

2. Discrepancy of serial number of the rib with number of a vertebra of this level (to parasternal, midclavicular and midaxillary lines),
3. The obtuse infrasternal angle and costal arches extending in the parties.
4. Asymmetry of a thorax.

### References

1. Abramyan M.A. Otcrytaya I punctsyonnaya khirurgiya ploda v covremennom acusherstve / M.A.Abramyan [I dr] // Acusherstvo I ginecologiya. – 2004. -№1. – C.3-8.
2. Batman YU.A. Sovremennye podkhody s ocazaniyu pomoschi novorozhdennym s icstremalnoi nizcoi massoi tela v usloviyakh perinatalnogo tsentra / YU.A. Batman, G.L.Linchevskii, D.A. Bessonov // Архів клінічної та експериментальної медицини. – 2010. – Т.19. – №1. – С.77-80.
3. Bobric I.I. Atlas anatomii novorozhdennogo / I.I.Bobric, V.I. Minacov // Ciev.: Zdorove, 1990. – 180 c.
4. Corostyshevskaya A.M. Magnitno-rezonansnaya tomografiya ploda – novyy metod nein vazivnoy diagnostici vnutriutrobnoy patologii // Voprosy ginecologii, akhuscherstva I patologii. – 2009. – №3. – С.86-92.
5. Lebedeva O.V. Osobennosti razvitiya i sostoyania zdorovya na pervom godu zhizni gluboco nedonoshennykh novorozhdennykh / O.V. Lebedeva, G.O.Nefryuzina, O.VV.Frolova // Izvestia vysshikh uchebnykh zavedeniy. – 2011. – №4. – С.102-108.
6. Saks F.F. Atlas po topograficheskoy anatomii novorozhdennykh / F.F.Saks. – M.: Meditsina, 1993. –240 c.
7. Achiron R. Three- and four- dimensional ultrasound: new methods for evaluating fetal thoracic anomalies / R. Achiron [et al.] // Ultrasound Obstet. Gynecol.- 2008. – Vol. 32. – P. 36-43.
8. Antsaklis, A. Fetal surgery: new developments / A. Antsaklis // Ultrasound Rev Obstet. Gynecol. – 2004. – Vol. 4, N.4. – P.245 –251.
9. Deprest, J.A. The making of fetal surgery / J.A. Deprest // Prenat Diagn. – 2010. – Vol. 30. – №7. – P. 653-667.
10. Eerdeken, A. Maternal bariatric surgery: adverse outcomes in neonates / A. Eerdeken, [et al.]. – 2010. – Vol. 169. – P.191-196.
11. Salomon L.J. Practice guidelines for performance of the routine mid-trimester fetal ultrasound scan / L.J. Salomon [et al.] // Ultrasound Obstet. Gynecol. – 2010. – Vol. 37. – P.116-126.
12. Werner, H. Additive manufacturing models of fetuses built from three-dimensional ultrasound, magnetic resonance imaging and computed tomography scan data / H.Werner, [et al.]// Ultrasound Obstet. Gynecol. – 2010. – Vol.36.-P.355-361.

## CARACTERISTICA IMUNOHISTOCHIMICĂ A CELULELOR STEM MEZENCHIMALE DIN COMPLEXUL OMBILICOPLACENTAR

**Globa L.**

Laboratorul de inginerie tisulară și culturi celulare, Catedra de anatomia a omului  
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova  
Corresponding author: lgloba@yahoo.com

### Abstract

#### THE IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF MESENCHYMAL STEM CELLS OF THE UMBELICO-PLACENTAR COMPLEX

The actual research presents the results obtained by studying the receptors characteristic for the mesenchymal stem cells of the umbilical cord and placenta using the immunohistochemical methods as follows CD 34, CD 105, AC (CD) 133 and VEGFR 2 (CD 309). The studied structures are rich in mesenchymal stem cells, which could be used for the collection, preserving, cultivation and following cellular transplantation in different diseases.

**Key words:** mesenchymal stem cells, cellular transplantation, immunohistochemical methods, umbilical cord.

### Actualitatea lucrării

Progresele făcute în ultimii ani în ceea ce privește izolarea, caracterizarea și diferențierea celulelor stem, au adus noi speranțe în dezvoltarea de terapii celulare ce pot fi utilizate în tratamentul unor boli considerate azi incurabile [1, 6, 12, 15].

Celulele stem pot, în funcție de sursa din care provin, să dea naștere unor celule diferențiate care odată introduse în organism preiau funcția celulelor distruse, corectând astfel modificările patologice apărute [2, 11, 15].

