

Ministerul Sănătății al Republicii Moldova
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
“Nicolae Testemițanu”

FACULTATEA MEDICINĂ

Laborator Inginerie tisulară și culturi celulare

Catedra Anatomie Topografică și Chirurgie Operatorie

TEZA DE DIPLOMĂ

CELULELE STEM DIN FLUIDUL AMNIOTIC, PARTICULARITĂȚI DE
PROLIFERARE ȘI DIFERENȚIERE

Crețu-Babanuță Natalia

Anul VI, grupa 1610

Conducător științific:

Nacu Viorel, dr.hab., profesor universitar

Chișinău, 2014

CUPRINS

Abrevieri	4
INTRODUCERE	5
I. REVISTA LITERATURII	8
1.1 Lichidul Amniotic .Noțiuni generale	8
1.1.1 Formarea și volumul LA pe parcursul sarcinii	8
Fiziologia LA	9
Volumul	10
Căile de pasaj ale LA	11
Compoziția LA	12
Citologia LA	17
1.2 Celule stem.Generalități.	18
Tipuri de celule stem	19
Funcția biologică a celulelor stem	19
Limitele capacității de regenerare a celulelor stem	20
II. MATERIAL ȘI METODE DE CERCETARE	21
2.1 Metode de colectare a LA	21
2.1.1 Amniocenteza	21
2.1.2 Amniotomia	24
2.1.3 Colectarea LA din camera posterioară în timpul expulziei fătului	26
2.1.4 Colectarea LA în timpul cezarienei	26
2.2 Protocol de prelucrare a LA	26
2.3 Pregătirea frotiurilor	27
2.3.1 Colorația după Romanovski-Giemsa	27
2.3.2 Colorația cu albastru de metilen	27

III. REZULTATE ȘI DISCUȚII	29
3.1 Analiza primară a LA	29
3.2 Analiza frotiurilor	29
3.2.1 Frotiurile native	29
3.2.2 Frotiurile colorate	30
3.3 Rezultatele studiului efectuat în baza articolelor medicale	35
3.3.1 Imunofenotipul celulelor stem	35
3.3.2 Particularități de diferențiere și proliferare	36
3.3.3 Celulele stem din fluidul amniotic în tratamentul CUN	36
IV. CONCLUZII	38
BIBLIOGRAFIE	39

Abrevieri

Afsc –amniotic fluid stem cells (celule stem din fluidul amniotic)

Bi -bismut

Ca -calciu

Cl -clor

Cu -cupru

CUN –colita ulcero-necrotică

Fe -fier

Hafs –human amniotic fluid stem cells (celule stem umane din fluidul amniotic)

K -kaliu

LA –lichidul amniotic

Mg -magneziu

MRI –Magnetic Resonance Imaging (rezonanța magnetică)

Na -natriu

P -fosfor

Pb -plumb

Zn –zinc

INTRODUCERE

Actualitatea și gradul de studiere a temei investigate.

Medicina regenerativă care are ca bază studierea celulelor stem reprezintă una din cele mai noi ramuri ale medicinei contemporane .Un obiectiv major în acest domeniu de cercetare este de a identifica surse potențiale noi de celule stem sau celule precursorare fără a ridica problemele etice întâlnite în cercetarea celulelor stem embrionare .Este cea care revolutionează și lungește speranța de viață dar nemijlocit și calitatea acesteea.Drept dovada că această ramură este în continuă evoluție și progres fiind esențială pentru viitor este Premiul Nobel pentru Medicină și Fiziologie din 2012 .Acesta a fost acordat unui medic japonez – Shinya Yamanaka și unui cercetător britanic- Sir John Gurdon [31] ,doi ași în cercetarea celulelor stem, pentru descoperirea faptului că celulele mature pot fi reprogramate pentru a deveni pluripotente.[28] Progresele făcute în ultimii ani în ceea ce privește izolarea, caracterizarea și diferențierea celulelor stem, au adus noi speranțe în dezvoltarea de terapii celulare ce pot fi utilizate în tratamentul unor boli considerate azi incurabile. În ciuda faptului că testele genetice de rutină cu lichid amniotic sunt indicate tot mai des , cunoștințele actuale referitor la compoziția și proprietățile acestuia sunt încă limitate .[6,7]

Celulele stem sunt celule nediferențiate sau nespecializate și au capacitatea de a se divide la infinit ,astfel aceasta proprietate de bază a și fost folosită ca pilon în căutarea unor noi metode de tratament pentru unele boli anterior incurabile. Surse de celule stem pot servi: organismul adult,celulele embrionare,celulele canceroase,celulele de la nivelul cordonului ombilical ,lichidul amniotic.Funcția biologică a celulelor stem adulte este de a contribui la procesul de vindecare, un exemplu elocvent îl reprezintă procesul de înlocuire a celulelor sangvine îmbătrânite cu celule stem hematopietice, care se află în măduva osoasă.Astfel în funcție de organele unde vor fi implantate acestea se pot transforma în celule osoase,hepatice,musculare,pulmonare,celule ale creierului,sangvine.Aceste celule au

un ritm foarte alert de creștere ,iar uneori evoluția lor nu poate fi ținută sub control. Lichidul amniotic este o sursa bogată de celule mezenchimale, iar celulele stem derivate sunt similare atât celulelor stem embrionare cât și celulelor stem adulte, putându-se diferenția în mai multe tipuri de celule. Celulele stem din lichidul amniotic pot fi stocate în bănci similar celulelor stem din sângele ombilical, au rata mare de multiplicare și pot fi exploatate fără pierderea integrității cromozomiale.[39,47,48,]

Cercetarea în domeniul utilizării celulelor stem adulte cu scop terapeutic are un trecut de aproximativ 4 decenii.În anul 1978 E.Donall Thomas împreună cu colaboratorii săi au adus la cunoștință rezultatele studiului lor: introducerea intravenoasă a celulelor stem extrase din maduva osoasă ,asupra pacienților cu leucemie . Pentru această descoperire senzațională aceștia au primit Premiul Nobel. Această descoperire a fost revoluționară în tratamentul pacienților cu forme grave de boală, astfel încât această metodă a început cu timpul să înlocuiască în unele cazuri transplantul de măduvă osoasă.De asemenea celulele stem sunt utilizate ca bază pentru creșterea de organe un factor foarte important pentru transplantologie, unde problema principală o constituie insuficiența permanentă de material de translatat,unde orice minută costă viața unui om.

Cercetarile din ultimii ani au demonstrat faptul că celulele stem derivate din placenta umană au proprietăți de diferențiere multipotentă și imunogenitate slabă, iar ținta următoare este explorarea mecanismelor prin care celulele stem din lichidul amniotic ar putea fi folosite în tratarea fibrozei pulmonare.

Scopul și obiectivele studiului:

Scopul tezei date este cercetarea celulelor lichidului amniotic și posibilitatea utilizării lor în medicina regenerativă.

Obiectivele tezei sunt următoarele:

1. Studierea bibliografiei la tema.

2. Studiarea protocolului de obtinere a celulelor stem din lichidul amniotic
3. Determinarea componentului celular al lichidului amniotic.
4. Caracterizarea componentului celular.
5. Posibilități de utilizare terapeutică.

Noutatea științifică a rezultatelor obținute.

Celulele stem originare din lichidul amniotic au o capacitate de proliferare mai mare decât celulele stem din măduva osoasă. În componența citologică a lichidului amniotic se găsesc toate tipurile elementelor sangvine și în special celulele progenitoare tinere conform schemei hematopoiezei.

Importanța teoretică și valoarea aplicativă a lucrării.

Făcînd o paralelă între celulele stem embrionare și celulele stem originare din lichidul amniotic, cele din urmă prezintă un avantaj – modul de recoltare. Dacă celulele embrionare sunt recoltate dintr-un embrion ce urmează să trăiască, celulele stem se recoltează din lichidul amniotic, care oricum urmează a fi eliminat.

Astfel este de primă necesitate studiarea celulelor stem din fluidul amniotic pentru a studia particularitățile de proliferare și diferențiere ca mai apoi să putem deduce în baza acestor rezultate noi metode de tratament și de a evita erorile terapeutice.

Acest studiu reprezintă baza științifică pentru a recomanda în viitor stocarea la naștere a celulelor stem amniotice, alături de cele din sângele placentar. Acestea vor putea fi utilizate pe parcursul vieții individului, în vederea tratării prin terapie celulară a unor boli considerate azi incurabile.

I. REVISTA LITERATURII

1.1 Lichidul amniotic – noțiuni generale.

Lichidul amniotic sau fluidul amniotic a fost pentru prima dată izolat și studiat pe la începutul secolului XX (Brace și al., 1989). Mai recent, în anii '60-'70 a existat un interes crescut în cultivarea și caracterizarea celulelor ce se conțin în lichidul amniotic (Huisjes HJ, 1970; Marchant GS, 1971). Cu toate acestea, lichidul amniotic era mai mult studiat pentru a determina starea fătului pe perioada sarcinii. Mai recent începând cu anii '90 a apărut un interes aparte față de celulele stem din lichidul amniotic (Torricelli, 1993). [16]

Lichidul amniotic reprezintă conținutul în care se află embrionul iar mai apoi fătul. Cavitatea amniotică este delimitată de membrana amniotică (amnios), membrana corială și caducă, formându-se din luna a II-a a sarcinii.

