

**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

Teză de doctor în științe medicale

Conducător științific:	NACU Viorel, dr. hab. șt. med., conf. univ.
Consultant științific:	MUȘET Gheorghe, dr. hab. șt. med., prof. univ., Om Emerit al RM
Autor:	MACAGONOVA Olga

CHIȘINĂU, 2019

© *MACAGONOVA Olga, 201*

CUPRINS

ADNOTARE	6
АННОТАЦИЯ	7
ANNOTATION	8
LISTA ABREVIERILOR	9
INTRODUCERE	10
1. CONCEPȚII DESPRE EVOLUȚIA, ETIOPATOGENIA ȘI TRATAMENTUL PEMFIGUSURILOR ACANTOLITICE	18
1.1. Structura pielii nemodificate	18
1.2. Dezvoltarea ontogenetică a pielii	20
1.3. Mecanismul de regenerare a plăgilor	20
1.4. Structura desmozomilor.	21
1.5. Boli cutanate provocate de lezarea desmozomilor	23
1.6. Rolul citokeratinei în dezvoltarea pemfigusului	25
1.6.1. Imunomorfologia pielii în normă	25
1.6.2. Imunomorfologia pielii în pemfigus.....	27
1.7. Rolul desmogleinei 3 în ancorarea firului de păr în foliculul pilos în faza telogenă	28
1.8. Sistemul complementului în patogeneza pemfigusului autoimun	32
1.9. Modelele experimentale de leziuni <i>pemfigus-like</i>	35
1.9.1. Modelarea pemfigusului vulgar prin transferul pasiv de anticorpi	35
1.9.2. Model experimental obținut prin transferul de limfocite autoreactive	37
1.9.3. Inducerea experimentală a autoanticorpilor antiepiteliali la iepuri	38
1.9.4. Reacțiile comportamentale ale șobolanilor cu leziunile <i>pemfigus-like</i>	39
1.9.5. Concepții despre etiologia pemfigusurilor acantolitice	40
1.9.6. Viitoarele direcții de tratament	41
Sinteza capitolului 1	43
2. MATERIAL ȘI METODE DE CERCETARE	44
2.1. Caracteristica generală a cercetării	44
2.1.1. Obiectul de studiu	44
2.1.2. Caracterizarea eșantionului de studiu	44
2.1.3. Metodele de cercetare științifică	52
2.1.4. Izolarea extractului proteic pe etanol și modelarea defectelor cutanate <i>pemfigus-like</i> pe șobolani	54
2.2. Metodele de obținere și procesare a grefelor de celule stem	56

2.2.1.	Obținerea celulelor stem mezenchimale din măduva osoasă	56
2.2.2.	Obținerea fibroblastelor din embrionii de găină	58
2.2.3.	Numărarea și aprecierea viabilității celulelor	59
2.3.	Metode matematice de analiză a rezultatelor	60
2.3.1.	Aprecierea scorului fenotipului leziunilor <i>pemfigus-like</i>	62
2.3.2.	Planimetrie	62
2.3.3.	Metoda histologică	62
2.3.4.	Metoda imunohistochimică cu AE1/AE3 de evidențiere a keratonocitelor	64
2.3.5.	Studierea componentelor C3 și C4 al complementului	64
2.3.6.	Explorarea reacțiilor de comportament la șobolani	64
2.4.	Sinteza capitolului 2	65
3.	CARACTERIZAREA LEZIUNILOR PEMFIGUS-LIKE PE MODELE DE ANIMALE EXPERIMENTALE	67
3.1.	Calcularea scorului leziunilor <i>pemfigus-like</i>	67
3.2.	Studierea componentelor C3 și C4 al complementului	69
3.3.	Evaluarea greutateii corporale	71
3.4.	Estimarea planimetrică a defectelor cutanate modelate	71
3.5.	Studierea histologică a leziunilor experimentale	72
3.5.1.	Evaluarea loturilor de șobolani cu leziuni <i>pemfigus-like</i>	72
3.5.2.	Rezultatele investigației histologice ale secțiunilor de piele	73
3.6.	Studierea imunohistochimică cu AE1/AE3 a leziunilor cutanate <i>pemfigus-like</i> modelate	76
3.7.	Reacțiile comportamentale ale șobolanilor cu leziuni <i>pemfigus-like</i>	78
3.8.	Sinteză problematicii tratate în capitolul 3	81
4.	EVALUAREA EFICACITĂȚII TRATAMENTULUI CU CELULE STEM PE MODELE DE ANIMALE CU LEZIUNI PEMFIGUS-LIKE INDUSE	82
4.1.	Distribuția eșantionului general	82
4.2.	Evaluarea scorului leziunilor <i>pemfigus-like</i>	82
4.3.	Modificarea greutateii corporale	84
4.4.	Dozarea complementului	85
4.5.	Dinamica leziunilor cutanate	85
4.6.	Evaluarea schimbărilor morfologice în secțiunile histologice ale pielii	86
4.7.	Evaluarea imunohistochimică cu AE1/AE3 a keratinocitelor	96
4.8.	Dinamica comportamentului șobolanilor după tratament	97
4.9.	Prelucrarea statistică a datelor	98

Sinteza rezultatelor din capitolul 4	103
CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI	105
BIBLIOGRAFIE	107
Anexa 1. Acte de implementare a rezultatelor obținute	127
Anexa 2. Brevete de invenție	131
Anexa 3. Hotărâri de acordare a brevetului de invenție	139
Anexa 4. Diplome și distincții	141
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII	161
CURRICULUM VITAE AL AUTORULUI	162

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 Банка 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" and 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
hAdSCs	celulele stem umane derivate din țesut adipos
DEX	Dexametazon
m-Psl	metil-prednisolon
AZA	Azatioprină
CPA	Ciclofosfamidă
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

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța problemei abordate

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].

Incidența bolii variază între 0,4 și 1,6 la 100 000 de locuitori, în funcție de populația studiată, și afectează egal ambele sexe. Vârsta medie a debutului este de 50-60 ani, cu variații foarte mari (s-au descris cazuri la sugari, copii mici și vârstnici) [11, 12, 13, 14].

Pemfigusul este o boală rară, constituind aproximativ 1% din cazurile internate în serviciile dermatologice. Într-un studiu intern efectuat în anul 2015 la Spitalul de Dermatologie și Maladii Comunicabile, a fost constatat că în Republica Moldova morbiditatea totală cauzată prin pemfigusuri acantolitice la 100 000 de locuitori este următoarea: 2010 – 1,8; 2011 – 1,9; 2012 – 1,9; 2013 – 2,3; 2014 – 2,2 [14]. Rata mortalității este de 5-15% [15].

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 [16]. La pacienții care abandonează tratamentul cu corticosteroizi, speranța de viață se reduce evident [17]. Ultima dintre 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.

Descrierea situației și identificarea problemei în domeniul de cercetare

În condițiile terapiei actuale a pemfigusului, pronosticul depinde, în primul rând, de răspunsul bolnavului la preparatele cortico-imunosupresoare și de complicațiile pe care acestea le induc în administrarea pe termen lung [17].

Terapia celulară este o direcție promițătoare a medicinei regenerative, în care actualmente se folosesc pe scară largă celulele cultivate pentru recuperarea și tratarea organelor și țesuturilor deteriorate, inclusiv ale pielii. Restabilirea defectelor de țesut și organe în medicina regenerativă este posibilă printre trei metode: transplantul țesuturilor și organelor, stimularea regenerării țesuturilor prin diferite substanțe biologice active, transplantarea celulelor. Astăzi, în practică, ca metodă de substituție a defectelor pielii și crearea analogilor dermici, pentru tratamentul maladiilor cutanate autoimune, în mod activ, se studiază caracteristicile imunomodulatoare unice ale celulelor stem mezenchimale din măduva osoasă: ele pot suprima proliferarea limfocitelor *in vitro*. Cu alte cuvinte, scad expresia antigenelor de histocompatibilitate și manifestă proprietăți imunosupresoare, datorită cărora ele pot fi utilizate în tratarea tulburărilor imunologice și reducerea riscului respingerii grefei [18].

Așadar, având în vedere cele expuse, se impune de a reproduce în mod experimental leziuni de tipul pemfigusului la animale de laborator și de a evalua eficacitatea terapiei prin aplicarea celulelor stem în tratamentul lor.

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.

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 substraturilor morfologice prin metode histologice și imunohistochimice în leziunile *pemfigus-like*?
- Influența celulelor stem asupra leziunilor *pemfigus-like* pe șobolani de laborator.

Design-ul cercetării

Design-ul studiului a presupus o cercetare în două etape: modelarea experimentală și studiul experimental, preclinic randomizat: etapa I – studii preclinice pe animale de laborator.

Pentru asigurarea reprezentativității datelor, numărul necesar de subiecți a fost determinat prin tabelul *Numărul de animale în fiecare grup pentru proporții, fiind cel puțin 30*, pentru a evita rezultate eronate [19].

Fiecare lot de cercetare (lotul II-V) a inclus câte 30 de animale tratate prin metodă nouă (celule stem osteomedulare și fibroblaste de la embrionii de găină), prin metoda tradițională de tratament (tratament de bază cu glucocorticoizi și citostatice) și lotul de control (lotul I). Cercetarea a derulat 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”.

Examenul imunologic al sângelui periferic (C3, g/l, C4, g/l). Sângele a fost colectat din venele superficiale caudale până la eliminarea animalelor din experiment sau nemijlocit după dislocarea cervicală. S-au efectuat investigații histologice (cu hematoxilină-eozină și picrofuxină); examenul imunohistochimic cu AE1/AE3 al secțiunilor pielii.

Animalele au fost retrase din experiment la 16, 32, 48 de zile după inocularea grefelor celulare, câte 3 animale din fiecare lot la fiecare termen (sunt necesari 45 de șobolani). Pielea și organele interne (ficat, splina) colectate au fost conservate în soluție de 10% de formalină.

Noutatea științifică și originalitatea rezultatelor obținute

Am inovat un model experimental de leziuni cutanate *pemfigus-like* la șobolani, studiat și confirmat prin metode macroscopice, microscopice, imunologice, imunohistochimice cu AE1/AE3 a secțiunilor cutanate cu leziuni reproduse experimental la animale.

În premieră s-a 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 [20-31]: 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 (vezi Anexe 1, 2).

Problema științifică soluționată. A fost creat un model experimental de obținere a leziunilor *pemphigus like*. Acest model studiază manifestarea maladiei, cât și testarea altor modele experimentale de tratament cu celule stem.

Rezultatele științifice principale înaintate spre susținere:

1. Evaluarea a două tipuri de grefe celulare: Celule stem (MSC) din măduva osoasă și fibroblastele din stratul epidermal al embrionilor de găină a arătat că utilizarea grefelor celulare a avut o acțiune benefică în tratarea leziunilor *pemfigus-like* la șobolani. Acest fapt a fost confirmat prin ameliorarea semnificativă ($P < 0,005$) a scorului ($0,67 \pm 0,17\%$) la a 48-a zi după utilizarea BM-MSCs, în comparație cu eficacitatea metilprednisolonei ($8,16 \pm 0,18\%$), ciclofosfamidei ($1,25 \pm 0,17\%$) și cu lotul martor ($9,23 \pm 0,37\%$), care nu a beneficiat de tratament.

2. Eficacitatea celulelor stem a fost argumentată prin creșterea în greutate a șobolanilor după terapia cu celule stem. Valoarea medie a scorului de greutate corporală ($2,46 \pm 0,091$) în lotul I, fără tratament, a rămas semnificativ înaltă ($P < 0,001$) față de valoarea în lotul II ($1,2 \pm 0,17$) și cu diferența semnificativă față de valoarea în lotul III ($2,2 \pm 0,13$), lotul V ($2,1 \pm 0,05$). În ziua a 32-a – valoarea rămâne neschimbată în lotul I ($2,46 \pm 0,091$) și crește semnificativ ($P < 0,001$) în ziua a 48 – a ($2,7 \pm 0,083$). În lotul II, scorul greutății corporale scade semnificativ ($P < 0,05$). Animalele din lotul IV și lotul V au scăzut în greutate nesemnificativ ($P > 0,05$) în zilele a 32 - a și 48 - a.

3. Datele planimetriei defectelor modele indică cel mai bun rezultat în lotul II ($4,95 \pm 0,31 \text{ mm}^2$), lotul IV ($6,65 \pm 0,33 \text{ mm}^2$) – cu o diferență statistic semnificativă ($P < 0,001$) față de lotul I ($8,81 \pm 0,17 \text{ mm}^2$), III ($7,27 \pm 0,32 \text{ mm}^2$) și lotul V ($8,31 \pm 0,24 \text{ mm}^2$).

4. Studiul histologic cu hematoxilina-eozină și picrofuxină al secțiunii cutanate afectate a arătat modificări similare la șobolanii din lotul II (15 animale, $8,3 \pm 0,15\%$), lotul III (15 animale, $8,3 \pm 0,15\%$), lotul IV (15 animale, $8,3 \pm 0,15\%$), și anume, îngroșarea epiteliului pluristratificat și dispariția acantolizei în epiderm.

5. Studiul imunohistochimic cu AE1/AE3 a relevat scăderea intensității expresiei reacției (++) de evidențiere a keratinocitelor în urma tratamentului cu celule stem osteomedulare (1×10^6 celule/kg corp/zi) la 16 animale ($10,6 \pm 2,5\%$) și cu ciclofosfamidă (40 mg/kg corp/zi), din lotul IV la 18 animale ($12,0 \pm 2,7\%$). Lotul II a inclus 9 animale ($6,0 \pm 1,9\%$), lotul IV - 7 animale ($4,6 \pm 1,7\%$), cu modificări de tip reacție de intensitate slabă (+) la nivelul secțiunii cutanate afectate. Lipsa intensității (-) s-a observat la 5 animale din lotul II ($3,3 \pm 1,5\%$) și 5 animale din lotul IV ($3,3 \pm 1,5\%$).

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

Implementarea rezultatelor științifice. Rezultatele studiului (vezi Anexe 1, 2) au fost implementate în activitatea Laboratorului de inginerie tisulară și culturi celulare, al USMF „Nicolae Testemițanu”, și a Băncii de țesuturi și celule umane din cadrul IMSP Spitalul Republican de Ortopedie și Traumatologie, Catedra de dermato-venerologie.

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 Urgență 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) (vezi Anexa 4);
- Al XII-lea Forumul Internațional al dermato-venerologilor și cosmetologilor (Rusia, Moscova, 2019) (vezi Anexa 4).

Rezultatele tezei au fost discutate și aprobate la ședința comună a Catedrei de anatomie topografică și chirurgie operatorie și Laboratorului de inginerie tisulară și culturi celulare din 24.08.2018 (proces - verbal nr. 1) și SȘP din 17.12.2018 (proces - verbal nr. 2).

Sumarul compartimentelor 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 și 4 anexe. Rezultatele obținute sunt publicate în 22 de lucrări științifice. Au fost revendicate 12 brevete de invenție de scurtă durată.

În **Introducere** este redată actualitatea temei abordată în teză. Se face o trecere succintă în revistă a datelor de ultimă oră referitor la realizările din domeniul tratamentului în pemfigusul acantolitic. Sunt menționate problemele și motivele ce au determinat căutarea noilor metode de tratament. Deasemenea au fost caracterizate proprietățile imunosupresoare ale celulelor stem, descrise scopul și obiectivele tezei, noutatea științifică a rezultatelor obținute, importanța teoretică, valoarea aplicativă a lucrării și aprobarea rezultatelor.

Capitolul 1 (**Conceptii despre evoluția, etiopatogenia și tratamentul pemfigusurilor acantolitice**) prezintă elementele structurale ale pielii, structura pielii nemodificate, noțiuni de ontogeneză, formarea elementelor structurale din ectoderm și mezoderm, mecanismul de regenerare a pielii, rolul desmozomilor în conexiunile intercelulare. A fost detaliat rolul maladiilor cutanate autoimune și influența autoanticorpilor asupra desmozomilor, prezentată structura biochimică, masa moleculară ale desmogleinelor. Rolul citokeratinei în pemfigus, imunomorfologia pielii în normă și maladiile cutanate autoimune. Am analizat rolul desmogleinei 3 în ancorarea firului de păr în foliculul pilos în faza telogenă. Au fost explorate datele studiilor anterioare privind activarea sistemului complementului în pemfigusul acantolitic, crearea modelelor experimentale de leziuni *pemfigus-like* prin transfer pasiv de anticorpi, prin transfer de limfocite autoreactive, (transgenice și forțat imunizate), producția experimentală a autoanticorpilor antiepiteliali la iepuri. S-a efectuat trecerea în revistă privind etiologia pemfigusurilor acantolitice și utilizarea preparatelor corticoimunosupresive în tratamentul

modelelor experimentale pe șobolani cu pemfigus vulgar și terapiile bazate pe celule stem în pemfigusul acantolitic.

Capitolul 2 (**Material și metodele de cercetare**) prezintă o caracteristică generală a materialului studiat, a metodelor histologice, imunohistochimice de investigație. Au fost descrise metodele de obținere a celulelor stem mezenchimale alogene din măduva osoasă și din fibroblastele de la embrionii de găină, prepararea antigenilor epiteliali din mucoasa esofagului de bovină. Sunt prezentate grupele de animale incluse în studiu și criteriile de selectare a cazurilor. Sunt descrise metodele de interpretare a rezultatelor (scorificarea, planimetria leziunilor modele, cuantificarea nivelului a componentelor C3 și C4 ale complementului în ser, expresiei diferitor markeri analizați). Sunt enumerate metodele și formulele cu ajutorul cărora a fost realizată prelucrarea statistică a rezultatelor obținute.

Capitolul 3 (**Caracterizarea leziunilor pemfigus-like pe modele de animale experimentale**) a fost dedicat clasificării leziunilor pemfigus-like prin calcularea scorului leziunilor pemfigus-like la 150 de șobolani, conform clasificării Aoki-Ota M. (2004). Am efectuat planimetria plăgilor. Am determinat expresia componentelor C3, C4 în serul animalelor experimentale. Cercetările au fost efectuate pe femele de șobolani de specia Wistar, cu vârsta medie $4,9 \pm 0,33$ luni, în cadrul laboratorului de Inginerie tisulară și culturi celulare al USMF „Nicolae Testemițanu”. Din punct de vedere histologic, prin colorarea cu hematoxilină-eozină și picrofuxină, s-a constatat că 3 animale ($10 \pm 5,5\%$) din lotul I, au continuat să dezvolte leziuni noi de la a 16-a săptămână. Au fost prezentate imagini microscopice care relevă prezența chisturilor în zonele de alopecie în teaca foliculului pilos telogen fără tulpina părului. Am determinat, prin investigație imunohistochimică cu AE1/AE3, o expresie diferită a keratinei. Toți șobolani din lotul I, lotul II, lotul III, lotul IV și lotul V au avut modificări de tip reacție intens pozitivă (+++) la nivelul secțiunii cutanate afectate.

Capitolul 4 (**Evaluarea eficacității terapiei celulare pe modele experimentale cu leziuni pemfigus-like induse**). În acest capitol este studiată eficacitatea grefelor celulare stem osteomedulare, fibroblastelor din embrionii de găină, metilprednisolonei și ciclofosfamidei în tratamentul leziunilor, modelate la șobolani. S-a descris distribuția eșantionului general în funcție de tipul grefei. Efectele celulelor stem au fost apreciate prin scorificarea și planimetria leziunilor. Prin colorarea cu hematoxilină-eozină și picrofuxină pe un eșantion de 45 de animale s-a determinat epitelizarea epidermului. Imunohistochimia cu AE1/AE3 a pus în evidență expresia moderată (+++) de colorare a keratinocitelor la 34 animale: în urma tratamentului cu celule stem osteomedulare (1×10^6 celule/kg corp/zi) la 16 animale ($10,6 \pm 2,5\%$) și cu ciclofosamidă (40mg/kg corp/zi), din lotul IV la 18 animale ($12,0 \pm 2,7\%$). Lotul II a inclus 9 animale ($6,0 \pm 1,9\%$), lotul IV

- 7 animale ($4,6 \pm 1,7$ %), cu modificări de tip reacție de intensitate slabă (+) la nivelul secțiunii cutanate afectate. Lipsa intensității (-) s-a observat la 5 animale din lotul II ($3,3 \pm 1,5$ %) și 5 animale din lotul IV ($3,3 \pm 1,5$ %).

Scăderea intensității reacției de colorare a leziunilor *pemfigus-like* a fost cauzată de regenerarea epidermului.

1. CONCEPȚII DESPRE EVOLUȚIA, ETIOPATOGENIA ȘI TRATAMENTUL PEMFIGUSURILOR ACANTOLITICE

Elementele structurale ale pielii

Pielea este un organ cu structură complexă. Ea prezintă un înveliș conjunctivo-epitelial, ce acoperă întreaga suprafață a corpului și continuă cu mucoasele orificiilor naturale. De la exterior spre interior, pielea este structurată în trei părți distincte: epidermul, dermul și hipodermul. Integritatea pielii are o importanță deosebită în îndeplinirea funcției de barieră, termoreglare, respiratorie ș.a. [32].

1.1. Structura pielii nemodificate

Acest capitol cuprinde generalități asupra morfologiei pielii. Ne-am concentrat pe histologia epidermului [33].

Epidermul neafectat este un epiteliu pluristratificat pavimentos, cu evoluție fiziologică progresivă spre cornificare și capacitatea de a se reinnoi continuu, datorită stratului germinal bazal, care produce keratinocite. Acestea migrează ascendent trecând prin mai multe faze de maturizare. Ajungând la suprafață, ele devin neviabile. Keratinocitele care alcătuiesc epidermul, au ca funcție de bază biosinteza keratinelor cu rol de susținere și protecție [33, 34].

Din profunzime spre suprafață se disting mai multe zone, în continuitate, dar de morfologie diferită, fiind organizate în patru straturi (Figura 1.1), în funcție de structura și proprietățile care le caracterizează. O dată cu ascensiunea lor dinspre stratul bazal spre cel cornos, keratinocitele suferă un proces de diferențiere. Prin urmare, celulele diferențiate se vor găsi în stratul cornos superficial. În afară de celule keratinocitare în epiderm se mai găsesc: melanocite, celule Langerhans, celule Merkel și limfocite. Stratul bazal și spinos, conțin cele mai active celule din punct de vedere mitotic. Elementul central este keratinocitul, celula cu un potențial regenerativ semnificativ, ce suferă un proces de diferențiere pe parcursul migrării sale de la nivelul stratului bazal germinativ până la stratul cornos, descuamativ. Celulele stratului bazal au un potențial de proliferare variat. Studiile de dezvoltare celulară au evidențiat trei categorii de populații celulare: celule stem, celule amplificate tranzitoriu și celule aflate în faza postmitotică [35].

Celulele stem izolate din pielea pot forma în cultură țesutul epitelial capabil să acopere întreaga suprafață a corpului unui individ. Celulele stem epidermice sunt celule ce se autoreinnoiesc în condiții stabile; diviziunea celulară se desfășoară doar atunci când condițiile impun o accelerare a proliferării celulare (cum ar fi procesul de cicatrizare). Mai multe cercetări,

au constatat prezența celulelor stem pluripotente epidermice, preponderent, la nivelul foliculului pilos [33-35].

Un al doilea compartiment celular al stratului germinativ este reprezentat de celulele amplificate tranzitoriu. Ele rezultă din diviziunea celulelor stem pluripotente și sunt cel mai bine reprezentate la acest nivel, fiind responsabile de reinnoirea permanentă a celulelor [36].

Timpul necesar unei celule pentru a trece din stratul bazal în cornos constituie 28 de zile [34].

Stratul spinos este stratul celular suprapus celui bazal. Este format din celule poliedrice cu nucleu rotund, acesta mărindu-și volumul și aplatizându-se. Aceste celule conțin filamente de keratină [33].

Stratul granular este implicat în procesul de formare a structurilor celulare, care intră în componența barierei impermeabile pentru apă (hidrofobe). Structurile cel mai bine reprezentate în celulele din acest strat sunt granulele bazale și cele de keratohialină.

Stratul cornos este format dintr-un sistem bicompartimental: corneocite, cu un bogat conținut de lipide și de o matrice lipidică extracelulară care le înconjoară. Forma și suprafața corneocitelor sunt adaptate pentru a menține integritatea stratului cornos, dar și pentru a permite descuamarea acestuia [34].

Dermul reprezintă un țesut conjunctiv format în majoritate din fibre de collagen și elastice ce conține: fibroblaste, macrofage, celule mastocitare, plasmocite și leucocite (care ajung aici ca răspuns la diferiți stimuli), structuri nervoase și vasculare, substanță fundamentală. Structura dermei dă volum pielii, conferindu-i acesteia rezistență, elasticitate și protejează organismul de traume mecanice, termice ce intervin în repararea și remodelarea tegumentului.

Trecerea de la dermul reticular profund la hipoderm are loc între țesutul conjunctiv dens a dermului și țesutul adipos. Cu toate acestea, cele două regiuni comunică structural și funcțional prin conexiunile rețelelor nervoase, vasculare și ale glandelor anexe [31, 35].

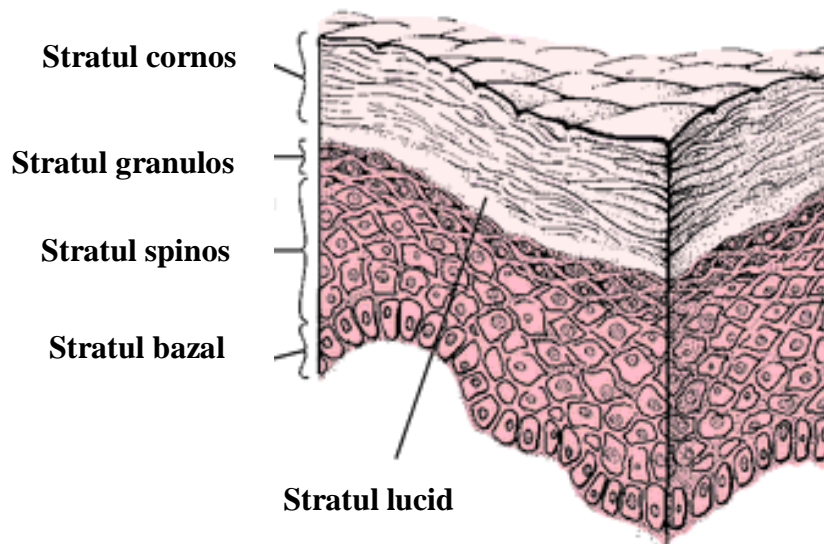


Fig.1.1. Structura epidermului [35]

1.2. Dezvoltarea ontogenetică a pielii

Pielea se formează din suprapunerea a două elemente embrionare: epidermul prospectiv, care își are originea în ectoderm, și dermatoamele mezodermului paraaxial, care vin în contact cu suprafața interioară a epidermului în timpul gastrulației [35].

Epidermul se dezvoltă aproape complet, din ectodermul de acoperire, și numai câteva celule (melanocite și celule Langerhans) migrează din alte zone. Stratul reticular al dermului derivă din mezoderm. Morfogeneza pielii depinde de interacțiunea constantă dintre aceste două elemente. Înainte de formarea pielii, anumite interacțiuni celulare au loc pentru a specifica în primul rând formarea progenitorilor dermului și în al doilea rând densificarea lor în interiorul spațiului subectodermal. Aceste prime două etape duc la formarea pielii embrionului, constituită din epidermul superior, care se suprapune pe un derm dens [36].

După gastrulație, suprafața embrionară apare ca un singur strat a neuroectodermului, care, ulterior, va specifica sistemul nervos și epiteliul pielii. Ectodermul se dezvoltă din epiblast în decursul a trei săptămâni de viață intrauterină. Epidermul se formează din ectoderm. În decursul a patru săptămâni se formează căile de semnalizare, care oferă ectodermului abilitatea de a răspunde la factorii de creștere a fibroblastelor (FGFs) [36, 37].

1.3. Mecanismul de regenerare a plăgilor

Vindecarea rănilor cutanate este un mecanism complex, care include trei faze: faza de inflamare, faza de proliferare și faza de restructurare. Faza de inflamare începe imediat după producerea traumei; în lipsa complicațiilor, ea durează 5-7 zile. Aceasta se caracterizează prin

vasoconstricție, iar în cazul afectării celulelor endoteliale, se activează o cascadă de reacții de hemocoagulare, ceea ce duce la agregarea trombocitelor cu formare de cheaguri și trombi. Trombocitele activate eliberează o varietate de substanțe biologic active (prostaglandinele, serotonină, histamină, proteaze, care induce vasoconstricția). Citokinele, factorul de creștere a trombocitelor, factorul de creștere asemănător insulinei, factorul de creștere a fibroblastelor, acționează asupra celulelor - țintă [38]. După vasoconstricție urmează procesul invers – vasodilatația. Are loc exsudația cu eliberarea proteinelor plasmatică, pierderea fibrinelor, și infiltrarea țesuturilor înconjurătoare. Citokinele atrag leucocitele și fibroblastele în zona leziunii, precum stimulează proliferarea celulelor și sinteza colagenului. La scurt timp după producerea leziunii, apar granulocite și monocite, precum și macrofage, care sunt cele mai importante componente ale întregului proces inflamator. În afară de fagocitoză, aceste celule eliberează factori de creștere, care determină proliferarea activă a fibroblastelor, celulelor endoteliale și conduc la rândul lor la formarea de țesut granular. A doua fază de proliferare durează în medie patru săptămâni. Procesele de regenerare a țesuturilor încep chiar în prima zi după producerea leziunii, iar durata lor depinde de dimensiunea defectului plăgii. Această fază include regenerarea epitelului și sinteza colagenului de tip III, care este înlocuit ulterior cu colagen de tip I. Reducerea plăgii, angiogeneza și formarea țesutului granular continuă în locul defectului [39]. Epitelizarea începe la marginea plăgii. Prin urmare, pe locul plăgii de culoare roșie intensă la sfârșitul acestei etape se formează o cicatrice, care este vizibilă datorită numărului mare de capilare care o penetrează. Faza de restructurare durează de la câteva luni până la un an. În această etapă cicatricea dobândește rezistență, scade în dimensiuni și capătă culoare pală. Resorbția apei în jurul cicatricii promovează organizarea ulterioară a fibrelor de colagen. Până la sfârșitul acestei faze cicatricea obține aproximativ 80% din rezistența la tracțiune în raport cu pielea normală, intactă [40].

1.4. Structura desmozomilor

Formarea țesuturilor în organismele multiceulare este posibilă datorită adeziunii celulare. Pielea are o structură complexă și integritatea sa are o importanță deosebită în îndeplinirea funcției de protecție. Conexiunea dintre epiderm și membrana bazală este asigurată de joncțiunile intercelulare. Prezența bolilor genetice și autoimune, asociate cu lipsa sau lezarea desmozomilor, deteriorează integritatea pielii [40]. Acestea sunt cele mai întâlnite joncțiuni intercelulare și au un rol important în menținerea structurii pielii, la nivelul epitelului. Celulele epidermale sunt atașate între ele prin intermediul plăcii desmozomale. Hertl (2006) și Delva și colab. (2009) au descris structura plăcii intercelulare desmozomale, alcătuite din desmoplakine și plakoglobine, cu filamente de keratină și proteine transmembranare, desmogleine și desmocoline [41].

Structura și funcția epidermului sunt menținute prin joncțiuni intercelulare, ce includ joncțiuni strânse, joncțiuni gap, joncțiuni hemodesmozomi și desmozomi. Aceste legături intercelulare au rol de adeziune, semnalizare, comunicare, diferențiere, migrare, proliferare, permeabilitate și dezvoltare celulară [42].

La microscopul electronic desmozomii au un aspect de joncțiuni discoide, cu diametrul de 0,2-0,5 μm . Sunt compuși din două plăci dense, separate de un spațiu de 24 – 30 μm [43, 44]. În structura desmozomilor intră desmogleinele și desmocolinele din familia cadherinelor, placoglobina și placofilinele din familia armadillo, iar din familia plachinelor se regăsesc patru proteine: desmoplachina, plectina, envoplachina și periplachina. Cadherinele desmozomale sunt reprezentate de desmogleinele 1 - 4 și desmocolinele 1 - 3, codate de gene localizate pe cromozomul 8 [45]. Desmogleina 2 (116 kDa) și desmogleina 3 (130 kDa) sunt exprimate, în principal, la nivelul straturilor profunde ale epidermului, în timp ce desmogleina 1 (165 kDa) este distribuită în straturile superficiale. Desmogleina 4 (108 kDa) se determină în foliculul pilos și în stratul granular [46-49]. Adeziunea extracelulară a proteinelor desmozomale este dependentă de calciu [50]. Cadherinele desmozomale interacționează în spațiile intercelulare cu molecule similare din celula vecină, iar la nivelul citoplasmei se leagă indirect de filamentele intermediare ale citoscheletului, prin intermediul proteinelor din familia armadillo și plachinelor (Figura 1.2).

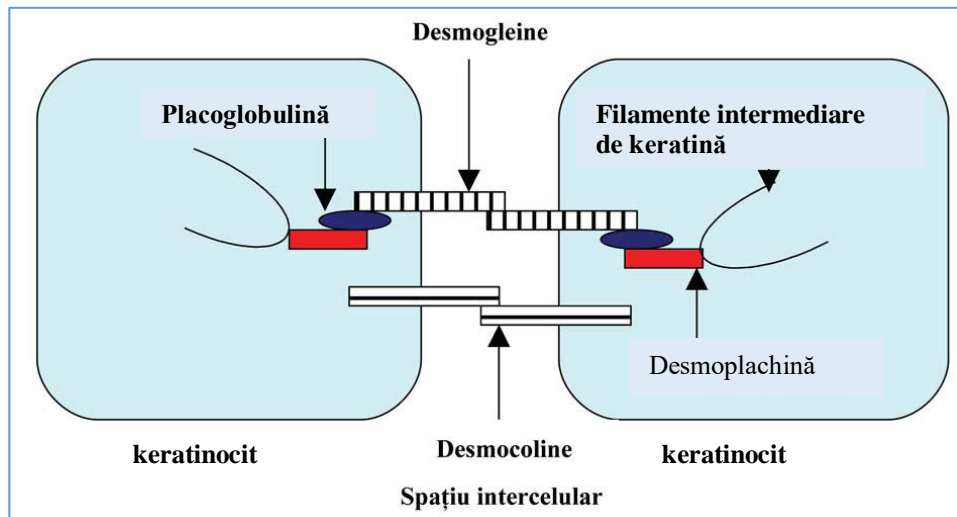


Fig. 1.2. Reprezentarea schematică a structurii desmozomului [44].

Desmogleinele și desmocolinele sunt alcătuite dintr-un domeniu extracelular, un domeniu scurt transmembranar și un domeniu citoplasmatic. Domeniul extracelular este format din 4 structuri repetitive și o structură de ancorare extracelulară. Cele 4 structuri sunt formate, fiecare, din aproximativ 110 de aminoacizi, conectați prin legături de calciu. Prin segmentul intracelular, desmogleinele se leagă de placoglobină [50, 51, 46]. La nivel intracelular, în structura

desmogleinelor intră și un segment bogat în prolină, un domeniu cu unități repetitive și un domeniu terminal bogat în glicină [52-56]. Domeniul central al placoglobinei interacționează cu desmoplachina, care fixează filamentele intermediare de keratină la nivelul plăcii desmozomale [57]. În plus, față de rolul de adeziune, placoglobina reglează creșterea, supraviețuirea și diferențierea celulelor indirect – prin influența asupra β -cateninei și direct – prin căile transcripționale [58, 59]. Gena care codează placoglobina este situată pe cromozomul 17 [60]. Placofilinele sunt considerate membre ale subfamiliei cateninei p120. S-au identificat trei variante de placofilină: 1 (80 kDa), 2 (100 kDa) și 3 (87 kDa). Genele care codifică aceste proteine sunt situate pe cromozomii 1, 12 și 11 [61]. Placofilinele sunt formate din 9 domenii. Variantele 1 și 2 există ca două izoforme, fiecare generând o formă scurtă (a) și o formă lungă (b). Placofilinele interacționează prin capătul N-terminal cu alte componente ale desmozomilor – desmoplachina, cadherinele desmozomale, placoglobina, β -catenina și cu filamentele intermediare de keratină, în funcție de izoformele prezente [56]. Ca răspuns la stresul celular, placofilinele sunt recrutate spre granulele ce acumulează complexe de inițiere a transducerii, sugerând un rol posibil al placofilinelor în metabolismul ARN [62].

Conexiunea citoscheletului cu membrană celulară este asigurată de proteinele din familia plachinelor, reprezentate de desmoplachina, plectină, envoplachina și periplachina. Desmoplachina se prezintă sub 2 variante: desmoplachina I (322 kDa) și desmoplachina II (259 kDa). Este codificată de o genă de pe cromozomul 6 [63]. Desmoplachina este formată din 3 domenii: capătul N-terminal se leagă de proteinele armadillo și de desmocolina 1a, domeniul central și extremitatea C-terminală fixează complexul desmozomal de filamentele intermediare de keratină [64-67]. În afară de menținerea integrității, tisulare desmoplachina are rol și în reglarea proliferării și diferențierii celulare.

1.5. Boli cutanate provocate de lezarea desmozomilor

Proteinele din structura desmozomilor pot fi ținta autoanticorpilor în leziunile pemfigusului. Defectele din formarea componentelor desmozomale sunt legate de anumite boli genetice.

Pemfigusul este o maladie autoimună. Clinic, este caracterizată prin bule la nivelul pielii și mucoaselor; histologic – prin lezarea keratinocitelor, iar imunologic – prin autoanticorpi direcționați împotriva desmogleinelor 3 și 1. Patogenitatea acestor autoanticorpi este demonstrată atât prin observații clinice, cât și prin studii experimentale. Se descriu două tipuri majore de pemfigus: pemfigusul vulgar, cel mai des întâlnit (aproximativ în 80-90% din cazuri), și pemfigusul foliaceu [68, 69]. Desmogleina 3 este exprimată pe toată grosimea epiteliului mucoasei

orale, dar în epiderm este prezentă în stratul bazal și epiderm. Desmogleina 1 este distribuită în tot epidermul, dar la nivelul epiteliului mucoasei orale se determină doar în straturile superficiale (Figura 1.3).

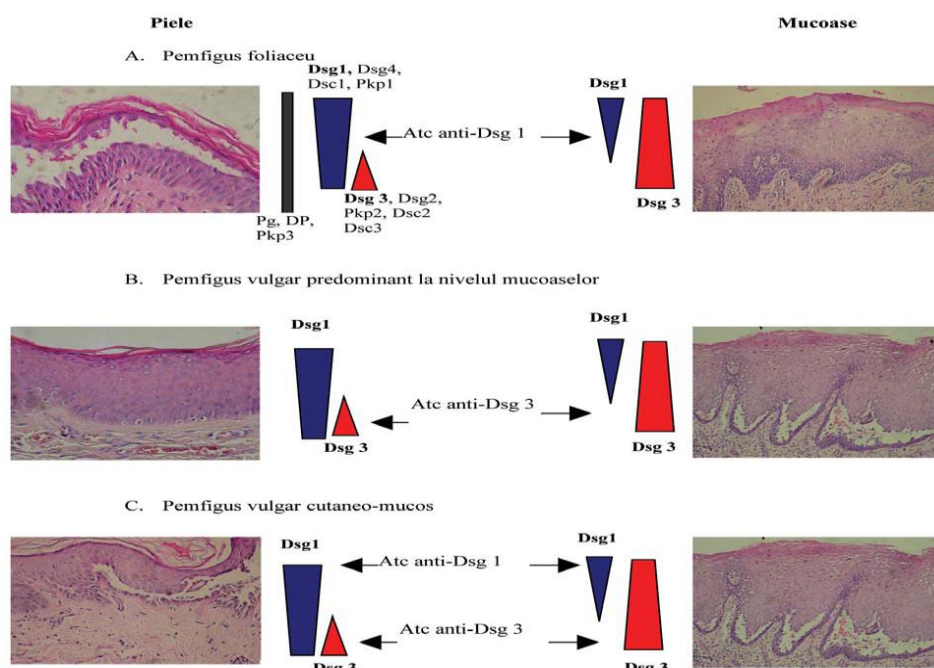


Fig. 1.3. Distribuția desmogleinelor și profilul auto-anticorpilor în piele și mucoase: atc - autoanticorpii, dsg – desmogleină, dsc – desmocollină, pkp – placofilină, dp – desmoplachină, placoglobină [68].

Prin urmare, dacă pacientul are doar autoanticorpi orientați împotriva desmogleinei 1, leziunile vor apărea în straturile superficiale ale epidermului, unde desmogleina 3 lipsește. Acești anticorpi nu pot induce leziuni în mucoase, deoarece la acest nivel pierderea desmogleinei 1 este compensată de prezența desmogleinei 3 pe toată grosimea epiteliului. În consecință, autoanticorpii anti-desmogleina 1 vor determina doar leziuni cutanate superficiale, fenotip clinic și imunologic caracteristic pentru pemfigusul foliaceu. Pacienții caracterizați imunologic doar prin anticorpi anti-desmogleină 3 vor dezvolta leziuni doar la nivelul mucoaselor, în straturile profunde ale epiteliului, unde lipsa desmogleinei 1 permite apariția leziunilor prin distrugerea desmogleinei 3. Astfel, se realizează fenotipul clinic al pemfigusului vulgar cu leziuni doar în mucoase [68-71]. Nivelul autoanticorpilor corelează cu severitatea maladiilor. De asemenea, pemfigusul vulgar apare la nou-născuți de mame bolnave de pemfigus, prin transferul transplacentar al autoanticorpilor [69]. Mai multe studii experimentale au demonstrat dezvoltarea bulelor cutanate la șoarecii nou-născuți injectați cu imunoglobulina G izolată de la pacienții cu pemfigus [72-75]. Anticorpii împotriva desmogleinelor 1 și 3 induc formarea bulelor intraepidermice prin diverse mecanisme, asamblarea desmozomilor și căile de semnalizare celulară. Implicarea desmogleinei 1 a fost raportată în

impetigo bulos și în forma sa generalizată, sindromul stafilococic de piele opărită (staphylococcal scalded skin syndrome – SSSS). Ambele afecțiuni sunt produse de stafilococul auriu, capabil de a secreta o toxină exfoliativă. [76]. O altă varietate de boli genetice, ce interesează componentele desmozomului, au fost identificate în ultimii ani. Astfel, o haploinsuficiență a genei care codifică desmoplachina sau desmogleina 1 produce keratoderma palmo-plantară striată, o boală autosomal dominantă, caracterizată prin hiperkeratoză liniară și focală palmo-plantară. [61]. La pacienții cu sindrom de fragilitate cutanată și displazie ectodermală severă autozomal recesivă s-au raportat mutații ale placofilinei 1 [77]. A fost raportat un caz de epidermoliză buloasă acantolitică letală, apărută prin două mutații recesive în domeniul carboxiterminal al desmoplachinei. Efectul acestor mutații este pierderea conexiunii filamentelor de keratină pe desmozom și, implicit, o acantoliză epidermică masivă [78]. Defectele genetice de formare a structurilor desmozomale pot afecta și foliculul pilos sau miocardul [79-86].

