

**MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA
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

Teză de doctor în științe medicale

Conducător științific:

NACU Viorel
dr. hab. șt. med.,
profesor universitar

**Conducător științific
prin cotutelă**

MOTOC Andrei
dr. în medicină,
profesor universitar

Autor:

GLOBA Lilian

CHIȘINĂU, 2023

© Globa Lilian, 2023

CUPRINS

ADNOTARE (<i>în română, engleză și rusă</i>)	5
LISTA ABREVIERILOR	8
INTRODUCERE	9
1. DATE GENERALE DESPRE IMPORTANȚA COMPONENTELOR COMPLEXULUI OMBILICO-PLACENTAR PENTRU MEDICINA REGENERATIVĂ	19
1.1. Cordonul ombilical	19
1.1.1. Vasele ombilicale	21
1.1.2. Substanța gelatinoasă Wharton	22
1.2. Membrana amniotică	24
1.3. Corionul	28
1.4. Placenta	28
1.5. Celulele stem	29
1.6. Medicina regenerativă - grefarea tisular - organică	32
1.7. Ingineria tisulară - grefarea celulară	36
1.8 Sinteza la capitolul 1	40
2. MATERIALUL ȘI METODELE DE CERCETARE	42
2.1. Obiectul de studiu	42
2.2. Metodele de inginerie tisulară	44
2.2.1. Metodele de decelularizare	44
2.2.2. Testul de rezistență la întindere	45
2.2.3. Testul de rezistență la presiune	45
2.3. Metodele histologice	46
2.4. Metodele imunohistochimice	48
2.5. Metodele de cuantificare	50
2.6. Metoda de coroziune	52
2.7. Sinteza la capitolul 2	54

3. PARTICULARITĂȚI STRUCTURALE MACRO- ȘI MICROSCOPICE ALE COMPONENTELOR COMPLEXULUI OMBILICO-PLACENTAR ...	56
3.1. Studiul macro-microscopic a arhitecturii vasculare a placentei umane	56
3.2. Evidențierea particularităților structurale microscopice a țesuturilor placentare	60
3.3. Proprietăți structurale microscopice ale vaselor ombilicale	63
3.4. Proprietățile biomecanice ale arterelor ombilicale decelularizate	68
3.5. Aspecte structurale specifice a substanței gelatinoase Wharton	77
3.6. Sinteza la capitolul 3	80
4. CARACTERISTICA IMUNOHISTOCHEMICĂ A CELULELOR DIN COMPONENTA COMPLEXULUI OMBILICO-PLACENTAR	82
4.1. Expresia D2-40 în țesuturile complexului ombilico placentar	82
4.2. Expresia CD105 în cordonul ombilical și țesutul placentar	89
4.3. Expresia CD34 în cordonul ombilical și țesutul placentar	94
4.4. Expresia VEGFR-2 în cordonul ombilical și țesutul placentar	99
4.5. Expresia AC133 în cordonul ombilical și țesutul placentar	103
4.6. Sinteza la capitolul 4	106
5. ANALIZA ȘI EVALUAREA COMPARATIVĂ A REZULTATELOR OBȚINUTE	108
CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI	125
BIBLIOGRAFIA	127
Anexa 1. Certificate de inovator	144
Anexa 2. Acte de implementare a rezultatelor obținute	148
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII	154
CURRICULUM VITAE AL AUTORULUI	155

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 colagen tip I și tip III în cadrul cordonului ombilical și placentei. Studiarea particularităților morfologice și morfometrice ale vaselor ombilicale. Identificarea metodelor optimale 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 coroziune pentru placentă, cu elaborarea de recomandări. Au fost descrise modelele de distribuție a fibrelor de colagen 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 reprezintă 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”.

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".

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».

LISTA ABREVIERILOR

MA	membrana amniotică
COP	complex ombilico-placentar
CO/UC	cordoanul ombilical
MHC 1	moleculelor complexului major de histocompatibilitate clasa I
HLA	antigenul leucocitar uman
CD	receptor de "Clone Differenttion"
AEC	celule amniotice epiteliale
CAM	celule amniotice mezenchimale
CS	celulele stem
iPS	celulele stem pluripotente induse
MSC	celule stem mezenchimale
P-MSC	celule stem mezenchimale placentare
BM-MSC	celule stem mezenchimale din măduva osoasă
UCMSC	celule stem mezenchimale din cordoanul ombilical
WJ	substanța gelatinoasă Wharton
AMC	celulele membranei amniotice
VEGF	factorul de creștere endotelial vascular
BM	măduva osoasă
TEVG	grefă vasculară obținută prin Inginerie tisulară
SSEA-3	antigenul embrionar specific stadiului-3
SSEA-4	antigenul embrionar specific stadiului-4
TRA-1-60	marker de celule stem pluripotente umane
TRA-1-81	marker de celule stem pluripotente umane
OCT-4	factorul de transcripție octamerbinding 4
HNF-3β	factorul nuclear hepatocitar 3 β
EGF	factorul de creștere epidermal
bFGF	factorul de creștere a fibroblastelor de bază
KGF	factorul de creștere a keratinocitelor
TGFα	factorul de creștere transformant α
TGFβ	factorul de creștere transformant β
NGF	factorul de creștere a nervilor
GAG	glicozaminoglican
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid

INTRODUCERE

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 surse de 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 biologice 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 (CO) reprezintă un element valoros al unității feto-placentare, asigurând debitul sângelui bidirecțional, în permanentă creștere, în consens cu cerințele de dezvoltare fetală. CO prezintă o structură deosebită și unică, a cărei finalitate este protejarea vaselor sangvine din interiorul său și, implicit, menținerea constantă a torentului sangvin în circulația feto-placentară. De obicei, vasele cordonului sunt reprezentate de o singură venă ombilicală, poziționată în axul central al cordonului, și două artere ombilicale de calibru mai mic, cu un traiect spiralat în sens orar sau anti orar, cu curbură constantă și echidistantă față de axul venos central [54, 174]. Această poziționare a vaselor CO diminuează efectul de blocare a fluxului sangvin, ce poate apărea în timpul torsiunilor acestuia. Vena ombilicală conduce sângele oxigenat de la placenta la făt, iar arterele ombilicale aduc sângele neoxigenat de la făt la placenta.

În structura cordonului ombilical intră și țesutul conjunctiv special – mucos 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. Apofizele citoplasmice ale acestor celule mezenchimale sunt subțiri și detectate cu dificultate la o colorare de rutină cu HE. Un spectru larg de fibre de collagen (V, XII, XIII, XIV, XX) împreună cu o cantitate impunătoare de glicozaminoglicani (chondroitinsulfat, heparină), proteoglicani (acid hialuronic) și glicoproteine (tenascin) formează matricea intercelulară. Substanța gelatinoasă Wharton asigură elasticitatea și turgorul cordonului ombilical [174].

În procesul de dezvoltare, cordonul ombilical este format din diverse componente care provin din compartimentul ventral al trunchiului embrionului. Aceste componente includ sacul vitelin cu canalul său, artera și vena vitelină, precum și alantoida cu ductul său numit urachus.

Astfel, cordonul va participa la formarea peretelui anterior al abdomenului embrionului în segmentul dintre umflătura pericardică și organele genitale externe. Componenta mezenchimală din zona cordonului ombilical are o origine foarte complexă, din: 1. somatopleura amniotică, 2. splanhnopleura ductului vitelo-intestinal și 3. splanhnopleura ductului alantoidian [32].

Inițial, două vene ombilicale sunt conectate la venele cardinale de pe părțile laterale ale ficatului. În timp, vena ombilicală dreaptă se reduce și dispare, rămânând doar o venă ombilicală (fosta venă ombilicală stângă). Aceasta din urmă se împarte în 2 ramuri. Una din ramuri se unește cu vena portală a ficatului, unicul vas rămas din primordiile venelor viteline, iar cea de-a doua ramură se unește cu ductul venos al ficatului, formând calea de ocolire a parenchimului hepatic. După naștere, vena ombilicală devine ligamentul rotund al ficatului, iar ductul venos se transformă în ligamentul venos (Arantius) [81].

Placenta reprezintă organul extraembrionar, 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. Placenta umană este de tip discoidal hemocorial vilos. Vilozitățile coriale ale placentei penetrează peretele endometrul funcțional și vasele terminale ale arterelor uterine, care intră în legătură directă cu sângele matern. În structura placentei deosebim partea fetală și cea maternă [102].

Placa corială reprezintă suprafața fetală a placentei, care la rândul său este acoperită de amnion. Amnionul este compus din epiteliu, care în funcție de zonă poate fi stratificat sau simplu, și mezenchimul amniotic, un țesut conjunctiv avascular. Mezenchimul amniotic este slab atașat la mezenchimul corionic și poate fi ușor îndepărtat de pe placenta [86].

Vilozitățile coriale sunt structurate în felul următor: central - țesut conjunctiv (țesut mezodermal, mezenchim extraembrionar) cu vasele coriale, periferic - trofoblast vilos, constituit dintr-un strat de citotrofoblast și sincitiotrofoblast (sincitiu compact), împreună realizând bariera hematoplacentară. Unitatea morfofuncțională a placentei este cotiledonul, compus din vilozitatea principală (trunculară) și ramificațiile ei: cele secundare și terțiare (terminale). În placenta numărul total de cotiledoane variază de la 15 la 30.

Partea maternă sau uterină reprezintă componenta endometriului funcțional – *decidua basalis*, care suferă modificări odată cu invadarea acestuia de către trofoblastul extravilor. Țesutul conjunctiv al plăcii bazale delimitează cotiledoanele placentei de lacunele umplute cu sânge matern. Decidua conține celule voluminoase numite celule deciduale, citoplasma cărora este bogată în glicogen. Placenta participă la formarea unui șir de substanțe biologice 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).

Macroscopic, placenta este descrisă ca o structură plată, discoidală, cu un diametru de 185mm (150-200 mm), grosimea – 23 mm (10-40 mm), un volum de 500 ml (200-950 ml), cu greutatea de 470 g (200-800 g), și care ocupă o suprafață cca de 30.000 mm² [102].

Membrana amniotică reprezintă învelișul care formează peretele cavității în care se dezvoltă fătul. De asemenea, aceasta acoperă cordonul ombilical, iar la nivelul inelului ombilical fuzionează cu epidermul. Amnionul are multiple funcții în timpul sarcinii, inclusiv producerea lichidului amniotic și protecția fătului [171]. Pe măsură ce sarcina avansează, epiteliul simplu pavimentos al membranei amniotice suferă o transformare, devenind un epiteliu prismatic, care poate fi anizomorf în anumite zone. Pe suprafața acestui epiteliu se observă prezența microvilozităților, iar în interiorul celulelor se găsesc lipide, granule de glicogen și glicozaminoglicani. Polul apical al celulelor epitelului amniotic conține numeroase vacuole de dimensiuni diferite, conținutul cărora este eliberat în cavitatea amniotică. Amnionul extraplacentar este reprezentat de epiteliu simplu cubic. Acest epiteliu participă predominant în procesele de secreție a lichidului amniotic *versus* epiteliul amnionului placentar, care are un rol important în absorbția lichidului amniotic. În structura stromei membranei amniotice, se identifică membrana bazală, care constă dintr-un strat dens de țesut conjunctiv (compus din straturile acelular și celular) și un strat de țesut conjunctiv lax (mucos), care leagă amnionul de corion [125, 153].

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 (dintre indivizi diferiți), cât și autogen (din propriul organism), în zonele cu deficit tisular (posttraumatice, postnecrotice). Celulele mezenchimale stem (MSC) sunt celule progenitoare mezenchimale cu capacitate înaltă de auto-regenerare și proprietate de diferențiere în diverse linii celulare, de exemplu în: celulele țesuturilor conjunctive scheletale (osos, cartilagos), celulele reticulare ale măduvei osoase roșii, adipocite, cardiomiocite, celule endoteliale și chiar în celule de origine non-mezodermală, precum, hepatocite, celule de proveniență neurală și celule epiteliale.

Inițial, celulele mezenchimale stem (MSC) au fost descoperite în măduva osoasă, urmând apoi identificarea lor în țesuturile muscular și conjunctiv. Ulterior, au fost descoperite modalități de identificare și izolare ale acestor celule MSC din surse precum mezenchimul vilozităților coriale, 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. Comitetul celulelor MSC din cadrul Societății

Internaționale pentru terapia celulară, a stabilit criteriile minime pentru definirea MSC umane. Acestea fiind: 1 – capacitatea de a se atașa aderent pe suprafețele de cultivare; 2 – exprimarea pe suprafața celulară a antigenilor CD105, CD73 și CD90, și absența exprimării antigenilor CD45, CD34, CD14 sau CD11b, CD79a sau CD19, precum și HLA-DR; 3 – capacitatea de a se diferenția *in vitro* în osteoblaste, chondroblaste și adipocite [66]. Un avantaj semnificativ al MSC este absența dilemelor etice, ceea ce le face să fie candidați promițători în: terapia celulară, bioinginerie și tratamentele bazate pe celule stem în multe maladii umane grave. Toate acțiunile legate de utilizarea celulelor stem, inclusiv celulele MSC din complexul ombilico-placentar, sunt reglementate de legi și acreditate la nivel național și internațional pentru a asigura siguranța și eficacitatea utilizării acestora.

MSC din componentele complexului ombilico-placentar oferă avantajate semnificative față de cele din măduva osoasă, din următoarele motive:

1. sursa acestor celule nu este fătul propriu-zis, dar provine din elementele extraembrionare, precum placenta și cordonul ombilical. Această particularitate permite obținerea celulelor fără a implica direct individul născut;
2. procesele de colectare, conservare (prin congelare) și utilizare sunt mai simple în comparație cu celulele MSC din măduva osoasă, respectiv sunt mai ușor de utilizat în context clinic și/sau pentru manipulații genetice;
3. celulele MSC din complexul ombilico-placentar prezintă o compatibilitate imună ridicată. Aceste celule exprimă slab sau deloc antigenul HLA. Prin urmare, riscul de respingere imună, atunci, când aceste celule sunt utilizate în terapii celulare sau transplanturi, este redus;
4. celulele MSC din componentele complexului ombilico-placentar pot fi ușor colectate și stocate, contribuind la crearea de bănci de celule stem.

MSC au fost utilizate cu succes în tratamentul osteogenezei imperfecte, afecțiune caracterizată prin fracturi multiple cauzate de sinteza defectuoasă a colagenului tip I și a altor tipuri de colagen. Injectarea celulelor stem în zona ischemică a inimii a condus la diferențierea și regenerarea cardiomiocitelor, celulelor endoteliale și miocitelor. Acest lucru a avut efecte pozitive asupra remodelării miocardului și reparării vaselor de sânge prin neoangiogeneză în cazul infarctului miocardic. MSC, cu astfel de capacități terapeutice, sunt adesea marcate cu CD105 și pot fi prelevate din sângele cordonului ombilical, țesutul adipos sau măduva osoasă. Aceste celule au fost utilizate cu succes în boli inflamatorii, imune și autoimune, inclusiv în tratarea patologiei renale, cum ar fi nefrita. De asemenea, au fost observate rezultate promițătoare în tratarea plăgilor de diverse etiologii, atât pe modele de animale de laborator, cât

și la oameni.

Sunt realizate numeroase studii și încercări, în ceea ce privește terapia cu celule stem în maladiile sistemului nervos central și periferic. În special, celulele stem sunt evaluate în tratamentul patologiilor neurodegenerative, cum ar fi: boala demielinizantă, boala Huntington, boala Parkinson, precum și în patologiile vasculare, ischemice și traumatismele sistemului nervos central și periferic. În ceea ce privește tratarea parezei infantile, terapia cu celule stem a demonstrat efecte benefice și rezultate pozitive.

În sindromul de detresă respiratorie acută, în care țesutul pulmonar suferă o reducere dramatică ca urmare a inflamației și fibrozei, actual, se utilizează tehnici de transplant cu celule stem pentru stabilizarea și remodelarea țesutul pulmonar. Studiile clinice au demonstrat o reducere semnificativă a nivelului de glucoză în sânge în diabetul zaharat juvenil tip I după utilizarea celulelor stem mezenchimale. Celulele stem din "substanța gelatinoasă Wharton", odată inoculate în insulele pancreatice, se pot diferenția în celule producătoare de insulină, având potențial în tratamentul diabetului. Numeroase afecțiuni autoimune sistemice, cum ar fi scleroza multiplă, artrita reumatoidă și lupusul eritematos sistemic, sunt rezultatul funcționării imperfecte a sistemului imunitar. Studiile recente au arătat acțiunea imunosupresoare a celulelor stem mezenchimale în astfel de afecțiuni.

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.

Au fost stabilite următoarele obiective:

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 studierea 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 venei permit formarea anastomozelor între placenta și organul recipient, astfel că placenta să poată fi utilizată drept grefă vasculară.
- Epiteliului amniotic prezintă un imunofenotip heterogen, ceea ce ar permite utilizarea acestuia în diverse afecțiuni.

Sinteza metodologiei de cercetare și justificarea metodelor de cercetare alese

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. Procesul de cercetare a implicat mai multe etape, inclusiv identificarea și definirea problemei de cercetare, revizuirea literaturii de specialitate, formularea ipotezelor, scopului și obiectivelor, elaborarea design-ului de cercetare, colectarea, pregătirea și investigarea materialului primar, analiza și interpretarea rezultatelor, formularea concluziilor și recomandărilor. Studiul a fost desfășurat cu atenție și rigurozitate, respectând protocoalele standard și normele etice în cercetarea științifică. S-au utilizat metode și tehnici adecvate pentru a obține datele necesare și a investiga fenomenele propuse.

Pentru studiul componentelor complexului ombilico-placentar au fost folosite metode macroscopice (metoda de coroziune), histologice și imunohistochimice. O altă componentă a cercetării a fost partea experimentală, care a inclus procedeele de decelularizare și testare a rezistenței vaselor decelularizate. Studiarea prezenței, caracteristicilor specifice și modelului de distribuție a fibrelor de colagen I au fost efectuate prin metoda de colorare tricrom Masson (MT). Această metodă a permis diferențierea clară a componentei fibrilare în funcție de zonele substanței Wharton. Totodată, a fost posibil identificarea colagenului în vasele cordonului ombilical și componentele fetală și maternă a placentei. Studiul preparatelor cu fragmentele vasculare decelularizate colorate cu MT în lumină polarizantă oferă date suplimentare despre intensitatea procesului de degradare a fibrelor post-decelularizate. Componenta fibrilară reticulară a fost studiată prin utilizarea metodei histochimice impregnarea argentică Gordon-Sweet, în care fibrele reticulare s-au colorat în negru-brun.

Procedura de decelularizare a arterelor ombilicale a implicat trei metode diferite, în care am utilizat ca detergent soluția de 1% dodecil sulfat de sodiu (SDS) și tripsina ca enzima. Aceste

două substanțe au mecanisme de acțiune distincte, iar prin combinarea lor am reușit să identificăm metoda optimă de decelularizare pentru arterele ombilicale. Fragmentele arterelor ombilicale decelularizate au fost, apoi, supuse unor teste 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 colagen după decelularizare.

Pentru a studia distribuția vasculară la nivelul placentei, s-a utilizat tehnica de corozie, care se dovedește mult superioară altor metode, mai ales că permite și analiza 3-D a arhitecturii vasculare.

În cadrul studiului, s-au utilizat metodele imunohistochimice (folosind markeri precum CD105, CD34, AC133, D2-40, VEGFR-2) pentru a determina prezența celulelor stem. Acest panel divers de markeri a permis identificarea unei populații heterogene de celule stem în cordonul ombilical și țesuturile placentare. Este important de menționat că localizarea celulelor stem în structurile complexului ombilico-placentar are o importanță practică semnificativă, în special atunci când acestea trebuie colectate.

Noutatea științifică a rezultatelor obținute

- ~ A fost adaptat procedeul tehnicii de corozie pentru placentă.
- ~ A fost arătată lipsa anastomozelor între sistemul arterial și cel venos placentar.
- ~ A fost demonstrată eficiența metodei de decelularizare cu detergenți comparativ cu alte metode (enzimatică, combinată);
- ~ A fost redusă semnificativ durata expunerii fragmentelor vasculare la acțiunea toxică a solvenților utilizați în procedeele de decelularizare;
- ~ A fost identificat că testul de rezistență are cea mai mare valoare practică care subliniază modificările scheletului colagenic post decelularizare;
- ~ Au fost descrise modelele de distribuție a fibrelor de colagen de tip I și tip III, identificându-se aranjarea spațială a acestora în cordonul ombilical și țesuturile placentare.
- ~ A fost demonstrată heterogenitatea populației de celule stem din cadrul substanței gelatinoase Wharton, cu indicarea zonelor de maximă densitate a acestora.
- ~ A fost demonstrată prezența celulelor stem hematogene în țesuturile fixe ale cordonului ombilical.
- ~ 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 acesteia în regenerările tisulare.

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 aniversării 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.

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

- Act de implementare în procesul științifico-didactic în cadrul Catedrei de histologie, citologie și embriologie și a Laboratorului morfologic, USMF „Nicolae Testemițanu”, nr. 16 din 04.03.2020.
- Act de implementare în procesul științifico-didactic în cadrul Catedrei de histologie, citologie și embriologie, USMF „Nicolae Testemițanu”, nr. 25 din 19.03.2020.
- Act de implementare în procesul de cercetare științifică în cadrul Catedrei de histologie, citologie și embriologie și a Laboratorului de morfologie, USMF „Nicolae Testemițanu”, nr. 26 din 19.03.2020.
- Act de implementare în procesul de cercetare științifică în cadrul Catedrei de histologie, citologie și embriologie și a Laboratorului de morfologie, USMF „Nicolae Testemițanu”, nr. 16-1 din 04.03.2020.
- Act de implementare în procesul de cercetare științifică în cadrul Laboratorului de ingenerie tisulară și culturi celulare, USMF „Nicolae Testemițanu”, nr. 39 din 23.03.2023.
- Act de implementare în procesul de cercetare științifică în cadrul Laboratorului de morfologie și a Laboratorului de ingenerie tisulară și culturi celulare, USMF „Nicolae Testemițanu”, nr. 42 din 31.03.2023.

Sumarul compartimentelor tezei

Teza respectă structura tradițională conform cerințelor actelor normative curente și cuprinde următoarele elemente: cuprinsul, adnotarea în limba română, rusă și engleză, lista

abrevierilor, urmate de introducere, cinci capitole, concluzii generale, recomandări, bibliografie, anexe, declarația privind asumarea răspunderii și CV-ul autorului.

În „Introducere” se subliniază relevanța și importanța temei tratate. Se evidențiază actualitatea și semnificația științifico-practică a problemei de cercetare abordate, precum și scopul și obiectivele acestuia. De asemenea, se prezintă ipoteza de cercetare formulată și se descrie metodologia generală a cercetării care va fi utilizată pentru a obține rezultatele dorite. În această secțiune, se pune accentul pe fundamentarea și justificarea studiului, evidențiindu-se contribuția acestuia la domeniul de cercetare și practica clinică.

Capitolul 1 „Date generale despre importanța componentelor complexului ombilico-placentar pentru medicina regenerativă” include o analiză detaliată a surselor bibliografice științifice naționale și internaționale relevante din domeniul complexului ombilico-placentar. Această analiză a permis definirea conceptului de complex ombilico-placentar și a componentelor sale într-un mod exhaustiv. De asemenea, s-au evidențiat și accentuat noțiunile și principiile de bază ale ingineriei țesuturilor și a grefelor celulare și tisulare. Prin examinarea minuțioasă 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 mesenchimale, precum și capacitatea lor de diferențiere în diverse tipuri de celule și potențialul lor terapeutic în tratamentul diferitelor afecțiuni. Prin integrarea și analiza critică a acestor surse bibliografice, s-au obținut cunoștințe și înțelegere mai profundă despre complexul ombilico-placentar și potențialul său în medicina regenerativă.

Capitolul 2 „Material și metode de cercetare” 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 coroziune, de decelularizare, de testare a rezistenței fragmentelor vasculare decelularizate, precum și tehnicile histologice și imunohistochimice. Aceste detalii au inclus informații despre procedurile specifice, reactivii și instrumentele utilizate în fiecare etapă a cercetării. De asemenea, s-au descris metodele utilizate pentru cuantificarea structurilor histologice de interes și interpretarea rezultatelor. Aceste metode au inclus scorificarea intensității de expresie, în care s-a evaluat nivelul și distribuția imunomarcajelor specifice în cordonul ombilical și țesuturile placentare. Pentru analiza și prelucrarea rezultatelor obținute, au fost utilizate metode de prelucrare statistică adecvate. Aceste metode au permis evaluarea și compararea datelor cantitative și calitative obținute în studiu, contribuind la obținerea unor rezultate relevante și semnificative din punct de vedere statistic.

Capitolul 3 „Aspecte structurale macro- și microscopice ale componentelor complexului ombilico-placentar” detaliază particularitățile structurale macro- și microscopice a componentelor complexului ombilico-placentar, cu accent pe placenta și tipul de vascularizare arterială și venoasă a acesteia. De asemenea, s-au investigat proprietățile biomecanice și morfologice ale arterelor ombilicale native, dar și a celor decelularizate, în vederea dezvoltării de grefe vasculare prin utilizarea tehnicilor de inginerie tisulară. Prin studiul efectuat, s-a evidențiat complexitatea și heterogenitatea morfologică a substanței gelatinoase Wharton, precum și variațiile în structură și distribuția specifică a celulelor și fibrelor în diverse regiuni ale acesteia. Aceste informații dobândite contribuie la o înțelegere mai detaliată a compoziției și organizării acestui țesut important din cordonul ombilical.

Capitolul 4 „Caracteristica imunohistochimică a celulelor din componența complexului ombilico-placentar” conține rezultatele obținute prin utilizarea metodelor imunohistochimice în evaluarea componentei celulare a cordonului ombilical și a țesuturilor placentare. S-au analizat imunomarcajele specifice pentru celulele D2-40 pozitive, CD105 pozitive, AC133 pozitive, CD34 pozitive și VEGFR-2 pozitive. Aceste imunomarcaje au fost utilizate pentru a evalua atât calitativ, cât și cantitativ, prezența și distribuția acestor tipuri de celule în cordonul ombilical și în țesuturile placentare. Rezultatele obținute au furnizat informații importante despre expresia acestor markeri specifici și au contribuit la înțelegerea compoziției celulare în structurile date. Informațiile acumulate constituie un progres în înțelegerea și explorarea potențialului terapeutic al complexului ombilico-placentar în medicina regenerativă.

În capitolul 5 „Analiza și evaluarea comparativă a rezultatelor obținute”, s-a realizat o sinteză comparativă a rezultatelor obținute în studiul nostru cu datele prezentate de alte grupuri de cercetători, expuse în literatura de specialitate. În urma analizei comparative, au fost evidențiate atât aspectele de consens, care susțin și întăresc concluziile și interpretările noastre, cât și aspectele de dezbatere și divergență, care pot stimula cercetarea ulterioară și identificarea unor noi direcții de investigație. Această abordare comparativă a permis evaluarea și contextualizarea rezultatelor proprii în raport cu cunoștințele științifice existente.

1. DATE GENERALE DESPRE IMPORTANȚA COMPONENTELOR COMPLEXULUI OMBILICO-PLACENTAR PENTRU MEDICINA REGENERATIVĂ

Complexul Ombilico – Placentar (COP) sau complexul placentar este reprezentat de numeroase structuri provizorii, care apar în procesul de embriogeneză din țesuturile extraembrionare. Toate componentele complexului dat realizează numeroase funcții, ce asigură creșterea și dezvoltarea normală a embrionului.

COP include: cordonul ombilical, amnionul, sacul vitelin, alantoida, corionul și placenta. Totuși, componentele acestui complex nu au fost suficient de atractive pentru cercetătorii anilor 70 și 80. Cel mai probabil din cauza faptului că aceste țesuturi erau aruncate imediat după naștere. În anii '90, câteva grupuri de cercetători revin la 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 [143, 179].

În prezent, țesuturile complexului prezintă un mare interes pentru medicină, în calitate de biomaterial, datorită proprietăților excepționale ale țesuturilor fetale [77, 156]. În literatura de specialitate se regăsec numeroase cercetări, care studiază intens componentele COP, în special, legat de utilizarea lor în domeniul ingineriei tisulare și al medicinei regenerative.

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 colagen, care pot fi utilizate ca grefe celulare, tisulare pentru transplantări alogene și autogene în zonele cu deficit de regenerare (posttraumatice, ischemice, defecte tisulare etc) [68].

1.1. Cordonul ombilical

Cordonul ombilical (CO) este structura tubulară care asigură legătura fătului de placenta. Acesta servește drept conductă pentru vasele ombilicale. Formarea CO ca entitate structurală are loc între săptămâna a 4-a și a 6-a de gestație. Ulterior, cordonul se alungește până la săptămâna 36 de gestație. Creșterea în lungime poartă un caracter neuniform, astfel că, schimbările majore au loc până la 28 de săptămâni de gestație, după care procesul de alungire încetinește. Există studii care sugerează că, lungimea cordonului este determinată de cantitatea lichidului amniotic, dar și de vârsta mamei. De asemenea, se pare că există relație între lungimea cordonului și

presiunea arterială ombilicală [50].

La naștere, cordonul are o lungime de 50–60 cm, diametrul de 1-2 cm și o greutate de 40g. Cordonul ombilical este acoperit de epiteliul amniotic ombilical, care este format dintr-un singur sau mai multe straturi de celule epiteliale de formă pavimentoasă/cubică [35, 138]. Acest epiteliu reprezintă un derivat al epiteliului amniotic. Celulele epiteliului ombilical prezintă caracteristici ultrastructurale și funcționale similare keratinocitelor, exprimând un model de citokeratină similar cu cel din celulele epidermei. În plus, celulele epiteliale ombilicale au caracteristici morfologice comune cu celulele epidermei fetale și epiteliului amniotic, ceea ce poate explica faptul că cordonul ombilical conectează epiteliul amniotic cu epidermul fetal. Totuși, capacitatea epiteliului ombilical de a se stratifica și/sau a se keratiniza îl diferențiază pe acesta de epiteliul amniotic placentar [139]. Recente studii au demonstrat că, asemenea altor celulele din cordonul ombilical, celulele epiteliale ombilicale, dar și cele amniotice au trăsături similare cu celulele stem mezenchimale, cum ar fi expresia unor markeri specifici, inclusiv CD105, CD44, SSEA-4, Oct-4, Nanog, CD73, CD90. Astfel, aceste celule prezintă capacități de diferențiere în liniile adipogene, condrogene și osteogene, oferind oportunități promițătoare pentru cercetări și aplicații medicale viitoare [71, 135, 170].

De regulă, cordonul ombilical conține trei vase sangvine – două artere și o venă. Circulația bidirecțională a sângelui, prin vasele cordonului ombilical, între mamă și făt, se stabilește la sfârșitul celei de-a cincea săptămână de dezvoltare intrauterină [174]. Vasele ombilicale sunt încorporate într-o masă gelatinoasă bogată în proteoglicani, numită substanța gelatinoasă Wharton. O particularitate deosebită pentru cordonul ombilical este absența totală a inervației, respectiv medierea și reglarea comunicării dintre mamă și făt este realizată exclusiv hormonal.

Prin examinarea minuțioasă a componentelor celulare și extracelulare ale cordonului ombilical uman, a fost elaborată o compartimentare tisulară a acestuia. Astfel, sunt recunoscute cel puțin șase zone distincte, începând de la suprafața exterioară și continuând spre interiorul cordonului ombilical: (1) epiteliul de suprafață, (2) stroma subamniotică, (3) stroma periferică (identificată, în mod tradițional, ca substanța gelatinoasă Wharton), (4) stroma intervasculară, (5) stroma perivasculară și (6) vasele ombilicale. Fiecare dintre aceste zone prezintă caracteristici celulare și elemente de matrice extracelulară distincte, care au fost identificate prin studii structurale și funcționale [177]. Cu toate că compartimentele cordonului au fost identificate și caracterizate, importanța celulelor și a componentelor matricei extracelulare din aceste zone nu a fost pe deplin înțeleasă. În plus, studierea acestor zone și a caracteristicilor lor, încă, rămâne o provocare pentru cercetători.

1.1.1. Vasele ombilicale

Cordonul ombilical, de obicei, conține două artere și o venă, cea de-a doua venă, frecvent, se reduce pe parcursul dezvoltării intrauterine. Vasele ombilicale umane prezintă diferențe structurale distinctive față de majoritatea vaselor de sânge majore cu același diametru din restul organismului. Particularitățile structurale permit vaselor ombilicale să fie implicate în procesul de transudare a lichidului, astfel contribuind la formarea lichidului amniotic [15].

Ambele tipuri de vase ombilicale sunt lipsite de vasa vasorum și, astfel, nutriția acestora depinde de propriul aport de oxigen, fapt pentru care acestea sunt mai susceptibile la modificările stării hemodinamice [10, 53]. În ciuda descrierilor complete și precise ale histologiei vaselor cordonului ombilical, histomorfometria acestor structuri a fost studiată insuficient, în ciuda spectrului larg de patologii care afectează mama și fătul.

În mod normal arterele se încolăcesc în jurul venei. Cu toate acestea, modul în care venele și arterele se interconectează în cordonul ombilical poate să difere. Aceste variații includ cazuri în care arterele se dispun, împreună sau separat, lateral de venă. Alteori, arterele se încolăcesc spiralat în jurul venei, care în acest timp, rămâne poziționată central în cordon. Frecvent, aceste artere sunt denumite elipsoidale (termenul preferat) sau/și spiralate. Uneori, în configurația elicoidală a arterelor, vena se poate dispune și paralel cu arterele, dar și în jurul arterelor. Aceste variante pot influența fluxul de sânge către făt, respectiv pot avea efecte negative asupra alimentării fetale [38].

Prin inelul ombilical din peretele anterior al abdomenului, arterele ombilicale părăsesc fătul, fiind ramuri ale arterelor iliace interne. În schimb, vena pătrunde prin același inel și se extinde până la ficatul fătului, unde se divide în două ramuri distincte: o ramură direcționează sânge către vena portă hepatică, asigurând astfel aprovizionarea cu sânge a ficatului, iar cea de-a doua ramură, cunoscută sub numele și de canal (duct) venos (Arantius), anastomozează cu vena cavă inferioară, transportând 80% din volumul total de sânge al corpului fetal. Această rețea de vase facilitează distribuția oxigenului și a altor substanțe nutritive esențiale în tot organismul fetal [140]. În interiorul placentei, arterele ombilicale se unesc între ele la o distanță de aproximativ 5 mm de inserția cordonului [17]. Ulterior, ele se ramifică în artere coriale sau artere fetale intraplacentare. Vasele din cordonul ombilical sunt unice în comparație cu celelalte vase sangvine, deoarece nu au ramificații. Această caracteristică fără ramificații duce la absența unui pat microcirculator în cordonul ombilical.

Uneori pe traseul venei ombilicale se observă dilatări, creând aspectul unui nod fals sau al unui varice multiplu; aceste spații cu un flux încetinit de sânge, pot coagula și predispune fătul la tromboembolie. Trombul format are potențial de a se desprinde și a pătrunde în circulația fetală,

obstruând fluxul de sânge de-a lungul cordonului ombilical. Și arterele ombilicale pot dezvolta niște dilatări, umflături asemenea unor buzunare numite anevrisme. Aceste umflături în perețele arterial se pot rupe și pot duce la hemoragiile fetale intrauterine [12].

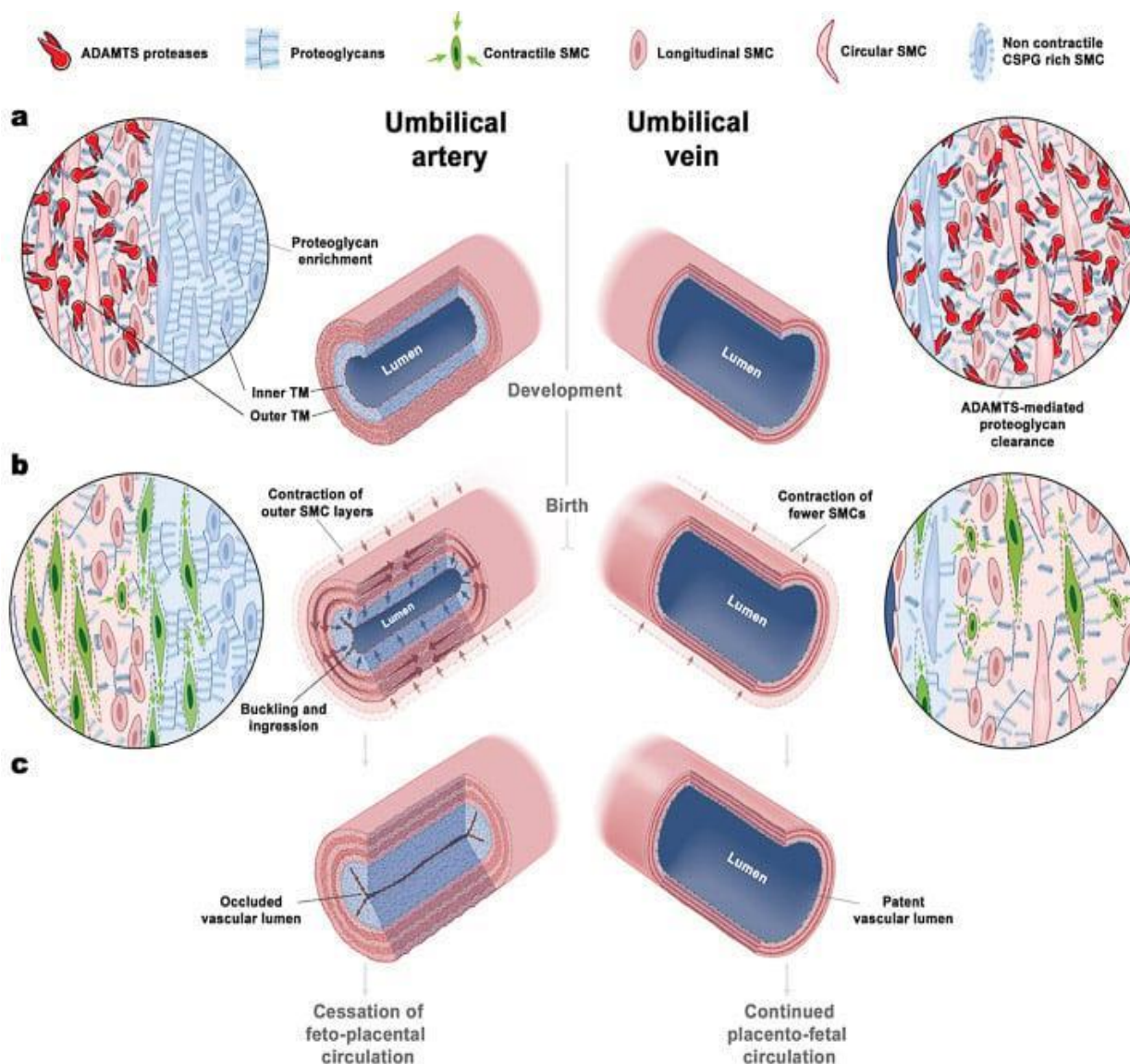


Fig. 1.1. Design-ul structural (expresia diferențială a proteazelor, proteoglicanilor și a miocitelor netede) al arterei ombilicale *versus* vena ombilicală. a) în timpul dezvoltării intrauterine; b) în timpul nașterii naștere; c) imediat după naștere [144].

1.1.2. Substanța gelatinoasă Wharton

Substanța gelatinoasă Wharton reprezintă o varietate de țesut conjunctiv specializat, care este important pentru fătul în dezvoltare. Țesutul Wharton este compus dintr-o matrice extracelulară bogată în colagen, glicozaminoglicani și proteoglicani, dar și dintr-o varietate de celule stromale. Această combinație de elemente structurale îi conferă substanței gelatinoase o proprietate elastică unică, un turgor specific care îi permite tolerarea vibrațiilor, îndoirilor,

întinderilor și răsucirilor din timpul activității fetale. În plus, substanța Wharton menține vasele ombilicale împreună, astfel, reglând fluxul sangvin spre făt. Cordonul ombilical cu o cantitate redusă de substanță Wharton este predispus la compresie, ceea ce poate duce la restricția fluxului sangvin către făt și invers, cantitatea crescută îmbunătățește fluxul sangvin, astfel contribuind la o dezvoltare sănătoasă a fătului [159, 176].

Pentru prima dată acest țesut conjunctiv de tip mucos a fost descris în 1656 de către Thomas Wharton (medic și anatomist englez, 1614-1673). Acesta afirma că, substanța gelatinoasă previne strangularea vaselor ombilicale, în special, în timpul mișcărilor fetale. De asemenea, el susținea că, matricea gelatinoasă servește drept un sistem de transport limfatic surogat [175]. Celulele substanței gelatinoase, precum majoritatea celulelor țesuturilor conjunctive, contribuie la elaborarea și secreția componentelor matricei extracelulare. Componenta celulară a substanței Wharton a fost pentru prima dată descrisă 9 ani mai târziu, în 1665, de către Hooke [40]. Comparativ cu alte tipuri de țesuturi conjunctive, substanța Wharton este unică, deoarece conține doar celule de origine mezenchimală, precum fibroblastele, miofibroblastele și precursorii acestora. În 1991, grupul de cercetători condus de McElreavey [134] au izolat, pentru prima dată, din cordonul ombilical uman celule asemănătoare fibroblastelor. Mai târziu, în 1993, Takechi și colab. [179] au relatat despre prezența unor celule fibroblast-like, care conțin miofilamente și sunt atât vimentin-pozitive, cât și desmin-pozitive. Miofibroblastele sunt celule secretoare de collagen, care în mod egal, au proprietăți contractile similare cu cele ale celulelor musculare netede. În funcție de localizarea lor în cordonul ombilical, celulele stromale ale substanței gelatinoase Wharton prezintă grade de diferențiere diferite – de la celulele mezenchimale nediferențiate la miofibroblaste/fibroblaste specializate [137].

Problema diferențierii fibroblastelor în miofibroblaste a fost studiată de Nanaev și colab. [143]. Obiectivul principal al grupului de cercetare a fost identificarea modelelor de expresie citoscheletică a vimentinei, desminei, α -SMA, γ -SMA și miozinei miocitului în celulele stromale. Astfel, prin utilizarea colorației imunohistochimice și a microscopiei electronice a fost posibil evidențierea gradului de diferențiere a celulelor stromale ombilicale. Rezultatele lui Nanaev și colab. au arătat că celulele stromale cu grad înalt de diferențiere sunt localizate primordial în apropierea vaselor ombilicale, în timp ce cele mai puțin diferențiate sunt prezente în zona subamniotică. Mai mult, diferențierea celulelor stromale este dependentă de termenul de gestație. Astfel că, celulele stromale cu grad scăzut de diferențiere sunt identificate în primul și al doilea trimestru de sarcină, ceea ce presupune că modelul lor de expresie citoscheletică este mai puțin complex [143]. Aceste constatări au fost confirmate și de alte studii, inclusiv de Kobayashi

și colab., care au observat că celulele stromale ale substanței Wharton inițiază procesul de diferențiere în miofibroblaste doar în al doilea trimestru de gestație [108]. Schugar și colab. au confirmat de asemenea aceste rezultate, concomitent indicând că, regiunea perivasculară a substanței Wharton poate conține până la 45% din toate celulele stromale [40, 175]. Substanța gelatinoasă Wharton, de asemenea, mai conține cantități mici de macrofage și mastocite, care preferențial sunt localizate perivascular.

Matricea extracelulară a substanței gelatinoase este constituită din componenta fibrilară și substanța amorfă. Substanță fundamentală amorfă, repartizată printre componenta fibrilară, conține glicozaminoglicani (ex. acid hialuronic; carbohidrați cu grupe glicozil și manozil). Aproape 70% din conținutul total de GAG este reprezentat de acidul hialuronic, iar restul de 30% este constituit din: cheratan sulfat, heparan sulfat, condroitin-4-sulfat, condroitin-6-sulfat, dermatan sulfat și heparină [173].

Componenta fibrilară este constituită, în principal, din fibrele de colagen, în timp ce fibrele elastice sunt absente. Fibrele de colagen devin mai abundente și orientate circular în jurul vaselor ombilicale. Majoritatea fibrelor de colagen sunt de tip I. În 1997, Sobolewski și colab., au demonstrat prezența în substanța Wharton a unei cantități mari de colagen de tip III și a unei cantități mai mici de colagen de tip V [173]. Aproximativ 1% din întregul colagen al substanței gelatinoase este reprezentat de colagenul de tip VII, produs, în principal, de către celulele epiteliale [166]. Studiile imunohistochemice, au evidențiat că, matricea extracelulară a substanței Wharton, nu este formată doar din fibre de colagen, dar conține și o rețea microfibrilară alcătuită din fibrilină și colagen de tip VI. Această rețea microfibrilară este un element important al matricei extracelulare care susține structura și funcția celulelor din cordonul ombilical [58]. Mai mult, Nanaev și colab. în 1997, au raportat depre prezența în matricea extracelulară a proteinelor libere ale membranei bazale, cum ar fi colagenul de tip IV și laminina [143].

Cercetările recente, au constatat că matricea extracelulară a substanței Wharton conține componente similare cu cele din cartilajul articular, precum și factori de creștere specifici pentru cartilaj, cum ar fi IGF-1 și TGF- β . În plus, numeroase studii au demonstrat că, utilizarea componentelor structurale ale matricei extracelulare din substanța Wharton pentru crearea schelelor de suport în țesutul cartilaginos, poate repara cu succes defectele cartilajului articular. Aceste constatări sugerează că, substanța gelatinoasă poate fi o sursă valoroasă pentru ingineria tisulară [197].

1.2. Membrana amniotică

Amnionul, structura extraembrionară care delimitează cavitatea amniotică, denumită și membrana amniotică, este implicat în numeroase procese fiziologice, precum, secreția de factori

biologici activi, factori de creștere, citokine, în transportul apei și macromoleculilor, dar și în reglarea volumului lichidului amniotic [161]. Membrana amniotică (MA) nu conține vase sangvine și nervi, și este organizată în 2 straturi: epiteliul amniotic, localizat pe membrana bazală și stroma conjunctivă mezenchimală. Suprafața membranei este de 1600 cm², iar grosimea membranei variază de la 0,02 mm la 0,05 mm [125].

Epiteliul amniotic este simplu cubic, dar care poate deveni scuamos în apropierea locului de inserție cu placenta sau spre finele termenului de gestație. Celulele epiteliului amniotic exprimă citokeratina 7. Majoritatea celulelor sunt întunecate, iar printre ele, ocazional, se regăsesc celule clare. Nucleul celulelor este voluminos, cu contur neregulat și conține un nucleol proeminent. Citoplasma este bogată în organite celulare, precum, reticulul endoplasmatic, aparatul Golgi. Paranuclear sunt localizate veziculele de pinocitoză și de secreție. Suprafața apicală conține numeroase microvilozități, care continuă de-a lungul suprafețelor laterale a celulelor, formând canalicule intercelulare sau canale de tip labirint. Celulele sunt unite între ele prin numeroase complexe joncționale de tip desmozom și hemidesmozom. Polul bazal al celulei formează prelungiri citoplasmice de tip podocit-like [125, 153].

MA a cordonului ombilical prezintă o morfologie complet diferită de cea de la nivelul cavității amniotice. Astfel, epiteliul aici este organizat în 3-8 straturi. Celulele stratului profund sunt întunecate și conțin nucleii înconjurați de un halou perinuclear. Celulele straturilor superficiale sunt aplatizate, clare și frecvent conțin nuclei picnotici. Pe suprafața apicală a celulelor superficiale se regăsesc microvilozități scurte și largi [82, 88].

Membrana bazală a epiteliului amniotic, este una dintre cele mai groase membrane bazale a corpului uman, care conține cantități considerabile de fibre de colagen (IV, V și VII), fibronectină și laminină [125]. De asemenea, în structura membranei se regăsesc cantități notabile de proteoglicani și macromolecule structurale, așa ca: actina, spectrina, vimentina, desmoplakina, etc.

În plus, aceasta conține perlecanul, un proteoglican cu masă moleculară mare, care are un rol esențial în legarea factorilor de creștere și în interacțiunile proteinelor extracelulare responsabile de adeziunea celulară. Toate componentele structurale contribuie la menținerea integrității și permeabilității membranei bazale, și de asemenea cresc rezistența acesteia la crioconservare [107, 196].

Proprietățile biomecanice ale membranei amniotice, cum ar fi elasticitatea, rigiditatea etc., sunt determinate în mare parte de variațiile cantitative ale componentelor matricei extracelulare. Stroma membranei amniotice este organizată în 3 straturi: compact, fibroblastic și spongios [125]. Colagenii stratului compact sunt secretați de celulele mezenchimale situate în

stratul fibroblastic. Colagenii (stratului fibroblastic) interstițiali (tipurile I și III) predomină și formează fasciculele paralele care mențin integritatea mecanică a MA. Colagenii de tip V și VI formează conexiuni filamentoase între colagenii interstițiali și membrana bazală epitelială. Stratul spongios al matricei stromale se află adiacent membranei coriale. Conținutul său abundent de proteoglicani și glicoproteine produce un aspect spongios în preparatele histologice și conține o rețea nefibrilară de colagen de tip III [88]. Strâns legat de membrana corială, stratul spongios este format din mănunchiuri ondulate de plexuri fibrilare scăldate în mucină; prin urmare, MA este ușor detașată de corion.

Astfel, elasticitatea, rigiditatea și alte proprietăți biomecanice ale MA depind de variația ingredientelor sale, cum ar fi colagenul, proteoglicanul și elastina. Orientarea fibrelor de colagen în MA este responsabilă pentru rezistența la tracțiune, în timp ce deformarea elastică este legată de prezența fibrelor de elastină, laminină, acid hialuronic și glicozaminoglican [59, 128].

Unele cercetări au demonstrat că modulul de forfecare a membranei amniotice este între 100 și 400 Pa, cu diferența de măsurători legată de starea MA umană utilizată în cercetări. MA umană decelularizată prezintă un modul de forfecare mai mare decât cel nativ, deoarece procesul de denudare deshidratează membrana și astfel îi scade grosimea. De asemenea, s-a demonstrat că elasticitatea scade odată cu creșterea grosimii MA umane. Valorile de elasticitate a MA variază între porțiunile distale (135 Pa) și cele proximale (62 Pa) ale placentei. Aceste diferențe ar putea fi rezultatul variațiilor în grosimea membranei și compoziția țesuturilor [28].

Moleculele matricei extracelulare a MA umane, cum ar fi fibronectina, laminina-1, laminina-5, colagenul de tip I, III, IV, V și VII, promovează, de asemenea, aderența și migrarea celulelor [61, 120]. Deși imunogenitatea MA este controversată, în general, se crede că MA posedă imunogenitate scăzută, deoarece celulele epitelului amniotic nu exprimă antigene HLA-A,-B,-D și-DR pe suprafața celulei, ci exprimă HLA-G. Prezența interferonului și a altor factori imunogeni, de asemenea, au fost observați în membrana amniotică. Se pare că membrana amniotică poate induce reacții imunologice în prezența celulelor epiteliale viabile.

AEC-urile umane și AMSC-urile umane exprimă niveluri scăzute până la moderate ale moleculelor complexului major de histocompatibilitate clasa I (MHC1) – antigenul leucocitar uman (HLA), inclusiv antigenele Ia (HLA-A, B, C) și Ib (HLA-G, E). Mai mult, ei nu exprimă (sau exprimă doar niveluri foarte scăzute de) molecule de clasă HLA II (HLA-DP, -DQ, -DR) și molecule costimulatoare (CD80, CD86) pe suprafața celulei. Aceste proprietăți ale MA scad posibilitatea respingerii transplantului, ceea ce reprezintă un avantaj foarte important atunci când se alege materiale pentru utilizare în medicina regenerativă.

Celulele membranei amniotice posedă proprietăți pluripotente și se clasifică în: celule amniotice epiteliale (CAE), localizate pe membrana bazală, și celule amniotice mezenchimale (CAM), localizate în stratul spongios al stromei. Ambele tipuri celulare au origine epiblastică și se formează, în perioada embrionară, înaintea inițierii procesului de delaminare a discului embrionar. CAM-urile sunt derivate din mezodermul extraembrionar al liniei primitive, iar CAE-urile derivă din ectodermul embrionar, anticipând organogeneza [154, 167]. Ambele tipuri celulare sintetizează componentele matricei extracelulare, diverse citokine, chemokine și factori de creștere.

Datorită proprietăților sale de a facilita transportul apei, de a secreta factori de creștere, precum, EGF, bFGF, KGF, α TGF, NGF, etc., MA reprezintă o sursă tisulară valoroasă pentru medicina regenerativă [95]. MA umană are caracteristici avantajoase, inclusiv promovarea epitelizării, efecte antiinflamatorii, proprietăți antibacteriene, proprietăți antifibrotice, imunogenitate scăzută, precum și proprietăți imunomodulatoare, proprietăți anti-angiogene și non-tumorigenice. Membrana bazală a MA este compusă din colagen de tip IV, V și VII care facilitează creșterea celulelor epiteliale. MA umană promovează epitelizarea prin excretația EGF, IL-8, factorul de creștere asemănător insulinei 1 (IGF-1), PDGF bFGF, HGF, TGF- β și alți factori care susțin epitelizarea și diferențierea diferitelor celule [93].

Implicarea tehnologiilor de inginerie tisulară, adesea, poate provoca reacții inflamatorii cunoscute sub numele de reacții la corp străin la momentul implantării. Menționăm că, materialele implantate pot avea caracteristici degradabile sau nedegradabile. Deși inflamația poate avea un impact pozitiv în anumite situații, declanșând procesele de vindecare, există riscul ca aceasta să contribuie la eșecul implantului. În literatura de specialitate sunt raportate diverse date despre capacitatea MA de a reduce inflamația. Un rol semnificativ în inhibarea expresiei citokinelor proinflamatorii puternice, precum IL-1 și IL-1 β îi revine matricei stromale a MA. S-a observat că, metaloproteazele matriceale (MMP) sunt exprimate prin infiltrarea celulelor polimorfonucleare și macrofagelor. În MA au fost identificați, de asemenea, inhibitori naturali ai MMP.