Lichidul amniotic înconjoară fătul pe parcursul dezvoltării intrauterine. Acest lichid creează condiții favorabile pentru dezvoltarea normală a fătului, protejează fătul, placenta și cordonul ombilical de traumatisme externe, menține temperatura constantă, permite acomodarea fătului în cavitatea uterină și mișcările lui, protejează fătul de infecția ascendentă; funcționează ca rezervor și sursă a lichidului și substanțelor nutritive pentru făt. În plus, cantitatea moderată a lichidului amniotic este necesară pentru dezvoltarea și maturizarea plămânilor fetale. În travaliu lichidul amniotic contribuie la deschiderea colului uterin, lubrefiază tractul genital, previne compresiunea cordonului ombilical și asigură repartizarea uniformă a forțelor de contracție asupra fătului. Modificările calitative și cantitative ale acestuia reflectă starea intrauterină a fătului și permit de a aprecia cum decurge dezvoltarea copilului, [18,21,22]

1.1.1 Formarea și volumul lichidului amniotic pe parcursul sarcinii

Hippocrate a fost primul care afirma ca lichidul amniotic își are originea din urina fetală. Ceva mai târziu ,Harvey studiază circulația lichidului amniotic , iar Claude Bernard emite ipoteza ca lichidul amniotic își are originea din surse materne ,ceea ce se explică prin aceea că lichidul amniotic și serul sanguin sunt medii interne.[8]

Lichidul amniotic este derivat atât din urina fetală cât și în rezultatul activității de perfuzie maternă a corioamnionului. Cu toate acestea , în al doilea și al treilea trimestru , acesta este constituit în principal de urina fetală .

Fiziologia lichidului amniotic.

Se disting 5 mecanisme :

- 1.urina fetală
- 2.deglutiția
- 3.plămînii fetali
- 4.membranele coriale și placentă
- 5.derivatele epiblastului:pielea și straturile cordonului ombilical

Contribuția urinei fetale la formarea lichidului amniotic.

Reprezintă sursa majoră de lichid amniotic ,primele urini formîndu-se aproximativ la săptămîna a 11-a de amenoree , cea mai mare cantitate de urină se formează în a doua jumătate a sarcinii.

Tabelul 1.1

Dinamica urinei fetale în componența lichidului amniotic

Termenul de sarcină	Volumul de urină/kg/24 h
25 săptămîni de amenoree	110 ml
39 săptămîni de amenoree	190 ml
La termen aproximativ	700-900 ml

Participarea deglutiției :

Deglutiția se declanșează odată cu primele urini ,la termen se deglutează aproximativ 700 ml/24 h(în momentul respirației) , avînd un rol major în a doua parte a sarcinii.

Participarea plămînilor

Reprezintă a doua sursă de lichid amniotic , fiind important în al doilea trimestru al sarcinii ,producîndu-se 200-400 ml/24 h.

Participarea pielii

Pielea fătului continuă să joace un rol important în reglarea volumului lichidului amniotic pe parcursul sarcinii. Importanța acestei căi este demonstrată de pierderea transcutană înaltă a lichidului la copiii prematuri.

Lichidul amniotic este în dinamică constantă și se reînnoiește la fiecare 3 ore.

Rolurile de bază ale lichidului amniotic sunt:

- mecanic,
- senzorial
- nutrițional.

El asigură în continuu hidratarea fătului și nutriția acestuia. [18,21,22,9]

Volumul:

De obicei sarcina are o durată de 41 săptămîni.de amenoree. Se disting 2 etape în modificarea volumului și anume:

- 1.pîna la 20 de săptămîni se atestă o creștere progresivă a lichidului amniotic , fiind corelație cu masa fătului.
- 2.după 20 de săptămîni volumul rămîne relativ constant aproximativ pînă la săptămîna 33-34 după care scade brusc în jurul celei de a 39-a săptămîni.

Tabelul 1.2

Volumele medii ale lichidului amniotic în dependență de termenul sarcinii

Termenul de sarcină	Volumul de LA
7 săptămîni	20 ml
10 săptămîni	30 ml
16 săptămîni	190 ml
32 săptămîni	780 ml
34 săptămîni	980 ml
40 săptămîni	800 ml
42 săptămîni (termen depășit)	540 ml

[15]

După 34-36 de săptămîni determinarea volumului de lichid amniotic devine mai dificilă din cauza că fătul înghite mai mult fluid.

Limita superioară admisă în cursul unei gravidități normale este de 2000 ml pentru o limită inferioară la 250 ml. Volumul lichidului amniotic este calculat ecografic.[3]

Căile de pasaj al lichidului amniotic:

Se atestă 2 surse primare și 2 rute primare de pasaj a lichidului amniotic pe parcursul celei de a II-a jumătăți a sarcinii. Ca surse primare servesc –urina fetală și lichidul pulmonar , cu o contribuție mică a secretului cavității bucale și nazale. Rutele

primare le constituie deglutiția de către făt și absorbția în sângele fetal , ce perfuzează suprafața fetală a placentei.

Calea potențială finală a schimbului este cea între lichidul amniotic și sângele matern din peretele uterului . Această cale se numește „transmembranaară” , iar calea între lichidul amniotic și sângele fetal de pe suprafața fetală a placentei se numește „intramembranaară” , și ea include toate schimburile pasive între lichidul amniotic și sângele fetal ce persistă și în alte structuri anatomice, ca exemplu pielea fătului și cordonul ombilical.[1,2,4,15,41]

Compoziția LA:

96,4 % apă , densitatea 1,006 , pH 7,10- 7,20 ,vîscozitate 1

Notă:pH-ul servește ca o metodă de diagnostic privind starea fătului intrauterin- pH-ul 6,9-7,0 ne avertizează că fătul este în hipoxie.

1.2.1.Compoziția biochimică:

Analiza biochimică a LA ne redă informații unice referitoare la starea fătului.În prima jumătate a sarcinii chimia fluidului extracelular al fătului se menține.În a doua jumătate acesta reflectă dezvoltarea funcției renale .

- Elemente minerale: Na, K, Ca, Mg, Cl, P, bicarbonați, oligoelemente (Fe ,Cu,Zn,Bi) .

Pe parcursul sarcinii cantitatea de anioni și cationi variază puțin . Na este responsabil de menținerea a 99 % a osmolarității . De la-nceputul sarcinii pînă aproximativ la săptămîna a 20-a osmolaritatea leger scade.Începînd cu săptămîna a 20-a procesul de keratinizare împiedică traversarea liberă a lichidului prin pielea fătului astfel producția urinară devine preponderentă în componența lichidului amniotic. Totuși rinichiul fetal are o slabă proprietate de concentrare a urinei astfel urina fetală este hipoosmolară în raport cu plasma maternă și fetală.Din această cauză se atestă un deficit osmotic constant de 30 mOsm/kg în raport cu serul maternal sau fetal.

Tabelul 1.3

Elementele minerale

	Valorile medii la termen	Evoluția pe parcursul sarcinii
Cationi		
Na	120 mEq/l	135-140 la debutul sarcinii
K	4,4 mEq/l	puține variații
Ca	3,20 mEq/l	puține variații
Mg	1-2 mEq/l	puține variații
Anioni		puține variații
Cl	100 mEq/l	
Bicarbonați	18 mEq/l	puține variații
P	13 mEq/l	puține variații
Oligoelemente		puține variații
Cu	0,30 mg/l	
Fe	0,31 mg/l	puține variații
Zn	0,28 mg/l	puține variații
Pb	0,08 mg/l	puține variații
Bi	0,04 mg/l	puține variații

- Elemente organice :

-acizii aminați:alanina,glutamina,prolina,valina,lizina,treonina,glicina. În primul trimestru al sarcinii compoziția aminoacidică a lichidului amniotic este comparabilă cu cea a urinei și sîngelui fetal ,iar în al doilea trimestru compoziția este independentă de profilul urinar sau sîngele fetal .

Tabelul 1.4

Constantele biochimice

	Valori la termen	Evoluția pe parcursul sarcinii
Acid uric	80 mg/l	Creșterea regulată în timpul sarcinii
Bilirubina	0,3 mg/l	1,3 mg/l la a 15-a săptămîină
Creatinina	22 mg/l	Creștere regulată începînd de la 10-a săptămîină (5 mg/l)
Glucosa	0,10 mg/l	
Ureea		0,12 g/l aproximativ la 10 săptămîni.

[3,14]

Enzimele :

Sunt depistate mai multe tipuri de enzime cele mai importante ar fi :

1-diaminoxidaza , se observă într-o concentrație înaltă dacă de asemenea este crescută și în sîngele mamei. Este o enzimă hepatică a degradării aminoacizilor,nivelul fetal fiind net superior celui matern .Prezența sa în secreția cervico-vaginală permite concretizarea diagnosticului în formele atipice ale ruperii premature a membranelor pungii amniotice.

2-colinesterazele ,

Butilcolinesteraza-prezentă în lichidul amniotic de obicei.

Acetilcolinesteraza- în normă este absentă în lichidul amniotic .Prezența sa indică la un defect de închidere a tubului neural la făt.

3- *enzimele digestive*- prezența lor depinde de fiziologia digestiei fetale.Începînd cu săptămîna a 10-13-a de gestație fiind momentul deschiderii membranei anale are loc inundarea lichidului amniotic de către secrețiile acumulate în tubul digestiv. Maxima se atestă la a 18-a săptămîna , după care scade progresiv la momentul închiderii sfîcterului anal.

Hormonii:

-corticosuprarenali : catecolaminele se atestă mai ales la sfîrșitul sarcinii ,cortizolul este în concentrații variabile.

