

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
DEPARTMENTUL II – Morfologie Microscopică**

COPOTOIU LARISA - CRISTINA



TEZĂ DE DOCTORAT

**VARIABILITATEA EXPRESIEI MARKELOR VASCULARI
ȘI LIMFATICI ÎN ȚESUTURI EMBRIONARE UMANE
ȘI ANEXELE FETALE**

- R E Z U M A T -

Conducător științific
PROF. UNIV. DR. CÎMPEAN ANCA MARIA

**Timișoara
2024**

INTRODUCERE

Complexitatea morfofuncțională a placentei, organ temporar, a stimulat în ultimele decenii numeroase investigații având ca rezultat achiziții importante privind rolul placentei în dezvoltarea embrio-fetală și în geneza unor manifestări ale bolii în viața prenatală.

În timpul sarcinii, placenta îndeplinește cele mai diverse funcții, primind și procesând nevoile metabolice ale produsului de concepție. Cunoașterea principalelor aspecte ale morfofiziologiei placentare ne aduce mai aproape de înțelegerea manifestărilor patologice ale acestui organ.

Bolile placentare au ca substrat solicitări crescute sau supralimitate, regresii structurale hipofuncționale, adaptări nefiziologice, noxuri de retenție sau transfer de la mamă la făt. Corelarea datelor clinice și structurale în organogeneza și organopatogeneza placentei ne permite, alături de stabilirea unui diagnostic mai veridic, să aplicăm o terapie adecvată atât de utilă pentru siguranța fătului și a mamei. În acest scop, medicul obstetrician trebuie să cunoască natura și semnificația leziunilor, abaterile funcționale de la nivelul organului placentar, pentru a le integra și interpreta în complexul de manifestări clinico-biologic ale sarcinii.

Țesutul embrionar și anexele embrionare au reprezentat întotdeauna un aspect microscopic controversat în ceea ce privește existența și funcționalitatea anumitor structuri histologice în dezvoltarea fetală dar și în interrelația materno-fetală. Aspectele morfologice ale structurilor placentare sunt uneori neglijate chiar și în sarcinile cu risc crescut sau întrerupte prematur și acest lucru are un impact negativ asupra elucidării ulterioare a cauzelor care conduc la aceste evenimente nedorite. Organogeneza embrionară include în mod necesar dezvoltarea rețelelor vasculare adaptate fiecărui organ în parte. Colectarea de embrioni umani este extrem de dificilă, aceștia provin de obicei din întreruperea sarcinii la cerere sau determinate de diverse stări patologice. Analiza imunohistochimică și microscopică moleculară a etapelor precursoare ale dezvoltării embrionare presupune extragerea întregului embrion, manevră extrem de dificil de efectuat în condițiile tehnicilor de realizare a sarcinii.

Principalele obiective ale acestei cercetări au fost:

(1) Analiza clinică epidemiologică a cazurilor; (2) Analiza microscopică convențională și prin tehnici de analiză a imaginilor digitale a dezvoltării rețelelor vasculare embrionare în săptămânile 5-7 în diferite primordii ale organelor embrionare; (3) Identificarea expresiei markerilor limfatici (podoplanina) în cordonul ombilical și structurile placentare și caracterizarea structurilor pozitive observate în aceste țesuturi; (4) Analiza expresiei genei

podoplaninei în structurile embrio-fetale prin aplicarea tehnicilor RNAscope la secțiunile de cordon ombilical și placentă.

Cuvinte cheie: podoplanin; vilozități placentare; decidua; placenta umană normală

PARTEA GENERALĂ

Țesutul embrionar și anexele embrionare au reprezentat întotdeauna un aspect microscopic controversat în ceea ce privește existența și funcționalitatea anumitor structuri histologice în dezvoltarea fetală dar și în interrelația materno-fetală. Aspectele morfologice ale structurilor placentare sunt uneori neglijate chiar și în sarcinile cu risc crescut sau întrerupte prematur și acest lucru are un impact negativ asupra elucidării ulterioare a cauzelor care conduc la aceste evenimente nedorite. Organogeneza embrionară include în mod necesar dezvoltarea rețelelor vasculare adaptate fiecărui organ în parte. Colectarea de embrioni umani este extrem de dificilă, aceștia provin de obicei din întreruperea sarcinii la cerere sau determinate de diverse stări patologice. Analiza imunohistochimică și microscopică moleculară a etapelor precursore ale dezvoltării embrionare presupune extragerea întregului embrion, manevră extrem de dificil de efectuat în condițiile tehnicilor de realizare a sarcinii.

