

## CONTENT HIGHLIGHTS

Expression of ER, PR, Her2, CK5 and Ki67 surrogate markers in invasive breast carcinoma not otherwise specified type and its correspondent lymph node metastasis

Immunogenic aspects of stem cells therapy in regenerative medicine



## SUMAR

## CONTENT

### CUVÂNT ÎNAINTE

Mesajul inaugural al rectorului Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova 3

### FOREWORD

Inaugural message from the rector of State University of Medicine and Pharmacy “Nicolae Testemitanu” of Republic of Moldova

### EDITORIAL

Adresare către autorii și cititorii Revistei de Științe ale Sănătății din Moldova 4

### EDITORIAL

Message to authors and readers of Moldovan Journal of Health Sciences

### ARTICOLE DE CERCETARE

**Veaceslav Fulga** 5  
Expresia markerilor surogat ER, PR, Her2, CK5 și Ki67 în carcinomul mamar invaziv de tip NOS și metastazele limfonodale corespondente

### RESEARCH ARTICLES

**Veaceslav Fulga**  
Expression of ER, PR, Her2, CK5 and Ki67 surrogate markers in invasive breast carcinoma not otherwise specified type and its correspondent lymph node metastasis

**Gheorghe Ghidirim, Igor Mișin, Gheorghe Rojnovceanu, Marin Vozian, Ana Mișina** 15  
Leziunile mucinoase ale apendicelui cu potențial malign

**Gheorghe Ghidirim, Igor Misin, Gheorghe Rojnovceanu, Marin Vozian, Ana Misina**  
Low grade and high grade appendiceal mucinous lesions

### ARTICOL DE SINTEZĂ

**Ramesh Mazhari, Ian Vasilovski Toma** 22  
Aspecte imunogene ale terapiei cu celule stem în medicina regenerativă

### REVIEW ARTICLE

**Ramesh Mazhari, Ian Vasilovski Toma**  
Immunogenic aspects of stem cells therapy in regenerative medicine

### ARTICOL DE EDUCARE MEDICALĂ CONTINUĂ

**Grigore Tinica, Mihail Enache, Diana Anghel, Victor Prisacari, Raluca Ozana Chistol** 32  
Tehnica recoltării arterei radiale în vederea folosirii în bypass-ul aorto-coronarian

### CONTINUOUS MEDICAL EDUCATION ARTICLE

**Grigore Tinica, Mihail Enache, Diana Anghel, Victor Prisacari, Raluca Ozana Chistol**  
Radial artery harvesting technique for use in coronary bypass surgery

### IMAGINI DIN PRACTICA CLINICĂ

**Victor Botnaru, Oxana Munteanu** 40  
Leziuni pulmonare în asociere cu macule melanocitice cutanate

### IMAGES FROM CLINICAL PRACTICE

**Victor Botnaru, Oxana Munteanu**  
Pulmonary changes associated with cutaneous melanin pigmentation

Ghidul autorului 42

Guidelines for authors

Scrisoare de însoțire 49

Cover letter

IN MEMORIAM 60

IN MEMORIAM

# Revista de Științe ale Sănătății din Moldova

## Moldovan Journal of Health Sciences

Ediție bilingvă: română, engleză

### Fondator:

Instituția Publică Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova

### Redactor-șef:

Adrian Belii, dr. hab. șt. med., conferențiar universitar

Colectivul redacției:

Liviu Belii, redactor stilist de limbă română

Viorica Cazac, redactor stilist de limbă engleză

### Adresa redacției:

biroul 407, blocul Administrativ, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, Republica Moldova, MD-2004

### Founder:

Public Institution State University of Medicine and Pharmacy „Nicolae Testemițanu” from Republic of Moldova

### Redactor-in-chief:

Adrian Belii, PhD, associate professor

### Editorial staff:

Liviu Belii, Romanian redactor  
Viorica Cazac, English redactor

### Address of Editorial Office:

office 407; Administrative building, State Medical and Pharmaceutical University „Nicolae Testemițanu”, bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, Republic of Moldova, MD-2004

Editat: ImprintStar

Tiraj: 500 ex.

Înregistrat la Ministerul Justiției cu nr. 250 din 01 august 2014

## EDITORIAL BOARD

### HONORARY MEMBERS

**Ababii Ion**, PhD, university professor, academician of ASM (Republic of Moldova)

**Anestiadi Vasile**, PhD, university professor, academician of ASM (Republic of Moldova)

**Ghidirim Gheorghe**, PhD, university professor, academician of ASM (Republic of Moldova)

**Gudumac Eva**, PhD, university professor, academician of ASM (Republic of Moldova)

### MEMBERS

**Acalovschi Iurie**, PhD, university professor (Cluj-Napoca, Romania)

**Balica Ion**, PhD, associate professor (Republic of Moldova)

**Bendelic Eugen**, PhD, university professor (Republic of Moldova)

**Bețiu Mircea**, PhD, associate professor (Republic of Moldova)

**Beuran Mircea**, PhD, university professor (Bucharest, Romania)

**Botnaru Victor**, PhD, university professor (Republic of Moldova)

**Brull Sorin**, PhD, university professor (Jacksonville, Florida, USA)

**Catereniuc Ilia**, PhD, university professor (Republic of Moldova)

**Cebotari Sergiu**, PhD, university professor (Hanover, Germany)

**Cernețchi Olga**, PhD, university professor (Republic of Moldova)

**Ciobanu Gheorghe**, PhD, university professor (Republic of Moldova)

**Ciocanu Mihai**, PhD, university professor (Republic of Moldova)

**Ciubotaru Anatol**, PhD, university professor (Republic of Moldova)

**Corcimaru Ion**, PhD, university professor, academician of ASM (Republic of Moldova)

**Costin Sawa**, PhD, university professor (Giessen, Germany)

**Croitor Gheorghe**, PhD, university professor (Republic of Moldova)

**Curoichin Ghenadie**, PhD, university professor (Republic of Moldova)

**Gavriliuc Mihai**, PhD, university professor (Republic of Moldova)

**Ghicavăi Victor**, PhD, university professor, correspondent member of ASM (Republic of Moldova)

**Gramma Rodica**, PhD, MPH, associate professor (Republic of Moldova)

**Grigoraș Ioana**, PhD, university professor (Iasi, Romania)

**Groppa Liliana**, PhD, university professor (Republic of Moldova)

**Groppa Stanislav**, PhD, university professor, academician of ASM (Republic of Moldova)

**Gudumac Valentin**, PhD, university professor (Republic of Moldova)

**Gurman Gabriel**, PhD, university professor (Beer Sheva, Israel)

**Guțu Eugen**, PhD, university professor (Republic of Moldova)

**Holban Tiberiu**, PhD, university professor (Republic of Moldova)

**Hotineanu Vladimir**, PhD, university professor, correspondent member of ASM (Republic of Moldova)

**Lebedinski Konstantin**, PhD, university professor (Sankt Petersburg, Russia)

**Matcovschi Sergiu**, PhD, university professor (Republic of Moldova)

**Mereuță Ion**, PhD, university professor (Republic of Moldova)

**Nacu Anatolie**, PhD, university professor (Republic of Moldova)

**Opopol Nicolae**, PhD, university professor, correspondent member of ASM (Republic of Moldova)

**Popa Florin**, PhD, associate professor (Bucharest, Romania)

**Popescu Irinel**, PhD, university professor (Bucharest, Romania)

**Popovici Mihai**, PhD, university professor, academician of ASM (Republic of Moldova)

**Prisacari Viorel**, PhD, university professor, correspondent member of ASM (Republic of Moldova)

**Raica Marius**, PhD, university professor (Timisoara, Romania)

**Rojnoveanu Gheorghe**, PhD, university professor (Republic of Moldova)

**Rudic Valeriu**, PhD, university professor, academician of ASM (Republic of Moldova)

**Safta Vladimir**, PhD, university professor (Republic of Moldova)

**Săndesc Dorel**, PhD, university professor (Timisoara, Romania)

**Știuca Svetlana**, PhD, university professor (Republic of Moldova)

**Țăbărnă Gheorghe**, PhD, university professor, academician of ASM (Republic of Moldova)

**Tagadiuc Olga**, PhD, associate professor (Republic of Moldova)

**Tănase Adrian**, PhD, university professor (Republic of Moldova)

**Tărcoveanu Eugen**, PhD, university professor (Iasi, Romania)

**Tinică Grigore**, PhD, university professor (Iasi, Romania)

**Todiraș Mihai**, PhD, university professor (Berlin, Germany)

**Toma Vasilovski Ian**, PhD, university professor (Washington, USA)

**Topalo Valentin**, PhD, university professor (Republic of Moldova)

**Țurcan Svetlana**, PhD, associate professor (Republic of Moldova)

**Valica Vladimir**, PhD, university professor (Republic of Moldova)

**Vorojbit Valentina**, PhD, associate professor (Republic of Moldova)

**Vovc Victor**, PhD, university professor (Republic of Moldova)

**Zaporojan Valeriu**, PhD, university professor, academician (Odessa, Ukraine)

**Zota Ieremia**, PhD, university professor, correspondent member of ASM (Republic of Moldova)

**Mesajul inaugural  
al rectorului Universității de Stat de Medicină și Farmacie  
„Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova**

Stimați Prieteni,

Prima filă întoarsă a acestei Reviste vă va introduce în miezul unei noi publicații științifice a USMF “Nicolae Testemițanu” – **Revista de Științe ale Sănătății din Moldova**, care va fi, în același timp, și prima publicație periodică din cadrul instituției noastre, conformă standardelor și ghidurilor internaționale actuale din domeniul editorial al științelor medicale.

Pe paginile ei își vor găsi locul diferite articole și lucrări din sfera medicinei fundamentale (anatomie și morfologie, fiziologie, imunologie, microbiologie și virusologie, farmacologie și toxicologie, biochimie și biologie moleculară, farmacie), medicinei clinice (chirurgie, obstetrică și ginecologie, medicină internă, pediatrie, diagnostic medical), stomatologiei, incluzând, totodată, și multe alte domenii ale științelor sănătății (sănătate publică, asistență medicală și reabilitare, sănătate ocupațională și biomedicină socială, biotehnologii medicale, medicină interdisciplinară) – în total, circa 60 de specialități.

Cu acest irepetabil și responsabil pas al debutului, aș dori întregului colectiv al revistei, bineînțeles, asistat de numeroșii și prestigioșii săi autori, de azi și de mâine, să devină din start, chiar din prima lui primăvară editorială (deși evenimentul are loc în miezul toamnei) un mare succes.

În contextul dat, luând în considerație și importanța momentului, am găsi de cuviință, să aducem la cunoștința tuturor celor implicați în elaborarea, dar și realizarea acestei publicații (în egală măsură, și celor care o vor răsfoi), afirmațiile unui mare filosof și pedagog francez de origine bulgară, Omraam Micael Aivanhov (1900-1986) – cele mai valoroase opere ale sale țin de științele aplicative, implicit, cele din domeniul medicinei. Dânsul precizează, între altele:

*“Oricine dintre noi trebuie să muncească asupra autoperfecționării sale, cu o singură condiție: să facă lucrul acesta nu doar pentru sine, dar și pentru binele întregii comunități. Atunci comunitatea devine frăție. Iar frăția – este o colectivitate, în care domnește adevărata consolidare umană; deoarece fiecare, lucrând pentru sine, totodată, lucrează conștient și pentru binele comun”.*

Profitând de acest frumos prilej și eveniment neordinar din viața universitară – inaugurarea uneia dintre cele mai prestigioase publicații științifice medicale din țară, adresez colectivului redacțional, cât și întregului contingent de autori, prezenți și care vor veni, veac lung de existență și rodnicie, precum și tradiționala urare de bine la orice început de cale – *“Într-un ceas bun!”*. Și, bineînțeles, un viitor pe măsură: spre binele medicinei moldave, spre binele întregului nostru popor; ori, luând în considerație faptul, că știința adevărată nu are nici hotare și nici “naționalitate” – spre binele întregii umanități!

Încă o dată, vă doresc început de bun augur, iar primul pas să fie făcut cu dreptul!

Academician al AȘM  
Ion Ababii,  
Rector al USMF “Nicolae Testemițanu”

**Inaugural message  
from the rector of State University of Medicine and Pharmacy  
U“Nicolae Testemitanu” of Republic of Moldova**

Dear friends,

When you turn the first page of this Journal you will be introduced to the heart of a new scientific publication of SUMPh “Nicolae Testemitanu” – **Moldovan Journal of Health Sciences**, which is also the first periodical of our institution in accordance with the current international standards and guidelines in the publishing field of medical sciences.

Its pages will host different articles and works from the field of fundamental medicine (anatomy and morphology, physiology, immunology, microbiology and virology, pharmacology and toxicology, biochemistry and molecular biology, pharmacy), clinical medicine (surgery, OG, general medicine, pediatrics, medical diagnosis), dentistry, but will also include other Health Sciences (public health, nursing and rehabilitation, occupational health and social biomedicine, medical biotechnology, interdisciplinary medicine) – over 60 specialities in total.

With this unrepeatable and responsible step of debut, I would like to wish the entire editorial staff, of course, assisted by our numerous and prestigious authors of today and tomorrow, to have great success from the start, from the very publishing spring (although the event takes place in the middle of autumn).

In this context, taking into consideration the importance of the moment, I find it necessary to communicate to all those involved in the development and realization of this publication (also to those, who will read it), the saying of a great French philosopher and pedagogue of Bulgarian origin, Omraam Micael Aivanhov (1900-1986), whose most valorous works refer to applied sciences and, implicitly, those from the field of medicine. He says:

*„Everyone of us needs to work on his self-improvement with one condition: to do this not only for himself, but for the good of the whole community. Then the community becomes brotherhood. And brotherhood is a collectivity where true human consolidation reigns, because while each one works for himself, he also consciously works for the common good.”*

Taking advantage of this beautiful occasion and extraordinary event in the life of our university – the inauguration of one of the most prestigious medical publications in the country, I wish the editorial staff, but also all the authors who are present and who are yet to come, many prosperous years of existence, as well as the traditional words said at the beginning of a new journey – *„Godspeed!”* Also, of course, an equally beautiful future: for the better of Moldavian medicine, for the better of our nation and, because true science has no borders or nationality, for the better of the whole humanity!

Once again, I wish you a good beginning and to get off with the right foot!

Academician of ASM  
Ion Ababii,  
Rector of SUMPh “Nicolae Testemitanu”

## Adresare către Autorii și Cititorii Revistei de Științe ale Sănătății din Moldova

Stimați Autori și Cititori,

Pagina editorială este considerată, pe drept cuvânt, coloana vertebrală și esența unei publicații. Editorialul este un spațiu de libertate, unde se expun puncte de vedere, atitudini sau se accentuează valoarea unui articol, publicat pe paginile Revistei. Editorialul argumentează opinia, urmărind să-i convingă pe Cititori și realizează legătura dintre fapte cu un context mai larg...

După emiterea Ordinului Rectorului nr. 166 din 29.04.2013 „Cu privire la fondarea revistei universitare”, a fost efectuat un volum considerabil de lucru pentru constituirea unei reviste științifice proprii a Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, numită Revista de Științe ale Sănătății din Moldova (*Moldovan Journal of Health Sciencess*).

Revista are ambiția să fie conformă standardelor și ghidurilor internaționale din domeniul editorial al științelor sănătății (notamente, cu Ghidurile **COPE** – Comitetul de Etica a Publicațiilor, Politicile **WAME** – Asociația Mondială a Editorilor Medicali, Politicile **ICMJE** – Comitetul Internațional al Editorilor Revistelor Medicale, Declarația **WMA Helsinki** – Etica Cercetării pe Subiecți Umani). În acest scop, se aplică aceeași modalitate de depunere și verificare a manuscriselor, de revizuire colegială și de comunicare interpersonală, ca în revistele științifice internaționale.

Revista de Științe ale Sănătății din Moldova – publicație periodică trimestrială, de limbă engleză și română, își propune să realizeze următoarele sarcini:

1. Promovarea și valorificarea activității științifice biomedicale, fundamentale și aplicative la nivel regional și internațional, prin publicarea și difuzarea celor mai bune articole științifice, cu respectarea politicilor editoriale și a standardelor internaționale de raportare, de publicare, precum și a principiilor etice în vigoare;
2. Contribuirea la instruirea autorilor cu principiile și metodologia publicării articolelor științifice în reviste de profil transnaționale, cu factor de impact (devenind, astfel, o pistă de lansare în circuitul științific internațional pentru autori);
3. Contribuirea la reformarea și modernizarea cercetării biomedicale fundamentale și aplicative din Republica Moldova, revista servind atât la realizarea reformării și modernizării cercetării, cât și drept instrument de evaluare a rezultatelor acestui demers.

Sperăm că în cel mai apropiat viitor, cu ajutorul Dvs. indispensabil, atât în calitate de Autori, cât și în cea de Cititori fideli, *Revista de Științe ale Sănătății din Moldova (Moldovan Journal of Health Sciencess)* să devină o publicație periodică competitivă și recunoscută la nivel național și internațional.

În acest demers, este indispensabilă o exigență sporită din partea Colectivului Redacției, a Comitetului Editorial și a Referenților (ultimii vor rămâne necunoscuți pentru Autori) în „filtrarea” și selectarea celor mai bune și mai competitive articole științifice. Țin să menționez, că o revistă științifică „bună” se caracterizează printr-o durată medie de „primă depunere a manuscrisului - publicare” de peste 6 luni de zile, o rată de rejecție a manuscriselor de peste 50%. De aceea, vă îndemn, stimați Autori, să nu vă pierdeți optimismul, dacă articolul Dvs. nu a fost acceptat „din prima”.

Vă urăm succes!

Adrian Belii,  
dr. hab. șt. med., conf. univ.,  
Redactor-șef

## Message to authors and readers of Moldovan Journal of Health Sciencess

Dear Authors and Readers,

The Editorial, in good sooth, is considered the backbone and the core of any periodical. Editorial page is an area of freedom where points of view and attitudes, that highlighted the value of a published article, are presented. Editorial argues opinions, aiming to convince the readers, and push the scientific paper in a wider context...

Subsequently to issuance of the SUMPh «Nicolae Testemitanu» Rector's order No. 166 from 29.04.2013 «On the foundation of the university journal» a considerable work was conducted in order to ensure the launch of an own scientific journals of SUMPh «Nicolae Testemitanu» - Moldovan Journal of Health Sciencess.

The new periodical is intended to be in accordance with the international standards and guidelines in the field of Health Sciencess publications (such as, **COPE** guidelines - Committee on Publication Ethics, **WAME** Policies - World Association of Medical Editors, **ICMJE** Policies - International Committee of Medical Journals Editors, **WMA Helsinki Declaration** - Ethics Research on Human Subjects). For that purpose, submission and verification of manuscripts should be performed in a peer review manner emphasizing interpersonal communication, as it is used to be done in the best international scientific journals.

Moldovan Journal of Health Sciencess will be issued quarterly in English and Romanian languages and aims to achieve the following tasks:

1. to promote and valorize the basic and applied biomedical scientific achievements at regional and international level by publishing and disseminating best scientific articles in compliance with editorial policies and international reporting standards as well as currently accepted ethical principles;
2. to contribute to the training of authors on principles and methodology of writing scientific articles eligible for impact factor journals (thus becoming a launch pad for international scientific circuit for eventual authors);
3. to contribute to the reform and modernization of basic and applied biomedical research in the Republic of Moldova, journal would serve for both modernization of the research field and as a tool for evaluation of the achieved results.

We hope that in the nearest future, with your implicit contribution as authors or loyal readers, Moldovan Journal of Health Sciencess will become a recognized nationally and regionally competitive publication.

In doing so, increased requirements from publisher, editorial board and reviewers (the last would remain unknown to the authors) in “filtering” and selecting the best and most competitive scientific articles, are indispensable. We have to mention that a “good” scientific journal is characterized by mean time, from “first submission” of the manuscript to publication of less than 6 months and a rejection rate of manuscripts of more than 50%. Therefore, dear authors, keep your optimism if your article has not been accepted at “first intention”.

We wish you success!

Adrian Belii,  
PhD, Associated Professor,  
Editor-in-Chief

## Expresia markerilor surogat ER, PR, Her2, CK5 și Ki67 în carcinomul mamar invaziv de tip NOS și metastazele limfonodale corespondente

**Veaceslav Fulga**

*Catedra de Histologie, Citologie și Embriologie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu", Chișinău, Republica Moldova*

### Autor corespondent

*Veaceslav Fulga, dr. șt. med., conf. univ.,  
Catedra de Histologie, Citologie și Embriologie,  
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu",  
bd. Ștefan cel Mare 165, MD-2004, Chișinău, Republica Moldova,  
e-mail: vmfulga@usmf.md*

## Expression of ER, PR, Her2, CK5 and Ki67 surrogate markers in invasive breast carcinoma not otherwise specified type and its correspondent lymph node metastasis

**Veaceslav Fulga**

*Department of Histology, Cytology and Embryology, State University of Medicine and Pharmacy "Nicolae Testemițanu", Chisinau, Republic of Moldova*

### Corresponding author

*Veaceslav Fulga, MD, PhD,  
Department of Histology, Cytology and Embryology,  
State University of Medicine and Pharmacy "Nicolae Testemițanu",  
Ștefan cel Mare str. 165, MD-2004, Chisinau, Republic of Moldova;  
e-mail: vmfulga@usmf.md*

### Rezumat

În pofida realizărilor contemporane în morfopatologie și genetică, incidența carcinomului mamar rămâne a fi una înaltă. În scopul depistării unui tratament eficace, cancerul de sân a fost divizat în categorii, fiecare având la bază criterii specifice.

Un nou concept propune de a clasifica această maladie în câteva clase moleculare. Tradițional, morfologul descrie în detalii tumora primară fără a menționa profilul molecular al metastazelor limfonodale (LNM). În literatura de specialitate pot fi depistate doar câteva publicații cu date controversate privitor la studiul comparativ, molecular al tumorii primare și metastazei la același pacient.

Prin aplicarea markerilor surogat pentru receptorii ER (estrogen), PR (progesteron), Her2 (factorul uman de creștere epidermală 2 sau Her2/neu), CK5 (citokeratina bazală) și Ki67 (marker al proliferării) am comparat subtipul molecular al tumorii primare și metastazelor limfonodale corespondente a 88 paciente diagnosticate cu carcinom mamar invaziv de tip NOS (not otherwise specified). Am demonstrat că, la un prag de peste 30% pentru celule ER și PR positive, subtipul molecular al metastazei limfonodale în 21,59% nu corespunde celui din tumora primară. Cea mai înaltă rată s-a înregistrat la comutarea subtipului Luminal A în triplu negativ (9.09%). Rata cazurilor comutate rămâne a fi una înaltă (18,18%) chiar și la utilizarea recomandărilor ASCO (American Society of Clinical

### Abstract

Despite advances in genetic and histopathology, the incidence of breast cancer remains very high. In order to find the best treatment, breast cancer was divided into categories, each based on different criteria. A new concept is purposing to categorize this disease into several molecular classes.

Traditionally pathologists are describing in details the primary tumor without mentioning molecular profile of metastases at the lymph nodes level. Nowadays, in the literature could find only several publications with controversial data, which are comparing these two sites from molecular position, primary tumor and its metastasis simultaneously at the same patient.

By using ER (estrogen), PR (progesteron), Her2 (human epidermal growth factor receptor 2 or Her2/neu), CK5 (basal cytokeratin) and Ki67 (marker of proliferation) surrogate markers we've compared the molecular subtype of primary tumor and its paired lymph node metastasis of 88 patients with invasive breast cancer NOS type (not otherwise specified). We demonstrated that for a cut-off >30% of ER and PR positive cells, in 21,59% the molecular subtype from LNM doesn't follow the same one from primary situs. The highest rate was established for Luminal A-triple negative switch (9.09%). The ratio of switched cases remained anyway high (18,18%) by using ASCO (American Society of Clinical On-

Oncology) privitor la pragul pozitivității >1% pentru markerii ER și PR [1].

**Concluzii:** Este important de a descrie profilul imunohistochimic (ER, PR, Her2, CK5, Ki67) la nivelul metastazelor limfonodale. Subtipurile moleculare determinate prin procedeele imunohistochimice nu sunt stabile de-a lungul progresiei tumorale. Rata cea mai înaltă de comutare a fost raportată de la fenotipul luminal la triplu negativ.

**Cuvinte-cheie:** carcinom mamar, metastaze, profil molecular, ER, PR, HER2/neu, CK5, Ki67.

## Introducere

În baza datelor GLOBOCAN, circa 12.7 mln cazuri de cancer și 7.6 mln de decese cauzate de carcinom au fost determinate în anul 2008 [2]. Cancerul de sân este cel mai frecvent tip de cancer diagnosticat la femei. Acesta constituie 23% din numărul total de cancere și 14% din decesele cauzate de tumori. În pofida realizărilor în genetică și morfologie, incidența acestui tip de cancer rămâne una înaltă. Factori multipli își au contribuția la menținerea acestei înalte rate, precum stilul de viață, factori de mediu, genetici, biologici [3]. Întru determinarea unui tratament eficace, cancerul de sân a fost clasificat în categorii, fiecare bazat pe criteriile morfologice specifice. Un nou concept propune de a diviza această maladie în câteva clase moleculare [4-6]. Aceasta ne sugerează că, carcinomul mamar nu este o singură entitate nozologică, cuprinzând la moment cel puțin 5 subclase, fiecare cu semnătura moleculară, caractere de creștere și potențial invaziv deosebit. Din păcate, dezvoltarea rezistenței la terapie și recurența sunt frecvente.

O particularitate comună a tumorilor maligne este capacitatea de a invada țesuturile adiacente și răspândi la distanță prin sistemul circulator sanguin și limfatic. Tradițional morfologii descriu în detalii tumora primară, fără a menționa profilul molecular al metastazelor limfonodale. În literatura de specialitate pot fi depistate doar câteva publicații cu date controversate privitor la studiul comparativ, molecular al tumorii primare și metastazei sale la același pacient [7-13]. Unii cercetători consideră că, subtipul molecular este stabil în decursul dezvoltării tumorale, totodată unele date ne sugerează că, expresia genică și fenotipul molecular nu sunt stabili în timpul progresiei cancerului mamar. Aceasta ar putea explica rezistența la tratament și recurențele ulterioare.

Scopul acestei lucrări este studiul comparativ al tumorii primare și metastazelor sale limfonodale, bazat pe procedeele imunohistochimice de evaluare a expresiei receptorilor ER, PR, Her2/neu, CK5 și Ki67, drept cei mai frecvenți markeri utilizați în diagnosticarea carcinomului mamar.

## Material și Metode

### Pacienți

Au fost colectate 172 specimene (88 tumori primare și 88 noduli limfatici axilari cu metastaze) de la 88 paciente diagnosticate cu carcinom mamar invaziv în stadii clinice avansate. Toate pacientele au fost supuse mastectomiei radicale în asociere cu evidarea nodulilor limfatici axilari, fără chimio-

logy) recommendations to a cut-off >1% for ER, PR markers [1].

**Conclusions:** It's important to describe the immunohistochemical profile (ER, PR, Her2, CK5, Ki67) at the lymph nodes metastasis level. The molecular subtypes determined by immunohistochemical assay are not stable during tumor progression. The highest rate of shifting has been reported from luminal to triple negative phenotype.

**Keywords:** breast cancer, metastasis, molecular profile, ER, PR, HER2/neu, CK5, Ki67.

## Introduction

Based on the GLOBOCAN 2008 results, about 12.7 million cancer cases and 7.6 million cancer deaths are estimated to have occurred in 2008 [2]. Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer among females. It accounts for 23% of the total cancer cases and 14% of the cancer deaths. Despite advances in genetic and histopathology, the incidence of this cancer type remains very high. Many factors are believed to contribute to this high rate of breast cancer, including lifestyle, environmental, genetic, and biological factors [3]. In order to find the best treatment, breast cancer was divided into categories, each based on different criteria. A new concept is purposing to categorize this disease into several molecular classes [4-6]. This one makes us to think about breast cancer not just as a single disease, but as several, at least 5 different subsets, with their proper molecular signs, characteristics of growth and different invasive potential. Unfortunately, development of resistance to therapy is frequent and often leads to cancer recurrence.

A common feature of malignant tumors is capacity to invade the nearby tissues and spread to more distant parts of the body through the bloodstream or lymphatic system. Traditionally pathologists are describing in details the primary tumor without mentioning molecular profile of metastases at the lymph nodes level. Nowadays, in the literature could find only several publications with controversial data, which are comparing these two sites from molecular position, primary tumor and its metastasis simultaneously at the same patient [7-13]. Some scientists consider that molecular subtype is stable during tumor development, in the same time some data let us suppose, that genes expression and molecular phenotype are not stable throughout tumor progression in breast cancer. This could explain the drug resistance and distant recurrences.

The aim of this study is a differential approach of primary tumor and its lymph node metastasis based on immunohistochemical assay of ER, PR, Her2/neu, CK5 and Ki67 receptors expression, as the most used markers in breast cancer diagnose.

## Materials and Methods

### Patients

The 172 specimens (88 primary tumors and paired 88 axillaries lymph nodes) were collected from 88 patients with invasive breast cancer in advanced clinical stages. No drug therapy preceded and all of patients underwent radical mastectomy and lymph nodes dissection. All biological material was col-

radioterapie antecedentă. Tot materialul biologic a fost colectat pe parcursul anilor 2012-2013 de la IMSP, Institutul Oncologic din Republica Moldova. Diagnosticul histopatologic a fost primar stabilit de morfologii acreditați ai instituției vizate și reconfirmat de 2 specialiști ai Centrului de Cercetări în Angiogeneză, Timișoara, România.

### Procesarea tisulară

Specimenele, tumora primară și metastaza limfonodală au fost plasate într-o casetă și ulterior procesate în condiții identice: fixare în formalină tamponată 10% timp de 24-48 ore și includere în parafină după un protocol tradițional. Pentru investigațiile histopatologice de rutină au fost colorate cu hematoxilină și eozină secțiuni de 4-6 μm grosime. Întru evitarea interpretărilor greșite privitor la procesarea tisulară, speci­menele (tumora primară și nodul limfatic) aceluiași caz au fost incluse într-un singur bloc de parafină, iar secțiunile ulterioare colorate pe aceeași lamă histologică (Fig. 1, pag. 51). Metastazele limfonodale au fost confirmate imunohistochimic cu un cocktail de citokeratine AE1/AE3. Suplimentar, secțiunile au fost colorate cu 5 anticorpi monoclonali utilizând tehnici imunohistochimice de rutină (Tabelul 1). Toate etapele imunohistochimice au fost efectuate automat prin utilizarea autostainer-ului Leica Bond-Max (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK). Contracolorarea nucleilor s-a efectuat cu hematoxilină Lille modificată.

**Tabelul 1**

Anticorpii utilizați: sursa, diluția, sistem de demascare, sistem de detecție, timp de incubare

	Anticorp/ clona	Sursa/timp de incubare / diluția	Sistem de demascare/ timp	Sistem de detecție/timp
1	ER/6F11	Leica Biosystem Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK/15 min/ RTU	Bond Epitope Retrieval Solution1, (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK)/20 min	Bond Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK), 15 min
2	PR/16			
3	Multi- cytokeratin/ (AE1/AE3)			
4	Her2 / policlonal	Dako Glostrup Denmark/30 min/RTU	Dako Target Retrieval Solution, pH6/20 min	EnVision- HER/30 min
5	Ki67/K2	Leica Biosystem Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK/15 min/ RTU	Bond Epitope Retrieval Solution2, (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK)/20 min	Bond Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK), 15 min
6	CK5/ XM26	Leica Biosystem Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK/15 min/ RTU		

lected during 2012-2013 from Oncological Institute, Republic of Moldova. The histopathological diagnosis was firstly established by accredited pathologists from above mentioned institution and confirmed by two specialists from Angiogenesis Research Center, Timisoara, Romania.

### Tissue processing

The specimens, primary tumor and its lymph node, placed in one cassette, were processed in an identical manner: fixed in 10% phosphate buffered formalin for 24-48h and paraffin embedded as traditionally. For routine histopathological assessment 4-6 μm sections were cut and stained with hematoxylin and eosin (HE). To avoid any misunderstandings about tissue processing, the specimens (primary tumor and lymph node) of the same patient have been embedded in a single paraffin block and sections were stained on the same slide (Fig. 1, pag. 51). The lymph nodes metastases were confirmed by immunohistochemistry with AE1/AE3 cytokeratin cocktail. In addition, sections were also stained with 5 monoclonal antibodies, using standard immunohistochemical techniques (Table 1). All stages of immunohistochemistry were performed automatically by using Leica Bond- Max (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK) autostainer. A modified Lille haematoxylin was used for counterstaining.

**Table 1**

Used antibodies: source, dilution, systems of detection and retrieval, time of incubation

	Antibody/ clone	Source/ incubation time/ dilution	Retrieval system/time	Detection/time
1	ER/6F11	Leica Biosystem Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK/15 min/ RTU	Bond Epitope Retrieval Solution1, (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK)/20 min	Bond Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK), 15 min
2	PR/16			
3	Multi- cytokeratin/ (AE1/AE3)			
4	Her2 / policlonal	Dako Glostrup Denmark/30 min/RTU	Dako Target Retrieval Solution, pH6/20 min	EnVision- HER/30 min
5	Ki67/K2	Leica Biosystem Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK/15 min/ RTU	Bond Epitope Retrieval Solution2, (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK)/20 min	Bond Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK), 15 min
6	CK5/ XM26	Leica Biosystem Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK/15 min/ RTU		



### **Evaluarea microscopică**

Tumora a fost evaluată drept ER, PR pozitivă dacă cel puțin 30% din celulele tumorale în secțiune prezentau un pattern nuclear specific (Fig. 2, pag. 52). Media aritmetică a fiecărui marker din metastaza limfonodală a fost comparată cu media markerului dat în tumora primară.

Colorarea cu Her2 a fost interpretată în corespundere cu recomandările ASCO [14]: Her2/neu-0 – în lipsa colorării sau colorarea membranară slabă, abia perceptibilă până la 10% din celule; Her2/neu+1 – la colorare membranară a >10% celule; Her2/neu+2 – în cazul colorării membranare incomplete, slab/moderată, circumferențială a >10% din celulele tumorale sau la colorarea circumferențială completă a <10% celule; Her2/neu+3 – la colorare circumferențială intensă a >10% celule tumorale. Cazurile interpretate Her2/neu +2 și +3 au fost considerate pozitive (Fig. 3, pag. 52).

Expresia CK5 a fost interpretată după Azoulay et al. [15]: 0 – în lipsa colorării; +1 – la colorarea a mai puțin de 10% din celulele tumorale; +2 – 10-50% din celule tumorale colorate; +3 – mai mult de 50% din celule tumorale colorate. Cazurile >0 au fost considerate pozitive (Fig. 4 pag. 53).

Pentru markerul Ki67 (Fig. 5, pag. 53) s-a utilizat un prag de 14% pentru delimitarea cazurilor pozitive/negative [16].

Celulele colorate a ducturilor normale au servit drept control intern. Rezultatele au fost grupate în 4 subgrupe:

1. ER<sup>+</sup> și/sau PR<sup>+</sup>, Her2<sup>-</sup>, CK5<sup>-</sup>, Ki67<14 drept Luminal A;
2. ER<sup>+</sup> și/sau PR<sup>+</sup>, Her2<sup>+</sup>, CK5<sup>-</sup>, Ki67<14 sau ER<sup>+</sup> și/sau PR<sup>+</sup>, Her2<sup>-</sup>, CK5<sup>-</sup>, Ki67>14 drept Luminal B;
3. ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup>, Her2<sup>+</sup>, CK5<sup>-</sup>, orice valoare a Ki67 drept Her2-su-praexpresat;
4. ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup>, Her2<sup>-</sup>, CK5<sup>+</sup>, orice valoare a Ki67 drept triplu negativ/basal like.

### **Achiziția imaginilor și procesarea datelor**

Numărarea a fost efectuată semi-automat [17] cu microscop Nikon Eclipse 80i cu cameră încorporată Nikon DS-Fi1, utilizând soft Nis-elements 2.30. Zece câmpuri microscopice (x400) a secțiunii imunocolorate cu cel mai înalt număr de celule pozitive au fost cuantificate. Pentru stocarea și gruparea datelor a fost utilizată baza de date MS Access 2003.

### **Analiza statistică**

Soft-ul WINSTAT 2012.1 a fost utilizat pentru analiza descriptivă, cu determinarea valorilor medii, erorilor standard a mediei. Cazurile cu  $p \leq 0.05$  au fost considerate statistic semnificative.

### **Etică**

Studiul a fost aprobat de Comitetul de Etică a Cercetării a Universității de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu", Chișinău, Republica Moldova, bazat pe consimțământul informat al pacientului.

### **Rezultate**

Rezultatele primite (Tabelul 2) prezintă prevalența în tumorile primare a cazurilor ER<sup>+</sup> (84.09%) față de cele PR<sup>+</sup> (76.14%). În metastazele limfonodale distribuția a fost evalu-

### **Microscopic evaluation**

The tumor was considered ER, PR positive if at least 30% of tumor cells in a section exhibited nuclear staining (Fig. 2, pag. 52). The mean levels of each marker from lymph node metastasis were compared with the primary tumor.

The Her2 status was interpreted in accordance with ASCO recommendations [14]: Her2/neu-0 if no staining observed or weak, barely perceptible membrane staining until 10% of cells; Her2/neu+1-in case of a weak membrane staining of >10%; Her2/neu+2- in case of incomplete, weak/moderate circumferential membrane staining >10% of tumor cells or complete circumferential intense staining <10% of cells; Her2/neu+3- in case of intense, circumferential staining of >10% of tumor cells. Cases with Her2/neu of +2 and +3 were considered as positive (Fig. 3, pag. 52).

The CK5 expression was interpreted as Azoulay et al. previously defined [15]: 0- no tumor cells stained; +1 – less of 10% of tumor cells stained; +2 – 10-50% of positive tumor cells; +3 – more than 50% of tumor cells stained. Expression was scored positive (>0) if any cytoplasmic and/or membranous staining tumor cells were observed (Fig. 4, pag. 53).

For Ki67 marker (Fig. 5, pag. 53) we used a 14% threshold as a limit to define positive/negative cases [16].

The positive cells of normal ducts served as internal control. The results were grouped in 4 subgroups:

1. ER<sup>+</sup> and/or PR<sup>+</sup>, Her2<sup>-</sup>, CK5<sup>-</sup>, Ki67<14 as Luminal A;
2. ER<sup>+</sup> and/or PR<sup>+</sup>, Her2<sup>+</sup>, CK5<sup>-</sup>, Ki67<14 or ER<sup>+</sup> and/or PR<sup>+</sup>, Her2<sup>-</sup>, CK5<sup>-</sup>, Ki67>14 as Luminal B;
3. ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup>, Her2<sup>+</sup>, CK5<sup>-</sup>, any Ki67 as Her2 over-expressed;
4. ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup>, Her2<sup>-</sup>, CK5<sup>+</sup>, any Ki67 as triple negative/basal like.

### **Image acquisition and data processing**

The counting was proceeded in a semi-automated way [17] on Nikon Eclipse 80i microscope with Nikon DS-Fi1 installed camera by using Nis-elements 2.30 imaging software. Ten microscope fields (x400) of immunostained section with the greatest number of positive cells were counted and summated to give a single figure. A MS Access 2003 database was used to store and group the data.

### **Statistical analysis**

The WINSTAT 2012.1 software was used for a descriptive statistics, the mean value and standard error of mean determined and for all the tests a P0.05 was considered significant.

### **Ethics**

The study has been approved by the Ethics Committee of the "Nicolae Testemițanu" University of Medicine and Pharmacy from Chisinau, Republic of Moldova, based on patients' informed consent.

