

MINISTERUL SĂNĂTĂȚII, MUNCII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE

AL REPUBLICII MOLDOVA

IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

„NICOLAE TESTEMIȚANU”

Cu titlu de manuscris
CZU: 616.52-08:602.9:611.018

MACAGONOVA OLGA

**INFLUENȚA CELULELOR STEM ASUPRA LEZIUNILOR
PEMFIGUS-LIKE (STUDIU EXPERIMENTAL PRECLINIC)**

311.01 – ANATOMIA OMULUI

Rezumatul tezei de doctor în științe medicale

CHIȘINĂU, 2019

Teza a fost elaborată în Laboratorul de inginerie tisulară și culturi celulare, al Instituției Publice Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova

Conducător științific:

Nacu Viorel, doctor habilitat în științe medicale, conferențiar universitar

Consultant științific:

Mușet Gheorghe, doctor habilitat în științe medicale, profesor universitar, Om Emerit

Referenți oficiali:

Nedelciuc Boris, doctor în științe medicale, conferențiar universitar

Căruntu Irina-Draga, doctor, profesor universitar (Iași, România)

Componența Consiliului științific specializat:

Catereniuc Ilia, președinte, doctor habilitat în științe medicale, profesor universitar

Fulga Veaceslav, secretar, doctor habilitat în științe medicale, conferențiar universitar

Darii Alic, membru, doctor habilitat în științe medicale, conferențiar universitar

Belic Olga, membru, doctor habilitat în științe medicale, conferențiar universitar

Bețiu Mircea, membru, doctor în științe medicale, conferențiar universitar

Susținerea va avea loc la 08 noiembrie 2019, ora 14:00 în ședința Consiliului științific specializat D 311.01-58 al Instituției Publice Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova (bd. Ștefan cel Mare și Sfânt nr. 165, bir. 204. Teza de doctor în științe medicale și rezumatul pot fi consultate la biblioteca Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova și la pagina web a C.N.A.A./ANACEC www.cnaa.md/anacip.md).

Rezumatul a fost expedit la _____ 2019

Secretar al Consiliului științific specializat

dr. hab. șt. med., conf., univ.

Fulga Veaceslav

Conducător științific

dr. hab. șt. med., conf., univ.

Nacu Viorel

Consultant științific:

dr. hab. șt. med., prof., univ., Om Emerit al RM

Mușet Gheorghe

Autor

Macagonova Olga

© *Macagonova Olga*, 2019

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea și importanța temei

Pemfigusul acantolitic este o afecțiune buloasă a pielii și mucoaselor de origine autoimună, etiologia căreia e necunoscută. Aboobaker J. (2001), Salmanpour R. și alții (2006) relatează că maladia se extinde la nivel mondial, iar frecvența ei variază în funcție de profilul clinic și epidemiologic în diferite regiuni ale lumii [1, 2, 3, 4, 5, 6].

Maladia evoluează grav. Histopatologic se caracterizează prin bule intraepidermice acantolitice, iar imunopatologic – prin prezența în tegumentele și în serul bolnavilor a autoanticorpilor din clasa IgG, direcționați împotriva desmozomilor. Hebra F. (1860) [7] și Kaposi M. (1896) [8] au diferențiat pemfigusul de celelalte afecțiuni buloase, iar Besnier E., (1904) a descris aspectele clinice, caracteristice maladiei [9]. Schimbările hidro-electrolitice și proteice diminuează funcția de barieră a epidermului, mucoaselor și condiționează asocierea infecțiilor bacteriene secundare [10].

Înainte de epoca corticoterapiei, 40-50% dintre bolnavi decedau, durata de supraviețuire fiind de până la doi ani. De-a lungul anilor, s-a utilizat terapia cu corticoizi, citostatice și imunosupresoare, cu avantajele și dezavantajele lor. Efectele corticoterapiei trec însă pe plan secundar în cazul pemfigusului vulgar, care netratat evoluează spre deces în 1-2 ani de la debut [11]. La pacienții care abandonează tratamentul cu corticosteroizi, speranța de viață se reduce evident [12]. Ultima din elaborări este tratamentul cu celule stem al pemfigusului acantolitic. Datele studiilor existente înaintează unele ipoteze, dar eficacitatea celulelor stem în tratamentul acestei maladii rămâne incertă. Din aceste motive, în lucrarea de față ne-am propus să evaluăm eficacitatea celulelor stem în tratamentul leziunilor *pemfigus-like* cutanate, modelate pe șobolani.

Scopul studiului: evaluarea eficacității celulelor stem în tratamentul leziunilor *pemfigus-like* modelate pe șobolani.

Obiectivele studiului:

1. Elaborarea modelului cutanat de afecțiuni *pemfigus-like* pe șobolani.
2. Evaluarea clinică, comparativă și planimetrică ale afecțiunilor cutanate pe modelele experimentale.
3. Aprecierea schimbărilor morfologice la nivelul epidermului, produse în modelul experimental al leziunilor *pemfigus-like*;
4. Estimarea modificărilor prin investigații imunologice și imunohistochimice ale leziunilor experimentale la animale de laborator.

5. Evaluarea tratamentului cu celule stem din măduvă osoasă al leziunilor *pemfigus-like* la șobolani prin estimarea scorului leziunilor modelate, planimetria plăgilor, investigații histologice, imunologice și imunohistochimice.

Inovația și originalitatea științifică a rezultatelor obținute

Am inovat un model experimental de leziuni cutanate *pemfigus-like* la șobolani, studiat și confirmat prin metode macroscopice, microscopice, imunologice, imunohistochimice cu pancitokeratină a secțiunilor cutanate cu leziuni reproduse experimental la animale.

În premieră a fost efectuat un studiu cu privire la eficacitatea tratamentului cu celule stem în leziunile *pemfigus-like* la șobolani în care, ca rezultat, obținându-se epitelizarea leziunilor *pemfigus-like*, scăderea invaziei microbiene din plagă și al sindromului algic.

Pentru prima dată a fost evidențiată acțiunea imunomodulatoare ale celulelor alogene stem, izolate din măduva osoasă în leziunile *pemfigus-like* pe șobolani.

Au fost obținute 12 brevete de invenție [13-24]: MD 793 (13) Y, 2014; MD 866 (13) Y, 2015; MD 867 (13) Y, 2015; MD 868 (13) Y, 2015; MD 905 (13) Y, 2015;; MD 915 (13) Y, 2015; MD 939 (13) Y, 2015; MD 1067 (13) Y; MD 1132 (13) Y, 2017; MD 1147 (13) Y, 2017; MD 1148 (13) Y, 2017; MD 1331 (13) Y, 2019.

Problema științifică rezolvată. A fost creat un model experimental de obținere a leziunilor *pemfigus-like*. Acest model pe care poate fi studiată manifestarea acestei patologii, cât și testate alte modele experimentale de tratament al acesteia cu celule stem.

Semnificația teoretică. Studiul a confirmat utilitatea examenului histologic și imunohistochimic cu AE1/AE3 în afectarea epidermului în leziunile *pemfigus-like* la animale.

A fost determinat corelația dintre scăderea nivelului componentelor C3 și C4 ale complementului în serul sangvin la animalele experimentale, administrate cu extractul etanolic din esofagul de bovină, și creșterea scorului leziunilor reproduse.

Valoarea aplicativă a rezultatelor. Rezultatele obținute în urma studiului completează cunoștințele în medicina regenerativă, dermatologie, anatomie, cu referire la metodele noi de tratare a maladiilor cutanate autoimune. Rezultatele studiului vor fi utilizate în lucrul Laboratorului de inginerie tisulară și culturi celulare, în cursurile și lecțiile practice la cursul de Dermatologie, Medicină regenerativă a IP USMF „Nicolae Testemițanu”.

Aprobarea rezultatelor cercetării

Rezultatele obținute în timpul investigațiilor efectuate și concepțiile de bază ale tezei au fost comunicate și discutate în cadrul următoarelor reuniuni științifice:

- Conferința Moldo-Română de Dermatologie (Republica Moldova, Chișinău, 2013);

- Sesiunea a XIX-a a Zilelor Medicale Balcanice și cel de al II-lea Congres de Medicină de Urgența din Republica Moldova (Republica Moldova, Chișinău, 2013);
- Congresul al V-lea Național de Dermatologie cu participare internațională. (Republica Moldova, Chișinău, 2016);
- Simpozionul științifico-practic anual „lecturi AGEPI” (Republica Moldova, Chișinău, 2016);
- Conferința Științifică anuală a IP USMF „Nicolae Testemițanu” (Republica Moldova, Chișinău, 2016);
- Congresul Național de Dermatologie (România, Sinaia, 2016);
- Conferința Națională de Dermatologie „Zilele Gh. Năstase” (România, Iași, 2018);
- Simpozionul „Patologie la limita între specialități” (România, București, 2019);
- Al XII-lea Forumul Internațional al dermato-venerologilor și cosmetologilor (Rusia, Moscova, 2019).

Publicații la tema tezei. În baza rezultatelor studiului efectuat au fost publicate 22 de lucrări științifice, inclusiv 3 în reviste din Registrul Național al revistelor de categorie B, dintre care 1 articol fără coautor, 3 articole în reviste recunoscute, au fost obținute 12 de brevete de invenție.

Structura tezei. Lucrarea este expusă pe 162 de pagini de text și include: introducere, 4 capitole, discuții, concluzii generale, recomandări practice și bibliografie (270 de surse). Teza este ilustrată cu 26 de tabele, 50 de figuri, 4 anexe.

Cuvinte-cheie: leziunile *pemfigus-like*, regenerare, eficacitate, celule stem.

CONȚINUTUL TEZEI

INTRODUCEREA conține actualitatea temei abordată în teză. A fost efectuată o trecere succintă în revistă a datelor de ultimă oră referitor la realizările din domeniul tratamentului în pemfigusul acantolitic. Erau menționate problemele și motivele ce au determinat căutarea noilor metode de tratament. Au fost descrise proprietățile imunosupresoare ale celulelor stem. S-au indicat scopul și obiectivele tezei, noutatea științifică a rezultatelor obținute, importanța teoretică, valoarea aplicativă a lucrării și aprobarea rezultatelor.

