



UNIVERZITET U BANJOJ LUCI
MEDICINSKI FAKULTET



Sanja Jovičić

**HEMATOPOETSKE MATIČNE ĆELIJE U HUMANIM
POSTELJICAMA RAZLIČITE STAROSTI-
IMUNOHISTOHEMIJSKO I MORFOMETRIJSKO
ISTRAŽIVANJE
DOKTORSKA DISTERTACIJA**

Banja Luka, 2025. godina



UNIVERSITY OF BANJA LUKA
FACULTY OF MEDICINE



Sanja Jovičić

**HEMATOPOIETIC STEM CELLS IN HUMAN
PLACENTAS OF DIFFERENT AGES -
IMMUNOHISTOCHEMICAL AND MORPHOMETRIC
STUDY**

DOCTORAL DISSERTATION

Banja Luka, 2025. godina

Mentor: Prof. dr Ivan R. Nikolić, redovni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu.

Komentor: Prof. dr Vesna Ljubojević, redovni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Banjoj Luci.

Naslov doktorske disertacije: Hematopoetske matične ćelije humane posteljice različite starosti-imunohistohemijsko i morfometrijsko istraživanje.

Sažetak: Posteljica (placenta) je privremeni ekstraembrionalni organ koji se razvija u maternici trudnice s ciljem uspostavljanja dijelotvorne razmjene materija između majke i ploda. Za vrijeme intrauterinog života obavlja mnogobrojne funkcije koje imaju za cilj normalan rast i razvoj embriona i fetusa. Jedna od tih uloga je i prenatalna hematopoeza. Nejasno je da li posteljica ima sposobnost sinteze hematopoetskih matičnih ćelija (HSC) ili predstavlja tranzitornu nišu za proliferaciju i diferencijaciju hematopoetskih matičnih ćelija koje nastaju na drugim hematopoetskim mjestima. U istraživanju smo koristili pet markera za detekciju HSCs ćelija: CD34, CD45, CD117, CD41 i CD38. Analizirali smo prisustvo i raspored HSCs ćelija u uzorcima humanih posteljica iz različitih perioda gestacije. Morfometrijskim metodama smo izračunali koncentraciju HSCs ćelija u svim uzorcima. Uzorke smo podjelili u tri grupe koje su predstavljale prvi, drugi i treći trimestar. Imunoreaktivne CD34 i CD45 HSC su prisutne u humanim posteljicama tokom čitave gestacije, dok su imunoreaktivne CD117 i CD41 HSC prisutne u ograničenom periodu gestacije. Najbrojnije su u lumenu krvnih sudova, gdje ostvaruju blizak kontakt sa endotelom krvnih sudova, a nalazimo ih kao pojedinačne ćelije u stromi horionske ploče i horionskih resica. Imunoreaktivne CD41 HSCs ćelije predstavljaju native HSCs ćelije koje sintetiše posteljica. CD38 je marker nezrelih HSC ćelija, ali populacija imunoreaktivnih CD38 ćelija nije detektovana u našim uzorcima. Posteljica je bogat izvor hematopoetskih matičnih ćelija različitih profila i fenotipova koji su u njoj prisutne tokom čitave gestacije. Naši rezultati potvrđuju da posteljica ima dvojaku ulogu u prenatalnoj hematopoezi, da ona produkuje rezidentne HSCs ćelije i da predstavlja privremenu nišu za tranzitorne HSCs ćelije koje u posteljicu dolaze sa drugih hematopoeskih mjesta. HSCs su prisutni u različitim odeljcima posteljice i njihova lokalizacija i koncentracija podliježe dinamičkim promjenama tokom gestacije.

Ključne riječi: Posteljica, prenatalna hematopoeza, hematopoetske matične ćelije.

Naučna oblast: Medicinske i zdravstvene nauke

Naučno polje: Medicinske nauke

Uža naučna oblast: Citologija, histologija i embriologija

Klasifikaciona oznaka za naučnu oblast prema CERIF šifrniku: B210

Tip odabrane licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za način korišćenja sadržaja doktorske disertacije: Autorstvo-nekomercijalno-dijeliti pod istim uslovima.

Mentor: Prof. Dr. Ivan R. Nikolić, full professor, Faculty of Medicine, University of Niš.

Commentator: Prof. Dr. Vesna Ljubojević, full professor, Faculty of Medicine, University of Banja Luka.

Title of doctoral dissertation: Hematopoietic stem cells of human placenta of different ages - morphometric and immunohistochemical research

Summary: The placenta is a temporary extraembryonic organ that develops in the uterus of a pregnant woman to establish effective exchange of substances between the mother and the fetus. During intrauterine life, it performs numerous functions aimed at ensuring normal growth and development of the embryo and fetus. One of these roles is prenatal hematopoiesis. It remains unclear whether the placenta has the ability to synthesize hematopoietic stem cells (HSCs) or if it serves as a transient niche for the proliferation and differentiation of hematopoietic stem cells originating from other hematopoietic sites.

In our study, we used five markers to detect HSCs: CD34, CD45, CD117, CD41, and CD38. We analyzed the presence and distribution of HSCs in human placenta samples from different stages of gestation. Using morphometric methods, we calculated the concentration of HSCs in all samples. The samples were divided into three groups representing the first, second, and third trimesters. Immunoreactive CD34 and CD45 HSCs were present in human placentas throughout gestation, whereas immunoreactive CD117 and CD41 HSCs were detected only during specific periods of gestation.

These cells were most abundant in the lumen of blood vessels, where they maintain close contact with the endothelium, and were also found as individual cells in the stroma of the chorionic plate and chorionic villi. Immunoreactive CD41 HSCs represent native HSCs synthesized by the placenta. CD38 is a marker of immature HSCs; however, the population of immunoreactive CD38 cells was not detected in our samples.

The placenta is a rich source of hematopoietic stem cells with diverse profiles and phenotypes present throughout gestation. Our results confirm that the placenta has a dual role in prenatal hematopoiesis: it produces resident HSCs and serves as a temporary niche for transient HSCs that migrate to the placenta from other hematopoietic sites. HSCs are present in different compartments of the placenta, and their localization and concentration undergo dynamic changes throughout gestation

Keywords: Placenta, Prenatal hematopoiesis, Hematopoietic stem cells

Scientific field: Medical and health sciences

Scientific field: Medical sciences

Narrower scientific field: Cytology, histology and embryology

Classification code for the scientific field according to the CERIF codebook: B210

Type of selected license of the Creative Commons (Creative Commons) for the way of using the contents of the doctoral dissertation: Authorship-non-commercial-share under the same conditions.

Zahvalnica

Iskreno zahvaljujem svom mentoru, prof. dr Ivanu Nikoliću, na nesebičnoj podršci, stručnom vođenju, korisnim savjetima i velikom strpljenju tokom izrade ovog rada. Njegovo znanje, iskustvo i posvećenost bili su od neprocjenjive pomoći u svim fazama istraživanja i pisanja.

Takođe, želim izraziti zahvalnost komentoru, prof. dr Vesni Ljubojević, na korisnim sugestijama koje su značajno doprinijele kvalitetu završnog rada.

Posebnu zahvalnost upućujem prof. dr Ljiljani Amidžić, na nesebičnoj pomoći i podršci oko odabira odgovarajućih materijala koji su bili neophodni za sprovođenje istraživanja i uključenosti u sav proces rada.

Dr Sanji Dimitrašinić, iz Zavoda za patologiju Univerzitetskog kliničkog centra Republike Srpske, na dragocjenoj pomoći tokom cijelog procesa uzorkovanja i odabira materijala za potrebe istraživanja, kao i koleginci dr Ljiljani Božić na nesebičnoj pomoći pri obradi prikupljenih podataka. Njihova stručnost, savjeti i posvećenost bili su od izuzetnog značaja za realizaciju ovog rada.

Zahvalna sam i svojim kolegama i prijateljima koji su mi pružali moralnu podršku, dijelili iskustva i motivisali me tokom cijelog procesa. Bez vas ovaj rad ne bi bio moguć. Hvala vam!

Istraživanje je realizovano i finansirano sredstvima Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci (Laboratorija za histologiju i biologiju ćelije), a dijelom iz projekta Medicinskog fakulteta u Nišu kojeg finansira Ministarstvo nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije (koordinator: prof. dr Ivan Nikolić; br. ugovora 451-03-137/2025-03/200113). Istraživanja su sprovedena i u okviru projekta Ogranka SANU u Nišu pod nazivom: 039-25 Embriologija čoveka i kongenitalne anomalije: histološka, imunohistohemijska, morfometrijska, klinička i eksperimentalna istraživanja ćelija, tkiva i organa embriona i fetusa i ekstraembrionalnih struktura (koordinator projekta: akademik Vladimir Kanjuh; rukovodilac projekta: prof. dr Ivan Nikolić).

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. RAZVOJ, GRAĐA I FUNKCIJA POSTELJICE	1
1.1.1. Razvoj posteljice	2
1.1.2. Građa posteljice	8
1.1.3. Posteljična barijera	12
1.1.4. Funkcija posteljice.....	13
1.2. HEMATOPOEZA	14
1.2.1. Ekstraembrionalna hematopoeza.....	16
1.2.1.1. Primitivna hematopoeza (prvi talas hematopoeze)	16
1.2.1.2. Definitivna hematopoeza nezavisna od HSCs (drugi talas hematopoeze).....	17
1.2.2. Intraembrionalna hematopoeza	18
1.2.2.1. Definitivna hematopoeza zavisna od HSCs (treći talas hematopoeze).....	18
1.2.2.1.1. Uloga posteljice u hematopoezi.	20
1.3. IMUNOHISTOHEMIJSKI MARKERI HEMATOPOETSКИH MATIČNIH ĆELIJA	22
1.3.1. CD34	22
1.3.2. CD117 (c-kit).	22
1.3.3. CD90 (Thy-1).....	23
1.3.4. CD133.	23
1.3.5. CD41.	23
1.3.6. CD38.	24
1.3.7. CD45 (Ly-5).....	24
2. RADNA HIPOTEZA	25
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	26
4. MATERIJAL I METODE	27
4.1. MATERIJAL	27

4.1.1. Uzorkovanje materijala	27
4.1.2. Obrada materijala	28
4.2. METODE	29
4.2.1. Klasično bojenje hematoksilinom i eozinom	29
4.2.2. Imunohistohemijsko bojenje	29
4.2.3. Morfometrijska analiza	31
4.2.4. Statistička analiza	32
5. REZULTATI	33
5.1. HISTOLOŠKE KARAKTERISTIKE POSTELJICE	33
5.1.1. Histološke karakteristike humane posteljice prvog trimestra	33
5.1.2. Histološke karakteristike humane posteljice drugog trimestra	37
5.1.3. Histološke karakteristike humane posteljice trećeg trimestra	41
5.2. CD34 IMUNOREAKTIVNOST	46
5.2.1. CD34 imunoreaktivnost u humanim posteljicama prvog trimestra.....	46
5.2.2. CD34 imunoreaktivnost u humanim posteljicama drugog trimestra.....	49
5.2.3. CD34 imunoreaktivnost u humanim posteljicama trećeg trimestra	51
5.3. CD45 IMUNOREAKTIVNOST	53
5.3.1. CD45 imunoreaktivnost u humanim posteljicama prvog trimestra.....	53
5.3.2. CD45 imunoreaktivnost u humanim posteljicama drugog trimestra.....	55
5.3.3. CD45 imunoreaktivnost u humanim posteljicama trećeg trimestra	57
5.4. CD117 IMUNOREAKTIVNOST	59
5.4.1. CD117 imunoreaktivnost u humanim posteljicama prvog trimestra.....	59
5.4.2. CD117 imunoreaktivnost u humanim posteljicama drugog trimestra.....	61
5.4.3. CD117 imunoreaktivnost u humanim posteljicama trećeg trimestra	63
5.5. CD41 IMUNOREAKTIVNOST	64
5.5.1. CD41 imunoreaktivnost u humanim posteljicama prvog trimestra	64
5.5.2. CD41 imunoreaktivnost u humanim posteljicama drugog trimestra	67
5.5.3. CD41 imunoreaktivnost u humanim posteljicama trećeg trimestra	68

5.6. CD38 IMUNOREAKTIVNOST	69
5.7. NUMERIČKA AREALNA GUSTINA HEMATOPOETSKIH MATIČNIH ĆELIJA U POSTELJICAMA RAZLIČITE STAROSTI	70
5.7.1. Numerička arealna gustina CD34 imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija	70
5.7.2. Numerička arealna gustina CD45 imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija	71
5.7.3. Numerička arealna gustina CD117 imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija.....	73
5.7.4. Numerička arealna gustina CD41 imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija.....	74
5.8. POREĐENJE NUMERIČKE AREALNE GUSTINE RAZLIČITIH POPULACIJA IMUNOREAKTIVNIH HEMATOPOETSKIH MATIČNIH ĆELIJA U PRVOM TRIMESTRU...	75
5.9. POREĐENJE NUMERIČKE AREALNE GUSTINE RAZLIČITIH POPULACIJA IMUNOREAKTIVNIH HEMATOPOETSKIH MATIČNIH ĆELIJA U DRUGOM TRIMESTRU	77
6. DISKUSIJA.....	79
6.1. OPŠTA RAZMATRANJA.....	79
6.2. ANALIZA CD34 IMUNOREAKTIVNIH HEMATOPOETSKIH MATIČNIH ĆELIJA.....	82
6.3. ANALIZA CD45 IMUNOREAKTIVNIH HEMATOPOETSKIH MATIČNIH ĆELIJA	86
6.4. ANALIZA CD117 IMUNOREAKTIVNIH HEMATOPOETSKIH MATIČNIH ĆELIJA	90
6.5. ANALIZA CD41 IMUNOREAKTIVNIH HEMATOPOETSKIH MATIČNIH ĆELIJA	94
6.6. ANALIZA CD38 IMUNOREAKTIVNIH HEMATOPOETSKIH MATIČNIH ĆELIJA	96
7. ZAKLJUČCI.....	98
8. REFERENCE.....	100

1. UVOD

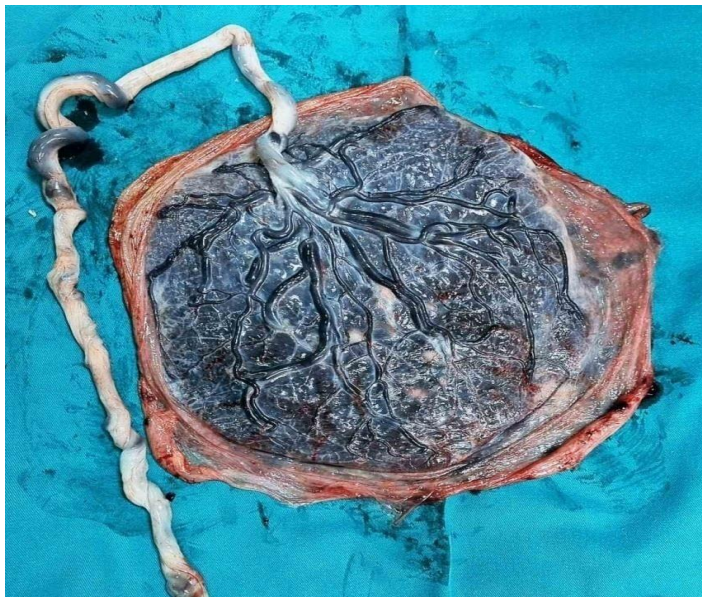
1.1. RAZVOJ, GRAĐA I FUNKCIJA POSTELJICE

Posteljica (placenta) je privremeni ekstraembrionalni organ koji se razvija u maternici trudnice s ciljem uspostavljanja djelotvorne razmjene materija između majke i ploda [1]. Rađanje posteljice se označava kao četvrto porođajno doba i događa se oko 30 minuta nakon rođenja ploda. Pri rođenju ima izgled diska, a prosječna težina je oko 500 grama, promjera je i do 22 cm, a debljina središnjeg dijela iznosi oko 2,5 cm. Na postporođajnu težinu i oblik može uticati i način porođaja kao i nivo i jačina klemovanja pupčane vrpce nakon porođaja [2]. Način začeca nema uticaja na makroskopsku i histološku građu posteljice [3].

Makroskopski na posteljici razlikujemo majčinu i fetalnu stranu. Majčina strana je izbrazdana i na njoj je prisutno 15 do 30 polja nepravilnog oblika koji se nazivaju kotiledonima. Kotiledoni predstavljaju projekciju režnjeva s majčine strane (Slika 1). Fetalna strana je prekrivena amnionom koji joj daje glatku i sjajnu površinu. Pupčana vrpca je najčešće pričvršćena za središnji dio posteljice sa fetalne strane, ali mogu postojati i brojne fiziološke varijacije u vezivanju pupčane vrpce za posteljicu. Od pripoja pupčane vrpce prema periferiji radijalno se pružaju alantohorijske arterije i vene (Slika 2) [1].