### **Results**

In case of primary tumors our results show (Table 2) the prevalence of ER<sup>+</sup> cases (84.09%) to PR<sup>+</sup> (76.14%). In lymph node metastasis the distribution was ER<sup>+</sup> -67.05%, PR<sup>+</sup> -60.23% respectively. The same amount, of 12.5% Her2/neu<sup>+</sup> (>1+) was established at both sites.

ată cu cotă de 67.05% pentru cazurile ER<sup>+</sup> și 60.23% respectiv, pentru PR<sup>+</sup>. Aceași rată de 12.5% au prezentat cazurile Her2/neu<sup>+</sup> de ambele localizări.

**Tabelul 2**

Distribuția cazurilor pozitive după receptorii hormonal

	Tumora primară		Metastaze limfonodale	
	Nr cazuri	%	Nr cazuri	%
ER>30	74	84.09	59	67.05
PR>30	67	76.14	53	60.23
Her2/neu>1+	11	12.5	11	12.5

S-a determinat că, valorile medii ale celulelor ER<sup>+</sup> și PR<sup>+</sup> din tumora primară (ER<sup>+</sup>75.64%; PR<sup>+</sup>68.12%) prevalează față de valorile markerilor omonimi din metastazele limfonodale (ER<sup>+</sup>63.58% și PR<sup>+</sup>53.18%) (Tabelul 3).

**Tabelul 3**

Analiza statistică descriptivă pentru markerii ER și PR: valorile medii, eroarea standard a mediei

	Tumora primară		Metastaze limfonodale	
	ER	PR	ER	PR
Numar cazuri	88	88	88	88
Media (%)	75.64	68.12	63.58	53.18
Eroarea standard a mediei	3.74	4.20	4.73	4.57

În 72.73% cazuri carcinomul mamar a fost înregistrat drept ER<sup>+</sup> și PR<sup>+</sup> (Tabelul 4). În metastazele limfonodale (LNM) o așa combinație a fost depistată în 47.73%. Această combinație (ER>30 și PR>30) a fost unica combinație prevalentă la nivelul tumorii primare. O discrepanță înaltă a fost determinată la combinația ER<30, PR>30: 3.41% în tumora primară și 12.5% în LNM. O diferență dublă a fost înregistrată pentru cazurile ER<30, PR<30: 12.5% în tumora primară și 20.45% în LNM. Combinația ER>30, PR<30 a fost mai frecvent întâlnită în LNM (19.32%) comparativ cu situs-ul primar (11.36%). Distribuția markerului Her2/neu a înregistrat aceleași valori în tumora primară și LNM (Tabelul 5).

**Tabelul 4**

Distribuția cazurilor după markerii ER, PR

	Tumora primară		Metastaze limfonodale	
	Nr cazuri	%	Nr cazuri	%
ER>30, PR>30	64	72.73	42	47.73
ER>30, PR<30	10	11.36	17	19.32
ER<30, PR>30	3	3.41	11	12.5
ER<30, PR<30	11	12.5	18	20.45

După gruparea cazurilor în subtipuri moleculare am realizat că, cel mai frecvent profil în ambele situs-uri este Luminal

**Table 2**

Cases distribution by hormon receptors immunopositivity

	Primary tumor		Lymph node metastasis	
	Nr of cases	%	Nr of cases	%
ER>30	74	84.09	59	67.05
PR>30	67	76.14	53	60.23
Her2/neu>1+	11	12.5	11	12.5

It was determined that the mean values of ER<sup>+</sup> and PR<sup>+</sup> cells are much higher in the primary tumor (ER<sup>+</sup>75.64%; PR<sup>+</sup>68.12%) than in LNM – ER<sup>+</sup>63.58% and PR<sup>+</sup>53.18% (Table 3).

**Table 3**

Descriptive statistics for ER and PR markers: the mean values, standard error of mean

	Primary tumor		Lymph node metastasis	
	ER	PR	ER	PR
Valid cases	88	88	88	88
Mean (%)	75.64	68.12	63.58	53.18
Std. Error of mean	3.74	4.20	4.73	4.57

The 72.73% of ER<sup>+</sup> breast cancers were also PR<sup>+</sup> (Table 4). In the lymph node metastasis (LNM) a such combination was valid in 47.73%. The ER>30, PR>30 combination was a single one which prevailed at the level of primary situs (72.73% and 47.73% in LNM). A high discrepancy was determined for ER<30, PR>30 combination, as 3.41% in primary tumor and 12.5% in LNM. Almost a double difference was established for ER<30, PR<30 combination: 12.5% in primary tumor and 20.45% in LNM. The combination ER>30, PR<30 was higher in LNM (19.32%) in comparison with primary situs (11.36%). The distribution of Her2/neu by the grade was the same, in the primary tumor and lymph node metastasis (Table 5).

**Table 4**

Cases' distribution according to ER, PR positivity

	Primary tumor		Lymph node metastasis	
	number of cases	%	number of cases	%
ER>30, PR>30	64	72.73	42	47.73
ER>30, PR<30	10	11.36	17	19.32
ER<30, PR>30	3	3.41	11	12.5
ER<30, PR<30	11	12.5	18	20.45

After grouping HR results in molecular subtypes, we realized that the most common profile in both sites is Luminal A (77.27% in primary tumor and 71.59% in LNM) (Table 6). The Luminal B subtype was slightly higher in primary tumor – 10.23% and 7.95% in LNM, respectively.

An increased incidence of Basal Like subtype was deter-

A (77.27% în tumora primară și 71.59% în LNM) (Tabelul 6). Rata subtipului Luminal B a fost ușor superioară în tumora primară – 10.23% față de 7.95% în LNM.

**Tabelul 5**

Distribuția markerului Her2/neu: numărul de cazuri, procentaj în dependență de grad

Gradul	Tumora primară		Metastaze limfonodale	
	Nr cazuri	%	Nr cazuri	%
0	69	78.41	74	84.09
1	8	9.09	3	3.41
2	5	5.68	6	6.82
3	6	6.82	5	5.68

O incidență sporită a subtipului Basal Like a fost determinat în LNM –15.91% (și 10.23% în tumora primară). Distribuție similară, superior în LNM s-au determinat cazurile Her2/neu-supraexpresate – 4.55% (respectiv, 2.27% în situs-ul primar).

**Tabelul 6**

Subtipuri moleculare: numărul de cazuri în tumora primară și metastazele limfonodale (LNM)

Subtipul	Tumora primară		LNM	
	Nr cazuri	%	Nr cazuri	%
Luminal A	68	77.27	63	71.59
Basal Like	9	10.23	14	15.91
Luminal B	9	10.23	7	7.95
Her2+	2	2.27	4	4.55
	88	100	88	100

Apoi, am comparat subtipul molecular din tumora primară și LNM (Tabelul 7). Astfel, în 78.41% cazuri metastazele au păstrat același fenotip ca și tumora primară, iar în 21.59% subtipul molecular a fost unul diferit. În lotul de 21.59%, rata cea mai înaltă a înregistrat tranziția Luminal A – Basal Like – 9.09%. Și viceversa, am determinat 3 cazuri (3.41%) unde tumora Basal Like a continuat în metastază cu fenotip Luminal A.

**Tabelul 7**

Evoluția profilurilor moleculare: din tumora primară spre metastazele limfonodale (LNM)

	Tumora primară	LNM	Nr cazuri	%
1	Luminal A	Luminal A	58	65.91
2	Luminal B	Luminal B	5	5.68
3	Basal Like	Basal Like	5	5.68
4	Her2+	Her2+	1	1.14
5	Luminal A	Basal Like	8	9.09
6	Luminal A	Luminal B	2	2.27
7	Luminal B	Her2+	2	2.27
8	Luminal B	Luminal A	2	2.27
9	Her2+	Basal Like	1	1.14
10	Basal Like	Luminal A	3	3.41
11	Basal Like	Her2+	1	1.14
			88	100

mined in LNM – 15.91% (and 10.23% in primary tumor). The same, increased in LNM were the Her2/neu-overexpressed cases – 4.55% (2.27% respectively in primary situs).

**Table 5**

Her2/neu distribution: number of cases, percentage in accordance with Her2/neu grading

Grade	Primary tumor		Lymph node metastasis	
	number of cases	%	number of cases	%
0	69	78.41	74	84.09
1	8	9.09	3	3.41
2	5	5.68	6	6.82

**Table 6**

Molecular subtypes: number of cases and percentage in primary tumor and lymph node metastasis (LNM)

Subtype	Primary tumor		LNM	
	number of cases	%	number of cases	%
Luminal A	68	77.27	63	71.59
Basal Like	9	10.23	14	15.91
Luminal B	9	10.23	7	7.95
Her2+	2	2.27	4	4.55
	88	100	88	100

After, we cross-linked and compared the molecular subtype evolution from primary tumor to LNM (Table 7).

So, in 78.41% the metastasis preserve the same phenotype as the primary tumor and in 21.59% the molecular subtype was another one. In the group of 21.59%, the highest rate had transition from Luminal A to Basal like-9.09%. And vice versa, we had 3 cases (3.41%) where Basal Like tumor was followed by Luminal A phenotype metastasis.

**Table 7**

The molecular profiles evolution: from primary tumor to lymph node metastasis (LNM)

	Primary tumor	LNM	Number of cases	%
1	Luminal A	Luminal A	58	65.91
2	Luminal B	Luminal B	5	5.68
3	Basal Like	Basal Like	5	5.68
4	Her2+	Her2+	1	1.14
5	Luminal A	Basal Like	8	9.09
6	Luminal A	Luminal B	2	2.27
7	Luminal B	Her2+	2	2.27
8	Luminal B	Luminal A	2	2.27
9	Her2+	Basal Like	1	1.14
10	Basal Like	Luminal A	3	3.41
11	Basal Like	Her2+	1	1.14
			88	100

## Discuții

Weigelt et al. (2003) studiind profilul genic afirmă că, tumorile mamare primare sunt similare metastazelor la distanță la acelaș pacient (plămân, ovar, piele, nod limfatic) [18]. Autorii consideră că, capacitatea de metastazare a carcinomului mamar este o proprietate inerentă, stabilă și nu are la bază selecția clonală. Această afirmație susține rezultatele lui van der Vijver et al., (2002) care consideră capacitatea metastatică a tumorii drept pre-programată de la bun început [19]. Date similare au fost publicate de Bernards et al. (2002), care afirmă că proprietățile metastatice sunt determinate de procese înfăptuite în dezvoltarea incipientă a tumorii și nu sunt influențate de evenimentele petrecute ani, decade mai târziu la punctul culminant al progresiei tumorale [20]. Mai mult, s-a demonstrat că profilurile moleculare expresate au un rol predictoriu în ceea ce privește riscul de dezvoltare a metastazelor la distanță, chiar și la tumori primare de dimensiuni mici [19, 30].

Date contradictorii însă au fost prezentate de Montel et al. (2005, 2006) care a demonstrat câteva diferențe în profilurile genice expresate de tumori derivate din linii celulare umane clonate, cu potențial metastatic slab/absent și sursele izogene, metastatice, a acestor clone colectate de la acelaș pacient [21, 22]. Studiile recente prezintă dovezi precum că, celulele tumorale individuale coexistă într-o anumită tumoră, dar diferă enorm după capacitatea metastatică și mai mult, unele din ele nu au proprietăți metastatice [23]. Astfel se pare că, cancerele primare conțin multe tipuri de celule tumorale, care diferă după receptorii expesați și activitatea metastatică. În plus, cu cât crește abilitatea metastatică a populației celulare se schimbă concomitent și expresia receptorilor [21, 22]. Aceasta în concluzie demonstrează că, fenotipul malign și semnătura moleculară nu sunt predeterminate și statice, dar continuă să evolueze în tumoră pe parcursul vieții sale [7].

După răspândire din situs-ul primar, metastazele se prezintă drept tumori solide în organe îndepărtate [24, 25, 29]. Dar micromediul tisular în care au ancorat este diferit de cel de origine și posibil acționează asupra acestor celule inducând dezvoltarea răspunsurilor adaptive, ce stimulează creșterea sub formă de tumoră. În plus, s-a demonstrat rolul componentelor matricei extracelulare în progresarea și metastazarea cancerului de sân [25].

La moment sunt puține date privind compararea profilului molecular al tumorii primare și metastazelor acesteia. Falck et al. (2010) nu au determinat o asimetrie statistic semnificativă prin compararea fracțiilor celulare ER, PR, Her2 [10] și Ki67 pozitive, deși au prezentat discordanțe între tumora primară și metastază în 7% pentru ER, 16% pentru PR și 3% pentru Her2. Aceași autori, un an mai târziu (2011) au prezentat diferențe semnificative dintre tumora primară și LNM la paciente cu carcinom mamar, utilizând multipli fenotipuri moleculare. Cele 16% de cazuri discordante prezentau tranziția subtipului Luminal A la un subtip cu prognostic mai rezervat. Similare sunt și rezultatele noastre. În 9.09% cazuri (Tabelul 7) subtipul Luminal A din tumorile primare a fost succedat cu Basal Like în LNM. Recent, Falck et al. (2013) au determinat că, atunci când are loc transfer de subtip dintre tumora primară și metastaza limfonodală,

## Discussion

Weigelt et al. (2003) using gene expression profiling, affirm that human primary breast tumors are strikingly similar to the distant metastases (lung, ovary, skin, lymph node) of the same patient [18]. They consider that metastatic capability in breast cancer is an inherent feature and is not based on clonal selection. Such affirmation is in line with the results of van der Vijver et al. (2002), which consider that the metastatic proficiency of a tumor is pre-programmed from its beginning and sustain Bernards et al. (2002) results, that metastatic outcome is partly governed by events occurring early in the development of a tumor, rather than being dictated exclusively by events that occur many years or decades later at the culmination of tumor progression [20]. Furthermore, has been shown that expression profiles can predict the risk of development of distant metastases even for small primary tumors [19, 30].

By the other side Montel et al. (2005, 2006) demonstrated several differences in the expression signatures of tumors derived from cloned weakly/non-metastatic human cell lines and from their isogenic metastatic counterparts of the the same patient [21, 22]. Recent studies [23] have provided direct proof that individual cancer cells, co-existing within a given tumor, differ greatly in metastatic capability, moreover some of them are non-metastatic. It seems that primary cancers, contain many types of tumor cells, which can differ by expression profiles and their metastatic activity. Plus, as the metastatic ability of the cell population increases, the receptors profiles changes concomitantly [21, 22]. These are demonstrating conclusively that the malignant phenotype and its molecular signature are not pre-determined and static, but continue to evolve in a tumor throughout its life history [7].

After spreading from its primary situs, metastases arise as solid tumors in distant organs [24, 25, 29]. But the microenvironment of the tissue in which they have landed it's quite different from which they have originated and possibly creates a pressure on these cells requiring them to develop an adaptive responses which allow them to grow as a tumor in these nodes. Plus, it's demonstrated the role of extracellular matrix components in breast cancer progression and metastasis [25].

By the moment, are few data, which compared the molecular profiles of primary tumor and its metastasis. Falck et al. (2010) have not determined a statistically significant skewness by comparing the fraction of ER, PR, Her2 and Ki67 positive cells, but a fraction of 7% (ER), 16% (PR), 3% (Her2) discordant pairs were present [10]. The same authors, one year later (2011) showed discordance between primary tumors and lymph node metastasis in breast cancer patients according to a multiple molecular phenotype. The discordant 16% of cases were shifted from Luminal A to a subtype where survival analysis showed an impaired prognosis compared to this subgroup. Our results are of the same similarity. In 9.09% (Table 7) Luminal A from primary tumors was succeeded by a Basal Like subtype in lymph node metastasis. Recently Falck et al. (2013) determined that when a shift in subtype between primary tumour and metastatic lymph node is happened, the prognosis (for 10 years) seemed to follow the subtype of the lymph node. So, the prognostic information for individual patients appears

pronosticul pentru o perioadă de 10 ani corelează cu fenotipul molecular al metastazei [12]. Altfel spus, informația prognostică pentru fiecare pacient individual poate fi disponibilă prin analiza expresiei biomarkerilor în metastazele limfonodale sincrone. Autorii au concluzionat că, profilurile moleculare nu sunt stabile de-a lungul progresiei tumorale în carcinomul mamar.

Rezultate similare privind migrarea la un subtip cu pronostic mai rezervat, agresivitate înaltă a subtipurilor luminal și triplu negative de-a lungul progresiei tumorale au fost raportate de Castaneda et al. [26]. În plus, autorii au remarcat că tumorile cu subtip Her2 au un comportament agresiv, indiferent de localizare și dimensiunile primare.

Discordanțe semnificative privind statusul Her2, cu aplicație terapeutică a fost raportată de Santinelly A et al. [27]. În particular, s-au demonstrat diferențe dintre tumora primară și LNM sincrone în 6.7%, tumora primară și recurențele locale în 13.3%, tumora primară și metastazele metacrone îndepărtate în 28.6%. Conform rezultatelor noastre (Tabelul 7), subtipul Her2-supraexpresat s-a schimbat odată în Basal Like (1.14%). Rezultate similare a raportat Niikura N et al, unde din 40 cazuri Her2 pozitive (netratate) 4 metastaze au avut statut Her2 negativ [28]. Noi am înregistrat și transfer de fenotip spre Her2, precum: de la Luminal B în 2.27% (2 cazuri) și un caz (1.14%) din Basal Like. În 2 cazuri (2.27%) supraexpresia markerului Her2/neu a transferat subtipul Luminal A în Luminal B.

Similar nouă după structura experimentului este lucrarea publicată de Adamczyk et al., cu excepția faptului că, pacientele au fost supuse anterior chimioterapiei [13]. Autorii descriu doar divergențe în expresia markerului Her2 (4.5% cazuri) și valori similare a receptorilor ER, PR în tumora primară și LNM.

Dat fiind faptul că, laboratoarele folosesc un prag diferit de pozitivitate pentru markerii ER, PR am decis să micșorăm acest barem de la >30% la >1% celule pozitive, având la bază recomandările ASCO [1] (Tabelul 8). Rata cazurilor cu transfer de subtip a rămas oricum înaltă – 18.18%.

**Tabelul 8**

Evoluția profilurilor moleculare: din tumora primară spre metastazele limfonodale (LNM). Baremul de >1% pentru definirea cazurilor ER+, PR+ în baza recomandărilor ASCO.

	Tumora primară	LNM	Nr cazuri	%	
1	Luminal A	Luminal A	64	72.73	81.82
2	Luminal B	Luminal B	5	5.68	
3	Basal Like	Basal Like	2	2.27	
4	Her2+	Her2+	1	1.14	
5	Luminal A	Basal Like	5	5.68	18.18
6	Basal Like	Luminal A	3	3.41	
7	Luminal A	Luminal B	2	2.27	
8	Luminal B	Her2+	2	2.27	
9	Luminal B	Luminal A	2	2.27	
10	Basal Like	Her2+	1	1.14	
11	Luminal B	Basal Like	1	1.14	
			88	100	

## Concluzii

Este important de a descrie profilul imunohistochimic (ER,

to be available from the analysis of biomarker expression in synchronous metastatic lymph nodes [12]. Authors concluded that molecular profiles are not stable throughout tumor progression in breast cancer. Similar results about migration to a poor prognosis subtype and increasing aggressiveness of luminal and triple-negative subtypes throughout tumor progression reported [26]. Plus, the authors remark that tumors belonging to the Her2 subtype behave aggressively regardless to the primary size.

A therapeutically significant Her2 status discordance was demonstrated and by Santinelly A et al. [27] between primary carcinoma and synchronous lymph node metastases (6.7%), local recurrence (13.3%) and metachronous distant metastases (28.6%). In our results (Table 7) Her2/neu shifted once (1.14%) to the Basal Like. Similar results received Niikura N et al. where from 40 Her2 positive cases (not treated) four metastasis convert to Her2 negative status [28]. We encountered and shifting from other phenotypes to Her2+ as follows: from Luminal B in 2.27% (2 cases) and in 1 case (1.14%) from Basal Like. In 2 cases (2.27%) over expression of Her2/neu shifted Luminal A to Luminal B.

Except the fact, that cases were drug treated, a similar by the experiment structure was reported an article in 2012 [13], in which authors reported a discrepancy only in Her2 expression in 4.5% cases and a high concordance in ER, PR receptors status between primary tumor and LNM.

Due to fact, that laboratories are using a different cut-off for ER, PR markers we decided to decrease it from >30% to >1% positive cells, followed the ASCO recommendations [1] (Table 8). The rate of shifted cases remained anyway high – 18.18%.

**Table 8**

The molecular profiles evolution from primary tumor to lymph node metastasis (LNM). The cut-off >1% used for ER+, PR+ cases, in accordance with ASCO recommendations

	Primary tumor	LNM	Number of cases	%	
1	Luminal A	Luminal A	64	72.73	81.82
2	Luminal B	Luminal B	5	5.68	
3	Basal Like	Basal Like	2	2.27	
4	Her2+	Her2+	1	1.14	
5	Luminal A	Basal Like	5	5.68	18.18
6	Basal Like	Luminal A	3	3.41	
7	Luminal A	Luminal B	2	2.27	
8	Luminal B	Her2+	2	2.27	
9	Luminal B	Luminal A	2	2.27	
10	Basal Like	Her2+	1	1.14	
11	Luminal B	Basal Like	1	1.14	
			88	100	

## Conclusions

It's important to describe the immunohistochemical profile (ER, PR, Her2, CK5, Ki67) at the lymph nodes metastasis level. The molecular subtypes determined by immunohistochemical assay are not stable during tumor progression. The

PR, Her2, CK5, Ki67) la nivelul metastazelor limfonodale. Subtipurile moleculare determinate prin procedee imunohistochemice nu sunt stabile de-a lungul progresiei tumorale. Rata cea mai înaltă de transfer a fost înregistrată de la fenotip luminal la triplu negativ.

### Conflict de interese

Autorul nu a raportat nici un conflict de interese.

### Mulțumiri

Autorul este recunoscător domnului Profesor Marius Raica și întregii echipe de la Departamentul de Morfologie/Histologie microscopică, Centrul de Cercetări în Angiogeneză, Universitatea de Medicină și Farmacie "Victor Babeș", Timișoara, România, cu suportul enorm al cărora această lucrare a fost efectuată. Această cercetare a fost susținută de grantul 13.820.09.08/RoF de Cooperare bilaterală Romania-Moldova a Academiei de Științe a Moldovei.

### Bibliografie/ References

- Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*, 2013;24(9):2206-23.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2011; 61(2):69-90.
- Cummings SR, Tice JA, Bauer S, Browner WS, Cuzick J, Ziv E, Vogel V, Shepherd J, Vachon C, Smith-Bindman R, Kerlikowske K. Prevention of breast cancer in postmenopausal women: Approaches to estimating and reducing risk. *J Natl Cancer Inst*, 2009;101:384-98.
- Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature*, 2000; 406: 747-752.
- Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*, 2011; 5 (1): 5-23.
- Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, Speed D, Lynch AG, Samarajiva S, Yuan Y, Gräf S, Ha G, Haffari G, Bashashati A, Russell R, McKinney S; METABRIC Group, Langerød A, Green A, Provenzano E, Wishart G, Pinder S, Watson P, Markowitz F, Murphy L, Ellis I, Purushotham A, Børresen-Dale AL, Brenton JD, Tavaré S, Caldas C, Aparicio S. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*, 2012; 486(7403):346-52.
- Suzuki M, and Tarin D. Gene expression profiling of human lymph node metastases and matched primary breast carcinomas: Clinical implications. *Molecular Oncology*, 2007; 1, 172-180.
- Hao X, Sun B, Hu L, Lähdesmäki H, Dunmire V, Feng Y, Zhang SW, Wang H, Wu C, Wang H, Fuller GN, Symmans WF, Shmulevich I, Zhang W. Differential gene and protein expression in primary breast malignancies and their lymph node metastases as revealed by combined cDNA microarray and tissue microarray analysis. *Cancer*, 2004; 100 (6), 1110-1122.
- Feng Y, Sun B, Li X, Zhang L, Niu Y, Xiao C, Ning L, Fang Z, Wang Y, Zhang L, Cheng J, Zhang W, Hao X. Differentially expressed genes between primary cancer and paired lymph node metastases predict clinical outcome of node-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat*, 2007; 103(3):319-29.
- Falck AK, Fernö M, Bendahl PO, Ryden L. Does Analysis of Biomarkers in Tumor Cells in Lymph Node Metastases Give Additional Prognostic Information in Primary Breast Cancer? *World J Surg*, 2010; 34:1434-1441.
- Falck AK, Fernö M, Bendahl PO, Ryden L. Molecular Classification in Primary Breast Cancer and Corresponding Lymph Node Metastasis Show Impaired Prognostic Profile in the Metastatic Node. *Cancer Res*, 2011; 71(24), 566s-67s.
- Falck AK, Bendahl PO, Chebil G, Olsson H, Fernö M, Ryden L. Biomarker expression and St Gallen molecular subtype classification in primary tumours, synchronous lymph node metastases and asynchronous relapses in primary breast cancer patients with 10 years' follow-up. *Breast cancer Res Treat*, 2013;140(1):93-104.
- Adamczyk A, Niemiec J, Ambicka A, Małecki K, Wysocki WH, Mituś J, Ryś J. Expression of ER/PR/HER2, basal markers and adhesion molecules in primary breast cancer and in lymph nodes metastases: a comparative immunohistochemical analysis. *Pol J Pathol*, 2012; 63: 228-234.
- Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*, 2013; 31(31):3997-4013.
- Azoulay S, Laé M, Fréneaux P, Merle S, Al Ghuzlan A, Chnecker C, Rosty C, Klijanienko J, Sigal-Zafrani B, Salmon R, Fourquet A, Sastre-Garau X, Vincent-Salomon A. KIT is highly expressed in adenoid cystic carcinoma of the breast, a basal-like carcinoma associated with a favorable outcome. *Mod Pathol*, 2005; 18:1623-31.
- Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. *Ann Oncol*, 2011; 22(8):1736-47.
- Suciu C, Muresan AM, Cornea R, Suciu O, Dema A, Raica M. Semi automated evaluation of Ki 67 index in invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncol Lett*, 2014; 7: 107-114.
- Weigelt B., Glas AM, Wessels LF, Witteveen AT, Peterse JL, van't Veer LJ. Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003;100(26):15901-15905.
- van der Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards RA. Gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*, 2002; 347, 1999-2009.
- Bernards R, Weinberg R. A progression puzzle. *Nature*, 2002; 418(6900):823.
- Montel V, Huang TY, Mose E, Pestonjamas K, Tarin D. Expression profiling of primary tumors and matched lymphatic and lung metastases in a xenogeneic breast cancer model. *Am Pathol*, 2005; 166 (5), 1565-1579.
- Montel V, Mose ES, Tarin D. Tumor-stromal interactions reciprocally modulate gene expression patterns during carcinogenesis and metastasis. *Int J Cancer*, 2006; 119(2):251-63.

highest rate of shifting has been reported from luminal to triple negative phenotype.

### Authors' disclosures of potential conflicts of interest

The author indicated no potential conflicts of interest.

### Acknowledgements

The author is thankful to Professor Marius Raica and entire team from the Department of Microscopic Morphology/Histology, Angiogenesis Research Center, "Victor Babeș" University of Medicine and Pharmacy Timisoara, Romania, by whose enormous support this work could be done. This work was sustained by Bilateral Cooperation Romania-Moldova grant 13.820.09.08/RoF of Academy of Sciences of Moldova.

23. Urquidi V, Sloan D, Kawai K, Agarwal D, Woodman AC, Tarin D, Goodison S. Contrasting expression of thrombospondin-1 and osteopontin correlates with absence or presence of metastatic phenotype in an isogenic model of spontaneous human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res*, 2002; 8 (1), 61-74.
24. Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. in *Diseases of the Breast*, ed. Freeman, S. (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia), 2000, 749-751.
25. Oskarsson T. Extracellular matrix components in breast cancer progression and metastasis. *Breast*, 2013;22 Suppl 2:S66-72.
26. Castaneda C, Andrés E, Barcena C, Gómez HL, Cortés-Funés H, Ciruelos E. Behaviour of breast cancer molecular subtypes through tumour progression. *Clin Transl Oncol*, 2012; 14(6):481-5.
27. Santinelli A, Pisa E, Stramazzotti D, Fabris G. HER-2 status discrepancy between primary breast cancer and metastatic sites. Impact on target therapy. *Int J Cancer*, 2008; 122: 999-1004.
28. Niikura N, Liu J, Hayashi N, Mittendorf EA, Gong Y, Palla SL, Tokuda Y, Gonzalez-Angulo AM, Hortobagyi GN, Ueno NT. Loss of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expression in metastatic sites of HER2-overexpressing primary breast tumors. *J Clin Oncol*, 2012; 30: 593-599.
29. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*, 2002; 2(8), 563-572.
30. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 2002; 415(6871):530-6.

## Leziunile mucinoase ale apendicelui cu potențial malign

Gheorghe Ghidirim<sup>+1</sup>, Igor Misin<sup>+12</sup>, Gheorghe Rojnovanu<sup>+1</sup>, Marin Vozian<sup>+1</sup>, Ana Misina<sup>+3</sup>

<sup>1</sup> Catedra Chirurgie nr.1 „Nicolae Anestiadi” și Laboratorul de Chirurgie Hepato-Pancreato-Biliară, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Moldova

<sup>2</sup> Institutul de Medicină Urgentă,

<sup>3</sup> Secția de Ginecologie Chirurgicală, Institutul Mamei și Copilului

### Autor corespondent:

Marin Vozian,  
Catedra de chirurgie nr.1 „Nicolae Anestiadi”  
Institutul de Medicină Urgentă  
1, str. Toma Ciorbă, Chișinău, MD 2004  
Republica Moldova  
e-mail: marin.vozian@usmf.md

## Low grade and high grade appendiceal mucinous lesions

Gheorghe Ghidirim<sup>+1</sup>, Igor Misin<sup>+12</sup>, Gheorghe Rojnovanu<sup>+1</sup>, Marin Vozian<sup>+1</sup>, Ana Misina<sup>+3</sup>

<sup>1</sup> Chair of Surgery nr.1 “Nicolae Anestiadi” and Laboratory of Hepato-Pancreato-Biliary Surgery, State Medical and Pharmaceutical University “Nicolae Testemițanu”

<sup>2</sup> Institute of Emergency Medicine,

<sup>3</sup> Surgical Gynecology Unit, Institute of Mother and Child;

### Corresponding author:

Marin Vozian, MD  
Chair of Surgery nr.1 “Nicolae Anestiadi”  
Institute of Emergency Medicine,  
1, Toma Ciorna street, Chisinau,  
Republic of Moldova, MD 2004  
e-mail: marin.vozian@usmf.md

### Rezumat

**Introducere.** Mucocelele apendicelare reprezintă o patologie rară, care se poate prezenta printr-o varietate de semne clinice sau poate fi depistată incidental intraoperator. Mucocelele apendicelare reprezintă o dilatare a apendicelui care se datorează acumulării intraluminală a substanței mucinoase și poate fi un proces atât benign, cât și malign. Incidența mucocelelor apendicelare este de 0.2-0.4% din apendicelele vermiculare înlăturate și constituie 8% din toate tumorile apendicelui. Mucocelele apendicelare în 10-15% din cazuri poate progresa spre pseudomixom peritoneal, care are un impact major asupra rezultatelor tratamentului și supraviețuirii. Pseudomixomul peritoneal are o incidență estimată de un caz la un milion pe an. Nu există, totuși, o statistică relevantă privind frecvența evoluției leziunilor mucinoase ale apendicelui spre pseudomixom. Scopul acestui studiu este de a analiza rezultatele proprii ale tratamentului mucocelelor apendicelare.

**Materiale și metode.** În studiu au fost incluși 22 de pacienți din trei instituții. Din grupul total 10 pacienți (45,45%) au fost diagnosticați primar sau au dezvoltat pe parcurs pseudomixom peritoneal, dintre care nouă cu neoplasme mucinoase cu potențial malign sporit.

### Abstract

**Introduction.** Appendiceal mucoceles is a rare entity that can present with a variety of clinical symptoms or occur as an incidental surgical finding. Appendiceal mucoceles is a dilatation of the appendix as a result of intraluminal accumulation of the mucoid substance. It may be a benign or malignant process. The incidence is 0.2%-0.4% of all appendectomized specimens and 8% of appendiceal tumors. Around 10%-15% of mucoceles progress to pseudomyxoma peritonei, changing completely the outcome. Pseudomyxoma peritonei is a rare disease with an estimated incidence of 1 per million per year, and is thought to originate usually from an appendiceal mucinous epithelial neoplasm. However it is not known exactly how often these neoplasms lead to pseudomyxoma peritonei. The aim of this study was to analyze the own treatment results of these pathologies.

**Materials and methods.** Twenty two patients from three institutions were included in the study. Ten patients (45,45%) were primarily diagnosed or subsequently developed pseudomyxoma peritonei, nine of them had high grade appendiceal mucinous neoplasms.

**Results.** The median time between diagnosis of the prima-



**Rezultate.** Durata medie dintre diagnosticarea leziunii mucinoase primare și dezvoltarea pseudomixomului peritoneal a constituit  $75 \pm 24.77$  luni. Au decedat 4 pacienți din lotul cu neoplasme mucinoase cu potențial malign sporit.

**Concluzii.** Datele obținute arată o diferență statistic semnificativă a duratei supraviețuirii și a apariției pseudomixomului peritoneal în funcție de tipul histologic al neoplasmelor apendiculare mucinoase, fiind mai frecvente în cazul leziunilor mucinoase cu potențial malign sporit.

**Cuvinte cheie:** mucocele apendicular, pseudomixom peritoneal, rezultatele tratamentului, supraviețuire.

### Introducere

Karl Rokitsansky primul a descris un mucocele apendicular (MA) cu degenerare mucinoasă [1]. Câteva decenii mai târziu, în 1884, Werth a introdus termenul de pseudomixom peritoneal (PMP), ceea ce înseamnă tumoră mucinoasă falsă a peritoneului [2]. La momentul actual se consideră că PMP este asociat neoplasmelor mucinoase epiteliale ale apendicelui [3-12]. Termenul "mucocele apendicular" include diagnosticul histologic de mucocele simplu sau chist de retenție, hiperplazie a mucoasei, chistadenom mucinos și chistadenocarcinom mucinos, cu excepția cazurilor care au fost inițial depistate cu pseudomixom peritoneal [13]. Totuși, unii autori pun la îndoială această clasificare și propun ca în baza particularităților arhitectonice și citologice MA să fie clasificate drept neoplasme apendiculare mucinoase cu potențial malign redus („low-grade”) (LGAMN) și cu potențial malign înalt sau adenocarcinomul mucinos („high-grade”) (HGAMN) [14].

Dezvoltarea PMP din leziunile mucinoase apendiculare se explică prin faptul că acestea tind să producă un volum progresiv de mucus, care eventual poate duce la perforația apendicelui cu distribuția ulterioară a celulelor tumorale producătoare de mucus prin cavitatea peritoneală. Aceste celule se răspândesc prin cavitatea peritoneală conform fenomenului de distribuție asociat curenților de lichid peritoneal și gravitației [15]. În final, distribuția acestor celule tumorale mucinoase rezultă în dezvoltarea implantelor peritoneale și a ascitei mucinoase. Din acest motiv pacienții cu PMP se prezintă frecvent cu distensie abdominală progresivă supranumită "jelly belly" (abdomen de jeleu).

Deoarece celulele tumorale nu manifestă proprietăți invazive, nu există diseminare hematologică, iar metastazele limfatice sunt extrem de rare, pseudomixomul peritoneal deseori este descris drept o afecțiune peritoneală benignă. Analiza histopatologică a arătat, totuși, existența tranziției de la caracteristici benigne spre maligne. Cu scop de a oferi o clasificare morfologică utilă, Ronnett și coautorii (1995) a categorizat PMP în trei subtipuri morfologice [16]. În pofida utilității acesteia, în special în evaluarea pronosticului, această clasificare nu este unanim acceptată. Unii autori clasifică PMP în funcție de potențialul malign: cu potențial malign redus ("low grade") și potențial malign sporit ("high grade") [10,17-19]. Deoarece la ora actuală apendicele este considerat originea primară dominantă a PMP, rămâne actuală întrebarea estimării riscului de dezvoltare a pseudomixomului la pacienții cu mucocele apendicular.

ry neoplasm and pseudomyxoma peritonei development was 75 months. Four patients died from the high grade appendiceal mucinous neoplasms group.

**Conclusions.** The obtained data show a statistically significant difference of the survival time and of the development of pseudomyxoma peritonei depending on the histological type of the appendiceal mucinous lesions, and the latter is more frequent in case of high grade appendiceal mucinous neoplasms.

**Key words:** appendiceal mucoceles, pseudomyxoma peritonei, treatment results, survival.

### Introduction

Karl Rokitsansky was the first to describe an appendiceal mucocele (AM) with mucinous degeneration [1]. Several decades later, in 1884, Werth introduced the term pseudomyxoma peritonei (PMP), which means a false mucinous tumour of the peritoneum [2]. Nowadays, it is considered, that PMP is associated with epithelial mucinous appendiceal neoplasms [3-12]. The term "mucoceles of the appendix" includes the histological diagnosis of simple mucoceles or retention cyst, mucosal hyperplasia, mucinous cystadenoma, and mucinous cystadenocarcinoma, excluding all cases that were initially discovered as pseudomyxoma peritonei [13]. Notwithstanding, some authors have recently questioned this classification and terminology due to uncertain behavior and proposed to classify the AM based on the cytological and architectural features into "low-grade" appendiceal mucinous neoplasms (LGAMN) and "high-grade" appendiceal mucinous neoplasms or mucinous adenocarcinoma (HGAMN) [14].

PMP develop from mucinous appendiceal lesions due to the fact that the latter tend to produce a progressive volume of mucinous content, which may lead eventually to a perforation of the appendix with subsequent distribution of the mucin producing cells throughout the peritoneal cavity. These cells spread through the peritoneal cavity according to the distribution phenomenon associated to the peritoneal fluid currents and gravitation [15]. Finally, the distribution of these cells results in the development of peritoneal implants and mucinous ascites. Thus, patients with PMP present frequently with a progressive girth increase named "jelly belly".

Pseudomyxoma peritonei is frequently described as a benign peritoneal lesion, because the tumour cells do not show invasive properties, there is no hematogenous dissemination, and lymphatic metastases are extremely rare. Histopathological analysis showed, though, a transition from benign to malignant features. In order to offer an useful morphological classification Ronnett et al (1995) categorized PMP into three morphological subtypes [16]. But regardless of its utility, especially for prognosis assessment, this classification is not unanimously accepted. Some authors classify PMP depending on the malignant potential: "low grade" and "high grade" [10,17-19]. Because the appendix is considered the primary dominant origin of PMP, the issue of risk assessment of PMP development in patients with AM is still actual.

## Materiale și metode

Au fost analizați prospectiv și retrospectiv 22 de pacienți cu mucocel apendicular și complicații ale acestuia. Șase pacienți au fost referiți și 16 pacienți au beneficiat de tratament primar în clinica noastră. Pacienții au fost divizați în două loturi conform tipului histologic: în primul lot au fost incluși pacienții cu mucocel simplu și neoplasme mucinoase ale apendicelui cu potențial malign redus (n=12) și în al doilea lot au fost incluși pacienții cu neoplasme mucinoase ale apendicelui cu potențial malign înalt (n=10). Analiza statistică a fost efectuată cu utilizarea unpaired t test și Fisher exact test (GraphPad Prism 5.0) și testul Kaplan-Meier pentru supraviețuire și dezvoltarea complicațiilor (SPSS Statistics 17.0).

În lotul general au fost 14 femei și 8 bărbați; vârsta medie 55.05±3.39 ani (95% CI:47.99-62.10). În primul lot au fost 9 femei cu vârsta medie 52.67±5.55 ani (95% CI:39.87-65.47) vs 3 bărbați cu vârsta medie 39.3±5.2 ani (95% CI:16.93-61.74) (p=0.22). Intervențiile chirurgicale de care au beneficiat pacienții din primul lot sunt reflectate în Tabelul 1. Examenul histologic a confirmat mucocel simplu sau neoplasme mucinoase ale apendicelui cu potențial malign redus în toate cazurile.

