

## TRANSPLANTAREA CELULARĂ: ACTUALITĂȚI ȘI PERSPECTIVE

*Acad. Ion ABABII*

*Dr.hab., prof. univ. Pavel CIOBANU*

*Dr. hab., prof. univ. Viorel NACU*

*Dr. hab., prof. univ. Boris TOPOR*

*Dr. hab., prof. univ. Filip GORNEA*

*USMF „Nicolae Testemițanu”*

### NEWS AND PERSPECTIVES IN CELL TRANSPLANTATION

**Summary:** The article presents the review on the problems of the cells transplantation, particularly the stem cells transplantation, about their role in the human organism, methods of obtaining and possibilities for optimization of the regeneration process. The opportunity of the cells cultures use in the cell-replacement therapy of diseases and some received results in this area. The global and national priority in tissue engineering and cells transplantation.

**Keywords:** stem cells, cells cultures, cells therapy, tissue regeneration.

**Rezumat:** Articolul prezintă o trecere în revistă a diferitor aspecte privind transplantarea celulară și, în particular, a celulelor stem. Este evocat rolul lor în organismul uman, metodele de colectare și posibilitățile de optimizare a procesului de regenerare; oportunitățile de utilizare a culturilor celulare în terapia de înlocuire a celulelor în diverse maladii și rezultatele obținute în acest domeniu; prioritățile mondiale și naționale în ingineria tisulară și transplantarea celulară.

**Cuvinte-cheie:** celule stem, culturi celulare, terapie celulară, regenerarea țesuturilor.

Organismul uman este în stare să se autorepare, adică să regenereze țesuturile deteriorate, proces în care un rol important îi este atribuit celulelor stem capabile să stea la baza formării diferitelor țesuturi în caz de necesitate. Pionieratul în efectuarea cercetărilor respective îi aparține savantului rus A. Fridenștein, care în 1960 a inițiat nu numai studiarea acestor elemente ca celule predecesorii hematopoietice, dar și elucidarea rolului lor în regenerarea altor țesuturi [20].

Actualmente, terapia cu celule stem constituie o direcție nouă în medicina modernă, numită medicina regenerativă, care include transplantarea celulară pentru tratamentul diverselor maladii. Strategiile de bază ale medicinei regenerative sunt terapia celulară, terapia genică și ingineria tisulară.

Medicina regenerativă este un domeniu în plină afirmare al biotehnologiei, reprezentată de tehnicile de vârf care vizează refacerea anatomică a țesuturilor deteriorate sau degenerate și reechilibrarea lor funcțională. În ultimul deceniu, o atenție deosebită se acordă utilizării materialelor embrionare, culturilor celulare pentru optimizarea și activizarea proceselor de regenerare suprimate, sau înlocuirea defectelor tegumentare survenite ca rezultat al eliminării pe cale chirurgicală sau al unui traumatism banal de țesuturi (os, piele, mușchi). În prezent, transplantologia clinică se confruntă cu multiple probleme de ordin etic, costul major al intervențiilor chirurgicale, cu aspecte legate de obținerea materialului pentru transplantare și de rejețul organelor sau a grefelor transplantate [2, 4].

Descoperirile de la finele secolului XX, realizate în biologia moleculară și cea celulară, deschid largi perspective pentru dezvoltarea biotehnologiilor noi, ceea ce va permite tratamentul unui șir de patologii actualmente greu de vindecat. O direcție promițătoare constituie cultivarea celulelor stem, pluripotente, precum și a celulelor predecesorii ale diferitelor structuri tisulare, separate din țesuturi embrionare, fetale și din organismul matur. Ghidarea diferențierii celulelor stem in vitro ar permite obținerea materialului biologic necesar pentru tratamentul de substituție a diferitelor maladii. E necesară elaborarea tehnologiilor de obținere a unui material celular cu capacități enorme de regenerare și fără efecte antigenice pronunțate, care la rândul său conduce la rejețul grefei transplantate [12, 14].