-prolactina:este secretată de celulele deciduale , care posedă receptori doar la dopamină .(8) Nivelul ei este scăzut pînă la 14 săptămîni crescînd la maxim către 18-a pînă la a 28-a săptămîna -3750 ng/ml, după care scade pînă la a 36-a săptămîna ca să rămîna constantă pînă la termen-500 ng/ml.

-pancreatici:

Insulina și glucagonul provin din urina fetală.

-tiroidieni:sunt depistați deja de la a 10-a săptămîna de sarcină.

-fetoplacentari : gonadotropina corionică,somatotropina, estrogenul , progesteronul sunt variabile în dependență de concentrația lor în serul matern și totuși net inferioare.

Lipidele:

Originea lor încă nu este complet studiată ,cu excepția fosfolipidelor tensioactive.Se cunoaște că nivelul acestora crește în timpul sarcinii, fiind totuși inferior valorii

serice. Prostaglandinele au o valoare net superioară celei serice materne , fiind maxime la debutul travaliului. Pentru diagnosticarea patologiilor membranelor hialine au fost studiate mai profund lecitinele tensioactive. Acestea reflectă foarte exact compoziția surfactantului pulmonar fetal care este secretat de către pneumocitele de tip II .Ele sunt constituite în 75 % din acid palmitic ,fiind o substanță biologic fundamentală care determină proprietățile fizice ale surfactantului pulmonar .Concentrația lipidelor tensioactive crește progresiv pe parcursul sarcinii atingând maxima la 35 săptămîni de gestație .Acestea reflectă maturitatea pulmonilor fetali . [3

Proteinele:

Maxima se atestă la vârsta de 24 săptămîni după care scade pînă la 2,5 g/l către perioada nașterii.Una dintre cele mai importante fracții este 1α -fetoproteina ,marker fetal produs exclusiv de ficatul fetal avînd un nivel foarte înalt în serul fetal –de 1000 de ori mai mare decît în lichidul amniotic și de 1 000 000 mai mult decît în serul mamei. Este depistată începînd cu a 10-a săptămîna de gestație , atingînd maxima la 14-15 săptămîni de sarcină, după care descrește progresiv . Acest fenomen este explicat prin faptul că ea pătrunde în lichidul amniotic prin rinichii fetali imaturi astfel odată cu maturizarea glomerulară această filtrație este blocată.(8)

Factorii de creștere:

Factorii de creștere epidermică așa ca EGF,IGF cresc progresiv pe parcursul sarcinii.

Fibronectina se găsește în cantități enorme în corion și lichidul amniotic . Prezența sa în secrețiile vaginale este un marker că se scurge lichidul amniotic și desigur are loc ruptura membranelor. [17,18,20,21,28

Citologia LA

Celulele prezente în lichidul amniotic au origine atât embrionică cât și extraembrionică. În urmă cu 40 de ani cercetătorii au încercat să caracterizeze aceste celule astfel se disting 4 grupuri de celule:

1. celule eozinofile mari
2. celule bazofile mari
3. celule eozinofile mici
4. celule bazofile mici (1974)

Astăzi se cunoaște că cele mai multe dintre celulele lichidului amniotic sunt derivate din piele , tract digestiv , căile urinare , sistemul pulmonar al fătului și amnion. De asemenea unele celule sunt derivate de la mamă prin traversarea barierei feto-placentare.

Există o diferențiere netă în evoluția compoziției citologice a lichidului amniotic pînă la și după termenul de 20 săptămîni de gestație.

Pe parcursul primelor 20 de săptămîni .

Maxima de celule vivante este depistată în perioada 16-20 săptămîni de gestație .La examinarea acestora diferențiem 2 populații de celule : fibroblastice și epiteliale.Își au originea din descuamarea amniotică sau cutanată.

Ultimele 20 de săptămîni:

Începînd cu săptămîna a 24-a cantitatea de celule începe să scadă rapid , în special cele de descuamare. În această perioadă se depistează o creștere a celulelor ce posedă structuri care se aseamănă cu kerato-hialina. În preajma nașterii aceste celule capătă un conținut dens avînd membrana totuși foarte fină . La microscopia electronică se observă că celulele depistate în această perioadă sunt asemănătoare cu cele de origine fetală : epiderm , cavitate bucală , partea superioară a tractului respirator și epiteliul cordonului ombilical.

În cursul studiilor citologice au fost utilizate mai multe metode de colorare ,în special: Papanicolau și Harris-Schorr. La colorarea cu sulfat de bleu de Nil 0,1 % în soluție apoasă se depistează 2 tipuri de celule colorate:

celule oranj- determinată de prezența lipidelor neutre

celule albastre-deschis –datorată prezenței structurilor cu reacție acidă.

Raportul acestor celule în dependență de vârsta gestațională:

- ❖ pînă la 34 săptămîni < 1%
- ❖ 34-38 săptămîni 1-10 %
- ❖ după 38 de săptămîni 10-50 %

Este vorba de celule moarte sau scuame care sunt colorate cu sulfat de bleu de Nil . Unele celule se colorează în oranj deoarece la suprafața lor aderă o peliculă fină și subțire de lipide neutre sau sebacee sau lecitina din componența surfactantului pulmonar .Astfel aceste celule ne vorbesc despre maturitatea sistemului pulmonar al fătului.[7,10,18,30,38,39]

1.2 Celulele stem. Generalități.

Omul, ca organism pluricelular, este compus din multiple celule diferențiate. Forma lor, capacitățile, proteinele exprimate în fiecare dintre ele sunt diferite, chiar dacă au la origine celula mezenchimală primordială (stem).

Acestea sunt celule nediferențiate sau nespecializate și au capacitatea de a se divide la infinit și de a produce toate cele 220 specii de celule umane.

Totuși aceste celule nu vor putea forma singure organismul uman, pentru că ele au pierdut, între timp, omnipotența, devenind deja "pluripotente" ("capabile de multe"). (Centrul XCell din Düsseldorf și Köln, Germania)

Celulele stem sunt progenitori nediferențiate care au abilitatea de a se divide și dezvolta într-o multitudine de alte tipuri de celule înalt specializate care sunt capabile să formeze țesuturi. (Adriana Aionicesei , MEDICA)

Tipuri de celule stem:

- ❖ celule stem totipotente -acestea sunt celulele din care se poate dezvolta orice tip de celule prezente în organismul uman.
- ❖ celule stem pluripotente - sunt descendente ale celulelor totipotente. Se pot diferenția în toate tipurile celulare , cu excepția celor totipotente. Sunt capabile să formeze țesuturi derivate din toate cele trei foițe embrionare (endoderm, mezoderm și ectoderm). Celule pluripotente pot fi obținute nemijlocit din masa celulară internă a blastocitului sau de la embrion, din regiunea de unde are loc dezvoltarea gonadelor. Tulpinile celulare obținute prin cultivarea acestor celule sunt identice, se numesc embrionare.
- ❖ celule stem multipotente- sunt cele care produc celule dintr-o singură familie, progenitoare ale celulelor din diferite țesuturi.
- ❖ celulele stem oligopotente - se pot diferenția numai în câteva tipuri de celule așa ca celule limfoide sau celule mieloide.
- ❖ celule stem unipotente - aceste celule pot produce un singur tip de celule, dar au proprietatea de a se reînnoi, ceea ce le diferențiază de celulele non-stem.
Surse de celule stem pot fi :
 - organismul adult
 - celulele embrionare
 - celulele canceroase
 - celule de la nivelul cordonului ombilical.
 - lichidul amniotic

Funcția biologică a celulelor stem adulte :

În cazul în care un organ este lezat, celulele stem adulte se îndreaptă spre organul dat și contribuie la procesul de vindecare. În general, organismul uman, în activitatea de zi cu zi, depinde de celulele stem: de exemplu, eritrocitele trăiesc aproximativ 120-130 de zile, după care îmbătrânesc și nu mai pot transporta suficient

oxigen, respectiv trebuie să fie înlocuite. Funcția de înlocuire este asigurată de celulele stem hematopoietice, care se află în măduva osoasă.

Limitele capacității de regenerare :

După un oarecare timp și celulele stem sunt supuse aceluiași proces de îmbătrânire. Cu toate acestea, ele au un potențial de regenerare mult mai mare în comparație cu celulele diferențiate din organism. Se pare că acest potențial este epuizabil abia după 130 de ani de viață. Până în prezent este cunoscut că cea mai în vârstă femeie din lume a trăit 122 ani, în Franța. Procesul de îmbătrânire nu poate fi oprit. Cu toate acestea, medicina contemporană oferă posibilitatea de a extrage celulele stem din organism, de a le selecta, de a le concentra, și de a le administra în țesutul, organul sau pe suprafața afectată. În majoritatea cazurilor, procesul fiziologic de recuperare poate fi intensificat.

Cu posibilitățile curative ale celulelor stem adulte de diferite proveniente se ocupa astazi o noua ramura a stiintei, medicina regenerativa. Cercetarile si aplicarea acestora se extinde de la prepararea si pregatirea corespunzatoare a tesuturilor provenite din celulele stem embrionare, la izolarea celulelor stem adulte din tesuturi si la sporirea numarului lor. Popularitatea cercetarilor privind celulele stem adulte se datoreaza pe de o parte faptului ca specialistii prevad posibilitati terapeutice uriase in tehnica cultivarii tesuturilor si organelor in scopuri terapeutice.[30,38,39]

II. MATERIAL ȘI METODE DE CERCETARE.

Materialul de studiu este lichidul amniotic. LA a fost prelevat de către secția Maternitate a IMSP Cahul.