**Tabelul 1**

Structura intervențiilor chirurgicale din lotul LGAMN

Intervenția chirurgicală	n
Apendicectomie (Fig.1, pag. 58)	10
Apendicectomie combinată cu histerectomie subtotală și anexectomie bilaterală în prima etapă și două intervenții citoreductive ulterioare pentru pseudomixom	1
Apendicectomie cu rezecție de intestin subțire (MA găsit incidental în cadrul operației pentru ischemie mezenterică acută)	1
Total	12

În al doilea lot au fost 5 femei cu vârsta medie 63.2±6.71 ani (95% CI:44.57-81.83) vs 5 bărbați cu vârsta medie 60.6±6.16 ani (95% CI:43.47-77.73) (p=0,78). Trei pacienți au avut intervenții primare (apendicectomie) și ulterior în rezultatul dezvoltării complicațiilor – pseudomixom peritoneal (n=2) și metastazare în cicatricea postoperatorie cu fistulă mucinoasă externă (n=1) – au fost efectuate intervenții repetate. Ceilalți pacienți (n=6) s-au prezentat primar cu complicații ale MA: pseudomixom peritoneal (n=5), pseudomixom extraperitoneal (n=1) și fistulă cutanată mucinoasă (n=1). Operațiile suportate de pacienții din al doilea lot sunt reflectate în Tabelulul 2. Examenul histologic a confirmat neoplasme mucinoase apendiculare cu potențial malign înalt în toate cazurile.

## Rezultate

Durata supravegherii postoperatorii a bolnavilor a constituit 41.25±7.23 (95% CI:24.15-58.35) luni pentru pacienții din lotul LGAMN și 32.33±9.71 (95% CI:9.93-54.73) luni pentru lotul HGAMN. În grupul LGAMN la un pacient s-a dezvoltat pseudomixomul peritoneal vs 9 pacienți din grupul HGAMN (8.33% vs 90.0%; p=0.0003) (Fig. 3, pag. 58). În grupul LGAMN nu s-au înregistrat decese imediate și la distanță vs 4 pacienți care au decedat din grupul HGAMN (0% vs 40.0%; p=0.035) (Fig. 4,

## Material and methods

Twenty two patients with AM and its complications were analyzed retro- and prospectively. Six patients were referred and 16 were primarily treated in our unit. According to the histological type the patients were divided in two groups: the first group included cases with simple mucoceles and low grade appendiceal mucinous neoplasms (n=12) and the second group included patients with high grade appendiceal mucinous neoplasms (n=10). The statistical analysis was performed with unpaired t test and Fisher exact test (GraphPad Prism 5.0) and Kaplan-Meier test for survival and complication development prognosis (SPSS Statistics 17.0).

The general group included 14 female and 8 male patients; mean age 55.05±3.39 years (95% CI:47.99-62.10). In the first group there were 9 female patients with median age 52.67±5.55 years (95% CI:39.87-65.47) vs 3 male patients with median age 39.3±5.2 years (95% CI:16.93-61.74) (p=0.22). The surgical procedures from the LGAMN group are shown in table 1. Histology showed simple mucoceles or low grade appendiceal mucinous neoplasms in all cases.

**Table 1**

Surgical procedures within the LGAMN group

Surgical procedure	n
Appendectomy (Fig. 1, pag. 58)	10
Appendectomy + subtotal hysterectomy and bilateral adnexectomy as the first procedure and two subsequent cytoreductive interventions for pseudomyxoma	1
Appendectomy + small bowel resection (AM found incidentally during surgery for acute mesenteric ischemia)	1
Total	12

In the second group there were 5 female patients with median age 63.2±6.71 years (95% CI:44.57-81.83) vs 5 male patients with median age 60.6±6.16 years (95% CI:43.47-77.73) (p=0,78). Three patients underwent primary surgery (appendectomy) and subsequently were operated for complications – PMP (n=2) and postoperative scar metastases with external mucinous fistula (n=1). Other patients (n=6) presented initially with complications of the AM: pseudomyxoma peritonei (n=5), pseudomyxoma extraperitonei (n=1) and mucinous skin fistula (n=1). The surgical procedures from the HGAMN group are shown in table 2. Histology showed high grade appendiceal mucinous neoplasms in all cases.

## Results

Median postoperative survival was 41.25±7.23 (95% CI:24.15-58.35) months for LGAMN patients and 32.33±9.71 (95% CI:9.93-54.73) months for HGAMN patients. In the LGAMN group one patient developed PMP vs 9 patients from HGAMN group (8.33% vs 90.0%; p=0.0003) (Fig. 3, pag. 58). In the LGAMN group no immediate or late deaths were recorded versus 4 patients died from the HGAMN group (0% vs 40.0%; p=0.035) (Fig. 4, pag. 58). The death occurred after 14.5±5.04 (95% CI:-1.54-30.54) months postoperatively due to PMP progression and intestinal obstruction (n=2), pleural spread of

pag. 58). Decesul a survenit la  $14.5 \pm 5.04$  (95% CI: -1.54-30.54) luni postoperator din cauza progresării PMP și ocluzie intestinală (n=2), extinderea pleurală a PMP (n=1) și episod coronarian acut (n=1). Durata medie dintre diagnosticarea neoplasmului primar și dezvoltarea PMP a constituit  $75 \pm 24.77$  (95% CI: 11.31-138.7) luni (au fost excluși pacienții cu prezentare primară cu pseudomixom peritoneal).

**Tabelul 2**

Structura intervențiilor chirurgicale din lotul HGAMN

Intervenția chirurgicală primară	n	Intervenția chirurgicală repetată pentru complicații (PMP, fistulă mucinoasă)	n
Apendicectomie	3	Intervenții citoreductive + HIPEC* + EPIC**	2
		Hemicolonectomie cu excizia metastazei cicatricei postoperatorii + HIPEC + EPIC	1
Hemicolonectomie cu excizia fistulei	1		
Hemicolonectomie cu HIPEC și EPIC	1		
Intervenție citoreductivă cu HIPEC și EPIC (Fig. 2, pag. 58)	3		
Laparocenteză cu EPIC	1		
Excizia pseudomixomului extraperitoneal cu HIPEC și EPIC	1		
Total	10		

**Notă:** \*HIPEC - chimioterapie hipertermică intraoperatorie; \*\*EPIC - chimioterapie hipertermică postoperatorie.

## Discuții

Mucocelele apendicelare (MA) este o nozologie rar întâlnită, care se poate prezenta printr-o varietate de simptome clinice sau poate fi depistat incidental intraoperator. Incidența MA este de 0.2-0.4% din apendicele viermiculare înlăturate și constituie 8% din toate tumorile apendicelui [20-24]. MA reprezintă o dilatare progresivă a apendicelui în rezultatul acumulării intraluminală a substanței mucinoase [24, 25] și poate fi un proces atât benign, cât și malign.

Datele din literatură privind distribuția pe sexe sunt controversate. Unele studii descriu predominanță feminină [21,26], pe când altele raportează o incidență similară la femei și bărbați [27,28], iar alți cercetători comunică o rată mai mare la bărbați [20]. În studiul de față au predominat pacienții de sex feminin. Distribuția conform vârstei arată o incidență predominantă în decadele a V-a și a VI-a de viață, deși MA poate fi diagnosticat la orice vârstă [27]. În studiul prezent au fost obținute date similare în ceea ce ține de vârsta medie, pe lângă aceasta s-a observat o tendință spre vârsta medie mai mare în lotul de neoplasme mucinoase ale apendicelui cu potențial malign sporit, comparativ cu lotul de neoplasme mucinoase ale apendicelui cu potențial malign redus:  $61.9 \pm 4.31$  (95% CI: 52.13-71.67) vs  $49.33 \pm 4.59$  (95% CI: 39.23-59.44) ( $p > 0.1$ ).

Complicațiile spontane și induse de intervenție al MA includ ocluzia intestinală, invaginarea [29,30], hemoragie intestinală [31-33], fistule [34-37], volvulus [38-40], sindrom de compartiment [41]. Cea mai severă complicație este pseudomixomul pe-

the PMP (n=1) and acute cardiac event (n=1). The median time elapsed from the diagnose of the primary neoplasm and PMP development was  $75 \pm 24.77$  (95% CI: 11.31-138.7) months (presented initially with PMP were excluded).

**Table 2**

Surgical procedures within the HGAMN group

Primary surgical procedure	n	Consequent surgical procedure for complications (PMP, mucinous fistula)	n
Appendectomy	3	Cytoreductive surgery + HIPEC* + EPIC**	2
		Hemicolectomy with postoperative scar implant excision + HIPEC + EPIC	1
Hemicolectomy with fistula excision	1		
Hemicolectomy with HIPEC and EPIC	1		
Cytoreductive surgery with HIPEC and EPIC (Fig. 2, pag. 58)	3		
Laparocenteză cu EPIC	1		
Pseudomyxoma extraperitonei excision with HIPEC and EPIC	1		
Total	10		

**Note:** \*HIPEC – hyperthermic intraoperative chemotherapy; \*\*EPIC – early postoperative hyperthermic chemotherapy.

## Discussion

Appendiceal mucoceles (AM) is a rare entity that can present with a variety of clinical symptoms or occur as an incidental surgical finding. The incidence is 0.2%-0.4% of all appendectomied specimens and 8% of appendiceal tumors [20-24]. AM is a progressive dilatation of the appendix as a result of intraluminal accumulation of the mucoid substance [24, 25] and may be a benign or malignant process.

Referring to gender distribution, there are discrepancies between different reports. Some studies describe female predominance [21, 26], others show a similar incidence in men and women [27, 28], and still others, show a higher frequency in men [20]. In present study a female preponderance was noted. In age distribution the incidence is predominating in the 5th and 6th decades of life, although mucoceles may be diagnosed at any age [27]. In present study similar results were obtained regarding the median age, besides a tendency to a higher median age in the HGAMN vs LGAMN group was evident:  $61.9 \pm 4.31$  (95% CI: 52.13-71.67) vs  $49.33 \pm 4.59$  (95% CI: 39.23-59.44) ( $p > 0.1$ ).

The spontaneous and surgery induced complications of AM include intestinal obstruction, intussusceptions [29,30], intestinal bleeding [31-33], fistula formation [34-37], volvulus [38-40], compartment syndrome [41]. The worst complication is pseudomyxoma peritonei, characterized by peritoneal dissemination caused by iatrogenic or spontaneous rupture of the mucoceles [42]. Classically it has been thought that only cystadenocarcinomas might progress to pseudomyxoma peritonei, whereas the other histological types of mucoceles were benign. Recently it has been observed some cases of pseudomyxoma peritonei originated from the other types of mucoceles. Misdr-

ritoneal, caracterizat prin diseminare peritoneală în rezultatul rupturii spontane sau iatrogene a mucocelului [42]. Tradițional se considera, că doar chistadenocarcinoamele pot progresa spre pseudomixom peritoneal, pe când alte tipuri histologice ale MA sunt benigne. Recent au fost observate cazuri de pseudomixom peritoneal dezvoltat din alte tipuri ale mucocelului. Misdraji și coautorii (2003) a prezentat 3 cazuri de pseudomixom peritoneal care au progresat din neoplasme mucinoase apendiculare cu potențial malign redus. Acestea erau caracterizate de celuritate înaltă a mucusului și atipie celulară moderată, fără a atinge criteriile de diagnostic pentru chistadenocarcinom [14]. Incidența mai mare a perforației în caz de chistadenocarcinoame ar putea justifica faptul, că majoritatea pseudomixomelor au aceste elemente histologice. Similar rezultatelor raportate în literatura de specialitate în studiul dat pseudomixomul peritoneal s-a dezvoltat în 9 cazuri din lotul cu HGAMN și într-un caz cu LGAMN (peste 120 de luni de la intervenția primară), fapt ce confirmă că deși există o probabilitate mai mare de dezvoltare a PMP din chistadenocarcinoame mucinoase, în caz de mucocele cu potențial malign redus, totuși persistă riscul de asemenea complicații. Din acest motiv este argumentată supravegherea la distanță a acestor pacienți.

Rezultatele apendicectomiei în mucocele simple, hiperplazie de mucoasă, și chistadenom mucinos sunt excelente, atingând rata de supraviețuire de 91% la 10 ani. Chistadenocarcinoamele fără implicare peritoneală sau a organelor adiacente sunt însoțite de rezultate satisfăcătoare după rezecția chirurgicală, însă există riscul de progresare a procesului patologic spre pseudomixom peritoneal, rata de supraviețuire la 5 ani în acest caz constituind 25%, cauzele decesului fiind mai frecvent ocluzia intestinală sau insuficiența renală [26].

În pofida rezultatelor bune imediate după operația pentru mucocele, o monitorizare la distanță este recomandată, deoarece există cazuri de recidive sub formă de pseudomixom peritoneal și de neoplasme colonice metacrone [27,43]. Urmărirea pacienților la distanță este recomandată în toate cazurile, chiar și în formele histologice benigne (mucocele simple, hiperplazie de mucoasă, chistadenom mucinos), deoarece sunt descrise cazuri de dezvoltare a pseudomixomului peritoneal, deși, evident, mai puțin frecvente [44].

**În concluzie**, datele apărute recent atestă faptul că nu doar formele maligne de mucocele pot progresa spre pseudomixom, fapt confirmat și în studiul prezent. Din acest motiv se impune o monitorizare la distanță a tuturor pacienților cu leziuni mucinoase ale apendicelui. Datele obținute arată o diferență statistic semnificativă a duratei supraviețuirii și a apariției pseudomixomului peritoneal în funcție de tipul histologic al neoplasmelor apendiculare mucinoase, fiind mai frecvente în cazul leziunilor mucinoase cu potențial malign sporit.

#### **Contribuția autorilor:**

Gheorghe Ghidirim, Igor Mișin, Gheorghe Rojnoveanu, Marin Vozian și Ana Mișina au conceput studiul și au participat la elaborarea design-ului cercetării, colectarea materialului clinic și au contribuit la redactarea manuscrisului. Marin Vozian a efectuat analiza statistică a datelor. Manuscrisul final a fost citit și aprobat de către toți autorii.

ji et al. (2003) presented 3 cases of pseudomyxoma peritonei appearing as progression of low-grade mucinous appendiceal neoplasms. Their only differential features were higher cellularity of the mucus and more cytological atypia, without reaching criteria to establish the diagnosis of mucinous cystadenocarcinoma [14]. The higher incidence of perforation in cystadenocarcinomas would justify that most pseudomyxoma peritonei had this histological pattern. Similar to other studies reported in the literature, in present study pseudomyxoma peritonei developed in 9 cases from the HGAMN group and just in one case with LGAMN (after over 120 months from the primary surgery), this confirming the fact that although there is a higher probability for PMP development from mucinous cystadenocarcinomas, in case of LGAMN still exists a risk of such complications. Thus a close follow up of these patients is mandatory.

The outcome of simple mucoceles, mucosal hyperplasia, and mucinous cystadenoma after appendectomy is excellent, reaching 91% 10-year survival. Cystadenocarcinomas without peritoneal or adjacent organ involvement also show good outcome after surgical resection, but when they are at risk of progressing to pseudomyxoma peritonei, 5-year survival is 25%, with most deaths attributed to intestinal obstruction or renal failure [26].

In spite of an immediate good outcome of operation for mucoceles, follow-up is recommended, because there are cases of recurrences as pseudomyxoma peritonei and instances of metachronic colonic neoplasms [27,43]. Follow-up is recommended in all cases, even those with benign histology (simple mucoceles, mucosal hyperplasia, and mucinous cystadenoma), because there are cases reported of development of pseudomyxoma peritonei with these histological types, although, obviously, less frequent [44].

**In conclusion**, the recent data show that not only the high grade appendiceal mucinous neoplasms may lead to pseudomyxoma, which was confirmed by the present study. Thus, a close follow up is mandatory for all patients with appendiceal mucinous lesions, regardless of its histological type. The obtained data show a statistically significant difference of the survival time and of the development of pseudomyxoma peritonei depending on the histological type of the appendiceal mucinous lesions, and the latter is more frequent in case of high grade appendiceal mucinous neoplasms.

#### **Authors contribution:**

George Ghidirim, Igor Mishin, Rojnoveanu Gheorghe, Marin Vozian and Ana Mișina conceived the study and participated in drafting of research design, clinical data collection and contributed to writing the manuscript. Marin Vozian performed statistical analysis. Final manuscript was read and approved by all authors.

#### **Conflict of interest:**

Authors declare no financial or nonfinancial conflict of interest.

### Conflict de interes

Autorii declară că nu se află în conflict de interese financiare sau nonfinanciare pentru datele și informațiile prezentate în manuscris.

### Bibliografie/ References

- Weaver CH. Mucocele of the appendix with pseudomucinous degeneration. *Am J Surg*, 1937;36:523.
- Werth R. Klinische und Anatomische Untersuchungen zur Lehre von den Bauchgeschwuelsten und der Laparotomie. *Arch Gynaecol Obstet*, 1884;24:100–18.
- Lamps LW, Gray Jr GF, Dilday BR, Washington MK. The coexistence of low-grade mucinous neoplasms of the appendix and appendiceal diverticula: a possible role in the pathogenesis of pseudomyxoma peritonei. *Mod Pathol*, 2000;13(5):495–501.
- Prayson RA, Hart WR, Petras RE. Pseudomyxoma peritonei: a clinicopathologic study of 19 cases with emphasis on site of origin and nature of associated ovarian tumors. *Am J Surg Pathol*, 1994;18(6):591–603.
- Szych C, Staebler A, Connolly DC, Wu R, Cho KR, Ronnett BM. Molecular genetic evidence supporting the clonality and appendiceal origin of pseudomyxoma peritonei in women. *Am J Pathol*, 1999;154(6):1849–55.
- Guerrieri C, Franlund B, Fristedt S, Gillooley JF, Boeryd B. Mucinous tumors of the vermiform appendix and ovary, and pseudomyxoma peritonei: histogenetic implications of cytokeratin 7 expression. *Hum Pathol*, 1997;28(9):1039–45.
- Ronnett BM, Shmookler BM, Diener-West M, Sugarbaker PH, Kurman RJ. Immunohistochemical evidence supporting the appendiceal origin of pseudomyxoma peritonei in women. *Int J Gynecol Pathol*, 1997;16(1):1–9.
- Young RH, Gilks CB, Scully RE. Mucinous tumors of the appendix associated with mucinous tumors of the ovary and pseudomyxoma peritonei. a clinicopathological analysis of 22 cases supporting an origin in the appendix. *Am J Surg Pathol*, 1991;15(5):415–29.
- Carr NJ, Emory TS, Sobin LH. Epithelial neoplasms of the appendix and colorectum: an analysis of cell proliferation, apoptosis, and expression of P53, CD44, Bcl-2. *Arch Pathol Lab Med*, 2002;126(7):837–41.
- Bradley RF, Stewart JH, Russell GB, Levine EA, Geisinger KR. Pseudomyxoma peritonei of appendiceal origin: a clinicopathologic analysis of 101 patients uniformly treated at a single institution (with literature review). *Am J Surg Pathol*, 2006;30(5):551–9.
- Young RH. Pseudomyxoma peritonei and selected other aspects of the spread of appendiceal neoplasms. *Semin Diagn Pathol*, 2004;21(2):134–50.
- Byron Jr RL, Yonemoto RH, King RM, et al. The management of pseudomyxoma peritonei secondary to ruptured mucocele of the appendix. *Surg Gynecol Obstet*, 1966;122(3):509–12.
- Ruiz-Tovar J, Teruel DG, Castiñeiras VM, Dehesa AS, Quindós PL, Molina EM. Mucocele of the appendix. *World J Surg*, 2007;31(3):542-8.
- Misdraji J, Yantiss RK, Graeme-Cook FM, et al. Appendiceal mucinous neoplasms: a clinicopathological analysis of 107 cases. *Am J Surg Pathol*, 2003;27:1089–1103.
- Sugarbaker PH. Pseudomyxoma peritonei. A cancer whose biology is characterized by a redistribution phenomenon. *Ann Surg*, 1994;219(2):109–11.
- Ronnett BM, Zahn CM, Kurman RJ, Kass ME, Sugarbaker PH, Shmookler BM. Disseminated peritoneal adenomucinosis and peritoneal mucinous carcinomatosis. a clinicopathologic analysis of 109 cases with emphasis on distinguishing pathologic features, site of origin, prognosis, and relationship to “pseudomyxoma peritonei”. *Am J Surg Pathol*, 1995;19(12):1390–408.
- Loungnarath R, Causeret S, Bossard N, et al. Cytoreductive surgery with intraperitoneal chemohyperthermia for the treatment of pseudomyxoma peritonei: a prospective study. *Dis Colon Rectum*, 2005;48(7):1372–9.
- Murphy EM, Sexton R, Moran BJ. Early results of surgery in 123 patients with pseudomyxoma peritonei from a perforated appendiceal neoplasm. *Dis Colon Rectum*, 2007;50(1):37–42.
- Elias D, Laurent S, Antoun S, et al. Pseudomyxoma peritonei treated with complete resection and immediate intraperitoneal chemotherapy. *Gastroenterol Clin Biol*, 2003;27(4):407–12.
- Pastor FA, Gomez S, Ortuno G. Sobre el llamado mucocele apendicular versus cistoadenoma mucinoso. *Rev Esp Enf Dig*, 1989;75:481–483.
- Higa E, Rosai J, Pizzimbono CA, et al. Mucosal hyperplasia, mucinous cystoadenoma and mucinous cystadenocarcinoma of the appendix: a re-evaluation of appendiceal “mucocele.”. *Cancer*, 1973;32:1525–1541.
- Pitiakoudis M, Tsaroucha AK, Mimidis K, Polychronidis A, Minopoulos G, Simopoulos C. Mucocele of the appendix: a report of five cases. *Tech Coloproctol*, 2004;8:109-112.
- Zanati SA, Martin JA, Baker JP, Streutker CJ, Marcon NE. Colonoscopic diagnosis of mucocele of the appendix. *Gastrointest Endosc*, 2005;62:452-456.
- Lien WC, Huang SP, Chi CL, Liu KL, Lin MT, Lai TI, Liu YP, Wang HP. Appendiceal outer diameter as an indicator for differentiating appendiceal mucocele from appendicitis. *Am J Emerg Med*, 2006;24:801-805.
- Jaffe BM, Berger DH. The appendix. In: Brunicaudi FC, Andersen DK, Billiar TR, Dunn DL, Hunter JG, Pollock RE. Schwartz’s Principles of Surgery. International edition: McGraw Hill Companies Inc, 2005:1119-1137.
- Isaacs KL, Warshauer DM. Mucocele of the appendix: computed tomographic, endoscopic and pathologic correlation. *Am J Gastroenterol*, 1992;87:787–789.

27. Serrano Sanchez PA, Perez-Bedmar JA, Larranaga Barrera E. Mucocele apendicular. Revision de la literatura y aportacion de 8 casos. *Rev Esp Enferm Dig*, 1989;76:35-41.
28. Morson BC, Dawson IMP. *Gastrointestinal Pathology*. Oxford, Blackwell Scientific, 1979:455-479.
29. Takehara Y, Takahashi M, Isoda H, Kaneko M, Mochizuki K, Yuasa H, Aiba K, Kawaguchi K. Adult intussusception with an appendiceal mucocele diagnosed by CT and ultrasonography. *Radiat Med*, 1989;7:139-142.
30. Cois A, Pisanu A, Piloni L, Uccheddu A. Intussusception of the appendix by mucinous cystadenoma. Report of a case with an unusual clinical presentation. *Chir Ital*, 2006;58:101-104.
31. Soweid AM, Clarkston WK, Andrus CH, et al. Diagnosis and management of appendiceal mucoceles. *Dig Dis*, 1998;16:183-186.
32. Qualia CM, Drugas GT, Jones LT, Rossi TM. Colonoscopic diagnosis of an appendiceal mucocele. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2007;45:145-146.
33. Lakatos PL, Gyori G, Halasz J, Fuszek P, Papp J, Jaray B, Lukovich P, Lakatos L. Mucocele of the appendix: an unusual cause of lower abdominal pain in a patient with ulcerative colitis. A case report and review of literature. *World J Gastroenterol*, 2005;11:457-459.
34. Nakao A, Sato S, Nakashima A, Nabeyama A, Tanaka N. Appendiceal mucocele of mucinous cystadenocarcinoma with a cutaneous fistula. *J Int Med Res*, 2002;30:452-456.
35. Andersson A, Bergdahl L, Boquist L. Primary carcinoma of the appendix. *Ann Surg*, 1976;183:53-57.
36. Mishin I, Ghidirim G, Vozian M. Appendiceal mucinous cystadenocarcinoma with implantation metastasis to the incision scar and cutaneous fistula. *J Gastrointest Cancer*, 2012;43(2):349-53.
37. Ghidirim G, Gagauz I, Mişin I, Canariov M, Ionesii P, Zastavnitchi G. Mucinous cystadenocarcinoma of the appendix complicated with spontaneous cutaneous fistula. *Chirurgia (Bucur)*, 2007;102(2):231-5.
38. Rudloff U, Malhotra S. Volvulus of an appendiceal mucocele: report of a case. *Surg Today*, 2007;37:514-517.
39. Haritopoulos KN, Brown DC, Lewis P, Mansour F, Eltayar AR, Labruzzo C, Hakim NS. Appendiceal mucocele: a case report and review of the literature. *Int Surg*, 2001;86:259-262.
40. Mishin I, Ghidirim G, Zastavniisky G, Popa C. Torsion of an appendiceal mucinous cystadenoma. Report of a case and review of literature. *Ann Ital Chir*, 2012;83(1):75-8.
41. Mishin I, Ghidirim G, Zastavniisky G, Vozian M. Pseudomyxoma peritonei of appendiceal origin – an unusual cause of abdominal compartment syndrome: case report. *Jurnalul de chirurgie*, 2011;7(1):86-92.
42. Gonzalez Moreno S, Shmookler BM, Sugarbaker PH. Appendiceal mucocele. Contraindication to laparoscopic appendectomy. *Surg Endosc*, 1998;12:1177-1179.
43. Wolff M, Ahmed N. Epithelial neoplasms of the vermiform appendix (exclusive of carcinoid). II. Cystoadenomas, papillary adenomas and adenomatous polyps of appendix. *Cancer*, 1976;37:2511-2522.
44. Smith JW, Kemeny N, Caldwell C, et al. Pseudomyxoma peritonei of appendiceal origin. The Memorial-Sloan Kettering Cancer Center experience. *Cancer*, 1992;70:396-401.

## Aspecte imunogene ale terapiei cu celule stem în medicina regenerativă

Ramesh Mazhari<sup>†1</sup> și Ian Vasilovski Toma<sup>\*2,3</sup>

*Departamentul de Medicină,*

<sup>1</sup> *Diviziunea de Cardiologie,*

<sup>2</sup> *Diviziunea de Medicină Genomică,*

<sup>3</sup> *Departmentul de Fizioterapie și Științe ale Sănătății*

*Centrul Medical „George Washington”, Washington, DC*

### Autor corespondent:

Ian Toma, MD, PhD, MSHS

Division of Genomic Medicine

The George Washington Medical Center

2300 I Street NW, Ross 443

Washington, DC 20037

Telefon: +1 (202) 994-8923

e-mail: itoma@gwu.edu

## Immunogenic aspects of stem cell therapy in regenerative medicine

Ramesh Mazhari<sup>†1</sup>, Ian Vasilovski Toma<sup>\*2,3</sup>

*Department of Medicine,*

<sup>1</sup> *Division of Cardiology,*

<sup>2</sup> *Division of Genomic Medicine,*

<sup>3</sup> *Department of Physical Therapy and Health Care Sciences*

*The George Washington Medical Center, Washington, DC*

### Corresponding author

Ian Toma, MD, PhD, MSHS

Division of Genomic Medicine

The George Washington Medical Center

2300 I Street NW, Ross 443

Washington, DC 20037

Phone: +1 (202) 994-8923

e-mail: itoma@gwu.edu

### Rezumat

Utilizarea celulelor stem pentru regenerarea și repararea țesuturilor deteriorate a fost de interes pentru comunități științifice și profesioniști timp de câteva decenii. Studiile de translație în cercetările de medicină regenerativă au scopul de a facilita transferul cunoștințelor științifice de bază ce țin de biologia celulelor stem în opțiuni terapeutice posibile. Celulele stem au un potențial promițător pentru aplicarea acestora în repararea sau regenerarea organelor și țesuturilor. Totuși, rata de supraviețuire a celulelor stem transplantate nu a fost una optimă și varia în funcție de metodele de livrare și tipul celulelor. Unul dintre mecanismele de transplantare care au eșuat este reacția imună a gazdei împotriva celulelor stem livrate. În cadrul acestei analize se vor discuta datele disponibile în literatura despre sursele de celule stem, imunogenitatea diferitor tipuri de celule stem și liniile lor descendente, precum și potențialele strategii de îmbunătățire a supraviețuirii și eficacitatea transplantării celulelor stem în medicina regenerativă.

**Cuvinte-cheie:** regenerare, regenerare, celule stem, CSM, hESC, CMH-I, HLA, reacție imună.

### Abstract

Using stem cells to regenerate and repair damaged tissue has been a focus of the scientific communities and medical professionals for the last couple of decades. Translational studies in regenerative medicine research are intended to facilitate the transfer of the basic science knowledge of stem cell biology into potential therapeutic options. Stem cells have a promising potential for application in repair or regeneration of organs and tissues. However, the survival rate of the transplanted stem cells has not been optimal and varies depending on the delivery methods and type of cells. One of the mechanisms of the failed transplantations is the host's immune reaction against the delivered stem cells. In this review, we will discuss the available data in the literature on sources of stem cells, the immunogenicity of different types of stem cells and their progeny lineages, and the potential strategies to improve the survival and the efficacy of the stem cells transplantation in regenerative medicine.

**Key words:** regeneration, stem cell, MSC, ESC, MHC-I, HLA, immune reaction.

## Introducere

Grefarea celulelor stem (CS) în țesutul gazdă este de importanță majoră pentru medicina regenerativă. Importanța transplantării efective este sporită pentru organele și țesuturile cu potențial de regenerare limitat, așa ca neuronii sau mușchii cardiaci. În cazuri de transplantare autologă când sursa de CS este pacientul, sau geamănul genetic monozigot (identic) al pacientului, procesul este singenic și, cu excepția cazurilor când gemenii sunt discordanți din cauza unor factori ai sistemului imun [1], reacția imună practic nu are loc [2]. Totuși, colectarea și introducerea celulelor stem autologe este un proces îndelungat, limitat în timp și complicat [3, 4], iar prevalența gemenilor printre populația generală este mică (1/30 în SUA) [5] și mult mai mică în cazul gemenilor monozigoti. Transplantarea CS de la o sursă genetic non-identică este numită alogenă și efectul terapeutic al acesteia adesea rezultă în respingerea imună a celulelor transplantate de către țesuturile gazdă.

Respingerea imună alogenă după terapia cu celule stem este mediată de către răspunsurile imune dependente de celulele T [6] activate de complexul major de histocompatibilitate de gradul I (CMH-I) într-o serie de evenimente moleculare. Administrarea imunosupresoarelor poate elimina răspunsul imun după terapia cu celule stem, dar nu este o opțiune sigură și realizabilă în cazul pacienților cu boli cronice din cauza riscului înalt de efecte adverse [7], inclusiv proliferarea și supraviețuirea celulelor stem transplantate [8]. Unele celule stem terapeutice, așa ca celulele stem hematopoietice (CSH) sau celulele stem mezenchimale (CSM), sunt mai favorabile datorită răspunsului imun redus al gazdelor, deși efectele de lungă durată nu sunt confirmate pentru bolile cronice și diferite căi de administrare și micromedii pot duce la imunogenitate variabilă în funcție de CSM în particularitate [9].

Se dezvoltă noi strategii de a induce toleranță imună pe diferite linii de CS și în această analiză se va prezenta un sumar al răspunsurilor imune în terapia cu celule stem (TCS) și datele de imunogenitate a trei cele mai studiate linii de celule stem pentru transplantare regenerativă: celule stem embrionare umane (hESC), CSM și celule stem pluripotente induse (CSPi).

## Complexul Major de Histocompatibilitate

Toate celulele mamifere manifestă agenți MHC de suprafață care le permite să discrimineze între particule străine în circulare și propriile produse ale metabolismului celular. La oameni MHC este codificat pentru genele locat pe locusul antigenului leucocitar uman (HLA) și este format din molecule de clasa 1 (MHC-I) și clasa 2 (MHC-II). Întregul locus HLA conține cca 4Mb pe brațul scurt al cromozomului 6 (6p21.3), care este divizat în regiune ce corespund genotipurilor specifice HLA. Fiecare regiune conține un număr mare de gene combinând șase gene care codează pentru MHC-I, 12 pentru MHC-II, 45 gene tip HLA și peste 200 de gene care codează proteine sau nu [10]. Cele 21 gene HLA de bază în aceste locusuri sunt extrem de polimorfe și diversitatea lor alelică este catalogată în baza de date a Institutului European de Bioinformatică și curatoriată de proiectul internațional ImMunoGeneTics (IMGT - <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>) [11]. Către luna iunie 2014 au fost înregistrate peste 11000 alele HLA (8976 pentru clasa I și 2870 pentru

## Introduction

The engraftment of transplanted stem cells (SCs) into the host tissue, even if only transiently, is likely to be an important factor for regenerative medicine. The importance of effective transplantation is increased for organs and tissues with limited regenerative potential, such as neurons and cardiac muscle. In cases of autologous transplantation in which the source of SCs is the patient, or the patient's genetically monozygotic (identical) twin, the process is called syngeneic and, unless the twins are discordant for some immune system factors [1], the immune reaction virtually never occurs [2]. However, collection and induction of autologous stem cells is a lengthy, time-constrained, and complicated process [3, 4], and the prevalence of twins among general population is in the single digit range (1/30 in the US) [5], much less of genetically monozygotic twins, which is only 4 per thousand births. Transplantation of SCs from a genetically non-identical source is termed allogeneic, and the therapeutic effect oftentimes results in immune rejection of the transplanted cells by the host tissues, and potentially attack of the host by the transplanted cells, a pathology known as graft-versus-host disease.

Allogeneic immune rejection after cell therapy is mediated by T cell-dependent immune responses [6] activated by the major histocompatibility complex I (MHC-I) in a chain of molecular events. Administration of immunosuppressants can eliminate the immune response after stem cell therapy, but it is not a safe and feasible option in patients with chronic disease because of high risk of side effects [7], including the proliferation and survival of transplanted cells [8]. Some of the therapeutic stem cells, such as hematopoietic stem cells (HSC) or mesenchymal stem cells (MSCs) are more favorable due to the reduced immune response in hosts, although their long-term effects are not confirmed in chronic diseases, and different routes of administration and microenvironments can lead to varying immunogenicity, particularly, of MSCs [9].

New strategies are developing to induce the immune tolerance to different stem cell lines and, in this review, we will present a summary on the immune response in stem cell therapy (SCT) and the data on immunogenicity of three most studied stem cell lines for regenerative transplantation: human embryonic stem cells (hESCs), MSCs, and inducible pluripotent stem cells (iPSCs).

## Major Histocompatibility Complex

All mammalian cells express surface MHC antigens that allow them to discriminate between the foreign circulating particles and their own products of cell metabolism. In humans, the MHC is coded for by genes located on the human leukocyte antigen (HLA) locus, and consists of class I (MHC-I) and class 2 (MHC-II) molecules. The entire HLA locus covers about ~4 million bases (Mb) on the short arm of chromosome 6 (6p21.3), which is subdivided into regions corresponding to specific HLA genotypes. Each region contains a large number of genes combining six genes coding for MHC-I, 12 for MHC-II, 45 HLA-like genes, and over 200 protein-coding and noncoding genes [10]. The 21 core HLA genes in these loci are highly polymorphic and their allelic diversity is catalogued



clasa II), fiecare cu un ID unic dintr-o nomenclatură actualizată în 2010. Genele HLA-A, HLA-B și HLA-C codifică pentru proteinele MHC-I, iar genele HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP codifică pentru antigenele de legare a peptidelor de clasa MHC-II (Fig. 1, pag. 57). Genele care codifică pentru MHC de clasa III sunt clasate în aceeași regiune genomică. Totuși, această clasă nu participă la prezentarea peptidelor către receptorii celulelor T (RCT), dar mai curând codifică pentru câțiva factori de semnalizare și regulatori de transcriere, componenți ai complimentului și citokine implicate în răspunsul imun adaptativ [12]. Pe lângă moleculele MHC clasice, un număr de complexe diverse îndeplinesc funcții specifice ale țesuturilor. Spre exemplu, izoforma alelică HLA-G este exprimată în celulele placentare și protejează fătul, care conține antigeni parentali, de celulele maternelor citotoxice [13, 14] pe lângă toleranța maternă care se dezvoltă în perioada de preimplantare [15, 16].

Precum se vede în prezentarea schematică din Fig. 1, pag. 57 MHC-I constă dintr-un trimer transmembranar kDa de lanțuri grele  $\alpha$  și un lanț ușor non-transmembranar 12 kDa  $\beta$ 2-microglobulin ( $\beta$ 2M). MHC-II constă dintr-un dimer din două lanțuri  $\alpha$  &  $\beta$  transmembranar de clasa II. Celulele T care formează grupul de diferențiere 8 (CD8+) co-receptor pe suprafață recunoaște peptidele legate de complexul MHC clasa I și îl prezintă la TCR pe celulele nucleate, în timp ce cele cu co-receptor CD4+ legat de complexul MHC de clasa II activează RCT pe celulele prezentatoare de antigen (APC), ambele activări declanșează cascade de semnalizare ce duc spre activarea celulelor T citotoxice (Tc) sau celulelor T ajutoare de către MHC de clasa I și clasa II, respectiv (Fig. 2, pag. 56).

Celulele Tc activate proliferază și se diferențiază în limfocite T citotoxice efectoare (LTC), care sunt capabile să lizeze orice celule care au peptide inițial prezentate de molecula MHC-I. O secvență de evenimente similară are loc cu activarea Th, cu excepția faptului că moleculele MHC-II sunt inițial prezente doar pe APC specializate, inclusiv celulele B și macrofagele activate. Acapararea unei peptide străine de către APC-uri duce la recunoașterea peptidei prin TCR și eliberarea de citokine care activează exponențial în continuare celulele Tc și B, în cele din urmă inițiind mecanismul de răspuns adaptativ și umoral mediat celular.

Compatibilitatea imună a celulelor donatorului și ale gazdei este evaluată de reacția limfocitară mixtă (MLR), în cadrul căreia subseturi de limfocite de la donator și de la gazdă sunt amestecate *in vitro* [17]. Supraviețuirea, proliferarea și secreția de citokine poate fi măsurată calitativ și cantitativ pentru a estima magnitudinea răspunsului imun. MLR este de asemenea o metodă preferată pentru testarea celulelor modulate ale sistemului imunitar (MSC modificate genetic), caz în care celulele modificate servesc drept donator și adăugarea suspensiei de limfocite va dezvălui un posibil răspuns imun *in vivo*.