Actualmente, multiple cercetări au pus în evidență faptul că celulele din măduvă osoasă, crescute în laborator în condiții specifice, se dezvoltă în celule osoase, cartilajinoase, adipoase și musculare. Astfel, celulele măduvei osoase sunt o sursă nu numai pentru celulele hematopoietice, ci și pentru cele mezenchimale, a căror dezvoltare poate fi direcționată în formarea in vitro a celulelor necesare. Probabil, după preluarea corespunzătoare și inocularea în mediul respectiv, aceste celule pot fi capabile să restabilească integritatea morfologică și cea funcțională a țesuturilor în regiunea administrării [4, 5, 16].

**Scopul studiului** este de a cerceta proprietățile materialelor biologice (monocomponente și compozite) cu substrat celular în calitate de remedii pentru restabilirea defectelor țesuturilor și organelor afectate.

#### Obiective de cercetare:

1. Studiarea posibilităților de obținere a celulelor din măduvă osoasă, sânge ombilico-placentar

și sânge periferic și studiul in vitro al capacităților de diferențiere în diverse tipuri de celule caracteristice diferitor țesuturi.

2. Evaluarea capacităților de proliferare a celulelor mononucleate și elucidarea duratei viabilității celulelor din măduvă osoasă și celor din sângele ombilico-placentar in vitro.

3. Elaborarea unei grefe compozite celulare și matrice osoasă demineralizată pentru optimizarea procesului de consolidare osoasă dereglat.

4. Studiul comparativ al capacității grefelor celulare din măduvă osoasă, celulelor ombilico-placentare, autoos morselat și grefe compozite (celulare cu Matrice Osoasă Demineralizată) de recuperare a defectului critic al osului lung radial (la iepure).

5. Stabilirea indicațiilor și contraindicațiilor utilizării grefelor celulare și celor de țesuturi în tratamentul defectelor tisulare.

6. Determinarea proprietăților antigenice și influenței celulelor embrionare osteomedulare implantate în organism asupra reactivității imunologice în cazuri de fracturi experimentale.

### **Materiale, metode și rezultate**

**Celulele predecesorii pot fi:** 1. *Totipotente* – acestea sunt celulele din care se poate dezvolta orice tip de celule prezente în organismul uman. După fecundarea ovulului, zigotul se divide, formând celule identice, fiecare din ele, dacă ar fi implantate în uter separat, ar putea da naștere unui embrion. Aproximativ la 4 zile de la fecundare, se formează blastocitul cu stratul extern (din care se dezvoltă placenta și a.), iar din masa celulară plasată intern se dezvoltă practic toate organele și țesuturile embrionului [1, 3, 18].

2. *Pluripotente* – sunt descendente ale celulelor totipotente. Celulele pluripotente pot fi obținute nemijlocit din masa celulară internă a blastocitului sau de la embrionul, din regiunea de unde are loc dezvoltarea gonadelor (celule fetale). Acest tip de celule se numesc embrionare. O altă metodă de obținere a celulelor pluripotente poate fi efectuată prin inocularea nucleului unei celule somatice în ovul denucleat, din care poate să se dezvolte un embrion – clonarea [7].

3. *Multipotente*, cele care produc celule dintr-o singură familie, progenitoare ale celulelor din diferite țesuturi. Drept exemplu ar fi celulele stem hematopoietice, responsabile de înnoirea continuă a celulelor sangvine, din care se dezvoltă eritrocitele, limfocitele, leucocitele etc. Celulele stem sunt prezente nu numai în țesuturile embrionului, dar și în ale nou-născutului și ale celui matur [7].