1.6. Rolul citokeratinei în dezvoltarea pemfigusului

1.6.1. Imunomorfologia pielii în normă

Cribier B., Croshant E. (1993), Белецкая Л. В., Махнова Н.В. (2000) au relatat că o mare parte din proteinele filamentelor intermediare la mamifere sunt reprezentate de keratine. Keratinele sunt proteine sintetizate în epiteliu [87, 88]. Acestea sunt heteropolimere obligatorii de tipurile I și II. În pielea omului sănătos citokeratina este sintetizată de celulele stratului bazal epitelial. Caracterul expresiei simultane al keratinelor ambelor tipuri caracterizează gradul de diferențiere a celulelor epiteliale și statusul proliferativ celular. Se cunosc 28 de keratine care se referă la tipul I și 26 de proteine la tipul II. Keratinele cu funcție de barieră au cel mai variat și complicat tip de expresie. În țesuturi, keratinele, adesea sunt numite citokeratine, și expresează împreună tipul I și II [88]. Filamente de keratină se leagă cu structurile intercelulare (desmozomi) și cu semidesmozomi. Din punct de vedere funcțional, perechile de keratină pot fi divizate în trei grupe: simple, de barieră și de structură. Epiteliocitele bazale se unesc prin intermediul desmozomilor și semidesmozomilor cu membrană bazală. Toate conexiunile, sunt compuse din legături de filamente keratinice în formă de rețea densă care trec prin citoplasma fiecărei celule [89, 90]. Componența proteinelor din filamentele de keratină, care se expresează în celule epiteliale, depinde de localizarea și starea fiziologică a celulelor. Aceasta se observă cel mai bine în diferențierea celulelor în epiteliul pluristratificat [91]. Celulele bazale ale epiteliului sunt mai puțin diferențiate, ele își mai păstrează contactul cu membrana bazală. Aceste celule se divid și prezintă celule stem, asigurând creșterea țesutului. După ce celulele părăsesc stratul bazal și se deplasează

spre suprafață, ele ies de sub acțiunea directă a membranei bazale și a semnalelor de creștere. Celula se pregătește pentru diferențiere definitivă. În procesul de dezvoltare, primele se expresează keratinele simple, reprezentate de proteinele K8 (tipul II) și K18 (tipul I). Ele există în celulele embrionare. Expresia lor este minimă și corespunde keratinocitelor caracteristice pentru epiteliul funcțional. La vertebrate proteinele K8 și K18 au cea mai conservativă structură și persistă în celule la toate etapele de dezvoltare celulară. Toate celulele embrionare expresează K8 și K18 până la stadiul de gastrulație. În keratinocitele stratului bazal al epitelului scuamos stratificat se găsesc K14 (tip I) și K5 (tip II), de exemplu, epiteliul cutanat. K5/K14 expresează celulele stratului bazal. Ele formează citoscheletul celulelor epitelului plat pluristratificat. Expresia keratinelor secundare depinde de tipul țesutului. Keratinele de izoformă K6, K16 și K17 manifestă proprietățile proteinelor de stres în epiderm, iar sinteza lor este indusă prin lezarea țesutului și inflamație [92]. Keratinele epidermale asigură rezistență tisulară. Adesea, diferite stări patologice cutanate sunt însoțite de afectarea diferențierii celulelor epidermului (Figura 1.4).

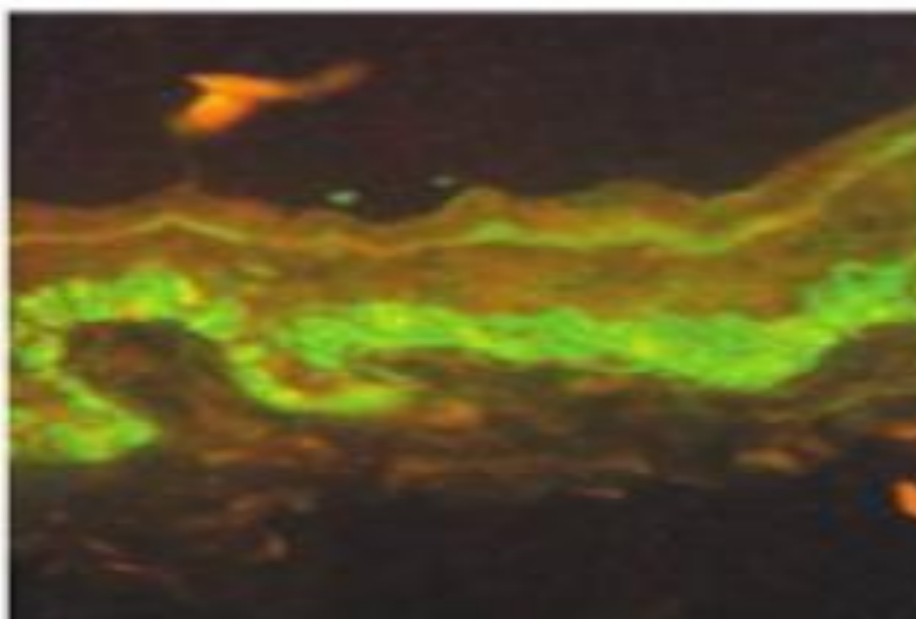


Fig. 1.4. Localizarea citokeratinei 5 (antigenul bazo-celular al epitelului plat pluristratificat). Secțiuni criostatice ale pielii prelucrate cu anticorpi monoclonali pentru citokeratină 5, serie 6/1, bolnavilor dermatologici (reacție de imunofluorescență directă, x40, efectuată de Дробышева Э. И.). Figura reprezintă segmentul cu localizare normală a antigenului, reacția în stratul bazal al

Exame..... epidermului [88]. reacția de imunofluorescență în citoplasma celulelor stratului bazal și lipsa ei în celulele straturilor diferențiate ale epitelului plat pluristratificat (Белецкая Л.В. și coautorii; 1991) [88]. Complexele imune cu acțiune citotoxică nu doar condiționează distrugerea structurilor tisulare, ci și se implică în programul de control asupra stării morfologice și funcționale ale celulei. Investigația cu

anticorpul AE1 detectează citokeratinele K10, K14, K15, K16 și K19. Clona AE3 marchează citokeratinele K1, K2, K3, K4, K5, K6, K8 și K9 [87].

1.6.2. Imunomorfologia pielii în pemfigus

Moll R. și alții în anul 1982, au observat defectul keratinei 5 în dermatitele autoimune buloase (pemfigus vulgar, pemfigoid bulos etc.) (Figura 1.5) [88]: zone fără expresia keratinei și/sau depleție (cu expresie numai în locurile semidesmozomilor), și/sau sinteză exprimată (cu expresia nu doar în citoplasma celulelor stratului bazal, ci și parțial în stratul spinos). Acest fenomen poate fi explicat prin acțiunea autoanticorpilor și a complementului asupra structurilor tisulare în etapele incipiente ale procesului și prin implicarea factorilor patologici suplimentari, inclusiv a citochinelor, fermentilor și mediatorilor. Ultimii sunt în legătură cu funcția aparatului desmozomal, responsabil de integritatea structurilor tisulare și de procesele normale de proliferare și diferențiere a elementelor celulare.

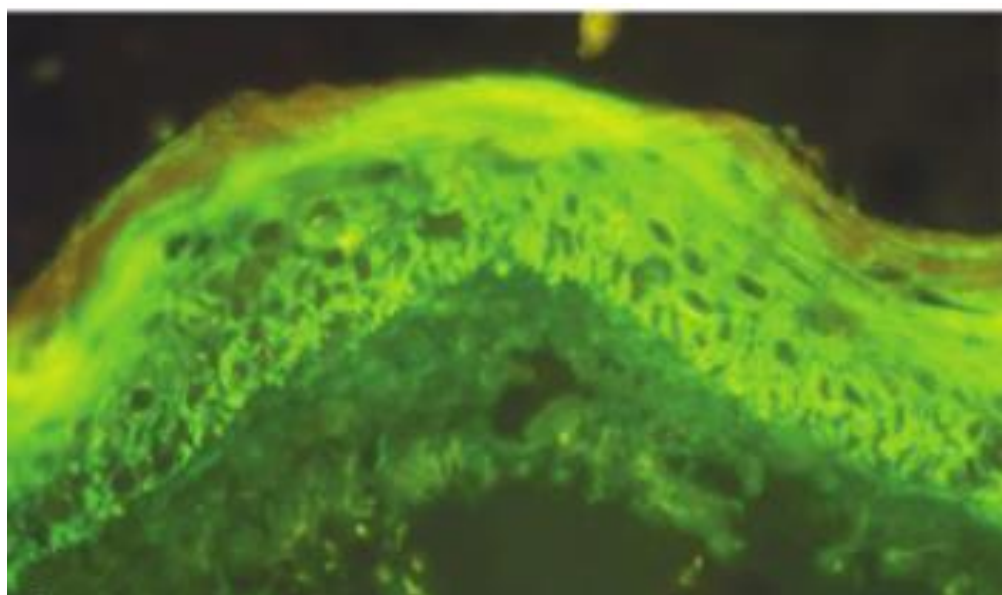


Fig. 1.5. Localizarea citokeratinei 5 (antigenul bazo-celular al epiteliului plat pluristratificat). Secțiuni criostatice ale pielii prelucrate cu anticorpii monoclonali pentru citokeratina 5, seria 6/1, a bolnavilor dermatologici (reacție de imunofluorescență directă, x 40, efectuată de Дробышева Э. И.). Figura reprezintă un segment al pielii bolnavului cu pemfigus vulgar, expresia citokeratinei în citoplasma celulelor stratului bazal a epidermului și a celulelor stratului spinos [88]

Originea cascadei interleukinice în pemfigus vulgar și alte afecțiuni buloase autoimune (pemfigoid bulos, pemfigus foliaceu etc.) este necunoscută [89, 90]. Există dovezi că keratinocitele produc mediatori chimici care pot influența sistemul imunitar local în pemfigus vulgar și pemfigoid bulos. Mulți autori au căutat o asociere dintre citokine și pemfigus. Baroni și colab. , au folosit testul imunoenzimatic (ELISA) pentru a căuta IL-10, IL-8, IFN γ în exudatul bulelor și în

serul pacientului. Ei au găsit că nivelul de citokine din acest secret a fost mai mare decât în seruri. În plus, ei au relevat rolul antiinflamator ale IL-10 și IL-8 în neutrofile și recrutarea limfocitelor-monocite [91]. Eberhard și colab., au studiat polimorfismul citokinelor și rolul lor în mecanismul de formare a bulelor. Ei nu au găsit diferențe între pacienții cu pemfigus și cei din lotul-martor cu frecvența polimorfismului genelor TNF α și TGF β . Cercetarea polimorfismului de citokine s-a efectuat și în pemfigus foliaceu, determinând doar rolul patogen al IL-6 [92, 93]. Însă rolul esențial al citokinelor a fost confirmat de un studiu imunohistochimic care evidențiază prezența unei populații de celule T cu o prevalență al pattern-ului de citokină Th2 în leziunile cutanate la pacienții cu pemfigus, în asociere cu un număr mare de granulocitele activate și celulele mastocite [94]. Mecanismul asemănător este și în pemfigoid bulos [95]. Citokinele sunt implicate în expresii și modulare ca C3, PA și PAI [96, 97]. S-a descris rolul pentru IL-1 α și TNF α în reglarea expresiei C3 și uPA [98], și s-a presupus că ambele citokine amplifică factorii de acantoliză [99- 101]. Recent, a fost propus rolul apoptozei în patogeneza acantolizei. Wang și colab. au arătat că în exudatul bulelor la pacienții cu pemfigus vulgar există celule izolate și resturi celulare cu nuclee condensate, fragmentate și corpuri apoptotici ce caracterizează apoptoza. Ei au determinat că celulele apoptotice corespund celulelor acantolitice și că apoptoza precede acantoliza. Ulterior, studiile au demonstrat că anticorpii împotriva desmogleinelor pot induce leziuni acantholitice în culturile keratinocitelor într-un mod similar. Aceste rezultate au indicat faptul că acantoliza ar putea rezulta din apoptoza indusă de legarea anticorpilor IgG de suprafața celulei, dar această ipoteză are nevoie de o confirmare ulterioară.

1.7. Rolul desmogleinei 3 în ancorarea firului de păr în foliculul pilos în faza telogenă

În acest subcapitol vom discuta despre rolul desmozomilor în structura și funcția normală ale părului. Marta Sar-Pomian și alții (2018) [102, 103] raportează că frecvența implicării scalpului în pemfigus se estimează la 16 - 60% [91]. Conform datelor selectate din literatura de specialitate în 9-15 % [103, 104] din cazuri, scalpul este regiunea cea mai frecvent afectată de pemfigusul acantolitic (Figurile 1.6, 1.7) [105].



Fig. 1.6. Afectarea scalpului în pemfigus vulgar [102].

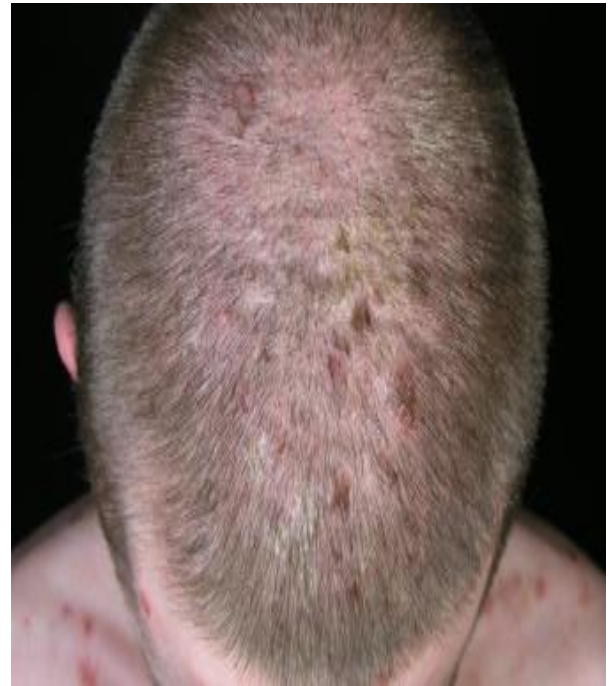


Fig. 1.7. Afectarea scalpului în pemfigus foliaceu [102].

Îndepărată neforțată a firelor de păr anagen într-un test de tragere cu banda adezivă este un semn de activitate înaltă a maladiei. Autorii au sugerat ideea că apariția alopeciei în aceste cazuri ar putea fi asociată cu o concentrație extrem de ridicată a anticorpului anti-DSG 1, egală cu 2017 U/ml (valoarea întreruptă <14 U/ml). Recent, Yoshida și colab. au descris un caz de tranziție de la pemfigus foliaceu la pemfigus vulgar [104]. Autorii au observat o corelație între leziunile scalpului și concentrația anticorpilor anti-DSG 3 în testul imunoenzimatic [105].

În studiul histopatologic efectuat de către Marta Sar-Pomian și alții, în anul 2017, pe 32 de pacienți cu pemfigus [106], a fost observat că acantoliza foliculară este o particularitate comună a ambelor tipuri de pemfigus, care apare la 12/17 (70,6%) de pacienți cu pemfigus vulgar și la 12/15 (80,0%) de pacienți cu pemfigus foliaceu [102]. De asemenea, s-a confirmat faptul că pemfigusul vulgar diferă de pemfigusul foliaceu în ceea ce privește profunzimea acantolizei. În pemfigusul vulgar acantoliza s-a extins pe întreaga lungime a tecii radiculare a foliculului pilos, iar în pemfigusul foliaceu acantoliza s-a limitat la infundibul. Acantoliza a fost observată și în foliculii de păr vellus la 12/17 (70,6%) de pacienți cu pemfigus vulgar și la 9/15 (60,0%) de pacienți cu pemfigus foliaceu [107]. În plus, acantoliza a fost prezentată în canalele glandelor sebacee la 3/17 (17,6%) de pacienți cu pemfigus vulgar și la 1/15 (6,7%) de pacienți cu pemfigus foliaceu, precum în glandele sudoripare la 2/17 (11,8%) și la 2/15 (13,3%) de pacienți, respectiv [108]. De asemenea, s-a observat micșorarea glandelor sebacee la 14/17 (82,4%) de pacienți cu pemfigus vulgar și la 12/15 (80%) de pacienți cu pemfigus foliaceu (Figura 1.8) [108, 109].

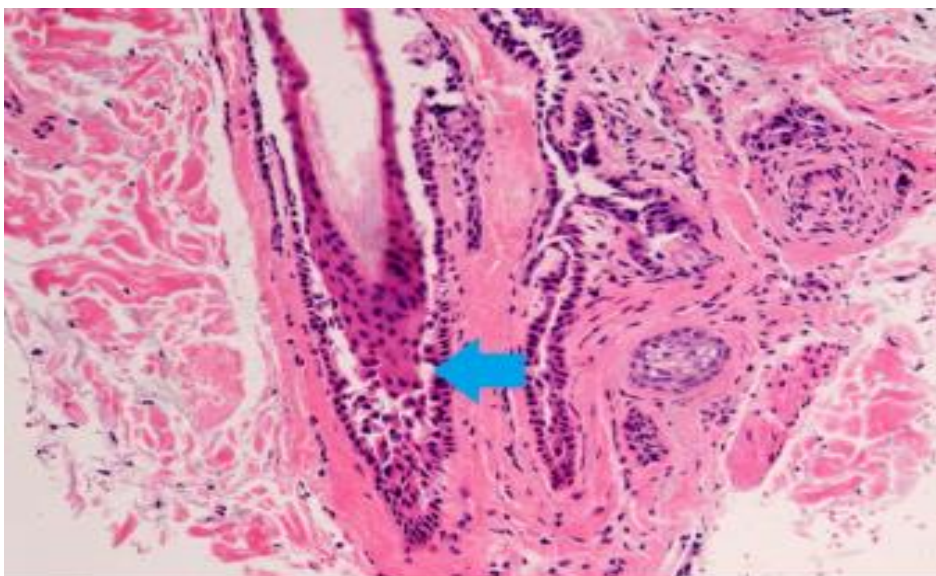


Fig. 1.8. Histopatologia leziunii scalpului în pemfigus vulgar (acantoliză în teaca radiculară dermală a foliculului pilos; sageată albastră. Hematoxină și eozină, ×40 [93].

Peter J. și alții (1998) [110] au obținut rezultate interesante, care relevă că șoarecii, în lipsa desmogleinei 3 (DSG3-/-), prezintă nu doar leziuni pe mucoase și piele, asemănătoare cu pemfigusul uman, ci și căderea firelor de blană. Analiza acestui fenotip demonstrează că firele de păr sunt normale în prima fază a creșterii părului (neogeneză foliculară). În jurul zilei a 20-a totuși, când foliculul pilos intră în faza de repaus a ciclului de creștere a părului (faza telogenă), șoarecii cu gena defectă pentru desmogleina 3 (DSG3-/-) își pierd blana într-un mod (patern) specific – de la cap până la coadă. Firele de blană cresc din nou, apoi cad în același mod în următorul ciclu de creștere a părului. La șoarecii maturi, firele de blană cădeau pe alocuri. S-a observat că firele fine de blană, trase cu bandă adezivă în faza anagenă (de creștere), erau ancorate ferm la șoareci DSG3 - / -, iar părul telogen a pierdut fixarea în comparație cu cel al fenotipul DSG3 +/- și + / + la care firele în fază telogenă au fost ferm ancorate. Histologia zonelor de chelie cutanată la șoareci DSG3 - / - a arătat prezența chisturilor în teacă foliculului pilos telogen fără tulpina părului. Histologia foliculilor piloși în faza telogenă timpurie, chiar înainte de căderea clinică a părului, a arătat lipsa aderenței celulare (acantoliza) între celulele din jurul bulbului pilos telogen și stratul bazal al epitelului cutanat (Figurile 1.9, 1.10) [109, 110].

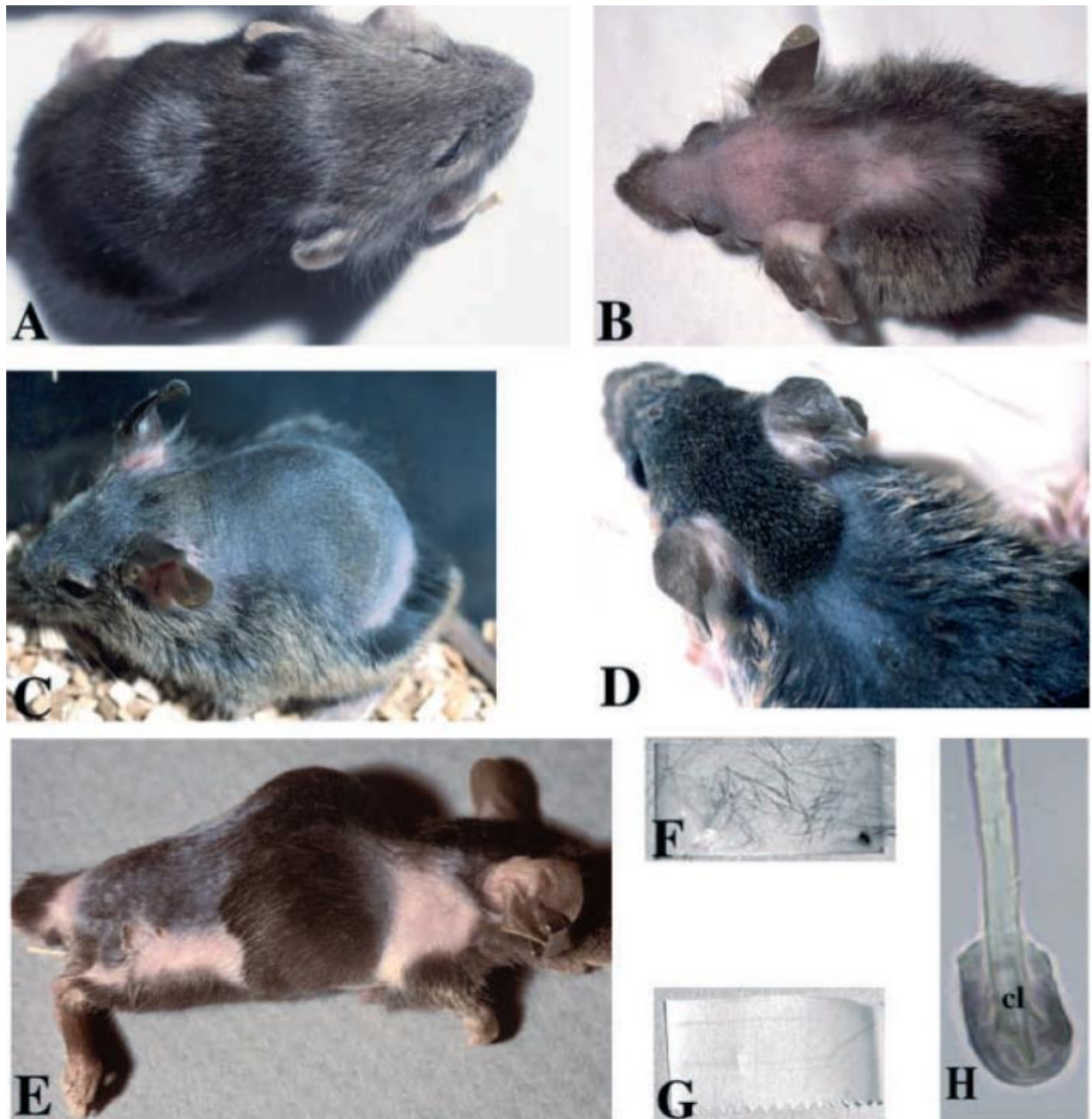


Fig. 1.9. Diferite etape ale căderii părului la șoarecii DSG3 - / - – șoarece DSG3 - / -, A – de 15 zile, cu pielea normală. B – șoarece de 31 de zile după o săptămână de la începerea căderii părului; regiunea capului și gâtului este lipsită de păr. C, D – după 2-3 săptămâni de la începerea căderii părului; este vizibilă restabilirea blanei C – șoarece de 36 de zile; D – șoarece sunt de 37 de zile). Aspectul întunecat al părului (imaginea C) indică faptul că foliculii de păr sunt în faza anagenă. Se denotă o creștere pronunțată a părului pe frunte D. Imaginile C și D, permit observarea variațiilor individuale în sincronizarea și întinderea căderii blanei și creșterea ei. E – șoareci mai maturi de 3 luni, cu pierderea și creșterea areată a părului (în patch-uri). F, G – după aplicarea benzii adezive pe spate printr-o tragere blândă în direcția creșterii părului, se observă pierderea fixării firelor părului în șoareci mutați F – șoarece DSG3 - / -, în vârstă de 23 de zile; G – șoarece DSG3 + / + de 20 de zile din lotul de control; ambii șoareci au fost în faza telogenă, cum s-a confirmat histologic. H – bulbul părului de pe banda adezivă (cl) este înconjurat de un strat celular derivat din teaca lui [110].

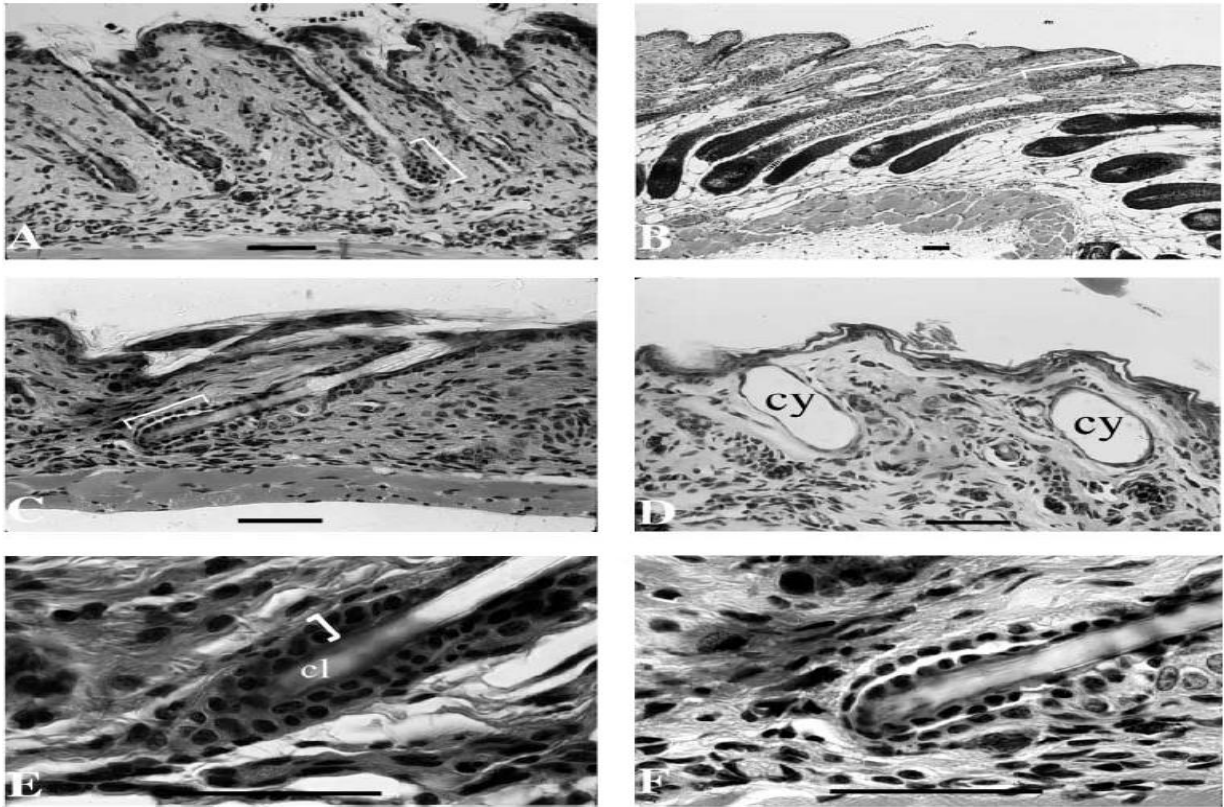


Fig. 1.10. Fragemntul de piele obținut de la șoareci DSG3 - / - (A, C, D, F) și de la șoarecii DSG3 + / + (B, E). A – șoarece mutant de 23 de zile, cu căderea părului (banda adezivă este reprezentată în figura 1.7., imaginea F provine de la acest șoarece). Părul se află în faza de repaus a ciclului de creștere (telogenă). Sunt vizibile numeroase leziuni în foliculii inferioari de păr (exemplu indicat în paranteze pătrate). B – șoarece DSG3 + / + din lotul-martor, deja în fază anagenă. C – foliculul pilos telogen de la șoarece DSG3 - / - (de 22 de zile). Numai în partea inferioară a foliculului în fază telogenă (vezi parantezele) se observă detașarea tecii. D – chisturi (cy) în regiunile de chelie la șoarece DSG3 - / - (de 24 de zile). E – folicul telogen de la șoarece din lotul-martor (normal) cu stratul celular epitelial a tecii bulbului părului (în paranteze) în jurul bulbului de păr (cl). F – îngroșarea superioară a foliculului pilos este prezentată în C. Se evidențiază formarea spațiului de detașare între cele două straturi de celule epiteliale [110].

Studiul cu imunoperoxidază prin intermediul anticorpilor împotriva desmogleinei 3 la șoareci a relevat o colorare intensă a spațiului interkeratinocitar în jurul bulbului de păr telogen la șoarecii normali. O colorare similară s-a observat în bulbul firului de păr telogen în imunofluorescență cu anticorpul uman împotriva desmogleinei 3. În final, biopsia scalpului unui animal cu pemfigus vulgar a arătat lipsa foliculilor de păr telogen.

1.8. Sistemul complementului în patogeneza pemfigusului autoimun

Cercetările științifice acordă multă atenție complementului și rolului său în evoluția

acantolizei. Complementul este unul dintre cele mai importante mecanisme naturale de rezistență contra infecțiilor la om și la animale se implică activ în patogeniza mai multor boli, inclusiv cutanate, caracterizate prin prezența autoanticorpilor și lezarea țesuturilor și celulelor. Complementul este destinat să atace nu numai microorganismele patogene, dar și celulele deteriorate ale organismului. Sistemul complementului are activitate puternică și este un potențial dăunător pentru însuși organism [111- 115].

Pentru prima dată, depunerea componentului C3 al complementului în țesutul afectat, a fost observată de Cormane și Chorzelski [116, 117]. C3 este prezent în leziunile cutanate până la inițierea terapiei cu corticosteroizi [118]. Fixarea componentelor complementare precoce (C1q și C4), în asocieră cu C3, este prezentă și în leziunile acantolitice timpurii ale pemfigusului, sugerând că sistemul complementului (în special, activat pe calea clasică) poate influența la patogeniza maladei [119-121].

S-a demonstrat faptul că componentele inițiale al complementului persistă atât în pielea afectată, cât și în pielea sănătoasă, fără semne histologice de maladiă. [122]. Autoanticorpii IgG ai pemfigusului, izolați și purificați, fixează componentele timpurii ale complementului (C1q, C3, C4) pe suprafața culturii celulare a keratinocitelor) [123]. La adăugarea complementului la IgG se atestă intensificarea acantolizei și schimbarea integrității membranei keratinocitelor. Ulterior, s-a demonstrat că aceste schimbări sunt posibile și fără implicarea sistemului plasminogen-plasmin [124].

Există câteva mecanisme de dereglare a contactelor intercelulare cu participarea proteazelor. A fost evidențiat faptul că IgG în pemfigus fixează componentele tardive ale complementului (C3-C9) pe suprafața keratinocitelor. S-a stabilit legătura dintre C5b-C9 și neoantigeni (antigenii modificați), cu implicarea ulterioară a complexului atacator de membrane în procesul de acantoliză [125].

Se presupune că componenetele timpurii ale complementului pot ataca, preventiv, în membranele celulare ale keratinocitelor, condiționând activarea componentelor tardive ale complementului sub acțiunea autoanticorpilor pemfigusului și formarea locală a complexului membrano-atacator. Acest complex afectează permeabilitatea membranei celulare prin acțiune citotoxică [126, 127]. Prin metoda de imunofluorescență directă s-a evidențiat prezența componentelor tardive ale complementului (C5, C7, C9) și a complexului de neoantigeni cu C5b-C9 în legăturile intercelulare lezate.

Cercetarea concentrației componentelor complementului a demonstrat că nivelul complementului total hemolitic este mai scăzut față de nivelul acestuia și altor proteine în serul sangvin, și din exsudat din leziunile buloase ale pacienților serologic pozitivi cu pemfigusul vulgar

[128]. Spre deosebire de leziunile buloase ale pacienților cu pemfigoid bulos, multe alte leziuni, inclusiv cele induse experimental, au avut indicii complementului puțin deosebiți de cei din serul sangvin [127]. Componentele C1, C2, C3, C4, și C5 dozate în serul sangvin și exsudatul leziunilor buloase la pacienții cu pemfigus, au avut valorile nedetectabile până la rezultate extrem de joase [125].

Totodată, în pemfigus complexul atacator de membrane nu a fost găsit în pielea clinic sănătoasă. Fixarea complexelor imune, care conțin IgG și componentele timpurii ale complementului în joncțiuni intercelulare a epidermului, dovedește dezvoltarea procesului imunopatologic [128].

Până în prezent, rolul complementului în pemfigus este discutabil, deoarece rezultatele unor investigații și experimente *in vitro* denotă participarea neobligatorie a complementului în mecanismul de formarea bulelor [129].

Nu este exclus faptul că pentru activarea sistemului de proteinaze ale plasminogenului este suficientă doar fixarea autoanticorpilor în țesuturi. În alte cercetări [119] s-a arătat implicarea activă a complementului în patogeneza pemfigusului autoimun, ceea ce posibil nu se observă prin metode obișnuite.

Conform unor autori (Makhneva N.V. s.a., 2013), C3 componentul al complementului circulant se apreciază în proporții scăzute (1:5), față de nivelul IgG-autoanticorpilor circulanți. Acest raport este independent de forma clinică sau stadiul evoluției maladiei. Ținta este o substanță de adeziune intercelulară a stratului granular, ce corespunde cu localizarea IgG2-autoanticorpilor circulanți [130, 131].

După studierea biopstatelor cutanate de către Махнева Н. В și Белецкая Л. В. (2012) a fost stabilit că în pemfigusul autoimun componentul C3 al complementului s-a fixat în 50,6% din cazuri, independent de forma clinică sau de stadiul dezvoltării bolii [132].

Identificarea componentului C3 al complementului după limitele pemfigusului autoimun sugerează nu doar participarea sistemului complementului în imunitatea specifică a organismului în localizarea antigenului-țintă, dar și răspândirea lui pe alte structuri a regiunilor cutanate clinic intacte.

S-a menționat că scăderea concentrației componentelor complementului în serul sangvin se datorează activității anticomplementare a exsudatului din leziunea buloasă, de pemfigus, prin inhibarea componentelor C1, C2, C3 și C5 complementului din serul sangvin. [133-135].

Prin urmare, având în vedere posibilitatea implicării diferitor mecanisme molecular-biologice în patogeneza pemfigusului autoimun, problema implicării sistemului complementului în această maladie are nevoie de dezvoltare și cercetări viitoare [136-140].

1.9. Modele experimentale de leziuni pemfigus-like

Animalele de laborator sunt folosite ca modele pentru a studia maladiile umane. Animalele mici, în special șoarecii, pot fi luate ca etalon [141].

Cercetarea pemfigusului s-a început în 1964, de la descoperirea de către Beutner E.H. și Jordon R.E. a anticorpilor circulanți, în serul pacienților cu pemfigus vulgar [137, 138]. Prin metode imunohistochimice (imunoprecipitare și imunobloting) au fost caracterizate antigenele-țintă în pemfigus [137, 138]. Etiopatogenia pemfigusului incriminează autoimunitatea prin autoanticorpi de tip IgG direcționați împotriva keratinocitelor, ceea ce condiționează pierderea legăturii interkeratinocitare datorită fenomenului numit acantoliză, formând spații intercelulare ce se umplu cu fluid formând bule sau chiar lezarea pielii.

În baza caracteristicilor evidențiate prin imunofluorescență, au fost descrise trei forme majore de pemfigus: pemfigusul vulgar, pemfigusul foliaceu și pemfigusul paraneoplazic [139, 140]. Pemfigusul vulgar se caracterizează prin apariția leziunilor buloase, mediate de acțiunea anticorpilor împotriva desmogleinei 3. În pemfigusul foliaceu este implicată IgG anti-desmogleina 1, determinând un clivaj superficial la nivelul epidermului. Pemfigusul paraneoplazic reprezintă cea mai rară, dar și cea mai gravă formă, luând în considerație dezvoltarea unei tumori.

Conform datelor din literatură [141-143], modelele animale ale maladiilor autoimune buloase cutanate ar putea reproduce și semnele clinico-morfologice ale pemfigusului vulgar.

Modele experimentale de animale cu pemfigus obținute prin transfer pasiv de anticorpi:

- a. Transferul de limfocite autoreactive
- b. Modele transgenice
- c. Modele forțat imunizate.

Fiecare model permite investigarea unei sau mai multor etape ale schimbărilor patogenice succesive ce au loc în pemfigusul vulgar.

1.9.1. Modelarea pemfigusului vulgar prin transferul pasiv de anticorpi

Primul model de animal obținut prin transfer pasiv de anticorpi pentru pemfigus a fost descris în 1982 de către G. Anhalt și colegii lui [144]. În aceea perioadă, desmogleinele nu au fost identificate ca ținte antigenice relevante ale autoanticorpilor. Prin precipitarea anticorpilor fracției IgG din serul pacienților cu pemfigus vulgar și cromatografia cu schimbul de ioni, G. Anhalt le-a purificat și zilnic le-a injectat intraperitoneal șoarecilor nou-născuți BALB/c în doze de 1,5-16 mg/g corp. În consecință, a indus apariția la ei a veziculelor și eroziunilor cu caracteristicile

histologice, imunologice și ultrastructurale ale pemfigusului uman (Figura 1.11) [145].

În funcție de doza injectată în decursul a 18-72 ore, au fost observate vezicule cutanate discrete și lezarea extensivă a epidermului. Injectarea în continuare a IgG la șoareci maturi a indus dezvoltarea continuă a eroziunilor și crustelor, însă după întreruperea administrării de IgG, leziunile cutanate s-au epitelizat. Dozele raportate de IgG obținută de la pacient și care sunt necesare pentru a induce patologia, au variat de la 50 μg până la 10 mg/g corp a șoarecelui [144, 145]. Această diferență a fost cauzată, probabil, de calitatea diferită a serurilor izolate de la pacienți pentru a induce patologia.

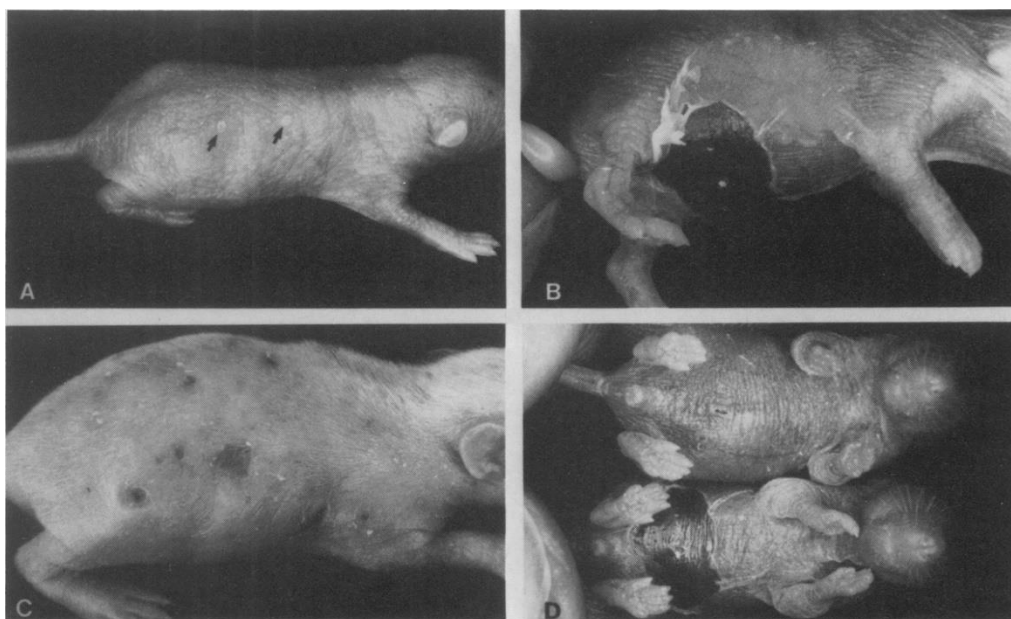


Fig. 1.11. Transferul pasiv de autoanticorpi la șoareci cu scopul modelării maladiilor cutanate buloase. Injecția de IgG de la pacienții cu pemfigus vulgar sau pemfigus foliaceu induce formarea bulelor atunci când sunt injectate la șoarecii nou-născuți. A, B, C, D - prezentare generală a modelelor disponibile [134].

Buschard K. în anul 1981 [146], a descris metoda transferului pasiv de anticorpi ce se asociază cu o greafă mucoasă umană. Această abordare i-a permis să analizeze interacțiunile autoanticorpilor umani cu mucoasa umană greafată șoarecilor. O greafă mucoasă a cavității bucale a fost transplantată șoarecilor nazi atimici BALB/c/BOM, urmată de injecția serului de la pacienții cu pemfigus vulgar.

Recent s-a reușit demonstrarea modelului maladiei la șoarecii micști grav imunodeficienți, cărora li s-a grefat pielea umană de grosime completă de la voluntari sănătoși, urmată de injecția anticorpilor fracției IgG (doza totală – 20 mg) de la pacienții cu pemfigus vulgar și a serului de la persoane sănătoase [146]. Această metodă de asemenea a demonstrat formarea acantolizei în epiderm. Neajunsurile acestui model au constat în efectele epitelizării plăgilor induse de greafă, ce pot influența rezultatele studiului.

Modelul obținut pe animal prin transfer pasiv de anticorpi pentru pemfigus, deasemenea a fost folosit într-un studiu experimental al modificărilor imunologice, clinice, ultrastructurale, precum și al celor citochimice, efectuat de către Takahashi Y. în 1985, pe șoareci nou-născuți BALB/c. El a studiat patofiziologia leziunilor cutanate provocate de pemfigusul vulgar și a demonstrat rolul patogenetic al autoanticorpilor în inducerea leziunilor cutanate ale acestei maladii. Prin acest model a fost posibilă analiza în dinamică a leziunilor la animale. Anhalt G. și Takahashi Y. au demonstrat existența unei corelații între erupțiile cutanate și leziunile ultrastructurale observate prin microscopie electronică [147].

Principiul de injectare a autoanticorpilor patogeni la șoarecii nou-născuți a fost utilizat cu succes pentru modelarea mai multor maladii autoimune buloase cutanate. Șoarecii nou-născuți BALB/c (cu vârstă mai mică de 24 de ore) au fost obținuți prin creșterea tulpinilor menținute în laborator. Frațiile purificate ale IgG (o doză – unică 10 mg de IgG/g corp) au fost injectate intraperitoneal acestor șoareci folosind acul M 30.

Katja B. (2009) [148] menționează că transferul de anticorpi fracției IgG are avantaje și dezavantaje. Acest model facilitează studiile asupra leziunilor tisulare induse și menținerea maladiei o perioadă mai lungă și permite analiza efectelor îndelungate ale autoanticorpilor asupra dezvoltării maladiei și evaluarea intervențiilor terapeutice. Dezavantajele sunt în faptul că pielea șoarecilor nou-născuți poate să difere de pielea la maturi, ceea ce poate duce la interpretări greșite. Pentru a induce boala șoarecilor adulți, este necesară o cantitate cu mult mai mare de anticorpi.

1.9.2. Model experimental obținut prin transferul de limfocite autoreactive

Conform datelor din literatura de specialitate [149-151] s-a obținut un model de maladie activă. Un fenotip clinic sever de pemfigus vulgar a fost dezvoltat la șoarecii recipienți Rag 2^{-/-} prin transferul limfocitelor autoreactive obținute de la șoarecii knock-out. Aceasta a permis să fie analizate mecanismele de pierdere a toleranței imune. Șoarecii DSG3-deficienți au fost imunizați prin injectarea intraperitoneală a DSG3 recombinat murine. După 32 de zile de la prima imunizare, șoarecilor Rag2^{-/-} intravenos li s-au introdus limfocite (1×10^7) din splina șoarecilor DSG3-deficienți. Șoarecii cu pemfigus vulgar indus au prezentat o depunere puternică de IgG *in vivo* și slabă de IgA pe suprafețele keratinocitelor în epitelile scuamoase stratificate și au produs anticorpi IgG anti-desmoglein 3 circulanți fără reactivitate încrucișată aparentă la desmogleină 1 prin ELISA. Subclasa IgG predominantă a fost IgG1. Șoarecii au prezentat acantoliză suprabazilară în epitelile scuamoase stratificate, incluzând membranele mucoase orale și pielea traumatizată în jurul botului sau labei. La animale a fost observată spongioză eozinofilică, care se determină în leziunile precoce ale maladiei la pacienți. Model de șoarece cu pemfigus vulgar

reflectă câteva dintre caracteristicile histopatologice și imunologice observate la pacienții cu pemfigus vulgar și oferă un instrument valoros pentru investigarea mecanismelor patofiziologice ale bolii. Pe acest model a fost studiat răspunsul terapeutic la unele preparate imunosupresoare utilizate în tratamentul pacienților cu pemfigus vulgar [152].