Complexul ombelicoplacental (COP) este alcătuit din structurile provizorii, care se dezvoltă în afara embrionului și includ: amnionul, corionul, cordonul ombilical, placenta. În aceste organe se găsesc celule polipotente – stem hematopoietice și mezenchimale [6, 13, 17].

Pentru caracterizarea celulelor stem mezenchimale (SCM), comitetul celulelor mezenchimale stem a Societății Internaționale pentru terapia celulară a propus criterii minimale pentru definirea SCM umane. Acestea sunt:

1. să adere pe plasticul suporturilor de cultivare a celulelor
2. să exprime pe suprafață antigeni CD 105, CD 73 și CD 90, și să nu exprime CD 45, CD 34 ori AC 133, CD 14 ori CD 11b, CD 79a ori CD 19, HLA-DR
3. să posede capacitatea de a se diferenția *in vitro* în osteoblaste, chondroblaste și adipocite.

Receptorii, care caracterizează fenotipul biologic al celulelor se clasifică în felul următor:  
Receptori de la suprafața celulelor mezenchimale.

4. Receptori fenotipici: Stro-1, CD 73, CD 90 (Thy-1), CD 105 (endoglina) și CD 166, CD 271 ș.a.
5. Receptori ai factorului de creștere: EGFR, bFGFR, IGFR, PDGFR, TGFβRI și RII, HGFR ș.a.
6. Receptori chemokinici: CCR 1, CCR 2, CCR 4, CCR 6, CCR 7, CCR 9, CCR10, CXCR 1, CXCR 2, CXCR 4, CXCR 5, CXCR 6 și CX3CR1 ș.a.
7. Receptori citokinici: IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R, IFNγR și TNFI și IIR ș.a.
8. Receptori de integrare, adeziune celulă-matrice: integrine α și β, CD44.
9. Receptori de integrare, adeziune celulo-celulari: Jagged-1, Jagged-2, DLL-1, DLL-3 and DLL-4, ICAM-1 și -2, VCAM-1 și ALCAM.
10. Receptori imunomodulatori: MHC clasa 1. TLR 1-5 și 9

În studiul dat ne-am pus ca scop să cercetăm prezența unor receptori tipici mezenchimali în structurile COP. S-au selectat pentru investigație receptorii CD 34, CD 105, AC(CD) 133 și VEGFR 2 (CD 309) [3, 4].

## Material și metode

Au fost colectate structuri ale COP de la 13 sarcini la termen (36-41 săptămâni). Recoltarea în vederea prelucrării histologice s-a efectuat rapid, datorită apariției precoce a modificărilor biochimice post-mortem, ce survin înaintea celor structurale. Fragmentele prelevate au avut volumul de 1 cm<sup>3</sup> în vederea realizării unei prelucrări cât mai corecte.

Fragmentele au fost clasificate în 3 grupuri: A. – extremitatea fetală a cordonului ombilical, B. – porțiunea mijlocie a cordonului ombilical, C. – porțiunea placentară a cordonului ombilical cu fragmente ale placentei. Biopsiile au fost prelucrate după tehnica histologică standard (fixare în soluție de formalină tamponată, incluzionare în parafină, secționare la 5 microni).

Secțiunile s-au colorat cu hematoxină-eozină, pentru diagnosticul histopatologic, în vederea stabilirii stării de sănătate a elementelor COP. Secțiunile corespondente adiționale au fost colorate imuno-histochemic.

Metoda consta în deparafinare, hidratare, demascarea antigenului, inhibarea peroxidazei endogene, incubare cu anticorpul primar și tratare cu sistemul de lucru.

Vizualizarea produsului final de reacție. S-a expresat receptorii de la suprafața celulară, CD 34, CD 133, CD 105 și receptorul factorului de creștere vaso-endotelial (VEGFR 2).

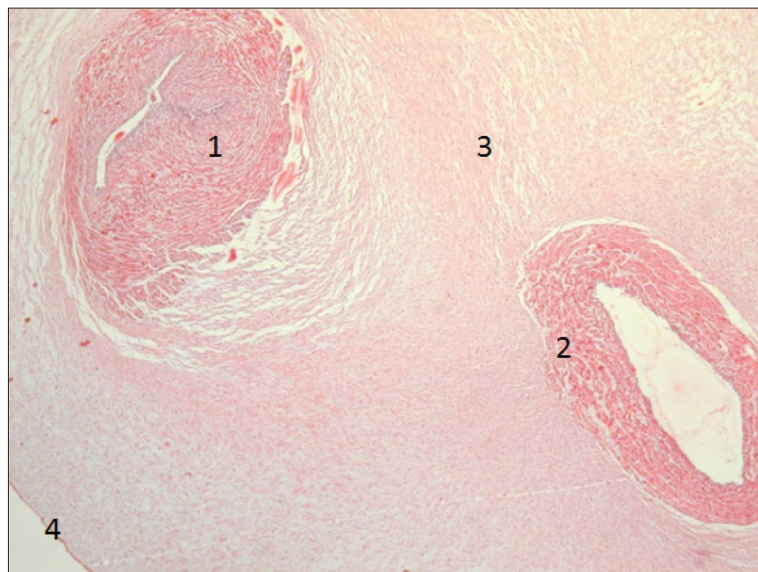
S-au utilizat anticorpi primar: CD 34, CD 133, CD 105 și VEGFR 2 (diluție 1:25, durata incubării 30 minute, sursa Dako, Danemarca).