### **Surse pentru obținerea celulelor stem**

*Autocelulele*, considerate actualmente unul dintre cele mai cu perspectivă materiale pentru terapia cu celule și inginerie tisulară. O sursă sigură de celule predecesorii este măduva osoasă, care este bogată în celule progenitoare, astfel se cercetează posibilitatea utilizării lor în optimizarea și activizarea procesului reparativ în diferite țesuturi, în caz de afectare [2, 5, 6, 20]. Concomitent, există tehnologii de obținere a celulelor stem din sângele periferic, după administrarea prealabilă a preparatelor hematopoetice, ce stimulează exodul celulelor stem din măduva osoasă în patul sangvin, apoi, folosind utilajul special, are loc separarea și utilizarea lor pentru transplantare. Avantajele utilizării autocelulelor sunt evidente prin lipsa conflictului imun (rejecția grefei); este redusă la minimum posibilitatea de contaminare a pacientului cu maladii hematotransmisibile, această utilizare fiind favorabilă din considerente etice [1]. Dezavantajul constituie limita de vârstă la care este rezonabil de cultivat autocelule. Se consideră că la făt unei celule stem îi revin 10 000 celule sangvine, la vârsta de 15 ani – 1:100 000, la 50 de ani 1:500 000. Sunt comunicări despre posibilitatea obținerii celulelor stem din țesut adipos, mucoasa nazală etc. [20].

La autocelule, de asemenea, pot fi atribuite celulele din sângele cordonului ombilical, amnion, țesuturile ombilico-placentare, lichidul amniotic care se colectează la nașterea fătului, din care se separă celulele stem și se crioconservează, păstrându-le la temperaturi joase timp îndelungat. La necesitate se utilizează pentru tratamentul donatorului [15].

*Grefele celulare alogene* – sunt cele obținute de la donator de aceeași specie. În acest tip de celule se includ celulele din măduvă osoasă, din sângele cordonului ombilical, care reprezintă celulele compartimentelor hematopoietic și limfopoietic ale măduvei osoase sunt celule sușe pluripotente și celule adulte eritrocitare, granulocitare, trombocitare, monocitare, limfocitare, plasmatică [2, 17] etc. Transplantarea celulelor alogene hematopoietice se utilizează de mai mult timp pentru tratamentul unor maladii sangvine – anemii congenitale, leucemii, unele maladii cu dereglări de metabolism, dereglări ale sistemului imun, precedat de insuficiență imunitară etc. O cerință dură, dificil de asigurat în efectuarea acestei transplantări, este corespunderea între HLA a recipientului și a donatorului. Din cauză polimorfismului sistemului HLA, au fost create bănci de țesut prin care se face selectarea pacienților și donatorilor, însă nu întotdeauna este posibil de a găsi donatorul necesar.

**Celulele fetale** au atras atenția transplantologilor prin faptul că țesuturile embrionare nu au un sistem imun format care micșorează probabilitatea complicațiilor după transplantare. O mare parte din celulele ce constituie acest țesut sunt slab diferențiate, dispun de un grad mare de proliferare și-s capabile să formeze colonii de celule care participă la regenerarea organului. Anume aceste capacități ale țesutului fetal și sistemul imun imatur asigură un efect terapeutic adecvat, fără agresivitate imună a celulelor transplantate față de recipient. De obicei, aceste celule sunt obținute din materialul embrionilor umani de 9-12 săptămâni [18, 21].

**Culturi celulare ombilico-placentare umane.** Este necesar de subliniat că ideea creării unor bănci de sânge ombilical a apărut din mai multe considerente și anume: colectarea sângelui ombilical este ușor de efectuat, nu-i provoacă niciun rău donatorului și părinții pot stoca, la nașterea copilului, o rezervă de celule stem hematopoietice, care fiind crioconservate pot fi păstrate un timp îndelungat, practic nelimitat. Pentru prima dată, transplantarea celulelor stem, obținute din sângele ombilical de la soră, a fost efectuată în 1988 la un copil de 6 ani, cu anemie Fanconi [10]. Până în prezent au fost efectuate peste 3000 de transplantări celulare din sângele cordonului ombilical la copii și la maturi.