Slika 1. Makroskopski izgled majčine strane porođene humane posteljice, odljubljene od endometrijuma. Uočava se njena izbrazdana površina, koja je žlijebovima podijeljena na polja nepravilnog oblika, odnosno kotiledone.



Slika 2. Makroskopski izgled plodove strane porođene humane posteljice. Na površini se nalazi amnion koji daje sjajnu, sedefastu boju posteljici. Hvatište pupčane vrpce je postavljeno u perifernom dijelu, a od njega se radijalno šire alantohorijske arterije i vene.

1.1.1. Razvoj posteljice

U humanoj populaciji trudnoća traje 40 nedjelja i podijeljena ja na trimestre, prvi u trajanju od

0-13 nedjelje gestacije, drugi do 14 -27 nedjelje gestacije i treći trimestar od 28. do 40. nedjelje gestacije.

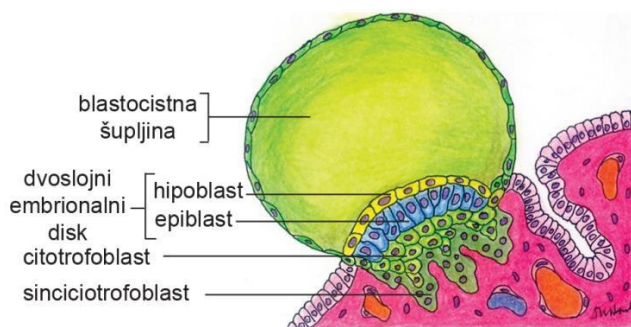
Posteljica se postepeno razvija tokom prva tri mjeseca trudnoće, dok nakon četvrtog mjeseca raste zajedno sa razvojem maternice. Za razvoj posteljice neophodno je uspostavljanje signalizacije na relaciji majka i plod. Da bi se implantacija desila neophodno je prisustvo proinflatornih citokina, faktora nekroze tumora a (engl. *Tumor necrosis factor*, TNFa) i interleukina 6 (engl. *Interleukins 6*, IL6), i prostaglandina E2 [4]. Razvoj posteljice započinje usadnjom blastociste u endometrijum materice oko 6 do 7 dana poslije začeća i on se rapidno odvija tokom prvih nedjelja gestacije (Slika 3). Formiranje blastociste i transformacija endometrijuma je sinhronizovan proces. Sama transformacija endometrijuma je pod kontrolom polnih hormona jajnika, a endometrijum pokazuje najveću receptivnost za implantaciju blastociste sredinom sekrecione faze menstrualnog ciklusa tokom tzv. implantacionog prozora [5].

Rani razvoj posteljice obuhvata period od implantacije do 12. nedelje prenatalnog razvoja, odnosno do kraja prvog trimestra trudnoće. Ovaj period se može podijeliti na nekoliko stadijuma: 1. adhezija i početak implantacije (6-7. dana nakon oplodjenja), 2. prelakunarni stadijum (7-8. dan), 3. lakunarni stadijum (9-11. dan), 4. stadijum stvaranja primarnih horionskih resica (12-14. dan), 5. stadijum stvaranja sekundarnih horionskih resica (15-17. dan), 6. stadijum stvaranja tercijarnih, mezenhimalnih i nezrelih intermedijarnih resica (18. dan-12. nedelja) [6,7]. Čelije trofoektoderma blastociste, ranije označeni kao polarni trofoblasti, su ključne za početak formacije posteljice. Putem njihove apozicije i adhezije, one omogućuju blizak i stabilan kontakt embrionalnog i majčinog tkiva koji vodi u dalju diferencijaciju trofoektodermalnih ćelija i implantaciju [8,9]. Navedeni procesi se odvijaju pod uticajem WNT i Noch signalnih puteva [10].

U **preimplantacionom stadijumu** trofoblastne ćelije prve započinju svoju diferencijaciju. One će se diferencirati u dvije vrste trofoblastnih ćelija, sinciotrofoblast i ekstravilozni trofoblast. Blastocista se u ovom periodu sastoji samo od unutrašnjeg sloja koja je obložen jednim slojem mononuklearnih trofoblastnih ćelija. Trofoblastne ćelije oblažu i embrioblast, blastocel i šupljinu blastociste. Spoljašni sloj blastociste će dati najveći dio posteljice, dok će se unutrašnji sloj ćelija diferencirati u embrion i pupčanu vrpцу i posteljični mezenhim iz kojeg će kasnije prerasti mezoderm ekstraembrionalnog porijekla [11].

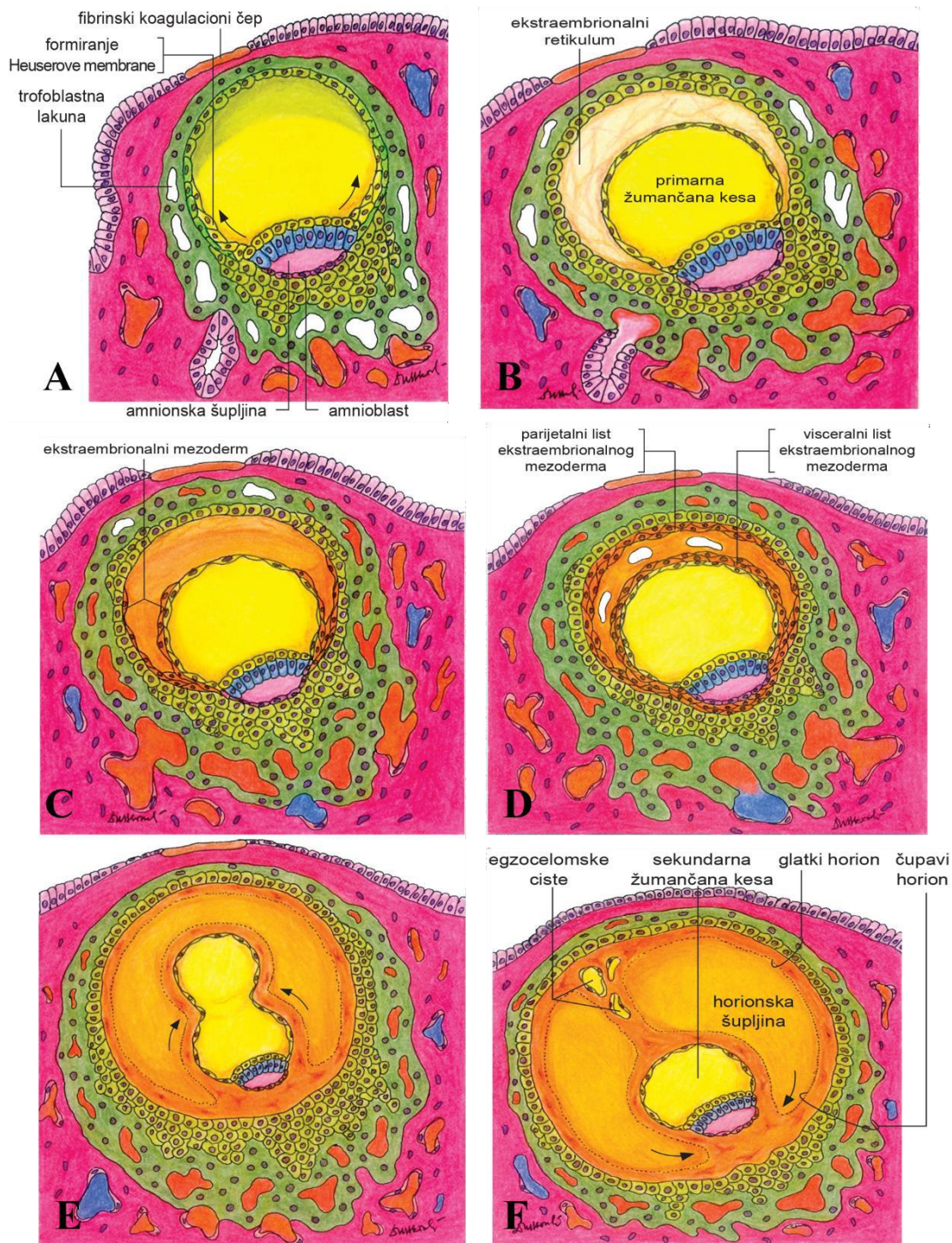
Prelakunarni stadijum započinje onog trenutka kada se blastocista učvrsti za endometrijum (Slika 3.). Tada polarni trofoblasti započinju svoju diferencijaciju, mononuklearne ćelije se

spajaju te nastaje oligonuklearni sinciciotrofoblast. Ovaj oblik sinciciotrofoblasta pokazuje invazivni karakter, što dovodi do toga da se embrion još dublje usadi u endometrijum koga sad okružuje u potpunosti sloj sinciciotrofoblasta. Preostale mononuklearne trofoblastne ćelije se sada označavaju kao citotrofoblast i nalaze se ispod sloja sinciciotrofoblasta i nisu u kontaktu sa tkivom uterusa. One se ponašaju kao matične ćelije jer se neprestano dijele i spajaju sa sinciciotrofoblastom i tako omogućavaju dalji rast. Resice posteljice u ovoj fazi oblaže dvoslojni epitel koji se sastoji od citotrofoblasta i sinciciotrofoblasta koje predstavljaju mjesto razmjene materija između majke i ploda. Ćelije sinciciotrofoblasta izlučuju hormone, u krvotok majke, poput humanog horionskog gonadotropina prilagođavajući tako endokrini sistem i metabolizam majke za razvoj ploda, odnosno za normalno odvijanje trudnoće [10,12].



Slika 3. Usadnja blastociste u endometrijum uterusa, prelakunarna faza razvoja posteljice (Nikolić I. i sar., 2018.). Blastocista tokom 7. dana razvoja, svojim embrionalnim polom, na kome su se formirali trofoblastni produžeci uranjaju u endometrijum, ćelije embrioblasta će se diferencirati i organizovati u epiblast i hipoblast.

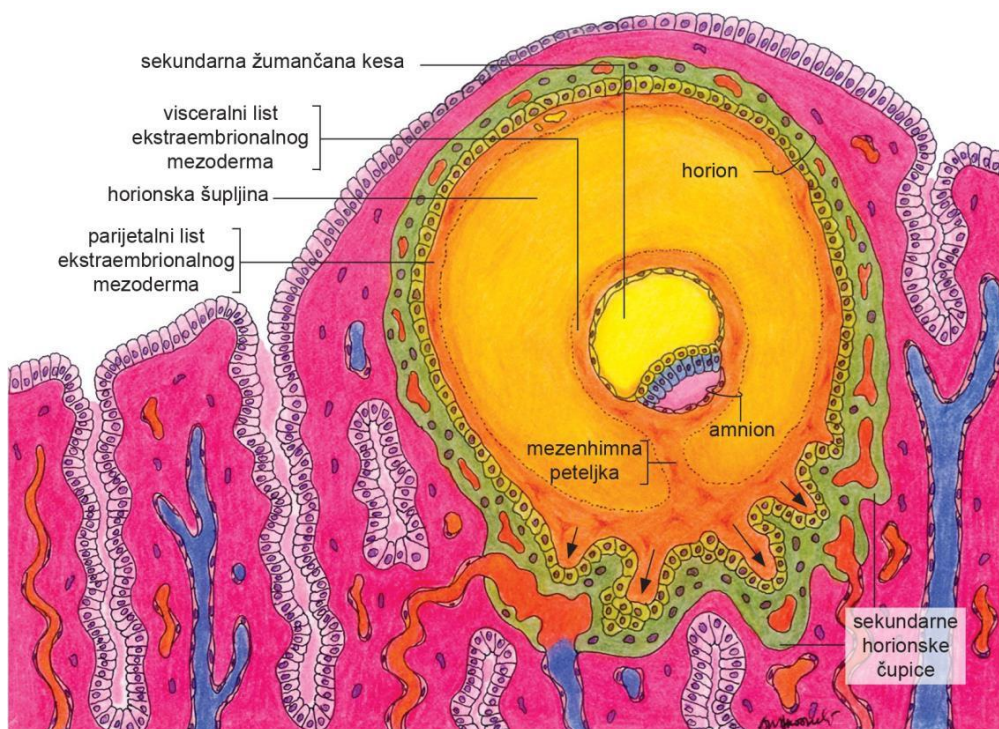
U **lakunarnoj fazi** razvoja mogu se uočiti tri osnovna dijela posteljice, primitivna horionska ploča, lakunarni sistem koji će se kasnije razviti u sistem vilusa i intervilozni prostor, te primitivna bazalna ploča (Slika 4). U ovoj fazi sinciciotrofoblast biva ispunjen tečnošću koja razdvaja sinciciotrofoblaste i formira šupljine-lakune. Preostala masa sinciciotrofoblasta se sada označava kao trabekule i predstavlja osnovu za razvoj vilusa i primitivnu bazalnu ploču koja je u kontaktu sa uterusom. Daljim prodiranjem u endometrijum sinciciotrofoblastne ćelije dolaze u kontakt sa endometrijalnim krvnim sudovima i vrše invaziju njihovog zida što omogućava dolazak majčine krvi u novoformirane lakune [13].



Slika 4. Razvoj posteljice-lakunarni stadijum razvoja (Nikolić I. i sar., 2018.). **A)** Nakon završene implantacije, 9. dana razvoja, mjesto uranjanja blastociste u endometrijum je zatvoreno fibrinskim koagulacionim čepom, ćelije epiblasta proliferišu i diferenciraju se u amnioblaste koji sa ćelijama epiblasta ograničavaju novoformiranu amniotsku šupljinu, hipoblast proliferiše i oblaže blastocistnu šupljinu i gradi Heuserovu membranu (engl. *Heuser's membrane*), a u sinciotrofoblastu se stvaraju šupljine, lakune; **B)** u periodu od 10. do 11. dana razvoja dolazi do uspostavljanja veze između lakuna i krvnih sudova i žlijezda endometrijuma,

formira se ekstraembrionalni retikulum između Hojserove membrane i citotrofoblasta; **C)** tokom 12. dana razvoja dolazi do formiranja dva lista ekstraembrionalnog mezoderma, visceralni i parijetalni; **D)** tokom 12. dana razvoja, u potpunosti je formiran parijetalni i visceralni list ekstraembrionalnog mezoderma, a trofoblastne lakune se u potpunosti ispune krvlju; **E)** u periodu od 12. do 13. dana razvoja dolazi do proliferacije ekstraembrionalnog mezoderma i reorganizacije žumančane kese; **F)** tokom 13. dana razvoja formirane su horionska šupljina, sekundarna žumančana vreća i egzocelomska cista.

Vilozni stadijum, odnosno **stadijum razvoja** resica započinje oko 13. dana nakon začeća razvojem trabekula i traje do kraja trudnoće (Slika 5). Posteljične resice predstavljaju glavne funkcionalne jedinice zbog čega je njihov pravilan razvoj ključan. Na novoformiranim trabekulama dolazi do razvoja perifernih pupoljaka koji se produžavaju i formiraju grančice sastavljene isključivo od sinciciotrofoblasta koje prominiraju u novoformirane intervilozne prostore. Ove resice se označavaju kao primarne resice. Proliferaciju sinciciotrofoblasta prati i ekstraembrionalne mezodermalne ćelije koje migriraju od horionske ploče i usađuju se u trabekule. One ne dolaze do majčine strane tako da terminalni dijelovi resica ostaju građeni isključivo iz sinciciotrofoblasta, koji će kako razvoj napreduje postepeno iščeznuti [14,15].



Slika 5. Razvoj posteljice-formiranje horionskih resica (Nikolić I. i sar., 2018). U periodu od 14. do 15. dana razvoja dvoslojni embrionalni disk je sastavljen od epiblasta i hipoblasta,

formirane su sekundarne horionske resice kroz čije se sinciotrofoblastne ćelije uspostavlja cirkulacija između arterijskih i venskih endometrijalnih krvnih sudova, parijetalni list ekstraembrionalnog mezoderma urasta u središte primarnih resica koje potom postaju sekundarne (strelice).

Kada ekstraembrionalne mezodermalne ćelije upotpunosti ispune središte primitivnih resica i formiraju mezenhim, resice se označavaju kao sekundarne. Dalje, od 17. do 20. dana poslije začeca, nezavisno od razvoja krvnih sudova u embrionu, dolazi do formiranja prvih hematopoetskih ostrvaca u mezenhimu iz kojih će se razviti krvni sudovi i hematopoetske matične ćelije. Resice koje sadrže i formirane krvne sudove unutar mezenhima, okružene sinciotrofoblastom, označavamo kao tercijarne resice [16].