Modelele de maladie activă ajută la înțelegerea mecanismelor de mediere a răspunsului imun de către celulele sistemului imunitar față de componentele structurale ale pielii, fapt ce permite dezvoltarea unei terapii celulare în maladiile autoimune buloase cutanate [152].

1.9.3. Inducerea experimentală a autoanticorpilor antiepiteliali la iepuri

Acest subcapitol cuprinde analiza rezultatelor studiilor anterioare [153-156] și ale experimentelor recent efectuate, în perioada anilor 2012 - 2017, în Laboratorul de inginerie tisulară și culturi celulare, care relevă despre specificitatea autoanticorpilor din pemfigusul vulgar și pemfigusul foliaceu pentru țesuturi [157-161]. Serul pacienților cu pemfigus vulgar și pemfigus foliaceu conține anticorpi antiepiteliali care reacționează *in vitro* cu desmogleinele 1 și 3 ale epitelului stratificat. Heteroimunizarea iepurilor cu extractul etanolic obținut din mucoasa esofagului bovin, încorporat în adjuvantul Freund, a fost efectuată cu succes în provocarea apariției anticorpilor, așa cum s-a constatat prin reacția de imunofluorescență directă a zonei intercelulare a epitelului scuamos stratificat. Prin demonstrarea colorației pozitive *in vitro*, efectuate prin imunofluorescență directă (IF), s-a dovedit că acești anticorpi sunt produși de țesuturile proprii. Acești anticorpi sunt specifici țesuturilor și, histologic și serologic, nu diferă de anticorpii din pemfigusul uman [162]. Aici, am inclus studii apărute recent [163, 164], care s-au axat pe posibila valoare diagnostică și pronostică a reacțiilor imunologice, adică a imunofluorescenței (IF), asupra caracteristicilor histopatologice stabilite ale acestor maladii ca indicator pentru diferențierea pemfigusului și pemfigoidului de alte boli buloase și unul de celălalt [165]. Deoarece în studii anterioare [166] s-a descoperit că există o relație directă dintre severitatea pemfigusului și titrul anticorpilor, problema apariției leziunilor, precum și modificările histopatologice nesemnificative ale pemfigusului sunt atribuite parțial fenomenelor imunologice. Au fost elaborate protocoale pentru prepararea extractelor apoase și etanolice din mucoasa esofagului de maimuță-rhesus și de bovina, care conțin antigen cu specificitate tisulară și serologică pentru autoanticorpi împotriva substanței intercelulare a epitelului scuamos stratificat [163-167]. Eforturile suplimentare s-au concentrat pe fracția solubilă în etanol, deoarece studiile preliminare [153] au arătat că fracțiile apoase conțin numeroase proteine serice.

Heteroimunizarea iepurilor cu un extract etanolic din mucoasa esofagului de bovină, încorporat în adjuvantul Freund, a rezultat cu formarea anticorpilor *pemfigus-like*, observați în

patternul de colorare prin IF directă a spațiului intercelular din epiteliul scuamos stratificat și nu a fost posibil să fie diferențiate de anticorpii din pemfigusul uman [159-165]. Anticorpii au reacționat numai cu epiteliul bovin, dar la continuarea imunizării, au apărut anticorpi reactivi cu epiteliul de iepure [166] Anticorpi asemănători cu pemfigusul s-au dovedit a fi autoanticorpii care au fost demonstrați prin reacțiile pozitive *in vitro* cu țesuturile producătoare de anticorpi [168, 169].

Apariția anticorpilor circulanți nu este neapărat însoțită de afectarea țesuturilor corespunzătoare [170, 171]. Acest studiu a fost efectuat în contextul unei încercări de a evalua posibila imunopatogenitate a extractelor etanolice ale mucoasei esofagiene, pentru a corela prezența anticorpilor pentru desmogleinele 1 și 3 din epiteliul scuamos stratificat și histopatologia caracteristică pemfigusului.

Studiile de comparație prin IF, efectuate la pacienții cu pemfigoid bulos, arată că majoritatea acestor indivizi au anticorpi pentru membrana bazală [169-172]. Sunt cunoscute rapoartele, în referire la concordanța dintre pemfigus și miastenia gravis [173, 174]. Anticorpii pentru membrana bazală au fost evidențiați nu doar în pemfigoidul bulos. Cu toate acestea, s-a notat prezența anticorpilor IgG legați *in vivo* de membrana bazală la pacienții cu lupus eritematos [175-186].

1.9.4. Reacțiile comportamentale ale șobolanilor cu leziuni pemfigus-like

Actualmente, problema influenței stresului emoțional de diferită etiologie asupra stării sănătății umane în general și a activității sale comportamentale, este deosebit de relevantă [187]. Stresul emoțional excesiv duce la dezvoltarea tulburărilor afective și stărilor patologice la om care se manifestă prin încălcarea statutului de comportament al lui. Un răspuns sistemic la stres, care vizează eliminarea sau reducerea stresului, este însoțit de schimbări în comportament, autonom, motor, senzoric, cognitiv și alte funcții ale corpului [188]. Comportamentul în timpul stresului este o parte integrantă a comportamentului general. Această schimbare a răspunsului comportamental are loc în direcția stărilor extreme de excitare – inhibare a sistemului nervos central și se încadrează într-o singură scală a activității etologice: stress, teamă, anxietate, depresie e.t.c. [189]. Este bine cunoscut că diferiți factori de stres și combinația lor conduc la o dereglare de orientare și instabilitate psiho-emoțională severă. Testele comportamentale generale și speciale pot fi utilizate pentru a studia indicatorii comportamentali calitativi și cantitativi. Reacțiile comportamentale ale animalelor pot fi determinate cu ajutorul testului „Câmp deschis”. Acest chestionar este un model de cercetare clasică a răspunsurilor comportamentale, bazată pe conflictul dintre două motivații: tendința instinctivă de a studia noul mediu și tendința de a reduce pericolul potențial de la sine [188].

Această metodă a fost propusă în 1936 de către Hall C. S., care a plasat șobolanii într-o arenă largă – „Câmp deschis” – pentru a le studia activitatea motorică și starea emoțională [189]. În cursul cercetărilor sale, s-a constatat că la stimuli noi, potențial periculoși, șobolanii răspund prin scăderea al indicelui de activitate. Această reacție este adaptivă, deoarece imobilitatea animalului reduce posibilitatea detectării sale de către prădători [189].

1.9.5. Concepții despre etiologia pemfigusurilor acantolitice

Deseori, pemfigus vulgar este cauzat de influența medicamentelor [191-193] (preparate pentru tensiunea arterială (inhibitorii enzimei de conversie a angiotensinei, cum ar fi captoprilul). S-au descris cazuri de inducere a pemfigusului după administrarea penicilaminei, cefalosporinelor, pirazolonei, medicamentelor antiinflamatoare nesteroidiene (AINS) și rifampicilinei.

Stresul emoțional, arsurile termice, razele ultraviolete și infecțiile au fost de asemenea raportate ca declanșatoare pentru pemfigusul vulgar.

În timp ce, în multe cazuri, cauza exactă a pemfigusului vulgar rămâne necunoscută, s-au identificat mai mulți factori etiopatogenetici [192].

Iar predispoziția genetică la pemfigus vulgar este legată de molecule complexe de histocompatibilitate majoră (MHC) clasa II, în special ale antigenului leucocitar uman (HLA) DR4, care sporesc probabilitatea de dezvoltare a acestei maladii.

De asemenea dezvoltarea pemfigusului la om este asociată cu vârsta maximă de debut între 50 - 60 de ani, deși, se descriu cazuri de pemfigus la copii nou-născuți (pemfigus neonatal), și de prezența maladiilor concomitente, în special miastenia gravis și timomul [192].

Termenul *pemfigus* a fost, cel mai probabil, utilizat în lumea antică, dar prima ipoteză a fost înregistrată de Hippocrates (460-370 î.Hr.), care a descris febra pemfigoidă ca *pemphigodes pyertoi*. Galenus W.K. (e.n. 130-c.201) a numit-o boală pustuloasă a cavității bucale *febris pemphigodes* [193].

În perioada 1600 - 1800, au fost descrise mai multe tentative de a caracteriza leziunile în pemfigus, de către Zacutus L. (1637), B. DeSavages (1760) și Boissier de Sauvages (1768). Cercetătorii definesc leziunile ca *pemphigus maior* [193, 194]. McBride S.R. (1777) și Wichmann K. (1791) au înregistrat primele cazuri de pemfigus adevărat. Pacienții decedau din cauza „hemoragiei” din „ulcerul septic”. Wichmann K. a fost primul care a aplicat termenul *pemfigus* în cazul pacienților săi și a descris cu exactitate leziunile buloase flasce și ulcerările dureroase la nivelul cavității bucale [193].

Cazenave P. L. A. (1844) și Neumann I. (1886) au descris pemfigus foliaceu și pemfigus vegetant [195].

În anul 1926, Senear F. și Usher B. au descris pemfigusul eritematos, combinând caracteristicile atât ale pemfigusului, cât și ale lupusului eritematos [193].

Auspitz H. (1881) și Civatte J. (1943) descriu acantoliza în pemfigus. [193].

Beutner E. H., Jorden R.E. (1964) și Amagai M. (1971) au făcut o descoperire: ei au raportat prezența autoanticorpilor în serul pacienților cu pemfigus, reactivi cu o „substanță intercelulară” a pielii și a mucoasei și considerați responsabili pentru ruperea legăturilor intercelulare dintre keratinocite. Acest fapt conduce la evoluarea maladiei. Ulterior, ei au prezentat autoanticorpi stabili în secțiunile patologice, utilizând metode de imunofluorescență directă. [77, 143, 146]

Anhalt G. și alții (1982) [144] au fost primii care au descris un model experimental de pemfigus pe animal, obținut prin transfer pasiv de anticorpi pentru a induce pemfigus la șobolani. În aceea perioadă, desmogleinele nu erau identificate ca ținte antigenice relevante ale autoanticorpilor [144].

Amagai, Klaus-Kovtun și Stanley (1990) au identificat ca „substanța intercelulară” este desmogleina-3, cu greutatea moleculară de 130-kDa [77].

1.9.6. Viitoarele direcții de tratament

Celulele stem mezenchimale sunt studiate pentru utilizarea lor clinică potențială în medicina regenerativă și ingineria tisulară. Acestea au proprietăți imunomodulatoare unice. Ele sunt capabile să suprimă răspunsul alogen al celulelor T și să modifice maturarea celulelor care prezintă antigenul [195-201]. Pot fi izolate dintr-o varietate de țesuturi, cum ar fi: măduva osoasă, mușchii scheletici, pulpa dentară, țesut os, cordonul ombilical și țesutul adipos. MSC sunt utilizate în medicina regenerativă mai ales pe baza capacității lor de a se diferenția în tipuri de celule specifice și, de asemenea, ca generatoare de factori solubili, care vor stimula precursorii celulelor țesuturilor deteriorate. În plus, față de aceste proprietăți regenerative, efectele imunosupresive sunt datorate exprimării scăzute a complexului histocompatibilității majore de clasa II (MHC-II) și a moleculelor costimulatorii la nivelul citolemei [201-210]. Aceste proprietăți imunosupresive au un potențial terapeutic atractiv pentru tratamentul bolilor autoimune [211-216]. Multe studii indică faptul că celulele MSC posedă o funcție imunosupresoare, care poate fi modulată de citokine și de liganzii receptorilor asemănători. Ele intervin pe diferite căi ale răspunsului imun prin intermediul celulelor și secreției factorului solubil. *In vitro* MSC inhibă proliferarea celulelor T, a celulelor B, a celulelor killeri naturali (NK) și a celulelor dendritice (DC), producând *anergie de stopare a*

diviziunii, deci și prezentarea antigenului [217-225].

Multe realizări în înțelegerea conceptului imunologic și molecular al bolilor autoimune au făcut și terapia genică, care este o abordare promițătoare în tratarea pacienților. În bolile autoimune terapia genică are drept scop reglarea nivelurilor de citokine sau molecule proinflamatorii. Scopul final al terapiei genice este de a restabili și de a menține toleranța imună la autoantigenii relevanți și de a îmbunătăți rezultatele clinice pentru pacienți. Au fost înregistrate progrese în identificarea genelor responsabile de bolile autoimune și prezentate exemple, în care terapia genică a fost aplicată ca tratament sau pentru prevenirea bolilor autoimune, atât pe modelele animale, cât și în studiile clinice [226-230].

O altă strategie este combinarea terapiei genice cu celule stem izolate din măduva osoasă, care poate să ofere o abordare rațională în prevenirea implicării limfocitelor auto-reactive prin stabilirea unei toleranțe imune solide, de lungă durată la autoantigenul cauzal [230, 232]. Recent, s-a demonstrat succesul acestei abordări combinate de prevenire și vindecare a unei boli autoimune experimentale [226]. Noi considerăm că această strategie de combinație are potențial pentru a trata maladiile autoimune umane, în care sunt cunoscuți autoantigenii.

Timp de câteva decenii, standardul terapeutic pentru pemfigusul acantolitic se bazează pe imunosupresia cronică, care determină morbiditate și mortalitate semnificative. Terapia ideală ar elimina numai celulele autoimune cauzătoare de boli, economisind în același timp celulele imune care oferă imunitate protectoare, o strategie denumită adesea *terapie orientată*. Pemfigusul vulgar este una dintre cele mai bine caracterizate boli autoimune umane cu privire la natura bine definită a autoantigenului bolii, ceea ce îl face un model ideal de boală pentru a dezvolta abordări terapeutice vizate [233-238]. Rezultatele utilizării preparatelor glucocorticoide pe model de șoarece nu au demonstrat un efect imunosupresiv, așa cum s-a arătat la pacienți. Așadar, utilizarea preparatelor glucocorticoide pe modelul de șoarece cu pemfigus nu a fost reprezentativă.

Lucrarea de față, cu temă „Influența celulelor stem asupra leziunilor *pemfigus-like*” (studiul experimental preclinic), cuprinde rezultatele unei activități științifice și practice, pe care noi am desfășurat-o în ultimii 4 ani, perioadă în care am comparat informațiile din literatura de specialitate cu rezultatele obținute în experiențe și am testat aplicabilitatea în diagnosticarea și tratamentul pemfigusului acantolitic. O parte importantă a proiectului a fost modelarea leziunilor cutanate care reproduc leziunea intercelulară intraepitelială, prin pierderea toleranței imune.

Sinteza capitoului 1

Schimbările degenerative care implică acantoliza intraepidermică datorată apariției transsudatului intraepidermal rezultă din lezarea joncțiunilor intercelulare de adeziune, întâlnite la nivelul țesuturilor epiteliale, demonstrată atât prin apariția bulelor flasce și leziunilor erozive vaste

pe suprafața pielii, observate clinic, cât și prin studii experimentale.

Desmogleinele 1 și 3 sunt atât indispensabile pentru atașarea celulară în epiderm, cât și pentru ancorarea părului telogen la teaca externă a foliculilor. Modele de animale cu pemfigus, descrise în literatură de specialitate, au fost obținute prin perturbarea toleranței imune față de tegumentale cutanate și mucoase proprii.

Analiza modelelor experimentale relevă că maladiile autoimune buloase care reproduc schimbări degenerative-distrofice ale joncțiunilor intercelulare cutanate, sunt asemănătoare cu modificările tisulare în pemfigus ce au loc la om. Totodată, nu sunt indicate clar obținerea modelelor experimentale pe șobolani, astfel, necesitând o studiere mai profundă a acestui subiect și propunerea unui model experimental mai reușit.

Proprietățile imunosupresive ale celulelor stem mezenchimale sunt un potențial terapeutic atractiv pentru tratamentul bolilor autoimune. Imunogenitatea slabă a MSC, demonstrată *in vitro* și *in vivo* face posibilă utilizarea MSC în tratamentul afecțiunilor buloase ale pielii. Pentru a evalua raportul risc/beneficiu al acestei abordări la pacienții cu pemfigus rezistenți la terapia convențională, este necesară efectuarea mai multor experimente *in vivo*, din cauza numeroaselor discrepanțe cu datele *in vitro*.

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

Obiectivele cercetării:

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.

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.

Conform tabelului *Numărul de animale în fiecare grup pentru proporții*, pentru a evita rezultatele eronate, numărul reprezentativ de animale pentru fiecare lot de studiu este cel puțin de 30 [19]. 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”.

Studiul a fost efectuat pe piesele histologice obținute de la 30 de femele, cu vârsta medie de $4,9 \pm 0,33$ luni. Au fost preparate și studiate 30 de secțiuni cutanate din diferite regiuni ale corpului (bot, regiunile periauriculară și perioculară, față, gât), obținute postoperator de la șobolanii operați și sacrificați și în laboratorul de Inginerie tisulară și culturi celulare al IP USMF „Nicolae Testemițanu”, în perioada ianuarie 2015 – decembrie 2015. În studiul histopatologic au fost folosite colorările cu hematoxilină-eozină și picrofuscină.

2.1.1. Obiectul de studiu

Materialul de studiu a inclus:

- esofagul de vite cornute (n=10);
- 150 de șobolani albi de specie Wistar, $4,9 \pm 0,33$ luni, cu masa de $270,6 \pm 5,5$ g;
- celule stem din măduva osoasă de la șobolani – 1×10^6 celule /kg corp/zi;
- fibroblaste din embrionii de găină – 1×10^6 celule /kg corp/zi;
- soluție de ciclofosamidă – 40 mg/kg corp/zi;
- soluție acetat de metilprednisolon – 100 mg/kg corp/zi.

2.1.2. Caracterizarea eșantionului de studiu

În conformitate cu scopul și obiectivele lucrării, au fost supuse cercetării femele de șobolani albi de specia „Wistar” (n=150), cu vârsta de $4,9 \pm 0,33$ luni și cu masa de $270,6 \pm 5,5$ g (Tabelul 2.1). Timp de 8 luni, prin injecție intracutanată a extractului proteic pe etanol (0,1 ml), șobolanilor li s-au indus leziuni *pemfigus-like* cutanate. Dozele au fost alese pe baza studiilor anterioare pe iepuri [239-246]. Prelevarea secțiunilor cutanate pentru studii histopatologice s-a efectuat după eutanasierea animalelor în camera cu CO₂.

Tabelul 2.1. Repartizarea animalelor în loturi de cercetare în funcție de nivelul afectării

Nivelul afectat	Total (n=150)	Lotul I (n = 30)	Lotul II (n = 30)	Lotul III (n = 30)	Lotul IV (n=30)	Lotul V (n = 30)
-----------------	------------------	---------------------	----------------------	-----------------------	--------------------	---------------------

	Abs (P± ES)	Abs.	P ₁ ±ES ₁ (%)	Abs.	P ₂ ± ES ₂ (%)	Abs.	P ₃ ± ES ₃ (%)	Abs.	P ₄ ± ES ₄ (%)	Abs.	P ₅ ± ES ₆ (%)
Leziuni erozive la nivelul botului , regiunii perioculare, spatelui, alopecie la nivelul feței, pierderea în greutate cu 10-20% (1)	29 (19,3±3,2)	5	16,7±6,81	1	3,3±3,25	10	33,3±8,60	1	3,3±3,25	12	40,0±8,95
Leziuni la nivelul botului, regiunii periauriculare, spatelui, alopecie la nivelul feței, scădere în greutate cu 10-20% (1)	20 (13,3±1,6)	7	23,3±7,72	3	10±5,5	5	16,7±6,81	4	13,3±6,19	1	3,3±3,25
Leziuni erozive la nivelul spatelui, alopecia în regiunea feții, gâtului, botului, spatelui, alungirea dinților anteriori, și scădere în greutate cu 20-30% (2)	43 (28,6±3,7)	10	33,3±8,60	7	23,3±7,72	9	30,0±9,47	8	26,7±8,07	9	30,0±9,47
Leziuni erozive la nivelul botului, regiunilor perioculare, periauriculare și spatelui, alopecie în regiunea feței botului, gâtului, spatelui, alungirea dinților anteriori, și scădere în greutate cu 20-30% (2).	58 (38,6±4,0)	10	33,3±8,60	12	40,0±8,95	11	36,7±8,79	12	40,0±8,95	13	43,3±9,04

P<0,001

Repartizarea șobolanilor în loturi s-a efectuat aleatoriu. Cu scopul determinării omogenității eşantioanelor în fiecare lot, am calculat coeficientul de variație (Cv) (Tabelul 2.2).

Tabelul 2.2. Calcularea coeficientului de variație (Cv%)

Lotul I (n=30)	Lotul II (n=30)	Lotul III (n=30)	Lotul IV (n=30)	Lotul V (n=30)	P
± 4,0%	± 4,2%	± 4,2%	4,2%	4,2%	P>0,05

Selectarea cazurilor

În prima etapă a cercetării am stabilit lotul de studiu prin selectarea cazurilor cu leziuni *pemfigus-like*.

Leziunile cutanate *pemfigus-like* au fost modelate la 150 de șobolani, corespunzător

criteriilor de includere în studiu.

Modalitatea de selectare și repartizare a șobolanilor pe grupe:

29 de șobolani – cu leziuni erozive la nivelul botului și regiunii periorulare, spatelui, alopecie la nivelul feței și pierderea în greutate cu 10-20% ($19,3 \pm 3,2$);

20 de șobolani – cu leziuni la nivelul botului, regiunii periauriculare, spatelui, alopecie la nivelul feții și scădere în greutate cu 10-20% ($13,3 \pm 1,6$);

43 de șobolani – cu leziuni erozive la nivelul spatelui, alopecie în regiunea feței, gâtului, botului, spatelui, alungirea dinților anteriori și scădere în greutate cu 20-30% ($28,6 \pm 3,7$);

58 de șobolani – cu leziuni erozive la nivelul botului, regiunii periorulare, periauriculare și spatelui; alopecie în regiunea feței, botului, gâtului, spatelui, alungirea dinților anteriori și scădere în greutate cu 20-30% ($38,6 \pm 4,0$) (Tabelul 2.1).

Criteriile de includere:

- evaluarea șobolanului timp de 6 luni;
- prezența leziunilor cutanate erozive (bot, regiunile periorulară, periauriculară, spate, piept, abdomen, laba anterioară dreaptă, laba anterioară stângă, laba posterioară dreaptă, laba posterioară stângă);
- prezența alopeciei (față, gât, bot, spate, abdomen);
- prezența alungirii dinților anteriori;
- pierderea greutate corporale;
- colectarea datelor conform principiilor cercetării biomedicale pe animale.

Criteriile de excludere:

- lipsa tuturor manifestărilor de îmbolnăvire a șobolanului (leziunilor erozive, alopeciei, alungirii dinților anteriori, pierderii greutate corporale);
- decesul animalului până la inițierea tratamentului.

Evaluând datele preclinice, histologice și imunohistochimice, am stabilit loturile de studiu.

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 [247], principiilor și standardelor etice pentru desfășurarea cercetărilor. Toate animalele au consumat standard aceleași alimente și au avut acces liber la apă și furaje, au fost păstrate în celule separate cu condiții normale de iluminare și temperatură. În timpul experimentului, la toate animalele a scăzut apetitul și mobilitatea. Animalele au fost împărțite

aleatoriu în 5 loturi, marcate și numerotate loturile I – V: 4 loturi experimentale și un lot-martor (lotul I). La animalele de laborator cu leziuni modelate, tratamentul a fost inițiat la a 16-a săptămână de modelare și a continuat zilnic, timp de 4 săptămâni cu terapia prin celule stem osteomedulare, fibroblaste și metilprednisolon. Pentru ciclofosamidă: de trei ori pe săptămână, cu durata de 5 săptămâni. Operația de injectare a grefelor celulare a fost efectuată în condiții sterile, intraperitoneal, cu utilizarea instrumentelor chirurgicale și a materialelor sterile – antiseptic, medicamentul Miramistin (OOO INFAMED, Rusia), care are acțiune imunostimulatoare locală, antimicrobiană și antiinflamatoare. Pe durata operației, șobolanii experimentali nu au beneficiat de anestezie. Metilprednisolon acetat, 40 mg/ml (SC Balkan Pharmaceuticals SRL, Moldova), a fost administrat în doza de 100 mg/kg/zi. BM-MSCs s-au injectat în doza de 1×10^6 kg corp/zi. Fibroblaste din embrioni de găină – în cantitatea de 1×10^6 kg/zi, au fost injectate intraperitoneal. Pulbere de Ciclofosamidă (200 mg) (BAXTER ONCOLOGY GmbH Kantstrasse 2, 33790 Halle, Germania) a fost administrată în doza de 40 mg/kg corp /zi. Dozele și durata tratamentului au fost selectate în baza studiilor anterioare pe șoarece, câine, precum și a tratamentului cu MSCs la om [241-248]. Locul leziunilor cutanate s-a prelucrat cu grijă – șobolanii au fost rași, pielea a fost tratată atent cu alcool și Miramistin, pentru a evita inflamarea și infectarea plăgii (Figurile 2.1 – 2.7). Câte un animal din fiecare lot a fost scos din experiment prin eutanasiere în camera cu CO₂ în zilele 128, 144, 160 de la începutul experimentului. Imediat după eutanasiere, a fost efectuată planimetria leziunilor cutanate, pentru a evalua dinamica vindecării lor pe model și a probelor de țesut prelevate împreună cu plaga modelului și țesuturile adiacente. Probele au fost stocate într-o soluție de formaldehidă de 4% și la finalizarea experimentului s-au efectuat examenul histologic al țesuturilor, investigația imunohistochimică cu AE1/AE3 și o testare imunologică a serului sanguin (C3, C4).

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

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

Aceste modele experimentale, obținute prin injectarea intracutanată a extractului proteic pe etenol din esofag de vițel, presupun utilizarea antigenilor „stimulatori”, care aflându-se mult timp în organism, elimină toleranță imună, stimulează celulele B pentru a sintetiza autoanticorpii agresivi. În pemfigus autoanticorpii din piele sunt direcționați către antigenii similari în majoritatea țesuturilor la mamifere, care reacționează încrucișat cu antigenii specifici, așa cum a fost descris anterior de către Koch N., Schaller J. și colab., în anul 1992.

De menționat faptul că 150 de animale au fost supuse experimentului, pentru aprecierea scorului leziunilor cutanate modelate. Prin planimetrie, la toți subiecții a fost evaluată suprafața plăgilor. Biopțiile de piele de la șobolani au fost supuse examenului histologic cu hematoxilină-eozină, picrofusicină, 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.

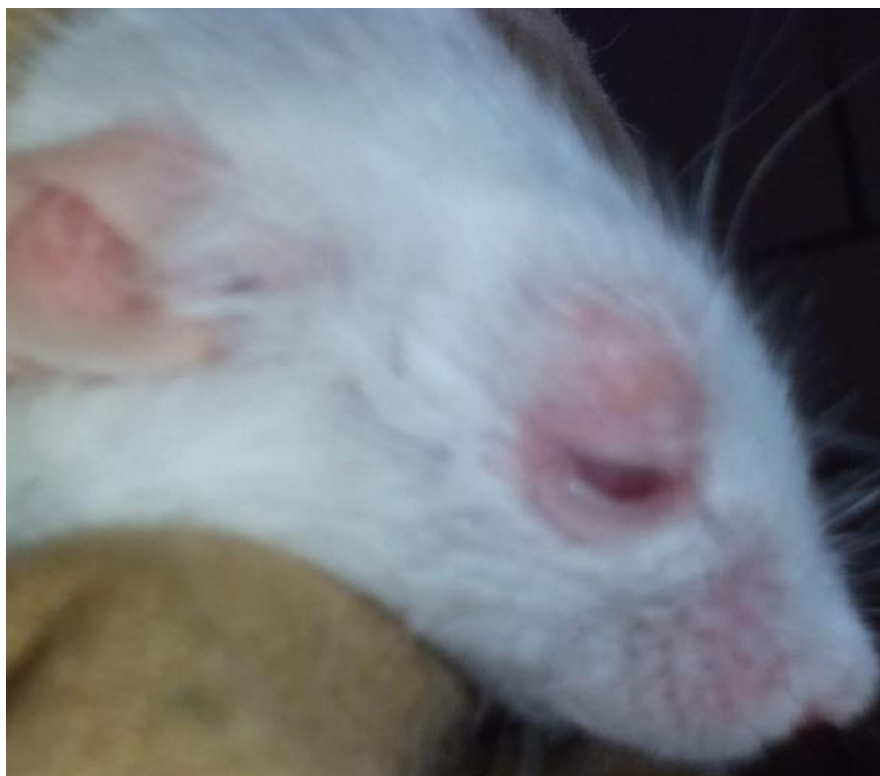


Fig. 2.4. Șobolan, din lotul III. În regiunea periorbitală o leziune – erozivă, acoperită cu cruste sero-hemoragice.



Fig. 2.5. Șobolan, din lotul IV. Fenotip de pierdere regională a firelor de păr.

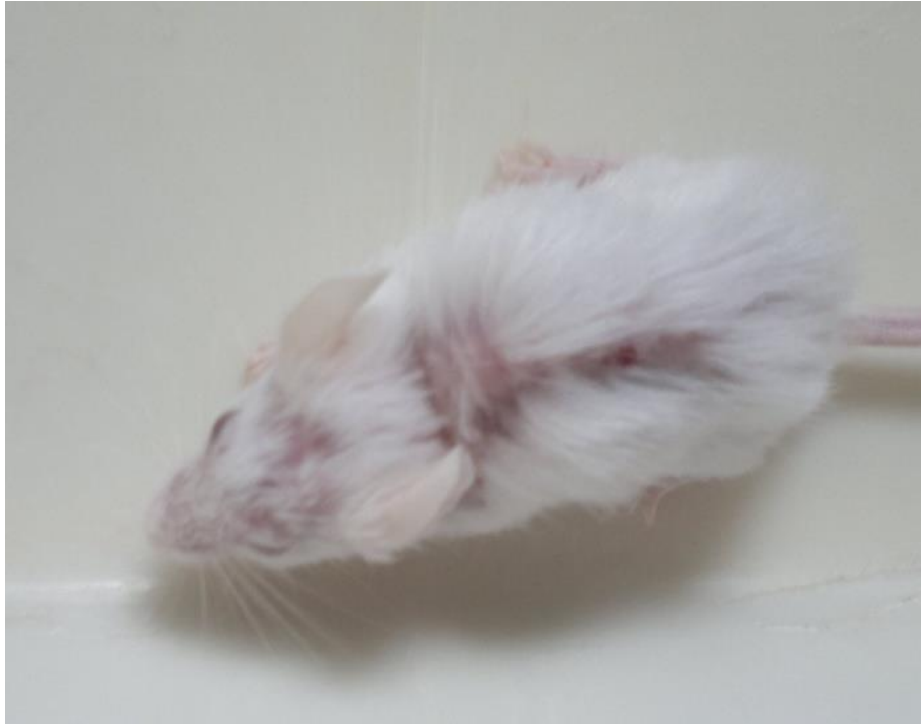


Fig. 2.6. Șobolan, din lotul II. Căderea difuză și pronunțată a părului. În regiunea capului și spatelui – leziuni erozive denudate cu suprafața de 30,2 mm², acoperite cu cruste sero-hemoragice.



Fig. 2.7. Șobolan, din lotul V. Leziuni erozive pe nas și pe pavilionul urechii.

Din datele obținute (Tabelul 2.3) rezultă că animalele din lotul I au dezvoltat modificări cutanate mai omogene.

Tabelul 2.3. Calcularea coeficientului de corelație Bravais-Pearson între scorul fenotipului pemfigusului (X) în loturile I-V și valorile componentului complementului C3 (Y) (22 de săptămâni) în funcție de lot

№ lotului	X	Y	d_x	d_y	d_x^2	d_y^2	$d_x d_y$
I	9,23	1,02	0,11	0,01	0,0121	0,0001	0,0011
II	9,5	0,9	0,38	-0,12	0,14	0,0144	-0,046
III	9,26	1,004	0,14	-0,006	0,0196	0,00006	-0,0084
IV	8,54	1,06	0,58	0,05	0,34	0,0025	0,029
V	9,23	1,03	0,11	0,02	0,0121	0,0004	0,0022
Σ					0,52	0,0174	-0,0221
m	9,115	1,01067					$r_{xy} = - 0,23$

X - valoarea medie al scorului fenotipului pemfigusului;

Y – valoarea medie a concentrației serice ale componentelor C3;

d_x – abaterea de la media a valorii scorului fenotipului pemfigusului;

d_y – abaterea de la media a valorii concentrației serice ale componentelor C3;

$\Sigma d_x d_y$ – suma produselor dintre abateriile de la media aritmetică a valorii scorului fenotipului pemfigusului (X) și valorii concentrației serice ale componentelor C3 (Y) ce se corelează;

Σd_x^2 – suma pătratelor abaterilor de la media aritmetică a valorii scorului fenotipului pemfigusului;

Σd_y^2 – suma pătratelor abaterilor de la media aritmetică valorii concentrației serice ale componentelor C3 (Y).

Conform Tabelului 2.3, scorul fenotipului pemfigusului și valorile componentului complementului C3 au fost cercetate pe eșantioane omogene, selectarea frecvenței eșantioanelor s-a făcut la întâmplare, iar coeficientul interpretat de corelație $r_{xy} = - 0,23$ denotă legătura slabă dintre fenomene.

2.1.3. Metodele de cercetare științifică

Procesarea primară a materialului a fost similară pentru toate metodele histologice 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 2.8).



Fig. 2.8. Separarea mucoasei de stratul submucos al esofagului de bovină

Pentru obținerea extractului etanolic proteic, s-a folosit dispozitivul revendicat pentru prepararea țesuturilor biologice. Brevet de invenție: Dispozitiv pentru prepararea țesuturilor biologice (Figura 2.9, Anexele 1, 2, 4). MD 793 (13)Y. A61C 5/02 (2006.01); A61B 10/02 (2006.01) [20].

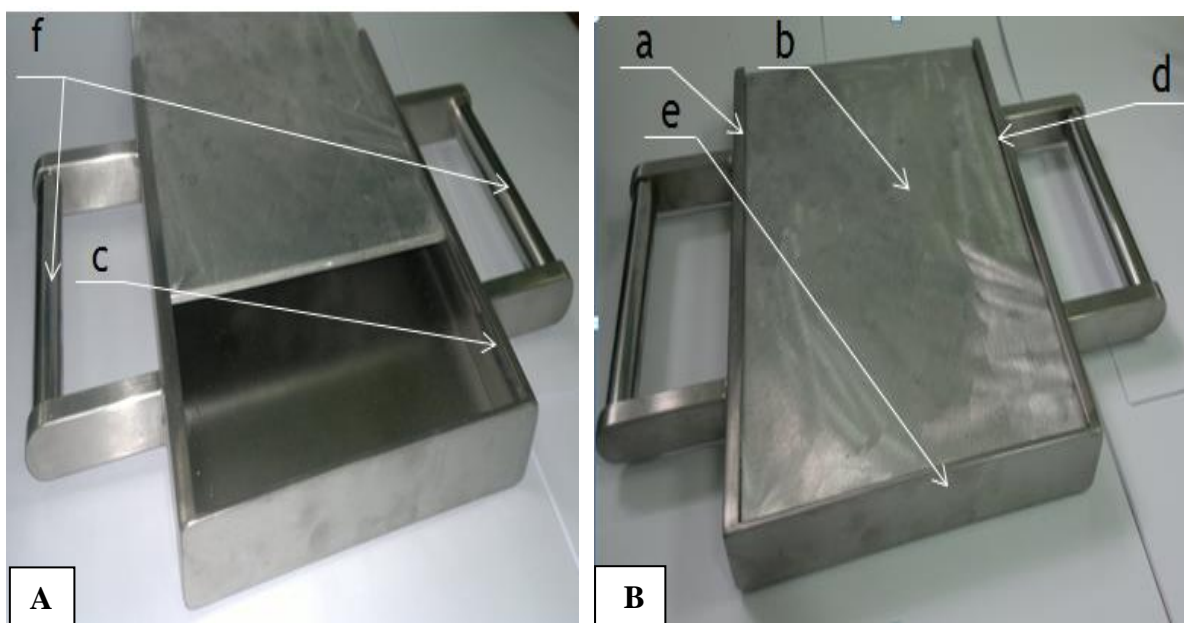


Fig 2.9. Dispozitiv pentru prepararea țesuturilor biologice: A – aspect deschis; B – aspect închis. Prezintă un rezervor (a) confecționat din inox, în formă de paralelipiped; suprafața superioară (b) a rezervorului este formată de o placă netedă dreptunghiulară confecționată din aluminiu, care, printr-un mecanism glisant de deschidere, este plasată în canalele 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. După prelucrarea țesutului prelevat cu soluție fiziologică, acesta a fost plasat pe suprafața de manipulare. Prezența substanțelor frigorifice (azot lichid, dioxid de carbon gaz sau solid) în rezervor și conductibilitatea termică bună a suprafeței de sus (aluminiu) asigură fixarea trainică a țesutului de suprafața de lucru răcită, ceea ce a permis o ușoară procesare a materialului. Ulterior, după separarea țesuturilor, a avut loc omogenizarea țesuturilor, centrifugarea la 12 000 rpm timp de 30 minute, spălarea fracției precipitate în soluție bufer de natriu fosfat, liofilizarea și extragerea proteinelor cu soluție de etanol de 70%. Concentrația proteică a fost determinată prin metoda Lowry (Figura 2.10) [248].

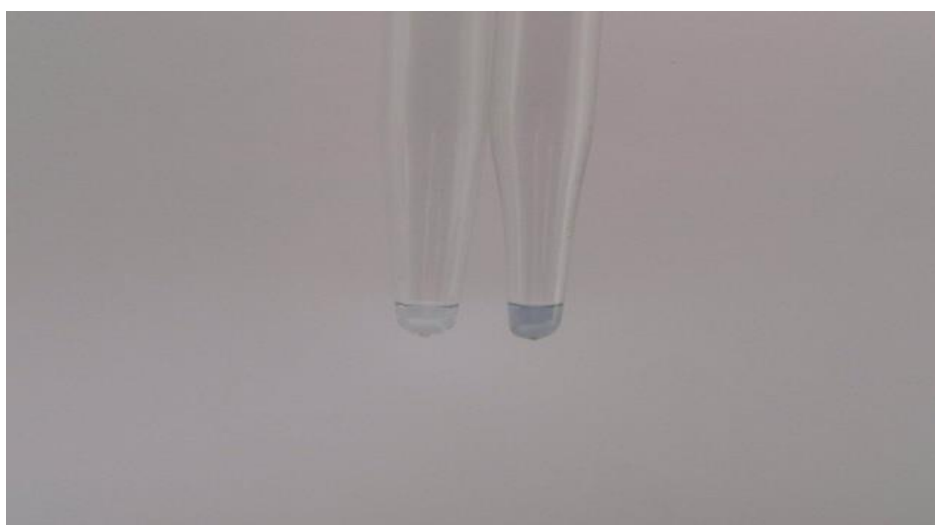


Fig. 2.10. Evaluarea calitativă după metoda Lowry prin prezența proteinei în soluție. Culoarea albastră rezultă în urma complexării legăturii peptidice cu sulfatul de cupru alcalin (reacția biuretului) și a reducerii reactivului Folin-Ciocalteu (fosfomolibdat-fosfotungstat) de către resturile de tirozină și triptofan din proteină.

În scopul modelării leziunilor *pemfigus-like* la animale de laborator, s-a brevetat metoda de modelare a leziunilor de tipul pemfigusului [27] (vezi Anexa 1, 2).

2.1.4. 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 [175-181]. Esofagul a fost obținut de la bovine (n=10), fiind înlăturat imediat după sacrificarea animalului în abator. Mucoasa a fost separată de submucoasa cu ajutorul foarfecelor și bisturiului, pe material congelat. Examenul histologic a confirmat prezența epitelului pavimentos pluristratificat nekeratinizat necesar pentru extragerea antigenelor (Figura 2.11). Proba de mucoasă a fost

congelată prin stocare în frigider la $t^{\circ} -70^{\circ}\text{C}$ sau imediat utilizată.

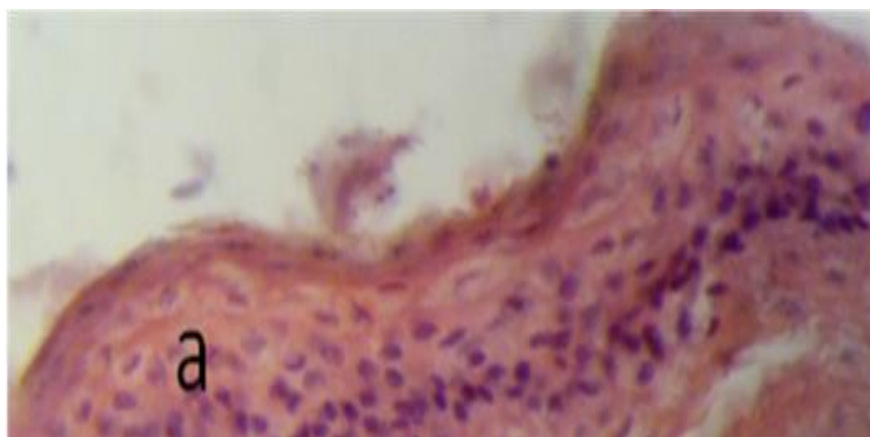


Fig. 2.11. Structura histologică a mucoasei esofagului de bovină. Mucoasa tapetată cu epiteliu pavimentos pluristratificat nekeratinizat (a) H-E, $\times 140$.

Mucoasa a fost separată în bucăți mici și omogenizată în fărâmișătorul de țesuturi (KIKA[®]-WERKE, GMBH & CO.KG) în proporție de 1:2 cu soluție salină tamponată cu fosfat la $\text{pH}=7,0$. Omogenizarea a fost repetată de trei ori. Toate etapele ulterioare s-au efectuat la temperatura de 4°C . Omogenizatului obținut a fost centrifugat la 4000 rpm timp de 60 min. După această, sedimentul a fost spălat de trei ori în soluție salină tamponată cu fosfat (PBS-0,115M NaCl, 0,001M Na_2HPO_4 și 0,003M KH_2PO_4 și 0,003M KH_2PO_4 , $\text{pH}=7,0$), liofilizat și supus extragerii prin adăugarea ulterioară a 5 ml de alcool etilic 70% la fiecare gram de masă uscată obținută. Amestecul obținut a fost supus agitării în agitator magnetic (MS 3000, BIOSAN) timp de 60 min și centrifugat la 4 000 rpm timp de 60 min. Extractul etanolic a fost decantat și dializat prin membrana de dializa (Sigma, flat width 35 mm, MWCO 12,000 Da=25EA) contra apei distilate timp de 8 ore. Precipitatul format la dializa a fost liofilizat (Figura 2.12).



Fig. 2.12. Extract proteic liofilizat

Bazându-ne pe studiile efectuate de C. A. Староверов și coautorii săi în anul 2013 [249, 250] cu privire la efectul vitaminelor asupra celulelor formatoare de anticorpi și rolul lor în stimularea limfocitelor T-helperi și răspunsului imun T-dependent pentru obținerea substratului imunogenic, extractul proteic solubil a fost emulsionat cu glicerină sterilă (HIMEDIA Laboratories Pvt. Ltd. Company certified for ISO 9001: 2006, LOT 0000209941 și vitamine în proporție egală (soluție sterilă Tetravit preparatul complex cu conținut de vitamine la 1 cm³ de soluție: A - 50000 ME; D₃ - 25000 ME; E - 20 mg și F - 5 mg, per. №: ПБП-2-4.0/00453 от 15.03.2008, OCT 12.1.007-76, NITA-FARM (Rusia).

Amestecul proaspăt pregătit în doză de 0,1 ml a fost injectat intracutanat șobolanilor în diferite locuri în regiunea spatelui o dată la fiecare două săptămâni. Șobolanii au fost injectați de 12 ori, conform protocolului.