Acidul hialuronic este un glicozaminoglican cu greutate moleculară mare care există în cantități mari în MA și acționează ca un ligand pentru CD44, care este exprimat pe celulele inflamatorii și joacă un rol important în aderarea celulelor inflamatorii, inclusiv a limfocitelor, la stroma MA [84]. S-a dovedit că IL-10 poate suprima efectul citokinei proinflamatorii IL-6 și al factorului de necroză tumorală- α . IL 10 suprimă, de asemenea, producția de IL-8, o chemokină proinflamatoare care atrage migrarea neutrofilelor. MA mai conține, un inhibitor de inter- α -tripsină, care posedă o acțiune antiinflamatoare [56, 57]. Totodată, în zonele lezate, MA exercită

acțiune de supresie și asupra unor celule inflamatorii, cum ar fi celulele polimorfonucleare, celulele CD3, celulele CD4, celulele T și celulele CD11b, scăzând astfel inflamația [84, 100]. MA conține molecule antimicrobiene naturale, care sunt parte componentă ale sistemului imunitar înăscut, acționând, astfel, ca protecție împotriva bacteriilor Gram- și Gram+, infecțiilor virale și fungice. Sistemul imunitar înăscut s-a dezvoltat pentru eradicarea microorganismelor la momentul în care acestea pătrund în țesuturi, inițiind producerea de antigene esențiale pentru generarea unui răspuns imunitar imun.

1.3. Corionul

Corionul este derivat din ectodermul trofoblastic și mezodermul extraembrionar (somatopleură). Există o asociere intimă între corion și amnion. Acesta se formează prin plierea bilaterală a somatopleurei extraembrionare. Aceasta se arcuiește dorsal față de embrion și continuă să crească. Fuziunea pliurilor corioamniotice are loc la mesamnion sau rafeul corioamniotic. Fuziunea dorsală are ca rezultat formarea a două straturi de somatopleure separate de exocelom: somatopleura exterioară devine corion și somatopleura interioară amnionul.

Astfel, corionul este căptușit de mezoderm din interior, iar amnionul este căptușit de mezoderm din exterior. Acest lucru determină orientarea trofoblastelor coriale spre endometru. Când are loc separarea completă a corionului și amnionului, exocelomul înconjoară complet amniosul.

La om, corionul este pur și simplu trofoblastul original, care devine căptușit de mezoderm somatic. În mare parte, corionul este o structură relativ avasculară, perfuzia căruia este realizată de către vasele alantoice. Porțiunea vascularizată de corion reprezintă componenta esențială a vilozităților coriale. Placenta corioalantoică este placenta funcțională permanentă la mamiferele domestice și la om, luând locul placentei corioviteline tranzitorii [85].

1.4. Placenta

Placenta umană la termen este un organ discoidal circular (ovoid) cu un diametru de cca 22 cm, o grosime centrală de 2,5 cm și o greutate medie de 470 g. Există o variație considerabilă de la placentă la placentă, care depinde foarte mult de modul de naștere. În special atunci când este planificată analiză morfometrică a placentei, factorii precum momentul și locul în care cordonul ombilical a fost clampat sunt critice, deoarece pierderea de sânge matern și/sau fetal afectează în mod clar dimensiunile placentei.

Placenta umană reprezintă un organ cu o configurație unică în cadrul corpului uman. Prezintă o structură extrem de complexă, al cărei aspect este conturat de interacțiunea dintre făt și corpul mamei [78]. În acest fel, placenta cuprinde atât suprafața fătului (placa corială), cât și

cea maternă (placa bazală), menținute împreună prin ancorarea vilozităților coriale. Aceste vilozități sunt organizate într-o serie de 30 până la 40 de lobuli sau cotiledoane, care sunt scăldate direct de sângele matern și care umple spațiul intervilos și reprezintă cele mai importante unități morfo-funcționale pentru schimbul metabolic materno-fetal [86].

Suprafața exterioară a vilozităților coriale constituie bariera principală între circulația fetală și cea maternă și este formată dintr-un strat exterior de sincitiotrofoblast și un strat interior de citotrofoblast, acesta din urmă diminuându-se pe măsură ce gestația avansează. Stroma vilozităților este compusă din capilarele fetale dilatate sinuos, încorporate în țesut conjunctiv lax, precum și din celule mezenchimale, macrofage de origine mezenchimală (celulele Hofbauer) și fibroblaste. Membrana fetală cuprinde trei straturi distincte:

1. *amnios* (cel mai intern strat). Acesta cuprinde un singur strat avascular de celule epiteliale și țesut conjunctiv care intră în contact direct cu lichidul amniotic.
2. *corion laeve*, de obicei, atrofic, este compus din țesut conjunctiv care conține vase de sânge fetale (corio-alantoice),
3. *decidua capsularis* (cel mai extern strat), care reprezintă endometrul matern modificat.

1.5. Celulele stem

Celulele stem (CS) în prezent sunt considerate celule nespecializate, dar cu un grad foarte înalt de diferențiere, multiplicare, capabile să se auto-reînnoiască și cel mai important să se diferențieze în diverse tipuri de țesuturi, astfel având un potențial terapeutic considerabil.

Celulele stem se clasifică, odată, în funcție de potențialul lor de diferențiere, dar și în funcție de localizare. Astfel celulele stem în dependență de potențialul lor de diferențiere pot fi subîmpărțite în:

1. Celule stem totipotente (zigota, morula), capabile să se diferențieze pentru a forma un organism integru.
2. Celule stem pluripotente (celule stem embrionare sau celule stem embrionare induse), au capacitatea de a se dezvolta în celulele celor trei straturi ale embrionului.
3. Celule stem multipotente (celule stem mezenchimale), posedă un spectru mai îngust de diferențiere.
4. Celule stem oligopotente (celule stem mieloide), au posibilitatea să se transforme într-un grup restrâns de tipuri celulare (toate fiind din aceeași familie).
5. Celule stem unipotente, dau naștere unui singur tip de celule [114].

În funcție de sursa de proveniență, celulele stem se clasifică în:

1. Celule stem embrionare
2. Celule stem fetale
3. Celule stem ombilicale, din
 - a. Sângele ombilical
 - b. Cordonul ombilical (substanța gelatinoasă Wharton) și placentă
4. Celule stem adulte
 - a. Celule stem mezenchimale (MSC), (localizate în aproape toate țesuturile)
 - b. Celule stem hematopoetice,
 - c. Celule stem neurale,
 - d. Celule stem epidermale,
 - e. Celule stem hepatice,
 - f. Celule stem pancreatice

Celulele stem mezenchimale au trezit cel mai mare interes în medicina regenerativă, datorită plasticității și proprietăților lor imunomodulatoare și antiinflamatorii. Ele posedă un randament ridicat de multiplicare și pot fi achiziționate prin metode neinvazive din diverse țesuturi adulte. Foarte important este de menționat că aceste celule sunt netumorigenice și sunt cele mai studiate la momentul dat [202].

Pe de altă parte, mai există și așa numitele celulele stem pluripotente induse (iPS), care sunt obținute direct din celulele embrionare sau adulte prin reprogramarea genelor, utilizând factori transcripționali (Oct3/4, Sox2, c-Myc, și KLF4). Prin utilizarea noilor tehnologii de reprogramare celulară se evită distrugerea sau manipularea embrionilor în vederea obținerii de celule pluripotente. Astfel, această abordare elimină preocupările etice legate de utilizarea celulelor stem embrionare. Pre-diferențierea celulelor iPS asigură siguranța viitoarelor abordări. Atât celulele stem mezenchimale, cât și celulele iPS pot fi utilizate pe larg pentru transplanturi de celule autologe fără riscul de respingere imună și reprezintă surse importante pentru viitoarele terapii alternative [178].

Celulele stem mezenchimale sunt ușor de colectat și de menținut în cultură, ele prezintă o multiplicare înaltă *in vitro* și sunt netumorigenice, atunci când sunt transplantate *in vivo*. Ele se pot diferenția în mai multe tipuri de celule mezodermice și pot fi utilizate pentru transplantul de celule sau ingineria tisulară. Aplicarea terapeutică a MSC prezintă multiple avantaje, deoarece aceste celule sunt recoltate cu ușurință, pot fi menținute în condiții optime fără dificultate, iar intervalul de timp dintre stabilizarea culturii celulare și utilizarea clinică este mult mai redus.

Placenta și cordonul ombilical uman reprezintă surse de celule stem cu o capacitate foarte înaltă comparativ cu alte zone. Faptul că, s-a observat că teratomul poate să se dezvolte într-o

placentă la termen, sugerează că aceasta poate conține celule germinale multipotente [106]. Multiple cercetări au dezvăluit prezența unei populații de celule stem multipotente în placenta umană, care exprimă markeri specifici pentru celulele stem, precum c-KIT, factorul de transcripție OCT4, SOX2, SSEA3, SSEA4, TRA-1-60 și TRA-1-81 [146]. Aceste celule prezintă caracteristici ale mezodermului și manifestă o notabilă abilitate de diferențiere într-o gamă variată de tipuri celulare.

În timpul dezvoltării embrionare, hematopoieza are loc în sacul vitelin și mai târziu în regiunea aorto-gonado-mesonefrică (AGM). Coloniile timpurii de celule hematopoietice și mezenchimale migrează din cordonul ombilical nou format către placentă, urmată de o a doua rundă de migrare de la placentă la ficatul fetal și în final la măduva lui osoasă. Studiile au arătat că aceste două migrații fac ca unele celule MSC rămân prinse în substanța Wharton și se păstrează acolo pe toată durata perioadei de gestație [191]. Încorporate în structura gelatinoasă a substanței Wharton, celulele MSC eliberează diverse elemente ale micromediului, precum citokine și o matrice stromală specifică, care contribuie la menținerea echilibrului populației celulare și susținerea funcționalității acestora [7]. Prezența celulelor mezenchimale stem în CO este caracteristica cheie a proprietăților sale regenerative [97, 186].

Celulele membranei amniotice (AMC) au mai multe caracteristici specifice, ceea ce le permit să fie o sursă celulară substanțială pentru terapia cu celule stem. AMC-urile prezintă aderență plastică și morfologie fibroblastică, în timp ce celulele epiteliale amniotice (AEC-urile) sunt caracterizate printr-un fenotip epitelial pietruit. Una dintre cele mai frecvente proteine găsite în celulele derivate din MA este laminina, care joacă un rol cheie în diferențiere, forma și migrarea celulelor, precum și regenerarea țesuturilor.

AMC-urile sunt pozitive pentru numeroși markeri specifici mezenchimali, inclusiv CD44, CD73, CD29, CD105 și CD90 și nu exprimă markerii hematopoietici și a antigenul leucocitar uman, inclusiv antigenele CD34, CD45, CD11b, CD19, HLA-A, HLA-B și DR [105]. AMC-urile secretă, la fel, unele citokine antiinflamatorii, cum ar fi PGE2,IDO, HGF și TGF-b [98]. AMC-urile promovează angiogeneza prin secreția unor factori angiogeni, cum ar fi angiogenina, factorul de creștere endotelial vascular (VEGF) și factorul de creștere derivat din trombocite (PDGF) [87]. Analiza RT-PCR a arătat că AMC-urile exprimă gene, cum ar fi Oct-3/4, proteina zfp42 sau Rex-1, proteina factorului de celule stem (SCF), moleculă de adeziune a celulelor neuronale (NCAM), nestin (NES), proteina morfogenetică osoasă 4 (BMP-4), proteina de legare GATA 4 (GATA-4) și factorul nuclear hepatocitar 4 α (HNF-4 α), chiar și în cantități crescute [105, 152]. Celulele mezenchimale amniotice prezintă trăsături fenotipice similare cu cele obținute din sursele de celule adulte. AMC-urile manifestă rate de proliferare mai mare în

comparație cu MSC-urile derivate din sursele adulte și, de asemenea, prezintă potențial de diferențiere pe multiple linii celulare (mutipotent) în celule derivate din cele trei straturi germinale [152].

Caracteristicile specifice ale AEC-urilor conferă acestor celule un potențial valoros pentru a fi considerate sursă importantă de celule stem pluripotente [145]. Populația de celule epiteliale ar putea fi izolată exclusiv din amnionul placentei umane la termen, prin digestie enzimatică specifică. A fost demonstrat că, AEC cultivate secretă diverși factori de creștere, cum ar fi factorul de creștere epidermic, Noggin, Activin, factorul de creștere derivat din trombocite, factorul de creștere endotelial vascular, angiogenina, factorul de creștere transformator-beta-2 (TGF- β 2) și inhibitori tisulari ai metaloproteinazelor (TIMP-1 și TIMP-2) [110, 182]. AEC-urile exprimă markeri de suprafață întâlniți în mod obișnuit în celulele stem embrionare, cum ar fi SSEA-3, SSEA-4, TRA1-60, TRA-1-81 și factori de transcripție specifici celulelor stem pluripotente, cum ar fi Oct-4 și Nanog, factorul de creștere a fibroblastelor 4 (FGF4), Rex-1, proteină criptică (CFC-1) și prominină 1 (PROM-1). AEC-urile exprimă antigenul leucocitar uman nepolimorf, neclasic (HLA-G), care este implicat în inducerea toleranței imune. Prin urmare, riscul de respingere sau de reacție imună va fi mult redus în transplantul de AEC. AEC-urile exprimă inhibitorul secretor al proteinazei leucocitelor (SLPI) și elafina care au proprietăți antiinflamatorii. În plus, ambele fac parte din sistemul imunitar înăscut al amnionului, care previne infecția. AEC-urile produc de asemenea β -defensine, peptide antimicrobiene [131, 165]. Un alt merit al AEC-urilor este numărul de celule derivate dintr-o singură sursă de țesut. Randamentul mediu este raportat a fi mai mult de 100 de milioane de celule per amnion.

Aceste celule manifestă o capacitate redusă de a declanșa reacții imune, ceea ce le oferă o protecție împotriva răspunsului imunitar al organismului gazdă [113]. Deși AEC-urile scad angiogeneza, AMC-urile sunt capabile să îmbunătățească angiogeneza prin exprimarea unor componente angiogene, cum ar fi interleukin-6 (IL-6), oncogena asociată creșterii (GRO), proteina chemoattractantă monocitară-1 (MCP1), C-C Motif Chemokine Ligand 8 (CXCL8), molecula de adeziune intracelulară (ICAM) și factorul inhibitor al migrației [87].

1.6. Medicina regenerativă - grefarea tisular-organică

Ingenieria 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.

În ciuda faptului că definițiile ingineriei tisulare predominante acoperă o varietate largă de domenii, în practică, acest termen este strâns legat de aplicațiile care se concentrează pe reparația sau înlocuirea părților de țesut sau chiar a întregilor structuri (cum ar fi osul, cartilajul, vasele de sânge, vezica urinară, pielea, mușchii etc.). Adesea, aceste țesuturi trebuie să îndeplinească cerințe mecanice și structurale specifice pentru a funcționa corect. Termenul *medicina regenerativă* este deseori considerat ca sinonim cu ingineria tisulară, deși cei implicați în medicina regenerativă pun un accent mai mare pe utilizarea celulelor stem sau a celulelor progenitoare pentru a genera țesuturi noi.

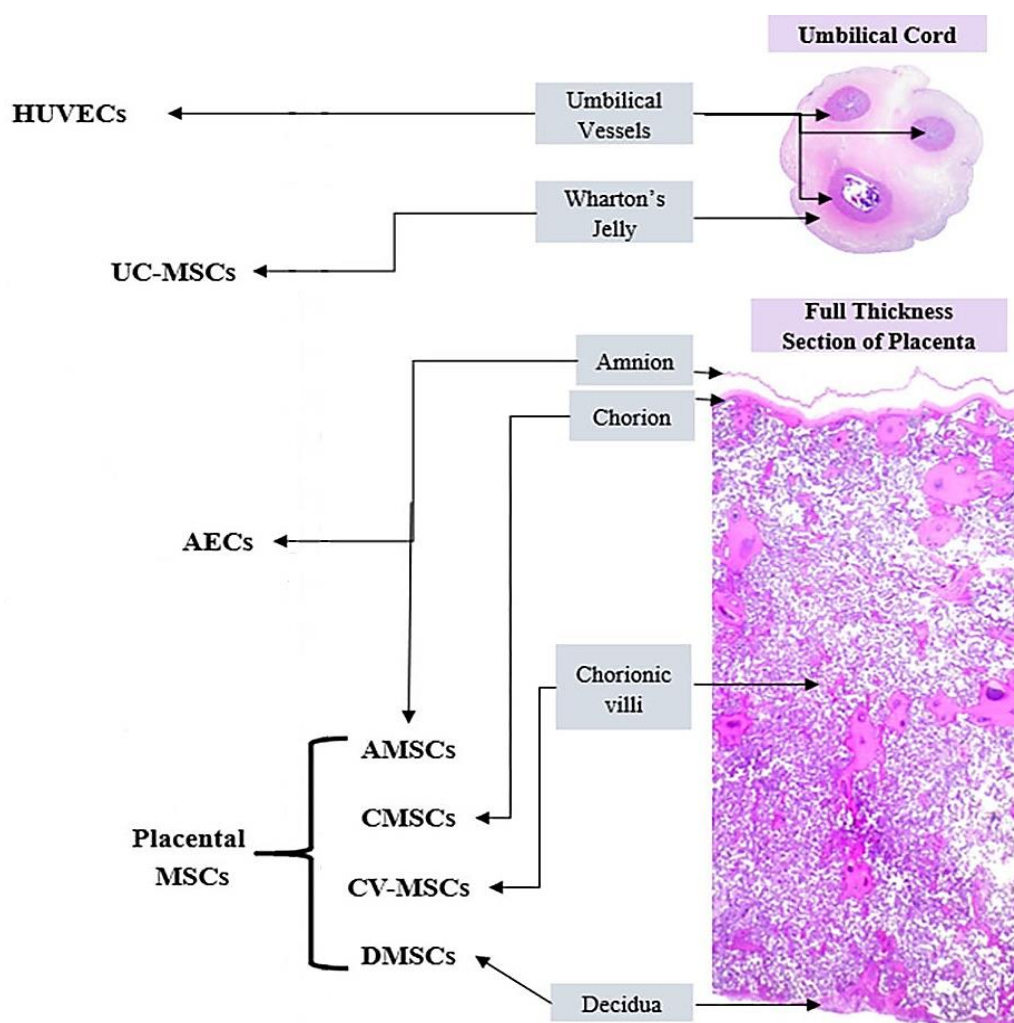


Fig. 1.2. Originea celulelor stem din placenta și cordonul ombilical. AEC - celule epiteliale amniotice; MSCs - celule mezenchimale stromale/stem amniotice; CMSCs - celule mezenchimale stromale/stem corionice; CV-MSC - celule mezenchimale stromale/stem din vilozități corionice; DMSC - celule mezenchimale stromale/stem deciduală; UC-MSC - celule mezenchimale stromale/stem din cordonul ombilical [29]

Definiția comună pentru ingineria tisulară, conform descrierii prezentate de Langer și Vacanti [115] este ca fiind „*un domeniu interdisciplinar care integrează conceptele și principiile ingineriei și științelor exacte în vederea dezvoltării substituenților biologici, care pot repara, menține sau îmbunătăți funcționalitatea unui țesut sau a unui organ întreg*”. Mai mult, conform Langer și Vacanti [115], sunt identificate trei categorii majore în domeniul ingineriei țesuturilor: utilizarea celulelor, substanțele care stimulează dezvoltarea țesuturilor și o strategie combinată ce implică atât celule, cât și matricea extracelulară (frecvent denumită schelă). Ingeria tisulară a fost, de asemenea, definită ca „*înțelegerea principiilor creșterii țesuturilor și aplicarea acestora pentru a produce țesut funcțional de înlocuire pentru uz clinic*”. O premisă fundamentală a ingineriei țesuturilor constă în ideea că exploatarea mecanismelor biologice naturale ale organismului va conduce la o mai mare eficacitate în conceperea strategiilor terapeutice menite să realizeze obiective precum înlocuirea, repararea, menținerea sau îmbunătățirea funcției țesuturilor.

Progresele în cadrul domeniului multidisciplinar al ingineriei tisulare au generat o serie nouă de componente pentru substituirea țesuturilor și abordări strategice de aplicare. Realizările științifice în domeniile biomaterialelor, celulelor stem, factorilor de creștere și diferențiere, precum și în dezvoltarea de medii biomimetice, au creat oportunități remarcabile pentru a produce sau îmbunătăți țesuturile existente în mediu de laborator, prin combinarea matricelor extracelulare ("schele"), celulelor și moleculelor biologice active. 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 [25].

În prezent, biomaterialele joacă un rol central în inovațiile medicale, în special în tratamentul traumatismelor și afecțiunilor cardiovasculare. Ingeria 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 biomateriale cu compuși celulari.

Biomaterialele sunt aplicate într-o gamă largă de proceduri chirurgicale, inclusiv în tratarea traumatismelor, patologiilor cardiovasculare și oftalmologice. Această sferă multidisciplinară implică domenii, precum științele fizice și chimice, ingineria, biologia și medicina. Termeni precum "Ingerie Biologică și Medicală", "Ingerie Tisulară" și "Ingeria Sănătății" sunt tot mai des utilizați pentru a caracteriza această abordare comprehensivă.

Conceptul de biocompatibilitate este fundamental în utilizarea biomaterialelor și se definește ca abilitatea unui material de a interacționa armonios cu răspunsul biologic al organismului într-un anumit context aplicativ. Ingeria tisulară se concentrează pe reconstrucția

sau regenerarea țesuturilor și organelor umane, folosind celule vii sau biomateriale sintetice sau naturale. Aceasta implică substituirea țesuturilor deficitare sau modificarea genetică a organismului.

În contextul bolilor cardiovasculare, care rămân o problemă majoră de sănătate publică, există o nevoie continuă de dezvoltare a protezelor arteriale și venoase. În prezent, rezultatele pentru reamplasările vaselor mici sau venelor nu sunt foarte favorabile, deoarece acestea pot fi predispuse la ocluzie și scăderea fluxului vascular. Îmbunătățirea protezelor cu o suprafață internă netrombogenă și ușor de implantat, rămâne un obiectiv important [48].

Două abordări principale au fost dezvoltate în ultimii ani. Prima constă în menținerea permeabilității vasculare pentru a permite dezvoltarea unui endotelium vascular pe suprafața internă a protezei, astfel încât să fie netrombogenă. Cu toate acestea, endotelializarea spontană este limitată la oameni, spre deosebire de animale. A doua abordare implică crearea de grefe vasculare utilizând ingineria tisulară, fie prin tehnici *in vitro*, fie *in vivo*, pentru a obține o structură și o funcționalitate similare vaselor native. Boala cardiovasculară rămâne principala cauză de deces la nivel global, iar tratamentul revascularizării vaselor ocluzate se bazează în mare măsură pe utilizarea grefelor vasculare, cum ar fi grefa de bypass coronarian și grefa de bypass periferic. Cu toate acestea, grefele autologe disponibile, cum ar fi vena safenă și artera toracică internă, sunt limitate în cantitate, necesită recoltare invazivă și nu sunt întotdeauna potrivite pentru utilizare [155].

Bypass-ul vascular reprezintă o procedură care implică redirectionarea fluxului sangvin prin reconectarea vaselor de sânge pentru a trata afecțiunile cauzate de fluxul sangvin inadecvat. Grefa vasculară, în special vena proprie a pacientului, este preferată în acest proces, dar alte materiale, cum ar fi politetrafluoretilena (Teflon), polietilen tereftalat (Dacron) sau venele altor persoane, pot fi, de asemenea, utilizate. Integritatea structurală a schelelor polimerice utilizate în bypass vascular se pierde în primele 26 de săptămâni, iar fragmentele polimerice persistă timp de până la 52 de săptămâni. Se observă că acumularea timpurie de neo-țesut este inițial indusă de reacția inflamatorie a corpului la schelele polimerice implantate, dar devine ulterior mecano-mediată pe măsură ce schelele se degradează.

Pe măsură ce schelele se degradează, remodelarea țesutului neo-format devine procesul dominant care devine evident în jurul săptămânii 26. Odată ce degradarea structurilor de suport este finalizată, structura vasculară nou formată suferă o creștere și remodelare similare cu cea a vaselor naturale, inclusiv capacitatea de creștere biologică. Simulările de interacțiune fluid-structură furnizează informații detaliate despre stresul hemodinamic și al peretelui vascular, susținând în continuare comportamentul și dezvoltarea vasului rezultat [19].

Cele mai frecvente zone supuse intervențiilor de bypass sunt: cordul (procedura de bypass coronarian) pentru tratarea afecțiunilor coronariene și membrele inferioare, unde operația de bypass la nivelul extremităților inferioare este utilizată pentru gestionarea patologiilor vasculare periferice.

1.7. Ingineria tisulară - grefarea celulară

Celulele reprezintă un element esențial pentru succesul abordărilor de ingineria tisulară. În acest domeniu, celulele sunt utilizate ca strategii pentru geneza țesuturilor noi sau înlocuirea celor afectate. Drept exemple sunt datele despre utilizarea: fibroblastelor pentru regenerarea pielii, condrocitelor pentru repararea cartilajelor (produsul aprobat de către MACI-FDA) și hepatocitelor în cadrul sistemelor de suport pentru funcționalitatea hepatică.

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 [187].

Conform clasificării 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. Sistemul imunitar al organismului recunoaște aceste celule reintroduse ca fiind proprii și nu le atacă. Utilizarea celulelor autologe poate fi descurajată de dependența acestora de sănătatea celulei gazdă și de posibila morbiditate asociată cu procesul de donare. Celulele stem mezenchimale derivate din țesutul adipos sau din măduva osoasă sunt de obicei autologe și pot fi utilizate într-o varietate de moduri, inclusiv în asistarea regenerării țesutului osos sau în refacerea celulelor beta la pacienții diabetici [8].

Celule alogene: Celulele sunt prelevate din corpul unui donator care este de aceeași specie ca și primitorul. Deși, există restricții etice în ceea ce privește utilizarea celulelor umane în studii *in vitro*, utilizarea fibroblastelor dermice prelevate din prepuțul uman este considerată o opțiune sigură, din punct de vedere imunologic și, prin urmare, o opțiune viabilă pentru ingineria țesuturilor cutanate alogene [52].

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. Totuși, utilizarea hibridizării

om-animal în medicină ridică preocupări etice legate de potențialul de îmbunătățire a conștiinței prin intermediul implantării de organe umane la animale [20].

Celule singeneice sau izogenice 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 [74].

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 [49, 89, 151].

Unul dintre avantajele utilizării MSC în terapia celulară și bioinginerie este absența problemelor etice asociate cu utilizarea celulelor embrionare. MSC se pot obține și conserva ușor, iar compatibilitatea lor imună este ridicată, datorită faptului că donatorul este componenta extraembrionară, nu omul în sine. De asemenea, MSC pot fi stocate pentru a forma bănci de celule stem proprii. Mecanismele exacte prin care acționează MSC nu sunt pe deplin înțelese. Se crede că MSC exercită efecte benefice prin diferențierea în țesutul specific din mediul în care sunt transplantate, repararea micro-mediului tisular, secreția de factori de creștere și citokine, precum și reorganizarea matricei extracelulare.

Sângele din cordonul ombilical a fost intens studiat, dar există cercetători care sugerează că majoritatea celulelor MSC se găsesc în țesuturile complexului ombilico-placentar. În special, substanța gelatinoasă Warton. De asemenea, MSC găsite în amnion posedă un potențial de diferențiere larg dând naștere la o varietate de linii celulare și au fost considerate de către Biserica catolică ca "viitorul medicinei", care condamnă cercetarea științifică ce utilizează embrionii în experiențe sale [68].

Utilitatea celulelor stem mezenchimale a fost demonstrată într-o serie de patologii, oferind perspective promițătoare în domeniul terapiei celulare. Aceste patologii includ:

Patologia cardiovasculară: Injectarea celulelor MSC în zonele ischemice ale inimii a dus la diferențierea celulelor cardiace, endoteliale și miocite, determinând remodelarea miocardului și repararea vaselor prin neoangiogeneză [148].

Patologia osoasă și cartilajinoasă: MSC sunt utilizate cu succes în tratamentul osteogenezei imperfecte și în reparația țesutului osos și cartilajinos, inducând activitatea

pericitelor și având capacitatea de a migra, prolifera și se rediferenția în aceste zone de reparație [142].

Patologia renală: MSC sunt studiate în boli renale cu componente inflamatorii, imune și autoimune. Rezultate promițătoare au fost observate în tratarea patologiei glomerulare și tubulare renale, iar celulele stem mezenchimale locale sau transplantul de MSC alogene sunt utilizate pentru restaurarea funcției renale [141, 157].

Patologia pielii: MSC prezintă un potențial mare în repararea țesutului cutanat în cazul plăgilor de origine inflamatorie sau traumatică. Studiile arată că celulele stem mezenchimale din foliculii părului pot contribui la regenerarea părului, glandelor sudoripare, glandelor sebacee și a epidermei [51].

Patologia nervoasă: MSC sunt studiate în terapia afecțiunilor sistemului nervos central și periferic, inclusiv în bolile neurodegenerative, patologii vasculare, ischemice și traumele cerebrale și spinale. MSC promovează formarea factorului neuronal de creștere, reduc apoptoza și îmbunătățesc conexiunile sinaptice ale neuronilor afectați [168, 194].

Patologia pulmonară: În sindromul de detresă respiratorie acută, MSC sunt utilizate pentru a stabiliza și remodela țesutul pulmonar afectat de inflamație și fibrozare, promovând, de asemenea, repararea vasculară și regenerarea epitelială [149].

Diabetul zaharat: Studiile clinice au arătat o reducere semnificativă a nivelului de glucoză în sânge în diabetul zaharat de tip I la pacienții tratați cu MSC. Celulele stem mezenchimale din cordonul ombilical pot forma insule de celule producătoare de insulină și au un efect imunoreglator care inhibă acțiunea citokinelor pro-inflamatorii [79].

Boli autoimune: MSC prezintă acțiuni imunosupresoare și au fost utilizate în tratamentul unor afecțiuni autoimune precum scleroza multiplă, artrita reumatoidă și lupusul eritematos sistemic, fie singure, fie în combinație cu terapiile tradiționale [27].

Studiul și înțelegerea subtilităților structurale ale complexului ombilical placentar sunt esențiale pentru aplicarea și dezvoltarea ulterioară a acestor terapii în medicina practică.

Mai multe categorii de celule stem au fost investigate pe scară largă în ultimele decenii, cum ar fi celulele stem embrionare (ESC), celulele stem fetale și celulele stem somatice/adulte. Cu toate acestea, achiziționarea de ESC-uri pluripotente care a implicat distrugerea unui embrion în curs de dezvoltare și utilizarea celulelor stem fetale din țesutul fetal avortat/viu a pus însă unele implicații etice și legale [119]. Mai mult, aceste ESC pluripotente și, eventual, celule stem fetale care posedă proprietăți oncogene similare cu celulele stem canceroase ridică o problemă majoră de siguranță, deoarece aceste celule pot suferi o diferențiere nedorită și prezintă un risc de transformare malignă după transplant [188]. De exemplu, teratomul in vivo atunci când este

grefat la șoareci cu imunodeficiență combinată severă [180].

Comparație *in vitro*

Celulele stem recoltate din măduva osoasă sunt considerate ca fiind standardul de aur și cea mai bine caracterizată sursă de celule stem multipotente la adulți, pentru utilizare în diverse intervenții medicale. Cu toate acestea, procesul de obținere a MSC din măduva osoasă implică o procedură invazivă cu potențial risc de complicații. De asemenea, este important de menționat că, cantitatea de celule MSC din măduva osoasă tinde să scadă odată cu înaintarea în vârstă a donatorului. În comparație cu donatorii mai tineri (sub 40 de ani), MSC-urile obținute de la donatorii mai în vârstă au prezentat colonii de dimensiuni mai mici și o densitate celulară totală redusă [63].

Atât celulele mezenchimale placentare (P-MS), cât și celulele mezenchimale provenite din cordonul ombilical (UC-MS) reprezintă alternative excelente în comparație cu celulele mezenchimale provenite din măduva osoasă (BM-MS). Celulele mezenchimale placentare prezintă o structură morfologică similară și împărtășesc anumiți markeri de suprafață și markeri legați de pluripotență cu cele din măduva osoasă. Ceea ce este remarcabil este că celulele mezenchimale din sângele cordonului ombilical au avantaje adiționale în comparație cu cele din măduva osoasă. De exemplu, s-a observat frecvența mai mare a coloniilor de fibroblaste formate în cazul celulelor nucleate din cordonul ombilical (1:1609) în comparație cu celulele nucleate din măduva osoasă (1:35700) [122].

S-a observat o imunogenicitate mai redusă în cazul celulelor mezenchimale din sângele cordonului ombilical în comparație cu cele din măduva osoasă (BM-MS), prezentând niveluri inferioare de proliferare a limfocitelor în urma testului de stimulare alogenică a limfocitelor. De asemenea, UC-MS-urile au efect imunomodulator global mai mare, evidențiind o exprimare crescută a factorilor imunosupresori puternici, precum CD200, LIF și TGF- β 2 [99]. Studiul *in vitro*, a constatat că UC-MS-urile trec printr-un proces de îmbătrânire mai lent, prezentând o rată mai mare de proliferare celulară și efecte antiinflamatorii mai pronunțate în comparație cu BM-MS [94]. Cu toate acestea, există încă provocări în înțelegerea heterogenității populațiilor celulare izolate și în standardizarea diverselor protocoale de izolare și a condițiilor de cultură asociate.

S-a observat că P-MS-urile prezintă o rată de dublare a populației mai rapidă și pot să se extindă pe termen lung (până la 15 serii mitotice) în condiții identice de cultură în comparație cu BM-MS. În cultură, P-MS-urile sunt distribuite mai omogen comparativ cu BM-MS-urile. Acest lucru se explică prin faptul că P-MS-urile sunt celule mai tinere, cu o expunere redusă la substanțe nocive, precum oxidanți, substanțe chimice și/sau biologici, factori de stress fizic, ceea

ce contribui la eficacitate și siguranță mai mare în aplicațiile terapeutice ale P-MSC în medicina regenerativă [9, 22]. Îmbunătățirea integrării P-MSC în țesutul deteriorat poate fi realizată prin creșterea exprimării moleculei de adeziune VLA-4 (antigen-4 foarte târziu) pe P-MSC în comparație cu BM-MSC, favorizând astfel aderența și migrarea celulelor prin endoteliu. De asemenea, un avantaj important al P-MSC față de BM-MSC și față de celulele stem derivate din țesutul adipos constă în capacitatea lor de a fi obținute folosind o metodă neinvazivă și în cantități mult mai mari [99, 185]. Cercetările lui Di Bernardo și colab. au evidențiat că P-MSC-urile au jucat un rol esențial ca stimulatori puternici ai morfogenezei pulmonare perinatale într-un model de cultură ex-vivo pentru plămâni fetal, în comparație cu BM-MSC [41].

Comparație *in vivo*

Eficacitatea terapeutică a BM-MSC a fost investigată în modele experimentale pe leziuni pulmonare la animale adulte și nou-născute. Tian și colab. [181] au raportat o îmbunătățire semnificativă a numărului alveolar și o reducere a citokinelor inflamatorii pulmonare la modelul de șoareci hiperoxici după injectarea intravenoasă de BM-MSC. Descoperirile lor au fost confirmate de alte studii pe modele de șobolani hiperoxici. Inocularea intra-traheală a BM-MSC în plămânii de șobolan neonatal hiperoxic a demonstrat că conferă protecție cu angiogeneză vasculară pulmonară crescută, hipertensiune pulmonară redusă și structuri alveolare normalizate. În schimb, administrarea intranasală a BM-MSC la modelul de leziune pulmonară la șoareci nou-născuți nu a reușit să realizeze reconstrucția epitelială și transdiferențierea în celulele epiteliale respiratorii. Până în prezent, eficacitatea BM-MSC în modelele BPD animale mai mari, cum ar fi mieii prematuri, porcii și babuinii, nu a fost explorată [60].

1.8. Sinteză la capitolul 1

Complexul ombilico-placentar reprezintă o serie de structuri temporare care se dezvoltă în afara embrionului în timpul embriogenezei. Acesta cuprinde cordonul ombilical, amnionul, sacul vitelin, alantoida, corionul și placenta, toate având funcții esențiale pentru dezvoltarea normală a embrionului. Cu toate că în trecut aceste componente au fost neglijate, în prezent ele atrag un mare interes în medicina regenerativă și ingineria țesuturilor.

Cordonul ombilical, o structură tubulară care conectează fătul de placenta, este deosebit de important în acest sens. El asigură circulația sângelui între făt și mamă și conține celule stem mezenchimale cu potențial de diferențiere multiplu.

Membrana amniotică, care delimitează cavitatea amniotică, și corionul sunt alte componente ale COP. Acestea sunt implicate în numeroase procese fiziologice și au potențialul de a fi utilizate în ingineria tisulară și medicina regenerativă. De exemplu, membrana amniotică

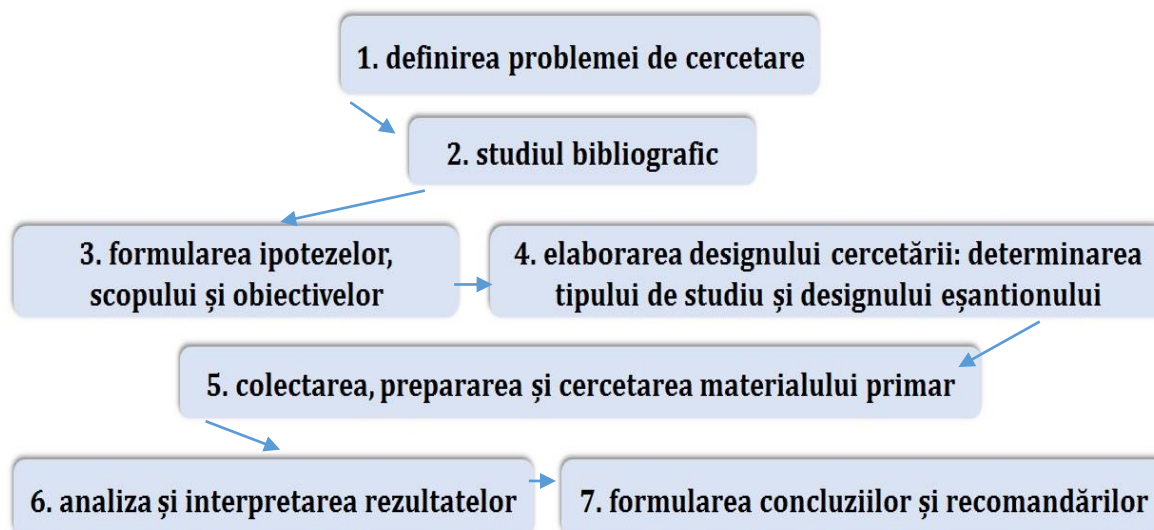
produce factori de creștere și citokine care pot stimula regenerarea țesuturilor.

Ingineria tisulară reprezintă o specialitate interdisciplinară care combină principiile ingineriei cu științele vieții, pentru a dezvolta și utiliza substituenți biologici care pot restaura, menține sau îmbunătăți funcția țesuturilor și organelor umane. Studiile asupra componentelor complexului ombilico-placentar au deschis noi perspective pentru dezvoltarea terapiilor 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.

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

Studiul dat a fost realizat conform metodologiei existente pentru cercetarea în domeniul ingineriei tisulare și urmând recomandările actuale ale cercetării științifice moderne. Procesul de cercetare s-a desfășurat în mai multe etape, care au inclus:



Pentru a determina problema și a stabili tema de cercetare, inițial, au fost analizate sursele bibliografice relevante. Urmare informațiilor acumulate au fost formulate ipotezele de lucru, scopul și obiectivele studiului.

Pentru a interpreta corect datele și a formula concluziile, s-a realizat o analiză statistică a datelor, folosind metode specifice. Astfel, s-a efectuat statistica descriptivă pentru datele cantitative, care a inclus calcularea indicatorilor tendinței centrale și a variației. De asemenea, s-a realizat statistica descriptivă pentru datele calitative, prin calcularea proporțiilor și rapoartelor. Pentru a formula concluziile, s-a folosit și statistica inferențială, prin calcularea testelor parametrice și neparametrice și stabilirea pragurilor de semnificație.

În ansamblu, acest studiu a respectat etapele esențiale ale cercetării științifice și a folosit o metodologie riguroasă pentru a obține rezultate valide și înțelese corect, permițând formularea de concluzii și recomandări relevante în domeniul cercetat.

2.1. Obiectul de studiu

Studiul a fost primar, descriptiv și observațional de tip transversal. De asemenea acest studiu a inclus și partea experimentală. Scopul și obiectivele studiului au fost axate pe cercetarea particularităților morfologice ale componentelor fibrilare și celulare din componența organelor complexului ombilico-placentar, precum cordonul ombilical, placenta, membrana amniotică. Astfel, prin utilizarea unei abordări descriptive și observaționale, au fost obținute informații detaliate despre morfologia specifică a cordonului ombilical și placentei, contribuind

astfel la înțelegerea utilității acestora drept sursă de grefare celulară și tisulară. Partea experimentală 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.

Materialul biologic a inclus cordonane ombilicale și placentele umane, rezultate în urma nașterilor *per vias naturalis* normale, în secția de obstetrică din cadrul IMSP Institutul Mamei și Copilului din Republica Moldova, în perioada 2012-2013. Pentru selectarea materialului de cercetare au fost aplicate criteriile de includere, precum:

- intervalul de timp nu mai mult de 10 ore dintre colectarea complexului ombilico-placentar și sfârșitul procedurii de naștere (*cordoanele și placentele care au ajuns în laboratorul nostru după o perioadă de 10 ore nu au fost acceptate*),
- vârsta mamei cuprinsă între 20-40 ani (*pentru a minimaliza acțiunea directă și indirectă a patologiilor asociate legate de vârstă*);
- sarcină la termen – 36-41s.g. (*pentru a exclude modificările asociate legate de prematuritate*);
- sarcini ce au decurs fără complicații până la procedura de naștere;
- cordonane ombilicale și placentele fără deteriorări mecanice survenite în timpul colectării, transportului sau tăierii cordonului ombilical.

La sfârșitul procedurii de naștere, cordonanele ombilicale erau transectate la aproximativ 5-7 cm de la peretele abdominal al fătului. Partea de cordon de la capătul transectat până la inserția placentară a fost preluată pentru cercetare. Urmare selectării materialului biologic colectat, în cercetare au fost incluse 56 cordonane ombilicale și 26 placentele (Tabelul 2.1).

Tabelul 2.1. Caracterizarea materialului biologic inclus în studiu

Vârsta mamei (ani) Media (X) ± DS	Termenul de gestație <i>(săptămâni)</i> Media (X) ± DS	Numărul de cordoane ombilicale	Numărul de placentele
27,82 ± 4,64 (20-40)	38,29 ± 1,79 (36-41)	56	26

După colectare, cordonanele ombilicale și placentele au fost plasate într-un recipient de plastic opac cu soluție fiziologică și introduse în frigider la temperatura +4° C până când au putut fi transportate la laborator. Transportarea pieselor biologice a fost efectuată aproximativ în primele 3-8 ore după naștere (5,45±1,56). Pentru îndepărtarea excesului de sânge, cheagurilor și/sau a altor bride tisulare, în laborator, materialul biologic a fost spălat cu soluție de fosfat de sodiu tamponat (PBS), pH 7,4.

Pentru realizarea studiului dat au fost utilizate metode de cercetare precum: metode de inginerie tisulară, metoda pentru obținerea preparatelor de coroziune, metode histologice și histochimice, metode imunohistochimice, metode de cuantificare a structurilor histologice, iar materialul biologic a fost repartizat în funcție de specificul fiecărei metode.

2.2. Metodele de inginerie tisulară

Anterior procedurii de decelularizare, din cordonul ombilical au fost izolate prin disecție exactă, cu instrumente sterile, vasele ombilicale. Ulterior, pe o lungime medie de 20-30 cm, din jurul vaselor, a fost înlăturată substanța gelatinoasă Wharton, iar cele două artere intacte au fost separate de vena ombilicală (Figura 2.1).



Fig. 2.1. a) Piesa cordonul ombilical înainte de disecție; b) arterele și vena ombilicală după separare și înlăturarea substanței gelatinoase Wharton

Arterele ombilicale obținute au fost divizate în două grupuri: artere supuse decelularizării și artere nedecelularizate, care au format grupul martor. Toate arterele selectate pentru procedeul de decelularizare au fost plasate, inițial, în soluție de fosfat de sodiu tamponat pentru 30 minute.

2.2.1. Metodele de decelularizare

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. Astfel, decelularizarea arterelor a fost executată atât din interiorul (prin îndepărtarea continuă a resturilor celulare), cât și exteriorul vasului (acțiunea directă a soluției). Această dublă acțiune a permis scurtarea timpului de decelularizare, de la 24 ore la 3,5 ore, și minimalizarea efectelor dăunătoare asupra componentelor matricei extracelulare.

Metoda chimică a constat în tratarea vasului cu soluție de 1% dodecil sulfat de sodiu tamponat (SDS). Prin metoda enzimatică vasele au fost tratate cu soluție tamponată de 0,25% tripsină și 0,01% EDTA-acid. Metoda combinată a constat în tratarea vasului atât cu componenta enzimatică, cât și cea chimică. Astfel, această metoda a constat din 2 etape consecutive:

- prima etapă a inclus tratarea segmentelor arteriale cu soluție de 0,25% tripsină și 0,01% EDTA-acid. Cea din urmă leagă ionii Ca^{2+} și Mg^{2+} , care au un efect inhibitor asupra tripsinei. După 30 minute, segmentele arteriale au fost spălate repetat cu soluție de fosfat de sodiu tamponat.
- etapa a doua a constat în tratarea vasului cu soluția de detergent de 1% SDS. Această etapă a durat 3 ore, iar la final, pentru eliminarea agentului chimic, segmentele tisulare au fost spălate bine cu soluție de fosfat de sodiu tamponat.

Fiecare arteră ombilicală decelularizată, cât și arterele nedecelularizate au fost secționare în segmente de 5 cm lungime. Pentru evidențierea calității metodei de decelularizare segmentele de artere decelularizate, cât și cele nedecelularizate (lotul martor) au fost supuse examenului morfologic microscopic (colorațiile: Hematoxilină-Eozină și Tricrom Masson). Pentru evidențierea proprietăților biologice și biomecanice ale vaselor decelularizate au fost aplicate testele de rezistență la întindere și la presiune.

2.2.2. Testul de rezistență la întindere

Pentru acest test s-au utilizat 60 segmente de artere ombilicale. Acestea au fost repartizate a câte 20 segmente pentru fiecare metodă de decelularizare și 20 segmente tisulare nedecelularizate pentru lotul martor. Pentru testarea forței de tracțiune a fost utilizat un dinamometru mecanic, cu capacitatea maximă – 5N, și un sistem de fixare. Segmentele de artere au fost întinse până la rupere, iar forța de tracțiune a fost înregistrată.

2.2.3. Testul de rezistență la presiune

Pentru această testare s-a utilizat dispozitivul de pompare a aerului "SANGVINOTEST" ilustrat în Figura 2.2. Presiunea maximă a volumului de aer format și înregistrat de dispozitiv a fost de 280 mmHg, cu o precizie de $\pm 0,2$ mmHg. Testările au fost supuse segmentele de artere decelularizate, cât și cele intacte din lotul martor. Astfel, un capăt al arterelor era conectat la

dispozitivul de pompare al aerului, iar celălalt capăt a fost clampat. Aerul a fost pompat până la indicarea valorilor maxime și/sau ruperea vasului cu înregistrarea digitală ulterioara a presiunii maxime de pe ecranul dispozitivului.

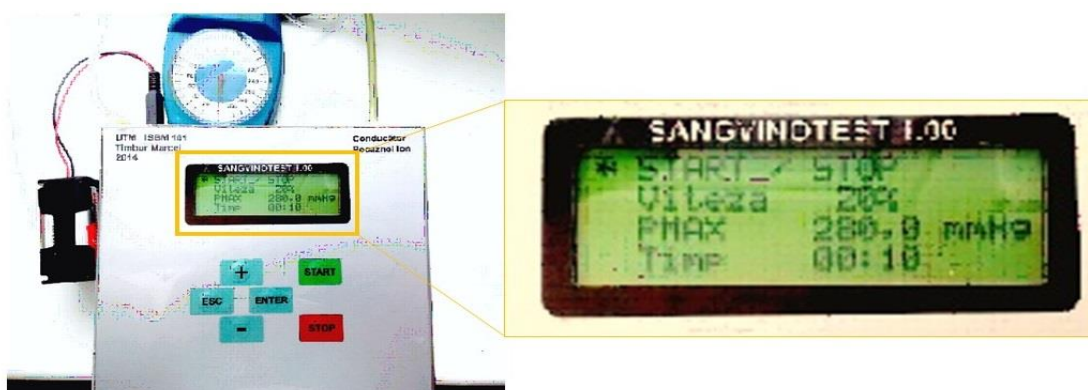


Fig. 2.2. Dispozitivul de pompare a aerului "SANGVINOTEST" utilizat în testarea arterelor ombilicale decelularizate la rezistența la presiune

Toate segmentele de artere ombilicale supuse testării la presiune au fost studiate microscopic, pentru evidențierea modificărilor post-testare a componentei colagenice al peretelui arterial.

Tabelul 2.2. Cantitatea materialului cercetat histologic (artere ombilicale) post testare la presiune

Metoda histologică	Segmente de artere intacte	Segmente de artere decelularizate prin metoda chimică	Segmente de artere decelularizate prin metoda enzimatică	Segmente de artere decelularizate prin metoda combinată
Colorație hematoxilină eozină	20	20	20	20
Colorație tricrom Masson	20	20	20	20

2.3. Metodele histologice

Pentru toate metodele histologice și imunohistochimice, procesarea primară a materialului a implicat pași similari, inclusiv fixare, dehidratare și includere. Specimenele cu țesut placentar și cordoane ombilicale au fost fixate în formalină tamponată 10% timp de 48 de ore. Apoi, acestea au fost incluse în parafină conform unei metode standard. Utilizând microtomul rotativ Leica RM2245 (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK), din fiecare bloc de parafină au fost obținute secțiuni cu grosimea de 5μm, care au fost montate pe lame histologice obișnuite și silanate.

Inițial, toate secțiunile au fost colorate cu hematoxilină eozină prin metoda standard. Această metodă a facilitat examinarea detaliilor morfologice specifice fiecărei componente structurale a complexului ombilico-placentar.

Tabelul 2.3. Materialul cercetat prin metodele histologice și imunohistochimice

Metoda	Cordon ombilical	Placenta	Total
Colorație hematoxilină eozină (HE)	56	13	69
Colorație tricrom Masson	56	13	69
Impregnație argentică după Gordon-Sweet	56	13	69
Colorație imunohistochimică cu anticorpi anti-CD105	26	13	39
Colorație imunohistochimică cu anticorpi anti-CD34	26	13	39
Colorație imunohistochimică cu anticorpi anti-D2-40	26	13	39
Colorație imunohistochimică cu anticorpi anti-AC133	26	13	39
Colorație imunohistochimică cu anticorpi anti- VEGF-R2	26	13	39
Total	298	104	402

Colorația tricrom Masson și impregnarea argentică Gordon-Sweet au fost aplicate pentru a studia densitatea și modelele de distribuție a componentei fibrilare din cordoanele ombilicale și placentă. Astfel, fibrele de colagen tip I au fost evidențiate prin colorația tricrom Masson, care a constat, în prima fază, în deparafinarea și hidratarea secțiunilor, urmată de colorarea cu hematoxilină timp de 5 minute. Apoi, după spălare consecutivă în apă curentă și distilată timp de 5 minute, secțiunile au fost tratate cu picrofuxină (30 secunde) și spălate, din nou, în apă distilată timp de 5 minute. În etapa următoare, secțiunile au fost expuse la soluție de acid fosfotungstic 2% timp de 5 minute, și colorate cu albastru de anilină timp de 5 minute, iar la final, au fost tratate cu o soluție de acid acetic 1% timp de 2 minute. Procedul de colorare a fost urmat de deshidratarea, clarifierea și montarea în balsam de Canada a secțiunilor. Rezultatul colorației tricromă Masson a fost evidențierea: fibrelor de colagen (culoare albastră), celulelor țesutului conjunctiv (nuclei de culoare albastru-violet) și celulelor musculare netede (culoare roșie).

Studierea fibrelor reticulare a fost posibilă prin utilizarea impregnării argentice Gordon-Sweet. Asemenea colorației tricrom, în primul rând, secțiunile erau deparafinate și hidratate, iar ulterior scufundate într-o soluție de permanganat de potasiu 0,25% timp de 5 min. În etapa următoare, secțiunile au fost spălate în apă distilată și tratate cu o soluție de acid oxalic 5%, timp de 5 min pentru fiecare procedeu. După spălarea secțiunilor timp de 5min cu apă distilată, acestea au fost tratate cu soluție de 2% de sulfat feric amoniacal timp de 15 min și din nou

spălate în apă distilată timp de 5 min. După o tratare rapidă (timp de 15 secunde) cu soluție de nitrat de argint preparată printr-o metoda specială, secțiunile au fost spălate în trei băi succesive (câte 5 minute fiecare) de apă distilată. În etapa finală, secțiunile au fost tratate cu soluție de 10% de formalină (1 min), spălate în apă distilată (5 min), apoi s-a aplicat soluția de tiosulfat de sodiu de 2% (5 min) și din nou scufundate în apă distilată (3 min). La final, secțiunile au fost deshidratate, clarefiate și montate cu balsam de Canada. Rezultatul impregnării a fost colorarea fibrelor reticulare în negru.

Pentru pregătirea soluției de nitrat de argint, la 5 ml de soluție de nitrat de argint 10%, s-a adăugat amoniac picătură cu picătură. Inițial, soluția a devenit maronie, apoi s-a titrat amoniac până când soluția a devenit clară. La soluția obținută s-au adăugat treptat și agitând 5 ml de soluție de hidroxid de sodiu 3%, ceea ce a dus la întunecarea soluției. Apoi, s-a adăugat din nou amoniac picătură cu picătură până când soluția a devenit clară. În final, soluția obținută a fost diluată cu apă distilată până la un volumul de 50 ml și ulterior filtrată.