**Culturi celulare xenogene.** Este un aspect mai puțin cercetat în lume, în ceea ce privește utilizarea lor în terapie. Mai frecvent sunt utilizate în procesul de cercetare în virusologie, bacteriologie etc. În Republica Moldova, au fost efectuate cercetări experimentale privitor la eficacitatea utilizării celulelor osteomedulare obținute din embrionii de pasăre (găină și prepeliță) și utilizate în tratamentul a sute de pacienți cu deficiențe ale aparatului locomotor, marcând succese considerabile [6, 21].

#### **Direcțiile de cercetare privind utilizarea celulelor stem în terapia celulară**

În ultimii ani, datorită unor cercetări fundamentale de succes care permit cultivarea diferitelor tipuri de celule, se dezvoltă transplantarea celulară nu numai în aspectul cercetărilor fundamentale, dar și a utilizării lor în terapia unei diversități considerabile de patologii ale organismului uman. Actualmente se studiază procesul de diferențiere a țesuturilor și a celulelor; elucidarea mecanismelor în embriogeneza țesuturilor și a organelor; studierea interacțiunii diferitelor celule; formarea organelor in vitro; modelarea diferitelor maladii genetice umane; studierea mecanismelor de îmbătrânire și posibilitatea întineririi țesuturilor; obținerea himerelor genetice

pentru studierea mecanismelor imunității, rejetelor tisulare imune etc.

Domeniile posibile de utilizare a celulelor stem sunt: hematologie; cardiologie; endocrinologie; dermatologie; oncologie; patologii ale sistemului nervos central și periferic; hepatologie; oftalmologie; otorinolaringologie; ortopedie și traumatologie etc. [8, 9, 11, 13].

Funcția specifică morfogenetică a celulelor stem permite reglarea proceselor reparatorii în diferite organe – rinichi, ficat în afecțiuni toxice, ateroscleroză, osteoartroze, pseudoartroze, distrofii osoase. Sunt efectuate cercetări pentru creșterea dinților prin metoda ingineriei tisulare, care se realizează prin două metode: 1. Prin dentogeneză directă, când de la embrion se colectează mugurele dentar; 2. Prin dentogeneză indirectă, când formarea dintelui are loc extraalveolar.

În pofida discuțiilor controversate privitor la eficacitatea, siguranța și oportunitatea utilizării celulelor stem în terapia umană, se lărgeste spectrul lor în clinică: tratamentul maladiilor sangvine (leucemii, anemii, maladii metabolice); tratamentul maladiilor congenitale imunodeficiente; corecția stărilor imunodeficitare după chimioterapie și radioterapie; tratamentul maladiilor genice (metabolice, degenerative); tratamentul insuficienței hepatice acute, cirozei maladiilor congenitale metabolice ale ficatului; tratamentul miostrofiofilor; tratamentul maladiilor degenerative ale sistemului nervos, ictusului cerebral, parchinsonismului etc.; tratamentul maladiilor genetice și degenerative ale sistemului reproductiv; tratamentul diabetului insulinodependent; tratamentul maladiilor degenerative ale pielii, mucoasei, cartilajului și a. [11, 14, 17, 19].

Firma biotehnologică Osiris Therapeutics a obținut tulpini de celule stem mezenchimale din bioplate ale măduvei osoase de la donatori. Din bioplat se obțin aproximativ 1 mil. de celule stem, care se multiplică prin cultivare până la 500 mil., ulterior aceste celule sunt administrate în fluxul sangvin al pacienților după radio, chimioterapie, pentru a stimula formarea coloniilor de celule progenitoare în măduva osoasă a pacientului, întru restabilirea hematopoezei și rezervelor de celule stem în măduva osoasă.

#### **Mecanismul de acțiune**

În mare măsură, mecanismul de acțiune a celulelor transplantate rămâne neelucidat până la sfârșit și, deseori, folosirea practică a metodei anticipează argumentarea științifică.

S-a observat că după transplantarea celulară se

activizează proliferarea celulelor lojei recipiente și restabilirea parțială sau integrală a structurii și funcției organului. Acțiunea morfoinductivă se argumentează prin eliminarea citochinelor de către celulele transplantate și interacțiunea intercelulară cu celulele gazdă. Totodată, celulele embrionare de la donator formează colonii în organele afectate ale recipientului și, proliferând, înlocuiesc celulele deteriorate ale organismului formând țesut funcțional morfologic corespunzător regiunii afectate [11, 13, 14].