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) [251]. Pentru izolarea celulelor stem din măduva osoasă s-a pregătit un mediu de cultură, care constă din DMEM cu 10% ser bovin fetal și 5,96 g/l soluție bufer Hepes. Antibiotice nu s-au adăugat în mediul de cultură.

1. Măduva osoasă a fost colectată de la 7 șobolani cu vârsta de 8-39 săptămâni (Figura 2.13). Animalele au fost sacrificate prin dislocare cervicală. Apoi cu ajutorul seringii cu ac 20G, s-a spălat măduva osoasă din tibie sau din femur.
2. După spălare, suspensia celulară s-a centrifugat la 400 G timp de 10 min..
3. S-a cuantificat numărul de celule cu soluție albastră de tripan în camera Goreaev, celulele s-a resuspendat în mediu de cultură până la o concentrație 5×10^6 de celule viabile per mililitru.
4. Pentru a iniția cultivarea celulelor mezenchimale, suspensia celulară a fost transferată în discul cu 6 godeuri pentru cultura tisulară, 3-5 ml/godeu ($1,94 \times 10^6$ celule/cm²);
5. Cultura a fost păstrată într-un incubator umidificat cu 5% CO₂ la t° de 37° C timp de 72 ore. Celulele neaderente au fost îndepărtate prin schimbarea mediului.

6. Cultura primară confluentă s-a spălat o dată cu soluție tampon Hank's fără Ca^{2+} și Mg^{2+} (Sigma).
7. Pe monostratul de celule s-a adăugat soluție de tripsină 0,25% cu EDTA 0,01% și s-a incubat timp de 10 min la t° de 37°C .
8. După detașarea completă a celulelor aderente utilizând pipeta, celulele s-au resuspendat în mediul normal de cultură până la volumul final de 0,5 ml. Suspensia rezultată s-a divizat în trei godeuri noi.
9. Cultura celulară a atins 90% de confluență.
10. Cultura celulară a fost schimbată la fiecare 3-4 zile (Figura 2.14).



Fig. 2.13. Izolarea celulelor stem osteomedulare din măduva osoasă a femurului și a tibiei de la șobolan cu vârstă de $4,9 \pm 0,33$ luni.

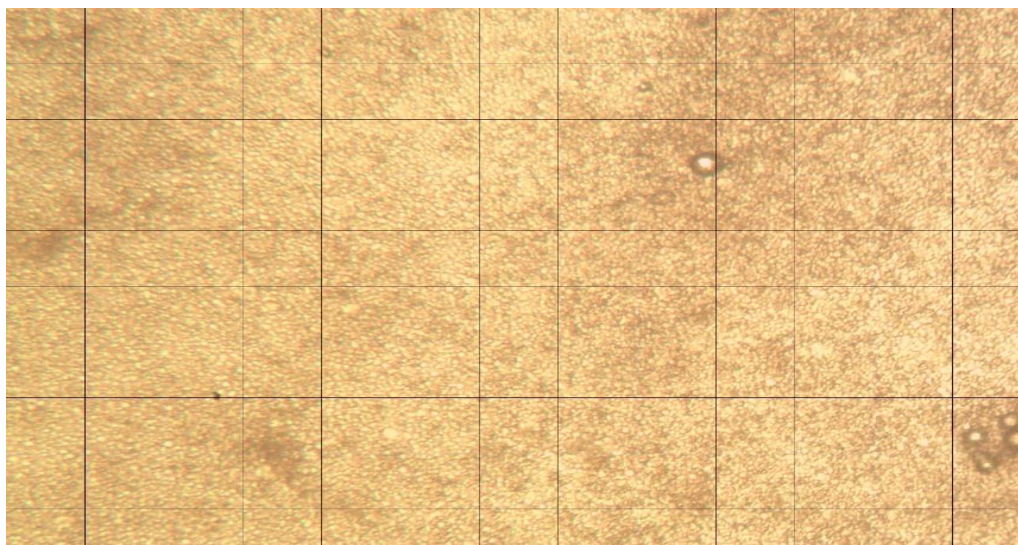


Fig. 2.14. Celule stem din măduva osoasă a femurului și a tibiei. A doua zi de cultivare, $7,2 \times 10^3$ celule/ mm^2 . $\times 140$.

2.2.2. Obținerea fibroblastelor din embrionii de găină

Prepararea culturii celulare primar-tripsinizate din embrionii de găină este în curs de dezvoltare [251-253].

1. La embrionii de găină în vârstă de 15 zile s-a apreciat calitatea incubării oului prin folosirea sursei de lumină direcționate, pentru a aprecia conținutul lui.
2. Au fost selectate ouă cu embrioni mobili și rețeaua vasculară bine exprimată.
3. Pe coaja oului, cu un creion simplu, s-au circumscris limitele camerei aeriene și locul aflării embrionului.
4. Suprafața oului s-a prelucrat cu soluție spirtoasă iodată de 5%.
5. Cu un foarfece steril s-a tăiat coaja cu 2-3 mm mai sus de camera aeriană, s-au secționat membranele sub coajă inclusiv cea corioalantoică și, ulterior, am scos embrionul de găină și l-am pus în cutie sterilă Petri.
6. Embrionului i s-au înlăturat capul, lăbuțele, aripile și organele interne;
7. Țesuturile embrionale restante s-a transferat într-un vas steril (250 ml) și s-au mărunțit cu foarfecele în fragmente de 3-4 mm.
8. Țesutul fragmentat s-a spălat de 2-3 ori cu soluție Henx pentru a îndepărta mucusul și elementele sangvine, până la obținerea apelor de spălare transparente. Apoi acest țesut a fost transferat într-o colbă pentru tripsinizare ulterioară.
9. Colba cu soluție de tripsină de 0,15%, încălzită la t° 35-37°C (raportul țesutului și tripsinei este de 1:3), s-a plasat pe agitatorul magnetic.
10. Tripsinizarea s-a efectuat fracționat. Adică, peste fiecare 3-5 minute, celulele separate împreună cu tripsina s-au repartizat în flacoane pentru centrifugare și s-au plasat la rece pentru stoparea acțiunii tripsinei asupra celulelor. La conținutul restant în colbă s-a adăugat o porție nouă de tripsină. Viteza agitatorului magnetic s-a reglat încât să nu se formeze spumă. Procesul s-a repetat de câteva ori (3-5) până la depleția totală a țesutului.
11. După tripsinizarea suspensiei celulare, soluția de tripsină s-a centrifugat la 1000 r/min 10 min, sedimentul celular s-a resuspendat în mediu nutritiv încălzit (37°C) și s-a filtrat prin hârtie de filtru.
12. După amestecarea minuțioasă a celulelor, s-a luat 1 ml pentru calcularea lor (figura 2.15).
13. Succesul cultivării foarte mult depinde de doza de inoculare. La o cantitate mică de celule nu se observă formarea monostratului chiar la o cultivare îndelungată. La o doză

prea mare, se produce proliferarea lor intensivă și stratul celular format cu mult mai devreme va suferi de îmbătrânire și degenerare nespecifică.

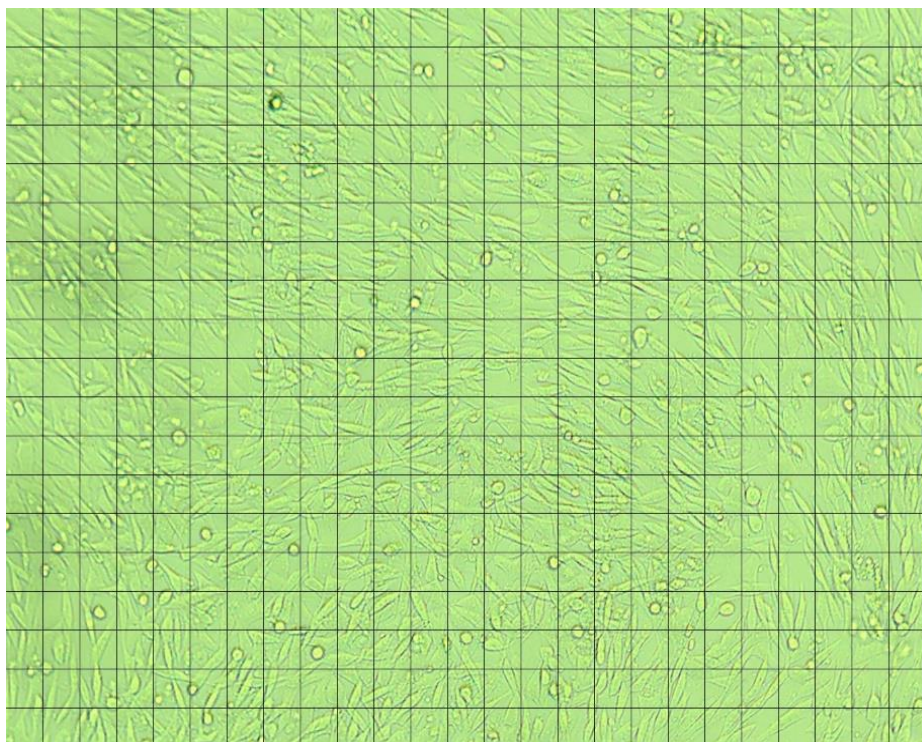


Fig. 2.15. Fibroblaste din embrionii de găină. A doua zi de cultivare, $0,86 \times 10^3$ celule/mm². $\times 140$.

2.2.3. Numărarea și aprecierea viabilității celulelor

1. La 1 ml de suspensie celulară s-a adăugat 1 ml de soluție de cristal violet 0,1%, preparat la 0,1 N soluție de acid citric. După amestecare, camera Goreaev s-a umplut cu suspensie celulară și s-au numărat toate celulele care au nucleu și citoplasmă intactă.
2. Pe baza calculării numărului de celule în două camere, s-a determinat valoarea medie aritmetică după formulă:
$$X = (A \cdot 2 \cdot 1000) : 0,9,$$
unde A – valoarea medie a numărului de celule într-o cameră;
 2 – coeficientul dizolvării suspensiei cu colorantul adăugat;
 $0,9$ – volumul camerei Goreaev, mm³. 1000 — număr de 1 mm³ în 1 cm³,
3. După calcularea numărului de celule, suspensia celulară s-a diluat cu mediu nutritiv în așa fel, încât în 1 ml de suspensie se conținea de la 700 mii de celule, până la 1 mln. de celule (pentru fibroblaste de găină).
4. Suspensia a fost repartizată în eprubete câte 1 ml.
5. Eprubetele au fost marcate și transferate în termostat la t° de 37 °C.
6. Zilnic, cultura era evaluată sub microscop, pentru a determina caracterul creșterii.

7. Mediul era schimbat la fiecare 2 zile cu un mediu nou. Monostratul din fibroblaste de găină a fost format peste 36 - 48 de ore.
8. De la un embrion de găină s-au obținut 70 — 120 mln. de celule.

2.3. Metode matematice de analiză a rezultatelor

Prelucrarea statistică. Toate datele experimentale au fost procesate utilizând Microsoft Office Excel 2003. 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.

Veridicitatea valorilor medii și relative în fiecare lot a fost calculată prin folosirea mediei aritmetice: $\bar{X}_{as} = \frac{\sum x}{n}$; deviației de la media (d): $d = \bar{X}_{as} - x$ și abaterii medii

pătratică: $\sigma = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n}}$ și calcularea erorii standard prin aplicarea formulei:

$$ES_M = \pm \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \text{ unde:}$$

ES_M = eroare standard;

d = abatere standard;

N = numărul frecvențelor.

Ulterior, mărimea intervalului de siguranță s-a calculat prin tabelul testului „t”, [19], utilizând probabilitatea eșantionului: $P_e = \frac{m}{n}$ și contraprobabilitatea $q_e = 100 - P$, prin urmare

aplicând formula:

$$ES = \frac{\sqrt{P_e q_e}}{n}, \text{ unde:}$$

m = fenomen;

ES = eroarea standard;

P_e = probabilitatea eșantionului;

q_e = contraprobabilitatea eșantionului;

n = numărul de frecvențe ale eșantionului.

$ES\% = \frac{ES}{M} \times 100$, unde M = media aritmetică sau ponderată.

Compararea a două valori medii sau alternative s-a efectuat prin aplicarea formulei criteriului testului student:

$$t_{calc.} = \frac{D}{\sigma_D} = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{ES_1^2 + ES_2^2}}, \text{ unde:}$$

$t_{calc.}$ = testul de semnificație;

D = diferența dintre valorile medii sau procentuale;

σ_D = eroarea diferenței.

Interpretarea semnificației statistice am efectuat comparând t „calculat” cu t „tabelar” din tabelul testului „t” [19].

Coeficientul de corelație (r_{xy}) a valorilor frecvențelor fenomenelor s-a determinat prin aplicarea formulei:

$$r_{xy} = \frac{\pm \sum d_x d_y}{\sqrt{\sum d_x^2 \sum d_y^2}}, \text{ unde:}$$

$\sum d_x d_y$ = suma produselor dintre abaterile de la media aritmetică a valorilor frecvențelor celor două fenomene (x și y) ce se corelează;

$\sum d_x$ = suma pătratelor abaterilor de la media aritmetică a valorilor frecvențelor fenomenului x;

$\sum d_y$ = suma pătratelor abaterilor de la media aritmetică a valorilor frecvențelor fenomenului y;

Determinarea coeficientul de variație a valorilor frecvențelor s-a efectuat prin aplicarea formulei:

$$Cv = \frac{\sigma}{X} \times 100, \text{ unde:}$$

σ = valoarea deviației standard;

X = media aritmetică.

Diferențele au fost considerate statistic semnificative la un nivel de semnificație de $p < 0,05$.

Metoda hot-spot [191-195] este cea mai utilizată metodă manuală de cuantificare a structurilor histologice. La microscopul optic, ariile de cuantificare am ales la o mărire x 200, ceea ce corespunde suprafeței de 0,74 mm². Metoda constă în alegerea a trei zone cu intensitatea cea mai mare a structurilor celulare, fiind urmată de calcularea mediei aritmetice.

Examinarea microscopică și obținerea imaginilor au fost efectuate cu microscopul Nikon Eclipse E800, folosind ocularul cu grosimet de 4 și obiective corectate optic cu grosimea de X2,5, X4, X10, X20 și X65. Cele mai semnificative imagini au fost preluate cu ajutorul unei camere video-digitale Nikon DN 100 și proiectate direct în calculator cu ajutorul programului LUCIA NET versiunea 1.16.5. Imaginile microscopice au fost prelucrate cu ajutorul modulului „Contrast Enhancement” din programul de analiză a imaginii Olympus MicroImage 3.0 – 32 bit.

2.3.1. Aprecierea scorului fenotipului leziunilor pemfigus-like

Penru 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 la șobolani.

Caracteristica morfometrică a leziunilor cu aspect *pemfigus-like* a avut ca reper scorul utilizat de Aoki-Ota M. și alții (2004) [141]. Scorul a fost util pentru a aprecia progresarea leziunilor modele *pemfigus-like*. Astfel, noi 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 greutateii 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) [254]. S-au marcat marginile fiecărei plăgi modelate pe o peliculă de polietilenă, preventiv sterilizată chimic. După finisarea cercetării *in vivo* din această peliculă după conturul respectiv, s-au efectuat secțiuni. De asemenea, din această peliculă s-a secționat un pătrat cu laturile de 10 mm. Toate mostrele au fost cântărite (S.R.L. AZICA-GRUP, mun. Chișinău). Ulterior, cu utilizarea datelor obținute după aprecierea masei, au fost evaluate suprafața fiecărei mostre prin formarea proporțiilor. Suprafața defectului cutanat modelat a fost calculată prin împărțirea primei valori de greutate a secțiunii ($m_{st.}$) la cea de-a doua (m), cu o ulterioară înmulțire cu suprafața cunoscută a peliculei pătrate standard ($S=a^2$): ($m_{st.} : m$) x S. Masa 1 cm² de peliculă a fost 22 mg. Examinările repetate s-au efectuat peste 4 zile. 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, secțiunile de piele au fost colorate: 30 de secțiuni cutanate – cu hematoxilină-eozină (H-E) și picrofuxina, utilizând metoda tehnică standard [255]. După fixarea mostrelor tisulare în soluție de formaldehidă de 4%, probele s-au spălat sub apă curgătoare în decursul a două ore și s-au uscat pe hârtie de filtru. Ulterior, mostrele au fost supuse deshidratării prin utilizarea soluției de etanol de 70%, 80% și 96%. Probele s-au aflat în fiecare soluție câte 24 de ore. În soluția de 96% etanol, mostrele s-au deshidratat de trei ori, a câte 24 de

ore. În fiecare zi, soluție era schimbată. După deshidratare, mostrele au fost incluse în parafină (Sigma-Aldrich, SUA). După deshidratarea materialului, s-a înlăturat etanolul, prin prelucrarea mostrelor cu mediul intermediar, format din etanol și xilol (1:1), timp de două ore. După aceasta, mostrele au fost transferate în soluție curată de xilol pe trei ore. La fiecare oră, xilolul era schimbat. Ulterior, probele au fost transferate în soluție de xilol (1:1) pe 24 de ore, și păstrate în termostat la t° de 58 °C. Apoi, probele au fost incluse în parafină și, în decurs de trei ore s-au păstrat în termostat la t° de 58 °C, schimbând parafina fiecare oră. Probele au fost plasate în casete speciale și pregătite pentru etapa de secționare.

Lamele histologice pentru examinare histologică s-au pregătit în următorul mod. Lamele selectate s-au spălat minuțios în soluție săpunată, și apoi au fost transferate în soluție de etanol de 96% pentru deshidratare. Ulterior, lamele s-au uscat pe hârtie de filtru. În condiții sterile, sub hota cu flux de aer laminar, pe fiecare lamă se picură soluție de L-lizină de 15% (Sigma-Aldrich, SUA), pentru a spori particularitățile adezive ale lamelor [255].

După pregătirea preventivă a lamelor, blocul de parafină a fost secționat cu microtomul Leica RM2235 (Leica, Germania). Secțiunile de pe cuțit s-au colectat în apă deionizată, încălzită pe baia de apă Leica HI 1210 (Leica, Germania) până la t° de 40°C, pentru îndreptarea secțiunilor. Ulterior, secțiunile s-au fixat pe lamele de sticlă și s-au transferat în termostat la t° de 37 °C pentru 8 ore. Înainte de colorarea secțiunilor, secțiunile s-au deparafinat și rehidratat. Pentru deparafinare s-au folosit xilol și etanol de 96%, iar pentru rehidratare s-au folosit soluții de etanol de 70% K₂O. Soluțiile s-au aflat în pahare cilindrice cu capace; deparafinarea și rehidratarea s-au efectuat sub hotă. În fiecare dintre soluții, probele au fost incubate timp de 3 minute. Din soluția de etanol de 70% mostrele au fost transferate în apă deionizată timp de 5 minute. Pentru colorarea secțiunilor s-a folosit hematoxilină Erlih și eozină. Colorarea s-a efectuat conform protocolului: după înlăturarea parafinei și rehidratare, secțiunile s-au colorat cu hematoxilină timp de 1-2 minute, apoi s-au spălat în apă distilată timp de 1-2 minute. Următorul pas a fost plasarea secțiunilor în soluție albastră de tripan timp de 1 minut. Această soluție s-a pregătit în felul următor: în 100 ml de apă distilată s-a adăugat o picătură de soluție de amoniac. Ulterior, secțiunile s-au plasat în apă distilată și s-au spălat timp de 5 minute. După aceasta, secțiunile au fost puse în soluție de eozină și ținute timp de 2 minute, apoi s-au spălat în apă distilată. Ulterior, s-a efectuat deshidratarea secțiunilor cu concentrații succesive de etanol – 70%, 80%, 96% – cu amestec de etanol și xilol (1:1). S-au incubat 2 minute. Ulterior, secțiunile s-au limpezit în orto-xilol timp de 2 minute. După toate aceste manipulații, secțiunile au fost acoperite cu lamele în balsam canadian și studiate microscopic.

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 μm, care au fost 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). S-a efectuat un studiu, focalizat pe expresia markerilor AE1/AE3. Evaluarea rezultatelor studiului s-a efectuat conform criteriilor de interpretare, practică de Имянитов Е.Н. și alții, în anul 2007 [256, 257]: „-” – lipsa colorării „+” – colorarea a 10% din celule; „++” – colorarea a 50% din celule; „+++” – colorarea a peste 50% din celule. Iar, Jasani M.K. și Schmidt S., în anul 1993 [258] au descris criteriile de interpretare ca: reacție intens pozitivă (+++), – reacție de intensitate moderată (++) , reacție de intensitate slabă (+), reacție de intensitate foarte redusă (+/-), lipsa reacției (-). Metoda de detecție a biomarkerilor proteici, bazată pe utilizarea anticorpilor monoclonali pentru antigeni, constă în evaluarea cumulativă a diferenței dintre exprimarea markerilor și intensitatea lor.

Investigațiile au fost efectuate în laboratorul Healthcare din or. Kiev, Ucraina.

2.3.5. Studiarea componentelor C3 și C4 al complementului

Sângele, în volum de 2 ml, a fost colectat din vasele caudale în tubul pentru separarea serului. 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 (vezi Anexa 3).

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. Partea de jos a fost marcată în patru rânduri de sectoare cu arii egale pentru înregistrarea vizuală a activității locomotorii în centru și la periferia unei porțiuni intermediare a arenei. Partea de jos a terenului a avut o gaură cu diametrul de 2 cm, diametru, pentru a studia reacțiile de comportament la animale [187-189].

Șobolanul marcat a fost plasat în colțul terenului și am monitorizat comportamentul acestuia timp de trei minute, am completat tabelele sumare. Pentru a determina stresul emoțional, animalele au fost testate la a 18-a săptămâna de modelare a leziunilor *pemfigus-like* cutanate, și cu 32 zile înainte de tratament și după 32 zile de la tratament, o dată pe zi, în special, între orele 11 și 13. La

întâmplare, din fiecare lot de studiu am luat câte șase animale. După testare, șobolanii au fost puși în cuști, în condiții de vivarium standard, cu acces liber la apă și hrană.

Au fost înregistrați următorii parametri:

- 1) locomoția – numărul de pătrate intersectate;
- 2) reacția de orientare – numărul de ridicări verticale;
- 3) activitatea de cercetare – numărul de priviri din interiorul găurilor ;
- 4) timpul de imobilitate (secunde) este considerat un simptom al fricii;
- 5) defecarea – numărul bolurilor și actelor de urinare în timpul testării, care este considerat un indicator al anxietății emoționale;
- 6) grooming (îngrijire) și durata acestuia.

Activitatea fiecărui animal a fost determinată în funcție de indicii IPA, care a fost calculat prin formula:

$$IPA = (\sum CI + \sum RV + \sum AC) / TI,$$

unde:

CI – este numărul de pătrate intersectate;

RV – numărul de ridicări verticale;

AC – activitate de cercetare;

TI – timpul de imobilitate (s).

Ca rezultat, activitatea animalului a fost clasificată astfel: activitate scăzută – valoarea IPA mai mică de 2; activitate medie – valoarea IPA = 2-3; activitate înaltă – IPA mai mare de 4.

Sinteza capitolului 2

Pentru studiul experimental randomizat au fost selectați șobolanii albi specie Wistar, deoarece este cel mai simplu și mai accesibil model dintre toate animalele de laborator, o specie autentică schimbărilor fiziologice ale omului și este de elecție pentru reproducerea leziunilor *pemfigus-like* cutanate.

Pentru reprezentativitatea statistică au fost formate cinci loturi, un lot martor și patru loturi experimentale pentru a compara eficacitatea terapiei cu celule stem osteomedulare, fibroblaste de embrionii de pasăre, a ciclofosfamidei și metilprednisolonei.

Determinarea concentrației componentelor C3 și C4 al complementului a fost relevantă pentru a dovedi caracterul imun al leziunilor *pemfigus-like* modelate la animale.

Examenul histologic a permis determinarea nivelului și tipului leziunilor *pemfigus-like*.

Reacție imunohistochimică cu AE1/AE3 determină expresia keratinocitelor în epiteliul

lezat de pemfigus.

3. CARACTERIZAREA LEZIUNILOR *PEMFIGUS-LIKE* PE MODELE 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* (Tabelul 3.1) și repartizarea lor în raport cu clasificarea Aoki-Ota M. și alții (2004) [141]. 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 maladii.

Tabelul 3.1. Evaluarea scorului activității maladii asemănătoare pemfigusului pe șobolani

Tipul leziunii	Regiunea	Scor
Eroziuni	Bot	1
	Regiunea perioculară	1
	Regiunea periauriculară	-
	Spate	2
	Piept	-
	Abdomen	-
	Laba anterioară dreaptă	-
	Laba anterioară stângă	-
	Laba posterioară dreaptă	-
	Laba posterioară stângă	-
Alopecia	Fața	1
	Gât	0,5
	Bot	1
	Spate	1
	Abdomen	0,5
Alungirea dinților anteriori		1
Pierderea greutateii corporale		2
Total (maximum)		11

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, alopeciei, alungirii dinților anteriori și scăderea greutateii 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 (Tabelul 3.1), permițând evaluarea detaliată a activității bolii.

Totodată, aceasta nu a inclus analiza fenomenului Nykolski, imunofluorescența directă, indirectă sau ELISA.

Prin urmare, noi am calculat numărul de leziuni pentru fiecare șobolan și am estimat valoarea medie a scorului pentru fiecare lot de studiu (Tabelul 3.2).

Tabelul 3.2. Valorile scorului în funcție de lot, M(±ES):

Loturile de studiu	Lotul I (n=30)	Lotul II (n=30)	Lotul III (n=30)	Lotul IV (n=30)	Lotul V (n=30)	P
Scorul fenotipului pemfigusului	9,23±0,37	9,5±0,403	9,26±0,39	8,54±0,36	9,23±0,38	P>0,05

Conform datelor din Tabelul 3.2, animalele din lotul I au avut scorul mediu 9,23±0,37. Astfel, s-a determinat o diferență nesemnificativă (P=0,53, P>0,05) față de lotul II cu scorul 9,5±0,403. Scorul din lotul II s-a deosebit nesemnificativ (P=0,43, P>0,05) de scorul din lotul III – scorul 9,26±0,39. Lotul III nu avut o diferență nesemnificativă (P=1,36, P>0,05) față de lotul IV cu scorul 8,54±0,36. Scorul din lotul IV s-a deosebit nesemnificativ (P=0,76, P>0,05) față de scorul din lotul V, 9,23±0,38.

Estimarea scorului s-a efectuat după a 6-a, a 12-a, a 18-a și a 24-a săptămâna de la modelare (Tabelul 3.3).

Tabelul 3.3. Estimarea scorului în lotul I în funcție de perioada de urmărire a leziunilor pemfigus-like la șobolani (după a 6-a, a 12-a, a 18-a și a 24-a săptămână)

Perioada (săptămâni)	Scorul
6	1,2±0,21
12	1,5±0,19
18	5,8±0,33
24	9,23±0,37

Conform datelor din Tabelul 3.3, s-a stabilit sporirea scorului fără tratament. Din momentul apariției leziunilor cutanate pe modelele experimentale la șobolani, prin injectarea intracutanată a extractului etanolic proteic, scorul a fost apreciat la fiecare șase săptămâni. După primele șase săptămâni, scorul a fost relevant, având o valoare de 1,2±0,21. Ulterior, la 12 săptămâni, scorul a constituit 1,5±0,19. Peste 18 săptămâni scorul a căpătat o ascensiune până la 5,8±0,33 și la sfârșitul săptămânii a 24-a, scorul era de 9,23±0,37.

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 (Tabelul 3.4, Anexa 3). Astfel, la animalele din lotul II experimental, s-a stabilit scăderea nivelului componentelor C3 și C4 de 3 ori față de valorile lotului – martor.

Tabelul 3.4. Parametrii imunologici ai serului sangvin la șobolani albi, cărora nu li s-au modelat leziuni *pemfigus-like* în studiul experimental randomizat, (M±ES%)

Parametrii	Loturile de comparare, (M±ES%)		P
	Lotul I (lotul martor)	Lotul II (experimental)	
Componentul C3 al complementului, g/l	2,9±0,35	1,02± 0,01	<0,001
Componentul C4 al complementului, g/l	2,8±1,85	0,82±0,02	<0,001

În Tabelul 3.4 sunt redate valorile medii ale componentului C3 al complementului în normă, obținut din serul sangvin a 7 șobolani (25±1,48) sănătoși. Rezultatul a constituit 2,9±0,35 pentru componentul C3, și 2,8±1,85 pentru C4. În Tabelul 3.5 lotul experimental a inclus 30 de șobolani (16,7±2,8), care au prezentat valoare pentru C3 egală cu 1,02±0,01 g/l, și 0,82±0,02 g/l pentru C4. Rezultatele menționate au prezentat diferențele semnificative din punct de vedere statistic.

Tabelul 3.5. Valorile componentelor C3 și C4 (g/l) ale complementului în funcție de lotul experimental

Parametrii	Total n = 150	Lotul I (n=30)	Lotul II (n=30)	Lotul III (n=30)	Lotul IV (n=30)	Lotul V (n=30)	P
Componentul C3 al complementului g/l	1,02± 0,01	1,017 ±0,0064	0,962* ±0,0041	1,004667 ±0,018##	1,060333 ±0,007#	1,028± 0,0079##	>0,001##
Componentul C4 al complementului g/l	0,82±0,02	0,68± 0,056	0,88± 0,056*	#0,78± 0,044	0,89± 0,052#	0,76± 0,036#	>0,05#

#P>0.05, *P>0,001

În Tabelul 3.5 valoarea componentelor C3 și C4 este repartizată în funcție de lotul experimental. Valorile componentului C3 au constituit: lotul I – 1,017±0,0064 g/l; lotul II – 0,962±0,0041 g/l; lotul III – 1,0046±0,018 g/l; lotul IV – 1,0603±0,0007); lotul V – 0,28±0,0079

g/l. Diferențele valorilor scorului dintre loturi au fost ne semnificative din punct de vedere statistic. Au fost evaluate scorul și valoarea componentelor C3 și C4 (g/l) (Tabelul 4.6).

Tabelul 3.6. Estimarea scorului și valorilor componentelor C3 și C4 (g/l) ale complementului în funcție de perioada de urmărire a leziunilor pemfigus-like la șobolani (6 după a 6-a, a 12-a, a 18-a și a 24-a săptămână)

Perioada (săptămâni)	Scorul	Parametrii imunologici	
		C3, g/l	C4, g/l
6	1,2±0,21	2,9±0,04	2,8± 1,85
12	1,5±0,19	2,01±0,036	0,89±0,0017
18	5,8±0,33	1,7±0,05	0,85±0,0013
24	9,23±0,37	1,02±0,01	0,82±0,02

Reieșind din Tabelul 3.6. am notat că scorul cel mai scăzut (1,2±0,21) a relevat cu valorile normale ale componentelor C3, (2,9±0,04 g/l) și C4, 2,8± 1,85 g/l. Scorul care a constituit 1,5±0,19 a scăzut valoarea componentului C3 până la 2,01±0,036 g/l și C4, 0,89±0,0017 g/l. La 18 săptămâni, scorul a crescut până la 5,8±0,33 și, respectiv, valoarea componentului C3 a scăzut până la 0,89±0,0017 g/l și C4 până la 0,85±0,0013 g/l. Animalele care au avut scorul maxim 9,23±0,37 au scăzut componentul C3 până la 1,02±0,01 g/l și C4 până la 0,82±0,02 g/l. Astfel, creșterea scorului leziunilor pemfigus-like la modele pe șobolani a fost invers proporțională nivelului seric al componentelor C3 și C4 ale complementului.

Prin urmare, am determinat corelația dintre scorul și valorile componentului C3 al complementului, determinate la termenele de: 6, 18, 18, 24 de săptămâni (Tabelul 3.7).

Tabelul 3.7. Calcularea coeficientului de corelație Bravais-Pearson utilizând scorul fenotipului pemfigusului și valorile componentului C3 al complementului la șobolani, în săptămâna a 6-a, a 12-a, a 18-a și a 24-a de reproducere al leziunilor cutanate

M – valoarea medie a frecvenței;

Perioada (săptămâni)	Scorul	Parametrii imunologici	d_x	d_y	d_x^2	d_y^2	$d_x d_y$
6	1,2±0,21	2,9	-3,2	0,99	10,24	0,98	-3,2
12	1,5±0,19	2,01	-2,9	0,1	8,41	0,01	-0,29
18	5,8±0,33	1,7	1,4	-0,21	1,96	0,044	-1,19
24	9,23±0,37	1,02	4,83	-0,89	23,33	0,79	-4,3
Σ					43,94	1,82	
M	4,4	1,91				8,95	$r_{xy} = -0,99$

d_x – abaterea de la media valorilor frecvențelor fenomenului x;

d_y – abaterea de la media valorilor frecvențelor fenomenului y;

r_{xy} – coeficientul de corelație.

Valoarea coeficientului de corelație a constituit - 0,99 și denotă o corelație puternică între fenomene.

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 ei medie (Tabelul 3.8).

Tabelul 3.8. Greutatea corporală (grame) a șobolanilor din loturile de cercetare (prima zi de modelare a leziunilor pemfigus-like)

Total (n =150)	Lotul I (n=30)	Lotul II (n=30)	Lotul III (n=30)	Lotul IV (n=30)	Lotul V (n=30)	P
270,6±5,5	275,7±7,1	271±6,6	267,2± 6,5	270,4±7.14	274,7± 7,0	>0,05

Prin urmare, după 16 săptămâni de la inițierea simulării defectelor pemfigus-like la animale, valoare medie a greutatea a scăzut până la 197,97±2,1 g, ceea ce corespunde cu 2,6±0,09, conform clasificării Aoki-Ota M. și alții (2004) [141] (Tabelul 3.9).

Tabelul 3.9. Distribuția greutății corporale (grame) în loturi de cercetare la a 16-a săptămână

Total n =150	Lotul I (n=30)	Lotul II (n=30)	Lotul III (n=30)	Lotul IV (n=30)	Lotul V (n=30)	P
197,4±2,7	194,7±4,5	201,5±6,02	196,5± 5,4	199,3±5,4	194,8± 3,6	>0,05

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 înmulțirea suprafeței preventiv cunoscute a peliculei pătrate standard ($S=a^2$): ($m_{st.}:m$) X_s (Tabelul 3.10).

Tabelul 3.10. Estimarea suprafeței defectelor cutanate modelate în lipsa tratamentului (mm²)

Loturile de cercetare	Lotul I (n=30)	Lotul II (n=30)	Lotul III (n=30)	Lotul IV (n=30)	Lotul V (n=30)	P
Suprafața leziunii	9,21±0.18	9,73±0,26	8,92±0,2	9,7±0,18	9,11±0,19	>0,05

cutanate						
----------	--	--	--	--	--	--

Conform datelor din Tabelul 3.10. în lotul I valoarea medie a suprafeței defectului cutanat este $9,21 \pm 0,18 \text{ mm}^2$, și astfel, cu o diferență nesemnificativă ($P=1,64, P>0,05$) față de suprafață valoarea suprafeței leziunii *pemfigus-like* în lotul II ($9,73 \pm 0,26 \text{ mm}^2$). În lotul II valoarea s-a deosebit semnificativ ($P=2,31, P<0,05$) de valoarea lotului III cu suprafața plăgii de $8,92 \pm 0,2 \text{ mm}^2$. Valoarea suprafeței plăgii s-a deosebit semnificativ ($P=3,0, P>0,01$) de cea din lotul IV cu extinderea plăgii de $9,7 \pm 0,18 \text{ mm}^2$. Suprafața plăgii din lotul IV nu s-a deosebit semnificativ ($P=0,69, P<0,05$) de cea din lotul V ($9,11 \pm 0,19 \text{ mm}^2$).

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.

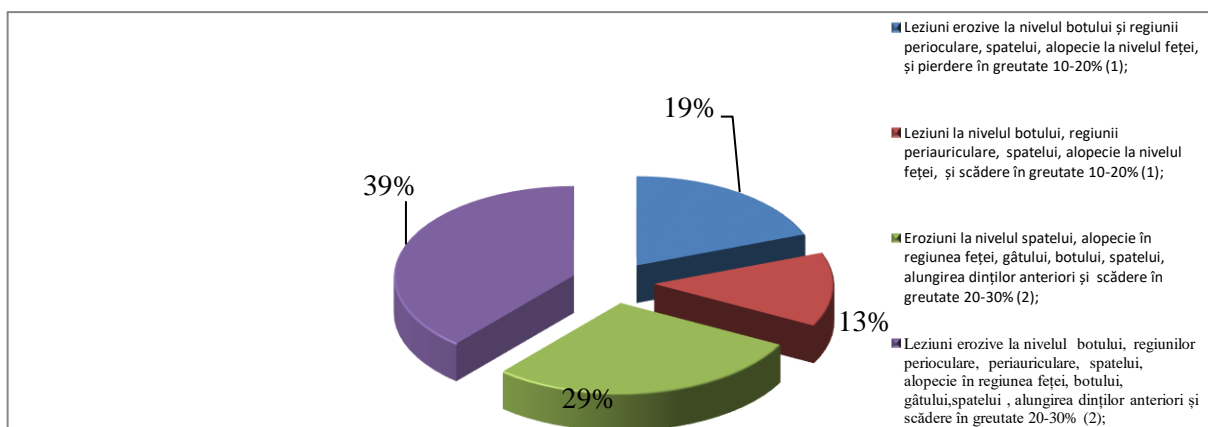


Fig. 3.1. Repartizarea animalelor în funcție de regiunea afectată (%)

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 ($28,6 \pm 3,7\%$) 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 ($38,6 \pm 4,0\%$) de animale. Diferența dintre loturi a fost semnificativă ($P>0,001$) din punct de vedere statistic. Vârsta medie a animalelor a fost $4,9 \pm 0,33$ 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 exudat sero-hemoragic, la a 16-a săptămână de la injectarea extractului etanolic din mucoasa esofagului de bovină. Suprafața plăgii a constituit 7 mm², (19 șobolani (63,3±1,6%)), 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).

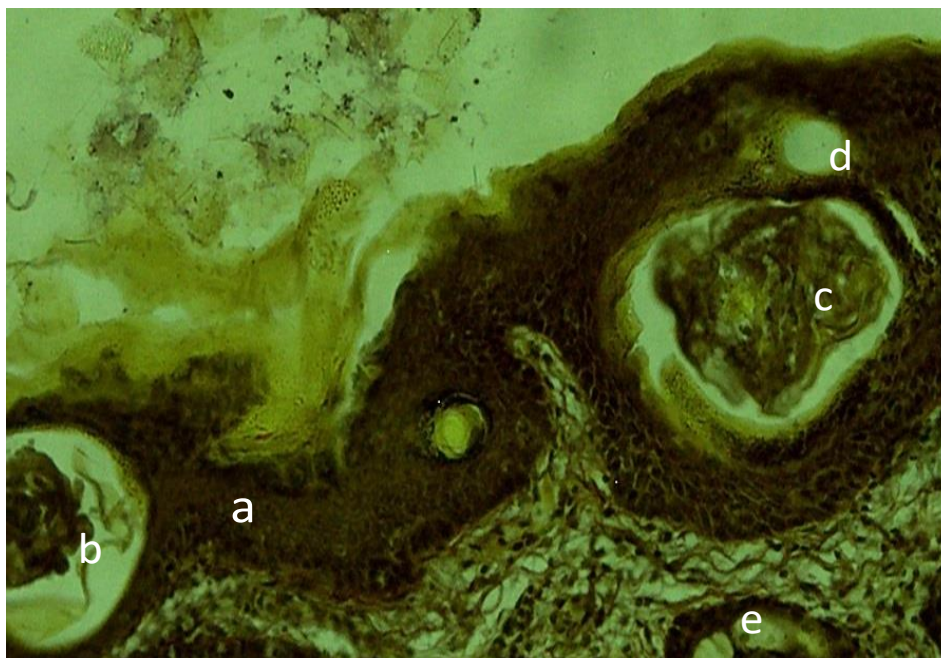


Fig. 3.2. Formarea elementelor buloase în pielea afectată la a 16-a săptămână de la injectarea extractului etanolic din mucoasa esofagului de bovină. Stratul granular și spinos supus acantolizei (a)), formarea elementelor buloase (b), bule cu conținut seros (c), bule nou-formate (d), glande sebacee formate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

În lotul II de la șobolani cu leziuni cutanate *pemfigus-like* (Figura 3.3), țesutul s-a prelevat din regiunea spatelui, unde erau prezente focare lipsite de blană, suprafața medie 9,5 mm², 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±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.

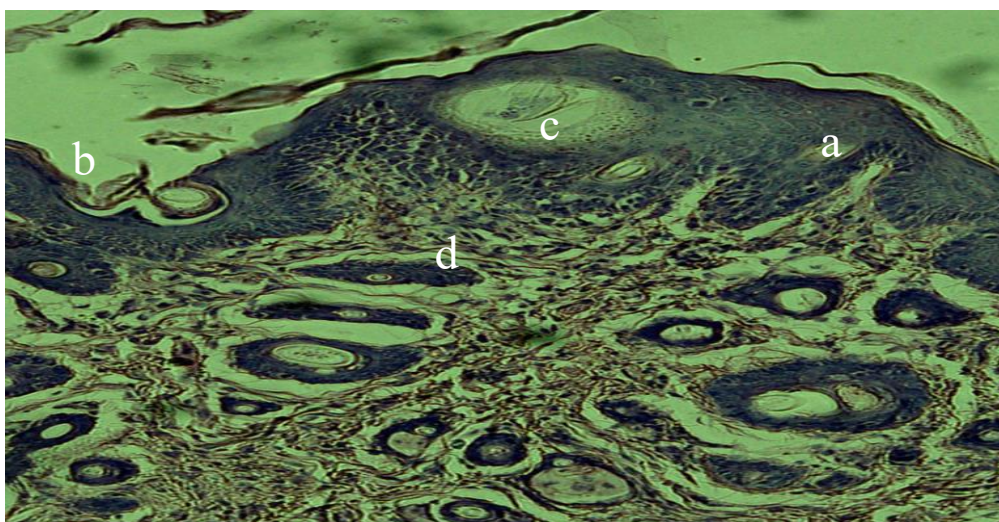


Fig. 3.3. Chisturi în regiunea de alopecie la a 18-a săptămână de la injectarea extractului etanolic din mucoasa esofagului de bovină. Epiteliocitele stratului granular și spinos supuse acantolizei (a), cu formarea elementelor buloase (b), bule cu conținut seros (c), bule nou-formate (d) în regiunea de alopecie. H-E, $\times 140$. (Șobolan din lotul II).

În lotul III la șobolanii cu leziuni *pemfigus-like* din regiunea pavilionului urechii la a 18-a săptămână de la injectarea extractului etanolic din mucoasa esofagului de bovină, pe suprafața afectată s-au observat leziuni de formă ovală 10-11,5 mm², acoperite cu un exudat seros, tulbure, (8 șobolani (26,7 \pm 1,5%)). Histologic leziunile aveau aspectul defectelor cutanate caracteristice pemfigusului foliaceu: epiteliul stratului granular și spinos era supus acantolizei (a), descuamarea keratinocitelor (c), formarea elementelor buloase (c), infiltrat inflamator în derm (d) (Figura 3.4).