2.4. Metodele imunohistochimice

Secțiunile destinate studiului imunohistochimic, inițial, au fost deparafinate. Procesul de deparafinare s-a efectuat în trei etape, utilizând benzen. Prima deparafinare a fost realizată la o temperatură de 57°C, la termostat, timp de 40 minute, în timp ce următoarele două deparafinări s-au efectuat la temperatura camerei, timpul de expunere fiind de 10 minute pentru fiecare. Pentru înlăturarea ulterioară a benzenului secțiunile au fost scufundate în băi succesive de alcool, în ordine descrescătoare a concentrației: 100%, 96%, 80%, 70%, fiecare baie având o durată de 5 minute. Alcoolul a fost substituit cu apă distilată.

Demascarea antigenului s-a făcut prin căldură la 99°C, utilizând o soluție de demascare. Durata de timp pentru procedeul de demascare a variat în funcție de antigen (vezi tabelul 2.4). Inhibarea peroxidazei endogene s-a realizat prin utilizarea apei oxigenate 3% timp de 5 minute. După incubarea cu anticorpii primari sistemele de lucru pentru vizualizare au fost NovoLink Max Polymer Detection System (Novocastra, Newcastle uponTyne, UK) și Bond Polymer Refine Detection System (Leica Biosystem Newcastle Ltd, Newcastle uponTyne, UK). Cromogenul folosit a fost 3,3 diaminobenzidina (DAB). Contracolorarea nucleelor s-a efectuat cu hematoxilină. Întreaga tehnică imunohistochimică s-a efectuat cu DakoCytomation Autostainer.

La final, secțiunile histologice au fost deshidratate, fiind trecute prin patru băi succesive de alcool (70%, 80%, 96%, 100%), clarificate în benzen și montate cu balsam de Canada.

Imunocolorarea cu anti-CD105

Pentru evidențierea celulelor stem mezenchimale în stroma cordonului ombilical, am recurs la colorația secțiunilor cu anticorpul primar monoclonal anti-CD105, clona SN6h, diluția 1:25, Dako Glostrup Denmark. Demascarea antigenului a fost efectuată prin Bond Epitope Retrieval Solution 2, (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK) – 20 minute. Sistemul de lucru compatibil a fost cel de tip Bond Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK), iar cromogenul aplicat 3,3'' diaminobenzidina dihidroclorid a fost vizualizat printr-o reacție de culoare brună.

Tabelul 2.4. Metodele imunohistochimice utilizate în studiu

Anticorp	Sursa	Clona	Diluție	Sistem de detecție	Demascare Antigen	Incubare anticorp primar
CD105	Dako Glostrup Denmark	Monoclonal mouse anti-human, clona SN6h	1:25	Bond Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK), 10 minute	Bond Epitope Retrieval Solution 2, (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK)–20 minute	20 min
D2-40	Dako Glostrup Denmark	Monoclonal mouse anti-human, clona D2-40	1:100	Bond Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK), 15 minute	Bond Epitope Retrieval Solution 2, (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK)–20 minute	20 min
CD34	Leica Biosystem Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK	QBEnd/10	prediluat	Bond Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK), 15 minute	Bond Epitope Retrieval Solution 2, (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK)–20 minute	20 min
AC133	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK	Mouse, monoclonal, clona T595	prediluat	Bond Polymer Refine Detection System (Leica Biosystem Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK)	Bond Epitope Retrieval Solution 2, (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK)–20 minute	15 min
VEGF-R2	Santa Cruz Biotechnolog, Inc.	Rabbit polyclonal	1:200	Bond Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK), 15 minute	Microunde 20 min, citrat pH6	20 min

Imunocolorarea cu anti-D2-40

Pentru a determina expresia D2-40 în stroma cordonului și placenta umană am recurs la colorația secțiunilor cu anticorpul primar monoclonal anti-D2-40, clona D2-40, diluția 1:100, Dako Glostrup Denmark. Demascarea antigenului a fost efectuată prin Bond Epitope Retrieval Solution 2, (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK) – 20 minute. Sistemul de lucru

compatibil a fost cel de tip Bond Polymer Refine Detection System (Leica Biosystem Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK), iar cromogenul aplicat 3,3'' diaminobenzidina dihidroclorid a fost vizualizat printr-o reacție de culoare brună.

Imunocolorarea cu anti-CD34

Pentru cuantificarea celulelor stem hematopoietice precursoră în țesuturile substanței Wharton și stroma vilozităților coriale, am recurs la colorația secțiunilor cu anticorpul primar monoclonal anti-CD34, clona QBEnd/10, prediluat, Leica Biosystem Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK. Demascarea antigenului a fost efectuată prin Bond Epitope Retrieval Solution 2, (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK) - 20 minute. Sistemul de lucru compatibil a fost cel de tip Bond Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK), iar cromogenul aplicat 3,3'' diaminobenzidina dihidroclorid a fost vizualizat printr-o reacție de culoare brună. Drept control pozitiv intern au fost considerate celulele endoteliale care exprimau CD34.

Imunocolorarea cu anti-AC133

Pentru evidențierea celulelor progenitoare/stem hematopoietice în stroma cordonului ombilical, am recurs la colorația secțiunilor cu anticorpul primar monoclonal anti-AC133 numit și Prominin-1, clona T595, prediluat, Novocastra, Newcastle, UK. Demascarea antigenului a fost efectuată prin Bond Epitope Retrieval Solution 2, (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK) - 20 minute. Sistemul de lucru compatibil a fost cel de tip Bond Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK), iar cromogenul aplicat 3,3'' diaminobenzidina dihidroclorid a fost vizualizat printr-o reacție de culoare brună.

Imunocolorarea cu anti-VEGF-R₂

Pentru evidențierea receptorului R₂ pentru VEGF (VEGF-R₂) în stroma cordonului ombilical și placentei, am recurs la colorația secțiunilor cu anticorpul primar policlonal concentrat anti-VEGF-R2, Santa Cruz Biotechnology, Inc. (SUA), din care am realizat diluții 1:200 în diluant corespunzător. Demascarea antigenului a fost efectuată prin încălzirea la microunde timp de 20 min, folosind tampon citrat pH6. Sistemul de lucru compatibil a fost cel de tip ABC, iar cromogenul aplicat 3,3'' diaminobenzidina dihidroclorid a fost vizualizat printr-o reacție de culoare brună. Drept control pozitiv intern au fost considerate celulele endoteliale care exprimau VEGF-R2.

2.5. Metodele de cuantificare

Studiul morfometric al vaselor ombilicale native și decelularizate a fost efectuat cu ajutorul software-lui ZEN 2011 SP2 (Release 8.0.0, Build 273). Imaginele captate la microscop erau

preluate prin software-ul dat, unde ulterior au fost efectuate măsurătorile diametrului extern și grosimii peretelui vaselor ombilicale. Pentru omogenizarea datelor, și a minimaliza erorile legate de microscopie, s-au făcut trei măsurători pentru grosimea peretelui la fiecare vas, iar media acestora a fost considerată ca date de referință incluse în studiul dat.

Expresia pentru D2-40 a fost apreciată pozitivă la exprimarea citoplasmatică și/sau membranară. În țesuturile placentare au fost făcute doar observații descriptive și nu au fost efectuate evaluări numerice. Astfel a fost examinată expresia podoplaninei de către: epiteliul amniotic, placa corială, celulele deciduale, celulele Hofbauer, trofoblastul vilos și stroma vilozităților.

Imunoreactivitatea la D2-40 a fost evaluată cu aplicarea metodei „Histo” scor pentru celulele stromale D2-40+ din substanța gelatinoasă Wharton a cordonului ombilical. Preparatele histologice colorate cu D2-40 au fost analizate la obiectivul x40, apoi a fost alese 3 câmpuri cu cele mai multe celule pozitive. Pentru fiecare grup de celule stromale selectate a fost evaluată semicantitativ intensitatea gradată a colorării în celulele stromale de la 0-3 după cum este redat în Tabelul 2.5.

Tabelul 2.5. Cuantificarea imunohistochimică a celulelor stromale evidențiate prin imunocolorarea D2-40

Proporția celulelor colorate	Scorul	Intensitatea
0%	0	absentă
1-25%	1+	slabă
26-50%	2+	moderată
51-75%	3+	înantă
>76%		
<i>H scorul este calculat prin înmulțirea procentului de celule pozitive cu scorul de intensitate, rezultând o valoare între 0 și 300.[150]</i>		

Acest sistem a fost utilizat și pentru evaluarea expresiei la CD105, AC133.

Expresia pentru CD34. O reacție citoplasmatică și/sau membranară a fost considerată pozitivă. Studiarea primară a preparatelor histologice colorate cu utilizarea anticorpului CD34 a arătat o distribuție neuniformă a celulelor CD34 pozitive în stroma cordonului ombilical. Reieșind din aceste date, în acest studiu, celulele CD34 pozitive au fost cuantificate prin aplicarea metodei hot-spot. Această metodă constă în identificarea a trei zone cu densitatea celulară maximă la obiectivul ×20, după care din rezultatele obținute pentru fiecare caz se

calculează media aritmetică. De asemenea a fost apreciată intensitatea de colorare, după cum urmează: reacție intensă (3+), reacție moderată (2+), reacție scăzută (1+), reacție absentă (0).

Pozitivitatea pentru fiecare marker imunohistochimic a fost determinată microscopic de doi cercetători independenți. Diferențe numerice semnificative între datele obținute de evaluatori nu au fost identificate.

2.6. Metoda de coroziune

Modelele particulare de distribuție spațială (3-D) ale arterelor ombilicale în interiorul placentei, precum și arhitectura placentei au fost evidențiate prin metoda de coroziune.

Metoda de coroziune implică utilizarea de mase plastice autopolimerizante de tipul "РЕДОHT-03" și "ПРОТАКРИЛ-М", care sunt injectate în vasele sangvine. Setul de mase autopolimerizante de injecție conține pulbere, monomer și colorant (Figura 2.3). Colorantul utilizat este un concentrat obișnuit care rezistă la acizi și baze. De obicei, volumul de colorant în masa totală trebuie să fie în jur de 5-10%. Cu cât se adaugă mai mult colorant, crește fragilitatea preparatului plastic.



Fig. 2.3. Setul de mase autopolimerizante "РЕДОHT-03" (a) și ustensilele (b) folosite la prepararea pieselor placentare prin metoda de coroziune

Piesele "proaspete" (prelevate în primele 12 ore), au fost plasate într-un vas cu apă curgătoare pentru 5-10 ore, astfel s-a înlăturat sângele din vasele ombilicale. Ulterior, în artera și vena ombilicală au fost introduse un tub de dren sau canule de sticlă. În același timp, a fost preparată o masă plastică de consistență lăptoasă, care, ulterior era injectată în vase. Reieșind din faptul că, masa plastică se polimerizează rapid și monomerul este volatil, pentru a obține consistența lăptoasă a masei plastice, diluția inițială trebuie să fie într-un raport de 1/4-1/6, iar pe parcursul procedurii de coroziune consistența masei plastice se va menține prin adăugarea

suplimentară a monomerului în funcție de necesitate. Imediat după injectare, placenta a fost aranjată într-un vas suficient de larg, odată pentru a preveni deformarea acesteia, dar și pentru a crea condiții optime pentru procedeul coroziv. Fiind plasate în vasul identificat, placentele au fost lăsate în condiții obișnuite la temperatura camerei timp de 5-10 ore. În etapa următoare, peste placentele s-a turnat sol. NaOH concentrat (35%), volumul căreia depășea de 2-3 ori volumul piesei. Corozia a durat 10-14 zile. Pe toată durata procesului de corozie, periodic la 2-3 zile placentele injectate erau spălate sub apă curgătoare, fără a fi scoase din vas. La finalizarea procesului coroziv, placentele au fost spălate sub apă curgătoare și montate pentru examinare la lupa binoculară.

Din totalul de 26 placentele selectate pentru cercetarea dată, 13 placentele au fost supuse metodologiei de corozie, iar restul de placentele au fost utilizate pentru metodele histologice și imunohistochimice. Urmare unor probleme tehnice apărute în timpul metodologiei de corozie (Tabelul 2.5), au fost supuse cu succes coroziei 9 placentele, obținând specimene corozive de înaltă calitate. Evaluarea calității preparatului pregătit pentru metoda coroziei a fost efectuată independent de o echipă de cercetători formată din două persoane. Acceptarea specimenului, ce urmează să fie supus metodei de corozie, a fost realizată prin consensul celor doi cercetători.

Tabelul 2.6. Repartizarea placentelor în raport cu problemele tehnice apărute în timpul procedurii de corozie

	Cantitate	Procente
Placentele acceptate pentru corozie	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 injectării (defecte ascunse)	1	7,7%
Placentele pierdute în timpul efectuării preparatelor corozive	2	15,4%
Placentele injectate cu succes	9	69,2%

Pe preparatele corozive obținute au fost analizate tipologiile de distribuție spațială a vascularizației arteriale și venoase, confruntând datele proprii cu cele comunicate în literatură despre acest subiect.

Pentru analiza statistică a fost creată o bază de date utilizând softul Microsoft Excel 2007.

Pentru a determina numărul minim de preparate acceptate pentru cercetare a fost aplicată următoarea formulă:

$$n = \left(\frac{t \cdot CV}{\varepsilon} \right)^2,$$

unde:

n – numărul de preparate pentru cercetare;

t – pentru semnificația statistică de 95,0% valoarea ale t-Student este egală cu 1.96;

CV – valoarea coeficientului de variație egală cu 9,0% (variația mică datorită faptului că toate preparatele histologice au fost similare în tactica de preluarea a materialului biptic, condițiile de preparare și păstrare, metodologia de colorare);

ε – eroarea planificată este de 5,0% ($\varepsilon = 0,05$)

Introducând datele în formula am obținut: $n = [(1,96 \times 0,09)/0,05]^2 = 12,4=12$, design-effect = 8 (HE, Tricrom, Impregnare argentică, CD105, D2-40, CD34, AC133, VEGFR2) = 102 de preparate.

Toate datele obținute au fost prelucrate statistic cu ajutorul softurilor EPI INFO 7.2.5.0, SPSS22.0 și Microsoft Excel 2007. Astfel, analiza statistică a inclus calcularea mediei aritmetice (X), deviației standard (DS), coeficienților de corelare non-parametrici Spearman (r_s). Pentru identificarea diferențelor statistic semnificative între valorile mediilor obținute au fost utilizate testele parametrice (t -Student, Anova) și non-parametrice ($Kruskal$ -Wallis), unde valorile $p < 0,05$, fiind considerate semnificative. Datele au fost expuse în teză sub formă de tabele și/sau grafice.

Examinarea microscopică. Microscoapele Nikon Eclipse E600 și Axio Imager A2 (Carl Zeiss Microscopy, Germania) au fost utilizate pentru examinarea microscopică. Pentru a documenta fiecare etapă a procesului, au fost realizate imagini care au fost salvate și stocate în format JPEG.

2.7. Sinteza la capitolul 2

În acest studiu, s-a utilizat o metodologie conformă cu cercetarea din domeniul ingineriei țesuturilor și cu recomandările actuale ale cercetării științifice moderne. Studiul a avut un design primar, descriptiv și observațional de tip transversal, incluzând o parte experimentală. Scopul și obiectivele au fost orientate spre cercetarea particularităților morfologice ale componentelor fibrilare și celulare din cordonul ombilical, placenta și membrana amniotică. S-a obținut informații detaliate despre morfologia specifică a acestor structuri, contribuind la înțelegerea potențialului lor ca surse de grefe celulare și tisulare.

Materialul biologic a inclus cordoane ombilicale și placentă umane, colectate în perioada 2012-2013. Au fost aplicate criteriile de includere, cum ar fi timpul scurs de maximum 10 ore între

colectare și naștere, vârsta mamei între 20 și 40 de ani, sarcină la termen (36-41 s.g.), sarcini fără complicații până la naștere, cordoane ombilicale și placentele fără deteriorări mecanice.

Metodele de cercetare utilizate au inclus metode de decelularizare, testele de rezistență la gonflare și întindere, obținerea preparatelor de coroziune, 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).

Procesul de decelularizare a arterelor ombilicale a fost realizat folosind trei metode: chimică (detergent), enzimatică și combinată (detergent+enzimă). Pentru toate metodele histologice și imunohistochimice descrise, procesarea primară a materialului a implicat pași similari, inclusiv fixare, dehidratare și includere. Studiul a utilizat și metoda de coroziune pentru a evidenția modelele particulare de distribuție spațială a vaselor ombilicale în interiorul placentelor. Metoda implică utilizarea de mase plastice autopolimerizante injectate în vasele sangvine.

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. 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.

3. PARTICULARITĂȚI STRUCTURALE MACRO- ȘI MICROSCOPICE ALE COMPONENTELOR COMPLEXULUI OMBILICO-PLACENTAR

3.1. Studiul macro-microscopic a arhitecturii vasculare a placentei umane

Placenta reprezintă o asociere parabiotică extrem de strânsă între țesuturile maternelle și fetale, iar schimbul transplacentar dintre aceste țesuturi asigură toate nevoile metabolice pentru o creștere și dezvoltare fetală normală. Reieșind din complexitatea acestor conexiuni profunde, cercetarea dată furnizează argumente macromicroanatomice, care vin să susțină utilizarea placentei umane ca sursă pentru transplant de celule și țesuturi.

Studiul macromicroscopic a fost efectuat pe placentele 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%) placentele. Aceasta a fost urmată de placentele de forma rotundă – 14 (25%) cazuri. De asemenea, menționăm că în 3 cazuri (5,36%) placenta a avut formă triunghiulară (Figura 3.1).

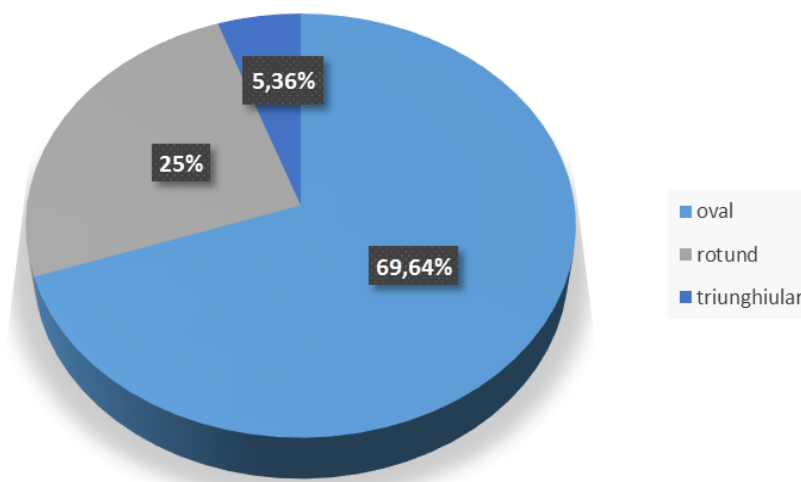


Fig. 3.1. Distribuția placentelor în funcție de formă

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 (Figura 3.2).

La moment, încă, sunt numeroase confuzii legate de modelul vascular al placentei. Ne-am propus în această lucrare să studiem pattern-ul de distribuție al vaselor placentare, utilizând metoda turnării prin coroziune. Această metodă oferă posibilitatea vizualizării în spațiu a modelului vascular, și respectiv creează condiții pentru o mai bună înțelegere a complexității acestui sistem. Din totalul de placentele prelevate au fost selectate pentru metoda de coroziune 13 placentele.

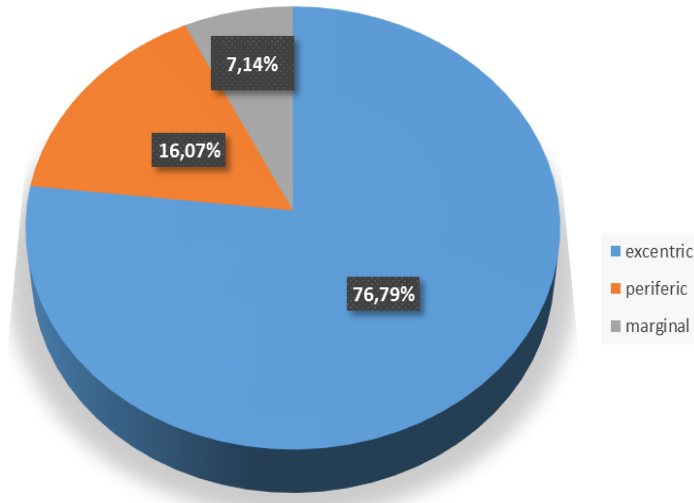


Fig. 3.2. Distribuția placentelor în funcție de locul de inserție a cordonului ombilical

Sistemul vascular fetoplacentar era reprezentat de ramurile vaselor ombilicale. Astfel, studierea preparatelor macromicroanatomice, obținute prin metoda de corozivare, 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. Ramurile secundare au prezentat un traiect radial spre interiorul placentei.

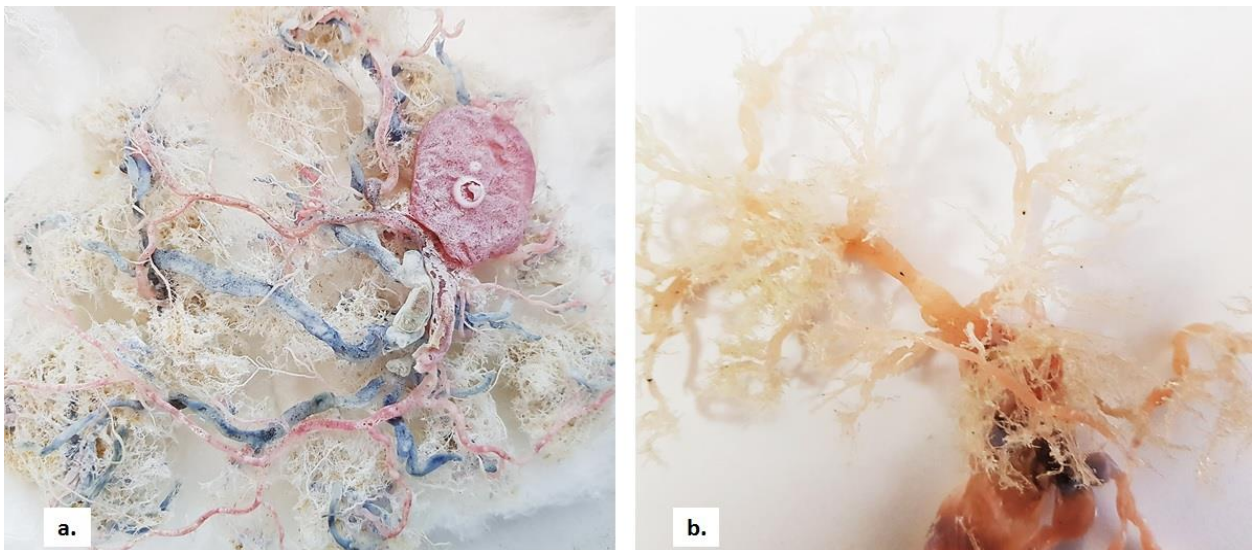


Fig. 3.3. Sistemul arterial al placentei. Modelul de ramificare a arterelor ombilicale: ramificația primară și secundară. Preparat coroziv policrom, ×20

În majoritatea placentelor a fost observată prezența anastomozei între arterele ombilicale, care au fost situate în segmentul dintre punctul de inserție a cordonului (la 3-4 mm după inserție) și ramificarea arterelor. Identificarea anastomozei a fost posibilă prin injectarea polimerului

colorat într-o arteră, iar la scurt timp materialul polimeric se făcea vizibil în sistemul vascular al celei de-a doua arteră. Pentru majoritatea vaselor placentare a fost caracteristic traiectul rectiliniu sau ușor sinuos. Unele ramuri terțiare, sau/și ramificațiile acestora, de-a lungul traiectul său, formau 2-3 spirale de-a lungul ramurilor venoase (Figura 3.4).



**Fig. 3.4. Traiectul sinusos și spiralat realizat de ramurile mici ale arterelor placentare.
Preparat coroziv policrom, ×20**

În general, rețeaua arterială corială a fost caracterizată de modelul dihotic de ramificare. Aceasta presupune o rețea simetrică de bifurcație, iar fiecare vas se ramifică în noi ramuri fiice care sunt destul de asemănătoare (Figura 3.5a).



Fig. 3.5. a) Modelul dihotic de distribuție a arterelor placentare; b) Ramificații cu diametru mic care se descind în lateral. Preparat coroziv monocrom, ×20

Menționăm că, în placentele incluse în studiu, am observat existența mai multor ramuri fiice complexe și subțiri, originare din ramurile primare și secundare (Figura 3.5 b). Ramurile vasculare de ordinul unu și doi erau vizibile pe suprafața fetală a placentei. Ramurile de ordinul trei parțial vizibile pe suprafața placentei, imediat după descinderea lor din ramurile de ordinul II, se adânceau în zonele profunde ale placentei, fiind localizate sub placa corială. Arterele mici ramificate care pătrund în placenta și alimentează cotiledoanele placentare sunt numite vase intraplacentare sau vasele cotiledonului (lobului). Acestea au fost caracterizate de un model de ramificare dispers, așa cum este ilustrat în Figura 3.6. Anastomoze între arterele diferitor cotiledoane nu au fost depistate. În cadrul aceluiași cotilidon deasemenea nu se descriu anastomoze arteliale.



Fig. 3.6. Aspecte ale arhitecturii vasculare la nivelul cotiledonului.

Preparat coroziv, a) $\times 20$, b) $\times 40$, c) $\times 50$, d) $\times 70$

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" (Figura 3.6 d).

Analizând preparatele corozive am observat că zonele care sunt drenate de afluenții venei ombilicale nu se suprapun, acestea având hotare bine delimitate. Cel mai frecvent pattern de distribuție identificat a fost localizarea ramurilor venoase între cotiledoanele placentare (Figura 3.7). Totuși, mai rar, au fost observate și vase venoase care își aveau traiectul prin cotiledon. Nu au fost identificate anastomoze directe între sistemul arterial și cel venos al placentei. De asemenea, nu au fost identificate anastomoze între ramurile venoase din diferite zone. Frecvent, vena ombilicală a fost formată prin confluarea a 2-5 ramuri venoase majore (Figura 3.7).



Fig. 3.7. Particularitățile structurale ale arhitecturii sistemului venos placentar.

Preparat coroziv monocrom, ×20

3.2. Evidențierea particularităților structurale microscopice a țesuturilor placentare

Studiind preparatele histologice cu țesut placentar au fost identificate caracteristici tipice ale placentei la termen, precum: prezența sincițiotrofoblastului (care a fost reprezentat de un sincițiu trofoblastic multinucleat), citotrofoblastului (care era mai rar observat), capilarelor fetale și a celulelor stromale. În ceea ce privește vilozitățile placentare, au fost identificate trei tipuri de vilozități: stem, intermediare și terminale (Figura 3.8).

Aranjarea spațială a componentei fibrilare, cât și cantitatea matricei extracelulare a variat de la un tip de vilozitate la altul. Astfel, vilozitățile coriale mari, stem, prezentau o matrice extracelulară bogată în fibre reticulare și de colagen. Au fost observate două modele de aranjare

a fibrelor de colagen în interiorul stromei vilozităților mari. Fibrele de colagen localizate în profunzimea vilozităților erau groase, compacte și dispuse circular în jurul vaselor sangvine. În timp ce fibrele de colagen de la suprafața vilozității erau subțiri și erau aranjate longitudinal, paralel cu axul vilozității (Figura 3.9. a,b).

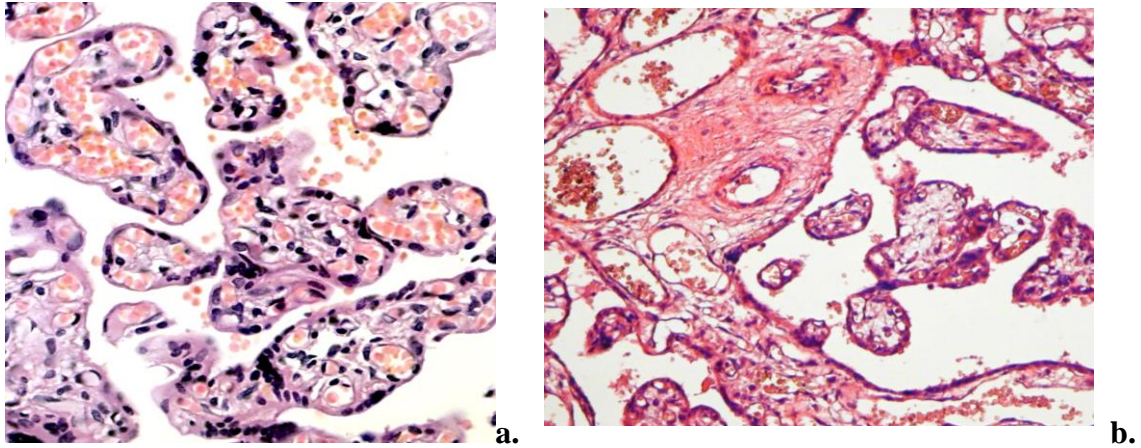


Fig. 3.8. Vilozitățile placentare unde se regăesc celulele cito- și sincițiotrofoblastului, capilare fetale, noduri sincițiale și țesut conjunctiv: a) vilozități intermediare și terminale; b) vilozități tulpină (stem); ×200, Colorația Hematoxilină-Eozină

Fibre reticulare groase, bine conturate au fost observate imediat sub membrana bazală a trofoblastului, respectiv la periferia vilozității, dar și în peretele vaselor sangvine, în apropierea intimei (Figura 3.9. c,d).

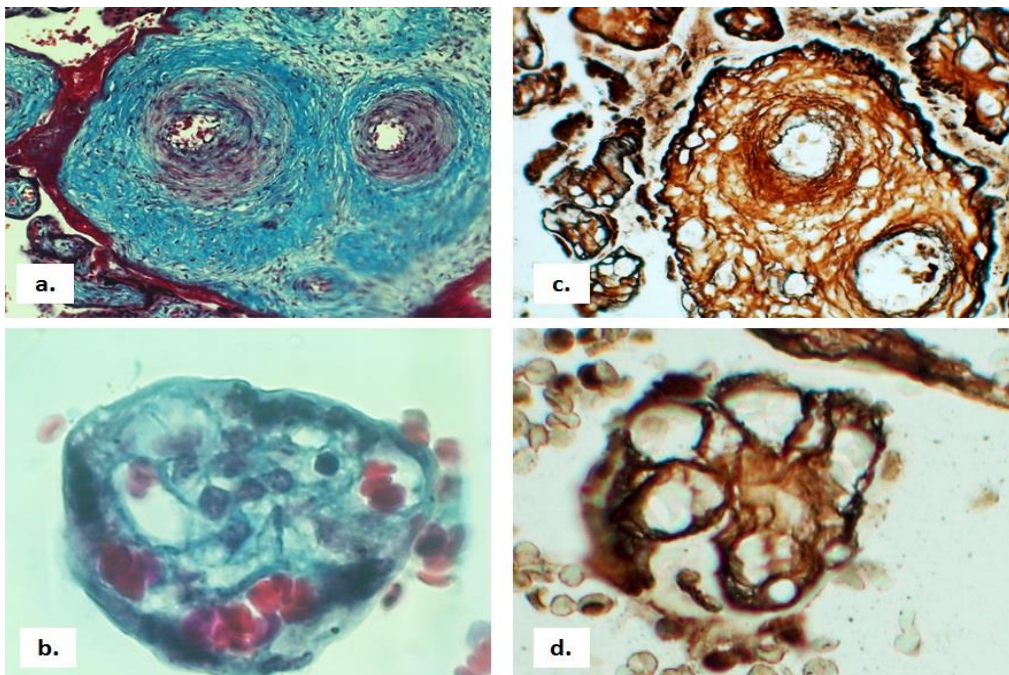


Fig. 3.9. Componenta fibrilară din cadrul arborelui vilos, aspecte de aranjament spațial. ×200, ×630 a-b) Colorația tricrom Masson, c-d) Impregnare argentică Gordon-Sweet

Cantitatea componentei fibrilare conjunctive s-a redus semnificativ pe măsură ce înaintă spre vilozitățile intermediare și terminale, unde aceasta era reprezentată de fibrile subțiri, cu un grad crescut de destrămare, aranjate în rețea, localizate central. În schimb, fibrele reticulare organizate într-un strat compact erau localizate în jurul capilarelor (Figura 3.9 d).

Celulele deciduale au fost caracterizate ca fiind celule cu nucleu mare, rotund și citoplasmă abundentă eozinofilă. Aceste celule formau grupuri strânse înconjurate de stroma conjunctivă (Figura 3.10 a). Numeroase fibre reticulare au fost distribuite pe întreaga suprafață a zonei deciduale, fiind organizate într-o rețea densă de fibrile cu traiect regulat. Celulele deciduale erau înconjurate de fibre reticulare netede, groase și intens colorate (Figura 3.10b). Porțiunile centrale a stromei deciduale au fost identificate prin prezența exclusivă a unor fibre reticulare mai groase, așezate într-un model ordonat. În același timp, zonele periferice conțineau două tipuri de fibre, atât groase, cât și subțiri, care se înfășurau și se intersectau reciproc. Celulele deciduale au fost înconjurate și de fibrele de collagen tip I, care aveau un traiect ușor ondulat, iar alocuri erau subțiri și fragmentate (Figura 3.10 c).

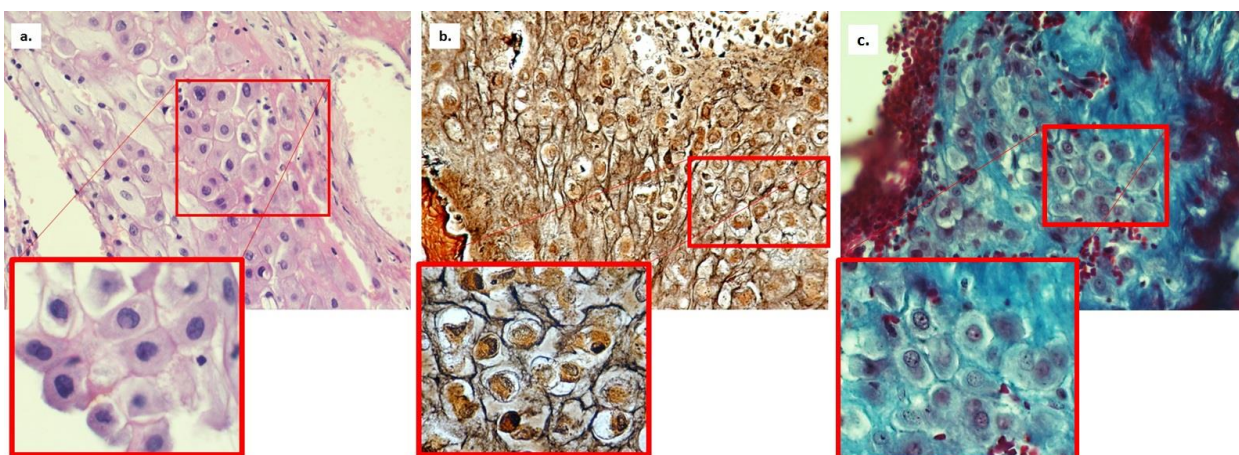


Fig. 3.10. Componenta fibrilară din jurul celulelor deciduale (aspecte morfologice și de relație). ×100, a) Colorația Hematoxină-Eozină, b) Impregnare argentică Gordon-Sweet, c) Colorația tricrom Masson

La nivelul plăcii coriale, componenta fibrilară a fost predominant reprezentată de fibrele de collagen. Fibrele reticulare, preponderent au fost prezente sub epiteliul amniotic, sub trofoblast și în componența mediei vaselor coriale mari, care reprezintă ramificațiile vaselor ombilicale. Au fost observate aspecte particulare în distribuția și densitatea fibrelor reticulare la nivelul fibrinoidului. Astfel, au fost identificate două modele de structurare a fibrinoidului. Modelul de tip fibros se caracteriza prin fibre reticulare groase, organizate în fascicule scurte, dezorganizate, prezentând numeroase ramificații scurte. Modelul de tip matriceal, la rândul său conținea fibre reticulare, doar că aceste fibre erau fine, omogen repartizate, prin ramificațiile sale formau o

plasă fibrilară foarte fină înglobată într-o matrice amorfă. Uneori, aceste două modele co-existau în cadrul același fibrinoid. În aceste cazuri, modelul fibros era localizat în zonele profunde ale fibrinoidului, respectiv, modelul matriceal era localizat superficial.

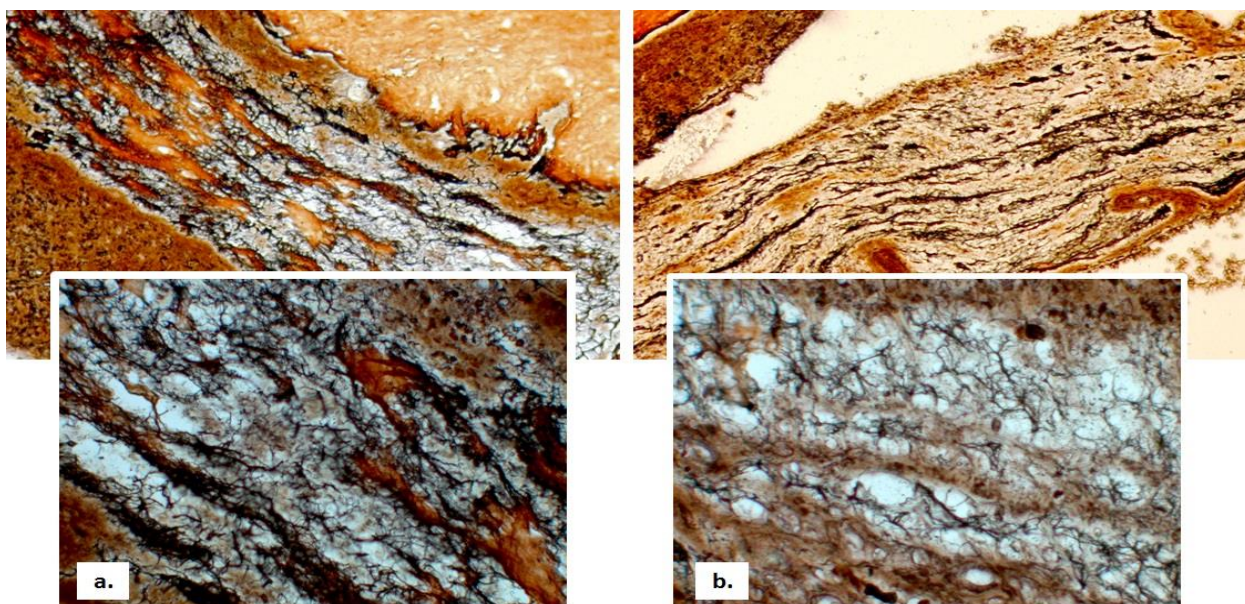


Fig. 3.11. Distribuția fibrelor reticulare în fibrinoid. a) modelul fibros, b) modelul matriceal, ×100, ×400, Impregnare argentică Gordon-Sweet

3.3. Particularități structurale microscopice ale vaselor ombilicale

Toate cordonanele ombilicale, care au fost incluse în studiu, conțineau 3 vase sangvine: 2 artere ombilicale și o venă. Cele două artere ombilicale aveau un traseu spiralat în jurul venei, ceea ce îi conferea cordonului un aspect torsionat, vizibil la nivel macroscopic. Microscopic, au fost studiate vasele sangvine din 56 cordonane 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.

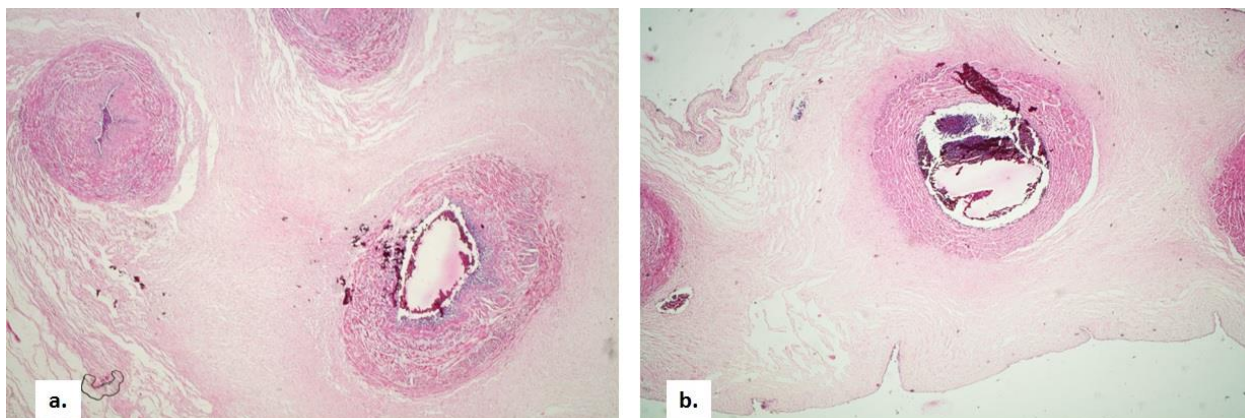


Fig. 3.12. Modelele de aranjare a vaselor ombilicale în interiorul cordonului ombilical. a) model triunghiular; b) model liniar, ×25, Colorația Hematoxină-Eozină

Studiul secțiunilor histologice colorate cu hematoxină-eozină a permis evidențierea particularităților structurale ale vaselor ombilicale. Astfel, la exterior, cordonul ombilical a fost acoperit de epiteliul amniotic, care prin intermediul componentei conjunctive fibroase era atașat de substanța gelatinoasă Wharton. În porțiunile distale ale cordonului, în special, în apropierea inserției cu placenta, epiteliul amniotic a fost reprezentat de un epiteliu simplu columnar și/sau cubic. Epiteliul amniotic devenea stratificat cubic în porțiunile medii și proximale ale cordonului.

În toate secțiunile histologice vena ombilicală a fost descrisă cu un lumen larg *versus* arterele ombilicale, care se caracterizau prin lumen neregulat, distorsionat, frecvent mult îngustat, iar alocuri greu de identificat (Figura 3.13 a). Pentru ambele tipuri de vase a fost caracteristic absența adventiției, astfel că, peretele vaselor ombilicale era format din 2 tunici (intima și media) *versus* vasele sangvine de același diametru din alte zone ale corpului uman, care prezintă 3 tunici. De asemenea, menționăm că, ambele tipuri de vase, pe întregul lor traseu, erau lipsite de membrana elastică externă, vaso-vasorum, inervație și nu formau ramificații.

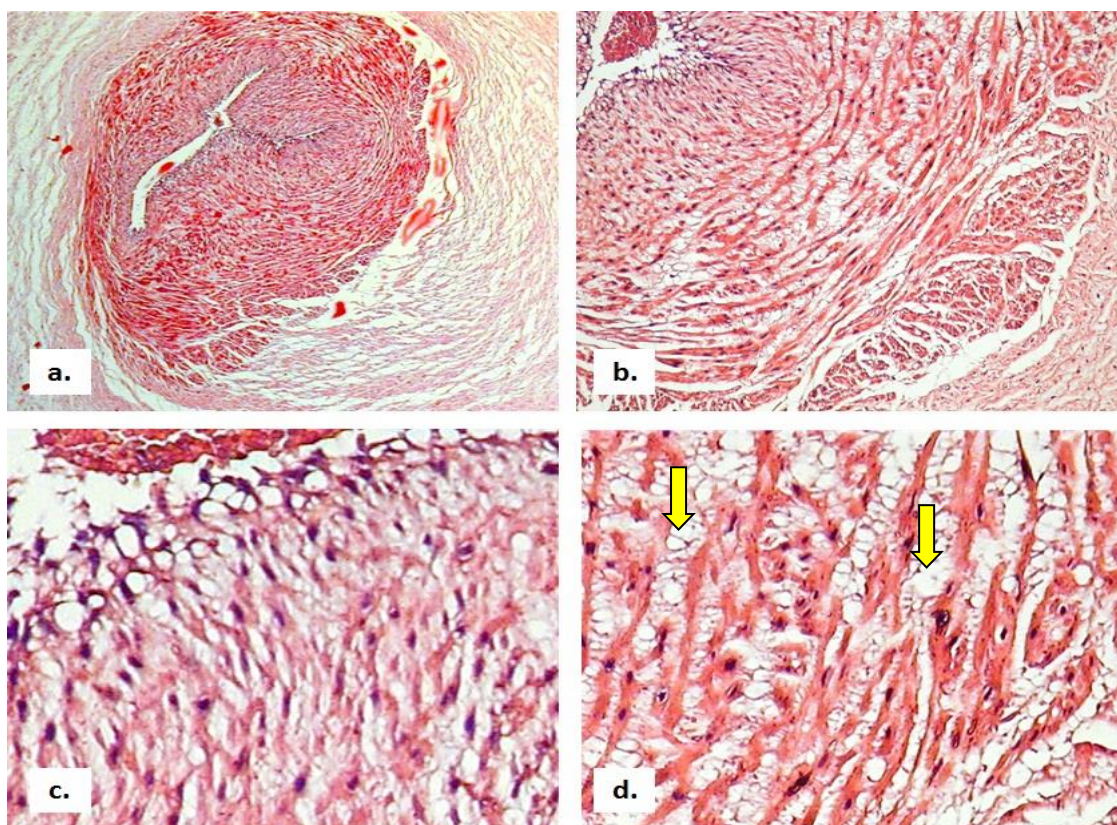


Fig. 3.13. Caracteristici microscopice structurale ale arterelor ombilicale. a) lumen neregulat, distorsionat, perete format din 2 tunici; b) media organizată în 2 straturi bine definite; c) miocite orientate longitudinal și situate la distanță în cadrul intimei; d) spații veziculoase intermusculare (interfasciculare) la nivelul mediei;

×25; ×100, ×400, Colorația Hematoxină-Eozină

Arterele ombilicale au fost căptușite de celule endoteliale caracterizate prin nucleii proeminenți, totuși, în zonele de ramificații, nucleii celulelor endoteliale deveneau aplatizați. Important de menționat că, tunica intimă, bine dezvoltată, conținea o cantitate variabilă de celule musculare netede de dimensiuni mici, mult mai subțiri, alungite, uneori ondulate comparativ cu miocitele din cadrul mediei. Miocitele intimei aveau nucleii heterocromatici. De asemenea, aceste celule, în cea mai mare parte, erau orientate longitudinal și situate la distanță una de alta (Figura 3.13 c). Remarcăm că, printre celulele musculare netede ale intimei au fost observate și miofibroblaste. Interesant, a fost imposibilitatea identificării membranei elastice interne, posibil din cauza grosimii foarte fine a acesteia, dar și a joncțiunii strânse între medie și intimă.

Tunica medie la arterele ombilicale a fost bine dezvoltată, grosimea acesteia varia de-a lungul circumferinței vasului. Celulele musculare netede erau organizate, predominant, în două straturi diferite ca grosime. Stratul intern, slab diferențiat, conținea miocite netede dispuse longitudinal, iar în stratul extern, celulele musculare netede au fost dispuse circular sau în spirală (Figura 3.13 b). Densitatea celulelor musculare netede în cadrul mediei a variat, astfel că, densitatea maximă celulară a fost observată în stratul extern. Celulele musculare netede au format fascicule înguste (1-3 rânduri de celule), aranjate în mod neregulat. O particularitate a mediei a fost prezența unor spații veziculoase intermusculare (interfasciculare) umplute cu conținut mucopolizaharidic (Figura 3.13 d). Prezența acestor spații conferea mediei un aspect spumos. Remarcăm că, în zonele periferice ale mediei, aceste structuri veziculoase se continuau cu spațiile matricei extracelulare din substanța gelatinoasă Wharton.

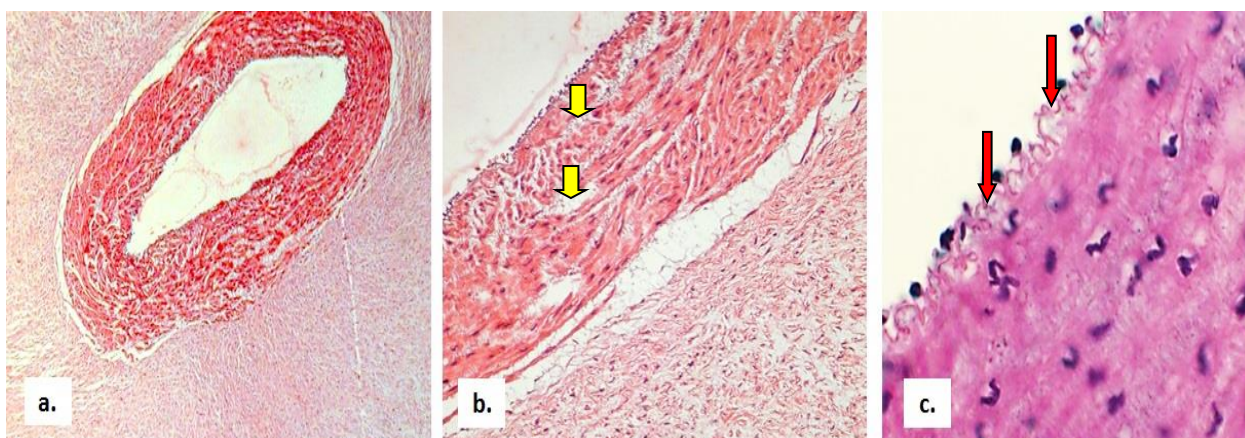


Fig. 3.14. Caracteristici microscopice structurale a venei ombilicale
×25; ×100, ×400, Colorația Hematoxină-Eozină

Structural, vena ombilicală a prezentat anumite deosebiri comparativ cu arterele. Astfel, putem menționa că, intima, dar și media au fost mai subțiri și compacte. Trăsătura distinctivă pentru vene a fost prezența membranei elastice interne (Figura 3.14 c), care era bine

reprezentată și avea un caracter continuu. Tunica medie a venei a fost organizată în 2 straturi, doar că aceste straturi nu erau bine definite. Celulele musculare netede ale mediei, preponderent, erau dispuse circular, mai rar oblic. Acestea se organizau în fascicule (lamele) din 2-3 rânduri de celule, separate, și în acest caz, de spații veziculoase ale matricei mucopolizaharidice. Menționăm că, în vene, densitatea structurilor veziculoase intermusculare era redusă (Figura 3.14 b ↓). Aranjarea longitudinală a miocitelor a fost observată în porțiunile externe ale mediei, și, frecvent, antrena grupuri mici de celule (Figura 3.14 a).

Reieșind din observațiile obținute referitor la dimensiunea vaselor, dar și grosimea pereților acestora, a fost efectuată analiza morfometrică pentru ambele tipuri de vase. Astfel, au fost obținute următoarele date referitor la diametrul extern al vasului și grosimea peretelui (Tabel 3.1).

Tabelul 3.1. 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.

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 (testul Student, $t=12,26$, $p<0,001$), au fost statistic semnificative.

Studiul componentei fibrilare a vaselor ombilicale a fost realizat pe lamelele histologice colorate prin metoda tricrom Masson și impregnare argentică după metoda Gordon-Sweet. A fost evidențiată și studiată distribuția fibrelor de colagen tip I și reticulare (tip III).

Fibrele de colagen tip I au fost distribuite neomogen, atât în artere, cât și în perețele venelor. În artere, fibrele de colagen tip I au fost dispuse predominant în intimă, acestea fiind mai îngroșate. Densitatea acestora a fost redusă în medie, aici fiind reprezentate de fibrele cu caracter discontinuu. La nivelul mediei, fibrele de colagen erau localizate predominant în jurul miocitelor și/sau circumscriau spațiile veziculoase cu conținut mucopolizaharidic (Figura 3.15 a, b, c).

