

**IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„NICOLAE TESTEMIȚANU”**

Cu titlu de manuscris

C.Z.U: [611.013.8+611.018.1]: 602.9(043.2)

GLOBA LILIAN

**COMPLEXUL OMBILICO-PLACENTAR – SURSĂ DE GREFARE
TISULARĂ ȘI CELULARĂ**

311.01 – ANATOMIA OMULUI

Rezumatul tezei de doctor în științe medicale

CHIȘINĂU, 2023

Teza a fost elaborată la Catedra de anatomie și anatomie clinică a IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” în colaborare cu Centrul de Cercetări în Angiogenează și Catedra de anatomie, UMF „Victor Babeș”, Timișoara, Romania.

Conducător științific: **NACU Viorel**, dr. hab. șt. med., profesor universitar

Conducător științific prin cotutelă: **MOTOC Andrei**, dr. în medicină, profesor universitar, UMF “Victor Babeș”, Timișoara, România

Referenți oficiali: **SAVA Anca**, dr. în medicină, profesor universitar, UMF “Grigore T. Popa”, Iași, România

SUMAN Serghei, dr. hab. șt. med., conferențiar universitar, Vicedirector medical, IMSP Centrul Național de Asistență Medicală Urgentă Prespitalicească, Chișinău

Componenta consiliului științific specializat:

Președinte: **CATERENIUC Ilia**, dr. hab. șt. med., profesor universitar

Membrii: **ZORINA Zinovia**, dr. șt. med., asistent universitar

ȘAPTEFRAȚI Lilian, dr. hab. șt. med., profesor universitar

HOTINEANU Adrian, dr. hab. șt. med., profesor universitar

FULGA Veaceslav, dr. hab. șt. med., conferențiar universitar

CEAUȘU Raluca Amalia, dr. med., conferențiar universitar

Sușinerea va avea loc la ” 30 ” noiembrie ” 2023, ora 14⁰⁰, în ședința Consiliului științific specializat D 311.01-23-56 din cadrul IP USMF „Nicolae Testemițanu”, **biroul 205**, etajul 2 (bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, MD-2004).

Teza de doctor și rezumatul pot fi consultate la biblioteca IP USMF „Nicolae Testemițanu” și pe pagina web a ANACEC www.anacec.md.

Rezumatul a fost expedit la ” 24 ” octombrie ” 2023

Secretar științific al Consiliului științific specializat, dr. șt. med., conf. univ.

ZINOVIA Zorina

Conducător științific,
dr. hab. șt. med., prof. univ.

NACU Viorel

Conducător științific prin cotutelă,
dr. în medicină, prof. univ.

MOTOC Andrei

Autor

GLOBA Lilian

© Globa Lilian, 2023

CUPRINS

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII	4
CONȚINUTUL TEZEI	7
1. Date generale despre importanța componentelor complexului ombilico-placentar pentru medicina regenerativă	7
2. Materialul și metodele de cercetare	9
3. Aspecte structurale macro- și microscopice ale componentelor complexului ombilico-placentar	11
3.1. Descrierea arhitecturii vasculare a placentei umane	11
3.2. Evidențierea particularităților structurale microscopice a țesuturilor placentare	12
3.3. Particularități structurale microscopice ale vaselor ombilicale	13
3.4. Proprietățile biomecanice ale arterelor ombilicale decelularizate	15
3.5. Aspecte structurale specifice a substanței gelatinoase Wharton	18
4. Caracteristica imunohistochimică a celulelor din componența complexului ombilico-placentar.....	19
4.1. Expresia D2-40 în țesuturile complexului ombilico placentar	19
4.2. Expresia CD105 în cordonul ombilical și țesutul placentar	21
4.3. Expresia CD34 în cordonul ombilical și țesutul placentar	22
4.4. Expresia AC133 în cordonul ombilical și țesutul placentar	23
4.5. Expresia VEGFR-2 în cordonul ombilical și țesutul placentar.....	24
CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI	26
BIBLIOGRAFIA	27
LISTA PUBLICAȚIILOR AUTORULUI LA TEMA TEZEI	28
ADNOTARE (în română, rusă și engleză)	30
Foaia privind datele de tipar.....	33

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea și importanța temei. Medicina regenerativă este un domeniu în continuă evoluție, iar diverse instrumente și abordări științifice joacă un rol crucial în progresul său. Componentele complexului ombilico-placentar (cordonul ombilical, placenta, membrana amniotică) au devenit țesuturi de mare interes pentru medicina regenerativă. Majoritatea cercetărilor din domeniu s-au concentrat în principal pe investigarea caracteristicilor morfologice, biochimice și clinice ale elementelor COP, în scopul asigurării dezvoltării armonioase a fătului și obținerii substanțelor biologic active ca remedii terapeutice. Cercetările actuale se concentrează pe studiul celulelor stem mezenchimale și a celulelor stem fetale, cu potențial terapeutic în diverse afecțiuni.

Cordonul ombilical reprezintă un element valoros al unității feto-placentare, asigurând debitul sângelui bidirecțional, în permanentă creștere, în consens cu cerințele de dezvoltare fetală [1; 2]. În structura cordonului ombilical intră și țesutul conjunctiv special – mucus de tip embrionar, ce constă dintr-o matrice gelatinoasă, specializată numită ”gelatina lui Wharton” sau substanța gelatinoasă. Aici sunt localizate celule mezenchimale fusiforme, asemenea fibroblastelor din perioada prenatală. Un spectru larg de fibre de collagen împreună cu o cantitate impunătoare de glucozaminoglicani, proteoglicani și glicoproteine formează matricea extracelulară [2].

Placenta reprezintă organul extraembionar, prin care se stabilește nemijlocit legătura dintre embrion și organismul matern. Este un organ provizoriu principal cu multiple funcții: trofică, de respirație, depozitare, excretoare (pentru făt), de apărare și endocrină. Placa corială reprezintă suprafața fetală a placentei, care la rândul său este acoperită de amnion. Amnionul este compus din epiteliu stratificat și/sau simplu și mezenchimul amniotic, un țesut conjunctiv avascular [3]. Placenta participă la formarea unui șir de substanțe biologic active, precum: hormonul corionic somatotrop, progesteronul placentar, IGF I și IGF II, factori de creștere endoteliali, relaxin, leptin, alți factori de creștere (ai fibroblaștilor, trombocitelor), interleuchine (IL 1, IL 3).

Studiul asupra celulelor stem (cu potențial pluripotent), în ultimele decenii, a câștigat un interes considerabil, cu accent pe posibilitatea transplantului acestor celule, atât într-un mod alogen, cât și autogen, în zonele cu deficit tisular. Inițial, celulele mezenchimale stem au fost descoperite în măduva osoasă. Ulterior, au fost descoperite modalități de identificare și izolare a acestor celule din surse precum placenta, lichidul amniotic și sângele ombilical. Celulele MSC provenite din structurile extrafetale manifestă un potențial de multiplicare înalt și o diversitate extinsă, în ceea ce privește capacitatea de a se specializa în diferite tipuri celulare [4]. Studiile recente au arătat acțiunea imunosupresoare a celulelor stem mezenchimale în multiple afecțiuni inflamatorii sau de altă natură.

Ingenieria tisulară, care implică utilizarea polimerilor, biotehnologiei și terapiei celulare, are potențialul de a aduce progrese semnificative în acest domeniu. Scopul este de a crea structuri tridimensionale care să favorizeze capacitatea organismului de a se regenera, combinând materialele biomateriale cu compuși celulari.

Scopul lucrării: Determinarea particularităților structurale ale componentelor complexului ombilico-placentar în vederea identificării posibilității de obținere a grefelor tisulare și celulare pentru ulterioara lor transplantare.

Obiectivele cercetării:

1. Identificarea particularităților arhitecturale ale sistemului vascular placentar.
2. Studiarea particularităților morfologice și morfometrice ale vaselor ombilicale.
3. Identificarea metodelor optimale de decelularizare pentru arterele ombilicale cu studiarea ulterioară a proprietăților lor biomecanice, pentru viitoarea lor transplantare.
4. Determinarea și descrierea modelelor de distribuție ale fibrelor de colagen tip I și tip III în cadrul cordonului ombilical și a placentei.
5. Studiul imunohistochimic al componentei celulare stromale (CD34, CD105, AC133, D2-40, VEGFR-2) în structurile complexului ombilico-placentar.

Ipoteza de cercetare. Având în vedere complexitatea structurală a complexului ombilico-placentar și diversitatea sa, precum și multiplele obiective stabilite, s-au formulat următoarele ipoteze de cercetare: exista relație între timpul de expunere la soluțiile de decelularizare și modificările destructive ale matricei extracelulare fibroase; există relație între imunofenotipul celulelor stromale și localizarea lor în cadrul componentelor complexului ombilico-placentar; substanța gelatinoasă Wharton poate reprezenta o sursă mai bună de celule stem comparativ cu sângele prelevat din vasele ombilicale; placenta umană poate fi o gazdă potrivită pentru crearea unui organ auxiliar; structura anatomică a arterelor și venelor permit formarea anastomozelor între placenta și organul recipient, astfel că placenta poate fi utilizată ca o grefă vasculară; epiteliului amniotic prezintă un imunofenotip heterogen, ceea ce permite utilizarea acestuia în diverse afecțiuni:

Metodologia generală a cercetării. Cercetarea dată a fost efectuată conform metodelor și principiilor existente în domeniile anatomiei și ingineriei țesuturilor, urmând protocoalele și recomandările curente ale cercetării științifice avansate. Studiul a avut un design primar, descriptiv și observațional de tip transversal, incluzând o parte experimentală. Scopul și obiectivele au fost orientate spre cercetarea aspectelor morfologice ale componentelor fibrilare și celulare din cordonul ombilical, placenta și membrana amniotică. Materialul biologic a inclus cordoane ombilicale și placentă umane, colectate în perioada 2012-2013. Metodele de cercetare utilizate au inclus metode de decelularizare (trei metode: chimică, enzimatică și combinată), teste de rezistență la gonflare și întindere, metoda de coroziune cu obținerea preparatelor plastinate, metode histologice (HE, tricrom Masson) și histochimice (impregnarea argentică Gordon-Sweet), metode imunohistochimice (CD105, D2-40, CD34, AC133, VEGFR2), lumină polarizată și metode de cuantificare a structurilor histologice (H scorul, hot-spot). Pentru toate metodele histologice și imunohistochimice descrise, procesarea primară a materialului a urmat protocolul standard. Datele obținute au fost prelucrate statistic cu ajutorul softurilor EPI INFO 7.2.5.0, SPSS22.0 și Microsoft Excel 2007, iar rezultatele au fost prezentate în tabele și grafice. Au fost calculate media aritmetică ($\bar{X}$), deviația standard (DS), veridicitatea diferenței mediilor aritmetice (p) a fost comparată cu criteriul *t-Student*, testul *Anova*, testul *Kruskal-Wallis*, valorile $p < 0,05$, fiind considerate semnificative. Examinarea microscopică a fost realizată cu ajutorul microscopelor Nikon Eclipse E600 și Axio Imager A2. Toată metodologia utilizată a facilitat acumularea de date care au permis formularea concluziilor și elaborarea recomandărilor practice.

Noutatea și originalitatea științifică a rezultatelor obținute. În lucrarea dată au fost raportate în premieră câteva aspecte ce țin de: reducerea semnificativă a duratei expunerii

fragmentelor vasculare la acțiunea toxică a solventilor utilizați în procedeele de decelularizare; a fost demonstrată eficiența metodei de decelularizare cu detergenți comparativ cu alte metode (enzimatică, combinată); a fost dovedit că testul de resitență are valoare practică mare pentru identificare modificărilor schelelor colagenice post decelularizare; a fost adaptat procedeul tehnicii de coroziie pentru placenta; au fost descrise modelele de distribuție a fibrelor de colagen de tip I și III, identificându-se aranjarea spațială a acestora în cordonul ombilical și țesuturile placentei; a fost demonstrată lipsa anastomozelor între sistemul arterial și cel venos în placenta; a fost prezentată heterogenitatea populației de celule stem din cadrul substanței gelatinoase Wharton, cu evidențierea zonelor cu densitate crescută a lor; a fost raportat despre prezența celulelor stem hematogene în țesuturile fixe ale cordonului; a fost evidențiat imunofenotipul heterogen al membranei amniotice, atât la nivelul cordonului ombilical, cât și la nivelul placentei, ceea ce demonstrează diversitatea de folosire a acestora în regenerările tisulare.

Semnificația teoretică și valoarea aplicativă a lucrării. Studiul evidențiază potențialul terapeutic al arterelor ombilicale, precum și importanța substanței gelatinoase Wharton ca sursă valoroasă de celule stem pluripotente. Identificarea microveziculelor extracelulare și caracteristicile distinctive ale vaselor ombilicale sugerează că cordonul ombilical reprezintă un depozit de substanțe biologice active. Diversitatea profilului molecular al celulelor stromale din complexul ombilico-placental deschide posibilități pentru multiple aplicații terapeutice.