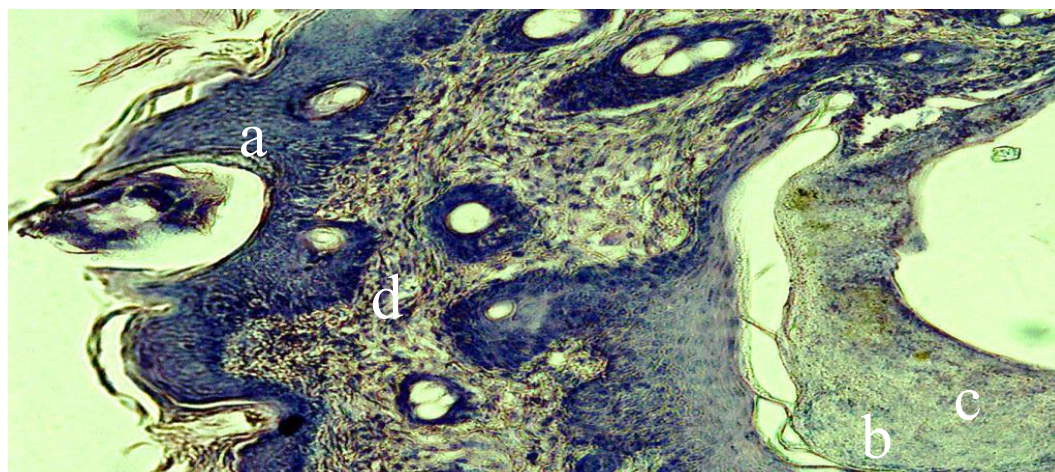


Fig. 3.4. Afectarea de tip pemfigus a epidermului pielii din regiunea pavilionului urechii șobolanilor afectați la a 18-a săptămână de la injectarea extractului etanolic din mucoasa esofagului de bovină. Tumifierea și hipertrofia straturilor granular și spinos a epidermului (a), descuamarea keratinocitelor (b), formarea unei cavitați cu conținut proteic (c), infiltrat inflamator în derm (d). H-E, $\times 140$. (Șobolan din lotul III).

În lotul IV, 8 șobolani ($26,7 \pm 1,5\%$) au prezentat complicații ale leziunii *pemfigus-like* la a 22-a săptămână de la injectarea extractului etanolic din mucoasa esofagului de bovină. Histologic s-a descris infectarea veziculei buloase, hipertrofierea și tumifierea celulelor spinoase și granulare (a), formarea bulelor (b) cu conținut inflamator nespecific leucocitar (c), infiltrat leucocitar perivezicular (d) (Figura 3.5).

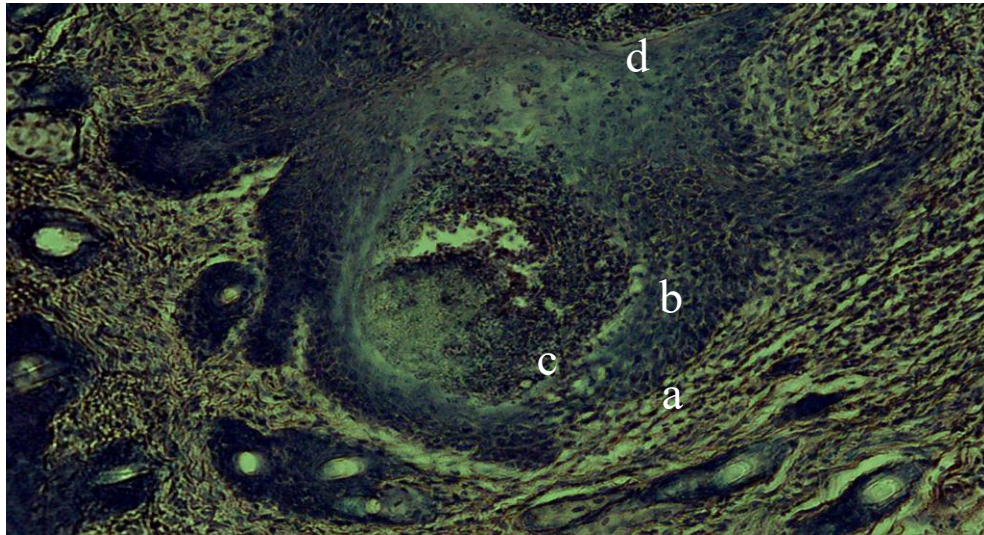


Fig. 3.5. Infectarea veziculei buloase în leziunea pemfigus-like la șobolan la a 22-a săptămână de la injectarea extractului etanolic din mucoasa esofagului de bovină. Hipertrofierea și tumifierea celulelor spinoase și granulare cu acantoliză (a), formarea bulelor (b) cu conținut inflamator nespecific leucocitar perivascular în hipoderm (c), infiltrat leucocitar perivezicular (d). H-E, $\times 140$. (Șobolan din lotul IV).

În lotul V animalele cu leziunile *pemfigus-like*, (8 șobolani ($26,7 \pm 1,5\%$)) la a 24-a săptămână de la injectarea extractului etanolic din mucoasa esofagului de bovină, histologic s-a descris formarea crustelor deasupra defectelor de tip pemfigus ale pielii. Crustă formată din filamente de fibrină (a), stratul epidermal atrofiat (b), dermul cu edem și rare elemente inflamatoare (c), papilomatoza stratului bazal (d) (Figura 3.6).

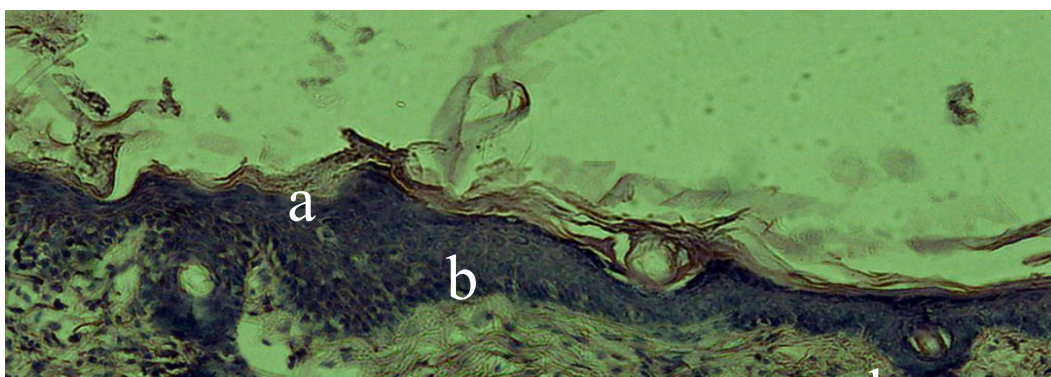


Fig. 3.6. Formarea crustelor deasupra defectelor de tip pemphigus ale pielii, la a 24-a săptămână de la injectrea extractului etanolic din mucoasa esofagului de bovină. Crustă formată din filamente de fibrină (a), stratul epidermal atrofiat (b), dermul cu edem și rare elemente inflamatoare în hipoderm (c), papilomatoza stratului bazal (d). H-E, ×140. (Șobolan din lotul V).

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

Rezultatele studiului au fost evaluate conform criteriilor de interpretare din literatura de specialitate [32, 192, 193] și includ intensitatea colorației, care s-a determinat astfel: reacție intens pozitivă – (+++), reacție de intensitate moderată – (++), reacție de intensitate slabă – (+), reacție de intensitate foarte redusă – (+/-), lipsa reacției – (-).

Rezultatele obținute au fost evaluate statistic conform metodelor de cercetare utilizate în biostatistică [19].

În loturile I și II animalele cu leziuni *pemphigus-like*, (30 de șobolani ($20 \pm 3,3\%$)), imunohistochimic s-au evidențiat modificări de tip reacție intens pozitivă (+++) la nivelul secțiunii cutanate afectate (Figurile 3.7, 3.8).

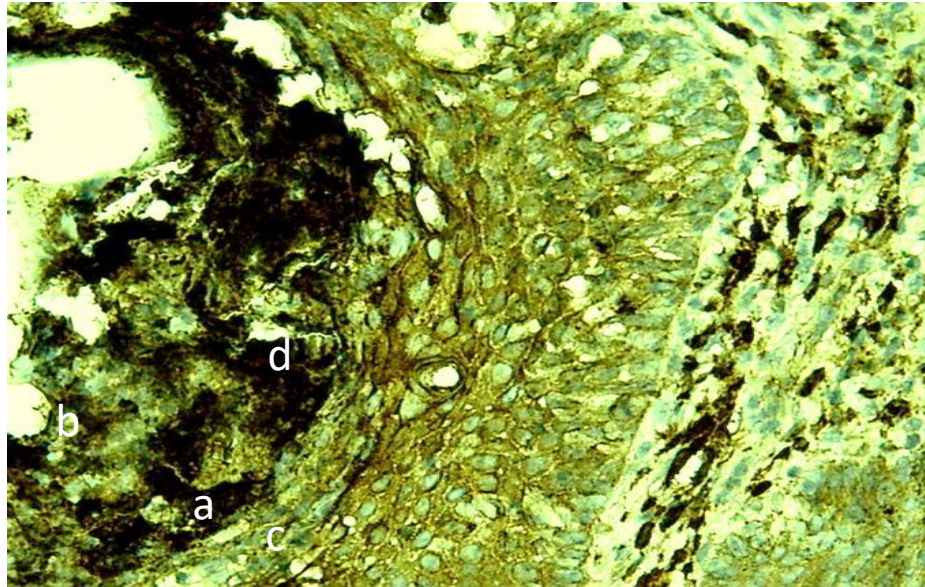


Fig. 3.7. Pielea șobolanilor cu leziuni cutanate *pemfigus-like* buloase și infectate, la a 16-a săptămână de la injectarea extractului etanolic din mucoasa esofagului de bovină. Peretele bulei – îngroșat (a), conținutul bulei – cu infiltrat inflamator având o reacție intens pozitivă (+++) (b); toate straturile epidermului au prezentat o intensitate de colorare intens pozitivă difuză (c), acantoliza celulelor spinoase (d). AE1/AE3, ×140. (Șobolan din lotul I).

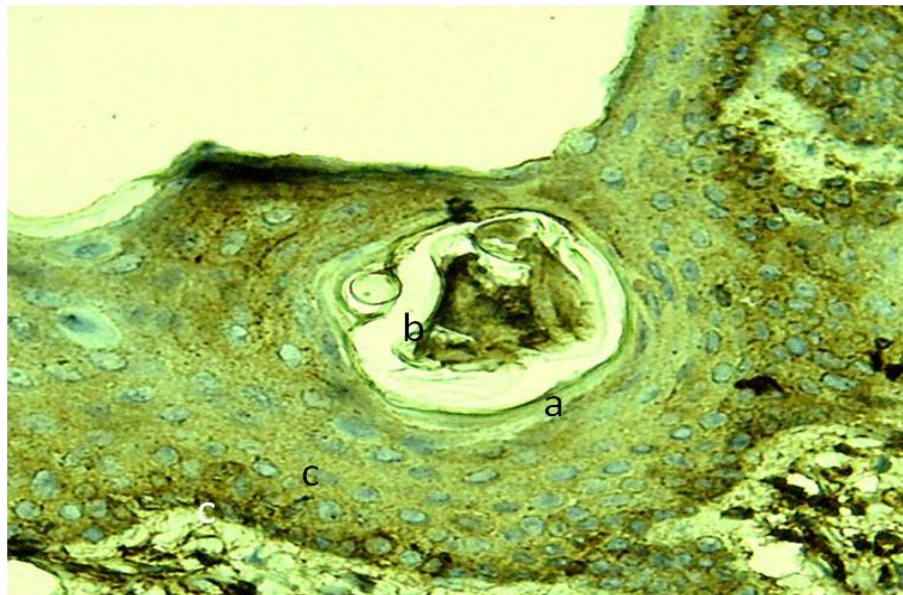


Fig. 3.8. Pielea șobolanilor cu leziuni cutanate *pemfigus-like* la etapa de formare a bulelor, la a 18-a săptămână de la injectarea extractului etanolic din mucoasa esofagului de bovină. Formarea bulei la nivelul epidermului (a), cu conținut proteic, colorat cu AE1/AE3 – intens pozitiv (+++) (b); toate straturile epidermului au o reacție de colorare moderată (++) (c). AE1/AE3, ×140. (Șobolan din lotul II).

3.7. Reacțiile comportamentale ale șobolanilor cu leziuni *pemfigus-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 (Tabelul 3.11) 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±7,4%, în timp ce căutarea găurii – de 16,43±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±8,5% din activitatea totală.

Tabelul 3.11. Indicatorii comportamentului orientativ-explorativ la șobolanii cu leziuni *pemfigus-like*

Caracteristicile comportamentale	Media eșantionului total, n=30	Lotul I (n=6)	Lotul II (n=6)	Lotul III (n=6)	Lotul IV (n=6)	Lotul V (n=6)
Locomoție, nr.	16,1±6,7	17,4±15,5	19,7±16,2	14,0±14,1	14,4±14,3	15,1±15,6
Reacție de orietare, nr.	23,1±7,4	23,21±17,2	22,6±17,07	23,3±17,3	23,5±17,3	22,8±17,2
Activitate de cercetare, nr.	16,43±6,8	16,07±15,0	14,51±14,4	16,34±15,1	17,0±15,3	18,25±16,6
Defecație, buc.	4,1±7,3	4,01±8,0	3,2±7,18	5,06±2,9	4,3±8,3	3,9±7,9
Timpul de imobilitate, s	32,4±8,5	33,03±19,2	33,06±19,2	33,07±19,2	31,4±19,0	31,57±18,9
Grooming, s	7,81±4,9	6,25±3,14	6,8±10,3	8,2±11,2	9,4±11,9	8,4±11,3
IPA	1,7±0,005	1,61	1,72	1,63	1,78	1,77

Reacția de imobilizare a șobolanilor (32,4±8,5%) a fost interpretată ca un simptom al fricii. În același timp, numărul defecațiilor (4,1±7,3%) și perioada de îngrijire (7,81±4,9%) au crescut. Nivelul înalt al defecațiilor (4,1±7,3%) a fost considerat un indice al „emoționalității” animalului,

iar prelungirea perioadei de autoîngrijire (grooming) ($7,81 \pm 4,9\%$) – un indice al anxietății. Activitatea șobolanilor a fost scăzută ($1,7 \pm 0,005$).

Discuții

În contextul rezultatelor menționate în acest capitol se poate concluda faptul că scopul principal al acestei etape al studiului a fost dezvoltarea unui model *in vivo* de pemfigus. Prin injectarea intracutanată al extractului proteic pe etanol din mucoasa esofagului de bovine, am indus leziunile *pemfigus-like* la șobolanii albi de specie Wistar. Debutul apariției erupțiilor cutanate a început la a 16 – 18 săptămână de la prima zi de imunizarea a animalelor. Algoritmul de caracterizare a maladii la animale a inclus scorul leziunilor *pemfigus-like*, precum: greutatea corporală, planimetria plăgilor, dozarea concentrației serice ale componentelor C3 și C4 al complimentului, examenul histologic și investigații imunohistochimice cu pancitokeratina. Mărirea scorului a fost asociată de scăderea în greutate a animalelor cu 20-30% relatând o corelație puternică (-0,99) cu scăderea concentrației serice a componentelor C3 și C4. Histologic evoluția acantolizei a relevat cu reacție intens pozitivă a keratinocitelor din stratul spinos și granular.

În anii 1970, au fost efectuate mai multe experimente de modelare a pemfigusului la animale [171]. Leziunile buloase au fost produse la maimuțe prin trei injecții successive al serului purificat, obținut de la pacienții cu pemfigus [259]. Transfuzia de acest ser la animale a reușit să modeleze maladia datorită distrugerii legăturilor intercelulare în epiderm de către autoanticorpii produși experimental [260]. Deasemenea, au fost efectuate și studii *in vitro*, folosind keratinocite izolate din pielea umană în care a fost produsă acantoliza prin adăugarea serului de pemfigus la cultură celulară [171, 261-264]. Cu toate acestea, modelul de șoarece nud a fost mai potrivit pentru studierea rolului anticorpilor în patogeneza bolii. Faptul că pemfigus este o maladie exclusiv umană [265] ce presupune că țesuturile umane sunt investigate mult mai bine decât alte modele de maladii. Modelul descris *in vivo* poate imita clinic mai bine maladia decât modelele *in vitro*.

Studii anterioare unde mucoasa orală umană obținută prin amigdalectomie postinflamatorie, a fost transplantată pe spatele șoarecilor nuzi imunodificienți, la care s-a injectat intraperitoneal serul obținut de la pacienții cu pemphigus, dezvoltând leziuni buloase specifice acestei maladii la nivelul mucoasei grefate [266, 267]. Modelul dat a fost utilizat pentru studierea patogenezei leziunilor pemfigusului.

Studiile privind transferul experimental al bolilor "autoimune" de la om la șoarece au fost efectuate și pe miastenia gravis [268], diabet zaharat dependent de insulină [269] și boala Graves

[270]. În toate aceste studii, însă, organele interne ale șoarecilor au fost țesuturi „țintă”. Aceste modele au fost dezvoltate pentru a studia mecanismele patogenetice ale autoanticorpiilor asupra țesuturilor umane. Studiile pemfigusului ar trebui să includă și investigații privind modul în care anticorpii penetrează epitelium, legarea lor la membranele celulare și evoluția acantolizei.

Takahashi Y. a descris evoluția schimbărilor imunologice și microscopice care are loc *in vivo* în epidermul șoarecilor BALB/c nou-născuți după ce îi s-a administrat parenteral imunoglobulinele IgG purificate. Cercetătorul a urmărit evoluția acantolizei și formarea de bule pe suprafața cutanată acestor animale. Dezavantajele sunt în faptul că pielea șoarecilor nou-născuți și a oamenilor poate să difere de pielea matură, ceea ce poate duce la interpretări greșite. Pentru a induce boala la șoareci adulți, este necesară o cantitate mai mare de anticorpi [147].

Ohyama M. a generat un model activ al pemfigusului vulgar prin transferul adoptiv de splenocite de la șoareci imunizați cu desmogleină 3 recombinată la șoareci Rag 2. Acest model a arătat modificări histopatologice și imunologice observate la pacienții cu această maladie oferind posibilitatea studierii mecanismelor patofiziologice ale pemfigusului vulgar și evaluarea eficacității tratamentului cu preparate corticosteroide și citostatice asupra bolii [150].

Theodor M.I. și Peter J.G. au studiat caracteristicile antigenului din mucoasa esofagului de iepure, observând că acesta este insolubil în soluție de 0,8 M KCl și au prezentat sedimentul tisular liber al proteinei solubile în apă. Cercetătorii au studiat 20 de iepuri olandezi la care au indus leziunile *pemfigus-like* pe pielea *in vivo* în urma injectării intracutanate a extractului proteic pe etanol obținut din mucoasa esofagului de iepure. La 11 din cei 20 de iepuri imunizați prin injectarea repetată la fiecare 14 zile al extractului proteic pe etanol din mucoasa esofagiană de iepure a dus la formarea de imunoglobuline IgG antiepiteliale. Ei au observat că aplicarea epicutanată la iepuri al sodiului lauryl sulfonat a sporit legarea anticorpilor de joncțiunile epidermo-dermale și evoluția acantolizei. Titrul de anticorpi în serul iepurilor a variat de la 1:80 până la 1:320. Anticorpii prezenți în serul la 7 iepuri au fost legate de întregul epitelium scuamos al esofagului la animal [153].

Mai apoi, Ablin R.J. și Beutner E.H. au efectuat inducerea pemfigusului la 4 iepuri Albino din Noua Zeelandă prin injectarea intracutanată a animalelor cu extractul solubil de proteină pe etanol, obținut din mucoasă esofagiană bovină și încorporat în adjuvantul Freund. După trei săptămâni, prin imunofluorescența indirectă cercetătorii au arătat că trei din patru iepuri au format autoanticorpi împotriva desmogleinei 3, titrul fiind de la 1:8 până la 1:64. Ei au urmărit că inițial anticorpii se legau numai cu țesut bovin inoculat intracutanat iepurilor dar după heteroimunizarea continuă acestea reacționau și cu mucoasa esofagului iepurilor. Prin imunofluorescență directă și examenul histologic autorii au dovedit dezvoltarea "pemfigusului experimental" la animale.

Apariția autoanticorpilor de tip pemfigus s-a început aproximativ între 18 și 22 de săptămâni de la prima zi de imunizare [145, 154].

Zonele cutanate inoculate la iepuri au fost cu aspect neregulat "*bulos-like*", leziuni cutanate de aproximativ 2 - 3 centimetri în diametru. Erupții au fost înconjurate de un edem sever. Numărul de leziuni a variat de la trei până la șapte și au fost observate cel mai adesea în grupuri de două sau trei. Datele obținute din studiile au sugerat că aceste autoanticorpi produși la iepuri au fost asemănătoare cu anticorpii din pemfigusul uman. Iar titrurile de anticorpi prin imunofluorescență indirectă au fost cuprinse între 1:16 și 1:64. Severitatea leziunilor a fost dependentă de titrul înalt a anticorpilor în serul animalelor. Schimbări histologice comparabile nu au fost observate în epiderma animalelor în mod similar inoculată cu adjuvant Freund complet și extracte obținute din alte organe (splina, rinichi, ficat) [154].

Sinteza problematicei tratate în capitolul 3

Metoda imunohistochimică cu AE1/AE3 a permis identificarea citokeratinei în leziunile *pemfigus-like* modelate pe șe delate ikentificaică. Astfel, colorarea imunohisto-chimică cu AE1/AE3 a identificat o reacție intens pozitivă (+++) la nivelul secțiunii cutanate afectate, care a fost depistată la toate animale din loturile I ($20\pm 3,6\%$), II ($20\pm 3,6\%$), III ($20\pm 3,6\%$), IV ($20\pm 3,6\%$) și V ($20\pm 3,6\%$). Astfel, expresia citokeratinei, poate fi utilizată pentru studierea în continuare a naturii procesului patologic.

Analiza fotometrică a concentrației componentelor C3 și C4 în serul sangvin în leziunile *pemfigus-like* pe animalele de laborator, denotă consumul componentelor C3 și C4 serice ce a relevat activitatea sistemului complementului ca rezultat al administrării extractului proteic pe etanol din esofagul de bovină.

Din rezultatele obținute putem nota că extractul proteic pe etanol din esofagul de bovină injectat intracutanat a cauzat o stimulare antigenică cronică cu participarea sistemului de complement, activat pe cale clasică, și a rezultat în efect membranolitic care a condus la distrugerea structurilor epiteliale și ruperea interacțiunilor dintre elementele celulare.

Cercetarea indicelui de activitate a relatat afectarea stării emoționale a șobolanilor. Prin urmare, activitatea șobolanilor era scăzută ($1,7\pm 0,005$). Reacția de imobilizare a șobolanilor ($32,4\pm 8,5\%$) a fost interpretată ca un simptom de anxietate.

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 (tabelul 4.1).

Tabelul 4.1. Repartizarea animalelor în funcție de metoda de tratament

Metoda de tratament	Numărul de animale	p±ES (%)
Fără tratament (lotul-martor)	30	20±3,6
Tratament cu celule stem obținute din măduva osoasă (1×10^6 celule/kg corp/zi)	30	20±3,6
Tratament cu fibroblaste obținute de la embrionii de găină (1×10^6 celule/kg corp/zi)	30	20±3,6
Tratamentul cu ciclofosamidă (40mg/kg/zilnic)	30	20±3,6
Tratament cu corticosteroizi (metil-prednisolon acetat, 100 mg/kg/zi)	30	20±3,6
Total	150	100,0

Din datele prezentate în Tabelul 4.1 rezultă că 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 greutății corporale în aceste două loturi a avut o diferență statistic semnificativă ($P=6,5$, $P<0,001$, 16 zile) (Tabelul 4.2, Anexa 3).

Tabelul 4.2. Scorul leziunilor *pemfigus-like* și masa la șobolani în lotul I (lotul-martor) și în lotul II, tratat cu celule stem din măduvă osoasă

Parametrii	Lotul I (n=30)	Lotul II (n=30)	P
Scorul	8,9±0,36	1,45±0,19	P=18,6, P<0,001
Masa corpului	2,46±0,091	1,2±0,17	P=6,5, P<0,001

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 ne semnificativ față de lotul-martor, care nu a primit nici un tratament. Totodată, diferența dintre diminuarea greutateii corporale în aceste două loturi a fost ne semnificativă ($P=1,63$, $P>0,05$, 16 zile de la începutul tratamentului) (Tabelul 4.3).

Tabelul 4.3. Scorul leziunilor *pemfigus-like* și masa la șobolani în lotul I (lotul-martor) și în lotul III, tratat cu fibroblaste din embrionii de găină

Parametrii	Lotul I (n=30)	Lotul III (n=30)	P
Scorul	8,9±0,36	4,02±2,03	P=1,96, P>0,05
Masa corpului	2,46±0,091	2,2±0,13	P=1,63, P>0,05

În lotul în care s-a utilizat tratamentul cu ciclofosfamidă (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 greutateii corporale în aceste două loturi a fost semnificativă ($P=3,46$, $P<0,01$, după 16 zile de la începutul tratamentului) (Tabelul 4.4).

Tabelul 4.4. Scorul leziunilor *pemfigus-like* și masa la șobolani în lotul I (lotul-martor) și în lotul IV, tratat cu ciclofosfamidă (40 /mg/kg corp/zi)

Parametrii	Lotul I (n=30)	Lotul IV (n=30)	P
Scorul	8,9±0,36	1,93±0,26	P=16,21, P<0,001
Masa corpului	2,46±0,091	1,73±0,19	P=3,46, P<0,001

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 greutateii corporale în aceste două loturi a fost semnificativă ($P=3,49$, $P<0,01$, 16 zile) (Tabelul 4.5).

Tabelul 4.5. Scorul leziunilor *pemfigus-like* și masa la șobolani în lotul I (lotul-martor) și lotul V, tratat cu m-Ps

Parametrii	Lotul I (n=30)	Lotul V (n=30)	P
Scorul	8,9±0,36	6,7±0,32	P=4,58, P<0,001
Masa corpului	2,46±0,091	2,1±0,05	P=3,49, P<0,001

4.3. Modificarea greutateii corporale

Indicele pierderii greutateii 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 de animale. Valoarea medie a greutateii corpului animalelor din eșantionul total la începutul tratamentului a constituit 197,97±2,1 g, ceea ce a corespuns cu 2,6±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.

Tabelul 4.6. Scorul greutateii corporale a animalelor după tratamentul cu celule stem

Perioada de tratament (zile)	Lotul I (n=30)	Lotul II (n=30)	Lotul III (n=30)	Lotul IV (n=30)	Lotul V (n=30)
16	2,46±0,091	1,2±0,17	2,2±0,13	1,73±0,19	2,1±0,05
32	2,46±0,091	0,87±0,17	2,2±0,13	1,3±0,19	2,0±1,99
48	2,7±0,083	0,4±0,087	2,03±0,13	0,67±0,14	1,86±0,25

Din datele tabelului 4.6 am făcut concluzie că în ziua a 16-a zi, valoarea medie a scorului greutateii (2,46±0,091) în lotul I fără tratament a rămas semnificativ înaltă ($P>0,001$) față de scorul în lotul II (1,2±0,17), lotul III (2,2±0,13), lotul IV (1,73±0,19) și diferă nesemnificativ față de valoarea scorului în lotul V (2,1±0,05). În ziua a 32-a, scorul a rămas neschimbat în lotul I (2,46±0,091) și crește semnificativ ($P<0,001$) până în ziua a 48-a, (2,7±0,083). În lotul II, greutatea corpului scade semnificativ ($P<0,001$), până în ziua a 48-a de supraveghere (0,4±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±0,13 și 2,03±0,13. Și șobolanii din lotul IV au adăugat semnificativ ($P<0,001$) în greutate, scorul s-a micșorat de la 1,3±0,19 până la 0,67±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 crește, 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 ($P<0,001$) (Tabelul 4.7).

Tabelul 4.7. Concentrația C3 (g/l) al complementului în lotul II după tratamentul cu celule stem din măduvă osoasă

Perioada de tratament (zile)	Prima zi de tratament	16	32	48	P
Concentrația C3 al complementului	$1,69\pm 0,009$	$2,1\pm 0,014$	$2,51\pm 0,015$	$2,81\pm 0,02$	$P>0,001$

C* – componentul din sistemul complementului.

4.5. Dinamica leziunilor cutanate

Conform protocolului [254, 255], investigația planimetrică a plăgilor se recomandă să fie efectuată la fiecare 3-4 zile, pentru a releva dinamica activității reparatorii a plăgilor.

Tabelul 4.8. Suprafața defectelor cutanate modelate la a 8-a zi de tratament

Loturile de cercetare	Lotul I (n=30)	Lotul II (n=30)	Lotul III (n=30)	Lotul IV (n=30)	Lotul V (n=30)	P
Suprafața leziunii cutanate (mm ²)	$8,81\pm 0,17$	$4,95\pm 0,31$	$7,27\pm 0,32$	$6,65\pm 0,33$	$8,31\pm 0,24$	$P<0,001$

S* – suprafața leziunii cutanate (mm²)

Din Tabelul 4.8 se observă că în urma tratamentului cu celule stem (1×10^6 celule/kg corp/zi) suprafața 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 (Tabelul 4.9).

Tabelul 4.9. Procentul de reducere a suprafeței leziunilor după tratament

Loturile de cercetare	Lotul I (n=30)	Lotul II (n=30)	Lotul III (n=30)	Lotul IV (n=30)	Lotul V (n=30)

Suprafața leziunii cutanate (%)	0,54%	6,14%	2,31%	1,68%	1,1%
---------------------------------	-------	-------	-------	-------	------

După 16 zile de tratament (Tabelul 4.10.) cel mai bun rezultat a fost obținut în lotul II (6,14%), tratat cu celule stem alogene (1×10^6 celule/kg corp/zi), izolate din măduvă osoasă.

Tabelul 4.10. Suprafața defectelor cutanate modelate după 16 zile de tratament

Loturile de cercetare	Lotul I (n=30)	Lotul II (n=30)	Lotul III (n=30)	Lotul IV (n=30)	Lotul V (n=30)	P
Suprafața leziunii cutanate (mm ²)	9,1±0,19	3,38±0,23	5,22±0,3	5,16±0,46	6,86±0,3	P<0,001

Tabelul 4.10 prezintă o eficacitate semnificativă ($P < 0,001$) a celulelor stem din măduvă osoasă în tratamentul leziunilor experimentale cutanate. Rezultatul este datorat proprietăților imunosupresoare ale grefelor din celule stem osteomedulare.

4.6. Evaluarea schimbărilor morfologice în secțiunile histologice ale pielii

Au fost formate 5 loturi de studii, a câte 30 de șobolani cu leziuni *pemfigus-like*, selecția aleatorie. Doza celulelor stem a fost de 1×10^6 celule/kg/zi, a ciclofosfamidei – de 40 mg/kg corp/zi și soluție de acetat metil-prednisolon – de 100 mg/kg/corp/zi. Soluția a fost administrată intraperitoneal. 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).

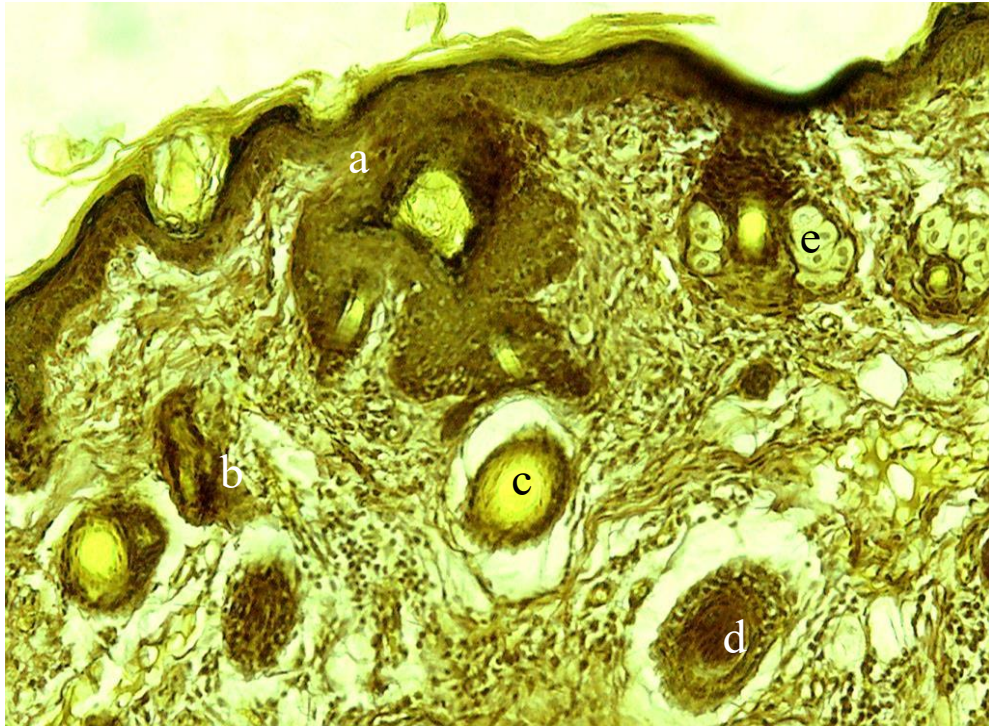


Fig. 4.1. Afectarea pemphigus-like a foliculilor piloși ai pielii la șobolanii din lotul fără tratament, la a 24-a săptămână de la injectarea extractului etanolic din mucoasa esofagului de bovină. Keratinocitele din stratul granular și spinos – tumefiate și hipertrofiate (a), teaca fibroasă – dezlipită 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), acinusul glandelor sebacee – lângă foliculul pilos (e). Picrofuxină, $\times 140$. (Șobolan din lotul I).

În săptămâna a 29-a de la demararea maladii, la animalele din lotul I s-au observat leziunile erozive noi în regiunea spatelui. Histologic, s-a pus în evidență formarea elementelor buloase noi pe suprafața cutanată a șobolanilor. Keratinocitele din stratul granular și spinos au fost supuse acantolizei (a), cu formarea leziunilor buloase (b), cu conținut seros (c), bule nou-formate (d), glande sebacee – formate din acinuși (e), fir de păr în teaca fibroasă (f) (Figura 4.2).

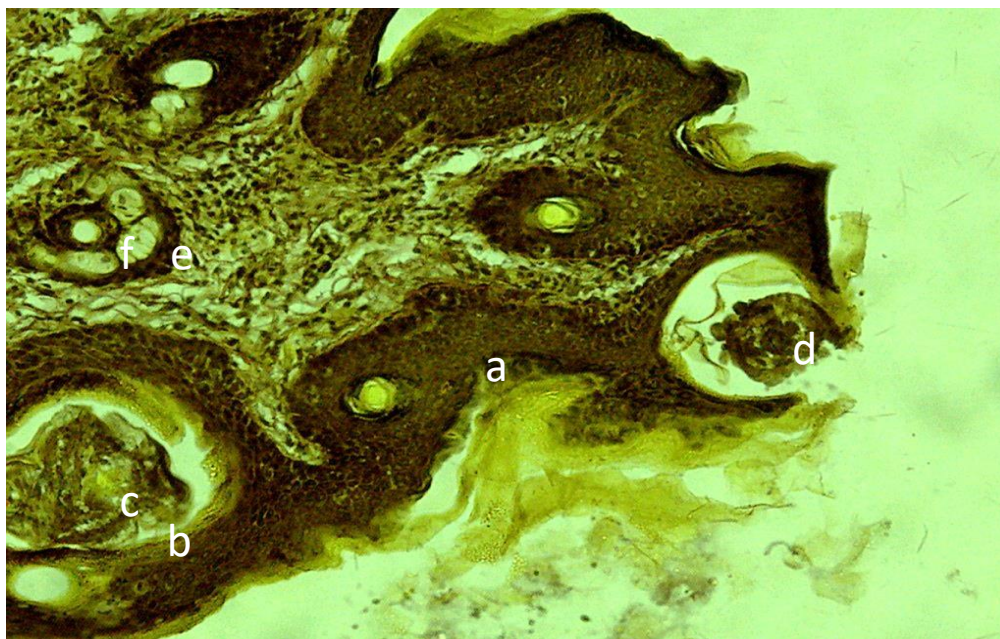


Fig. 4.2. Formarea elementelor buloase noi pe suprafața cutanată a șobolanilor în săptămâna a 29-a de la demararea maladii. Epiteliocitele stratului granular și spinos sunt supuse acantolizei (a), formarea leziunilor buloase (b), cu conținut seros (c), bule nou-formate (d), glande sebacee – formate din acinusuri cu celule spumoase nemodificate (e), fir de păr în teaca fibroasă (f). 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 s-au descris infectarea leziunilor erozive, hipertrofierea și tumefierea celulelor spinoase și granulare cu acantoliză (a), cu formarea bulelor (b) cu conținut inflamator nespecific leucocitar (c), infiltrat inflamator perivezicular (d) (Figura 4.3).



Fig. 4.3. 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 zi de tratament cu celule stem. (3 șobolani ($10 \pm 5,5\%$)). Histologic s-au descris: epidermul cu toate straturile intacte (a), limfocite solitare în hipoderm (b), glande sebacee ce comunică (c) cu foliculul pilos (d) (Figura 4.4).

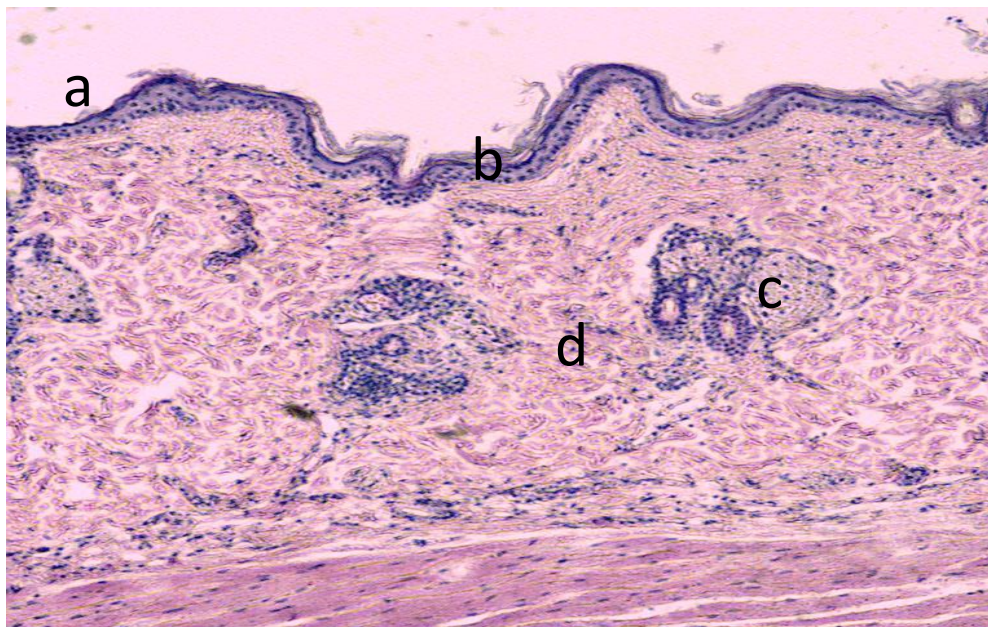


Fig. 4.4. Bioptatul de piele prelevat de la șobolan cu leziunile *pemphigus-like* după tratamentul cu celule osteomedulare în a 16-a zi. Epidermul cu toate straturile intacte (a), limfocite solitare în hipoderm (b), glande sebacee ce comunică (c) cu foliculul pilos (d). H-E, $\times 90$. (Șobolan din lotul II).

În lotul II la animale cu leziuni *pemphigus-like* în a 32-a zi de tratament, pe suprafața pielii spatelui pe locul leziunii erozive, s-au observat modificări de epitelizare, formarea unei pelicule de fibrină, tracțiunea marginelor plăgii, stoparea exsudației, recreșterea firelor noi de blană, (9 animale ($6,0 \pm 1,9\%$)). Histologic, epidermul cu toate straturile intacte (a), stratul bazal este format din keratinoblaste uniforme (b), urmat de keratinocite spinoase (c), celule granulare solitare (d), stratul lucid a fost ușor îngroșat, stratul cormos – cu hiperkeratoză (e), limfocite solitare, în hipoderm (f), glande sebacee ce comunică (g) cu foliculul pilos (h) (Figura 4.5).

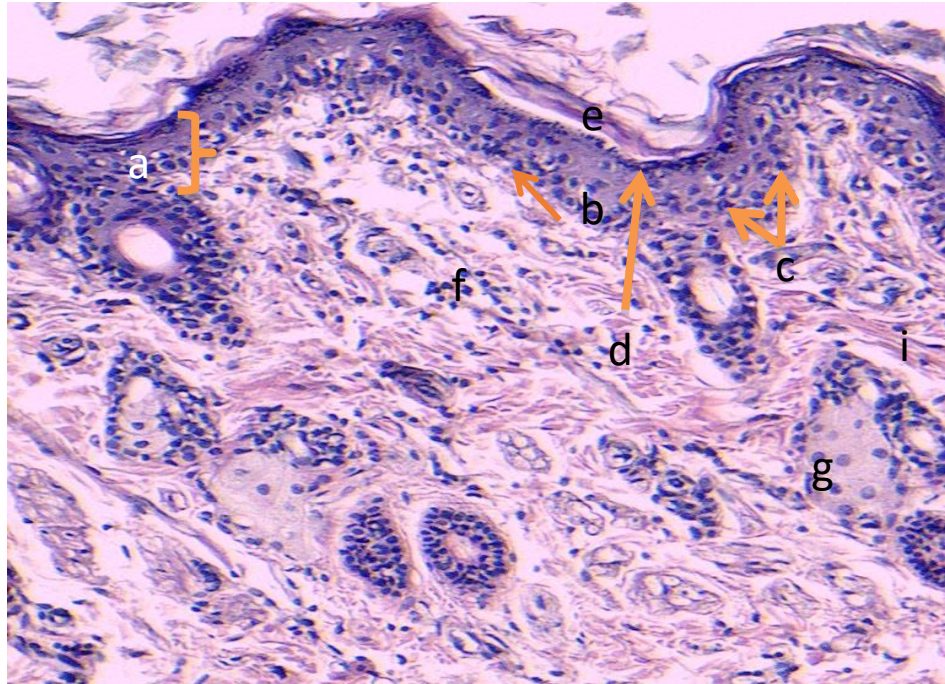


Fig. 4.5. Biopatul de piele prelevat de la șobolani cu leziunile pemfigus-like tratați cu celule stem din măduva osoasă administrate intraperitoneal la șobolani, în a 32-a zi. Epidermul cu toate straturile intacte (a); stratul bazal a fost format din keratinoblaste uniforme (b), urmat de keratinocite 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).

În lotul III animalele cu leziunile *pemfigus-like* au beneficiat de tratament cu celule fibroblaste obținute din embrioni de găină. Fragmentele pielii au fost prelevate din regiunea gâtului și a spatelui, în ziua a 32-a de tratament. La 3 șobolani ($10 \pm 5,5\%$), histologic s-a descris formarea crustelor pe defecte *pemfigus-like* ale pielii. Crustă formată din filamente de fibrină (a), atrofia stratului epidermal (b), dermul cu edem și rare elemente inflamatorii (c), papilomatoza stratului bazal (d) (Figura 4.6).

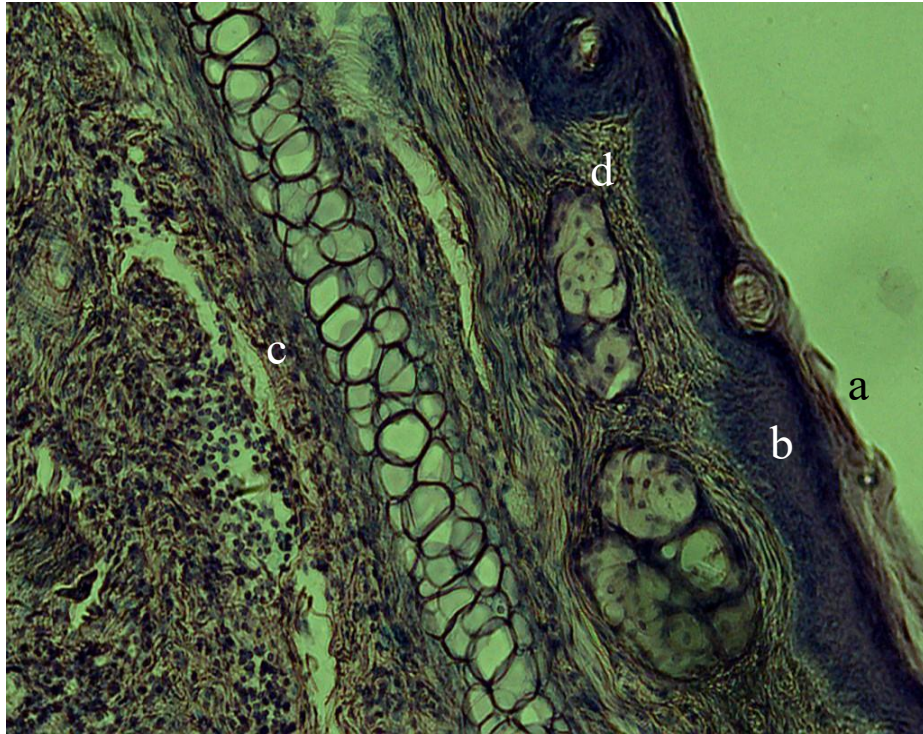


Fig. 4.6. Formarea crustelor pe defecte pemfigus-like ale pielii, în ziua a 32-a de tratament. Crustă formată din filamente de fibrină (a), atrofia stratului epidermal (b), dermul cu edem și rare elemente inflamatorii (c), papilomatoza stratului bazal (d). H-E, × 140. (Șobolan din lotul, III).