O atenție deosebită se acordă celulelor stem după ce, în 1998, cercetătorii Tompson D. și Gherhard D. au obținut tulpini imortale de celule stem. În 1999, revista *Sciens* a apreciat această descoperire ca fiind a treia după importanță, după descifrarea spiralei ADN și genomului omului. Necesitățile medicinei în acest tip de material sunt enorme. Numai 10-20% din cei care necesită transplant de organ se tratează, 70-80% decedază fără a obține tratamentul necesar, fiind pe lista de așteptare a transplantelor. Este în interesul milioanei de oameni efectuarea investigațiilor în acest domeniu.

Trebuie de menționat că ideea utilizării culturilor celulare osteomedulare embrionare în tratamentul diferitelor afecțiuni ale aparatului locomotor a fost lansată la noi în anul 1971 de către profesorul Pavel Ciobanu împreună cu conferențiarul Nicolae Cereș. Ei și-au propus utilizarea celulelor embrionare în calitate de stimulatori ai procesului de consolidare a fracturilor. În anul 1975, problema în cauză a fost examinată la Consiliul științific al Institutului de Cercetări Științifice în Traumatologie și Ortopedie (Moscova 12.01.75), fiind evaluată ca metodă de perspectivă, recomandându-se continuarea cercetărilor în cadrul USMF „Nicolae Testemițanu”. Au fost efectuate experimente, in vitro și in vivo pe animale. Ulterior, a fost utilizată în clinică, la pacienții cu consolidare lentă a fracturilor, pseudoartroze și osteomieliță post-traumatică a oaselor lungi [2, 5, 6, 14, 21].

Un alt aspect al transplantării celulare a fost promovat de profesorul I. Șroit și colaboratorii, care au propus utilizarea autolimfocitelor activate în tratamentul afecțiunilor inflamatorii în Otorinolaringologie, Ginecologie, Oftalmologie [1, 2].

Trebuie de menționat că în urma studiilor fundamentale și aplicative au fost elaborate mai multe publicații științifice, inclusiv 13 monografii, 206 articole publicate în reviste internaționale și naționale recenzate, dintre care 16 – în reviste cu factor de impact (Pubmed). Autorii au fost citați în reviste internaționale de 136 de ori (conform Google scho-

lar citations), au obținut 121 de brevete de invenții. Rezultatele cercetărilor au fost apreciate în cadrul Expozițiilor Naționale și Internaționale cu 24 medalii de aur, 18 medalii de argint, 14 medalii de bronz și 12 diplome de excelență. Dispun de 30 de premii și distincții.

Cercetările efectuate pe parcursul a peste 30 de ani s-au soldat cu crearea Laboratorului „Inginerie tisulară și culturi celulare”, în anul 2007, și a unui obiect nou de studiu „Medicină regenerativă”, în cadrul USMF „Nicolae Testemițanu” în anul 2011.

### Concluzii

1. Actualmente, terapia cu celule este o direcție prioritară în medicina modernă. Utilizarea acestui tip de transplant celular reprezintă o alternativă a tratamentului medicamentos și o cale posibilă de soluționare a problemelor legate de insuficiența cantitativă a materialului destinat transplantării.

2. Pentru dezvoltarea acestei direcții științifico-practice, urmează să se concentreze potențialul experimental și clinic actual la efectuarea cercetărilor în acest domeniu prin adoptarea unui **Program Național de Transplantare Celulară**, fapt care ar stimula utilizarea acestor inovații în mai multe ramuri ale medicinei.

3. În acest scop ar fi binevenită crearea unui Centru de Tratamente Inovaționale în cadrul Clinicii Universitare al USMF „Nicolae Testemițanu”.