De asemenea studiul se bazează pe analizarea rezultatelor altor studii științifice în domeniul dat.

2.1 Metode de colectare a LA.

2.1.1. Amniocenteza.

2.1.2. Amniotomia.

2.1.3. Colectarea LA la expulzia fătului din camera posterioară.

2.1.4. Colectarea LA în timpul cezarienei.

2.1.1. Amniocenteza.

Pentru prima dată amniocenteza a fost inclusă în practică de către Bavis(1952) și Lilley(1961).

Definiție: amniocenteza este o procedură invazivă care se face cu scopul de a face testele genetice. Cel mai frecvent aceasta se face la 16-20 săptămâni de sarcină. Ea constă în punctarea transabdominală a cavității amniotice după aprecierea prealabilă a localizării placentei.

Indicații:

- ✓ antecedente obstetricale complicate
- ✓ izoimunizări severe de exemplu :incompatibilitatea Rh dintre mamă și făt.
- ✓ feți morți în antepartum
- ✓ prezența malformațiilor
- ✓ depășirea termenului nașterii
- ✓ suferință fetală
- ✓ diabet zaharat la mamă
- ✓ suspecție la boli genetice
- ✓ mame care au vârsta mai mare de 35 de ani , fiind la prima sarcină

Tehnica amniocentezei:

1. Mai întâi de toate pacienta este informată amănunțit despre etapele procedurii, inclusiv beneficiile și riscurile. Amniocenteza se face în condiții de strictă asepsie-câmp de lucru steril, mănuși sterile, instrumente sterile ș.a.
2. Pacienta trebuie informată că înaintea procedurii vezica urinară trebuie golită în prealabil.
3. După aceasta gravida se așează în poziția Trendelenburg.
4. Se analizează ecografic localizarea placentei după care se aseptizează regiunea investigației în conformitate cu localizarea acesteia, plasarea uterului și contactul cu peretele abdominal. Aseptizarea se face cu alcool iodat sau betadina.
5. Se realizează anestezia locală cu xilină a peretelui abdominal.
6. Se folosește un ac special, care este prevăzut cu un obturator care să evite încorporarea de țesut matern în cursul traversării straturilor abdomenului gravidei (eroare de diagnostic). Lungimea acului variază între 18 cm și 22 cm. Acul are o grosime în general de 0,8 mm, dar pot fi folosite și ace mai groase.
7. Se introduce acul pe linia mediană fiind atent la trecerea fiecărui strat atât tactil, dar mai ales ecografic, vizualizând în permanență vârful acului.
8. Când echoul vârfului acului a ajuns în punga amniotică se extrage obturatorul acului și se extrage 1ml de lichid amniotic care se aruncă (cu scopul de a evita contaminarea cu țesut matern care ar putea rămâne pe ac) apoi se extrage o cantitate de lichid amniotic în dependență de vârsta sarcinii și extensibilitatea investigației, variază între 5 și 40 de ml.
9. Lichidul extras este mai apoi centrifugat și analizat.

Complicații posibile:

- Amniotită 1%
- Scurgere de lichid amniotic 1-2%, de obicei se rezolvă în 2-3 zile.
- Avort spontan, procent care depinde foarte mult de priceperea doctorului, datele raportate variind între 0,5% și 5%.

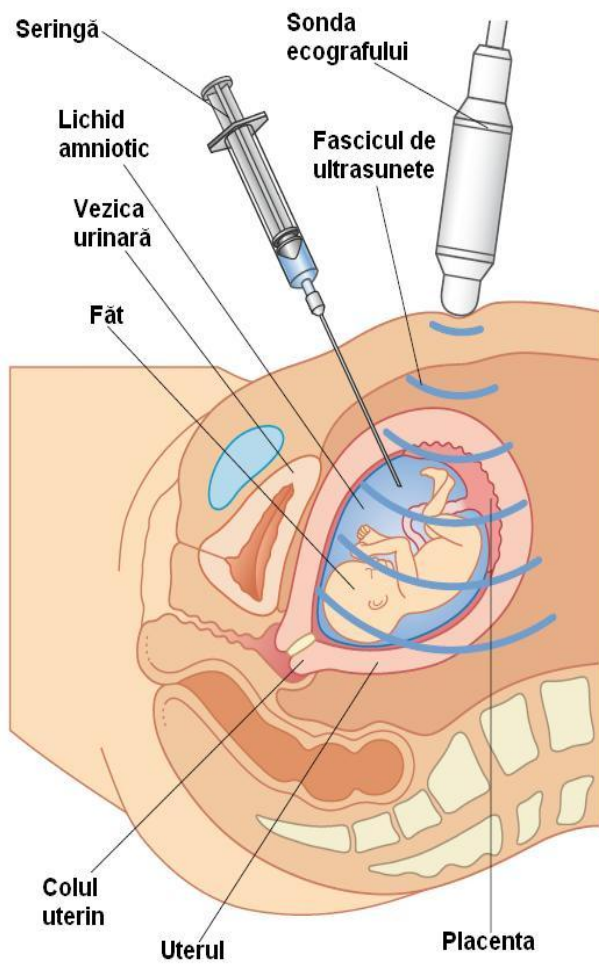


Fig.2.1 Tehnica amniocentezei

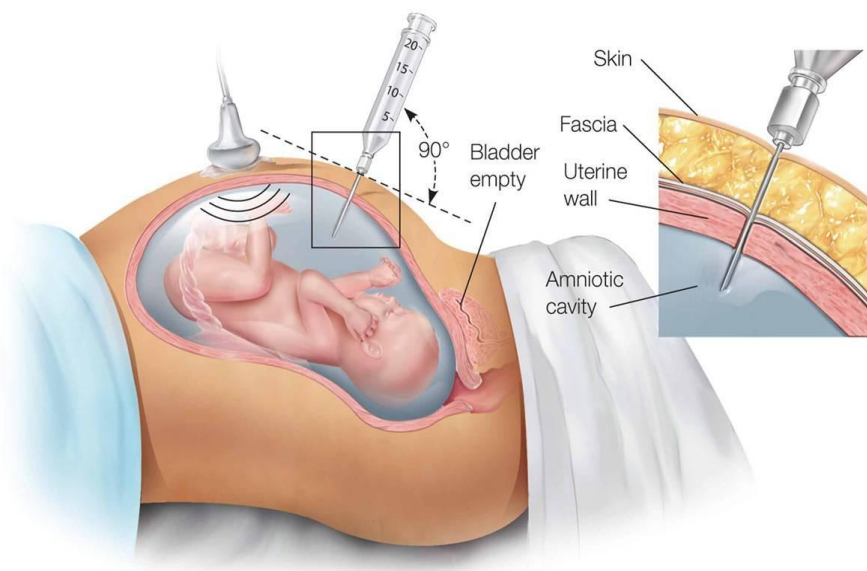


Fig.2.2 Amniocenteza, abordarea strat cu strat.

- Lezarea fătului.
- Lezarea placentei cu sîngerare intraamniotică.
- Izoimunizare Rh.
- Bradicardie fetală (tranzitorie).[8,12,13,20,25,27,35,41]

2.1.2.Amniotomia.

Definiție: amniotomia sau mai simplu spus -ruperea sacului amniotic, reprezintă o procedură obstetricală făcută unei femei în travaliu în sala de nașteri. În normă punga amniotică se sparge singură la deschiderea colului uterin de 4-6 cm, în cazul în care colul uterin este deschis mai mult de 6 cm iar punga nu se rupe se recurge la amniotomie.

Indicații :

A.pînă la naștere

- sarcină după termen
- toxicoza tîrzie
- incompatibilitate Rh
- contractii neefective de naștere, care se prelungesc deja de cîteva zile

B.după declanșarea nașterii

- contractiile de naștere au slăbit
- sacul amniotic prea rezistent
- hidramnios
- placenta inserată prea jos
- TA la mamă prea ridicată
- colul uterin este deschis de 6-7 cm și mai mult, ceea ce îngreuiază avansarea căpușorului copilului în jos.

Tehnica:

Amniotomia se face doar atunci cînd medicul este sigur că căpușorul copilului a coborît în bazinul mic, astfel fiind exclusă căderea cordonului care poate aluneca

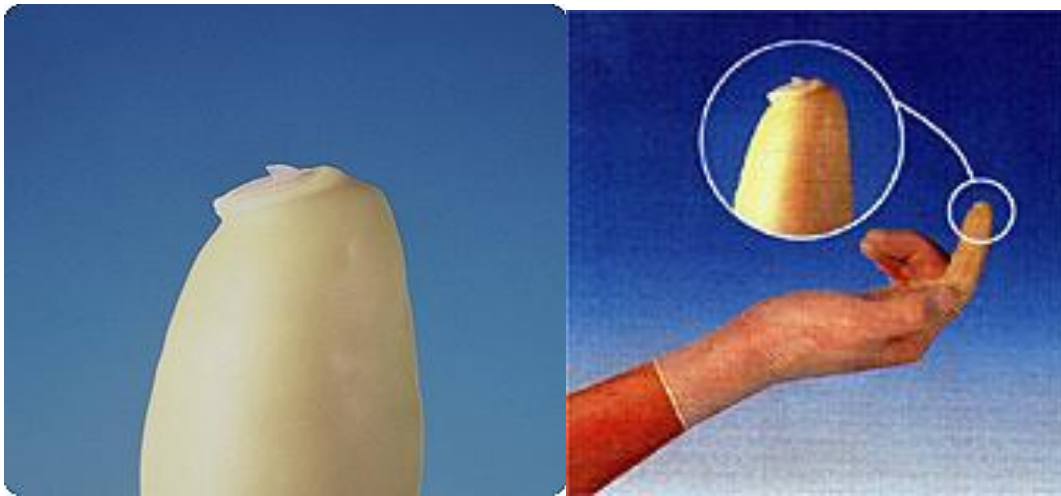


Fig.2.3 Amniotom localizat.