1. CONCEPȚII DESPRE EVOLUȚIA, ETIOPATOGENIA ȘI TRATAMENTUL PEMFIGUSURILOR ACANTOLITICE

Capitolul I este dedicat analizei revistei literaturii de specialitate și include 10 subcapitole, care reflectă aspectele etiopatogenetice, clinico-diagnostice ale pemfigusurilor acantolitice, metodele de modelare a leziunilor *pemfigus-like* experimentale pe animale de laborator și strategiile de tratament cu celule stem în leziunile *pemfigus-like* experimentale. Concomitent au fost descrise viitoarele direcții de tratament ale pemfigusurilor acantolitice.

2. MATERIAL ȘI METODE DE CERCETARE

2.1. Caracteristica generală a cercetării

Pentru a realiza obiectivele cercetării, a fost planificat un studiu experimental, preclinic randomizat. Etapa I – studii preclinice pe animale de laborator.

Studiul s-a realizat în Laboratorul de inginerie tisulară și culturi celulare al USMF „Nicolae Testemițanu”. Cercetarea a fost aprobată (certificat nr. 1 din 21.09.2015) de Comitetul de Etică a Cercetării al USMF „Nicolae Testemițanu”.

Ipoteza de cercetare a inclus 4 întrebări principale, inclusiv:

- Care sunt metodele de modelare al leziunilor *pemfigus-like* experimentale pe animale de laborator?
- Implicarea componentelor C3 și C4 al complementului în evoluția leziunilor *pemfigus-like* experimentale?
- Investigarea leziunilor morfologice prin metode histologice și imunohistochimice în afecțiunile *pemfigus-like*?
- Influența celulelor stem asupra leziunilor *pemfigus-like* pe șobolanii de laborator.

Repartizarea animalelor în loturi

Pentru cercetare au fost selectate 150 de femele de șobolani albi de specie „Wistar”, cu vârsta de $4,9 \pm 0,33$ luni. Studiul s-a efectuat conform Ghidului pentru îngrijirea și utilizarea animalelor de laborator [25] (Figurile 2.1–2.3). Dozele și durata tratamentului au fost selectate în baza studiilor anterioare pe șoarece, câine, precum și a tratamentului cu MSCs la om.

Cele 150 de animale de laborator au fost repartizate în 5 loturi, în funcție de metoda de tratament:

Lot I – fără tratament, n = 30 de șobolani cu greutatea corpului - $275,7 \pm 7,1$ g;

Lot II – tratamentul cu celule stem din măduva osoasă (1×10^6 kg corp/zi), n=30 de șobolani cu greutatea corpului - $271 \pm 6,6$ g;

Lot III – terapie cu fibroblaste din embrionii de pasăre (1×10^6 /kg corp/zi), n=30 de șobolani cu greutatea corpului - $267,2 \pm 6,5$ g.

Lot IV – tratamentul cu ciclofosfamidă (40 mg/kg corp/zi), n=30 de șobolani cu greutatea corpului - $270,4 \pm 7,14$ g;

Lot V – utilizarea de metilprednizolon (100 mg/kg/ corp/zi), n=30 de șobolani cu greutatea corpului - $274,7 \pm 7,0$ g;

Bioptatele de piele de la șobolani au fost supuse examenului histologic cu hematoxină-eozină, picrofuscină, testare imunohistochimică cu AE1/AE3 a secțiunilor cutanate și reacție imunologică al serului sangvin.

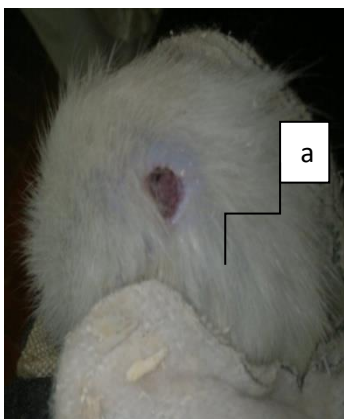


Fig. 2.1. Șobolan, din lotul I. Căderea difuză și pronunțată a părului. În regiunea botului (a) – o leziune erozivă denudată cu diametrul de 1 cm, acoperită cu cruste sero-hemoragice.



Fig. 2.2. Șobolan, din lotul II. Căderea difuză și pronunțată a părului. În regiunea spatelui – o leziune erozivă denudată cu diametrul de 1 cm, acoperită cu cruste sero-hemoragice.



Fig. 2.3. Șobolan, din lotul III. În regiunea cervicală – o leziune erozivă, acoperită cu cruste sero-hemoragice.

2.1.1. Metodele de cercetare științifică

Procesarea primară a materialului a fost similară pentru toate metodele morfologice și imunohistochimice utilizate în studiu. Procesarea mucoasei esofagului de bovină s-a efectuat în Laboratorul de inginerie tisulară și culturi celulare al USMF „Nicolae Testemițanu” (Figura 2.4).



Fig. 2.4. Separarea mucoasei de stratul submucos al esofagului de bovină

Pentru obținerea extractului proteic pe etanol, s-a folosit dispozitivul revendicat pentru prepararea țesuturilor biologice. Brevet de invenție: Dispozitiv pentru prepararea țesuturilor biologice (Figura 2.5). MD 793 (13)Y. A61C 5/02 (2006.01); A61B 10/02 (2006.01) [13].

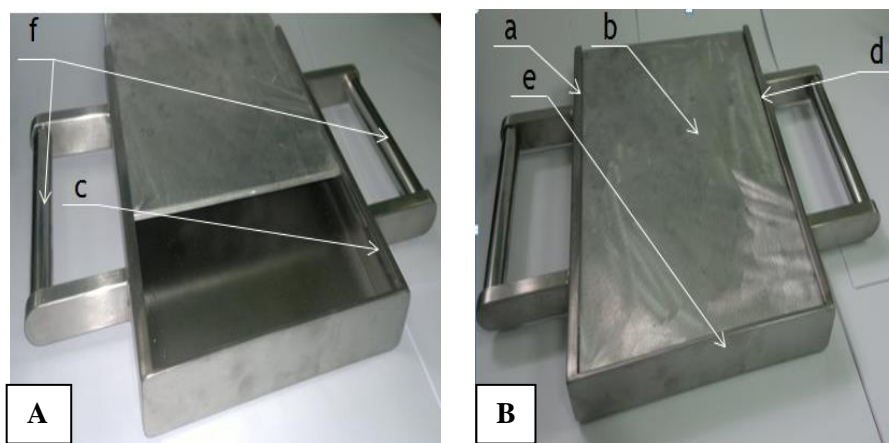


Fig 2.5. Dispozitiv pentru prepararea țesuturilor biologice: A – aspect deschis; B – aspect închis. Prezintă un rezervor (a) confecționat din inox, în formă de paralelipiped; suprafața superioară (b) a rezervorului este formată de o placă netedă dreptunghiulară confecționată din aluminiu, care, printr-un mecanism glisant de deschidere, este plasată în canale filetate (c) pe partea interioară a doi pereți laterali (d) și anterior (e) ai rezervorului. Pereții laterali ai rezervorului sunt dotați cu două mânere cilindrice (f), sudate din ambele părți la pereți.

Manoperele s-au efectuat în hota cu flux laminar. În prealabil, dispozitivul a fost supus sterilizării cu soluții dezinfectante. Concentrația proteică a fost determinată prin metoda prin metoda Lowry.

În scopul modelării leziunilor *pemfigus-like* la animale de laborator, a fost brevetată metoda de modelare a leziunilor de tipul pemfigusului [20].

2.1.2. Izolarea extractului proteic pe etanol și modelarea defectelor cutanate pemfigus-like pe șobolani

Metoda de preparare a esofagului a fost bazată pe studiile efectuate anterior.

Examenul histologic a confirmat prezența epitelului pavimentos pluristratificat nekeratinizat necesar pentru extragerea antigenelor. Proba de mucoasă a fost congelată prin stocare în frigider la $t^{\circ}-70^{\circ}\text{C}$ sau imediat utilizată. Precipitatul format la dializa a fost liofilizat (Figura 2.6).



Fig. 2.6. Extract proteic liofilizat

Bazându-ne pe studiile efectuate de C. A. Староверов și coautorii săi în anul 2013, extractul proteic solubil a fost emulsionat cu glicerină sterilă și vitamine în proporție egală.

2.2. Metodele de obținere și procesare a grefelor de celule stem

Pentru efectuarea acestei etape a studiului au fost necesari 7 șobolani și 7 embrioni de găină, de la care s-au obținut grefele celulare necesare pentru tratamentul leziunilor *pemfigus-like* modelate pe șobolani.

2.2.1. Obținerea celulelor stem din măduva osoasă

Tehnica de obținere a celulelor stem din măduva osoasă a fost bazată pe protocolul lui Фрешни, Р. Я., (2010) [34-36] (Figura 2.7).



Fig. 2.7. Izolarea celulelor stem osteomedulare din măduva osoasă a femurului și a tibiei de la șobolan cu vârstă de $4,9 \pm 0,33$ luni.

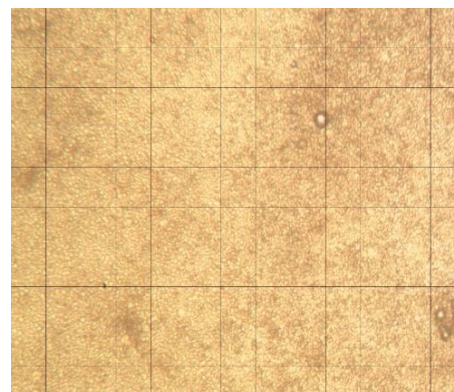


Fig. 2.8. Celule stem din măduva osoasă a femurului și a tibiei. A doua zi de cultivare, $7,2 \times 10^3$ celule/mm². $\times 140$.

2.2.2. Obținerea fibroblastelor din embrionii de găină

Obținerea culturii celulare primar-tripsinizate s-a efectuat din embrionii de găină în curs de dezvoltare (Figura 2.9).

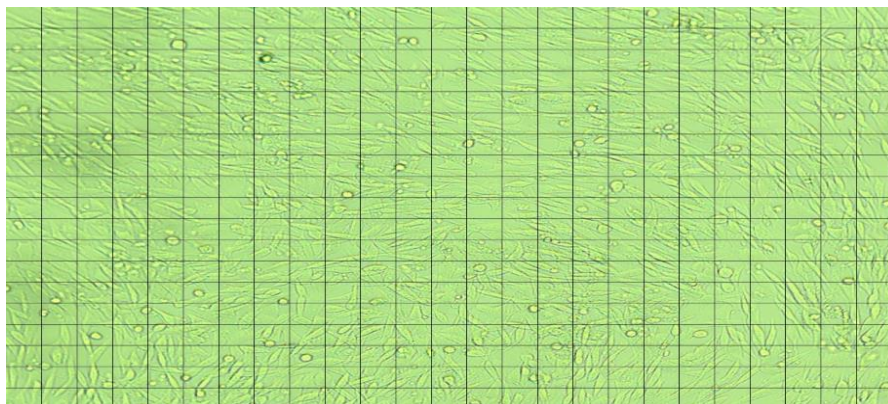


Fig. 2.9. Fibroblaste din embrionii de găină. A doua zi de cultivare, $0,86 \times 10^3$ celule/mm². $\times 140$.