Aprobarea rezultatelor științifice. Rezultatele științifice obținute în cadrul studiului au fost prezentate și discutate în diverse forumuri științifice de nivel național și internațional: Conferința anuală științifică a universității de stat de medicină și farmacie “Nicolae Testemițanu”, Chișinău, 2022, 2019, 2018, 2017, 2014; International Scientific Conference ACTUAL ISSUES OF MORPHOLOGY dedicated to the 75th anniversary of the founding of “Nicolae Testemitsanu” State University of Medicine and Pharmacy, Chișinău, 2020; Congresul consacrat aniversarii a 70-a de la fondarea USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, 2015; International Scientific Conference ACTUAL ISSUES OF MORPHOLOGY dedicated to 70th year anniversary of “Nicolae Testemitsanu” State University of Medicine and Pharmacy, Chișinău, 2015; The XIV National Congress of the Romanian Society of Anatomy with international participation, Timisoara, Romania, 2013.

Teza a fost discutată, aprobată și recomandată spre susținere la ședința Catedrei de anatomie și anatomie clinică a USMF “Nicolae Testemițanu” (proces verbal nr.10 din 04.07.2023) și Seminarul Științific de profil 311. Anatomie și morfologie; 351. Medicină interdisciplinară (process verbal /nr. 2din 25.08.2023).

Publicațiile la tema tezei. Pe marginea temei au fost publicate 9 lucrări științifice, dintre care 5 articole în reviste științifice (3 articole în reviste din bazele de date Web of Science și SCOPUS, 2 articole în reviste din Registrul Național al revistelor de profil); 2 articole în culegeri științifice și 2 teze în lucrările conferințelor științifice internaționale și naționale. Au fost obținute 4 certificate de inovator și 6 acte de implementare practică a rezultatelor științifice.

Implementarea rezultatelor științifice. Rezultatul e studiului dat au fost implementate în activitatea didactică și științifică a Catedrei de histologie, citologie și embriologie, Laboratorului de inginerie tisulară și culturi celulare și Laboratorului de morfologie al USMF “Nicolae Testemițanu”.

Sumarul compartimentelor tezei. Teza realizată în limba română este expusă pe 157

pagini, dintre care partea principală reprezintă 118 pagini. Teza constă din adnotări, introducere și 5 capitole, dintre care capitolul 1 prezintă reviu literaturii, capitolul 2 – material și metodele de cercetare, capitolele 3 și 4 – includ datele obținute, capitolul 5 – sinteza rezultatelor obținute; concluzii; recomandări practice; bibliografie. Bibliografia include 204 de titluri de referințe. Lucrarea conține 56 figuri, 19 tabele și 2 anexe.

Cuvinte-cheie: placentă, cordon ombilical, membrana amniotică, artere ombilicale decelularizate, celule stem mezenchimale, inginerie tisulară, grefă tisulară, grefă celulară.

CONȚINUTUL TEZEI

1. Date generale despre importanța componentelor complexului ombilico-placentar pentru medicina regenerativă

Acest compartiment al cercetării este dedicat analizei surselor științifice naționale și internaționale relevante, care raportează date despre Complexul Ombilico - Placentar (COP) sau complexul placentar, care este reprezentat de numeroase structuri provizorii, ce apar în procesul de embriogeneză din țesuturile extraembrionare. Analiză literaturii de specialitate a permis definirea conceptului de complex ombilico-placentar și a componentelor sale într-un mod exhaustiv. COP include structuri, care nu au fost suficient de atractive pentru cercetătorii anilor 70 și 80. Cel mai probabil din cauza faptului că, aceste țesuturi erau eliminate imediat după naștere. În anii '90 s-a reînviat interesul pentru studierea componentelor complexului ombilico-placentar, în principal, al cordonului ombilical. Acest interes marcat a fost legat, în mare parte, de compoziția și modificările matricei extracelulare a substanței gelatinoase Wharton, în contextul pre-eclampsiei, dar și a componentei celulare stromale, care prezintă caracteristici comune cu celulele mezenchimale din perioada intrauterină de dezvoltare [5, 6]. În prezent, în literatura de specialitate, se regăsesc numeroase cercetări, care studiază intens componentele COP, în special, legat de utilizarea lor în domeniul ingineriei tisulare și al medicinei regenerative [7, 8].

Astfel, au fost evidențiate și accentuate noțiunile și principiile de bază ale ingineriei țesuturilor și a grefelor celulare și tisulare. Prin examinarea atentă a literaturii de specialitate, s-au identificat și sintetizat informații despre rolul și importanța componentelor complexului ombilico-placentar în medicina regenerativă. S-au explorat aspecte legate de caracteristicile celulelor stem mezenchimale, precum și capacitatea lor de diferențiere în diverse tipuri de celule și potențialul lor terapeutic în tratamentul diferitelor afecțiuni.

Medicina regenerativă este un domeniu al medicinei moderne, care se ocupă cu repararea, înlocuirea și/sau regenerarea celulelor, țesuturilor și organelor deteriorate. Țesuturile complexului ombilico-placentar reprezintă o preocupare importantă a medicinei regenerative, deoarece reprezintă surse bogate de: celule stem, factori de creștere, fibre de collagen, care pot fi utilizate ca grefe celulare, tisulare pentru transplantări alogene și autogene în zonele cu deficit de regenerare (posttraumatice, ischemice, defecte tisulare etc) [9].

Ingineria tisulară reprezintă o ramură a ingineriei biomedicale ce utilizează o combinație de elemente, precum celule, tehnici de inginerie, materiale și factori biochimici și/sau fizico-chimici adecvați pentru a restabili, menține, îmbunătăți sau înlocui diverse tipuri de țesuturi biologice. Această disciplină implică frecvent plasarea celulelor pe structuri de suport (scaffolds) pentru a dezvolta noi țesuturi viabile în scopuri medicale, însă nu se rezumă doar la situații ce implică celule și structuri de suport. Deși, inițial a fost considerată o subramură a

biomaterialelor, în urma dezvoltării sale, în ceea ce privește domeniul de aplicare și importanță, ingineria tisulară poate fi văzută acum ca un domeniu distinct. Printre provocările majore cu care se confruntă acum ingineria tisulară este nevoia de funcționalitate mai complexă, stabilitate biomecanică și vascularizare în țesuturile cultivate în laborator destinate transplantului [10].

Placenta și cordonul ombilical uman reprezintă un rezervor de celule stem cu un potențial de diferențiere foarte înalt în comparație cu alte surse [11]. Aceste celule prezintă o imunogenitate scăzută, care le protejează împotriva sistemului imunitar al gazdei [12].

Celulele reprezintă elementul esențial pentru succesul abordărilor de ingineria tisulară. În acest domeniu, celulele sunt utilizate ca strategii pentru geneza țesuturilor noi sau înlocuirea celor afectate. Celulele pot fi utilizate fie singure, fie împreună cu matricea de suport. Asigurarea unui mediu favorabil care promovează creșterea celulelor, diferențierea și integrarea acestora cu țesutul existent reprezintă un aspect deosebit de important în construcția structurilor celulare fundamentale. Manipularea acestor procese celulare oferă căi alternative pentru dezvoltarea de țesuturi noi, inclusiv metode, precum, reprogramarea celulelor somatice sau promovarea vascularizării [13].

Conform clasificări genetice, celulele destinate grefării se pot împărți în:

Celule autologe: Donatorul și primitorul celulelor sunt aceeași persoană. Celulele sunt colectate, cultivate sau stocate, iar apoi reintroduse în corpul gazdă. Datorită reintroducerii celulelor proprii ale gazdei, nu apare un răspuns antigenic. Utilizarea celulelor autologe poate fi descurajată de dependența acestora de sănătatea celei gazdă și de posibila morbiditate asociată cu procesul de donare [14].

Celule alogene: Celulele sunt prelevate din corpul unui donator, care este de aceeași specie, ca și primitorul. Totuși, există restricții etice în ceea ce privește utilizarea celulelor umane în studii *in vitro* [15].

Celule xenogene sunt prelevate și izolate din specii alternative în comparație cu primitorul. Un exemplu important al utilizării țesuturilor xenogene este reprezentat de construcția implanturilor cardiovasculare utilizând celule animale [16].

Celule singeneice sau izogene sunt celule ce au același cod genetic. Aceasta conferă un beneficiu imunologic similar liniilor celulare autologe. Termenul de "singenic" poate fi aplicat celulelor autologe, dar clasificarea se extinde și la celulele derivate non-autologe, cum ar fi cele provenite de la un geamăn identic, modele de cercetare cu genotip identic sau celule stem induse (iSC) care sunt legate de donator din punct de vedere genetic [17].

Celulele stem mesenchimale (MSC) reprezintă o categorie importantă de celule progenitoare multipotente, capabile de auto-reînnoire și diferențiere într-o varietate de linii celulare. De-a lungul timpului, s-au căutat surse alternative de MSC, cum ar fi lichidul amniotic, placenta, sângele ombilical, venele ombilicale, țesutul conjunctiv al cordonului ombilical și mezenchima pulpară a dinților deciduali. Studiile au arătat că MSC sunt afiliate vaselor, fiind localizate în apropierea acestora și având un rol important în repararea țesuturilor și menținerea homeostaziei tisulare [18, 19, 20].

Studiile asupra componentelor complexului ombilico-placentar au deschis noi perspective pentru dezvoltarea terapiei regenerative. Țesuturile fetale sunt o sursă bogată de celule stem, factori de creștere și fibre de colagen, care pot fi utilizate în transplanturi alogene și autogene în zonele cu deficiență de regenerare. Aceasta deschide perspective promițătoare în

abordarea unor afecțiuni și leziuni care anterior erau dificil de tratat. Prin utilizarea adecvată a celulelor, biomaterialelor și factorilor biochimici, ingineria tisulară poate dezvolta țesuturi viabile fie în laborator, fie în corpul uman. Abordarea dată are capacitatea de a trata și repara țesuturile afectate în diverse boli și traumatisme [9]. În perspectivă, se anticipează că, ingineria tisulară va continua să progreseze și să aducă îmbunătățiri semnificative în ceea ce privește starea de sănătate umană, deschizând, astfel, drumul către terapii inovatoare și personalizate.

2. Materialul și metodele de cercetare

Capitolul respectiv conține date despre metodologia utilizată în studiu, care a fost în conformitate cu cercetarea din domeniile anatomic și ingineriei tisulare și cu recomandările actuale ale cercetării științifice moderne. Au fost detaliate tehnicile utilizate, inclusiv tehnicile de decelularizare, de testare a rezistenței fragmentelor vasculare decelularizate, de coroziune, precum și tehnicile histologice și imunohistochimice. Au fost descrise metodele de scorificare a intensității de expresie, cu evaluarea nivelului și distribuției imunomarcajelor specifice în țesuturile cordonului ombilical și placentare. Metodele de prelucrare statistică au permis evaluarea și compararea datelor cantitative și calitative, contribuind la sistematizarea rezultatelor, formularea concluziilor și elaborarea recomandărilor practice.

Studiul a fost primar, descriptiv și observațional de tip transversal. Cercetarea a fost realizată pe material biologic prelevat în urma nașterilor vaginale normale, din secția de obstetrică din cadrul IMSP Institutul Mamei și Copilului din Republica Moldova, în perioada 2012-2013. În cercetare au fost incluse 56 cordonuri ombilicale și 26 placentă (Tabelul 1). Materialul biologic a fost repartizat în funcție de specificul fiecărei metode.

Tabelul 1. Caracterizarea materialului biologic inclus în studiu

Vârsta mamei (ani) Media (X) ± DS	Termen de gestație (săptămâni) Media (X) ± DS	Nr. de cordonuri ombilicale	Nr. de placentă
27,82 ± 4,64 (20-40)	38,29 ± 1,79 (36-41)	56	26

Partea experimentală a cercetării a inclus studiul aspectelor legate de procedura de decelularizare a arterelor ombilicale și de testare a vaselor decelularizate, pentru a evalua posibilitatea utilizării acestora ca grefe tisulare. Anterior procedurii de decelularizare, cordonurile ombilicale au fost disecate, iar vasele ombilicale intacte extrase și separate. Substanța gelatinoasă Wharton din jurul arterelor a fost înlăturată pe o lungime de 20-30 cm. Decelularizarea arterelor a fost obținută prin utilizarea a 3 metode: chimică (detergent), enzimatică și combinată (detergent+enzimă). Vasele au fost conectate la un sistem de perfuzie, soluțiile fiind perfuzate continuu prin lumenul vasului cu imersia ulterioară a acestora în soluțiile din exteriorul vasului. Dublă acțiune a soluțiilor de decelularizare a permis scurtarea timpului de decelularizare de la 24 ore la 3,5 ore. Fiecare arteră ombilicală decelularizată, cât și arterele nedecelularizate au fost secționare în segmente de 5 cm lungime. Fragmentele arterelor ombilicale decelularizate au fost supuse testelor de rezistență la întindere și presiune. În mod deosebit, testul de rezistență la presiune pare să fie crucial în evaluarea gradului de afectare a matricei de collagen după decelularizare.

Modelele particulare de distribuție spațială al vaselor din interiorul placentei, precum și arhitectură placentă au fost evidențiate prin metoda de coroziune. Această metodă implică utilizarea de mase plastice autopolimerizante de tipul "РЕДОHT-03" și "ППОТАКРИЛ-М",

care sunt injectate în vasele sangvine. Setul de mase autopolimerizante de injecție conține pulbere, monomer și colorant. După injectarea vaselor placentare, placenta a fost aranjată într-un vas larg, unde s-a turnat sol. NaOH concentrat (35%), volumul căreia a depășit de 2-3 ori volumul piesei. Menționăm că, coroziya a durat 10-14 zile, iar periodic la 2-3 zile complexul injectat era spălat sub apă curgătoare fără a fi scos din vas. La finalizarea procesului coroziv, complexul spălat sub apă curgătoare a fost montat pentru examinare la lupa binoculară. Din totalul de 26 placentele selectate pentru cercetarea dată, 13 placentele au fost supuse metodologiei de corozione, iar restul de placentele au fost utilizate pentru metodele histologice și imunohistochimice. Urmare unor probleme tehnice apărute în timpul metodologiei de corozione (Tabelul 2), au fost supuse cu succes coroziei 9 placentele, obținând specimene corozive de înaltă calitate.

