

C.Z.U.: 611.013.8:611.136.4:611.149.8

DOI: <https://doi.org/10.52692/1857-0011.2025.2-82.28>

EXPLORAREA IMUNOHISTOCHEMICĂ A EXPRESIEI UNOR MARKERI DE DIFERENȚIERE ȘI ANGIOGENEZĂ ÎN STRUCTURILE CORDONULUI OMBILICAL

¹Lilian GLOBALA, dr. în șt. med., conf. univ., ORCID: 0000-0001-9743-1680¹Tatiana GLOBALA, dr. în șt. med., conf. univ., ORCID: 0000-0002-5317-2776¹IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițanu”,
Chișinău, Republica Moldova
email: lilian.globa@usmf.md

Rezumat.

Departea de a fi un simplu țesut de susținere, substanța gelatinoasă Wharton funcționează ca o nișă mezenchimală vie, în care se regăsesc celule cu trăsături stem, semnale moleculare de diferențiere și indicii ale unui dialog tisular încă incomplet înțeles. Scopul acestui studiu a fost caracterizarea imunohistochemică a expresiei markerilor CD105, CD34, VEGFR-2 și AC133 în cadrul substanței Wharton, în vederea evidențierii diversității fenotipice și a potențialului biologic al componentei celulare. Studiul a fost realizat pe 26 de cordoane ombilicale umane. Probele au fost fixate în formol tamponat 10%, apoi procesate prin tehnici histologice standard și incluse în parafină. Secțiunile au fost colorate cu hematoxilina-eozină și imunohistochemic pentru markerii CD105, CD34, VEGFR-2 și AC133. Expresia markerilor a fost evaluată semi-cantitativ în trei zone ale substanței gelatinoase Wharton, iar datele au fost analizate morfologic și statistic. CD105 a prezentat o expresie intensă, în special, în zona periferică a substanței Wharton, indicând prezența unei populații mezenchimale cu potențial de diferențiere. CD34 și AC133 au evidențiat subpopulații celulare progenitoare, cu distribuție focală și intensitate slabă spre moderat. VEGFR-2 a fost exprimat în celule endoteliale și stromale, precum și în substanța extracelulară. A fost observată suprapunerea parțială a zonelor de expresie pentru markerii studiați, fără co-expresie completă la nivel celular. Studiul a evidențiat caracterul activ, heterogen și funcțional al substanței gelatinoase Wharton, sugerând existența unui micromediu celular complex, capabil să susțină procese de diferențiere celulară și angiogeneză.

Cuvinte cheie: AC133, CD105, CD34, celule mezenchimale, celule progenitoare, VEGFR₂.

Summary. Immunohistochemical exploration of differentiation and angiogenesis marker expression in umbilical cord structures.

Far from being a mere supportive tissue, Wharton's jelly functions as a living mesenchymal niche, containing cells with stem-like properties, molecular signals for differentiation, and hints of a tissue dialogue that remains incompletely understood. The aim of this study was to perform an immunohistochemical characterization of CD105, CD34, VEGFR-2, and AC133 marker expression in Wharton's jelly, in order to highlight the phenotypic diversity and biological potential of its cellular component. The study was conducted on 26 human umbilical cords. The samples were fixed in 10% buffered formalin, then processed using standard histological techniques and embedded in paraffin. Sections were stained with hematoxylin-eosin and immunohistochemically for the markers CD105, CD34, VEGFR-2, and AC133. Marker expression was evaluated semi-quantitatively in three regions of Wharton's jelly, and the data were analyzed morphologically and statistically. CD105 showed strong expression, particularly in the peripheral zone of Wharton's jelly, indicating the presence of a mesenchymal population with differentiation potential. CD34 and AC133 highlighted progenitor cell subpopulations with focal distribution and low to moderate intensity. VEGFR-2 was expressed in both endothelial and stromal cells, as well as in the extracellular matrix. A partial overlap of expression zones was observed for the studied markers, without complete cellular co-expression. The study revealed the active, heterogeneous, and functional nature of Wharton's jelly, suggesting the existence of a complex cellular microenvironment capable of supporting processes such as cellular differentiation and angiogenesis.