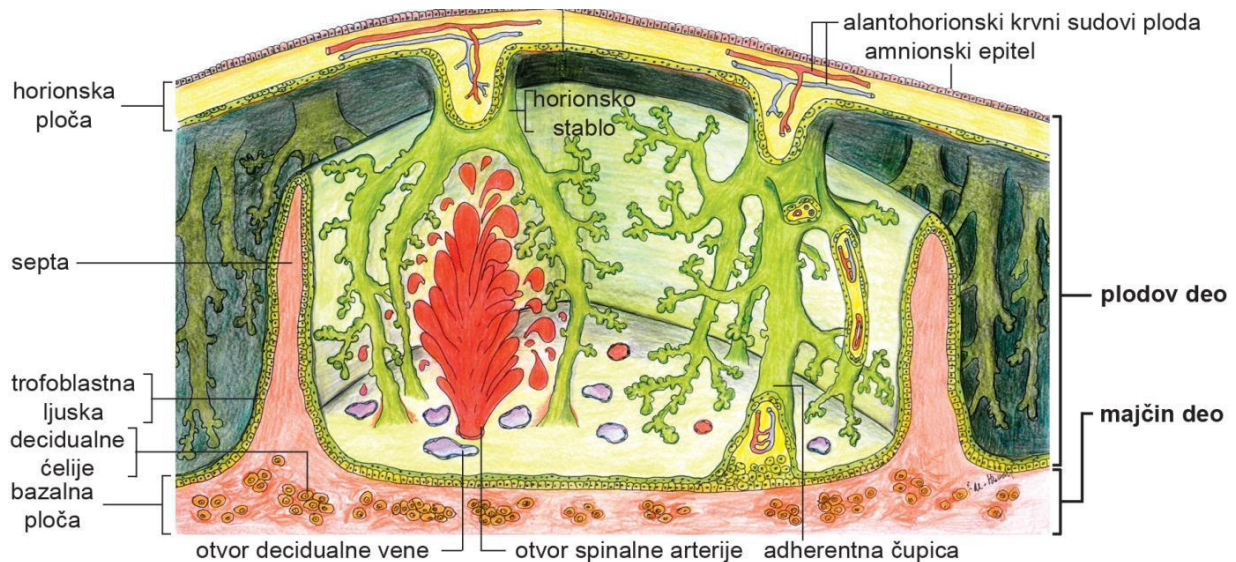
Tokom prvih deset nedjelja gestacije ćelije sinciotrofoblasta prenose hranjive materije koje izlučuju decidualne žlijezde do embriona u razvoju. Ovaj proces, nazvan histiotrofna ishrana, odvija se u nedostatku kiseonika, čime se izbjegava oštećenje ranih resica posteljice slobodnim radikalima. Nakon 10. do 12. nedjelje gestacije, kada se čepovi trofoblasta otapaju, majčina krv ulazi u intervilozni prostor i dospijeva do epitela posteljice te se posljedično, posteljica prebacuje s histiotrofne na hemotrofičnu prehranu budući da kasniji rast embrija zahtijeva učinkovit transport kiseonika i hranjivih materija pomoću ćelija sinciotrofoblasta [17].

Razvoj krvnih sudova u posteljici prednjači u odnosu na plod, jer u fazi kad se prvi krvni sudovi vide u posteljici, embrion se sastoji od samo tri klicina lista [18]. Hemangiogeneza i vaskulogeneza posteljice se razvija *de novo* putem diferencijacije iz ćelija ekstraembrionalnog mezenhima jer se tek oko 32. dana nakon začeca povezuje posteljični i embrionalni vaskularni sistem. Ekspanzija vaskularne mreže se odigrava krajem prvog trimestra i tokom cijelog drugog trimestra. Kod terminskih posteljica volumen kapilarne mreže čini preko 50% volumena tercijalnih resica [1].

Amnion se razvija od ćelija epiblasta koje su u bliskom kontaktu sa citotrofoblastom. Ćelije unutrašnje mase blastociste se diferenciraju u dva sloja ćelija, hipoblast i epiblast. Ćelije epiblasta koje su u bliskom kontaktu sa citotrofoblastom se diferenciraju u epitelne ćelije amniona, amnioblasti, i one okružuju primitivnu amnionsku šupljinu, dok će se ekstraembrionalni mezenhim diferencirati u amnionsko vezivno tkivo [19].

1.1.2. Građa posteljice

Posteljica je jedini organ koji se sastoji od tkiva dvojakog porijekla, tkiva majke (*pars materna*) i tkiva ploda (*pars fetalis*) (Slika 6).



Slika 6. Šematski prikaz histološke građe posteljice na poprečnom presjeku (Nikolić I. i sar., 2018.).

Pars materna čini bazalna ploča infiltrirana decidualnim ćelijama, dok se *pars fetalis* sastoji od horionske ploče, horionskih resica (vilusa) i interviloznih prostora. Bazalna ploča je septama podijeljena u režnjeve. Septe se pružaju od bazalne ploče ka horionskoj ploči. Kao što je naprijed opisano, kotiledoni su projekcije režnjeva bazalne ploče, tako da bazalna ploča ima isti broj režnjeva koliko i kotiledona. Svaki režanj je u kontaktu sa jednim do četiri razgranata vilozna stabla i ta jedinica se označava kao režnić ili lobulus [1].

Bazalna ploča nastaje odvajanjem posteljice od zida uterusa tokom poroda i neki autori je označavaju kao arteficialnu strukturu [6]. Proces formiranja bazalne ploče naziva se decidualizacija. Pod uticajem progesterona dolazi do transformacije stromalnih ćelija sličnih fibroblasta endometrija u specijalizovane epiteloidne decidualne ćelije [20]. Bazalna ploča je mješavina fetalnih ekstraviloznih trofoblasta i decidue uterusa, sadrži decidualne ćelije i ćelije imunog sistema, ćelije prirodne ubice (NK ćelije), makrofage, ekstracelularni matriks i velike količine fibrina.

Decidualne ćelije posjeduju jedan do dva velika euhromatska jedra sa jasno vidljivim jedarcem i svijetlo obojenom citoplazmom kao i dobro razvijen granulirani endoplazmatski retikulum i Goldžijev kompleks, mitohondrije i klatrinske vezikule u blizini ćelijske membrane. Međusobno su povezane dobro razvijenim neksusima [21]. NK ćelije bazalne ploče, za razliku od NK ćelija periferne krvi pokazuju visoku ekspresiju citotoksičnih granula kao što su perforini, granzimi, granulizin i nekoliko NK-aktivirajućih receptora, uključujući NKp46, NKp44, NKp30 i NKG2D i najgušće su raspoređene na mjestu kontakta majčinog i plodovog tkiva [22]. Tokom trudnoće ćelije imunskog sistema čine 30% ukupnih decidualnih ćelija, najbrojnije su NK ćelije dok su na drugom mjestu decidualni makrofazi i oni čine ukupno 20% leukocita u decidui [23]. Decidualni makrofazi imaju različito porijeklo jer faktor rasta koji stimulise rast kolonije 1 (engl. *Growth factor colony-stimulating factor 1*, CSF-1) iz miometrijuma utiče i na tkivne makrofage i na cirkulišuće monocite. Do sada su identifikovane populacije decidualnih makrofaga koji nastaju u žumančanoj vreći i aortno gonadno mezonefrosnom regionu ploda i koštanoj srži majke.

Horionska ploča se sastoji od amnionske membrane (amniona) i horionskog veziva (parijetalni list ekstraembrionalog mezoderma).

Amnionska membrana je tanka membrana koja čini unutrašnju površinu posteljice. U potpunosti oblaže plod te formira šupljinu ispunjenu amnionskom tečnošću. Na njoj se opisuje pet slojeva. Epitelni sloj čine jedan red kubičnih ćelija, bazalna membrana koja je sastavljena od kolagena tipa III, IV i V, laminina, fibronektina i nidogena, kompaktni sloj koji je sastavljen od kolagena I, III, V i VI i fibronektina, sloj fibroblasta koji pored fibroblasta sadrži i kolagen tipa I, III i VI nidogen, laminin i fibronektin, te spužvasti sloj koji je sastavljen od kolagena I, III i IV i proteoglikana. Njena debljina se kreće u rasponu od 0.02 mm do 0.5 mm. Epitelni sloj se sastoji od pojedinačnih kubičnih ćelija koje su svojom bazom pričvršćene za bazalnu membranu, a apikalnom stranom su u kontaktu sa amnionskom tečnošću. Na apikalnoj strani se nalaze mikrovili koji aktivno učestvuju u intra i transcelularnom transportu. Jedro je centralno položeno, veliko i iregularno sa jasno vidljivim jedarcetom, ćelijske organele su razvijene i prisutne su piknotičke vezikule. Epitelne ćelije sintetišu veliki broj faktora rasta i citokina, uključujući epidermalni faktor rasta (engl. *Epidermal growth factors*, EGF), vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *Vascular endothelial growth factors*, VEGF), keratinocitni faktor rasta (engl. *Keratinocyte growth factors*, KGF), bazični fibroblastni faktor rasta (engl. *Basic fibroblast growth factors*, bFGF), alfa- i beta-transformirajući faktor rasta (*alpha-, beta-transforming growth factors*, TGF- α , TGF- β), interleukin-8 (IL-8), angiogenin,

inhibitor serin proteaze (serpin) E1, inzulinu sličan faktor rasta (engl. *Insulin-like growth factors*, IGF) i njihovi vezni proteini (engl. *Insulin-like growth factor binding proteins*, IGFBP). Bazalna membrana služi kao propusna barijera za makromolekule iz amniona. Bogata je proteoglikanima, najviše heparan sulfatom, kolagenim i retikularnim vlaknima te aktinom, spekrionom, citokeratinom, desmoplakinom i lamininom koji služe kao stabilizatori membrane. Mezenhim amnionske membrane je podijeljen u tri podsloja: kompaktni sloj, sloj fibroblasta i spongiozni sloj. Mezenhim je u cjelosti bogat kolagenom, proteoglikanima i glikoproteinima, dok je količina fibroblasta najveća u središnjem sloju, a u spongioznom sloju gotovo ih nema. Spongiozni podsloj je građen isključivo od mreže kolagenih i retikularnih vlakana te mucina što omogućava lako odvajanje amnionske membrane od horionskog veziva [24-26].

Horionsko vezivo potiče od parijetalnog lista ekstraembrionalnog mezenhima. Od horionske ploče se odvajaju razgranata horionska stabla koja prestvaljaju fetalni reznjić. Centralni dio stabla nastaje od trabekule u toku rane faze razvoja posteljice dok se grane stabla razvijaju tokom cijele trudnoće. Kod terminskih posteljica njihova veličina se kreće od 1-3 cm [27]. Centralni dio reznjića se nalazi iznad otvora spiralne arterije bazalne ploče. Pojedina stabla resica dodiruju bazalnu ploču i označavaju se kao ankorirajuće resice. Horionske resice se na osnovu izgleda, veličine, građe vezivnog tkiva i krvnih sudova mogu podijeliti na pet vrsta: mezenhimalne resice, nezrele intermedijarne resice, stem resice, zrele intermedijarne resice i terminalne resice.

Mezenhimalne resice dominiraju u prvim nedjeljama gestacije, te su prisutne samo u prvom trimestru. Njihova veličina se kreće od 100 do 250 μm . U vezivu ovih resica dominiraju mezenhimalne ćelije, krvni sudovi nisu razvijeni i većinom im nedostaje lumen.

Nezrele intermedijarne resice nastaju diferencijacijom mezenhimalnih resica, veličina im varira od 100 do 400 μm i prisutne su od 8. do 22. nedjelje gestacije. Stroma resica je ispunjena brojnim stromalnim kanalima. Stromalni kanali su ispunjeni tkivnom tečnošću i nisu okruženi ni endotelom ni epitelom, niti komuniciraju sa bilo kojim drugim strukturama u horionskom stablu, nego ih grade produžeci retikularnih ćelija. Osim stromalnih kanala, srž nezrelih intermedijarnih resica sadrži veće krvne sudove - arteriole i venule, koje nisu obavezno lokalizovane uz horionski trofoblast. U zidu ovih krvnih sudova pored endotela, prisutan je i sloj vaskularnih glatkih mišićnih ćelija, ali nema unutrašnje i spoljašnje elastične lamine [7]. Stromalni kanali sadrže brojne posteljične makrofage, Hofbauerove ćelije, koje imaju sposobnost kretanja kroz kanale.

Stem resice nastaju diferencijacijom nezrelih intermedijarnih resica, veličina im se kreće od 100-3000 μm . Središnji dio resice ispunjava gusto vezivno tkivo u kome su smješteni krvni sudovi, arterije i vene. Njihova uloga je da obezbijede mehaničku potporu horionskom stablu.

Zrele intermedijarne resice se diferenciraju iz mezenhimalnih resica koje se odvajaju od stem resica sredinom gestacije, veličina im se kreće od 80 do 120 μm . U stromi dominira ekstracelularni matrix u kome je smješten veći broj kapilara.

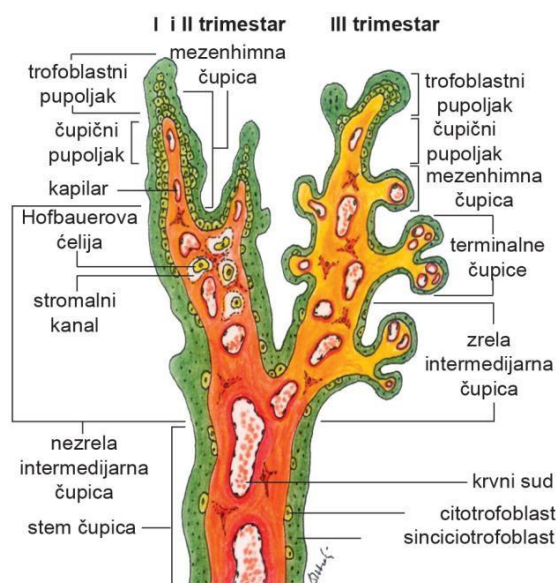
Terminalne resice su završne grane horionskog stabla, nastaju od zrelih intermedijarnih resica. Dužina im je do 100 μm , a širina oko 80 μm . One su najvažnije komponente horionskog stabla koje su ključne za razmjenu materija između majke i ploda. Više od 50% volumena terminalnih resica čine krvni sudovi (Slika 7) [1, 6, 28-30].

Na svim zrelim, terminskim posteljicama, prisutna je i određena količina fibrinoida. Fibrinoid je zajednički termin za sve acelularne homogene strukture koje se boje kiselim bojama. Razlikujemo dva tipa fibrinoida koji imaju različit sastav i porijeklo, ali su međusobno povezani i nalaze se na istim lokalizacijama.

Tip I fibrina se sastoji najvećim dijelom od fibrina i fibronektina koji potiče od ugrušaka majčine krvi i degenerativnih procesa. Onemogućava prekomjerni rast grana horionskog stabla kako bi majčina krv neometano cirkulisala u interviloznim prostorima.

Fibrinoid tip II ili matriksni tip luče ekstravilozni trofoblasti. Sadrži laminine, kolagen IV i VI, heparan sulfat, onkofetalni fibronektini, vitronektin i i-glikozilirane molekule. On reguliše invaziju trofoblasta pomoću interakcije sa integrinima na ćelijskoj površini. Učvršćuje posteljicu za zid maternice i smatra se da ima i odbrambenu ulogu.

Na osnovu lokalizacije razlikujemo nekoliko tipova fibrinoida. Subhorijalni fibrinoid ili Langhansova strija oblaže površinu horionske ploče. Perivilozni fibrinoid oblaže površinu horionskih resica. Intravilozni fibrinoid nalazi se u središtu resica i djelimično ili u potpunosti zamjenjuje stromu resica. U posteljičnim pregradama se nalazi septalni fibrinoid. Rohrova strija je površinski sloj fibrinoida koji prekriva interviloznu površinu bazalne ploče. Nitabuchova strija je fibrinoid smješten dublje u bazalnoj ploči. Fibrinoid decidualnih stubova se nalazi unutar bazalne ploče i djelimično se preklapa sa Nitabuchovom strijom [31, 32].