Tabelul 2. Repartizarea placentelor în raport cu problemele tehnice apărute în timpul procedurii de corozione

	Cantitatea	Procente
Placentele acceptate pentru corozione	13	100%
Placentele pierdute ca rezultat al unor deteriorări mecanice în timpul colectării, transportului sau disecției cordonului ombilical	1	7,7%
Placentele pierdute în timpul injecției (defecte ascunse)	1	7,7%
Placentele pierdute în timpul efectuării preparatelor corozive	2	15,4%
Placentele injectate cu succes	9	69,2%

Toate secțiunile histologice, inițial, au fost colorate cu hematoxină-eozină, metoda standard. Această metodă a permis examinarea detaliilor morfologice specifice fiecărei componente structurale a complexului cordon-placentă. Metoda tricromă Masson și impregnarea argentică după metoda Gordon-Sweet au fost efectuate pentru analiza modelelor de distribuție a fibrelor de colagen de tip I și III. Aceste metode au permis diferențierea clară a componentei fibrilare în funcție de zonele complexului ombilico-placentar.

Tabelul 3. Metodele imunohistochimice utilizate în studiu

Anticorp	Clona	Diluție	Sistem de detecție	Demascare Antigen	Incubare anticorp
CD105	Monoclonal mouse anti-human, clona SN6h	1:25	Bond Polymer Refine Detection System	20 minute, Bond Epitope Retrieval Solution 2	20 minute
D2-40	Monoclonal mouse anti-human, clona D2-40	1:100	Bond Polymer Refine Detection System	20 minute, Bond Epitope Retrieval Solution 2	20 minute
CD34	QEnd/10	prediluat	Bond Polymer Refine Detection System	20 minute, Bond Epitope Retrieval Solution 2	20 minute
AC133	Mouse, monoclonal, clona T595	prediluat	Bond Polymer Refine Detection System	20 minute, Bond Epitope Retrieval Solution 2	15 minute
VEGF-R2	Rabbit polyclonal	1:200	Bond Polymer Refine Detection System	20 minute, pH6, PT-Link	20 minute

Pentru a determina prezența celulelor stem, în cadrul studiului, s-au utilizat metode imunohistochimice (folosind markeri precum CD105, CD34, AC133, D2-40, VEGFR-2). Acest panel divers de markeri a permis identificarea unei populații heterogene de celule stem în cordonul ombilical și țesuturile placentare. Numărul total de preparate histologice confecționate și studiate a fost 402.

3. Aspecte structurale macro- și microscopice ale componentelor complexului ombilico-placentar

3.1. Descrierea arhitecturii vasculare a placentei umane

Studiul macromicroscopic a fost efectuat pe placentate la termen (37-41 săptămâni de gestație), provenite după sarcini normale și finalizate cu nașterea unor nou-născuți sănătoși. Cea mai frecventă formă de placenta observată în studiul dat a fost forma ovală – 39 (69,64%) placentate. Aceasta a fost urmată de placentate de forma rotundă – 14 (25%) cazuri. De asemenea, menționăm că în 3 cazuri (5,36%) placenta a avut formă triunghiulară. Cel mai frecvent pattern de inserție al cordonului de placenta, observat în studiul dat, a fost inserția excentrică – 43 (76,79%) cazuri, urmat de inserția periferică – 9 (16,07%) cazuri și inserția marginală – 4 (7,14%) cazuri.

Studierea preparatelor macromicroanatomice, obținute prin metoda de corozie, a evidențiat că fiecare arteră ombilicală, la intrarea sa în placenta, forma de la 2 până la 3 ramuri primare. Acestea au fost caracterizate printr-un model de ramificare bine definit și un traiect liniar. Fiecare ramură primară s-a ramificat, ulterior, în ramuri secundare, numărul acestora variind de la 4 până la 6 ramuri. Ambele tipuri de ramuri erau vizibile pe suprafața fetală a placentei.

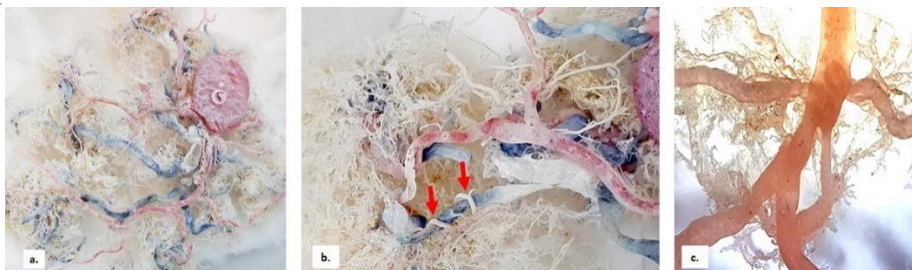


Fig. 1. Sistemul arterial al placentei. a) Modelul de ramificare a arterelor ombilicale: ramificația primară și secundară; b) Traiect spiralat al ramurilor mici ale arterelor placentare; c) Modelul dihotomic de distribuție a arterelor placentare.

Preparat coroziv, ×20

Ramurile secundare au prezentat un traiect radial spre interiorul placentei. Ramurile de ordinul trei, parțial vizibile pe suprafața placentei, imediat după descinderea lor din ramurile de ordinul II, se adânceau sub placa corială. Vasele cotiledonului au prezentat un model de ramificare dispers. Ramurile intraplacentare din vilozitățile terminale au fost identificate ca structuri care au un caracter terminal evidențiat prin aspect de "fund de sac". Totuși, de-a lungul vaselor terminale au fost observate structuri asemănătoare mugurilor, ceea ce conferea vaselor un aspect de "înmugurire". Cel mai frecvent pattern de distribuție ai afluenților venei ombilicale a fost localizarea ramurilor venoase între cotiledoanele, mai rar, traiectul acestora

fiind prin cotiledon. Frecvent, vena ombilicală a fost formată prin confluența a 2-5 ramuri venoase majore.

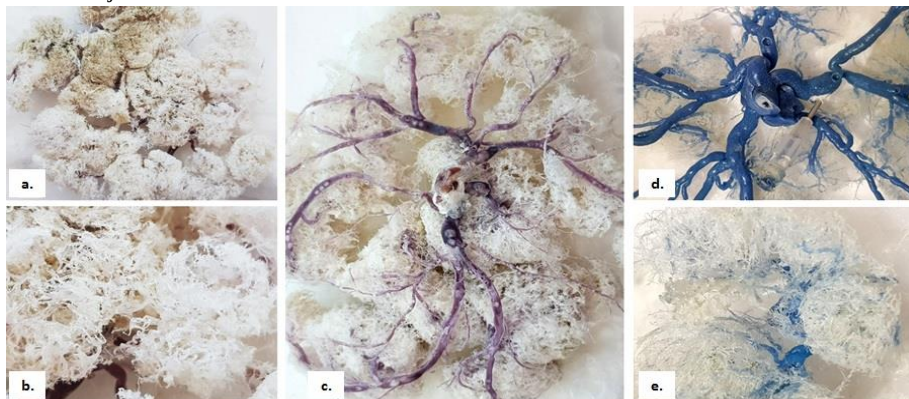


Fig. 2. a-b) Aspecte ale arhitecturii vasculare la nivelul cotiledonului; c-e) Aspecte particulare ale ale sistemului venos placentar. Preparat coroziv, $\times 20$, $\times 50$

Menționăm că, între arterele ombilicale au fost prezente anastomoze. Acestea, frecvent, erau localizate în segmentul dintre punctul de inserție a cordonului (la 3-4 mm după inserție) și ramificarea arterelor. În schimb, nu au fost identificate anastomoze directe între arterele aceluiași cotilidon sau cotiledoanele vecine, precum și între sistemul arterial și cel venos al placentei.

3.2. Evidențierea particularităților structurale microscopice a țesuturilor placentare

În ansamblu, studiul aduce în prim plan detaliile structurii și compoziției placentare la termen, evidențiind variațiile între diferitele tipuri de vilozități și zone ale plăcii coriale, precum și caracteristicile celulelor deciduale. Au fost identificate caracteristicile tipice ale placentei mature, cum ar fi prezența sincitiotrofoblastului, citotrofoblastului, capilarelor fetale și celulelor stromale. Au fost descrise trei tipuri de vilozități: stem, intermediare și terminale, cu variabilitate în ceea ce privește aranjarea fibrelor și cantitatea matricei extracelulare. Astfel, vilozitățile coriale stem aveau matricea extracelulară bogată în fibre reticulare și de collagen. Fibrele de collagen localizate în profunzimea vilozităților erau groase, compacte și dispuse circular în jurul vaselor sangvine. În timp ce fibrele de collagen de la suprafața vilozității erau subțiri și erau aranjate longitudinal, paralel cu axul vilozității. Fibre reticulare groase, bine conturate au fost observate imediat sub membrana bazală a trofoblastului, dar și în peretele vaselor sangvine, în apropierea intimei. Pe măsură ce se avansează către vilozitățile intermediare și terminale, cantitatea componentei fibrilare conjunctive se reduce, fiind reprezentate de fibrile subțiri, cu un grad crescut de dezorganizare localizate predominante central. În schimb, fibrele reticulare organizate într-un strat compact erau localizate în jurul capilarelor.

La nivelul plăcii coriale, fibrele de collagen sunt predominante, iar fibrele reticulare sunt prezente în mai multe locuri, inclusiv sub epiteliul amniotic, sub trofoblast și în peretele vaselor coriale mari. Două modele de fibrinoid sunt identificate, unul fibros cu fibre reticulare groase și ramificații scurte și unul matriceal cu fibre fine și o plasă fibrilară fină înglobată într-o matrice amorfă. Celulele deciduale au fost caracterizate ca având nucleu mare, rotund și citoplasmă

abundentă. Aceste celule formează grupuri înconjurate de o stromă conjunctivă, fibrele de collagen tip I, având un traiect ușor ondulat, iar alocuri fiind subțiri și fragmentate. Zonele centrale ale stromei deciduale au fibre reticulare mai groase și organizate, în timp ce zonele periferice conțin fibre groase și subțiri care se intersectează.

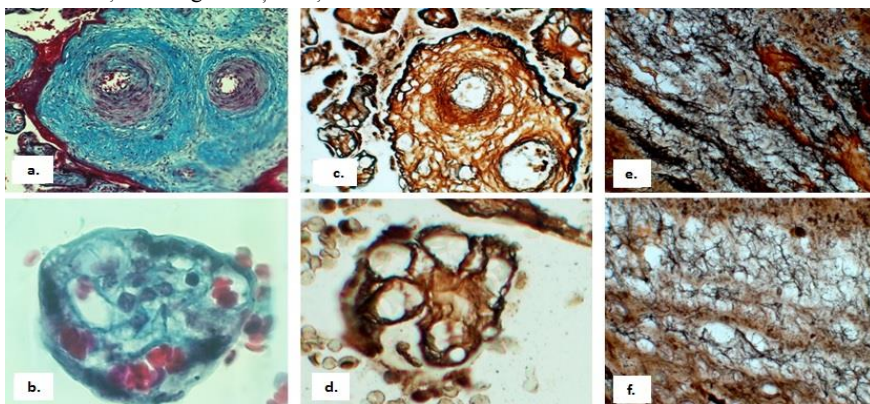


Fig. 3. a-d)Aspecte de aranjament spațial al componenteii fibrilare din arborele vilos și e-f) fibrinoidul de la nivelul plăcii coriale. $\times 200$, $\times 630$; Colorația tricromă Masson (a-b), Impregnare argentică Gordon-Sweet (c-f)

3.3. Particularități structurale microscopice ale vaselor ombilicale

Au fost identificate două modele de aranjare a vaselor ombilicale în interiorul cordonului: modelul triunghiular – 43 (76,79%) cazuri și modelul liniar – 13 (23,21%) cazuri. Pentru ambele tipuri de vase a fost caracteristic absența adventiției. De asemenea, menționăm că, ambele tipuri de vase, pe întregul lor traseu, erau lipsite de membrana elastică externă, vasosorum, inervație și nu formau ramificații.

Tunica intimă a arterelor ombilicale este caracterizată de celule endoteliale cu nuclee proeminente, care devin aplatizate în zonele de ramificații. De asemenea, această tunică conține celule musculare netede mai mici și mai subțiri în comparație cu cele din tunica medie. Remarcăm că, printre celulele musculare netede ale intimei au fost observate și miofibroblaste. Interesant, a fost imposibilitatea identificării membranei elastice interne. Tunica medie a fost organizată în două straturi de celule musculare netede: un strat intern cu miocite dispuse longitudinal și un strat extern cu miocite dispuse circular sau în spirală. Densitatea celulelor musculare netede variază, fiind maximală în stratul extern. O particularitate a mediei a fost prezența unor spații intermusculare largite (veziculoase) umplute cu conținut mucopolizaharidic, ceea ce conferea mediei un aspect spumos. Remarcăm că, aceste structuri veziculoase, în zonele periferice ale mediei, se continuau cu spațiile din substanța gelatinoasă Wharton.