### Bibliografie

1. Ababii I., Șroit I., Gladun E., Ghidirim Gh. *Stimularea imunității locale în tratamentul procesului inflamator*: Chișinău, 2004, 333 p.
2. Ababii I., Ciobanu P., Ghidirim Gh., Nacu V., Șroit I. *Optimizarea regenerării reparatorii a țesuturilor și imunogenezei locale în contextul funcționării nanosistemelor naturale*. Chișinău. „Tipografia Centrală”, 2011, 336 p.
3. Bianco P., Robey P. *Mesenchymal Stem Cell: clinical applications*. J. Clin. Invest. 2000, v.105, p.1663-68.
4. Bruder S. P., Kurth A. A., Shea M., Hayes W.C., Jaiswal N., Kadiyala S. *Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells*. J Orthop Res. 1998, Mar; 16(2): p.155-162.
5. Ciobanu P. I., Lavrișeva G. și al. *Stimularea osteogenezei prin celule osteomedulare în complicațiile la fracturi*. Chișinău, 1989, 200 p.
6. Ciobanu P. I. *Activizarea osteogenezei reparatorii prin celule osteomedulare*. Dis. D.H. în st. med. Chișinău, 1994, 232 p.
7. Deans R. J., Moseley A. B. *Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses*. Exp Hematol, 2000, V. 28, p. 875-884.

8. Duailibi M. et al. *Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells*. J.Dent Res., 2004; 83,7, p.523-528.
9. Ferrari G., Mavilio F. *Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors*. Science, 279 (March 6):1998.
10. Glucman E. *Hematopoietic Stem-Cell transplants using umbilical-cord blood*, N.Engl.J. Med 2001, 344(24), p.1860-1861.
11. Leung Y, Kandyba E, Chen YB, Ruffins S, Kobielak K. *Label Retaining Cells (LRCs) with Myoepithelial Characteristic from the Proximal Acinar Region Define Stem Cells in the Sweat Gland*. PLoS One. 2013 Sep 18;8(9):e74174.
12. Liu S., Qu Y., Stewart T. J. et al. *Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation*; Proc.Natl. Acad.SciUS; 2000, V. 97, p.6126-31.
13. Mizuno H., Tobita M., Uysal A.C. *Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine*. Stem Cells. 2012 May;30(5):804-10. doi: 10.1002/stem.1076.
14. Nacu V. *Optimizarea regenerării osoase post-traumatice dereglate*. Chişinău: „Tipografia – Sirius”, 2010. 188 p.
15. Shmji Tomita, Ren-Ke Li, Richard D. Weisel. *Autologous Transplantation of Bone Marrow Cells Improves Damaged Heart Function*, Circulation, Nov., 9, 1999.
16. Thomson J. et al. *Embryonic stem cell lines derived from human blastocyst*. Science, 1998,V. 282, p.1145-1147.
17. Walia B, Satija N, Tripathi RP, Gangenahalli GU. *Induced pluripotent stem cells: fundamentals and applications of the reprogramming process and its ramifications on regenerative medicine*. Stem Cell Rev. 2012 Mar; 8(1):100-15. doi: 10.1007/s12015-011-9279-x.
18. Wagner J. *Umbilical cord transplantation*. Leukemia. 1988, Vol.12., Suppl 1, p.30-32.
19. Гололобов В. Г., Дулаев А. К., Деев Р. В. *Новый подход к лечению дефектов длинных костей конечностей. От культур in vivo к культурам in vitro*. В кн.: *Анатомия и военная медицина. Сборник науч. работ конф., посвящ. 80-летию со дня рождения проф. Е.А. Дыскина*. СПб., ВМедА, 2003, с. 104 – 106.
20. Фриденштейн А. Я., Лалькина К. С. *Индукция костной ткани и остеогенные клетки-предшественники*. М. Медицина, 1973, 224 с.
21. Чобану П. И. *Биологическая активность аллогенных эмбриональных костно-мозговых клеток*. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. Nr. 4, 1982. с. 95-97.



Iurie Platon. *Zbor*, gresie, 1000×600×300 mm, 2001