Pe lângă imunosupresie, care blochează complet răspunsul imun față de un antigen străin, metodele mai avansate de evitare a respingerii post-transplantare includ modificarea genomică funcțională a lanțului greu  $\alpha$  sau a genelor  $\beta$ 2M în celulele stem. Câteva grupuri au raportat schimbări pozitive în studii pe animale în cadrul cărora doborârea antigenilor HLA în hESC a dus la ignoranța celulelor T și lipsa răspunsului imun de la soarecii gazdă [18].

within the European Bioinformatics Institute database and curated by an international project ImMunoGeneTics (IMGT - <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>) [11]. As of June 2014, there were recorded more than 11,000 HLA alleles (8976 for class I, and 2870 for class II), each with unique ID under a new nomenclature updated in 2010. The human leucocyte antigens (HLA), HLA-A, HLA-B, and HLA-C genes code for the MHC-I proteins, and HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP genes code for peptide-binding proteins of the MHC-II class, which collectively present the bound peptides to the T-cell receptor (TCR) (Fig. 1, pag. 57). The genes coding for MHC class III are mapped to the same genomic region, however, this class does not participate in peptide presentation to the TCR, but rather encode for several signaling factors and transcription regulators, components of the complement system, and cytokines involved in the adaptive immune response [12]. In addition to the classical MHC molecules, a number of diverse complexes perform tissue specific functions. For example, the HLA-G allelic isoform is expressed in placental cells and protect the fetus containing paternal antigens from maternal circulating cytotoxic cells [13, 14], in addition to the maternal tolerance that is developed during the pre-implantation period [15, 16].

As schematically presented in Fig. 1 (pag. 57), the MHC-I consists of a transmembrane 40 kDa trimer of heavy class I  $\alpha$ -chains and a non-transmembrane 12 kDa  $\beta$ 2-microglobulin ( $\beta$ 2M) light chain. The MHC-II consists of a dimer of two transmembrane class II  $\alpha$  &  $\beta$  chains. T-cells that express the cluster of differentiation 8 (CD8+) co-receptor on their surface, recognize the peptides bound to MHC class I complex and present it to TCR on the nucleated cells, while those with CD4+ co-receptor bound to the MHC class II complex activate the TCR on the antigen-presenting cells (APCs), both activations trigger signaling cascades leading to the cytotoxic T-cell (Tc) or helper T-cell (Th) activation by MHC class I and II respectively (Fig. 2, pag. 56).

Activated Tc cells proliferate and differentiate into effector cytotoxic T lymphocytes (CTL), which are capable of lysing any cells that have the peptide initially presented by the MHC-I molecule. A similar sequence of events occurs with Th activation, except that the MHC-II molecules are present only on specialized APCs, including activated B-cells and macrophages. Engulfment of a foreign peptide by APCs leads to the recognition of the peptide by the TCR and the release of cytokines that further exponentially activate the Tc and B cells, ultimately, initiating the cell-mediated adaptive and humoral defense response mechanism.

The immune compatibility of the donor and host cells is assessed by the mixed lymphocyte reaction (MLR), in which the subsets of lymphocytes from both donor and host are mixed *in vitro* [17]. The survival, proliferation, and secretion of cytokines can be measured qualitatively and quantitatively in order to estimate the magnitude of the immune response. MLR is also a method of choice for testing the immune-modulated cells (i.e. genetically modified MSCs), in which case the modified cells serve as donor, and addition of lymphocytes suspension will reveal a potential immune response *in vivo*.

### Celulele stem embrionare umane

Din punctul de vedere a toleranței imune, pentru pacient a doua cea mai bună variantă, după transplantarea autologă, ar fi hESC, considerată "privilegiată imun". hESC au o stare pluripotentă, imortală și nediferențiată și pot fi ghidate spre angajamente către filiații de celule specifice. Totuși, aplicarea practică a hESC este complicată din motive științifice, legale și etice ce țin de sursa și aplicarea acestor celule [19]. Abilitatea de a se auto-renova și a se diferenția în toate tipurile de celule din corp îi conferă hESC un potențial terapeutic enorm și un oarecare progres în aplicarea acestora în practica medicală a fost recent raportat odată ce US Food and Drug Administration (FDA) a aprobat studiile clinice [20, 21].

Principalele surse de hESC sunt embrioanele, placenta și sângele din cordonul ombilical (UCB), prima fiind limitată legal pentru studii în SUA cu excepția rezervelor de linii de celule existente, colectate anterior, iar utilizarea placentei și a UCB încă mai provoacă discuții de ordin etic în rândurile a cca 40% din respondenții din SUA [22]. Menținerea acestor celule în stare nediferențiată și diferențiere predestinată ghidată spre filiație specifică este o problemă atât tehnică, cât și științifică [23]. În pofida controverselor etice existente și a regulamentelor strânse ale multor țări, UCB poate fi "depozitat" în peste 130 de repertorii de sânge ombilical în peste 30 de țări în întreaga lume, permițând pacienților să-și păstreze UCB-ul nou-născuților lor sau să-l doneze pentru uz public [24]. Misperceperea și lipsa de cunoștințe despre scopul și posibilitățile UCB în mase ar trebui abordată pentru a evita așteptările neinformate față de mostrele depozitate [25].

Din punct de vedere clinic UCB este o sursă bună pentru unele celule descendente derivate, așa ca HSC, care sunt deja folosite cu succes în practica clinică pentru transplantarea alogenă, în mod primar în rândul copiilor și în absența unui donator compatibil de măduvă osoasă [26]. Pe lângă aceasta, țesutul cordonului ombilical este considerat o sursă bună de MSC mai primitivă sau mai puțin diferențiată, ceea ce demonstrează un bun potențial pentru dezvoltare spre un tratament clinic acceptabil. Totuși, o singură doză colectată de la un donator este, de obicei, insuficientă pentru aplicarea terapeutică în cazul unui pacient [27].

### Imunogenitatea hESC și Celulele Pluripotente

#### Derivative

Literatura existentă despre imunogenitatea celulelor stem și celulele pluripotente derivate ale acestora este controversată. Consensul este că hESC nediferențiate exprimă un nivel scăzut de MHC-I de suprafață, un nivel minim sau neglijabil de MHC-II și câțiva antigeni specifici etapelor (SSEA3, SSEA4) pe lângă careva glicoproteine (TRA-1-60, TRA-1-81) și factor de transcriere OCT4 [28]. Totuși contradicțiile apar în cazul hESC stimulate și diferențiate. Li et al. [29] raportează că atât hESC nediferențiate cât și diferențiate nu ilicită un răspuns imun la soarecii imunocompetenți. Mai mult decât atât, pe lângă toleranța imunogenă, hESC au inhibat local activitatea celulelor T fără a afecta abilitatea acestora de a răspunde la antigeni străini. În același timp, Grinemma et al. [30] au depistat o creștere la nivelul MHC-I în răspuns la interferonul  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) fără a afec-

Aside from immunosuppression, which completely blunts the immune response to a foreign antigen, the more advanced approaches in avoiding rejection of transplanted cells include the genomic functional modification of either heavy  $\alpha$ -chain or  $\beta$ 2M genes in the transplanted stem cells. Several groups have reported positive effects in animal studies in which knock-down of HLA antigens in hESCs resulted in an attenuated immune response by the host mice [18].

### Human embryonic stem cells

From the immune tolerance point of view, for a patient, the next best choice after autologous transplantation would be the hESCs, which are believed to be "immune-privileged". hESCs are pluripotent, immortal in the undifferentiated state, and can be guided into specific lineage-cell commitments. However, the practical application of hESCs is complicated due to scientific, legal, and ethical issues in sourcing and application of these cells [19]. With their ability to undergo self-renewal and to differentiate into all cell types in the body, hESCs have a great therapeutic potential and some progress in bringing them into medical practice have been recently reported as first-in-human US Food and Drug Administration (FDA) approved clinical trials [20, 21].

The main sources of hESC are embryos, placenta, and the umbilical cord blood (UCB), the first being legally restricted for research in the US, with the exception of existing, previously collected cell lines. The use of placenta and UCB are still raising ethical concerns in about 40% of the US respondents [22]. Maintenance and expansion of these cells in an undifferentiated state, and directed fate-restricted differentiation into specific lineages is both a technical and scientific challenge [23]. Despite the existing ethical controversies and tight regulation by the governments of many countries, the UCB can be "banked" in over 130 private and public cord blood repositories in more than 30 countries around the world, allowing parents to store their newborn's UCB or to donate it for public use [24]. The existing misperception and lack of knowledge about the purpose and possibilities of UCB among the public may need to be addressed in order to avoid uninformed expectations from the deposited sample [25].

From the clinical point of view, UCB is also a good source for some important derivative progeny cells such as HSCs, which are already successfully used in clinical practice for allogeneic transplantation, primarily to children and in the absence of compatible bone marrow donor [26]. In addition, the umbilical cord tissue is considered a good source for more "primitive" or less differentiated MSCs, which show a good potential of being developed into clinically acceptable treatment. However, a single dose collected from one donor is usually insufficient for a therapeutic application in a patient [27].

### Immunogenicity of hESCs and Derivative Pluripotent Cells

The existing literature on immunogenicity of stem cells and their derivative pluripotent cells is somewhat controversial. The consensus is that the undifferentiated hESCs express a low level of cell surface MHC-I, a minimal or negligible level

ta nivelul scăzut al HC-II în hESC. Nivelul inducției MHC-I a fost comparabil cu cel al fibroblastelor umane alogene, dar mult mai scăzut decât cel indus de celulele dendritice alogene, ceea ce poate fi explicat prin faptul că atât hESC, cât și fibroblastele au un nivel constitutiv de MHC-I scăzut, dar le lipsește antigenul MHC-II. Totuși, un al treilea grup [31] a raportat că nivelul MHC-I crește în corpurile embrionare la prima etapă de diferențiere și aceasta se exprimă mult mai mult în teratome. Pe lângă discuțiile despre nivelul de inducere a MHC-I, Robertson et al. [32] a atribuit toleranța hESC nivelului înalt al expresiei factorului de creștere transformator beta (TGF- $\beta$ ), care are un efect potent antiinflamator.

Activarea MHC-I poate avea loc drept rezultat al diferențierii spontane sau în anumite condiții specifice mediului de creștere care includ factori de creștere [33]. Expunerea hESC diferențiate și nediferențiate la IFN- $\gamma$  declanșează inducerea înzecită a expresiei MHC-I *in vitro* fără a afecta nivelul de MHC-II semnificativ [31]. În final, complexul MHC-I activat poate duce spre respingerea imună în urma transplantării spre gazdă. Mai mult decât atât, celulele într-o populație cu aspecte fiziologice aproape niciodată nu funcționează în unison, ceea ce înseamnă că în orice hESC nediferențiată poate exista un anumit număr de celule la diferite etape de diferențiere, ceea ce poate declanșa un răspuns imun dacă a avut loc activarea MHC-I. Identificarea citokinelor inflamatorii și a căilor de chemokine în faza inflamatorie timpurie a furnizat ținte care pot fi modificate pentru a diminua imunogenitatea țesutului transplantat. Spre exemplu, direcționarea imunogenitatea mediată de complement în țesuturile derivate din ESC poate ameliora răspunsul imun inițial față de transplantul de țesut și îmbunătăți supraviețuirea țesutului transplantat [34].

Imunogenitatea hESC și filiația lor derivativă în terapia cu celule stem umane (SCT) rămâne a fi investigată, considerând faptul că studiile pe animale *in vitro* și *in vivo* la șoareci sau mamifere nu întotdeauna se transferă perfect [35, 36].

### Celule Stem Mezenchimale

Descoperite în anii 1960 și inițial recoltate din populația de celule ale măduvei osoase [37] (de aici al doilea nume "celule stromale ale măduvei osoase"), MSC au devenit una dintre cele mai accesibile și practice surse pentru celulele stem multipotente care ar putea genera un număr mare de țesuturi [38]. Datorită interpretărilor diverse ale profilurilor MSC în ultimii ani, Societatea Internațională pentru Terapie celulară a stabilit criteriile minime pentru definirea MSC, specificând lista markerilor de suprafață care trebuie să fie prezenți (CD105, CD73, CD90) sau absenți (CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 $\alpha$ , CD19, și HLA-DR) pe lângă cerințele de aderare în condițiile de cultură celulară și de a fi capabile de a se diferenția în osteoblaste, adipocite și condroblaste *in vitro* [39].

MSC sunt de obicei recoltate din măduva osoasă. Pe lângă aceasta, MSC are putea fi recoltate din lichidul amniotic, sânge și UCB, pulpa dentară și alte țesuturi și compartimente biologice [40], dar abundența lor și cantitatea totală se consideră de a descrește dramatic cu vârsta [41]. Pentru aplicarea în SCT și cercetare, MSC pot fi extinse *in vitro* utilizând medii îmbogățite cu factori de creștere sau este nevoie de plasmă derivată

of MHC-II, and several differentiation stage-specific antigens (SSEA3, SSEA4) along with some glycoproteins (TRA-1-60, TRA-1-81) and OCT4 transcription factor [28]. However the disagreement arises in cases of stimulated and differentiated hESCs. Li et al. [29] reported that both undifferentiated and differentiated hESCs do not elicit immune response in immunocompetent mice. Moreover, in addition to the immunogenic tolerance, hESCs locally inhibited the T-cell activity, without affecting their ability to respond to foreign antigens. At the same time, Grinemmo et al. [30] detected an increase in MHC-I level in response to interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) without affecting the low level of MHC-II in hESCs. The level of MHC-I induction was comparable to that of the allogeneic human fibroblast, but much lower than the one induced by allogeneic dendritic cells, which may be explained by the fact that both hESCs and fibroblast have a very low constitutive level of MHC-I, but lack MHC-II antigen. And yet a third group [31] reported that the MHC-I level increases in embryonic bodies as a first stage of differentiation, and it is expressed much higher in teratomas. In addition to the discussions on MHC-I level of induction, Robertson et al. [32] attributed the hESCs tolerance to the high level of transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) expression, which has a potent immunosuppressive effect.

Activation of MHC-I may occur as a result of spontaneous differentiation or under specific growth media conditions that include growth factors [33]. Exposure of both differentiated and undifferentiated hESCs to IFN- $\gamma$  triggers at least a 10-fold induction of MHC-I expression *in vitro* without affecting significantly the level of MHC-II [31]. Ultimately, the activated MHC-I complex may lead to an immune rejection upon transplantation into the host. Moreover, cells in a population under physiological conditions almost never function in unison, meaning that in any undifferentiated hESCs there may be certain number of cells at different stages of spontaneous differentiation, which may trigger an immune response if the MHC-I activation occurred. Identification of the inflammatory cytokines and chemokine pathways in the early immune phase have provided targets that can be modified to diminish the immunogenicity of the transplanted tissue. For example, targeting the complement-mediated immunogenicity in ESC-derived tissue can ameliorate the early immune response to ESC-derived tissue transplantation and improve the survival of the transplanted tissue [34].

The immunogenicity of hESCs and their derivative lineages in human stem cell therapy (SCT) remains to be investigated, considering that *in vitro* and *in vivo* animal studies in mice or in mammals do not always translate seamlessly [35, 36].

### Mesenchymal Stem Cells

Discovered in 1960s and initially harvested from bone marrow cell population [37] (hence, a second name "marrow stromal cells"), MSCs became one of the most accessible and practical sources for multipotent stem cells that could give rise to a large number of tissues [38]. Due to diverse interpretations of the MSC profiles in the recent years, the International Society for Cellular Therapy established the minimal criteria for definition of MSCs specifying the list of surface markers

din sânge bogată în plachete [42]. În ultimii ani securitatea și eficacitatea MSC au fost puse la dezbatere în baza rezultatelor discutabile ale aplicării MSC în fazele inițiale ale testărilor clinice [43].

MSC sunt prezente în măduva osoasă, dar populația acestora reprezintă aproximativ 0.01% din totalul celulelor nucleate ale măduvei [44], deși din punct de vedere practic, la moment MSC din măduva osoasă sunt cea mai bună sursă pentru transplantarea autoloagă singenică după expansiunea lor *ex vivo* [45]. Pentru o aplicare imediată MSC imunotolerante, "de pe raft", ar fi o sursă ideală pentru medicina regenerativă și modificarea MSC în celule non-imunogene sau imunotolerante este scopul principal al domeniului SCT.

Asemănător cu hESC, MSC umane exprimă MHC-I și nu exprimă MHC-II și moleculele cosimulatoare B7 și ligand CD40 [40]. MSC au o afinitate înaltă de a lega limfocite T activate care sunt CD4+ și CD8+ și inhibă activ proliferarea celulelor T prin eliminarea citokinelor, așa ca factorul de creștere al hepatocitelor umane recombinante (rhHGF) și rhTGF-β1 [46]. Secreția factorilor de creștere, a citokinelor și a moleculelor bioactive de către MSC prestează adaptarea celulelor transplantate la micromediu (*plasticitate terapeutică*) prin semnalizare paracrină și autocrină [47].

În pofida similarității cu hESC și presupusul privilegiu imun al MSC, experimentele *in vitro* au demonstrat că MSC diferențiate într-un fenotip cardiac sau vascular vor exprima atât MHC I cât și II și vor deveni imunogene [48]. Studiile pe animale au demonstrat rezultate mixte. În unele studii, supraviețuirea MSC injectate este neglijabilă și se consideră că celulele sunt eliminate ca rezultat al răspunsului imun al recipientului [48], în timp ce studii pe animale mai extinse sugerează că MSC alogene pot supraviețui, engrafta și diferenția în țesuturile gazdei [49]. Imunogenitatea MSC în regenerarea cardiacă este acum studiată într-un studiu clinic randomizat al tratamentelor MSC alogene vs. autologe la pacienții cu insuficiență cardiacă [50]. Luând în considerare abundența surselor pentru MSC și abilitatea lor de a se extinde *in vitro*, modularea imunogenității lor poate avansa imens domeniul medicinei regenerative.

### Celule Stem Pluripotente Induse

Descoperite mai puțin de un deceniu în urmă, celulele stem pluripotente induse (iPSC) sunt celule adulte genetic reprogramate (de-diferențiate) într-o stare embrionară, manifestate în exprimarea unui șir de markeri. Reprogramarea constă în transducția retrovirală a unui grup de gene care codifică pentru factori de pluripotență (OCT4, SOX2, C-Myc, KLF4) [51] și sursa de iPSC sunt de obicei celule somatic autologe adulte recoltate din măduva osoasă sau sângele pacientului. Aceste celule demonstrează un fenotip pluripotent, similar cu cel din ESC, dar nu au problemele și controversile legale și etice asociate cu celulele embrionare [52]. Succesul tehnic în reprogramarea celulelor somatice singenice specifice pacientului a sporit speranța că nu mai trebuie să ne îngrijorăm despre răspunsul imun așa cum o făceam în cazul celulelor stem embrionare [53]. Drept dezavantaj, studiile recente au demonstrat că unele din celulele diferențiate din iPSC sunt foarte imunogene [54], iar tipul celulelor diferențiate, calea de administrare a celule-

that need to be present (CD105, CD73, CD90) or absent (CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79α, CD19, and HLA-DR), in addition to the requirements to adhere to cell culture surfaces, and to be capable of differentiating into osteoblasts, adipocytes, and chondroblasts *in vitro* [39].

MSCs are mainly harvested from the bone marrow. In addition, MSCs could be harvested from amniotic fluid, blood and UCB, dental pulp, and other tissues and biological compartments [40], but their abundance and replicative capacity is believed to decrease with increasing age of the donor [41]. For application in SCT and research, MSCs can be expanded *in vitro* using media enriched with growth factors or blood-derived platelet rich plasma is required [42]. In recent years, the safety and efficacy of MSCs has been debated based on contentious results of application of MSCs in early phases of clinical trials [43].

MSCs are present in bone marrow, but their population represents approximately 0.01% of the total nucleated marrow cells [44], although from a practical point of view, so far the bone marrow derived MSCs are the best source for autologous syngeneic transplantation after their expansion *ex vivo* [45]. For an immediate application, the "off-shelf", immunotolerant MSCs would be an ideal source for regenerative medicine, and the modification of MSCs into non-immunogenic or immunotolerant cells is a significant priority in the field of SCT.

Similar to hESC, human MSCs express MHC-I, and don't express MHC-II or co-stimulatory molecules B7 and CD40 ligand [40]. MSCs have a high affinity to bind activated T lymphocytes that are CD4+ and CD8+, and actively inhibit T-cell proliferation by releasing cytokines, such as recombinant human hepatocyte growth factor (hHGF) and hTGF-β1 [46]. Secretion by MSCs of growth factors, cytokines, and bioactive molecules renders the adaptation of transplanted cells to the microenvironment (*therapeutic plasticity*) via autocrine and paracrine signaling [47].

Despite the similarity to hESCs and presumed immune-privilege of MSCs, *in vitro* experiments have demonstrated that MSCs differentiated into a cardiac or vascular phenotype will express both MHC I and II and become immunogenic [48]. Animal studies have shown mixed results so far. In some studies, the survival of the injected MSCs are negligible and it is thought that the cells are eliminated as a result of the recipient's immune response [48], while larger animal studies suggest that allogeneic MSCs can survive, engraft and differentiate in the host's tissue [49]. The immunogenicity of MSCs in cardiac regeneration is currently being studied in a randomized clinical trial of allogeneic vs. autologous MSCs treatment in patients with heart failure [50]. Considering the abundance of sources for MSCs and their ability to be expanded *in vitro*, modulation of their immunogenicity may advance immensely the field of regenerative medicine.

### Induced Pluripotent Stem Cells

Discovered less than a decade ago, the induced pluripotent stem cells (iPSCs) are genetically reprogrammed (de-differentiated) adult cells into an "embryonic-like" state, manifested in expression of a number of primitive stem cell markers.

lor și chimerismul în gazdă joacă un rol important în imunogenitatea celulelor provenite din iPSC. Indiferent de problemele tehnice și efectele adverse posibile, utilizarea iPSC devine mai atractivă deoarece aceste celule au demonstrat potențialul de a fi diferențiate în cardiomiocite [55] și utilizate la repararea țesutului cardiac. Mai mult decât atât, o nouă aplicare interesantă a cardiomiocitelor din iPSC este sub forma țesutului cardiac artificial (EHT) [56], ca parte a manșetelor EHT venoase (VEHTCs) în care cardiomiocitele formează un syncytium cardiac și dezvoltă un ritm de bătăi intrinsec [57].

### Problemele curente și promisiunile de viitor

*Imunogenitatea și supraviețuirea celulelor stem transplantate:* Pe cât mai bine înțelegem cascadele inflamatorii implicate în reacțiile imune față de celula stem livrată, cu atât mai eficient putem utiliza invențiile vizate pentru a ameliora răspunsul imun la celulele implantate și pentru a îmbunătăți supraviețuirea acestora. Spre exemplu, expresia predominantă de repetiție a glicoproteinei A (GARP) pe MSC le permite să inhibe răspunsurile celulelor T *in vitro* și este o nouă țintă potențială pentru îmbunătățirea supraviețuirii MSC și eficacității terapeutice [58].

*Afecțiuni maligne ca rezultat al complicațiilor terapiei cu celule stem:* Printre efecte adverse și complicații, formarea teratomelor și leucemia sunt pericole reale ale SCT și mai cu seamă aplicabile în cazul filiațiilor de celule cu caracteristici pluripotente, așa ca ESC și iPSC [59]. Îmbunătățirea metodelor de izolare și manipulare a celulelor stem, inclusiv o alternativă mai sigură a transformării genetice virale, poate reduce riscurile și este un domeniu de interes în lumea celulelor stem.

*Supraviețuirea celulelor:* Pe lângă aspectele imune, reținerea celulelor injectate în miocard este de asemenea un lucru dificil. Unele metode noi demonstrează un potențial de depășire a acestui obstacol la animalele cercetate prin aplicarea adaptoarelor de scară nanometrică pentru livrarea celulelor stem în țesutul cardiac [60]. Spre exemplu, raportată recent, aplicarea ESC a șoarecilor sub formă de "gel nanomatrix incapsulat și injectabil" compus din peptide amfofile cu ligand adeziv de celule Arg-Gly-Asp-Ser a demonstrat retenție și engraftare satisfăcătoare 14 săptămâni post-transplantare [61]. Utilizarea nanotehnologiilor a deschis un nou capitol în înțelegerea biologiei celulelor stem și poate spori posibilitățile de supraviețuire și diferențiere ghidată *in vivo* [62].

*Aplicări noi:* Diferențierea ESC în cardiomiocite "ritmice" este printre cele mai impresionante succese ale medicinei regenerative, luând în considerare povara clinică și socială a bolilor cardiovasculare care au fost cauza principală a mortalității în ultimele decenii [63]. Aplicarea acestor cardiomiocite în repararea țesutului cardiac este testată activ [61], împreună cu încercările de a utiliza cardiomiocitele "în afara inimii", în biosinteza *ex vivo* a VEHTC, pompa contracțiilor vasculare prin venele profunde [57]. Aplicarea practică a acestor pompe venoase încă trebuie dezvoltată, dar drept scop potențial, astfel de pompe venoase pot deveni o alegere salvatoare pentru pacienții cu insuficiență cronică a valvelor venelor profunde (CDVI), când majoritatea patologiilor reprezintă lipsa de capacitate de a propulsa sângele înapoi spre inimă.

The reprogramming consists of retroviral transduction of a group of genes coding for pluripotency factors (OCT4, SOX2, C-Myc, KLF4) [51] and the source of iPSCs are usually adult autologous somatic cells harvested from patient's bone marrow or blood. iPSCs show a pluripotent phenotype, similar to that of ESCs, but don't have the legal and ethical controversies associated with embryonic cells [52]. Technical advancement in reprogramming of patient-specific syngeneic somatic cells has reduced concerns about the immunogenic responses that are likely to limit the use of hESCs [53]. As a downside, recent studies have demonstrated that some of the differentiated cells from iPSCs are highly immunogenic [54], and the type of differentiated cells, the route of administration of the cells, and the chimerism in the host plays an important role in the immunogenicity of the iPSC-derived cells. Regardless of the technical challenges and potential adverse effects, the use of iPSCs becomes more attractive as these cells showed the potential to be differentiated into cardiomyocytes [55] and used in cardiac tissue repair. Moreover, an interesting novel application of the iPSC-derived cardiomyocytes in the form of engineered heart tissue (EHT) [56] as a part of venous EHT cuffs in which the cardiomyocytes form a cardiac syncytium and develop an intrinsic beating rhythm [57].

### Current challenges and future promises

*Immunogenicity and survival of the transplanted stem cells:* As we further understand the immune responses to transplanted stem cells, we can use targeted interventions to ameliorate the immune response to implanted cells, and improve their survival. For example, glycoprotein A repetitions predominant (GARP) expression on MSCs enables them to inhibit T cell responses *in vitro*, and is potentially a new target for improving the MSCs survival and therapeutic efficacy [58].

*Malignancies as a complication of stem cell therapy:* Among the adverse events and complications, teratoma formation and leukemia are a real threat of SCT and most applicable to the cell lines with pluripotent characteristics such as ESCs and iPSCs [59]. Improvements in methods of isolation and manipulation of stem cells, including a safer alternative to the viral genomic transformation, can reduce these risks and is an area of active interest in the stem cell world.

*Cell survival:* Aside from immunological aspects, the retention of injected cells into myocardium is also a difficult endeavor, particularly because of its highly contractile nature. Some novel methods show a potential for overcoming this hurdle in animal models by applying nanoscale adapters for delivering the stem cells into cardiac tissue [60]. For example, a recently reported application of mouse ESC "encapsulated in injectable nanomatrix gel" composed of peptide amphiphiles with Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) cell adhesive ligand showed an improved retention and engraftment 14 weeks post-transplantation [61]. The use of nanotechnology has opened a new chapter in understanding the biology of stem cells and can enhance the possibilities of directed *in vivo* differentiation and survival [62].

*Novel applications:* Differentiation of ESC into "beating" cardiomyocytes is among the most impressive achievements

Perspectivile pentru medicina regenerativă și aplicarea SC par foarte promițătoare, dar aplicarea sigură și efectivă a tehnologiilor sale va necesita o înțelegere mai profundă a proceselor imune și a regulilor acestora în celulele stem, precum și selectarea corectă și direcționată a donatorilor și a recipienților.

#### Acronime și abrevieri:

CS – celule stem  
 MHC – **m**ajor **h**istocompatibility **c**omplex (complex major de histocompatibilitate)  
 HLA – **h**uman **l**eukocyte **a**ntigen (antigen leucocitar uman)  
 HSCs – **h**ematopoietic **s**tem **c**ells (celule stem hematopoietice)  
 MSCs – **m**esenchymal **s**tem **c**ells (Celule stem mezenchimale)  
 hESCs – **h**uman **e**mbrionic **s**tem **c**ells (Celule stem embrionare umane)  
 iPSCs – **i**nduced **p**luripotent **s**tem **c**ells (celule stem pluripotente induse)  
 IMGT – ImMunoGeneTics (numele proiectului internațional din cadrul Institutului European de Bioninformatică)  
 TCR – **T**-cell receptor (receptorii celulelor T)  
 $\beta$ 2M – **b**eta-2 **m**icroglobulin  
 APC – **a**ntigen **p**resenting **c**ells (celule prezentatoare de antigen)  
 CD8 (other CDs) – **c**luster of **d**ifferentiation (grup de diferențiere)  
 Tc and Th – Celule T citotoxice și ajutătoare (**h**elper)  
 CTL – **c**ytotoxic **T** lymphocytes (limfocitele T citotoxice)  
 MLR – **m**ixed **l**ymphocytes **r**eaction (reacție de limfocite mixtă)  
 FDA – **F**ood and **D**rug **A**dministration (agenție de reglementare SUA)  
 UCB – **u**mbilical **c**ord **b**lood (sangele din cordonul ombilical)  
 IFN- $\gamma$  - **i**nterferon **g**amma  
 TGF- $\beta$  - **t**ransforming **g**rowth **f**actor **b**eta (factor de creștere transformator beta)  
 rhHGF – **r**ecombinant **h**uman **h**epatocyte **g**rowth **f**actor (factorul de creștere a hepatocitelor umane recombinante)  
 SCT – **s**tem **c**ell **t**herapy (terapia cu celule stem)  
 OCT4 – **o**ctamer-binding transcription factor **4** (factor de transcriere octamer de legare 4)  
 SOX2 – **S**RY(sex determining region Y)-**box 2**  
 C-Myc – V-myc avian myelocytomatosis viral  
 KLF4 – Kruppel-like factor 4  
 GARP – **g**lycoprotein **A** repetitions **p**redominant  
 SSEA (3&4) - **s**tage **s**pecific **e**mbrionic **a**ntigen  
 EHT – **e**ngineered **h**earth **t**issue (țesut cardiac artificial)  
 VEHTCs – **v**enous EHT cuffs (manșete EHT venoase)

#### Contribuția autorilor:

Ambii autori au contribuit în mod egal la scrierea acestui manuscris.

**Conflict de interes:** Autorii nu declară conflict de interes.

of regenerative medicine, considering the clinical and social burden of cardiovascular diseases being a lead cause of mortality for the past several decades [63]. Application of ESC-derived cardiomyocytes in repair of cardiac tissue is being actively tested [61], along with attempts to use the cardiomyocytes “outside of the heart”, to create contractile vascular pumps to aid venous or lymphatic flow [57]. The later approach is in early stages of development, but it holds promise to become a life-saving choice for patients with chronic deep vein valve insufficiency (CDVI), in which the major pathology is failure to pump the blood back to the heart.

The prospects for the regenerative medicine and application of SCs look very promising, but effective and safe application of this technology will require a deeper understanding of the immune processes and their regulation in stem cells, along with proper and targeted selection of donors and recipients.

#### Acronyms and Abbreviations:

APC – **a**ntigen **p**resenting **c**ells  
 $\beta$ 2M – **b**eta-2 **m**icroglobulin  
 CD8 (other CDs) – **c**luster of **d**ifferentiation  
 C-Myc – V-myc avian myelocytomatosis viral  
 CTL – **c**ytotoxic **T** lymphocytes  
 SCs – **s**tem **c**ells  
 EHT – **e**ngineered **h**earth **t**issue  
 FDA – **F**ood and **D**rug **A**dministration (US Regulatory agency)  
 GARP – **g**lycoprotein **A** repetitions **p**redominant  
 hESCs – **h**uman **e**mbrionic **s**tem **c**ells  
 hHGF – **h**uman **h**epatocyte **g**rowth **f**actor  
 HLA – **h**uman **l**eukocyte **a**ntigen  
 HSCs – **h**ematopoietic **s**tem **c**ells  
 IFN- $\gamma$  - **i**nterferon **g**amma  
 IMGT – ImMunoGeneTics (project - part of European Bioinformatics Institute)  
 iPSCs – **i**nduced **p**luripotent **s**tem **c**ells  
 KLF4 – Kruppel-like factor 4  
 MHC – **m**ajor **h**istocompatibility **c**omplex  
 MLR – **m**ixed **l**ymphocytes **r**eaction  
 MSCs – **m**esenchymal **s**tem **c**ells  
 OCT4 – **o**ctamer-binding transcription factor **4**  
 SCT – **s**tem **c**ell **t**herapy  
 SOX2 – **S**RY(sex determining region Y)-**box 2**  
 SSEA (3&4) - **s**tage **s**pecific **e**mbrionic **a**ntigen  
 TCR – **T**-cell **r**eceptor  
 Tc and Th – **c**ytotoxic and **h**elper T-cells, respectively  
 TGF- $\beta$  - **t**ransforming **g**rowth **f**actor **b**eta  
 UCB – **u**mbilical **c**ord **b**lood

#### Authors contribution:

Both authors contributed equally to the writing of this manuscript.

**Conflict of interest:** Authors declare no conflict of interest.

## Bibliografie/ References

- Valentin-Acevedo A, Covey LR, Gurkan S. B lymphocyte cytokine profile in a monozygotic twin pair discordant for nephrotic syndrome. *Indian journal of pediatrics*. 2013;80(10):875-7. doi: 10.1007/s12098-013-0984-0. PubMed PMID: 23397174.
- Guha P, Morgan JW, Mostoslavsky G, Rodrigues NP, Boyd AS. Lack of immune response to differentiated cells derived from syngeneic induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell*. 2013;12(4):407-12. doi: 10.1016/j.stem.2013.01.006. PubMed PMID: 23352605.
- Carpenter MK, Couture LA. Regulatory considerations for the development of autologous induced pluripotent stem cell therapies. *Regenerative medicine*. 2010;5(4):569-79. doi: 10.2217/rme.10.55. PubMed PMID: 20632860.
- Mangan PA, Gleason CL, Miceli T. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma: frequently asked questions. *Clinical journal of oncology nursing*. 2013;17 Suppl:43-7. doi: 10.1188/13.CJON.43-47. PubMed PMID: 24280458.
- Martin JA, Hamilton BE, Osterman MJK. Three Decades of Twin Birth in the United States, 1980-2009. Hyattsville, MD: CDC, 2012 January 2012. Report No.
- Getts DR, Shankar S, Chastain EM, Martin A, Getts MT, Wood K, et al. Current landscape for T-cell targeting in autoimmunity and transplantation. *Immunotherapy*. 2011;3(7):853-70. doi: 10.2217/imt.11.61. PubMed PMID: 21751954; PubMed Central PMCID: PMC3666312.
- Nakajima F, Tokunaga K, Nakatsuji N. Human leukocyte antigen matching estimations in a hypothetical bank of human embryonic stem cell lines in the Japanese population for use in cell transplantation therapy. *Stem cells*. 2007;25(4):983-5. doi: 10.1634/stemcells.2006-0566. PubMed PMID: 17185611.
- Poncelet AJ, Nizet Y, Vercruyse J, Hiel AL, Saliez A, Gianello P. Inhibition of humoral response to allogeneic porcine mesenchymal stem cell with 12 days of tacrolimus. *Transplantation*. 2008;86(11):1586-95. doi: 10.1097/TP.0b013e31818bd96f. PubMed PMID: 19077894.
- Gu LH, Zhang TT, Li Y, Yan HJ, Qi H, Li FR. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells transplanted via different routes in diabetic rats. *Cellular & molecular immunology*. 2014. doi: 10.1038/cmi.2014.70. PubMed PMID: 25242276.
- Shiina T, Hosomichi K, Inoko H, Kulski JK. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *J Hum Genet*. 2009;54(1):15-39.
- Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Parham P, Marsh SGE. The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Research*. 2013;41(D1):D1222-D7. doi: 10.1093/nar/gks949.
- Mak TW, Saunders ME, Jett BD. Primer to The immune response. 2nd edition / ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier/AP Cell, AP Cell is an imprint of Elsevier; 2014. xxvii, 674 pages p.
- Keskin F, Karatas A, Albayrak M, Biyik I, Erkan M, Demirin H, et al. Maternal serum soluble HLA-G levels in missed abortions. *Medicina*. 2013;49(10):435-8. PubMed PMID: 24709785.
- Kuroki K, Maenaka K. Immune modulation of HLA-G dimer in maternal-fetal interface. *European journal of immunology*. 2007;37(7):1727-9. doi: 10.1002/eji.200737515. PubMed PMID: 17587197; PubMed Central PMCID: PMC2991771.
- Mellor AL, Munn DH. Immunology at the Maternal-Fetal Interface: Lessons for T Cell Tolerance and Suppression. *Annual Review of Immunology*. 2000;18(1):367-91. doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.367. PubMed PMID: 10837063.
- Jiang S-P, Vacchio MS. Cutting Edge: Multiple Mechanisms of Peripheral T Cell Tolerance to the Fetal "Allograft". *The Journal of Immunology*. 1998;160(7):3086-90.
- Schwarz MR. THE MIXED LYMPHOCYTE REACTION: AN IN VITRO TEST FOR TOLERANCE. *The Journal of Experimental Medicine*. 1968;127(5):879-90. doi: 10.1084/jem.127.5.879.
- Deuse T, Seifert M, Phillips N, Fire A, Tyan D, Kay M, et al. Human leukocyte antigen I knockdown human embryonic stem cells induce host ignorance and achieve prolonged xenogeneic survival. *Circulation*. 2011;124(11 Suppl):S3-9. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.020727. PubMed PMID: 21911816.
- Brignier AC, Gewirtz AM. Embryonic and adult stem cell therapy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;125(2 Suppl 2):S336-44. doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.032. PubMed PMID: 20061008.
- Chapman AR, Scala CC. Evaluating the first-in-human clinical trial of a human embryonic stem cell-based therapy. *Kennedy Institute of Ethics journal*. 2012;22(3):243-61. PubMed PMID: 23285793.
- Brindley D, Mason C. Human embryonic stem cell therapy in the post-Geron era. *Regenerative medicine*. 2012;7(1):17-8. doi: 10.2217/rme.11.115 or 10.2217/rme.12.80. PubMed PMID: 22168491.
- Wagner AM, Krenger W, Holzgreve W, Burkli P, Surbek DV. Use of human embryonic stem cells and umbilical cord blood stem cells for research and therapy: a prospective survey among health care professionals and patients in Switzerland. *Transfusion*. 2013;53(11):2681-9. doi: 10.1111/trf.12137. PubMed PMID: 23451834.
- Parsons XH. Constraining the Pluripotent Fate of Human Embryonic Stem Cells for Tissue Engineering and Cell Therapy - The Turning Point of Cell-Based Regenerative Medicine. *British biotechnology journal*. 2013;3(4):424-57. doi: 10.9734/BBJ/2013/4309#sthash.6D8Rulbv.dpuf. PubMed PMID: 24926434; PubMed Central PMCID: PMC4051304.
- Guilcher GM, Fernandez CV, Joffe S. Are hybrid umbilical cord blood banks really the best of both worlds? *Journal of medical ethics*. 2014. doi: 10.1136/medethics-2013-101673. PubMed PMID: 24825373.
- Fox NS, Stevens C, Ciubotariu R, Rubinstein P, McCullough LB, Chervenak FA. Umbilical cord blood collection: do patients really understand? *Journal of perinatal medicine*. 2007;35(4):314-21. doi: 10.1515/JPM.2007.084. PubMed PMID: 17511596.
- Cohen Y, Nagler A. Umbilical cord blood transplantation--how, when and for whom? *Blood reviews*. 2004;18(3):167-79. doi: 10.1016/S0268-960X(03)00064-X. PubMed PMID: 15183901.
- Broxmeyer HE. Cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *StemBook*. Cambridge (MA)2008.
- Bradley JA, Bolton EM, Pedersen RA. Stem cell medicine encounters the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(11):859-71.
- Li L, Baroja ML, Majumdar A, Chadwick K, Rouleau A, Gallacher L, et al. Human Embryonic Stem Cells Possess Immune-Privileged Properties. *Stem cells*. 2004;22(4):448-56. doi: 10.1634/stemcells.22-4-448.
- Grinnemo K-H, Kumagai-Braesch M, Månsson-Broberg A, Skottman H, Hao X, Siddiqui A, et al. Human embryonic stem cells are immunogenic in allogeneic and xenogeneic settings. *Reproductive BioMedicine Online*. 2006;13(5):712-24. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60663-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60663-3).
- Drukker M. Immunogenicity of Embryonic Stem Cells and Their Progeny. In: Irina K, Robert L, editors. *Methods in Enzymology*: Academic Press; 2006. p. 391-409.
- Robertson NJ, Brook FA, Gardner RL, Cobbold SP, Waldmann H, Fairchild PJ. Embryonic stem cell-derived tissues are immunogenic but their inherent immune privilege promotes the induction of tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(52):20920-5. doi: 10.1073/pnas.0710265105.
- Drukker M, Katz G, Urbach A, Schuldiner M, Markel G, Itskovitz-Eldor J, et al. Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(15):9864-9. doi: 10.1073/pnas.142298299. PubMed PMID: 12114532; PubMed Central PMCID: PMC125045.
- Boyd AS, Wood KJ. Characteristics of the early immune response following transplantation of mouse ES cell derived insulin-producing cell clusters. *PLoS one*. 2010;5(6):e10965. doi: 10.1371/journal.pone.0010965. PubMed PMID: 20532031; PubMed Central PMCID: PMC2881030.
- Poncelet AJ, Vercruyse J, Saliez A, Gianello P. Although pig allogeneic mesenchymal stem cells are not immunogenic in vitro, intracardiac injection elicits an immune response in vivo. *Transplantation*. 2007;83(6):783-90. doi: 10.1097/01.tp.0000258649.23081.a3. PubMed PMID: 17414713.
- Swijnenburg R-J, Tanaka M, Vogel H, Baker J, Kofidis T, Gunawan F, et al. Embryonic Stem Cell Immunogenicity Increases Upon Differentiation After Transplantation Into Ischemic Myocardium. *Circulation*. 2005;112(9 suppl):I-166-I-72. doi: 10.1161/circulationaha.104.525824.
- Friedenstein AJ, Piatetzky S, II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of embryology and experimental morphology*.