2.3. Metode matematice de analiză a rezultatelor

Rezultatele au fost prezentate în valori absolute și frecvențe medii. În cursul lucrărilor, am utilizat bazele medicinei de dovezi. Au fost completate tabelele de corelație și explorat testul de semnificație Student. Mărimea intervalului de siguranță s-a calculat prin tabelul testului „t”, utilizând probabilitatea eșantionului: $P_e = m/n$ și contraprobabilitatea $q_e = 100 - P$, aplicând formula:

$$ES = \frac{\sqrt{P_e q_e}}{n} .$$

Interpretarea semnificației statistice am efectuat comparând t „calculat” cu t „tabelar” din tabelul testului „t”.

Diferențele au fost considerate statistic semnificative la un $P < 0,05$.

Metoda hot-spot este cea mai utilizată metodă manuală de cuantificare a structurilor histologice.

2.3.1. Aprecierea scorului fenotipului leziunilor pemfigus-like

Caracteristica morfometrică a leziunilor cu aspect pemfigus-like a avut ca reper scorul utilizat de Aoki-Ota M. și alții (2004). Scorul a fost util pentru a aprecia progresarea leziunilor modele pemfigus-like. Astfel, am estimat dinamica îmbolnăvirii prin calcularea numărului de leziuni la șobolani conform următorilor parametri: 0 – fără leziuni; 1 – până la 4 leziuni; 2 – mai mult de 4 leziuni sau 1-5 arii anatomice distincte; 3 – de la 6 până la 11 arii anatomice și apariția

zonelor de alopecie. A fost inclus și gradul pierderii greutatei corporale: 1 – pentru 10-20%, 2 – pentru 20-30% și 3- pentru 30-40% de pierdere în greutatea corporală.

2.3.2. Planimetrie

Investigațiile planimetrice privind dinamica epitelizării defectelor cutanate modelate s-au efectuat după metoda lui Hejda B. și Hejdova J., (1971). Procentul de reducere a suprafeții rănilor pe zi a fost estimat prin formula: $((S_1 - S_2 \times 100\%) / S_1) / St$, unde: S_1 – prima determinare; S_2 – a doua determinare a suprafeții defectului cutanat; S – numărul de zile între măsurări.

2.3.3. Metoda histologică

Pentru stabilirea afectării cutanate, 30 de secțiuni de piele au fost colorate cu hematoxilină-eozină (H-E) și picrofuxina, utilizând metoda tehnică standard.

2.3.4. Metoda imunohistochimică cu AE1/AE3 de evidențiere a keratinocitelor

Materialul destinat colorării imunohistochimice a fost prelucrat prin tehnica includerii în parafină, după care s-au practicat colorații imunohistochimice (anticorpii monoclonali panCK (clona AE1/AE3, Leica, UK)). Pentru studiul imunohistochimic s-au realizat secțiuni de 4 μ m, întinse pe lame de sticlă pretratate cu poly-L-lysine, după care pentru demascarea markerilor specifici s-a folosit Streptavidin-Biotină (sABC)/Horse Radish Peroxidase (HRP).

2.3.5. Studiarea componentelor C3 și C4 al complementului

Determinarea componentelor C3 și C4 ale complementului (Complement Component C3, Ref 31084. Lot 04689, Complement Component C4, Ref 31085. Lot 01507, BioSystems, Costa Brava Barcelona, Spain) a fost efectuată prin metoda fotometrică, cu analizatorul KONELAB 30i (TermoFischer, Finlanda), în laboratorul EuroLab.

2.3.6. Explorarea reacțiilor de comportament la șobolani

Pentru a determina caracteristicile individuale de afectivitate ale animalelor, am folosit un inel alb pentru a crea o arenă rotundă, cu diametrul de aproximativ de 90 cm și înălțimea pereților laterali de 50 cm. Activitatea (IPA) al fiecărui animal a fost clasificată: activitate scăzută – mai mică de 2; activitate medie – 2-3; activitate înaltă – mai mare de 4.

3. CARACTERIZAREA LEZIUNILOR PEMFIGUS-LIKE PE MODELELE DE ANIMALE EXPERIMENTALE

Studiul efectuat a avut menirea să aprecieze leziunile *pemfigus-like* și să stabilească evoluția modificărilor simulate pe pielea șobolanilor după aplicarea tratamentului cu celule stem.

3.1. Calcularea scorului leziunilor *pemfigus-like*

În acest studiu a fost stabilit scorul pentru fiecare șobolan cu leziuni *pemfigus-like* și repartizarea lor în raport cu clasificarea Aoki-Ota M. și alții (2004). Scorul leziunilor *pemfigus-like* s-a apreciat prin sumarea numărului de afecțiuni la șobolani. Astfel, au fost determinate cele patru modificări, după care s-a apreciat gradul de inducere a maladei.

Rezultatele scorului evaluate în studiu

Severitatea bolii a fost evaluată conform indicelui de activitate a pemfigusului modelat pe șobolani. Au fost studiați patru parametri: prezența eroziunilor alopecie, alungirea dinților anteriori și scăderea greutatei corporale. Zonele selectate au fost: 10 arii pentru eroziuni, 5 arii pentru alopecie. Fiecărei locații i s-au atribuit 1, 2, 3 puncte corespunzător. Scorul a fost apreciat pentru gradarea detaliată a progresiei bolii, unde un punctaj mai mare semnifică o evoluție mai gravă a bolii în lot. Scorul severității bolii s-a estimat conform următorilor parametri: 0 – fără leziuni; 1 – până la 4 leziuni; 2 – mai mult de 4 leziuni sau 1 – 5 arii anatomice distincte; 3 – de la 6 la 11 arii anatomice. Conform scorului, la animalele de laborator s-a apreciat apariția alopeciei. Scorul a avut un punctaj de 0 – 33, permițând evaluarea detaliată a activității bolii. Totodată, aceasta nu a inclus analiza fenomenului Nykolski, imunofluorescența directă, indirectă sau ELISA.

3.2. Studiarea componentelor C3 și C4 al complementului

Printre valorile de laborator privind starea șobolanilor albi cu leziuni *pemfigus-like* la acțiunea intracutanată a extractului proteic pe etanol din mucoasa esofagului de bovină, în studiul experimental randomizat au fost cercetați și parametrii rezistenței naturale – concentrația componentelor C3 și C4 ale complementului.

3.3. Evaluarea greutății corporale

Gradul pierderii greutății corporale a fost deasemenea, apreciat conform următoarei clasificări: 1 – pentru 10-20% pierdere din greutate, 2 – pentru 20-30%, 3 – mai mult de 30%.

La începutul experimentului au fost măsurate greutatea corporală la 150 de șobolani și valoarea medie a ei.

Prin urmare, după 16 săptămâni de la inițierea simulării defectelor *pemfigus-like* la animale, valoare medie a greutateații a scăzut până la $197,97 \pm 2,1$ g, ceea ce corespunde cu $2,6 \pm 0,09$, conform clasificării Aoki-Ota M. și alții (2004).

3.4. Estimarea planimetrică a defectelor cutanate modelate

Planimetria defectelor cutanate modelate a relevat suprafața leziunii cutanate restante în lipsa tratamentului. A fost evaluată extinderea defectului cutanat prin proporționarea primei valori de greutatea secțiunii peliculei pătrate standard ($m_{st.}$) pe cea de a doua (m), cu o ulterioară înmulțire cu suprafața preventiv cunoscută a peliculei pătrate standard ($S=a^2$): $(m_{st.}:m)Xs$.

În lotul I valoarea medie a suprafeței defectului cutanat este $9,21 \pm 0,18$ mm², și astfel, cu o diferență nesemnificativă ($P=1,64$, $P>0,05$) față de suprafața valoarea suprafeței leziunii *pemfigus-like* în lotul II ($9,73 \pm 0,26$ mm²). În lotul II valoarea s-a deosebit semnificativ ($P=2,31$, $P<0,05$) de valoarea lotului III cu suprafața plăgii de $8,92 \pm 0,2$ mm². Valoarea suprafeței plăgii s-a deosebit semnificativ ($P=3,0$, $P>0,01$) de cea din lotul IV cu extinderea plăgii de $9,7 \pm 0,18$ mm². Suprafața plăgii din lotul IV nu s-a deosebit semnificativ ($P=0,69$, $P<0,05$) de cea din lotul V ($9,11 \pm 0,19$ mm²).

3.5. Studiarea histologică a leziunilor experimentale

3.5.1. Evaluarea loturilor șobolanilor cu leziuni pemfigus-like

Noi am estimat grupe de animale în funcție de regiunile afectate ale corpului.