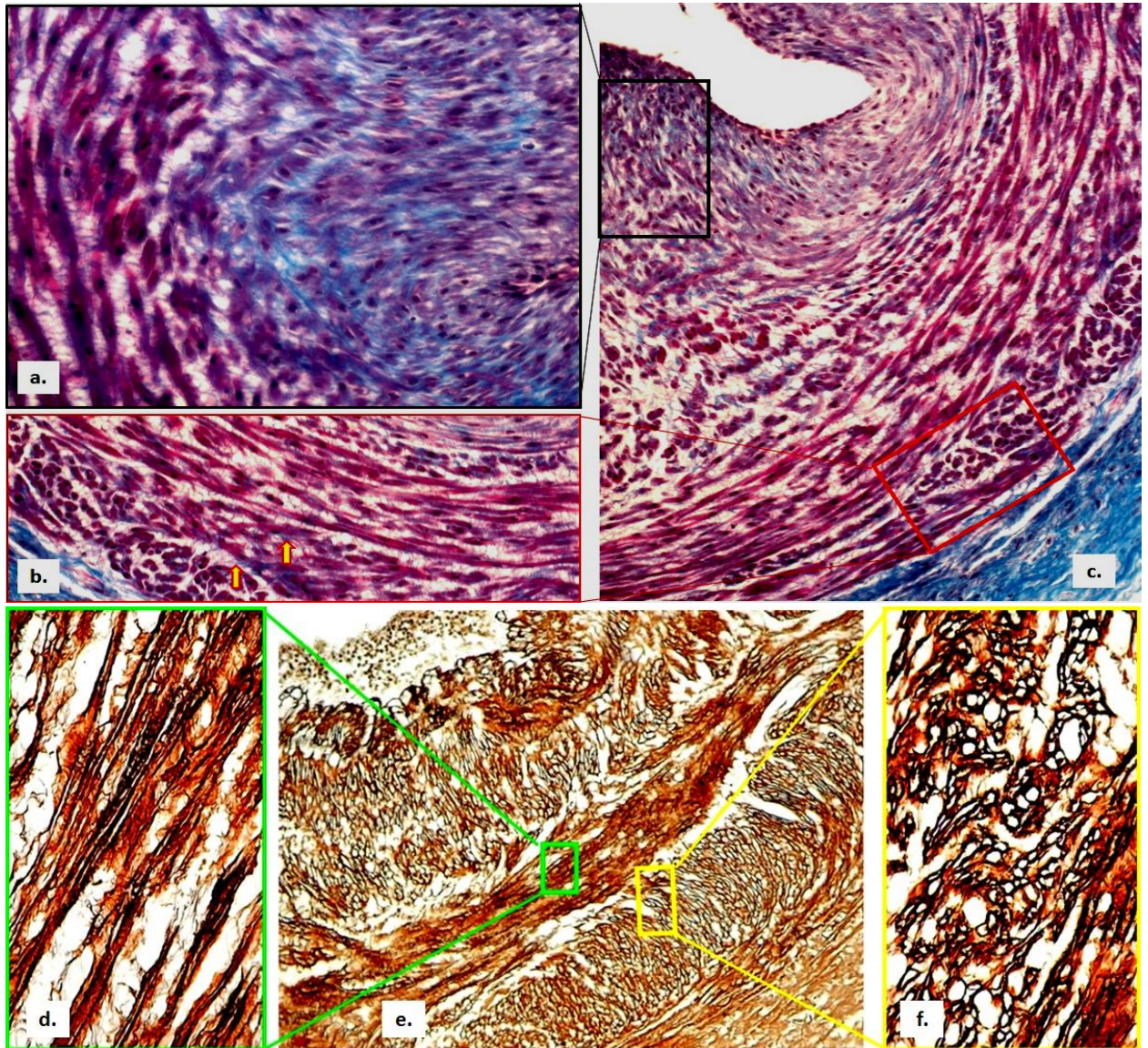


Fig. 3.15. Distribuția fibrelor de colagen tip I în grosimea peretelui arterelor ombilicale: a) fragmente fibrilare în intimă și straturile profunde ale mediei, $\times 200$; b) aspectul fibrelor de colagen în straturile superficiale ale mediei, $\times 200$; c, e) imagini de ansamblu al peretelui arterei ombilicale cu evidențierea fibrelor de colagen tip I și fibrelor reticulare, d) pattern-ul liniar de distribuție a fibrelor reticulare, f) pattern-ul areolar de distribuție a fibrelor reticulare, $\times 100$, $\times 400$, Colorația tricrom Masson, Impregnație argentică Gordon-Sweet

Fibrele de colagen din peretele venei erau ușor mai îngroșate, în schimb densitatea acestora era mai redusă comparativ cu arterele ombilicale. La nivelul intimei componenta colagenică tip I, îngroșată semnificativ, avea aspectul unei membrane localizate la limita între intimă și medie. La nivelul mediei au fost observate doar urme de colagen, în schimb, în apropierea substanței gelatinoase, cantitatea fibrelor, dar și grosimea acestora, erau crescute (Figura 3.16 a). Fibrele reticulare, pentru ambele tipuri de vase, au fost localizate predominant în

medie. Aici componenta fibrilară de tip III circumscria miocitele, formând o carcasă de suport pentru acestea. Pentru ambele tipuri de vase au fost identificate două pattern-uri de distribuție a fibrelor reticulare: liniar și areolar (Figura 3.15d, e, f).

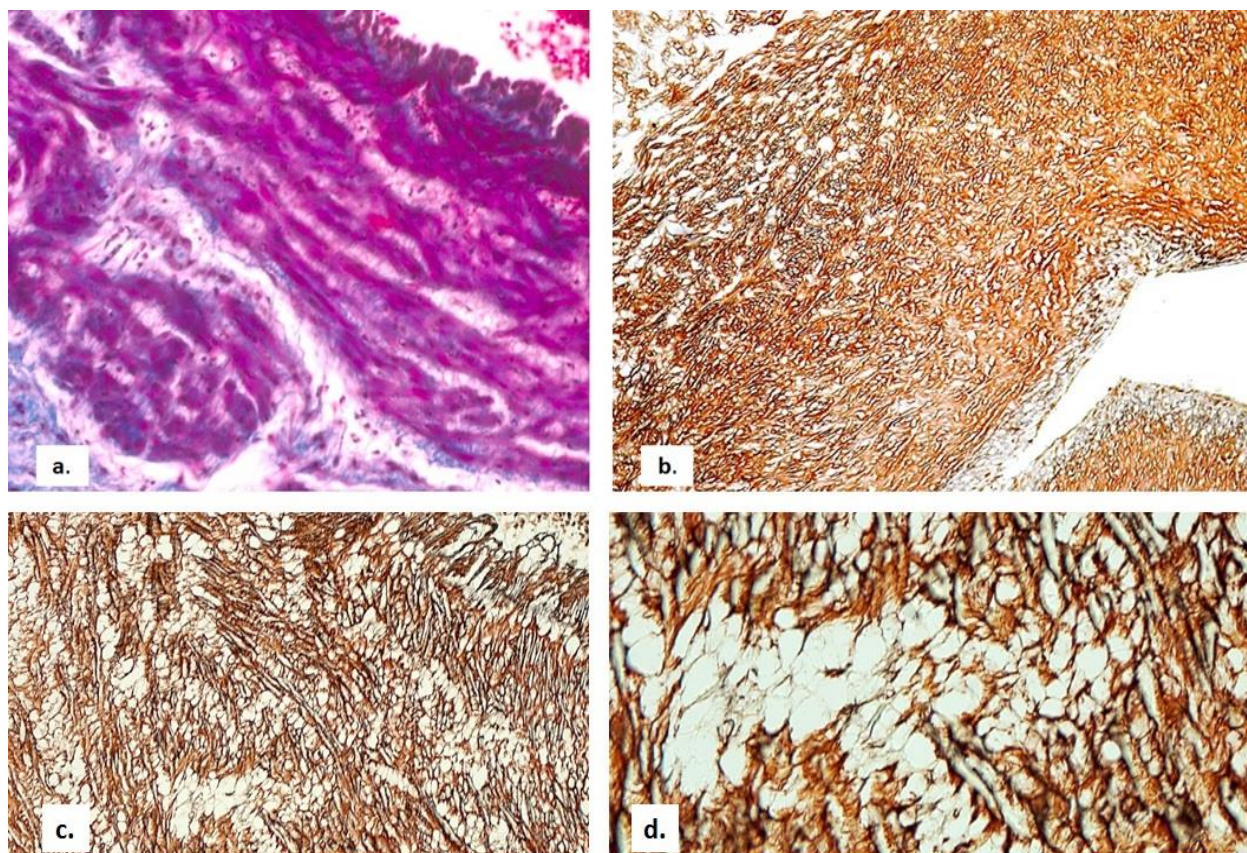


Fig. 3.16. Distribuția fibrelor reticulare în grosimea peretelui vaselor ombilicale: a) aspectul fibrelor de collagen în grosimea peretelui venei ombilicale, $\times 200$; b) aspect comparativ al densității fibrelor reticulare în intimă *versus* media $\times 100$, c-d) fibre reticulare fine ce circumscriu parțial sau total spațiile veziculoase din media venei, $\times 100$, $\times 400$; Colorația tricrom Masson, Impregnație argentică Gordon-Sweet

De asemenea, la nivelul mediei, în zonele structurilor veziculoase cu conținut mucopolizaharidic, fibrele reticulare erau fragmentate. Aceste fragmente fibrilare circumscriau parțial, alteori total aceste vezicule, astfel formând un perete fin pentru structurile date (Figura 3.16 c, d). Menționăm că, la nivelul intimei densitatea fibrelor reticulare a fost mult redusă, alocuri, chiar absentă (Figura 3.16 b).

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 bio-

compatibilitatea, proprietățile mecanice, suprafața anti-trombogenică, porozitatea ridicată și biodegradabilitatea. Pentru a obține un astfel de vas, au fost propuse mai multe metode bazate pe principii fizice, chimice și enzimatic. Cu toate acestea, identificarea unei metode de decelularizare optimale rămâne un obiectiv important și pentru studiul nostru, care vine să integreze cunoștințele din domeniile biologiei, medicinei și ingineriei tisulare.

Pentru studierea proprietăților biomecanice ale arterelor ombilicale s-au întreprins 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 la presiune); 6) în final, segmentele de vase au fost caracterizate biomecanic și morfologic. Caracterizarea morfologică a inclus studierea aspectelor structurale ale vaselor decelularizate, mai exact gradul de decelularizare și calitatea componentelor matricei extracelulare. De asemenea, microscopic au fost studiate și segmentele de vase ombilicale care au fost supuse testului de rezistență la presiune. Caracterizarea biomecanică a arterelor ombilicale decelularizate a constat în măsurarea rezistenței la tracțiune, a elasticității și a altor proprietăți mecanice care sunt critice pentru funcția lor *in vivo*.

Examenul morfologic al arterelor ombilicale decelularizate.

Arterele decelularizate au prezentat în secțiuni transversală un lumen larg comparativ cu specișenele din lotul martor, care au fost descrise cu un lumen neregulat, ramificat, caracteristic pentru vasele contractate (Figura 3.17).

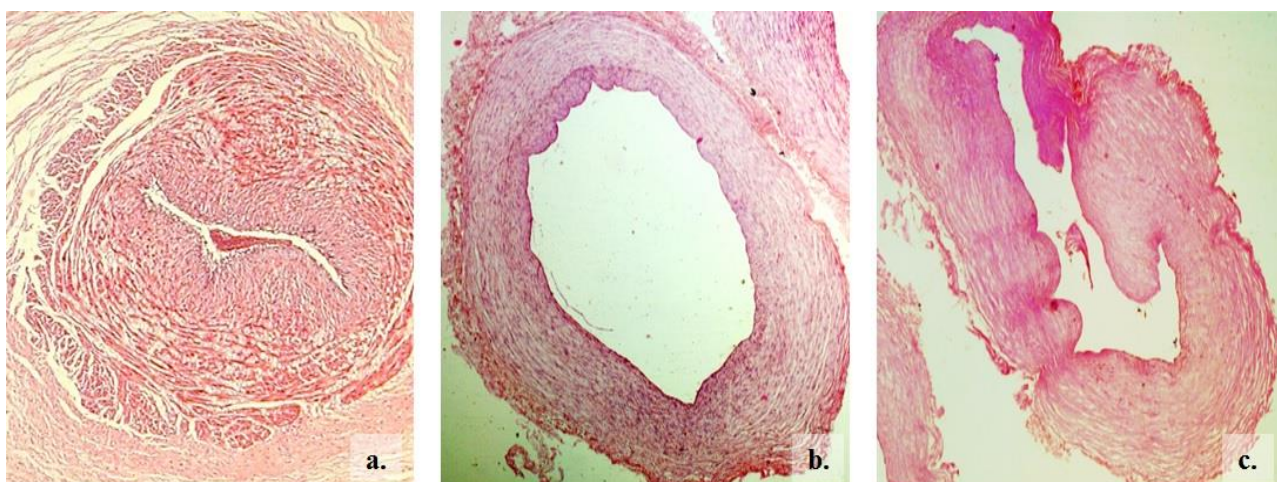


Fig. 3.17. Secțiuni transversale prin arterele ombilicale cu vizualizarea lumenului vasului ; a) arteră ombilicală nativă; b) arteră decelularizată prin metoda enzimatică; c) arteră decelularizată prin metoda combinată, ×250; Colorația Hematoxină-Eozină

Microscopic, pentru toate vasele decelularizate a fost observată, reducerea spațiilor veziculoase mucopolizaharidice intermusculare de la nivelul mediei. În funcție de metoda utilizată gradul de decelularizare a vaselor a fost variat. La tratarea arterelor ombilicale cu soluție de tripsină (metoda enzimatică) s-a obținut un grad scăzut de decelularizare. Menționăm că, țesuturile peretelui vascular prezentau încă un număr semnificativ de celule și/sau resturi celulare. Decelularizarea obținută prin metoda enzimatică a avut un caracter neomogen. Astfel că, în porțiunea externă a mediei gradul de decelularizare a fost ridicat comparativ cu porțiunile interne ale vasului, unde au fost identificate celule musculare netede care au suferit modificări calitative (Figura 3.18). Astfel, miocitele netede erau caracterizate prin volum citoplasmatic redus, formă mult aplatizată, nucleu cu un grad crescut de degenerare, frecvent picnotici. La nivelul intimei gradul de decelularizare a fost unul ridicat. Sub acțiunea litică a tripsinei s-au produs modificări ale structurii matricei extracelulare colagenice. Fibrele de colagen erau subțiri și prezentau grad crescut de degradare. De asemenea, a fost observată reducerea densității și caracterului ondulat al fibrelor.

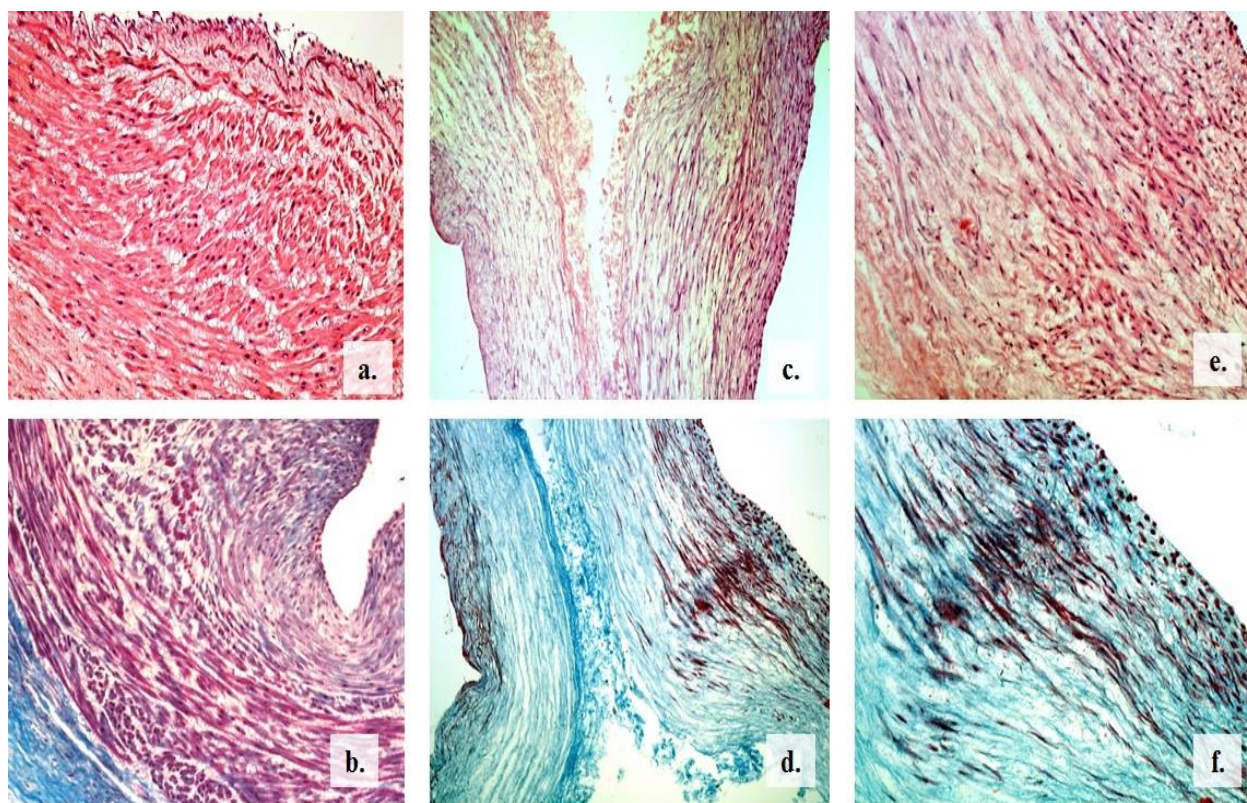


Fig. 3.18. Artere ombilicale native *versus* artere decelularizate prin metoda enzimatică (aspecte morfologice). (a-b) structura arterelor ombilicale din lotul martor, ×200; (c-f) structura peretelui arterial decelularizat, cu vizualizarea resturilor celulare și a modificărilor matricei extracelulare, ×100; ×200, Colorația Hematoxină-Eozină; Colorație tricrom Masson

Fibrele de colagen din porțiunile externe ale vaselor decelularizate prin metoda enzimatică prezentau un traiect longitudinal, fiind preponderent localizate perpendicular cu axul lung al vasului. Această tendință nu a fost observată în zonele profunde ale mediei, unde fibrele de colagen aveau un aspect areolar.

Cel mai crescut grad de decelularizare a fost obținut prin metoda chimică cu utilizarea soluției de detergent de 1% dodecil sulfat de sodiu (SDS). Decelularizarea țesuturilor vasculare purta un caracter omogen, fără prezența urmelor celulare (Figura 3.19). Matricea extracelulară a fost bine conservată, fiind caracterizată de prezența unor fibre de colagen organizate în fasciculele groase, omogen repartizate în întreaga grosime a arterelor decelularizate. Pe alocuri, fibrele de colagen au prezentat un grad minim de fragmentare. În straturile intimei, matricea extracelulară a fost caracterizată de cantități mici de fibre elastice, localizate printre fibrele de colagen și colorate în albastru deschis.

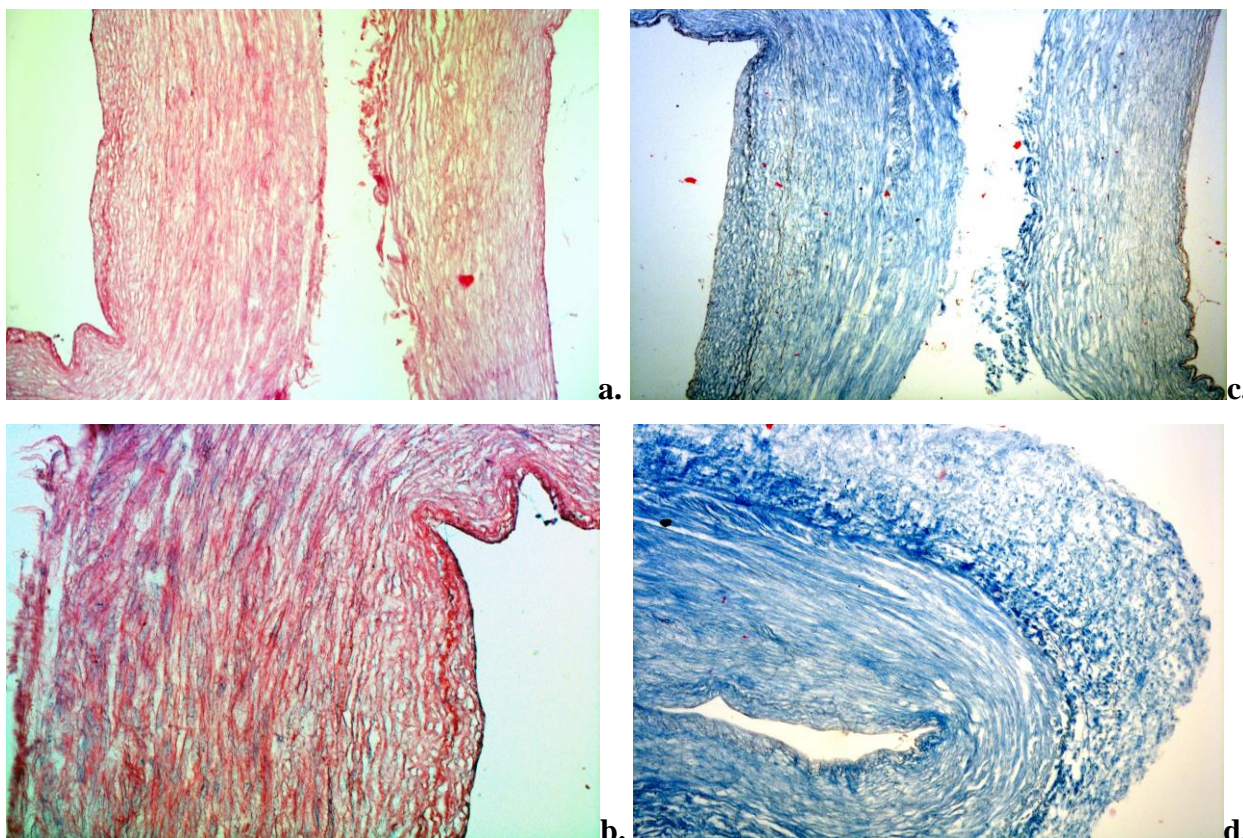


Fig. 3.19. Artere ombilicale decelularizate prin metoda chimică (aspecte morfologice). (a-d) structura peretelui arterial, cu vizualizarea unui grad crescut de decelularizare și o matrice extracelulară bine conservată; a) $\times 100$; b) $\times 200$, Colorația Hematoxină-Eozină; c) $\times 100$; d) $\times 200$, Colorație tricrom Masson

Metoda combinată a dus la o decelularizare parțial completă, astfel că, încă, se putea observa prezența unor cantități reduse de celule sau resturi celulare în spațiul subendotelial, dar

și în ariile profunde ale mediei. Frecvent aceste celule erau izolate, rareori se puteau observa grupuri de celule. Menționăm că, componenta celulară restantă prezenta modificări morfologice degenerative, astfel că, mai des s-au observat resturi citoplasmice sau nucleare (Figura 3.20). Matricea extracelulară avea un aspect aparent bine conservat. Fibrele de collagen au fost groase, cu un caracter ondulat păstrat, dispuse compact, caracteristic pentru zonele interne ale mediei. Totuși, în porțiunile externe ale mediei, dar și în substanța gelatinoasă Wharton restantă din jurul arterelor, fibrele de collagen erau subțiri și prezentau local fragmentari.

În scopul evaluării efectului decelularizării asupra grosimii peretelui arterial s-a realizat morfometria pentru toate segmentele arteriale supuse decelularizării prin cele trei metode utilizate.

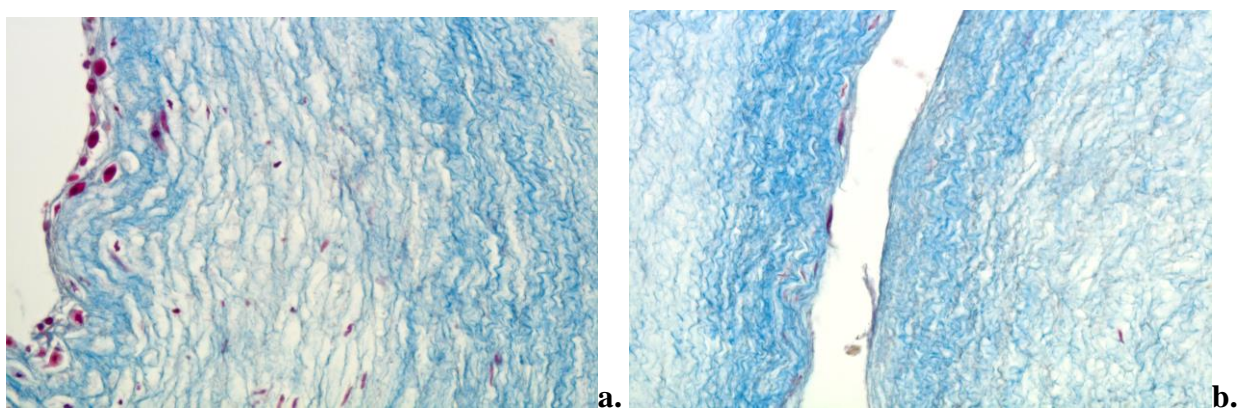


Fig. 3.20. Artere ombilicale decelularizate prin metoda combinată, cu vizualizarea unor resturi celulare și a matricei extracelulară ușor modificate; a) $\times 200$; b) $\times 100$, Colorație tricrom Masson

Datele obținute prin studiul morfometric al grosimii peretelui segmentelor arteriale supuse decelularizării au fost expuse tabelul 3.2.

Tabelul 3.2. Analiza morfometrică a segmentelor de artere ombilicale supuse procedeeilor de decelularizare

Piesele vasculare	n	Grosimea peretelui (mm)				
		Media	DS	IHQ	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 inițial au fost obținute în mkm, după care au fost transformate în mm.

Pentru a estima impactul procedeelelor de decelularizare asupra morfologiei arterelor, s-au comparat valorile medii a diametrului extern și grosimii peretelui vasului. Diferențele obținute la compararea datelor între artera nedecelularizată și arterele decelularizate cu ajutorul celor 3 metode, atât pentru diametrul extern, cât și pentru grosimea vasului sunt reprezentate în tabelul 3.3.

Tabelul 3.3. 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.

Rezultatele **testului de rezistență la întindere** a segmentelor arterelor decelularizate comparativ cu vasele intacte din lotul martor au arătat variații pentru toate metodele de decelularizare utilizate.

Tabelul 3.4. Rezultatele testului de rezistență la întindere a arterelor ombilicale supuse procedeelelor de decelularizare

Tipul de arteră ombilical	Media	DS	IIQ	Mediana	Mo
Martor (artere nedecelularizate)	2,30	0,25	2,00-2,50	2,50	2,50
Artere decelularizate cu sol. 1% SDS	1,85	0,02	1,75-2,00	1,75	2,00
Artere decelularizate cu sol. Tripsina	1,55	0,04	1,50-1,57	1,55	1,55
Artere decelularizate prin met. combinată	1,80	0,04	1,75-1,80	1,80	1,80

Tabelul 3.5. 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.

Astfel, pentru arterele decelularizate prin metoda combinată, valorile forței de tracțiune au variat de la 1,75 N la 1,85 N, iar diferența aritmetică între valoarea medie a lotului control a fost de 0,50 N. Arterele ombilicale decelularizate prin metoda chimică (cu soluție 1% SDS) s-au rupt la valori situate între 1,7 N și 2 N.

Cea mai însemnată diferență de 0,75 N, raportată la valoarea medie a lotului martor, a fost pentru vasele decelularizate prin metoda enzimatică (cu tripsină). Rezultatele experimentului repartizate per grup sunt ilustrate în Figura 3.21.

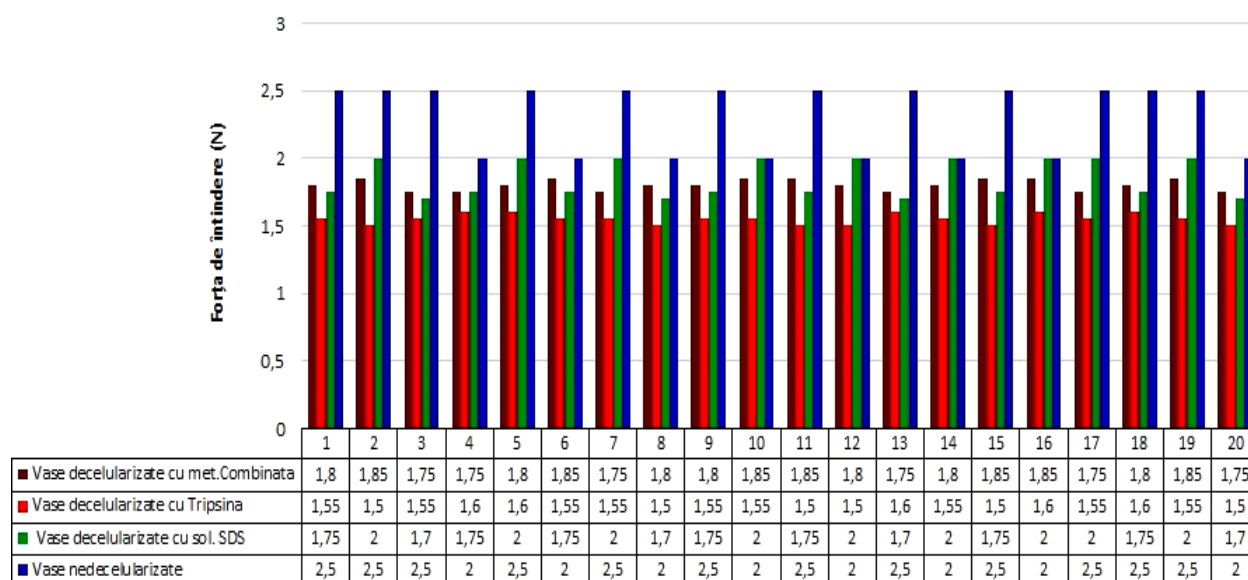


Fig. 3.21. Rezultatele detaliate a testului de rezistență la întindere a segmentelor arterelor decelularizate comparativ cu vasele intacte din lotul martor

Testul de rezistență la presiune a fost prevăzut pentru evaluarea capacității vaselor de a rezista la presiunea de 280 mm Hg. 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 – martor (vase intacte) și 3 loturi de artere decelularizate prin cele 3 metode (combinată, chimică, enzimatică). Reieșind din considerentul că, atât în condiții fiziologice, cât și în patologii, presiunea în vasele de calibrul DI < 0,6 nu atinge nivelul de 200 mm Hg, putem afirma că, din punct de vedere mecanic, arterele ombilicale intacte și decelularizate sunt capabile să fie utilizate pentru substituie vasculară în calitate de greafă.

Ulterior segmentele de artere decelularizate și 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.

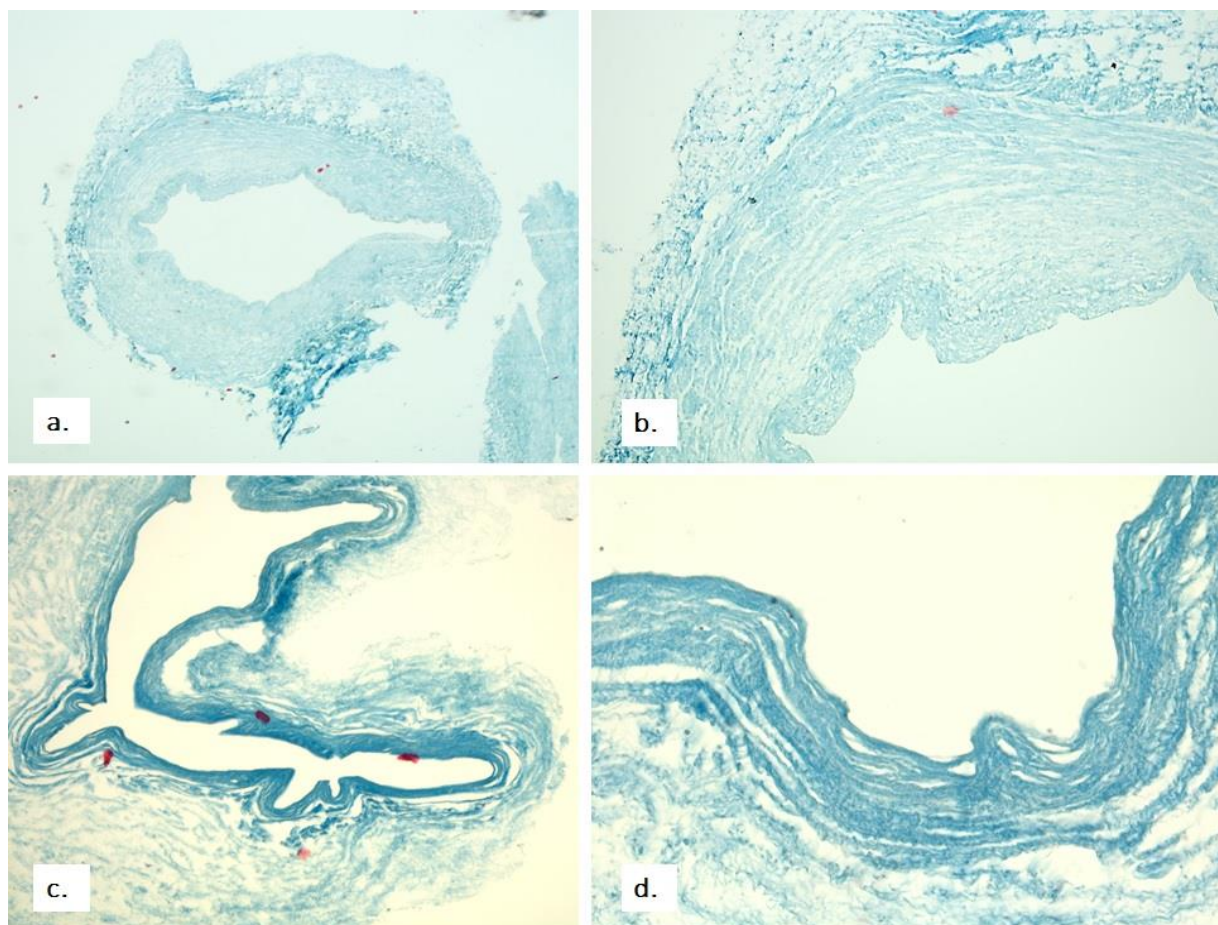


Fig. 3.22. Artere ombilicale decelularizate prin metoda chimică (a-b) și metoda combinată (c-d) supuse testului de rezistență la presiune (*particularități microscopice*); a, c) $\times 100$; b, d) $\times 200$, Colorație tricrom Masson

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 (Figura 3.22). Această metodă de decelularizare a afectat matricea extracelulară, ceea ce poate conduce la scăderea proprietăților mecanice ale arterei. În Figura 3.23, se poate observa o comparație vizuală între modificările grosimii peretelui în probele de artere decelularizate care au fost supuse testului de gonflare, în raport cu vasele decelularizate înainte de testare.

Tabelul 3.6. Valorile grosimii peretelui al segmentelor de artere ombilicale decelularizare supuse testului de rezistență la presiune

Piesele vasculare	n	Grosimea peretelui, mm				
		Media	DS	IIQ	Mediana	Mo
Segmente decelularizate prin aplicarea sol. 1% SDS testate la presiune	20	0,45	0,04	0,42- 0,47	0,45	0,39
Segmente decelularizate prin aplicarea sol. Tripsină testate la presiune	20	0,33	0,04	0,29 - 0,36	0,32	0,28
Segmente decelularizate prin metoda combinată testate la presiune	20	0,11	0,02	0,09- 0,12	0,10	0,09

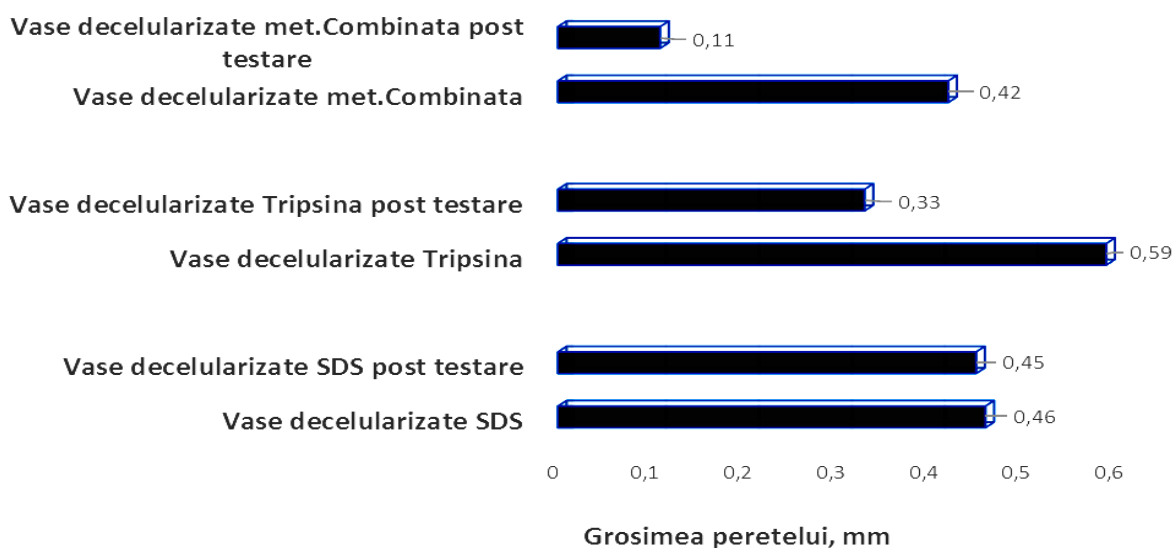


Fig. 3.23. Redimensionarea grosimii peretelui segmentelor arterelor decelularizate post-testul de rezistență la presiune comparat cu grosimea segmentelor decelularizate pre-testare

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

Tabelul 3.7. Compararea valorilor medii a grosimii peretelui vaselor decelularizate până la testare și post-testare

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

3.5. Aspecte structurale specifice a substanței gelatinoase Wharton

Substanța gelatinoasă reprezintă un țesut cu o structură heterogenă în care pot fi găsite mai multe subpopulații de celule și configurații ale matricei extracelulare. Utilizând metodele de colorare histologice (Hematoxină-Eozină, tricrom Masson) și histochimice (Impregnarea argentică Gordon-Sweet) am studiat particularitățile structurale caracteristice ale substanței Wharton. În scopul standardizării și ușurinței de comparare între componentele structurale ale țesutului dat, am utilizat clasificarea regională propusă de Davies et al. (2017). Conform acestei clasificări în substanța Wharton, se deosebesc 4 zone (regiuni) topografice diferite: 1) subamniotică, 2) periferică, 3) perivasculară și 4) intervasculară [40].

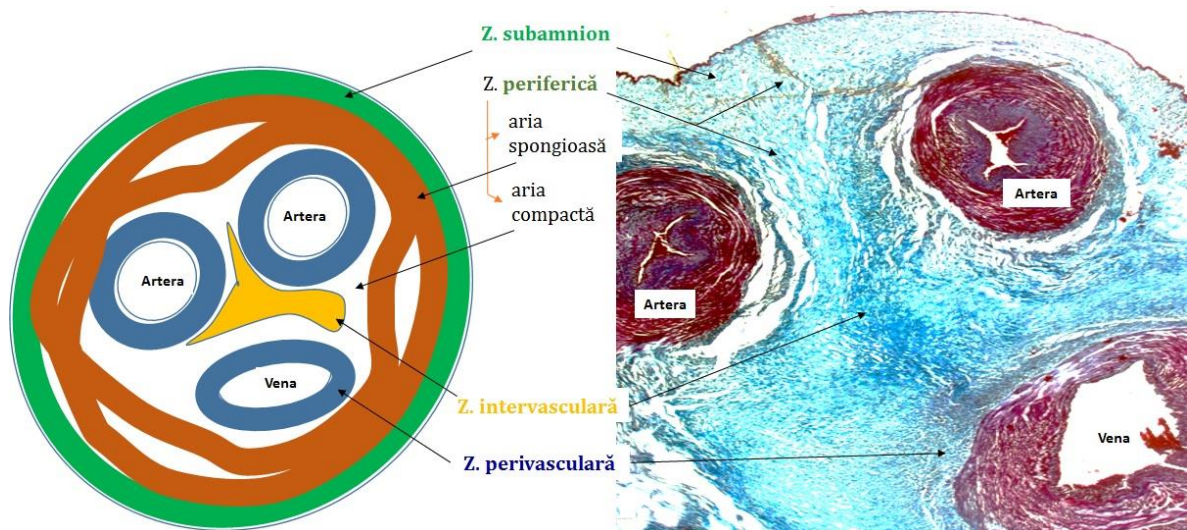


Fig. 3.24. Schema și reprezentarea histologică a zonelor substanței gelatinoase Wharton

Studiind fiecare regiune separat, am observat că zona periferică, microscopic, era diferită în ariile superficiale și profunde. Reieșind din această observație, am subîmpărțit zona periferică în 2 subregiuni: regiunea superficială spongioasă și regiunea profundă compactă (Figura 3.24).

Distribuția celulară în substanța Wharton poartă un caracter neomogen. Astfel, cantitatea cea mai mare fiind pentru zona perivasculară, urmată de zona intervasculară. S-a observat că numărul celulelor crește exponențial de la periferie spre ariile profunde ale cordonului ombilical. Morfologia celulelor a variat în funcție de ariile substanței gelatinoase. Astfel că, regiunile subamniotică și periferică, predominant, au fost populate de celule de formă stelată, ce prezentau prelungiri foarte lungi, prin intermediul cărora formau conexiuni cu celulele din vecinătate. Celulele zonei periferice se caracterizau prin morfologie asemănătoare miofibroblastelor, prezentând nucleu mare, de formă ovală sau rotundă și citoplasmă din abundență (Figura 3.25 b).

În plus, s-a observat că celulele zonei periferice au prezentat mai multe și mai lungi procese citoplasmatică în comparație cu cele din regiunile perivascularare, unde caracteristicile apofizate erau mai puțin evidente. Celulele zonei perivascularare aveau frecvent o formă de fus, cu o cantitate redusă de citoplasmă (Figura 3.25 d). Aceste celule erau uniform distribuite în jurul vaselor ombilicale și păreau să formeze straturi concentrice.

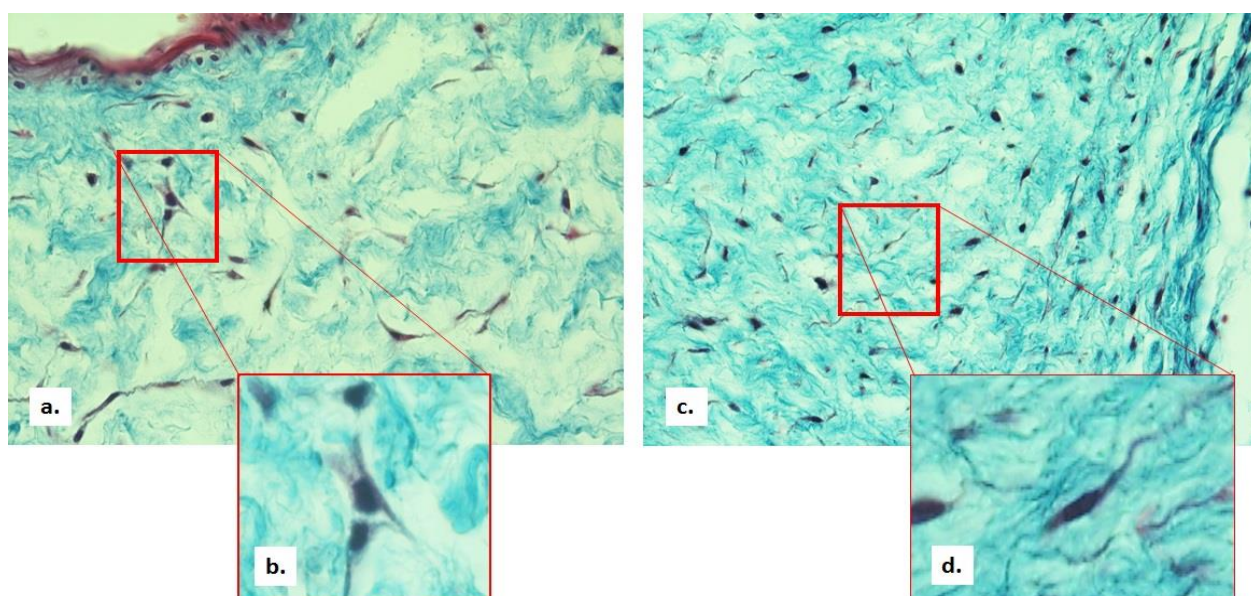


Fig. 3.25. Celulele substanței Wharton din zonele periferică și perivasculară. a) zona periferică spongioasă cu numeroase celule apofizate, b) celule miofibroblast-like, c) zonele periferică compactă și perivasculară cu celule fusiforme, d) morfologia celulei fibroblast-like; a, c) $\times 100$; b, d) $\times 400$, Colorație tricrom Masson

Componenta fibrilară a substanței Wharton era bine reprezentată în toate ariile studiate. Totuși, densitatea cea mai mare a fibrelor de colagen era în zona perivasculară, unde acestea formau fascicule groase dispuse compact în jurul vaselor ombilicale. Analizând preparatele histologice în lumina polarizată s-a observat că fibrele de colagen emit semnal alb-translucent în

toată substanța gelatinoasă. Iar această birefrență și dicroism al fibrelor demonstrează caracterul matur al acestora (Figura 3.26 a, b).

În zona subamniotică, fasciculele de fibre de colagen erau dispuse compact. Pe măsura succedării acestora spre zona periferică, dispăre caracterul compact, iar fibrele de colagen sunt dispersate printre componenta amorfă, care în straturile periferice ale zonei compacte formează acumulări. Aceste acumulări, delimitate de componenta fibrilară conjunctivă de tip I, dar și reticulară formează niște teritorii asemănătoare cu despicături (crăpături). În interiorul acestor „despicături stromale” se regăsesc foarte puține fragmente fibrilare și o cantitate suficientă de mucopolizaharide. Fibrele reticulare au fost bine reprezentate în zona subamniotică, imediat sub membrana bazală a epitelului amniotic (Figura 3.26 f). Componenta reticulară a fost prezentă în toată substanța Wharton, fără a putea identifica un model caracteristic în distribuția acestora.

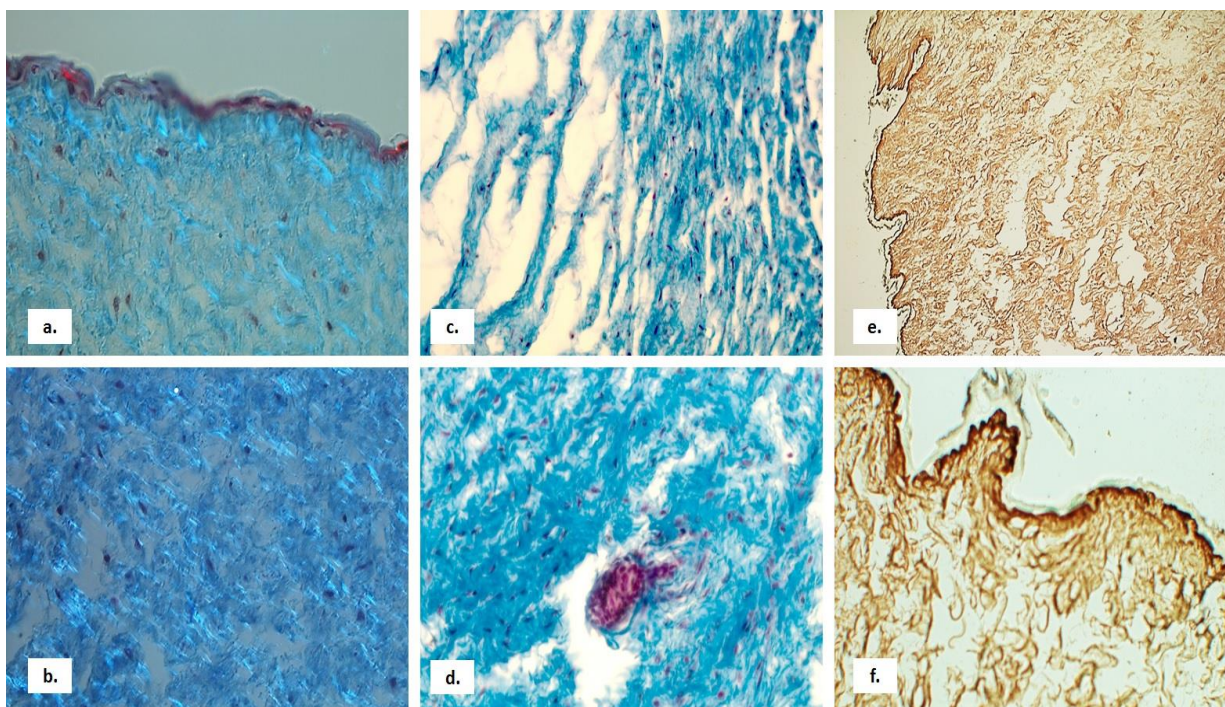


Fig. 3.26. Componenta fibrilară a substanței Wharton (*particularități microscopice*). a, b) fibre birefringente în ariile periferică și subamniotică, c) zona periferică spongioasă cu vizualizarea de ”despicături stromale”, d) reminiscente celulare ale ductului alantoidic, e, f) distribuția particular a fibrelor reticulare în zonele subamniotic și periferică, a, d) $\times 100$, $\times 200$; Colorația tricromă Masson. e-f) $\times 100$, Impregnație argentică Gordon-Sweet

Notăm că, în 6 (10,71%) cazuri, în zona intervasculară, au fost observate reminiscente celulare ale ductului alantoidian, care erau reprezentate de aglomerări celulare de formă aplatizată sau cubică, înconjurate de fibre de colagen compact organizate (Figura 3.26 d).

3.6. Sinteza la capitolul 3

Forma cea mai frecventă a placentei a fost observată ca fiind ovală, urmată de forma rotundă și triunghiulară. În ceea ce privește inserția cordonului de placentă, cea mai frecventă a fost inserția excentrică, urmată de inserția periferică și inserția marginală. Studiul a evidențiat ramificarea vaselor ombilicale și prezența anastomozelor între arterele ombilicale în majoritatea placentelor. Rețeaua arterială corială a fost caracterizată de un model de ramificare dihotomic, iar ramurile intraplacentare din vilozitățile terminale au fost identificate ca structuri cu aspect de "fund de sac". Zonele drenate de afluenții venei ombilicale au fost observate cu hotare bine delimitate, iar cel mai frecvent pattern de distribuție al ramurilor venoase a fost între cotiledoanele placentare. Nu au fost identificate anastomoze directe între sistemul arterial și cel venos al placentei.

Cordoanele ombilicale au fost acoperite de epiteliul amniotic, care era atașat de substanța gelatinoasă Wharton prin intermediul componentei conjunctive fibroase. Epiteliul amniotic ombilical varia în funcție de localizarea sa în cordon, fiind simplu columnar și/sau cubic în porțiunile distale și devenind stratificat cubic în porțiunile medii și proximale. Arterele ombilicale au prezentat un lumen neregulat *versus* vena ombilicală, care avea un lumen mai larg. Peretele vaselor ombilicale consta din două tunici (intima și media), lipsind adventiția și membrana elastică externă. Tunica intimă a arterelor ombilicale era bine dezvoltată comparativ cu vena și conținea celule musculare netede de dimensiuni mici, dispuse longitudinal. Tunica medie a vaselor ombilicale era structurată în două straturi distincte în artere și mai puțin evidente în venă. Membrană elastică internă era prezentă doar în vena ombilicală. Printre miocitele netede ale mediei au fost prezente spații veziculoase umplute cu conținut mucopolizaharidic.

Analiza componentei fibrilare a vaselor ombilicale a relevat distribuția neomogenă a fibrelor de colagen tip I și reticulare. Fibrele de colagen tip I erau predominant prezente în intimă și în jurul miocitelor din media. Fibrele reticulare erau localizate în medie și circumscriau miocitele, formând o carcasă de suport. Densitatea și grosimea fibrelor a variat între artere și vene.

În acest studiu, s-au investigat proprietățile biomecanice și morfologice ale arterelor ombilicale decelularizate, în contextul dezvoltării grefelor vasculare prin tehnicile de inginerie tisulară. S-a constatat că crearea unui vas ideal, care să aibă toate proprietățile unui vas sangvin biologic, rămâne un obiectiv nerealizat. Pentru evaluarea proprietăților biomecanice, arterele ombilicale au fost supuse unor teste de rezistență la întindere și presiune. Rezultatele au evidențiat modificări semnificative în structura și compoziția vaselor decelularizate. În ceea ce privește analiza microscopică, decelularizarea a condus la reducerea spațiilor mucopolizaharidice

interlaminare și la îndepărtarea componentei celulare. Gradul de decelularizare a variat în funcție de metoda utilizată, cu un grad scăzut în cazul tratării cu soluție de tripsină. De asemenea, s-a observat o neuniformitate a decelularizării în straturile vaselor decelularizate, cu un grad mai ridicat în porțiunile externe ale stratului mijloc și în intima.

Analiza matricei extracelulare a relevat modificări ale fibrelor de colagen, cum ar fi subțierea, fragmentarea și reducerea densității acestora. Fibrele de colagen au prezentat un traiect longitudinal în porțiunile externe ale vaselor decelularizate, în timp ce în zonele profunde ale stratului mijloc au prezentat un aspect areolar. Metoda combinată de decelularizare a dus la o decelularizare parțial completă, cu prezența redusă a celulelor sau resturilor celulare. Prin acest studiu se evidențiază importanța dezvoltării de metode optimizate de decelularizare pentru obținerea grefelor vasculare ideale în ingineria tisulară. Îmbunătățirea bio-compatibilității, proprietăților mecanice și anti-trombogene, porozității și bio-degradabilității rămân provocări importante pentru cercetările viitoare în acest domeniu.

Datele morfologice obținute din studiu relevă caracteristicile structurale ale matricei extracelulare din placenta umană. În vilozitățile intermediare și terminale, componenta fibrilară conjunctivă a fost observată sub forma unor fibrile subțiri, dezorganizate, dispuse într-o rețea centrală. În jurul capilarelor, s-a identificat un strat compact de fibre reticulare.

Stroma decidualei prezenta fibre reticulare mai groase, organizate într-un model ordonat în porțiunile centrale, iar în zonele periferice se intersectau fibrele groase și subțiri. La nivelul placii coriale, componenta fibrilară era dominată de fibrele de colagen, iar fibrele reticulare erau prezente în diverse zone, cum ar fi sub epiteliul amniotic, sub trofoblast și în vasele coriale mari. Fibrinoidul, o structură specifică placentei, prezenta două modele distincte: unul fibros, cu fibre reticulare groase și dezorganizate, și unul matriceal, cu fibre fine omogen distribuite într-o matrice amorfă. Aceste două modele puteau coexista în același fibrinoid, fiind localizate în zonele profunde și, respectiv, superficiale.

Acest studiu a evidențiat structura complexă și heterogenă a substanței gelatinoase Wharton, precum și variațiile morfologice și distribuția celulară în funcție de regiunile sale. Aceste informații contribuie la înțelegerea mai profundă a compoziției și organizării acestui țesut important din cordonul ombilical.

4. CARACTERISTICA IMUNOHISTOCHEMICĂ A CELULELOR DIN COMPONENTA COMPLEXULUI OMBILICO-PLACENTAR

4.1. Expresia D2-40 în țesuturile complexului ombilico placentar

Anticorpul D2-40 reprezintă un marker selectiv pentru endoteliul limfatic, având o afinitate crescută față de podoplanina umană. Rezultatul final al imunoreacției la anti-D2-40 a fost colorarea în brun a celulelor din componenta țesuturilor cordonului ombilical și a placentei. Modelul de expresie a markerului a fost unul mixt: membranar și citoplasmatic, cu aspect fin granular. Utilizarea imunoreacției la anti-D2-40 a permis evaluarea expresiei și intensității diferențiate în celulele epiteliale și stromale din cadrul cordonului ombilical și a placentei la termen.

Distribuția celulelor D2-40 pozitive în cordonul ombilical

În speciamele cu cordon ombilical s-au observat mai multe porțiuni care au exprimat markerul D2-40. Odată, acest marker a fost exprimat de celulele epitelului amniotic al cordonului ombilical. De obicei, pattern-ul de expresie a fost citoplasmatic, difuz și granular. Uneori, s-a observat și o expresie mixtă în aceste celule. Este important de menționat că, expresia markerului a fost evidențiată, în special, la polul bazal al celulei, iar în zonele unde epitelul era stratificat, imunomarcajul a fost observat doar în celulele bazale (Figura 4.1). Această caracteristică particulară a creat impresia unei linii de demarcație, care uneori era subtilă, iar alteori era bine definită.