În lotul IV animale cu pemfigus-like au fost supuși tratamentului cu ciclofosfamidă (40 mg/kg/corp/zi), 3 șobolani ($10 \pm 5,5\%$) au prezentat modificările de epitelizare a epidermului. Fragmentul cutanat a fost prelevat din regiunea botului, în ziua a 32-a de tratament. Pe suprafața plăgii s-a constatat o placă pigmentată secundară, cu suprafața de 7 mm^2 . Locul era acoperit complet cu blană. Histologic, s-au descris epidermul cu toate straturile intacte (a), stratul bazal a fost format din keratinoblaste uniforme (b), urmat de keratinocite ce conțin celule spinoase. S-au identificat celule granulare solitare (c), stratul lucid a fost îngroșat (d), stratul cornos a fost subțiat cu keratină (e), limfocite solitare în hipoderm (f), teaca internă și cea externă ale foliculului pilos (g) (Figura 4.7).

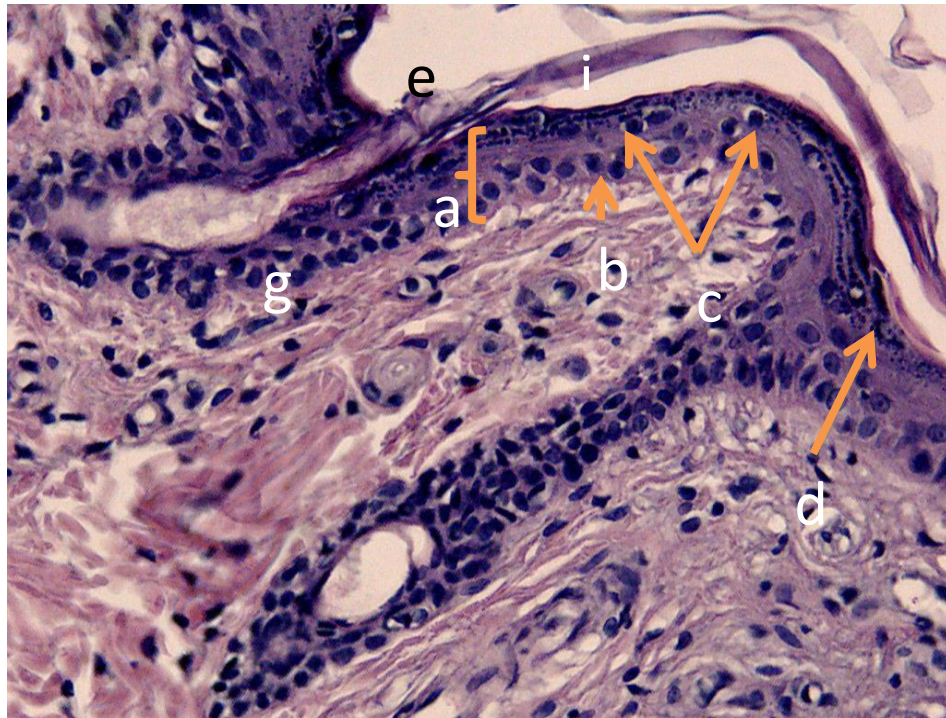


Fig. 4.7. Leziunile pemfigus-like tratate cu ciclofosfamidă (40 mg/kg corp/zi) la șobolani în ziua a 32-a. Epidermul cu toate straturile persistente (a), stratul bazal a fost format din keratinoblaste uniforme (b), urmat de keratinocite din stratul spinos. S-au identificat celule granulare solitare (c), stratul lucid a fost îngroșat (d), stratul cornos a fost subțiat cu keratină (e), limfocite solitare, în hipoderm (f), teaca internă și cea externă ale foliculului pilos conțin celule conturate (g). H-E, × 140. (Șobolan din lotul, III).

Lotul IV a inclus 3 ($10 \pm 5,5\%$) șobolani cu leziuni erozive pemfigus-like, la nivelul capului și spatelui. Animale au fost tratate cu ciclofosfamidă – 40 mg/ kg corp/ zi. Fragmentul cutanat a fost excizionat în ziua a 48-a de terapie. Plaga – complet epitelizată, de culoare roză, acoperită cu blană lucioasă. Tulpinile părului au fost de aceeași lungime. Histologic s-au descris epidermul cu toate straturile persistente (a), limfocite solitare în hipoderm (b), sub stratul bazal s-au vizualizat fibre de colagen colorate în roșu ce au determinat arhitectonica țesutului conjunctiv (c), glande sebacee cu celule conturate ce comunică (d) cu foliculul pilos (e) (Figura 4.8).

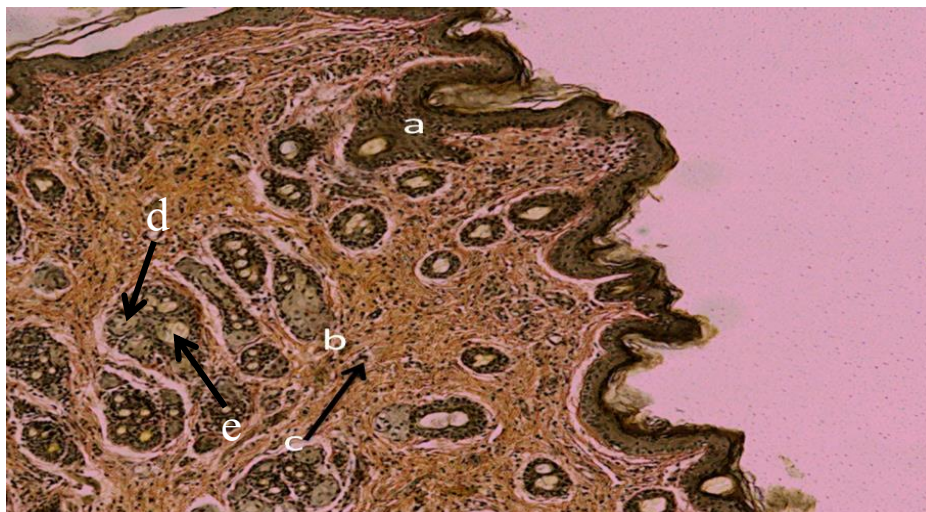


Fig. 4.8. Leziunile pemfigus-like tratate cu ciclofosfamida (40 mg/kg corp/zi), la șobolani în ziua a 48-a. Epidermul cu toate straturile persistente (a), limfocite solitare în hipoderm (b), sub stratul bazal s-au vizualizat fibre de collagen colorate în roșu ce au determinat arhitectonica țesutului conjunctiv (c), glande sebacee cu celule conturate ce comunică (d) cu foliculul pilos (e). Picrofuxină, ×90. (Șobolan din lotul, IV).

Lotul V a inclus 30 ($20 \pm 3,6\%$) șobolani. Fragmentul cutanat a fost secționat în ziua a 16-a de tratament cu metil-prednisolonă acetat 100 mg/kg corp/zi. Macroscopic, suprafața plăgii a fost de 10,1 mm². S-a descris tracțiunea marginilor plăgii cu secreție purulentă. Microscopic s-au determinat de tumefierea stratului spinos și granular (a), descuamarea keratinocitelor (b), formarea unei cavități cu conținut fibro-proteic (c), infiltrat inflamator în derm (d) (Figura 4.9).

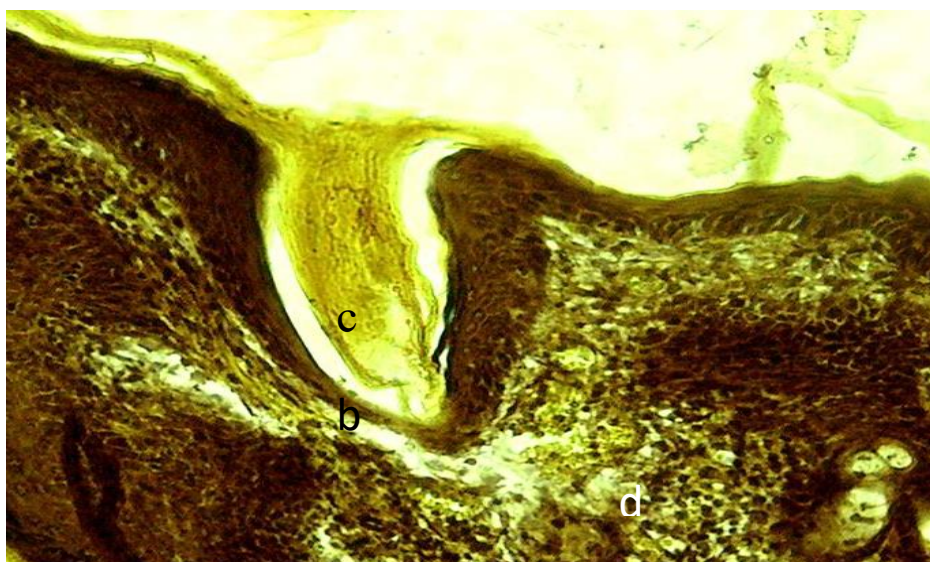


Fig. 4.9. Leziuni pemfigus-like la șobolani din lotul V, în ziua a 16-a de terapie. Tumefierea stratului spinos și granular (a), descuamarea keratinocitelor (b), formarea unei cavități cu conținut fibro-proteic (c), infiltrat inflamator în derm (d). Picrofuxină, × 140. (Șobolan din lotul, V).

De la șobolanii din lotul V, fragmentul de piele a fost secționat în ziua a 32-a de tratament. Macroscopic, pe suprafața pielii s-a constatat o placă erozivă, acoperită cu peliculă epitelială și o tracțiune semnificativă a marginilor plăgii. Suprafața leziunii cutanate – 5,3 mm². Microscopic, s-a evidențiat formarea crustelor pe leziuni cutanate erozive. Crustă formată din filamente de fibrină (a), atrofia stratului epidermal (b), dermul cu edem și rare elemente inflamatorii (c), papilomatoza stratului bazal (d) (Figura 4.10).

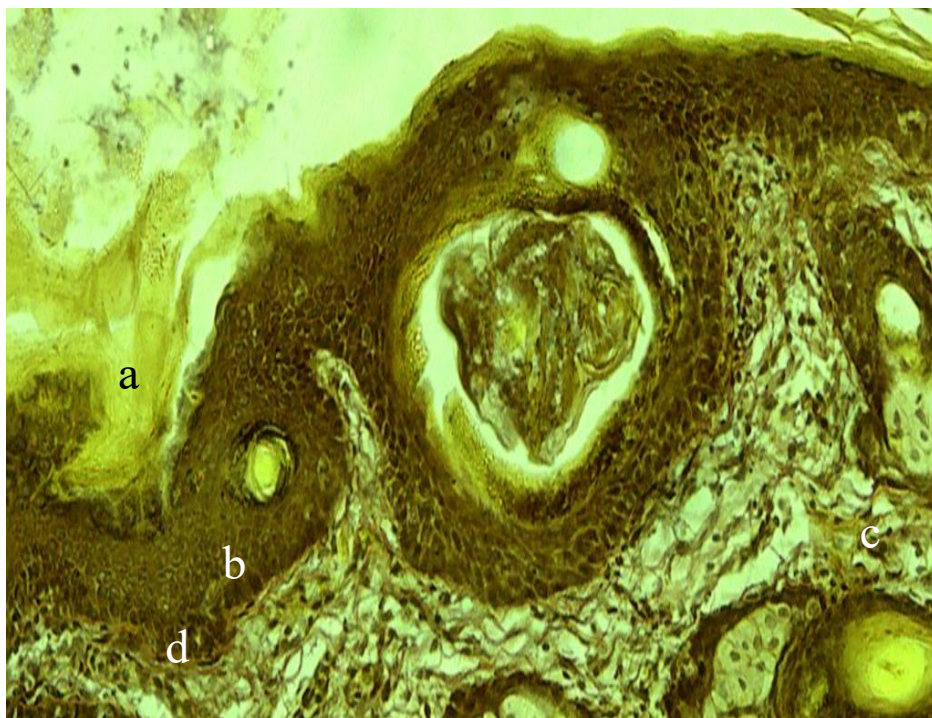


Fig. 4.10. Formarea crustelor pe defecte cutanate erozive în ziua a 32-a de tratament. Crustă formată din filamente de fibrină (a), atrofia stratului epidermal (b), dermul cu edem și rare elemente inflamatorii (c), papilomatoza stratului bazal (d). Picrofuxină, × 140. (Șobolan din lotul V).

De la șobolanii din lotul II, supuși tratamentului cu celule osteomedulare alogene, (7 animale (4,6±1,7%), ficatul a fost examinat în ziua a 48-a de tratament. Histologic s-au descris hepatocite conturate (a), edem (b), infiltrat limfocitar în jurul triadelor hepatice (c), hiperemie venoasă (d) (Figura 4.11).

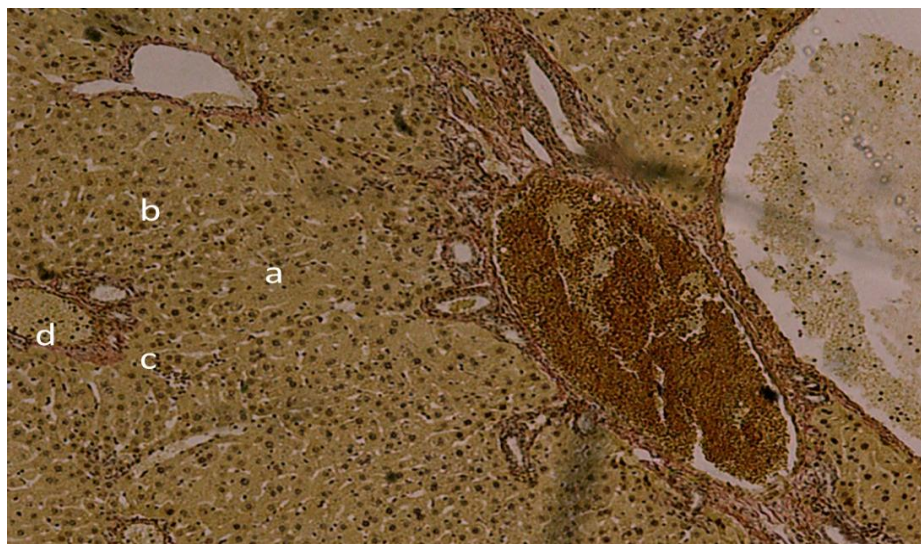


Fig. 4.11. Ficatul șobolanilor din lotul II, Ficatul a fost prelevat în ziua a 48-a de tratament. Hepatocite conturate (a), edem (b), infiltrat limfocitar în jurul triadelor hepatice (c), hiperemie venoasă (d). Picrofuxină, × 140. (Șobolan din lotul, II).

Lotul III a inclus 30 ($20 \pm 3,3\%$) de șobolani, supuși tratamentului cu fibroblaste din embrioni de găină. Splina a fost prelevată în ziua a 32-a de tratament. Tabloul microscopic: reacție inflamatorie a țesutului parenchimatous al splinei. Histologic s-au determinat noduli limfatici (a) cu centrul germinativ hiperplaziat (b), zona mantinică – slab conturată (c) (Figura 4.12).

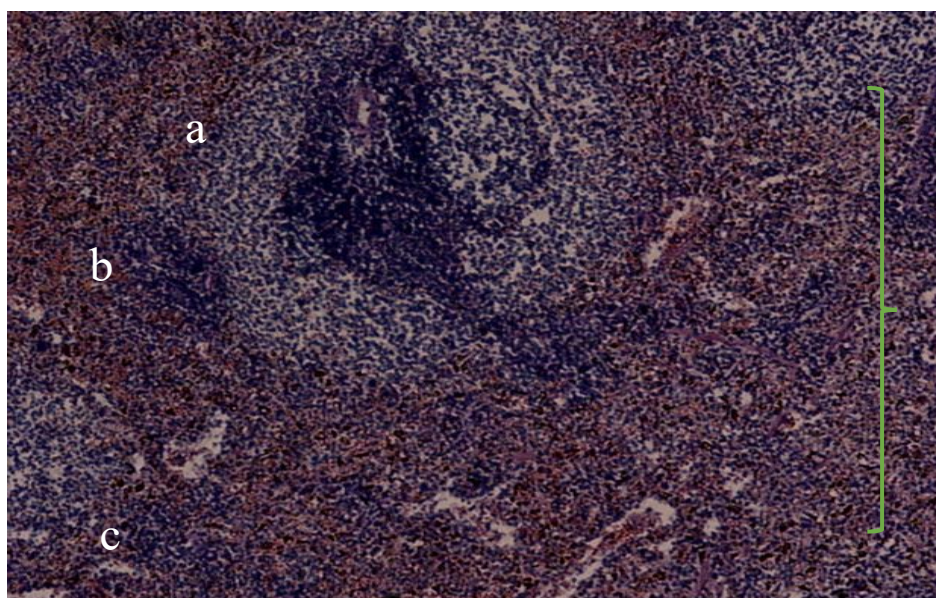


Fig. 4.12. Splina șobolanilor tratați cu fibroblaste în pemfigus, la a 32 –a zi de tratament. Noduli limfatici (a) cu centrul germinativ hiperplaziat (b), zona mantinică – slab conturată (c). H-E, × 140. (Șobolan din lotul, III).

4.7. Evaluarea imunohistochimică cu AE1/AE3 a keratinocitelor

Animale din loturile III și V au inclus câte 15 animale ($8,3\pm 0,15\%$) care s-au investigat imunohistochimic cu AE1/AE3 la a 32-a zi de tratament. Au fost puse în evidență toate straturile a epidermului care au fost colorate slab (+) (a), straturile lucid și cornos au fost îngroșate (b), straturile spinos și granular erau formate de celule clar evidențiate (c), stratul bazal a avut o reacție moderată de colorare (++) (d) (Figura 4.13).



Fig. 4.13. Pielea șobolanilor afectați de pemfigus la etapa de epitelizare, la a 32-zi de tratament. Toate straturile a epidermului au fost colorate slab (+) (a), straturile lucid și cornos erau îngroșate (b), straturile spinos și granular au fost formate de celule clar evidențiate (c), stratul bazal a avut o reacție moderată de colorare (++) (d). AE1/AE3, $\times 140$. (Șobolan din lotul III).

Loturile II și IV au inclus 16 animale: lotul II – 9 animale ($6,0\pm 1,9\%$) și lotul IV – 7 animale ($4,6\pm 1,7\%$) cu intensitate slabă de colorare a keratinocitelor (+) la nivelul secțiunii cutanate afectate, la a 32-zi de tratament. Au fost puse în evidență toate straturile colorate slab (+) (a), straturile lucid și cornos erau îngroșate (b), straturile spinos și granular au fost formate de celule clar evidențiate (c), stratul bazal a avut o reacție moderată de colorare (++) (d) (Figura 4.14).

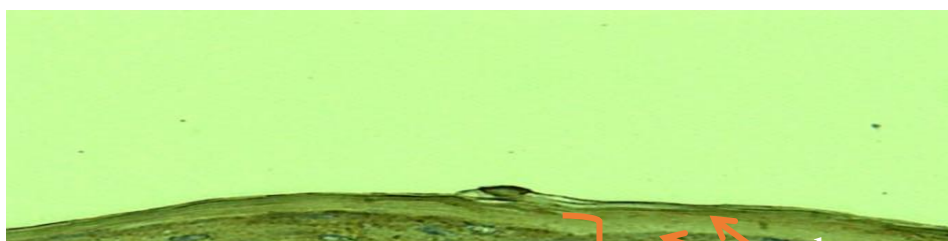


Fig. 4.14. Pielea șobolanilor afectați de pemfigus la etapa de epitelizare, la a 32-zi de tratament. Au fost puse în evidență toate straturile colorate slab (+) (a), straturile lucid și cornos sunt îngroșate (b), straturile spinos și granular sunt formate de celule clar evidențiate (c), stratul bazal a avut o reacție moderată de colorare (++) (d). AE1/AE3, ×140. Șobolan din lotul II).

4.8. Dinamica comportamentului șobolanilor după tratament

Caracteristica IPA a arătat (Tabelul 4.13) că principală manifestare comportamentală a animalelor, care au descris starea de bine, a fost activitatea motorie (locomoție) pe suprafața terenului, măsurată prin numărul de pătrate traversate.

Tabelul 4.11. Indicatorii comportamentului orientativ-explorativ la șobolani cu leziuni pemfigus-like

Caracteristicile comportamentale	Lotul I (n=30)	Lotul II (n=30)	Lotul III (n=30)	Lotul IV (n=30)	Lotul V (n=30)
Locomoție, nr.	19,2±16,1	32,2±19,01	20,2±16,4	28,3±18,4	19,31±16,1
Reacție de orientare, nr.	22,7±17,1	27,1±18,2	22,9±17,2	22,1±16,9	22,4±17,02
Activitate de cercetare, nr.	15,7±14,8	17,8±15,6	16,03±14,9	22,5±17,04	17,9±15,7
Defecație, buc.	3,9±7,9	1,4±4,8	4,6±8,6	2,1±5,8	3,8±7,8
Timpul de imobilitate, sec	32,3±19,1	17,8±15,6	28,2±18,4	21,25±16,7	30±18,7
Grooming, sec	6,11±9,8	3,7±7,7	8,01±11,1	3,8±7,8	6,6±10,1
IPA	1,8	4,4	2,1	3,4	2,05

În lotul II la șobolani activitatea motorie a fost cea mai semnificativă ($P < 0,05$) și a constituit $32,2\% \pm 19,01$. Perioadele de autoîngrijire (grooming) 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).

4.9. Prelucrarea statistică a datelor

Valorile $P < 0,05$ au fost considerate semnificative statistic. Astfel, terapia cu celule osteomedulare a arătat o diferență semnificativă în scăderea scorului leziunilor, comparativ cu terapie cu fibroblaste din embrioni de găină. Lotul III ($P=4,5$, $P<0,001$, 16 zile), ciclofosfamidă 40 mg/kg/zi, lotul IV ($P=3,3$, $P<0,001$, 16 zile) și lotul tratat cu soluție acetat de metil-prednisolon 100 mg/kg corp/zi lotul V ($P=2,75$, $P<0,001$, 16 zile).

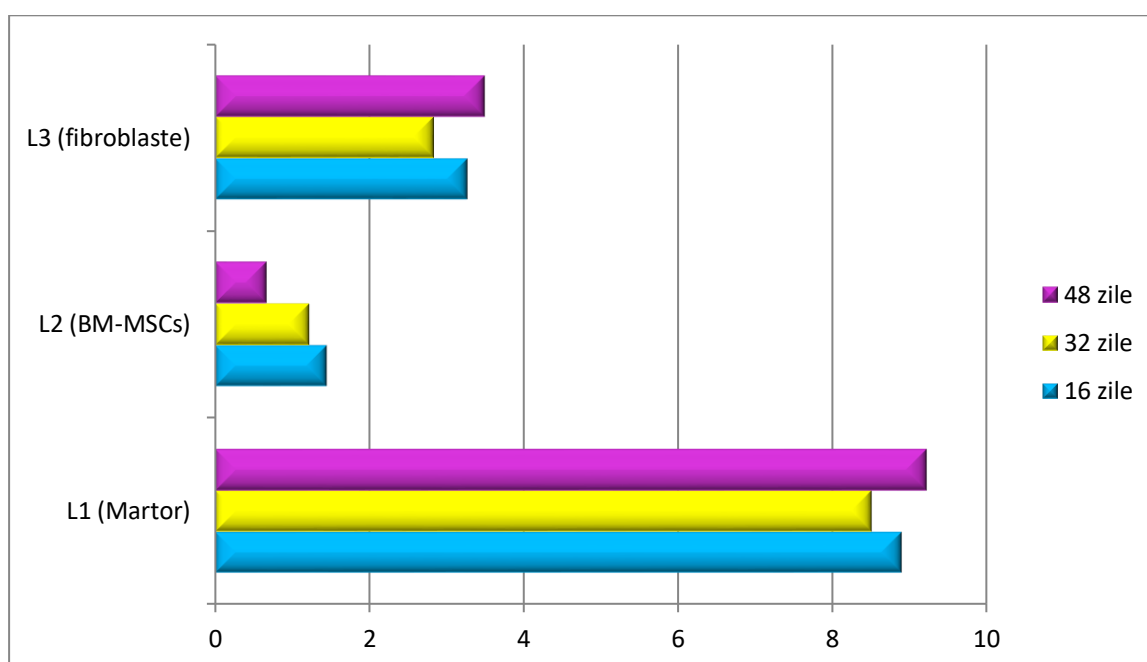


Fig. 4.15. Scorul leziunilor pemfigus-like în funcție de durată tratamentului

Conform Figurei 4.15, după 16 zile de tratament, putem constata următoarele rezultate: în lotul-martor (lotul I) s-a evidențiat un scor de $8,9 \pm 0,36\%$. Aceasta înseamnă, că în lotul fără tratament s-a observat dezvoltarea continuă a leziunilor, relevată prin sporirea scorului și diferența semnificativă ($P=18,6$, $P<0,001$) față de scorul din lotul II ($1,45 \pm 0,19\%$). După 32 de zile, am determinat că în lotul-martor (lotul I) a fost un scor de $8,51 \pm 0,35\%$. Aceasta dovedește că în lotul fără tratament s-a observat stoparea dezvoltării leziunilor, relevată prin micșorarea scorului. După 48 de zile, am stabilit că în lotul-martor (lotul I) scorul a ajuns până la $9,23 \pm 0,37\%$. Aceasta înseamnă că în lotul fără tratament s-a observat dezvoltarea continuă a leziunilor, relevată prin sporirea scorului.

După 16 zile de tratament, lotul II a obținut scorul $1,45 \pm 0,19\%$. În ziua a 32-a, diferența dintre valorile scorului în lotul II ($1,22 \pm 0,22\%$) și lotul III ($2,83 \pm 0,32\%$) a fost semnificativă ($P=4,13$, $P<0,05$). În ziua a 48-a, lotul II cu scorul $0,67 \pm 0,17\%$ a prezentat o diferență semnificativă ($P=11,8$, $P<0,05$) față de scorul din lotul III ($3,5 \pm 0,18\%$).

În ziua a 16-a, comparând scorurile lotului III ($4,02 \pm 2,03\%$) și lotului IV ($1,93 \pm 0,26\%$), am obținut o diferență statistic nesemnificativă ($P=1,02$, $P>0,05$). În ziua a 32-a, diferența dintre două valori medii ale scorului din lotul III ($2,83 \pm 0,32\%$) și lotul IV ($1,5 \pm 0,25\%$) a fost statistic semnificativă ($P=3,3$, $P<0,01$). În ziua a 48-a, valoarea scorului obținut de lotul III ($3,5 \pm 0,18\%$) a fost semnificativă ($P=9,4$, $P<0,05$) mai mare decât valoarea scorului lotului IV ($1,25 \pm 0,17$).

În ziua a 16-a, valoarea scorului obținut de lotul IV ($1,93 \pm 0,26\%$) a fost semnificativ ($P=11,6$, $P<0,05$) mai mică decât valoarea scorului din lotul V ($6,7 \pm 0,32\%$). În ziua a 32-a, valoarea scorului a scăzut semnificativ în lotul IV ($1,5 \pm 0,25\%$) ($P=11,4$, $P<0,001$), în comparație cu valoarea scorului din lotul V ($6,05 \pm 0,3\%$). În ziua a 48-a, am observat o diferență semnificativă ($P=28,8$, $P<0,001$) dintre valoarea scorului obținut de lotul IV ($1,25 \pm 0,17\%$) și valoarea scorului lotului V ($8,16 \pm 0,18\%$) (Tabelul 4.13).

Tabelul 4.13. Evaluarea diferenței statistice (P) între loturi

Loturile	Lotul I (n=30)	Lotul II (n=30)	Lotul III (n=30)	Lotul IV (n=30)	Lotul V (n=30)	P
Ziua 16	$8,9 \pm 0,36^*$	$1,45 \pm 0,19$	$4,02^* \pm 2,03$	$1,93 \pm 0,26$	$6,7 \pm 0,32$	$>0,001$
Ziua 32	$8,51 \pm 0,35^*$	$1,22 \pm 0,22^*$	$2,83 \pm 0,32$	$1,5 \pm 0,25^{**}$	$6,05 \pm 0,3$	$<0,001$
Ziua 48	$9,23 \pm 0,37$	$0,67 \pm 0,17^{**}$	$3,5 \pm 0,18$	$1,25 \pm 0,17$	$8,16 \pm 0,18$	$<0,001$

* $P>0,001$

** $P<0,05$

Prin urmare, șobolanii din lotul I au continuat să dezvolte leziuni și au scăzut în greutate semnificativ ($P<0,001$) față de șobolanii din lotul II, III, IV. În aceste loturi, leziunile cutanate s-au ameliorat. Șobolanii au rămas în remisie timp de 1 an, cu prurit și cruste minime, chiar și după încetarea terapiei cu celule stem. În lotul V, scorul leziunilor *pemfigus-like* a fost reversibil după întreruperea tratamentului cu doza administrată în acest experiment. Noi am concluzionat că celulele stem mezenchimale osteomedulare și ciclofosfamida au avut acțiune benefică în tratarea leziunilor *pemfigus-like* la șobolani.

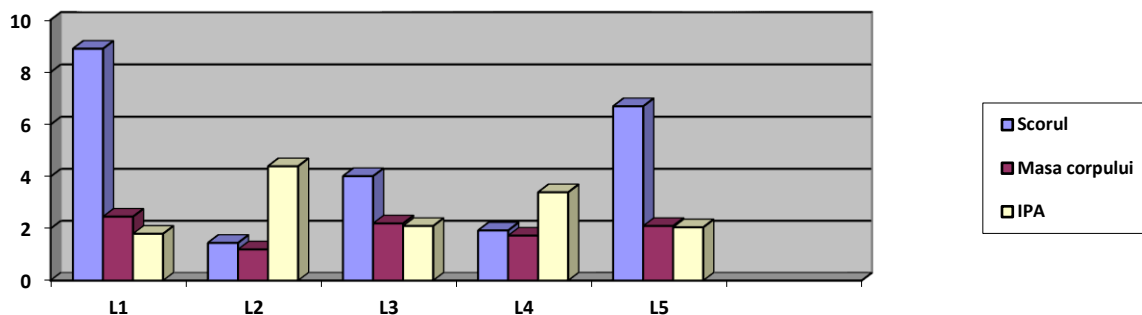


Fig. 4.16. Parametrii de evaluare a eficacității tratamentului cu celule stem la șobolani cu leziuni pemfigus-like scorul **masa corpului** **IPA**.

Din figura 4.16 se observă că în lotul II după tratamentul cu celule stem alogene mezenchimale din măduvă osoasă, valorile scorului au scăzut, greutatea corpului s-a micșorat cel mai semnificativ, iar IPA crește.

Discuții

Tratamentul pemfigusului este îndreptat spre suprimarea leziunilor cutanate și mucoase cu prevenirea complicațiilor potențial asociate cu maladia sau tratamentul acesteia, deși nu există nici un remediu etiopatogenetic de vindecare pentru pemfigus [203].

În anii 1940 - 1998 ai secolului trecut, pemfigusul vulgar era considerat o boală incurabilă, până la introducerea corticosteroizilor în tratament și era caracterizat ca cea mai frecventă cauză de deces a pacienților în secțiile dermatologice [204].

În anul 2009, apar date noi referitoare la folosirea modelului de pemfigus pe animal pentru evaluarea eficacității preparatelor citostatice și a glucocorticoizilor [152].

În ultimii ani, s-au obținut realizări de succes [239-241] în tratamentul pemfigusului vulgar sever cu celule stem hematopoietice alogene, celule mezenchimale din sângele ombilico-placentar și cu celule stem derivate din țesut adipos.

Tratamentul acestor boli necesită o cercetare a patogenezei, profunzimii și gradului de implicare în procesul patologic a elementelor intercelulare și intraepiteliale. La momentul actual s-a constatat că la baza afecțiunilor stau modificările integrității conexiunilor intercelulare [242].

Takae Y. în anul 2008 [152] a abordat efectele preparatelor corticoimunosupresive pe șobolani Rag2 cărora li s-a modelat pemfigus vulgar prin transfer adoptiv de splenocite imunizate DSG3. Tratamentul s-a inițiat cu 2 zile înainte de modelarea maladii și a continuat 4 săptămâni. Șobolanii au fost evaluați timp de 8 săptămâni. Cercetătorii au utilizat dexametazonă (DEX), metil-prednisolon (m-PSL), azatioprină (AZA), ciclofosfamidă (CPA) și hidrat de tacrolimus

(FK506). DEX a fost administrată în doză de 10 mg/kg/ zi, m-PS, – 100 mg/kg/ zi. CPA – 40 mg/kg 3 zile pe săptămână, CsA s-a introdus în – de 40 mg/kg/ zi și FK506 – câte 5 mg/kg/zi. Calea de administrare a acestor preparate a fost cea intraperitoneală. Numai AZA a fost administrată pe cale orală – 15 mg / kg 3 zile pe săptămână. Pentru evaluarea eficacității preparatelor corticoidesupresive pe șobolani, au fost determinate titrul anticorpilor anti-DSG3 IgG prin reacție imunoenzimatică ELISA, scăderea în greutate și scorul pemfigusului timp de 119 zile. La animalele din lotul martor cărora li s-a administrat soluție de PBS, a persistat producerea anticorpilor anti-DSG3 IgG și menținerea scăderii în greutate. Scorul pemfigusului a devenit pozitiv la a 10-a zi și a crescut rapid până la ziua a 28-a. Rezultatele supravegherii animalelor au arătat o eficacitate înaltă a CPA, AZA, CsA, FK506. Injectarea lor a avut efect supresiv asupra producerii de IgG anti-DSG3, dezvoltării leziunilor și creșterii scorului leziunilor. Leziunile de pemfigus pe modele de șoareci au fost reversibile după întreruperea tratamentului cu CPA, CsA, FK506 în doza administrată în acest experiment. La administrarea AZA, dezvoltarea leziunilor a fost oprită definitiv la a 28-a zi. CPA, AZA, FK506 au arătat o diferență nesemnificativă în scăderea greutății corporale, comparativ cu lotul martor. Doar administrarea CsA a stopat scăderea masei corporale a animalelor.

Dozele preparatelor corticosteroide m-PSL și DEX au fost stabilite în baza rezultatelor studiilor anterioare ale lui Takae Y. și altor (2008) [152]. S-au obținut un nivel mai mic de anticorpi IgG anti-DSG3 și un scor semnificativ mai scăzut decât în lotul martor. Diferența în scăderea masei corporale între lotul experimental și cel martor nu a fost semnificativă [152].

Celulele stem mezenchimale (MSC) au proprietăți imunosupresoare și inhibă o varietate de celule care mediază răspunsul imun [243, 244]. MSC suprimă în mod independent limfocitele T CD₄⁺ și CD₈⁺ și inhibă diferențierea și producerea anticorpilor de către celulele B [245, 246] precum și activarea și extinderea celulelor naturali killeri (NK) [232]. În plus, celulele MSC au capacitatea de a modula proliferarea și funcția celulelor T. Pe baza acestor abilități, MSC au fost propuse ca o opțiune terapeutică în tratamentul pemfigusurilor acantolitice și a prezentat un efect terapeutic înalt în bolile autoimune [233].

Aruna V., Vanikar A. și alții (2012) au efectuat studiu prospectiv clinic randomizat, experimental (n=11). După 24 de ore de la transplantarea celulelor stem hematopietice, leziunile cutanate au început să se regreseze. Au scăzut numărul și intensitatea noilor leziuni eruptive. După aproximativ 6 luni, noi leziuni au încetat să erupă. Examenul histologic al leziunilor a evidențiat lipsa cavităților buloase și dispariția depunerilor de IgG. Perioada medie de urmărire a fost de 8,0 ± 0,4 (cu un interval de 7,64-8,81 ani) [239].

Suslova I. și alții (2010) raportează rezultatele studiului prospectiv clinic randomizat, experimental (n=1). Ei au descris un caz clinic a unei femei cu diagnosticul – pemfigusul vulgar sever rezistent la tratament. Durata bolii a fost 1 an. După transplantul de măduvă osoasă cercetătorii au obținut rezultate de succes [240].

Wang M. și alții (2017) descrie rata de supraviețuire a pacienților (n=12). Remisie completă a constituit 92% (11/12) și 75% (9/12), respectiv [241].

Sun L. și alții (2015), relatează rezultatele reacției prin imunofluorescență indirectă (n=1). Titrul anticorpilor a devenit negativ la 6 săptămâni după transplantul de celule stem autologe hematopoietice. La pacient s-a descris o remisie clinică completă fără administrarea medicamentelor, fără activitate clinică sau serologică reziduală a pemfigusului în timpul unui an de urmărire [244].

Van G. și alții (2015), au explorat posibilitatea aplicării transplantării celulelor stem din sângele ombilical pentru un singur caz de pemfigus rezistent la tratamentul cu corticosteroizi și au obținut un efect satisfăcător [245].

Han S. M. și alții (2015), au descris un caz preclinic despre efectul celulelor stem derivate din țesutul adipos, utilizate în tratamentul unui câine cu pemfigus foliaceu. În acest studiu de caz, celule stem mezenchimale derivate din țesut adipos (ATMSCs) au fost folosite cu succes în tratamentul pemfigusului foliaceu. Câinele în vârstă de 10 ani, căruia i s-a stabilit pemfigus foliaceu, a fost adus la un spital veterinar cu manifestări de prurit sever, anorexie, scădere în greutate și leziuni tipice generalizate. Terapia cu celule stem din țesut adipos a fost inițată experimental, cu substanțe citotoxice pentru limfocite T antigen 4 (CTLA4). Ele au fost injectate intravenos la intervale de 2-8 săptămâni, 21 de cure, timp de 20 de luni. Pruritul și leziunile pielii s-au îmbunătățit după primul curs de tratament. Pe durata mai multor tratamente, doza de prednisolon oral a fost redusă treptat până la 0,25 mg/kg/zi, iar azatioprină a fost suspendată [246]

Pacienții cercetați de către Aruna V. și alții (2012), au prezentat rezistență la terapia convențională cu glucocorticoizi și agenți citostatici, ca: prednisolon – 4 mg/kg/zi, per os, cefalexina – 60 mg/kg/zi, ciclosporină – 5 mg/kg/zi) și azatioprină – 2 mg/kg/zi. Diagnosticul de pemfigus a fost stabilit în baza rezultatelor clinice, histologice, citologice, biochimice și imunofluorescență. Celulele stem din sângele periferic au fost mobilizate cu ciclofosfamidă (factor de stimulare a coloniilor de granulocite) și rituximab. Celule stem autologe au fost identificate cu CD₃₄, purificate, apoi perfuzate [239-246, 232, 233].

Transplantul cu celule stem hematopoietice autologe a fost urmat de reconstituirea sistemului imun, care a fost monitorizat prin citometrie în flux. Glucocorticoidul a fost retras imediat după transplant. Tabloul, rezultatele examenului paraclinic, inclusiv frotiul citologic,

biochimia sângelui și biopsiile cutanate, au fost în concordanță cu diagnosticul de pemfigus acantolitic [233].

După transplantarea celulelor stem, s-a evidențiat remisie clinică, erupțiile cutanate au început să regreseze. A scăzut numărul și intensitatea noilor leziuni [239-246]. Examenul histologic al leziunilor a arătat lipsa cavităților buloase și dispariția depunerilor de IgG. Rata completă de remisie clinică a fost de 96% (26/27) și, respectiv, 89% (24/27). Efectele adverse observate au fost pirexia, alergia, infecția și creșterea nivelului enzimelor, care au răspuns la medicamentele antipiretice și antihistaminice. Doar un pacient a decedat de sepsis sever și de insuficiență poliorganică la 2 luni după transplantarea celulelor stem hematopoietice autologice [234, 235].

Celulele stem mezenchimale (MSC) sunt cunoscute nu doar pentru multipotența lor, ci și pentru proprietățile antiinflamatorii și regenerative. Conform testelor preclinice *in vitro* și *in vivo*, MSC autologe și alogene au fost aplicate în afecțiunile mediate imun [234]. Datele actuale sugerează că MSC nu doar înlocuiesc țesuturile bolnave, ci și de asemenea, exercită mai multe efecte trofice, regenerative și antiinflamatorii [234]. Efectele imunosupresive au devenit acum proprietăți ale celulelor stem mezenchimale pentru utilizarea potențială clinică. În primul rând, MSC sunt slab imunogene, datorită lipsei de HLA-DR și a exprimării scăzute a moleculelor MHC de clasa I [237, 238]. S-a demonstrat că MSC au proprietăți imunomodulatoare *in vitro*. În plus, MSC nu conțin proteine CD₈₀ și CD₈₆ [194] – molecule co-stimulatoare care induc activarea celulelor T și supraviețuirea lor. Lipsa de HLA-DR, CD₈₀ și CD₈₆ sugerează că MSCs nu provoacă respingere acută și sunt potrivite pentru terapia bazată pe celule alogene. În al doilea rând, celule mezenchimale de origine ombilico-placentară (UC-MSCs) au proprietăți imunosupresoare *in vitro* și *in vivo*. Efectul imunosupresiv al UC-MSCs este mediat de factori solubili și contacte intercelulare. PGE₂, galectina-1 și HLA-G₅ sunt eliberate din MSC și servesc drept factori eficienți ai imunosupresiei [234-238].

Sinteza rezultatelor din capitolul 4

La ziua a 48-a scorul plăgilor *pemfigus-like* a scăzut cel mai semnificativ în lotul II, în care au fost administrate celule alogene din măduvă osoasă, constituind $0,67 \pm 0,17\%$, $P > 0,001$; comparativ cu scorul celorlalte loturi de studiu: lotul I ($9,23 \pm 0,37\%$), lotul III ($3,5 \pm 0,18\%$), lotul IV ($1,25 \pm 0,17\%$), lotul V ($8,16 \pm 0,18\%$).

S-a constatat că greutatea corporală, după 48 de zile de tratament, a crescut (scorul greutății corporale) cel mai mult în lotul II ($0,4 \pm 0,087\%$), ($P < 0,001$) comparativ cu celelalte loturi de

cercetare: lotul I ($9,1\pm 0,19\%$), lotul III ($2,03\pm 0,13\%$), lotul IV ($0,67\pm 0,14\%$), lotul V ($1,86\pm 0,25\%$).

Investigarea planimetrică a defectelor cutanate a constatat o diferență statistic semnificativă ($P < 0,001$), între lotul II ($3,38\pm 0,23\%$) și celelalte loturi experimentale: lotul I ($2,7\pm 0,083\%$), lotul III ($5,22\pm 0,3\%$), lotul IV ($5,16\pm 0,46\%$), lotul V ($6,86\pm 0,3\%$). Schimările morfologice microscopice au corelat ce cele macroscopice. Totodată dinamica stării emoționale a animalelor experimentale a fost mai benefică în urma tratamentului cu celule stem osteomedulare.