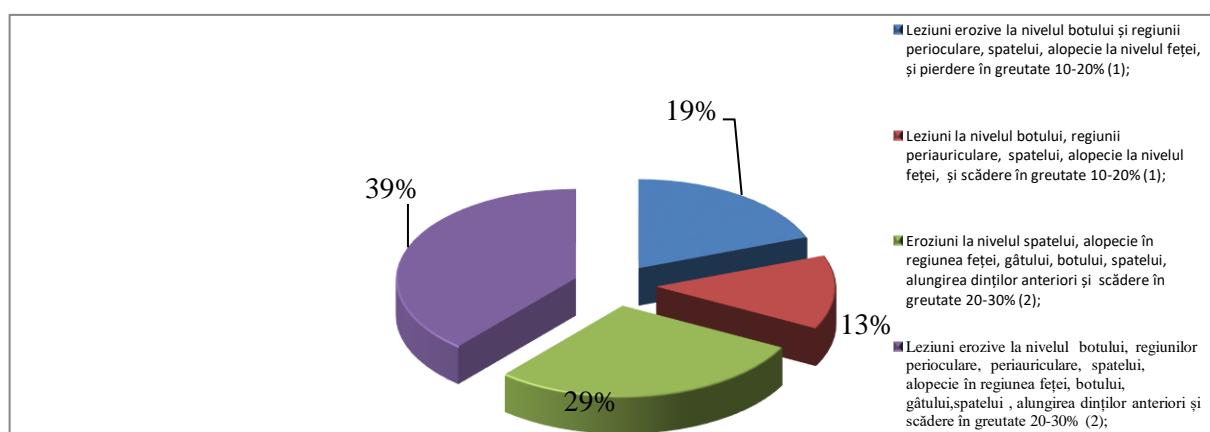


Fig. 3.1. Repartizarea animalelor în funcție de regiunea afectată (%)

Conform Figurii 3.1. leziunile erozive la nivelul botului, regiunii perioculare, spatele, alopecie la nivelul feței și pierderea în greutate cu 10-20% (1) au fost prezente la 29 ($19,3 \pm 3,2\%$) de animale. Leziuni la nivelul botului, regiunii periauriculare, spatelui, alopecie la nivelul feței și pierdere în greutate cu 10-20% (1) au avut 20 ($13,3 \pm 1,6\%$) de animale. Eroziuni la nivelul spatelui, alopecie în regiunea feței, gâtului, botului, spatelui, alungirea dinților anteriori și scădere în

greutate cu 20-30% (2) au fost observate la 43 (28,6±3,7%) de animale. În lotul cu leziuni erozive la nivelul botului, regiunilor perioculare, periauriculară, spatelui, alopecie în regiunea feței, botului, gâtului, spatelui, alungirea dinților anteriori și scădere în greutate cu 20-30% (2) au fost repartizate 58 (38,6±4,0%) de animale. Diferența dintre rezultate a fost semnificativă ($P>0,001$) din punct de vedere statistic. Vârsta medie a animalelor a fost $4,9\pm0,33$ luni.

Studiul histopatologic a avut drept scop analiza parametrilor morfologici ai elementelor din leziunile cutanate modelate – prin evaluare macroscopică (suprafața defectului cutanat modelat) și microscopic (modificările morfologice la nivelul epidermului și dermului, aspectul microscopic al celulelor).

3.5.2. Rezultatele investigației histologice ale secțiunilor de piele

În lotul I de la șobolanii cu leziunile *pemfigus-like* fragmentul de piele s-a prelevat din regiunea labei drepte posterioare, cu leziuni erozive și un exsudat sero-hemoragic, la a 16-a săptămână de la injectarea extractului etanolic din mucoasa esofagului de bovină. Suprafața plăgii a constituit 7 mm^2 , (19 șobolani ($63,3\pm1,6\%$)). Histologic stratul granular și spinos supus acantolizei (a), formarea elementelor buloase (b), bule cu conținut seros (c), bule nou-formate (d), glande sebacee formate din acinuși (e) (Figura 3.2).

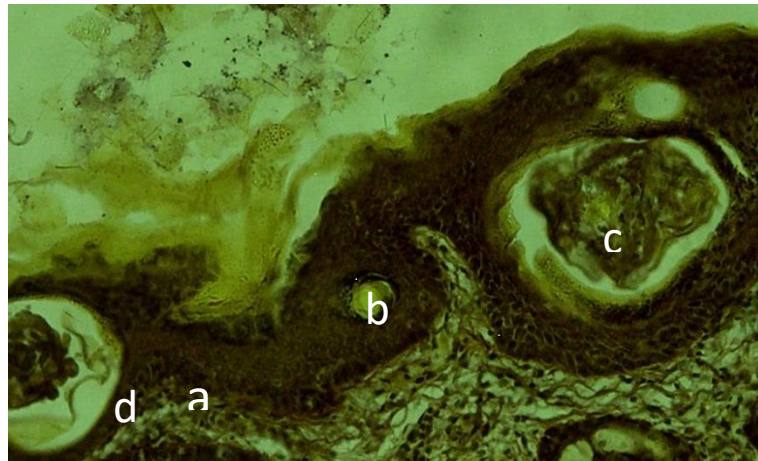


Fig. 3.2. Formarea elementelor buloase în pielea afectată la a 16-a săptămână de la injectarea extractului etanolic din mucoasa esofagului de bovină. Stratul granular și spinos supus acantolizei (a), formarea elementelor buloase (b), bule cu conținut seros (c), bule nou-formate (d), glande sebacee formate din acinuși (e). H-E, $\times 140$. (Șobolan din lotul I).

În lotul II de la șobolanii cu leziuni cutanate *pemfigus-like*), țesutul s-a prelevat din regiunea spatelui, unde erau prezente focare lipsite de blană, suprafața medie $9,5\text{ mm}^2$, la a 18-a săptămână

de la injectarea extractului etanolic din mucoasa esofagului de bovină. Ostiumul foliculului pilos a fost păstrat, la 30 de animale ($20 \pm 3,3\%$), epitelocitele stratului granular și spinos erau supuse acantolizei (a), formarea elementelor buloase (b), bule cu conținut seros (c), bule nou-formate (d) în regiunea de alopecie.

3.6. Studiarea imunohistochimică cu AE1/AE3 a leziunilor cutanate *pemphigus-like* modelate

Rezultatele obținute au fost evaluate statistic conform metodelor de cercetare utilizate în biostatistică (Larisa Spinei și alții. Biostatistică, 2009) [37].

În loturile I și II animalele cu leziunile *pemphigus-like*, (30 de șobolani ($20 \pm 3,3\%$)), imunohistochimic s-au evidențiat modificări de tip reacție intens pozitivă (+++) la nivelul secțiunii cutanate afectate (Figura 3.3).

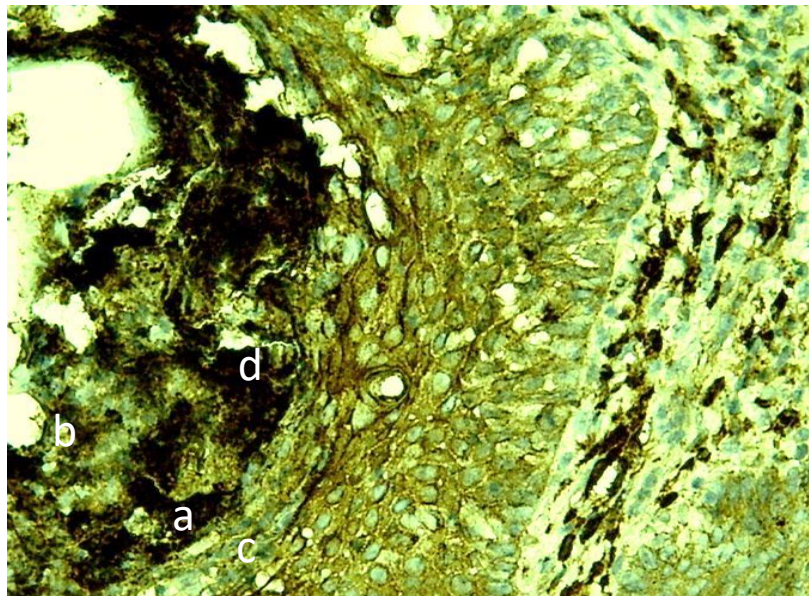


Fig. 3.3. Pielea șobolanilor cu leziuni cutanate *pemphigus-like* buloase și infectate, la a 16-a săptămână de la injectarea extractului etanolic din mucoasa esofagului de bovină. Peretele bulei – îngroșat (a), conținutul bulei – cu infiltrat inflamator având o reacție intens pozitivă (+++) (b); toate straturile epidermului au prezentat o intensitate de colorare intens pozitivă difuză (c), acantoliza celulelor spinosase (d). AE1/AE3, $\times 140$. (Șobolan din lotul I).

3.7. Reacțiile comportamentale ale șobolanilor cu leziuni *pemphigus-like*

În studiu am explorat intensitatea fricii la a 18-a săptămână de modelare a leziunilor *pemfigus-like*, care a fost provocată de sindromul algic. Totodată am reflectat starea emoțională a animalelor. Prin urmare, după folosirea testului „Câmp deschis” ca un simplu chestionar, a fost apreciată afectivitatea.

Parametrii de analiză IPA au indicat că principală manifestare a comportamentului animalelor a fost imobilitatea pe suprafața terenului, măsurată în timpul de liniște (în secunde).

Din numărul total de manifestări (100%), reacție sub formă de ridicări a fost de numai $23,1 \pm 7,4\%$, în timp ce căutarea găurii – de $16,43 \pm 6,8\%$ din totalul activității.

La animalele din loturile experimentale au fost identificate simptomele fricii și un nivel mai ridicat de anxietate, datorită faptului că reacția de imobilitate a constituit $32,4 \pm 8,5\%$ din activitatea totală.

Reacția de imobilizare a șobolanilor ($32,4 \pm 8,5\%$) a fost interpretată ca un simptom al fricii. În același timp, numărul defecațiilor ($4,1 \pm 7,3\%$) și perioada de autoîngrijire (grooming) ($7,81 \pm 4,9\%$) au crescut. Nivelul înalt al defecațiilor ($4,1 \pm 7,3\%$) a fost considerat un indice al „emoționalității” animalului, iar prelungirea perioadei de autoîngrijire ($7,81 \pm 4,9\%$) – un indice al anxietății. Activitatea șobolanilor era scăzută ($1,7 \pm 0,005$).

4. EVALUAREA EFICACITĂȚII TRATAMENTULUI CU CELULE STEM PE MODELE DE ANIMALE CU LEZIUNI *PEMFIGUS-LIKE* INDUSE

4.1. Distribuția eșantionului general

Repartizarea animalelor în loturi s-a efectuat aleatoriu.

Loturile de animale au fost identice în aspectul dimensiunii eșantionului.

4.2. Evaluarea scorului leziunilor *pemfigus-like*

De menționat, că animalele de laborator cu leziuni modelate au beneficiat de tratament la a 16-a săptămână după instalarea leziunilor *pemfigus-like*. Supravegherea animalelor s-a efectuat la 16, 32 și 48 de zile de la inițierea terapiei.

După administrarea celulelor stem alogene din măduva osoasă (BM-MSCs) (1×10^6 kg/zi), scorul leziunilor *pemfigus-like* la șobolani a scăzut semnificativ ($P=18,6$, $P<0,001$, 16 zile), față de scorul din lotul-martor (lotul I) care nu au primit tratament. Scăderea greutatei corporale în aceste două loturi a avut o diferență statistic semnificativă ($P=6,5$, $P<0,001$, 16 zile).

