

## Concluzii

- 1) Existența numeroaselor surse în literatura de specialitate despre vascularizația aortei nu ne permite să afirmăm că s-a epuizat câmpul de cercetare al morfologilor în ceea ce privește acest aspect.
- 2) Investigațiile urmează să fie urgentate, amplificate, aprofundate, iar rezultatele lor implementate în activitatea practică a clinicienilor.

## Bibliografie

1. Clarke JA. An x-ray microscopic study of the development of the vasa vasorum in the human foetal aorta and pulmonary trunk. *Acta Anat (Basel)*. 1966;63(1):55-70.
2. Dimitrios Angouras<sup>a</sup>, Dimitrios P. Sokolis<sup>a</sup>, Theodosios Dosios<sup>a</sup>, Nikolaos Kostomitsopoulos<sup>a</sup>, Harisios Boudoulas<sup>b</sup>, Gregorios Skalkeas<sup>a</sup>, Panagiotis E. Karayannacos<sup>a</sup>. Effect of impaired vasa vasorum flow on the structure and mechanics of the thoracic aorta: implications for the pathogenesis of aortic dissection *Eur J Cardiothorac Surg* 2000;17:468-473
3. McMahon CJ, Ravekes WJ, Smith EO, Denfield SW, Pignatelli RH, Altman CA, Ayres NA. Risk factors for neo-aortic root enlargement and aortic regurgitation following arterial switch operation. *Pediatr Cardiol*. 2004 Jul-Aug;25(4):329-35.
4. Nakayama T. Vasa vasorum with special reference to the aorta and their development. *Okajimas Folia Anat Jpn*. 1956 Sep;28(1-6):365-76.
5. Parke WW. The vasa vasorum of the ascending aorta and pulmonary trunk and their coronary-extracardiac relationships. *Am Heart J*. 1970, Dec.80(6):802-10.
6. Schlichter J., Harris R. The vascularization of aorta. *American Journal of the Medical Sciences*: December 1949 - Volume 218 - Issue 6 - ppg 610&hyhen;615
7. Smetana H. Vasa nutritia der aorta. *Virch Arch Pathol Anat Physiol Klin Med*, 1930, 174:170-187. *Virchows Archiv*, Volume 274, Number 1, 170-187.
8. Stefanadis C, Vlachopoulos C, Karayannacos P, Boudoulas H, Stratos C, Filippides T, Agapitos M, Toutouzas P. Effect of vasa vasorum flow on structure and function of the aorta in experimental animals. *Circulation*. 1995 May 15;91(10):2669-78.
9. Yildiz, Ali; Gur, Mustafa; Yilmaz, Remzi; Demirbag, Recep The association of elasticity indexes of ascending aorta and the presence and the severity of coronary artery disease. *Coronary Artery Disease*: August 2008 - Volume 19 - Issue 5 - pp 311-317.
10. Кузьмина-Преградова А.В. Об артериальном снабжении начального отдела аорты. *АГЭ*, 1953, т.30, в.1, стр. 39-44.

## MODALITĂȚI DE STIMULARE A ANGIOGENEZEI ÎN ISCHEMIA EXPERIMENTALĂ A MEMBRULUI INFERIOR

Sergiu Vișnevschi, Viorel Nacu

Catedra Anatomie Topografică și Chirurgie Operatorie, USMF „Nicolae Testemițanu”  
Laboratorul Inginerie tisulară și culturi celulare

### Summary

#### *Angiogenesis stimulation modalities in experimental ischemia of the lower limb*

Obstructive arterial diseases of different etiologies remain a significant cause of surgical and medical hospital treatment. The number of performed classic surgery is a continuous falling. Due to the development of efficient techniques involving gene or stem cell therapy could be the most promising treatment methods in severe lower limb ischemia.

## Rezumat

Arteriopatiile obstructive de toate etiologiile rămân procentual la un număr important de cazuri internate și tratate în clinicile chirurgicale și medicale. Numărul de intervenții chirurgicale clasice este în continuă scădere, datorită dezvoltării a unor tehnici relativ eficiente, cum ar fi: terapia genică și terapia cu celule progenitoare, care este una din cele mai promițătoare metode de tratament al ischemiei critice ale membrilor pelviene.