- 1966;16(3):381-90. PubMed PMID: 5336210.
38. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2004;36(4):568-84. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2003.11.001>.
  39. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7. doi: <http://dx.doi.org/10.1080/14653240600855905>.
  40. Williams AR, Hare JM. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res*. 2011;109(8):923-40. Epub 2011/10/01. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.243147. PubMed PMID: 21960725.
  41. Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *The Journal of Pathology*. 2009;217(2):318-24. doi: 10.1002/path.2469.
  42. Murphy MB, Blashki D, Buchanan RM, Yazdi IK, Ferrari M, Simmons PJ, et al. Adult and umbilical cord blood-derived platelet-rich plasma for mesenchymal stem cell proliferation, chemotaxis, and cryo-preservation. *Biomaterials*. 2012;33(21):5308-16. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.04.007. PubMed PMID: 22542609.
  43. Rolandsson S, Karlsson JC, Scheduling S, Westergren-Thorsson G. Specific subsets of mesenchymal stroma cells to treat lung disorders - Finding the Holy Grail. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2014. doi: 10.1016/j.pupt.2014.08.001. PubMed PMID: 25239767.
  44. Burdon TJ, Paul A, Noiseux N, Prakash S, Shum-Tim D. Bone marrow stem cell derived paracrine factors for regenerative medicine: current perspectives and therapeutic potential. *Bone Marrow Res*. 2011;2011:207326. Epub 2011/11/03. doi: 10.1155/2011/207326. PubMed PMID: 22046556; PubMed Central PMCID: PMC3195349.
  45. Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2004;94(1):92-5. Epub 2004/06/29. doi: 10.1016/j.amjcard.2004.03.034. PubMed PMID: 15219514.
  46. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 2003;75(3):389-97. doi: 10.1097/01.TP.0000045055.63901.A9. PubMed PMID: 12589164.
  47. Drago D, Cossetti C, Iraci N, Gaude E, Musco G, Bachi A, et al. The stem cell secretome and its role in brain repair. *Biochimie*. 2013;95(12):2271-85. doi: 10.1016/j.biochi.2013.06.020. PubMed PMID: 23827856; PubMed Central PMCID: PMC4061727.
  48. Huang XP, Sun Z, Miyagi Y, McDonald Kinkaid H, Zhang L, Weisel RD, et al. Differentiation of allogeneic mesenchymal stem cells induces immunogenicity and limits their long-term benefits for myocardial repair. *Circulation*. 2010;122(23):2419-29. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.95971. PubMed PMID: 21098445.
  49. Quevedo HC, Hatzistergos KE, Oskouei BN, Feigenbaum GS, Rodriguez JE, Valdes D, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(33):14022-7. Epub 2009/08/12. doi: 10.1073/pnas.0903201106. PubMed PMID: 19666564; PubMed Central PMCID: PMC2729013.
  50. Mazhari R, Hare JM. Translational findings from cardiovascular stem cell research. *Trends in cardiovascular medicine*. 2012;22(1):1-6. doi: 10.1016/j.tcm.2012.05.017. PubMed PMID: 22940024; PubMed Central PMCID: PMC3563254.
  51. Yamanaka S, Blau HM. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature*. 2010;465(7299):704-12.
  52. Laflamme M. Introduction to JCPT Focused Issue on "Stem Cells and Cardiac Regenerative Medicine". *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*. 2014;19(4):329. doi: 10.1177/1074248414535342.
  53. Araki R, Uda M, Hoki Y, Sunayama M, Nakamura M, Ando S, et al. Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. *Nature*. 2013;494(7435):100-4. doi: 10.1038/nature11807. PubMed PMID: 23302801.
  54. Fu X. The immunogenicity of cells derived from induced pluripotent stem cells. *Cellular & molecular immunology*. 2014;11(1):14-6. doi: 10.1038/cmi.2013.60. PubMed PMID: 24336164; PubMed Central PMCID: PMC4002141.
  55. Suh CY, Wang Z, Bártulos O, Qyang Y. Advancements in Induced Pluripotent Stem Cell Technology for Cardiac Regenerative Medicine. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*. 2014;19(4):330-9. doi: 10.1177/1074248414523676.
  56. Zimmermann W-H, Schneiderbanger K, Schubert P, Didié M, Münzel F, Heubach JF, et al. Tissue Engineering of a Differentiated Cardiac Muscle Construct. *Circ Res*. 2002;90(2):223-30. doi: 10.1161/hh0202.103644.
  57. Sarvazyan N. Thinking Outside the Heart: Use of Engineered Cardiac Tissue for the Treatment of Chronic Deep Venous Insufficiency. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*. 2014;19(4):394-401. doi: 10.1177/1074248413520343. PubMed PMID: 24500906.
  58. Carrillo-Galvez AB, Cobo M, Cuevas-Ocana S, Gutierrez-Guerrero A, Sanchez-Gilbert A, Bongarzone P, et al. Mesenchymal stromal cells express GARP/LRRC32 on their Surface: Effects on their biology and immunomodulatory capacity. *Stem cells*. 2014. doi: 10.1002/stem.1821. PubMed PMID: 25182959.
  59. Fraser CJ, Hirsch BA, Dayton V, Creer MH, Neglia JP, Wagner JE, et al. First report of donor cell-derived acute leukemia as a complication of umbilical cord blood transplantation. *Blood*. 2005;106(13):4377-80. doi: 10.1182/blood-2005-06-2551. PubMed PMID: 16118319; PubMed Central PMCID: PMC1895243.
  60. Kang BJ, Kim H, Lee SK, Kim J, Shen Y, Jung S, et al. Umbilical-cord-blood-derived mesenchymal stem cells seeded onto fibronectin-immobilized polycaprolactone nanofiber improve cardiac function. *Acta biomaterialia*. 2014;10(7):3007-17. doi: 10.1016/j.actbio.2014.03.013. PubMed PMID: 24657671.
  61. Ban K, Park HJ, Kim S, Andukuri A, Cho KW, Hwang JW, et al. Cell Therapy with Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Encapsulated in Injectable Nanomatrix Gel Enhances Cell Engraftment and Promotes Cardiac Repair. *ACS nano*. 2014. doi: 10.1021/nn504617g. PubMed PMID: 25210842.
  62. Kingham E, Oreffo RO. Embryonic and induced pluripotent stem cells: understanding, creating, and exploiting the nano-niche for regenerative medicine. *ACS nano*. 2013;7(3):1867-81. doi: 10.1021/nn3037094. PubMed PMID: 23414366; PubMed Central PMCID: PMC3610401.
  63. Toma I, McCaffrey T. Transforming growth factor- $\beta$  and atherosclerosis: interwoven atherogenic and atheroprotective aspects. *Cell Tissue Res*. 2012;347(1):155-75. doi: 10.1007/s00441-011-1189-3; PubMed Central PMCID: PMC21626289.



## Tehnica recoltării arterei radiale în vederea folosirii în bypass-ul aorto-coronarian

Grigore Tinica\*<sup>1,2</sup>, Mihail Enache†<sup>1,2</sup>, Diana Anghel†<sup>1,2</sup>, Victor Prisacari†<sup>2</sup>, Raluca Ozana Chistol†<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa” Iași, România

<sup>2</sup> Institutul de Boli Cardiovasculare „Prof. Gr. George I.M. Georgescu”, Iași, România

### Autor corespondent:

Grigore Tinică, dr. șt. med.,  
Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa”,  
Bd. Carol I, 50, Iași, 700503 România  
e-mail: grigoretinica@yahoo.com

## Radial artery harvesting technique for use in coronary bypass surgery

Grigore Tinica\*<sup>1,2</sup>, Mihail Enache†<sup>1,2</sup>, Diana Anghel†<sup>1,2</sup>, Victor Prisacari†<sup>2</sup>, Raluca Ozana Chistol†<sup>2</sup>

<sup>1</sup> University of Medicine and Pharmacy „Gr.T.Popa”, Iasi, Romania

<sup>2</sup> Institute of Cardiovascular Diseases „Prof. Dr. George I.M. Georgescu”, Iasi, Romania

### Corresponding author:

Grigore Tinică, PhD  
University of Medicine and Pharmacy „Gr.T.Popa”,  
Bd. Carol I, 50, Iasi, 700503 România  
e-mail: grigoretinica@yahoo.com

### Rezumat

Artera radială (AR) a fost introdusă în chirurgia cardiacă la începutul anilor 1970 ca alternativă a utilizării venelor în chirurgia de bypass aorto-coronarian (BAC) (Carpentier, 1973). Autorii descriu caracteristicile anatomice ale AR și metoda de recoltare chirurgicală insistând asupra zonelor anatomice riscante care trebuie abordate cu atenție pe parcursul intervenției.

Datorită introducerii în practica medicală a blocaților de calciu, a perfecționării tehnicilor de recoltare și preparare a AR, a crescut durata patenței graftului arterial, AR redevenind graft de elecție în chirurgia arterelor coronare. Comparativ cu artera mamară internă (AMI), AR este caracterizată de o prevalență crescută a leziunilor intimale de tip hiperplazie fibrointimală sau ateroscleroză. Cunoașterea morfologiei și anatomiei topografice a structurilor brahiantibrahiale precum și manevrarea delicată a AR previne apariția complicațiilor secundare bypass-ului de tipul spasmului arterial, lezarea endarterei, disesteziilor, ischemiei, sindromului de compartiment. Tehnica BAC (alegerea tipului de graft, metoda de recoltare) depinde de particularitățile clinoc-anamnesticale ale cazului, opțiunea și experiența chirurgului.

**Cuvinte cheie:** artera radială, bypass aorto-coronarian, graft, recoltare.

### Introducere

Artera radială (AR) a fost introdusă în chirurgia cardiacă la începutul anilor 1970 ca alternativă a bypass-ului venos al arterelor coronare (Carpentier, 1973) [1]. Treptat această

### Abstract

The radial artery (RA) was introduced in coronary artery bypass grafting (CABG) as an alternative to the use of the great saphenous vein at the beginning of the 1970s (Carpentier, 1973). The authors describe the anatomical characteristics of the radial artery, the main procedures used in harvesting the vessel, underlying the most risky anatomical area that should be avoided during the surgical procedures. Compared with the internal mammary artery (IMA), the radial artery is characterized by an increased prevalence of intimal alterations of fibrointimal hyperplasia or atherosclerosis type. Rigorous knowledge of brachio-antebrachial anatomical structures and gentle manipulation of the RA prevents CABG complications such as arterial spasm, injury to the endothelium, dysesthesia, ischemia, and compartment syndrome.

The strategy of the graft procedure (graft type, method of harvesting) depends on the clinico-anamnestic specificities of the case, on the surgeon's choice and his surgical expertise.

**Keywords:** radial artery, bypass, harvesting.

### Introduction

The radial artery (RA) was introduced in coronary artery bypass grafting (CABG) as an alternative to the use of the great saphenous vein at the beginning of the 1970s (Carpentier, 1973) [1]. Its use was gradually abandoned because of early occlusion through arterial spasm (due to harvesting trauma and improper preparation) and corresponding upper limb ischemia [2-5]. Improved harvesting technique and the use of

metodă este respinsă datorită ocuziei precoce a grafturilor arteriale prin spasm arterial (determinat de lezarea iatrogenă a radialei în momentul recoltării și preparării în vederea greșării) și apariției fenomenelor ischemice la nivelul membrului superior de la nivelul căruia s-a recoltat artera [2-5]. Datorită introducerii în practica medicală a blocaților de calciu, a perfecționării tehnicilor de recoltare și preparare a AR, a crescut durata patenței graftului arterial, AR redevenind graft de elecție în chirurgia arterelor coronare [6,7].

Cunoașterea morfologiei și anatomiei topografice a structurilor brahiantbrahiale precum și manevrarea delicată a AR previne apariția complicațiilor secundare *bypass*-ului arterial de tipul spasmului arterial, lezarea endarterei, disesteziilor, ischemiei, sindromului de compartiment.

### Structurile anatomice ale antebrăului anterior

Regiunea antebrachială anterioară este limitată superior de linia circulară care trece la două laturi de deget sub epicondili humerali, inferior de linia circulară care trece tangent la partea cea mai cranială a capului ulnei, la 2 cm de asupra vârfului procesului stiloid ulnar, lateral și medial, la suprafață, prin două linii care unesc epicondili humerali cu procesele stiloide ale radiusului și respectiv ulnei, iar în profunzime, de planul osteofibros al antebrăului.

În funcție de lama conjunctivă în care se găsește mănunchiul neurovascular radial, regiunea antebrachială anterioară este subîmpărțită pe fața laterală a mușchiului rotund pronator, în două zone:

- *anteromedială*, care conține mușchii antebrachiali mediali, nervii median și ulnar, arterele ulnară și interosoasă anterioară,
- *anterolaterală*, care conține mușchiul brahioradial, ramura anterioară a nervului radial și artera radială.

Regiunea antebrachială anterioară are caracter unitar, fiind implicată în flexie și pronație și prezintă următoarele planuri anatomice:

- *planul superficial*: pielea, stratul adipos subcutanat și fascia superficială;
- *planul intermediar*, alcătuit din:
  - o fascia antebrachială anterioară;
  - o stratul musculofascial superficial format din fascia antebrachială ventrală, mușchii superficiali (în sens lateromedial, sunt *brahioradial*, *pronator rotund*, cu direcție oblică inferolateral, *flexorul radial al carpului*, *palmar lung*, *flexorul ulnar al carpului*) și mănunchiul neurovascular radial;
  - o stratul musculofascial intermediar format de mușchiul flexor superficial al degetelor cu teaca sa fascială și mănunchiul neurovascular median;
  - o stratul musculofascial profund format din țesut conjunctiv organizat cu valoare septală, mușchii flexor lung al policelui și flexor profund al degetelor, mănunchiul neurovascular ulnar;
- *planul profund*, musculo-osteofibros este format din inserția radială a mușchiului supinator, mușchiul pronator pătrat, ulna, membrana interosoasă, radius și mănunchiul neurovascular interosos anterior.

calcium channel blockers increased the long-term patency rate of RA grafts, thus making it the graft of choice in coronary artery bypass surgery [6, 7].

Thorough knowledge of brachi-antebrachial anatomical structures and gentle manipulation of the RA prevents CABG complications such as arterial spasm, injury to the endothelium, dysesthesia, ischemia, and compartment syndrome.

### Surgical anatomy of the ventral antebrachial region

The ventral antebrachial region is limited superiorly by a circular line passing 2 cm distal to the humeral epicondyles, inferiorly by a circular line tangent to the upper part of the ulnar head, 2 cm above the tip of ulnar styloid process, laterally and medially by two superficial lines uniting the humeral epicondyles with the radial and ulnar styloid processes and by the osteofibrous layer in a deep plane (Fig. 1).

The conjunctive sheath containing the radial neurovascular bundle placed on the lateral aspect of *m. pronator teres* subdivides the ventral antebrachial region into two areas [8]:

- *anteromedial area*, containing the medial antebrachial muscles, median and ulnar nerves, ulnar and anterior interosseous arteries;
- *anterolateral area*, containing the anterior branch of the radial nerve, radial artery *m. brachioradialis*.

The ventral antebrachial region, involved both in flexion and pronation, can be divided into three layers:

- *superficial layer*: the skin, the subcutaneous adipose tissue, and the superficial fascia;
- *intermediate layer*, divided into:
  - o a superficial musculofascial layer containing the anterior antebrachial fascia, superficial muscles (from lateral to medial, *m. brahioradialis*, *m. pronator teres*, *m. flexor carpi radialis*, *m. palmaris longus*, *m. flexor carpi ulnaris*), and the radial neurovascular bundle;
  - o an intermediate musculofascial layer containing the median neurovascular bundle and *m. flexor digitorum superficialis*;
  - o a deep musculofascial layer containing connective tissue septa, *m. flexor pollicis longus*, *m. flexor digitorum profundus*, and the ulnar neurovascular bundle.
- *deep, musculo-osteofibrous, layer*, containing the radial insertion of *m. supinator*, *m. pronator quadratus*, the ulna, the interosseous membrane and the anterior interosseous neurovascular bundle.

The radial neurovascular bundle contains the terminal anterior branch of the radial nerve, the radial artery and accompanying veins, and lymphatics. The terminal anterior branch of the radial nerve is anterior to the proximal radioulnar joint, covered by *supinator*. It pierces the interstitium between *brachioradialis* (lateral aspect), *pronator teres* and *flexor carpi radialis* (medial aspect). In the lower half of the forearm, the nerve passes into the dorsal antebrachial region, being situated deep to the *brachioradialis* tendon, and pierces the antebrachial fascia in order to reach the superficial layer [8].

**Mănunchiul neurovascular radial** este format din ramul terminal anterior al nervului radial, artera radială cu venele comitante și limfatice.

Ramul terminal anterior al nervului radial, este situat anterior față de trohoida radiocubitală superioară, acoperită de mușchiul supinator și trece succesiv prin interstițiul dintre mușchii brahioradial, situat lateral și pronator rotund și flexorul radial al carpului, situați medial. În jumătatea inferioară a antebrațului, artera abordează regiunea antebrahială posterioară, pe fața profundă a tendonului mușchiului brahioradial, perforază fascia antebrahială și devine superficial [8].

Artera radială, superficială de la origine, încrucișează tendonul mușchiului pronator rotund și se plasează în partea medială a ramului anterior al nervului radial, fiind situată pe fața ventrală a mușchiului flexor superficial al degetelor. În treimea inferioară mănunchiul se disociază, vasele continuând traiectul vertical prin șanțul pulsului, până în partea laterală a regiunii carpiene (Fig. 1, pag. 54).

Artera radială este ramul terminal de bifurcație al arterei brahiale cu originea la 1 cm inferior de interlinia articulară a cotului, anterior de inserția mușchiului biceps brahial. Distal, artera radială se anastomozează cu ramurile carpiene palmare ale arterei ulnare formând arcada palmară profundă.

Traiectului arterei radiale i se descriu 3 segmente:

- **segment antebrahial** care are traiect descendent aproape vertical prin loja anterioară a antebrațului; în 2/3 superioare artera este profundă, așezată în fascia ce delimitează loja anterioară de cea laterală a antebrațului; în 1/3 inferioară artera este superficială, situată între mușchii flexor radial al carpului și brahioradial; în 1/3 inferioară a arterei radiale se poate palpa pulsul [9];
- **segment carpian** în care, la nivelul interliniei articulare radio-carpiene, artera părăsește loja anterioară a antebrațului, înconjoară marginea laterală a carpului, inferior de procesul stiloid al radiusului; traversează tabachera antomică printre ligamentul colateral al articulației radiocarpiene și osul scafoid pe de o parte, și tendoanele mușchilor lung abductor, scurt extensor radial al carpului de altă parte [10];
- **segment palmar** în care artera radială traversează proximo-distal primul spațiu intermetacarpian.

În traiectul său, AR este însoțită de 2 vene satelite, iar în 2/3 superioare ale antebrațului vine în raport lateral cu ramul superficial al nervului radial. Ramul superficial al nervului radial (sNR) inervează senzitiv parțial eminiența tenariană și feța dorsală a mâinii. În treimea proximală și medială a antebrațului, nervul urmează traiectul AR și este acoperit de *m. brachioradialis*. În treimea distală sNR trece pe sub tendonul *m. brachioradialis* și abordează regiunea antebrahială posterioară [11] (Tabelul 1).

Ramurile colaterale ale AR sunt reprezentate de:

- la nivelul antebrațului și carpului: ramuri musculare, artera recurentă radială, ramul carpian palmar, ramul palmar superficial;
- la nivelul mâinii: artera dorsală a policelui, ramul carpian dorsal al arterei radiale, artera metacarpiană dorsală (interosoasă) a primului spațiu.

Ramurile terminale ale AR formează împreună cu ramurile carpiene palmare ale arterei ulnare arcul palmar profund.

The radial artery, superficial at its origin, crosses the tendon of *m. pronator teres*, and is placed medial to the anterior branch of the radial nerve, on the anterior aspect of *m. flexor digitorum superficialis*. In the lower third of the forearm, the neurovascular bundle dissociates, and the vessels follow a vertical course through the pulse groove to the lateral aspect of the carpal region (Fig. 1, pag. 54).

The radial artery originates as a terminal branch of the brachial artery, 1 cm inferior to the elbow articular line, anterior to the insertion of *biceps brachialis muscle*. In the hand, the radial artery anastomoses with the deep palmar carpal branches of the ulnar artery and form the deep palmar arch.

The course of the radial artery is divided into three segments:

- **antebrachial segment** courses almost vertically through the ventral antebrachial region, deep in the upper 2/3 of the forearm being contained into the intermediate fascia of the forearm, and superficial in the lower 1/3, between *flexor carpi radialis* and *brachioradialis* muscles (the pulse can be palpated in this segment) [9];
- **carpal segment:** at the level of the distal radioulnar joint, the radial artery leaves the ventral antebrachial region, loops around the lateral border of the carpal region, inferior to radial styloid process; crosses the anatomical snuffbox between the radial collateral ligament of the wrist joint and scaphoid bone on laterally, and *abductor pollicis longus* and *extensor carpi radialis brevis* tendons medially;
- **palmar segment** crosses the first intermetacarpal space.

In its course, the radial artery is accompanied by two satellite veins, and in the 2/3 upper thirds of the forearm is related with the superficial branch of the radial nerve. The superficial branch of the radial nerve (sRN) lies proximally slightly laterally to the radial artery, concealed beneath the *brachioradialis* muscle; in the middle third of the forearm, it lies behind the same muscle, close to the lateral side of the artery. In the distal third of the forearm, sRN passes below the *brachioradialis* tendon reaching the posterior aspect of the forearm. The sRN supplies sensorial innervation to the thenar eminence and dorsal aspect of the hand [11] (Table 1).

The collateral branches of RA are:

- in the forearm and at the wrist: muscular branches, radial recurrent artery, palmar carpal branch of the radial artery, the superficial palmar branch of the radial artery;
- in the hand: dorsal thumb branch, dorsal carpal branch of the radial artery, first dorsal metacarpal artery.

The terminal branches of the RA form with the carpal branches of the ulnar artery the deep palmar arch.

**Tabelul 1**

Raporturile arterei radiale

	La antebraț	La pumn ("tabachera anatomică")	La mână
Anterior	<ul style="list-style-type: none"> <li>• superior: m. brahioradial</li> <li>• inferior: piele, fascia superficială, fascia profundă</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• osul scafoid</li> <li>• osul trapez</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• capătul oblic al m. adductor al policelui</li> <li>• tendoanele flexorilor degetelor</li> <li>• mm. lombricali</li> </ul>
Posterior	<ul style="list-style-type: none"> <li>• tendonul m. biceps brahial</li> <li>• m. supinator</li> <li>• m. pronator rotund</li> <li>• m. flexor superficial al degetelor</li> <li>• m. flexor lung al policelui</li> <li>• m. pronator pătrat</li> <li>• extremitatea distală a radiusului</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• tendonul m. extensor lung al policelui</li> <li>• v. cefalică</li> <li>• rr. digitale pentru police și index ale r. anterioare a n. radial</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• bazele metacarpienelor</li> <li>• mm. interosoși</li> </ul>
Lateral	<ul style="list-style-type: none"> <li>• m. brahioradial</li> <li>• r. anterioară a n. radial</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• tendoanele mm. abductor lung și extensor scurt ai policelui</li> </ul>	
Medial	<ul style="list-style-type: none"> <li>• superior: m. pronator rotund</li> <li>• inferior: m. flexor radial al carpului</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• lig. colateral radial al articulației pumnului</li> </ul>	

**Recoltarea arterei radiale****Selectarea membrului superior pentru recoltarea arterei radiale**

În cazul folosirii unui graft unic arterial, se recoltează artera radială de la membrul superior nondominant. Pentru prevenirea ischemiei ulterioare a membrului superior este necesară efectuarea preoperatorie a testului Allen, care indică compensarea circulației sangvine a antebrațului și a mâinii în condițiile funcționării unei singure artere (*a. ulnaris*) [12, 13].

**Testul Allen**

Metoda clasică: se palpează pulsațiile arterei radiale și ulnare și se comprimă concomitent. Pacientul efectuează 5-6 mișcări de flexie-extensie a mâinii, după care mâna rămâne în extensie. În timpul mișcărilor, tegumentele mâinii devin palide. Se decomprimă artera ulnară și se cronometrează timpul de recolorare a tegumentelor. Fluxul sangvin se consideră compensat, dacă timpul recolorării tegumentelor nu depășește 12 secunde.

Testul Allen modificat constă în folosirea pulsoximetrului pentru controlul  $\text{SaO}_2$ . Pulsoximetrul se atașează pe degetul mare sau la nivelul indexului. Se comprimă arterele antebrațului până la scăderea valorilor  $\text{SaO}_2$  la 0%, după care se decomprimă artera ulnară și se notează timpul revenirii saturației la valorile inițiale. Testul se consideră pozitiv dacă valorile saturației periferice revin la nivelul celor inițiale în 12 secunde [14].

**Poziționarea și pregătirea membrului superior pe masa de operație**

După iodare, se poziționează membrul brahial pe suportul standard al mesei de operație, în extensie și abducție laterală

**Table 1**

Relations of the radial artery

	Forearm	Wrist	Hand
Anterior	<ul style="list-style-type: none"> <li>• superior: m. brachioradialis</li> <li>• inferior: skin, superficial and deep fascias</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• scaphoid bone</li> <li>• trapezium bone</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• oblique head of m. adductor pollicis</li> <li>• tendons of flexor muscles of the fingers</li> <li>• mm. lumbricales manus</li> </ul>
Posterior	<ul style="list-style-type: none"> <li>• m. biceps brachii tendon</li> <li>• m. supinator</li> <li>• m. pronator teres</li> <li>• m. flexor digitorum superficialis</li> <li>• m. flexor pollicis longus</li> <li>• m. pronator quadratus</li> <li>• distal end of radius</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• tendon of m. extensor pollicis longus</li> <li>• cephalic vein</li> <li>• thumb and index branches of the anterior branch of the radial nerve</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• metacarpal bones bases</li> <li>• mm. interossei manus</li> </ul>
Lateral	<ul style="list-style-type: none"> <li>• m. brachioradialis</li> <li>• anterior branch of radial nerve</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• tendons of mm. abductor pollicis longus and extensor pollicis brevis</li> </ul>	
Medial	<ul style="list-style-type: none"> <li>• superior: m. pronator teres</li> <li>• inferior: m. flexor carpi radialis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• radial collateral ligament of the wrist</li> </ul>	

**Surgical harvesting of the radial artery****Upper limb selection**

When using a single arterial graft, the nondominant forearm is preferred as a harvest site. Preoperative Allen test is performed in order to prevent subsequent upper limb ischemia. This test indicates if the hand and forearm can be normally supplied by a single (ulnar) artery [12, 13].

**Performing the Allen test**

The classic method consists in palpating the pulsations of the radial and ulnar arteries and simultaneous compression. The patient is then asked to close and open his hand 5-6 times, movements that turn the palm pale. At the end the hand has to be left in extension. The ulnar artery is then decompressed and the hand recoloring time is quantified. The blood flow is considered compensated if the hand recolors in less than 12 seconds.

The modified Allen test consists in using the pulse-oximeter for controlling  $\text{O}_2$  saturation. The pulse-oximeter is attached to the thumb or to the index. The arteries are compressed until  $\text{O}_2$  saturation diminishes to 0. The ulnar artery is then decompressed and the time to reach the initial  $\text{O}_2$  saturation is quantified. The test is considered positive if the saturation reaches the initial level in less than 12 seconds [14].

**Positioning and preparing the upper limb for harvesting**

The upper limb is placed in extension and 90° lateral abduction onto the standard support of the surgical table.

de aproximativ 90°. Se atașează pulsoximetrul la nivelul policelului sau al indexului pentru controlul intraoperator al saturației în oxigen [15]. Pentru stabilitatea poziției, mâna poate fi fixată de câmpurile operatorii cu două pense.

### **Incizia și recoltarea**

Incizia structurilor tegumentare este limitată de două puncte: unul proximal între marginea medială *m. brachioradialis* și marginea laterală a tendonului *m. bicipitalis*, la 1 cm distal de plica cotului, distal între procesul stiloid radial și tendonul *m. flexor carpi radialis*. În primele 2/3 proximale, incizia trebuie să respecte conturul marginii mediale a *m. brachioradialis* (Fig. 2, pag. 54). Venele superficiale aflate pe traiectul inciziei pot fi ligaturate și secționate.

După disecția stratului subcutanat și hemostază, se pătrunde în spațiul dintre *m. brachioradialis* și *m. flexor carpi radialis* prin secționarea fasciei antebrațiale anterioare cu prezervarea nervului cutanat antebrațial lateral dispus lateral în plaga operatorie. (Fig. 3, pag. 54).

După disecția fasciei (Fig. 4, pag. 54, Fig. 5, pag. 55) și rețracția a *m. brachioradialis* și *m. flexor carpi radialis*, se evidențiază traiectul arterei radiale. Pentru prevenirea spasmului arterial se indică administrarea intravenoasă a Diltiazemului hidroclohid într-o doză de încărcare de 0.15-0.25 mg/kg, urmată de perfuzie continuă cu doza de 0.5-1.0  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  [16].

AR se etaleză în 1/3 medie a antebrațului, nivel la care se începe disecția. AR se încarcă cu grijă pe vessel loop. Prin tracțiune ușoară a vessel loop-ului, se ridică artera pentru evidențierea ramurilor colaterale, care se secționează între două clipuri hemostatice (Fig. 5, 6, pag. 55). Artera radială poate fi recoltată scheletizată sau împreună cu venele comitante și cu țesutul adipos adiacent.

### **Secționarea proximală și distală a arterei radiale**

După finalizarea disecției, se clampează distal artera cu un bulldog (clamp Dietrich) și se ligaturează distal de locul clampării, la nivelul procesului stiloid, cu un fir de mătase 2-0. Se secționează ulterior artera între bulldog și ligatură. Prin pulsațiile extremității arteriale ligaturate se apreciază aportul arterei ulnare la circulația colaterală.

AR se ridică perpendicular pe planul antebrațial, se aplică proximal o dublă ligatură cu fir de mătase 2-0 pentru a asigura o hemostază sigură.

Se introduce la extremitatea proximală a AR un ac arterial (Fig. 7, pag. 56). Lumenul arterial se spală cu ser fiziologic cu Papaverină pentru eliminarea cheagurilor de sânge și prevenirea spasmului arterial. Plaga operatorie se acoperă cu comprese sterile și se trece la prepararea AR recoltate. AR se poziționează pe o compresă sterilă. Se produce dilatarea graftului arterial prin injectarea ușoară a soluției de Papaverină și se efectuează verificarea finală a hemostazei prin clipirea ramurilor permeabile. După finalizarea preparării, AR se introduce într-un vas cu soluție de Papaverină.

The pulse-oximeter is attached to the thumb or to the index for intraoperative control of  $\text{O}_2$  saturation [15]. The hand may be attached to surgical fields using two clamps for stabilization.

### **Incision and harvesting**

The incision of the cutaneous structures is performed between two points: proximally, between the medial border of *m. brachioradialis* and the lateral border of the biceps tendon, 1 cm distal to the cubital fossa, and distally, between the radial styloid process and the *m. flexor carpi radialis* tendon. In the upper 2/3, the incision has to respect the contour of the medial border of *m. brachioradialis* (Fig. 2, pag. 54). The superficial veins can be ligated and sectioned.

After subcutaneous layer dissection and hemostasis, the surgeon enters into the space between *brachioradialis* and *flexor carpi radialis* muscles by sectioning the anterior antebrachial fascia and preserving the lateral antebrachial cutaneous nerve situated laterally to the surgical incision (Fig. 3, pag. 54).

After dissecting the fascia (Fig. 4, pag. 54, Fig. 5, pag. 55) and retracting *brachioradialis* and *flexor carpi radialis* muscles, the course of the radial artery is visualised. In order to prevent arterial spasm, diltiazem hydrochloride is administered intravenously with a loading dose of 0.15-0.25 mg/kg, followed by a continuous perfusion 0.5-1.0  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  [16].

The dissection of the radial artery begins in the middle 1/3 of the anterior forearm region. The artery is carefully positioned on the vessel loop (Fig. 5, 6, pag. 55). Through slow traction of the vessel loop the artery is removed from its environment, while the collateral branches are identified and sectioned between two hemostatic clips. The radial artery might be skeletonized single or harvested together with the cominant veins and the adjacent adipous tissues.

### **Proximal and distal sectioning of the radial artery**

After finalizing the arterial dissection, the artery is clamped distally using a bulldog (clamp Dietrich) and ligated distally to the clampation level, closely to the styloid process, with a silk wire 2-0, and subsequent sectioning between the bulldog and the ligation. It might be evaluated the contribution of the ulnar artery in the collateral circulation through the pulsation of the ligated arterial end. The radial artery is elevated perpendicular to the antebrachial plane, in order to apply proximally a double ligature using a silk wire 2-0 for securizing the hemostatic procedure.

At the proximal end of the radial artery an arterial needle is introduced (Fig. 7, pag. 56) and the arterial lumina is cleaned using a hydrosaline solution with Papaverina in order to remove the clots and to prevent arterial postoperator contractions. The wound is covered with steril bandage and the procedure will be continued in order to prepare the harvested radial artery.

### Închiderea plăgii operatorii

Se verifică hemostaza înaintea închiderii plăgii operatorii, (Fig. 8, pag. 56) în vederea prevenirii dezvoltării sindromului de compartiment în perioada postoperatorie.

Plăgă operatorie se închide în dublu strat prin sutură cu fir de acid poliglicolic 3-0 surjet urmat de sutura intradermică cu fir de polidioxonă 4-0 (Fig. 9, pag. 56). Plăgă nu se drenează. Se aplică pentru 24 de ore un pansament compresiv al antebrațului cu urmărirea atentă a dezvoltării unor eventuale fenomene ischemice la nivelul membrului superior.

### Discuții

În timpul recoltării arterei radiale, chirurgul trebuie să țină cont de 4 arii de risc chirurgical.

Prima arie de risc chirurgical este reprezentată de ramurile anterioare ale nervilor cutanați antebrahiali medial și lateral. Nervul cutanat antebrahial medial, ram al cordonului medial (C8, T1) al plexului brahial, inervează pielea regiunii antebrahiale mediale [8, 9]. Nervul cutanat antebrahial lateral reprezintă ramul cutanat al nervului musculocutanat, ram al cordonului lateral (C5-C7), și se distribuie pielii jumătății laterale a regiunii antebrahiale anterioare. Nervul emite ramuri care descriu o ansă în jurul marginii radiale a antebrațului, și se anastomozează cu nervul cutanat posterior al antebrațului și cu ramul terminal al nervului radial. În timpul abordului chirurgical al regiunii antebrahiale anterioare trebuie respectate aceste filete nervoase. Vena mediană (vena antebrahială intermediară) este situată la nivelul inciziei sau în apropierea acesteia, și poate fi ușor ligaturată. Se indică efectuarea de anastomoze venoase pentru a preveni edemele antebrahiale sau palmare. În 1/3 distală a antebrațului artera radială este superficială, mai ales în vecinătatea tendonului *flexor carpi radialis*, nivel la care se dispune subcutanat [8].

A doua arie de risc chirurgical potențial o constituie 1/3 medie a traiectului, nivel la care aceasta artera radială se află în raport lateral imediat cu ramul superficial al nervului radial. Ramul superficial al nervului radial este pur senzitiv, are originea în trunchiul radial, la 0,5 cm după ce acesta abordează regiunea antebrahială, descrie un traiect descendent anterior de epicondilul lateral, pe marginea laterală antebrahială, de asupra mușchiului supinator. În traiectul său, descrie o ansă în jurul arterei radiale, posterior de mușchiul brahioradial. În 1/3 mijlocie ocupă flancul lateral al arterei radiale, nivel la care poate fi lezat în timpul recoltării arterei. Părăsește artera la aproximativ 7 cm de articulația pumnului, trece profund de tendonul mușchiului brahioradial, și înconjură marginea laterală a radiusului înainte de a străbate plafonul tabacherei anatomice. Ulterior descrie un traiect descendent, perforează fascia palmară profundă și se divide în 4-5 ramuri, nervii digitali dorsali. Inervează articulațiile mâinii, pielea 2/3 laterale ale regiunii antepalmare, regiunea dorsală a policelui și extremitățile proximale ale părții laterale ale policelui, și 1/2 ale celorlalte degete. În cazul lezării severe a ramului superficial al nervului radial în cursul recoltării arterei radiale, pacientul prezintă hipoestezie la nivelul unei arii cutanate situate la baza primului și celui de al doilea metacarpian. Anastomozele nervoase de la nivelul ramurilor cutanate ale ner-

The radial artery is placed on the steril bandage and will be slowly injected with a solution of papaverina in order to dilate the arterial graft and to verify the hemostasis of its collateral branches. After preparation, the radial artery is introduced into a solution of Papaverina, until it will be used for the bypass.

### Wound closure

Before the closure of the wound careful hemostasis will be performed (Fig. 8, pag. 56) in order to prevent any postoperative development of a compartmental syndrom.

The incision is closed by using a double layer suture by performing a surjet with a poliglicolic acid 3-0 wire followed by a intradermic suture with polydioxonne wire 4-0 (Fig. 9, pag. 56). No drainage will be performed. It will be applied a compressive bandage on the forearm under careful surveillance of any ischemical phenomena in the operated brahial limb.