În cazul utilizării culturii celulare de fibroblaste izolate din embrionii de găină. (1×10^6 kg/zi), scorul leziunilor ($P=1,96$, $P>0,001$, după 16 zile) s-a redus nesemnificativ față de lotul-martor, care nu a primit nici un tratament. Totodată, diferența dintre diminuarea greutatei corporale în loturile I și III a fost nesemnificativă ($P=1,63$, $P>0,05$, 16 zile de la începutul tratamentului).

În lotul în care s-a utilizat tratamentul cu ciclofosamidă (40 mg/kg corp/zi), scorul defectelor modelate la șobolani a scăzut semnificativ ($P=16,21$, $P<0,001$, după 16 zile de la începutul tratamentului) față de scorul în lotul martor. De asemenea, din punct de vedere statistic, diferența dintre parametrii de pierdere a greutatei corporale în aceste două loturi a fost semnificativă ($P=3,46$, $P<0,01$, după 16 zile de la începutul tratamentului).

În urma administrării soluției de acetat de metil-prednisolon (mPs) intraperitoneal, în doză de 100 mg/zi, la supravegherea șobolanilor după 16 zile, scorul leziunilor *pemfigus-like* era semnificativ scăzut ($P=4,58$, $P<0,001$, 16 zile), față de scorul în lotul I (martor), unde în decursul experimentului animalele nu au primit nici un tratament. Dar, diferența dintre parametrii de scădere a greutatei corporale în aceste două loturi a fost semnificativă ($P=3,49$, $P<0,01$, 16 zile).

4.3. Modificarea greutății corporale

Indicele pierderii greutății corporale a fost de asemenea apreciat conform următoarei clasificări: 1 – pentru 10-20% de pierdere din greutate, 2 – pentru 20-30% și 3 – mai mult de 30%.

De asemenea am studiat greutatea corpului în fiecare lot. Valoarea medie a greutății corpului animalelor din eșantionul total la începutul tratamentului a constituit $197,97 \pm 2,1$ g, ceea ce a corespuns cu $2,6 \pm 0,09$, conform scorificării. Efectele tratamentului asupra masei corporale a animalelor experimentale au fost studiate la 16, 32 și 48 de zile de la inițierea terapiei.

În ziua a 16-a zi, valoarea medie a scorului greutății ($2,46 \pm 0,091$) în lotul I fără tratament a rămas semnificativ înaltă ($P > 0,001$) față de scorul în lotul II ($1,2 \pm 0,17$), lotul III ($2,2 \pm 0,13$), lotul IV ($1,73 \pm 0,19$) și diferă nesemnificativ față de valoarea scorului în lotul V ($2,1 \pm 0,05$). În ziua a 32-a, scorul a rămas neschimbat în lotul I ($2,46 \pm 0,091$) și crește semnificativ ($P < 0,001$) până în ziua a 48-a, ($2,7 \pm 0,083$). În lotul II, greutatea corpului scade semnificativ ($P < 0,001$), până în ziua a 48-a de supraveghere ($0,4 \pm 0,087$). Animalele din lotul III, de asemenea au adăugat semnificativ ($P < 0,001$) în greutate, în ziua 32 și 48, scorul fiind $2,2 \pm 0,13$ și $2,03 \pm 0,13$. Și șobolanii din lotul IV au adăugat semnificativ ($P < 0,001$) în greutate, scorul micșorându-se de la $1,3 \pm 0,19$ până la $0,67 \pm 0,14$. Șobolanii din lotul V și-au schimbat greutatea nesemnificativ ($P > 0,05$) în zilele 32 și 48.

4.4. Dozarea complementului

La începutul tratamentului cu celule stem din măduvă osoasă în lotul II experimental, pe parcursul a 16 zile concentrația C3 a complementului a fost de $1,69 \pm 0,009$ g/l. Prin urmare, după tratamentul cu celule stem din măduvă osoasă (1×10^6 celule/kg corp/zi), în ziua a 16-a, concentrația C3 a crescut, fiind $2,1 \pm 0,014$ g/l ($P < 0,001$). Ulterior, în ziua 32 și 48, nivelul C3 al complementului în serul sangvin a revenit în limitele normale, constituind $2,51 \pm 0,015$ g/l și $2,81 \pm 0,02$ g/l. Diferența dintre rezultatele obținute a fost statistic semnificativă ($P < 0,001$).

4.5. Dinamica leziunilor cutanate

Conform cerințelor, investigația planimetrică a plăgilor se recomandă să fie efectuată la fiecare 3-4 zile, pentru a releva dinamica activității reparatorii a plăgilor.

În urma tratamentului cu celule stem suprafața (1×10^6 celule/kg corp/zi) defectelor cutanate modelate ($4,95 \pm 0,31$ mm²) în lotul II s-a micșorat cel mai semnificativ ($P = 11,02$, $P > 0,001$, 8 zile).

Dinamica a fost calculată la fiecare 3-4 zile a activității reparatorii a plăgilor, relevată în procente.

După 16 zile de tratament cel mai bun rezultat a fost obținut în lotul II (6,14%) ,tratată cu celule stem (1×10^6 celule/kg corp/zi) alogene, izolate din măduvă osoasă.

4.6. Evaluarea schimbărilor morfologice în secțiunile histologice ale pielii

Durata terapiei cu celule stem osteomedulare și cu metil-prednisolon a constituit 4 săptămâni. Ciclofosfamida a fost administrată 3 zile pe săptămână, timp de 5 săptămâni. Puls-terapia s-a efectuat conform standardelor folosite la oameni. Pe parcursul tratamentului, în zilele a 16-a, a 32-a, și a 48-a, din fiecare lot câte 3 șobolani au fost scoși din experiment pentru studiul patomorfologic.

În lotul I, animalele experimentale, care nu au beneficiat de tratament, la a 24-a săptămână de la injectarea extractului pe etanol din mucoasa esofagului de bovină au prezentat leziunile *pemfigus-like* neschimbate. Pe secțiunile colorate cu picrofuxină, s-au vizualizat celulele stratului spinos și granular – tumefiate și hipertrofiate (a), teaca fibroasă a fost detașată de teaca epitelială externă (b), loja foliculului pilos – lipsită de firul de păr cu conținut de fibrină și mase proteice (c), foliculul pilos – intact (d), acinusul glandelor sebacee – lângă foliculul pilos (e) (Figura 4.1).

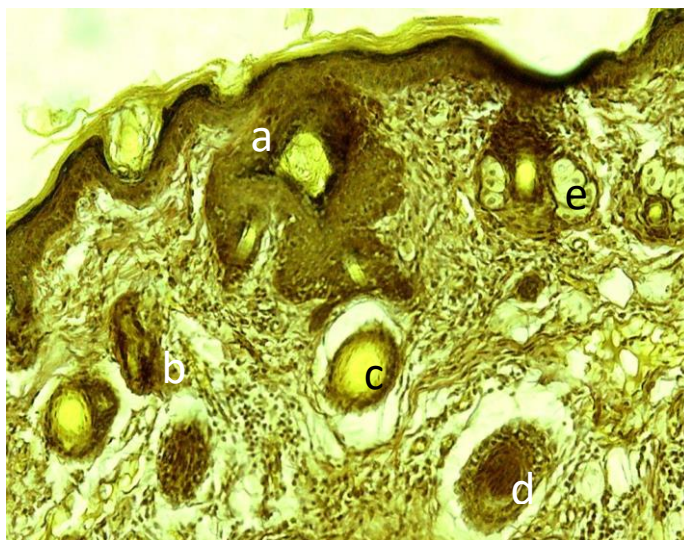


Fig. 4.1. Afectarea *pemfigus-like* a foliculilor piloși ai pielii la șobolani din lotul fără tratament, la a 24-a săptămână de la injectarea extractului etanolic din mucoasa esofagului de bovină. Keratinocitele din stratul spinos și granular – tumefiate și hipertrofiate (a), teaca fibroasă – dezlipită de teaca epitelială externă (b), loja foliculului pilos – lipsită de firul de păr cu conținut de fibrină și mase proteice (c), foliculul pilos – intact (d), acinus glandelor sebacee – lângă foliculul pilos (e). Picrofuxină, $\times 140$. (Șobolan din lotul I).

În lotul I, animale în săptămâna a 33-a de maladie, (3 animale ($10 \pm 5,5\%$)), histologic se descrie infectarea leziunilor erozive, hipertrofierea și tumefierea celulelor spinoase și granulare cu acantoliză (a), formarea bulelor (b) cu conținut inflamator nespecific leucocitar (c), infiltrat inflamator perivezicular (d) (Figura 4.2).



Fig. 4.2. Infectarea bulei în săptămâna a 33-a de maladie. Hipertrofierea și tumefierea celulelor spinoase și granulare cu acantoliză (a), formarea bulelor (b) cu conținut inflamator nespecific leucocitar (c), infiltrat inflamator (d). Picrofuxina, $\times 140$. (Șobolan din lotul I).

În lotul II animale cu leziunile *pemfigus-like* au primit tratamentul cu celule stem derivate din măduvă osoasă în cantitatea de 1×10^6 celule/kg corp/zi, intraperitoneal, timp de 4 săptămâni. Fragmentul cutanat a fost prelevat în a 16-a și a 32-a de tratament cu celule stem. (3 șobolani ($10 \pm 5,5\%$)). Histologic s-a descris: epidermul cu toate straturile intacte (a), limfocite solitare în hipoderm (b), glande sebacee (c) cu teaca foliculului pilos (d) (Figura 4.3). De asemenea modificări de epitelizare, formarea unei pelicule de fibrină, tracțiunea marginelor plăgii, stoparea exudației, recreșterea firelor noi de blană, (9 animale ($6,0 \pm 1,9\%$)), histologic, epidermul cu toate straturile intacte (a), stratul bazal a fost format din keratinoblaste uniforme (b), urmat de keratinocite spinoase (c), celule granulare solitare (d), stratul lucid a fost ușor îngroșat, stratul cornos – cu hiperkeratoză (e), limfocite solitare, în hipoderm (f), glande sebacee ce comunică (g) cu foliculul pilos (h). H-E, $\times 140$. (Figura 4.4).