Intima și media venei ombilicale sunt mai subțiri și mai compacte. O caracteristică distinctivă a venelor este prezența membranei elastice interne, care este bine dezvoltată și continuă. Tunica medie a venei este organizată, de asemenea, în două straturi, doar că acestea nu sunt bine definite. În vene, densitatea structurilor veziculoase intermusculare este redusă. Aranjarea longitudinală a miocitelor este observată în porțiunile externe ale mediei și implică adesea grupuri mici de celule. Reieșind din observațiile obținute referitor la dimensiunea

vaselor, dar și grosimea pereților acestora, a fost efectuată analiza morfometrică pentru ambele tipuri de vase (Tabelul 4).

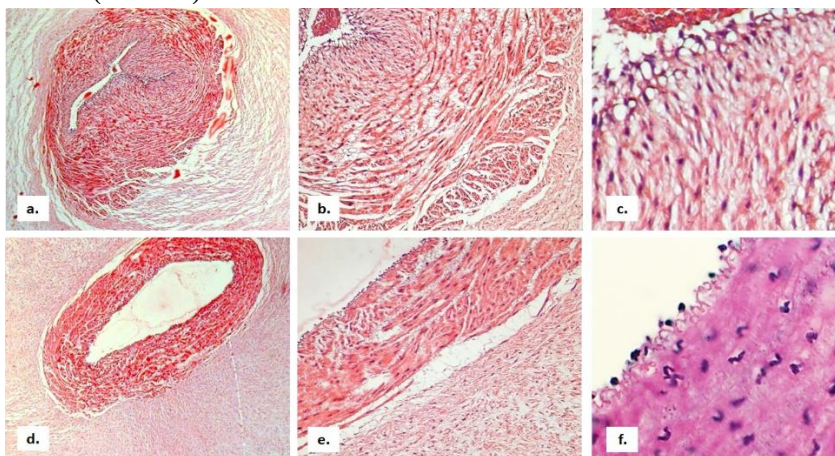


Fig. 4. Aspecte microscopice comparative ale arterei ombilicale (a,b,c) versus vena ombilicală (d,e,f), $\times 25$, $\times 100$, $\times 400$, Colorația Hematoxină-Eozină

Analizând datele obținute putem spune că, vena este mai lată decât artera cu 27,22%, respectiv grosimea peretelui arterei este mai mare cu 37,53%. Diferențele obținute la compararea datelor dintre artere și venă, atât pentru diametrul (testul Kruskal-Wallis, $t=37,58$, $p<0,001$), cât și pentru grosimea vasului (t-Student, $t=12,26$, $p<0,001$), au fost statistic semnificative.

Tabelul 4. Analiza morfometrică a vaselor cordonului ombilical

Vasul ombilical		Parametrii statistici				
		Media	DS	IIQ	Mediana	Mo
Artera ombilicală	Diametrul extern, mm	1,63	0,35	1,35 - 1,76	1,55	1,77
	Grosimea peretelui, mm	0,65	0,11	0,57 - 0,71	0,63	0,68
Vena ombilicală	Diametrul extern, mm	2,24	0,51	1,86 - 2,63	2,19	1,86
	Grosimea peretelui, mm	0,41	0,09	0,34 - 0,46	0,38	0,36

Notă: n – numărul de vase măsurate a fost 56 artere și respectiv 56 vene; măsurătorile inițial au fost obținute în mkm, după care au fost transformate în mm.

În ambele tipuri de vase, fibrele de collagen tip I sunt distribuite neuniform. În artere, acestea sunt concentrate în principal în tunica intimă, iar în vene, densitatea lor este mai redusă. În artere, fibrele de collagen tip I sunt prezente și în jurul miocitelor din tunica medie și în jurul spațiilor veziculoase cu conținut mucopolizaharidic. În vene, fibrele de collagen tip I sunt mai groase în intima și au un aspect de membrană la limita dintre intima și medie. Fibrele reticulare sunt predominant localizate în tunica medie a ambelor tipuri de vase, formând o carcasă de suport pentru miocite. Distribuția acestora poate fi liniară sau areolară. În zonele cu conținut mucopolizaharidic, fibrele reticulare pot fi fragmentate și pot forma un perete subțire pentru aceste structuri. Densitatea fibrelor reticulare este mult redusă sau chiar absentă în tunica intimă.

3.4. Proprietățile biomecanice ale arterelor ombilicale decelularizate

Utilizarea tehnicilor de inginerie tisulară reprezintă o soluție promițătoare pentru rezolvarea problemei deficitului de grefe vasculare. Până în prezent, încă nu s-a reușit crearea unui vas ideal, care să îmbine în totalitate proprietățile unui vas sangvin biologic, cum ar fi biocompatibilitatea, proprietățile mecanice, suprafața anti-trombogenică, porozitatea ridicată și biodegradabilitatea. Identificarea unei metode de decelularizare optimale a fost un obiectiv important pentru studiul nostru, care vine să integreze cunoștințele din domeniile biologiei, medicinei și ingineriei tisulare.

Pentru studierea proprietăților biomecanice ale arterelor ombilicale au fost întreprinși următorii pași: 1. arterele au fost extrase din componența cordonului ombilical; 2. acestea au fost spălate bine; 3. arterele au fost supuse procesului de decelularizare; 4. arterele decelularizate au fost fragmentate în segmente a câte 5 cm lungime; 5. segmentele arteriale decelularizate au fost supuse testelor biomecanice (testele de rezistență la întindere și presiune); 6. în final, segmentele de vase au fost caracterizate morfologic. Caracterizarea morfologică a inclus studierea aspectelor structurale ale arterelor decelularizate (*gradul de decelularizare, calitatea componentelor matricei extracelulare*), dar și a segmentelor de artere ombilicale supuse testului de rezistență la presiune.

Examenul morfologic al arterelor ombilicale decelularizate

Arterele decelularizate au prezentat un lumen larg *versus* arterele contractate din grupul martor, care aveau un lumen neregulat și ramificat. Microscopic, s-a observat că, decelularizarea a dus la reducerea spațiilor mucopolizaharidice interlaminare de la nivelul mediei. În funcție de metoda de decelularizare utilizată a variat gradul de succes al procesului. Prin utilizarea soluției de tripsină, decelularizarea a fost neomogenă, cu un grad de decelularizare mai pronunțat în porțiunile externe ale mediei și în intima. Metoda chimică cu SDS a dus la o decelularizare completă și omogenă, păstrând matricea extracelulară și fibrele de collagen bine conservate. Metoda combinată a produs o decelularizare parțial completă, cu prezența redusă a celulelor sau a resturilor celulare, iar matricea extracelulară a fost, în general, bine conservată. Fibrele de collagen au avut variate grosimi și distribuții în funcție de metoda de decelularizare, iar în anumite zone au prezentat fragmentări.

În scopul evaluării efectului decelularizării asupra grosimii peretelui arterial s-a realizat morfometria pentru toate segmentele arteriale supuse decelularizării prin cele trei metode utilizate. Datele obținute au fost expuse în Tabelul 5.

Tabelul 5. Analiza morfometrică a segmentelor de artere ombilicale supuse procedeelor de decelularizare

Piesele vasculare	n	Grosimea peretelui (mm)				
		Media	DS	IQ	Mediana	Mo
Segmente supuse decelularizării prin aplicarea sol. 1% SDS	20	0,46	0,06	0,40- 0,51	0,47	0,35
Segmente supuse decelularizării prin aplicarea sol. Tripsină	20	0,59	0,03	0,57 - 0,61	0,60	0,52
Segmente supuse decelularizării prin metoda combinată	20	0,42	0,08	0,34- 0,48	0,40	0,40

Notă: n – numărul de segmente măsurate; măsurătorile inițiale au fost obținute în mkm, după care au fost transformate în mm.

Pentru a estima impactul procedeele de decelularizare asupra morfologiei arterelor, s-au comparat valorile medii a diametrului extern și grosimii peretelui vasului. Diferențele obținute la compararea datelor între arterele nedecelularizată și decelularizate cu ajutorul celor 3 metode, atât pentru diametrul extern, cât și pentru grosimea vasului sunt reprezentate în Tabelul 6.

Tabelul 6. Diametrul și grosimea peretelui arterelor decelularizate prin cele trei metode de decelularizare raportate la lotul martor (artere nedecelularizate)

Diametrul extern, mm	Media	DS	H	p
Artere nedecelularizate	1,63	0,35		
Artere decelularizate cu sol. 1% SDS	2,10	0,16	25,7293	<0,001 [†]
Artere decelularizate cu sol. Tripsina	2,22	0,09	29,9585	<0,001 [†]
Artere decelularizate met. combinată (1% SDS+Tripsina)	2,09	0,14	26,5738	<0,001 [†]
Grosimea peretelui, mm	Media	DS	H	p
Artere nedecelularizate	0,65	0,11		
Artere decelularizate cu sol. 1% SDS	0,46	0,06	-67,3232	1,0000*
Artere decelularizate cu sol. Tripsina	0,59	0,03	-21,6892	1,0000*
Artere decelularizate met. combinat (1% SDS+Tripsina)	0,42	0,09	68,6421	<0,001 [‡]

*Notă: X – media, DS – deviația standard, * între grupele comparate nu au fost stabilite deosebiri veridice, p[†] - valoare obținută prin testul Kruskal-Wallis, p[‡] - valoare obținută prin testul Anova.*

Caracterizarea biomecanică a arterelor ombilicale decelularizate a fost realizată prin testul de rezistență la întindere și testul de rezistență la gonflare. Astfel, pentru arterele decelularizate prin metoda combinată, valorile forței de tracțiune au variat de la 1,75N la 1,85, iar diferența aritmetică între valoarea medie a lotului control a fost de 0,50N. Arterele ombilicale decelularizate prin metoda chimică (cu soluție 1% SDS) s-au rupt la valori situate între 1,7N și 2N. Cea mai însemnată diferență de 0,75N, raportată la valoarea medie a lotului martor, a fost pentru vasele decelularizate prin metoda enzimatică (cu tripsină).

Tabelul 7. Compararea valorilor medii a forței de întindere între grupele de studiu

Tipul de arteră ombilical	t	p
Martor (artere nedecelularizate)/Artere decelularizate cu sol. 1% SDS	22,1016	<0,001 [†]
Martor (artere nedecelularizate)/Artere decelularizate cu sol. Tripsina	30,8453	<0,001 [†]
Martor (artere nedecelularizate)/Artere decelularizate met. combinată	30,7601	<0,001 [†]
Artere decelularizate cu sol. 1% SDS/Artere decelularizate cu sol. Tripsina	30,2942	<0,001 [†]
Artere decelularizate cu sol. 1% SDS/Artere decelularizate met. combinată	0,0008	0,9778*
Artere decelularizate cu sol. Tripsina/Artere decelularizate met. combinată	413,5481	<0,001 [‡]

*Notă: * între grupele comparate nu au fost stabilite diferențe veridice, p[†] - valoare obținută prin testul Kruskal-Wallis, p[‡] - valoare obținută prin testul Anova.*

Rezultatele testului de rezistență la gonflare a evidențiat o rezistență mare a arterelor ombilicale la presiunea de 280 mm Hg pentru toate loturile incluse în studiu. Reieșind din considerentul că, atât în condiții fiziologice, cât și în patologii, presiunea în vasele de calibru

DI<0,6 nu atinge nivelul de 200 mmHg, putem afirma că, arterele ombilicale intacte și decelularizate, din punct de vedere mecanic, sunt capabile să fie utilizate în calitate de grefă pentru substituție vasculară.

Segmentele de artere decelularizate supuse testului de rezistență la presiune au fost examinate microscopic pentru identificarea posibilităților modificări ale componentei extracelulare colagenice. Peretele arterelor decelularizate prin metoda chimică nu a suferit schimbări esențiale, grosimea acestuia nu s-a redus esențial, iar carcasa de fibre de colagen a rămas integră și compactă.

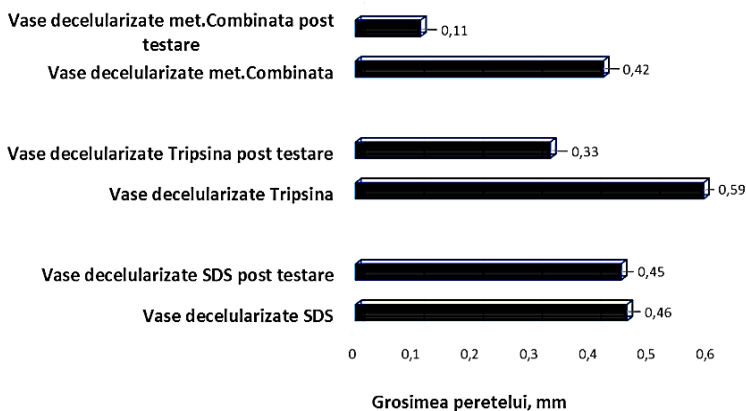


Fig. 5. Redimensionarea grosimii peretelui segmentelor arterelor decelularizate post-testul de rezistență la presiune comparat cu grosimea segmentelor decelularizate pre-testare

Modificările substanțiale au fost observate în pereții arterelor decelularizate prin metoda combinată. Chiar dacă inițial această metoda a dat un grad crescut de decelularizare comparativ cu metoda enzimatică, totuși componenta extracelulară a fost afectată, respectiv am observat o deformare a vaselor decelularizate post-testare la gonflare, precum și o reducere a grosimii peretelui.