Întreaga procedură s-a efectuat în sistemul automat cu DakoAustainerPlus (DakoCytomation, Glostrup, Danemarca) în Laboratorul de Imunohistochimie al catedrei de Histologic a UMF "Victor Babeș", Timișoara, România [17].

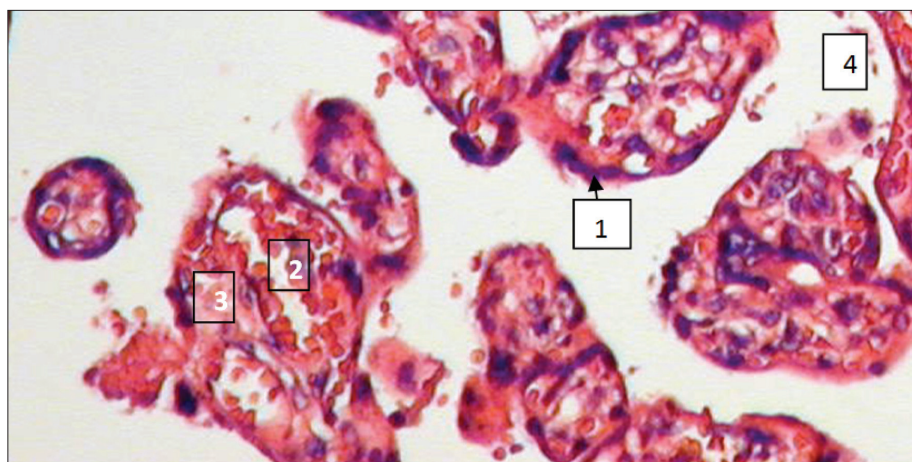
## Rezultate și discuții

În urma examinării histologice prin colorarea hematoxină –eozină s-au pus în evidență structurile clare ale cordonului ombilical (vena ombilicală, arterele ombilicale, amnionul și gelul Warton) și ale placentei (corionul, vilozitățile coriale de diferit ordin cu toate componentele descriptive – sincițiotrofoblastul, citotrofoblastul, capilarele și mezenchimul vilozității).

Nu au fost depistate elemente ce denotă vre-o patologie (Fig.1 și 2).



**Fig. 1. Structurile cordonului ombilical: 1. Artera ombilicală; 2. Vena ombilicală; 3. Gelul Warton; 4. Amnionul. Mărire originală x 100.**



**Fig. 2. Elementele structurale ale placentei: 1. Sincițiotrofoblastul; 2. Capilarele vilozității coriale; 3. Mezenchimul vilozității. 4. Sângele matern. Mărire originală x 800.**

La expresarea CD 34 s-au evidențiat colorații intense atât la nivel de endoteliului vaselor cordonului ombilical cât și al vaselor vilozităților coriale (Fig. 3 și 4).

Alte structuri nu au fost colorate cu anticorpii anti-CD34.

S-au evidențiat cu anticorpii anti-CD 105 elementele endoteliale ale vaselor cordonului ombilical și ale vilozităților placentei. De asemenea s-au observat celule CD105+ în mezenchimul vilozității coriale. Totodată s-a evidențiat pozitiv la Ac anti-CD105 și sincițiotrofoblastul.

Colorația cu anticorpii anti CD (AC)133 nu a evidențiat vre-o structură a COP.

Anticorpii contra antigenului VEGFR2 a colorat slab intens mezenchimul vilozităților coriale.