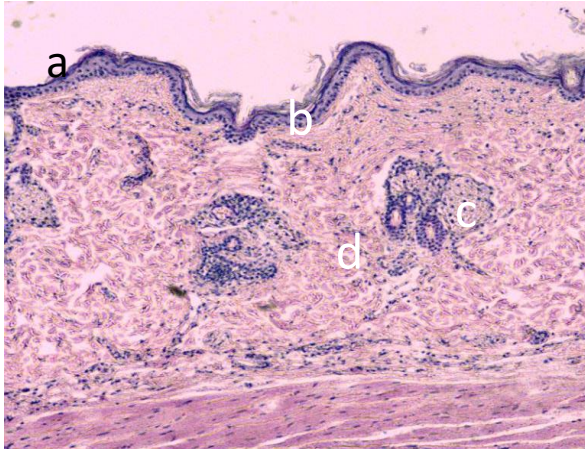


Fig. 4.3. Bioptatul de piele prelevat de la șobolan cu leziunile *pemphigus-like* după tratamentul cu celule osteomedulare în a 16-a zi. Epidermul cu toate straturile intacte (a), limfocite solitare în hipoderm (b), glande sebacee ce comunică (c) cu foliculul pilos (d). H-E, × 90. (Șobolan din lotul II).

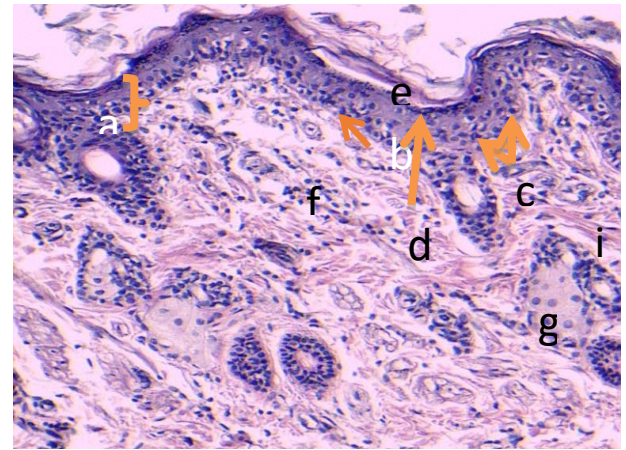


Fig. 4.4. Bioptatul de piele prelevat de la șobolani cu leziunile *pemphigus-like* tratați cu celule stem osteomedulare, în a 32-a zi. Epidermul cu toate straturile persistente (a); stratul bazal a fost format din keratinoblaste uniforme (b), urmat de keratinocite de structură spinoasă (c), celule granulare solitare (d), stratul lucid a fost ușor îngroșat, stratul cornos – cu hiperkeratoză (e), limfocite solitare, în hipoderm (f), glande sebacee ce comunică (g) cu foliculul pilos (i). H-E, × 140. (Șobolan din lotul, II).

4.7. Evaluarea imunohistochimică cu AE1/AE3 a keratinocitelor

Lotul II și IV a inclus 16 animale: lotul II – 9 animale (6,0±1,9 %) și lotul IV – 7 animale (4,6±1,7 %) cu modificări de tip reacție de intensitate slabă (+) la nivelul secțiunii cutanate afectate, la a 32-zi de tratament (Figura 4.5).

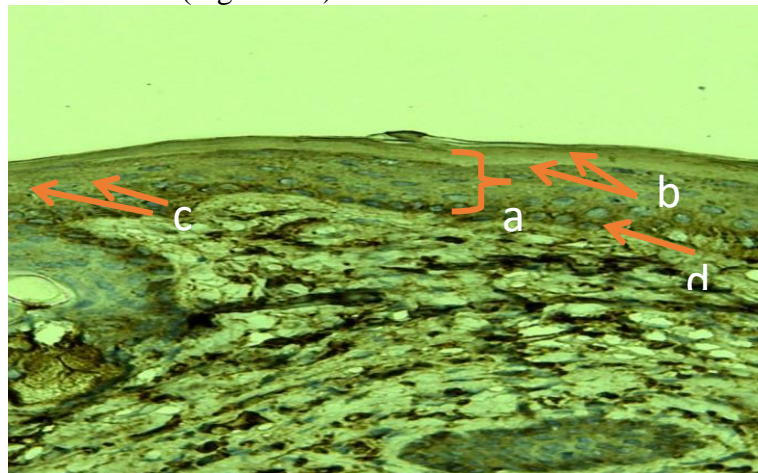


Fig. 4.5. Pielea șobolanilor afectați de pemfigus la etapa de epitelizare, la a 32-zi de tratament. Straturile colorate slab (+) (a), straturile lucid și cornos sunt îngroșate (b), straturile spinos și granular erau formate de celule clar evidențiate (c), stratul bazal a avut o reacție moderată de colorare (++) (d). AE1/AE3, × 140. Șobolan din lotul II).

Au fost puse în evidență toate straturile colorate slab (+) (a), straturile lucid și cornos au fost îngroșate (b), straturile spinos și granular au fost formate de celule clar evidențiate (c), stratul bazal a avut o reacție moderată de colorare (++) (d) .

4.8. Dinamica comportamentului șobolanilor după tratament

Caracteristica IPA a arătat că principală manifestare comportamentală a animalelor, care descrie starea de bine, este activitatea motorie (locomoție) pe suprafața terenului, măsurată prin numărul de pătrate traversate.

În lotul II la șobolani activitatea motorie a fost cea mai semnificativ crescută ($P < 0,05$) și a constituit $32,2\% \pm 19,01$. Perioadele de îngrijire au fost destul de rare și de scurtă durată, ($3,7\% \pm 7,7$) din totalul activității. Numărul defecațiilor de asemenea a scăzut până la $1,4\% \pm 4,8$ din activitatea totală.

Prin urmare, cea mai scăzută activitate (1,8) era în lotul I, și o activitate medie (2,1) – în lotul III, 3,4 – în lotul IV, 2,05 – în lotul V. Cel mai înalt indice de activitate a fost observat în lotul II (4).

CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI

Concluzii

1. Metoda imunologică de modelare pe șobolani a leziunii *pemfigus-like* a fost cea mai reușită în loturile II și V în proporție de $43,3 \pm 9,04\%$. Animalele au prezentat fenotipul asemănător pemfigusului acantolitic la om, astfel acest model este binevenit de a fi utilizat pentru cercetări experimentale, preclinice în domeniul etiologiei și tratamentului leziunilor *pemfigus-like*.

2. Animalele experimentale la care au fost induse leziunile *pemfigus-like* au prezentat numeroase leziuni buloase pe piele în $67,3 \pm 4,0$ cazuri, scăderea de greutate cu 20-30% , alungirea dinților anteriori în $67,3 \pm 4,0$ cazuri și sporirea semnificativă a scorului leziunilor *pemfigus-like*.

3. Datele examenului histopatologic au relevat schimbări în straturile granular și spinos cu formarea leziunilor buloase – un tablou acantolitic (*pemfigus-like*).

4. Modelul de pemfigus a demonstrat o corelație strânsă între progresarea bolii, și scăderea nivelului componentelor C3, C4 ale complementului în serul sangvin, ceea ce dovedește caracterul imun al leziunii.

5. Investigația imunohistochimică cu AE1/AE3 a epitelului lezat confirmă simptomele de pemfigus acantolitic avansat, reprezentate printr-o reacție de colorare a citoplasmei keratinocitelor, cu expresia citokeratinei și în straturile spinos și granular ale epitelului pluristratificat.

6. Studiul comparativ al efectului terapeutic al ciclofosfamidei și metil-prednisolonului, a celulelor alogene din măduvă osoasă și a celulelor xenogene din embrioni de pasăre, utilizate în tratamentul leziunilor *pemfigus-like* la șobolani în loturile experimentale, a demonstrat că celulele stem mezenchimale din măduva osoasă au o acțiune mai benefică în tratamentul acestor leziuni.

Recomandări practice

1. Modelarea pe șobolani a leziunii *pemfigus-like* poate fi obținută prin imunizare locală, injectând intracutanat antigenul heterolog, reproducând reacție experimentală autoimună împotriva antigenelor native la șobolani.

2. Deoarece autoanticorpii în pemfigusul autoimun sunt direcționați către antigene specifice țesutului, lansarea reacțiilor autoimune în producerea leziunilor *pemfigus-like* pe pielea șobolanilor poate fi prin impunerea sistemului imun să reacționeze încrucișat cu antigenul similar al structurii plăcii desmozomale, prin injectarea intracutanată a extractului de esofag la fiecare 14 zile, repetat de 12 ori;

3. Se recomandă ca extractul proteic utilizat pentru modelarea leziunilor *pemfigus-like* să fie obținut dintr-o secțiune de epiteliu. Drept surse pot fi: esofag sau epiteliul buzelor de bovină,

cobai, iepure, maimuță sau pielea umană, care se utilizează ca substrat pentru producerea autoanticorpilor în pemfigusul autoimun.

4. Pentru a preveni degradarea și resorbția rapidă al extractului în pielea șobolanilor și a potenția acțiunea lui imunogenică este necesar de utilizat amestecul de glicerină sterilă și vitamina A.

5. Acest model experimental pe șobolani a leziunilor *pemfigus-like* poate fi folosit în domeniul medicinei regenerative și dermatologiei experimentale pentru studierea proceselor patofiziologice în pemfigusul autoimun și testarea noilor metode de tratament.

6. Pentru evaluarea procesului patologic reprodus pe modelul animal a leziunilor *pemfigus-like* se recomandă de apreciat corelația dintre doza extractului proteic pe etanol, administrat intracutanat animalelor, scorul, planimetria defectelor cutanate și fenomenul Nikolski.

7. Pentru obținerea extractului proteic pe etanol, se recomandă de utilizat esofagul prelevat recent în primele 24 de ore de la animalul sacrificat în abator. În așa mod noi evităm degradarea enzimatică a proteinelor în material.

8. În cazul dacă esofagul de bovină nu se utilizează complet, se recomandă că acesta să fie stocat în frigider la -70 C. Această condiție ne permite să evităm formarea cristalelor de gheață care lezează membranele celulare în material.

10. Având în vedere masa moleculară a desmogleinelor în spațiile intercelulare la nivelul epidermului care constituie 130-165 kDa, extractul proteic pe etanol a fost dializat prin membrană de dializă cu latimea porilor de 35 mm și permeabilă pentru molecule cu masa mai mică de 12 kDa.

BIBLIOGRAFIE

1. ABOOBAKER, J., MORAR, N., RAMDIAL, P. K. et al. Pemphigus in South Africa. In: Int. *J. Dermatol.*, 2001, vol. 40. no 2, p. 115-119.
2. ALSALEH, Q., NANDA, A., AL BAGHLI, N.M. et al. Pemphigus in Kuwait. In: Int. *J. Dermatol.*, 1999, vol. 38. no 5, p. 351-356.