## Actualitatea

Conform materialelor Comitetului European de conciliere, ischemia critică a membrilor inferioare se întâlnește la 500-1000 de pacienți pe an dintr-un milion. Problema tratării complexe de ischemie cronică a membrilor inferioare este una dintre cele mai complexe în angiologia și chirurgia vasculară. Ischemia severă a membrilor inferioare este rezultatul final al bolii arteriale ocluzive, în cele mai multe cazuri fiind determinată de ateroscleroză [1]. Consecință a sindromului de ischemiei cronice a membrilor inferioare este ischemia critica care reprezintă o manifestare a bolii arteriale periferice, pacienții cu dureri cronice tipice la nivelul membrilor inferioare (mai ales pe timp de noapte), cu tulburări trofice cum ar fi ulcere ischemice și gangrena, și claudicația intermitentă pe o distanță de mai puțin de 30 m. Termenul de "ischemie critică a membrilor" (critical limb ischemia) prima dată a fost introdus de P.R.F Bell, în 1982. Autorul l-a introdus pentru a descrie un grup de pacienți cu dureri în repaus, ulcerări trofice și necroză distală. Acest termen este utilizat în cazurile când aceste simptome persistă o perioadă mai mult de 2 săptămâni.

Simptomele subiective, care apar lent și progresiv, de obicei în următoarea ordine: oboseala la mers, parestezii în gambă sau gleznă, claudicația intermitentă. Apariția acestor simptome se datorează reducerii debitului arterial, prin obliterarea incompletă a arterelor. Debitul este suficient pentru asigurarea nutriției țesuturilor în repaus, dar insuficient pentru necesitățile crescute în timpul efortului. Ischemia cronică se accentuează considerabil la efort, durere spontană de repaus, care apare mai târziu, precedând de obicei instalarea gangrenei. Acest fenomen apare când obliterarea arterială este aproape totală și când cantitatea de sânge care vine la țesuturi este atât de mică, încât nu pot fi satisfăcute necesitățile de oxigen nici în repaus. Durerea este difuză, atroce, cu exacerbări nocturne, refractara la tratament. Prognosticul nefavorabil pentru pacient al acestei boli, este asociat cu un risc înalt de amputare sau dezvoltarea unor accidente vasculare fatale. În literatura de specialitate, prognosticul ischemiei cronice, este comparat cu prognosticul pacienților cu tumori maligne. Aproximativ 25% dintre pacienții cu acest diagnostic mor, iar 30% necesită o amputare la nivel proximal în perioada de un an de la stabilirea diagnosticului [2, 3]. Obiectivele tratamentului ischemiei cronice a membrilor inferioare este: ameliorarea durerii ischemice, vindecarea ulcerelor, de a crește activitatea pacientului, îmbunătățirea calității vieții și prognosticul favorabil pe termen lung cu privire la rezultatul primar - supraviețuire fără amputarea. Măsură necesară pentru a atinge aceste obiective este de revascularizare. Posibilitatea de obținere a acestei măsuri depinde de gradul și amploarea bolii arteriale [4].

Actualmente metodele alternative metodelor tradiționale de tratament sunt: terapia genică și terapia cu celule progenitoare, care are la baza inocularea acestui tip de celule în țesuturilor afectate pentru a stimula procesele vitale și înlocuirea celulelor devitalizate cu celule tinere care ulterior declanșează angiogeneza. Angiogeneza (în limba greacă - angiogenesis) reprezintă formarea de noi vase pornind de la vasele existente și joacă un rol important atât în aportul de substanțe nutritive cât și a factorilor de creștere. Procesul se desfășoară atât în timpul embriogenezei cât și în remodelarea vasculară în perioada postnatală.

**Angiogeneza** reprezintă un proces multistadial care implică modificări la nivelul matricei extracelulare, proliferarea celulelor endoteliale, migrarea și diferențierea acestora și formarea de noi capilare. În ultimii ani a devenit tot mai evident că formarea de noi vase este rezultatul interacțiunii diferitelor molecule proangiogenice și antiangiogenice, reprezentat de factorii de creștere și de unele componente ale matricei extracelulare.