Fig.2.4 Tehnica



Fig.2.5 Amniotom reutilizabil



Fig.2.6 Amniotom de unică folosință

întîmplător dacă amniotomia se face cînd capul copilului nu este angajat în bazinul mic.

Amniotomia se realizează cu ajutorul amniotomului, care are forma unui cîrligaș de croșetat (Fig.2.4). Acesta poate fi de unică folosință (Fig.2.6) și reutilizabil (Fig.2.5). În calitate de amniotom poate fi folosită și pensa Kocher. În prezent în unele țări ca America, Germania, Franța se folosesc amniotoamele localizate care după formă amintesc un degetar cu o pioneză în cap (Fig.2.3).[5,21,33,36,37,49]

2.1.3. Colectarea LA din camera posterioară în timpul expulziei fătului .

În cazul cînd apele s-au rupt la domiciliu sau sunt meconiale se hotărăște colectarea din camera posterioară cînd are loc expulzia fătului. Însă aici trebuie să fim atenți la prelucrarea vaginului în prealabil de a nu contamina LA cu floră vaginală la expulzie. LA este colectat într-o tăviță renală pregătită în prealabil, iar mai apoi colectată în eprubetă și trimisă la laborator.

2.1.4. Colectarea LA în timpul cezarienei.

În timpul cezarienei se colectează atent o probă de LA cu volumul de 5ml ,cu o eprubetă de unică folosință sterilizată fiind riguros respectate regulile de asepsie.

2.2 Protocol de prelucrare a lichidului amniotic.

1. Se plasează în centrifugă eprubeta care conține LA, paralel se pune o eprubetă cu apă distilată cu același volum (ex: 5ml LA și 5ml apă distilată).
2. Se centrifughează timp de 5 min la 18.000 rotații.
3. Se înlătură supernatantul și dacă nu este sediment se mai centrifughează o dată cu aceiași parametri.
4. Se înlătură iarăși supernatantul , astfel încît să rămînă numai sedimentul.
5. Din acest sediment se pregătesc frotiuri.
6. Frotiurile se fac în picătură groasă cu pipeta și în strat subțire cu lamela.
7. Frotiurile sunt lăsate să se usuce la temperatura camerei, fiind în prealabil studiate la microscop ca material nativ.

8.Cînd sunt aproape uscate sunt puse în termostat la temperatura de 37⁰C timp de 10 min.

9.După aceasta frotiurile pot fi utilizate pentru colorații specifice sau native.[11,47,48, 32]

2.3 Pregătirea frotiurilor

Mai întîi se pregătesc frotiurile native ,adică fără coloranți.Acestea sunt studiate proaspete ,preferabil umede,astfel se exclude folosirea uleiului de imersie și se observă mișcarea acestora în cîmpul microscopic.

Pentru a evidenția unele celule de altele se recurge la colorarea acestora și în dependență de tip acid sau bază acestea capătă anumite culori. Mai întîi frotiurile se vor fixa cu alcool de 96 % . Lamela este cufundată în alcool timp de 5 min, după care se va lăsa să se usuce prin evaporare . Ulterior se recurge la colorare.[3,44,45,50,51,52]

2.3.1 Colorația după Romanovski-Giemsa

Frotiul este fixat cu alcool de 96 % după care este colorat cu soluția deja pregătită.

Soluția se pregătește în felul următor :

1ml colorant lichid+ 2ml soluție de diluție de bază +47 ml de apă distilată .

Timpul de colorare:40-150 în dependență de frotiu.

Se utilizează diluant fosfat, pH-ul acestuia depinde de obiectul cercetării:

-frotiu LCR 5,8- 6,0

-frotiu sînge ,LA 6,4-6,5

După aceasta frotiul este spălat sub jet de apă distilată și studiat la microscop cu ulei de imersie .[14,26,29,44,45,50,51,52]

2.3.2 Colorația cu albastru de metilen

Se folosește colorantul albastru de metil după fixarea cu alcool în prealabil.

Se cunosc 2 metode de colorare:

1.plasarea colorantului direct pe frotiu

2.plasarea unei hîrtii de filtru uscată, imbibată cu albastru de metil pe care se picura cîteva picături de apă distilată.

Colorantul se spală atent sub jet de apă și se usucă cu hîrtie de filtru Mai apoi se studiază cu ulei de imersie la microscopul optic.[50,51,52]

III. REZULATE ȘI DISCUȚII

LA a fost prelevat din secția Maternitate a IMSP Cahul .Studiul a fost făcut în baza a 10 probe de LA colectate de la parturiente cu termenul de sarcină 39-40 săptămîni. Cercetarile au fost realizate în Laboratorul din incinta IMSP Cahul, Laboratorul Catedrei de microbiologie a USMF „Nicolae Testemițanu”.

3.1 Analiza primară a LA.

LA reprezintă în normă un lichid limpede, ușor gălbui(fig.3.1), însă dacă termenul sarcinii este depășit această devine tulbure, uneori conținînd și meconiu fetal.

După prima centrifugare(fig.3.2) s-a depus puțin sediment cu tendința de formare a 2 medii –una mai vîscoasă, iar alta mai lichidă(fig.3.4). Partea lichidă este reprezentată de supernatant. Acesta este atent colectat cu o pipetă dozatoare și depozitat într-o eprubetă aparte. După care se face un frotiu nativ și este studiat umed la microscop(fig.3.3). În câmpul de vedere se observă 5-6 celule , iar la colorare cu albastru de metilen se obține același rezultat.(fig.3.6)

După a doua centrifugare se obține un sediment alb cu urme de sînge.(fig.3.5) La cercetarea supernatantului de asemenea la microscop se observă că acesta este deja acelular(fig.3.7),acesta este momentul ideal de a pregăti frotiuri din sediment.

3.2 Analiza frotiurilor :

3.2.1 Frotiurile native

Frotiurile native sunt studiate imediat după centrifugare.(fig.3.8) Cu pipeta se plasează o picătură de sediment format după centrifugare. Acesta este întins cu ajutorul altei lamele după tehnica pregătirii frotiurilor de sînge. După aceasta este studiat la microscopul optic proaspăt cît încă este umed. Se observă încă foarte bine și

clar motilitatea celulelor, care se mișcă haotic. Câmpul de vedere este suprapopulat cu celule nucleate, având nucleul albastru iar citoplasma străvezie fiind conturate de un inel subțire de culoare albastru dens. De asemenea se observă celule cu nucleu de culoare brun-deschisă.

3.2.2 *Frotiurile colorate*

Coloranții utilizați în microbiologie sunt reprezentați de 2 tipuri de săruri:

1. coloranții acizi-la care cromoforul este anion, ex. eozina
2. coloranții bazici-la care cromoforul este cation, ex. albastru de metilen.

-Colorația cu albastru de metilen.

Pe frotiurile colorate cu albastru de metilen se observa foarte bine neutrofilele, bazofilele, monocitele, limfocite-albastru intens.

De asemenea se evidențiază fibrele de colagen care sunt de o culoare albastru intens, având forma unor panglici. (fig.3.9-3.11)

-Colorația după Romanovski –Giemsa.

Rezultatele colorării frotiului de lichid amniotic:

1. citoplasma limfocitelor- albastră, iar nucleele de la purpuriu intensiv până la violet
2. citoplasma monocitelor-albastru-gri, iar nucleele purpuriu deschis cu aspect de granule azurofile.
3. bazofilele-culoare albastru-violet intensiv.
4. granulele eozinofile-culoarea oranj-roz
5. granulele neutrofile- de la purpuriu până la violet

Neutrofile segmentate și nesegmentate de culoare violet intens spre albastru.

Nucleele neutrofilelor fie segmentate sau nesegmentate sunt de culoare violet intens spre albastru, iar citoplasma de culoare violet deschis.

6. nucleele leucocitelor- violet-roșu
7. hemoglobina-roz-roșu, sub formă de inel



Fig.3.1 LA proaspăt



Fig.3.2 Centrifuga



Fig.3.3 Microscop optic



Fig.3.4 I-a centrifugare

Fig.3.5 a II-a centrifugare

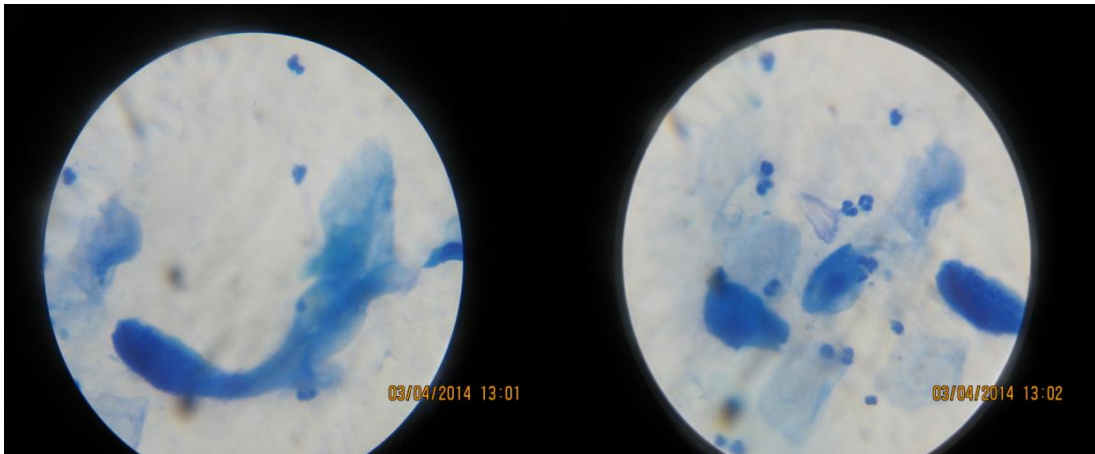


Fig.3.6 Frotiu supernatant LA după prima centrifugare, colorație cu albastru de metilen,x100