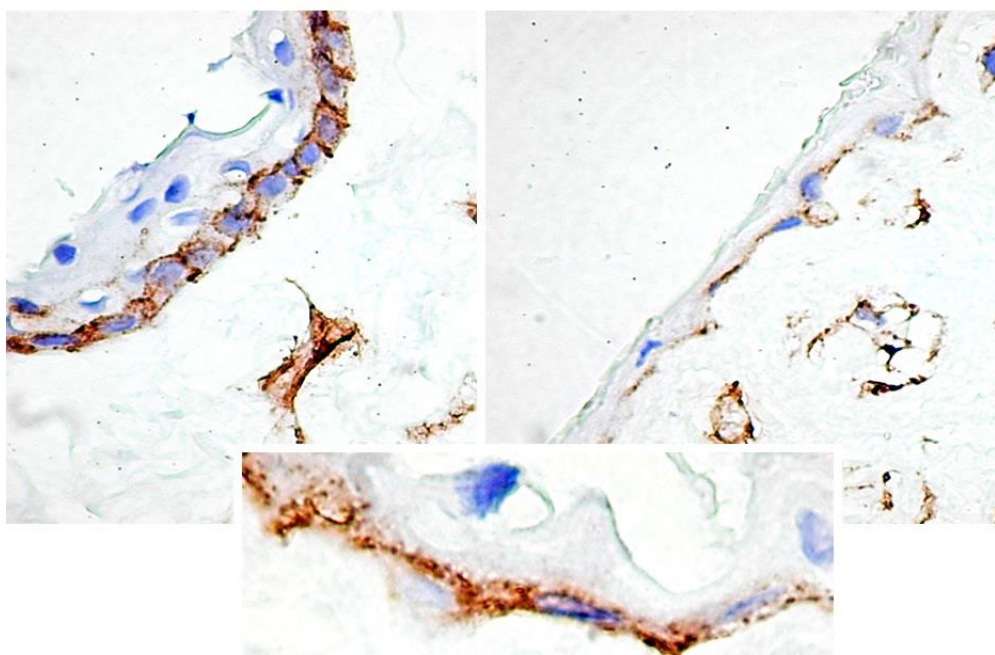


Fig. 4.1. Aspecte particulare a imunomarcajului pentru D2-40 la nivelul epitelului amniotic ombilical, ×100, ×400, Imunoreacție pentru anti-D2-40, DAB

Este de remarcă faptul că în 3 cazuri (11,5 %) au fost identificate structuri mici vacuolate pozitive pentru D2-40, localizate printre celulele D2-40+ ale epiteliului amniotic ombilical. Analizând numărul de celule epiteliale care au fost pozitive pentru D2-40, putem afirma că toate celulele componente ale epiteliului au fost pozitive, iar expresia imunomarcajului a avut un caracter uniform, consistent și continuu. Intensitatea expresiei a variat de la crescută (mai frecventă) la moderată (mai rară).

În toate zonele substanței gelatinoase Wharton au fost observate celule D2-40+. Distribuția acestor celule a fost neomogenă. Astfel că, au fost identificate zone unde celulele D2-40+ predominau numeric, și zone unde acestea erau practic absente. Similar densității celulare, și intensitatea de exprimare a markerului de către celule pozitive a prezentat variații în funcție de zona substanței gelatinoase.

Astfel, în zona subamniotică, toate celulele au fost D2-40+. Intensitatea de expresie a markerului a fost intensă (3+). Pattern-ul de expresie a fost mixt (membranar și citoplasmatic). Celulele D2-40+ din această zonă erau de dimensiuni mici - medii, cu prelungiri scurte, îngroșate.

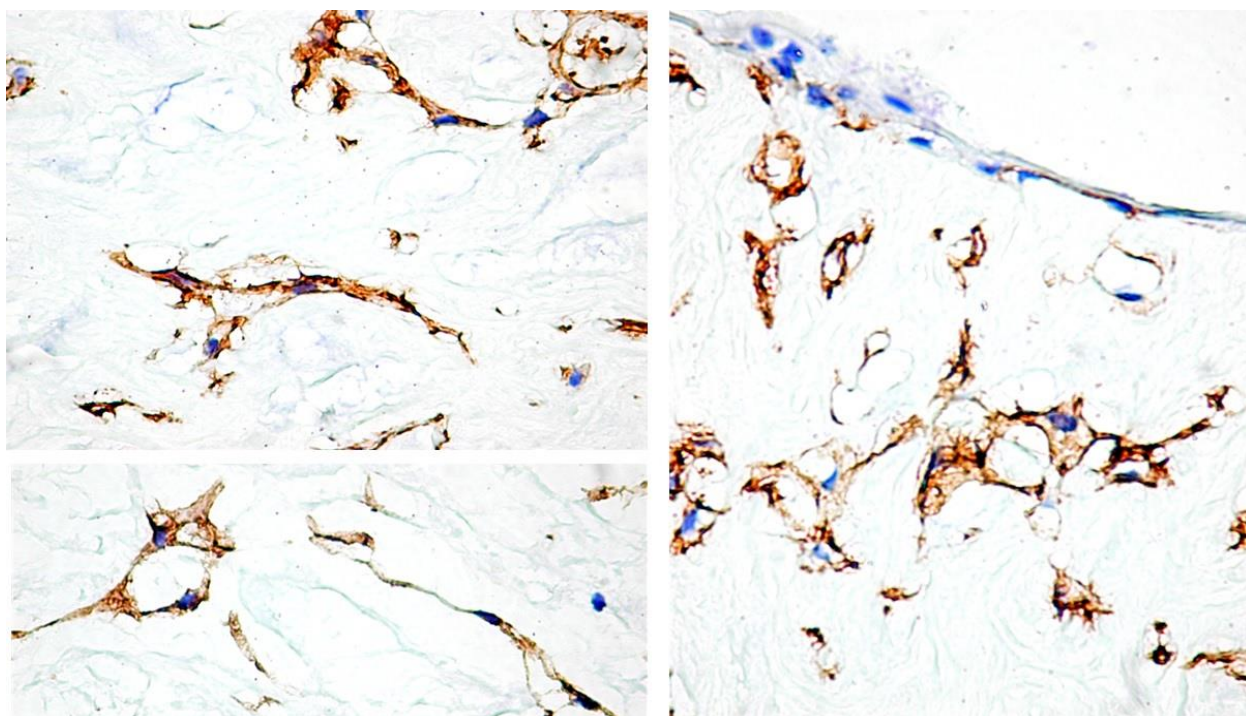


Fig. 4.2. Morfologia celulelor D2-40 pozitive de la nivelul zonelor subamniotică și periferică a substanței gelatinoase Wharton, ×100, ×200, Imunoreacție pentru anti-D2-40, DAB

Zona periferică porțiunea spongioasă a substanței gelatinoase a fost populată predominant de celule D2-40+, care erau de dimensiuni mai mari comparativ cu cele din zona subamniotică (Figura 4.2). Celulele D2-40+ din stratul spongios al zonei periferice erau caracterizate prin

prezența unor prelungiri citoplasmice lungi și groase. Prin intermediul prelungirilor, adesea, aceste celule formau conexiuni cu celulele învecinate. De asemenea, prin prelungirile citoplasmice, celulele din stratul spongios realizau anastomoze cu celulele D2-40+ din zona subamniotică. Datorită morfologiei particulare a acestor celule D2-40+, și a conexiunilor lor, microscopic, porțiunea periferică a substanței Wharton căpăta un aspect reticular. Celulele D2-40+ formau structuri în formă de cordon cu lumen, dar și fără lumen (Figura 4.2). Menționăm că, în stratul spongios al substanței gelatinoase au fost prezente și celule D2-40-, doar ca numărul acestora era mult redus. Exprimarea markerului de către celulele D2-40+ din stratul spongios a fost mixt, dar dominant membranar. Intensitatea de expresie a fost crescută (3+).

Un aspect notabil pentru ambele zone a fost prezența unor celule D2-40+ cu un fenotip vacuolar. Este important de menționat că, pentru anumite structuri vacuolare din stroma periferică, s-a observat doar expresia markerului, fără a putea identifica componenta citoplasmică sau membranară a celulei. Un alt aspect caracteristic pentru unele celule D2-40+, din ambele zone, a fost aspectul lacunar de localizare, ceea ce presupunea plasarea celulelor în spații cu mucopolizaharide asemenea unor lacune. Menționăm despre faptul că, în zona intervasculară a substanței Wharton, unde au fost prezente resturi celulare ale ductului alantoidian, s-a observat o creștere a numărului de celule stromale D2-40+ (Figura 4.3a). Aceste celule erau predominant localizate în jurul resturilor celulare restante.

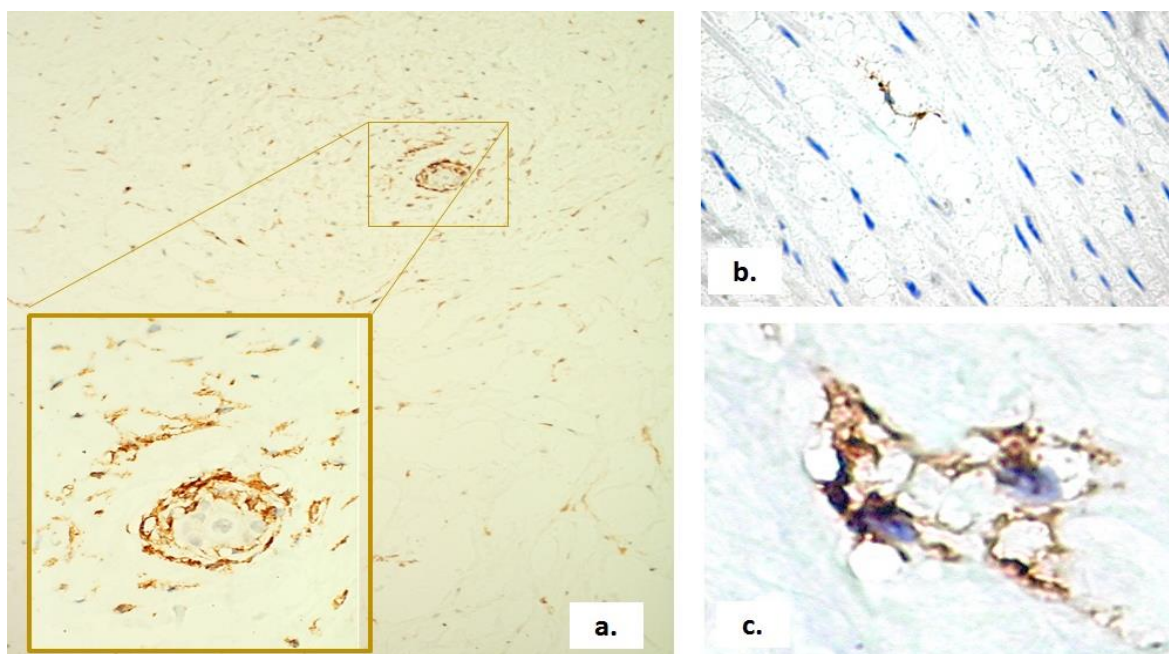


Fig. 4.3. Aspecte specifice a expresiei D2-40 în componentele structurale a substanței gelatinoase Wharton. a) pozitivitate la D2-40 în resturile de duct alantoidian; b) celulă solitară pozitivă în media vaselor; c) aspect lacunar al localizării celulelor D2-40 pozitive, ×100, ×400, Imunoreacție pentru anti-D2-40, DAB

Pentru zonele profunde ale substanței gelatinoase a fost caracteristic prezența celulelor D2-40+ cu morfologie diferită. Majoritatea celulele prezentau o reducere semnificativă a aspectului apofizat și a dimensiunii lor. În stratul compact al zonei periferice celulele D2-40+ erau fusiforme. Acestea erau dispuse concentric în jurul zonei perivasculare și a vaselor ombilicale, conferind stromei un aspect de distribuție liniară în comparație cu pattern-ul reticular din straturile superficiale.

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-. Datele despre repartizarea densităților medii pe zonă este ilustrat în Figura 4.4.

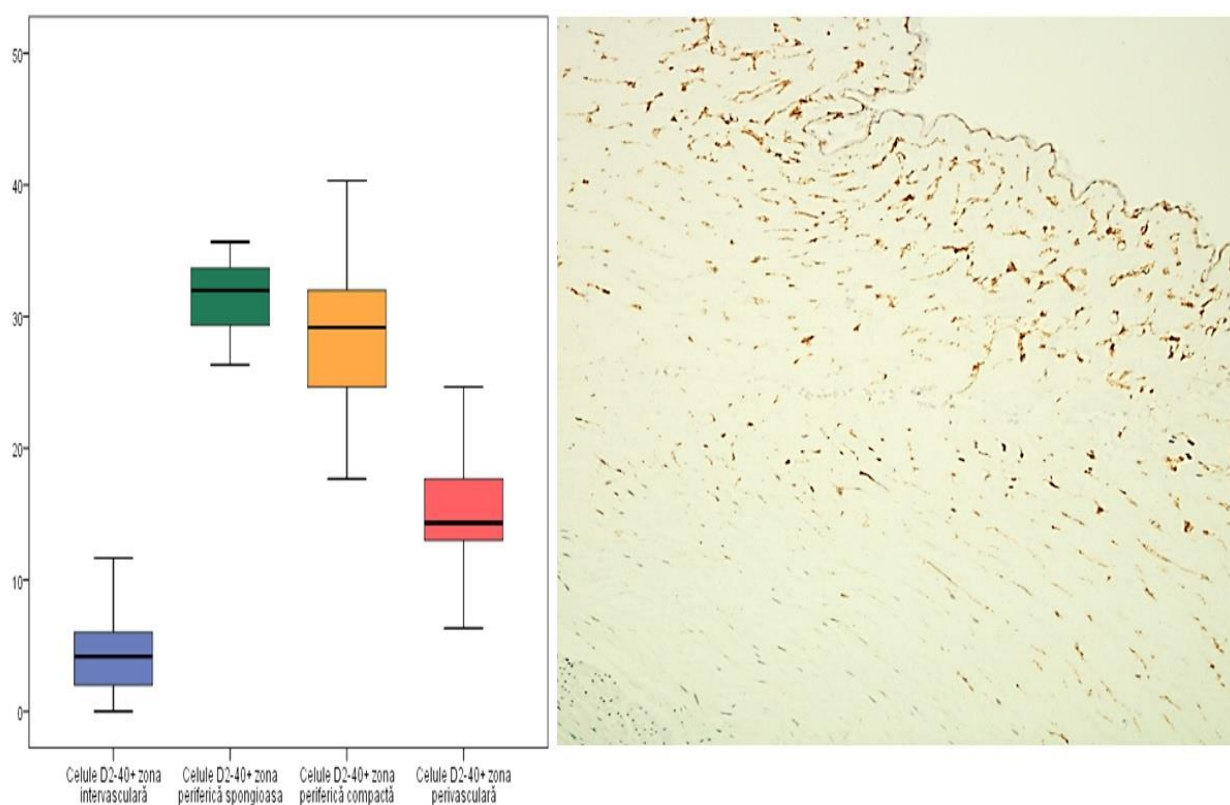


Fig. 4.4. Densitățile medii a celulelor D2-40 pozitive din zonele substanței gelatinoase Wharton

De asemenea a fost calculată proporția celulelor D2-40 pozitive și D2-40 negative per zonă. La nivelul substanței Wharton zona cu cea mai mică proporție de celule D2-40+ a fost zona intervasculară – 9,73% (95% ÎÎ 7,17%-12,29%) (Figura 4.5).

Celulele endoteliale ale vaselor ombilicale au fost D2-40 negative, la fel ca și majoritatea celulelor din componența mediei și intimei vasului. Totuși, uneori, au fost observate celule fibroblast-like D2-40+ printre miocitele netede din medie (Figura 4.3 b).

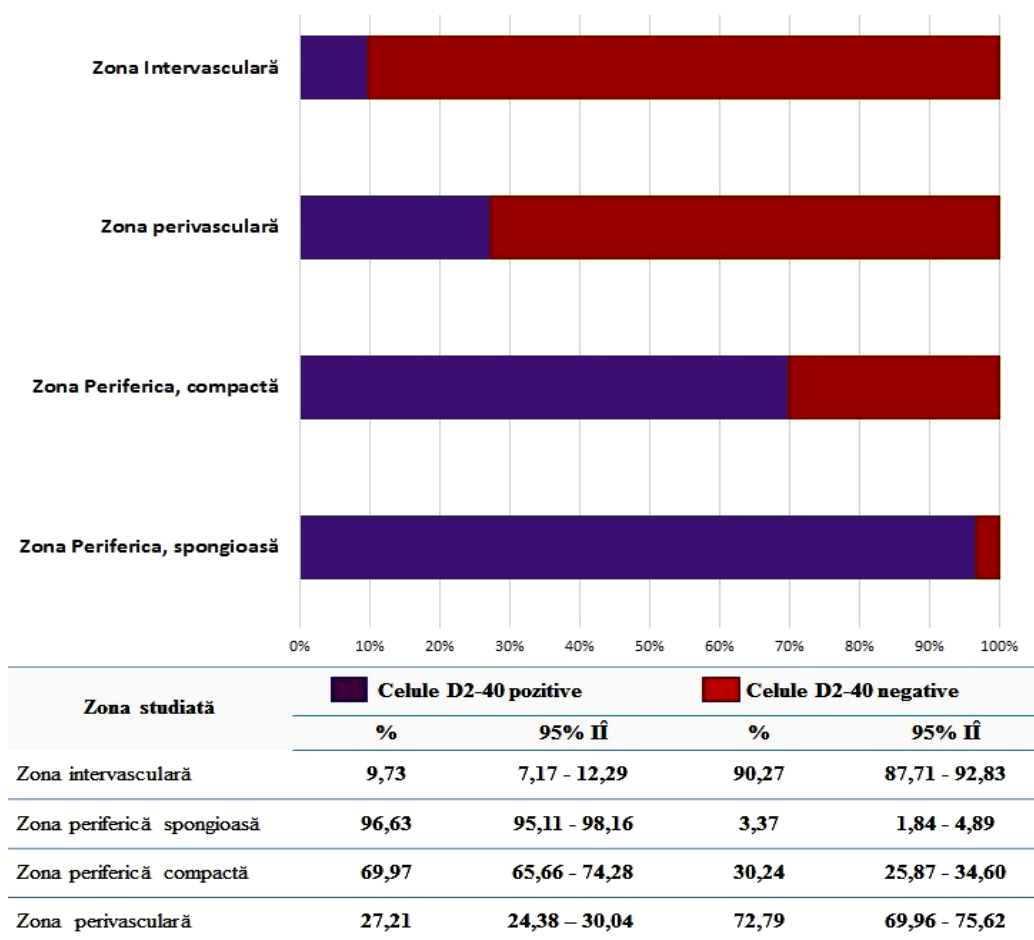


Fig. 4.5. Proporția celulelor D2-40 pozitive versus D2-40 negative din zonele substanței gelatinoase Wharton

Studiul celulelor nu se limitează doar la înțelegerea și evaluarea densităților și proporțiilor acestora, ci implică și evaluarea nivelului de exprimare a imunomarcajului de către celule. Prin urmare, prin analiza atât a proporțiilor celulelor pozitive pentru markerul D2-40, cât și a intensității de exprimare a acestui marker, a fost calculat un scor denumit "Histo scor" sau "H-scor". La compararea datelor obținute pentru H-scor, au fost obținute următoarele diferențe statistice semnificative (Tabelul 4.1).

Distribuția celulelor D2-40 pozitive în placentă

La nivel de placentă a fost studiată distribuția, morfologia și intensitatea de exprimare a markerului în celulele din vilozitățile coriale, țesutul decidual, precum și din placa corială și epitelul amniotic. Menționăm că, la nivel de placentă au fost făcute doar observații descriptive și nu au fost efectuate evaluări numerice.

Au fost observate două populații distincte de celule deciduale: celule D2-40+ și D2-40-. Numeric au predomina celulele deciduale negative pentru D2-40. Celulele deciduale D2-40+ au fost heterogene ca mod de exprimare a imunomarcajului.

Tabelul 4.1. Diferențele statistice obținute la compararea Histo-scorului calculat pentru celulele D2-40+ din zonele substanței gelatinoase Wharton a cordonului ombilical

H-scor		Zona subamniotică	Zona periferică Spongioasă	Zona periferică Compactă	Zona perivasculară	Zona intervasculară
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
Zona subamniotică	<i>t</i>	-	-0,2417	-10,0857	-25,5871	-36,2928
	<i>p</i>		0,8101*	<0,001	<0,001	<0,001
Zona periferică Spongioasă	<i>t</i>	-0,2417	-	-11,0698	29,6974	-45,7757
	<i>p</i>	0,8101*		<0,001	<0,001	<0,001
Zona periferică Compactă	<i>t</i>	-10,0857	-11,0698	-	13,8868	-22,3493
	<i>p</i>	<0,001	<0,001		<0,001	<0,001
Zona perivasculară	<i>t</i>	-25,5871	29,6974	13,8868	-	-8,0253
	<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001		<0,001
Zona intervasculară	<i>t</i>	-36,2928	-45,7757	-22,3493	-8,0253	-
	<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	

Notă: *p* – valoare obținută prin testul Student, * între grupele comparate nu au fost stabilite deosebiri veridice

Astfel, unele celule au exprimat markerul predominant membranal, iar altele doar citoplasmatic. Intensitatea de exprimare a imunomarcajului în celulele deciduale pozitive a variat de la moderată la intensă (Figura 4.6). Un aspect semnificativ remarcat a fost prezența între celulele deciduale D2-40 negative sau în nemijlocita apropiere a unor celule asemănătoare fibroblastelor, care au exprimat intens markerul D2-40, cu o localizare predominant citoplasmatică. Din punct de vedere structural, aceste celule prezentau prelungiri citoplasmatiche lungi dispuse printre celulele deciduale. Astfel de celule *fibroblast-like* au fost observate și în baza conjunctivă a plăcii amniotice. În această localizare prelungirile citoplasmatiche erau orientate printre celulele epitelului amniotic.

Și la nivelul arborelui vilos au fost identificate structuri care au exprimat markerul D2-40. Distribuția structurilor D2-40+, dar și pattern-ul de expresie în cadrul celulei au prezentat heterogenitate în funcție de tipul de vilozitate. În vilozitățile stem, structurile pozitive la D2-40 au fost localizate în special în jurul vaselor fetale de dimensiuni mari poziționate central. Totuși,

densitatea cea mai mare de elemente D2-40+ au fost observate periferic în zona sub-sincitiotrofoblastului (Figura 4.7a).

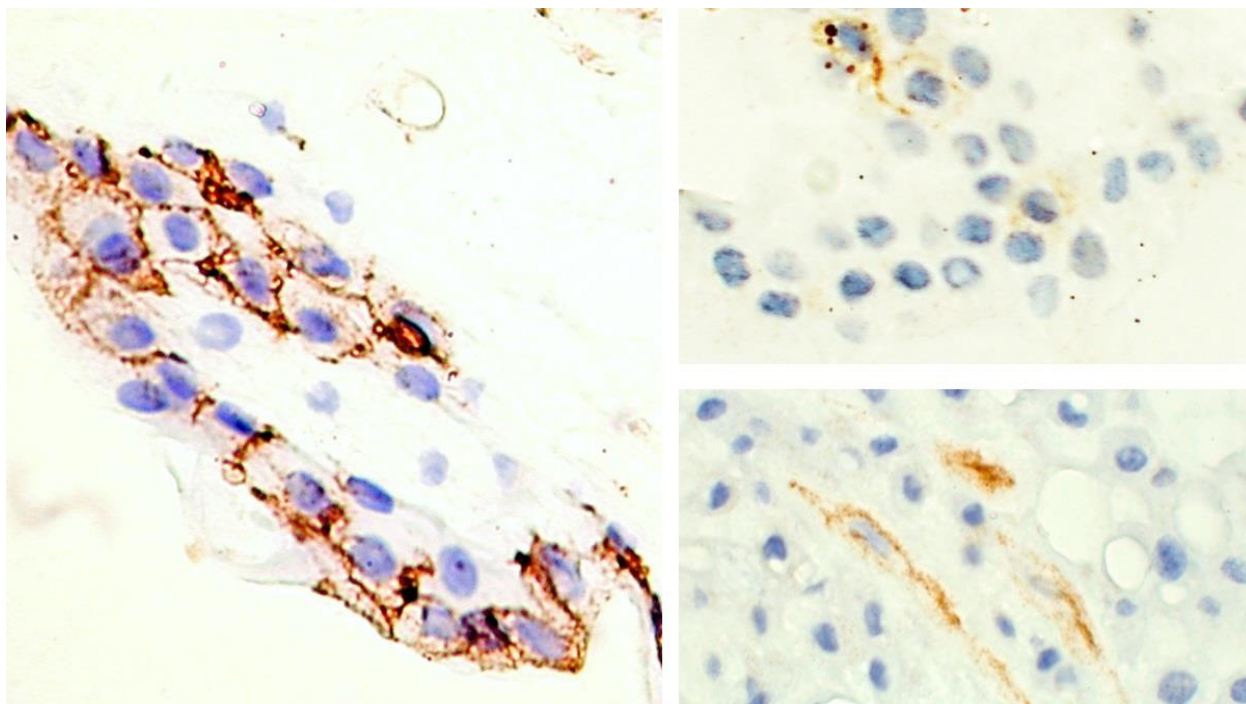


Fig. 4.6. Imunoexpresia pentru D2-40 pentru celulele deciduale și stromale *fibroblast-like* din placenta la termen. ×200, ×400, Imunoreacție pentru anti-D2-40, DAB

În vilozitățile intermediare și terminale o expresie puternică a D2-40 a fost detectată, practic, în toată stroma vilooasă. Intensitatea de exprimare a markerului era înaltă și mai omogenă. Structurile D2-40+ formau rețele reticulare limfatice-like, care înconjurau vasele sangvine. Este important de notat că, celulele endoteliale în toate vasele coriale au fost D2-40 negative. Analizând comparativ distribuțiile structurilor pozitive la D2-40 și a fibrelor reticulare, putem spune cu certitudine că matricea extracelulară perivasculară/pericelulară D2-40 pozitivă din vilozitățile coriale a fost localizată în imediata apropiere de stroma reticulară. Aceste structuri D2-40+ au reprezentat un mixt de celule stromale *fibroblast-like*, celule stromale vacuolate, elemente tubulare (Figura 4.7 b, c). O altă celulă stromală pozitivă pentru podoplanină a fost celula Hofbauer. Pattern-ul de expresie a fost citoplasmatic fin granular de intensitate moderată.

Un aspect particular a fost exprimarea nucleară a markerului în sincitiotrofoblast. Această expresie nu a fost generalizată, dar avea un caracter focal și era observată, în special, în vilozitățile terminale (Figura 4.7 d, e).

Astfel, rezultatele studiului nostru sugerează că D2-40 reacționează cu podoplanina sau cu polipeptidele asemănătoare podoplaninei localizate în stroma din cordonul ombilical și placentă.

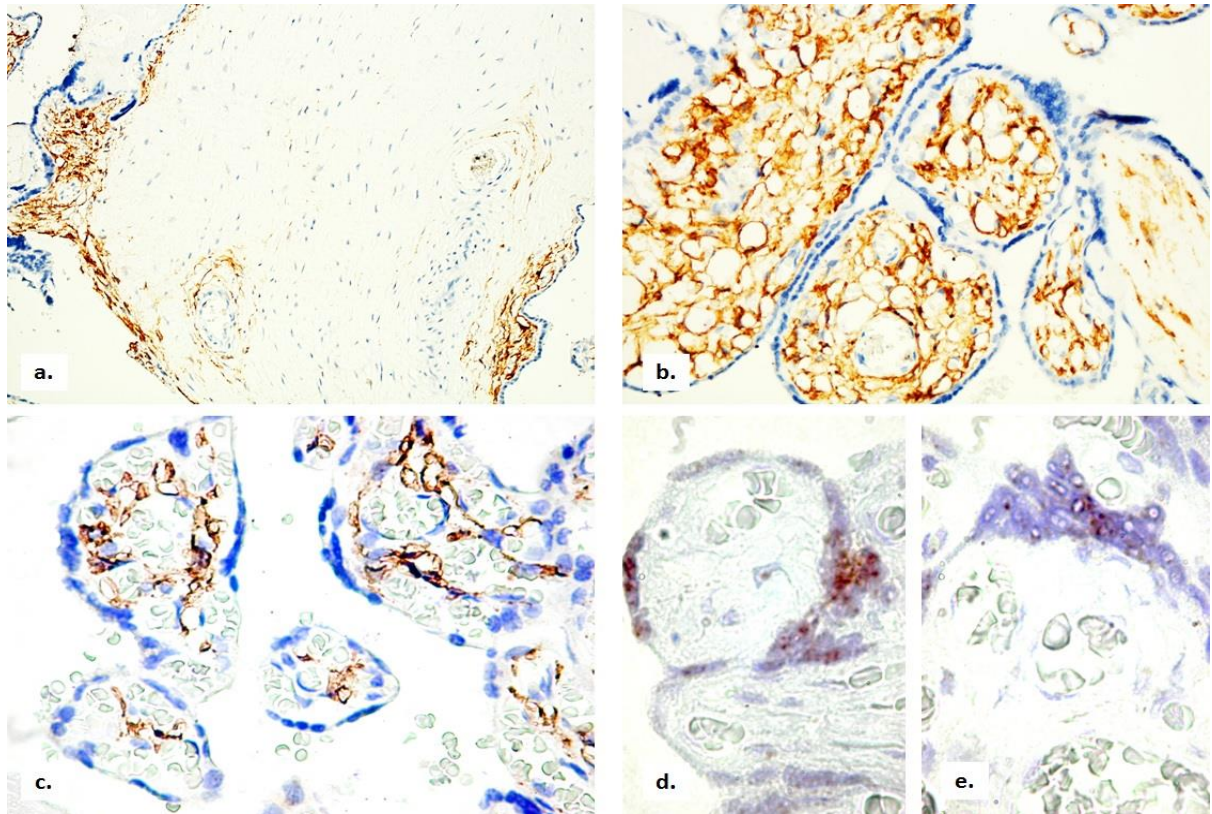


Fig. 4.7. Aspecte ale imunoexpresiei pentru D2-40 în vilozitățile coriale din placenta la termen. a) vilozitățile stem; b) vilozitățile intermediare; c) vilozitățile terminale; d-e) expresie nucleară a imunomarcajului la nivelul sincițiotrofoblastului în vilozitățile terminale; ×200, ×400, Imunoreacție pentru anti-D2-40, DAB

4.2. Expresia CD105 în cordonul ombilical și țesutul placentar

Rezultatul colorării cu anti-CD105 a fost exprimat printr-o reacție de culoare brună. Semnalele pozitive brune au fost observate la nivel membranar, nuclear și citoplasmatic. Menționăm că, celulele stem mezenchimale din cordonul ombilical și țesuturile placentare studiate au prezentat imunoexpresie pentru anti-CD105, chiar dacă, în același timp, nu toate celulele au exprimat markerul de suprafață CD34.

Distribuția celulelor CD105 pozitive în cordonul ombilical. Analizând țesuturile cordonului ombilical, au fost evidențiate mai multe elemente structurale care au exprimat markerul CD105. Intensitatea de exprimare a imunomarcajului a variat de la o structură la alta.

Astfel, la nivelul vaselor ombilicale, imunomarcajul a fost exprimat de celulele endoteliale. Expresia la anti-CD105 a fost citoplasmatică și membranară. Frecvent, intensitatea de exprimare a variat de la intens (în artere) la moderat (în venă). Notăm că, un imunomarcaj pozitiv pentru CD105 a fost observat și în grosimea peretelui vascular, aspect datorat structurilor veziculoase cu mucopolizaharide localizate printre straturile de miocite netede, iar

imunoexpresia era vizibilă doar la nivelul pereților acestor vezicule. Menționăm că, aspectul dat a fost frecvent întâlnit în venele ombilicale (Figura 4.8a,b).

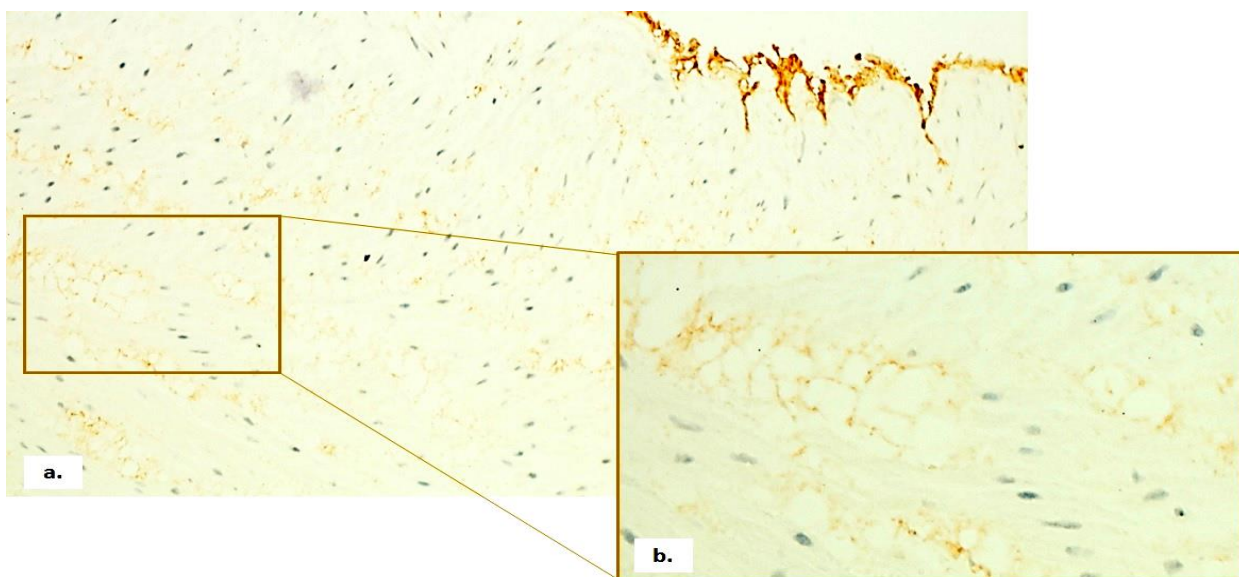


Fig. 4.8. Peretele venei ombilicale, unde se observă structuri veziculoase CD105+ localizate printre straturile de celule musculare netede, ×200, ×400; Imunoreacție pentru anti-CD105, DAB

Expresia pozitivă pentru CD105 a fost observată la nivelul epiteliului amniotic ombilical. Majoritatea celulelor epiteliale au fost pozitive – 83,73% (95% ÎI 75,38%-92,08%). Imunomarcajul a fost observat atât la nivel citoplasmatic, cât și membranar, iar intensitatea a fost scăzută. Un aspect de remarcă a fost expresia citoplasmatică neuniformă în cadrul celulei, cu o intensitate de colorare mai puternică la nivel apical (Figura 4.9).

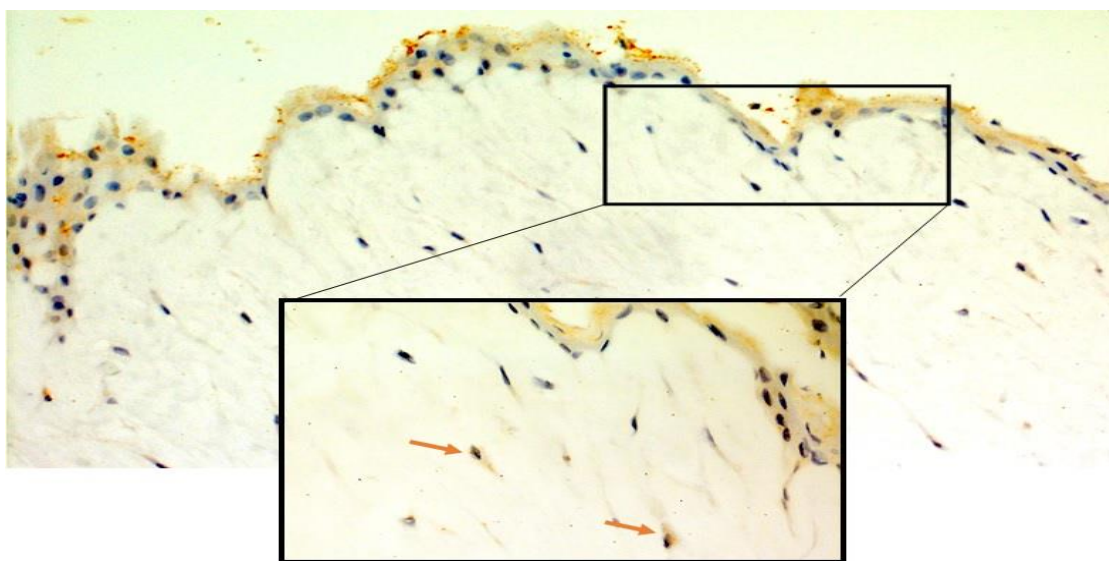


Fig. 4.9. Celule CD105+ prezente în membrana amniotică și substanța Wharton din componența cordonului ombilical, ×200, ×400; Imunoreacție pentru anti-CD105, DAB.

Celulele stromale CD105+ din substanța gelatinoasă Wharton au fost distribuite neuniform, astfel, au existat zone unde numărul acestor celule era mai mare și zone unde densitatea celulelor CD105-negative a predominat.

Zona substanței gelatinoase cu cea mai mare proporția de celule CD105+ a fost zona periferică – 74,54% (95% Î 73,63%-81,45%). Din punct de vedere structural, celulele CD105+, în special cele din zona periferică, dar și din alte regiuni ale substanței Wharton, aveau o formă de fus, cu o cantitate moderată de citoplasmă și un nucleu eucromatic. Aceste celule prezentau scurte prelungiri citoplasmice. Raportul procentual de celule CD105+ *versus* celule CD105- este ilustrat în Figura 4.10.

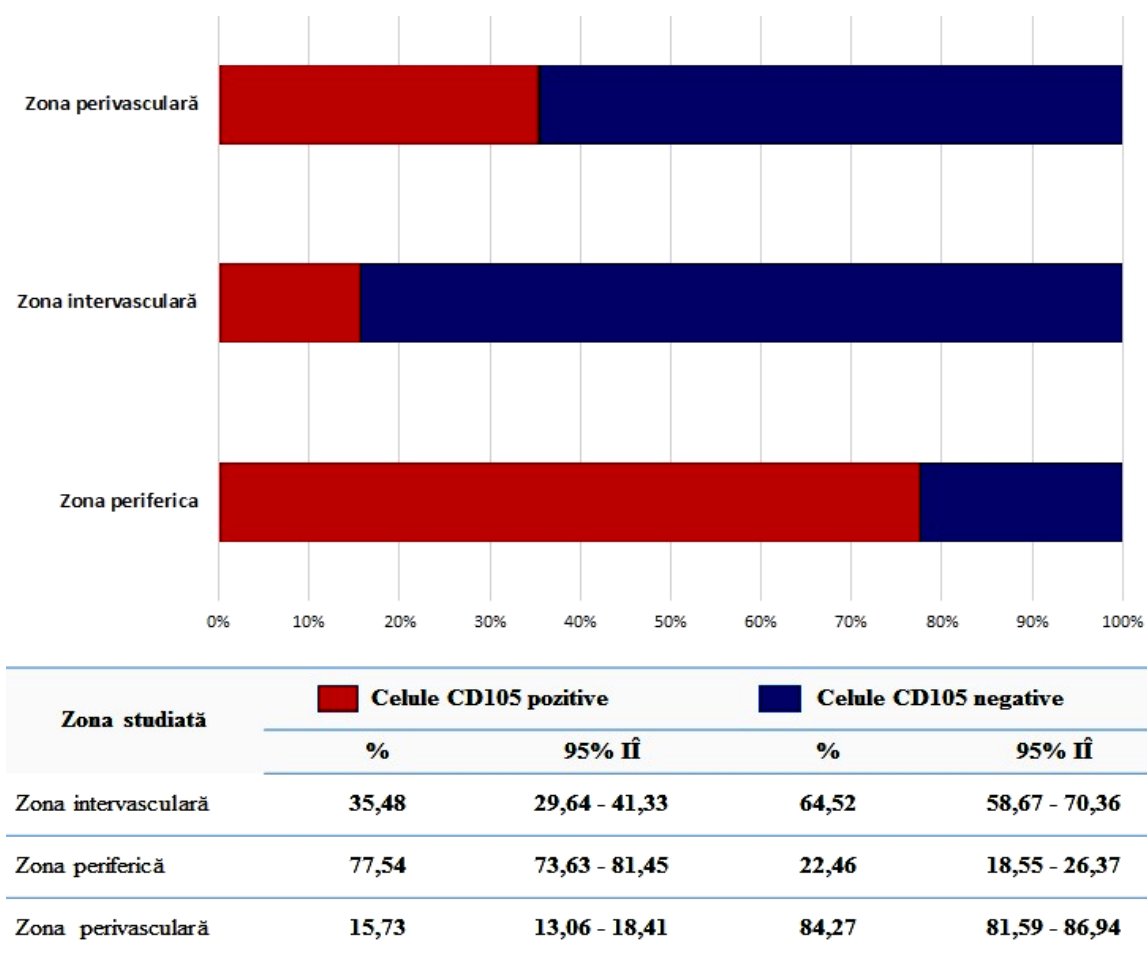


Fig. 4.10. Proporția celulelor CD105 pozitive *versus* CD105 negative din zonele substanței gelatinoase Wharton

De reținut că, celulele CD105+ din zona perivasculară erau localizate, frecvent, în jurul venei ombilicale. Un alt aspect particular este faptul că, resturile epiteliale restante ale ductului alantoidian, prezente în substanța Wharton, au exprimat markerul la nivel citoplasmatic, cu un pattern fin granular (Figura 4.11b). În aceeași ordine de idei, notăm că, pentru toate celulele stromale expresia markerului anti-CD105 a fost strict citoplasmatică.

Analizând proporțiile celulelor CD105 pozitive și intensitatea de exprimare a acestui marker, a fost calculat "Histo scor"-ul. La compararea datelor obținute pentru H-scor, au fost obținute următoarele diferențe statistic semnificative (Tabelul 4.2).

Tabelul 4.2. Diferențele statistice obținute la compararea Histo-scorului calculat pentru celulele CD105+ din zonele substanței Wharton a cordonului ombilical

H-scor	Zona periferică	Zona perivasculară	Zona intervasculară
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
Zona periferică	<i>t</i>	-	26,8651
	<i>p</i>	-	<0,001
Zona perivasculară	<i>t</i>	26,8651	-
	<i>p</i>	<0,001	<0,001
Zona intervasculară	<i>t</i>	12,3145	6,3260
	<i>p</i>	<0,001	<0,001

p – valoare obținută prin test Student

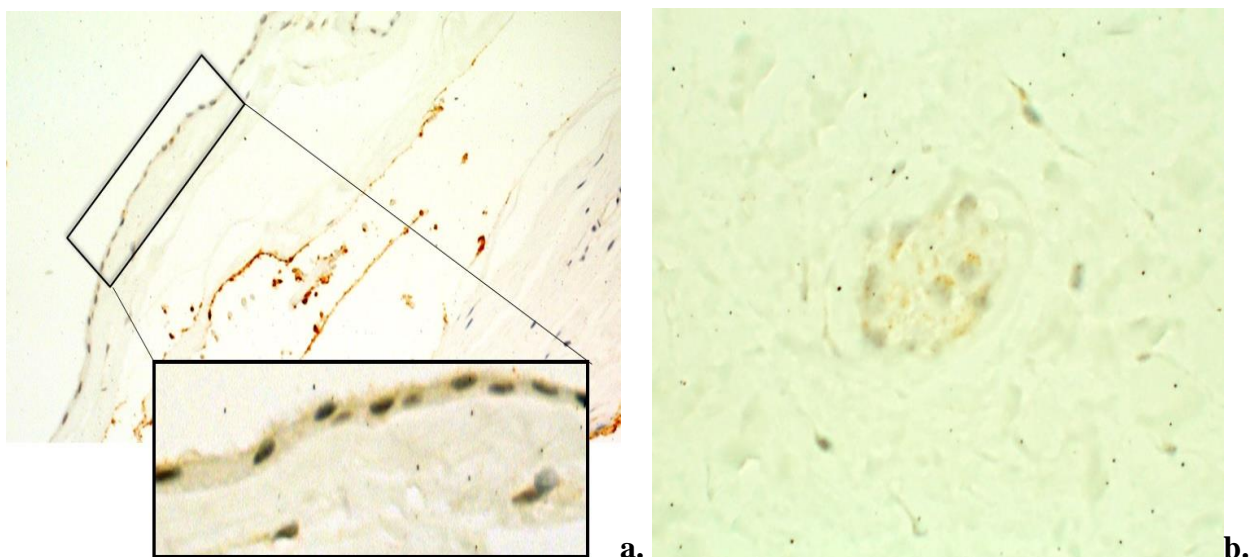


Fig. 4.11. Imunoexpresia markerului CD105 de către: a) partea amniotică a membranei fetale, formată dintr-un strat epitelial amniotic și un strat mezenchimal amniotic și b) resturile epiteliale restante ale ductului alantoidian CD105+ din substanța Wharton, ×200, ×400; Imunoreacție pentru anti-CD105, DAB

Distribuția celulelor CD105 pozitive în placentă

Remarcăm faptul că, în țesuturile placentare structurile pozitive la CD105 nu au fost evaluate cantitativ, acestea fiind estimate într-o manieră calitativă. Astfel, au fost descrise și observate următoarele structuri: celulele epitelului amniotic, placa corială, celulele deciduale, iar la nivelul vilozităților coriale – trofoblastul, componenta stromală și vasculară.

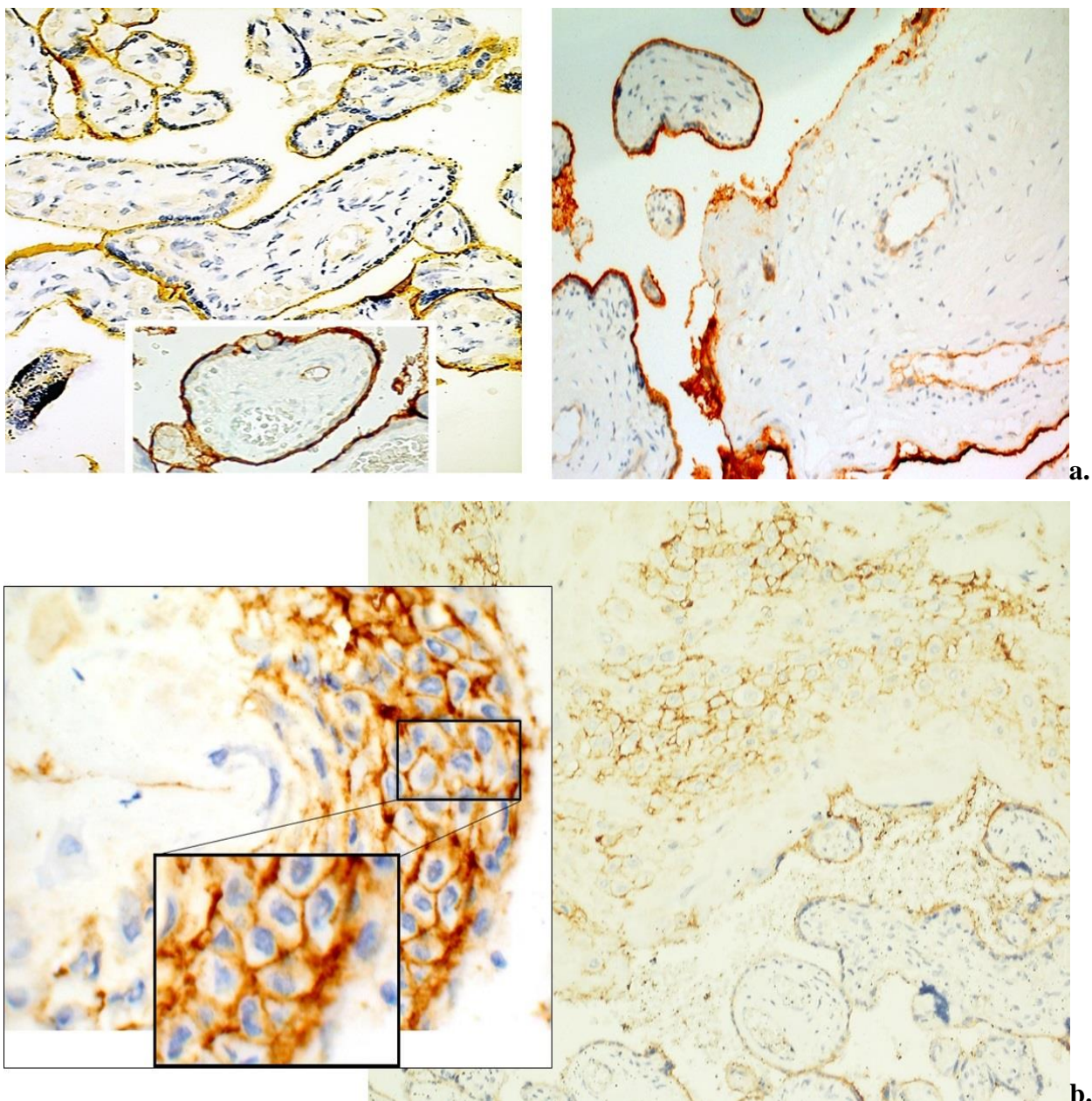


Fig. 4.12. Imunoexpresia markerului CD105 de către: a) celulele sincițiotrofoblastului, și vase la nivel de vilozități tip tulpină, trunculare și terminale și b) celulele deciduale din componența decidua bazală, $\times 200$, $\times 400$; Imunoreacție pentru anti-CD105, DAB

Am observat semnal pozitiv la anti-CD105 emis de celulele epitelului amniotic și celulele plăcii coriale subamniotice. Celulele CD105+ din stratul epitelial, dar și din stratul

mezenchimal subamniotic au prezentat o expresie nucleară de intensitate moderată (2+) și expresie citoplasmatică de intensitate scăzută (1+) (Figura 4.11a).

Imunoexpresie intensă (3+) a markerului CD105 a fost observată la nivelul sincițiotrofoblastului pentru toate tipurile de vilozități coriale. *Pattern*-ul de exprimare a fost citoplasmatic granular, cu ușor tropism apical. În vilozitățile coriale au fost observate două tipuri de vase în funcție de exprimarea imunomarcajului. Astfel, au fost identificate vase CD105 pozitive și vase CD105 negative (Figura 4.12a). Distribuția ambelor tipuri de vase în vilozitățile coriale a fost neuniformă.

Densitatea cea mai mare de vase CD105 pozitive 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. 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: celulele endoteliale CD105+ și celulele endoteliale CD105-. Intensitatea de exprimare a markerului de către celulele endoteliale CD105+ din componența vilozităților a fost estimată ca moderată (2+).

În stroma vilozităților au fost observate celule stromale CD105+, solitare, cu aspect fusiform. Aceste celule erau, frecvent, localizate în apropierea trofoblastului, și/sau a vaselor, în special, de tip arteră. Celulele deciduale au prezentat o expresie intensă membranară a markerului CD105 (Figura 4.12b).

4.3. Expresia CD34 în cordonul ombilical și țesutul placentar

Unul dintre cei mai tradiționali marker folosit pentru a identifica celulele stem hematopoietice este anticorpus anti-CD34. Imunoreacția pozitivă a endoteliului vaselor ombilicale și fetale a servit control pozitiv intern pentru CD34. Celulele CD34 pozitive s-au colorat în brun cu DAB, prezentând un pattern membranar și/sau citoplasmic.

Distribuția celulelor CD34 pozitive în cordonul ombilical

Studiul imunohistochimic al țesuturilor cordonului ombilical a demonstrat prezența unui număr variabil de celule CD34 pozitive, care au fost heterogene ca distribuție, pattern de exprimare și intensitate a imunomarcajului. Primar, au fost observate celulele CD34+ vasculare, atât de la nivelul arterelor, cât și din vena ombilicală. Expresia imunomarcajului pentru CD34 a fost continuă, omogenă pentru ambele tipuri de vase. Notăm că, intensitatea de exprimare imunocolorării a fost estimată ca crescută (3+) (Figura 4.13). Distribuția marcajului a fost descrisă printr-un pattern mixt, ceea ce a presupus că, celulele endoteliale prezentau semnal pozitiv atât la nivel membranar, cât și citoplasmic. Nu au fost identificate alte tipuri de celule CD34 pozitive în structura peretelui vascular.

Analizând zonele substanței Wharton, au fost observate celule CD34 pozitive stromale. Distribuția acestor celule a fost neomogenă și neuniformă, astfel că se puteau identifica arii stromale ce conțineau doar celule CD34 negative. Este important de menționat că, pentru toate celulele CD34+ din substanța gelatinoasă intensitatea de exprimare a imunomarcajului a fost scăzută (1+).