### Discussions

In harvesting the radial artery the surgeons have to take into account a number of anatomical risk areas.

*The first anatomical risk area* is represented by the *branches of the medial and anterior antebrahial cutaneous nerve*. The medial cutaneous antebrahial nerve, branch of the brachial plexus medial cord (C8, T1), distributes to the skin of the medial antebrahial region. The lateral antebrahial cutaneous nerve represents the cutaneous branch of the musculocutaneous nerve, branch of the brachial plexus lateral cord (C5-C7), and innerves the skin of the lateral half of ventral antebrahial region [8, 9]. The nerve gives branches that loops around the radial antebrahial border, anastomoses with the posterior cutaneous antebrahial nerve and the terminal branch of the radial nerve. During the surgical procedures on the anterior antebrahial region the surgeon have to take care of the nervous fibers. The median vein (intermediate antebrahial vein) is situated at the incision level or closely related to it, and can be easily ligated. In order to prevent the development of a local edema it is advisable to perform venous anastomosis. In the distal 1/3 of the antebrahial region, the radial artery is situated superficially, subcutaneously, closely related to the tendon of *flexor carpi radialis* [8].

*The second anatomical risk area* is represented by the medial 1/3 part of the artery trajectory, where the artery is closely related to the superficial branch of the radial nerve. The superficial branch of the radial nerve, purely sensitive, originates in the radial trunk, at 0,5 cm after it enters into the antebrahial region. It orientates inferiorly, anterior to the lateral epicondyle, on the lateral antebrahial border, being applied on the supinator muscle. In its trajectory, the nerve describes a loop around the radial artery, posterior to the brahioradialis muscle. In its the middle 1/3 the nerve is applied on the lateral side of the radial artery, a risky zone where it might be interested during the radial artery harvesting. The nerve leaves the artery at about 7 cm from the carpal joint, being situated on the deep surface of the brahioradialis tendon, and loops around the radial lateral border before entering into the snuff box. It crosses proximo-distally the floor of the snuff box, perforates the deep

vilor median și ulnar explică incidența scăzută a hipoesteziei în teritoriul menționat [8, 9].

A treia arie de risc chirurgical o constituie ramul profund al nervului radial, cel mai voluminos dintre cele 2 ramuri terminale ale acestuia, pur motor. Teritoriul de distribuție interesează mușchiul *extensor carpi radialis brevis* și mușchiul supinator. Înainte de a perfora supinatorul descrie o ansă în jurul colului radial și abordează compartimentul antebrahial posterior. Ramul profund al nervului radial are un traiect distal, schimbându-și numele în nerv *interosus posterior*.

După emergența din mușchiul supinator, nervul *interosus posterior* emite următoarele ramuri:

- Trei ramuri scurte pentru mușchii *extensor digitorum*, *extensor digiti minimi* și *extensor carpi ulnaris*;
- Două ramuri lungi
  - o Ram medial pentru mușchii *extensor pollicis longus* și *extensor indicis*;
  - o Ram lateral pentru mușchiul *abductor pollicis longus*, care se termină în mușchiul *extensor pollicis brevis*.

Nervul *interosus posterior* se termină la nivelul regiunii carpiene dorsale, înervând ligamentele și articulațiile carpiene. Ramul profund al nervului radial poate fi lezat în cursul extracției extensive profunde, în special proximal, la nivelul regiunii cotului. Lezarea ramului profund al nervului radial determină inabilitatea extensiei policelui și a articulației metacarpofalangeale ale celorlalte degete. Leziuni înalte de nerv radial determină mâna în gât de lebădă.

A patra arie de risc chirurgical o constituie nervii cutanați antebrahiali lateral și medial, ramul superficial al nervului radial și ramul profund al nervului radial, cu alterări ale funcțiilor motorii la nivelul mâinii și pumnului.

Un element care complică recoltarea arterei radiale o reprezintă existența variantelor anatomice, care au o incidență conform studiilor de specialitate de peste 30%. Variantele anatomice ale arterei radiale se clasifică în trei categorii [17, 18]:

- Arteră radială cu origine înaltă 14,4% după McCormack;
- Prezența arterei radiale superficiale 15% după McCormack;
- Absența arterei radiale sub 1%.

Ultimile două variante anatomice sunt ușor de diagnosticat clinic prin absența pulsului la radială în șanțul pulsului, de cele mai multe ori însoțită de malformații la nivelul membrelor (de exemplu, absența congenitală a radiusului).

### Concluzii

Arterele reprezintă cele mai voluminoase și mai puternice structuri vasculare musculo-membranoase care transportă și distribuie sângele organelor interne. Vase suplă, rezistente, prezentând un calibru semnificativ, arterele au capacitatea de a prelua semnale de la un număr mare de stimuli, influențând statusul parametrilor biologici ce asigură specializarea variatelor tipuri celulare de la nivelul pereților vasculari.

Ductele arteriale sunt structural distincte de arterele coronare, dar morfologic și fiziologic mult mai asemănătoare arterelor coronare comparativ cu grefele venoase.

palmary fascia and divides into 4-5 branches, the dorsal digital nerves. In case of lesions at the level of the superficial branch of the radial nerve during the harvesting of the radial artery the patient present hipoesthesia in the territories of distribution, respectively the base of the first and second metacarpian bone [8,9].

*The third anatomical risk aria* is represented by the deep branch of the radial nerve, the most voluminous one, and purely motor. The territory of distribution is represented by *extensor carpi radialis brevis* and *supinator* muscles. Before it perforates the *supinator* muscle, the nerve describes a loop around the radial neck and enters into the posterior antebrahial region. The iatrogenic lesion of this branch determines the limitation of the *policis* extension and of the first two metacarpophalangeal joints.

*The forth risk aria* is represented by the lateral and medial cutaneous nerves. The superficial branch of the radial nerve and the deep branch of the radial nerve, which may affect the mobility at the levels of the hand and carpien joints.

An important anatomical element that might complicate the radial artery harvesting is represented by its numerous anatomical variants, with an incidence in the literature of about 30%.

Generally, the anatomical variants of the radial artery are classified into three types [17, 18]:

- High origin of the radial artery 14,4% after McCormack
- Superficial radial artery (15%)
- Radial artery agenesis 91%).

The last two types are easy to be identified due to the pulse absence into the radial sulcus and the coexistence of various upper limb malformations (example, radial agenesia).

### Conclusions

The arterial ducts represent the strongest and the most voluminous musculomembranous structures that supplies the inner organs. The arteries are defined as flexible, resistant vessels significant in size, able to capture the signals determined by a variable number of stimuli, influencing the biological statuses and parameters thus providing the specialization of various cellular types localized into the vascular walls.

Arterial ducts are structurally distinct from the coronary arteries, but morphologically and physiologically more similar to coronary artery versus the venous grafts.

Compared with the IMA, the radial artery is characterized by an increased prevalence of intimal alterations of fibrointimal hyperplasia or atherosclerosis type.

The strategy of the graft procedure (graft type, method of harvesting) depends on the clinical and paraclinical specificities of the case, on the surgeon's choice and his surgical expertise.

### Conflict of interest:

None to declare.

Artera radială se caracterizează printr-o prevalență crescută a alterărilor intimale de tipul hiperplaziei fibrointimal sau ateroscleroză comparativ cu IMA.

Strategia de grefare (tip de grefă, modalitate de recoltare) depinde de opțiunea chirurgului operator, în funcție de particularitățile clinico-anamnestice ale cazului și de expertiza sa.

### Conflict de interese:

Nimic de declarat.

### Bibliografie/ References

1. Carpentier A, Guermontprez JL, Deloche A, Frechette C, DuBost C. The aorta-to-coronary radial artery bypass graft: a technique avoiding pathological changes in grafts. *Ann Thorac Surg* 1973;16:111-21.
2. Chiu C-J. Why do radial artery grafts for aortocoronary bypass fail? A reappraisal. *Ann Thorac Surg* 1976;22:520-3
3. Curtis JJ, Stoney WS, Alford WC Jr, Burrus GR, Thomas CS Jr. Intimal hyperplasia: a cause of radial artery aortocoronary bypass graft failure. *Ann Thorac Surg* 1975;20:628-35.
4. Fisk RL, Brooks CH, Callaghan JC, Dvorkin J. Experience with the radial artery graft for coronary artery bypass. *Ann Thorac Surg* 1976;21:513-8
5. Van Son JAM, Smedts F. Revival of the radial artery for coronary artery bypass grafting: l'histoire se repete [Letter]. *Ann Thorac Surg* 1993;55:1596-8
6. Acar C, Jebara VA, Portoghese M, et al. Revival of the radial artery for coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg* 1992;54:652-60.
7. Acar C, Jebara VA, Portoghese M, et al. Comparative anatomy and histology of the radial artery and the internal thoracic artery: implications for coronary artery bypass. *Surg Radiol Anat* 1991;13:283-8.
8. Varlam H, Francu LL, Antohe D St, Frincu DL, Taranu T. Anatomie regionala si aplicata. Membre. Junimea, Iasi, 2004.
9. Brash JC, Jamieson EB, eds. Cunningham's manual of practical anatomy. New York: Oxford University Press, 1947.
10. McMinn RMH, Hutchings RT, eds. Color atlas of human anatomy. Chicago: Year Book Medical, 1977.
11. Pansky B, House EL, eds. Review of gross anatomy: a dynamic approach. New York: Macmillan, 1964.
12. Husum B, Palm T. Arterial dominance in the hand. *Br J Anaesth* 1978;50:913-6.
13. Koman LA, Urbaniak JR. Ulnar artery insufficiency: a guide to treatment. *J Hand Surg* 1981;6:16-24.
14. Reyes AT, Frame R, Brodman RF. Technique for harvesting the radial artery as a coronary artery bypass graft. *Ann Thorac Surg*. 1995; 59: 118-126
15. Johnson WH, Cromartie RS, Arrants JE, Wuamett JD, Holt JB. Simplified method for candidate selection for radial artery harvesting. *Ann Thorac Surg*. 1998; 65: 1167.
16. Bojar RM. Manual of Perioperative Care in Adult Cardiac Surgery, 5th Edition. Wiley-Blackwell, 2011.
17. Coleman S, Anson B. Arterial patterns in the hand based upon a study of 650 specimens. *Surgery, Gynecology & Obstetrics* 1961; 113(4):409-24.
18. McCormack LJ, Caulwell EW, Anson BJ. Braquial and antebraquial arterial patterns. *Surgery, Gynecology & Obstetrics* 1953; 96:43-54.
19. Risteski et al. The radial artery conduit for coronary artery bypass. *Anadolu Kardiyol Derg* 2005; 5: 153-62



## Leziuni pulmonare în asociere cu macule melanocitice cutanate

Victor Botnaru<sup>†1</sup>, Oxana Munteanu<sup>\*1</sup>

USMF "Nicolae Testemițanu"

<sup>†1</sup> Departamentul de medicină internă, disciplina pneumologie/alerologie, Chișinău, Republica Moldova

### Autor corespondent:

Oxana Munteanu, dr. șt. med., asist. univ.

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”,  
bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, Republica Moldova, MD-2004  
e-mail: obarbieru@yahoo.com

## Pulmonary changes associated with cutaneous melanin pigmentation

Victor Botnaru<sup>†1</sup>, Oxana Munteanu<sup>\*1</sup>

SUMPh "Nicolae Testemițanu"

<sup>†1</sup> Department of Internal medicine, Division of Pneumology and Allergology, Chișinău, Republic of Moldova

### Corresponding author

Oxana Munteanu, MD, PhD, assist. prof.,

State University of Medicine and Pharmacy „Nicolae Testemițanu”  
bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chisinau, Republic of Moldova, MD-2004  
e-mail: obarbieru@yahoo.com

Pacient, 26 ani, internat în clinica pneumologie pentru tuse seacă persistentă, dispnee în repaos, dureri epigastrice, melena (2 zile anterior internării), scădere ponderală 10 kg/2 luni, astenie marcată. Afecțiunea ereditară diagnosticată la vârsta de 5 ani cu ocazia intervenției chirurgicale pentru invaginație intestinală. Operat repetat la vârsta de 10 și 19 ani pentru ocluzie intestinală cu polipi intestinali hamartomatoși și la 20 ani polipectomie gastrică endoscopică.

Subponderal, normotensiv, tahicardic (120/min), tahipneic (30/min), SaO<sub>2</sub> 88%, wheezing pe toată aria pulmonară, crepitante inferior bilateral. Inghinal dreapta un ganglion limfatic (diametrul 1 cm).

Fibrogastroduodenoscopic edem și hiperemie a mucoasei esofagului, stomacului, duodenului, fără semne de eroziuni sau hemoragii active; în treimea medie a duodenului 3 formațiuni polipoide mici (3-5 mm), pe bază plată, cu suprafață netedă, culoare roz-pală, fără eroziuni (nu au fost biopsați) (Fig. 1, pag. 59).

### Interbări

1. Considerând datele anamnestice și modificările cutanate, care este cel mai probabil diagnostic? (Fig. 1 [a, b] pag. 59).
2. Ce riscuri comportă această maladie?
3. Ce complicație a bolii este sugerată de examenul imagistic toracic? (Fig. 1 [c, d, e, f] pag. 59).
4. Ce investigație sugerați pentru confirmare?

### Răspunsuri

1. Sindromul Peutz-Jeghers.
2. La pacienții tineri, obstrucția intestinului subțire și invaginația, datorate polipozei intestinale, sunt principalele complicații ale sindromului Peutz-Jeghers. Aproximativ 50% dintre pacienții cu sindrom Peutz-Jeghers decedea prin cancer până la vârsta de 57 de ani. Riscul cumulativ de a dezvolta orice cancer asociat cu sindromul Peutz-Jeghers la pacientul de 15-64 de ani este de 93%. Printre formele

Male, aged 26, admitted to the pulmonology department for persistent dry cough, marked dyspnea, epigastric pain, melena (2 days before admission), weight loss 10 kg /2 months, asthenia. Hereditary disease diagnosed at age 5 during surgery for intussusception. Repeated surgery for partanintestinal obstructions and intestinal polyps (hamartomas) at age 10 and 19 and endoscopic gastric polypectomy at age 20.

On physical examination underweighted, normal blood pressure, tachycardia (120/min), tachypnea (30/min), SaO<sub>2</sub> 88%. Diffuse wheezing, crackles at bases bilaterally. Right inguinal lymph node (1 cm in diameter).

On fibrogastroduodenoscopy edema and hyperemia of the esophageal, gastric and duodenal mucosa, with no signs of erosions or active bleeding; in the middle third of the duodenum 3 small (3-5 mm) sessile polyps with smooth surface, pink colour, no erosion (not biopsy) (Fig. 1, pag. 59).

### Questions

1. Considering history and skin lesions, which is the most likely diagnosis? (Fig. 1 [a, b] pag. 59).
2. What risks are associated with this syndrome?
3. What complication of the disease is suggested by chest imaging? (Fig. 1 [c, d, e, f] pag. 59).
4. What examination would you suggest for confirmation?

### Answers

1. Peutz-Jeghers syndrome.
2. In young patients intestinal obstruction and intussusception (due to intestinal polyposis) are the main complications of Peutz-Jeghers syndrome. Approximately 50% of patients with Peutz-Jeghers die from cancer by the age of 57 years. The cumulative risk of developing any cancer in Peutz-Jeghers syndrome patients of 15-64 years of age is 93%.

particulare cancerul de colon și cancerul de sân au cea mai mare pondere (esofag-0,5%, stomac-29%, intestin subțire-13%, colon-39%, pancreas-36%, plămân-15%, testicule-9%, sân-54%, uter-9%, ovare-21%).

3. La radiografia cutiei toracice se evidențiază un sindrom interstițial extins, bilateral pe toată aria pulmonară, cu multiple opacități liniare, reticulare cu traiect hilifug și micronodulație, semnul siluetei exprimat prin ștergerea limitelor opacității cordului, accentuarea scizurii interlobare orizontale pe dreapta, hilurile pulmonare lărgite, deformate. La HRCT pulmonară se atestă prezența unui pattern nodular diseminat pe toată aria pulmonară și a unui pattern limfangitic mai exprimat în lobii inferiori bilateral (opacități reticulare, cu îngroșări nodulare ale septurilor interlobulare, noduli centrolobulari, linii și poligoane septale, îngroșare „în mărgelă” a scizurilor interlobare) – aspect înalt sugestiv pentru metastaze pulmonare cu limangită carcinoasă.
4. Biopsia ganglionului limfatic inghinal. Examenul histologic a arătat metastaze de adenocarcinom.

**Sindromul Peutz-Jeghers** este o maladie ereditară autozomal dominantă rară manifestată prin polipi hiperplastici (hamartoame) gastrointestinali în asociere cu leziuni pigmentate pe mucoase și tegumente. În 1921 un medic olandez, Jan Peutz, a identificat la membrii unei familii corelația dintre polipii intestinali și leziunile cutanate [1,6]. Cauza sindromului Peutz-Jeghers în majoritatea cazurilor (66-94%) este o mutație la nivelul genei de supresie tumorală *STK11/LKB1* (serina/treonina kinaza 11), cu o variabilitate mare a manifestărilor fenotipice (numărul și localizarea polipilor, aspectul și distribuția diferită a leziunilor cutanate) și a riscului de apariție a cancerului la acești pacienți [4].

Leziunile cutanate se prezintă sub forma unor macule mici, plate, de 1-5 mm, brune sau negricioase, localizate mai frecvent în zona peribucală, pe marginea buzei superioare, zona perinazală, pe antebrățe, palme, plante, degete și regiunea perianală. Unele leziuni se pot decolora la pubertate, persistând doar maculele la nivelul cavității bucale [5].

Ca și manifestări clinice ale sindromului Peutz-Jeghers sunt menționate episoade repetate de durere abdominală, hematemă, melenă inexplicabilă la un pacient tânăr, prolapsul țesutului rectal, pubertate precoce, ginecomastie prin producție de estrogeni din tumorile celulelor Sertoli testiculare, invaginație gastrointestinală [2]. La pacienții tineri, invaginația și obstrucția intestinului subțire, determinate de prezența polipilor, sunt principalele complicații. Deși polipii gastrointestinali sunt hamartoame, pacienții cu sindromul Peutz-Jeghers au un risc de 15 ori mai mare de a dezvolta cancer intestinal [3], gastric sau de colon, necesitând investigații sistematice ale markerilor tumorali și examinări endoscopice.

### Bibliografie/ References

1. Jeghers, H., V. A. McKusick, and K. H. Kaitz. Generalized intestinal polyposis and melanin spots of the oral mucosa, lips and digits: a syndrome of diagnostic significance. *N Engl J Med* 1949. 241:994-1006.
2. Gammon A, Jasperson K, Kohlmann W, Burt RW. Hamartomatous polyposis syndromes. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2009;23(2):219-31.
3. Giardiello, F. M., S. B. Welsh, and S. R. Hamilton. et al. Increased risk of cancer in the Peutz-Jeghers syndrome. *N Engl J Med* 1987. 316:1511-1514.

Among particular forms colon cancer and breast cancer have the highest frequency (esophagus-0.5%, stomach- 29%, small intestine-13%, colon-39%, pancreas-36%, lung-15%, testes-9%, breast-54%, uterus-9%, ovaries-21%).

3. The chest X-ray shows interstitial syndrome with extensive bilateral linear and reticular opacities, small nodules, silhouette sign on the right heart border, prominent horizontal interlobar fissure on the right, enlarged and deformed hila. The HRCT shows diffuse nodular pattern throughout the whole pulmonary area and a lymphangitic pattern mainly in lower lobes (reticular opacities with nodular thickening of interlobular septa, centrilobular nodules, septal lines and polygons with beaded appearance) highly suggestive for lymphangitic carcinomatosis.
4. Inguinal lymph node biopsy. Histological examination showed adenocarcinoma metastases.

**Peutz-Jeghers syndrome** is a rare autosomal dominant inherited disorder manifested by hyperplastic gastrointestinal polyps (hamartomas) in association with mucosal and skin pigmentation. In 1921 a Dutch doctor, Jan Peutz, noted a relationship between intestinal polyps in a family members [1]. The cause Peutz-Jeghers syndrome in most cases (66-94%) is a mutation of the *STK11/LKB1* (serine/threonine kinase 11) tumor suppressor gene, with a high variability of phenotypic manifestations (the number and location of polyps, appearance and distribution of skin lesions) and increased risk of cancer [4,6].

Skin lesions are small (1-5 mm) flat brown or blackish patches, most commonly around the mouth, on the upper lip, nostrils, on the forearms, palms, plants, fingers and perianal area. Some lesions may fade after puberty but tend to persist only in the mouth [5]. Following clinical manifestations are mentioned in the Peutz-Jeghers syndrome: repeated episodes of abdominal pain, haematemesis, inexplicable melaena in a young patient, rectal tissue prolapse, precocious puberty, ginecomastia (estrogen production in testicular Sertoli cell tumors), gastrointestinal intussusception [2]. In young patients, intussusception and intestinal obstruction (caused by the presence of polyps) are the main complications. Although gastrointestinal polyps are hamartomas, Peutz-Jeghers syndrome patients have a 15 fold increased risk of developing intestinal and gastric cancer [3,6], requiring follow-up of tumor markers and endoscopy.

4. Hearle N, Schumacher V, Menko FH, Olschwang S, Boardman LA, Gille JJ. *STK11* status and intussusception risk in Peutz-Jeghers syndrome. *J Med Genet*. Aug 2006;43(8):e41.
5. Bartholomew LG, Dahlin DC, Waugh JM. Intestinal polyposis associated with mucocutaneous melanin pigmentation Peutz-Jeghers syndrome; review of literature and report of six cases with special reference to pathologic findings. *Gastroenterology*. Mar 1957;32(3):434-51.
6. Attard T, et al. Peutz-Jeghers syndrome. [www.emedicine.medscape.com/article/182006-overview](http://www.emedicine.medscape.com/article/182006-overview).

## Revista de Științe ale Sănătății din Moldova Moldovan Journal of Health Sciences

### Ghidul autorului

#### Criteria pentru publicare

Articolele originale trebuie să conțină cercetări noi (originale), rezultatele cărora contribuie la acumularea de noi cunoștințe în domeniul publicat și cu condiția că rezultatele prezentate nu au mai fost publicate înainte sau nu sunt depuse, în paralel, la o altă revistă, în vederea publicării.

Manuscrisele prezentate trebuie să corespundă standardelor STROBE (<http://www.strobe-statement.org>).

#### Prezentarea manuscrisului

Manuscrisele trebuie să fie prezentate doar în formă electronică, în limba română sau engleză. Dacă manuscrisul a fost depus doar în limba română, odată ce a trecut procedura de recenzare internă, acesta va fi tradus integral de către autori în limba engleză, pentru a putea trece procedura de recenzare externă. În același manuscris se permite utilizarea *US English* sau *British English*, dar nu mixt. Varianta tipărită (hârtie) nu va fi acceptată. Doar autorul corespondent va putea depune manuscrisul la redacție; tot el va deține responsabilitatea completă de procesul de depunere, de ducerea corespondenței cu redacția pe durata procesului de publicare.

Procesul de publicare poate fi amânat, întrerupt sau anulat, la discreția autorului corespondent. Odată manuscrisul depus, autorul corespondent va primi un cod electronic de identificare a manuscrisului, pe care îl va folosi în corespondența ulterioară cu redacția.

În scopul menținerii integrității editoriale și a standardelor internaționale de calitate, Redacția *Moldovan Journal of Health Sciences – Revista de Științe ale Sănătății din Moldova* utilizează un sistem de detectare a plagiatului și va supune manuscrisul unei verificări antiplagiat. Depunerea manuscrisului pentru publicare înseamnă, implicit, acordul tuturor autorilor cu verificarea lui antiplagiat. În cazul suspectării că manuscrisul depus a încălcat politicile de publicare, acesta poate fi suspendat sau respins, indiferent de etapa procesului de publicare.

#### Scrisoarea de intenție

La depunere, autorul corespondent va anexa la manuscris o scrisoare de intenție. Formularul tipizat al Scrisorii de intenție este oferit de către Redacție. Scrisoarea de intenție include: (1) titlul manuscrisului; (2) o scurtă descriere despre relevanța manuscrisului pentru scopul promovat de Revistă; (3) contribuțiile aduse de manuscris pentru domeniul său; (4) modul în care manuscrisul adaugă valoare la literatura științifică de specialitate; (5) numele și semnăturile tuturor coautorilor; (5) datele complete de contact ale Autorului corespondent, cu menționarea instituției și adresei instituționale, nr. de telefon, nr. de fax și adresa e-mail.

În scrisoarea de intenție, Autorul corespondent trebuie să indice în mod clar că: (1) lucrarea menționată este originală; (2) lucrarea menționată nu a fost publicată anterior; (3) lucrarea menționată nu este depusă pentru publicație în altă revistă; (4) toți autorii subsemnați au contribuit la elaborarea manuscrisului; (5) de la subiecții incluși în studiu a fost obținut consimțământul informat; (6) toți autorii subsemnați au aprobat versiunea finală a manuscrisului; (7) acordul implicit de verificare antiplagiat al manuscrisului; (8) au fost declarate orice potențiale conflicte de interes. De asemenea, Autorul corespondent poate include orice informație suplimentară în Scrisoarea de intenție, dacă consideră că aceasta poate fi utilă pentru Redacție.

#### Consimțământul informat

Orice manuscris care comunică rezultate experimentale, obținute de la subiecți umani, trebuie să fie bazat pe studii, în care a fost obținut consimțământul

### Instructions for Authors

#### Criteria for publication

Original articles should contain new (original) results, which bring new knowledge in the field. The submitted manuscripts should contain data unpublished before and not submitted in parallel for publication to another journal. Manuscripts submitted must meet STROBE standards (<http://www.strobe-statement.org>).

#### Manuscript Submission

Manuscripts must be submitted only in electronic form in Romanian or English. Once past the internal reviewing procedure, the manuscript was submitted only in Romanian will be fully translated by the authors in English to pass the external reviewing procedure. In the manuscript are allowed to use U.S. English or British English, but not mixed. Printed version (paper) will not be accepted. Only the corresponding author may submit the manuscript. The corresponding author holds full responsibility of the submission and correspondence with the editor during reviewing and publication process.

The publication of the manuscript may be postponed, stopped or canceled at the request of the corresponding author. Once the manuscript is submitted, the corresponding author will receive an electronic identification code of the manuscript, which should be used for subsequent correspondence with the editor.

In order to maintain editorial integrity and international quality standards, editor of the *Moldovan Journal of Health Sciences* reserves the right to use a plagiarism detection system. Thus the submitted manuscript will be checked for plagiarism. Manuscript submission involves agreement of all coauthors for checking for plagiarism. If the submitted manuscript violates copyright policies; it can be suspended or dismissed, regardless of the stage of the publishing process.

#### Letter of intention

A submitted manuscript should be accompanied by a letter of intention. A template of Letter of Intention is provided by editor. Letter of Intention should include: (1) the title of the manuscript; (2) a short statement regarding the relevance of the manuscript for the journal proposes; (3) contributions of the manuscript for to field; (4) what is the added value of the manuscript to the already published scientific literature; (5) the names and signatures of all coauthors; (5) the full contact details of corresponding author, indicating the institution and institutional address, no. telephone, no. fax and e-mail.

In the letter of intention, the corresponding author should clearly indicate that: (1) the paper contain original data; (2) the paper has not been published before; (3) the manuscript is not submitted for publication to another journal; (4) all authors have contributed to the manuscript; (5) the informed consent were obtained from all study subjects (6) all coauthors approved the final version of the manuscript; (7) agreement for checking of the manuscript for plagiarism; (8) any potential conflicts of interest were disclosed. Corresponding author may include in the letter of intention any other additional information which could be useful for the editor.

#### Informed Consent

Manuscripts that report experimental results obtained on human subjects must be based on studies in which informed consent was obtained from study subjects and/or their legal representative. The corresponding author should clearly indicate in his letter of intention about the obtaining of the informed. Editor reserved the right to request additional evidence attesting the obtaining of the informed consent.

mântul informat de la subiect (ti) și/sau tutore (i). În scrisoarea de intenție, autorul corespondent trebuie să indice în mod clar obținerea consimțământului informat. În caz de necesitate, Redacția este în drept să solicite probe suplimentare, care atestă obținerea consimțământului informat.

#### Comitetul de Etică

Pentru orice studiu experimental, efectuat pe oameni sau animale, este necesar de a menționa evaluarea etică a proiectului de cercetare. În acest sens, în articol vor fi menționate numărul procesului verbal și data ședinței Comitetului de Etică, când a fost aprobat proiectul de cercetare.

#### Permișiuni

În conformitate cu ghidurile Comitetului Internațional al Editorilor Revistelor Medicale (ICMJE Guidelines), în cazul când în manuscrisul prezentat este folosită sau reprodusă o informație publicată anterior, sau un material cu drepturi de autor, este de responsabilitatea Autorului corespondent să obțină permisiunea în scris a deținătorului de drepturi (Copyright) și să citeze corect sursa originală. Cu scopul de a menține transparența, se recomandă ca această permisiune, sub formă de copie, să fie depusă împreună cu manuscrisul.

#### Fotografii cu Pacienți identificabili

În conformitate cu ghidurile internaționale ale Comitetului de Etică a Publicațiilor (COPE Guidelines), în cazul când în imaginile prezente în manuscris (fotografii, radiograme, rezultate de laborator, rezultatele investigațiilor paraclinice, înregistrări video sau sonore ș. a.) o persoană este identificabilă fizic, de la aceasta trebuie obținută o permisiune în scris de utilizare a imaginii date. Se recomandă ca permisiunea dată să fie depusă împreună cu manuscrisul, iar în manuscris să fie stipulat în mod clar, că această permisiune a fost obținută.

#### Specificarea medicamentelor și dispozitivelor

În manuscris se vor utiliza nume generice de medicamente, urmate, dacă este cazul, de denumirea lor comercială între paranteze. Pentru medicamente și dispozitive, includeți numele producătorului și localizarea acestuia (țara de origine).

#### Formatul Fișierelor

Se acceptă următoarele formate de text pentru manuscrisul principal: Microsoft Word (97, 2003, 2007, 2010) și formatele ".rtf", ".doc", ".docx". Se acceptă următoarele formate pentru imagini: ".jpeg", ".tiff", ".eps", ".ppt", ".pptx". Este posibil ca imaginile articolului să fie transmise în format .ppt sau .pptx (o imagine – un slide). Calitatea imaginilor, indiferent de format, trebuie să fie, minim: pentru desene – 800 dpi, imagini cu detalii fine – 1000 dpi, imagini alb-negru – de 300 ppm.

#### Structura manuscrisului

Publicația Periodică Revista *Moldovan Journal of Health Sciences* – Revista de Științe ale Sănătății din Moldova respectă recomandările STROBE de raportare a cercetărilor observaționale biomedicale. Pentru a vă ușura procesul de elaborare și structurare a manuscrisului, vă recomandăm să consultați informația respectivă, disponibilă online, pe site-ul [www.strobe-statement.org](http://www.strobe-statement.org).

Volumul textului unui manuscris nu trebuie să depășească 6000 de cuvinte. Cu toate că numărul figurilor și Tabelulelor în manuscris rămâne la discreția autorilor, se recomandă ca numărul lor să fie limitate la 5, pentru a nu reduce din lizibilitatea articolului pe paginile Revistei.

#### Structura unui articol original trebuie să respecte următoarea consecutivitate:

- Titlul lung (format în conformitate cu ghidurile STROBE)
- Numele și prenumele complete ale autorului (autorilor)
- Afilierile autorului (autorilor)
- Datele de contact ale autorului corespondent
- Titlul scurt (va fi utilizat în calitate de colontitlu pe paginile Revistei)
- Elementele scoase în evidență din articol:
  - Ce nu este deocamdată cunoscut la subiectul abordat (descrie în 1-3 fraze)
  - Ipoteza de cercetare (formată în 1-2 fraze)
  - Noutatea adusă de articol literaturii științifice din domeniu (limitată la 1-3 fraze).

#### Ethic Committee

For any experimental study conducted on humans or animals, it is necessary to mention in the article the ethical evaluation of the research project (such as date of evaluation and reference number of approval).

#### Permissions

In accordance with the guidelines of the International Committee of Medical Journals Editors (ICMJE Guideline) if the submitted manuscript used or reproduced information/material previously published or copyrighted is the responsibility of the corresponding author to obtain a written permission from the owner of the copyright and properly cite the original source. In order to maintain transparency, it is recommended to submit the permission, as a copy, along with the manuscript.

#### Pictures

In accordance with international guidelines of the Publications Committee of Ethics (COPE Guidelines), if the manuscript contains pictures (photographs, radiograms, laboratory results, results of laboratory investigations, videos or sound etc.) which allows physical identification of the person, it must be obtained a written permission for the use of the image data. It is recommended to submit the permission along with the manuscript. Also in the manuscript text should be clearly stated that permission was obtained.

#### Drugs and devices specifications

In manuscript generic names of drugs, followed by their trade name in parentheses (if appropriate) should be used. For drugs and devices, manufacturer's name and location (country of origin) should be mentioned.

#### Files format

The following file formats for manuscript text are accepted: Microsoft Word (97, 2003, 2007, 2010) ".rtf", ".doc", ".docx". Pictures should be submitted in one of the following formats: ".jpeg", ".tiff", ".eps", ".ppt", ".pptx". The images could be transmitted also, in a format item ".ppt" or ".pptx" (one image - one slide). Scanning resolution should be as follows: drawings – at least 800 dpi, fine line images – 1000 dpi and greyscale images – at least 300 dpi.

#### Structure of the manuscript

Moldovan Journal of Health Sciences - follow STROBE recommendations for reporting observational biomedical research studies. To facilitate the development of the manuscript, please consult this information available online at [www.strobe-statement.org](http://www.strobe-statement.org).

The volume of the manuscript text should not exceed 6000 words. Although, the number of figures and tables in the manuscript is at the discretion of the authors, in order to not reduce article legibility it is recommended to limit their number to five.

Structure of original article must comply with the following sequence:

- Full title (according to the STROBE guidelines)
- Full authors' name
- Authors' affiliations
- Contact details of corresponding author
- Short title (to be used as a running head on the journal)
- Article highlights:
  - What is not yet known on the issue addressed in the submitted manuscript (described in 1-3 sentences)
  - The research hypothesis (described in 1-2 sentences)
  - The novelty added by manuscript to the already published scientific literature (limited to 1-3 sentences).
- Abstract (consisting of background, materials and methods, results and conclusions), to not exceed 350 words.
- Keywords
- Background
- Materials and methods
- Results
- Discussions
- Conclusions
- List of abbreviations used (if applicable)
- Declaration of conflict of interests

- Rezumatul articolului (compus din introducere, materiale și metode, rezultate și discuții, concluzii), limitat la maximum 350 de cuvinte.
- Cuvinte cheie
- Introducere
- Materiale și metode
- Rezultate
- Discuții
- Concluzii
- Lista abrevierilor utilizate (dacă este cazul)
- Declarația de conflict de interese
- Contribuțiile autorilor
- Mulțumiri și finanțare
- Referințe bibliografice
- Tabelule și legende la Tabelule (dacă este cazul)
- Ilustrații și figuri
- Legendele figurilor (dacă este cazul)
- Descrierea datelor suplimentare, anexe (dacă este cazul)

**Pe pagina de titlu a manuscrisului trebuie să fie prezente următoarele elemente:**

- **Titlul manuscrisului:** trebuie să fie laconic, relevant pentru conținutul manuscrisului, să reflecte tipul (design-ul) studiului și să nu depășească 25 de cuvinte. Nu se admit prezența abrevierilor în titlu.
- **Titlul scurt** (ce va fi utilizat drept colontitlu pe paginile Revistei) reprezintă o versiune scurtă, de esență, a titlului complet. Va fi limitat la 40 de caractere, inclusiv spațiile.
- **Numele autorului (autorilor).** Autori sunt numiți doar acele persoane, care au avut o contribuție substanțială la lucrare. Exemple de contribuție esențială la lucrare sunt: elaborarea design-ului studiului, recrutarea pacienților, participarea în colectarea datelor, analiza datelor, interpretarea rezultatelor, scrierea propriu-zisă a articolului, realizarea tehnică a testelor, investigațiilor, realizarea imaginilor, formularea concluziilor. Pot fi citați până la 10 autori individuali. În cazul când grupul de lucru depășește 10 autori individuali, vor fi citați în secțiunea „Numele și prenumele autorilor” doar primii doi, iar restul vor fi menționați la sfârșitul articolului, la secțiunea „Mulțumiri și finanțare”.

Membrii grupului de lucru, care nu îndeplinesc criteriile formale de autor enumerate, dar au avut o oarecare contribuție la lucrare, pot fi menționați în secțiunea „Mulțumiri și finanțare”.

**Notă:** Pentru a diferenția autorul corespondent și autorii care au contribuit în aceeași măsură la lucrare, folosiți caractere speciale, ca exponenți, la sfârșitul numelor lor:

(\*) – pentru Autorul corespondent;

(†) – pentru Autorii care au contribuție egală.

(De exemplu: Adrian Belii\*, Adrian Belii†)

Nu se vor menționa gradele și titlurile științifice și cele științifico-didactice.

- **Afilieri.** Afilierarea autorilor se va scrie după secțiunea „Numele autorului (autorilor)”. În acest sens, se va menționa numele complet al instituției de afiliere a autorului (autorilor), localitatea și țara.

Afilierarea se marchează cu cifre arabe, în superscript (de exemplu: Adrian Belii<sup>1</sup>)

**Elementele scoase în evidență din articol:**

- Ce nu este deocamdată cunoscut la subiectul abordat (descrise în 1-3 fraze)
- Ipoteza de cercetare (formulată în 1-2 fraze)
- Noutatea adusă de articol literaturii științifice din domeniu (limitată la 1-3 fraze).

**Din pagină nouă:**

**Rezumatul**

Rezumatul trebuie să fie scris la timpul trecut, persoana a treia. Acesta trebuie să ofere un sumar concis al scopului, obiectivelor, rezultatelor semnificative și concluziilor studiului, în limitele la 350 de cuvinte, organizate în următoarele secțiuni:

- **Introducere** – unde se va reflecta, pe scurt, contextul și scopul principal al studiului;
- **Materiale și metode** – cum a fost realizat studiul și ce teste statistice au fost aplicate;

- Authors' contributions
- Acknowledgements and funding
- References
- Tables and tables' captions (if applicable)
- Pictures and figures
- Figures' legends (if applicable)
- Description of additional data, appendices (if applicable)

**The cover page of the manuscript should include:**

- **Title of the manuscript:** should be concise, relevant to the content of the manuscript, and reflect the study design. The title length should not exceed 25 words. It is not allowed the presence of abbreviations in the title.
- **Short title:** (to be used as a running title) is a short version of the essential of the full title. Short title will be limited to 40 characters, including spaces.
- **Author(s) name:** Authors list must include only those persons who had a substantial contribution to the work. Examples of essential contribution to the work are: developing of the study design, patients recruitment, participation in data collection, data analysis, interpretation of results, writing of the manuscript, performing of the tests, pictures taking, drawing conclusions. The authors list should not exceed 10 persons. If the research group exceed 10 individual authors, in the "Authors name" section first two will be cited, all others should be mentioned at the end of the article, in the "Acknowledgements and funding" section.

Members of the research group who do not meet the formal criteria of the authorship, but have had some contribution to the paper, may be mentioned in the "Acknowledgements and funding" section.

**Note:** To differentiate the corresponding author, as well as authors who have an equal contribution to the work, using special characters as a superscript index at the end of their names is recommended:

(\*) - Corresponding author;

(†) - Authors with equal contribution.