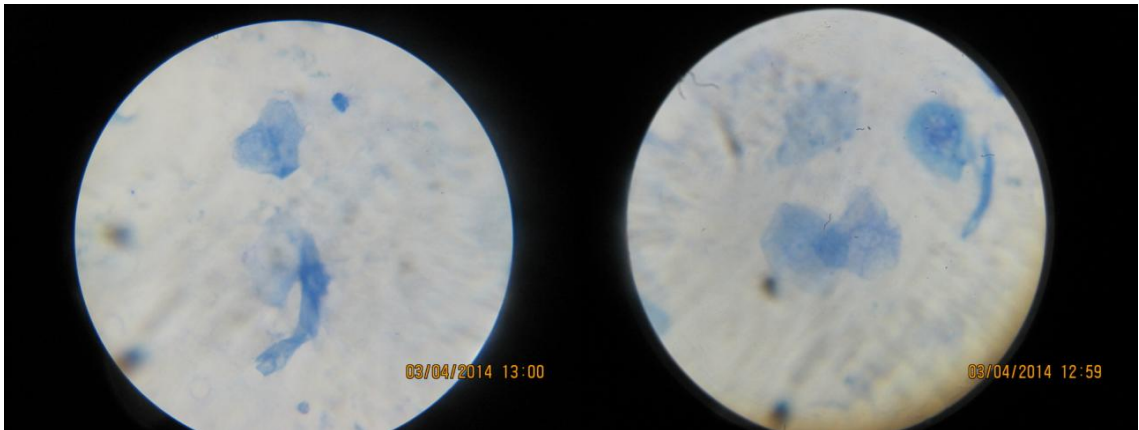


Fig.3.7 Frotiu supernatant LA după a doua centrifugare, colorație cu albastru de metilen, x100

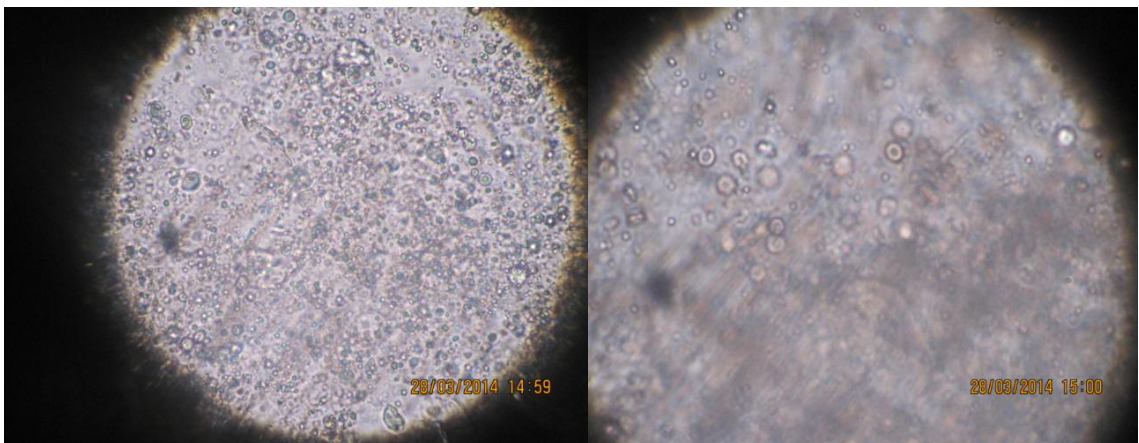


Fig.3.8 Frotiu nativ de LA ,x100

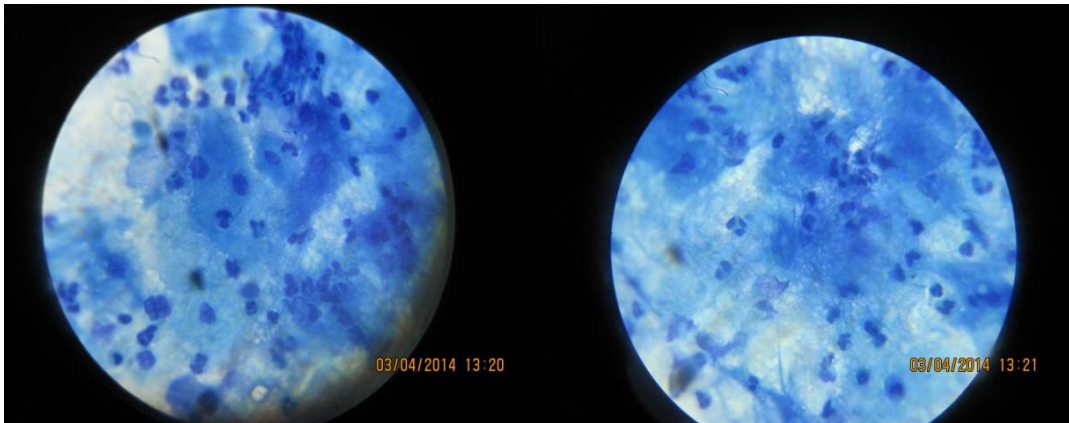


Fig.3.9 Frotiu LA,colorație cu albastru de metilen ,x100

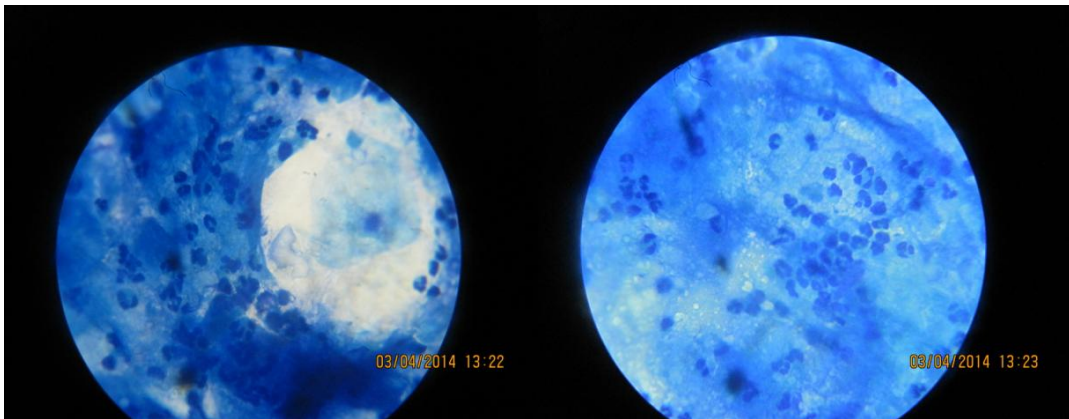


Fig.3.10 Frotiu LA,colorație cu albastru de metilen ,x100



Fig.3.11 Adăugarea uleiului de imersie pentru a studia frotiurile colorate

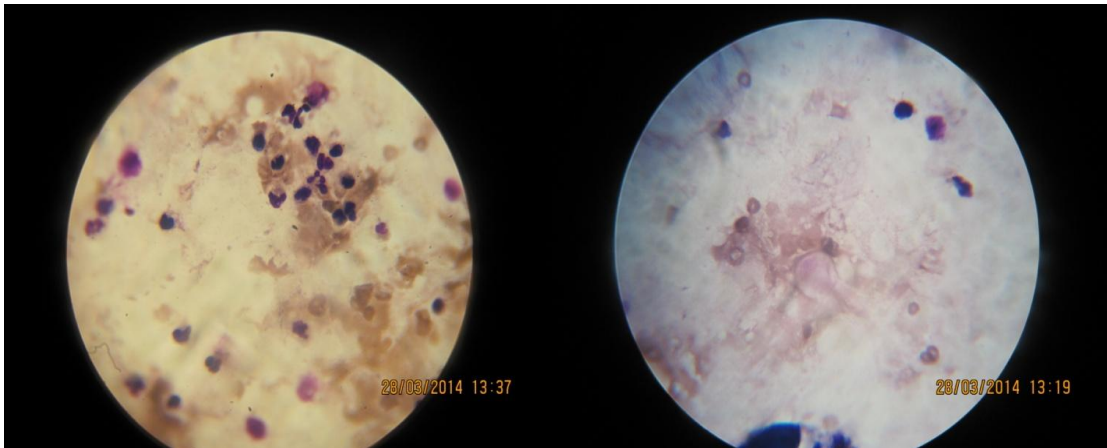


Fig.3.12 Frotiu LA, colorație Romanovski-Giemsa,x100

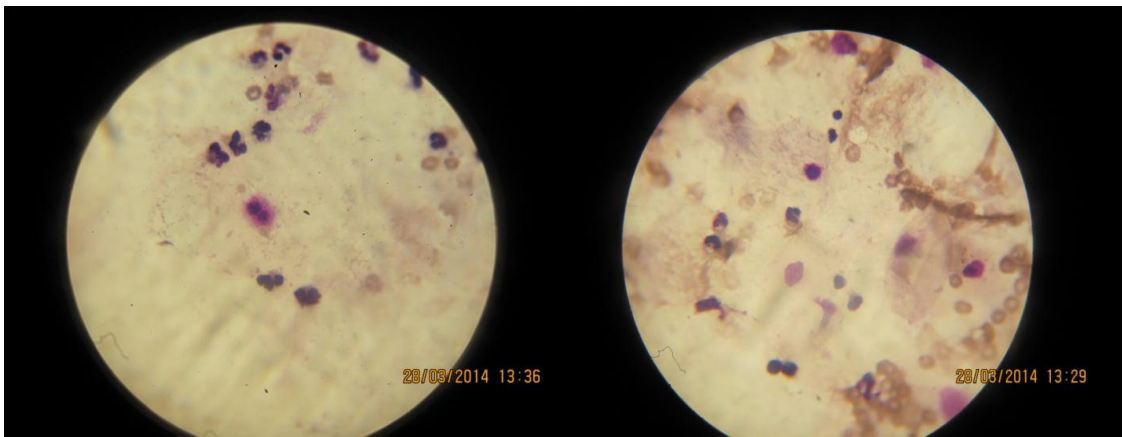


Fig.3.13 Frotiu LA ,predominarea formelor tinere și neutrofilelor segmentate, colorație după Romanovski-Giemsa, x100