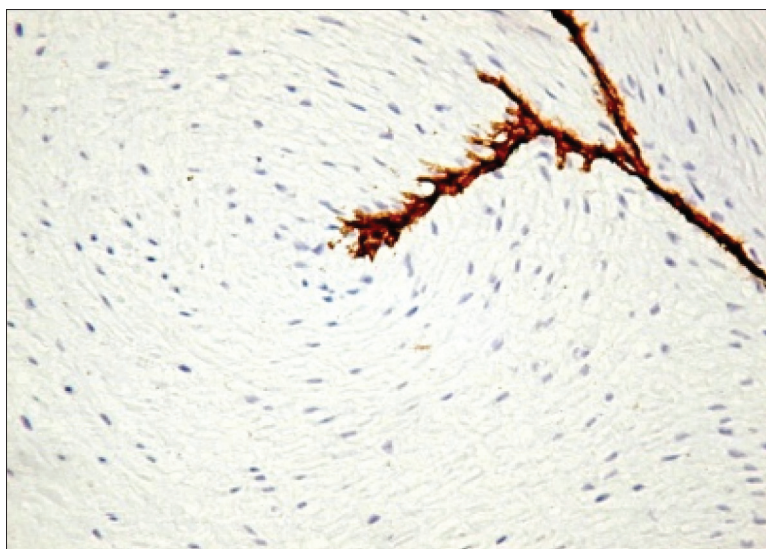


Fig. 3. Expresia imunohistochimică a CD 34 la nivelul vasului cordonului ombilical. x400.

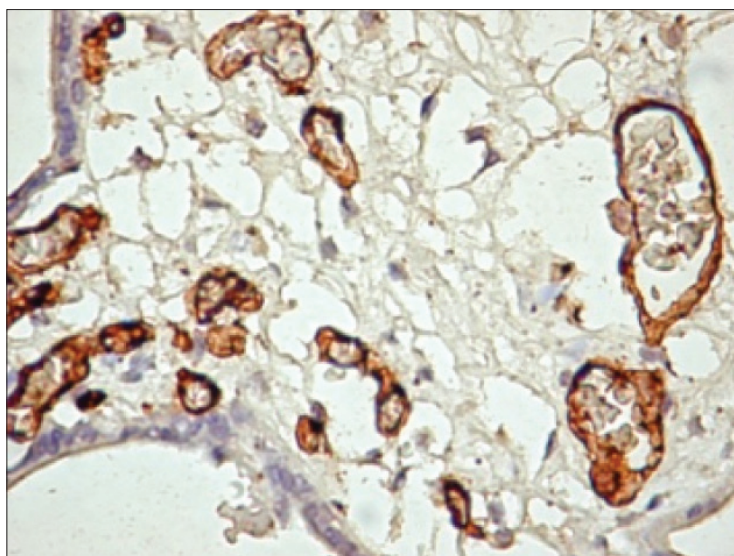


Fig. 4. Expresia imunohistochimică a CD34 la nivelul placentei. Mărire originală x800.

**Receptorul CD 34.** Clusterul de diferențiere CD 34 este o glicoproteidă prezentă pe suprafața anumitor celule cu rol de interconexiune intercelulară și legătura celulelor stem din măduva osoasă roșie. Celule ce expresează CD34 se găsesc în măduva osoasă roșie și cordonul ombilical la celulele hematopoietice. De asemenea se depistează la celulele progenitoare de endoteliu, celule endoteliale, mastocite, celule dendritice. CD34 se observă și în țesutul conjunctiv lax al unor tumori.

Absența CD 34 în structurile COP în afara de endoteliul vascular ne permite să presupunem absența celulelor stem hematopoietice în stroma COP și în vasele respective. Unicul sediu ar fi celulele nucleare ale sângelui cordonului ombilical [5, 15].

**Receptorul CD 10.** Endoglina sau CD 105, este glicoproteidă membranară fiind o parte componentă a complexului de receptor TGF beta.

Acesta din urmă are un rol crucial în angiogeneză în condiții de normă și în diverse patologii (tumori).

Endoglina a fost depistată în toate celulele endoteliale a tuturor țesuturilor, în macrofage activate, limfoblaste, fibroblaste și miocite netede. Rolul CD 105 se rezumă la modularea răspunsului celular la conexiunea cu complexul de receptor TGF, implicarea în organizarea citoscheletului și a migrării celulare. În timpul organogenezei are un rol hotărâtor la formarea sistemului cardiovascular (absența genei respective duce la grave malformații cardiace și vasculare) [10, 14].

**Receptorul CD 133** de asemenea cunoscut și ca AC 133 este o glicoproteină transmembranară. El se expresează în celulele stem hematopoietice, celulele progenitoare endoteliale, glioblastomă și celulele stem neuronale și gliale, la adulți se pune în evidență la rinichi, glandele mamare, trahee glande salivare, placentă, testicule ș.a. În preparatele noastre acest receptor nu s-a evidențiat sugerând ideea lipsei celulelor hematopoietice la nivelul substratului COP studiat [9].