Tabelul 8. Compararea valorilor medii a grosimii peretelui vaselor decelularizate până la testare și post-testare

Tipul de arteră ombilicală	F	p
Artere decelularizate met.chimică pre-testare /Artere decelularizate metoda chimică post-testare	0,1813	0,6727*
Artere decelularizate met.enzimatică pre-testare /Artere decelularizate metoda enzimatică post-testare	600,1690	<0,001
Artere decelularizate met.combinată pre-testare /Artere decelularizate metoda combinată post-testare	229,4319	<0,001

Notă: * între grupele comparate nu au fost stabilite diferențe veridice, p - valoare obținută prin testul Anova.

Astfel, arterele decelularizate prin metoda chimică (soluție 1% SDS) au demonstrat superioritate comparativ cu cele care au fost decelularizate prin metodele combinată și enzimatică.

3.5. Aspecte structurale specifice a substanței gelatinoase Wharton

Substanța gelatinoasă Wharton este caracterizată de un țesut heterogen, cu multiple subpopulații celulare și configurații ale matricei extracelulare. Prin utilizarea metodelor histologice și histochimice de colorare și clasificării regionale propuse de Davies et al. (2017) [21], s-au identificat patru regiuni topografice distincte: subamniotică, periferică, perivasculară și intervasculară. Menționăm că, zona periferică a substanței Wharton a fost împărțită în două subregiuni: regiunea superficială spongioasă și regiunea profundă compactă.

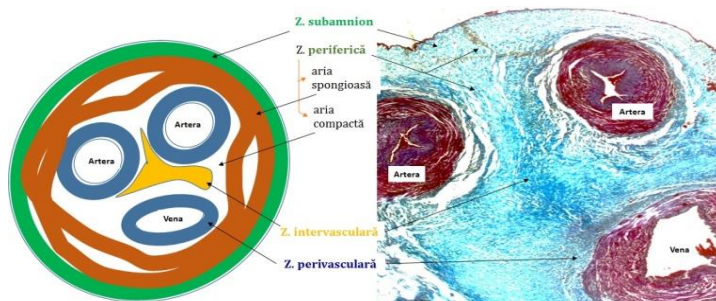


Fig. 6. Schema și reprezentarea histologică a zonelor substanței gelatinoase Wharton

În general, substanța Wharton a demonstrat o structură complexă și variabilă în funcție de regiuni. Unele componente, cum ar fi fibrele de collagen și fibrele reticulare, au fost bine reprezentate în întreaga substanță, în timp ce densitatea celulară și morfologia celulelor au variat. Rezultatele sugerează că substanța gelatinoasă Wharton este un țesut complex, cu caracteristici structurale diferite în funcție de regiuni.

Densitatea celulară a variat în funcție de regiune, fiind cea mai mare în zona perivasculară și intervasculară. Morfologia celulelor a variat în întreaga substanță Wharton. Predominant, celulele din zona periferică au fost stelate cu prelungiri lungi care permiteau interconexiuni cu celulele vecine. Celulele din zona perivasculară au fost, frecvent, fusiforme și au fost distribuite în mod uniform în jurul vaselor.

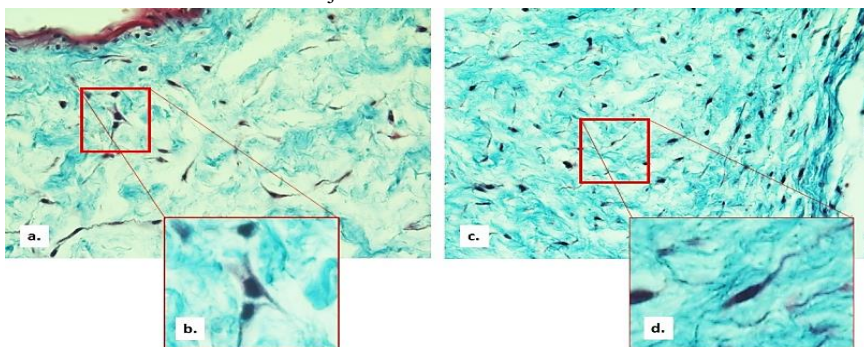


Fig. 7. Aspecte morfologice ale celulelor substanței Wharton din zonele periferică și perivasculară. a) zona periferică spongioasă cu numeroase celule apofizate, b) celule miofibroblast-like, c) zonele periferică compactă și perivasculară cu celule fusiforme, d) morfologia celulei fibrocit-like; a, c) $\times 100$; b, d) $\times 400$, Colorație tricromă Masson

Componenta fibrilară, în special fibrele de collagen tip I, a fost bine reprezentată în toate regiunile substanței Wharton. Totuși, perivascular, a fost observată o densitate crescută de fibre de collagen, care formau fascicule groase în jurul vaselor.

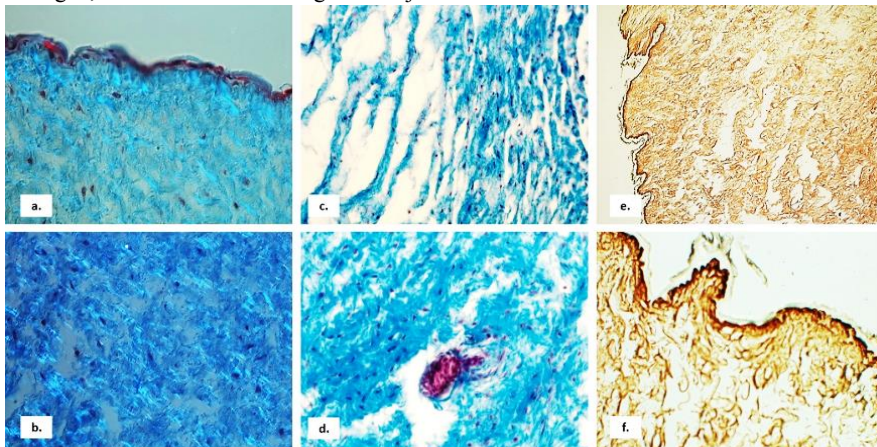


Fig. 8. Particularități structurale ale componentei fibrilare din substanța Wharton. a-b) fibre birefringente din ariile periferică și subamniotică, c) zona periferică spongioasă cu "despicături stromale", d) reminiscențe ale ductului alantoidic, e-f) distribuția fibrelor reticulare din ariile periferică și subamniotică, $\times 10$, $\times 20$; Colorația tricromă Masson. e-f) $\times 10$, Impregnație argentică Gordon-Sweet

Structurile observate în lumina polarizată au indicat că fibrele de collagen sunt mature. Fibrele reticulare au fost bine reprezentate, în special, subamniotic, imediat sub membrana bazală a epiteliului amniotic. Notăm că, în 6 (10,71%) cazuri, în zona intervasculară, au fost observate reminiscențe celulare ale ductului alantoidian.

4. Caracteristica imunohistochimică a celulelor din componența complexului ombilico-placentar

4.1. Expresia D2-40 în țesuturile complexului ombilico placentar

Studiul evidențiază prezența markerului D2-40 în diferite tipuri de celule și regiuni tisulare în cordonul ombilical și în placentă, furnizând o perspectivă detaliată asupra distribuției și exprimării acestui marker în contextul tisular specific.

În cordonul ombilical, markerul D2-40 a fost observat în mai multe porțiuni, cu o expresie predominant citoplasmatică, difuză și granulară. Markerul a fost detectat, în special, în celulele epiteliului amniotic ombilical, cu o distribuție în principal la polul bazal al celulei. În zonele stratificate ale epiteliului, expresia a fost identificată doar în celulele bazale, creând o linie distinctă de demarcație.

În substanța gelatinoasă Wharton din cordonul ombilical, celulele D2-40+ au fost prezente în toate zonele, dar cu o distribuție neuniformă. Aceste celule au fost caracterizate de morfologie variabilă, inclusiv celule stelate cu prelungiri lungi și groase. În zonele subamniotică și periferică, expresia D2-40 a avut un pattern mixt membranal și citoplasmatic, iar în zona subamniotică toate celulele au fost D2-40+. În zona periferică, celulele D2-40+ au creat un

aspect reticular datorită conexiunilor și prelungirilor lor.

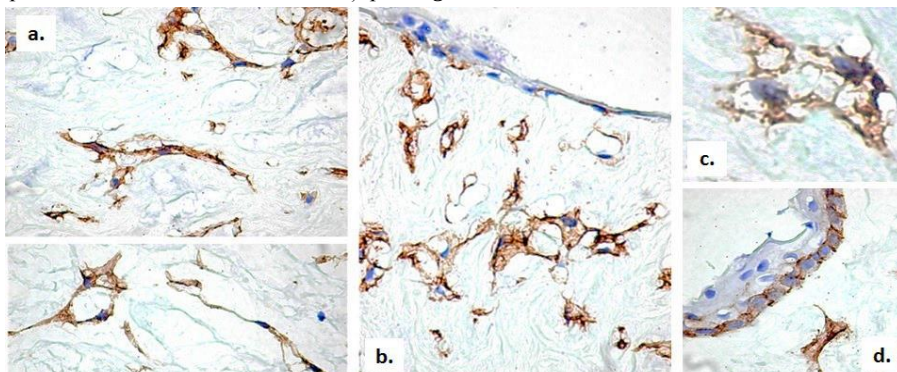


Fig. 9. Morfologia celulelor D2-40+ din cordonul ombilical. a) zona periferică; b) zona subamniotică ; c) aspect lacunar al celulelor D2-40+; d) imunomarcaj pentru D2-40 la nivelul epiteliului amniotic, $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$, Imunoreacție pentru anti-D2-40, DAB

Pentru fiecare zonă topografică a substanței Wharton a fost calculată densitatea medie de celule D2-40 pozitive. Astfel, s-a observat că, densitatea celulelor D2-40+ a fost în scădere din periferia cordonului ombilical spre zonele profunde, unde populația celulară majoritară a fost D2-40-.

Tabelul 9. Diferențele statistice obținute la compararea Histo-scorului calculat pentru celulele D2-40+ din zonele substanței gelatinoase Wharton a cordonului ombilical

H-scor	ZS		ZPs	ZPc	ZPv	ZIv
Media	284,62		282,42	181,25	57,02	12,08
DS	36,79		28,19	37,11	26,52	10,59
Mediana	300		286,40	183,39	48,67	11,46
IIQ	300 - 300		277,78 - 300	149,49 - 197,72	40,79 - 69,74	5 - 15,65
ZS	t	-	-0,2417	-10,0857	-25,5871	-36,2928
	p		0,8101*	<0,001	<0,001	<0,001
ZPs	t	-0,2417	-	-11,0698	29,6974	-45,7757
	p	0,8101*		<0,001	<0,001	<0,001
ZPc	t	-10,0857	-11,0698	-	13,8868	-22,3493
	p	<0,001	<0,001		<0,001	<0,001
ZPv	t	-25,5871	29,6974	13,8868	-	-8,0253
	p	<0,001	<0,001	<0,001		<0,001
ZIv	t	-36,2928	-45,7757	-22,3493	-8,0253	-
	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	

*Noiță: ZS - Zona subamniotică; ZPs - Zona periferică spongioasă; ZPc - Zona periferică compactă; ZPv - Zona perivasculară; ZIv - Zona intervasculară; p - valoare obținută prin testul Student, * între grupele comparate nu au fost stabilite deosebiri veridice*

Celulele endoteliale ale vaselor ombilicale au fost D2-40 negative, iar în zona substanței Wharton au fost identificate și resturi celulare ale ductului alantoidian cu exprimare D2-40+. De asemenea, în straturile profunde ale substanței Wharton au fost identificate celule D2-40+ cu morfologie diferită, inclusiv celule fusiforme.

La nivelul țesutului placentar, celulele deciduale au exprimat variabil markerul D2-40, cu modele membranare sau citoplasmatic. În vilozitățile coriale, expresia D2-40 a fost neuniformă, cu distribuție heterogenă în funcție de tipul de vilozitate. În vilozitățile terminale, s-a observat expresia nucleară a markerului în sinciotrofoblast. De asemenea, în cadrul plăcii coriale și a epiteliului amniotic au fost observate celule fibroblast-like D2-40+.

4.2. Expresia CD105 în cordonul ombilical și țesutul placentar

Colorarea cu anti-CD105 a rezultat în semnale de culoare brună, observate la nivel membranar, nuclear și citoplasmatic. Celulele stem mezenchimale din cordonul ombilical și țesuturile placentare au prezentat exprimare pentru CD105, chiar dacă nu toate exprimau și markerul de suprafață CD34. În vasele ombilicale, celulele endoteliale au exprimat CD105 cu intensități variabile, iar expresia a fost observată și în grosimea peretelui vascular, aspect datorat structurilor veziculoase cu mucopolizaharide localizate printre straturile de miocite netede. Epiteliul amniotic ombilical a prezentat o exprimare citoplasmatică și membranară a CD105, iar în substanța gelatinoasă Wharton, celulele stromale CD105+ au fost distribuite neuniform. Astfel, au existat zone unde numărul acestor celule era mai mare și zone unde densitatea celulelor CD105-negative a predominat. Analizând proporțiile celulelor CD105 pozitive și intensitatea de exprimare a acestui marker, a fost calculat "Histo scor"-ul. La compararea datelor pentru H-scor, au fost obținute următoarele diferențe statistic semnificative (Tabelul 10).