Keywords: AC133, CD105, CD34, mesenchymal cells, progenitor cells, VEGFR-2.

Резюме. Иммуногистохимическое исследование экспрессии маркеров дифференцировки и ангиогенеза в структурах пуповины.

Вартонов студень – это не просто опорная ткань; а живая мезенхимальная ниша, в которой присутствуют клетки со стволовыми свойствами, молекулярные сигналы дифференцировки и признаки тканевого диалога, который остаётся до конца не изученным. Целью данного исследования была иммуногистохимическая характеристика экспрессии маркеров CD105, CD34, VEGFR-2 и AC133 в Вартоновом студне, с целью выявления фенотипического разнообразия и биологического потенциала клеточного компонента. Исследование было проведено на 26 пуповинах человека. Образцы фиксировали в 10% забуференном формалине, обрабатывали

po standardной гистологической методике и заливали в парафин. Срезы окрашивали гематоксилином-эозином и проводили иммуногистохимическое окрашивание с использованием антител к маркерам CD105, CD34, VEGFR-2 и AC133. Экспрессию маркеров оценивали полуквантитивно в трёх зонах Вартонова студенья. Данные анализировали морфологически и статистически. CD105 показал интенсивную экспрессию, особенно в периферической зоне Вартонова студня, что свидетельствует о наличии мезенхимальной популяции с потенциалом к дифференцировке. CD34 и AC133 выявили субпопуляции прогениторных клеток с очаговым распределением и слабой или умеренной интенсивностью. VEGFR-2 экспрессировался в эндотелиальных и стромальных клетках, а также во внеклеточном матриксе. Отмечено частичное совпадение зон экспрессии среди изученных маркеров, но полного клеточного ко-экспрессии не было обнаружено. Исследование подчёркивает активный, гетерогенный и функциональный характер Вартонова студня, предполагая существование сложной клеточной микросреды, способной поддерживать процессы дифференцировки и ангиогенеза.

Ключевые слова: AC133, CD105, CD34, мезенхимальные клетки; клетки-предшественники; VEGFR-2.

Introducere.

Cordonul ombilical nu este doar o simplă extensie anatomică între făt și placentă, ci o structură complexă, cu o arhitectură tisulară remarcabilă, adaptată unei funcții vitale: menținerea vieții intrauterine. Pe lângă componenta vasculară, arhitectura internă a cordonului este reprezentată de substanța gelatinoasă Wharton – un țesut conjunctiv specializat, de origine mezenchimală, bine hidratat, ce conține proteoglicani, fibre de colagen și un compartiment celular cu profil pluripotent. Departe de a fi un simplu țesut de umplere, această componentă este un compartiment dinamic al cordonului ombilical, capabil să susțină procese de diferențiere, migrare celulară și inițiere angiogenică, transformând cordonul ombilical într-un model biologic valoros pentru cercetările de regenerare și terapie celulară [1].

În ultimii ani, substanța gelatinoasă Wharton a devenit obiectul unui interes științific din ce în ce mai pronunțat, fiind considerată o sursă accesibilă, non-invazivă și etic acceptabilă de celule mezenchimale stem (MSC). Aceste celule sunt caracterizate de un fenotip imatur, capacitate proliferativă crescută și potențial de diferențiere înalt către liniile celulare multiple, inclusiv osteogenică, condrogenică și endotelială [2–4]. În plus, este descris că, MSC pot contribui la inițierea și susținerea proceselor de neo-angiogenează, ceea ce le conferă o valoare strategică în medicina regenerativă și terapia tisulară avansată.

Pentru înțelegerea profundă a biologiei și potențialului terapeutic al MSC, din cordonul ombilical este esențială analiza expresiei unor markeri imunohistochimici implicați în diferențiere și angiogenează. Markerii CD105 și CD34 sunt frecvent utilizați pentru identificarea celulelor mezenchimale și endoteliale, în timp ce VEGFR-2 și AC133 (*epitop al moleculei CD133*) sunt asociați cu celulele progenitoare endoteliale și inițierea răspunsului angiogenic [5–7]. Corelarea distribuției și intensității acestor markeri în substanța Wharton poate oferi date valoroase despre micromediul celular și vascular din cordonul ombilical.