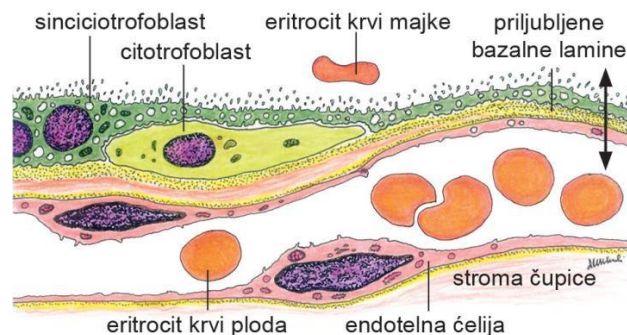
Slika 7. Morfofunkcionalni oblici horionskog stabla tokom razvoja posteljice od prvog do trećeg trimestra (Nikolić I. i sar., 2018.).

1.1.3. Posteljična barijera

Posteljična barijera je višeslojna membrana koja razdvaja krv majke i ploda i omogućava razmjenu materija između ove dvije jedinke. Krv majke i ploda se ne miješaju već su odvojene plodovim tkivom [1]. Prolaz kiseonika do fetusa odvija se difuzijom, a transport većine drugih materija, kao što su antitjela i male molekule se odvijaju pomoću proteinskih nosača. S obzirom na to da je ona propustljiva, odnosno omogućen je transport kroz njene strukture, mišljenja smo da je termin posteljična barijera neadekvatan, pa se stoga treba označavati kao posteljična membrana. U njenoj izgradnji učestvuje veliki broj ćelija koji većinom potiču iz istih prekursora matičnih ćelija trofektoderma blastociste kao što su vilozne citotrofoblastne ćelije, sinciotrofoblast, ekstravilozni trofoblast i džinovske ćelije trofoblata. Na mjestu najintenzivnije razmjene, posteljičnu barijeru čine istanjeni sinciotrofoblast, bazalna lamina trofoblata, bazalna lamina kapilara i endotel kapilara (Slika 8). Dodatne ćelije koje su ključne za normalno funkcionisanje placentne membrane, ali nisu trofoblastnog porijekla, su Hofbauerove ćelije, fetalne endotelne ćelije i decidualne ćelije. Sve one međusobno djeluju, pridonoseći različitim funkcijama posteljice u rasponu od imunološke tolerancije do proizvodnje hormona.

Građa posteljične membrane je različita tokom različite gestacije. U prvom trimestru sastavljena je od sinciotrofoblastnih i citotrofoblastnih ćelija, mezenhima resica koji je

ispunjen brojnim Hofbauerovim ćelijama i zida kapilara fetusa. U tom periodu njena debljina iznosi od 20 do 30 μm . Sredinom drugog trimestra iščezavaju citotrofoblastne ćelije, a fetalni krvni sudovi se umnožavaju i približavaju površini resica, tako da se debljina posteljične membrane smanjuje, ali povećava se njena transportna površina. Tokom trećeg trimestra mijenja se morfologija sinciciotrofoblastnih ćelija. Njihova jedra se grupišu u proliferacijske čvorove ili sincicijalne čvorove, ostavljajući veći dio površine ćelije bez jedra. Ti dijelovi ćelije ostaju čvrsto priljubljeni za fetalne krvne sudove i oni se označavaju kao zona razmjene materija. Na apikalnoj površini sinciciotrofoblastnih ćelija nalaze se citoplazmatski produžeci, mikrovili, koji dodatno povećavaju raspoloživu transportnu površinu. Prosječna debljina posteljične membrane u trećem trimestru iznosi oko 5 μm . U terminskim posteljicama prosječna transportna površina iznosi 11 m^2 , a brzina protoka krvi 450 ml/min [33]. Na debljinu posteljične barijere terminske posteljice može uticati zdravstveno stanje majke kao i sama starost majke. Nađeno je da kod trudnica starijih od 35 godina dolazi do većeg umnožavanja horionskog vezivnog tkiva nego kod mlađih trudnica iste gestacije [34-37].



Slika 8. Šematski prikaz histološke građe posteljične barijere (Nikolić I. i sar., 2018.). Barijeru čine (strelica), posmatrano sa majčine strane, istanjeni sinciciotrofoblast, priljubljene bazalne lamine trofoblasta i kapilara i istanjeni dio citoplazme endotelnih ćelija kapilara ploda u terminalnim resicama.

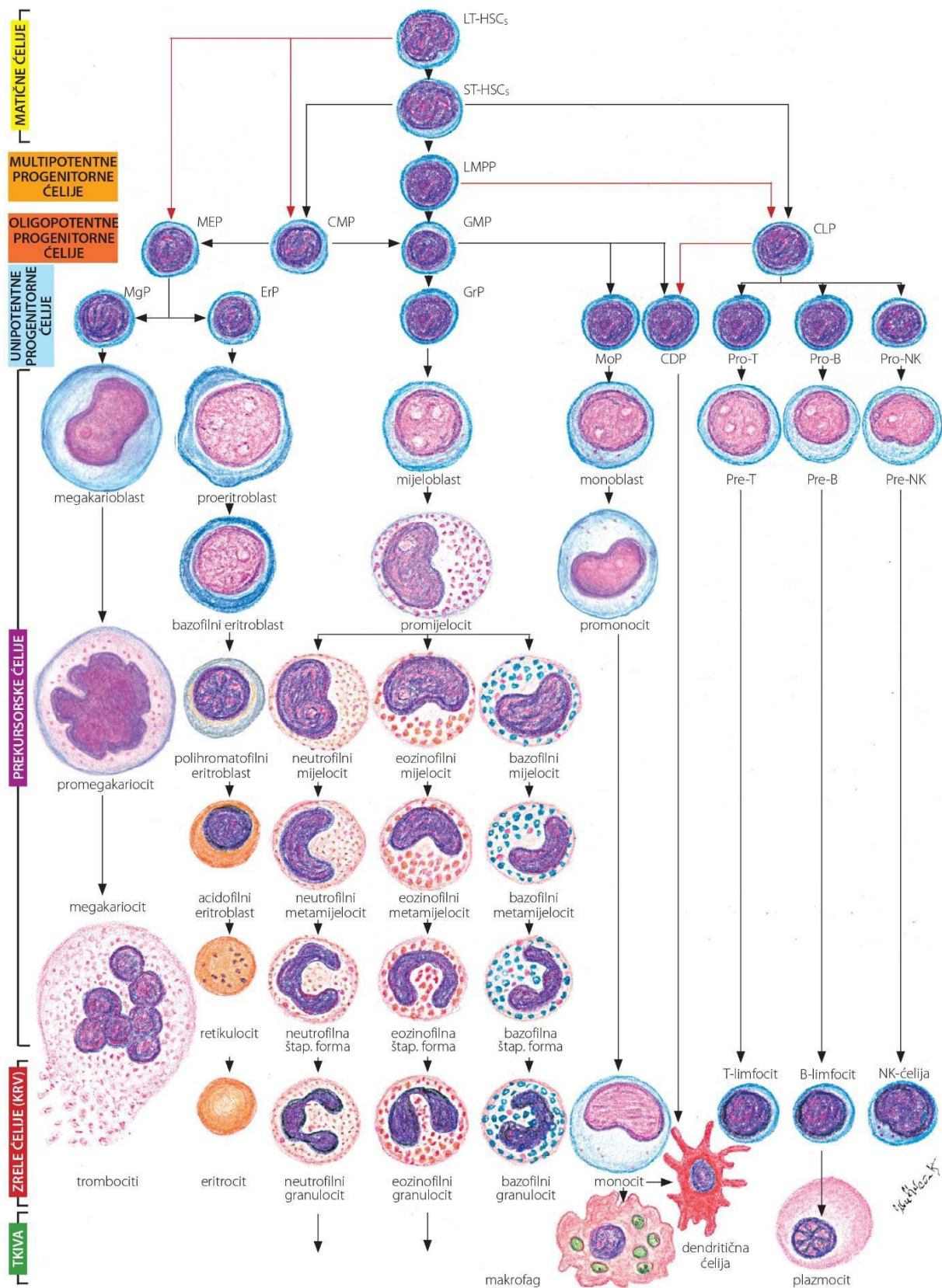
1.1.4. Funkcija posteljice

Osnovne funkcije posteljice su metabolizam i transport hranjivih materija, odnosno nutritivna i respiratorna funkcija, endokrina i zaštitna funkcija [38-40]. Ona obebjeđuje kiseonik, vodu, ugljene hidrate, amino kiseline, vitamine, minerale i ostale nutrijente za fetus te ujedno uklanja ugljen dioksid i druge otpadne proizvode iz fetalne cirkulacije [41-44]. Štiti plod od infektivnih

agenasa, bolesti majke i ksenobiotika. Oslobađa hormone i u majčinu i u fetalnu cirkulaciju te tako reguliše sam tok trudnoće i fetalni razvoj [45-50]. Takođe, posteljica ima značajnu ulogu i u hematopoezi.

1.2. HEMATOPOEZA

Hematopoeza (hematocitopoeza) predstavlja proces stvaranja ćelija krvi. Kod odraslih ljudi, postnatalno, proces hematopoeze odvija se isključivo u koštanoj srži, a različite zrele ćelije krvi nastaju iz pula ćelija koje se nazivaju hematopoetske matične (stem) ćelije (engl. *Hematopoietic stem cells*, HSCs) (Slika 9). Hematopoetske matične ćelije imaju sposobnost samoobnavljanja, a po potencijalu diferencijacije su multipotentne [51]. Dok se postnatalna hematopoeza odvija u potpunosti na jednom mjestu, prenatalna hematopoeza se odvija u različitim periodima razvoja na anatomski različitim mjestima. Za prenatalnu hematopoezu je karakteristično da matične ćelije migriraju sa primarnog mjesta nastanka na druge anatomske lokalizacije gdje se naseljavaju i gdje dolazi do njihovog umnožavanja, a potom i do sazrijevanja i diferencijacije. Kod sisara postoje dva osnovna izvora prenatalne hematopoeze: žumančana vreća i regija aortno-gonadalnog mezonefrosa (AGM) (prednji zid dorzalne aorte). Prenatalna hematopoeza se prema mjestu nastanka hematopoetskih ćelija može podijeliti na ekstraembrionalnu, koja se odvija u žumančanoj vreći i intraembrionalnu hematopoezu, koja započinje u AGM embriona, a odatle se širi u različite hematopoetske niše.



Slika 9. Savremeni koncept hematopoeze u koštanoj srži u postnatalnom životu i morfologija prekusorskih i zrelih ćelija hematopoeze (Nikolić I. i sar., 2023.). *LT-HSCs*-Dugoživeće hematopoetske matične ćelije (engl. *Long Term-Hematopoietic Stem Cells*, *ST-*

HSC-Kratkoživeće hematopoetske matične ćelije (engl. *Short Term-Hematopoietic Stem Cells*), *LMPP*- Multipotentni progenitori usmjereni u limfoidnom pravcu (engl. *Lymphoid primed multipotential progenitors*), *MEP*-Mijeloidni eritroidni progenitor (engl. *Myeloid-erythroid progenitor*), *CMP*-Zajednički mijeloidni progenitor (engl. *Common myeloid progenitor*), *GMP*-Granulocitno-monocitni progenitor (engl. *Granulocyte-monocyte progenitor*), *CLP*-Zajednički limfoidni progenitor (engl. *Common lymphoid progenitor*), *MgP*-Megakariocitni progenitori (engl. *Megakaryocyte progenitor*), *ErP*-Eritroidni progenitori (engl. *Erythroid progenitor*), *GrP*-Granulocitni progenitor (engl. *Granulocyte progenitor*), *MoP*-Monocitni progenitor (engl. *Monocyt progenitor*), *CDP*-Zajednički dendritski progenitori (engl. *Common dendritic progenitor*).

1.2.1. Ekstraembrionalna hematopoeza

1.2.1.1. Primitivna hematopoeza (prvi talas hematopoeze)

Primitivna hematopoeza ima za cilj da obezbijedi dovoljne količine kiseonika za brzo rastući plod, stoga ovaj talas ima za cilj obezbijediti dovoljne količine eritrocita. Pored eritrocita tokom primitivne hematopoeze nastaju makrofagi i ćelije megakariocitne linije. Primitivna hematopoeza nema limfoidni potencijal, kao ni potencijal za stvaranje granulocita. Ovaj talas je prolazan i ćelije koje su stvorene tokom njega nemaju mogućnost samoobnavljanja i dalje diferencijacije, mada mogu da se presađuju u ćelijskoj kulturi nekoliko puta, pa se smatra da se radi o kratkoživećim progenitorskim ćelijama [52].

Primitivne ćelije su nezavisne od c-Myb i Runx1 transkripcionih faktora što znači da se mogu razvijati i bez uticaja ovih signala, za razliku od definitivnih ćelijskih oblika koji se javljaju u cirkulaciji tokom definitivnog talasa hematopoeze [53]. Primitivna hematopoeza kod ljudi započinje oko druge nedjelje gestacije okupljanjem mezodermalnih ćelija unutar žumančane vreće embrija i formiranjem krvnih ostrvaca [54].

Ove nakupine ćelija, krvna ostrvca, imaju i hematopoetski i vaskulogeni potencijal pa se nazivaju hemangioblasti. U vrijeme njihovog nastanka i diferencijacije primitivnih krvnih ćelija, još uvijek nije uspostavljena kontrakcija srčane cijevi, niti cirkulacija krvi. Hemangioblasti su u čvrstom kontaktu sa ekstraembrionalnim endodermom žumančane vreće koji utiče na njihovu dalju diferencijaciju. Ćelije koje su postavljene periferno će se diferencirati

u endotel, a preostale će se naknadno diferencirati u ćelije krvi. Većina centralno postavljenih ćelija podliježe apoptozi u cilju stvaranja lumena krvnog suda, dok ćelije centralne zone koje su nakon nastanka lumena ostale vezane za endotel diferenciraće se u hemocitoblaste, tj. primitivne hematopoetske progenitore. Primitivni hematopoetski progenitori prilikom kultivisanja imaju sposobnost da stvaraju kolonije (engl. *Colony-Forming Cells*, CFCs, ili *Colony-Forming Unit-Culture*, CFU-C) [55].

Kao što je ranije navedeno većina krvnih ćelija formiranih u žumančanoj vreći su primitivni eritrociti. Za regulaciju primitivne eritropoeze odgovorna su dva transkripciona faktora GATA1 i KLF1 [56]. Morfološki, primitivni eritroblasti su velike ćelije sa centralno postavljenim jedrom koje sadrže i embrionalni ζ -hemoglobin ($\epsilon\gamma$ - i βH1 -globin) i odrasli α - i β -hemoglobin ($\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, $\beta 1$ - i $\beta 2$ -globin) i ispoljavaju površinske markere glikoforina A [57].

Diferencijacija primitivnih makrofaga u žumančanoj vreći započinje oko 25. dana gestacije, gdje se zadržavaju do 30. dana gestacije pa potom migriraju. Primitivni makrofazi porijeklom iz žumančane vreće brzo sazrijevaju, izostavljajući stadijum monocita tokom razvoja. Primitivni makrofazi će u najvećem broju migrirati u centralni nervni sistem i diferencirati se u prekursore mikroglije [58]. Primitivni megakariocitni progenitori morfološki pokazuju obilnu citoplazmu i lobularno jedro sa velikim brojem granula u citoplazmi. Oni su proliferativniji i zahtijevaju manje citokina za razliku od megakariocitnih progenitora u odrasloj dobi. Njihov broj je manji od broja primitivnih eritroblasta. Ne zahtijevaju trombopoetin za stvaranje trombocita, međutim iako je ovaj proces brži, primitivni megakariocitni progenitori ne daju veliki broj trombocita [59].

1.2.1.2. Definitivna hematopoeza nezavisna od HSCs (drugi talas hematopoeze)

Drugi talas hematopoeze označava početak definitivne hematopoeze i započinje između 3. i 4. nedjelje gestacije kod humanih embriona. Odgovoran je za stvaranje eritroidno-mijelidnih progenitora (engl. *Erythro-Myeloid Progenitors*, EMP), koji će se diferencirati u veliki broj potpuno zrelih eritrocita, trombocita, granulocita, monocita/makrofaga, Langerhansovih dendričnih ćelija i mastocita, kao i limfoidno-mijeloidnih progenitora (engl. *Lympho-Myeloid Progenitors*, LMP) koji će dati malu količinu B1a-limfocita i $\gamma\delta$ T-limfocita.

Za definitivne hematopoetske talase do sad je utvrđeno da se hematopoeza odvija putem prelaska endotelnih ćelija u hematopoetske iz specijalizovane endotelne subpopulacije poznate

kao hematogeni endotel. Procesom transdiferencijacije endotelne ćelije velikih krvnih sudova, arterija i vena, žumančane vreće se transformišu u hematogene koje će se kasnije diferencirati u bipotentne eritroidno-mijeloidne progenitore [60].