Tabelul 10. Diferențele statistice obținute la compararea Histo-scorului calculat pentru celulele CD105+ din zonele substanței Wharton a cordonului ombilical

H-scor		ZP	ZPv	ZIv
Media		77,54	15,73	35,48
DS		9,68	6,63	14,47
Mediana		80	15,10	33,14
IIQ		70,59 – 85,71	11,11 - 18,56	25,93 - 44
ZP	t	-	26,8651	12,3145
	p		<0,001	<0,001
ZPv	t	26,8651	-	6,3260
	p	<0,001		<0,001
ZIv	t	12,3145	6,3260	-
	p	<0,001	<0,001	

*Notă: ZP - Zona periferică;; ZPv - Zona perivasculară; ZIv - Zona intervasculară; p – valoare obținută prin testul Student, * între grupele comparate nu au fost stabilite deosebiri veridice.*

Din punct de vedere structural, celulele CD105+, în special cele din zona periferică, dar și din alte regiuni ale substanței Wharton, erau fusiforme, cu o cantitate moderată de citoplasmă și un nucleu eucromatic. Aceste celule prezintau scurte prelungiri citoplasmatic.

În placentă, exprimarea CD105 a fost observată în diverse structuri, incluzând celulele epitelului amniotic, placa corială, celulele deciduale și vilozitățile coriale. S-a observat expresie CD105 în sincițiotrofoblast pentru toate tipurile de vilozități coriale, Densitatea cea mai mare de vase CD105+ a fost pentru vasele localizate în vilozitățile stem și trunchiurile magistrale, iar cele mai multe vase cu endoteliul CD105– au fost identificate în vilozitățile terminale.

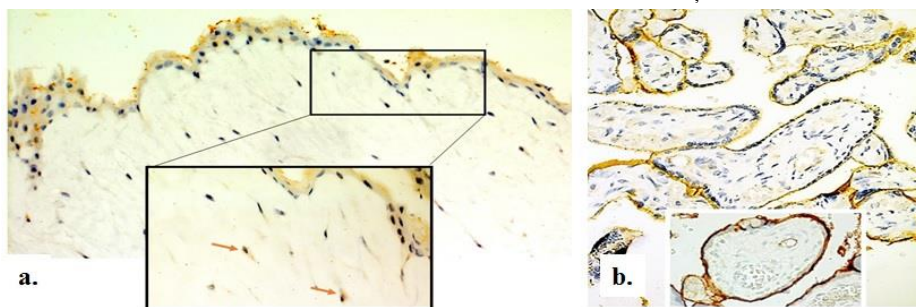


Fig. 10. Imunoexpresia markerului CD105 de către: a) celulele membranei amniotice și din substanța Wharton; b) celulele sincițiotrofoblastului și vase la nivel de vilozități tip tulpină și terminale, ×200, ×400; Imunoreacție pentru anti-CD105, DAB

Un alt moment important pentru vasele CD105 pozitive a fost prezența unei heterogenități de expresie. Astfel, au fost identificate vase sangvine care exprimau parțial imunomarcajul, ceea ce presupunea prezența a două populații celulare: celule endoteliale CD105+ și celule endoteliale CD105-. De asemenea, celulele stromale CD105+ au fost observate în stroma vilozităților și celulele deciduale au prezentat o exprimare membranară intensă a markerului CD105.

4.3. Expresia CD34 în cordonul ombilical și țesutul placentar

În cordonul ombilical, expresia CD34 a fost identificată în celulele endoteliale vasculare, cu o distribuție omogenă și continuă în artere și vene. Intensitatea expresiei a fost estimată ca crescută (3+). De asemenea, celulele stromale CD34+ au fost identificate în substanța gelatinoasă Wharton, cu o distribuție neuniformă și expresie scăzută (1+). Celulele CD34+ non-endoteliale au fost localizate în zonele periferică și perivasculară, cu o expresie variabilă și un pattern membranar și/sau citoplasmatic. Totuși, densitatea cea mai mare de celule CD34+ a fost pentru zona periferică a stromei cordonului ombilical, unde numărul de celule CD34+ a variat între 8 și 19 celule/câmp. Morfologic, celulele CD34+ din zona periferică, puteau fi caracterizate prin aspectul său apofizat, prezentând prelungiri citoplasmatic lungi și/sau scurte. Aceste celule conțineau un nucleu mare, eucromatic, oval/rotund. Un aspect foarte important de menționat este faptul că, expresia markerului a fost neuniformă chiar în cadrul aceleiași celule. Astfel, frecvent, au fost observate celule pozitive care prezentau expresie focală atât la nivel membranar, cât și citoplasmatic. La analiza datelor obținute pentru H-scor, au fost identificate diferențe statistice semnificative între grupuri (Tabelul 11).

În placentă, CD34 a fost exprimat intens în vasele placentare, atât din vilozitățile coriale, cât și din placa corială, cu un pattern mixt la nivel membranar, citoplasmatic și chiar nuclear. De asemenea, celule CD34+ non-endoteliale au fost identificate în stroma vilozităților, cu expresie scăzută (1+).

Tabelul 11. Diferențele statistice obținute la compararea Histo-scorului calculat pentru celulele non-endotheliale CD34+

H-scor	Media	DS	Mediana	IIQ	F	p
Zona periferică	52,67	21,40	45,60	41,51 – 53,93	96,0299	<0,001
Zona perivasculară	11,14	6,63	10,42	9,23 - 12,80		

p – valoare obținută prin test Anova

Studiul detaliat preparatele, am identificat două tipuri distincte de celule CD34+ non-endotheliale. Primul tip celular, de dimensiuni mici, era predominant localizat în regiunile periferice ale vilozităților, exprimând markerul intens (3+), cu un pattern similar celulelor endotheliale. Cel de-al doilea tip celular, frecvent localizat în regiunile centrale ale vilozităților, avea o formă apofizată, cu variabilitate în intensitatea expresiei. De asemenea, au prezentat imunomarcaj CD34+: citotrofoblastul, sincitrofoblastul, unele celule deciduale, celulele epiteliale amniotice și celulele stromale din țesutul mesenchimal subamniotic.

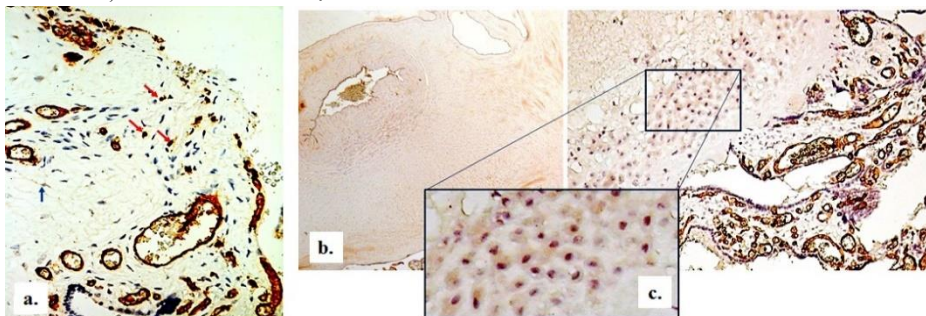


Fig. 11. Aspecte particulare de prezența celulelor CD34 pozitive non-endotheliale: a) celule stromale din vilozitățile coriale; b) placa corială; c) celule deciduale. ×10; ×20;×40; Imunoreacție pentru anti-CD34, DAB

4.4. Expresia AC133 în cordonul ombilical și țesutul placentar

Studiul a evidențiat distribuția heterogenă și complexă a celulelor AC133 pozitive, atât în cordonul ombilical, cât și țesuturile placentare, relevând, astfel, potențialul acestor celule în regenerarea țesuturilor. Celulele endotheliale din vene au fost CD133 pozitive, în timp ce cele din artere au fost CD133 negative. Totuși, celulele endotheliale din țesuturile placentare nu au exprimat markerul CD133. Morfologic, celulele CD133 pozitive non-endotheliale au avut prelungiri citoplasmice lungi și au prezentat pattern-uri citoplasmice sau granulare.

Tabelul 12. Diferențele statistice obținute la compararea Histo-scorului calculat pentru celulele non-endotheliale AC133+

H-scor	Media	DS	Mediana	IIQ	F	p
Zona periferică	85,92	28,61	95,54	52,30 – 112,50	134,7256	<0,001
Zona perivasculară	17,98	8,52	14,96	10,84 - 25,85		

p – valoare obținută prin test Anova

Intensitatea de exprimare a fost scăzută (1+) și/sau moderată (2+). Densitatea celulelor CD133 pozitive a variat în cele 2 zone studiate. Analizând proporțiile pentru celulele CD34/AC133 pozitive și negative în cele două zone studiate am observat că zona perivasculară a fost populată preponderent de celule ai căror profil molecular era CD34- și AC133-, doar o mică parte de celule erau pozitive. În schimb, zona periferică a fost populată de celule stromale ce au prezentat profil molecular mixt.

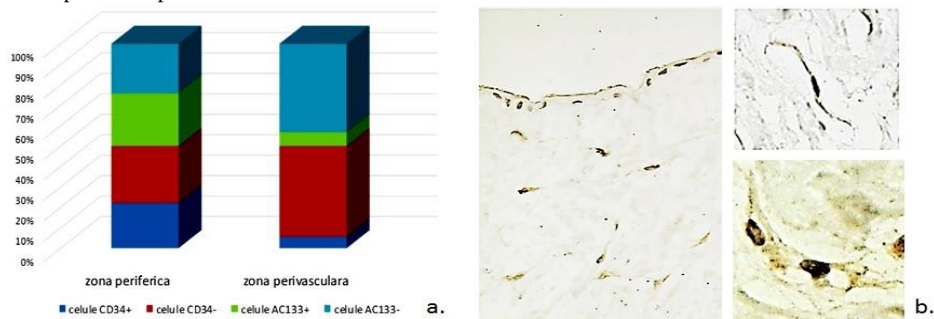


Fig. 12. a) Analiza comparativă a proporțiilor celulare CD34 și AC133 în zonele periferică și perivasculară din substanța gelatinoasă Wharton, $\times 10$, $\times 40$; b) Aspecte particulare ale celulelor stromale AC133+ din substanța gelatinoasă Wharton, $\times 10$, $\times 40$; Imunoreacție pentru anti-AC133, DAB

În placenta, exprimarea markerului AC133 a fost observată în celulele epitelului amniotic, celulele stromale din stratul mezenchimal subamniotic și unele celule deciduale. A fost remarcată diversitatea morfologică a celulelor stromale AC133 pozitive. Markerul AC133 nu a fost exprimat în vilozitățile coriale, iar exprimarea sa în celulele deciduale a fost focală.

4.5. Expresia VEGFR-2 în cordonul ombilical și țesutul placentar

Celulele endoteliale din vasele ombilicale au prezentat o reacție pozitivă omogenă la nivel membranar și citoplasmatic pentru VEGFR-2, cu intensitate moderată sau crescută. De asemenea, imunomarcajul a fost prezent în spațiile mucopolizaharidice din medie, în special în vena ombilicală.

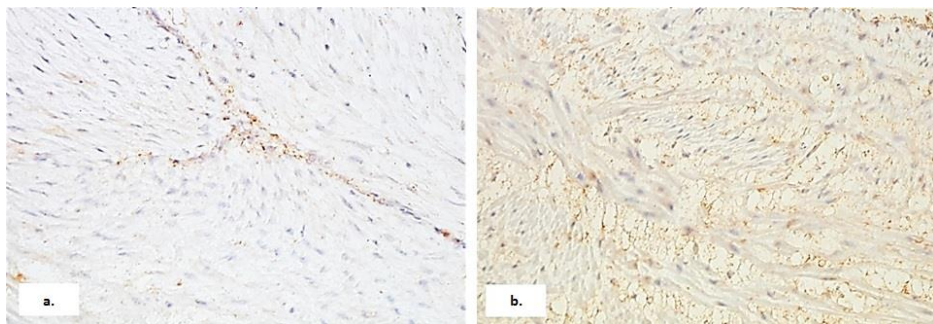


Fig. 13. Celule endoteliale VEGFR-2 pozitive de la nivelul arterelor ombilicale (a) și venei ombilicale (b). Prezența numeroaselor vezicule extracelulare în media venei (b), $\times 100$, $\times 400$; Imunoreacție pentru anti-VEGFR-2, DAB

Celulele stromale din zona periferică și perivasculară a substanței Wharton au exprimat markerul VEGFR-2 în modele diverse, iar microveziculele extracelulare au prezentat semnal pozitiv, mai ales în zonele superficiale spongioase. De asemenea, exprimarea a fost observată în celulele epiteliului amniotic ombilical, cu intensitate înaltă și distribuție neuniformă.

În placenta, markerul VEGFR-2 a fost exprimat în trofoblast, cu intensitate diferită între sinciotrofoblast și citotrofoblast. De asemenea, celulele endoteliale din vasele fetale și unele celule stromale din vilozitățile terminale au exprimat VEGFR-2. Celulele deciduale au prezentat, de asemenea, exprimare a markerului, cu intensitate moderată, iar celulele epiteliului amniotic au fost pozitive pentru VEGFR-2, cu distribuție neuniformă.

Sumarizarea datelor obținute arată că, cordonul ombilical și componentele placentei la termen, precum placa corială, epiteliul amniotic, stroma vilozităților coriale conțin grupuri de celule hematopoietice, care nu sunt asociate cu circulația fetală sau maternă și sunt separate de celulele endoteliale care exprimă CD34, CD133 și VEGFR-2 (Figura 14).