Investigațiile imunohistochimice cu AE1/AE3 au pus în evidență expresia moderată (++) de colorare a citoplasmei keratinocitelor în epiderm la 34 animale: în urma tratamentului cu celule stem osteomedulare (1×10^6 celule/kg corp/zi) la 16 animale ($10,6\pm 2,5\%$) și cu ciclofosfamidă (40mg/kg corp/zi), din lotul IV la 18 animale ($12,0\pm 2,7\%$). Lotul II a inclus 9 animale ($6,0\pm 1,9\%$), lotul IV - 7 animale ($4,6\pm 1,7\%$), unde am determinat intensitate slabă (+) de colorare a keratinocitelor la nivelul secțiunii cutanate afectate. Lipsa intensității (-) s-a observat la 5 animale din lotul II ($3,3\pm 1,5\%$) și 5 animale din lotul IV ($3,3\pm 1,5\%$). Scăderea reacției de colorare a fost cauzată de epitelizarea leziunilor *pemfigus-like* și a corelat cu rezultatele histologice ale secțiunilor cutanate investigate.

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,

injecând 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. HEBRA, F. *Руководство по изучению болезней кожи (русский перевод)*. Санкт-Петербург: 1876, с. 781.
8. KAPOSI, M. Über den gegenwärtigen Stand der Lehre vom Pemphigus. In: *Arch. f. Dermat. u. Syph.*, 1896, 34, p. 89-92.
9. JEAN, L. Bologna. Pemphigus vulgaris. In: *Dermatology*, 2nd ed, 2008, p. 383-385.
10. THOMAS, K.. *Therapy of Skin Diseases: A Worldwide Perspective on Therapeutic Approaches and Their Molecular Basis*. 1st Edition, 2010. p. 391.
11. *Ghid de diagnostic și tratament pentru pemfigus*. Anexa 24. Ordinul nr.1218/2010 privind aprobarea Ghidurilor de practică medicală pentru specialitatea dermatovenerologie. Ministerul Sănătății României, 2010. 31 p.
12. LANGAN, S. Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris-incidence and mortality in the UK: population based cohort study. *Centre of Evidence-based Dermatology, University of Nottingham, Queen's Medical Centre, Nottingham NG7 2UH*. In: *BMJ*, 2008; 337 (7662). p. 160-163.
13. MACAGONOVA, O., MUȘET GH., NACU V. ș. a. Schimbări clinico-morfologice în pemfigus vulgar (caz clinic). În: *Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină*, 2013, 4(49), p. 44-47.
14. MACAGONOVA, O., MUȘET GH., COCIUG A. ș. a. Pemphigus vulgaris as the actual problem in dermatology. În: *Archives of the Balkan Medical Union*, 2013, p. 70-71.
15. *Protocol clinic național*. PCN-239. Pemfigusuri autoimune (profunde și superficiale). Ministerul Sănătății a Republicii Moldova. Chișinău, 2015, p. 6.
16. BASSAM, Z. Pemphigus vulgaris. Treatment and Management. In: *Dermatology*, 2018. Medscape, 2018, p. 365- 378.

17. КИСЕЛЕВА, Е.В. Сравнение дифференцировочных потенциалов фибробластоподобных клеток стромы костного мозга, жировой ткани, волосяного сосочка и фибробластов дермы человека. *Цитология*, 2009, т. 51, ном 1, с. 12.
18. ШАХПАЗЯН, Н.К. Мезенхимальные стволовые клетки из различных тканей человека: биологические свойства, оценка качества и безопасности для клинического применения. В: *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*, 2012, т. 7, ном 1, с. 23-34.
19. SPINEI, L., LOZAN, O., BADAN, V. *Biostatistica*. Chişinău: 2009, 186 p.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.

29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. COLȚOIU, AL., FORSEA, D., MATEESCU, D. ș. a. Pemfigus vulgar. În: *Dematovenerologie*. Editura didactică și pedagogică, R.A. București: 1993. p. 19-36.
33. WHITTOCK, N.V., ASHTON, G.H., DOPPING-HEPENSTAL, P.J. et al. Striate palmoplantar keratoderma resulting from desmoplakin haploinsufficiency. In: *J Invest Dermatol*, 1999, 113: 940-6.
34. DÉDÉE, M. AutoImmune Blistering Disease Part I, An Issue of Dermatologic Clinics, 2011, 192 p.
35. MARIA DE FALCO, MICHELE, M. PISANO, ANTONIO DE LUCA. Embryology and Anatomy of the Skin, 2013, p. 1-15.
36. VISSCHER, M., NAREDAN, V. The ontogeny of Skin. In: *Adv. Wound (New Rochelle)*, 2014, 1; 3 (4), p. 291-303.
37. KASUYA, A. Attempts to accelerate wound healing. In: *Journal of Dermatological Science – Elsevier Ltd*, 2014, no 76, p. 169- 172.
38. GOMATHYSANKAR, S. Proliferation of Keratinocytes Induced by Adipose Derived Stem Cells on a Chitosan Scaffold and Its Role in Wound Healing. In: *Archives of Plastic Surgery*, 2014, no 41, p. 452-457.
39. MAKOTO, T., WENDY, L., MAYUMI, I. Wound Healing and Skin Regeneration. In: *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015; 5(1): a023267.
40. LAI-CHEONG, J.E., ARITA, K., MCGRATH, J.A. Genetic diseases of junctions. In: *J Invest Dermatol*. 2007; 127: 2713-25.
41. ODLAND, G. The fine structure of the interrelationship of cells in the human epidermis. In: *J Biophys Biochem Cytol.*, 1958, 4: 529-38.
42. FARQUHAR, M., PALADE, G.E. Junctional complexes in various epithelia. In: *J Cell Biol.*, 1963:17:375-412.

43. COWLEY, C., SIMRAK, D., MARSDEN, M.D. ET AL. A yac contig joining the desmocollin and desmoglein loci on human chromosome 18 and ordering of the desmocollin genes. In: *Genomics*, 1997, 42: 208-16.
44. KOTTKE, M., DELVA, E., KOWALCZYK, A.P. The desmosome: Cell science lessons from human diseases. In: *J Cell Sci*, 2006, 119: 797-806.
45. SHAMIM, T., VARGHESE, V.I., SHAMEENA, P.M. et al. Pemphigus vulgaris in oral cavity: Clinical analysis of 71 cases. In: *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2008, 13: E 622–6.
46. KLJUIC, A., BAZZI, H., SUNDBERG, J.P. et al. Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal adhesion; evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris. In: *Cell*, 2003, 113: 249-60.
47. GARROD, D. Desmosomes *in vivo*. In: *Dermatology Research and Practice, Hindawi Publishing Corporation*, 2010, ID 212439.
48. BAICAN, C., BAICAN, A., MAIER, N. Implicatiile desmozomilor în bolile cutanate. In: *DermatoVenerol din Cluj-Napoca*, 2010, 56, p. 53.
49. MATHUR, M., GOODWIN, L., COWIN, P. Interactions of the cytoplasmic domain of the desmosomal cadherin Dsg1 with plakoglobin. In: *J Biol Chem*, 1994, 269: 14075-080.
50. ROH, J., STANLEY, J.R. Plakoglobin binding by human Dsg3 (pemphigus vulgaris antigen) in keratinocytes requires the cadherin-like intracytoplasmic segment. In: *J Invest Dermatol*, 1995; 104: 720-4.
51. HOLTTHOFER, B. WINDOFFER, R., TROYANOVSKY, S. Structure and function of desmosomes. In: *Int Rev Cytol.*, 2007, 264: 65-163.
52. GARROD, D., CHIDGEY, M. Desmosome structure, composition and function. In: *Bioch biophys Acta*, 2008, 1778:572-87.
53. PEIFER, M., MCCREA, P.D., GREEN, K.J. et al. The vertebrate adhesive junction proteins beta-catenin and plakoglobin and the Drosophila segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties. In: *J Cell Biol.*, 1992, 118: 681-91.
54. HUBER, A., NELSON, W.J., WEIS, W.L. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. In: *Cell*, 1997; 90: 871-82.
55. KOWALCZYK, A., BORNSLAEGER, E.A., BORGWARDT, J.E. et al. The amino-terminal domain of desmoplakin binds to plakoglobin and clusters desmosomal cadherin-plakoglobin complexes. In: *J Biol.*, 1997, 139: 773-84.
56. BORNSLAEGER, E., GODSEL, L.M., CORCORAN, C.M. et al. Plakophilin 1 interferes with plakoglobin binding to desmoplakin, yet together with plakoglobin promotes clustering of desmosomal plaque complexes at cell-cell borders. In: *J Cell Biol.*, 2001; 114: 727-38.

57. HATZFELD, M. Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesions? In: *Biochim Biophys Acta*, 2007, p. 69-77.
58. KEIL, R., WOLF, A., HUTTELMAIER, S. et al. Beyond regulation of cell adhesion: local control of RhoA at the cleavage furrow by the p0071catenin. In: *Cell Cycle*, 2007; 6: 122-7.
59. ABERLE, H., BIERKAMP, C., TORCHARD, D. et al. The human plakoglobin gene localizes on chromosome 17q21 and is subjected to loss of heterozygosity in breast and ovarian cancers. In: *Acad Proc Natl Sci USA*, 1995, 92: 6384-8.
60. BONNE, S., VAN HENGEL, J., VAN ROY, F. Chromosomal mapping of human armadillo genes belonging to the p120(ctn)/plakophilin subfamily. In: *Genomics*, 1998; 51: 452-4.
61. GREEN, K.J., GETSIOS, S., TROYANOVSKY, S. et al. Intercellular junction assembly, dynamics and homeostasis. In: *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2009, 1: a000125.
62. BASS-ZUBEK, A., HOBBS, R.P., AMARGO, E.V. et al. Plakophilin 2, a critical scaffold for PKC alpha that regulates intercellular junction assembly. In: *J Cell Biol.*, 2008;, 181: 605-13.
63. ARMSTRONG, D., MCKENNA, K.E., PURKIS, P.E. et al. Haploinsufficiency of desmoplakin causes a striate subtype of palmoplantar keratoderma. In: *Hum Mol Genet.*, 1999; 8: 143-8.
64. PISANTI, S., SHARAV, Y., KAUFMAN, E., POSNER, L. Pemphigus vulgaris: incidence in Jews of different ethnic groups, according to age, sex, and initial lesion. In: *Oral Surg.*, 1974, 38:382-7.
65. MAHONEY, M., WANG, Z., ROTHENBERGER, K. et al. Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. In: *J Clin Invest.*, 1999, 103: 461-8.
66. AMAGAI, M., TSUNODA, K., ZILLIKENS, D. et al. The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. In: *J Am Acad Dermatol.*, 1999, 40: 167-70.
67. UDEY, M.C., STANLEY, J.R. Pemphigus – diseases of antidesmosomal autoimmunity. In: *JAMA*, 1999, 282; 6: 572-6.
68. KALANTARI-DEHAGHI, M., ANHALT, G.J., CAMILLERI, M.J. et al. Pemphigus vulgaris autoantibody profiling by proteomic technique. In: *PLoS One*, 2013, 8(3):e57587. doi: 10.1371/journal.pone.0057587.
69. JAMORA, M., JIAO, D., BYSTRYN, J.C. Antibodies to desmoglein 1 and 3, and the clinical phenotype of pemphigus vulgaris. In: *J Am Acad Dermatol.*, 2003, 48: 976-7. 61.
70. DELVA, E., TUCKER, D.K., KOWALCZYK, A.P. The desmosome. In: *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2009; 1: a002543.

71. DESAI, B., HARMON, R.M., GREEN, K.J. Desmosomes at a glance. In: *J Cell Sci*, 2009, 122: 4401-7.
72. JACOBSON, D.L, GANGE, S.J., ROSE, N.R. et al. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. In: *Clin Immunol Immunopathol*, 1997, 84(3): 223-43.
73. BAICAN, A., BAICAN, C., CHIRIAC, G. et al. Pemphigus vulgaris is the most common autoimmune bullous disease in Northwestern Romania. In: *Int J Dermatol*, 2010; 49: 768-74.
74. ISHII, K., AMAGAI, M., HALL, R.P. et al. Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assays with baculovirus-expressed recombinant proteins. In: *J Immunol*, 1997; 159: 2010-17.
75. CHOWDHURY, M.M.U., NATARAJAN, S. Neonatal pemphigus associated with mild oral pemphigus vulgaris in the mother during pregnancy. In: *Br J Dermatol*, 1998, 139: 500-3.
76. ANHALT, G.J, LABIB, R.S., VOORHEES, J.J. et al. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. In: *N Engl J Med*, 1982, 306: 1189-96.
77. AMAGAI, M., HASHIMOTO, T., SHIMIZU, N. et al. Absorption of pathogenic autoantibodies by the extracellular domain of pemphigus vulgaris antigen (Dsg3) produced by baculovirus. In: *J Clin Invest*, 1994, 94: 59-67.
78. AMAGAI, M., HASHIMOTO, T., GREEN, K.J. et al. Antigen-specific immunoabsorption of pathogenic autoantibodies in pemphigus foliaceus. In: *J Invest Dermatol*, 1995, 104: 895-901.
79. STANLEY, J.R., AMAGAI, M. Pemphigus, bullous impetigo, and the staphylococcal scalded-skin syndrome. In: *N Engl J Med*, 2006, 355: 1800-10.
80. AMAGAI, M. Autoimmune and infectious skin diseases that target desmogleins. In: *Proc Jpn Acad*, 2010, 86: 524-36.
81. WHITTOCK, N., ASHTON, G.H., DOPPING-HEPENSTAL, P.J. et al. Striate palmoplantar keratoderma resulting from desmoplakin haploinsufficiency. In: *J Invest Dermatol*, 1999, 113: 940-6.
82. MILINGOU, M., WOOD, P., MASOUYE, I. et al. Focal palmoplantar keratoderma caused by an autosomal dominant inherited mutation in the desmoglein 1 gene. In: *Dermatology*, 2006; 212: 117-122.
83. MCGRATH, J., MCMILLAN, J.R., SHEMANKO, C.S. et al. Mutations in the plakophilin 1 gene result in ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome. In: *Nat Gen*, 1997, 17: 240-4.
84. JONKMAN, M., PASMOOIJ, A.M.G., PASMANS, S.G. et al. Loss of desmoplakin tail causes lethal acantholytic epidermolysis bullosa. In: *Am J Hum Gen*, 2005, 77: 4, 653-60.

- 85.** KLJUIC, A., BAZZI, H., SUNDBERG, J.P. et al. Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal adhesion: evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris. In: *Cell*, 2003, 113: 249-60.
- 86.** ASIMAKI, A., SYRRIS, P., WICHTER, T. et al. A novel dominant mutation in plakoglobin causes arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. In: *Am J Hum Genet*, 2007, 81: 964-973.
- 87.** СКРИПКИНА, Ю. К., БУТОВА, Ю.С., ИВАНОВА, О.Л. В: *Дерматовенерология: нац. рук.*. Москва, 2013, p. 82-83.
- 88.** МАХНЕВА, Н. В., БЕЛЕЦКАЯ, Л. В. В: Иммунопатологические аспекты аутоиммунных буллезных дерматозов. In: *Palmarium Academic Publishing*, 2012. 416 с.
- 89.** GRANDO, S.A., GLUKHENKY, B.T., DRANNIKET, G.N. Pemphigus and pemphigoid epidermocytes interfere with interleukin cascade reactions. In: *J Clin. Lab. Immunol.*, 1990, 32:/37.
- 90.** D'AURIA, L., BONIFATI, C., MUSSI, A. Cytokines in the sera of patients with pemphigus vulgaris: IL6 and TNF alfa levels are significantly increased as compared to healthy subjects and correlate with disease activity. In: *Eur. Cytokine Netw.*, 1997. 8:383.
- 91.** BARONI, A., PERFETTO, B., RUOCCO, E. et al. Cytokine pattern in blister fluid and sera of patients with pemphigus. In: *Dermatology*, 2002, 205:1/6.
- 92.** FELICIANI, C., TOTO, P., AMERIO, P. et al. Immune modulation in pemphigus vulgaris: role for CD28 and IL-10. In: *J Immunol.*, 2000, 164:522.
- 93.** PEREIRA, N.F., HANSEN, J.A., LIN, M.T. et al. Cytokine gene polymorphisms in endemic pemphigus foliaceus: a possible role for IL6 variants. In: *Cytokine*, 2004, 28:233.
- 94.** ROXO, V., PEREIRA, N.F., PAVONI, D.P. et al.. Polymorphisms within the tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha genes and endemic pemphigus foliaceus - are there any associations? In: *Tissue Antigen*, 2003, 62:394.
- 95.** CAPRONI, M., GIOMI, B., CARDINALI, C. et al. Further support for a role Th2-like cytokines in blister formation of pemphigus. In: *Clin. Immunol.*, 2001, 98:264.
- 96.** FELICIANI, C., TOTO, P., MOHAMMAD, P.S. et al. A th2-like cytokine response is involved in bullous pemphigoid, the role of IL4 and Il5 in the pathogenesis of the disease. In: *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 1999, 12:55.
- 97.** KATZ, Y., STRUNK, R.C. IL-1 and tumor necrosis factor: similarities and differences in simulation of expression of alternative pathway of complement and IFN- β /il-6 genes in human fibroblasts. In: *J. Immunol.*, 1989, 142:3862.

- 98.** TERUI, T., ISHII, K., OZAWA, M., et al. C3 production of cultured human epidermal keratinocytes is enhanced by IFN γ and TNF α through different pathways. In: *J. Invest. Dermatol.*, 1997, 108:62.
- 99.** FELICIANI, C., TOTO, P., AMERIO, P. et al.. *In vitro* C3 mRNA expression in pemphigus vulgaris: complement activation is increased by IL-1 alpha and TNF-alpha. In: *J. Cut. Med. Sur.*, 1999, 3:140.
- 100.** FELICIANI, C., TOTO, P., WANG, B. et al. Urokinase plasminogen activator mRNA is induced by IL-1 alpha and TNF alpha in vitro acantholysis. In: *Exp. Dermatol.*, 2003, 12:466.
- 101.** FELICIANI, C., TOTO, P., AMERIO, P. et al. *In vitro* and *in vivo* expression of IL-1 alpha and TNF alpha mRNA in pemphigus vulgaris: IL1 alpha and TNF alpha are involved in acantholysis. In: *J. Invest. Dermatol.*, 2000, 11:71.
- 102.** SAR-POMIAN, M., LIDIA, R., MLAGORZATA, P. The Significance of Scalp Involvement in Pemphigus: A literature Review. In: *Biomed Research International*, 2018, p. 1-8.
- 103.** DING, X., AOKI, J., MASCARO, JR.. Mucosa and mucocutaneous (generalized) pemphigus vulgaris show distinct autoantibody profiles. In: *Journal of Investigative Dermatology*, 1997, vol. 109, p.592-596.
- 104.** WU, H., STANLEY, J. R., COTSARELIS, G. Desmoglein isotype expression in the hair follicle and its cysts correlates with type of keratinization and degree of differentiation. In: *Journal of Investigative Dermatology*, 2003, vol. 120, no 6, p. 1052–1057.
- 105.** ESMAILI, N., CHAMS-DAVATCHI, C., VALIKHANI, M. et al. Pemphigus vulgaris in Iran: A clinical study of 140 cases. In: *International Journal of Dermatology*, 2007, vol. 46, no 11, p. 1166–1170.
- 106.** BAZZI, H., GETZ, A., MAHONEY, M.G. et al. Desmoglein 4 is expressed in highly differentiated keratinocytes and trichocytes in human epidermis and hair follicle. In: *Differentiation*, 2006, vol. 74, no 2-3, p. 129–140.
- 107.** VERAITCH, O., OHYAMA, J., YAMAGAMI, J. Alopecia as a rare but distinct manifestation of pemphigus vulgaris. In: *Journal of the European Academy of Dermatology and Venerology*, 2013, vol 27, no 1, p.86-91.
- 108.** YOSHIDA, K., ISHII, K., ISHIKO, A. Alopecia developed in a transitional case from pemphigus foliaceus to pemphigus vulgaris. In: *The Journal of Dermatology*, 2017.
- 109.** SAR-POMIAN, M., CZUWARA, J., RUDNICKA, L., et al. Miniaturization of sebaceous glands: A novel histopathological finding in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus of the scalp. In: *Journal of Cutaneous Pathology*, 2017, vol. 44, no 10, p. 835–842.

- 110.** PETER, J. K., MAHONEY, M. G., GEORGE, C. et al. Desmoglein 3 anchors telogen hair in the follicle. In: *Journal of Cell Science* 111, 1998, p. 2529-2537.
- 111.** KOTNIK, V. Complement in skin diseases. In: *Acta Dermatoven APA*, 2011, vol. 20, , no 1, p. 4-5.
- 112.** MULLER-EBERHA, H.J. Chemistry and reaction mechanisms of complement. In: *Adv Immunol.*, 1968, 8: 1, p 80.
- 113.** RUDDY, S., GIGLI, I., AUSTEN, K.F. The complement system of man. In: *N Engl J. M.* 1972, 287, p. 489- 494.
- 114.** БРАУН, Э.Д., ДЖОЙНЕР, К.А., ФРАНК, М.М. Комплимент. В: *Иммунология*. Под ред. У. Пола-М, 1989, т.3. с. 89-125.
- 115.** СОКОЛОВ, Е.И. Клиническая иммунология. 1988, 45 с.
- 116.** CRAM D.L. Fukuyama. Immunochemistry of ultraviolet-induced pemphigus and pemphigoid lesions. In: *Arch Dermatol.*, 1972,106:819- 824,
- 117.** VAN JOOST, T., CORMANE, R.H., PONDMAN, K.W. Direct immunofluorescent study of the skin on occurrence of complement in pemphigus. In: *Br J Dermatol*, 1972, 87:466.
- 118.** KAWANA, S, GEOGHEGAN, W.D, JORDON, R.E. Complement fixation by pemphigus antibody. Complement enhanced detachment of epidermal cells. In: *Clin Exp Immunol*, 1985, 61(3):517-25.
- 119.** PEIZHEN, X., ROBERT, E. JORDON, WILLIAM, D. GEOGHEGAN. Complement Fixation by Pemphigus Antibody. In: *J Clin Invest.*, 1988; 82(6):1939-1947
- 120.** KAWANA, S., GEOGHEGAN, W.D., JORDON, R.E. et al. Deposition of the membrane attack complex of complement in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus skin. In: *J Invest Dermatol*, 1989;92(4):588-92.
- 121.** BIESECKER, G., MÜLLER-EBERHARD, H.J. The membrane attack complex. In: *J. Immunol*, 1980; 7(2-3):93–141.
- 122.** DIAZ-PREZ, J.L., JORDON, R.E. The complement system in bullous pemphigoid. In: *Clinical Immunol., immunopathol.*, 1978, 5; 560.
- 123.** KAWANA, S., JANSON, M., JORDON, R.E. Complement fixation by pemphigus antibody. I. In vitro fixation to organ and tissue culture skin. In: *J Invest Dermatol*, 1984; 82(5):506-10.
- 124.** REID, K.B. Proteins involved in the activation and control of the two pathways of human complement. *Biochem Soc Trans.* 1983 Jan;11(1):1-12.
- 125.** ROBERT, E., JORDON, M.D. Complement activation in bullous skin diseases. In: *The Journal of Investigative Dermatology*, 1975, 65:162-169.

- 126.** TAKASHI, H., MAKOTO, S., SEILCHI, K. et al. *In vitro* complement activation by intercellular antibodies. In: *J Invest Dermatol.*, 1982, vol. 78, no 4 .78:316-318.
- 127.** Ogawa T., McGhee M.L., Moldoveanu Z. Production of epidermal acantholysis in normal human skin in vitro by the IgG fraction from pemphigus serum. In: *Clin Exp Immunol.*, 1989, 76(1):103-10.
- 128.** SINGER, K.H., HASHIMOTO, K., LAZARUS, G.S. Antibody-induced proteinase activation: a proposed mechanism for pemphigus. In: *Springer Semin Immunopathol*, 1981, 4(1):17-32.
- 129.** DOUBLEDAY, C.W., GEOGHEGAN, W.D., JORDON, R.E. Complement fixation by pemphigus antibody. In: *J Lab Clin Med.*, 1988;111(1):28-34.
- 130.** МАХНЕВА, Н.В. Роль сывороточного С3 компонента комплемента в развитии аутоиммунной пузырчатки. В: *Аллергология и иммунология*, 2013, т. 14, ном 1, с. 36.
- 131.** МАХНЕВА, Н.В. Роль гистоиммунологических барьеров и триггерных факторов в развитии аутоиммунной пузырчатки. В: *Сборник статей "Актуальные вопросы дерматовенерологии и дерматоонкологии"*, 2013, с. 13-14.
- 132.** МАХНЕВА, Н.В. Диагностика аутоиммунных буллезных дерматозов с помощью методов иммунофлюоресценции. В: *Методические рекомендации, Москва*, 2012, 17 с.
- 133.** МАХНЕВА, N.V. The role of serum C3 component of complement in the development of auto-immune pemphigus In: *International journal of immunorehabilitation*, 2013, vol. 14. ном 1. p. 51.
- 134.** CAMPO-VOEGELI, A., MUÑIZ, F., MASCARÓ, J.M. et al. Neonatal pemphigus vulgaris with extensive mucocutaneous lesions from a mother with oral pemphigus vulgaris. In: *Br J Dermatol.*, 2002;147(4):801-5.
- 135.** МАХНЕВА Н.В. Гуморальный ответ при аутоиммунной пузырчатке В: *Аллергология и иммунология*, 2012, т. 13, ном. 1, с. 34.
- 136.** МАХНЕВА, Н. В., БЕЛЕЦКАЯ, Л. В. Иммунопатологические аспекты аутоиммунных буллезных дерматозов. В: *Palmarium Academic Publishing*, 2012, 416 с.
- 137.** BEUTNER, E.H., JORDON, R.E., CHORZELSKI, T.P. The immunopathology of pemphigus and bullous pemphigoid. In: *J Invest Dermatol*, 1968, 51:63-80.
- 138.** JORDON, R.E., DAY, N.K., LUCKASEN, J.R., et al. Complement activation in pemphigus vulgaris blister fluid. In: *Clin Exp Immunol*, 1973, 15:53-63.
- 139.** BROOKS, W.S., LEE, Y.Y., ABEL, E. et al. Comparison of IgG subclass and complement fixing activity of antibodies from patients with bullous pemphigoid and pemphigus . In: *J. Clin. Anals*, 1989, p. 307-311.

- 140.** VAILANT, L, BERNARD, P, JOLY, P, et al. Evaluation of clinical criteria for diagnosis of bullous pemphigoid. In: *Arch. Dermatol*, 1998; 134: 1,74-80.
- 141.** AOKI-OTA, M., TSUNODA, K., OTA, T. et. al. A mouse model of pemphigus vulgaris by adoptive transfer of naive splenocytes from desmoglein 3 knockout mice. In: *Br. J. Dermatol*, 2004. 151: 346-354.
- 142.** RALF, J.L, KAREN, V., FRANK, L. Mechanisms of Autoantibody-Induced Pathology. In: *Front Immunol*, 2017; 8: 603.
- 143.** AMAGAI, M. Use of autoantigen-knockout mice in developing an active autoimmune disease model for pemphigus. In: *J Clin Invest*, 2000; 105 (5):625-31.
- 144.** ANHALT, G.J., LABIB, R.S., VOORHEES, J.J., et al. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. In: *N. Engl. J. Med*, 1982; 306: 11.89-1.196.
- 145.** BEUTNER, E.H. Demonstration of skin antibodies in sera of pemphigus vulgaris patients by indirect immunofluorescent staining. In: *Proc Soc Exp Biol Med*, 1964;117:505-10.
- 146.** BUSCHARD, K. A model for the study of autoimmune diseases applied to pemphigus: transplants of human oral mucosa to athymic nude mice binds pemphigus antibodies *in vivo*. In: *J Invest Dermatol*, 1981;76(3):171-3.
- 147.** TAKAHASHI, Y. Experimentally induced pemphigus vulgaris in neonatal BALB/c mice: a time-course study of clinical, immunologic, ultrastructural, and cytochemical changes. In: *J Invest Dermatol*, 1985;84(1): 41-6.
- 148.** KATJA, B. Animals model for autoimmune bullous dermatoses. Lubeck, 2009 (citat 15.03.2017). Disponibil: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2009.00948.x>
- 149.** LOUIS-MARIE, H. The Mouse as an Animal Model for Human Diseases. In: *Biologie du Développement et Reproduction, Cellulaire et Moleculaire*, 2004, p. 97–110.
- 150.** OHYAMA, M. Immunologic and histopathologic characterization of active disease model mouse for pemphigus vulgaris. In: *Journal of Investigative Dermatology*, 2002: 118 / 1 , 199-204.
- 151.** STANLEY, J.R. Pemphigus antibodies identify a cell surface glycoprotein synthesized by human and mouse keratinocytes. In: *J Clin Invest*, 1982; 70 (2): 281-8.
- 152.** TAKAE, Y. Pemphigus mouse model as a tool to evaluate various immunosuppressive therapies. In: *Exp Dermatol*, 2009;18(3): 252-60.
- 153.** PETER, J. G., AND THEODOR, M. I. Experimental production in rabbits of antiepithelial autoantibodies. In: *The journal of investioatjve dermatology*, 1967, vol. 49, no 6, p. 637-641.
- 154.** ABLIN, R.J. Immunopathologic studies of experimental pemphigus-like autoantibodies and bullous-like lesions. In: *The journal op investigative dermatology*, 1969, vol. 53, no 6, p. 463-469.

- 155.** SU-YU, S. Author links open the author workspace. Isolation and Characterization of Antigens Reactive with Pemphigus Antibodies. In: *Journal of Investigative Dermatology*, 1973, vol. 61, Issue 5, p. 270-276.
- 156.** TOUITOU, Y., PORTALUPPI, F., SMOLENSKY, M.H., et al. Ethical principles and standards for the conduct of human and animal biological rhythm research. In: *Chronobiol Int.*, 2004 Jan;21(1):161-70.
- 157.** MACAGONOVA, O. Modelarea pemfigusului vulgar pe animale experimentale. In: *Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină*, 2013, 4(49), ISSN 1729-8687, p.70-73.
- 158.** MACAGONOVA, O., MUSET, G.H., NACU, V. ș. a. Metoda de modelare a leziunilor de tipul pemfigusului vulgar. In: *Curier medical*, 2016, vol. 59, no 3, p. 72-73.
- 159.** MACAGONOVA, O., MUSET, G.H., NACU, V. ș. a. Modelarea leziunilor de pemfigus vulgar la șobolanii de laborator. În: *Culegere de rezumate științifice ale studenților, rezidenților și tinerilor cercetători, IP Universitatea de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu", Chișinău*, 2015, p. 64.
- 160.** MACAGONOVA, O., MUSET, G.H., COCIUG, A. ș. a. Studiile asupra leziunilor cutanate produse de antigenul din mucoasa esofagului bovin reactiv cu anticorpii al pemfigusului. In: *Revista Societății Române de Dermatologie*, 2016, vol. 61, supliment. p. 129-130.
- 161.** MACAGONOVA, O., MUSET, G.H., COCIUG, A. ș. a. 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*, 2018, p. 46.
- 162.** BEUTNER, E.H., LEVER, W.F., WITEBSK, E. et al. Autoantibodies in pemphigus vulgaris. In: *JAMA*, 1965, 192: 682.
- 163.** EYRE, R.W., STANLEY, J.R. Identification of pemphigus vulgaris antigen extracted from normal human epidermis and comparison with pemphigus foliaceus antigen. In: *J Clin Invest*, 1988;81(3):807–812.
- 164.** BERNARD, P. Recent advances on the 180-kDa epidermal antigen in autoimmune subepidermal bullous skin diseases. In: *Springer Semin Immunopathol.*, 1992;13(3-4):401-12.
- 165.** KABAT, E.A., MAYER, U. M.: Experimental Immunochemistry. In: *Immunology*, 1960, vol.4, p. 21.
- 166.** CHARLES, C.T., SPRINGFIELD, I.I., MARSHALL, J.D. et al. Superiority of fluorescein isothio- cyanate for fluorescent antibody technic with a modification of its application. In: *Proc. Soc. Exp. Biol. MeD.*, 1958, 98: 898.
- 167.** SCHEIDEGGER, J.J. Une micromethode de l'im- muno-electrophorese. In: *Tnt. Arch. Allergy*, 1955, 111: 785, 1960.

- 168.** COONS, A.H., KAPLAN, M. H. Localization of antigen in tissue cells. In: *J. Exp. Med.*, 1950, 91: 1,
- 169.** BEUTNER, E.H., JORDAN, R.E., CHORZELSKI, T.P. The immunopathology of pemphigus and bullous pemphigoid. In: *J. Invest. Derm.*, 1968, 51: 63,.
- 170.** JORDAN, R.E., BEUTNER, E.H., WITEBSKY, E.B. et al. Basement zone antibodies in bullous pemphigoid. In: *J. A. M. A.*, 1967, 200: 751.
- 171.** CHORZELSKI, T.P., VON WEISS, J., LEVER, W.F. Clinical significance of autoantibodies in pemphigus. In: *Arch. Derm.*, 1966, 93: 570.
- 172.** CHORZELSKI, T.P., JABLONSKA, S., BLASZCZYK, M. Autoantibodies in pemphigus. In: *Acta Dermatovener.*, 1966, 107:809.
- 173.** BEUTNER, E.H., RHODES, E.L., HOLBOROW, E.H. Autoimmunity in chronic bullous diseases. In: *Clin. Exp. Immunol.*, 1967, 2: 141.
- 174.** BEUTNER, E.H., PRIGENZI, L.S., HALE, W. et al. Immunofluorescence studies of autoantibodies to intercellular areas of epithelia in Brazilian pemphigus foliaceus. In: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1968, 127: 81.
- 175.** ABLIN, R.J., BEUTNER, E.H., WITCBSKY, E. Nature of the intercellular antigen. In: 1st Conf. *Immunodermatol. Studies Pemphigus and Pemphigoid. XIII Int. Cong. Dermatol., Munich, Germany*, 1967, 7:75.
- 176.** ABLIN, R.J., BEUTNER, H.H., SIEVENPIPER, T. Antigen(s) of esophageal mucosa reactive with autoantibodies of pemphigus. In: *J. Den. Res.*, 1968, 47(Suppl.): 105.
- 177.** ABLIN, R.J., BEUTNER, E.H. Absorption studies on antigen(s) of esophageal mucosa reactive with autoantibodies of pemphigus. In: *Arch. Allerg. Appl. Immunol.*, 1968, 33: 227.
- 178.** ABLIN, R.J., BRONSON, P., BEUTNER, H.H. Immunochemical characterization of epithelial antigen(s) reactive with pemphigus-like antibodies of rabbit and human pemphigus autoantibodies. In: *J. Hyg. Epidem.*, 1968, 9:79.
- 179.** ABLIN, R.J., BEUTNER, E.H. Experimental production of pemphigus-like antibodies. In: *Clin. Exp. Immunol.*, 1969, 4: 283.
- 180.** INDERBITZEN, T.M., GROB, P.J. Destruction of epithelial cells in vivo by antiepithelial autoantibodies. In: *J. Invest. Derm.*, 1967, 49: 642.
- 181.** RASANEN, O. Antigens of rat and mouse epidermis. In: *Acta Pathol. et Microbiol., Suppl.*, 1968, p. 198.
- 182.** DUMONDE, D.C. Tissue specific antigens. In: *Advances in Immunology*, 1966. p. 245.
- 183.** CHORZELSKI, T., JABLONSKA, S., BLASZCZYK, M. et al. Autoantibodies in pemphigoid. In: *Dermatologica*, 1968, 130: 325.

- 184.** STRAUSS, A.J., VAN DER GELD, H.W., KEMP, P. G. JR., et al. Immunologic concomitants of myasthenia gravis. In: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1965, 124: 744.
- 185.** BEUTNER, E.H., CHORZELSKI, T.P., HALE, W.L. et al. Autoimmunity in a case with concurrent myasthenia gravis and pemphigus erythematosis. In: *J. A. M. A.*, 1968, 203: 10.
- 186.** ABLIN, R.J. Immunopathologic studies of experimental pemphigus-like autoantibodies and bullous-like lesions. In: *The journal of investigative dermatology*, 1969, vol. 53, no 6, p. 463-469.
- 187.** ПЕРМЯКОВ, А.А., ЕЛИСЕЕВА, Е.В., ЮДИЦКИЙ, А.Д., и др. Поведенческие реакции у экспериментальных животных с различной прогностической устойчивостью к стрессу в тесте «открытое поле». В: *Вестник Удмуртского университета*, 2013, ном 6-3, с. 83-90.
- 188.** КУРЬЯНОВА, Е.В., УКАД, А.С., ЖУКОВА, Ю.Д. Половые и типологические различия поведенческой активности нелинейных крыс в тесте «Открытое поле». В: *Современные проблемы науки и образования*, 2013, ном 5, с. 460.
- 189.** БЕССАЛОВА, Е.Ю. Половые и сезонные отличия поведения крыс в «Открытом поле». В: *Світ медицини та біології*, 2011, т. 7, ном 4, с. 12-16.
- 190.** ZEINA, B. Pemphigus Vulgaris. In: *Medscape Reference*, 2018 (vizitat 25.01.2017). Disponibil: <http://emedicine.medscape.com/article/1064187>.
- 191.** BERMAN, K. Pemphigus vulgaris. In: *Medline Plus*, 2016 (citat 25.01.2017). Disponibil: <https://medlineplus.gov/ency/article/000882.htm>
- 192.** GIOVANNI, A., DOMENICO, B., ALBERTA, L. et al. Preliminary data on *Pemphigus vulgaris* treatment by a proteomics-defined peptide: a case report. In: *J Transl Med*, 2006; 4: 43.
- 193.** KING, D.F., HOLUBAR, K. History of pemphigus. In: *Clin Dermatol*, 1983;1(2):6–12.
- 194.** BOISSIER DE SAUVAGES, F. Frateres de Tournes. Management of pemphigus vulgaris. In: *Adv Ther.*, 2016; vol. 1. 33(6):910–58.
- 195.** SANDHYA, T., AVINASH, T., DAIVAT, M. Pemphigus vulgaris. In: *Contemp Clin Dent.*, 2011; 2(2): 134–137.
- 196.** STAHNLEY, J.R.. Pathophysiology and Therapy in the 21st century. In: *J.Dermatol.*, 2001, 28: 645-646.
- 197.** SULIMAN, N.M., ÅSTRÖM, A.N., ALI, R.W. et al. Clinical and histological characterization of oral pemphigus lesions in patients with skin diseases: a cross sectional study from Sudan. In: *BMC Oral Health*, 2013; 13: 66.
- 198.** JORDON, R.E., DAY, N.K., SAMS, W.M. JR., GOOD, R.A. The complement system in bullous pemphigoid. I. Complement and component levels in sera and blister fluids. In: *J Clin Invest*, 1973; 52(5): 1207–1214.

- 199.** AMAGAI, M., NISHIKAWA, T., NOUSARI, H.C. et al. Antibodies against desmoglein 3 (pemphigus vulgaris antigen) are present in sera from patients with paraneoplastic pemphigus and cause acantholysis in vivo in neonatal mice. In: *J Clin Invest*, 1998, 102:775–782 76.
- 200.** AMAGAI, M., KOCH, P.J., NISHIKAWA, T. et al. Pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) is localized in the lower epidermis, the site of blister formation in patients. In: *J Invest Dermatol*, 1996, 106: 351–355.
- 201.** AMAGAI, M. Adhesion molecules I: Keratinocyte-keratinocyte interactions; cadherins and pemphigus. In: *J Invest Dermatol*, 1995, 104:146–152.
- 202.** AMAGAI, M. Autoimmunity against desmosomal cadherins in pemphigus. In: *J Dermatol Sci*, 1999, 20: 92–102.
- 203.** KRIDIN, K. Emerging treatment options for the management of pemphigus vulgaris. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 2018; (citat 25.01.2017)14:757-778. Disponibil: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5931200/>.
- 204.** BRENTANI, M.M., BUTUGAN, O., OSHIMA, C.T. et al. Multiple steroid receptors in nasopharyngeal angiofibromas. In: *Laryngoscope*, 1989; 99(4): 398–401. 15.
- 205.** VELDMAN, C., PAHL, A., HERTL, M. Desmoglein 3-specific T regulatory 1 cells consist of two subpopulations with differential expression of the transcription factor Foxp3. In: *Immunology*, 2009, 127: 40-49.
- 206.** MIZUNO, H., NAKANISHI, Y., ISHII, N. et al. A signature-based method for indexing cell cycle phase distribution from microarray profiles. In: *BMC Genomics*, 2009; 10:137.
- 207.** VIJAYA, V., MYSOREKAR, T.K., SUMATHY, A.L. et al. Role of direct immunofluorescence in dermatological disorders. In: *Indian Dermatol Online J*. 2015 May-Jun; 6(3): 172–180.
- 208.** KING, I.A., SULLIVAN, K.H., BENNETT, R. JR. The desmocollins of human foreskin epidermis: identification and chromosomal assignment of a third gene and expression patterns of the three isoforms. In: *J Invest Dermatol*, 1995, 105: 314–321.
- 209.** CHRISTOPH, T., ELLEBRECHT, S., AIMEE, S. Setting the target for pemphigus vulgaris therapy. In: *JCI Insight.*, 2017; 2(5): e92021.
- 210.** RA, J.C., KANG, S.K., SHIN, I.S. et al. Stem cell treatment for patients with autoimmune disease by systemic infusion of culture-expanded autologous adipose tissue derived mesenchymal stem cells. In: *J Transl Med*, 2011; 9(1): 181.
- 211.** HAITAO, J., LINLIN, Q., RONGRONG, D. et al. Potential Role of Mesenchymal Stem Cells in Alleviating Intestinal Ischemia/Reperfusion Impairment. In: *PLoS One*, 2013; 8(9): e74468.

- 212.** FLAVIO, A., CARRION, E., FERNANDO, E. Mesenchymal stem cells for the treatment of systemic lupus erythematosus: is the cure for connective tissue diseases within connective tissue? In: *Stem Cell Res Ther.*, 2011; 2(3): 23.
- 213.** MICHAEL, S.D. Human umbilical cord mesenchymal stromal cells in regenerative medicine. In: *Stem Cell Res Ther.*, 2013; 4(6): 142.
- 214.** CHAMBERLAIN, G., FOX, J., ASHTON, B. et al. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. In: *Stem Cells*, 2007; 25: 2739–2749.
- 215.** GHANNAM, S., BOUFFI, C., DJOUAD, F. et al. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. In: *Stem Cell Res Ther.*, 2010; 1(1):2.
- 216.** WATERMAN, R.S., TOMCHUCK, S.L., HENKLE, S.L. et al. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. In: *PLoS One*, 2010; 5(4): e10088.
- 217.** RAFAEL, A.L., PEDRO, M. MORAES-VIEIRA, ÊNIO, J.B. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Increase Skin Allograft Survival and Inhibit Th-17 Immune Response. In: *PLoS One*, 2013. (citat 26.01.2017). Ddisponibil: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076396>.
- 218.** CHOI, E.W., SHIN, I.S., LEE, H.W. et al. Transplantation of CTLA4Ig gene-transduced adipose tissue derived mesenchymal stem cells reduces inflammatory immune response and improves Th1/Th2 balance in experimental autoimmune thyroiditis. In: *J Gene Med.*, 2011; 13(1): 3–16.
- 219.** EL-BADRI, N.S., WANG, B.Y., STEELE, A. et al. Successful prevention of autoimmune disease by transplantation of adequate number of fully allogeneic hematopoietic stem cells. In: *Transplantation*. 2000; 70: 870–7.
- 220.** SAKIC, B., SZECHTMAN, H., DENBURG, S.D. et al. Immunosuppressive treatment prevents behavioral deficit in autoimmune MRL-lpr mice. In: *Physiol Behav*, 1995; 58: 797–802.
- 221.** SHIRAKI, M., FUJIWARA, M., TOMURA, S. Long term administration of cyclophosphamide in MRL / 1 mice. I. The effects on the development of immunological abnormalities and lupus nephritis. In: *Clin Exp Immunol*, 1984; 55: 333–339.
- 222.** TSUKAMOTO, H, NAGAFUJI, K, HORIUCHI, T, MIYAMOTO, T, AOKI, K, TAKASE, K, et al. A phase I-II trial of autologous peripheral blood stem cell transplantation in the treatment of refractory autoimmune disease. In: *Ann Rheum Dis*, 2006; 65: 508-51.
- 223.** SHU, S.A., WANG, J., TAO, M.H. et al. Gene Therapy for Autoimmune Disease. In: *Clin Rev Allergy Immunol.*, 2015; 49(2): 163-76.