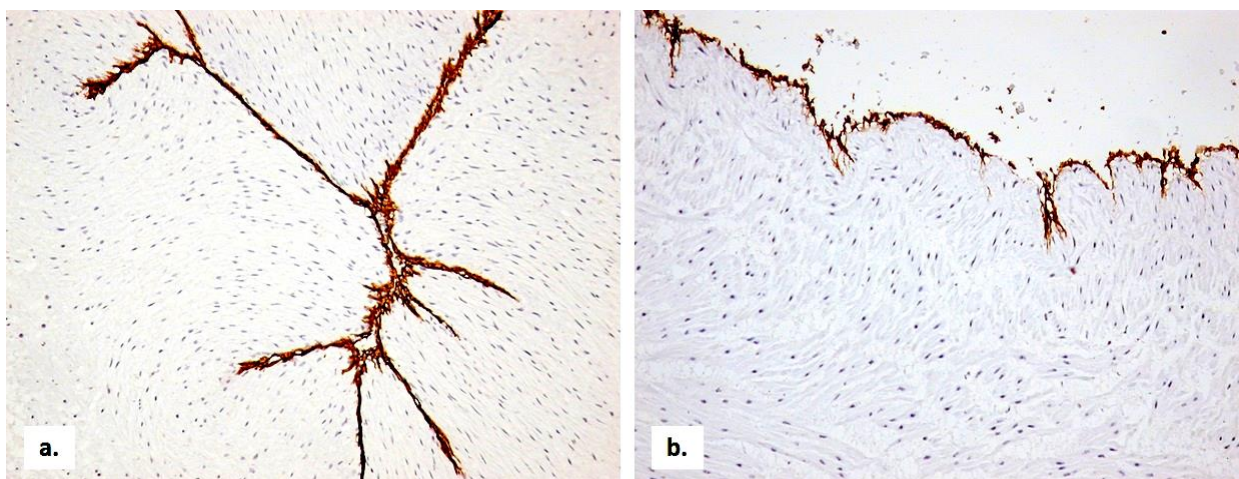


Fig. 4.13. Celule CD34 pozitive de la nivelul endotelului vaselor ombilicale. a) artera ombilicală; b) vena ombilicală, ×100; Imunoreacție pentru anti-CD34, DAB

Celulele CD34+ non-endotheliale erau localizate preferențial în zonele periferică și perivasculară a substanței Wharton. Totuși, densitatea cea mai mare de celule CD34+ a fost pentru zona periferică a stromei cordonului ombilical, unde numărul de celulele CD34+ a variat între 8 și 19 celule/câmp. Densitatea celulelor CD34+ din zona perivasculară a fost între 2 și 9 celule/câmp. Datele despre densitatea medie a celulelor CD34+ din zonele menționate anterior sunt ilustrate în tabelul 4.3.

Tabelul.4.3. Densitatea medie a celulelor non-endotheliale CD34+ din substanța gelatinoasă Wharton a cordonului ombilical

	n	Media	DS	IIQ	Mediana
Zona periferică	26	14,19	2,14	13 - 16	14,50
Zona perivasculară	26	5,92	1,13	5 – 6,67	5,83

Morfologic, celulele CD34+ din zona periferică, puteau fi caracterizate prin aspectul său apofizat, prezentând prelungiri citoplasmice lungi și/sau scurte. Aceste celule conțineau un nucleu mare, eucromatic, oval/rotund. Pattern-ul de expresie a fost membranar și/sau citoplasmatic. 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 (Figura 4.14b,c). Expresia citoplasmatică frecvent avea un caracter fin granular, în expresia sa focală, granulația era mult mai evidentă. Menționăm că, pozitivitatea la CD34 a fost observată și în celulele epiteliale ale membranei amniotice ombilicale. Frecvent, pattern-ul de distribuție a fost membranar de intensitate moderată (2+), în special, prezent în porțiunile apicale ale celulelor (Figura 4.14e). Totuși, au fost observate la unele celule epiteliale și expresia nucleară a markerului CD34.

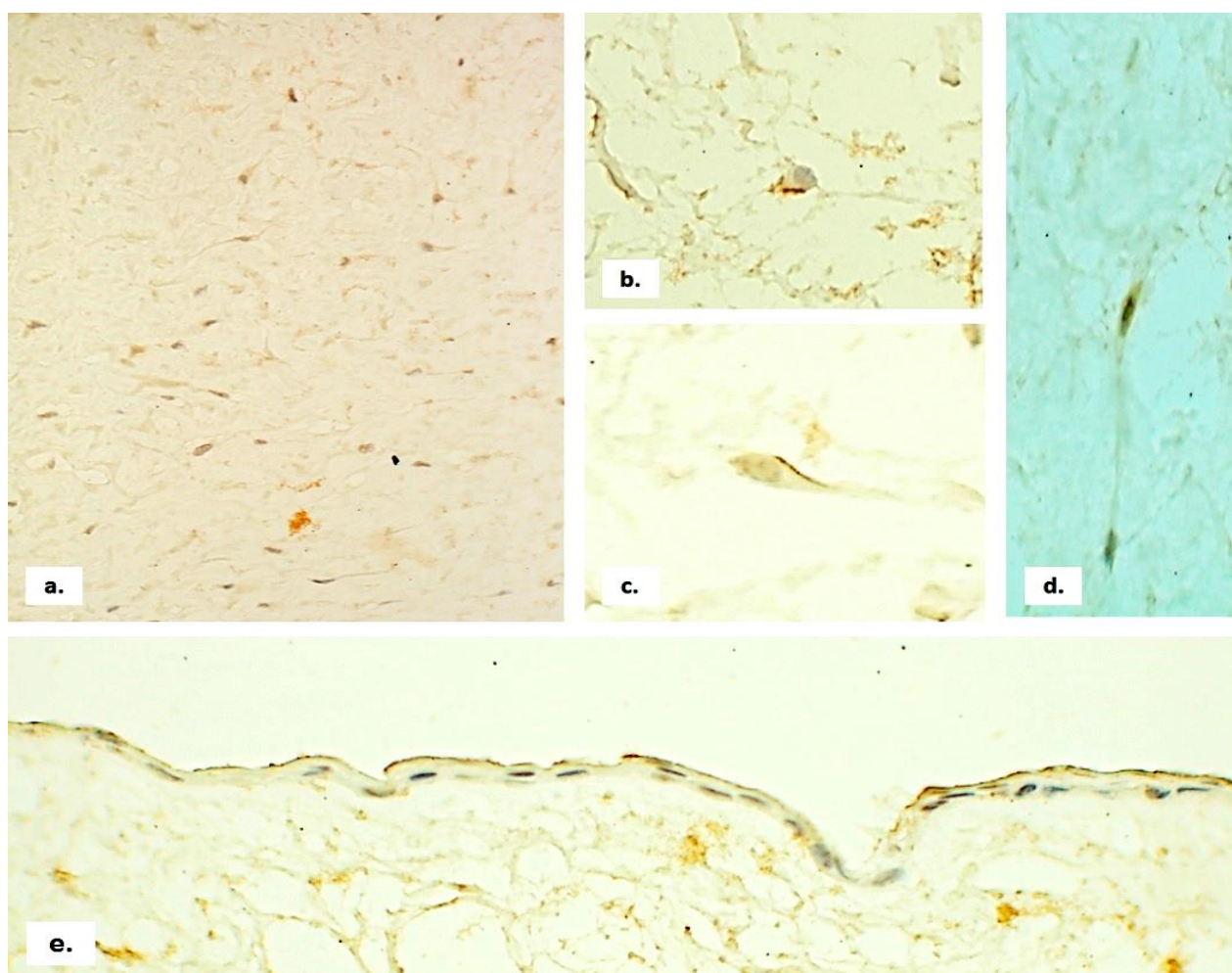


Fig. 4.14. Aspecte caracteristice de expresie a markerului CD34 de către celulele non-endoteliale pozitive din substanța gelatinoasă (a-d) și epiteliul amniotic ombilical (e), ×200, ×400. Imunoreacție pentru anti-CD34, DAB

După determinarea proporțiilor de celule CD34 pozitive în ambele zone ale substanței gelatinoase și a intensității de exprimare a acestui marker, a fost calculat "Histo scor"-ul. La analiza datelor obținute pentru H-scor, au fost identificate diferențe statistice semnificative între grupuri (Tabelul 4.4).

Tabelul 4.4. Diferențele statistice obținute la compararea Histo-scorului calculat pentru celulele non-endoteliale 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

Distribuția celulelor CD34 pozitive în placentă

În țesutul placentar, expresia markerului de o intensitate crescută (3+), a fost observată în vasele placentare atât din vilozitățile coriale, cât și din placa corială. Markerul a fost exprimat de către celulele endoteliale, caracterul de exprimare a fost continuu și omogen, iar pattern-ul a fost unul mixt, astfel că imunoexpresia a fost observată la nivel membranar, citoplasmatic și chiar nuclear. Pozitivitatea celulelor endoteliale la CD34 ne-a permis să observăm arhitectura specifică de organizare a componentelor arborelui vascular în funcție de tipul vilozității.

Astfel, pentru vilozitățile trunculare și intermediare, vasele mari și medii dominau porțiunile centrale ale vilozității, fiind înconjurate de o cantitate mare de stromă vilosă. Această distribuție distinctă separa vasele fetale de dimensiuni mari de cele mici, care se găseau în porțiunile periferice ale vilozităților, în apropierea imediată a trofoblastului. (Figura 4.15 a).

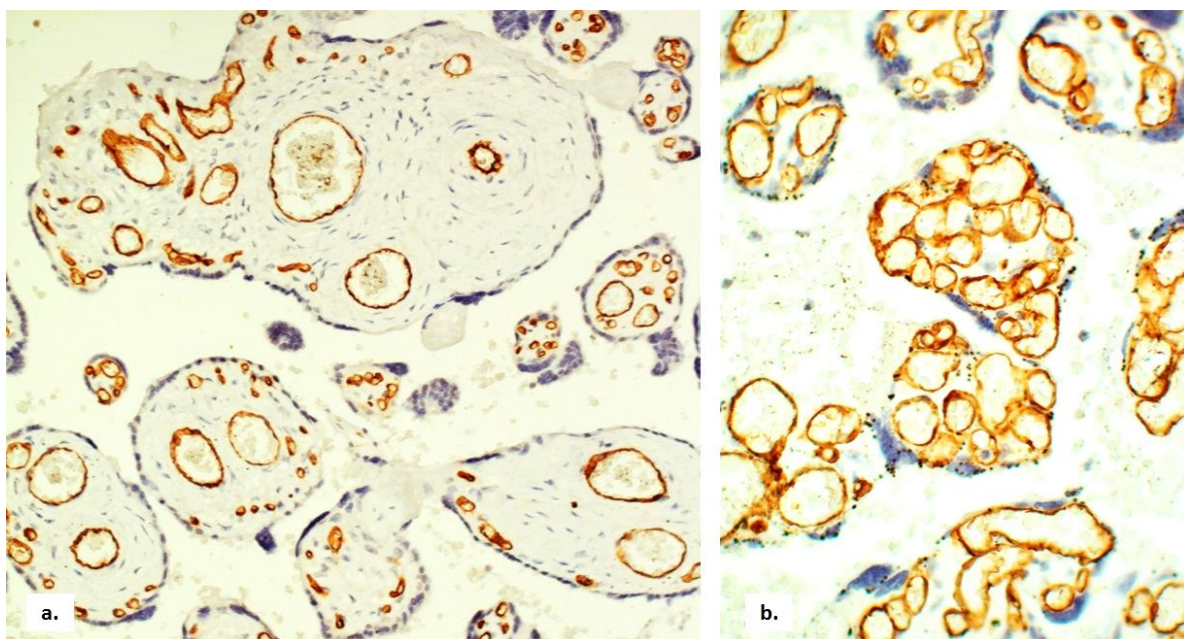


Fig. 4.15. Arhitectura specifică de organizare a componentelor arborelui vascular în vilozitățile coriale. a) poziționarea centrală a vaselor mari și medii în vilozitățile trunculare și intermediare; b) aspectul dominant al vaselor mici în vilozitățile coriale mic, odată cu reducerea volumului de stromă vilosă, ×200, ×400. Imunoreacție pentru anti-CD34, DAB

Prin reducerea stromei în vilozitățile terminale, vasele de dimensiuni mici se adunau și se apropiau atât de mult încât dominau interiorul vilozității (Figura 4.15 b). Analizând detaliat preparatele cu țesut placentar, au fost observate, în stroma vilozităților, și celule CD34 pozitive, care nu sunt celule endoteliale. Au fost identificate două populații de celule CD34+ non-endoteliale. Notăm că, un tip celular era caracterizat prin dimensiuni mici, localizate predominant periferic, și exprima markerul intens (3+), iar pattern-ul expresiei a fost similar cu cel al celulelor endoteliale.

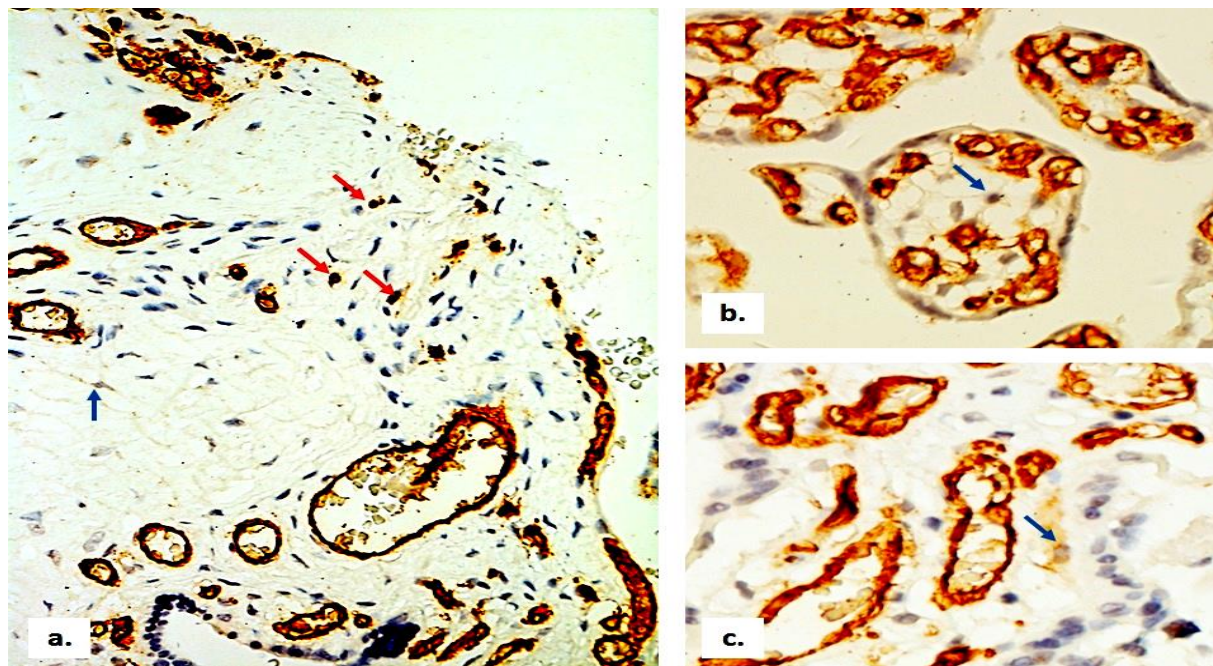
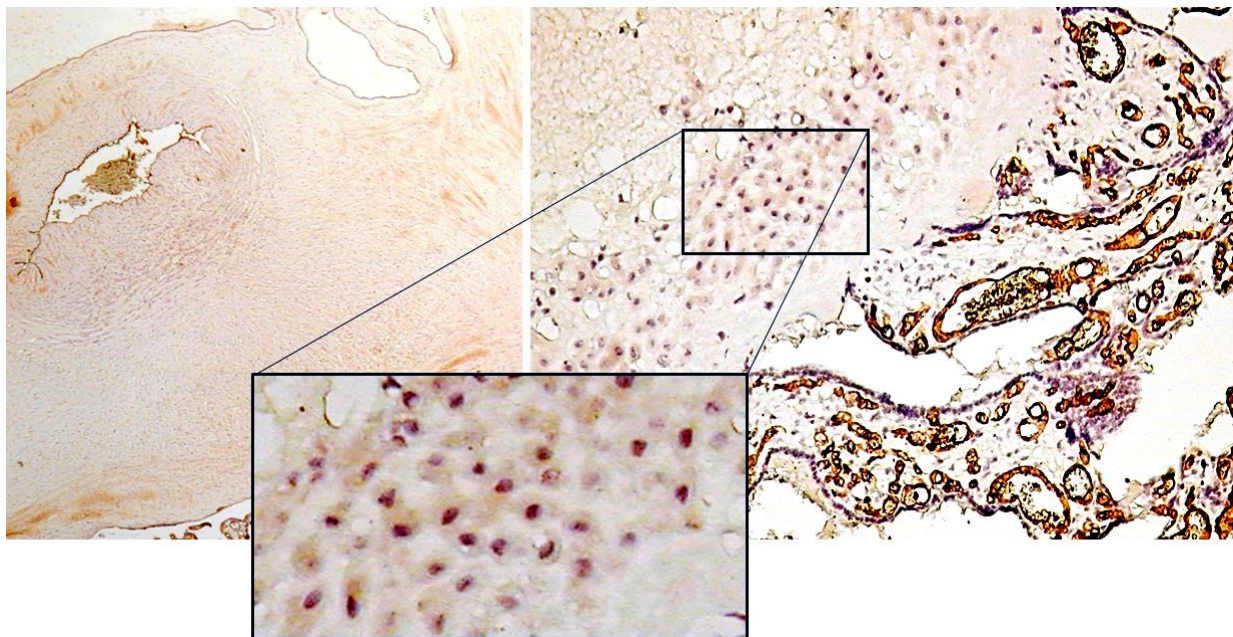


Fig. 4.16. Celule CD34 pozitive în stroma vilozităților coriale. Aspecte heterogene al structurii și expresiei imunomarcajului, a)×100; b, c)×400; Imunoreacție pentru anti-CD34, DAB

Cea de-a doua populație celulară s-a caracterizat printr-o formă apofizată, pentru unele celule mai intens, pentru altele mai puțin. De asemenea, acestea au prezentat citoplasmă din abundență, iar exprimarea markerului a fost exclusiv citoplasmatică, de o intensitate scăzută (1+). Remarcăm că, cel de-al doilea tip celular a fost identificat, în special, în regiunile centrale ale vilozităților (Figura 4.16 c).

Important de menționat că, în placenta normală, a fost identificat imunomarcaj CD34 pozitiv în citotrofoblast și sincitrofoblast. În plus, a fost găsită o imunoexpresie la CD34 și în unele celule deciduale, celule epiteliale amniotice și celule stromale din țesutul mesenchimal subamniotic (Figura 4.17). Remarcăm faptul că, în toate aceste structuri menționate anterior imunoexpresia a avut un caracter ocazional, focal, neuniform, de intensitate de exprimare a fost scăzută (1+).

Astfel, datele acumulate sugerează prezența în placentă a celulelor CD34+ endoteliale și celulelor CD34+ non-endoteliale.



**Fig. 4.17. Aspecte particulare de prezența celulelor CD34 pozitive non-endoteliale.
×100;×400; Imunoreacție pentru anti-CD34, DAB**

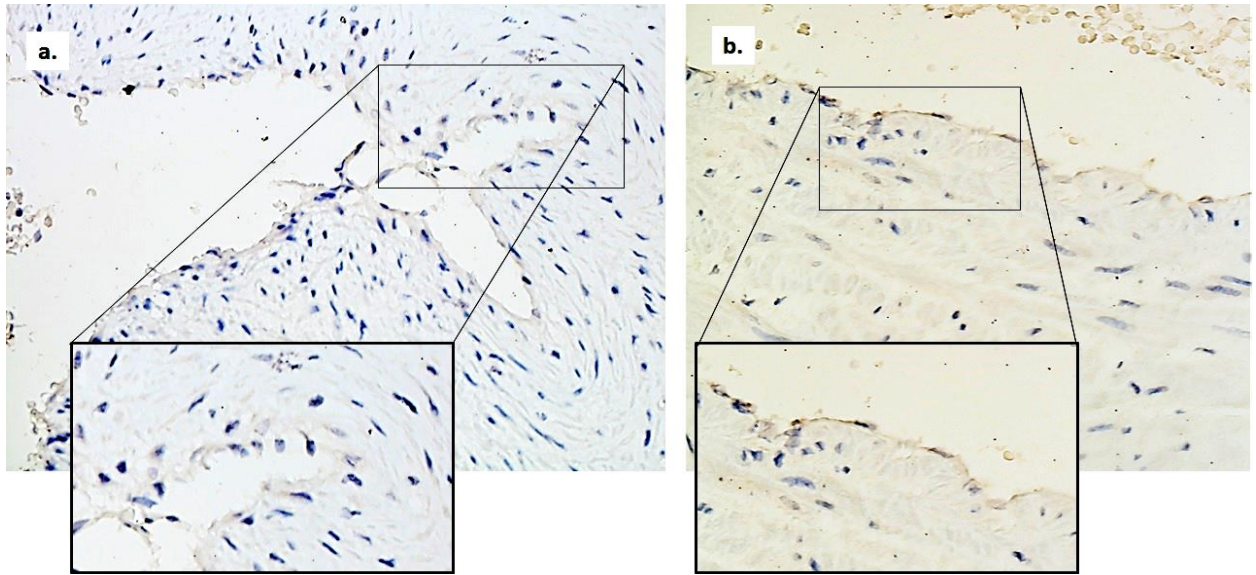
4.4. Expresia AC133 în cordonul ombilical și țesutul placentar

AC133 sau CD133, cunoscut și sub denumirea de Prominin-1, este o proteină transmembranară glicozilată compusă din 865 de aminoacizi, având o masă moleculară totală de 120 kDa. Expresia AC133 este reglată de o varietate de factori extracelulari sau intracelulari și indică modificări ale tipurilor celulare cu funcții specifice. Acest marker este utilizat pentru identificarea unor subseturi particulare de celule stem, care nu sunt celule progenitoare hematopoietice.

Distribuția celulelor AC133 pozitive în cordonul ombilical

Exprimarea markerului de către celulele endoteliale a variat în funcție de vasul ombilical. Astfel, celulele endoteliale din venă au fost CD133 pozitive, iar cele din arteră au fost CD133 negative (Figura 4.18). Menționăm, de asemenea că, celule endoteliale nu au exprimat markerul nici la nivelul vaselor din țesuturile placentare. Intensitatea de expresie a markerului de către celulele endoteliale CD133 pozitive a fost scăzută (1+).

Celule non-endoteliale CD133 pozitive au fost identificate, în special, în două zone ale substanței Wharton – periferică și perivasculară. Pentru zona perivasculară distribuția celulelor pozitive a fost neuniformă comparativ cu zona periferică, unde celulele au fost mai numeroase și răspândite omogen printre componentele extracelulare ale substanței gelatinoase.



**Fig. 4.18. a) Celule endoteliale AC133 negative de la nivelul arterelor ombilicale; b) Celule endoteliale AC133 pozitive de la nivelul venei ombilicale, $\times 100$, $\times 400$;
Imunoreacție pentru anti-AC133, DAB**

Morfologic, majoritatea celulelor CD133+ din zona periferică au fost celule cu prelungiri citoplasmice lungi, citoplasmă abundentă și nucleu oval, eucromatic. Au fost observate și celule CD133+ fusiforme atât în zonele periferică, cât și perivasculară. Notăm că, pattern-ul de expresie a fost citoplasmatic, omogen. Totuși, unele celule, citoplasmatic, au prezentat un pattern granular bine vizibil. Intensitatea de exprimare a fost scăzută (1+) și/sau moderată (2+) (Figura 4.19).

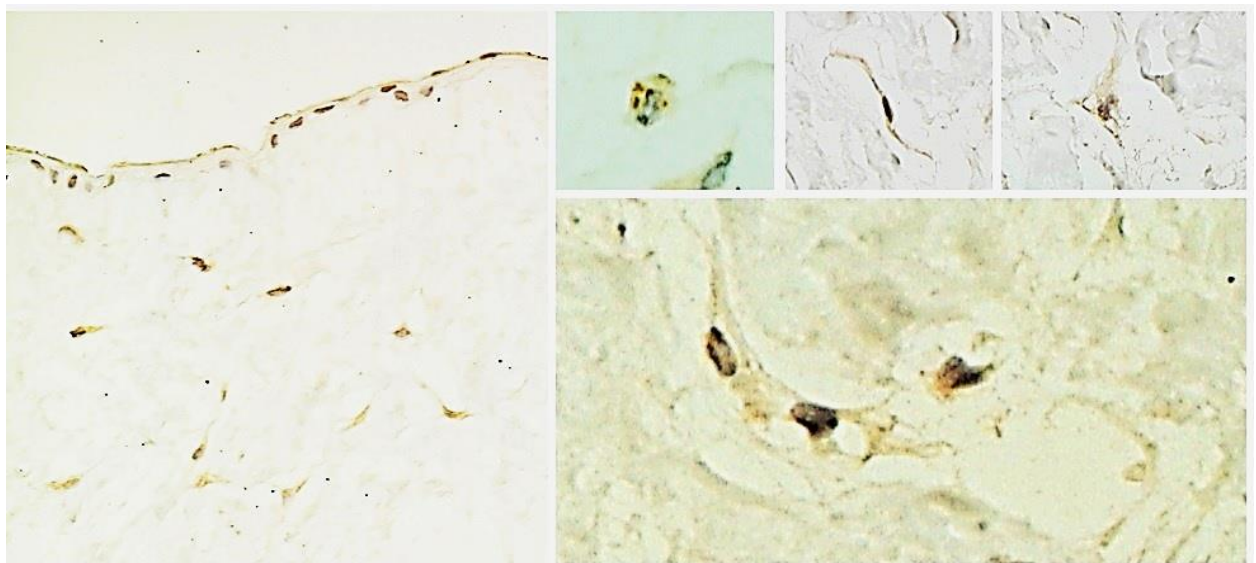


Fig. 4.19. Aspecte caracteristice ale imunomarcajului exprimat clar de celulele stromale AC133 pozitive în substanța gelatinoasă Wharton, $\times 100$, $\times 400$; Imunoreacție pentru anti-AC133, DAB

În zona periferică densitatea celulelor CD133+ a variat de la 12 până la 22 celule/câmp, iar în zona perivasculară de la 3 până la 13 celule/câmp. A fost calculată densitatea medie celulară pentru cele două zone, iar rezultatele sunt expuse în tabelul 4.5.

Tabelul.4.5. Densitatea medie a celulelor non-endoteliale AC133+ din substanța gelatinoasă Wharton a cordonului ombilical

	n	Media	DS	IIQ	Mediana
Zona periferică	26	16,65	1,64	15 - 18	16,67
Zona perivasculară	26	7,17	1,00	5 – 8	7,17

Ulterior s-a calculat din totalul de celule per câmp care a fost proporția de celule AC133 pozitive. Astfel, pentru zona periferică s-a înregistrat proporția de 51,50% (95% ÎÎ 49,28%-53,73%), iar pentru cea perivasculară a fost – 13,47% (95% ÎÎ 12,19%-14,75%).

Datele H scorului calculat pentru ambele zone sunt expuse în tabelul 4.6.

Tabelul 4.6. Diferențele statistice obținute la compararea Histo-scorului calculat pentru celulele non-endoteliale 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

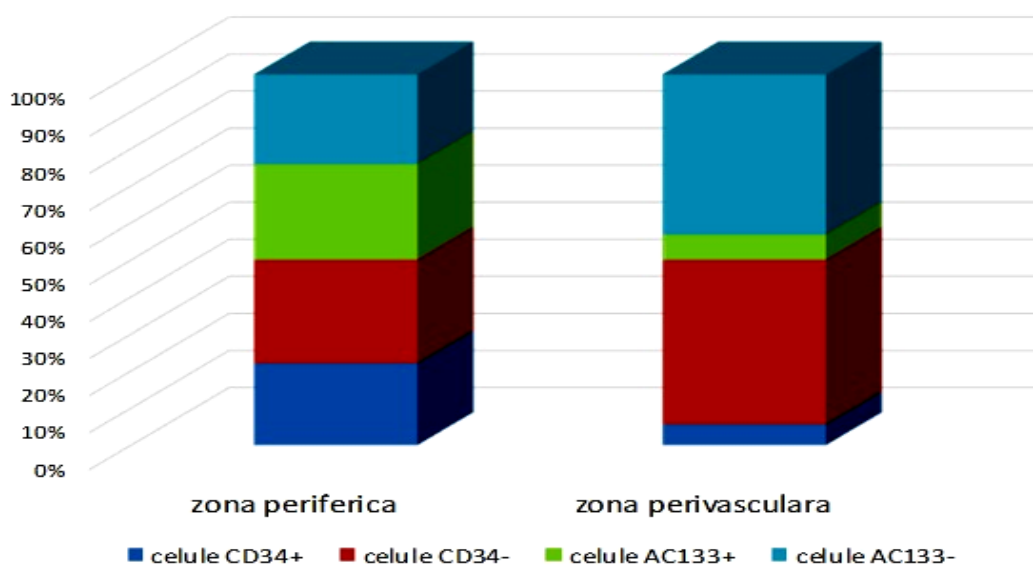


Fig. 4.20. Analiza comparativă a proporțiilor celulare CD34 și AC133 în zonele periferică și perivasculară din substanța gelatinoasă Wharton

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.

Celulele epitelului amniotic ombilical au exprimat membranal markerul, iar intensitatea a fost moderată (2+). Notăm că expresia membranală a avut caracter discontinuu și neomogen, fiind bine identificat în porțiunile apicale ale celulei epiteliale. Celulele musculare netede din componența mediei vaselor ombilicale au fost CD133 negative.

Distribuția celulelor AC133 pozitive în placentă

La nivelul vilozităților coriale nici o structură celulară sau tisulară nu a prezentat pozitivitate pentru markerul AC133. A fost observată imunoexpresie la CD133 în celulele epitelului amniotic. Intensitatea de exprimare a fost moderată, iar patternul membranal, în unele celulele epiteliale a fost observat imunoexpresie la nivel nuclear. Celulele stromale din stratul mezenchimal subamniotic au fost CD133 pozitive.

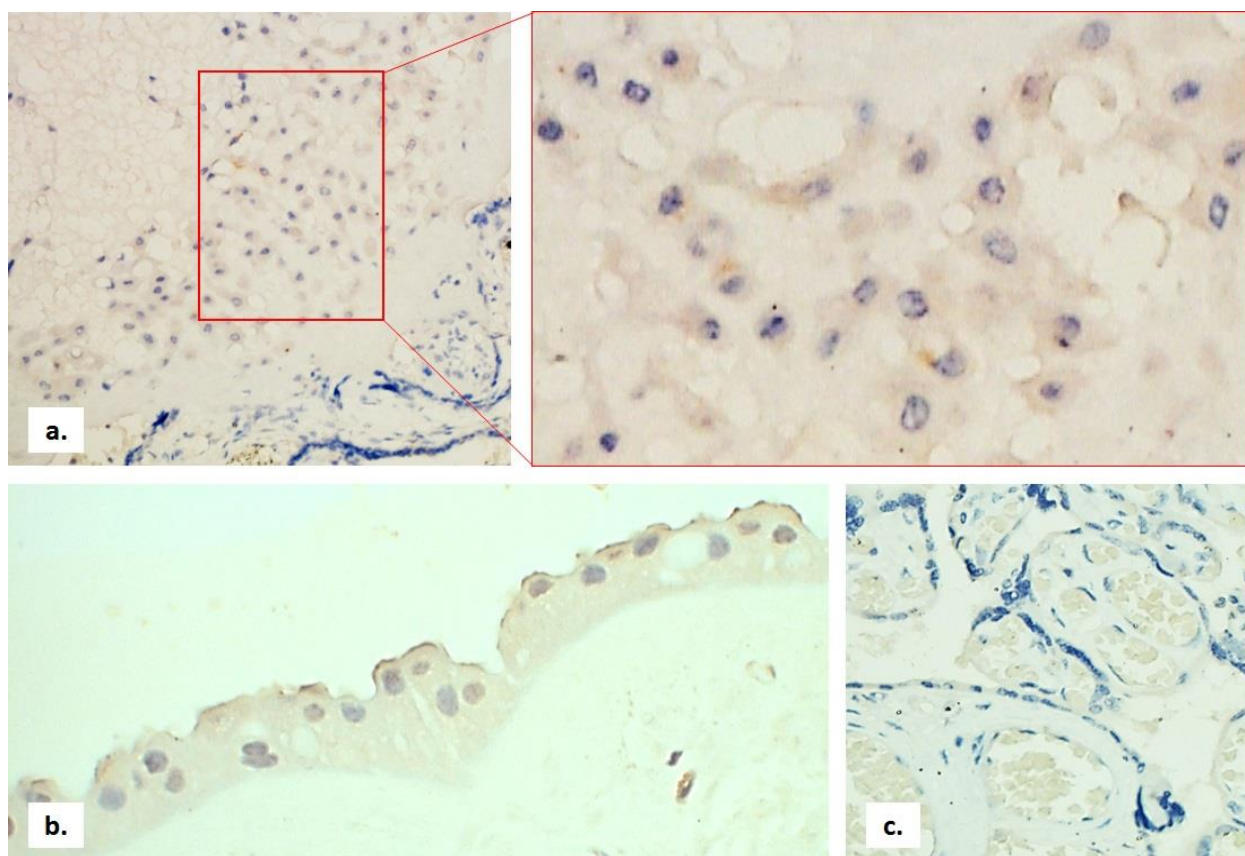


Fig. 4.21. Aspecte particulare a imunoexpresiei la AC133 în placentă. a) celule deciduale unice CD133 pozitive, cu expresie citoplasmatică focală; b) celulele epitelului amniotic ce exprimă markerul membranal cu tropism apical; c) absența imunomarcajului în vilozitățile coriale, ×100;×400; Imunoreacție pentru anti-AC133, DAB

Morfologia celulelor stromale AC133+ a fost diversă de la celulă apofizată până la celule fusiforme sau ovale. Pattern-ul de distribuție a fost citoplasmatic omogen, iar intensitatea a fost moderată și/sau scăzută. Au fost observate și celulele deciduale pozitive la CD133. Această pozitivitate nu a fost un fenomen de masă, fiind restricționat doar în nivelul unor celule, care la rândul său au fost dispersate printre celulele deciduale CD133 negative. Mai mult, imunoexpresia citoplasmatică din celulele deciduale CD133+ a avut un caracter focal și o intensitate moderată.

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

Pattern-ul de exprimare al markerului VEGFR-2 a fost mixt, fiind prezent atât în citoplasmă, cât și membranar. Prezența semnalului cromogen la nivelul celulelor endoteliale și sincițiotrofoblastului a fost considerat ca control pozitiv intern. Produsul final al imunoreacției a fost colorarea membranei și/sau citoplasmei în brun-gălbui.

Distribuția celulelor VEGFR-2 pozitive în cordonul ombilical

Studiul preparatelor histologice cu cordon ombilical a arătat prezența imunoexpresiei la markerul VEGFR-2 în mai multe structuri. Astfel, reacție pozitivă, cu o distribuție omogenă a marcajului la nivel membranar și citoplasmatic a fost observată în celulele endoteliale din vasele ombilicale. Intensitatea de expresie a fost apreciată ca moderată (2+) sau crescută (3+) (Figura 4.22).

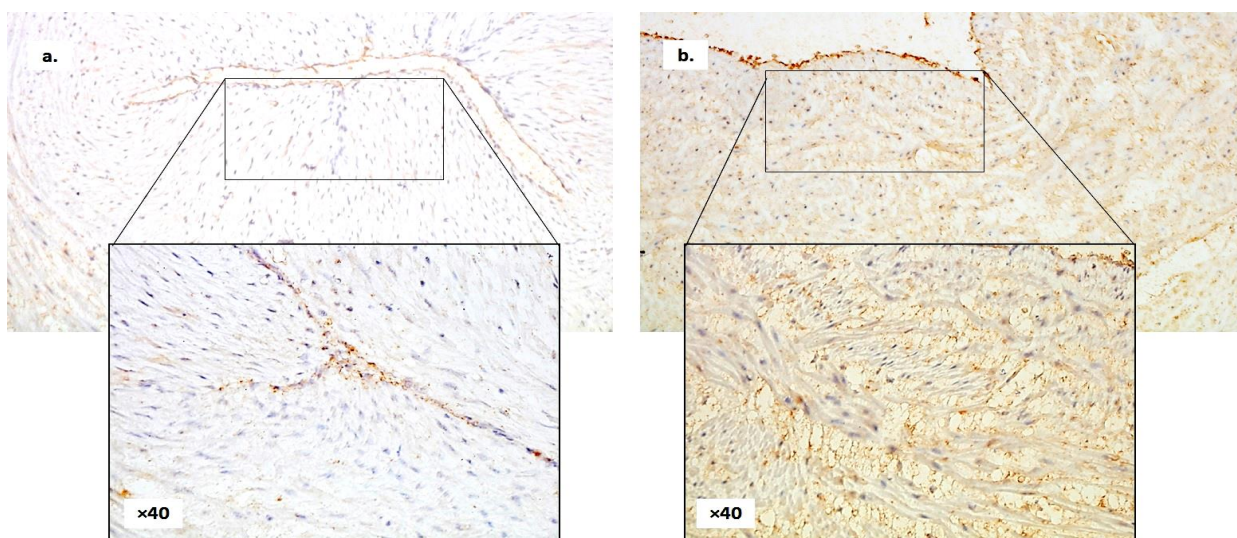


Fig. 4.22. Celule endoteliale VEGFR-2 pozitive de la nivelul arterelor ombilicale (a) și venei ombilicale (b). Prezența numeroaselor vezicule extracelulare în spațiile mucopolizaharidice din media venei (b) ×100, ×400; Imunoreacție pentru anti-VEGFR-2, DAB

Notăm că, am observat prezența imunomarcajului în spațiile mucopolizaharidice din medie, printre straturile de miocite netede. Acest fenomen a fost caracteristic, în special pentru

vena ombilicală (Figura 4.22. b). Intensitatea expresiei markerului din media vaselor ombilicale a fost moderată – înaltă. Menționăm că, la nivelul mediei au fost observate și miocite netede unice care au exprimat imunomarcajul anti-VEGFR-2.

În majoritatea zonelor substanței Wharton celulele stromale au fost VEGFR-2 negative. Totuși, au fost observate și celule pozitive, care, predominant, ocupau zonele subamniotică și superficială spongioasă, iar densitatea acestora a variat de la 5 până la 8 celule/camp. Celulele VEGFR-2 pozitive erau de dimensiuni mari, aveau un caracter apofizat, conțineau multă citoplasmă și nucleu oval eucromatic (Figura 4.23. b). Pattern-ul de expresie în celulele stromale a fost membranar și citoplasmatic. Pentru ambele modele de expresie a fost caracteristic caracterul focal al imunomarcajului.

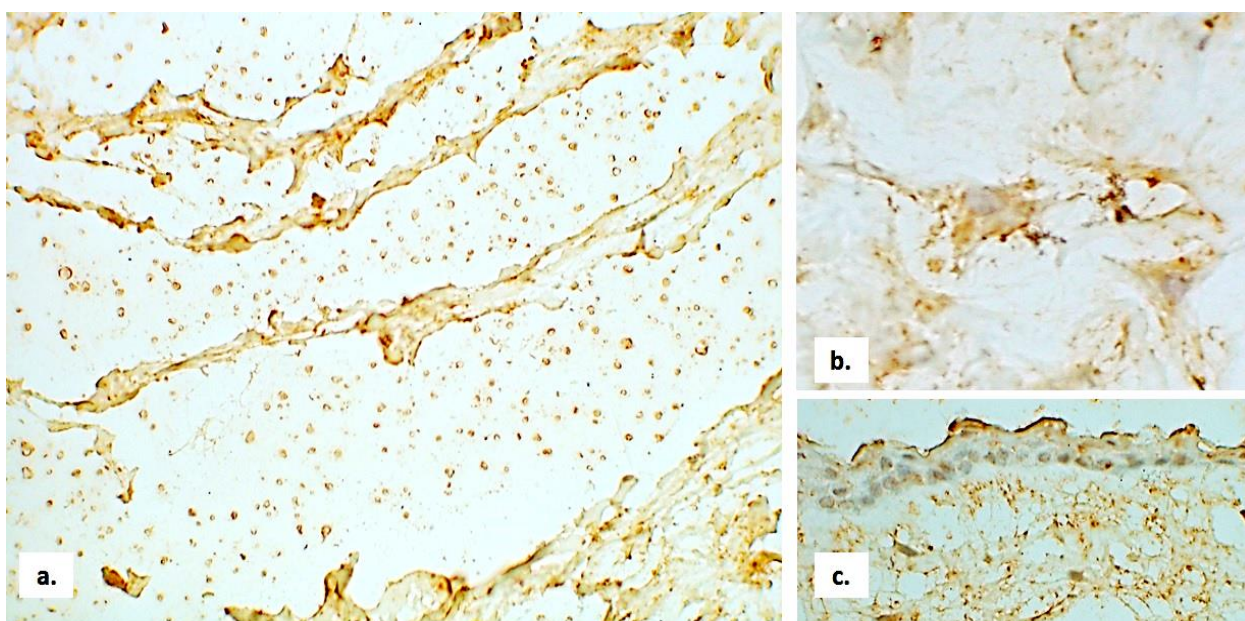


Fig. 4.23. Aspecte particulare ale expresiei imunomarcajului la anti-VEGFR-2 în substanța gelatinoasă Wharton. a) expresia focală de-a lungul componentei colagenice, precum și prezența microveziculelor extracelulare în spațiile matriciale din zona periferică; b) pattern mixt de expresie a markerului în celulele stromale din zona periferică, c) expresia markerului în celulele epiteliului amniotic ombilical, ×200;×400;

Imunoreacție pentru anti-VEGFR-2, DAB

În substanța Wharton a fost observată o prezență remarcabilă a microveziculelor extracelulare VEGFR-2 pozitive, în special în zona periferică a țesutului, mai ales în spațiile matriciale din ariile superficiale spongioase (Figura 4.23 a). Este important de menționat că, în substanța gelatinoasă semnalul pozitiv era predominant extracelular, mai ales în jurul structurii colagenice a stromei cordonului ombilical. Intensitatea de exprimare a acestui imunomarcaj a fost variabil, cu o distribuție neuniformă, fluctuând între niveluri intense și moderate.

Semnalul pozitiv pentru VEGFR-2 a fost observat și în celulele epiteliului amniotic ombilical. Markerul a fost exprimat membranar de o intensitate înaltă (3+). Expresia imunomarcajului a fost neuniformă cu o prezență predominantă în porțiunile apicale ale celulelor. Remarcăm că, în unele celule s-a observat o expresie concomitentă și la nivel nuclear imunomarcajului (Figura 4.23 c).

Distribuția celulelor VEGFR-2 pozitive în placentă

În vilozitățile coriale reacție pozitivă la markerul VEGFR-2 a fost observată la nivelul trofoblastului. Notăm că, semnalul pozitiv a fost emis de ambele componente ale trofoblastului. În schimb, intensitatea de expresie a fost diferită, astfel, sincițiotrofoblastul a emis semnal de intensitate moderată-intensă, iar citotrofoblastul – de intensitate scăzută. De asemenea, este important de menționat că, expresia markerului anti-VEGFR-2 la nivelul sincițiotrofoblastului a fost nu doar citoplasmatică sau membranară, dar și nucleară. Pattern-ul de expresie nuclear a avut un caracter focal. Totodată, a fost observată expresie la VEGFR-2 în celulele endoteliale din vasele fetale, dar și în unele celule stromale, în special din vilozitățile terminale.

Majoritatea celulelor deciduale au exprimat reacția la VEGFR-2 la nivel membranar și citoplasmatic. Au fost observate și celule deciduale, care au exprimat markerul nuclear. Intensitatea de expresie a fost moderată.

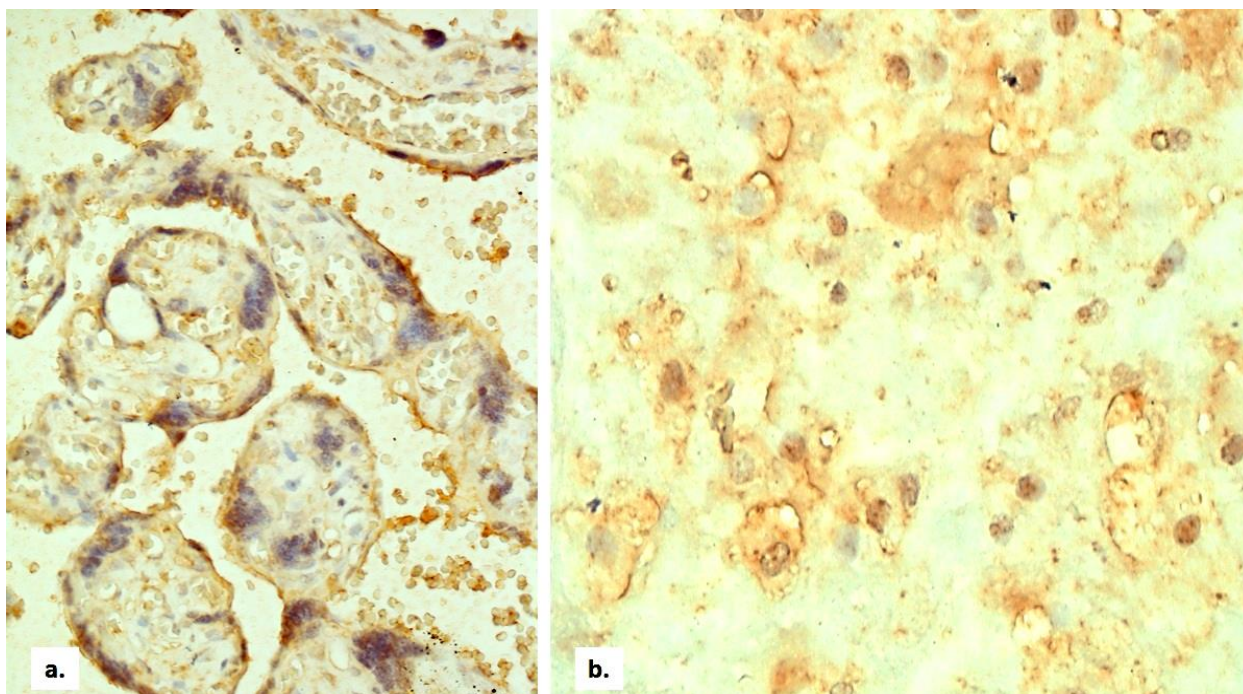


Fig. 4.24. Aspecte ale expresiei imunomarcajului la anti-VEGFR-2 în țesuturile placentale. a) reacție pozitivă a componentelor trofoblastului, a celulelor endoteliale și a unor celule stromale din vilozitățile terminale; b) pattern mixt de expresie a markerului în celulele deciduale, ×200;×400; Imunoreacție pentru anti-VEGFR-2, DAB

Celulele epiteliului amniotic din speci­me­nele cu țesut placentar, au fost VEGFR-2 pozitive, expresia markerului fiind membranară, iar distribuția fiind neuniformă.

4.6. Sinteza la capitolul 4

Celule D2-40 pozitive au fost identificate în cordonul ombilical și în placentă. În ceea ce privește cordonul ombilical, markerul a fost exprimat în celulele epiteliului amniotic al cordonului ombilical, în special la polul bazal al celulelor. Distribuția celulelor D2-40 pozitive în cordonul ombilical a fost neomogenă, cu variații în densitate și intensitate în diferite zone ale substanței gelatinoase Wharton. De asemenea, s-au observat celule D2-40 pozitive cu un fenotip vacuolar și cu un aspect lacunar de localizare. În placentă, celulele deciduale au prezentat o expresie heterogenă a markerului D2-40, fie membranară, fie citoplasmatică. Au fost identificate și celule asemănătoare fibroblastelor care exprimau markerul D2-40 și care erau dispuse printre celulele deciduale. În arborele vilos, markerul D2-40 a fost exprimat în diferite structuri, cu distribuție heterogenă în funcție de tipul de vilozitate. În vilozitățile intermediare și terminale, exprimarea markerului a fost puternică și omogenă în stroma vilooasă. Celulele endoteliale din vasele coriale au fost negative pentru markerul D2-40.

Expresia CD105 a variat în intensitate și distribuție în funcție de tipul și localizarea celulelor analizate. Rezultatele au relevat că expresia CD105 a fost observată la nivel membranar, nuclear și citoplasmatic. În cordonul ombilical, celulele CD105+ au fost observate în vasele ombilicale, în special în artere, precum și în peretele vascular, sub aspectul structurilor veziculoase cu mucopolizaharide. Expresia CD105 observată în epiteliul amniotic a fost de o intensitate mai scăzută, la nivel citoplasmatic și o distribuție neuniformă în cadrul celulei. Totuși, polul apical al celulei amniotice a prezentat o intensitate moderată (2+). În substanța gelatinoasă Wharton, celulele stromale CD105+ au fost distribuite neuniform, iar densitatea celulară cea mai mare a fost pentru zona periferică. Aceste celule aveau o formă fusiformă, cu prelungiri citoplasmatică scurte. Celule CD105+ au fost identificate în diverse regiuni ale placentei, cum ar fi celulele endoteliale din vasele fetale, celulele epiteliului amniotic, celulele stromale din stroma subamniotică, trofoblast și componentele stromale ale vilozităților coriale.

În cordonul ombilical, au fost observate celule CD34+ în vasele arteriale și venoase. Expresia markerului CD34 a fost continuă și omogenă pentru ambele tipuri de vase. Celulele CD34+ non-endoteliale au fost identificate în zona periferică și perivasculară a substanței Wharton. Densitatea celulelor CD34+ a fost mai mare în zona periferică a stromei, în comparație cu zona perivasculară. În țesutul placentar, celulele CD34+ au fost observate în vasele placentare din vilozitățile coriale și placa corială. Expresia markerului CD34 a fost continuă, omogenă și

mixtă la nivel membranar, citoplasmatic și nuclear. Distribuția vaselor sangvine în vilozități a variat în funcție de tipul vilozității. Vasele mari și medii au predominat în porțiunile centrale ale vilozităților, în timp ce vasele mici au fost concentrate în porțiunile periferice, aproape de trofoblast. În stroma vilozităților, au fost identificate două populații de celule CD34+ non-endoteliale, caracterizate prin dimensiuni și intensitate diferite ale expresiei markerului CD34.

Markerul AC133 sau CD133, cunoscut și sub numele de Prominin-1, este o proteină transmembranară glicozilată care indică prezența unor subseturi specifice de celule stem. Această proteină este exprimată în diverse structuri ale cordonului ombilical și placentă. În cordonul ombilical, exprimarea CD133 a fost observată în celulele endoteliale venoase, dar nu în cele arteriale. De asemenea, celulele non-endoteliale CD133 pozitive au fost identificate în zona periferică și perivasculară a substanței Wharton. În zona periferică, celulele CD133 pozitive au avut un aspect morfologic specific, cu prelungiri citoplasmice lungi și nucleu oval, iar distribuția lor a fost omogenă. Expresia markerului a fost predominant citoplasmatică și cu intensitate scăzută sau moderată. În placentă, markerul CD133 a fost exprimat în celulele epitelului amniotic și celulele stromale din stratul mezenchimal subamniotic, precum și în celulele deciduale. Expresia CD133 în aceste celule a fost variabilă, cu o intensitate moderată și un caracter focal.

Studiul a evidențiat prezența markerului VEGFR-2 în diverse structuri ale cordonului ombilical și placentei. A fost observată o expresie mixtă a markerului, atât în citoplasmă, cât și la nivel membranar. Semnalul pozitiv la VEGFR-2 a fost întâlnit în celulele endoteliale, sincițiotrofoblastul și trofoblastul citoplasmatic, precum și în celulele deciduale. În cordonul ombilical, markerul a fost exprimat în celulele endoteliale vasculare și în spațiile mucopolizaharidice din medie, iar în substanța Wharton a fost observată prezența microveziculelor extracelulare VEGFR-2 pozitive. În vilozitățile coriale, expresia markerului a fost observată în trofoblastul sincițiotrofoblastic și citotrofoblastic, precum și în celulele endoteliale și stromale. Expresia markerului VEGFR-2 în celulele epitelului amniotic a fost predominant membranară, iar în unele cazuri s-a observat și expresia nucleară. Intensitatea expresiei a variat de la moderată la înaltă în diferite regiuni ale țesuturilor examinate.

5. ANALIZA ȘI EVALUAREA COMPARATIVĂ A REZULTATELOR OBTINUTE

Placenta umană este un organ unic al corpului uman, caracterizat printr-o structură complexă. Una dintre componentele extrem de importante ale placentei este sistemul său vascular, care are o funcționalitate vitală în susținerea unei noi vieți. Placenta este formată din două sisteme circulatorii separate: maternă și fetală, cu un accent deosebit pe sistemul vascular fetal. Această rețea complexă de vase arteriale și venoase joacă un rol crucial în dezvoltarea normală a fătului [163].

Pentru a înțelege cât mai exact anatomia macroscopică și microscopică a vaselor placentare, este importantă utilizarea unor metode de investigație accesibile. Evaluarea completă a vaselor prin metode observaționale simple nu este posibilă din cauza specificității structurale a organului. Tehnicile de ecografie transabdominală și transvaginală au limitări tehnice, în timp ce rezonanța magnetică (RMN), deși precisă, nu este considerată sigură pentru fătul în curs de dezvoltare [198]. Tomografia computerizată (CT) are și ea indicații limitate în timpul sarcinii și nu poate fi utilizată pe scară largă pentru studiile asupra persoanelor sănătoase [33].

Metodele *in vitro* sunt preferate pentru a obține o reprezentare mai detaliată a arhitecturii vasculare, în comparație cu metodele *in vivo*. Un exemplu este tehnica de turnare prin coroziune, care permite obținerea unei reconstrucții tridimensionale prin umplerea vaselor cu diferiți polimeri. Această tehnică permite vizualizarea mai cuprinzătoare a structurilor vasculare. Analiza preparatelor de coroziune ale placentelor umane oferă astfel un supliment valoros pentru investigațiile *in vivo*.

Modelele obținute în cadrul studiului nostru au fost generate prin tehnica coroziunii folosind un polimer dentar. Vasculatura fetoplacentară a fost reprezentată de ramurile vaselor ombilicale, care traversau placa corială. S-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 dihotomic 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. Ramurile secundare au prezentat un traiect radial spre interiorul placentei. Datele noastre sunt aproape similare cu cele raportate de grupul de cercetători condus de Gordon [72]. În schimb, Rana și colab. raportează despre un număr de până la 17 bifurcații ale vaselor sanvine în inserția marginală a cordonului [160].

Pentru majoritatea placentelor a fost caracteristică prezența anastomozelor între arterele ombilicale, care erau localizate în segmentul dintre punctul de inserție a cordonului și

ramificarea arterelor. Menționăm că, în placentele incluse în studiu, am observat existența mai multor ramuri fiice complexe și subțiri, originare din ramurile primare și secundare.