Iz eritroidno-mijeloidnih progenitora tokom drugog talasa hematopoeze nastaje eritroidni progenitori BFU-E (engl. *Burnst-Forming Unit-Erythroid*) i CFU-E (engl. *Colony-Forming Unit-Erythroid*), mijeloidni progenitori CFU-GM (engl. *Colony-Forming Unit-Granulocyte-Macrophage*) i CFU-M (engl. *Colony-Forming Unit-Macrophage*) i CFU-Meg (engl. *Colony-Forming Unit-Megacariocyte*) [51].

Drugi talas hematopoeze se označava kao definitivna hematopoeza jer tokom njega nastaju “definitivni” eritrociti. Za razliku od prvog talasa gdje se primitivni eritrociti direktno izlučuju u krv, tokom ovog talasa oni iz žumančane vreće putuju ka fetalnoj jetri gdje sazrijevaju. Sazrijevanje se karakteriše gubitkom jedra i promjenom ekspresije globina, zreli eritrociti ekspimiraju većinom β -globin [61].

Tokom ovog talasa nastaju i tri tipa makrofaga iz eritroidno-mijeloidnih prekursora, Kupferove ćelije, alveolarni makrofazi i Langerhansove nezrele dendritične ćelije [62]. Makrofazi koji nastaju tokom ovog talasa su važni za normalno odvijanje procesa razvoja i remodelovanja tkiva, prije svega krvnih i limfnih sudova, a učestvuju i u apoptotskim procesima. Takođe, potpomažu sazrijevanje eritrocita u fetalnoj jetri [63]. Određena populacija ovih makrofaga zahvaljujući njihovoj sposobnosti da se samoobnavljaju, ostaje na navedenim lokalitetima tokom čitavog postnatalnog života i da se nikad ne zamjenjuje makrofazima koji se diferenciraju iz HSCs [51].

1.2.2. Intraembrionalna hematopoeza

1.2.2.1. Definitivna hematopoeza zavisna od HSCs (treći talas hematopoeze)

Centralno mjesto u definitivnoj hematopoezi zauzimaju HSCs ćelije. Sve ćelije krvi, osim nekih tkivnih makrofaga, B-1 B ćelija i epidermalnih $\gamma\delta$ T ćelija nastaju iz HSCs ćelija. Hematopoetske matične ćelije s dugotrajnom sposobnošću repopulacije ne pojavljuju se sve do kasne embrionalne/rane fetalne faze tokom razvoja [64].

Glavne karakteristike HSCs ćelija su sposobnost dugotrajnog samoobnavljanja i sposobnost diferencijacije u sve funkcionalne krvne ćelije. Svaka pojedinačna HSCs može stvoriti kompletan krvni sistem ili klon, omogućavajući prenos kiseonika i imunološku zaštitu tokom ograničenog vremenskog perioda. Vrijeme tokom kojeg se svi zreli tipovi krvnih ćelija mogu naći u jednom klonu naziva se životni vijek. U istom organizmu mogu koegzistirati HSCs ćelije sa različitim životnim vijekom. Iako sa starošću jedinke raste broj HSCs ipak sposobnost njihove diferencijacije u funkcionalne ćelije krvi opada [65,66].

HSCs se dijele na dvije kćerke ćelije, dugotrajne (engl. *Long-term HSCs*, LT-HSCs) i kratkotrajne HSCs (engl. *Short-term HSCs*, ST-HSCs). Dugotrajne HSCs imaju životni vijek duži od šest mjeseci, dok su kratkotrajne HSC vezane za lozu pa u zavisnosti od intenziteta signala iz niše ne mogu se samoobnavljati duže od mjesec dana. Kratkoročne HSCs se diferenciraju u hematopoetske progenitorne ćelije (engl. *Hematopoietic progenitor cells*, HPC) koje se dalje dijele na zajednički mijeloidni (engl. *Common myeloid progenitors*, CMPs) i zajednički limfoidni progenitori (engl. *Common lymphoid progenitors*, CLPs). Mijeloidni progenitori stvaraju granulocitno makrofagne progenitore (engl. *Granulocyte-macrophage progenitors*, GMPs) megakariocitno-eritrocitne progenitore (engl. *Megakaryocyte-erythrocyte progenitors*, MEPs). GMP se diferenciraju u granulocite, monocite i dendritične ćelije, dok se MEP diferenciraju u eritrocite i megakariocite, a CLP se diferenciraju u T, B, NK i dendritične ćelije [67,68].

Prve HSCs nastaju od endotela prednjeg zida dorzalne aorte u regiji aortno-gonadalnog mezonefrosa (AGM) u periodu od 4. do 5. nedjelje gestacije [69,70].

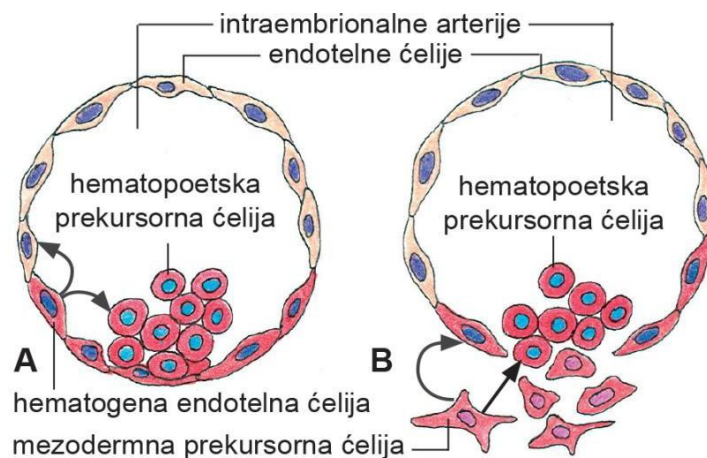
Aortno-gonadalni mezonefros je regija embriona koja sadrži dorzalnu aortu i urogenitalni nabor. Ona je dio šire regije koja se naziva para-aortalna regija splahnopleuralnog mezoderma (PaSpM), a koju čine dorzalna aorta, omfalo-mezenterična arterija, primitivno crijevo i splahnopleuralni mezoderm koji pokriva navedene embrionalne strukture [67, 71].

Hematopoetski potencijal je dokazan u kaudalnoj para-aortnoj splahnopleuri, endomezodermalnom sloju koji uključuje dva rudimenta dorzalnih aorti, a HSCs se prvo pojavljuju kao razbacane grupe CD34+ CD45+ ćelija koje su čvrsto povezane sa slojem endotelne ćelije [72, 73].

Razvijene su dvije teorije o embrionalnom porijeklu HSC ćelija, teorija rediferencijacije i teorija migracije (Slika 9). Po modelu rediferencijacije, sa ventralne strane intraembrionalnih arterija hematogene endotelne ćelije rediferenciraju se u HSC ćelije, dok po modelu migracije

razbacani mezodermalni prekursori kolonizuju ventralni zid krvnog suda i stvaraju endotelne ćelije i HSCs ćelije. Oba procesa se dešavaju oko 27. dana gestacije [1].

Nakon što napuste AGM region putem cirkulacije kroz glavne arterijske izlaze aorte, umbilikalne i viteliske arterije dolaze do placente i žumančane vreće. U ekstraembrionalnim mjestima, HSCs potiskuju identitet endotela i pokazuju transkripcijsku pripremu za eritromegakariocitne loze. One se vraćaju u embrion nakon pete nedjelje gestacije i kolonizuju jetru za razvojno sazrijevanje i započinju diferencijaciju loze. Tokom vremena, HSCs stiču sposobnost višelinijske diferencijacije dok se prebacuju s eritromegakariocitne loze na višelinijski potencijal, uključujući mijeloidne i limfoidne loze. Tokom drugog trimestra, HSCs dolazi do koštane srži, gdje prelaze u dublje mirovanje i potpuno razvojno sazrijevanje. Premještanje HSCs između intra i ekstraembrionalnih mjesta nastavlja se tokom trudnoće, što dokazuje njihova prisutnost u krvi umbilikalnim krvnim sudovima pri rođenju. Različita intra i ekstraembrionalna mjesta koja su potrebna za održavanje HSCs ćelija, u kojima se odvija njihova proliferacija i diferencijacija se označavaju kao niše. Privremene (intermedijarne) niše HSCs u trećem talasu hematopoeze kod humanih embriona i fetusa su jetra, slezina, timus, placenta i koža, a trajna hematopoetska niša je koštana srž [69].



Slika 9. Intraembrionalno porijeklo hematopoetskih matičnih ćelija (Nikolić I. i sar., 2018.). **A)** model rediferencijacije; **B)** model migracije.

1.2.2.1.1. Uloga posteljice u hematopoezi

Posteljica je jedinstvena među ostalim hematopoetskim organima jer ne samo da ima kapacitet za *de novo* hematopoezu, već predstavlja i veliki rezervoar HSC-a. Takođe, štiti HSCs od signala koji potiču njihovu neposrednu diferencijaciju. Lavirintna vaskulatura posteljice

obezbjeduje nišu za definitivno stvaranje i širenje HSCs, a predstavlja i privremenu ekstraembrionalnu hematopoetsku nišu koju naseljavaju ćelije nastale na anatomski različitim mjestima tokom različitih stadija (talasa) hematopoeze [74]. Tokom razvoja, humana posteljica sadrži velik broj različitih hematopoetskih ćelija, zrele i nezrele hematopoetske progenitore i HSCs [75]. Hematopoetske ćelije se u posteljici pojavljuju nešto kasnije u odnosu na druga mjesta hematopoeze. Prve HSCs se mogu indentifikovati u posteljici prisutne nakon šeste nedjelje gestacije. Većinom su lokalizovane u horionu i u horionskim resicama. Za razliku od mišijih posteljica, u humanim posteljicama HSCs su prisutne tokom čitave gestacije, sve do termina. Na osnovu porijekla HSCs se mogu podijeliti u dvije grupe, rezidente HSCs-nastale u posteljici i tranzitorne koje su porijeklom iz AGM iz trećeg talasa hematopoeze. Hematopoetske matične ćelije koje su prisutne u prvom trimestru u posteljici kada se tansplantiraju letalno ozračenim miševima nemaju mogućnost kompletne obnove hematopoeze, nego su sposobne da obnove jednu ili dvije hematopoetske linije, dok HSCs koje su prisutne tokom drugog trimestra imaju sposobnost kompletne obnove hematopoeze [76]. Gekas i saradnici su analizom površinskog fenotipa HSCs-a u posteljici pomoću protočnog citometra utvrdili da najveći dio HSCs u posteljici eksprimiraju površinske markere CD34 i CD117 (c-kit). Pored ova dva markera utvrđeno je i da zrele HSCs eksprimiraju i CD38 [77]. Najveći izazov je razlikovanje HSCs koje su primarno nastale u posteljici (rezidente HSCs) od HSCs koje su cirkulacijom došle u posteljicu. Ispitivanjem na Runx1-lacZ i Runx1^{+/-} *knockout* miševima kod kojih je isključena srčana aktivnost i odsustvo dotoka krvi u posteljicu, identifikovana je populacija CD41 imunoreaktivnih (CD41⁺) HSCs [78].

Rezidentne HSCs, iako u malom broju, stvaraju se u horionskoj ploči posteljice (iz mezodermalnih progenitora u stromi horionske membrane) između 15. i 24. nedjelje gestacije. Većina horionskih CD34⁺⁺ CD45^{low} -ćelija nalazi se uronjena u vimentin⁺ stromalne ćelije, dok je manji broj lokalizovan u lumenu krvnih sudova ili oko njih. Ove ćelije kroz seriju transplantacija obnavljaju hematopoezu i kod sekundarnih primalaca, što potvrđuje da humani horion u navedenom gestacionom periodu sadrži funkcionalno zrele HSCs [79]. Od 16. nedjelje gestacije u horionskim resicama mišije posteljice nađene su i CD34⁺CD45⁺ HSCs.

Placenta je mjesto intenzivne maturacije primitivnih eritroblasta koji dolaze iz žumančane kese u toku prvog talasa hematopoeze. Ove ćelije eksprimiraju glikoforin-A, GATA-2 i c-KIT ali nisu pozitivne na CD34 ili CD45. Primitivni eritroblasti gubitkom jedra u placenti ulaze u završnu fazu sazrijevanja. U posteljici se u istom periodu nalaze i progenitori opredijeljeni za

eritroidnu i mijeloidnu diferencijaciju (EMP), koji potiču iz drugog talasa hematopoeze, koji nije zavisen od HSCs [80].

1.3. IMUNOHISTOHEMIJSKI MARKERI HEMATOPOETSКИH MATIČNIH ĆELIJA

Markere koji se najčešće koriste za identifikaciju i pročišćavanje HSCs-a iz humanog tkiva su: CD34 antigen, CD90 (Thy-1 površinski ćelijski antigen), CD117 (protein onkogen, c-kit), CD45 antigen, CD49f (integrinska podjedinica alfa 6), endotelni protein C receptor (EPCR/CD201), CD133 (prominin 1), CD59 antigen, GPI-80 (Vanin 2), CD43 (Sijaloforin), CD44, CD9, CD48, CD84, CD244 [81,82].

1.3.1. CD34

CD34 (*Cluster of differentiation 34*) je transmembranski fosfoglikoprotein, prvi put indentifikovan 1984. godine na hematopoetskim matičnim (LT-HSCs, ST-HSCs) i progenitorskim ćelijama (MEP, CMP, GMP, CLP) [83]. Pripada porodici sijalomucina tip I, a molekularna težina mu iznosi približno 115 kDa. Posjeduje veći vanćelijski domen koji sadrži mnogo glikoziliranih i sijaliranih ostataka serina, treonina i prolina i manji intracelularni domen koji posjeduje mnoga mjesta fosforilacije. Zadužen je za ćelijsku adheziju i regulaciju ćelijske proliferacije i diferencijacije. Najčešće opisivani ligand za CD34 je I-selektin (CD62L) i adapterski protein CrkL, zadužen za regulaciju adhezije. Antigen CD34 se eksprimira na HSCs i hematopoetskih progenitorskih ćelija, uključujući limfne i mijelogene elemente, ali se također eksprimira na površini vaskularnih endotelnih progenitora, embrionalnih fibroblaste i intersticijske dendritične ćelije [84,85].

1.3.2. CD117 (c-kit)

CD117 (*Cluster of differentiation 117*) ili c-kit je transmembranski receptor klase III tirozin kinaze za faktor matičnih ćelija kodiran protoonkogenim c-kitom. Poput CD34 zadužen je za ćelijsku adheziju i regulaciju ćelijske proliferacije i diferencijacije. Normalno ga ekspimiraju sve HSCs koje imaju sposobnost dugotrajne obnove uključujući progenitore vezane za eritroidne, granulomonocitne i megakariocitne ćelijske linije. Brojne studije potvrđuju važnost c-kit receptora i njegovog liganda, poznatog kao faktor matičnih ćelija (engl. *Stem cell factor*, SCF), faktor rasta mastocita (engl. *Mastocyte growing factor*, MGF) i kit ligand (KL) u razvoju humanih hematopoetskih ćelija. U sinergističkoj kombinaciji s drugim citokinima Kit ligand

pospješuje rast mijeloidnih progenitorskih ćelija (MPC), te je važan i za stvaranje eritropoetskih progenitorskih ćelija [86].

Osim njih, normalno se eksprimiraju i na mastocitima, melanocitima, Kahalovim ćelijama, ćelijama bazalnog sloja kože, polnim ćelijama i ćelijama dukalnog epitela mliječne žlijezde. Patološku CD117 pozitivnost imaju maligne ćelije kod akutne mijeloidne leukemije, mikrocelularnog tumora pluća, sarkoma i gastrointestinalnih stromalnih tumora [87].

1.3.3. CD90 (Thy-1)

CD90 (*Cluster of differentiation 90*) je površinski usidreni glikoprotein molekularne mase 25-37 kDa. Prvobitno je izolovan na mišijim timocitima. Reguliše adheziju, migraciju i proliferaciju, apoptozu i ćelijsku komunikaciju te je uključen u aktivaciju T ćelije, zarastanje rana i fibrozu. Ekspirira se na površini najprimitivnijih hematopoetskih progenitorskih ćelija (LMPP), mezenhimalnim ćelijama, neuronima, endotelnim ćelijama i fibroblastima. Nedavne studije pokazale su da patološku CD90 pozitivnost imaju maligne ćelije, te da ima važnu ulogu u razvoju karcinoma dojke, hepatocelularnog karcinoma, intrahepatičnog holangiokarcinoma, karcinoma žučne kese i hondrosarkoma [88].