3. HAFEEZ, Z.H. Pemphigus in Pakistan, a study of 108 cases. In: *J. Pak. Med. Assoc.*, 1998, no 1, vol. 48, p. 9-10.
4. HANS-FILHO, G. DOS SANTOS, V., KATAYAMA, J. H. et al. An active focus of high prevalence of fogo selvagem on an Amerindian reservation in Brazil. In: *J. Invest. Dermatol.*, 1996, vol. 107, no 1, p. 68-75.
5. MAHÉ, A., FLAGEUL, B., CISSÉ, I. et al. Pemphigus in Mali: a study of 30 cases. In: *Br. J. Dermatol.*, 1996, vol. 134, no 1, p. 114-119.
6. SALMANPOUR, R., SHAHKAR, H., NAMAZI, M. R. et al. Epidemiology of pemphigus in south-western Iran: a 10-year retrospective study (1991–2000). *Int. J. Dermatol.*, 2006, vol. 45, no 2, p. 103-105.
7. НЕБРА, Ф. Руководство по изучению болезней кожи (русский перевод). Санкт-Петербург: 1876, с. 781.
8. KAPOSÍ, M. Über den gegenwärtigen Stand der Lehre vom Pemphigus. In: *Arch. f. Dermat. u. Syph.*, 1896, 34, p. 89-92.
9. JEAN, L. BOLOGNIA. Pemphigus vulgaris. In: *Dermatology*, 2nd ed, 2008, p. 383-385.
10. THOMAS, K. Therapy of Skin Diseases: In: *A Worldwide Perspective on Therapeutic Approaches and Their Molecular Basis. 1st Edition*, 2010. p. 391.
11. BASSAM, Z.. Pemphigus vulgaris. Treatment and Management. In: *Dermatology*, 2018. Medscape, 2018, p. 365- 378.
12. КИСЕЛЕВ, Е.В. Сравнение дифференцировочных потенциалов фибробластоподобных клеток стромы костного мозга, жировой ткани, волосяного сосочка и фибробластов дермы человека. В: *Цитология*, 2009, т. 51, ном 1, с. 12.
13. Brevet de invenție. 793 (13)Y, MD, A61C 5/02. Dispozitiv pentru prepararea țesuturilor biologice / **Olga Macagonova**, Viorel Nacu, Adrian Cociug (MD)/ Cererea depusă 13.01.2014, *BOPI* nr. 7/2014.
14. Brevet de invenție. 866 (13)Y, MD, A61B 17/56. Dispozitiv pentru prepararea țesuturilor biologice / **Olga Macagonova**, Viorel Nacu. Adrian Cociug (MD). Cererea depusă 01.08.2014, *BOPI* nr. 1/2015.
15. Brevet de invenție. 867 (13)Y, MD, A61B 10/02. Dispozitiv pentru secționarea țesuturilor biologice / Adrian Cociug , **Olga Macagonova**, Nicolae Caproș ș. a. (MD). Cererea depusă 08.01.2014, *BOPI* nr. 1/2015.
16. Brevet de invenție. 868 (13)Y, MD, A61B 17/56. Dispozitiv pentru fixarea grefei osoase / Adrian Cociug, **Olga Macagonova**, Eremia Zota ș. a. (MD). Cererea depusă 22.08.2014, *BOPI*, nr. 1/2015.

17. Brevet de invenție. 905 (13)Y, MD, A61B 10/00. Dispozitiv pentru separarea țesuturilor biologice / **Olga Macagonova**, Ion Ababii, Adrian Cociug ș. a. (MD). Cererea depusă 12.12.2014 *BOPI*, nr. 5/2015.
18. Brevet de invenție. 915 (13)Y, MD, A61B 17/00. Dispozitiv pentru curățarea oaselor tubulare de măduva osoasă / Adrian Cociug, Viorel Nacu, Nicolae Caproș, Eremie Zota, **Olga Macagonova** (MD). Cererea depusă 12.03.2014 *BOPI*, nr. 6/2015.
19. Brevet de invenție. 939 (13) Y (51), MD, A61B 19/00. Dispozitiv pentru decelularizarea țesuturilor biologice / Alexandru Ursu, **Olga Macagonova**, Viorel Nacu ș. a. (MD). Cerere depusă 04.172015. *BOPI*, nr.8/2015, p.33.
20. Brevet de invenție. 1067 (13) Y, MD, G09B 23/28. Metoda de modelare a leziunilor de tip pemfigus / **Olga Macagonova**, Viorel Nacu, Gheorghe Mușet ș. a. (MD). Cererea depusă 11.02.2016. *BOPI* nr. 8/2016.
21. Brevet de invenție. 1132 (13) Y, MD, A61B 90/00. Dispozitiv pentru fixarea pielii în procesul de decelularizare / **Olga Macagonova**, Viorel Nacu, Gheorghe Mușet ș. a. (MD). Cererea depusă 18.11.2016. *BOPI* nr. 3/2017.
22. Brevet de invenție. 1147 (13) Y, MD, A61B 90/00. Dispozitiv pentru fixarea etajată a pielii în procesul de decelularizare / Olga Macagonova, Viorel Nacu, Gheorghe Mușet ș. a. (MD). Cererea depusă 29.11. 2016. *BOPI* nr. 5/2017.
23. Brevet de invenție. 1148 (13) Y, MD, A61B 90/00. Dispozitiv pentru fixarea etajată a pielii în procesul de decelularizare / **Olga Macagonova**, Viorel Nacu, Gheorghe Mușet ș. a. (MD). Cererea depusă 29.11.2016. *BOPI* nr. 5/2017.
24. Brevet de invenție. 1331 (13) Y, A61B 10/00. Metodă de diagnostic imunologic al leziunilor experimentale *pemfigus-like* la șobolani / **Olga Macagonova**, Viorel Nacu, Cociug Adrian ș. a. (MD). Cererea depusă 07.09.2018.
25. MINESH, K., HUI, Z., DONGLAI, M. et al. Zoopharmacognosy in Diseased Laboratory Mice: Conflicting Evidence. In: *PLoS One*. 2014; 9(6): e100684.

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE, ȘTIINȚIFICO-METODICE, DIDACTICE

- **Articole științifice în reviste din Registrul Național al revistelor de profil (cu indicarea categoriei):**

- **categoria B**

1. **Macagonova O.** Modelarea pemfigusului vulgar pe animale experimentale. În: Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină. Chișinău, 2013, 4(49), p.70-73. ISSN 1729-8687.
2. **Macagonova O.**, Mușet Gh., Nacu V. ș.a. Schimbări clinico-morfologice în pemfigus vulgar (caz clinic). În: Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină. Chișinău, 2013, 4(49), p. 44-47. ISSN 1729-8687.
3. **Macagonova O.**, Muset G., Cociug A. ș.a.. Terapiile bazate pe celule stem în pemfigus acantolitic: sinteză de literatură. In: Moldovan Journal of Health Science. Revista de Științe ale Sănătății din Moldova. 2018, Nr. 1(15), p. 87-92.

• **Teze în materialele congreselor, conferințelor, simpozioanelor științifice internaționale (peste hotare)**

4. **Macagonova O.**, Muset Gh., Cociug A., Nacu V. Modelarea experimentală a leziunilor pemphigus-like. În: Provocări Clinice și Sănătate Publică în Dermatologie. Volum de rezumate. Conferința de Dermatologie Zilele «Gh. Năstase», ediția a XXIV-a, Iași, România, 2018, p. 46.
5. **Макагонова О.** Экспериментальная акантолитическая пузырчатка на границе между иммунологией и дерматологией. В: Сборник тезисов XII-ого Международного форума дерматовенерологов и косметологов. Москва, Россия, 2019. с. 45.
6. **Macagonova O.**, Mușet Gh., Cociug A. ș.a. Studiile asupra leziunilor cutanate produse de antigenul din mucoasa esofagului bovin reactiv cu anticorpul al pemfigusului. Congresului Național de Dermatologie. În: Revista Societății Române de Dermatologie. Vol. 61, Sinaia, România, 2016, supplement, p. 129-130. ISSN 1220-3734.

• **Teze în materialele congreselor, conferințelor, simpozioanelor științifice internaționale în republică**

7. **Macagonova O.**, Mușet Gh., Cociug A. ș.a. Pemphigus vulgaris as the actual problem in dermatology. In: Archives of the Balkan Medical Union. Chisinau, 2013, p. 70-71. ISSN 0041-6940,

• **Teze în materialele congreselor, conferințelor, simpozioanelor științifice naționale cu participare internațională**

8. **Macagonova O.**, Muset Gh., Nacu V. ș.a. Metoda de modelare a leziunilor de tipul pemfigusului vulgar. În: Congresul V Național de Dermatologie cu participare internațională.

Chişinău. Curier Medical, 2016, vol. 59, nr. 3, p. 72-73. ISSN 1857-0666.

- **Teze în materialele congreselor, conferințelor, simpoziunelor științifice naționale**

9. **Macagonova O.**, Mușet Gh., Nacu V. ș.a. Modelarea leziunilor de pemfigus vulgar la șobolanii de laborator. În: Culegere de rezumate științifice ale studenților, rezidenților și tinerilor cercetători, Chişinău, 2015, p. 64.

10. **Macagonova O.**, Nacu V., Cociug A. ș.a. Metode și dispozitive inovative de procesare a țesuturilor biologice. În: Lucrările Simpozionului științifico-practic anual „LECTURI AGEPI”, ediția a XVIII-a. Chişinău, 2016, p.150-159. ISBN 978-9975-911-96-2.

- **Brevete de invenții, patente, certificate de înregistrare, materiale la saloanele de invenții**

11. Brevet de invenție. **Macagonova O.**, Nacu V., Mușet Gh. ș.a. Dispozitiv pentru fixarea pielii în procesul de decelularizare. 1132 (13) Y. Int. Cl.: A61B 90/00 (2016.01). Cerere depusă 2016.11.18; BOPI, NR. 3/2017, p. 34.

12. Brevet de invenție. **Macagonova O.**, Nacu V., Mușet Gh., Cociug A. ș.a. Dispozitiv pentru fixarea etajată a pielii în procesul de decelularizare. 1147 (13) Y. Int. Cl.: A61B 90/00 (2016.01). Cerere depusă 2016.11.29; BOPI, NR. 5/2017, p. 42-43.