Structurile ramurilor intraplacentare din vilozitățile terminale au fost recunoscute ca având un aspect terminal distinctiv, sugerând forma unui "fund de sac". Totuși, de-a lungul vaselor terminale au fost observate structuri asemănătoare mugurilor, ceea ce conferea vaselor un aspect de "înmugurire". De asemenea, studiul nostru a relevat, că zonele drenate de afluenții venei ombilicale au fost observate cu hotare bine delimitate, iar cel mai frecvent pattern de distribuție al ramurilor venoase a fost între cotiledoanele placentare. Nu au fost identificate anastomoze directe între sistemul arterial și cel venos al placentei.

Problema supraviețuirii reduse în vivo a celulelor și țesuturilor transplantate este legată de faptul că acestea nu au acces adecvat la circulația sangvină pentru a primi nutrienți și a elimina deșeurile metabolice. Lipsa aportului adecvat de sânge și, ca rezultat, deficitul de oxigen și substanțe nutritive, precum și expunerea la toxine metabolice, pot duce la leziuni grave și chiar la moartea celulelor [3, 24, 31]. Pentru a rezolva această problemă, se recomandă utilizarea unui recipient de celule implantabile care să fie conectat la sistemul circulator al gazdei. De asemenea, se poate recurge la transplantul de celule în țesutul vascular pentru a asigura un flux sangvin adecvat către transplant [23]. Pentru a păstra structurile vasculare native ale organului și pentru a permite anastomozele cu circulația sangvină a gazdei, se acordă prioritate decelularizării întregului organ [184]. Placenta conține componente ale matricei extracelulare și factori de creștere endogeni bine conservați. Placenta umană decelularizată poate fi utilizată ca substituent dermic pentru vindecarea rănilor și în ingineria țesutului adipos [55, 91]. Utilizarea placentei în bioinginerie prezintă avantaje din punct de vedere anatomic și etic, deoarece, după naștere, placenta este considerată de obicei un deșeu clinic. Astfel, utilizarea placentei în ingineria celulară și tisulară nu ridică probleme etice majore legate de utilizarea organelor umane [96].

Respectiv, rezultatele obținute susțin informațiile existente despre abundența vascularizării placentei umane. Iar structura vasculară a placentei pare potrivită pentru utilizarea acesteia ca gazdă pentru organe auxiliare. Vasele ombilicale ale placentei pot furniza vascularizarea necesară pentru grefă în organismul receptor, asigurând, astfel, accesul transplantului la circulația sangvină.

Studiul nostru a evidențiat distribuția și organizarea componentei fibrilare a matricei extracelulare în diferite regiuni ale placentei umane, precum vilozitățile terminale, stroma deciduale și placa corială. Aceste caracteristici structurale sugerează rolul mecanic de suport al matricei colagenice pentru vasele fetale coriale și trofoblast. De asemenea, se observă o variație

în distribuția și densitatea fibrelor reticulare în diverse zone ale placentei, inclusiv în fibrinoid. Aceste informații contribuie la înțelegerea arhitecturii și funcției placentei umane și pot fi relevante pentru aplicațiile în bioinginerie și medicină regenerativă.

Totodată, datele morfologice acumulate sugerează, că placenta reprezintă o sursă bogată în colagen, iar repartizarea acestuia, în special, la nivelul arborelui vilos respectă o compartimentare caracteristică. Astfel, putem vorbi de existența unui „schelet fibrilar de colagen” foarte organizat, ceea ce subliniază rolul mecanic de suport al matricei colagenice pentru vasele fetale coriale și a trofoblastului. În plus, prezența unei rețele fine reticulare în vilozitățile terminale sugerează că componenta fibrilară a matricei extracelulare îndeplinește și un rol suplimentar, și anume de a crea un mediu favorabil care facilitează schimburile active între făt și mamă.

Matricea extracelulară oferă oportunitatea de a dezvolta biomateriale care să ofere un micro-ambiant cu proprietăți biologice și biofizice deosebite, care pot îmbunătăți și regla funcțiile celulare. Pentru a înlocui țesuturile umane, care sunt disponibile într-o cantitate limitată, se utilizează în principal matricea extracelulară obținută din surse animale. Cu toate acestea, dacă decelularizarea acestor țesuturi nu este realizată complet, există un risc crescut de respingere imună și de transmitere a bolilor [92].

Vasele ombilicale sunt componente esențiale ale sistemului circulator al fătului în timpul dezvoltării intrauterine. Acestea sunt responsabile de furnizarea oxigenului și substanțelor nutritive necesare creșterii și dezvoltării adecvate a fătului în timpul sarcinii. Structura lor histologică complexă și adaptată îndeplinește o funcție vitală în susținerea vieții înainte de naștere.

Analizând histologic structura vaselor ombilicale, am relevat anumite particularități structurale specifice arterelor și venei ombilicale, precum diferențe în grosimea peretelui, organizarea celulelor musculare netede și distribuția fibrelor de colagen și reticulare. Astfel, am identificat că arterele ombilicale prezentau un lumen neregulat, în timp ce vena ombilicală avea un lumen mai larg. Peretele vaselor ombilicale a fost format doar din două tunici (intima și media), adventiția și membrana elastică externă fiind absentă. Tunica medie, mult mai groasă în artera ombilicală decât în venă, era organizată în două straturi: intern și extern. Această aranjare a fost condiționată de poziționarea celulelor musculare netede, care formau straturi alternante orientate longitudinal și circumferențial. Venele prezentau mai puține straturi de celule musculare netede în comparație cu arterele. Celulele musculare netede observate în colorația Tricrom Masson au prezentat intensități similare de colorare în ambele vase ombilicale. Între celulele musculare netede ale mediei se aflau spații veziculoase umplute cu conținut

mucopolizaharidic. Important de menționat că celule musculare netede au fost prezente și în intima arterei ombilicale. Aici, aceste celule au fost de dimensiuni mici, dispuse longitudinal. Membrana elastică internă era prezentă doar în vena ombilicală. Date similare sunt raportate și de către Dougherty și colab., în 2014 [46]. Dougherty sugerează că celulele musculare netede din stratul exterior al arterei ombilicale sunt responsabile în principal de răspunsul la vasoconstricție în momentul nașterii, în timp ce celulele musculare netede din stratul interior sunt relativ puțin contractile. Totodată, ei menționează că vena conține un număr mult mai redus de celule musculare contractile [46]. Există o serie de substanțe ce influențează procesele de vasodilatație sau vasoconstricție, precum ar fi: serotonina, angiotensina, oxitocina, prostaglandinele, oxidul de azot și polipeptida natriuretică atrială. Este posibil ca anumite substanțe vasoconstrictoare să fie responsabile de medierea închiderii circulației placentare imediat după nașterea fătului [50]. Astfel, în baza datelor obținute de noi și alți cercetători, putem presupune că celulele musculare din stratul extern al mediei funcționează ca un inel exterior contractil, care împinge centripet componenta amorfă bine reprezentată în artere, determinând astfel ocluzia lumenului.

Celulele musculare netede vasculare reprezintă principalul element al peretelui vascular. Aceste celule nu doar se contractă, ci sunt implicate în sinteza și secreția componentelor matricei extracelulare, cum ar fi colagenul și elastina. Nivelul de maturitate al acestor celule poate fi reflectat prin conținutul de colagen prezent în peretele vascular. Analiza componentei fibrilare a vaselor a relevat o distribuție inegală a fibrelor de colagen de tip I și a celor reticulare. Astfel, fibrele de colagen de tip I erau predominant prezente în intima și straturile externe a media, în timp ce fibrele reticulare predominau în medie, înconjurând celulele musculare și formând o structură de susținere pentru acestea [70].

Epiteliul amnionic ombilical a prezentat variații în structură, trecând de la un epiteliu simplu columnar la un epiteliu simplu cubic, iar alocuri devenea stratificat cubic. Există studii care susțin că epitelium amniotic conține două tipuri principale de celule, sugerând astfel că poate fi implicat în secreția lichidului amniotic. Cu toate acestea, există și date care contestă această ipoteză. Potrivit lui Parry și Abramovich, celulele din epitelium sunt sărace în organite și nu au funcții distincte sau nu sunt implicate în procesele de reglare a apei. Gebrane-Younes și colab. sugerează că vasele ombilicale au o importanță directă în formarea lichidului amniotic. Aceste vase permit o transudație fluidă semnificativă din sângele fetal în lichidul amniotic [65].

Datorită caracteristicilor sale structurale, artera ombilicală poate fi considerată un candidat promițător pentru dezvoltarea de grefe vasculare cu diametru mic. Conform datelor obținute în cadrul cercetării noastre, diametrul arterei poate varia între 1-2 mm și poate fi izolată cu ușurință din cordonul ombilical fără a necesita proceduri invazive. De asemenea, în

comparație cu vena ombilicală, structura peretelui arterei ombilicale este bine definită, ceea ce poate facilita lucrul chirurgului în timpul transplanturilor. În plus, conform datelor din literatură, arterele ombilicale prezintă o complianță similară cu cea a arterelor coronare [76, 126]. Reieșind din datele prezentate mai sus și având în vedere faptul că arterele ombilicale prezintă proprietăți de remodelare în condiții *in vivo*, acestea devin candidați ideali pentru utilizarea în ingineria grefelor vasculare cu diametru mic.

În acest studiu ne-am propus să găsim metoda optimă de decelularizare ce poate fi utilizată pentru vasele ombilicale, metodă care nu va afecta sau într-un grad minim matricea extracelulară, astfel că proprietățile mecanice ale arterei decelularizate să nu fie modificate. Țesuturile supuse procedurii de decelularizare își păstrează matricea extracelulară nativă și respectiv proprietățile mecanice ale țesuturilor native [5, 39]. Aceste biomateriale decelularizate pot fi ulterior recelularizate cu diverse tipuri de celule, cum ar fi celule endoteliale, celule progenitoare, etc. pentru a genera țesuturi funcționale. Prin decelularizare se obține reducerea imunogenității țesutului, ceea ce permite utilizarea lor în calitate de grefă alogenă. Din datele prezentate în literatura de specialitate se pare că, țesuturile decelularizate au potențial de a fi reparate, a crește și a suferi remodelari în condiții de *vivo* [104, 132].

În studiul nostru, arterele ombilicale au fost supuse procesului de decelularizare utilizând trei metode: chimică (utilizând detergent), enzimatică și o metodă combinată (detergent+enzimă). Pentru a realiza decelularizarea, am folosit un sistem de perfuzie în care soluțiile respective au fost perfuzate continuu prin lumenul vasului, în timp ce arterele erau complet scufundate în soluția de decelularizare. Astfel, decelularizarea vaselor a fost făcută concomitent din interior și exterior. În comparație cu alte cercetări în care procesul de decelularizare durează de obicei între 3-5 zile [76, 126], utilizarea sistemului de perfuzie ne-a permis să reducem semnificativ timpul necesar pentru decelularizare, de la 24 ore la doar 3,5 ore. Prin scurtarea timpului de decelularizare, am reușit să minimizăm efectele negative asupra componentelor matricei extracelulare.

Analiza histologică a arterelor decelularizate ne-a permis să apreciem calitatea decelularizării și să identificăm metoda cea mai calitativă. Cel mai crescut grad de decelularizare a fost obținut prin metoda chimică cu utilizarea soluției de detergent de 1% dodecil sulfat de sodiu (SDS) Decelularizarea țesutului vascular purta un caracter omogen, fără urme celulare. Matricea extracelulară a fost bine conservată, caracterizată de fibre de colagen organizate în fascicule groase, alocuri fibrele au prezentat un grad scăzut de fragmentare. Decelularizare parțială s-a obținut prin metoda enzimatică. Metoda combina a reușit să producă o decelularizare practic totală, totuși, alocuri se regăseau urme celulare. Rezultate similare în ceea ce privește

utilizarea soluțiilor de detergenți și calitatea înaltă a decelularizării au fost raportate și de către Mallis și colab. Aceștia au utilizat o soluție formată din doi detergenți (CHAPS și SDS) și au obținut grefe vasculare complet decelularizate. Mai mult, aceste grefe vasculare obținute au demonstrat rezistență la depozitare în azot lichid, pe o perioadă de 6 luni [127]. Malcova și colab. relatează despre o decelularizare parțială a aortelor porcine la utilizarea soluției de detergent de 1% dodecil sulfat de sodiu (SDS). Mai mult, aceștea raportează despre o degradare și a matricei colagenice [124]. Diferențele în rezultatele obținute pot fi atribuite utilizării unor vase diferite în procesul de decelularizare. De exemplu, aorta este cunoscută pentru a avea o tunică mai groasă în comparație cu artera ombilicală. În plus, timpul de expunere la detergent poate juca un rol important în alterarea structurii fibrilare a matricei extracelulare. În studiul anterior menționat, timpul de expunere la detergent a fost de 48 de ore, ceea ce poate contribui la modificări mai pronunțate ale carcasi fibrilare.

Următorul pas al studiului experimental a fost evaluarea proprietăților biologice și biomecanice ale vaselor decelularizate. Astfel segmentele de artere decelularizate au fost supuse testelor de rezistență la întindere și la presiune. Rezultatele testului de rezistență la întindere a arterelor decelularizate nu a evidențiat variații semnificative comparativ cu vasele intacte din lotul martor. Arterele ombilicale decelularizate prin metoda chimică (cu soluție SDS) s-au rupt la valori situate între 1,7 N și 2 N. Cea mai însemnată diferență de 0,79 N, raportată la valoarea medie a lotului martor, a fost pentru vasele decelularizate prin metoda enzimatică (cu tripsină). Presupunem că tripsina își manifestă acțiunea proteolitică nu doar în direcția eliminării celulelor dar și asupra componentelor matricei extracelulare.

Rezultatele testului de rezistență la gonflare a evidențiat o rezistență mare a arterelor ombilicale la presiunea de 280mmHg pentru toate loturile incluse în studiu. Ulterior arterele decelularizate și supuse testului de rezistență la presiune au fost examinate microscopic pentru identificarea modificărilor în componenta colagenice. Astfel, peretele arterelor decelularizate prin metoda chimică nu a suferit schimbări esențiale, grosimea acestuia nu s-a redus esențial, iar carcasa de fibre de collagen a rămas integră și compactă. Modificările substanțiale au fost observate în pereții arterelor decelularizate prin metoda combinată. Presupunem că sumarea acțiunilor proteolitice a detergentului și tripsinei au un efect distructiv asupra componentelor matricei extracelulare.

În general, aceste constatări sugerează că vasele ombilicale decelularizate au proprietăți mecanice și morfologice favorabile pentru utilizarea lor ca schelete de inginerie tisulară. Este necesară o cercetare suplimentară pentru a optimiza utilizarea lor și pentru a determina eficacitatea lor *in vivo*.

Pentru a asigura o dezvoltare sănătoasă a sarcinii, în paralel cu creșterea fetală, țesuturile complexului ombilico-placentar parcurg un proces continuu de adaptare fizică și funcțională. Un aspect crucial în această dezvoltare adecvată este inițierea și menținerea formării de noi vase de sânge în vilozitățile coriale. Creșterea fluxului sangvin utero-placentar, care este esențial pentru perfuzia placentară normală și dezvoltarea sănătoasă a fătului, impune remodelări vasculare dramatice în vasele uterine. În majoritatea organelor, angiogeneza are un parcurs paralel cu limfangiogeneza. În literatura de specialitate, există un număr limitat de studii recente care evidențiază schimbările dramatice din sistemul vaselor limfatice uterine în procesul de remodelare vasculară din timpul sarcinii. Până în prezent, nu există informații concludente despre prezența vaselor limfatice în cordonul ombilical. Cu toate acestea, nu se poate exclude complet existența acestora în placentă. Este posibil ca, vasele limfatice placentare să nu treacă prin cordonul ombilical, ci să se conecteze direct la venele placentare [75]. Potrivit datelor raportate de Castro și Lundell [26, 123], vasele limfatice sunt supuse regresiei în endometrul gestațional. Aceste observații sugerează că limfangiogeneza în țesutul placentar ar putea urma un model distinct față de angiogeneza.

Pentru a studia expresia podoplaninei în țesuturile complexului ombilico-placentar, am utilizat markerul D2-40, care interacționează cu sialoglicoproteina O-legată de pe endoteliul limfaticelor și nu interacționează cu endoteliul vaselor sangvine. Respectiv, imunomarkerul D2-40 este specific vaselor limfatice [62].

Studiul efectuat a arătat că atât în țesuturile placentei, cât și în cordonul ombilical au fost prezente structuri care au exprimat imunomarcajul D2-40. Evident că, urmare acestor observații, a fost important să înțelegem dacă toate elementele structurale aparțin sistemului limfatic. Datele noastre certifică că celulele endoteliale atât în placentă, cât și la nivelul vaselor cordonului ombilical au fost negative la D2-40. Iar distribuția structurilor D2-40 pozitive în rețele reticulare limfatice-like în stroma vilozităților, dar și în zonele periferice ale substanței gelatinoase Wharton poate sugera existența unor sisteme conductoare asemănătoare vaselor limfatice.

Stroma vilozităților, cât și substanța gelatinoasă Wharton, conțin din abundență matrice amorfă, în timp ce componenta fibrilară prezintă o distribuție complexă și particulară. Îmbinarea armonioasă a acestor două compartimente tisulare contribuie la formarea unor canale mezenchimale matriceale. Astfel, stroma poate fi comparată cu o structură unică asemenea unui canal [102, 103]. Aceste canale matriciale asigură deplasarea celulelor, dar și a lichidului tisular atât în interiorul stromei vilozității, cât și în substanța gelatinoasă. Analiza comparativă a distribuțiilor structurilor pozitive la D2-40 și a fibrelor reticulare, ne-a permis să presupunem că, modelul de distribuție reticular al structurilor D2-40 pozitivă din matricea extracelulară

perivasculară/pericelulară este susținut de stroma reticulară din apropiere. Acest fapt este diferit de datele raportate de Korhonen și colab., care în 2001 susțineau că niciuna dintre proteinele matricei (inclusiv laminină și fibronectina oncofetală) prezintă un model de distribuție similar cu cel al podoplaninei [109].

Podoplanina reprezintă o proteină transmembranară de tip mucină, formată dintr-un lanț de 162 de aminoacizi. În 1998, podoplanina a fost identificată în alveolocitele de tip I de către Dobbs și colab. [44]. Domeniul extracelular al podoplaninei conține patru repetări ale domeniului de agregare a trombocitelor (PLAG), care interacționează cu receptorii de lectină de tip C2 (CLEC-2) de pe suprafața trombocitelor. De asemenea, podoplanina se leagă de CCL21, Galectina 8, CD9, CD44 și MMP14 [158, 183].

Importanța podoplaninei, în mare parte, este conectată cu implicarea acestora în procesele de vasculogeneză și limfangiogeneză. Este important de menționat că, podoplanina controlează mișcarea celulară prin reorganizarea actinei din citoschelet. Această reorganizare are loc datorită interacțiunii dintre proteinele ezrin-radixin-moesin și secvența intracelulară a podoplaninei, care conține aminoacizi bazici și reziduuri de serină. De asemenea, podoplanina are un rol important în procesele de adeziune celulară, migrare și chemotaxie. Numeroase substanțe, precum factori de creștere (VEGF-C și TGF- β 1), citokine (lu, TNF- α , IFN- γ , IL-1 și IL6), fibronectina și lipopolizaharidele, cresc expresia podoplaninei în celulele epiteliale și cele de origine mezenchimală [111, 112].

Un aspect important al studiului nostru a fost identificarea expresiei D2-40 de intensitate crescută în celulele deciduale. Mai mult, această expresie a avut un caracter neomogen, iar pattern-ul de expresie a fost unul predominant membranar. Menționăm că, numărul de celule deciduale era mai mare la localizarea acestora în apropierea vaselor sangvine. Despre pozitivitatea celulelor deciduale, în special, din apropierea arteriolelor spiralate amintește Volchek și colab., care conectează acest fenomen cu regresia limfatică din endometrul gestațional, ce startează în jurul arteriolelor spiralate [189]. Autorii au formulat ipoteza că în urma regresiei vaselor limfactice are loc eliberarea unei cantități semnificative de podoplanină, care, ulterior, este fagocitată de către celulele deciduale periarteriolare. Datele din literatura de specialitate amintesc și despre efectele importante ale podoplaninei asupra migrației pericitului [121].

Podoplanina are un rol crucial nu doar în procesul de formare a vaselor limfactice, dar și în angiogeneză. Inhibarea podoplaninei duce la perturbări a angiogenezei, cu formarea de vase sangvine defectuoase, care sunt lipsite de suportul adecvat al pericitului, permeabile și susceptibile la sângerare [133, 147].

Studiul nostru a evidențiat expresia abundentă a markerului D2-40 în toate zonele substanței gelatinoase Wharton și stroma viloză. Distribuția acestor celule pozitive a fost neomogenă, identificându-se astfel zone unde celulele D2-40+ predominau numeric. Celulele stromale D2-40 au prezentat și o morfologie heterogenă. Totuși, majoritatea celulelor pozitive din substanța Wharton prezentau prelungiri lungi, prin intermediul cărora formau coardoane fără lumen, asemenea unor canale limfatice imature. În ceea ce privește stroma vilozităților coriale, nu s-au identificat structuri tubulare similare vaselor limfatice. Cu toate acestea, s-au observat celule stromale pozitive pentru markerul D2-40, amplasate în imediata apropiere a vaselor sangvine. Echipa de cercetare condusă de Bellini a raportat rezultate similare, constatând absența vaselor limfatice mature în vilozitățile coriale, dar identificând celule stromale pozitive pentru podoplanină [13]. Autorii sugerează că celulele stromale pozitive la podoplanină ar putea funcționa ca niște canale limfatice primitive.

Țesuturile complexului ombilico-placentar sunt printre puținele regiuni ale organismului care beneficiază de protecție imunologică și care nu dispun de un sistem limfatic propriu. Cu toate acestea, cercetările noastre au arătat că podoplanina este prezentă în diferite tipuri de celule din aceste țesuturi, precum celulele stromale ale vilozităților coriale, celulele deciduale, epiteliul amniotic și celulele din substanța gelatinoasă Wharton. Deși au fost realizate studii asupra expresiei podoplaninei în țesuturile placentare normale și patologice, semnificația biologică a acestei proteine în contextul țesuturilor ombilico-placentare rămâne încă neclară.

După părerea lui Wang și colab. podoplanina are un rol crucial în angiogeneza fetală pe parcursul dezvoltării intrauterine. Reducerea nivelurilor de podoplanină contribuie la apariția diverselor afecțiuni gestaționale asociate cu defecte în procesul de angiogeneză [192]. Într-un studiu realizat de Lee și colab., s-a constatat prezența unui sistem primovascular (PVS) pozitiv pentru podoplanină în cordonul ombilical și vilozitățile coriale. Acest sistem PVS are funcții placentare, printre care se numără imunomodularea, regenerarea țesuturilor și modularea celulelor stem [116]. Heazell și colab. sugerează că celulele stromale pozitive la podoplanină ar putea avea o funcție similară cu cea a celulelor stem [80]. Potrivit informațiilor prezentate de Lundell și colaboratorii săi, celulele stromale din vilozitățile coriale și celulele stromale deciduale reprezintă principalele surse de podoplanină în placenta umană. De asemenea, se sugerează că celulele secretoare de podoplanină din țesuturile placentare au un rol important în menținerea toleranței imunologice fetomaternală [123].

Kandemir și colab. [147], studiind exprimarea podoplaninei în țesuturile placentare în diferite perioade ale gestației, au observat o creștere treptată a nivelului de exprimare a podoplaninei odată cu avansarea gestației. Astfel, nivelurile de exprimare a podoplaninei în

celulele stromale au fost cele mai scăzute în perioada de gestație timpurie, înainte ca vasele de sânge fetale să se formeze [147].

Țesuturile complexului ombilico-placentar sunt bogate în celule stem fetale. Acestea sunt considerate celulele stem pluripotente intermediare, ce se plasează între celulele stem embrionare și celulele stem adulte [1]. Una dintre trăsăturile notabile ale CSF constă în abilitatea lor de a se înmulți rapid în culturi celulare și de a genera o populație extinsă de celule stem. Acest potențial de expansiune este un atribut valoros în cercetarea și aplicațiile terapeutice, deoarece oferă o sursă abundentă de celule stem pentru utilizare. Pe lângă potențialul lor de expansiune, CSF sunt recunoscute și pentru siguranța lor în ceea ce privește formarea tumorilor. Aceasta înseamnă că aceste celule stem nu prezintă tendința de a se transforma în tumori sau de a genera creșteri celulare necontrolate. Această caracteristică este esențială pentru aplicările terapeutice, deoarece asigură un nivel ridicat de siguranță atunci când sunt utilizate în terapiile celulare și regenerative [129].

Vasele ombilicale, precum și țesutul conjunctiv specializat de tip mucos din cordonul ombilical provin din mezodermul embrionar și/sau extraembrionar. Datele din literatura de specialitate sugerează că cordonul ombilical uman se formează prin migrarea celulelor mezodermice extraembrionare, care ulterior se conectează cu mezodermul corionic. Aceste structuri migratoare sunt apoi comprimate într-un cordon subțire acoperit de epiteliul amniotic și vascularizat de vasele alantoide. Pe măsură ce procesul de dezvoltare avansează, această componenta mesodermală a cordonului suferă modificări și ajunge să rămână într-o stare de tranziție similară cu mezenchimul prezent în măduva osoasă adultă [177]. Prin urmare, diversitatea și heterogenitatea structurii cordonului ombilical pot fi atribuite complexității procesului de dezvoltare embrionară, care implică mai multe subpopulații celulare și variate configurații ale matricei extracelulare [190].

În ciuda diverselor algoritme de clasificare propuse, majoritatea studiilor i-au în considerare patru zone principale ale substanței Wharton: zona subamniotică, zona Wharton propriu-zisă (situată între regiunea subamniotică și vasele ombilicale), zona perivasculară, și zona intervasculară (situată în spațiul central al cordonului, între cele trei vase ale cordonului) [143, 172]. Unele cercetări au raportat despre diferențe atât în structura histologică a matricei extracelulare, cât și proprietățile celulelor din fiecare zonă [64]. Astfel, deși există date care susțin existența diferențelor structurale în aceste zone, la acest moment nu există încă date bine stabilite în ceea ce privește potențialul lor specific ca sursă de celule stem pentru ingineria țesutului vascular. În cadrul cercetării noastre, analizând preparatele histologice colorate cu hematoxilină-eozină am observat că zona Wharton prezenta o organizare în două straturi

distincte. Din acest motiv, am decis să divizăm această regiune în două zone separate: zona superficială spongioasă și zona profundă compactă. Astfel, am analizat caracteristicile specifice ale fiecărei zone periferice în parte. Inițial, utilizând metode histologice și histochimice, am evidențiat existența diferențelor histologice între zonele substanței Wharton. De fapt, am demonstrat că densitatea cea mai mare a fibrelor de colagen era în zona perivasculară, unde acestea formau fascicule groase dispuse concentric în jurul vaselor ombilicale, în timp ce subamniotic și periferic densitatea fibrelor a fost în scădere. Densitatea crescută de fibre de colagen presupune și prezența unor cantități crescute de proteoglicani și glicozaminoglicani. Rezultatele obținute ar putea fi legate de vasele ombilicale și mai ales de presiunile mari care trebuie să fie suportate de aceste structuri [195, 203]. Analizând preparatele histologice în lumina polarizată am evidențiat caracterul matur al fibrelor de colagen de tip I atât în toate zonele cordonului ombilical, cât și țesuturile placentare. Chiar dacă sunt necesare și studii biomecanice suplimentare, aceste constatări sugerează că proprietățile biomecanice ale cordonului ombilical pot varia între zonele specifice. Studiind distribuția fibrelor reticulare în substanța gelatinoasă nu a fost identificat un pattern caracteristic pentru acestea. Notăm că, densitatea cea mai crescută a acestor fibre a fost în zona subamniotică.

Studiind distribuția componentelor matricei extracelulare din substanța gelatinoasă, am observat că substanța Wharton prezenta variații în caracterul său structural. Anume, am identificat zone în care aceasta avea o structură mai compactă, în timp ce în alte zone, în special zona periferică spongioasă, prezenta o consistență mai laxă. Aspectul lax a fost determinat de prezența unor spații neregulate, de dimensiuni variate, cu caracter de fisură, care nu erau delimitate de celule. În mare parte, aceste zone conțineau o componentă amorfă nefibrilară, care era bogată în proteoglicani și mucopolizaharide, iar uneori se găseau fragmente scurte de fibrile de colagen. Celulele care înconjura parțial aceste spații prezenta caracteristici asemănătoare miofibroblastelor. Este important să menționăm că celulele cu aspect miofibroblast-like au reprezentat populația predominantă în zonele superficiale ale substanței Wharton.

Încă în 1970, Goworka a raportat despre prezența fisurilor în matricea extracelulară a substanței Wharton, presupunând că aceste spații contribuie la nutriția vaselor ombilicale, care sunt lipsite de adventiție, și respectiv nu conțin vasa vasorum [73]. Nanaev și colab. [143] au sugerat că fisurile stromale au o importanță în principal mecanică. Astfel, interacțiunea dintre spațiile matricei care conțin mucopolizaharide, miofibroblastele contractile și fibrile de colagen din vecinătatea lor joacă un rol crucial în reglarea turgorului cordonului ombilical. Acest aspect este deosebit de important în prevenirea compresiei și îndoirii cordonului ombilical, evitând astfel obstrucția vaselor ombilicale.

Analizând toate datele noastre, sugerăm că în adiție la semnificațiile funcționale menționate de alte grupuri de cercetare, spațiile din matricea cordonului ombilical pot fi implicate în schimbul de substanțe între sângele din vasele ombilicale și lichidul amniotic. De asemenea, considerăm că aceste spații pot asigura mobilitatea celulară în cadrul substanței Wharton. În plus, identificarea microveziculelor extracelulare VEGFR2 pozitive în spațiile matricei, printre miocitele netede din peretele vaselor ombilicale, dar și în componenta amorfă a substanței gelatinoase, ne sugerează că întreaga substanță Wharton poate fi un depozit impresionant de substanțe biologic active. Aceste substanțe au un rol important în promovarea proceselor de remodelare tisulară, proliferare și diferențiere celulară, precum și în migrarea și supraviețuirea celulară. Menționări similare au fost raportate și de către Nanaev și colaboratorii săi, care au constatat prezența neobișnuită a componentelor membranei bazale, în special a colagenului IV, în matricea substanței Wharton și în trofoblastul extravilos al placentei umane. Acești cercetători sugerează că depunerile proteice din matricea extracelulară a stromei cordonului ombilical joacă un rol în remodelarea țesutului și sunt capabile să influențeze creșterea și diferențierea celulelor, inclusiv a fibroblastelor [143].

Caracteristicile unice ale diferitelor zone ale stromei extracelulare compusă din componente fibrilare și non-fibrilare, ar putea fi corelate cu proprietățile fizice specifice ale acestora. Aceste proprietăți fizice ar putea juca un rol important în comunicarea și reglarea comportamentului celulelor.

Celulele stromale sunt distribuite neuniform în substanța gelatinoasă din cordonul ombilical. Studiile microscopice efectuate de Takechi et al. [179] au relevat că celulele stromale sunt numeroase în apropierea vaselor ombilicale, iar densitatea acestora scade în apropierea epitelului amniotic ombilical. Date similare sunt evidențiate și de cercetarea noastră.

Cercetările recente relatează despre faptul că, celulele prelevate din cordonul ombilical prezintă un potențial semnificativ de expansiune celulară, plasticitate și capacitate de a modula răspunsul imun al organismului, fapt pentru care acestea sunt propuse ca potențiali actori utili în terapiile care implică celule stem [43, 101]. În plus, s-a constatat că aceste celule au potențialul de a fi folosite în ingineria țesuturilor vasculare. Studiile au arătat că celulele stem prelevate din vasele ombilicale pot fi direcționate să se diferențieze în celule endoteliale. Acest lucru deschide posibilitatea utilizării lor ca o sursă valoroasă de celule pentru regenerarea și repararea țesuturilor vasculare afectate [2]. Cu toate acestea, rezultatele utilizării clinice a acestor celule au arătat o variație considerabilă, iar majoritatea studiilor clinice disponibile nu au furnizat suficiente dovezi științifice pentru a susține utilizarea de rutină a celulelor stem la pacienții umani [118]. Heterogenitatea structurală și histologică a cordonului ombilical ar putea fi unul dintre factorii

responsabili de variabilitatea rezultatelor observată în terapiile cu utilizarea de celule stem. Astfel, identificarea și caracterizarea diferitelor regiuni ale cordonului ombilical ar putea juca un rol important în determinarea potențialului lor terapeutic specific [16]. Această abordare ar putea implica utilizarea regiunilor specifice ale cordonului ombilical în generarea de țesuturi bioartificiale prin inginerie tisulară și alte aplicații în medicina regenerativă [170].

În cadrul studiului nostru, ne-am propus să investigăm caracteristicile și trăsăturile distinctive ale celulelor cu potențial de celulă stem din fiecare zonă a cordonului ombilical și din țesuturile placentare. Astfel, au fost incluși în cercetare mai mulți markeri de suprafață (CD105, CD34, AC133, VEGFR2), care ne-a permis să identificăm potențiale celule stem mezenchimale.

Imunocolorarea cu CD105 a devenit o metodă importantă pentru identificarea și caracterizarea celulelor stem pluripotente în diferite țesuturi și organe. CD105 este un marker de suprafață specific pentru celulele endoteliale și celulele stem pluripotente implicate în angiogeneză și remodelarea vasculară. În această lucrare, am evaluat exprimarea markerului CD105 de către celulele stromale din cordonul ombilical și componentele placentei umane, atât de origine maternă, cât și fetală. Pentru evidențierea celulelor stem mezenchimale este important exprimarea markerului pe suprafața celulară în $\geq 95\%$ din populația celulară. După părerea lui Dominici și colab. (2006), celulele stem mezenchimale trebuie să exprime CD105, un marker esențial utilizat pentru confirmarea acestora [45].

Am constatat că toate celulele din cele patru regiuni ale cordonului ombilical au fost pozitive pentru CD105, dar densitatea acestora a variat în funcție de zone. De asemenea, au fost stabilite diferențe statistic semnificative pentru CD105 între toate regiunile cordonului ombilical. Expresia CD105 a variat și în intensitate în funcție de tipul și localizarea celulelor analizate. Rezultatele au relevat că expresia CD105 a fost observată la nivel membranar, nuclear și citoplasmatic. Morfologic, celulele CD105 pozitive atât din stroma Wharton, cât și stroma vilozităților coriale au caracterizate prin aspectul fusiform. Observații similare sunt raportate și de echipa de cercetători condusă de Conconi M.T. Aceștea au constatat că celulele CD105(+)/CD31(-)/KDR(-) sunt caracterizate printr-o formă alungită și rate înalte de proliferare. Mai mult, Conconi demonstrează că după 16 cicluri de diviziuni mitotice, celulele CD105+ nu prezintă variații în morfologia celulară sau semne de senescență [34].

Creșterea interesului pentru cordonul ombilical ca o sursă alternativă de celule stem se datorează originii embrionare a acestuia, care presupune prezența celulelor fetale caracterizate printr-o rată înaltă de proliferare. În plus, cantitatea de progenitori mezenchimali, care se găsesc în cantități mari în sângele ombilical în primul trimestru al sarcinii, scade semnificativ în ultimele luni ale gestației. Acest aspect sugerează că aceste celule migrează în substanța

gelatinoasă a cordonului ombilical, unde sunt stocate [164]. Prin urmare, identificarea densităților crescute de celule CD105+ în zonele periferică și subamniotică, obținute în cadrul studiului nostru, confirmă această ipoteză. Mai mult, observațiile noastre indică faptul că celulele CD105 pozitive din aceste zone prezintă caracteristici morfologice asemănătoare celulelor mezenchimale.

CD105, cunoscut și sub numele de endoglină, este o glicoproteină membranară de tip I, care funcționează ca un receptor accesoriu pentru liganzii superfamiliei TGF- β [69]. După cum sugerează și numele, endoglina este exprimată de celulele endoteliale vasculare, dar și, de sincițiotrofoblast (în placentă la termen) și mai puțin exprimată în monocite, fibroblaste, condrocite și celulele progenitoare hematopoietice. Endoglina poate fi, de asemenea, implicată în organizarea citoscheletică care afectează morfologia și migrarea celulelor. De asemenea, CD105 poate fi folosit pentru a evalua gradul de activare al celulelor stem mezenchimale. De exemplu, nivelul crescut de expresie a CD105 a fost asociat cu o activare mai mare a celulelor stem în cazul rănilor vasculare. În plus, CD105 poate fi utilizat pentru a urmări și monitoriza evoluția terapiei celulelor stem.

Mecanismul principal prin care celulele stem mezenchimale se fac utile în tratarea diverselor afecțiuni este modularea imunității. Cu toate că modularea imună este o caracteristică importantă pentru celulele stem, funcția lor de reglare a sistemului imun poate varia. Aceste variații sunt dependente de mai mulți factori, precum, populația celulelor stem, care frecvent este heterogenă, de țesuturile donor, cât și de laboratoarele care lucrează cu aceste celule. S-a demonstrat că expresia markerului CD105 poate fluctua semnificativ în culturile celulare și între diferite laboratoare [90, 130].

Prin utilizarea markerului CD105, am reușit să evidențiem faptul că nu toate celulele din cordonul ombilical și țesutul placentar au exprimat CD105. Astfel, diferența în expresia markerului CD105 în toate zonele cordonului ombilical ne-a permis să identificăm două populații celulare: CD105 pozitive și CD105 negative. Într-un studiu realizat de Hieu Pham L. și colab. s-a sugerat că aceste două populații celulare diferite prezintă un potențial similar de diferențiere *in vitro*. Mai mult decât atât, s-a observat că celulele CD105 negative au un potențial mai mare de a modula răspunsul imun în comparație cu celulele CD105 pozitive [83]. Presupunem că, că efectele modulării imune de către celulele stem depind de nivelul de TGF- β 1 produs și secretat în mediul extracelular.

De asemenea, a fost remarcabilă evidențierea unei expresii puternice a markerului CD105 în celulele deciduale și sincițiotrofoblast. Această distribuție diferită a celulelor CD105 în placentă

poate furniza o opțiune viabilă pentru izolarea selectivă a celulelor stem mezenchimale din diverse zone ale placentei.

În prezent, procedura de colectare a sângelui din cordonul ombilical, care conține celule stem hematogene, este bine cunoscută [162]. Cu toate acestea, principalul obstacol în utilizarea mai largă a acestor celule stem hematogene este cantitatea limitată disponibilă a acestora în sângele din cordonul ombilical. Alvarez-Silva și colab. [4] au demonstrat că placenta de șoarece este de câteva ori mai bogată în celule stem hematopoietice decât ficatul. Apariția timpurie a celulelor stem hematopoietice sugerează că placenta este un organ hematopoietic, iar originea cea mai probabilă a acestor celule este mezodermul alantoidei. Descoperirea prezenței celulelor progenitoare hematopoietice în țesutul placentar la șoareci are o importanță majoră pentru medicină. Reieșind din acest aspect, am dorit să studiem existența unor potențiale celule stem hematopoietice și localizarea acestora în țesutul placentar uman și cordonul ombilical [68]. În acest sens am inclus în studiul nostru doi markeri specifici celulelor stem hematopoietice: CD34 și AC133 (CD133).

CD133 reprezintă o proteină transmembranară pentaspan (cu cinci domenii transmembranare și două bucle mari extracelulare) identificată în toate celulele stem hematopoietice umane și celulele neuroepiteliale de la șoareci [136, 199]. CD133 reprezintă unul dintre markerii cheie utilizați pentru izolarea și caracterizarea celulelor stem hematopoietice. Cercetările recente au arătat că, CD133 nu este doar un biomarker, dar este implicat și în creșterea celulară, dezvoltarea și biologia tumorilor.

În cercetarea noastră au fost observate celulele non-endoteliale CD133 pozitive, care preponderent au fost localizate în zona periferică a substanței Wharton. Distribuția acestor celule a avut un caracter omogen. Localizarea periferică, precum și distribuția uniformă, probabil sunt datorate faptului că celulele CD133+ au o rezistență semnificativă la apoptoza indusă de condițiile hipoxice și de ligandul de inducere a apoptozei (TRAIL) legat de TGF- β și TNF, în comparație cu celulele CD133 negative [42, 201]. De asemenea, s-a constatat că populația CD133 pozitivă manifestă o rezistență mai mare la apoptoza indusă de stres [200]. Este important să notăm că, intensitatea de expresie a fost moderată, ceea ce presupune un grad înalt de activitate a acestor celule. În placentă, markerul CD133 a fost exprimat în celulele epiteliului amniotic și celulele stromale din stratul mezenchimal subamniotic, precum și în celulele deciduale. Expresia CD133 în aceste celule a fost variabilă, cu o intensitate moderată și un caracter focal. Conform datelor din literatură, CD133 și alte proteine înrudite din familia prominin sunt distribuite selectiv în protruziile membranei celulare, indiferent de tipul celular.

Cu alte cuvinte, proteina CD133 este direcționată către regiunile apicale ale membranei celulare în celulele epiteliale polarizate [47, 193].

În celulele epiteliale, CD133 este localizat în microvilozități, cili și regiunile centrale ale celulei [37]. S-a observat că această proteină membranară, odată eliberată parțial sau complet din celulele neuroepiteliale, formează structuri veziculoase membranare, care din spațiile extracelulare ajung în lichidul tubului neural [47]. Este important de remarcat că eliberarea acestor exosomi este asociată cu diferențierea celulelor epiteliale [37]. De asemenea, CD133 este o proteină membranară care interacționează cu colesterolul și se face responsabilă pentru formarea extensiilor citoplasmice, precum și pentru interacțiunile intercelulare [36]. Faptul că CD133 inhibă absorbția transferinei și că anticorpul AC133 reglează în jos această absorbție indică, de asemenea, implicarea CD133 în metabolismul celular [21].

Un număr semnificativ de celule care exprimă CD133 au fost, de asemenea, pozitive și pentru CD34. Ca și celulele CD133 pozitive, celulele non-endoteliale CD34+ au fost identificate, preferențial, în cele două zone ale substanței Wharton: periferică și perivasculară. Aceste date reprezintă dovezi ale prezenței mai multor grupuri de celule care exprimă CD34, și care nu sunt asociate cu circulația fetală sau maternă. Rezultate similare privind prezența celulelor stem hematopoietice CD34-pozitive în substanța Wharton au fost raportate și de către Blanco-Elices și colab. Cu toate acestea, conform datelor lor, densitatea maximă a acestor celule pozitive a fost observată în zonele perivascularare și intervasculare [18].

În țesutul placentar, celulele CD34+ au fost observate în vasele placentare din vilozitățile coriale și placa corială. Iar în stroma vilozităților, au fost identificate două populații de celule CD34+ non-endoteliale, caracterizate prin dimensiuni și intensitatea expresiei markerului CD34 diferit.

Mai mult, compararea profilurilor de transcripție între celulele CD34+ și cele CD133+ indică faptul că celulele CD133+ au un număr mai mare de gene activate în comparație cu celulele CD34+. Genele exprimate exclusiv în populațiile de celule CD34+ sau CD133+ sunt asociate cu diverse procese biologice: celulele CD34+ prezintă o supraexprimare a genelor implicate în dezvoltare, în timp ce celulele CD133+ exprimă gene asociate cu arhitectura cromatinică, metabolismul ADN-ului și ciclul celular [117].

Compilarea 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 5.1).

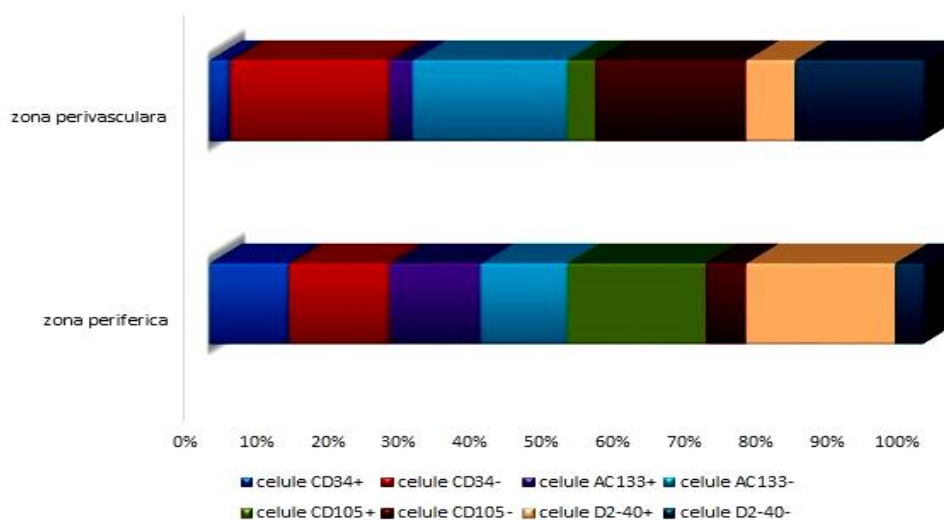


Fig. 5.1. Evidențierea caracterului heterogen al populațiilor celulare stem în zonele periferică și perivasculară a substanței gelatinoase Wharton

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 [66]. De asemenea, s-a observat o expresie moderată a markerului VEGFR-2 în celulele endoteliale și celulele stromale din zona periferică și subamniotică [67]. 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 dihatomic 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 colagen 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 colagenică 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 expresează 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. ABDULRAZZAK, H., MOSCHIDOU, D., JONES, G., GUILLOT, P.V. Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues. *J R Soc Interface*. 2010 Dec 6;7 Suppl 6(Suppl 6):S689-706. doi: 10.1098/rsif.2010.0347.focus.
2. ALAMINOS, M., et al. Transdifferentiation Potentiality of Human Wharton's Jelly Stem Cells towards Vascular Endothelial Cells. *J. Cell. Physiol*. 2010, 223, 640-647.
3. ALBERTI, C. Hollow organ tissue engineering: short updating about current approaches and forecast for major research advances. *G Chir*. 2011 Aug-Sep;32(8-9):345-51.
4. ALVAREZ-SILVA, M., BELO-DIABANGOUAYA, P., SALAUN, J., DIETERLEN-LIEVRE, F. Mouse placenta is a major hematopoietic organ. *Development*. 2003 Nov;130(22):5437-44. doi: 10.1242/dev.00755.
5. AMIEL, G.E., et al. Engineering of blood vessels from acellular collagen matrices coated with human endothelial cells. *Tissue Eng*. 2006 Aug;12(8):2355-65. doi: 10.1089/ten.2006.12.2355.
6. AUGUSTINE, S., et al. Are all stem cells equal? Systematic review, evidence map, and meta-analyses of preclinical stem cell-based therapies for bronchopulmonary dysplasia. *Stem Cells Transl Med*. 2020 Feb;9(2):158-168. doi: 10.1002/sctm.19-0193.
7. BAKHTYAR, N., et al. Acellular Gelatinous Material of Human Umbilical Cord Enhances Wound Healing: A Candidate Remedy for Deficient Wound Healing. *Front Physiol*. 2017. 4;8:200.
8. 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.
9. BARLOW, S., et al. Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2008. 17:1095–107.
10. BARNWAL, M., RATHI, S.K., CHHABRA, S., NANDA, S. Histomorphometry of umbilical cord and its vessels in pre-eclampsia as compared to normal pregnancies. *Nepal J Obstet Gynecol*, 2012, 7(1): 28-31.
11. BASIRI, A., et al. A silk fibroin/decellularized extract of Wharton's jelly hydrogel intended for cartilage tissue engineering. *Prog Biomater*. 2019;8:31-42.
12. BEALL, M.H., ROSS, M.G. Umbilical Cord Complications. *Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2009;24(13): 218-23.

13. BELLINI, C., et al. Are there lymphatic vessels in the placenta? *Lymphology*. 2012 Mar;45(1):34-6.
14. BELTRAMI, A.P., et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003;114:763-76.12.
15. BENIRSCHKE, K., KAUFMANN, P., BAERGEN, R.N. *Pathology of the human placenta*. 5th edition, Springer-Verlag, New York, 2006.
16. BHARTI, D., et al. Comparative analysis of human Wharton's jelly mesenchymal stem cells derived from different parts of the same umbilical cord. *Cell Tissue Res*. 2018 Apr;372(1):51-65. doi: 10.1007/s00441-017-2699-4.
17. BIMPONG, S., STANSIE, A.CH., DJAN ATUAHENE, O. O., TETTEH J. Morphometric characterization of umbilical cord vessels and neonatal outcome. *Int J Anat Res*, 2019;7(1.1):6050-58.
18. BLANCO-ELICES, C., et al. Histological Profiling of the Human Umbilical Cord: A Potential Alternative Cell Source in Tissue Engineering. *J. Pers. Med*. 2022, 12, 648.
19. BLUM, K. M., et al. Tissue engineered vascular grafts transform into autologous neovessels capable of native function and growth. *Commun Med (Lond)*. 2022 Jan 10;2:3. doi: 10.1038/s43856-021-00063-7.
20. 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.
21. BOURSEAU-GUILMAIN, E., GRIVEAU, A., BENOIT, J. P., GARCION, E. The Importance of the Stem Cell Marker Prominin-1/CD133 in the Uptake of Transferrin and in Iron Metabolism in Human Colon Cancer Caco-2 Cells. *PLoS One* 2011, 6(9):e25515.
22. BRANDL, A., et al. Oxidative stress induces senescence in human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*. 2011. 317:1541-7. doi: 10.1016/j.yexcr.2011.02.015.
23. CARRARO, A., et al. In vitro analysis of a hepatic device with intrinsic microvascular-based channels. *Biomed Microdevices*. 2008 Dec;10(6):795-805. doi: 10.1007/s10544-008-9194-3.
24. CARVALHO, J., CARVALHO, P., GOMES, D., DE GOES, A. Innovative Strategies for Tissue Engineering. *Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications*, R. Pignatello Publ., 2013.
25. CASSIDY, J. W. Nanotechnology in the Regeneration of Complex Tissues. *Bone Tissue Regen Insights*. 2014 Nov 12;5:25-35. doi: 10.4137/BTRIS12331.

26. CASTRO, E., TONY PARKS, W., GALAMBOS, C. Neither normal nor diseased placentas contain lymphatic vessels. *Placenta*. 2011, 32, 310–316; Lundell, A. et al. IFN type I and II induce BAFF secretion from human decidual stromal cells. *Sci. Rep.* 2017, 6, <https://doi.org/10.1038/srep39904>.
27. CHANG, J. W., et al. Therapeutic effects of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell transplantation in experimental lupus nephritis. *Cell Transplant*. 2011;20(2):245-57. doi: 10.3727/096368910X520056.
28. CHEN, B., et al. The mechanical properties of amniotic membrane influence its effect as a biomaterial for ocular surface repair. *Soft Matter*. 2012;8(32):8379-8387. doi:10.1039/c2sm26175h.
29. CHIA, W. K., et al. A Review of Placenta and Umbilical Cord-Derived Stem Cells and the Immunomodulatory Basis of Their Therapeutic Potential in Bronchopulmonary Dysplasia. *Front Pediatr*. 2021 Mar 9;9:615508. doi: 10.3389/fped.2021.615508.
30. CHITRA, T., SUSHANTH, Y. S., RAGHAVAN, S. Umbilical coiling index as a marker of perinatal outcome: an analytical study. *Journal of Obstet Gynecol Int*. 2012;21(10): 1155-58.
31. CHUNG, S., KING, M. W. Design concepts and strategies for tissue engineering scaffolds. *Biotechnol Appl Biochem*. 2011 Nov-Dec;58(6):423-38. doi: 10.1002/bab.60.
32. COCHARD, L. R. *Netter's Atlas of Human Embryology*. 1st ed. New Jersey: Icon Learning Systems; 2002.
33. Committee Opinion No. 723: Guidelines for Diagnostic Imaging During Pregnancy and Lactation. *Obstet Gynecol*. 2017 Oct; 130 (4): e210-e216. doi: 10.1097/AOG.0000000000002355.
34. CONCONI, M. T., et al. CD105(+) cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential. *Int J Mol Med*. 2006 Dec;18(6):1089-96.
35. COPLAND, I. B., et al. TGF-beta 3 expression during umbilical cord development and its alteration in pre-eclampsia. *Placenta*. 2002 Apr;23(4):311-21. doi: 10.1053/plac.2001.0778.
36. CORBEIL, D., MARZESCO, A. M., FARGEAS, C. A., HUTTNER, W. B. Prominin-1: a distinct cholesterol-binding membrane protein and the organisation of the apical plasma membrane of epithelial cells. *Subcell Biochem* 2010, 51:399–423.
37. CORBEIL, D., MARZESCO, A. M., WILSCH-BRAUNINGER, M., HUTTNER, W. B. The intriguing links between prominin-1 (CD133), cholesterol-based membrane microdomains, remodeling of apical plasma membrane protrusions, extracellular

- membrane particles, and (neuro)epithelial cell differentiation. *FEBS Lett* 2010, 584(9):1659–1664.
38. CROMI, A., et al. Sonographic atypical vascular coiling of the umbilical cord. *Journal of Prenatal Diagnosis*. 2005;25(1):1-6.
 39. DANIEL, J., ABE, K., McFETRIDGE, P. S. Development of the human umbilical vein scaffold for cardiovascular tissue engineering applications. *ASAIO J*. 2005 May-Jun;51(3):252-61. doi: 10.1097/01.mat.0000160872.41871.7e.
 40. 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.
 41. Di BERNARDO, J., et al. Paracrine regulation of fetal lung morphogenesis using human placenta-derived mesenchymal stromal cells. *J Surg Res*. 2014 Jul;190(1):255-63. doi: 10.1016/j.jss.2014.04.013.
 42. DING, W., et al. CD133+ liver cancer stem cells from methionine adenosyl transferase 1Adeficient mice demonstrate resistance to transforming growth factor (TGF)-beta-induced apoptosis. *Hepatology* 2009, 49(4):1277-1286.
 43. DING, D. C., CHANG, Y. H., SHYU, W. C., LIN, S. Z. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: A New Era for Stem Cell Therapy. *Cell Transplant*. 2015, 24, 339–347;
 44. DOBBS, L. G., WILLIAMS, M. C., GONZALEZ, R. Monoclonal antibodies specific to apical surfaces of rat alveolar type I cells bind to surfaces of cultured, but not freshly isolated, type II cells. *Biochim. Biophys. Acta*. 1998, 970, 146–156.
 45. DOMINICI, M., et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7. doi: 10.1080/14653240600855905.
 46. DOUGHERTY, P. J., et al. PKC activation increases Ca²⁺ sensitivity of permeabilized lymphatic muscle via myosin light chain 20 phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2014. 306:H674–H683.
 47. DUBREUIL, V., et al. Midbody and primary cilium of neural progenitors release extracellular membrane particles enriched in the stem cell marker prominin-1. *J Cell Biol* 2007, 176(4):483–495.