1.3.4. CD133

CD133 (*Cluster of differentiation 133*) ili prominin 1 je membranski glikoprotein koji se vezuje za holesterol i selektivno je povezan sa visoko zakrivljenim i istaknutim membranskim strukturama. Prvi put je identifikovan na neuroepitelnim matičnim ćelijama miša. Široko je poznat kao antigenski marker matičnih ćelija i matičnih ćelija malignih tumora. CD133 je visoko eksprimiran u proksimalnim tubulima bubrega, epitelnim ćelijama epididimisa, jetre te u mliječnim žlijezdama, pankreasu i pljuvačnim žlijezdama [89,90].

1.3.5. CD41

CD41 (*Cluster of differentiation 41*) ili integrin α IIb je heterodimerni integralni membranski protein. CD41 se eksprimira na trombocitima i megakariocitima, ali i na ranim embrionalnim hematopoetskim matičnim ćelijama. Povezan je sa CD61 (β 3 integrin, trombocitni GPIIIa) u kompleksu koji stvara integrin GPIIb/IIIa (α IIb β 3), koji igra glavnu ulogu u funkciji trombocita, djelujući kao receptor za nekoliko adhezijskih molekula, uključujući fibrinogen, von Willebrandov faktor, vitronektin i trombospondin, a ima ključnu ulogu u koagulaciji. CD41 označava početak mišije primitivne i definitivne hematopoeze, te je predložen kao marker izražen u nastajućim HSCs ćelijama. Većina hematopoetskih progenitora, koji ne nastaju od hemangioblasta, na svojoj površini eksprimiraju CD41 marker [91-93].

1.3.6. CD38

CD38 (*Cluster of differentiation 38*) ili ciklička ADP ribozomska hidrolaza je transmembranski glikoprotein prisutan na površini B limfocita, NK ćelija, makrofaga, dendritičnih ćelija i urođenih limfoidnih ćelija. Otkriven je 1980. godine na površini timusnih limfocita. CD38 markeri koriste se za razlikovanje pluripotentnih progenitorskih ćelija hematopoetskih matičnih ćelija (CD38⁻) od predanih progenitorskih ćelija (CD38⁺). On služi kao receptor koji pokreće aktivaciju i proliferaciju, te kao adhezijska molekula. Takođe, ima ektoenzimsku aktivnost i uključen je u stvaranje metabolita nukleotida, koji imaju ulogu u regulaciji intracelularnih zaliha kalcijuma. CD38 se koristi kao marker za detekciju leukemije i mijeloma, pouzdan je marker za hroničnu limfoidnu leukemiju [94,95].

1.3.7. CD45 (Ly-5)

CD45 (*Cluster of differentiation 45*) ili zajednički antigen leukocita (engl. *Leucocyte common antigen*) je transmembranski protein tirozin fosfataze. On je površinski marker ograničen na hematopoetsku lozu koji se eksprimira na svim hematopoetskim ćelijama, od HSCs do zrelih krvnih ćelija, osim eritrocita, trombocita i plazma ćelija, koje gube ovaj antigen tokom sazrijevanja. Postoji u nekoliko izoformi, a hematopoetske ćelije ekspimiraju jedan ili više izoformi-CD45RO, CD45RA i CD45RB. CD45 ima ulogu u regulaciji i modulaciji imunog odgovora. Patološku CD45 pozitivnost imaju maligne ćelije kod leukemije, ne Hodžkinovog (*Non-Hodgkin*) limfoma i sarkoma [96,97].

2. RADNA HIPOTEZA

Na osnovu podataka navedenih u prethodnom poglavlju razvijene su sledeće radne hipoteze.

1. U tkivu humane posteljice nalazi se značajan broj različitih imunohistohemijskih profila hematopoetskih matičnih ćelija.
2. Imunohistohemijski profili hematopoetskih matičnih ćelija u tkivu humane posteljice mijenjaju se u zavisnosti od starosti posteljice.
3. Imunohistohemijski profili hematopoetskih matičnih ćelija variraju u različitim dijelovima posteljice u zavisnosti od gestacijske starosti, pri čemu se specifične ćelije i njihovi markeri razlikuju između pojedinih dijelova posteljice.
4. Posteljica je najaktivnija tokom drugog trimestra u procesu prenatalne hematopoeze.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Analizom dostupne literature dolazimo do zaključka da je istraživanje uloge posteljice u hematopoezi aktuelno kao i njeno korištenje kao izvor hematopoetskih matičnih ćelija.

Većina studija koja se bavila ovom tematikom je svoje istraživanje sproveda na animalnim modelima, na različitim sojevima miševa i pacova imunohistohemijskim, morfometrijskim metodama ili pomoću protočnog citometra i na kulturama ćelija. Iako je humana prenatalna hematopoeza u mnogome slična animalnoj prenatalnoj hematopoezi postoje i određene razlike, a broj studija na humanom materijalu je značajno manji.

Takođe, metodologija koja je korištena u detekciji hematopoetskih matičnih ćelija u većini istraživanja ne pruža dovoljno podataka o histološkim i morfometrijskim karakteristikama hematopoetskih matičnih ćelija. Shodno tome, postavljeni su sljedeći ciljevi istraživanja doktorske disertacije:

1. upotrebom specifičnih imunohistohemijskih markera (CD34, CD45, CD117, CD41 i CD38) utvrditi prisustvo i topografsku lokalizaciju različitih profila (subpopulacija) hematopoetskih matičnih ćelija u humanim posteljicama različite starosti;
2. opisati morfološke (veličina, oblik, nukleocitoplazmatski odnos) i imunohistohemijske (stepen imunoreaktivnosti) karakteristike hematopoetskih matičnih ćelija u humanim posteljicama različite starosti;
3. odrediti zastupljenost različitih imunohistohemijskih profila (subpopulacija) hematopoetskih matičnih ćelija izračunavanjem numeričke arealne gustine u humanim posteljicama različite gestacijske starosti.

4. MATERIJAL I METODE

Istraživanje je sprovedeno u Centru za Biomedicinska istraživanja, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci i Univerzitetskom kliničkom centru Republike Srpske (UKC RS), a u skladu sa standardima postavljenim posljednjom revizijom Helsinške deklaracije. Istraživanje je odobreno od strane nadležnog Etičkog odbora Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci broj 18/4.167/21.

4.1. MATERIJAL

4.1.1. Uzorkovanje materijala

Materijal su činile humane posteljice iz sva tri trimestra dobijene u Zavodu za patologiju i u Klinici za ginekologiju i akušerstvo UKC RS. Posteljice prvog trimestra gestacijske starosti do 13. nedjelje prikupljane su u Zavodu za patologiju nakon patohistološke verifikacije ektrauterine trudnoće u jajovodu koji su prethodno hirurški odstranjeni. Posteljice drugog trimestra gestacijske starosti od 14. do 24. nedjelje prikupljene su nakon planiranih arteficialnih abortusa ili prijevremenih porođaja u okviru navedene gestacije u Klinici za ginekologiju i akušerstvo UKC RS. Posteljice trećeg trimestra gestacijske starosti od 25. do 38. nedjelje su se takođe prikupljale u navedenoj Klinici nakon vaginalo završenog porođaja ili sekcije.

U istraživanju su korištene samo posteljice starosti do 38. nedjelje gestacije zbog ranije publikovanih rezultata, koji su pokazali da je u istraživačke svrhe najbolje koristiti posteljice do navedene gestacije [34]. Takođe, korištene su posteljice bez vidljivih makroskopskih i mikroskopskih oštećenja, odnosno posteljice bez izmjenjene morfološke strukture posteljice za određenu gestaciju. Sve posteljice su pripadale zdravim ženama starosti do 35 godina koje u anamnezi nisu imale podatak o hroničnim nezaraznim bolestima kao što su hipertenzija i dijabetes, zaraznim bolestima i pušenju, jer sva navedena stanja mogu uticati na morfologiju posteljica [98,99]. U materijal je uključeno ukupno 30 posteljica, po 10 posteljica iz svakog trimestra (Tabela 1).

Tabela 1. Broj uzoraka uključenih u istraživanje podjeljeno po trimestrima i nedjeljama gestacije.

Period razvoja	Nedjelja gestacije	No posteljica	ΣNo
Prvi trimestar	7. nedjelja	2	10
	8. nedjelja	2	
	9. nedjelja	3	
	10. nedjelja	1	
	11. nedjelja	2	
Drugi trimestar	19. nedjelja	3	10
	20. nedjelja	5	
	23. nedjelja	2	
Treći trimestar	28. nedjelja	1	10
	35. nedjelja	1	
	36. nedjelja	5	
	37. nedjelja	3	

No-broj uzoraka, Σ No-ukupan broj uzoraka

4.1.2. Obrada materijala

Obrada materijala je vršena u Centru za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci i Zavodu za patologiju UKC RS.

Posteljice prvog trimestra odnosno jajovodi u kojima su se razvile ektopične trudnoće su obrađene u Zavodu za patologiju do parafinskih blokova. Radilo se o poprečnim presjecima kroz jajovod. S obzirom na to da volumen ciljanog tkiva nije veliki, korišteni su postojeći kalupi nakon patohistološke verifikacije intratubarne trudnoće. Sa posteljica drugog i trećeg trimestra uzeti su tkivni isječci veličine 2x2 cm pune debljine posteljice, od horionske do bazalne ploče, sa srednje udaljenosti od pupčanika i ruba posteljice. Nakon 48 časovne fiksacije u 4% formaldehidu, tkivni uzorci su prošli automatizovanu obradu u tkivnom procesoru *Laica TP 1020*, te se potom kalupili u parafinske blokove pomoću *Leica HistoCore Arcadia H* uređaja.

Nakon toga dobijeni kalupi su rezani Rotary 3003 pfm mikrotomom na rezove debljine 5 μm koji su adherirani na obična predmetna stakla *Epredia Netherlands B.V.* i 4 μm na predmetna stakla za imunohistohemijsko bojenje *SuperfrostTMPlus Adhesion Microscope Slides, Epredia Netherlands B.V.*

4.2. METODE

4.2.1. Klasično bojenje hematoksilinom i eozinom

Za osnovnu morfološku analizu tkivni uzorci su bojeni hematoksilinom i eozinom u automatizovanom stejneru *Myreva*. Tkivni uzorci su deparafinizovani prvo u termostatu na 60 stepeni celzijusa tokom 60 minuta a potom u ksilolu (4 minuta). Rehidracija se obavila kroz niz alkohola sa opadajućim koncentracijama (100%, 96%, 75%) po 2 minuta. Nakon ispiranja tekućom vodom bojenje se započinje uranjanjem u hematoksilin (*Fisher Scientific, Belgium*) 9 minuta, potom slijedi ispiranje destilovanom vodom, pa uranjaje u hlorovodoničnu kiselinu 30 sekundi, ispiranje destilovanom vodom, 75% alkohol 1 minut, te bojenje u eozinu (*Sigma Aldrich, Spain*) 2 minuta. Za dehidraciju su korišteni alkoholi u rastućim koncentracijama (96%, 100%) po 2 minuta, te su slajdovi prosvijetljeni u ksilolu 3 minuta. Za montiranje je korišten DPX medijum (*Sigma Aldrich, Spain*) i pokrovna stakla (*Biosigma*).

4.2.2. Imunohistohemijsko bojenje

Za imunohistohemijsko bojenje tkivni uzorci su deparafinizovani u termostatu na 60 stepeni tokom 60 minuta, pa u ksilolu kroz dvije izmjene od po 10 minuta. Rehidracija se takođe obavila kroz niz alkohola sa opadajućim koncentracijama, 100%, 96%, 70% po 5 minuta i dovedeni do destilovane vode u trajanju od 10 minuta. Oporavak, odnosno demaskiranje antitijela je obavljeno dvadeset minutnim kuvanjem u citratnom puferu pH vrijednosti 6 (*Vector Laboratories*) u mikrovalnoj pećnici. Aktivnost endogene peroksidaze i nespecifična pozadinska bojenja su blokirana inkubacijom tkiva tokom 10 minuta sa 3% vodonik peroksidom (*Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC detection Kit- Micro-polymer, ab236466, lot: GR3445040-1, Abcam*). Inkubacija sa primarnim antitijelom vršena je na sobnoj temperaturi tokom 30 minuta za antitijela navedena u Tabeli 2, izuzev za primarno mišije monoklonalno antitijelo na CD117. Inkubacija sa navedenim antitijelom je vršena preko noći u vlažnoj komori na 4 stepena. Sledeći korak je inkubacija sa mišijim specifičnim reagensom

(komplement) u trajanju od 10 minuta, kada su upotrebljavana primarna mišija antitijela, a zatim zečijim konjugatom još 15 minuta. Kada je upotrebljavano zečije primarno antitijelo, izostavlja se mišiji komplement. Za vizualizaciju je korišten ostatak HRP/DAB IHC detekcionog sistema (*Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC detection Kit- Micro-polymer, ab236466, lot: GR3445040-1, Abcam*), HRP polimer u trajanju od 15 minuta, te 3,3-diaminobenzidin (DAB) hromogen, kratko pod kontrolom ispod mikroskopa. Između svih navedenih koraka vršeno je ispiranje puferom (*EnVision FLEX WASH BUFFER (20x), Dako*) 3x3 minuta. Za kontrastno bojenje korišten je Mayerov hematoksilin u trajanju od 3 minuta, te amonijačna voda u trajanju od 30 sekundi radi dobijanja intenzivnije boje hematoksilina. Nastavljena je dehidracija u alkoholima rastuće koncentracije (96%, 100%) 5 x 2 minuta, te prosvijetljavanje ksilolom 2x5 minuta. Montiranje je vršeno DPX medijumom (*Sigma Aldrich, Spain*) i pokrovnim staklima (*Biosigma*). Imunopozitivne ćelije se indentifikuju kao smeđe obojene ćelije zbog prisustva DAB hromogena na mjestu spoja antigen-antitijelo.

Prije započinjanja gore opisanog protokola imunohistohemijskog bojenja rađene su i pozitivne i negativne kontrole za sva antitijela. Za pozitivnu kontrolu je korišteno tkivo tonzile, kao što je preporučeno od strane proizvođača. Sproveden je isti protokol, samo umjesto ispitivanog tkiva posteljice, korišteno je tkivo tonzile. Za negativnu kontrolu, umjesto inkubacije sa primarnim antitijelom, vršena je inkubacija sa fiziološkom otopinom.

Tabela 2. Primarna antitijela koja su korištena u istraživanju

Antitijelo	Klon	Proizvođač	Broj	Razblaženje
Mišije monoklonoalno antitijelo na CD34	QBEND/10	Invitrogen	MA110202	1:100
c- Kit mišije monoklonoalno antitijelo na CD117	K45	Invitrogen	MA512944	1:100
Zečije poliklonoalno antitijelo na CD41		Invitrogen	PA583184	1:200
Mišije monoklonoalno antitijelo na CD38	RM 388	Invitrogen	MA536061	1:200
Mišije monoklonoalno antitijelo na CD45	SPM946	SantaCruz Biotechnology	MA516340	1:100

4.2.3. Morfometrijska analiza

Analiza dobijenih tkivnih uzorka vršena je pomoću optičkog binokularnog *Leica DM 6000* mikroskopa, opremljenog sa *Leica DFC310FX* kamerom (*Leica Microsystems, Germany*). Za analizu su korištena uvećanja u rasponu od x50 do x640, a preparati su fotografisani na uvećanju x400.

Stepen imunoreaktivnosti ispitivanih markera, CD34, CD117, CD41, CD45 i CD38 određen je semikvantitativno kao odustna -, nisko +, srednja ++ i visoka +++.

Za morfometrijsku analizu korišten je *Image J* program, verzija 18.0. Pomoću navedenog softvera određena je veličina struktura i ćelija od interesa tako što se nakon kalibracije mikrofotografija iz *Menu bar* odabere se opcija *Analyze* i *Measure*.

Kvantifikacija ispitivanih ćelija vršena je određivanjem numeričke arealne gustine (N_A). Numerička arealna gustina pokazuje broj ispitivanih struktura, imunoreaktivnih ćelija prema

površini vidnog polja izraženog u kvadratnim milimetrima. Numerička arealna gustina se izražava kao količnik broja ispitivanih struktura ili ćelija (N), sa površinom vidnog polja (A), $N_A = N/A$.

Kod tkivnih uzoraka posteljica prvog trimestra fotografisana su i analizirana sva vidna polja. Za ostale grupe uzoraka, broj pregledanih vidnih polja (N) se odredio prema formuli $N=(20 \times SD/X)^2$, gdje je SD standardna devijacija, a X srednja vrijednost rezultata dobivenih u pilot studiji na 20 vidnih polja (Kališnik M, 2002) [100].