Matricea extracelulară (MEC) și membrana bazală (MB) constituie substratul natural de la care celulele migrează, proliferază și se diferențiază *in vivo*. Studiile anterioare au contribuit la elucidarea răspunsului celular sub influența MEC indicând abilitatea celulelor de a răspunde la diferiți factori de creștere și diferențiere. Acest răspuns, ce constă în variații de formă și orientare, este modulată de componentele MEC, care interacționează cu receptori specifici ai suprafeței membranelor celulare – integrine. Au fost identificați un număr foarte mare de factori implicați în diferite etape ale procesului de angiogeneză - distrugerea membranei bazale din jurul vaselor preexistente, orientarea, mobilizarea, proliferarea și diferențierea de noi celule endoteliale ce vor forma noi vase.

În principal acești factori sunt reprezentați de:

1. Citokine (polipeptide): VEGF (vascular endothelial growth factor) [5], bFGF (basic fibroblast growth factor), TNF- $\alpha$  (tumour necrosis factor  $\alpha$ ), TGF- $\alpha$  și - $\beta$  (transforming growth factors alpha and beta) [6, 7], EGF (epidermal growth factor), angiogenină, HGF (hepatocyte growth factor), angiostatină, prostaglandine și trombospondină.
2. Enzime: plasmina, heparina, trombina, hialuronidaze, colagenaze și metalproteinaze matriciale, timidinfosforilaza [8].
3. Componente ale matricei extracelulare: laminină, vitronectină, fibronectină, diferite tipuri de colagen, proteoglicani, glicozaminoglicani [9].
4. Moleculă pe suprafața celulară: uPAR (urokinase-type plasminogen activator receptor), diferite selectine, factori tisulari, integrine de tip heterodimeric ( $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 3$ ) [10].

Hipoxia reprezintă principalul stimul al „switch-ului” angiogenetic. HIF1 $\alpha$  (*hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$* ) este exprimat și degradat, în mod normal, de tumori și în condiții hipoxice, această proteină este stabilizată, inducând expresia anumitor gene, inclusiv VEGF. Gena von Hippel-Lindau (VHL), responsabilă de supresia expresiei genice indusă de hipoxie, este adesea mutată în celulele tumorale. Alți determinanți ai neovascularizației sunt: pH-ul scăzut, hipoglicemia, inflamația (cu producerea de ciclooxigenază-2 (COX2) și prostaglandine). În condiții hipoxice, tumora produce și eliberează mulți factori de creștere (VEGF, bFGF, PDGF, TGF- $\beta$ -1, PlGF, angiopoetina-2) pentru a iniția și regla angiogeneza. Acești factori interacționează cu receptori tirozinkinazici (RTK) de pe suprafața a multiple celule, incluzând celulele endoteliale și pericitele (celule din peretele vasului, distincte de celulele endoteliale și musculare, având rol de susținere). În majoritatea situațiilor, mai mulți factori de creștere pot interacționa cu același RTK. Datorită acestei complexități, angiogeneza poate fi inhibată pe multiple căi [11].

Vascular endothelial growth factor (VEGF) și platelet-derived growth factor (PDGF) sunt factori de creștere produși de celulele tumorale și joacă un rol esențial în angiogeneză. Familia VEGF cuprinde 5 membri notați de la A la E. Cel mai studiat este VEGF-A, cel mai puternic stimulator al angiogenezei, inductor al proliferării celulelor endoteliale și inhibitor al apoptozei. Acționează, în principal, în fazele inițiale ale angiogenezei. Familia receptorilor VEGF (VEGFR) are 3 componente: VEGFR-1, -2 și -3. VEGFR-2 este receptorul predominant, implicat în proliferarea și migrarea celulară, inducând semnale de supraviețuire a celulelor endoteliale și a mugurilor vasculari. Blocarea VEGFR-2 induce apoptoza celulelor endoteliale. VEGFR-1 este exprimat pe celulele endoteliale, participând la generarea de semnale intracelulare proangiogenetice, pe macrofage, promovând inflamația, deci metastazarea și pe celule tumorale, generând semnale ce stimulează supraviețuirea acestora. Rolul proinflamator al VEGFR-1 a fost incriminat și în alte procese patologice, incluzând artrita cronică și reumatoidă. VEGFR-3 induce semnale care stimulează proliferarea și creșterea vaselor limfatice, ceea ce poate amplifica metastazarea ganglionară (locală) și la distanță. PDGFR- $\beta$  induce semnale în pericite, semnale de maturare, întreținere și supraviețuire a vaselor create. PDGFR- $\beta$  este un receptor important cu rol în inițierea proliferării pericitelor și în migrarea acestora spre vasele nou-formate [12].