Rețeaua vasculară reprezintă un punct cheie în dezvoltarea embrionară a tuturor organelor embrionare și reprezintă un moment critic cu componente celulare eterogene care vor determina ulterior dezvoltarea normală sau patologică a organelor embrionare. Rețelele vasculare din diferite organe se dezvoltă diferit. Mecanismele care stau la baza dezvoltării rețelelor vasculare sunt incomplet descrise în țesuturile embrionare umane din cauza complicațiilor etice stricte care se aplică utilizării țesuturilor embrionare umane. Modelele matematice de dezvoltare a rețelelor vasculare embrionare sunt eterogene de la un organ la altul și stau la baza aplicării studiilor morfometrice ale formării rețelelor vasculare. Pe lângă aspectele microscopice limitate descrise în literatura de specialitate cu privire la caracteristicile vasculare embrionare, sunt și mai puține date disponibile cu privire la studiile efectuate pe anexele embrionare, și anume cordonul ombilical și placenta. Cordonul ombilical reprezintă o formă particulară de țesut conjunctiv care include celule mezenchimale parțial diferențiate, o anumită matrice extracelulară gelatinoasă și vase mari. Datele privind existența capilarelor sanguine de calibr mic dispersate în țesutul conjunctiv mucos al cordonului ombilical precum și existența structurilor limfatice în cordonul ombilical sunt probleme extrem de controversate în acest moment în literatura de specialitate. Date despre existența altor vase ombilicale decât marile vase au fost publicate recent în literatură și au demonstrat existența vaselor limfatice care au o traiectorie caudală de-a lungul arterei ombilicale. Cu toate acestea, cu toate acestea expresia markerilor limfatici în cordonul ombilical este foarte puțin studiată fiind raportată în

doar 3 articole din literatură. Mai mult, analize moleculare precum identificarea genelor tisulare (hibridarea in situ sau ARNscope) nu se găsesc în literatura de specialitate aplicată anexelor fetale.

Patogenia în diferite patologii placentare nu este clară, unii factori de risc sunt bine cunoscuți, precum operația anterioară de cezariană, chiuretajul, chirurgia uterului, vârsta maternă avansată și multiparitatea .

Tulburările de angiogeneză și inflamația generalizată sunt simptomele dominante în diferite patologii legate de sarcină, cum ar fi preeclampsia și restricția de creștere a uterului.

În acest studiu emitem ipoteza că diferite boli asociate sarcinii au același profil angiogenic și limfangiogenic al placentei, singura diferență fiind gradul de exacerbare a leziunilor.

Pe baza celor de mai sus, au derivat o serie de obiective ale prezentului studiu care au încercat să elucideze aspectele mai puțin cunoscute ale microscopiei și analizei moleculare a structurilor embrio-fetale în stadiile lor incipiente și târzii de dezvoltare.

Prezentul studiu abordează embrionul fetal atât din punct de vedere clinic, cât și din punct de vedere microscopic și molecular. Analiza statistică a cazurilor incluse în studiu a fost completată ulterior cu corelații clinice. Studiul structurilor embrionare s-a limitat la stadiile incipiente ale dezvoltării embrionare, săptămânile 5-7 de dezvoltare embrionară.