4.2.4. Statistička analiza

Statistička analiza rezultata dobijenih u ovom istraživanju rađena je u statističkom softverskom paketu R 4.2.3. Za određivanje učestalosti, mjera centralne tendencije, mjera varijabiliteta i grafičko prikazivanje rezultata korištena je deskriptivna statistika. Hi-kvadrat testa (χ^2 , *Chi-square Test*) je upotrebljen za poređenje učestalosti pojavljivanja kategorijalnih varijabli nezavisnih uzoraka. Statistička analiza numeričkih podataka i izbor odgovarajućeg testa je zavisio od raspodjele numeričkih podataka. Normalnost raspodjele je određena preko vrijednosti skjunitisa (od -3 do +3 – normalna raspodjela) i kurtozisa (od -1 do +1 – normalna raspodjela), te *Shapiro-Wilk* test. Studentov t-test (T test za dva nezavisna uzorka) korišten je za poređenje srednjih vrijednosti dva nezavisna uzorka kod normalne distribucije numeričkih podataka, dok je kod odstupanja od normalne raspodjele korišten Man Vitnijev U test (*Mann Whitney U Test*) za dva uzorka. Homogenost varijansi za više od dve grupe je urađena upotrebom Levenovog (*Levene's*) testa. Nakon statističke analize i primjene Levene's testa rađena je ANOVA ($p > 0,05$ *Levene's* testa) ili Kraskal-Volisonov test (*Kruskal-Wallis Test*) ($p < 0,05$ *Levene's* testa). Za poređenje srednjih vrijednosti numeričkih podataka kod više od dva nezavisna uzorka kod normalne raspodjele numeričkih podataka i vrijednosti $p > 0,05$ nakon Levene's testa korištena je ANOVA, dok je Kraskal-Volisonov test (*Kruskal-Wallis Test*) korišten kao neparametarski test. Svi rezultati su smatrani statistički značajnim ako je $p \leq 0,05$ i visoko statistički značajnim ako je $p < 0,001$. U primjerima gdje su dobijeni visoko statistički značajni rezultati, pisan je nivo statističke značajnosti ($p > 0,001$)

5. REZULTATI

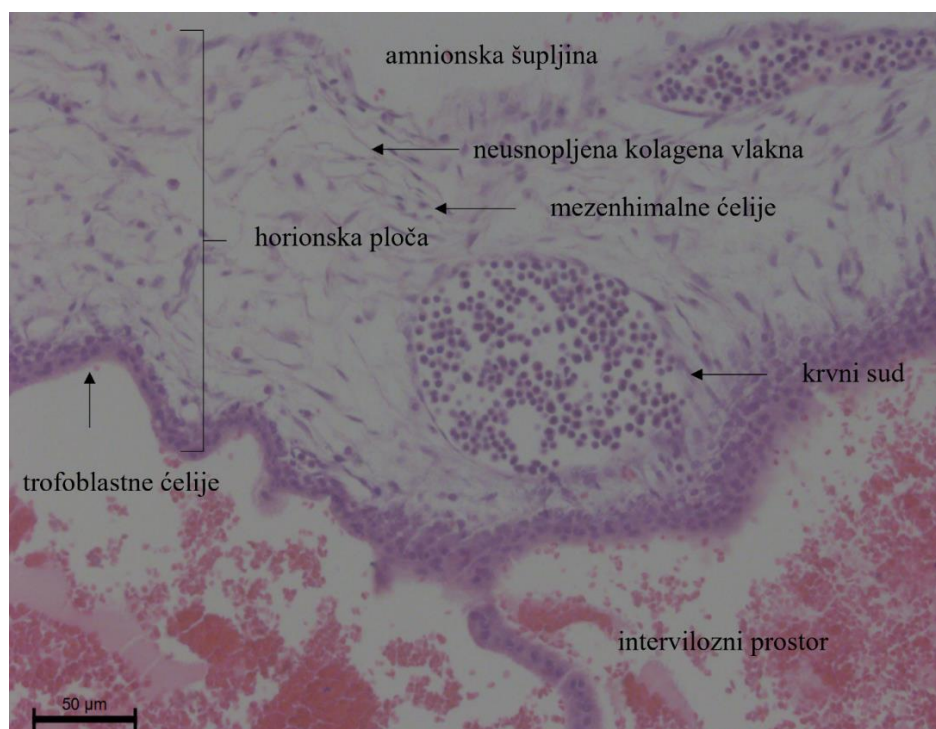
5.1. HISTOLOŠKE KARAKTERISTIKE HUMANE POSTELJICE

5.1.1. Histološke karakteristike humane posteljice prvog trimestra

Na histološkim preparatima obojenim sa hematokslinom i eozinom može se vidjeti građa svih dijelova posteljice.

Horionska ploča je većim dijelom izgrađena iz mezenhimalnog vezivnog tkiva i sloja trofoblastnih ćelija. Mezenhimalno vezivo sačinjeno je od mezenhimalnih ćelija, retikularnih ćelija i neusnopljenih kolagenih vlakana. Mezenhimalne ćelije su najzastupljeniji tip ćelija do 10. nedjelje gestacije, kada bivaju zamjenjene fibroblastima. Mezenhimalne ćelije posjeduju okruglo centralno postavljeno jedro i veliki broj citoplazmatskih produžeta što ćelijama daje zvjezdolik izgled.

U horionskoj ploči se uočavaju i krvni sudovi čiji lumen je ispunjen brojnim ćelijama krvi u različitim fazama razvoja. Jasno se zapaža i amnionski mezenhim čija građa se ne razlikuje od mezenhima horiona. Amnionski epitel ne naliježe na amnionski mezenhim. Horionska ploča je obložena sa nekoliko slojeva trofoblastnih ćelija. One su uniformne, kubičnog su oblika, posjeduju centralno postavljeno jedro i veličina im je oko 6 μm (Slika 10).



Slika 10. Horionska ploča humane posteljice prvog trimestra, 11. nedjelja gestacije (H&E bojenje, x200). U horionskoj ploči se uočavaju veliki krvni sudovi koje ispunjavaju krvni elementi u različitim fazama razvoja; stroma horionske ploče je građena od brojnih neusnopljenih kolagenih vlakana raspoređenih u različitim pravcima, zapažaju se i brojni fibroblasti; stroma je okružena sa nekoliko slojeva trofoblastnih ćelija; od horionske ploče se odvajaju horionske resice, a intervilozne prostore ispunjavaju brojne uobličene ćelije krvi.

Od horionske ploče odvajaju se stabla horionskih resica. U posteljicama prvog trimestra možemo uočiti mezenhimalne horionske resice i nezrele intermedijarne resice. Do 10. nedjelje gestacije dominiraju mezenhimalne horionske resice, a kasnije se povećava broj nezrelih intermedijarnih horionskih resica. Mezenhimalne i nezrele intermedijarne horionske resice se razlikuju po građi i po površini.

Mezenhimalne resice su građene od mezenhimalne strome okružene sa trofoblastnim ćelijama. U mezenhimu je prisutan veliki broj mezenhimalnih ćelija kao i vezivna vlakna. Mezenhimalne ćelije su zvjezdastog oblika sa centralno postavljenim ovalnim jedrom i brojnim citoplazmatskim produžecima. Oni se međusobno spajaju pa tvore stromalne kanale.

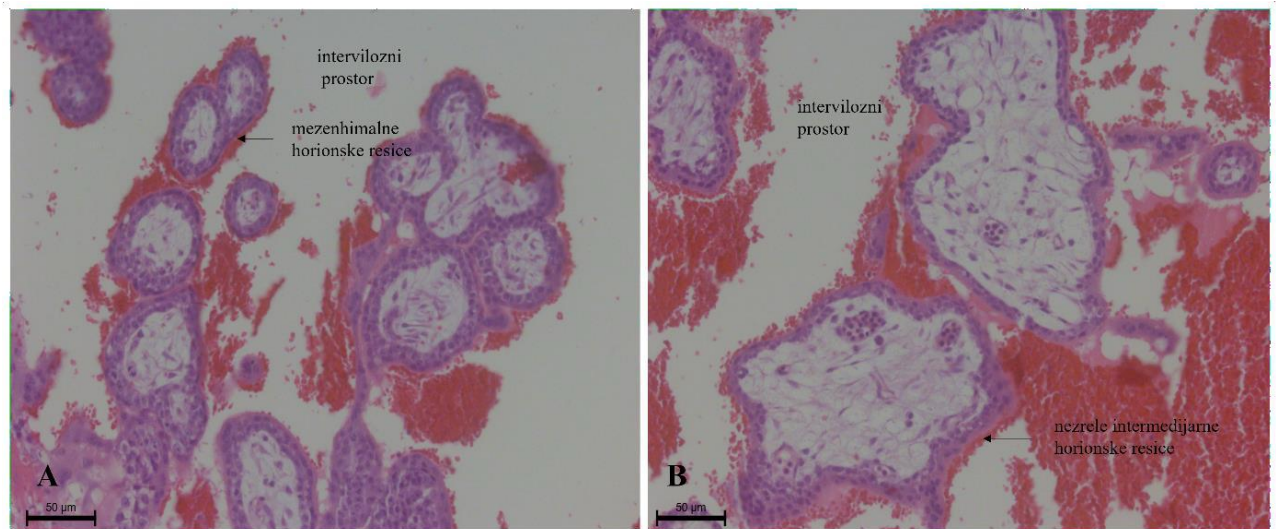
U mezenhimalnim resicama, na preparatima obojenim hematoksilinom i eozinom, se ne uočavaju krvni sudovi. Prisustvo krvnih sudova se može potvrditi samo imunohistochemijskim bojenjem endotelnih ćelija.

Trofoblast čine dva sloja trofoblastnih ćelija, citotrofoblast i sinciotrofoblast. Promjer trofoblastnog sloja horionskih resica u prvom trimestru iznosi od 15 do 20 μm .

Sinciotrofoblast je postavljen na površini i u kontaktu je sa majčinom krvi koja protiče kroz intervilozne prostore. Kubičnog su oblika sa centralno postavljenim jedrom, promjera oko 6 μm .

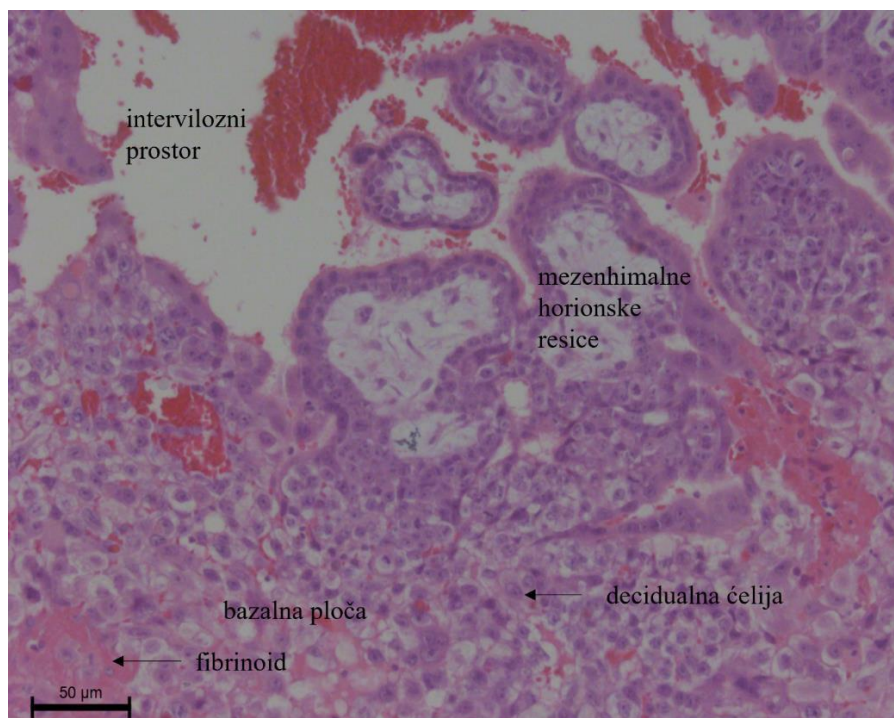
Citotrofoblast je postavljen ispod sinciotrofoblastnih ćelija uz mezenhimalno vezivno tkivo. Ćelije citotrofoblasta su poligonalnog oblika sa centralno postavljenim okruglim jedrom. Promjer citotrofoblasta je veći od promjera sinciotrofoblasta i prosječno iznosi od 10 do 15 μm (Slika 11A).

Nezrele intermedijarne horionske resice se pojavljuju nakon 10 nedjelje gestacije. U njima se mogu vidjeti i krvni sudovi. Uočavaju se i stromalni kanali koji nastaju spajanjem brojnih citoplazmatskih nastavaka mezenhimalnih fibroblasta. U stromalnim kanalima nalazimo i pojedinačne Hofbaureove ćelije, posteljične makrofage. Njih odlikuje centralno postavljeno okruglo jedro okruženo velikom količinom citoplazme. Na stromu resice nalježu dva sloja trofoblastnih ćelija, istih karakteristika kao i kod mezenhimalnog tipa horionskih resica (Slika 11B).



Slika 11. Horionske resice humane posteljice prvog trimestra, 11. nedjelja gestacije (H&E bojenje, uvećanje x200). A) Mezenhimalne horionske resice su sastavljene od strome koju čine neusnopljena kolagena vlakana i brojni fibroblasta, a koja je okružena sa dva reda trofoblastnih ćelija, citotrofoblasta i sinciciotrofoblasta; B) nezrele intermedijarne horionske resice, u svojoj stromi sadrže brojne stromalne kanale i krvne sudove ispunjene krvnim elementima.

Majčin dio posteljice, bazalna ploča, je dobro razvijen u prvom trimestru. Unutar zida materice velika količina intersticijskog trofoblasta prodire prema krvnim sudovima, žljezdama i miometriju te formira bazalnu ploču. U njoj se uočavaju brojne poligonalne decidulane ćelije sa centralno postavljenim okuglim jedrom i jasno vidljivim jedarcetom, okruženo obilnom citoplazmom. Decidulane ćelije okružuje acidofilna masa, fibrinoid. Prosječan promjer decidulanih ćelija iznosi od 15-20 µm (Slika 12).

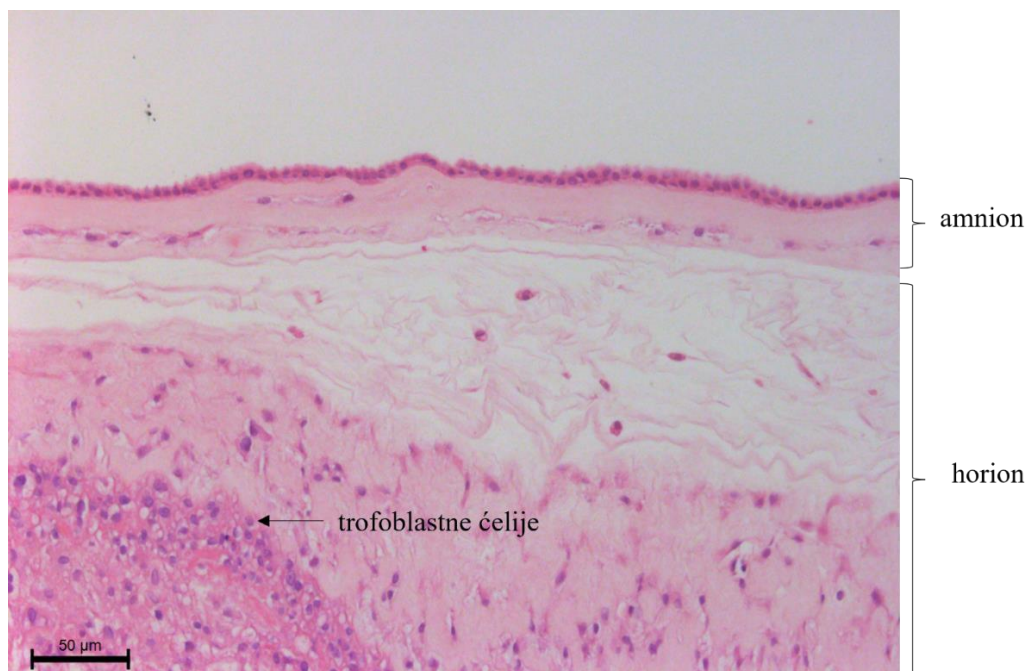


Slika 12. Bazalna ploča i mezenhimalne resice humane posteljice prvog trimestra, 11. nedjelja gestacije (H&E bojenje, x200). Bazalnu ploču čine brojne gusto zbijene poligonalne decidualne ćelije i mala količina fibrinoida; mezenhimalne resice se sastoje od strome koju čine kolagena vlakna i fibroblasti, a okružene su sa dva sloja trofoblastnih ćelija.