Scopul studiului a fost caracterizarea imunohistochimică detaliată a expresiei markerilor CD105, CD34, VEGFR-2 și AC133 în substanța gelatinoasă Wharton, cu scopul de a evidenția potențialul de diferențiere și pro-angiogen al acestui țesut. Prin această abordare, ne-am propus ca rezultatele obținute să contribuie la fundamentarea utilizării acestui țesut fetal ca sursă viabilă pentru aplicații clinice inovatoare în domeniul medicinei regenerative și al terapiei celulare avansate.

Material si metode.

Studiul a fost realizat pe un lot de 26 cordoane ombilicale umane recoltate la naștere, cu consimțământul informat al pacientelor și cu avizul comisiei de etică instituționale. Prelevarea s-a efectuat imediat după clamparea cordonului, în condiții de asepsie. Segmentele recoltate, cu lungime de aproximativ 3–5 cm, au fost fixate în soluție de formalină 10% tamponată, timp de 48 de ore, urmate de procesare histologică standard.

După fixare, probele au fost deshidratate progresiv și incluse în parafină. Secțiuni seriate cu grosimea de 5 μm au fost obținute cu ajutorul microtomului rotativ Leica RM2245 (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK), apoi montate pe lame silanate.

Pentru stabilirea diagnosticului histologic secțiunile au fost colorate cu hematoxilină eozină. Pentru detecția imunohistochimică a markerilor CD105, CD34, VEGFR-2 și AC133 s-au utilizat anticorpi monoclonali specifici, conform specificațiilor producătorilor (Tabelul 1).

Secțiunile au fost examinate cu ajutorul microscoapelor Nikon Eclipse E600 și Axio Imager A2 (Carl Zeiss Microscopy, Germania), iar imaginile relevante au fost capturate și analizate morfometric în format JPEG.

Expresia fiecărui marker a fost evaluată semicantitativ de către doi cercetători independenți, utilizând o scală de scoruri (0–3) pentru intensitatea reacției (scor: 0: negativ, 1: slab, 2: moderat, 3: intens) și procentul de celule pozitive în câmpurile analizate

Tabelul 1

Caracteristicile tehnice ale anticorpilor utilizați în studiul imunohistochimic

Nr.	Marker	Tipul anticorpului	Diluție	Producător	Sistem de detecție	Demascare Antigen
1	CD105	Monoclonal mouse anti-human, clona SN6h	1:25	Dako Glostrup Denmark	Bond Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK), 10 minute	Bond Epitope Retrieval Solution 2, (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK) -20 minute
2	CD34	Mouse monoclonal anti-human, clona QBEnd/10	prediluat	Leica Biosystem Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK	Bond Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK), 15 minute	Bond Epitope Retrieval Solution 2, (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK) -20 minute
3	VEGFR-2	Rabbit polyclonal	1:200	Santa Cruz Biotechnolog, Inc.	Bond Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK), 15 minute	Microunde 20 min, soluție citrat pH6
4	AC133	Mouse monoclonal	1:100	Dako Glostrup Denmark	Bond Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK), 10 minute	Microunde 20 min, soluție citrat pH6