### **Metode de stimulare a angiogenezei**

Actualmente toate metodele de tratament au ca scop, restabilirea totală sau parțială, a fluxului sanguin arterial spre segmentul afectat de ischemie cronică, cu ulterioara instalare a

proceselor metabolice normale ce corespund cerințelor energetice ale țesuturilor (în deosebi cel muscular). Aceste metode pot fi calificate în felul următor:

1. **Metode terapeutice** (conservative)-esența acestor metode este de a restabili fluxul arterial cu preparate farmcologice. Cele mai frecvent utilizate sunt: corecția factorilor de risc; preparate antiagregante plachetare și preparate ce modifică proprietățile reologice ale sîngelui la nivelul circuitului capilar; preparate vasodilatatoare (derivați din prostaglandina E1).

2. **Metode chirurgicale**- includ tehnici clasice și tehnici endovasculare. Cele clasice sunt prezentate de: endarterectomiile-care reprezintă înlăturarea intimei vasculare împreună cu placa ateromatoasă, și cu deblocarea circuitului pe segment distal; șunturile cu aplicarea protezelor sintetice sau a autogrefelor; amputațiile din nefericire idiferent de dezvoltarea tehnicilor endovasculare, ele rămân ca ultimă instanță la pacienții cu leziuni ischemice ireversibile (gangrene).

3. **Metode cu utilizarea ingineriilor genice și culturilor celulare.** Terapia genică – factorul (VEGF) este codificat de două gene alele, la expresia cărora are loc sinteza *factorului de creștere endotelială*, și respectiv controlul sintezei acestuia. Tehnica reprezintă izolarea acestor gene cu introducerea ulterioară în model experimental.

4. **Terapia celulară** la moment este una din cele mai promițătoare metode în tratamentul ischemiei critice, prin administrarea celulelor progenitoare de proveniență medulară celule mature izolate, celule progenitoare embrionare, celule izolate din sângele periferic.

Celulele stem în terapia celulară care în ultimii ani, datorită succeselor obținute în cercetările fundamentale, care permit cultivarea diferitor tipuri de celule, se dezvoltă transplantarea celulară nu numai sub aspectul cercetărilor fundamentale, dar și sub aspectul utilizării lor în terapia unei diversități considerabile de patologii [13, 14]. Este descrisă capacitatea celulelor osteomedulare injectate în regiunea afectată a țesutului muscular pentru promovarea procesului reparator. Celulele sunt recoltate din maduva osoasă, transportate cu fluxul sanguin, traversează peretele vasului sanguin și repară mușchiul afectat. S-a determinat ca o parte din celulele regeneratului muscular conțin marcheri specifici țesutului transplantat, indicând că celulele medulare transplantate s-au dezvoltat în celule musculare [15].

Celule ombilico-placentare au capacitate majoră de a restabili practic integral sistemul hematopoetic al pacientului. Cu toate că sângele ombilical conține un număr mai mic de celule stem comparativ cu măduva osoasă, calitatea grefei este superioară față de cea osteomedulară. În aceste cazuri este nevoie de 10 ori mai puține celule stem ombilicale pentru transplantare reușită, deoarece celulele ombilicale sunt mai tinere comparativ cu cele osteomedulare și cele obținute din sângele periferic.

#### **Factori importanți care au un rol semnificativ în tratamentul cu celule progenitoare sunt:**

- ▶ Starea locală a țesuturilor, stadiu clinic la care se află procesul. Este important de inițiat tratamentul la etapele când procesele sunt reversibile.
- ▶ Un alt element este metoda de administrare a grefelor celulare cea mai eficientă fiind calea intramusculară și administrarea pe traectul arterelor. Alte căi sunt intravenoasă și intraarterială.
- ▶ Tipul celulelor utilizate și capacitatea angiogeneza(capilarogeneza) și vasculogenetică(arteriogeneza) a acestora.