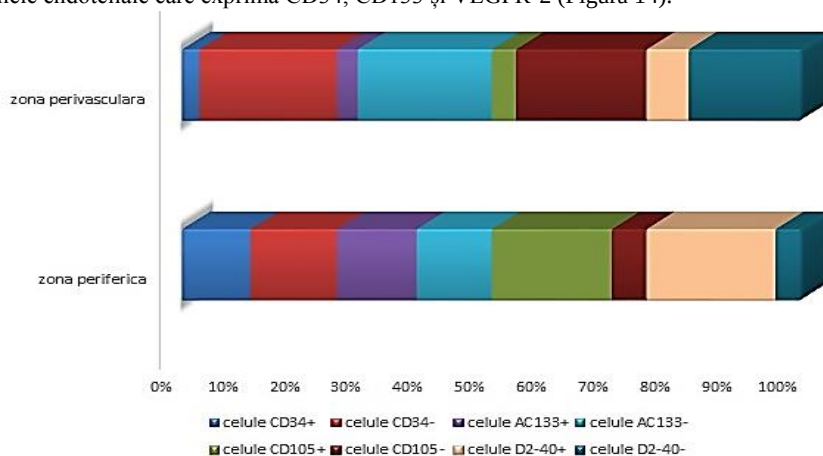


Fig. 14. Evidențierea caracterului heterogen al populațiilor celulare stem în zonele periferică și perivasculară a substanței gelatinoase Wharton

Prin utilizarea markerilor vasculari (CD133, CD34, VEGFR-2), am putut analiza comportamentul celulelor endoteliale pentru a evalua posibila lor utilitate în ingineria țesutului vascular. Identificarea unei surse potențiale adecvate de celule cu potențial vascular ar putea avea o mare valoare în generarea de structuri vasculare de dimensiuni mari, similare arterelor și venelor. În acest context, s-a constatat că expresia la CD133, o proteină implicată în adeziunea celulară, a fost negativă în celulele endoteliale ale arterelor ombilicale și ușor pozitivă în vene. În schimb, s-a observat o exprimare intensă a markerului CD34 în toate vasele sangvine din cordonul ombilical și vasele placentare. Această expresie puternică a markerului CD34 sugerează un potențial ridicat al celulelor endoteliale pentru diferențiere. Markerul CD34 este cunoscut ca fiind amplu exprimat de către celulele progenitoare endoteliale implicate în dezvoltarea vaselor de sânge mici, în special a capilarelor [4]. De asemenea, s-a observat o expresie moderată a markerului VEGFR-2 în celulele endoteliale și celulele stromale din zona periferică și subamniotică [22]. Faptul că toate celulele endoteliale și unele celule stromale din

regiunile specifice ale complexului ombilico-placentar au prezentat o expresie a acestor markeri susține potențialul celulelor cordonului ombilical de a se diferenția spre linia celulară vasculară.

Rezultatele obținute indică nu numai prezența unor populații celulare heterogene, ci și localizarea specifică a acestora în cordonul ombilical și în țesuturile placentare. Prin urmare, rezultatele noastre sugerează că celulele din zona periferică pot fi utilizate cu succes ca grefe celulare în ingineria tisulară. În plus, diversitatea profilului molecular al celulelor stromale din cordonul ombilical sugerează că aceste celule ar putea fi utilizate nu numai cu rol angiogenic, ci și pentru generarea altor organe și țesuturi umane.

CONCLUZII GENERALE

1. Sistemul vascular placentar este caracterizat de modelul dihotomic bine definit, de tip mixt, fără a prezenta anastomoze directe între sistemul arterial și cel venos, dar și între ramurile acestor sisteme în particular. La nivelul vilozităților terminale, ramurile vasculare intraplacentare poartă un caracter terminal bine stabilit.
2. Prezența celulelor musculare netede la nivelul intimei și a unui număr mare de structuri veziculoase intermusculare de la nivelul mediei determină diferențe (cu 37,53%) în grosimea peretelui arterelor ombilicale *versus* vena ombilicală.
3. Distribuția fibrelor de collagen de tip I în cordonul ombilical și țesuturile placentare a fost predominant perivasculară, sub membrana amniotică, iar la nivelul vaselor sangvine în intima și în zona periferică a mediei. Fibrele reticulare au prezentat o distribuție omogenă descrise prin două pattern-uri distincte: liniar și areolar.
4. Metoda chimică cu soluție de detergent de 1% dodecil sulfat de sodiu (SDS), utilizată pentru decelularizarea arterelor ombilicale, s-a dovedit a fi cea mai eficientă prin obținerea unei decelularizări totale, comparativ cu metodele enzimatică și mixtă.
5. Arterele ombilicale decelularizate prin metoda chimică mențin proprietățile morfologice (carcasă collagenică intactă) și calitățile mecanice pertinente pentru utilizarea acestora în calitate de grefe vasculare cu diametru mic, de până la 1 mm.
6. Componenta celulară a zonei periferice din cadrul substanței gelatinoase Wharton exprează combinația de markerii CD105+, CD34+, AC133+, D2-40+, VEGFR-2+, ceea ce denotă o populație celulară heterogenă, și prin urmare, această zona poate servi drept sursă de celule stem pluripotente utilizate nu doar cu rol angiogenic, ci și cu rol generator a altor tipuri de țesuturi umane.
7. Identificarea microveziculelor extracelulare CD105+, VEGFR-2+ în spațiile matricei tisulare, precum și printre miocitele netede din peretele vaselor ombilicale, sugerează că substanța gelatinoasă Wharton reprezintă un depozit important de substanțe biologice active.

RECOMANDĂRI

1. Pentru a obține o decelularizare eficientă a arterelor cordonului ombilical, păstrând proprietățile biomecanice satisfăcătoare ale vasului, recomandăm utilizarea soluției cu 1% dodecil sulfat de sodiu (SDS).
2. Pentru a permite restrângerea timpului de expunere a vaselor ombilicale la acțiunea toxică a soluțiilor de detergenți în procesul de decelularizare, recomandăm concomitent cu procedeul

de imersie utilizarea unui sistem de perfuzie, prin care soluțiile sunt perfuzate continuu prin lumenul vasului. De asemenea, dubla acțiune asupra vasului minimizează efectele distructive asupra componentei fibrilare a matricei extracelulare.

3. Pentru evaluarea rezistenței arterelor ombilicale decelularizate, înainte de efectuarea grefei vasculare, recomandăm utilizarea testului de rezistență la gonflare, urmat de examinarea histologică în vederea identificării eventualelor modificări ale carcanei de colagen.
4. Pentru a obține un preparat coroziv de înaltă calitate al placentei, recomandăm în prima fază injectarea polimerilor în artere, urmată de injectarea sistemului venos.
5. Pentru determinarea profilului populației celulare stem mezenchimale, recomandăm folosirea unui set de trei markeri: anti-CD105, anti-CD133, anti-CD34.

BIBLIOGRAFIA

1. FERGUSON, V. L., DODSON, R. B. Bioengineering aspects of the umbilical cord. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009 May;144 Suppl 1:S108-13. doi: 10.1016/j.ejogrb.2009.02.024.
2. SPURWAY, J., LOGAN, P., PAK, S. The development, structure and blood flow within the umbilical cord with particular reference to the venous system. *Australas J Ultrasound Med.* 2012 Aug;15(3):97-102. doi: 10.1002/j.2205-0140.2012.
3. HUPPERTZ, B. The anatomy of the normal placenta. *J Clin Pathol.* 2008 61(12), 1296–1302. doi:10.1136/jcp.2008.055277.
4. **GLOBA, L.,** NACU, V. Caracteristica imunohistochimică a celulelor stem mezenchimale din complexul ombilicoplacental [The immunohistochemical characteristics of the mesenchymal stem cells of the umbilicoplacental complex]. *Archives of the Balkan Medical Union.* 2017;52(1Supl 1):195-97. Romanian.
5. NANAIEV, A. K., et al. Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord. *Placenta.* 1997 Jan;18(1):53-64. doi: 10.1016/s0143-4004(97)90071-0.
6. TAKECHI, K., KUWABARA, Y., MIZUNO, M. Ultrastructural and immunohistochemical studies of Wharton's jelly umbilical cord cells. *Placenta.* 1993 Mar-Apr;14(2):235-45. doi: 10.1016/s0143-4004(05)80264-4.
7. GUPTA, S. GUPTA, R. Placental Tissues- From Reproductive to Regenerative Biology. *Int. J. Sci. Res. IJSR*, vol. 3, pp. 607–612, 2014.
8. POGOZHYKH, O., PROKOPYUK, V., FIGUEIREDO, C., POGOZHYKH, D. Placenta and Placental Derivatives in Regenerative Therapies: Experimental Studies, History, and Prospects. *Stem Cells Int.* 2018 Jan 18;2018:4837930. doi: 10.1155/2018/4837930.
9. CASSIDY, J. W. Nanotechnology in the Regeneration of Complex Tissues. *Bone Tissue Regen Insights.* 2014 Nov 12;5:25-35. doi: 10.4137/BTRIS12331.
10. MORIGI, M., et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells accelerate recovery of acute renal injury and prolong survival in mice. *Stem Cells.* 2008;26:2075–2082.
11. KING, A. E., et al. Elafin in human endometrium: an antiprotease and antimicrobial molecule expressed during menstruation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(9):4426-4431. doi:10.1210/jc.2003-030239.
12. KUBO, M., et al. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(7):1539-1546.

13. VIG, K., et al. Advances in Skin Regeneration Using Tissue Engineering. *Int J Mol Sci*. 2017 Apr 7;18(4):789. doi: 10.3390/ijms18040789.
14. BARA, J.J., RICHARDS, R.G., ALINI, M., STODDART, M.J. Concise review: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells change phenotype following in vitro culture: implications for basic research and the clinic. *Stem Cells*. 2014.32 (7): 1713-23.
15. FARAHANY, N. A., et al. The ethics of experimenting with human brain tissue. *Nature*. 2018. 556 (7702): 429–32.
16. BOURRET, R., et al. Human-animal chimeras: ethical issues about farming chimeric animals bearing human organs. *Stem Cell Research & Therapy*. 2016. 7 (1): 87.doi;10.1186/s13287-016-0345-9.
17. GROBARCZYK, B., FRANCO, B., HANON, K., MALGRANGE, B. Generation of Isogenic Human iPS Cell Line Precisely Corrected by Genome Editing Using the CRISPR/Cas9 System. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2015. 11(5): 774–87.
18. ERICES, A., CONGET, P., MINGUELL, J. J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*. 2000;109:235–42.
19. In't ANKER, P. S., et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells*. 2004; 22(7):1338-45. doi: 10.1634/stemcells.2004-0058.
20. PANEPUCCI, R. A., et al. Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrowderived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2004;22:1263–78.
21. DAVIES, J. E., WALKER, J. T., KEATING, A. Concise Review: Wharton's Jelly: The Rich, but Enigmatic, Source of Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Transl Med*. 2017 Jul;6(7):1620-1630. doi: 10.1002/sctm.16-0492.
22. **GLOBA, L.** Caracteristica imunohistochimică a celulelor mezenchimale stem din complexul ombilicoplacental. În *Materialele Conferinței științifice internaționale dedicată celor 70 ani de la fondarea USMF "Nicolae Testemițanu"* Problemele actuale ale morfologiei, 15-16 octombrie 2015, 54-58, Chisinau, Moldova, ISBN 978-9975-57-164-4.

LISTA PUBLICAȚIILOR AUTORULUI LA TEMA TEZEI

Lucrări științifice

❖ Articole în reviste științifice

✓ în reviste din bazele de date *Web of Science* și *SCOPUS*

1. REVENCU, T., TRIFAN, V., NACU, L., GUTIU, T., **GLOBA, L.** ș.a. Collection, isolation and characterization of the stem cells of umbilical cord blood. În *Romanian Journal of Morphology and Embryology (ISO4)*, 2013, 54 (2): 291–297, ISSN 1220-0522 (print), ISSN 2066-8279 (online), Craiova, Romania (IF 0,88).
2. **GLOBA, L.**, NACU, V. Caracteristica imunohistochimică a celulelor stem mezenchimale din complexul ombilicoplacental. În *Archives of the Balkan Medical Union*, aprilie 2017, vol. 52, nr. 1, supl. 1. 195-197, Chisinau, Moldova, ISSN 0041-6940.
3. MALCOVA, T., **GLOBA, L.** ș.a. Mechanical and morphological characterization of decellularized umbilical vessels as tissue engineering scaffolds. În *collection of 4th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering: Proceedings of ICNBME-2019*, September 18-21, 2019, 589-593, Chisinau, Moldova, ISBN 978-3-030-31865-9, ISSN 1680-0737