(e.g. Adrian Belii\*, Adrian Belii†)

**Affiliation:** Please state the full name of institution, city and country to which the author (s) is affiliated. Affiliation should be marked with Arabic numerals in superscript after the author (s) name (e.g. Adrian Belii<sup>1</sup>)

**Article highlights:**

- What is not yet known on the issue addressed in the submitted manuscript (described in 1-3 sentences)
- The research hypothesis (described in 1-2 sentences)
- The novelty added by manuscript to the already published scientific literature (limited to 1-3 sentences).

**From new page:**

**Abstract**

The abstract should be written using the past tense, third person. It should provide a concise summary of the purpose, objectives, significant results and conclusions of the study. The summary text should not exceed 350 words organized into the following sections:

- **Background** - reflect in short the context and purpose of the study;
- **Materials and methods** - describe how the study was conducted and specify the applied statistics;
- **Results** - present the key results of the study;
- **Conclusion** - a brief overview of the findings, with possible implications for further studies.

Do not use abbreviations or citations in the abstract of the article.

**Keywords**

List 4-10 keywords that are representative for the contents of the article. To facilitate finding of your article by search engines of electronic databases, use MESH keywords list (available on <http://nlm.nih.gov/mesh>).

- **Rezultate** – prezintă rezultatele principale ale studiului;
- **Concluzii** – o scurtă trecere în revistă a constatărilor făcute, cu posibile implicări pentru studii ulterioare.

Nu utilizați abrevieri și citații în rezumatul articolului.

#### Cuvintele cheie

Enumerați 4-10 cuvinte cheie, care sunt reprezentative pentru conținutul articolului. Pentru a ușura găsirea articolului Dvs. de către motoarele de căutare a bazelor de date, folosiți termeni recomandați din lista de titluri cu subiect medical de pe <http://nlm.nih.gov/mesh>.

#### Înregistrarea trialului clinic

În caz dacă articolul Dvs. comunică rezultatele unui trial clinic, vă rugăm să indicați Registrul trialului și numărul unic de înregistrare a trialului.

Exemplu: „*Current Controlled Trials* ISRCTN61362816”. Atenție! Nu trebuie să existe niciun spațiu între literele și cifrele numărului unic de înregistrare a trialului. Pentru mai multe informații, va rugăm să accesați <http://www.isrctn.org> (*International Standard Randomised Controlled Trial Number*) și <http://www.icmje.org> (*International Committee of Medical Journal Editors*).

#### Din pagină nouă:

#### Introducerea

Introducerea, scrisă la timpul trecut, persoana a treia, trebuie:

- să ofere informații care ar permite cititorilor din afara domeniului să intre în contextul studiului, să-i înțeleagă semnificația;
- să definească problema abordată și să explice de ce aceasta este importantă;
- să includă o scurtă trecere în revistă a literaturii recente din domeniu;
- să menționeze orice controverse sau dezacorduri relevante în domeniu;
- să formuleze ipoteza de cercetare și să prezinte parametrul principal și cei secundari de rezultat;
- să concludă cu scopul lucrării și cu un comentariu care să ateste dacă scopul propus a fost atins.

#### Materiale și metode

În secțiunea „Materiale și metode” trebuie să fie descrise cu detalii suficiente procedurile efectuate. Aici se vor menționa protocoalele detaliate privind metodele utilizate precum și informații justificative. Se vor include: design-ul studiului, descrierea participanților și materialelor implicate, descrierea clară a tuturor intervențiilor și comparațiilor efectuate, precum și testele statistice aplicate. Se vor specifica denumirile generice de medicamente. Atunci când în cercetare sunt folosite branduri, se indică în paranteze denumirea lor comercială. În cazul studiilor pe subiecți umani sau pe animale, trebuie să fie menționată aprobarea etică (data și nr. procesului verbal al ședinței Comitetului de Etică, președintele CE și denumirea instituției, în cadrul căreia activează CE), precum și consimțământ informat al persoanelor.

#### Rezultate

Rezultate și discuțiile vor fi prezentate în secțiuni separate.

Autorii trebuie să prezinte rezultate clare și exacte. Rezultatele trebuie explicate (nu justificate sau comparate, în această secțiune) cu constatări fundamentale, evident, referitoare la ipoteza care a stat la baza studiului. Rezultatele trebuie redactate concis și logic, cu accentuarea celor noi.

#### Discuții

Se va descrie impactul, relevanța și semnificația rezultatelor obținute în domeniul respectiv. Rezultatele obținute se vor compara cu cele provenite din studiile anterioare din domeniu și se vor trasa potențiale direcții viitoare de cercetare. Discuțiile trebuie să conțină interpretări importante ale constatărilor și rezultatelor, în comparație cu studiile anterioare. De asemenea, se vor menționa limitele studiului și factorii potențiali de bias.

#### Concluzii

Această secțiune trebuie să concludă laconic întregul studiu, și să specifice, care este plus-valoarea adusă la informațiile disponibile despre subiectul abordat. În concluzii nu se vor oferi informații noi și nu se vor dubla (repetă) cele prezentate în secțiunea „Rezultate”.

#### Registered clinical trial

In case if your article reported the results of a clinical trial, please indicate Trial Register and the unique registration number of the trial.

e.g.: "Current Controlled Trials ISRCTN61362816."

Attention! There should be no space between letters and numbers of the unique record number of the trial. For more information, please visit <http://www.isrctn.org> (*International Standard Randomized Controlled Trial Number*) and <http://www.icmje.org> (*International Committee of Medical Journal Editors*).

#### From new page:

#### Background:

The Background section should be written using past tense, third person must:

- provide information that would allow readers outside of the field to enter the context of the study, to understand its meaning;
- define the problem addressed and explain why it is important;
- include a brief review of recent literature in the field;
- mention any controversy or disagreement existing in the field;
- formulate research hypothesis and present the main and secondary assessed outcomes;
- to conclude with the research' propose and a short comment whether the purpose has been achieved.

#### Materials and Methods

"Materials and methods" section must present in sufficient details all carried out procedures. Here should be described protocols and supporting information on the used methods. It will include study design, subjects' recruitment procedure, clear description of all interventions and comparisons and applied statistics. In the manuscript text the generic names of drugs should be used. When drug brands are used their trade name will be shown in parentheses. For studies on humans or animals a statement about ethical approval and informed consent of study subjects should be included. Please specify date and number of Ethics Committee (EC) decision, chair of the EC as well as institution within EC is organized.

#### Results

Results and discussion should be presented in separate sections. Authors must present results in a clear and accurate manner. Results should be explained (not justified or compared in this section) and include fundamental statements related to hypothesis behind the study. The results should be presented concisely and logically, emphasizing on new original data.

#### Discussion

Describe the impact, relevance and significance of the obtained results for the field. The results are compared with those from previous publications and draw potential future research directions. Discussions should include important interpretations of the findings and results compared with previous studies. Also, study limitations and potential bias should be mentioned.

#### Conclusions

This section should conclude laconically entire study, and highlight the added-value brought on the studied issue. The conclusions should not provide new information or double (repeat) those presented in the "Results" section.

#### Abbreviations

Use only standard abbreviations. Other abbreviations may be defined and provided when are used for the first time in the manuscript. Abbreviations in the figures and tables will be explained in legend. Abbreviations should be used as rare as possible.

#### Declaration of conflict of interests

Following publication, persons or organizations involved in the study become public and thus their reputation may be influenced. Therefore, authors must disclose financial and non-financial relationship with people or organizations and to declare conflicts of interest related to the data presented in the manuscript. In accordance with the ICMJE guidelines, authors must fulfill a statement of conflicts of interest, which will be published at the end of the article.

### Abrevieri

Folosii numai abrevieri standard. De asemenea, pot fi formulate și alte abrevieri, cu condiția că acestea vor fi descifrate în text atunci când sunt utilizate pentru prima dată. Abrevierile din figuri și Tabelule vor fi descifrate în legendă. Abrevierile trebuie folosite cât mai rar posibil.

### Declarația de conflict de interese

După publicare, persoanele sau organizațiile implicate în studiu vor deveni publice și astfel poate fi influențată reputația lor. Prin urmare, autorii trebuie să dezvăluie relația financiară sau non-financiară cu persoane sau organizații și să declare conflictele de interese pentru datele și informațiile prezentate în manuscris. În conformitate cu ghidurile ICMJE, Autorul (autorii) trebuie să completeze o declarație privind Conflictele de interes, care va fi prezentată la sfârșitul articolului publicat.

Completând declarația referitoare la Conflictele de interes, se vor lua în considerație:

#### Pentru Conflicte de interese financiare

- specificați dacă vreo organizație are relație financiară cu lucrarea științifică reflectată în manuscris, inclusiv de finanțare, salariu, rambursări;
- menționați, dacă articolul are un impact asupra organizației date, ce ar genera pierderi sau profituri după publicare, în prezent sau în viitor;
- autorul (autorii) trebuie să precizeze dacă dețin cote de proprietate în orice organizație care ar putea să suporte pierderi sau să aibă profituri după publicare, în prezent sau în viitor. De asemenea, se recomandă să se specifice dacă autorul (autorii) dețin(e) sau aplică pentru orice drepturi de proprietate (brevet) în legătură cu conținutul utilizat în manuscris;
- precizați dacă există oricare alte conflicte de interese.

#### Pentru Conflicte de interese non-financiare

- Vă rugăm să specificați oricare conflicte de interese non-financiare legate de politică, individuale, religioase, ideologice, educaționale, raționale, comerciale, etc., care au legătură cu manuscrisul.

### Contribuția autorilor

Această secțiune a manuscrisului are rolul de a specifica contribuția și gradul de implicare a fiecărui autor. În acest sens, vă rugăm să respectați formatul propus: „HW a conceput studiul și a participat la design-ul studiului și a ajutat la redactarea manuscrisului. MG a efectuat procesarea exemplarelor și a metodelor de cultură ale țesutului și a elaborat manuscrisul. TK a efectuat testele de imunofluorescență. PN a participat la colorare și analiza citometrică prin flux. AR a participat la design-ul studiului și a efectuat analiza statistică. Manuscrisul final a fost citit și aprobat de către toți autorii”.

Fiecare Autor trebuie să aibă o contribuție individuală în desfășurarea cercetării, pregătirii manuscrisului și publicării lucrării. Un Autor trebuie să contribuie semnificativ la conceptul și designul lucrării, la efectuarea procedurilor experimentale, la colectarea datelor, la compilarea, analiza, interpretarea și validarea rezultatelor.

Conform recomandărilor Comitetului Internațional al Editorilor Revistelor Medicale, ICMJE, ([www.icmje.org](http://www.icmje.org)), drept autor poate fi considerată persoana care se încadrează în toate cele 4 criterii:

1. a adus o contribuție individuală substanțială concepției, elaborării design-ului cercetării, sau a colectat, analizat sau interpretat datele;
2. a elaborat manuscrisul sau l-a revizuit în mod critic, aducând o contribuție intelectuală importantă;
3. a aprobat versiunea finală a manuscrisului, gata pentru publicare;
4. este de acord să fie responsabilă pentru toate aspectele legate de cercetarea efectuată și de manuscrisul depus pentru publicare și să dea asigurare, că toate întrebările referitoare la acuratețea sau integritatea lucrării vor fi investigate și rezolvate în mod corespunzător.

**Notă:** Persoanele, care au contribuit la realizarea lucrării, însă nu se încadrează în toate cele 4 criterii enunțate mai sus, nu pot fi considerate autori; contribuția acestora va fi menționată în secțiunea „mulțumiri și finanțare” a manuscrisului. De asemenea, persoanele care au fost implicate doar în colectarea datelor, supraveghere, asistență tehnică și finanțare, nu dețin drept de

Complementing the declaration of conflicts of interest the following will be taken into consideration

#### For financial conflicts of interest

- specify whether any organization has financial relationship with research presented in the manuscript, including funding, salary, reimbursements;
- mentioned, if the article has any impact on the eventually involved organization and could generate losses or profits after publication, now or in the future;
- authors must indicate if they have shares ownership in any organization that may incur losses or take profits after publication, now or in the future. Also, you should specify whether the author (s) own (s) or apply to any property rights (patent) on the content used in the manuscript;
- indicate if there are any other conflicts of interest.

#### For non-financial conflicts of interest

- Please specify any non-financial conflicts of interest: political individual, religious, ideological, educational, rational, commercial, etc. related to manuscript.

### Authors' contributions

This section of the manuscript is to specify the input and involvement of each author. In this regard, please follow the suggested format: "HW conceived the study and participated in study design and helped drafting the manuscript. MG performed the processing of specimens and tissue culture methods and drafted the manuscript. TK performed immunofluorescence tests. PN participated in staining and flow-cytometry. AR participated in the study design and performed the statistical analysis. Final manuscript was read and approved by all authors. "

Each author must have an individual contribution to the research, manuscript preparation and work publication. An author should contribute substantially to one of the following: the concept and design of the work, performing of the experimental procedures, data collection, compilation, analysis, interpretation and validation of results.

According to the International Committee of Medical Journals Editors, ICMJE ([www.icmje.org](http://www.icmje.org)), as author may be a person who fit all four of following criteria:

1. has made a substantial personal contribution in designing, developing research protocol, or collected, analyzed and interpreted data;
2. developed or reviewed critically the manuscript bringing a significant intellectual contribution;
3. approved the final version of the manuscript ready for publication;
4. agrees to be responsible for all aspects of the conducted research and submitted manuscript and to assure that all questions relating to accuracy or completeness of the work was adequately assessed and resolved.

**Note:** Persons who have contributed to the work, but not fit the four criteria mentioned above cannot be considered as authors. Their contribution will be mentioned in the "Acknowledgment and funding section" of the manuscript. Also, people who have only been involved in data collection, monitoring, technical assistance and funding, are not eligible as coauthors, but they may be mentioned in the "Acknowledgements and funding" section. Mere position of head of unit, department or institution, on which the research was conducted, without fulfilling all four ICMJE criteria, doesn't provide the right to be a coauthor of the work.

### Acknowledgements and funding

People who contributed to the study design, data collection, analysis and interpretation, manuscript preparation and editing, offered general or technical support, contributed with essential materials to the study, but do not meet ICMJE authorship criteria will not be considered as authors, but their contribution will be mentioned in section "Acknowledgements and funding." Also in this section must be specified the sources of work funding. Mention of persons or institutions who have contributed to the work and manuscript can be made only after obtaining permission from each of them.

Autor, dar ei pot fi menționați în secțiunea „mulțumiri și finanțare”. Simpla deținere a funcției de șef de unitate, departament sau instituție, pe baza căreia s-a efectuat cercetarea, fără îndeplinirea tuturor celor 4 recomandări ale ICMJE, nu oferă dreptul de a fi Autor al lucrării.

### Mulțumiri și finanțare

Persoanele care au contribuit la elaborarea design-ului studiului, colectarea datelor, analiza și interpretarea acestora, la pregătirea manuscrisului și la redactarea lui critică, au oferit suport general sau tehnic, au contribuit cu materiale esențiale pentru studiu, dar care nu îndeplinesc criteriile ICMJE de Autor, nu vor fi considerate drept Autori, dar contribuția lor va fi menționată în secțiunea „mulțumiri și finanțare”. Tot în această secțiune se vor menționa sursele de finanțare ale lucrării. Menționarea persoanelor fizice sau juridice, care au contribuit la realizarea lucrării și manuscrisului, poate fi făcută doar după obținerea unei permisiuni de la fiecare din ele.

### Tabelulele

Fiecare Tabelul va fi creat cu dublu-spațiere și amplasat pe o pagină separată, după textul manuscrisului. Enumerarea Tabelulelor va fi consecutivă, cu cifre arabe, în ordinea primei lor citări în text, scris cu caractere grase (**bold**), alinierea – pe stânga, deasupra Tabelulului. Fiecare Tabelul va avea un titlu laconic, care va fi scris cu caractere normale (regular) sub numărul Tabelulului. Nu utilizați caractere bold în interiorul Tabelulului. Urmați exemplul prezentat:

#### Tabelul 1.

Evenimente adverse intra-anestezice și imediat post-extubare

	Lot experimental (n=100)	Lot control (n=100)	p
Disritmii	6,0%	3,0%	0,49
Instabilitate hemodinamică	7,0%	1,0%	0,034
Trezire prelungită*	11,0%	4,0%	0,19
GVPO <sup>†</sup> post-extubare	8,0%	27,0%	0,007
Durere intensă la trezire	17,0%	19,0%	1,0

**Notă:** \* – trezire neobișnuit de lentă, după ce concentrația cerebrală a reziduurilor de anestezice a trecut sub pragul de inducere a hipnozei. † - greață și vomă postoperatorie. Analiza statistică utilizată: testul Fisher.

Legende și notele explicative vor fi făcute sub Tabelul. Toate abrevierile non-standard se vor explica în notele de subsol, folosind următoarele simboluri, în următoarea ordine: \*, †, ‡, §, ||, ¶, \*\*, ††, ‡‡, §§, ||||, ¶¶, etc.

Menționați, de asemenea, testele statistice aplicate și tipul de date prezentate. Asigurați-vă că fiecare Tabelul este citat în text. Dacă utilizați date din altă sursă publicată sau nepublicată, trebuie să obțineți permisiunea și să declarați pe deplin sursa sub Tabelul.

### Figurile

Figurile vor fi prezentate atât în manuscris, cât și pe fișiere separate. În manuscris, figurile vor fi prezentate după textul lucrării, fiecare pe pagină separată și vor fi numerotate consecutiv, cu cifre arabe, în ordinea citării lor în text. Numerotarea va fi scrisă abreviat (**Fig. 1**), cu caractere grase (**bold**), alinierea – pe stânga, sub figură. Fiecare figură va avea un titlu laconic, care va fi scris cu caractere normale (regular) în dreptul numerotării.

Figurile trebuie să fie calitative, vizibile în detaliu. Fotografiiile cu persoane potențial identificabile trebuie să fie însoțite de permisiunea scrisă de a utiliza fotografia. În caz contrar, fața persoanelor trebuie acoperită cu o bandă neagră. În cazul în care o figură a fost publicată anterior, faceți referință la sursa originală și prezentați permisiunea scrisă de la deținătorul drepturilor de autor pentru a reproduce figura. Permisuniunea poate fi luată atât de la autor, cât și de la editor, cu excepția documentelor din domeniul public.

Pentru figuri, sunt acceptate următoarele formate de fișiere:

- TIFF
- JPEG
- EPS (format preferat pentru diagrame)

### Tables

Content of each table should be double-spaced and placed on a separate page after the text of the manuscript. Tables numbering will be done using consecutive Arabic numerals in the order of their first citation in the text; it should be written in bold, align to left and place above the table. Each table should have a concise title that will be written in bold (regular) under table number. Do not use bold within the table. Please follow the example:

#### Table 1

Intra-anesthetic and immediately post-extubation adverse events

	Experimental Cohort (n=100)	Control Cohort (n=100)	p
<i>Dysrhythmia</i>	6,0%	30%	0,49
Hemodynamic instability	7,0%	1,0%	0,034
Prolonged awakening*	11,0%	4,0%	0,19
PONV <sup>†</sup> post-intubation	8,0%	27,0%	0,007
Strong pain on awakening	17,0%	19,0%	1,0

**Notă:** \* – trezire neobișnuit de lentă, după ce concentrația cerebrală a reziduurilor de anestezice a trecut sub pragul de inducere a hipnozei. † - greață și vomă postoperatorie. Analiza statistică utilizată: testul Fisher.

Note: \* - Unusually slow awaking, after that cerebral concentration of the anesthetic reach the under hypnotic level. † - postoperative nausea and vomiting. used statistical analysis: Fisher's exact test.

Legends and notes will be place under the table. All non-standard abbreviations should be explained in footnotes, using the following symbols, in the following order: \*, †, ‡, §, ||, ¶, \*\*, ††, ‡‡, §§, ||||, ¶¶, etc.

Applied statistical tests and the type of presented data should be also mentioned. Make sure that each table is cited in the text. If you use data from another published or unpublished source, you must obtain permission and cited the source below the table.

### Figures

Figures will be included in the main manuscript, and also submitted as separate files. The manuscript figures should be presented, each one on a separate page and should be numbered consecutively with Arabic numerals in the order of their citation in the text. Figure numbering will be written abbreviated (**Fig. 1**), using bold fonts, left alignment, and placed under the figure. Each figure should have a laconic title that will be written using regular font and place in the right of the figure's number.

Figures' quality should assure the visibility of details. Pictures of persons potentially identified must be accompanied by written permission to use it. If a figure has been previously published, please cite the original source and submit the written permission to reproduce the figure from the copyright owner. Permission can be taken from both the author and the publisher, except the documents of public domain.

For figures, the following file formats are accepted:

- TIFF
- JPEG
- EPS (preferred format for diagrams)
- PowerPoint (figures should be of the size of a single slide)

The file title should include the figure number and an identifiable short title.

### Figures' legends

Figure's legend should be written immediately after the figure's title. Figure's description should not repeat the description in the text of the manuscript. When used symbols, arrows, numbers or letters to describe parts of the figure, explain clearly each one of them in the legend. Explain the internal scale and identify the staining method of the photomicrographs.

Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures or tables that have been published previously elsewhere. Color images will be printed at the expense of the manuscript authors.



- PowerPoint (figurile trebuie să fie de mărimea unui singur diapozitiv) Titlul fișierului va consta din numărul figurii și un titlu scurt, identificabil.

#### Legendele figurilor

Legenda figurii va fi scrisă în continuare, imediat după titlul figurii. Descrierea figurii nu trebuie să repete descrierea din textul manuscrisului. Când sunt folosite simboluri, săgeți, numere sau litere pentru a identifica, descrie părți ale ilustrațiilor, identificați-le și explicați-le pe fiecare în mod clar în legendă. Explicați scala internă și identificați metoda de colorare în microfotografii.

Vă rugăm să rețineți că este de responsabilitatea autorului (autorilor) de a obține permisiunea de la deținătorul drepturilor de autor pentru a reproduce figuri sau Tabelule care au fost publicate anterior în altă parte. Imaginile color vor fi tipărite din contul autorilor.

#### Referințele bibliografice

Toate referințele bibliografice trebuie să fie numerotate consecutiv, între paranteze pătrate [], în ordinea în care sunt citate în text. Citatele de referință nu trebuie să apară în titluri sau subtitluri. Fiecare referință trebuie să aibă un număr individual. Citările multiple din cadrul unui singur set de paranteze trebuie să fie separate prin virgule. În cazul în care există trei sau mai multe citări secvențiale, acestea ar trebui să fie indicate sub formă de serie. Exemplu: [1, 5-7, 28].

Vă rugăm să evitați folosirea excesivă a referințelor. În cazul în care se folosesc sisteme automate de numerotare, numerele de referință trebuie să fie finalizate, iar bibliografia trebuie formatată complet înainte de depunere. Lista de referință trebuie să conțină toți autorii. Abrevierea revistelor trebuie să fie în conformitate cu Index Medicus / MEDLINE. Pot fi citate doar articolele sau rezumatele care au fost publicate și care sunt disponibile, accesibile prin intermediul serverelor publice. Orice rezumate sau articole nepublicate sau cu caracter personal nu trebuie să fie incluse în lista de referință, dar pot fi incluse în text și citate în mod corespunzător, indicând cercetătorii implicați. Obținerea permisiunii printr-o scrisoare de la autori pentru a le cita comunicările sau datele nepublicate sunt în responsabilitatea autorului articolului.

#### Formatul referințelor

Autorii sunt rugați să furnizeze cel puțin un link pentru fiecare referință bibliografică (preferabil PubMed).

##### □ Referință la revistă

Numele și inițialele autorului sau al autorilor, separate prin virgulă (regular). Titlul articolului (regular). Forma abreviată a denumirii revistei (italice), urmat de anul, numărul volumului: numărul paginilor (regular). Articolele în curs de publicare citate vor fi menționate cu „***In press***” (italic, bold), după numărul paginilor. Se vor menționa toți autorii articolului.

Ex: „1. Belii A., Cobălețchi S., Casian V., Belii N., Severin G., Chesov I., Bubulici E. Les aspects pharmaco-economiques dans la gestion de la douleur perioperative. Mise au point. *Ann Fr Anesth Réanim*, 2012; 31: 60-66.”

##### □ Referință la carte

Numele și inițialele autorului sau al autorilor, separate prin virgulă (regular). Titlul capitolului (regular) (numărul paginii sau paginilor citate). În: Titlul cărții. Detalii privind Editorul. Editura, locul, anul editării.

Ex: „1. Belii A. Gestiunea riscului și siguranța pacientului în anestezie și terapie intensivă (p. 115-134). În: Recomandări și protocoale în anestezie, terapie intensivă și medicină de urgență. Editori: Săndesc D., Bedreag O., Păpurică M. Ed. Mirton, Timișoara, România, 2010.”

##### □ Referința la Web

Numele și inițialele autorului sau al autorilor, separate prin virgulă, sau denumirea deținătorului de drept de autor (regular). Titlul. Numele site-ului. Disponibil la adresa: [URL]. Accesat pe: data.

EX: “Agency For Healthcare Research and Quality (AHRQ). Production pressures. WebM&M. Disponibil la adresa: [http://webmm.ahrq.gov/case.aspx?caseID=150]. Accesat pe : 18.06.2010.”

#### Pentru precizări și informații suplimentare:

Adrian Belii, dr. hab. șt. med., conf. univ.,

Redactor-șef

tel.: +373 79579474

e-mail: [adrian.beliu@usmf.md](mailto:adrian.beliu@usmf.md)

#### References

All references must be numbered consecutively, in square brackets [], in the order they are cited in the text. Reference citations should not appear in titles or subtitles. Each reference should have an individual number. Multiple citations within a single set of brackets must be separated by commas. If there is a sequence of three or more citations, they have to be given as a range (e.g. [1, 5-7, 28]).

Please avoid excessive use of references. If an automatic system of citation is used, reference numbers must be finalized and the bibliography must be fully formatted before submission. Reference list should include all authors. Journals' abbreviation must be in accordance with Index Medicus/MEDLINE. It may be cited only articles or abstracts that have been published and are available through public servers. Any abstracts or unpublished data or personal items should not be included in the reference list, but may be included in the text and cited accordingly, indicating the involved researchers. It is of manuscript authors' responsibility to obtain the permission to refer to unpublished data.

#### References format

Authors are asked to provide at least one link for each citation (preferably PubMed).

##### □ Journal article reference

Surname and initials of the author(s), separated by commas (regular). Title of article (regular). Abbreviated name of the journal (in italics), followed by the year, volume number: pages number (regular). Articles in press should be specified as “***In press***” (italic, bold), after the pages number. All the authors should be listed.

e.g.: „1. Belii A., Cobălețchi S., Casian V., Belii N., Severin G., Chesov I., Bubulici E. Les aspects pharmaco-economiques dans la gestion de la douleur perioperative. Mise au point. *Ann Fr Anesth Réanim*, 2012; 31: 60-66.”

##### □ Book reference

Surname and initials of the author (s), separated by commas (regular). Title of chapter (regular) (cited page(s) number). In: Title of book. Details of the editor, publisher, place, year of publication.

e.g. Belii A. Risk management and patient safety version anesthesia and intensive care unit (p. 115-134). In: Recommendations and Protocols in anesthesia, intensive care and emergency medicine. Editors: Săndesc D., Bedreag O., Papurica M. Ed. Mirton, Timișoara, Romania, 2010.

##### □ Web reference

Name and initials of the author(s), separated by commas, or Copyright holder (regular). Title. Site Name. Available at: [URL]. Accessed: date.

e.g.: Agency for Healthcare Research and Quality (AHRQ). Production Pressures. WebM & M. Available at: [http://webmm.ahrq.gov/case.aspx?caseID=150]. Accessed on: 18.06.2010.

#### For more details please contact

Adrian Belii, PhD., Associated Professor

Chief Editor

tel: +373 79579474

e-mail: [adrian.beliu@usmf.md](mailto:adrian.beliu@usmf.md)

## SCRISOARE DE ÎNSOȚIRE

Titlul manuscrisului: \_\_\_\_\_

Relevanța manuscrisului pentru scopul promovat de Revistă: \_\_\_\_\_

Ce aduce nou manuscrisul domeniului (specialității) în care este publicat: \_\_\_\_\_

Modul în care manuscrisul adaugă valoare la literatura științifică de specialitate: \_\_\_\_\_

Noi, autorii subsemnați ai manuscrisului, declarăm că (bifați):

- lucrarea menționată este originală;
- lucrarea menționată nu a fost publicată anterior;
- lucrarea menționată nu este depusă pentru publicație în altă revistă;
- toți autorii subsemnați au contribuit la elaborarea manuscrisului;
- de la subiecții incluși în studiu a fost obținut consimțământul informat;
- toți autorii subsemnați au aprobat versiunea finală a manuscrisului;
- suntem de acord cu verificarea antiplagiat al manuscrisului;
- au fost declarate orice potențiale conflicte de interes.

Prin prezenta, autorii sunt de acord să transfere drepturile de proprietate (copyright) Revistei Științe ale Sănătății din Moldova – Moldovan Journal of Health Sciences, în caz că manuscrisul va fi publicat.

**Autorii (nume, prenume complet, semnătură):**

1. \_\_\_\_\_
2. \_\_\_\_\_
3. \_\_\_\_\_
4. \_\_\_\_\_
5. \_\_\_\_\_
6. \_\_\_\_\_
7. \_\_\_\_\_

Locul și data: \_\_\_\_\_

**Datele de contact ale autorului corespondent:**

Instituția: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Adresa: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

e-mail: \_\_\_\_\_

tel./fax.: \_\_\_\_\_

Vă rugăm să transmiteți documentul redacției

## COVER LETTER

Manuscript title: \_\_\_\_\_

Relevance of the manuscript for the Journal proposes: \_\_\_\_\_

Contributions of the manuscript for to the research field: \_\_\_\_\_

What is the added value of the manuscript to the already published scientific literature: \_\_\_\_\_

We, the undersigned authors of the manuscript, declare that (tick):

- the paper contain original data;
- the paper has not been published before;
- the manuscript is not submitted for publication to another journal;
- all authors have contributed to the manuscript;
- the informed consent were obtained from all study subjects
- all coauthors approved the final version of the manuscript;
- agreement for checking of the manuscript for plagiarism;
- any potential conflicts of interest were disclosed.

With this, the authors agree to transfer property rights (copyright) to the Moldovan Journal of Health Sciences, in the event that the manuscript will be published.

**Authors (name, surname, signature):**

1. \_\_\_\_\_
2. \_\_\_\_\_
3. \_\_\_\_\_
4. \_\_\_\_\_
5. \_\_\_\_\_
6. \_\_\_\_\_
7. \_\_\_\_\_

Place and date: \_\_\_\_\_

**Corresponding author data:**

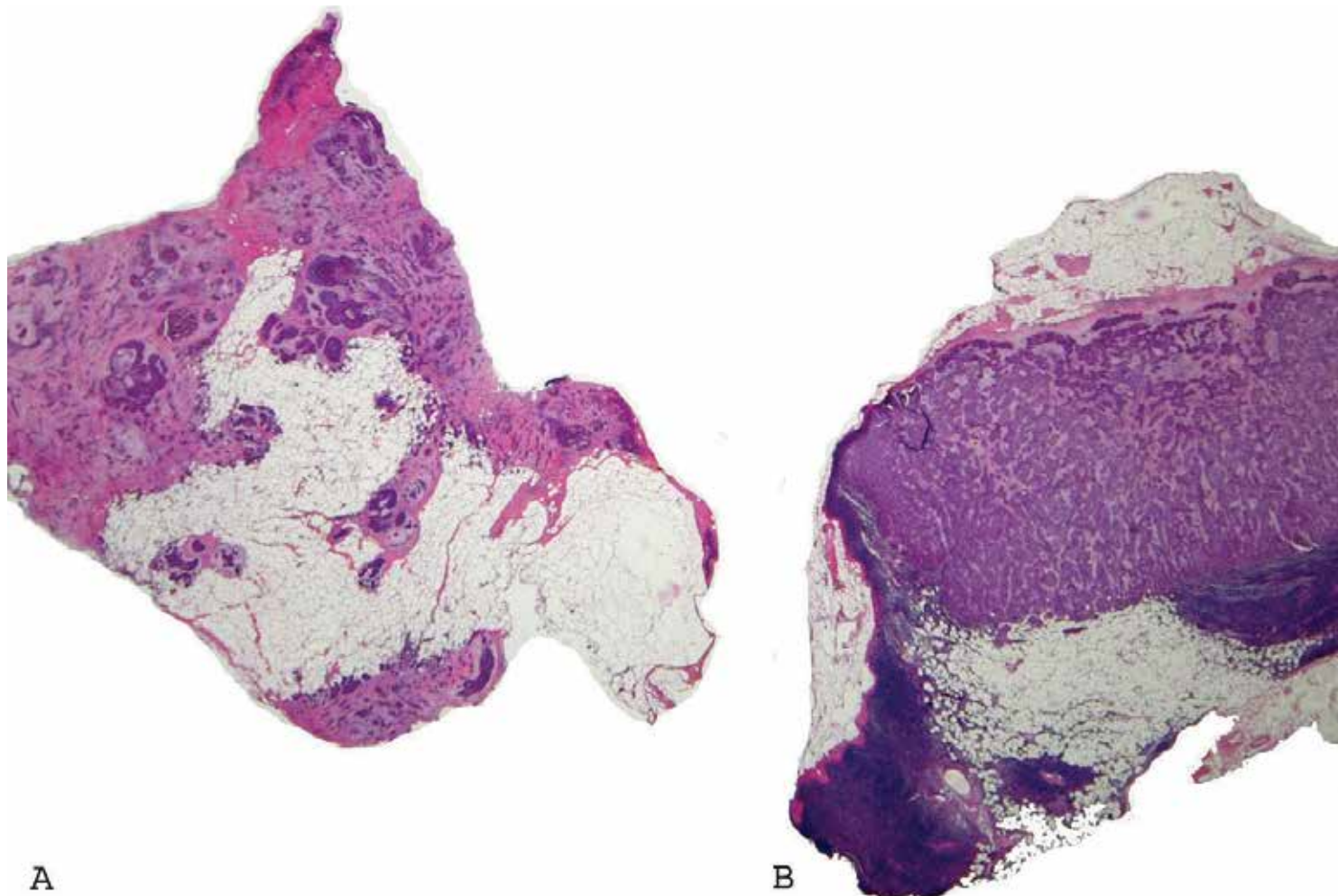
Institution: \_\_\_\_\_

Address: \_\_\_\_\_

e-mail: \_\_\_\_\_

tel./fax.: \_\_\_\_\_

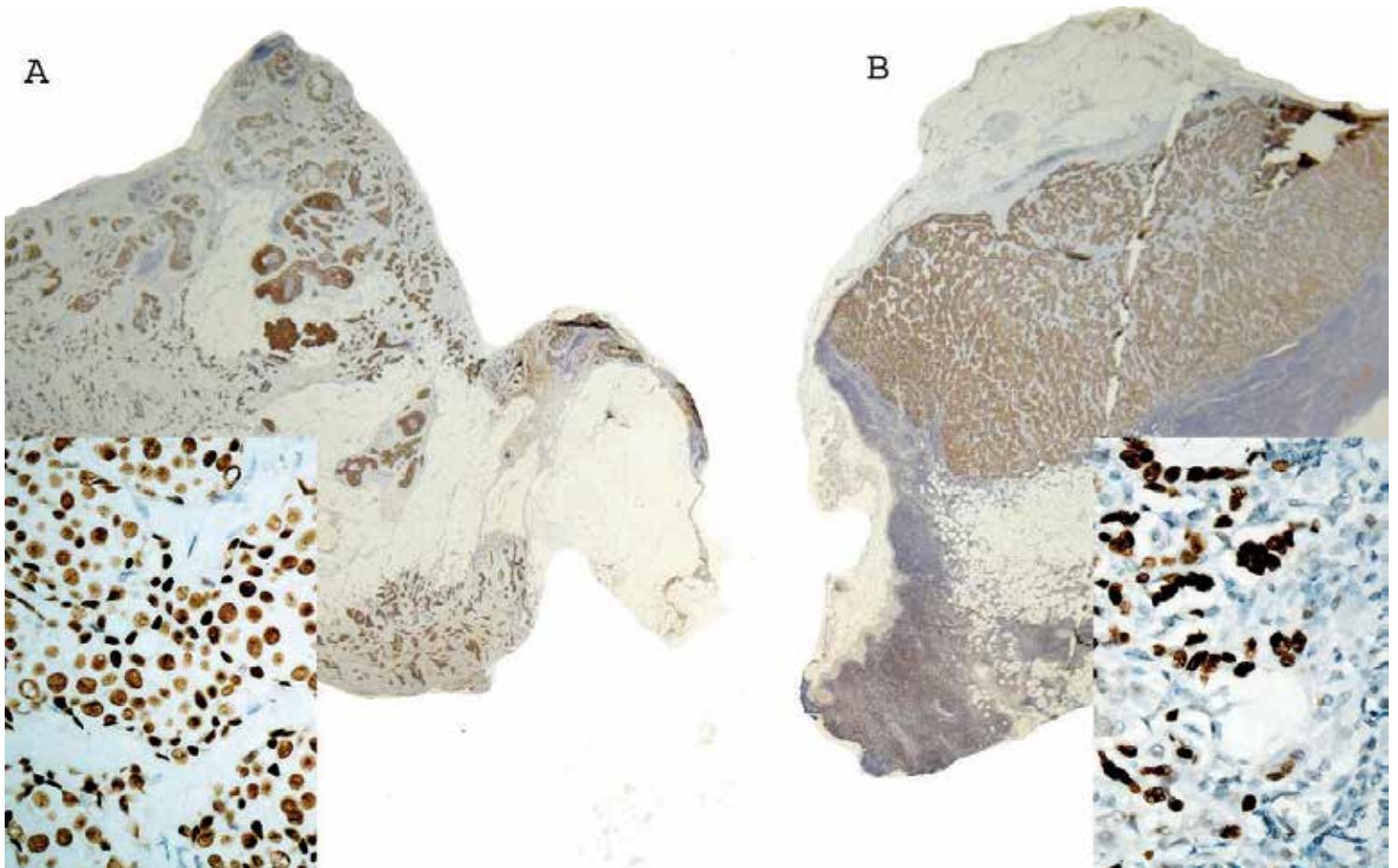
Please, send this filled page to the Editor



**Fig. 1**

Carcinom mamar invaziv de tip NOS. Tumora primară (A) și LNM (B) procesate pe aceeași lamă histologică. HE, x10

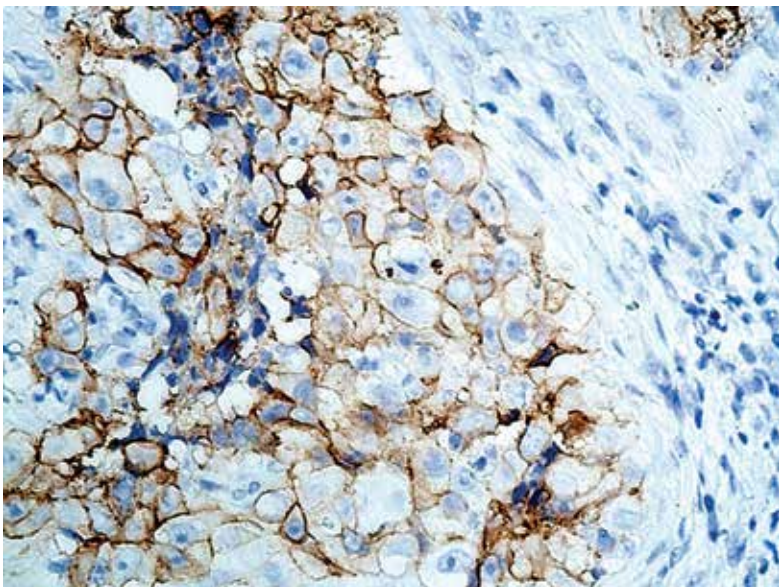
*Breast carcinoma NOS type. Primary tumor (A) and its LNM (B) processed on the same slide. HE, x10*



**Fig. 2**

Carcinom mamar invaziv de tip NOS, G2. Tumora primară (A) și LNM (B) marcate cu anticorp ER/6F11 pe aceeași lamă; x10 și x400 (colțuri jos). Tumoarea a fost evaluată drept ER+ în ambele localizări.