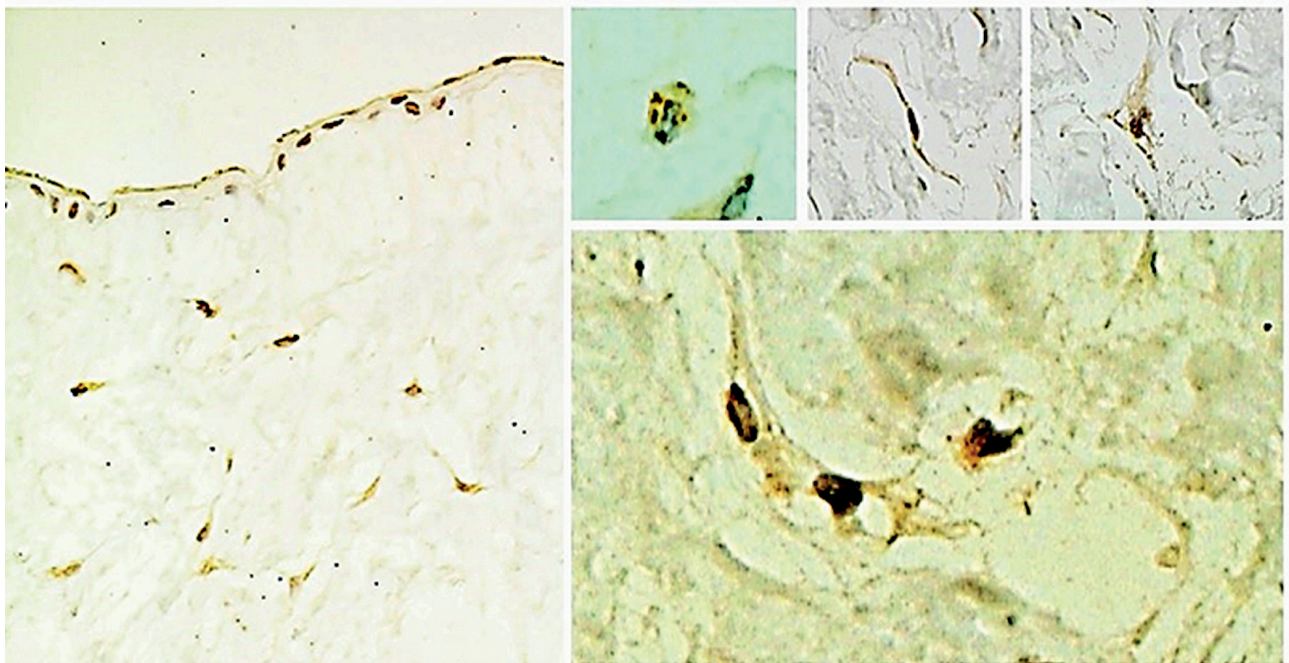


Figura 1. Aspecte caracteristice ale imunomarcajului exprimat clar de celulele stromale AC133 pozitive în substanța gelatinoasă Wharton, $\times 100$, $\times 400$; Imunoreacție pentru anti-AC133, DAB

($\times 200$ și $\times 400$). Distribuția celulară a markerilor a fost corelată cu morfologia celulelor și cu structura matricială a substanței Wharton. Rezultatele au fost comparate între markerii analizați pentru a evidenția suprapunerii, co-expresii sau distribuții diferențiate în cadrul substanței gelatinoase Wharton.

Rezultate și discuții.

Celulele CD105+ au fost identificate în toate zonele substanței gelatinoase Wharton, cu o distribuție predominantă în zona periferică 74,54% (95% ÎI 73,63%-81,45%), urmată de zona intervaculară (35,48%) și zona perivasculară (15,73%). Intensitatea reacției a fost variabilă, cu un Histo-scor semnificativ mai mare în zona periferică (media: 77,54) comparativ cu celelalte regiuni ($p < 0,001$). Celulele pozitive au prezentat morfologie fusiformă, nucleu eucromatic și prelungiri scurte, cu un pattern de imunocolorare citoplasmatic omogen sau apical intens.

CD34 a fost exprimat intens (3+) de celulele endoteliale din vasele ombilicale, cu pattern membranar și citoplasmatic. În ceea ce privește celulele stromale non-endoteliale, expresia CD34 a fost modestă (1+), cu densitate crescută în zona periferică (medie: 14,19 celule/câmp), urmată de zona perivasculară (5,92 celule/câmp). Histo-score-ul a evidențiat diferențe semnificative între cele două regiuni ($p < 0,001$).