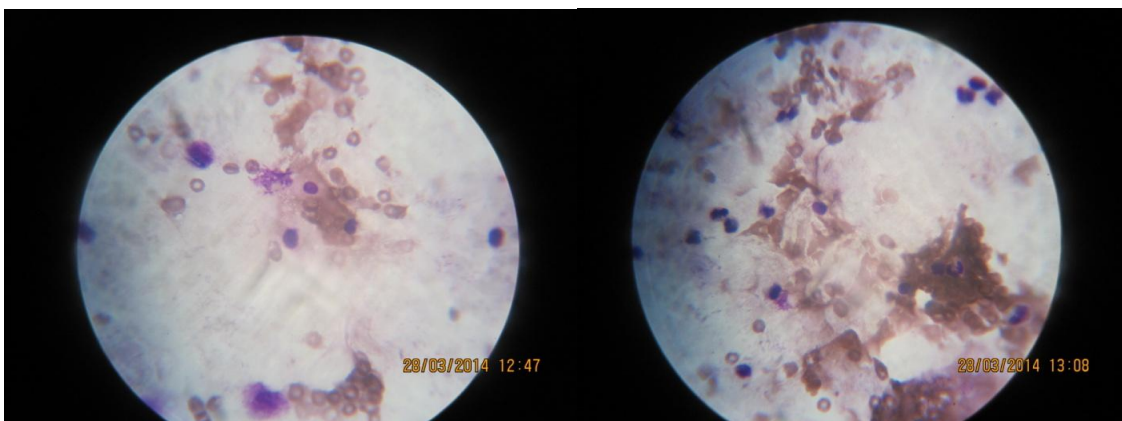


Fig.3.14 Frotiu LA, monocitele și globulele roșii, colorația după Romanovski-Giemsa, x100

8. Mieloblaștii apar de forma unor celule mari, voluminoase, cu un nucleu de culoare roz închis-violet care ocupă aproape toată citoplasma. Citoplasma la rîndul său fiind colorată în roz pal.

9. Unic apar proeritroblaștii, avînd un nucleu neregulat și voluminos (fig.3.12-3.14).

[3,14,26,29,44,45,50,51,52]

3.3 Rezultatele studiului efectuat în baza articolelor medicale.

Imunofenotipul celulelor stem

Celulele stem din lichidul amniotic prezintă un imunofenotip specific celulelor stem mezenchimale prin exprimarea markerilor CD29 , CD90 și CD73 . Imunofenotipul CD29+/ CD90+/ CD105+/ CD133+/ CD146+ al acestor celule, ne sugerează prezența unor markeri specifici și altor tipuri de celule, precum CD105 specific celulelor endoteliale și CD133 prezent pe suprafața celulelor stem hematopietice și a celulelor endoteliale progenitoare. În ciuda capacității foarte ridicate de proliferare a celulelor din lichidul amniotic, imunofenotipul acestora se modifică după 10 zile în cultură, devenind CD29+/CD90-/CD105-/CD133-/CD146+. La nivel molecular AFC-urile prezintă atât markeri de celule stem mezenchimale, precum ACAN, BGLAP, COL2A1 și PPAR γ , cât și markeri transcriptomici specifici celulelor stem embrionare cum ar fi OCT4, REX1 sau SOX2. Interesant de notat este prezența unor markeri specifici celulelor stem hematopietice precum CD3D, CD4, CD8A sau MME și a unor markeri specifici celulelor stem neurale cum ar fi NCAM1, SIGMAR1 și S100B. Aceste rezultate ne conduc spre ipoteza prezenței unui număr limitat de markeri specifici tuturor liniilor celulare la nivelul celulelor stem. Acest fenomen ar putea fi corelat cu potențialul de diferențiere, ca răspuns la stimuli externi prin existența unor molecule “primer” care conduc diferențierea în funcție de stimulul aplicat. Totodată, AFC-urile prezintă capacitatea de diferențierea către linia endotelială. Aceste se pot diferenția în celule cu imunofenotip specific celulelor endoteliale mature așa cum a fost demonstrat prin tehnica citometriei de

flux, de prezenta markerilor endoteliali CD31, CD105 si CD144. Un element de noutate important îl reprezintă analiza ultrastructurală a AFC-urilor diferențiate care a demonstrat prezența structurilor intracelulare specifice celulelor endoteliale precum veziculele plasmalemale și corpusculii Weibel-Palade.

Astfel, aceste celule nu au capacitatea doar de a fi ghidate către o linie endotelială, ci pot deveni chiar celule endoteliale mature cu structurile necesare unei posibile îndepliniri a funcțiilor acestora, cum ar fi de exemplu veziculele plasmalemale care ar putea fi implicate în procesele de transcitoză.[6,16,19]

Particularități de diferențiere și proliferare

S-au obținut 15 culturi de celule stem din lichidul amniotic, la 14 culturi primare din probele independente în ziua a 3-a s-au numărat de la 4 până la 8 celule aderate într-o zonă distinctă. După aceasta fiecare celulă a fost notată ca „celulă de pornire” pentru extinderea coloniilor celulare mai departe. Au fost lăsate să crească timp de 48 h, astfel încât fiecare colonie conținea aproximativ 100-300 de celule. Fiecare celulă a rămas echidistant de la alte celule din cadrul aceleiași colonii, cele mai multe celule din colonie erau în perioada de metafază, iar morfologic aceste celule se aseamănă cu celulele fibroblastice. Mai apoi fiecare cultură a fost separată și reînsămânțate într-o cultură cu 24 godeuri. La 3-4 zile de la însămânțare cultura clonală a crescut la 70 % astfel că se numărau 30.000-35.000 de celule. Deci folosind această metodă dintr-o celulă Hafs clonală se pot obține 1010 celule, populația fiind derivată în câteva săptămâni.[23]

Astfel această metodă de rastartare a celulelor este o abordare simplă pentru a oferi celule stem de o bună calitate care corespund cerințelor terapeutice.

Celulele stem din fluidul amniotic în tratamentul CUN

Studiul a fost efectuat pe 2 loturi de șobolani cărora li s-a injectat intraperitoneal :

1. primul lot-celule stem din fluidul amniotic
2. al doilea lot-celule stem mezenchimale din măduva osoasă

S-au analizat următorii parametri: gradul de supraviețuire, comportamentul, imagistica intestinală (scanare MRI), datele histologice, absorbția și motilitatea intestinală, gradul de inflamație, apoptoza și proliferarea enterocitelor.

În rezultatul acestui studiu s-a observat că a scăzut morbiditatea și mortalitatea prin CUN, prin păstrarea funcției intestinale. De asemenea a scăzut inflamația intestinală și apoptoza enterocitelor și a crescut proliferarea enterocitelor. Șobolani tratați cu celule stem amniotice au avut o rată de supraviețuire semnificativ mai mare la 7 zile de viață cu CUN, decât la șobolani tratați cu celule stem mezenchimale din măduva osoasă sau mieloblaști.[43]

IV. CONCLUZII

1. LA este un lichid biologic bogat în substanțe nutritive și biologic active, toate acestea variind în dependență de perioada sarcinii, la fel și volumul acestuia.
2. Celulele prezente în LA au origine atât embrionică cât și extraembrionică, acestea variind după tip și cantitate în perioadele sarcinii.
3. În procesul de obținere a celulelor stem este important de a face 2 centrifugări pentru a obține un sediment cât mai pur.
4. Prin colorația Romanovski-Giemsa se scot bine în evidență formele tinere ale elementelor sangvine, iar prin colorația cu albastru de metil doar celulele bazofile și fibrele de colagen caracteristice pentru sarcina la termen.
5. Celulele stem din LA amniotic au o capacitate mai mare de diferențiere și proliferare decât celulele stem din măduva osoasă, ceea ce dă speranțe și posibilitate de utilizare a lor în tratarea mai multor boli.