PARTEA SPECIALĂ

Partea specială include 6 capitole: 2 introductive (motivație, materiale și metode) și 2 studii imunohistochimice cu scopuri distincte: combinarea RNAscope, imunohistochimie (IHC) și analiză digitală a imaginii pentru a evalua proteinele podoplaninei (PDPN) și expresia PDPN_mRNA pe formalină fixată. Țesuturi normale de placenta umană încorporate în parafină și evaluarea factorilor vasculogeni în embrionul în curs de dezvoltare în săptămânile cinci și șapte, cu un accent special pe markerii CD133 și TIE2.

Grupul de lucru a inclus 100 de placentă și cordonul ombilical adiacent din care am selectat 30 de placentă din sarcinile la termen. Criterii de includere: placenta din sarcina la termen cu fetuși vii și nicio boală maternă/fetală asociată cu sarcina.

Expresia și funcția podoplaninei (PDPN) în placenta umană normală a fost dezbătută în evaluarea placentară. Acest studiu subliniază importanța unei abordări multimodale a expresiei PDPN în placentele umane normale. Se efectuează o examinare completă folosind imunohistochimie, RNAscope și interpretare automată a examinării imaginii digitale (DIA). Analiza bazată pe QuPath DIA a generat automat scorurile stromale și histologice ale expresiei

PDPN pentru imunohistochimie și colorații RNAscope. Fibroblastele și structurile luminale izolate ale cordonului ombilical au exprimat proteina PDPN și ARNm PDPN. RNAscope a detectat reglarea PDPN_mRNA în celulele trofoblastice ale nodurilor placentare sincițiale, dar imunohistochimia nu a certificat acest lucru la nivel de proteine. Studiul a găsit o corelație semnificativă între IHC și RNAscope H-Score ($p = 0,033$) și Allred Score ($p = 0,05$). O strategie multimodală de succes pentru evaluarea PDPN în placentele umane a confirmat heterogenitatea expresiei PDPN în placenta și cordonul ombilical uman normal pe termen întreg la nivel de proteine și ARNm. În celulele trofoblastice ale nodurilor sincițiale placentare, PDPN a prezentat supraexpresie ARNm, sugerând un rol potențial în maturarea placentei.

Vasculogeneza embrionului uman (dezvoltarea vaselor de sânge pornind de la precursorii endoteliali) include capacitatea celulelor mezenchimale și a celulelor stem pluripotente de a se diferenția în celule endoteliale. Cuantificarea celulelor progenitoare endoteliale este dificil de evaluat în timpul etapelor incipiente ale dezvoltării embrionului uman din cauza mai multor factori, în special din cauza deficitului de țesut embrionar uman, care este de obicei aruncat după metodele abortive ale sarcinii în stadiu incipient. CD133 (Prominin-1) este un marker general al celulelor progenitoare, dar combinat cu alți markeri endoteliali, cum ar fi CD34, poate identifica celulele progenitoare endoteliale în timpul dezvoltării embrionare. Imunohistochimia CD34 a fost efectuată anterior de echipa noastră pentru a identifica capilarele embrionului uman și pentru a evalua comparativ densitatea microvaselor între diferite țesuturi embrionare umane. TIE2 este un receptor de angiopoietină puternic implicat în maturarea vaselor de sânge nou formate datorită expresiei sale în unii precursori mezenchimale pentru viitoarele pericite. CD34 evaluează prezența celulelor endoteliale, dar utilizarea sa unică nu evaluează starea progenitoarelor endoteliale, așa cum poate face CD133, și nici maturarea vaselor așa cum o poate face TIE2. Datele despre dinamica exprimării CD133/TIE2 în stadiile incipiente ale dezvoltării embrionului uman sunt rare. Prin urmare, în acest studiu, ne-am propus să evaluăm comparativ dinamica precursorilor endoteliali CD133+ și expresia TIE2 pe țesuturile embrionare umane vechi de cinci și șapte săptămâni, cu un accent special pe expresia lor pe paturile vasculare embrionare.

Imunohistochimia CD133 și TIE2 a fost efectuată pe țesuturi embrionare umane vechi de cinci și șapte săptămâni, urmată de cuantificarea lor folosind metoda automată de analiză a imaginii digitale Qu Path (DIA).