Markerul AC133 a fost detectat în celulele endoteliale din vena ombilicală, dar nu și în arterele ombilicale. Celulele non-endoteliale AC133+ au fost mai numeroase în zona periferică (medie: 16,65 celule/câmp; H-scor: 85,92), comparativ cu zona perivasculară (medie: 7,17 celule/câmp; H-scor: 17,98), cu diferențe statistice semnificative ($p < 0,001$). Celulele CD133+ au prezentat citoplasmă abundentă și prelungiri citoplasmice, cu un pattern de exprimare citoplasmatic granular omogen (Figura 1).

VEGFR-2 a fost exprimat într-o proporție mică de celule stromale din zonele subamniotică și superficială a substanței Wharton. În plus, au fost identificate vezicule extracelulare VEGFR-2+, în special, în zona periferică. Expresia a fost focală, cu pattern mixt (membranar și citoplasmatic), neuniform distribuit. Un aspect remarcabil a fost prezența semnalului pozitiv și în epiteliul amniotic, predominant apical.

Rezultatele obținute în acest studiu confirmă heterogenitatea imunofenotipică a celulelor din substanța gelatinoasă Wharton, demonstrând o distribuție diferențiată a markerilor CD105, CD34, VEGFR-2 și AC133. Aceste observații sunt în acord cu datele actuale din literatură, dar și cu unele rezultate contradictorii, care reflectă particularități de interpretare și diversitatea modelelor experimentale utilizate.

Distribuția predominantă a celulelor CD105+ în zona periferică sugerează existența unei nișe celulare specializate cu funcții regenerative. Acest aspect este susținut de studiul lui Troyer și Weiss (2008), care au asociat această regiune cu un microambient celular activ, bogat în celule stromale primitive [3]. De asemenea, datele noastre sunt în acord cu rezultatele publicate de Wang et al. (2004), care au izolat cu succes celule CD105+ cu potențial multipotent din substanța gelatinoasă Wharton [2]. Totuși, alte cercetări, precum cele ale lui Bieback et al. (2004), indică o variabilitate a expresiei CD105 în funcție de metoda de procesare și de momentul prelevării, unele culturi primare prezentând un fenotip CD105 slab exprimat în fazele inițiale, posibil din cauza stresului tisular postnatal [8]. În acest context, expresia crescută și uniformă a CD105 în studiul nostru poate reflecta o prelevare optimă și păstrarea integrității microambientului celular.

Markerul CD34, asociat clasic cu celulele endoteliale și progenitoare hematopoietice, a fost identificat și în celule non-endoteliale, cu morfologie distinctă, în special în zona periferică. Această expresie focală, slabă dar constantă, este susținută de observațiile lui Mitchell et al. (2003), care au sugerat existența unui subset stromal CD34+ cu proprietăți de tranziție între celulele progenitoare și cele mezenchimale [9], precum și de rezultatele echipei lui Bieback (2004), care au identificat CD34 în celule stromale imature, sugerând existența unei populații multipotente nedefinite [8]. În contrast, Baksh et al. (2007) au considerat că expresia CD34 în substanța Wharton ar fi nespecifică, atribuind-o unei posibile contaminări cu celule endoteliale sau hematopoietice [10]. Totuși, în studiul nostru, distribuția clară, morfologia distinctă și consistența reacției imunohistochimice susțin ipoteza unei expresii reale în celule stromale proprii.

Expresia VEGFR-2, concentrată în zonele superficiale ale substanței Wharton și în celulele endoteliale ale vaselor ombilicale, este în concordanță cu studiul lui Sarugaser et al. (2005), care au identificat o subpopulație perivasculară VEGFR-2+ cu potențial endotelial și osteogenic în țesuturi fetale [11]. Un aspect deosebit remarcabil în studiul nostru este prezența veziculelor extracelulare VEGFR-2 pozitive în matricea Wharton, fenomen rar raportat în literatura de specialitate. Această constatare susține implicarea posibilă a VEGFR-2 în mecanisme de comunicare intercelulară paracrină, idee discutată de Harrell et al. (2019) în contextul angiogenezei fetale și al rolului veziculelor extracelulare în reglarea microambientului [12].