BIBLIOGRAFIE

1. Adamson TM, Brodecky V, Lambert TF. The production and composition of lung liquid in the in-utero foetal lamb. In Comline RS, Cross KW, Dawes GS (eds): Foetal and Neonatal Physiology. Cambridge University Press, 1973.
2. Bachi Modena Alberto ,Fieni Stefania, Amniotic fluid dynamics, Acta Bio Medica Ateneo Parmense 2004;75;Suppl.1:11-13
3. Bartl R, Thomas L. Blood Cell Differential Count. In Clinical Laboratory Diagnostics, First Edition, Frankfurt/Main, 1998, 509-517.
4. Beall M.H, Van den Wijngaard JPHM, Van Gemert MJC, Ross MG. Regulation of Amniotic Fluid Volume. Placenta. Aout-septembre 2007; 28 (8-9) : 824-832.
5. Breton Marie, „Pratique actuelle de l’Amniotomie et Influence sur le déroulement du travail’’, etude comparative, durant l’année 2010, au sein d’hôpitaux de niveau I, II et III , ecole de Sages-femmes de Metz, Université Henri Poincaré, Nancy I ,2010.
6. Bossolasco Patrizia, Montemurro Tiziana, Cova Lidia et al.,Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential, Cell Research (2006)16:329-336.
7. Carraro Gianni, Garcia H Orquidea., Perin Laura, Roger De Filippo and David Warburton Amniotic Fluid Stem Cells, Embryonic Stem Cells – Differentiation and Pluripotent Alternatives ,25:493-506
8. Cirigliano V, Voglino G, Canadas MP, Marongiu A, Ejarque M, Ordonez E, Plaja A, Massobrio M, Todros T, Fuster C, Campogrande M, Egozcue J, Adinolfi M. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR. Assessment on 18 000 consecutive clinical samples. Mol Hum Reprod. 2004;10:839-846.

9. Codaccioni X, Vaast P, Therby D, Baalbaky I, Puech F. Physiologie du liquide amniotique. Encyclopedie Medico-Chirurgicale : Gynecologie-Obstetrique. 1995 ; 5-006-A-10. 12 p.
10. Cross Nick , White Helen, National Genetics Reference Laboratory (Wessex) , November 2004.
11. De Coppi Paolo, Bartsch Georg et al., Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy, Nature biotechnology (2007), 25:1.
12. Ding C, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chan LC, Chan AY, Charoenkwan P, Ng IS, Law HY, Ma ES, Xu X, Wanapirak C, Sanguansermsri T, Liao C, Ai MA, Chui DH, Cantor CR, Lo YM. MS analysis of single-nucleotide differences in circulating nucleic acids: Application to noninvasive prenatal diagnosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101:10762-7.
13. Gerdes T, Kirchhoff M, Lind AM, Larsen GV, Schwartz M , Lundsteen C. Computer –assisted prenatal aneuploidy screening for chromosome 13,18,21,X and Y based on multiplex ligation–dependent probe amplification (MLPA). Eur J Hum Genet . 2004 Oct 13
14. Giemsa G (1904). «Eine Vereinfachung und Vervollkommnung meiner Methylenazur-Methylenblau-Eosin-Färbemethode zur Erzielung der Romanowsky-Nochtschen Chromatinfärbung.». Centralbl f Bakt etc 37: 308–311.
15. Gilbert WM, Brace RA. The missing link in amniotic fluid volume regulation: Intramembranous absorption. Obstet-Gynecol 1989; 74: 748.
16. Hartmann K., Raabe O., Wenisch S., Arnold S., Amniotic fluid derived stem cells give rise to neuron-like cells without a further differentiation potential into retina-like cells, Am J Stem Cells 2013; 2(2):108-118.
17. Hoehn H., Salk D.: Morphological and biochemical heterogeneity of amniotic fluid cells in culture. Methods in Cell Biology, 1982; 26:11-34.

- 18.Hoffmann-Cucuz Pascale,Cours: Membranes foetales ,cordon ombilical et liquide amniotique, Universite Joseph Fourier de Grenoble,2010/2011
- 19.Kavianni A, Perry T., Dzakovik A. et al.: The amniotic fluid as a source of cells for fetal tissue engineering, J Ped Surgery, 2001;36:1662-1665.
- 20.Mann K, Donaghue C, Fox SP, Docherty Z, Ogilvie CM. Strategies for the rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidy. Eur J Hum Genet. 2004;12:907-15.
- 21.Paladi Gheorghe, Cernetchi Olga, Bazele obstetricii fiziologice, vol. I, 2006, cap.8.
- 22.Paladi Gheorghe, Cernetchi Olga, Obstetrica Patologica, Vol.II, 2007, cap.16
- 23.Phermthai Tatsanee, Odglun Yuparat, Julavijitphong Suphakde, Titapant Vitaya Chuenwattana, Vantanasiri Prakong Chanchai, Pattanapanyasat Kovit, A novel method to derive amniotic fluid stem cells for therapeutic purposes, Phermthai et al.BMC Cell Biology,2010,11:79
- 24.Prusa Andreea-Romana, Hengstschlager Markus, Amniotic fluid cells and human stem cell research- a new connection, Med Sci Monit, 2002, 8(11):RA 253-257.
- 25.Skrypnyk Cristina,Ghid:Amniocenteza,informații pentru pacienți și familiile lor,2007,Oradea
- 26.Skubitz K, Qualitative Disorders of Leukocytes. In Wintrobe's Clinical Hematology,Philadelphia, 2004, 1801-1813.
- 27.Slater HR, Bruno DL, Ren H, Pertile M, Schouten JP, Choo KH. Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (MLPA). J Med Genet. 2003;40:907-12
- 28.Thadikkaran L, Crettaz D, Barelli S, Gallot D, Sapin V,Tissot JD.,Analyse proteomique du liquide amniotique. Immuno-analyse & Biologie Specialisee.Decembre 2007; 22 (6) : 359-365.).

29. Thomas L. Hematopoiesis. In Clinical Laboratory Diagnostics, First Edition, Frankfurt/Main, 1998, 463-469.
30. Wallach J. Afecțiuni hematologice. În Interpretarea testelor de diagnostic, Ed VII, Trad Ionescu R, Dragomir M, Ed. Științelor Medicale, Buc, 458, 462-464.
31. www.actualitateabuzoiana.ro/premiul-nobel-2012-pentru-celulele-stem/
32. www.biochemmack.ru/upload/iblock/1bd/1bd0d509a3223f92b0aa79b5d6facdc d.pdf
33. www.child-hood.ru/index.php/childbirth/1507-stimulation-of-birth-amniotomy.pdf
34. www.contraboli.ro/celule-stem-din-lichid-amniotic/
35. www.cpmc.org/learning/documents/amnio-russ.pdf
36. www.gynesol.com/products.php?prod_id=78
37. www.medfarm.org/katalog/akusherstvo-i-ginekologiya/amniotom-akusherskij
38. www.nizhgma.ru/_resources/directory/459/common/19a_.pdf
39. [www.nlm.nih.gov//The patient education institute , Inc. www.X-plain.com , 1995-2011,.](http://www.nlm.nih.gov//The%20patient%20education%20institute%20,%20Inc.%20www.X-plain.com%20,%201995-2011,)
40. www.ro.wikipedia.org/wiki/Premiul_Nobel_pentru_Medicin%C4%83
41. www.sfatulmedicului.ro/Investigatii-in-sarcina/amniocenteza-a-metoda-invaziva-de-diagnostic_1134
42. www.uvmaf.org/UE-obstetrique/cordonombilical/site/html
43. Zani Augusto, Cananzi Mara, et al., Amniotic fluid stem cells improve survival and enhance repair of damaged intestine in necrotising enterocolitis via a COX-2 dependent mechanism, Inflammatory bowel disease, 2013
44. Базарнов М. А., Воробьева А. И., Руководство по клинической лабораторной диагностике. (Части 1 - 2). Киев, "Вища школа", 1991 г.
45. Базарнов М. А., Морозова В. Т.. Руководство к практическим занятиям по клинической лабораторной диагностике. Киев, "Вища школа", 1988 г.

46. Безруков А. В. Окраска по Романовскому: к вопросу о приоритете / К 120-й годовщине открытия эффекта Романовского. – 12 с.
47. Давыдова Д.А., Воротеляк Е.А., Брагина Е.Е., Культивирование стволовых клеток амниотической жидкости человека в трехмерном коллагеновом матриксе, журнал Цитология, том 53, N° 4, 2011.
48. Давыдова Д.А., Фенотип и дифференцировка стволовых клеток амниотической жидкости человека IN VITRO, рукопись, Москва, 2012.
49. Коркан И.П., Коркан А.И., Быковский В.И., Индукция родов./Вестник акушера-гинеколога. N°3 3-4, 2003
50. Кост Е. А., Справочник по клиническим лабораторным методам исследования. Москва "Медицина" 1975 г.
51. Козловская Л. В., Николаев А. Ю.. Учебное пособие по клиническим лабораторным методам исследования. Москва, Медицина, 1985 г.
52. Сайфиддинова Л.М., Клинико-лабораторная характеристика амниотической жидкости, Душанбе 2010

Declarație

Prin prezenta declar că Lucrarea de licență cu titlul ”Titlul complet al lucrării” este scrisă de mine și nu a mai fost prezentată niciodată la o altă facultate sau instituție de învățământ superior din țară sau străinătate. De asemenea, că toate sursele utilizate, inclusive cele de pe Internet, sunt indicate în lucrare, cu respectarea regulilor de evitare a plagiatului:

- toate fragmentele de text reproduse exact, chiar și în traducere proprie din altă limbă, sunt scrise între ghilimele și dețin referința precisă a sursei;
- reformularea în cuvinte proprii a textelor scrise de către alți autori deține referința precisă;
- rezumarea ideilor altor autori deține referința precisă la textul original.

Data 16.04.14

Absolventa *Crețu-Babanuță Natalia*