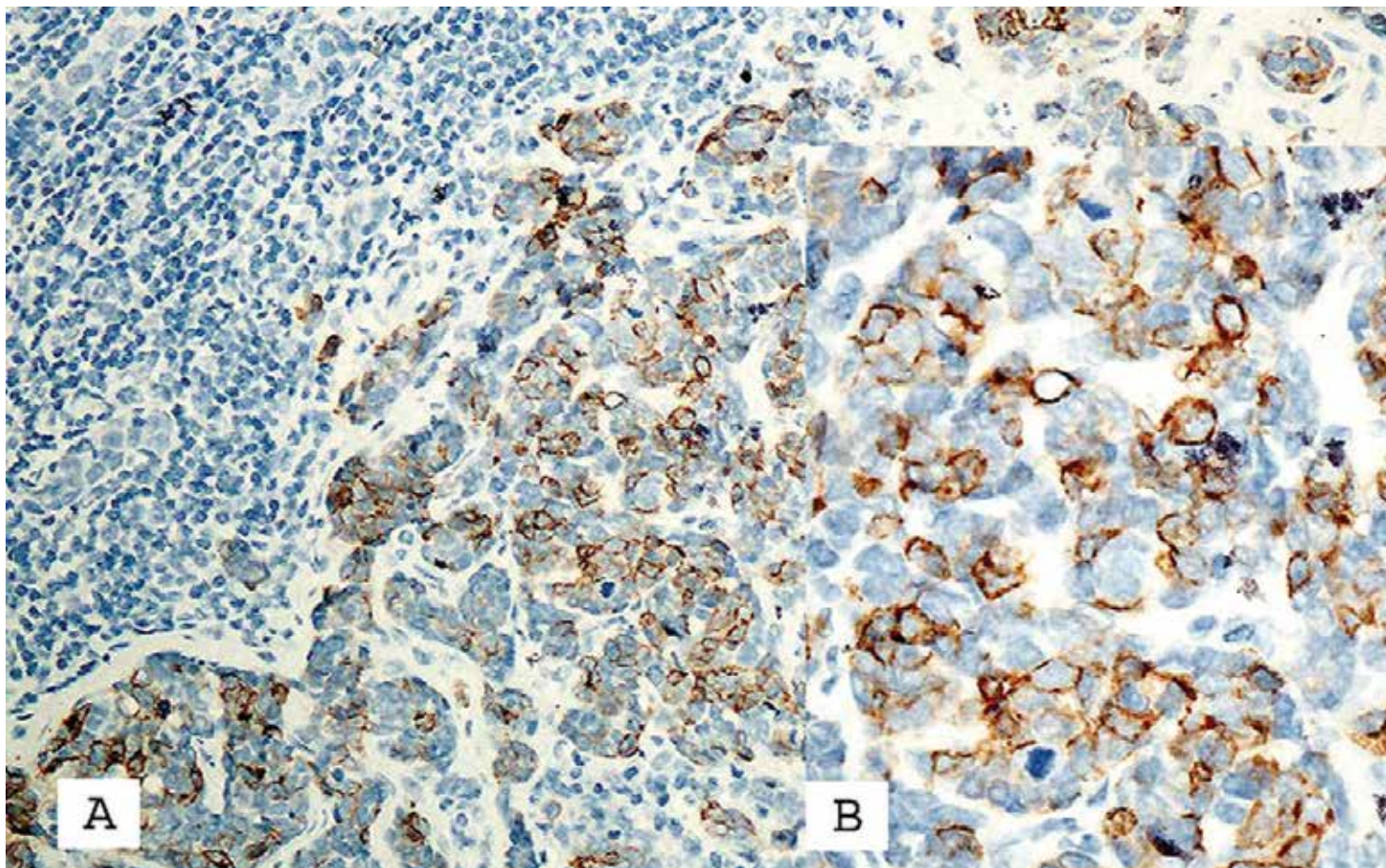
*Breast carcinoma NOS type, G2. Primary tumor (A) and its LNM (B) marked with ER/6F11 antibody on the same slide; x10 and x400 (bottom corners). Tumor was considered as ER+ at both sites.*



**Fig. 3**

Carcinom mamar invaziv de tip NOS, G3, scor "+3" pentru markerul Her2/neu, x400.

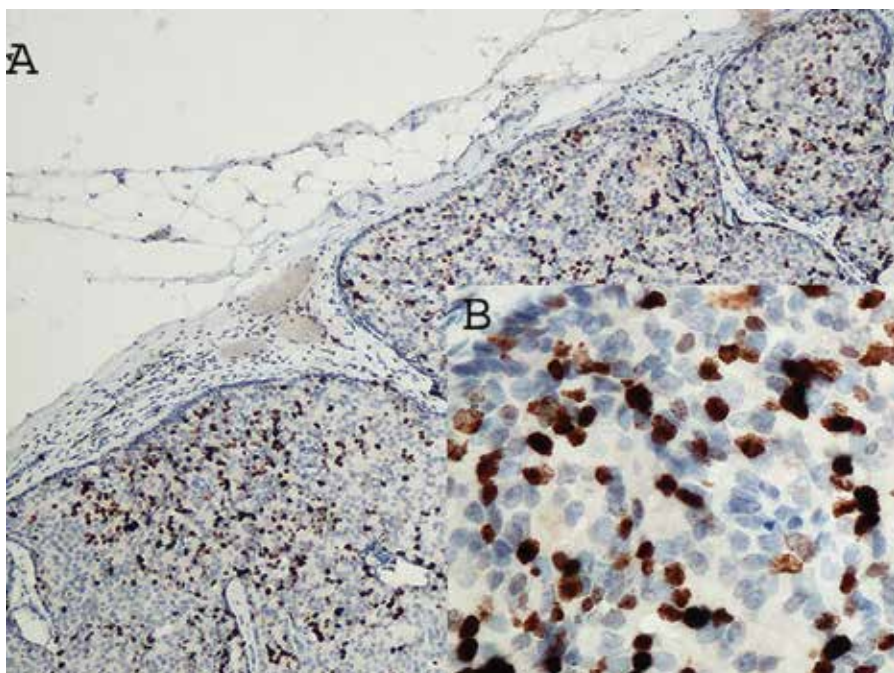
*Invasive breast carcinoma, NOS type, G3, scored as "+3" for Her2/neu marker, x400.*



**Fig. 4**

Metastază limfonodală a carcinomului mamar invaziv de tip NOS, G3, colorat pentru identificarea citokeratinei bazale CK5/XM26. A, x100; B, x400. Tumora a fost evaluată ca "+3" pentru CK5.

*Lymph node metastasis of invasive breast carcinoma NOS type, G3, stained for basal cytokeratin CK5/XM26. A, x100; B, x400. Tumor was evaluated as "+3" for CK5.*



**Fig. 5**

Metastază limfonodală a carcinomului mamar invaziv de tip NOS, G2 marcată cu anticorp Ki67/K2, x100 (A) și x400 (B). Metastaza a fost evaluată drept una cu indice de proliferare înaltă (Ki67=30%).

*Lymph node metastasis of breast carcinoma NOS type, G2, marked with Ki67/K2 antibody, x100 (A) and x400 (B). Metastasis was considered as a high proliferative one (Ki67>30%).*

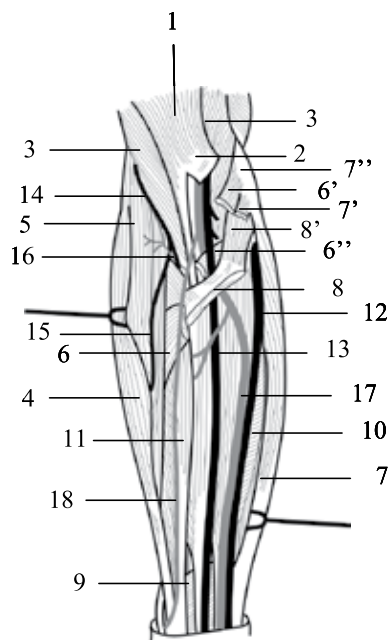


Fig. 1

## Regiunea antebrațială anterioară [8]

1. M. biceps brachialis. 2. Aponeurosis m. bicipitis brachii . 3. M. brachialis. 4. M. brachioradialis. 5. M. extensor carpi radialis longus. 6. M. pronator teres. 6'. M. pronator teres (caput humerale). 6''. M. pronator teres (caput ulnare). 7. M. flexor carpi ulnaris. 7'. M. flexor carpi ulnaris (caput humerale). 7''. M. flexor carpi ulnaris (caput ulnare). 8. M. flexor digitorum superficialis. 8'. M. flexor digitorum superficialis (caput humero-ulnare). 9. M. pronator quadratus. 10. M. flexor digitorum profundus. 11. M. flexor pollicis longus. 12. N. ulnaris. 13. N. medianus. 14. N. radialis. 15. N. radialis (r. superficialis). 16. N. radialis (r. profundus). 17. A. ulnaris 18. A. radialis.

## Ventral antebrachial region [8]

1. M. biceps brachialis. 2. Aponeurosis m. bicipitis brachii . 3. M. brachialis. 4. M. brachioradialis. 5. M. extensor carpi radialis longus. 6. M. pronator teres. 6'. M. pronator teres (caput humerale). 6''. M. pronator teres (caput ulnare). 7. M. flexor carpi ulnaris. 7'. M. flexor carpi ulnaris (caput humerale). 7''. M. flexor carpi ulnaris (caput ulnare). 8. M. flexor digitorum superficialis. 8'. M. flexor digitorum superficialis (caput humero-ulnare). 9. M. pronator quadratus. 10. M. flexor digitorum profundus. 11. M. flexor pollicis longus. 12. N. ulnaris. 13. N. medianus. 14. N. radialis. 15. N. radialis (r. superficialis). 16. N. radialis (r. profundus). 17. A. ulnaris 18. A. radialis.



Fig. 3

Abordul chirurgical al regiunii antebrațiale anterioare (Colecția IBCV Iași)

Surgical approach to the ventral antebrachial region (IBCV Iasi collection)

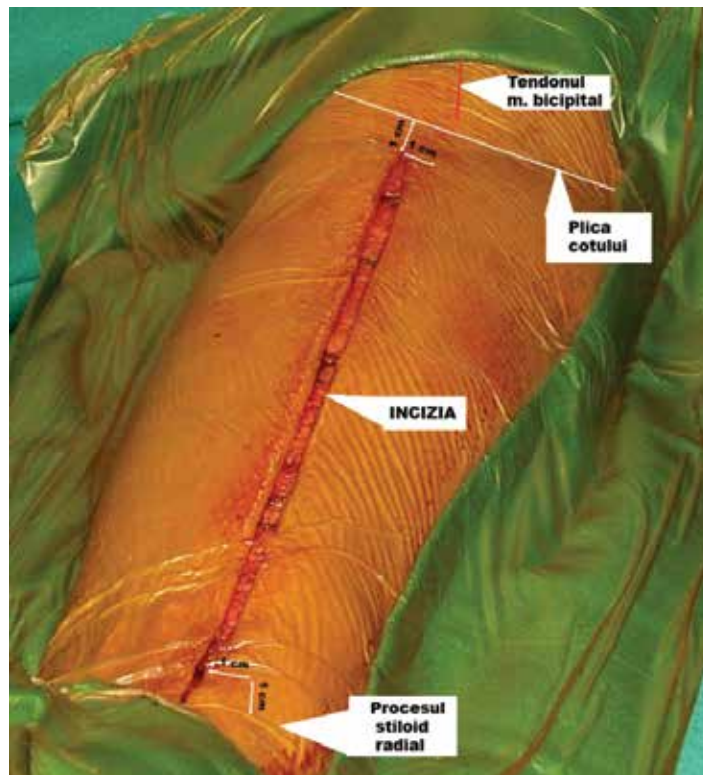


Fig. 2

Incizia antebrațială anterioară (Colecția IBCV Iași)

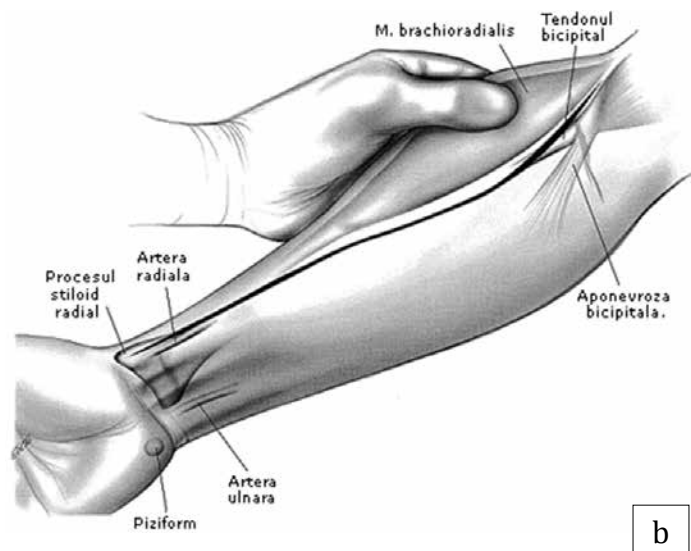
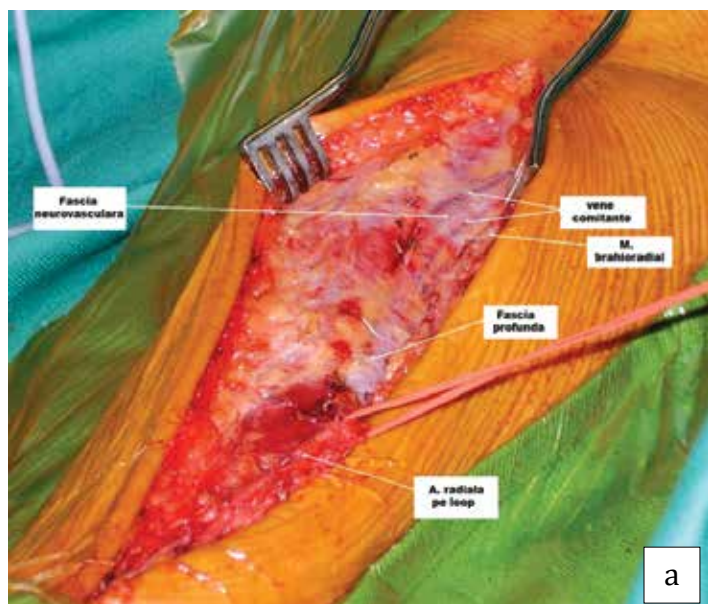
Surgical incision (IBCV Iasi collection)



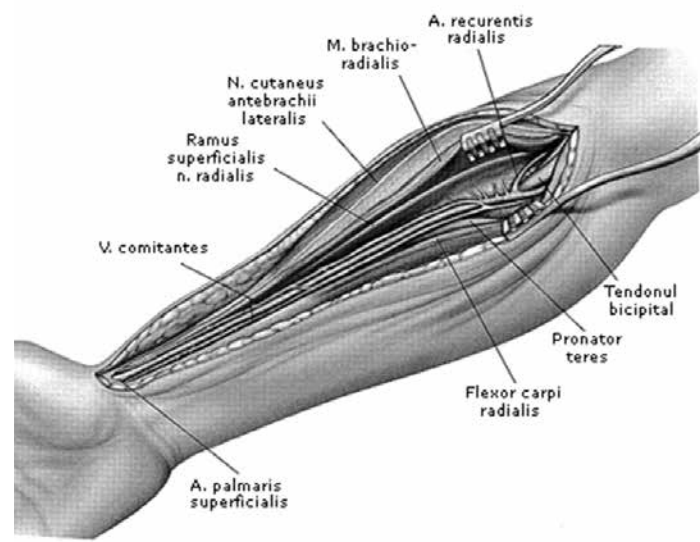
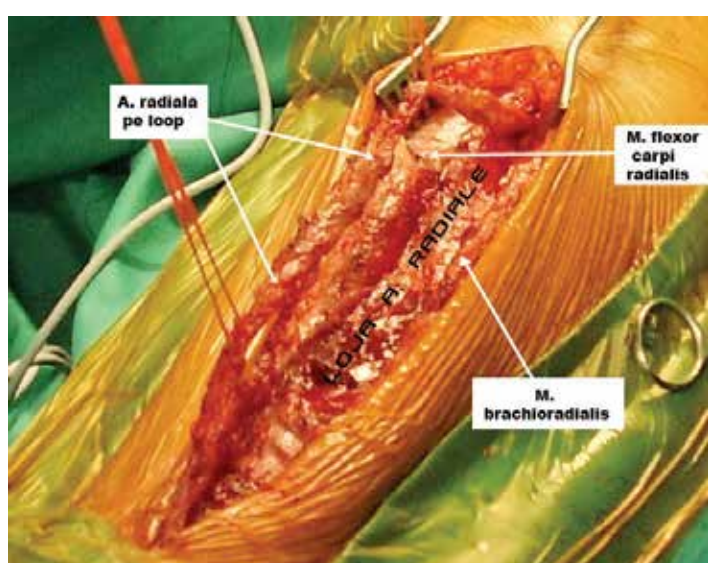
Fig. 4

Evidențierea fasciei antebrațiale anterioare (Colecția IBCV Iași)

Superficial dissection of the ventral antebrachial region (IBCV Iasi collection)



**Fig. 5**  
 Disecția pachetului vasculo-nervos radial: **a)** evidențierea intraoperatorie a pachetului vasculonervos radial (colecția IBCV Iași); **b)** schiță anatomică [19]  
*Dissection of the radial neurovascular bundle (anterior view): a) surgical aspect (IBCV Iasi collection); b) anatomical drawing [19]*



**Fig. 6**  
 Traiectul arterei radiale cu raporturile anatomice adiacente **a)** etalarea intraoperatorie a arterei radiale (colecția IBCV Iași); **b)** schiță anatomică [19]  
*Exhibition of the course of the radial artery a) surgical aspect (IBCV Iasi collection); b) anatomical drawing [19]*





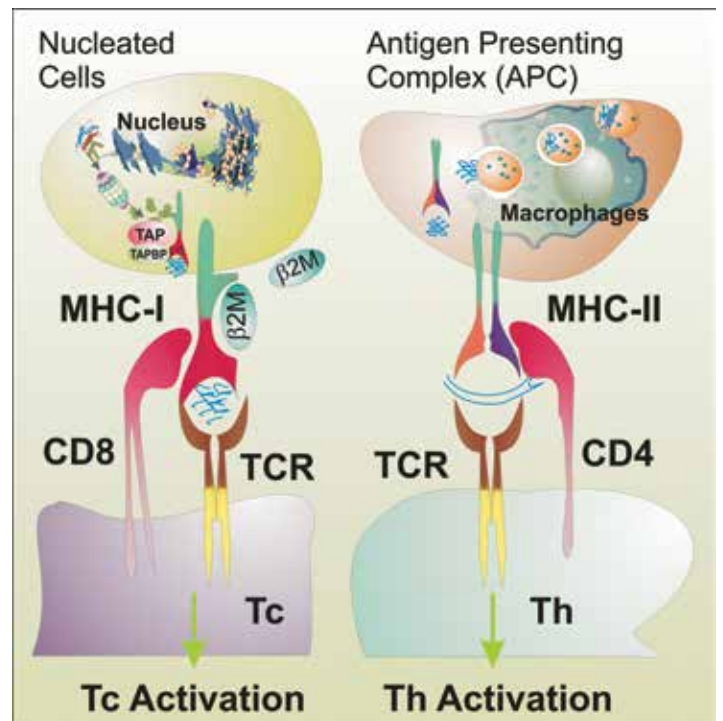
**Fig. 7**  
Scheletizarea arterei radiale (colecția IBCV Iași)  
*Skeletonized radial artery (IBCV Iasi collection)*



**Fig. 8**  
Situsul operator după recoltarea arterei radiale (colecția IBCV Iași)  
*Surgical site after harvesting (IBCV Iasi collection)*



**Fig. 9**  
Închiderea plăgii operatorii (colecția IBCV Iași)  
*Closure of the harvesting site (IBCV Iasi collection)*



**Fig. 2**

#### Activarea celulelor T efectoare MHC-I & II.

În celulele nucleate, trimerul de lanț  $\alpha$  al MHC-I leagă peptidele străine în reticulul endoplasmatic (ER) și este secretat în citosol unde lanțul  $\beta 2M$  se atașează de lanțul  $\alpha$ . Complexul HLA încărcat de clasa I este recunoscut de celulele T CD8+ și activează răspunsul celulelor T citotoxice (Tc). În APC (macrofage), peptidele se unesc de peptidele lezate și sunt exportate în citosol, unde HLA de clasa II este recunoscută de celulele T CD4+ T și inițiază activarea celulelor T ajutoare (Th).

#### Activation of MHC I & II effector T-cells.

In nucleated cells, the  $\alpha$ -chain trimer of MHC-I binds the foreign peptide in endoplasmic reticulum (ER) and is secreted into cytosol where the  $\beta 2M$  chain attaches to the  $\alpha$ -chain. The loaded HLA class I complex is recognized by CD8+ T-cells and activates the cytotoxic T-cell (Tc) response. In APC (i.e. macrophages), the peptide binds to the lysed peptide and is exported into the cytosol where the HLA class II is recognized by CD4+ T cells and initiates the helper T-cell (Th) activation.

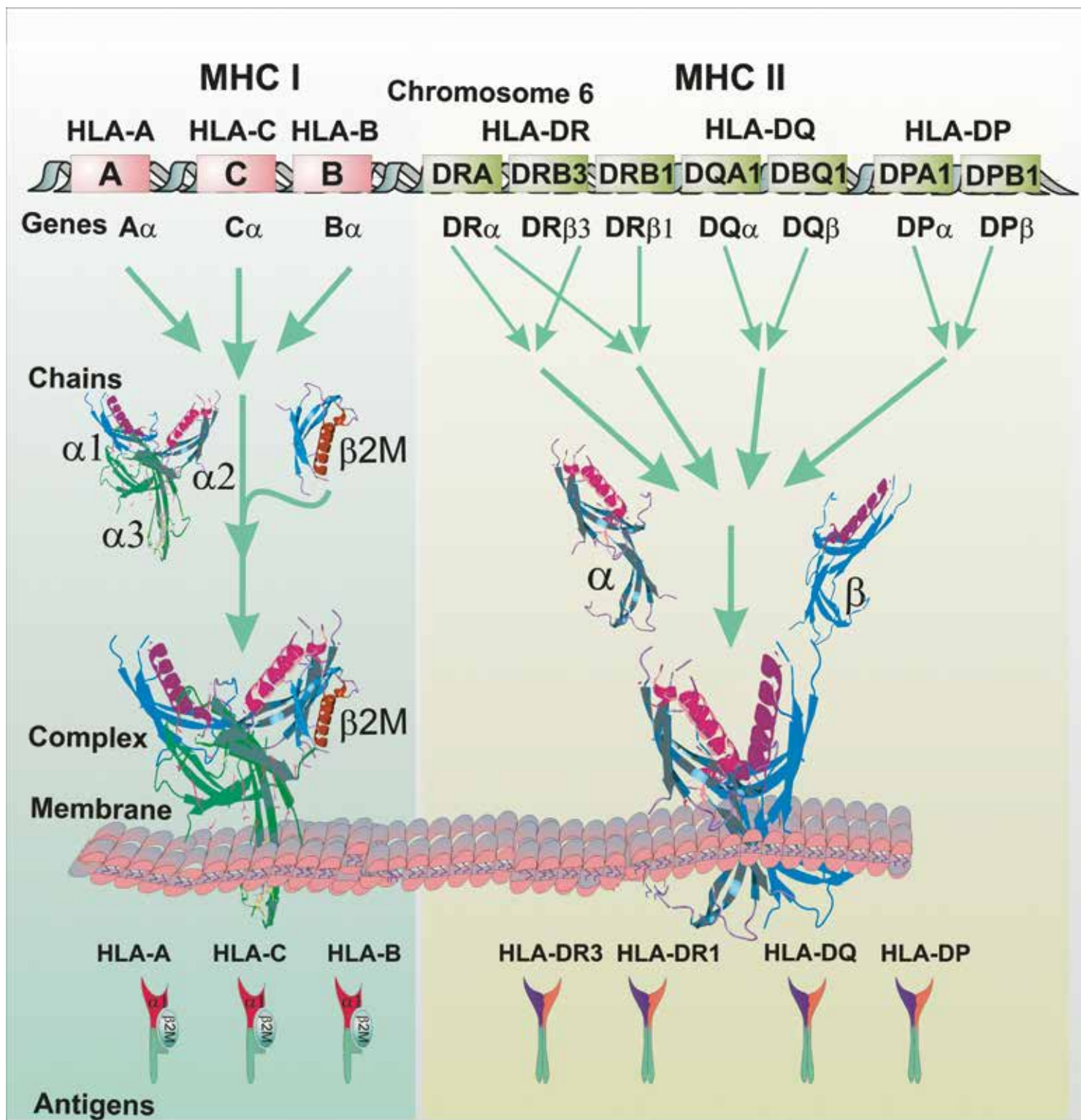


Fig. 1

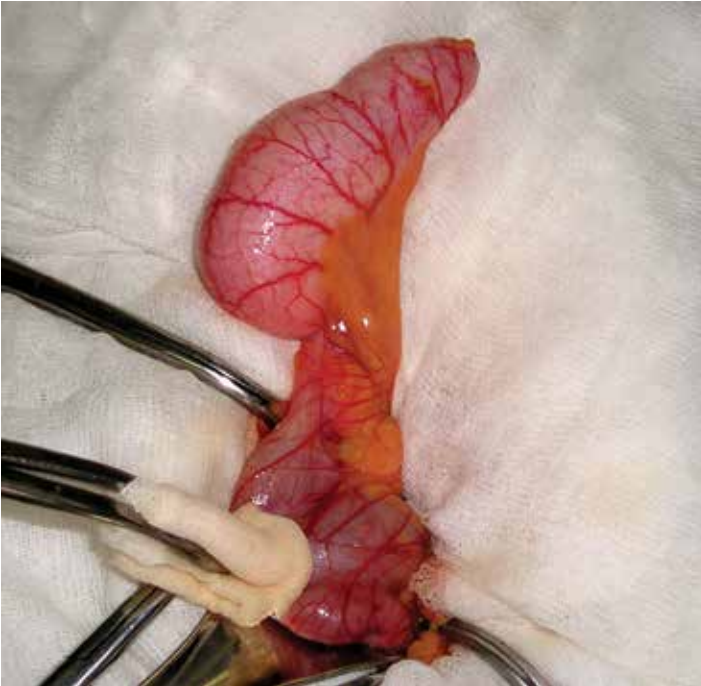
**Localizare genomică, diversitatea și structura MHC.**

Genele MHC de clasa I și clasa II sunt localizate pe brațul scurt al cromosomului 6 (6p21.3) la oameni și declanșează creșterea tuturor proteinelor HLA de bază. MHC-I constă dintr-un trimer transmembranar de lanțuri grele  $\alpha$  și un lanț ușor *non*-transmembranar  $\beta 2$ -microglobulin ( $\beta 2M$ )

**Genomic location, diversity, and structure of MHC**

MHC class I and class II genes are located on the short arm of chromosome 6 (6p21.3) in humans and give rise to all core HLA proteins.

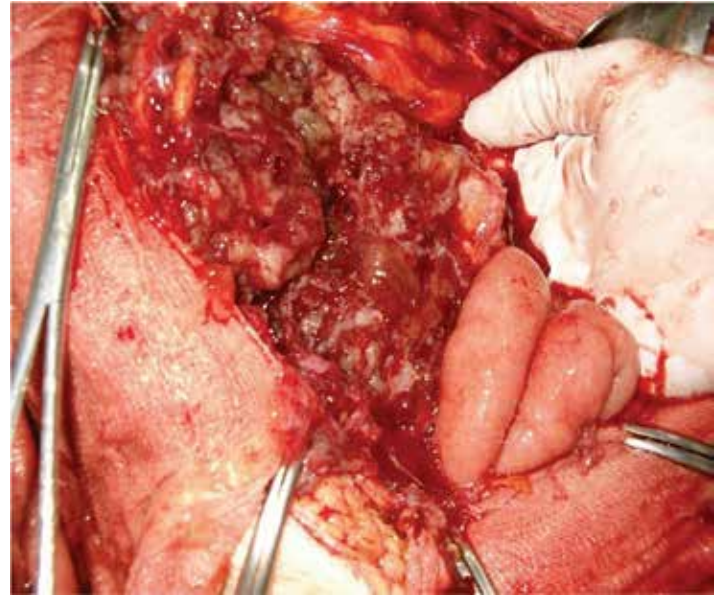
MHC-I consists of a transmembrane  $\alpha$ -chain trimer and a non-transmembrane  $\beta 2M$  light chain, while MHC-II is a dimer of class II  $\alpha$  &  $\beta$  chains, both transmembrane proteins.



**Fig. 1**

Imagine intraoperatorie: mucocele apendicular simplu

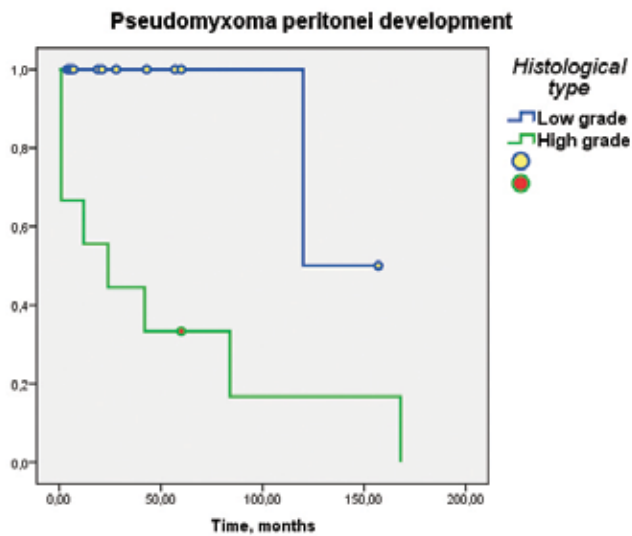
*Intraoperative view: simple appendiceal mucocele*



**Fig. 2**

Imagine intraoperatorie: pseudomixom peritoneal cu component mucinos și implante solide pe oment

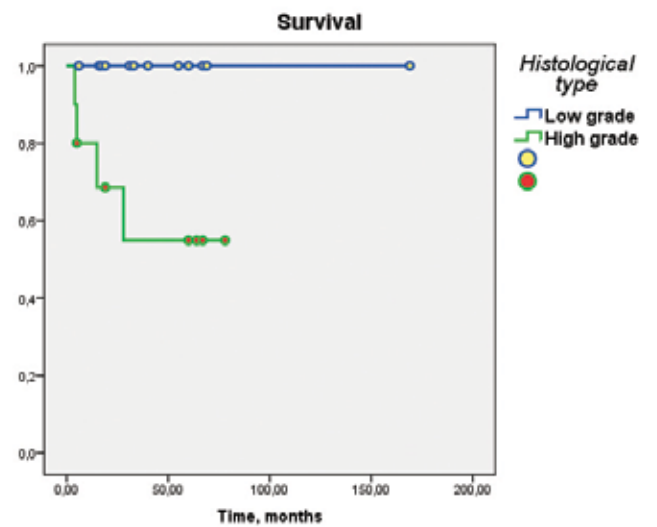
*Intraoperative view: pseudomyxoma peritonei with mucinous component and solid implants on the greater omentum*



**Fig. 3**

Prognostarea dezvoltării pseudomixomului peritoneal în funcție de tipul histologic al neoplasmului apendicular

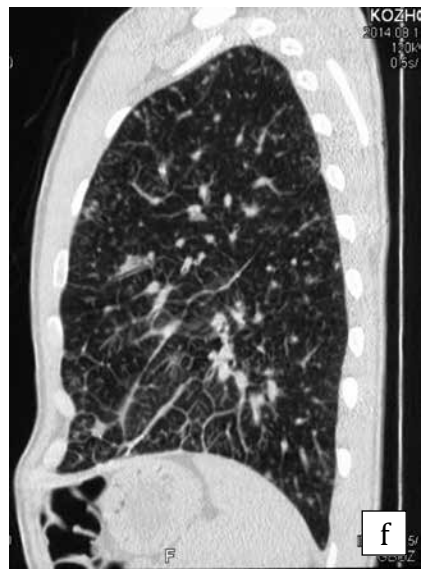
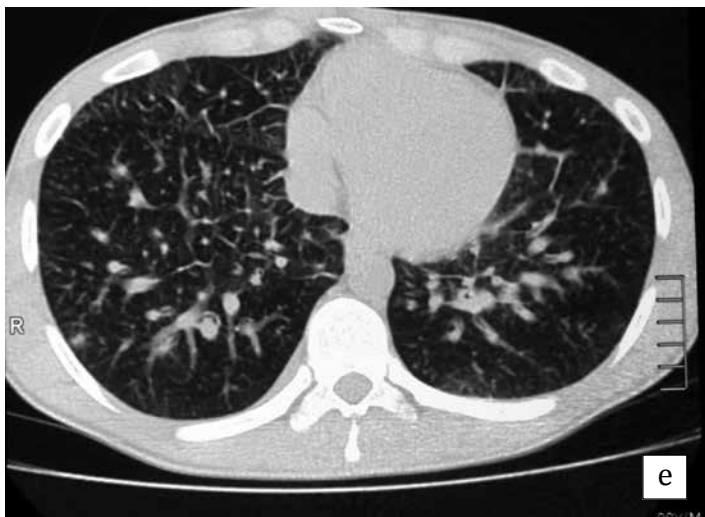
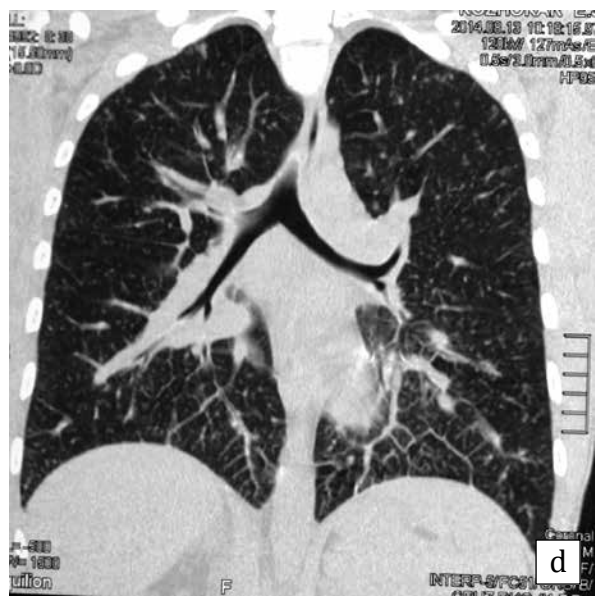
*Prognosis of PMP development depending on the histological type of the appendiceal neoplasm*



**Fig. 4**

Prognostarea supraviețuirii în funcție de tipul histologic al neoplasmului apendicular

*Survival prognosis depending on the histological type of the appendiceal neoplasm*



**Fig. 1**  
Leziuni pulmonare în asociere cu macule melanocitice cutanate (a, b – modificări cutanate; c, d, e, f – tabloul imagistic)  
*Pulmonary changes associated with cutaneous melanin pigmentation (a, b – cutaneous modifications; c, d, e, f – imagistic presentation)*

## IN MEMORIAM



75 de ani

## LEONID COBÂLEANSCHI – UN MODEL DE MODESTIE EXEMPLARĂ ȘI BOGĂȚIE SUFLETEASCĂ

În luna octombrie 2014, profesorul universitar Leonid Cobâleanschi – eminent pedagog, Om de știință, organizator iscusit și patriot – ar fi sărbătorit aniversarea de 75 de ani de la naștere. Născut în satul Baraboi, a fost lipsit de tată din copilărie, dar iubit și crescut de mamă, care l-a educat să fie harnic, decis și plin de o aleasă Omenie.

L-am cunoscut pe profesorul Leonid Cobâleanschi în anul 1963, pe vremea când acesta, fiind un student sârguincios și capabil, se străduia să pătrundă enigmaticele medicinei, participând activ atât în viața obștească, cât și în cerul științific studentesc al Catedrei de fiziopatologie.

Disponând de calități de analiză și sinteză, dublate de o rară voință de cercetare, a desfășurat o activitate științifică prodigioasă în problema șocului traumatic.

Rezultatele științifice obținute de către profesorul universitar Leonid Cobâleanschi și colaboratorii lui au elucidat aspecte patogenetice, anterior necunoscute, ale bolii traumatice. Studiul rolului peroxidării lipidelor și enzimelor lizosomale în cadrul reacției de stres, induse de trauma mecanică gravă au lărgit semnificativ orizontul cunoștințelor teoretice din domeniu. Cercetările din domeniul menționat le-au continuat cu succes elevii profesorului Cobâleanschi – I. Cavdari, V. Gafencu, E. Bors, A. Derbențev, S. Todiraș, A. Vișnevschi și C. Hangan.

Leonid Cobâleanschi a urcat cu demnitate toate treptele ierarhiei pedagogice: asistent, lector superior, conferențiar, doctor habilitat în științe medicale, profesor universitar, șef de Catedră de fiziopatologie. Om emerit în știință, distins cu Premiul de Stat în domeniul științei și tehnicii al Republicii Moldova, Membru de onoare al Academiei de Științe din România. În perioada anilor 1986-1994, dl Cobâleanschi a fost Rector al Universității de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu".

Pentru mulți dintre noi Leonid Cobâleanschi a fost și va rămâne în memoria noastră ca un model de conduită, un Om de o modestie exemplară și de o bogăție sufletească remarcabilă.

El a știut să ofere totul, fără să aștepte nimic în schimb.

Porfirie Cazacu,  
dr. șt. med., profesor universitar

The 75th anniversary

## LEONID COBÂLEANSCHI – A MODEL OF EXEMPLARY MODESTY AND SPIRITUAL WEALTH

In October 2014 Professor Leonid Cobâleanschi - eminent teacher, scientist, patriot and skilled manager - would be celebrated the 75th anniversary. He was born in Baraboi village. During the childhood he lost his father, being grown up by his mother who loved him so much, and educated him to be diligent, strong-minded and full of exquisite humanity.

I met Professor Leonid Cobâleanschi in 1963, in that time he was a painstaking and promising student, struggling to discover medical enigmas, actively participating both in social life and in student's scientific club at the Department of pathophysiology.

Endorsed with analyze and synthesis qualities and enforced by a rare research wish he conducted prodigious scientific activity in traumatic shock field.

Scientific results obtained by Professor Leonid Cobâleanschi and his collaborators elucidated pathogenic aspects of trauma injuries unknown before. Study of the role of lipid and liposomal enzymes peroxidation in the stress response induced by severe mechanical trauma significantly broadened the horizon of theoretical knowledge in this field. His disciples - I. Cavdari, V. Gafencu, E. Bors, A. Derbențev, S. Todiraș, A. Vișnevschi and C. Hangan - successfully continued researches of professor Cobâleanschi.

Leonid Cobâleanschi rose with dignity all educational hierarchy steps: assistant, superior lecturer, associate professor, philosophy doctor, professor, head of Chair of pathophysiology. He was Emeritus Man in Science, awarded the State Prize in science and technology of the Republic of Moldova, also - Honorary Member of the Academy of Sciences of Romania. During 1986-1994, Mr. Cobâleanschi was Rector of the State University of Medicine and Pharmacy "Nicolae Testemițanu".

For many of us, Leonid Cobâleanschi was and will remain in our memory as model of conduct, a man of exemplary modesty and remarkable spiritual rich.

He knew how to give all, without expecting anything in return.

Porfirie Cazacu,  
PhD, university professor