CD133 și TIE2 au prezentat modele divergente de expresie în timpul fazelor inițiale ale dezvoltării embrionare umane, în special în endoteliul vascular al capilarelor mici. Expresia CD133 în celulele endoteliale care căpтуșesc lumenul perfuzat a scăzut treptat de la embrionii de cinci până la șapte săptămâni. Ea a rămas exprimată cu o intensitate mai mare în celulele situate la vârful mugurelui vascular care au apărut în capilarele preexistente. TIE2 a fost mult

mai specific decât CD133, fiind restrâns la nivelul endoteliului vascular; prin urmare, a fost mai ușor de cuantificat folosind analiza digitală a imaginii. Endoteliul aortei embrionare a fost o excepție de la expresia divergentă, deoarece CD133 și TIE2 au fost co-exprimate în mod constant în embrionul în vârstă de șapte săptămâni. Evaluarea Qu Path DIA a crescut acuratețea evaluării CD133 și TIE2, fiind prima dată când acestea au fost cuantificate prin utilizarea software-ului automat și nu manual.

A fost observată o eterogenitate ridicată a CD133 și TIE2 între țesuturile embrionare vechi de cinci și șapte săptămâni, precum și între diferite regiuni embrionare de la aceeași vârstă gestațională. Constatarea unică a persistenței co-expresiei CD133/TIE2 în endoteliul aortic necesită studii suplimentare pentru a elucida rolul acestei co-expresii.

CONCLUZII GENERALE ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

1. Podoplanina este exprimată atât la nivel de proteine, cât și la nivel de gene în placentă umană la termen și în cordonul ombilical. Precizia determinării prezenței podoplaninei în placentă este crescută, iar dezbaterile despre existența acesteia în placentă și cordonul ombilical uman sunt diminuate, datorită metodei combinate de evaluare a expresiei podoplaninei prin RNAscope și imunohistochimie. Distribuția și aranjarea structurilor pozitive pentru podoplanină diferă în placentă fetală, maternă și cordon ombilical la termen. Celulele pozitive pentru podoplanină seamănă cu stelele la termen și au o serie de extensii care se unesc pentru a crea rețele pozitive PDPN. Celulele pozitive pentru podoplanină au prezentat frecvent o tendință pentru vacuolizarea intracitoplasmatică și fuziunea acestor vacuole, rezultând contururile structurilor asemănătoare vaselor cu un lumen separat. Celulele roșii din sânge au fost absente din structurile asemănătoare vasculare pozitive pentru podoplanină, indicând prezența vaselor limfatice în placentă și cordonul ombilical la termen.

2. Celulele deciduale au prezentat o expresie puternică a genelor și proteinei PDPN. Distribuția PDPN în toate celulele deciduale a fost strict submembranară, dându-i o caracteristică unică la nivel de proteine.

3. Nodulii placentari din placentă pe termen întreg au avut cele mai mari scoruri Allred și H_Score. Această caracteristică, care nu a fost niciodată raportată înainte, implică faptul că podoplanina joacă un rol în dezvoltarea placentei fetale.

4. Expresia distinctă a TIE2 și CD133 în endoteliul vascular atât al arterelor mari de tip aortic, cât și al vaselor mici de tip capilar embrionar în timpul fazelor incipiente ale dezvoltării embrionare umane. Endoteliul aortic embrionar este o excepție de la această expresie divergentă, așa cum demonstrează co-expresia continuă a embrionului de șapte săptămâni a TIE2 și CD133. Este imposibil să se determine rolul co-expresiei CD133 și TIE2 la endoteliul

aortic al embrionului uman din cauza deficitului de informații care înconjoară această co-expresie în literatură.

5. O teorie care a fost deja acceptată la nivelul endoteliului aortic în zona aortogonado-mezodermică dar nu a fost încă descrisă la nivelul aortei toracice este că această co-expresie susține rolul hemogen al embrionului. endoteliul aortei, care conferă celulelor endoteliale capacitatea de a se diferenția atât în precursor endotelial, cât și în precursori hematopoietici.