- 224.** FRANK, A., JAMES, C., DAVID, W. et al. Gene therapy and bone marrow stem-cell transfer to treat autoimmune disease. In: *Trends in Molecular Medicine*, vol. 15, Issue 8, 2009, p. 344-351.
- 225.** THIVOLET, J. BEYVIN, A.J. Recherche par immunofluorescence d'auto anticorps Sriques vis a vis des constituants de l'epidermo chez les brules. In: *Experientia*, 1968, 24: 945,
- 226.** ABLIN, R. J., MILGROM, F., KANO, K. et al. Pemphigus-like antibodies in patients with skin burns. In: *Vox Sang.*, 1969, 16: 73.
- 227.** JORDAN, R. E., MULLER, S. A., HALE, W. L. et al. Bullous pemphigoid associated with systemic lupus erythematosus. In: *Arch. Derm*, 1969, 99: 17.
- 228.** AITHAL, D., USHA, K., ELIZABETH, J. Role of direct immunofluorescence on Tzanck smears in pemphigus vulgaris. In: *Diagn Cytopathol*, 2007; 35(7):403-7.
- 229.** LIN, M.S., SWARTZ, S.J., LOPEZ, A. et al. Development and characterization of desmoglein-3 specific T-cells from patients with pemphigus vulgaris. In: *J Clin Invest.*, 1997; 99:31-40.
- 230.** IKEHARA, S. Treatment of autoimmune diseases by hematopoietic stem cell transplantation. In: *Exp Hematol.*, 2001; 29:661-9.
- 231.** MACKAY, I.R., ROSEN, F.S. Tolerance and autoimmunity. In: *N Engl J Med.*, 2001;344:655-64.
- 232.** FLAVIO, A., CARRION, F. Mesenchymal stem cells for the treatment of systemic lupus erythematosus: is the cure for connective tissue diseases within connective tissue? In: *Stem Cell Res Ther*, 2011; 2(3): 23.
- 233.** CECELIA, C.Y., MELANIE, R., AUSTIN, N. Multipotent stromal cells/mesenchymal stem cells and fibroblasts combine to minimize skin hypertrophic scarring. In: *Cell Research & Therapy*, 2017, 8:193.
- 234.** WAPPLER, J., RATH, B., LÄUFER, T., HEIDENREICH, A. et al. Eliminating the need of serum testing using low serum culture conditions for human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell expansion. In: *Biomed Eng Online*, 2013; 12:15.
- 235.** NASEF, A., MATHIEU, N., CHAPEL, A. et al. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G. In: *Transplantation*, 2007; 84(2): 231-7.
- 236.** MAUMUS, M., GUÉRIT, D., TOUPET, K. et al. Mesenchymal stem cell-base therapies in regenerative medicine: applications in rheumatology. In: *Stem Cell Res Ther*, 2011, 18; 2(2): 14.
- 237.** ANDREIA, R., PAULA, L., SANDRINE, M. et al. Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells. In: *Stem Cell Res Ther*, 2013; 4(5): 125.

- 238.** LANZA, A., CIRILLO, N., ROSSIELLO, L. Evidence of key role of Cdk2 overexpression in pemphigus vulgaris. In: *J. Biol. Chem.*, 2008, 283: 8736-8745.
- 239.** ARUNA, V., VANIKAR, A. Single-Center Experience. Allogenic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Pemphigus Vulgaris: A Single-Center Experience. In: *Indian Journal of Dermatology*, 2012, 57(1): 9–11.
- 240.** SUSLOVA, I.M, THEODOROPOULOS, D.S. CULLEN, N.A. et al. Pemphigus vulgaris treated with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation following non-myeloablative conditioning. In: *Med Pharmacol Sci.*, 2010; 14(9): 785-8.
- 241.** MENGLEI, W., CAN, C., JING, S. et al. Application of autologous hematopoietic stem cell transplantation for pemphigus. In: *International Journal of Dermatology*, 2017, vol. 56, Issue 3, p. 296–301.
- 242.** SMITH, D.A., AND GERMOLEC, D.R. Introduction to immunology and autoimmunity. In: *Environ Health Perspect*, 1999; 107(Suppl 5): 661–665.
- 243.** MACAGONOVA, O., MUSEI, 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.
- 244.** SUN, L., SUN, J., ZENG, K. et al. Autologous peripheral hematopoietic stem-cell transplantation in a patient with refractory pemphigus. In: *Frontiers of medicine*, 2015, vol. 10, Issue 3, 297:310.
- 245.** VAN, G., CHAUL, FU P., ZHOU XIAOHONG, W. et al. Clinical experience. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells and umbilical cord blood-derived stem cells for the treatment of refractory pemphigus: a case report. In: *Stem Cells Dev.*, 2013; 22(9): 1370–1386.
- 246.** HAN, S.M., KIM, H-T., KIM, K.W. et al. CTLA4 overexpressing adipose tissue-derived mesenchymal stem cell therapy in a dog with steroid-refractory pemphigus foliaceus. In: *BMC Vet Res.*, 2015; 11(1): 49.
- 247.** MINESH, K., HUI, Z., DONGLAI, M. et al. Zoopharmacognosy in Diseased Laboratory Mice: Conflicting Evidence. In: *PLoS One*. 2014; 9(6): e100684.
- 248.** TAGADIUC, O., LÎȘÎ, L.; GAVRILIUC, L. și a. Biochimie. *Ghid pentru lucrări practice pentru studenții facultății Sănătate Publică. Centrul Editorial Poligrafic Medicina*. 2016. p. 46.
- 249.** СТАРОВЕРОВ, С., СИДОРКИН, В., СЕМЕНОВ, С. Изучение адьювантных свойств вододисперсных растворов неионогенных поверхностно-активных веществ и витаминов. В: *Ветеринария*, 2003, ном 10, с. 101.
- 250.** КУДРИН, А.В., СКАЛЬНЫЙ, А.В., ЖАВОРОНКОВ, А.А. и др. *Имунофармакология микроэлементов*, 2000. с. 53.

- 251.** THOMAS, E., ICHIM· PETE O'HEERON· SANTOSH KESARI. Fibroblasts as a practical alternative to mesenchymal stem cells. In: *Journal of Translational Medicine*, 2018, 16:212.
- 252.** RODBELL, M. Metabolism of isolated fat cells. In: *J Biol Chem*, 1966; 241:3909–3917.
- 253.** SOUNDARARAJAN, M., KANNAN, S. Fibroblasts and mesenchymal stem cells: Two sides of the same coin? In: *J Cell Physiol*, 2018; 233(12):9099-9109.
- 254.** ГОСТИЦЕВ, В.К. Учения о ранах. Москва, 2010. (цитат 25.01.2017). Disponibil: <http://woundinfection.ru>.
- 255.** КОРЖЕВСКИЙ, Д.Э. Основы гистологической техники. СПб: *Спецлит*. 2010, 95 с.
- 256.** ИМЯНИТОВ, Е.Н., ХАНСОН, К.П. Молекулярная онкология: клинические аспекты. СПб. В: *СПбМАПО*. 2007, 211 с.
- 257.** ЛУКЪЯНОВА, Н.Ю., КУЛИК, Г.И., ЧЕХУН, В.Ф. Роль генов p53 и bcl-2 в апоптозе и лекарственной резистентности опухолей. В: *Вопросы онкологии*, 2000; 46(2):121–8.
- 258.** JASANI, B., SCHMID, K.W. Historical perspective. Immunocytochemistry in Diagnostic Histopathology. In: *Edinburgh: Churchill Livingstone*, 1993, p. 3-9.
- 259.** WOOD, G.W, BEUTNER, E.H., CHORZELSKI, T.P. Studies in immunodermatology: II. Production of pemphiguslike lesions by intradermal injection of monkeys with Brazilian pemphigus foliaceus sera. *Int Arch Allerg Appl Immunol* 42:556-564, 1972 15.
- 260.** SAMS, W.M., JORDON, R.E: Pemphigus antibodies: Their role in disease. *J. Invest Dermatol* 56:474-479, 1971.
- 261.** BEUTNER, E.H., JORDON, R.E: Demonstration of skin antibodies in sera of pemphigus vulgaris patients by indirect immunofluorescent staining. *Proc Soc Exp Med* 117:505-510, 1964.
- 262.** SCHILTZ, J.R., MICHEL, B.: Production of epidermal acantholysis in normal human skin in vitro by the IgG fraction of pemphigus serum. *J Invest Dermatol* 67:254-260, 1976.
- 263.** DENG, J., BEUTNER, E.H., SHU, S., CHORZELSKI, T.P. Pemphigus antibody action on skin explants: kinetics of acantholytic changes and stability of antigens in tissue cultures of normal monkey skin explants. *Arch Dermatol*.13:923-926, 1977 5.
- 264.** FARLE, R.M., DYKES, R., LAXARUS, G.S. Anti-epidermal-cell surface pemphigus antibody detaches viable epidermal cells from culture plates by activation of proteinase. *Proc Natl Acad Sci* 75:459-463, 1978.
- 265.** HURWITZ, A.I., FELDMAN, E. A disease in dogs resembling human pemphigus vulgaris: Case reports. *J Am Vet Med Assoc* 166:585, 1975.
- 266.** MACKENZIE, I.C., DABELSTEEN, E., ROED-PETERSEN, B. A method for studying epithelial-mesenchymal interactions in human oral mucosal lesions. *Scand J Dent Res* 87:234-243, 1979.

267. HOLMSTRUP, P., DABELSTEEN, E., MACKENZIE, I.C. Transplantation of an oral mucosa to nude (nu/ nu) mice. *J Dent Res* 58A:416, 1979.
268. TOYKA, K.V., DRACHMAN, D.B., GRIFFIN, D.E. et al. Myasthenia gravis. Study of Humoral Immune Mechanisms by Passive Transfer to Mice. *New Engl J Med* 296:125-131, 1977.
269. BUSCHARD, K., MADSBAD, S., RYGAARD, J.: Passive transfer diabetes mellitus from man to mouse. *Lancet* I:908-910, 1978.
270. VOLPE, R. The pathogenesis of Graves' disease: An overview. *Clin Endocrinol Metabolism* 7:3-29, 1978.

Anexa 1. Acte de implementare a rezultatelor obținute

Anexa 1.1 Acte de implementare a rezultatelor obținute brevet de invenție 1148

APROB

Prorector pentru activitatea științifică

USMF „Nicolae Testemițanu”

Prof. univ., dr. hab. șt. med.,

Gh. Rojnovanu



14 September 2017

ACTUL 103

DE IMPLEMENTARE A INVENȚIEI

(în procesul științifico-didactic)

1. *Denumirea ofertei pentru implementare:* Dispozitiv pentru fixarea etajată a pielii în procesul de decelularizare

2. *Autorii:* MACAGONOVA Olga, MD; NACU Viorel, MD; MUȘET Gheorghe, MD; COCIUG Adrian, MD; JIAN Mariana, MD; SAREV Violeta, MD; COBZAC Vitalie, MD

3. *Numarul invenției MD 1148(13) Y*

4. *Sursa de informație:* Prezentă propunere/ metoda este elaborată prin colaborare USMF "Nicolae Testemițanu"- Laboratorul inginerie tisulară și culturi celulare, bazată pe studierea particularităților structurale și funcționale pielii, pentru obținerea matricilor tridimensionale.

5. *Unde și când a fost implementată:* În procesul de obținere grefelor de piele, folosite pentru tratamentul defectelor cutanate simulate pe animale experimentale, în condiții Laboratorului inginerie tisulară și culturi celulare, noiembrie 2016.

6. *Eficacitatea implementării:* Semnificația științifică a implementării dispozitivului pentru prepararea matricii de piele în activitatea Laboratorului inginerie tisulară și culturi celulare, constă în operativitatea, siguranța, calitatea și eficacitatea tehnicii de preparare a țesuturilor biologice pentru studiile științifice preclinice și clinice în cadrul realizării diferitor proiecte de cercetare.

7. *Obiecții/ propuneri:*

Prezenta invenție este implementată conform descrierii în brevet.
La etapa implementării obiecții nu sunt.

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

Viorel Nacu *[Signature]*

Șef Departament, Departamentul Știință.
Prof. univ., dr. hab. șt. med.

Ghenadie Curocichin *[Signature]*

Anexa 1.2 Acte de implementare a rezultatelor obținute brevet de invenție 1067

APROB

Prorector pentru activitatea științifică

USMF „Nicolae Testemițanu”

Prof. univ., dr. hab. șt. med.,

Gh. Rojnovanu



11 septembrie 2017

ACTUL 104

DE IMPLEMENTARE A INVENȚIEI

(în procesul științifico-didactic)

1. *Denumirea ofertei pentru implementare:* Metodă de modelare a leziunilor de tip pemfigus

2. *Autorii:* MACAGONOVA Olga, MD; NACU Viorel, MD; MUȘET Gheorghe, MD; COCIUG Adrian, MD; JIAN Mariana, MD; SAREV Violeta, MD; COBZAC Vitalic, MD

3. *Numarul invenției:* MD 1067 (13) Y

4. *Sursa de informație:* Prezentă propunere/ metoda este elaborată prin colaborare USMF "Nicolae Testemițanu"- Laboratorul de inginerie tisulară și culturi celulare, bazată pe studierea simulare a maladiilor autoimune la animale experimentale.

5. *Unde și când a fost implementată:* În procesul de perfectare a tezei de doctor, bazate pe simularea leziunilor cutanate pemfigus –like pe animale experimentale, în condiții de laborator inginerie tisulară și culturi celulare, ianuarie 2015.

6. *Eficacitatea implementării:* Semnificația științifică a implementării dispozitivului pentru prepararea extractului etanolic proteic în activitatea laboratorului Inginerie Tisulară și Culturi Celulare, constă în amplificarea și prelungirea efectului imun al antigenului, lipsa toxicității, disponibilitatea preparatelor chimico-farmaceutice utilizate, simplitatea preparării amestecului și simplitatea metodei, pentru studiile științifice preclinice în cadrul realizării tezei de doctor.

7. *Obiecții/ propuneri:*

Prezenta invenție este implementată conform descrierii în brevet .
La etapa implementării obiecții nu sunt.

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

Viorel Nacu _____

Șef Departament, Departamentul Știință,
Prof. univ. dr. hab. șt. med.

Ghenadie Curocichin _____

Anexa 1.3 Acte de implementare a rezultatelor obținute brevet de invenție 1132

APROB

Prorector pentru activitatea științifică

USMF „Nicolae Testemițanu”

Prof. univ., dr. hab. șt. med.,

Gh. Rojnovceanu



11 September 2017

ACTUL 105

DE IMPLEMENTARE A INVENȚIEI

(în procesul științifico-didactic)

1. Denumirea ofertei pentru implementare: Dispozitiv pentru fixarea pielii în procesul de decelularizare

2. Autorii: MACAGONOVA Olga, MD; NACU Viorel, MD; MUȘET Gheorghe, MD; COCIUG Adrian, MD

3. Numarul invenției: MD 1132 (13) Y

4. Sursa de informație: Prezentă propunere/ metoda este elaborată prin colaboarare USMF "Nicolae Testemițanu"- Laboratorul inginerie tisulară și culturi celulare, bazată pe studierea particularităților structurale și funcționale pielii, pentru obținerea matricilor tridimensionale.

5. Unde și când a fost implementată: În procesul de obținere grefelor de piele, folosite pentru tratamentul defectelor cutanate simulate pe animale experimentale, în condiții de laborator Inginerie Tisulară și Culturi Celulare, noiembrie 2016.

6. Eficacitatea implementării: Semnificația științifică a implementării dispozitivului pentru prepararea matricii de piele în activitatea Laboratorului inginerie tisulară și culturi celulare, constă în operativitatea, siguranța, calitatea și eficacitatea tehnicii de preparare a țesuturilor biologice pentru studiile științifice preclinice și clinice în cadrul realizării diferitor proiecte de cercetare.

7. Obiecții/propuneri:

La momentul implementării obiecții nu sunt.

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

Viorel Nacu

Șef Departament, Departamentul Știință,
Prof. univ, dr. hab. șt. med.

Ghenadie Curocichin

Anexa 1.

APROBAT:

Prorector pentru activitatea științifică

USMF "Nicolae Testemițanu",

dr. hab. med., profesor universitar

Gh. Rojnowanu



9 decembrie 2014

ACTUL nr.24

DE IMPLEMENTARE A INVENȚIEI

(în laboratorul Inginerie Tisulară și Culturi Celulare)

1. Denumirea ofertei pentru implementare: "Dispozitiv pentru prepararea țesuturilor biologice" nr. 793, autorii/coautorii: Macagonova Olga, Nacu Viorel, Cociug Adrian.
2. De cine și când a fost propusă: De către Macagonova Olga, Nacu Viorel, Cociug Adrian, mai 2014
3. Sursa de informație: Prezentă propunere/ metoda este elaborată prin colaborare USMF "Nicolae Testemițanu"- laboratorul Inginerie Tisulară și Culturi Celulare, secția Inovare, marketing și transfer tehnologic și a Băncii de Țesuturi și Celule Umane IMSP Spitalul Clinic Traumatologie și Ortopedie, bazată pe studierea probelor tisulare a mucoasei esofagului de bovină folosite pentru izolarea antigenului epitelial.
4. Unde și când a fost implementat: În cadrul studiilor experimentale de preparare a țesuturilor biologice folosite pentru izolarea antigenului epitelial în activitatea științifică a laboratorului Inginerie Tisulară și Culturi Celulare USMF "Nicolae Testemițanu", mai 2014.
5. Eficacitatea implementării: Semnificația științifică a implementării dispozitivului pentru prepararea țesuturilor biologice în cercetările științifice a laboratorului propus constă în ușurința, siguranța, calitatea și eficacitatea tehnicii de preparare a țesuturilor biologice pentru studiile științifice preclinice și clinice în cadrul realizării diferitor proiecte de cercetare.
6. Obiecții/ propuneri: La etapa implementării obiecții nu sunt.

Cercetător științific principal
Laborator Inginerie Tisulară și Culturi Celulare
dr. hab. med., profesor universitar Pavel Ciobanu

Anexa 2. Brevete de invenție



REPUBLICA MOLDOVA

Agenția de Stat pentru
Proprietatea Intelectuală

BREVET
DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ

Nr. **793**

Eliberat în temeiul Legii nr. 50/2008 privind protecția invențiilor

Titlul: **Dispozitiv pentru prepararea țesuturilor biologice**

Titular: **UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN
REPUBLICA MOLDOVA, MD**

Data depozit: **2014.01.13**

Descrierea invenției, revendicările și desenele constituie parte
integrantă a prezentului brevet de invenție de scurtă durată



Director General

COPIE

CHIȘINĂU



REPUBLICA MOLDOVA

Agenția de Stat pentru
Proprietatea Intelectuală

BREVET DE INVENȚIE DE SCURTĂ DURATĂ

Nr. **866**

Eliberat în temeiul Legii nr. 50/2008 privind protecția invențiilor

Titlul: Dispozitiv pentru prepararea țesuturilor biologice

**Titular: IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN
REPUBLICA MOLDOVA, MD**

Data depozit: 2014.08.01

Durata brevetului : 6 ani

Descrierea invenției, revendicările și desenele constituie parte
integrantă a prezentului brevet de invenție de scurtă durată



Director General

COPIE

CHIȘINĂU



REPUBLICA MOLDOVA

Agencia de Stat pentru
Proprietatea Intelectuală

BREVET DE INVENȚIE DE SCURTĂ DURATĂ

Nr. 867

Eliberat în temeiul Legii nr. 50/2008 privind protecția invențiilor

Titlul: **Dispozitiv pentru secționarea țesuturilor biologice**

Titular: **IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN
REPUBLICA MOLDOVA, MD**

Data depozit: 2014.08.01

Durata brevetului : **6 ani**

Descrierea invenției, revendicările și desenele constituie parte
integrantă a prezentului brevet de invenție de scurtă durată



Director General



CHIȘINĂU


REPUBLICA MOLDOVA
Agenția de Stat pentru
Proprietatea Intelectuală

BREVET
DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ
Nr. 868

Eliberat în temeiul Legii nr. 50/2008 privind protecția invențiilor

Titlul: Dispozitiv pentru fixarea grefei osoase

Titular: IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN
REPUBLICA MOLDOVA, MD

Data depozit: 2014.08.22

Durata brevetului : 6 ani

Descrierea invenției, revendicările și desenele constituie parte
 integrantă a prezentului brevet de invenție de scurtă durată

Director General

CHIȘINĂU





REPUBLICA MOLDOVA

Agencia de Stat pentru
Proprietatea Intelectuală

BREVET
DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ

Nr. 905

Eliberat în temeiul Legii nr. 50/2008 privind protecția invențiilor

Titlul: Dispozitiv pentru separarea țesuturilor biologice

**Titular: IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN
REPUBLICA MOLDOVA, MD**

Data depozit: 2014.12.12

Durata brevetului : 6 ani

Descrierea invenției, revendicările și desenele constituie parte
integrantă a prezentului brevet de invenție de scurtă durată



Director General



CHIȘINĂU



REPUBLICA MOLDOVA

Agencia de Stat pentru
Proprietatea Intelectuala

BREVET DE INVENTIE DE SCURTĂ DURATĂ

Nr. 914

Eliberat in temeiul Legii nr. 50/2008 privind protectia inventiilor

**Titlul: Dispozitiv de fixare a oaselor spongioase pentru
prepararea grefei osoase**

**Titular: IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINA ȘI
FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN
REPUBLICA MOLDOVA, MD**

Data depozit: 2014.11.27

Durata brevetului : 6 ani

Descrierea invenției, revendicările și desenele constituie parte
integrantă a prezentului brevet de invenție de scurtă durată

Director General



CHISINAU





Anexe 3. Hotărâri de acordare a brevetului de invenție

Anexe 3.1 Hotărâri de acordare a brevetului de invenție 9249

AGENȚIA DE STAT PENTRU PROPRIETATEA
INTELECTUALĂ A REPUBLICII MOLDOVA

DIRECȚIA BREVETE



F-01-BI-026-I-03-0307
STATE AGENCY ON INTELLECTUAL PROPERTY
OF THE REPUBLIC OF MOLDOVA

PATENTS DIRECTION

nr. 5020
din 2019.05.02

COȘNEANU Elena, Departamentul Știința,
USMF "N. Testemițanu"
bd. Ștefan cel Mare și Sfint nr. 165, MD-2004,
Chișinău, Republica Moldova

H O T Ă R Ă R E

nr.9249 din 2019.04.26

În urma examinării dosarului cererii de brevet de invenție de scurtă durată:

- (21) Nr. depozit: s 2018 0040
- (22) Data depozit: 2018.05.02
- (54) Titlul: **Metodă de diagnostic al afectării keratinocitelor în leziunile pemfigus-like experimentale**

și în temeiul art. 52(3) din Legea nr. 50/2008 privind protecția invențiilor, Direcția Brevete, Secția Examinare

H O T Ă R Ă Ș T E

Acordarea brevetului de invenție de scurtă durată conținând următoarele date:

- (13) Y
- (51) **Int.Cl:** *A61B 10/00* (2006.01)
G01N 33/536 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
- (21) s 2018 0040
- (22) 2018.05.02
- (71) (73) UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD
- (72) MACAGONOVA Olga, MD; NACU Viorel, MD; MUȘET Gheorghe, MD; COCIUG Adrian, MD
- (74) COȘNEANU Elena
- (54) **Metodă de diagnostic al afectării keratinocitelor în leziunile pemfigus-like experimentale**

Str. Andrei Doga nr. 24/1, MD-2024, Chișinău, Republica Moldova
Tel: (+373-22) 400-511, (+373-22) 400-514 Fax: (+373-22) 440-119
www.agepi.gov.md, e-mail: office@agepi.gov.md

24/1 Andrei Doga str., MD-2024, Chisinau, Republic of Moldova
Tel: (+373-22) 400-511, (+373-22) 400-514 Fax: (+373-22) 440-119
www.agepi.gov.md, e-mail: office@agepi.gov.md

Anexe 3.2 Hotărâri de acordare a brevetului de invenție 9209

AGENȚIA DE STAT
PENTRU PROPRIETATEA INTELLECTUALĂ
A REPUBLICII MOLDOVA



F-01-BI-026-1-03-0307
STATE AGENCY
ON INTELLECTUAL PROPERTY
OF THE REPUBLIC OF MOLDOVA

DIRECȚIA BREVETE



PATENTS DEPARTMENT

IDNO 1015601000112

nr. 2074
din 2019.02.21

COȘNEANU Elena, Departamentul Știința,
USMF "N. Testemițanu"
bd. Ștefan cel Mare și Sfânt nr. 165, MD-2004,
Chișinău, Republica Moldova

H O T Ă R Ă R E

nr.9209 din 2019.02.20

În urma examinării dosarului cererii de brevet de invenție de scurtă durată:

- (21) Nr. depozit: s 2018 0071
- (22) Data depozit: 2018.07.09
- (54) Titlul: **Metodă de diagnostic imunologic ale leziunilor experimentale pemfigus-like la șobolani**

și în temeiul art. 52(3) din Legea nr. 50/2008 privind protecția invențiilor, Direcția Brevete, Secția Examinare

H O T Ă R Ă Ș T E

Acordarea brevetului de invenție de scurtă durată conținând următoarele date:

- (13) Y
- (51) **Int.Cl:** *A61B 10/00* (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)
- (21) s 2018 0071
- (22) 2018.07.09
- (71)(73) UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD
- (72) MACAGONOVA Olga, MD; NACU Viorel, MD; COCIUG Adrian, MD
- (74) COȘNEANU Elena
- (54) **Metodă de diagnostic imunologic ale leziunilor experimentale pemfigus-like la șobolani**



**EURO
INVENT**

EUROPEAN EXHIBITION OF
CREATIVITY AND INNOVATION

EXPOZIȚIA EUROPEANĂ A
CREATIVITĂȚII ȘI INOVĂRII

IAȘI - ROMÂNIA



DIPLOMA OF EXCELLENCE



**EURO
INVENT**



**EURO
INVENT**

DEVICE FOR TISSUE PROCESSING

Macagonova Olga, Nacu Viorel, Cociug Adrian



UNIVERSITATEA TEHNICA DIN CLUJ-NAPOCA

sub egida MINISTERULUI EDUCAȚIEI NAȚIONALE și
ACADEMIEI DE ȘTIINȚE TEHNICE DIN ROMÂNIA, FILIALA CLUJ

SALONUL INTERNAȚIONAL DE INVENTICĂ
PRO INVENT editia a XII-a, 2014, Cluj-Napoca,
România

DIPLOMA

DE EXCELENȚĂ PRO INVENT

Se acordă: doctorand Macagonova Olga; Dr.hab. prof. univ. Nacu Vioreli, doctorand.Cociug Adrian

Pentru: DISPOZITIV PENTRU PROCESAREA ȚESUTURILOR



PREȘEDINTELE SALONULUI,
Prof. dr. ing. AUREL VLAICU
Rector al

Universității Tehnice din Cluj-Napoca



PREȘEDINTELE JURIULUI,
Prof. dr. ing. RADU MUNTEANU

Radu Munteanu



NATIONAL INSTITUTE OF
INVENTICS, JASSY, ROMANIA

Diploma

GOLD MEDAL

INVENTICA 2014

Offered Mr / Ms

NACU VIOREL, MACAGONOVA OLGA,
COCIUG ADRIAN

DISPOZITIV PENTRU PREPARAREA ŢESUTURILOR

THE XVIII-TH INTERNATIONAL EXHIBITION
OF RESEARCH, INNOVATION AND
TECHNOLOGICAL TRANSFER

“INVENTICA 2014”

IASI, ROMANIA
2-4 JULY 2014

General Manager



ASSOCIATION OF POLISH INVENTORS AND RATIONALIZERS
WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY PATENT OFFICE OF THE
REPUBLIC OF POLAND



DIPLOMA



INTERNATIONAL WARSAW INVENTION SHOW
IWIS 2014

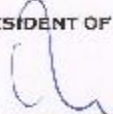
SILVER MEDAL

FOR
NACU VIOREL , MACAGONOVA OLGA , COCIUG ADRIAN

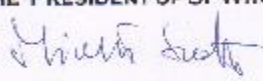
FROM
LABORATORY OF TISSUE ENGINEERING AND CELLULAR CULTURE FROM
THE UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY "NICOLAE TESTEMITANU"
OF THE REPUBLIC OF MOLDOVA
MOLDOVA

FOR THE INVENTION
DEVICE FOR BIOLOGICAL TISSUE PREPARING

THE PRESIDENT OF JURY


PROF. LESZEK RAFALSKI

THE PRESIDENT OF SPWIR


PROF. MICHAŁ SZOTA

WARSAW, 14-16TH OF OCTOBER 2014



UNIVERSITATEA TEHNICĂ DIN CLUJ-NAPOCA

sub egida MINISTERULUI EDUCAȚIEI ȘI CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE
ȘI ACADEMIEI DE ȘTIINȚE TEHNICE DIN ROMÂNIA, FILIALA CLUJ

SALONUL INTERNAȚIONAL DE INVENTICĂ

PRO INVENT, Ediția a XIII-a, 2015, Cluj-Napoca, România

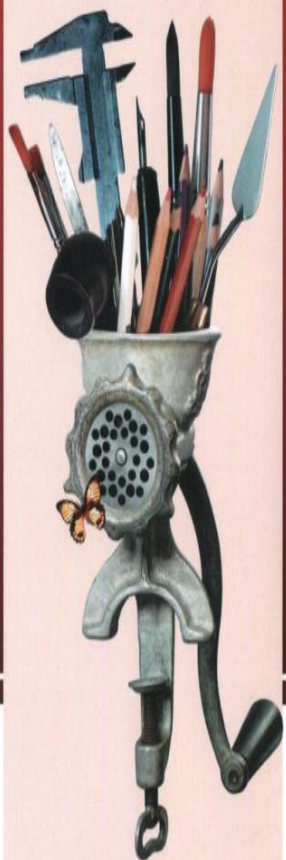
DIPLOMA

DE EXCELENȚĂ
ȘI MEDALIA DE AUR CU MENȚIUNE SPECIALĂ

Se acordă **VIOREL NACU, OLGA MACAGONOVA, ADRIAN COCIUG**

UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINA ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMITANU"
REPUBLICA MOLDOVA

Pentru **DISPOZITIV PENTRU PROCESAREA TESUTURILOR**



PREȘEDINTELE SALONULUI,
Prof. dr. ing. AUREL VLAICU
Rector al
Universității Tehnice din Cluj-Napoca

PREȘEDINTELE JURIULUI,
Prof. dr. ing. RADU MUNTEANU



EIS "INFOINVENT"

DIPLOMĂ

„CEA MAI BUNĂ INVENȚIE CREATĂ DE UN TÂNĂR INVENTATOR”

se acordă

dnei **MACAGONOVA OLGA**,
UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „NICOLAE TESTEMIȚANU”

pentru

DISPOZITIVE PENTRU PREPARAREA ȚESUTURILOR BIOLOGICE



PREȘEDINTELE
COMITETULUI ORGANIZATORIC

PREȘEDINTELE
JURIULUI INTERNAȚIONAL



25.11.15
EIS "INFOINVENT"

DIPLOMĂ

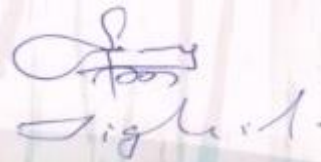
MEDALIA DE AUR

se acordă

**COCIUG ADRIAN, NACU VIOREL, CAPROȘ NICOLAE,
ZOTA IEREMIA, MACAGONOVA OLGA**

pentru ciclul de invenții

DISPOZITIVE DE PREPARARE A ȚESUTURILOR BIOLOGICE



PREȘEDINTELE
COMITETULUI ORGANIZATORIC

PREȘEDINTELE
JURIULUI INTERNAȚIONAL

25-28 noiembrie 2015, Chișinău, Republica Moldova

25.11.15
EIS "INFOINVENT"

DIPLOMĂ

MEDALIA DE AUR

se acordă

**COCIUG ADRIAN, NACU VIOREL, CAPROȘ NICOLAE,
ZOTA IEREMIA, MACAGONOVA OLGA**

pentru ciclul de invenții

DISPOZITIVE DE PREPARARE A ȚESUTURILOR BIOLOGICE

**PREȘEDINTELE
COMITETULUI ORGANIZATORIC**

**PREȘEDINTELE
JURIULUI INTERNAȚIONAL**

25-28 noiembrie 2015, Chișinău, Republica Moldova



NATIONAL INSTITUTE OF INVENTICS,
JASSY, ROMANIA

Diploma

GOLD MEDAL

The Hamangia Thinker

Offered Mr / Ms

**COCIUG ADRIAN, PHD STUDENT;
MACAGONOVA OLGA, PHD STUDENT;
CAPROȘ NICHOLAE, PHD, MD, PROFESSOR;
NACU VIOREL, PHD, MD, PROFESSOR**

DEVICE FOR TISSUE PROCESSING

in recognition of high scientific contribution
and loyalty to

**THE XIX-TH INTERNATIONAL EXHIBITION
OF RESEARCH, INNOVATION AND
TECHNOLOGICAL TRANSFER**

"INVENTICA 2015"

Iasi, Romania, June 24 -26, 2015



PRESIDENT
INVENTICA 2015
Prof. Dr. Ing. Constantin Băbuș

GENERAL MANAGER
NATIONAL INSTITUTE OF INVENTICS
Prof. Dr. Ing. Dr. Ec. Constantin Băbuș



Transplant Procurement Management

Awards this diploma for the accomplishment of the

— **International On-line Course in Tissue Banking and Advanced Therapies** —

To

Olga Macagonova

from 23rd of March to 24th of May 2015 and taught under the auspice of the University of Barcelona
Barcelona (Spain), July 2015

Course Director

Mr Scott Brubaker

Course Director

Dr Marfi Manyalich



Series: **MX** Code: **XV** No. **53202**

The present Certificate

HEREBY CERTIFIES THAT:

Mr./Ms. **Olga MACAGONOVA**

attended the **Online Professional Training in Tissue Banking and Advanced Therapies**,
in the Twinning Project "Strengthening the Transplant Agency of the Republic of Moldova and support in
legal approximation in the area of quality and safety of substances of human origin"
(75 credits of ongoing medical studies)

23 March - 24 May 2015

Chisinau, the Republic of Moldova



Patricia SANCHEZ RICO



Igor CODREANU

CERTIFICAT

ELIBERAT

Dnei Olga MACAGONOVA

prin care se confirmă participarea
la Simpozionul științifico-practic anual

"Lecturi AGEPI 2016"

(ediția a XVIII-a)

Octavian APOSTOL,
Director General



21-22 aprilie 2016
Chișinău



Korea University Invention Association

World Invention Creativity Contest



WICC World Invention Creativity Contest 2017

Presented to

MACAGONOVA Olga,

State Medical and Pharmaceutical University "Nicolae Testemitanu"

In honor of the best presentation and outstanding creativity and innovativeness of the invention entitled

Devices for Preparation of Biological Tissues

Exhibited at World Invention Creativity Contest 2017 organized by Korea University Invention Association in Seoul, KOREA July 28 - 30, 2017

World Invention Creativity Contest Olympic Organizing Committee Korea University Invention Association

Chairman LEE JU HYUNG







第十屆國際發明展覽會
第三屆世界發明創新論壇（佛山）
10th International Exhibition of Inventions &
3rd World Invention and Innovation Forum (Foshan)

獲獎證書
AWARD CERTIFICATE

GOLD MEDAL

for

Macagonova Olga

from

MOLDOVA

for the invention

Devices for preparing biological tissues



中國發明協會
China Association of Inventions

理事長
President

潘雲鶴

2018年9月
September 2018.





WORLD FEDERATION OF SCIENTISTS

THE PRESIDENT

Ms. Olga Macagonova
Nicolae Testemitanu State University of Medicine
MD-2004 Chisinau
Republic of Moldova

Geneva, 22nd November 2016

Concerns: Moldovan Scholarship Programme

Dear Ms. Macagonova,

Following the recommendation made by Academician Gheorghe Duca, National Representative of the World Federation of Scientists in Moldova, I have the pleasure of granting you a **one-year scholarship** to conduct research under the direct supervision of Professor Viorel Nacu at the **Laboratory of Tissue Engineering and Cells Cultures, State University of Medicine, Chisinau**. The **topic of your research**, related to the WFS Planetary Emergency "Medicine and Biotechnology", will be "**Predinical, Morphological and Immunological Studies of Experimental Pemphigus – like Lesions**".

The scholarship will amount to 150 Swiss Francs per month and will be paid to you every 2 months against receipt. Please note that we must receive the following for the continuation of the scholarship:

- 1) A copy of this letter signed for acceptance by return mail.
- 2) The delivery of an interim report after six months, and a final report at the end of the scholarship.
- 3) Signed receipts every two months.

Wishing you success with your research work, I remain,

I agree to be the executor
Macagonova Olga
01.12.2016

Yours sincerely

Professor Antonino Zichichi
President

Enclosures: Basic Rules & Guidelines and Receipt Form

Main centres:
OPERATIONAL CENTRE – 1211 Geneva – Switzerland – C/o CERN, LAA Building #29 - Tel: +41/227679957 - Fax: +41/227679965 - E-mail: info@worldlab.ch
ESTONIA - EE0010 TALLIN - 10 Ravalda Boulevard - Tel: +372/2/441304 - Fax: +372/2/440640 - E-mail: rebanek@park.tartu.ee
GEORGIA - 300008 TBILISI - 52 Rustaveli Avenue - Tel: +995/32/998891 - Fax: +995/32/998823 - Telex: 212133 ECO SU - E-mail: lado@acad.acnet.ge
LITHUANIA - 232600 VILNIUS - 3 Gedimino Avenue - Tel: +3702/613651 - Fax: +3702/618464 - Telex: 261141 LMA SU - E-mail: tmkc.plls@wllb.lt
MEDITERRANEAN area - CCSEM, I 91016 ERICE - 26 Via Guarnotta - Tel: +39/923/869133 - Fax: +39/923/869226 - E-mail: hq@emcsc.ccssem.infn.it
PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA - BEIJING - 52 Sanlihe Road - Tel: +86/1/8597701 - Fax: +86/1/8511095 - Telex: 22474 ASCHI CN
UKRAINE - 252054 KIEV - 32-A Str. Turguenevskaya - Tel: +380/44/2167012 - Fax: +380/44/2167012 - Telex: 131376 IDEA SU
USA - Colombia University in the City of New York, NY 10027 NEW YORK - 538 West 120th Street - Tel: +1/212/8543339 - Fax: +1/212/9323169
CH-1211 GENEVA 23, Switzerland - Tel: +41/22/7678167 - Fax: +41/22/7850207 - Telex: 419000 CERN CH - Telegram: CERNLAB-Geneva
Sections in the following countries:
ALGERIA • ARGENTINA • BELARUS • BELGIUM • BULGARIA • BURKINA FASO • CANADA • CHILE • CHINA • COLUMBIA • CZECH REPUBLIC
DENMARK • EGYPT • ESTONIA • FINLAND • FRANCE • GERMANY • GREECE • HUNGARY • INDIA • ISRAEL • ITALY • JAPAN • JORDAN
KENYA • KOREA • LITHUANIA • NIGERIA • PAKISTAN • POLAND • PORTUGAL • REPUBLIC OF GEORGIA • ROMANIA • RUSSIA • SLOVENIA
SPAIN • SWEDEN • SWITZERLAND • THE NETHERLANDS • TUNISIA • TURKEY • UK • UKRAINE • USA • VIETNAM • YUGOSAVIA



Certificat de participare

DI./Dna dr. Olga MACAGONOVA

a participat la simpozionul

PATOLOGIE LA LIMITA ÎNTRE SPECIALITĂȚI

desfășurat la București în data de 22 februarie 2019

Manifestarea a fost creditată de CMR cu **6 puncte EMC**

conform adresei de creditare **554 / 05.02.2019**

Coordonator program

Luminița Adriana Gurghean

Coordonator program

Iilca Savulescu-Fiedler

Serie B nr. 11

/22 februarie 2019



Национальный альянс дерматологов и косметологов (НАДС)
Еврос-Азиатский ассоциатив дерматовенерологов (ЕААД)
Титулярная ассоциация специалистов по инфекциям, передаваемым половым путем (IUSP)
Некоммерческое партнерство «Международная медицинская ассоциация» (ИММА)

при участии:
Национальной ассоциации дерматологов и косметологов (НАДС)
Профессионального общества дерматологов
Российской педиатрической ассоциации

СЕРТИФИКАТ

Настоящим удостоверяется, что

Макагонова

Ольга

Вячеславовна

является
УЧАСТНИКОМ

**XII Международного форума
дерматовенерологов
и косметологов**

Москва, «Крокус Экспо», 13-15 марта 2019 года



Председатель Оргкомитета
профессор Н.Н. Почепаев

DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

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

02.03.2019

Macagonova Olga

CURRICULUM VITAE



Nume / Prenume	Macagonova Olga
Cetățenia	Republica Moldova
Studii	Superiare, IP USMF „Nicolae Testemițanu”, Medicina, 2003-2009 Rezidențiat, specilitatea: Dermato-venerologie, 2009--2012 Școala doctorală, IP USMF „Nicolae Testemițanu”, Specialitatea: Anatomia omului, 311.01 2015–2018
Stagii	- Curs de perfecționare: Transplant Procurement Management Awards this diploma for the accomplishment of the International On-line Course in Tissue Banking and Advanced Therapies, 2015 - Online Professional Training in Tissue Banking and Advanced Therapies, in the Twinning Project "Strengthening the Transplant Agency of the Republic of Moldova and support in legal approximation in the area of quality and safety of substances of human origin", 2015, Republica Moldova, Chișinău
Domeniile de interes științific	Medicina regenerativă, biomedicină, inginerie tisulară
Participări în proiecte științifice naționale și internaționale	2 proiecte instituționale („Eficacitatea celulelor stem în procesul de restabilire a țesutului hepatic”, 2011-2014; „Ingineria tisulară în crearea și restabilirea țesutului hepatic”, 2015- 2018), 2 proiecte din cadrul Programului de stat („Elaborarea metodelor de obținere, stocare și diferențiere ale celulelor stem din maduva osoasa și complexul ombilico-placentar”, 2014-2015; „Aprecierea eficacității terapiei celulare cu fibroblaste și keratinocite în restabilirea defectelor tegumentare posttraumatice și

Participări la foruri științifice naționale și internaționale

Lucrări științifice și științifico-metodice publicate - numărul de monografii, articole, materiale ale comunicărilor științifice, brevete de invenții, manuale

Premii, mențiuni, distincții, titluri onorifice etc

Limba maternă
Limbi străine cunoscute

Telefon
E-mail

postcombustionale”, 2014-2015), 1 proiect independent pentru tineri cercetători („Grefe combinate: pielea decelularizată și celule stem în tratamentul leziunilor postcombustionale și postraumatice”, 2016-2017).

- Conferința Moldo-Română de Dermatologie (Republica Moldova, Chișinău, 2013);
- Sesiunea XIX-lea a Zilelor Medicale Balcanice și cel de al II-lea Congres de Medicină de Urgență 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. Nastase" (România, Iași, 2018);
- Simpozionul „Patologie la limita între specialități” (România, București, 2019);
- Al XII-lea Forumul Internațional al dermatovenerologilor și cosmetologilor (Rusia, Moscova, 2019).

Rezultatele tezei au fost discutate și aprobate la ședința Catedrei de anatomie topografică și chirurgie operatorie și laboratorului de inginerie tisulară și culturi celulare din 24.08.2018 (proces - verbal nr. 1) și SȘP din 17.12.2018 (proces - verbal nr. 2).

35 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 și au fost obținute 25 de brevete de invenție

4 medalii de aur, 1 medalie de bronz, 3 medalii de argint, Premiu AGEPI, “Cea mai bună invenție creată de un tânăr inventator”. INFOINVENT, 2015, Chișinău.

Română

Rusă – fluent, germană – A2, engleza – intermediar

Mobil: 060044537

olga.macagonova@usmf.md