48. DVORNIC, D., BOTEZATU, V., BORȘ, A. Aspecte ale ingineriei tisulare vasculare în practica medicală. In: *Analele Științifice ale USMF „N. Testemițanu”*, 2013, nr. 4(14), pp. 24-31. ISSN 1857-1719.
49. ERICES, A., CONGET, P., MINGUELL, J. J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol.* 2000;109:235–42.
50. FAHMY, M. Anatomy of the Umbilical Cord. In: *Umbilicus and Umbilical Cord.* Springer, Cham. 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-319-62383-2_11.
51. FALANGA, V., et al. Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. *Tissue Eng.* 2007;13:1299–1312.
52. FARAHANY, N. A., et al. The ethics of experimenting with human brain tissue. *Nature.* 2018. 556 (7702): 429–32.
53. FENG, D., et al. Ultrastructural localization of the vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) receptor-2 (FLK-1, KDR) in normal mouse kidney and in the hyperpermeable vessels induced by VPF/VEGF-expressing tumors and adenoviral vectors. *J Histochem Cytochem*, 2000, 48(4):545–556.
54. 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.
55. FLYNN, L., SEMPLE, J. L., WOODHOUSE, K. A. Decellularized placental matrices for adipose tissue engineering. *J Biomed Mater Res A.* 2006 Nov;79(2):359-69. doi: 10.1002/jbm.a.30762.
56. FORTUNATO, S. J., MENON, R., LOMBARDI, S. J. Interleukin-10 and transforming growth factor inhibit amniochorion tumor necrosis factor- α production by contrasting mechanisms of action: therapeutic implications in prematurity. *Am J Obst Gynecol.* 1997;177(4):803-809. doi: 10.1016/s0002-9378(97)70272-2.
57. FORTUNATO, S. J., MENON, R., LOMBARDI, S. J. The effect of transforming growth factor and interleukin-10 on interleukin-8 release by human amniochorion may regulate histologic chorioamnionitis. *Am J Obst Gynecol.* 1998;179(3 Pt 1):794-799. doi: 10.1016/s0002-9378(98)70085-7.
58. FRANCO, S., et al. Microfibrillar composition of umbilical cord matrix: characterization of fibrillin, collagen VI and intact collagen V. *Placenta.* 1998 Jan;19(1):95-104. doi: 10.1016/s0143-4004(98)90104-7.

59. FRIEL, N. A., et al. Amniotic fluid, cells, and membrane application. *Oper Tech Sports Med.* 2017;25(1):20-24. <https://doi.org/10.1053/J.OTSM.2016.12.004>.
60. FRITZELL, J. A., et al. Fate and effects of adult bone marrow cells in lungs of normoxic and hyperoxic newborn mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009, 40:575–87. doi: 10.1165/rcmb.2008-0176OC;
61. FUKUDA, K., CHIKAMA, T., NAKAMURA, M., NISHIDA, T. Differential distribution of sub-chains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea and conjunctiva. *Cornea.* 1999; 18(1):73-9.
62. FUKUNAGA, M. Expression of D2-40 in lymphatic endothelium of normal tissues and in vascular tumours. *Histopathology,* 2005;46:396-402.
63. GANGULY, P., et al. The analysis of in vivo aging in human bone marrow mesenchymal stromal cells using colony-forming unit-fibroblast assay and the CD45^{low} CD271⁺ phenotype. *Stem Cells Int.* 2019. 2019:5197983. doi: 10.1155/2019/5197983;
64. GARZÓN, I., et al. Expression of Epithelial Markers by Human Umbilical Cord Stem Cells. A Topographical Analysis. *Placenta* 2014, 35, 994–1000.
65. GEBRANE-YOUNES, J., MINH, H. N., ORCEL, L. Ultrastructure of human umbilical vessels: a possible role in amniotic fluid formation? *Placenta.* 1986;7:173–85.
66. **GLOBA, L.,** NACU, V. Caracteristica imunohistochimică a celulelor stem mezenchimale din complexul ombilicoplacentar [The immunohistochemical characteristics of the mesenchymal stem cells of the umbilicoplacentar complex]. *Archives of the Balkan Medical Union.* 2017;52(1Supl 1):195-97. Romanian.
67. **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.
68. **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.
69. **GLOBA, L.** Endoglin (CD105) expression by mesenchymal stem cells from human placenta and umbilical cord . In: *Revista de Științe ale Sănătății din Moldova,* 2022, nr. 3 An.1(29), p. 9. ISSN 2345-1467.
70. **GLOBA, L.** Morfologia microscopică a vaselor ombilicale umane. *Probleme actuale ale morfologiei: Materialele Conferinței științifice internaționale,* Chisinau, Moldova, 2020. pp. 58-62. ISBN: 978-9975-57-281-1.

71. GONZALEZ, R., et al. An efficient approach to isolation and characterization of pre- and postnatal umbilical cord lining stem cells for clinical applications. *Cell Transplant.* 2010, 19, 1439–1449.
72. GORDON, Z., et al. Anthropometry of fetal vasculature in the chorionic plate. *J Anat.* 2007;211(6):698–706.
73. GOWORKA, E. *Placenta Cheloweka.* (Russian). Warsaw: Polskoje Gosoudarstwenoje Medicinskoje Isdatelstwo. 1970, 470 pp.
74. 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.
75. GU, B., et al. Expression of lymphatic vascular endothelial hyaluronan receptor-1 (LYVE-1) in the human placenta. *Lymphat Res Biol.* 2006 Spring;4(1):11-7. doi: 10.1089/lrb.2006.4.11.
76. GUI, L., et al. Development of decellularized human umbilical arteries as small-diameter vascular grafts. *Tissue Eng Part A.* 2009;15:2665–76.
77. GUPTA, S. GUPTA, R. Placental Tissues- From Reproductive to Regenerative Biology. *Int. J. Sci. Res. IJSR*, vol. 3, pp. 607–612, 2014.
78. GUTTMACHER, A. E., MADDOX, Y. T., SPONG, C. Y. The Human Placenta Project: placental structure, development, and function in real time. *Placenta.* 2014 May;35(5):303-4. doi: 10.1016/j.placenta.2014.02.012.
79. HALLER, M. J., et al. Autologous umbilical cord blood transfusion for type 1 diabetes. *Experimental Hematology.* 2008;36:710–715.
80. HEAZELL, A. E., et al. A case of intrauterine growth restriction in association with placental mesenchymal dysplasia with abnormal placental lymphatic development. *Placenta.* 2009, 30, 654–657.
81. HEIL, J. R., BORDONI, B. Embryology, Umbilical Cord. [Updated 2023 Apr 17]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557490>.
82. HERENDAEL, B. J., OBERTI, C., BROSENS, I. Microanatomy of the human amniotic membranes. A light microscopic, transmission, and scanning electron microscopic study. *Am J Obstet Gynecol.* 1978 Aug 15;131(8):872-80. doi: 10.1016/s0002-9378(16)33135-0.
83. HIEU PHAM, L., BICH, V. U. N., VAN PHAM, P. The subpopulation of CD105 negative mesenchymal stem cells show strong immunomodulation capacity compared to CD105 positive mesenchymal stem cells. *Biomed. Res. Ther.;*2019, 6(4):3131-3140.

84. HIGA, K., SHIMMURA, S., SHIMAZAKI, J., TSUBOTA, K. Hyaluronic acid-CD44 interaction mediates the adhesion of lymphocytes by amniotic membrane stroma. *Cornea*. 2005;24(2):206-212. doi: 10.1097/01.ico.0000133999.45262.83.
85. HUCKLE, W. Molecular Biology of Placental Development and Disease. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 2017.
86. HUPPERTZ, B. The anatomy of the normal placenta. *J Clin Pathol*. 2008 61(12), 1296–1302. doi:10.1136/jcp.2008.055277.
87. HWANG, J. H., et al. Comparison of cytokine expression in mesenchymal stem cells from human placenta, cord blood, and bone marrow. *J Korean Med Sci*. 2009;24(4):547-54. doi: 10.3346/jkms.2009.24.4.547.
88. IGNATOV, O., et al. Could human amniotic membrane be a source for acupoint thread embedding therapy? *Moldovan Medical Journal*. December 2021;64(6):41-48.
89. 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.
90. IZGI, K., SONMEZ, M. F., CANATAN, H., ISKENDER, B. Long Term Exposure to Myrtucommulone-A Changes CD105 Expression and Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng Regen Med*. 2017;14(2):113–21. 30603468. doi:10.1007/s13770-016-0020-3.
91. CHOI, J. S., KIM, J. D., YOON, H. S., CHO, Y. W. Full-thickness skin wound healing using human placenta-derived extracellular matrix containing bioactive molecules. *Tissue Eng Part A*. 2013 Feb;19(3-4):329-39. doi: 10.1089/ten.TEA.2011.0738.
92. JIAN, M., COBZAC, V. Purification of collagen from human umbilical-placental complex for bioengineering use. In *MedEspera: International Medical Congress for Students and Young Doctors*, Ed. 9th edition, 12-14 mai 2022, Chişinău. Chisinau, Republic of Moldova: 2022, 9, p. 436. ISBN 978-9975-3544-2-4.
93. JIN, E., KIM, T. H., HAN, S., KIM, S. W. Amniotic epithelial cells promote wound healing in mice through high epithelialization and engraftment. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015;10(7):613-622. doi: 10.1002/term.2069.
94. JIN, H. J., et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. *Int J Mol Sci*. 2013.14:17986–8001. doi: 10.3390/ijms140917986.

95. JIRSOVA, K., JONES, GLA. Amniotic membrane in ophthalmology: properties, preparation, storage and indications for grafting – a review. *Cell Tissue Bank*. 2017;18(2):193-204. <https://doi.org/10.1007/s10561-017-9618-5>.
96. KAKABADZE, A., et al. Anatomical Justification for the Use of Human Placenta as a Host for in Vivo Cell and Tissue Transplantation. *Asian Journal of Pharmacy, Nursing and Medical Sciences*, 2015, p. 31-34, Vol 2. ISSN: 2321–3639.
97. KALASZCZYNSKA, I., FERDYN, K. Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells: future of regenerative medicine? Recent findings and clinical significance. *Biomed Res Int*. 2015;2015:430847. doi: 10.1155/2015/430847.
98. KANG, J. W., et al. Immunomodulatory effects of human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells. *J Vet Sci*.2012;13(1):23-31. doi: 10.4142/jvs.2012.13.1.23.
99. KARLSSON, H., et al. Stromal cells from term fetal membrane are highly suppressive in allogeneic settings in vitro. *Clin Exp Immunol*. 2012. 167:543–55. doi: 10.1111/j.1365-2249.2011.04540.x.
100. KASAHARA, H., et al. Characterization of homo- and heterodimerization of cardiac Csx/Nkx2.5 homeoprotein. *J Biol Chem*. 2001;276(7):4570-4580. doi: 10.1074/jbc.M004995200.
101. KASSEM, D. H., KAMAL, M. M. Therapeutic Efficacy of Umbilical Cord-Derived Stem Cells for Diabetes Mellitus: A Meta-Analysis Study. *Stem Cell Res Ther*. 2020 Nov 16;11(1):484. doi: 10.1186/s13287-020-01996-x.
102. KAUFMANN, P., BLACK, S., HUPPERTZ, B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod* 2003;69:1–7.
103. KAUFMANN, P., STARK, J., STEGNER, H. E. The villous stroma of the human placenta. *Cell Tissue Res* 1977;177:105-21.
104. KETCHEDJIAN, A., et al. Recellularization of decellularized allograft scaffolds in ovine great vessel reconstructions. *Ann Thorac Surg*. 2005 Mar;79(3):888-96; discussion 896. doi: 10.1016/j.athoracsur.2004.09.033.
105. KIM, J., et al. Ex vivo characteristics of human amniotic membrane-derived stem cells. *Cloning Stem Cells*. 2007;9(4):581-594. doi: 10.1089/clo.2007.0027.
106. 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.

107. KING, B. Related distribution and characterization of anionic sites in the basal lamina of developing human amniotic epithelium. *Anat Rec.*1985;212(1):57-62. doi: 10.1002/ar.1092120108.;
108. KOBAYASHI, K., KUBOTA, T., ASO, T. Study on myofibroblast differentiation in the stromal cells of Wharton's jelly. Expression and localization of α -smooth muscle actin. *Early Hum. Dev.* 1998, 51, 223–233.
109. KORHONEN, M., VIRTANEN, I. Immunohistochemical localization of laminin and fibronectin isoforms in human placental villi. *J Histochem Cytochem* 2001;49: 313-22.
110. KOYANO, S., et al. Synthesis and release of activin and noggin by cultured human amniotic epithelial cells. *Dev Growth Differ.* 2002;44(2):103-112. doi: 10.1046/j.1440-169x.2002.00626.x.;
111. KRISHNAN, H. et al. Podoplanin - an emerging cancer biomarker and therapeutic target. *Cancer. Sci.* 2018, 109, 1292–1299.
112. KRISHNAN, H., MILLER, W. T., BLANCO, F. J., GOLDBERG, G. S. Src and podoplanin forge a path to destruction. *Drug Discov Today.* 2019; 24(1):241-249. doi: 10.1016/j.drudis.2018.07.009.
113. KUBO, M., et al. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(7):1539-1546.
114. EL BARKY, A. R., ALI, E. M. M., MOHAMED, T. M. Stem Cells, Classifications and their Clinical Applications. *Am J Pharmacol Ther.* 2017;1(1): 001-007.
115. LANGER, R., VACANTI, J. Advances in tissue engineering. *J Pediatr Surg.* 2016 Jan;51(1):8-12. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2015.10.022.
116. LEE, B. S., et al. Primo vascular system in human umbilical cord and placenta. *J Acupunct Meridian Stud.* 2014 Dec;7(6):291-7. doi: 10.1016/j.jams.2014.09.002.
117. LI, Z. CD133: a stem cell biomarker and beyond. *Exp Hematol Oncol.* 2013 Jul 1;2(1):17. doi: 10.1186/2162-3619-2-17.
118. LIAU, L.L., RUSZYMAH, B. H. I., NG, M. H., LAW, J. X. Characteristics and clinical applications of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells. *Curr Res Transl Med.* 2020 Jan;68(1):5-16. doi: 10.1016/j.retram.2019.09.001.
119. LO, B., PARHAM, L. Ethical issues in stem cell research. *Endocr Rev.* 2009.30:204–13. doi: 10.1210/er.2008-0031.
120. LOBERT, V. H., et al. Ubiquitination of alpha 5 beta 1 integrin controls fibroblast migration through lysosomal degradation of fibronectin-integrin complexes. *Dev Cell.* 2010;19(1):148-159. doi: 10.1016/j.devcel.2010.06.010.

121. LOWE, K. L., et al. Podoplanin and CLEC-2 drive cerebrovascular patterning and integrity during development. *Blood*. 2015, 125,3769–3777.
122. LU, L. L., et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica*. 2006. 91:1017–26.
123. LUNDELL, A. et al. IFN type I and II induce BAFF secretion from human decidual stromal cells. *Sci. Rep.* 2017, 6, <https://doi.org/10.1038/srep39904>.
124. MALCOVA, T., BALUTEL, T., COCIUG, A., POPESCU, V. Tissue engineered vascular grafts: decellularization of porcine aorta through three different methods. In: *MedEspera: International Medical Congress for Students and Young Doctors*, Ed. 8th edition, 24-26 septembrie 2020, Chişinău. Chisinau, Republic of Moldova: 2020, 8, p. 101. ISBN 978-9975-151-11-5.
125. MALHOTRA, C., JAIN, A. K. Human amniotic membrane transplantation: different modalities of its use in ophthalmology. *World J Transplant*. 2014;24(2):111-121. doi:10.5500/wjt.v4.i2.111.
126. MALLIS, P., et al. Evaluation of decellularization in umbilical cord artery. *Transplant Proc*. 2014;46:3232–9.
127. MALLIS, P., et al. Vitrified Human Umbilical Arteries as Potential Grafts for Vascular Tissue Engineering. *Tissue Eng Regen Med*. 2020 Jun;17(3):285-299. doi: 10.1007/s13770-020-00243-x.
128. MAMEDE, A. C., BOTELHO, M. F. Amniotic membrane: origin, characterization and medical applications. New York, NY: Springer; 2015. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-9975-1>.
129. MARCUS, A., WOODBURY, D. Fetal stem cells from extraembryonic tissues: donot discard. *J. Cell. Mol. Med.* 2008, 12, 730–742.
130. MARK, P., et al. Human Mesenchymal Stem Cells Display Reduced Expression of CD105 after Culture in Serum-Free Medium. *Stem Cells Int*. 2013;2013:698076. doi: 10.1155/2013/698076.
131. MARONGIU, F., et al. Isolation of amniotic mesenchymal stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2010;Chapter 1, Unit 1E 5. doi:10.1002/9780470151808.sc01e05s12.
132. MARTIN, N. D., et al. J. In vivo behavior of decellularized vein allograft. *J Surg Res*. 2005 Nov;129(1):17-23. doi: 10.1016/j.jss.2005.06.037.

133. MAZURU, et al. Podoplanina – factor molecular diagnostic și predictiv în carcinoamele mamare invazive și în alte neoplazii umane solide. In: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale, 2015, nr. 1(46), pp. 30-34. ISSN 1857-0011.
134. McELREAVEY, K .D., et al. Isolation, culture, and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton’s Jelly portion of human umbilical cord. *Biochem Soc Trans.* 1991 Feb;19(1):29S. doi: 10.1042/bst019029s.
135. MIKI, T., et al. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells.* 2005 Nov-Dec;23(10):1549-59. doi: 10.1634/stemcells.2004-0357.
136. MIRAGLIA, S., et al. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 1997, 90(12):5013–5021.
137. MITCHELL, K. E., et al. Matrix cells from Wharton’s jelly form neurons and glia. *Stem Cells.* 2003;21:50–60.
138. MIZOGUCHI, M., et al. Organotypic culture and surface plantation using umbilical cord epithelial cells: Morphogenesis and expression of differentiation markers mimicking cutaneous epidermis. *J Dermatol Sci* 2004;35:199 –206.
139. MIZOGUCHI, M., IKEDA, S., SUGA, Y., OGAWA, H. Expression of cytokeratins and cornified cell envelope-associated proteins in umbilical cord epithelium: A comparative study of the umbilical cord, amniotic epithelia, and fetal skin. *J Invest Dermatol.* 2000 Jul;115(1):133-4. doi: 10.1046/j.1523-1747.2000.00031-4.x.
140. MOORE, K. L, PERSAUD, T. V. N., TORCHIA, M. G. Fetal membranes. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology with Student Consult Online.* 9th ed. Lippincott Williams & Wilinks. Canada. 2011;125-131.
141. MORIGI, M., et al. Human bone marrow mesenchymal stem 48 cells accelerate recovery of acute renal injury and prolong survival in mice. *Stem Cells.* 2008;26:2075–2082.
142. NACU, V. Optimizarea regenerării osoase post traumatide dereglate. Chisinau, 2010 p.63-71.
143. NANAEV, 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.
144. NANDADASA, S., et al. Vascular dimorphism ensured by regulated proteoglycan dynamics favors rapid umbilical artery closure at birth. *Elife.* 2020 Sep 10;9:e60683. doi: 10.7554/eLife.60683.
145. NIKNEJAD, H., et al. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cells Mater.* 2008;15:88-99. <https://doi.org/10.22203/ecm.v015a07>.

146. OKAZAKI, T., et al. Initiation of human parturition. XII. Biosynthesis and metabolism of prostaglandins in human fetal membranes and uterine decidua. *Am J Obstet Gynecol.* 1981;139(4)373-381.
147. ONAK KANDEMIR, N., et al. Biological importance of podoplanin expression in chorionic villous stromal cells and its relationship to placental pathologies. *Scientific Reports*, 2019, 9(1). doi:10.1038/s41598-019-50652-9.
148. ORLIC, D., et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001;410:701–5.
149. ORTIZ, L. A., et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:8407–8411.
150. OZBILGIN, K. et al. The expression of Forkhead transcription factors in decidua and placenta in patients with missed abortion. *Clin.Exp. Obstet. Gynecol.* 2015, 42510–514.
151. PANEPUCCI, R. A., et al. Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2004;22:1263–78.
152. PAPPA, K., ANAGNOU, N. Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum? *Regen Med.* 2009;4(3):423-433. doi: 10.2217/rme.09.12.
153. PAROLINI, O., SONCINI, M., EVANGELISTA, M., SCHMIDT, D. Amniotic membrane and amniotic fluid-derived cells: potential tools for regenerative medicine? *Regen Med.* 2009;4(2):275-291. doi: 10.2217/17460751.4.2.275.
154. PAROLINI, O., et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international workshop on placenta derived stem cells. *Stem Cells.* 2008;26(2):300–11.
155. PASHNEH-TALA, S., MACNEIL, S., CLAEYSSSENS, F. The Tissue-Engineered Vascular Graft-Past, Present, and Future. *Tissue Eng Part B Rev.* 2016 Feb;22(1):68-100. doi: 10.1089/ten.teb.2015.0100.
156. 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.
157. QIAN, H., et al. Bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate rat acute renal failure by differentiation into renal tubular epithelial-like cells. *Int J Mol Med.* 2008;22:325–332.
158. QUINTANILLA, M., MONTERO-MONTERO, L., RENART, J., MARTIN-VILLAR, E. Podoplanin in Inflammation and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 6, <https://doi.org/10.3390/ijms20030707>.

159. RAJASEKHARAN, S., et al. To estimate the importance of Wharton's jelly in the growth of the foetus – a light microscopic study. *J Evolution Med Dent Sci.* 2021;10(35):3024-3029, doi: 10.14260/jemds/2021/617.
160. RANA, P., RAZDAN, S. K., KUMAR, S. Morphometric study of human placenta and an insight into its vascular pattern by corrosion cast technique. *Indian J Clin Anat Physiol* 2021;8(2):123-129.
161. REVENCU, T., TRIFAN, V., NACU, L., GUTIU, T., **GLOBA, L.**, et al. Collection, isolation and characterization of the stem cells of umbilical cord blood. In: *Romanian Journal of Morphology and Embryology (ISO4)*, 2013, 54 (2): 291–297, ISSN 1220-0522 (print), ISSN 2066-8279 (online), Craiova, Romania.
162. REVENCU, T., et al. The influence of certain obstetric factors on the collection, isolation and quality of cord blood units. In: *ICNBME-2013: 2nd International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering*; 2013 Apr 18-20; Chişinău, Moldova: Proceedings. Chisinau; 2013. p. 539-544.
163. REYNOLDS, L.P., et al. Uteroplacental vascular development and placental function: an update. *Int J Dev Biol.* 2010;54(2-3):355-66. doi: 10.1387/ijdb.082799lr.
164. ROMANOV, Y. A., SVINTSITSKAYA, V. A., SMIRNOV, V. N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells*, 2003, 21: 105-110.
165. ROUBELAKIS, M. G., TROHATOU, O., ANAGNOU, N. P. Amniotic fluid and amniotic membrane stem cells: marker discovery. *Stem Cells Int.*2012;2012:107836. doi: 10.1155/2012/107836.
166. RYYNÄNEN, J., et al. Type VII collagen gene expression in human umbilical tissue and cells. *Lab Invest.* 1993 Sep;69(3):300-4.
167. SAKURAGAWA, N., et al. Human amnion mesenchyme cells express phenotypes of neuroglial progenitor cells. *J Neurosci Res.* 2004;78(2):208–14.
168. SANBERG, P. R., et al. Umbilical cord blood-derived stem cells and brain repair. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1049:67–83.
169. SANMANO, B., et al. Engraftment of umbilical cord epithelial cells in athymic mice: In an attempt to improve reconstructed skin equivalents used as epithelial composite. *J Dermatol Sci* 2005;37:29–39.
170. SEMENOVA, E., et al. Mesenchymal Stromal Cells from Different Parts of Umbilical Cord: Approach to Comparison & Characteristics. *Stem Cell Rev. Rep.* 2021, 17, 1780–1795.

171. SILINI, A. R., et al. The long path of human placenta, and its derivatives, in regenerative medicine. *Front Bioeng Biotechnol.* 2015 Oct 19;3:162. doi: 10.3389/fbioe.2015.00162.
172. SILINI, A. R., et al. Perinatal Derivatives: Where Do We Stand? A Roadmap of the Human Placenta and Consensus for Tissue and Cell Nomenclature. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020, 8, 610544.
173. SOBOLEWSKI, K., BAŃKOWSKI, E., CHYCZEWSKI, L., JAWORSKI, S. Collagen and glycosaminoglycans of Wharton's jelly. *Biol Neonate.* 1997; 71(1):11-21. doi: 10.1159/000244392.
174. 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.
175. STEFANSKA, K., et al. Human Wharton's Jelly- cellular specificity, stemness potency, animal models and current application in human clinical trials. *J Clin Med.* 2020;9(4):1102.
176. StKULKARNI M. L., et al. Absence of Wharton's jelly around the umbilical arteries. *Indian J. Pediatrics.* 2007;74:787–789. doi: 10.1007/s12098-007-0142-7.
177. SUBRAMANIAN, A., FONG, C. Y., BISWAS, A., BONGSO, A. Comparative Characterization of Cells from the Various Compartments of the Human Umbilical Cord Shows That the Wharton's Jelly Compartment Provides the Best Source of Clinically Utilizable Mesenchymal Stem Cells. *PLoS ONE* 2015, 10, e0127992.
178. TAKAHASHI, K., et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007,131 (5): 861–872. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019.
179. 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.
180. THOMSON, J. A., et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998, 282:1145–7. doi: 10.1126/science.282.5391.1145.
181. TIAN, Z. F., et al. Intravenous infusion of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorates hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2007, 27:1692–5.
182. UBERTI, M. G., et al. Amnion-derived cellular cytokine solution (ACCS) promotes migration of keratinocytes and fibroblasts. *Ann Plast Surg.* 2010;64(5):632-635. doi: 10.1097/SAP.0b013e3181c39351.

183. UGORSKI, M., DZIEGIEL, P., SUCHANSKI, J. Podoplanin - a small glycoprotein with many faces. *Am J Cancer Res.* 2016 Jan 15;6(2):370-86.
184. UYGUN, B., YARMUSH, M., UYGUN, K. Application of whole-organ tissue engineering in hepatology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012 Dec;9(12):738-44. doi: 10.1038/nrgastro.2012.140.
185. VANOVER, M., WANG, A., FARMER, D. Potential clinical applications of placental stem cells for use in fetal therapy of birth defects. *Placenta.* 2017.59:107–12. doi: 10.1016/j.placenta.2017.05.010.
186. VELARDE, F., et al. Use of Human Umbilical Cord and Its Byproducts in Tissue Regeneration. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020 Mar 10;8:117. doi: 10.3389/fbioe.2020.00117.
187. 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.
188. VOLAREVIC, V., et al. Ethical and safety issues of stem cell-based therapy. *Int J Med Sci.* (2018) 15:36–45. doi: 10.7150/ijms.21666.
189. VOLCHEK, M., et al. Lymphatics in the human endometrium disappear during decidualization. *Hum Reprod.* 2010 Oct;25(10):2455-64. doi: 10.1093/humrep/deq224.
190. WANG, Q., et al. Single-cell transcriptome profiling reveals molecular heterogeneity in human umbilical cord tissue and culture-expanded mesenchymal stem cells. *FEBS J.* 2021 Sep;288(18):5311-5330. doi: 10.1111/febs.15834.
191. WANG, X. Y., et al. Identification of mesenchymal stem cells in aorta-gonad-mesonephros and yolk sac of human embryos. *Blood.* 2008 Feb 15;111(4):2436-43. doi: 10.1182/blood-2007-07-099333.
192. WANG, Y., et al. D2-40/podoplanin expression in the human placenta. *Placenta.* 2011 Jan;32(1):27-32. doi: 10.1016/j.placenta.2010.10.014.
193. WEIGMANN, A., CORBEIL, D., HELLWIG, A., HUTTNER, W. B. Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:12425–30.
194. WEISS, M. L., et al. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells.* 2006;24:781–792.
195. WILKE, D. J., DENIER, J. P., KHONG, T. Y., MATTNER, T. W. Pressure and flow in the umbilical cord. *J Biomech.* 2018 Oct 5;79:78-87. doi: 10.1016/j.jbiomech.2018.07.044.

196. WOLF, H., SCHMIDT, W., DRENCKHAHN, D. Immunocytochemical analysis of the cytoskeleton of the human amniotic epithelium. *Cell Tissue Res.* 1991;266(2):385-389. doi: 10.1007/BF00318194.
197. XIAO, T., et al. Fabrication and in vitro study of tissue-engineered cartilage scaffold derived from wharton's jelly extracellular matrix. *BioMed Res Int.* 2017;2017:5839071.
198. YAMASATO, K., ZALUD, I. Three dimensional power Doppler of the placenta and its clinical applications. *J Perinat Med.* 2017 Aug 28;45(6):693-700. doi: 10.1515/jpm-2016-0366.
199. YIN, A. H., et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997, 90(12):5002–5012.
200. ZOBALOVA, R., et al. The potential role of CD133 in immune surveillance and apoptosis: a mitochondrial connection? *Antioxid Redox Signal.* 2011 Dec 15;15(12):2989-3002. doi: 10.1089/ars.2010.3785.
201. ZOBALOVA, R., et al. Cancer cells with high expression of CD133 exert FLIP upregulation and resistance to TRAIL-induced apoptosis. *Biofactors.* 2008;34(3):231-5. doi: 10.3233/BIO-2009-1076.
202. ZOMER, H. D., VIDANE, A. S., GONÇALVES, N. N., AMBRÓSIO, C. E. Mesenchymal and induced pluripotent stem cells: general insights and clinical perspectives. *Stem Cells Cloning.* 2015 Sep 28;8:125-34. doi: 10.2147/SCCAA.S88036.
203. KASITEROPOULOU, D., TOPALIDOU, A., DOWNE, S. A Computational Fluid Dynamics Modelling of Maternal-Fetal Heat Exchange and Blood Flow in the Umbilical Cord. *PLoS ONE* 2020, 15, e0231997.
204. Ingineria țesuturilor - Tissue engineering Ingineria țesuturilor - https://ro.abcdef.wiki/wiki/Tissue_engineering (vizitat 15.05.2023).





Republica Moldova
Ministerul Sănătății

CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. **6012**

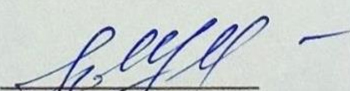
Pentru inovația cu titlul
**EVALUAREA CELULELOR STEM
MEZENCHIMALE DIN COMPLEXUL
OMBILICO-PLACENTAR PRIN UTILIZAREA
IMUNOCOLORĂRII ANTI-CD105**

Inovația a fost înregistrată pe data de
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autor(i)
**GLOBĂ Lilian, PELIN Elina,
GLOBĂ Pavel, DAVID Valeriu,
GLOBĂ Tatiana**



Data eliberării **31 Martie 2023**


(Semnătura autorizată)





Republica Moldova
Ministerul Sănătății,
Muncii și Protecției Sociale

CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 5754

Pentru inovația cu titlul
**UTILIZAREA IMUNOCOLORĂRII ANTI-S100
PENTRU EVIDENȚIEREA CELULELOR DENDRITE
- UN NOU MARKER DE PROGNOSTIC ÎN
LEZIUNILE PROLIFERATIVE**

Inovația a fost înregistrată pe data de **17 martie 2020**
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autor(i)

**GLOBA Tatiana,
PELIN Elina, GLOBA Lilian, DAVID Valeriu**



7 martie 2020

(Semnatura autorizată)



Republica Moldova
Ministerul Sănătății,
Muncii și Protecției Sociale

CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 5745

Pentru inovația cu titlul
**UTILIZAREA IMUNOCOLORĂRII
ANTI-CD68 DREPT CRITERIU DE
PRONOSTIC ÎN LEZIUNILE
PROLIFERATIVE DE PROSTATĂ**

Inovația a fost înregistrată pe data de **02 martie 2020**
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
"Nicolae Testemițanu"

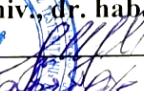
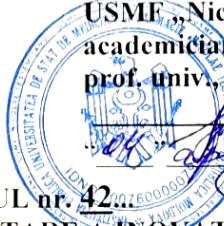
Se recunoaște calitatea de autor(i)

**GLOBA Tatiana,
PELIN Elina, GLOBA Lilian, DAVID Valeriu**



02 martie 2020

(Semnătura autorizată)

	<p>USMF „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova Institutul Național de Cercetare în Medicină și Sănătate</p>	<p>Pag. 1/ 1</p>												
<p style="text-align: center;">APROB</p> <p style="text-align: center;">Prorector pentru activitate de cercetare, USMF „Nicolae Testemițanu” din RM academician al AȘM, prof. univ., dr. hab. șt. med. —  Stanislav GROPPA 2023</p> <p style="text-align: center;"> ACTUL nr. 42 DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI (în procesul științifico-practic)</p> <ol style="list-style-type: none">Denumirea ofertei pentru implementare: „<i>Evaluarea celulelor stem mezenchimale din complexul ombilico-placentar prin utilizarea imunocolorării anti-CD105</i>”.Autorii: GLOBA L., asist. univ.; PELIN E., dr. șt. med., conf. univ.; GLOBA P., dr. șt. chim., conf. univ.; DAVID V., dr. șt. med., conf. univ.; GLOBA T., dr. șt. med., asist. univ.Numărul inovației: Nr.6012 din.31 martie 2023.Unde și când a fost implementată: rezultatele au fost implementate în Laboratorul de inginerie tisulară și culturi celulare și Laboratorul de morfologie a USMF “Nicolae Testemițanu”, semestrul IV anul 2022- 2023.Eficacitatea implementării: Metoda propusă este accesibilă tehnic și argumentată cu efect important asupra identificării și caracterizării celulelor stem mezenchimale nu doar din țesuturile placentare și a cordonului ombilical. CD105 este un marker de suprafață specific pentru celulele endoteliale și celulele stem vasculare, fiind implicat în angiogeneză și remodelarea vasculară. Această metodă poate fi utilizată pentru identificarea și izolarea celulelor stem, precum și pentru explorarea potențialului terapeutic al acestora în medicina regenerativă și în tratamentul diferitelor afecțiuni.Rezultatele: Rezultatele expuse în această propunere sunt bazate pe probele tisulare prelevate din cordonale ombilicale și țesuturile placentare colectate de la pacientele internate în IMSP după naștere, perioada de gestație de la 36 la 40 săptămâni, pe parcursul perioadei anului 2019. Materialul de studiu a fost cercetat histologic și imunohistochimic. Propunerea este utilă pentru identificarea celulelor stem vasculare atât din țesuturile normale, cât și tumorale, ceea ce va permite dezvoltarea a noi metode de tratament. <p>Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere</p> <table><tr><td data-bbox="355 1639 691 1711">Șef Departament Cercetare, conf. univ., dr. hab. șt. med.</td><td data-bbox="901 1624 1045 1736"></td><td data-bbox="1054 1677 1302 1709">Elena RAEVSCHI</td></tr><tr><td data-bbox="351 1733 973 1807">Șef Laborator de inginerie tisulară și culturi celulare prof. univ., dr. hab. șt. med.</td><td data-bbox="845 1758 957 1825"></td><td data-bbox="1054 1774 1238 1805">Viorel NACU</td></tr><tr><td data-bbox="351 1836 695 1910">Șef Laborator de morfologie conf. univ., dr. șt. med.</td><td data-bbox="798 1814 925 1937"></td><td data-bbox="1054 1877 1265 1910">Valeriu DAVID</td></tr><tr><td data-bbox="351 1944 521 1975">COORDONAT:</td><td data-bbox="694 1926 853 1982"></td><td data-bbox="1054 1944 1249 1977">Eugenia GROZA</td></tr></table>			Șef Departament Cercetare, conf. univ., dr. hab. șt. med.		Elena RAEVSCHI	Șef Laborator de inginerie tisulară și culturi celulare prof. univ., dr. hab. șt. med.		Viorel NACU	Șef Laborator de morfologie conf. univ., dr. șt. med.		Valeriu DAVID	COORDONAT:		Eugenia GROZA
Șef Departament Cercetare, conf. univ., dr. hab. șt. med.		Elena RAEVSCHI												
Șef Laborator de inginerie tisulară și culturi celulare prof. univ., dr. hab. șt. med.		Viorel NACU												
Șef Laborator de morfologie conf. univ., dr. șt. med.		Valeriu DAVID												
COORDONAT:		Eugenia GROZA												



APROB

Prorector pentru activitate de cercetare,
USMF „Nicolae Testemițanu” din RM
academician al AȘM,
prof. univ., dr. hab. șt. med.

Stanislav GROPPA

2023

ACTUL nr. 39

DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI

(în procesul științifico-practic)

1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** „*Superioritatea utilizării metodei chimice cu soluție 1% dodecil sulfat de sodiu (SDS) în decelularizarea arterelor ombilicale*”.
2. **Autorii:** GLOBA Lilian, asist. univ.; PELIN Elina, dr. șt. med., conf. univ.; GLOBA Pavel, dr. șt. chim., conf. univ.; NACU Viorel, dr. had. șt. med., prof. univ.
3. **Numărul inovației:** Nr.6009 din 23 martie 2023.
4. **Unde și când a fost implementată:** rezultatele au fost implementate în Laboratorul de inginerie tisulară și culturi celulare a USMF “Nicolae Testemițanu”, semestrul IV anul 2022.
5. **Eficacitatea implementării:** Metoda propusă este accesibilă tehnic și argumentată cu efect important asupra gradului de decelularizare a peretelui arterei ombilicale, inclusiv capacitatea de a păstra integritatea structurii matricei extracelulare, ceea ce poate îmbunătăți procesul de regenerare a țesuturilor. De asemenea, această tehnică poate fi utilizată pentru a crea șabloane personalizate de țesut pentru diferite aplicații medicale.
6. **Rezultatele:** Rezultatele expuse în această propunere sunt bazate pe probele tisulare prelevate din cordonale ombilicale colectate de la pacientele internate în IMSP după naștere, perioada de gestație de la 36 la 40 săptămâni, pe parcursul perioadei anului 2019, vârsta pacientelor cuprinsă între 15-45 ani. Materialul de studiu, cercetat histologic și histochimic, a fost divizat în 3 loturi de baza, fiecare lot fiind reprezentat de 20 segmente de artere ombilicale și lotul martor - 20 cazuri. Propunerea este utilă pentru generarea de grefe vasculare cu diametrul mic pentru chirurgia de reconstrucție vasculară.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere

Șef Laborator de inginerie tisulară și culturi celulare
prof. univ., dr. hab. șt. med.

Viorel NACU

Șef Departament Cercetare,
conf. univ., dr. hab. șt. med.

Elena RAEVSCHI

COORDONAT:

Eugenia GROZA



"APROB"

Prorector pentru activitatea de cercetare,
IP USMF „Nicolae Testemițanu” din RM
Academician al AȘM,

prof. univ., dr. hab. șt. med.

Stanislav GROPPA

2020

ACTUL nr. 25

DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI

(în procesul științifico-didactic a Catedrei de histologie, citologie și embriologie)

1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** "Utilizarea imunocolorării anti-S100 pentru evidențierea celulelor dendritice - un nou marker de prognostic în leziunile proliferative"
2. **Autori:** Globa Tatiana, asist.univ., Pelin Elina, dr.șt.med., conf. univ., Globa Lilian, asist.univ., David Valeriu, dr. șt. med., conf. univ.
3. **Numărul inovației:** Nr. 5754 din 17 martie 2020
4. **Unde și când a fost implementată:** rezultatele studiului au fost implementate în procesul didactic la Catedra de histologie, citologie și embriologie, iar procesul tehnologic de procesare, confecționare și evaluare la Laboratorul de morfologie.
5. **Eficacitatea implementării:** Studiind caracterul morfologic al celulelor S100 pozitive în leziunile proliferative de prostată au fost evidențiate două subpopulații diferite de celule dendritice, care diferă după maturare și statutul funcțional. Heterogenitatea a fost identificată în ambele arii studiate: intraepitelial și stromal. După părerea noastră, un efect deosebit al imunocolorării anti-S100 îl prezintă posibilitatea studierii diferenței cantitative a celulelor dendritice din cele două arii în leziunile proliferative benigne și maligne.
6. **Rezultatele:** Imunocolorarea anti-S100 a permis studierea densității, morfologiei, precum și a localizării celulelor dendritice în leziunile proliferative benigne și maligne de prostată. Urmare rezultatelor obținute considerăm că, celulele dendritice stromale S100 pozitive pot fi considerate elemente ale micromediului cu efect important anti-tumoral, iar scăderea numărului lor în ariile stromale ale adenocarcinomului de prostată este un factor de prognostic nefavorabil. În același timp creșterea numărului de celule dendritice intraepiteliale poate fi asociată cu creșterea toleranței imune la mecanismele antitumorale.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere

Șef Catedra de histologie,
citologie și embriologie
prof. univ., dr. hab. șt. med.

Lilian ȘAPTEFRĂȚI

Departamentul didactic
conf. univ., dr. șt. med.

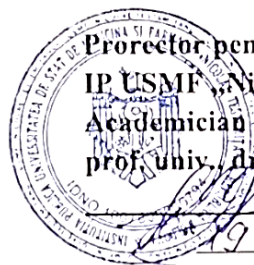
Silvia STRATULAT

Șef departament știință,
conf. univ., dr. hab. șt. med.

Elena RAEVSCHI



"APROB"



Prorector pentru activitatea de cercetare,
IP USMF "Nicolae Testemițanu" din RM
Academician al AȘM,
prof. univ., dr. hab. șt. med.

Stanislav GROPPA

19 martie 2020

ACTUL nr. 26

DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI

(în procesul de cercetare științifică a Laboratorului de morfologie)

1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** *"Utilizarea imunocolorării anti-S100 pentru evidențierea celulelor dendritice - un nou marker de prognostic în leziunile proliferative"*.
2. **Autori:** Globa Tatiana, asist.univ., Pelin Elina, dr.șt.med., conf. univ., Globa Lilian, asist.univ., David Valeriu, dr. șt. med., conf. univ.
3. **Numărul inovației:** Nr. 5754 din 17 martie 2020
4. **Unde și când a fost implementată:** rezultatele studiului au fost implementate în procesul didactic la Catedra de histologie, citologie și embriologie, iar procesul tehnologic de procesare, confecționare și evaluare la Laboratorul de morfologie.
5. **Eficacitatea implementării:** Studiind caracterul morfologic al celulelor S100 pozitive în leziunile proliferative de prostată au fost evidențiate două subpopulații diferite de celule dendritice, care diferă după maturare și statutul funcțional. Heterogenitatea a fost identificată în ambele arii studiate: intraepitelial și stromal. După părerea noastră, un efect deosebit al imunocolorării anti-S100 îl prezintă posibilitatea studierii diferenței cantitative a celulelor dendritice din cele două arii în leziunile proliferative benigne și maligne.
6. **Rezultatele:** Imunocolorarea anti-S100 a permis studierea densității, morfologiei, precum și a localizării celulelor dendritice în leziunile proliferative benigne și maligne de prostată. Urmare rezultatelor obținute considerăm că, celulele dendritice stromale S100 pozitive pot fi considerate elemente ale micromediului cu efect important anti-tumoral, iar scăderea numărului lor în ariile stromale ale adenocarcinomului de prostată este un factor de prognostic nefavorabil. În același timp creșterea numărului de celule dendritice intraepiteliale poate fi asociată cu creșterea toleranței imune la mecanismele antitumorale.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere

Șef Laborator de morfologie
conf. univ., dr. șt. med.

Valeriu DAVID

Șef departament știință,
conf. univ., dr. hab. șt. med.

Elena RAEVSCHI



"APROB"

Prorector pentru activitatea de cercetare,
IP USMF „Nicolae Testemițanu” din RM
Academician al AȘM,
prof. univ., dr. hab. șt. med.



Stanislav GROPPA

“04” martie 2020

ACTUL nr. 16

DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI

(în procesul științifico-didactic a Catedrei de histologie, citologie și embriologie)

- 1. Denumirea ofertei pentru implementare:** *"Utilizarea imunocolorării anti-CD68 drept criteriu de prognostic în leziunile proliferative de prostată"*
- 2. Autori:** Globa Tatiana, asist.univ., Pelin Elina, dr. șt. med., conf. univ., Globa Lilian, asist.univ., David Valeriu, dr. șt. med., conf. univ.
- 3. Numărul inovației Nr. 5745 din 02 martie 2020.**
- 4. Unde și când a fost implementată:** rezultatele studiului au fost implementate în procesul didactic la Catedrele de histologie, citologie și embriologie, și procesul tehnologic de procesare, confecționare și evaluare la Laboratorul de morfologie.
- 5. Eficacitatea implementării:** Studiind caracterul morfologic al celulelor CD68 pozitive atât în leziunile benigne cât și în speciunile cu cancer de prostată au fost observate două populații celulare diferite. Heterogenitatea a fost legată nu doar de morfologia celulelor dar și de localizarea acestora în cadrul leziunii. Astfel că, populația majoritară a macrofagelor a fost reprezentată de celule mici, cu multiple prelungiri citoplasmice apofizate, dispuse în grupuri cu un caracter de masă infiltrativă. Celulele de dimensiuni mici erau localizate predominant în stroma peritumorală, și în zona de invazie a tumorii, iar intratumoral populau preponderent ariile periferice ale masei tumorale.
- 6. Rezultatele:** Imunocolorarea anti-CD68 a permis studierea densității, morfologiei, precum și a localizării macrofagelor în leziunile proliferative benigne și maligne de prostată, iar creșterea liniară a numărului de macrofage CD68 pozitive în raport cu scorul Gleason în adenocarcinoamele de prostată permite a considera celulele CD68 pozitive un criteriu de prognostic în adenocarcinomul de prostată.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere

Șef Catedra de histologie,
citologie și embriologie
prof. univ., dr. hab. șt. med.

Lilian ȘAPTEFRĂȚI

Departamentul didactic
conf. univ., dr. șt. med.

Silvia STRATULAT

Șef departament știință,
conf. univ., dr. hab. șt. med.

Elena RAEVSCHI



"APROB"

Prorector pentru activitatea de cercetare,
IP USMF "Nicolae Testemițanu" din RM
Academician al AȘM,
prof. univ., dr. hab. șt. med.

Stanislav GROPPA

2020

ACTUL nr. 16-1

DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI

(în procesul de cercetare științifică a Laboratorului de morfologie)

1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** *"Utilizarea imunocolorării anti-CD68 drept criteriu de prognostic în leziunile proliferative de prostată"*
2. **Autori:** Globa Tatiana, asist.univ., Pelin Elina, dr. șt. med., conf. univ., Globa Lilian, asist.univ., David Valeriu, dr. șt. med., conf. univ.
3. **Numărul inovației Nr. 5745 din 02 martie 2020.**
4. **Unde și când a fost implementată:** rezultatele studiului au fost implementate în procesul didactic la Catedrele de histologie, citologie și embriologie, și procesul tehnologic de procesare, confecționare și evaluare la Laboratorul de morfologie.
5. **Eficacitatea implementării:** Studiind caracterul morfologic al celulelor CD68 pozitive atât în leziunile benigne cât și în speciunile cu cancer de prostată au fost observate două populații celulare diferite. Heterogenitatea a fost legată nu doar de morfologia celulelor dar și de localizarea acestora în cadrul leziunii. Astfel că, populația majoritară a macrofagelor a fost reprezentată de celule mici, cu multiple prelungiri citoplasmice apofizate, dispuse în grupuri cu un caracter de masă infiltrativă. Celulele de dimensiuni mici erau localizate predominant în stroma peritumorală, și în zona de invazie a tumorii, iar intratumoral populau preponderent ariile periferice ale masei tumorale.
6. **Rezultatele:** Imunocolorarea anti-CD68 a permis studierea densității, morfologiei, precum și a localizării macrofagelor în leziunile proliferative benigne și maligne de prostată, iar creșterea liniară a numărului de macrofage CD68 pozitive în raport cu scorul Gleason în adenocarcinoamele de prostată permite a considera celulele CD68 pozitive un criteriu de prognostic în adenocarcinomul de prostată.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere

Șef Laborator de morfologie
conf. univ., dr. șt. med.

Șef departament știință,
conf. univ., dr. hab. șt. med.

Valeriu DAVID

Elena RAEVSCHI

Declarația privind asumarea răspunderii

Subsemnatul, declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

GLOBA Lilian

Semnătura

Data

CURRICULUM VITAE



Informații personale:

Nume / Prenume	Globa Llian
Adresă	Bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, MD-2004, Chișinău, Republica Moldova
Telefon	Fix: +373 22 205210 Mobil: +373 69530897
E-mail	lilan.globa@usmf.md
Cetățenia	Republica Moldova
Data nașterii	28.08.1973

Experiența profesională:

<i>Perioada</i>	<i>Funcția sau postul ocupat</i>
2021-2022	Membru al Comisiei Ministerului Sănătății RM cu privire la: 1. Elaborarea ”Regulamentului de repartizare și plasare în câmpul muncii a absolvenților instituțiilor de învățământ medical și farmaceutic superior, profesional tehnic postsecundar și postsecundar nonterțiar de stat” din Republica Moldova, 2021; 2. Modificarea ”Regulamentului de organizare și realizare a studiilor de rezidențiat” în Republica Moldova, 2022; 3. Modificarea ”Nomenclatorului specialităților pentru pregătirea posuniversitară prin studii de Rezidențiat” în Republica Moldova, 2022.
2021-prezent	Membru permanent a Comisiei de calificare și evaluare a experților judiciari, aprobat în baza HG 1411/2016.
2019--prezent	Membru al Comisei de susținere a probei de concurs și a Comisiei de contestare a Comisiei de Admitere în secundariatul clinic, USMF „Nicolae Testemițanu”.
2018-prezent	Vice-decan Facultatea de Rezidențiat, USMF „Nicolae Testemițanu”.
2010-prezent	Asistent universitar, Catedra de histologie, citologie și embriologie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, MD-2004, Chișinău, Republica Moldova.
2005-prezent	Membru al comitetului olimpic republican la specialitatea Biologie.
2008-2012	Responsabil de întocmirea datelor cu referire la absolvenții USMF ”Nicolae Testemițanu”, necesare pentru personalizarea actelor de studii.

2006	Membru al Comisiei Ministerului Educației, Tineretului și Sportului din RM cu privire la evaluarea procesului de organizare și desfășurare a studiilor pentru cetățenii străini și apatrizi în instituțiile de învățământ din Republica Moldova. Ord. nr. nr. 171 din 13 martie 2006
2003-2010	Șef-adjunct Secția studenți de peste hotare, USMF „Nicolae Testemițanu”.
1998-2005	Membru al Comisei tehnice a Comisiei de Admitere, USMF „Nicolae Testemițanu”.
1997-prezent	Asistent universitar, Catedra de Anatomie și anatomie clinică, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, bd. Stefan cel Mare și Sfânt, 165, MD-2004, Chișinău, Republica Moldova .

Tipul activității sau sectorul de activitate:

Didactic, științific, administrativ

Educație și formare

<i>Perioada</i>	<i>Instituția, specialitatea</i>	<i>Calificarea</i>
2006–2008	Rezidențiat în Neurologie, USMF „Nicolae Testemițanu”.	Diplomă de licență în Neurologie
1997–1999	Masterat la catedra de anatomie a omului, USMF „Nicolae Testemițanu”.	Diplomă de master în anatomie
1991–1997	Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău.	Diplomă de doctor medic
1989-1991	Școala medicală, or. Orhei, Republica Moldova.	Diplomă de asistent medical

Stagii:

Iunie 2003	Cursul: Inițiere în psihopedagogie Chișinău.
Martie 2009	Cursuri de perfecționare la Anatomie, UMF „Victor Babeș”, Timișoara, Romania
Mai 2010	Cursuri de perfecționare în neurologie, Chișinău,
Martie 2018	Cursuri de perfecționare la Anatomie, UMF „Gheorge T. Popa”, Iași, Romania;
Septembrie 2018	Cursul „Moderne ausbildung und verbesserung der lehre an der staatlichen universitat fur medizin und pharmazie „Nicolae Testemițanu”, Moldova Institut Leipzig;
Noiembrie 2018	Cursul „Învățarea bazată pe probleme”, Moldova Institut Leipzig;
August 2019	Cursul: Dezvoltarea gândirii strategice. Institutul de Științe penale și criminologie aplicată. nr.2-23/8/0918-23

Domeniile de interes științific: Anatomie umană secțională, radiologică, variațională, sanogeneză, limfologie, culturi celulare, medicina regenerativă, imunohistochimie.

Participări la foruri științifice (naționale și internaționale):

- Conferințele științifice anuale ale colaboratorilor IP USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, 1999-2021;

- Congresul consacrat aniversarii a 75-a de la fondarea USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, 2020;	
- International Scientific Conference ”Actual Issues of Morphology”, Chișinău, 2020;	
- International Scientific Conference „Actual issues of morphology”, Chisinau, 2015;	
- Al XXXV-lea Simpozion Național de Morfologie Normală și Patologică; Al IV-lea Simpozion de Morfologie Microscopică. Craiova, 2004;	
Lucrări științifice	37 publicații științifice și metodico-didactice, inclusiv 8 la tema tezei
Apartenența la societăți/asociații științifice naționale, internaționale	
1997 – prezent	Membru al Asociației Științifice de Morfologie din RM;
Limba maternă	Română
Competente lingvistice: Engleza (B2), Rusa (C2), Franceza (A2)	
Competențe și abilități sociale, aptitudini organizatorice	
spirit de echipă, abilități de lucru în echipă, bună capacitate de comunicare și convingere, capacitate de analiză și sinteză, responsabilitate, abilități de comunicare și decizie, abilități de organizare, motivare și control	