#### **Concluzii**

Angiogeneza este un exemplu perfect asupra modului în care cercetarea fundamentală și-a transferat rezultatele în practica clinică ilustrând modul în care aceasta a contribuit la substanțiale achiziții terapeutice. Cunoașterea proprietăților factorului de creștere VEGF tip-A responsabil de angiogeneza vaselor sanguine, receptorilor în deosebi VEGFR-2, PDGF care sunt implicate în proliferarea și migrarea celulară. Terpia cu celule progenitoare autologate reprezintă o metodă de tratament al pacienților cu ischemie cronică sau chiar critică a membrilor inferioare care nu au posibilitate de a efectua o intervenție reconstructivă, sau au contraindicații pentru aceasta.

## **Bibliografie**

1. Hirsh A. T., Criquit M. H., Treat-Jacobson D., Regensteiner J. G., Creager M. A., Olin J. W., et al. Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care. *JAMA* 2001; 286, p.1317-1324.
2. Рекомендации Российского общества ангиологов и сосудистых хирургов «Диагностика и лечение больных с заболеваниями периферических артерий». М. 2007, 112с.
3. Российский консенсус «Диагностика и лечение пациентов с критической ишемией нижних конечностей». М.: 2002; 40.с.
4. Trans Atlantic Inter-Society Consensus (TASC) on Management of Peripheral Arterial Disease (PAD). *J. Vasc. Surg.* 2000; 31, p. 1–296.
5. Rosenbaum-Dekel Y., Fuchs A., Yakirevich E., et al. Nuclear localization of long-VEGF is associated with hypoxia and tumor angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 332(1), p. 271-178.
6. Manganini M., Maier J.A.M. Transforming Growth Factor  $\beta$ 2 inhibition of Hepatocyte Growth Factor-induced endothelial proliferation and migration. *Oncogene.* 2000; 19, p.124-133.
7. Hasegawa Y., Takanashi S., Kanehira Y., et al. Transforming growth factor-beta1 level correlates with angiogenesis, tumor progression, and prognosis in patients with non small cell lung carcinoma. *Cancer.* 2001; 91(5), p. 964-971.
8. Mazurek A., Kuc P., Terlikowski S., Laudanski T. Evaluation of tumor angiogenesis and thymidine phosphorylase tissue expression in patients with endometrial cancer. *Neoplasma.* 2006; 53(3), p.242-246.
9. Yip G. W., Smollich M., Gotte M. Therapeutic value of glycosaminoglycans in cancer. *Mol Cancer Ther.* 2006; 5(9), p. 2139-2148.
10. Nisato R.E., Tille J.C., Jonczyk A., Goodman S. L., Pepper M.S. Alpha beta 3 and alpha beta 5 integrin antagonists inhibit angiogenesis in vitro. *Angiogenesis.* 2003; 6(2), p.105-119.
11. McDonnell K., Wellstein A. Cancer metastasis. In: Chang AE, ed. *Oncology - An Evidence-Based Approach.* New York, Springer, 2006, p. 244-272.
12. Miron L., Gafton B., Marinca M. Angiogeneza tumorală – implicații în terapia cancerului. *Jurnalul de Chirurgie, Iași,* 2010, Vol. 6, nr. 2, p.
13. Muschler G. F., Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. *JBJS Am.,* 1997, vol. 79, p. 223-232.
14. Papathanasopoulos A., Giannoudis P. V. Biological considerations of mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells. *Injury,* Sept. 2008, vol.39, suppl 2, p. 21-32.
15. Muschler G. F., Nakamoto C., Griffith L. G. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint surg Am.,* 2004; 86, p.1541-1558.

## **DENSITATEA VASCULARĂ ȘI DISTRIBUȚIA VASELOR SANGUINE ÎN NEOPLAZIA CERVIXULUI UTERIN (DUBLA IMUNOCOLORARE ANTI- CD31/ANTI-ACTINA MUȘCHIULUI NETED-ALPHA)**

**Lilian Șaptefrați, Vitalie Mazuru, Valeriu David, Tatiana Globa, Lucian Rudico**  
Catedra Histologie, Citologie și Embriologie

### **Summary**

#### ***Divergent expression of endoglin and marker of proliferation Ki67 in the benign and malign lesions of the uterine cervix***

In this study we show, for the first time, application of double immunohistochemical stain method using endothelial marker of high specificity (CD105) and marker of proliferation (Ki67),