**Factorul de creștere a endoteliului vascular (VEGF)** se depistează prin evidențierea receptorilor lui specifici VEGFR 1, VEGFR 2 și VEGFR 3. Receptorul VEGFR2 (CD 309) este critic pentru angiogeneza vaselor sanguine și responsabil de permeabilitatea vasculară.

Prezența lui slabă în vilozitățile coriale ale placentei denotă faptul menținerii active a procesului de formare a vaselor sanguine. Totodată celulele mezenchimale care expresează VEGFR 2 pot induce angiogeneza și în alte țesuturi după o prelevare și inoculare respectivă [7].

## Concluzii

1. Structurile COP sunt bogate în celule stem mezenchimale care pot fi utile în prelevarea, conservarea, cultivarea lor corespunzătoare cu scopul transplantării lor ulterioare în tratamentul patologieilor ce necesită suplینire de țesut.

2. Celulele mezenchimale ale COP, celulele perivasculare și periamniotice de asemenea au un grad sporit de expresare a receptorilor specifici unor celule cu capacitate de proliferare majoră.

## Bibliografie

1. Andrea Lindenmair, Tim Hatlapatka, Gregor Kollwig, Simone Hennerbichler, Christian Gabriel, Susanne Wolbank, Heinz Redl and Cornelia Kasper Mesenchymal stem or stromal cells from amnion and umbilical cord tissue and their potential for clinical applications. *Cells*. 2012, 1061-1088
2. Carmen Mihaela Mihiu, D. Mihiu, N. Costin, D. Rus Ciucă, S. Șușman, R. Ciortea. Isolation and characterization of stem cells from the placenta and the umbilical cord, *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 2008, 49 (4), 441-446.
3. Diaz-Prado S. Muinos-Lopez E., Hermida-Gomes T., Rendal-Vazchez M.E. Human amniotic membrane as an alternative source of stem cells for regenerative medicine.
4. Efrimescu Cătălin -Iulian, Aplicații ale celulelor stem mezenchimale în reconstrucția tractului digestiv. București, 2010.
5. Evangelista M, Soncini M. Parolini O, Placenta-derived stem cells. New hope for cell therapy? *Cytotechnology* 2008, 58, 33-42.
6. Globa Lilian, Celulele mesenchimale stem ale complexului ombelico- placentar: utilitate și necesitate, *analele USMF "Nicolae Testemițanu"*, vol. I, p. 43-48, 2012.
7. Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ. (Oct 2007). "Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signaling and therapeutic inhibition." *Cell Signal*. 19 (10): 2003-2012.
8. Horn PA, Tesch H, Staib P, Kube D, Diehl V, Voliotis D (1999). „Expression of AC133, a novel hematopoietic precursor antigen, on acute myeloid leukemia cells". *Blood* 93 (4): 1435-37.
9. Insausti C., Blanquer M., The amniotic membrane as a source of stem cells. *Histology, Histopathology*, 2010, 25, 91-98.
10. Lopez-Novoa JM, Bernabeu C. ENG (endoglin). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* (January 2012).
11. Nacu Viorel. Optimizarea regenerării osoase posttraumatice deregulate. Chișinău, 2010, p 63-71.
12. Revencu Tatiana, Trifan Victoria, Nacu Ludmila, Gutium Tatiana, L. Globa , A. G. M. Motoc , V. Nacu Collection, isolation and characterization of the stem cells of umbilical cord blood, *Rom J Morphol Embryol* 2013, 54(2):291-297, 2013
13. Romanov Y.A. Svintiskaya V.A. Smirnov V.N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal cells: Candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem cells* 2003, 21, 105-110
14. Sanz-Rodriguez F, Guerrero-Esteo M, Botella LM, Banville D, Vary CP, Bernabéu C (July 2004). Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins". *J. Biol. Chem.* 279 (31): 32858-68.
15. Satterthwaite AB, Burn TC, Le Beau MM, Tenen DG (April 1992). „Structure of the gene encoding CD34, a human hematopoietic stem cell antigen". *Genomics* 12 (4): 788-94.
16. Susman S., Rus-Ciucă D., Soritau Olga, Tomuleasa C., Buiga R., Mihiu D., V. I. Pop, Carmen Mihaela Mihiu Pancreatic exocrine adult cells and placental stem cells co-culture. Working together is always the best way to go. *RJME*, 2011, vol. 52. 3.
17. Șușman Sergiu, Utilizarea celulelor stem placentare în vederea obținerii de progenitori pancreatici și neuronali, Cluj-Napoca, rezumat al tezei de doctor, 2011.