13. Brevet de invenție. **Macagonova O.**, Nacu V., Mușet Gh. ș.a. Dispozitiv pentru fixarea etajată a pielii în procesul de decelularizare. 1148 (13) Y. Int. Cl.: A61B 90/00 (2016.01). Cerere depusă 2016.11.29; BOPI, NR. 5/2017, p. 43-44.

14. Brevet de invenție. **Macagonova O.**, Nacu V., Mușet Gh. ș.a. Metoda de modelare a leziunilor de tip pemfigus. 1067 (13) Y. G09B 23/28 (2006.01) A61K 35/37 (2006.01). Cerere depusă 2016.02.11.; BOPI, NR. 8/2016, p. 38-39.

15. Brevet de invenție. Ursu A., **Macagonova O.**, Nacu V. ș.a. Dispozitiv pentru decelularizarea țesuturilor biologice. 939 (13) Y (51). A61B 19/00 (2006.01). Cerere depusă 2015.04.17. BOPI, nr.8/2015, p. 33.

16. Brevet de invenție. Cociug A., Marin I., Zota E., Caproș N., **Macagonova O. ș.a.** Dispozitiv de fixare a oaselor spongioase pentru prepararea grefei osoase. (MD) 914 (13)Y. A61B 17/00 (2006.01); A61B 17/16 (2006.01). Cerere depusă 2014.11.27. BOPI, nr. 6/2015, p. 28.

17. Brevet de invenție. **Macagonova O.**, Nacu V., Cociug A. Dispozitiv pentru prepararea țesuturilor biologice. MD 866 (13)Y, A61B 17/56 (2006.01); A61B 17/66 (2006.01); A61B 17/68 (2006.01); A61B 17/76 (2006.01). Cerere depusă 2014.08.01. BOPI, nr. 1/2015, p. 43.
18. Brevet de invenție. Cociug A., **Macagonova O.**, Caproș N. ș.a. Dispozitiv pentru secționarea țesuturilor biologice. MD 867 (13)Y, A61B 10/02 (2006.01). Cerere depusă 2014.08.01. BOPI, nr. 1/2015, p. 44.
19. Brevet de invenție. Cociug A., **Macagonova O.**, Zota E. ș.a. Dispozitiv pentru fixarea grefei osoase. MD 868 (13)Y, A61B 17/56 (2006.01); A61B 17/66 (2006.01); A61B 17/68 (2006.01); A61B 17/76 (2006.01). Cerere depusă 2014.08.22. BOPI, nr. 1/2015, p. 45.
20. Brevet de invenție. **Macagonova Olga**, Ababii I., Cociug A. ș.a. Dispozitiv pentru separarea țesuturilor biologice. MD 905 (13)Y, A61B 10/00 (2006.01); A61B 10/02 (2006.01). Cerere depusă 2014.12.12. BOPI, nr. 5/2015, p. 29.
21. Brevet de invenție. Cociug A., Nacu V., Caproș N., Zota E., **Macagonova O.** Dispozitiv pentru curățarea oaselor tubulare de măduva osoasă. (MD) 915 (13)Y. A61B 17/00 (2006.01); A61B 17/16 (2006.01). Cerere depusă 2014.12.03. BOPI, nr. 6/2015, p. 29.
22. Brevet de invenție. **Macagonova O.**, Nacu V., Cociug A. Dispozitiv pentru prepararea țesuturilor biologice. MD 793 (13)Y. A61C 5/02 (2006.01); A61B 10/02 (2006.01). Cerere depusă 2014.01.13. BOPI, nr. 7/2014, p. 30.

ADNOTARE

Macagonova Olga

„Influența celulelor stem asupra leziunilor *pemfigus-like*” (studiu experimental preclinic)

Teză de doctor în științe medicale. Chișinău, 2019

Structura tezei. Lucrarea este expusă pe 162 de pagini de text și include: introducere, 4 capitole, concluzii, recomandări practice și bibliografie (270 de surse). Teza este ilustrată cu 26 de tabele, 50 de figuri, 4 anexe. Rezultatele obținute sunt publicate în 22 de lucrări științifice.

Cuvinte - cheie: leziunile *pemfigus-like*, regenerare, eficacitate, celule stem.

Domeniul de studiu: medicina regenerativă, dermatologie experimentală.

Scopul cercetării. Evaluarea eficacității celulelor stem în tratamentul leziunilor *pemfigus-like* modelate pe șobolani.

Obiectivele: simularea defectelor cutanate *pemfigus-like* și evaluarea eficacității tratamentului leziunilor *pemfigus-like* cu celule stem la șobolani.

Noutatea și originalitatea științifică. În premieră s-a efectuat tratamentul cu celule stem al leziunilor *pemfigus-like* la șobolani.

Problema științifică soluționată. A fost creat un model experimental asemănător pemfigusului, a fost demonstrată acțiunea imunosupresivă a celulelor stem alogene izolate din măduva osoasă asupra leziunilor *pemfigus-like*.

Semnificația teoretică. Studiul a confirmat utilitatea examenului histologic și imunohistochimic cu AE1/AE3, în evaluarea stării epidermului.

Valoarea aplicativă a lucrării. Modele obținute vor fi utilizate în alte studii științifice atât în USMF „Nicolae Testemițanu”, cât și în alte instituții.

Implementarea rezultatelor științifice. Rezultatele studiului au fost implementate în procesul de studiu a cursului opțional de Medicină regenerativă și în activitatea Laboratorului de inginerie tisulară și culturi celulare al USMF „Nicolae Testemițanu”, și a Băncii de țesuturi și celule umane.

АННОТАЦИЯ

Макагонова Ольга

«Влияние стволовых клеток на пемфигусоподобные поражения»

(экспериментальное преклиническое исследование)

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук.

Кишинев, 2019

Структура диссертации. Документ представлен на 162 страницах электронного текста и включает: введение, 4 главы, выводы, практические рекомендации и библиографию (270 источника). Диссертация иллюстрируется 26 таблицами, 50 рисунками, 4 приложениями. Полученные результаты опубликованы в 22 научных статьях.

Ключевые слова: пемфигусоподобные поражения, регенерация, эффективность, стволовые клетки.

Область исследования: регенеративная медицина, экспериментальная дерматология.

Цель исследования. Оценка эффективности стволовых клеток при лечении пемфигусоподобных моделей поражений.

Задачи: моделирование пемфигусоподобных дефектов кожи и оценка эффективности лечения стволовыми клетками пемфигусоподобных изменений на коже у лабораторных животных.

Научная новизна и оригинальность. Было проведено первое исследование эффективности лечения стволовыми клетками в пемфигусовых поражениях.

Решенная научная проблема. Впервые было обосновано иммуносупрессивное действие стволовых аллогенных клеток, выделенных из костного мозга, на пемфигусовые поражения.

Теоретическая значимость. Исследование подтвердило полезность использования иммуногистохимических маркеров AE1/AE3 при оценке уровня эпидермального повреждения.

Ценность применения работы. Полученные модели будут использованы в других научных исследованиях в ГУМФ „Николай Тестемицану”, так и в прочих учреждениях.

Применение научных результатов. Результаты исследования лабораторных работ были внедрены в научной деятельности лаборатории Тканевой инженерии и клеточных культур ГУМФ «Николай Тестемицану» и Банк человеческой ткани и клеток.

ANNOTATION

Macagonova Olga

"Influence of the stem cells treon the *pemphigus-like* lesions"

(experimental preclinical study)

PhD thesis in medicine. Chisinau, 2019

Structure of the thesis. The paper is exposed on 162 pages of electronic text and includes: introduction, 4 chapters, conclusions, practical recommendations and bibliography (270 sources). The thesis is illustrated with 26 tables, 50 figures, 4 anexes. The obtained results are published in 22 scientific papers.

Key words: lesions *pemphigus-like*, regeneration, efficacy, stem cells

Field of study: regenerative medicine, experimental dermatology.

The purpose of the research. Evaluation of the efficacy of the stem cells in the treatment of the lesions of the *pemphigus-like* models.

Objectives: simulating of the *pemphigus-like* skin defects and evaluation of the efficacy of the stem cell treatment for the *pemphigus-like* lesions in rats.

Scientific novelty and originality. The first study of the efficacy of the stem cell treatment in the *pemphigus-like* lesions in the rats was performed.

Resolved scientific issue. For the first time, the immunosuppressive action of allogeneic stem cells, isolated from bone marrow, on the *pemphigus-like* lesions, was justified.

Theoretical significance. The study confirmed the utility of the histological and immunohistochemical examination with AE1 and AE3 in the assessing of the level of the epidermal damage.

Application value of the paper. The obtained models will be used in other scientific researches in SMPHU "Nicolae Testemitanu" and other departments.

Implement the scientific results. The results of the study were implemented in the activity of the laboratory of Tissue engineering and cell culture, SMPHU "Nicolae Testemitanu", the Bank of Tissues and Human Cells.

LISTA ABREVIERILOR

C3, C4	componentele complementului C3, C4
panCK	pancitokeratină
AE 1/AE 3	anticorpi monoclonali pentru evidențierea pancitokeratinei
FGFs	factor de creștere pentru fibroblaste
DSG3	desmogleină 3
DIF	imunofluorescență directă
PBS	bufer fosfat salin
FITC	compus fluorescent izotiocianat de fluoresceină
Ag	antigen
Ac	anticorp
HE	hematoxilină-eozină
CID	coagulare intravasculară diseminată
TBS	tris bufer salin
BSA	albumină serică bovină
CSH	celule stem hematopoietice
CSA	celule stem adipoase
hAdMSCs	celulele stem mezenchimale umane derivate din țesut adipos
DEX	dexametazon
m-Psl	metil-prednisolon
AZA	azatioprină
CPA	ciclofosamidă
FK506	hidrat de tacrolimus
MMSCs	celule stem mezenchimale multipotente
NK	natural killer
CTLa4	substanțe citotoxice pentru antigenul 4 al limfocitelor T
FBS	ser bovin fetal
EDTA	acid etilendiamintetraacetic

MACAGONOVA OLGA

**INFLUENȚA CELULELOR STEM ASUPRA LEZIUNILOR *PEMFIGUS-LIKE*
(STUDIUL EXPERIMENTAL PRECLINIC)**

311.01 – ANATOMIA OMULUI

Rezumatul tezei de doctor în științe medicale

Aprobat spre tipar: 02.10.2019
Hârtie ofset. Tipar digital.
Coli de tipar: 2,1

Formatul hârtiei 60/84 1/16
Tiraj 60 ex.
Comanda nr.