Markerul AC133 (CD133), specific celulelor progenitoare primitive, a fost exprimat de celule stromale izolate cu morfologie fusiformă, predominant în zona periferică. Distribuția sa este în acord cu observațiile lui Kogler et al. (2004) și Bühring et al. (2007), care au identificat o subpopulație CD133+ în substanța Wharton, cu potențial diferențiativ multipotent și profil imunofenotipic distinct de celulele stem mezenchimale clasice [13, 14]. Densitatea crescută a acestor celule în zona periferică și colocalizarea parțială cu celulele CD105+ și CD34+ susțin existența unui compartiment progenitor activ și versatil. Pe de altă parte, alte cercetări – precum cea a lui Fong et al. (2010) – au raportat absența AC133 în culturi celulare primare, atribuind acest lucru pierderii expresiei în timpul cultivării sau unui profil foarte restrictiv [15]. Observațiile noastre, realizate *in situ*, susțin existența acestei populații în starea sa nativă, dar potențial vulnerabilă la modificările postnatale.

Un aspect deosebit de important identificat în studiul nostru este distribuția parțial suprapusă, dar imunofenotipic distinctă a markerilor CD105, CD34, AC133 și VEGFR-2, sugerând existența unui microambient celular interactiv, în care celule mezenchimale, progenitoare și endoteliale coexistă și comunică funcțional. Această coexistență regională, mai ales în zona periferică a substanței Wharton, poate reflecta procese active de diferențiere, recrutare și remodelare angiogenică.

Concluzii.

Substanța gelatinoasă Wharton prezintă o distribuție regională diferențiată a celulelor CD105+, CD34+, AC133+ și VEGFR-2+, cu o densitate celulară crescută în zona periferică. În ansamblu, datele obținute susțin ideea că substanța gelatinoasă Wharton nu este doar un suport structural inert, ci un țesut funcțional dinamic, cu o arhitectură celulară complexă și un potențial biologic relevant. Aceste rezultate consolidează literatura de specialitate și aduc noi dovezi morfologice privind valoarea microambientului stromal fetal în terapia celulară și inginerie tisulară.

Bibliografie.

- Parolini O, Soncini M, Evangelista M, Schmidt D. *Amniotic membrane and amniotic fluid-derived cells: potential tools for regenerative medicine?* Regenerative Medicine. 2009;4(2):275–291.
- Wang HS, Hung SC, Peng ST, et al. *Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord.* Stem Cells. 2004;22(7):1330–1337.
- Troyer DL, Weiss ML. *Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population.* Stem Cells. 2008;26(3):591–599.
- El Omar R, Beroud J, Stoltz JF, Menu P, Velot É, Decot V. *Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies?* Tissue Eng Part B Rev. 2014;20(5):523–544.
- Barry FP, Murphy JM. *Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization.* The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2004;36(4):568–584.
- Fina L, Molgaard HV, Robertson D, et al. *Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells.* Blood. 1990;75(12):2417–2426.
- Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, et al. *Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors.* Blood. 2000;95(3):952–958.
- Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H. *Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood.* Transfusion. 2004;44(5):642–648.
- Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, et al. *Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia.* Stem Cells. 2003;21(1):50–60.
- Baksh D, Yao R, Tuan RS. *Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow.* Stem Cells Dev. 2007;16(4):513–522.
- Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. *Human umbilical cord perivascular cells (HUCPVCs) maintain multipotency and produce proangiogenic molecules.* Stem Cells. 2005;23(9):1284–1294.
- Harrell CR, Simovic Markovic B, Fellabaum C, Arsenijevic A, Volarevic V. *Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived exosomes in the treatment of eye diseases.* Front Cell Dev Biol. 2019;7:85.
- Kogler G, Sensken S, Airey JA, et al. *A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential.* J Exp Med. 2004;200(2):123–135.
- Bühring HJ, Tremel S, Cerabona F, et al. *Phenotypic characterization of distinct human bone marrow-derived mesenchymal stem cell subsets.* Stem Cells Dev. 2007;16(5):887–896.
- Fong CY, Chak LL, Biswas A, et al. *Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells.* Stem Cell Rev Rep. 2010;6(3):385–393.