- ✓ **în reviste din Registrul Național al revistelor de profil, cu indicarea categoriei**
- categoria C
- 4. **GLOBA, L.** Celulele mezenchimale stem ale complexului ombelico-placentar: necesitate și utilitate. În *Analele Științifice ale USMF „N. Testemițanu”*, octombrie 2012, 43-48, Chisinau, Moldova, Numărul 1(13) / 2012 / ISSN 1857-1719.
- 5. **GLOBA, L.** Particularitățile vaselor complexului ombelico-placentar. (comunicare) În *Analele Științifice ale USMF „N. Testemițanu”*, octombrie 2014, 43-48, Chisinau, Moldova, Numărul 1(13) / 2014 / ISSN 1857-1719.
- ❖ **Articole în culegeri științifice**
- ✓ **în lucrările conferințelor științifice naționale cu participare internațională**
- 6. **GLOBA, L.** Caracteristica imunohistochimică a celulelor mezenchimale stem din complexul ombilicoplacentar. În *Materialele Conferinței științifice internaționale dedicată celor 70 ani de la fondarea USMF “Nicolae Testemițanu” Problemele actuale ale morfologiei*, 15-16 octombrie 2015, 54-58, Chisinau, Moldova, ISBN 978-9975-57-164-4.
- 7. **GLOBA, L.** Morfologia microscopică a vaselor ombilicale umane *Probleme actuale ale morfologiei: Materialele Conferinței științifice internaționale*, Chisinau, Moldova, 2021.
- ❖ **Teze în culegeri științifice**
- ✓ **în lucrările conferințelor științifice internaționale (peste hotare)**
- 8. VASCAN, A., **GLOBA, L.**, ș.a. Biomechanical properties of decellularized umbilical cord vessels. În *Abstract book of The 6th International Medical Congress for Students and Young Doctors. May 12-14 2016*, 195-196, Chisinau, Moldova, ISBN 978-9975-3028-3-8.
- ✓ **în lucrările conferințelor științifice naționale**
- 9. **GLOBA, L.** Expresia endogleinei (CD 105) de către celulele mezenchimale din placenta și cordonul ombilical uman: *Calitate, excelență și performanță. Conferința științifică anuală. 19-21 octombrie 2022. MJHS Moldovan Journal of Health Sciences. 2022, 29 (3), ANEXA 1. p. 9. ISSN 2345-1467. https://conferinta.usmf.md/wp-content/uploads/MJHS_29_3_2022_anexa_compressed.pdf.*
- ❖ **Brevete de invenții și alte obiecte de proprietate intelectuală, materiale la saloanele de invenții**
- 1. **GLOBA, L., PELIN, E., GLOBA, P., NACU, V.** Superioritatea utilizării metodei chimice cu soluție 1% dodecil sulfat de sodiu (SDS) în decelularizarea arterelor ombilicale. Certificat de inovator nr. 6009; 23.03.2023.
- 2. **GLOBA, L., PELIN, E., GLOBA, P., DAVID, V., GLOBA, T.** Evaluarea celulelor stem mezenchimale din complexul ombilico-placentar prin utilizarea imunocolorării anti-CD105. Certificat de inovator nr. 6012; 31.03.2023.
- 3. **GLOBA, T., PELIN, E., GLOBA, L., DAVID, V.** Utilizarea imunocolorării anti-CD68 drept criteriu de prognostic în leziunile proliferative de prostată. Certificat de inovator nr. 5745; 02.03.2020.
- 4. **GLOBA, T., PELIN, E., GLOBA, L., DAVID, V.** Utilizarea imunocolorării anti-S100 pentru evidențierea celulelor dendrite - un nou marker de prognostic în leziunile proliferative. Certificat de inovator nr. 5754; 17.03.2020.

ADNOTARE

Globa Lilian

„Complexul ombilico placentar – sursă de grefare tisulară și celulară”,

Teză de doctor în științe medicale, Chișinău 2023

Structura tezei: introducere, 5 capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografie din 204 titluri, 118 pagini de text de bază, 56 figuri, 19 tabele, 2 anexe. Rezultatele obținute au fost publicate în 9 lucrări științifice.

Cuvinte cheie: placentă, cordon ombilical, membrana amniotică, artere ombilicale decelularizate, celule stem mezenchimale, inginerie tisulară, grefă tisulară, grefă celulară.

Scopul lucrării: Determinarea particularităților structurale ale componentelor complexului ombilico-placentar (cordonului ombilical și placentei) în vederea identificării posibilității de obținere a grefelor tisulare și celulare pentru ulterioara lor transplantare.

Obiectivele cercetării: Identificarea aspectelor particulare ale arhitecturii vasculare placentare. Descrierea și determinarea modelelor de distribuție ale fibrelor de collagen tip I și tip III în cadrul cordonului ombilical și placentei. Studiarea particularităților morfologice și morfometrice ale vaselor ombilicale. Identificarea metodelor optime de decelularizare pentru arterele ombilicale cu studierea ulterioară a proprietăților lor biomecanice. Studiul imunohistochimic al componentei celulare stromale (CD34, CD105, AC133, D2-40, VEGFR-2) în structurile complexului ombilico-placentar.

Noutatea și originalitatea științifică: A fost redusă semnificativ durata expunerii fragmentelor vasculare la acțiunea toxică a solvenților utilizați în procedeele de decelularizare. A fost demonstrată eficiența metodei de decelularizare cu detergenți comparativ cu alte metode (enzimatică, combinată). A fost identificat testul de rezistență cu cea mai mare valoare practică care evidențiază modificările scheletului colagenic post decelularizare. A fost adaptat procedeul tehnicii de corozie pentru placentă, cu elaborarea de recomandări. Au fost descrise modelele de distribuție a fibrelor de collagen de tip I și tip III. A fost confirmată heterogenitatea populației de celule stem din cadrul substanței gelatinoase cu prezența celulelor stem hematogene în țesuturile fixe ale cordonului ombilical, sugerând folosirea lor în regenerările tisulare.

Problema științifică importantă soluționată: Componenta celulară a zonei periferice din cadrul substanței gelatinoase Wharton expresează combinația de markerii CD105+, CD34+, AC133+, D2-40+, VEGFR-2+. Metoda chimică utilizată pentru decelularizarea arterelor ombilicale, ce implică utilizarea soluției de detergent de 1% dodecil sulfat de sodiu (SDS), s-a dovedit a fi cea mai eficientă în eliminarea celulelor și obținerea unei structuri omogene. Vasele ombilicale decelularizate prezintă proprietăți mecanice și morfologice favorabile, ceea ce le face potrivite pentru utilizarea ca grefe în ingineria tisulară.

Semnificația teoretică și valoarea aplicativă a lucrării: Studiul evidențiază potențialul terapeutic al arterelor ombilicale, precum și importanța substanței Wharton, ca sursă valoroasă de celule stem pluripotente. Identificarea microveziculelor extracelulare și prezența spațiilor veziculoase intermusculare sugerează că cordonul ombilical reprezintă un depozit de substanțe biologice active. Diversitatea profilului molecular al celulelor stromale cu potențial de celulă stem din complexul ombilico-placentar deschide posibilități pentru multiple aplicații terapeutice.

Implementarea rezultatelor științifice: Rezultatele studiului dat au fost implementate în activitatea didactică și științifică a Catedrei de histologie, citologie și embriologie, Laboratorului de inginerie tisulară și culturi celulare și Laboratorului de morfologie al USMF “Nicolae Testemițanu”.

АННОТАЦИЯ

Глоба Лилиан

«Плацентарно-пуповинный комплекс - источник для тканевых и клеточных трансплантатов», Диссертация на соискание учёной степени кандидата медицинских наук, Кишинев, 2023

Структура диссертации: введение, 5 глав, общие выводы и рекомендации, библиография из 204 наименований, 118 страницы основного текста, 56 рисунков, 19 таблиц, 2 приложения. Полученные результаты были опубликованы в 9 научных статьях.

Ключевые слова: плацента, пуповина, амниотическая мембрана, децеллюляризованные пупочные артерии, мезенхимальные стволовые клетки, тканевая инженерия, тканевой трансплантат, клеточный трансплантат.

Цель исследования: Определение структурных особенностей компонентов плацентарно-пупочного комплекса (пуповина и плацента) с целью выявления возможности получения тканевых и клеточных трансплантатов для их последующей трансплантации.

Задачи исследования: Выявление особенностей сосудистой архитектуры плаценты. Описание и определение моделей распределения коллагеновых волокон I и III типов в пуповине и плаценте. Изучение морфологических и морфометрических особенностей сосудов пуповины. Определение оптимальных методов децеллюляризации артерий пуповины с последующим изучением их биомеханических свойств. Иммуногистохимическое исследование стромального клеточного компонента (CD34, CD105, AC133, D2-40, VEGFR-2) в структурах плацентарно-пупочного комплекса.

Новизна и оригинальность исследований: Значительно сокращена продолжительность воздействия на сосудистые фрагменты токсического действия растворителей, используемых в процедурах децеллюляризации. Доказана эффективность детергентного метода децеллюляризации по сравнению с другими методами (ферментативными, комбинированными). Выявлен тест на резистентность с наивысшей практической ценностью, который подчеркивает изменения в коллагеновом каркасе вследствие децеллюляризации. Адаптирован процесс методики коррозии плаценты с разработкой рекомендаций. Описаны модели распределения коллагеновых волокон типа I и III. Гетерогенность популяции стволовых клеток в составе студенистой субстанции была подтверждена наличием гематогенных стволовых клеток в фиксированных тканях пуповины.

Решённая научная задача: Клеточная составляющая периферической зоны в пределах студенистой субстанции Вартонова выражает комбинацию маркеров CD105+, CD34+, AC133+, D2-40+, VEGFR-2+. Химический метод декеллюляризации пуповинных артерий, включающий использование 1% раствора додецилсульфата натрия (SDS), доказал свою наибольшую эффективность в удалении клеток и получении однородной структуры. Декеллюляризованные пуповинные артерии обладают благоприятными механическими и морфологическими свойствами, что делает их подходящими для использования в качестве трансплантатов в тканевой инженерии.

Теоретическая и практическая значимость работы: Исследование подчеркивает терапевтический потенциал пуповинных артерий, а также важность студенистой субстанции Вартонова как ценного источника плюрипотентных стволовых клеток. Выявление межклеточных микровезикул и характерных особенностей пуповинных сосудов предполагает, что пуповина представляет собой хранилище биологически активных веществ. Разнообразие молекулярного профиля стромальных клеток плацентарно-пупочного комплекса открывает возможности для более широких терапевтических применений.

Внедрение научных результатов: Результаты исследования внедрены в научно-учебном процессе на Кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии, Лаборатории тканевой инженерии и клеточных культур и Лаборатория морфологии ГУМФ им. «Николае Тестемицану».

ANNOTATION

Globa Lilian

"The placental umbilical complex - source of tissue and cellular grafting", Doctoral thesis in medical sciences, Chisinau 2023

Thesis structure: introduction, 5 chapters, general conclusions and recommendations, bibliography of 204 titles, 118 pages of main text, 56 figures, 19 tables, 2 appendices. The obtained results have been published in 9 scientific papers.

Keywords: placenta, umbilical cord, amniotic membrane, decellularized umbilical arteries, mesenchymal stem cells, tissue engineering, tissue graft, cell graft.

The purpose of the research: Determination of the structural peculiarities of the components of the umbilico-placental complex (umbilical cord and placenta) in order to identify the possibility of obtaining tissue and cellular grafts for their subsequent transplantation.

The research objectives: Identification of particular aspects of placental vascular architecture. Description and determination of the distribution patterns of collagen fibers types I and III within the umbilical cord and placenta. Studying the morphological and morphometric peculiarities of the umbilical vessels. Identification of optimal decellularization methods for umbilical arteries with subsequent study of their biomechanical properties. Immunohistochemical study of the stromal cellular component (CD34, CD105, AC133, D2-40, VEGFR-2) within the structures of the umbilico-placental complex.

The scientific novelty and originality: The duration of exposure of the vascular fragments to the toxic action of solvents used in decellularization procedures has been significantly reduced. The effectiveness of the detergent-based decellularization method has been demonstrated compared to other methods (enzymatic, combined). The practical value of the resistance test highlighting post-decellularization changes in the collagen framework has been identified. The corrosion technique procedure has been adapted for the placenta, with recommendations developed. The distribution patterns of type I and tip III collagen fibers were described. The heterogeneity of the stem cell population within the Wharton's jelly has been confirmed with the presence of hematogenous stem cells in the fixed tissues of the umbilical cord. suggesting their use in tissue regeneration.

The scientific solved problem: The cellular component of the peripheral region within Wharton's jelly expresses a combination of markers CD105+, CD34+, AC133+, D2-40+, VEGFR-2+. The chemical method used for decellularizing umbilical arteries, involving the use of a 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) detergent solution, has proven to be the most efficient in removing cells and obtaining a homogeneous structure. The decellularized umbilical arteries exhibit favorable mechanical and morphological properties, rendering them suitable for use as grafts in tissue engineering.

The theoretical significance and applicative value of the research: the study highlights the therapeutic potential of umbilical arteries, as well as the importance of Wharton's jelly as a valuable source of pluripotent stem cells. The identification of extracellular microvesicles and the distinctive characteristics of umbilical vessels suggest that the umbilical cord represents a repository of biologically active substances. The diversity of the molecular profile of stromal cells within the umbilico-placental complex opens up possibilities for wider therapeutic applications.

The implementation of scientific results: The obtained results of this research were implemented in the teaching and scientific activity of the Department of Histology, cytology and embryology, the Laboratory of tissue engineering and cell cultures and the Morphology Laboratory of USMF "Nicolae Testemițanu".

Foaia privind datele de tipar

GLOBA LILIAN

**COMPLEXUL OMBILICO-PLACENTAR – SURSĂ DE GREFARE
TISULARĂ ȘI CELULARĂ**

311.01 – ANATOMIA OMULUI

Rezumatul tezei de doctor în științe medicale

Aprobat spre tipar: 20.10.2023	Formatul hârtiei 60x84 1/16
Hârtie offset. Tipar offset.	Tiraj 50 ex.
Coli de autor: 2.0	Comanda nr. 1112

SRL S.C. TIPOGRAFIA NR.1
MD-2001, mun. Chișinău, sect. Centru,
str. 31 August 1989, 46, ap.(of.) 9,
Tel. +373 69104435, +373 79471245