5.1.2. Histološke karaktersitike posteljice drugog trimestra

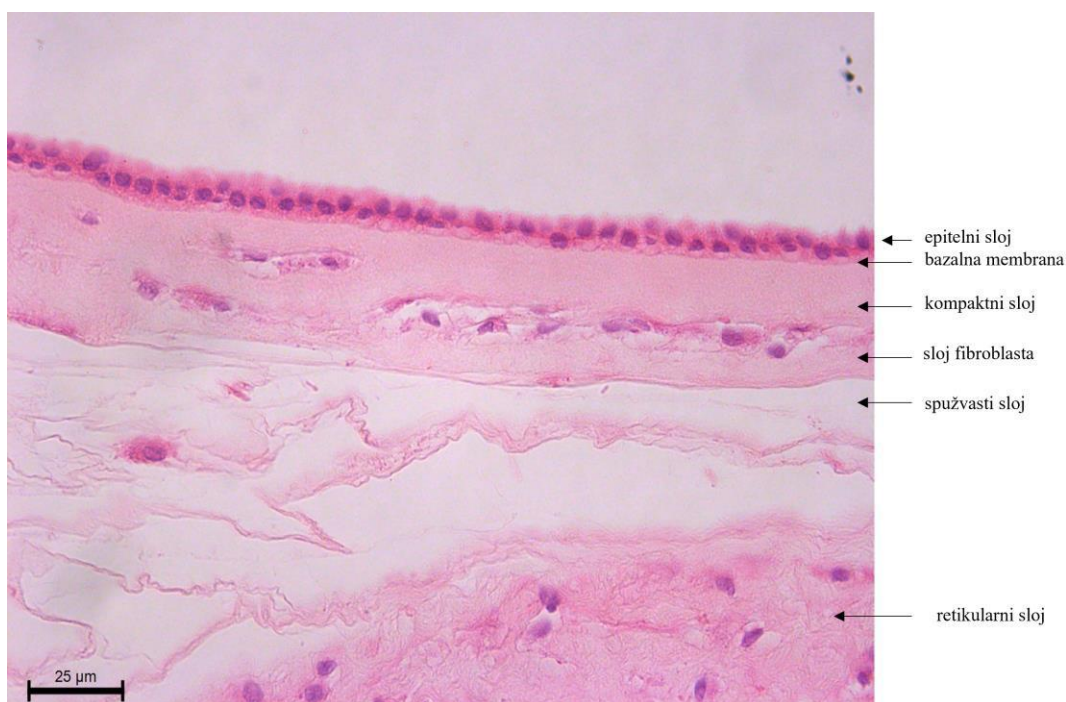
Sa porastom gestacije raste i volumen tkiva posteljice, uvećava se i horionska i bazalna ploča, kao i horionske resice koje ujedno postaju i razgranatije. Takođe, povećava se i broj i volumen krvnih sudova u njima kao i sama stroma horionskih resica. Mezenhimalne horionske resice isčezavaju do kraja prvog trimestra, dok ostale tipove horionskih resica možemo naći u ovoj gestaciji.

Horionska ploča se sastoji od amniona, horionskog vezivnog tkiva i trofoblastnih ćelija koji oblažu njenu spoljašnju površinu (Slika 13).



Slika 13. Horionska ploča humane posteljice drugog trimestra, 20. nedjelja gestacije (H&E bojenje, x200).

Iako oni čine jednu cjelinu, na njima možemo opisati nekoliko slojeva. Amnion je unutrašnji dio horionske ploče i na njemu opisujemo pet slojeva, epitelni sloj koga čine jedan red kubičnih ćelija; bazalna membrana i kompaktni sloj koji su sastavljeni od komponenti ekstracelularnog matriksa; sloj fibroblasta većinom sastavljen od fibroblasta i spužvasti sloj. Na horionskom dijelu opisujemo retikularni sloj, bazalnu membranu i sloj trofoblastnih ćelija koga čini jedan red citotrofoblasta (Slika 14).

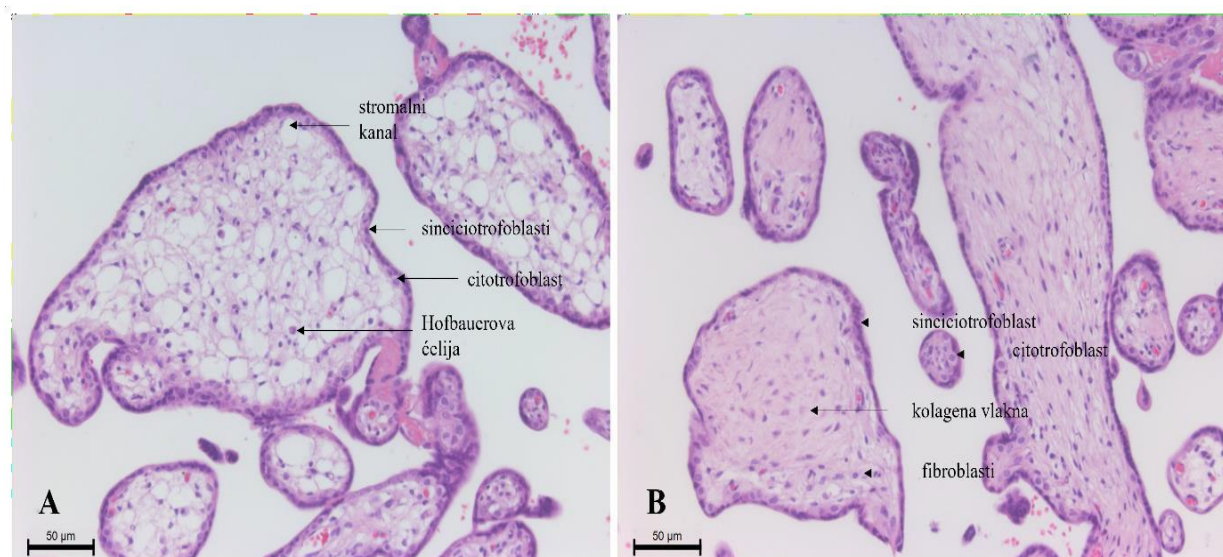


Slika 14. Slojevi horionske ploče humane posteljice drugog trimestra, 20. nedjelja gestacije (H&E bojenje, x400).

U ovom periodu su najbrojnije nezrele intermedijarne horionske resice.

U njima nalazimo brojne stromalne kanale u kojima su, kao i u nezrelim intermedijarnim resicama prvog trimestra, prisutne Hofbauerove ćelije. Za razliku od prvog trimestra broj Hofbauerovih ćelija je značajno veći u drugom trimestru. Stromalno vezivno tkivo okružuje sinciotrofoblast ispod kojih se mogu naći pojedinačne citotrofoblastne ćelije (Slika 15A).

Nakon 22. nedjelje gestacije nalazimo i stem i zrele intermedijarne resice. U ovom tipu resica stromalni kanali iščezavaju, a stroma je bogata mezenhimalnim vezivnim tkivom, u kome su smješteni brojni krvni sudovi. Spoljašnju stranu resica oblažu sinciotrofoblastne ćelije ispod kojih se mogu naći rijetki i pojedinačni citotrofoblast (Slika 15B).



Slika 15. Histološka građa horionskih resica humane posteljice drugog trimestra, 20. nedjelja gestacije (H&E bojenje, x200). A) Nezrele intermedijarene resice se odlikuju prisustvom brojnih stromalnih kanala unutar horionskih resica, u kojima se mogu naći Hofbauerove ćelije; na površini resica se uočava jedan red sinciciotrofoblastnih ćelija, ispod kojih se nalazi diskontinuirani sloj citotrofoblastnih ćelija; **B)** zrele intermedijarne horionske resice se odlikuju prisustvom velikog broja fibroblasta i umnoženih kolagenih vlakana u stromi, na površini se uočava sloj sinciciotrofoblasta ispod koga se nalaze pojedinačni citotrofoblast.

Građa bazalne ploče posteljice drugog trimestra se ne razikuje od građe bazalne ploče prvog trimestra. Bogata je decidualnim stromalnim ćelijama i imunim ćelijama uronjenim u fibrionoid (Slika 16).

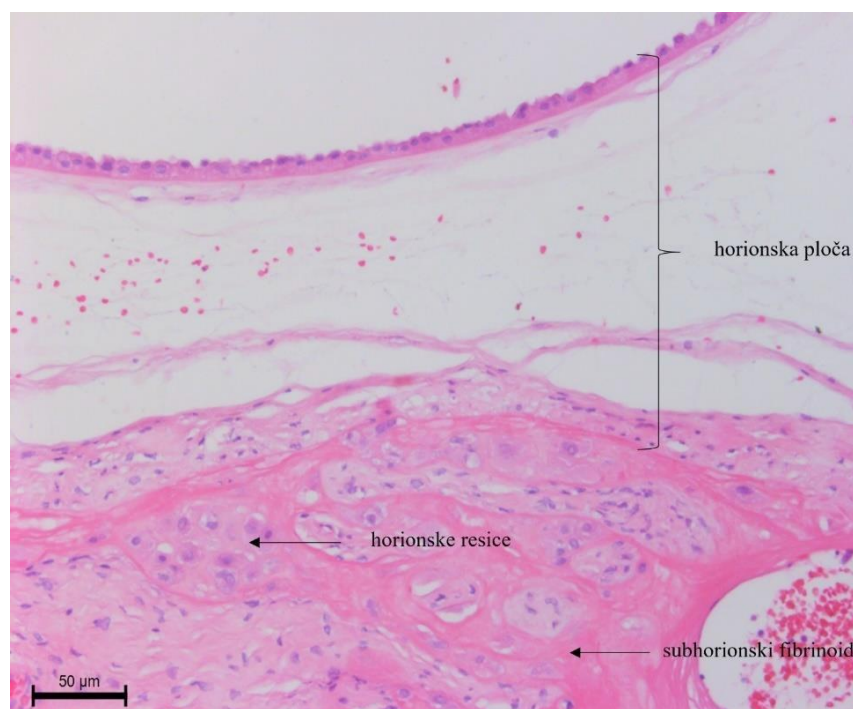


Slika 16. Bazalna ploča humane posteljice drugog trimestra, 20. nedjelja gestacije (H&E bojenje, x200). Bazalnu ploču čine brojne poligonalne decidualne ćelije uronjene u fibrinoid.

5.1.3. Histološke karaktersitike posteljice trećeg trimestra

Razlike u građi posteljice između drugog i trećeg trimestra su jako male. Najviše se ogledaju u građi horionskih resica kao i pojavi veće količine fibrinoida u trećem trimestru.

Horionska ploča se sastoji od amniona, horionskog vezivnog tkiva, dok se trofoblaste ćelije ne uočavaju jer su prekrivene subhorionskim fibrinoidom (Slika 17).



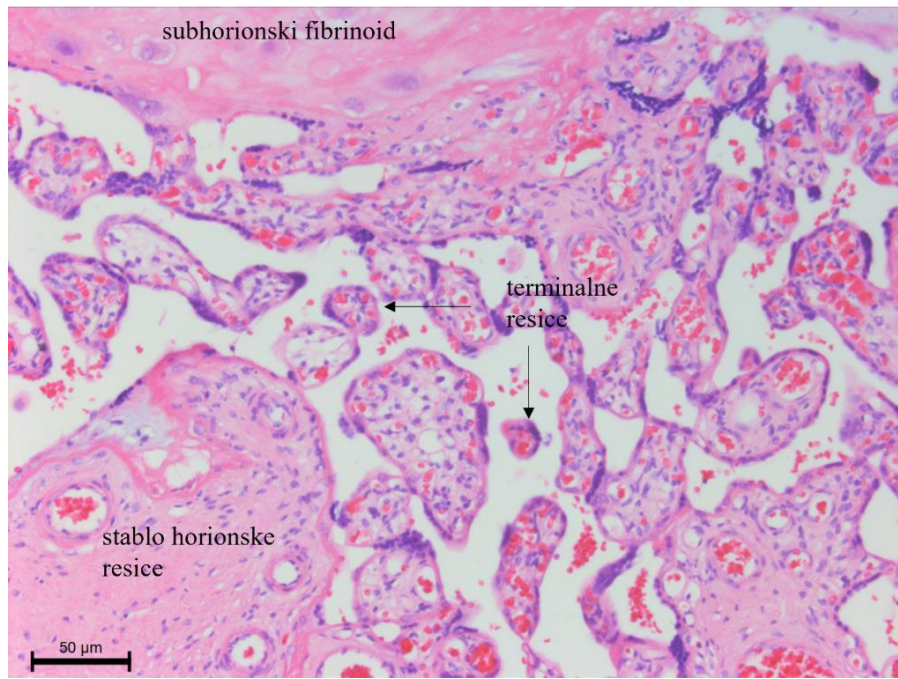
Slika 17. Pars fetalis humane posteljice trećeg trimestra, 36. nedjelja gestacije (H&E bojenje, x200). Pars fetalis čine horionska ploča i horionske resice; horionska ploča je sastavljena od amnionskog epitela, amnionskog mezenhima i horionskog mezenhima; sloj trofoblastnih ćelija na horionskoj ploči se ne uočava jer su prekrivene velikom količinom subhorionskog fibrionoida.

U posteljicama trećeg trimestra nalaze se stem resice, zrele intermedijarne resice i terminalne horionske resice. Stem i zrele intermedijarne resice ispoljavaju iste karakteristike opisane u drugom trimestru.

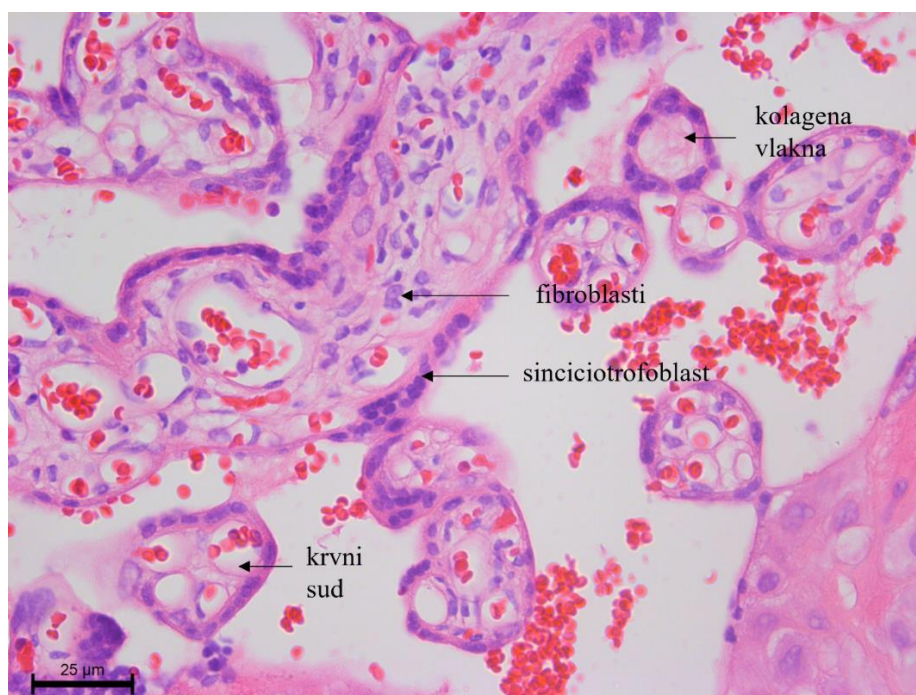
Terminalne resice su najbrojnije u ovom trimestru. One u svojoj stromi sadrže veliki broj kapilara. Stroma resica je okružena jednim redom sinciotrofoblastnih ćelija. Ispod sloja sinciotrofoblastnih ćelija se mogu uočiti pojedinačni citotrofoblast. Broj Hofbauerovih ćelija u vezivu horionskih resica se smanjuje.

Pored terminalnih resica, u posteljicama trećeg trimestra nalaze se i stem resice kao i zrele intermedijarne resice koje ispoljavaju iste karakteristike opisane u drugom trimestru (Slika 18 i 19).

Na površini resica i uz bazalnu ploču nalazi se različita količina fibrinoida. Količina fibrinoida raste sa napredovanjem gestacije, tako da najveći volumen fibrinoida nalazimo kod terminskih, zrelih posteljica, starosti od 36. nedjelja gestacije.

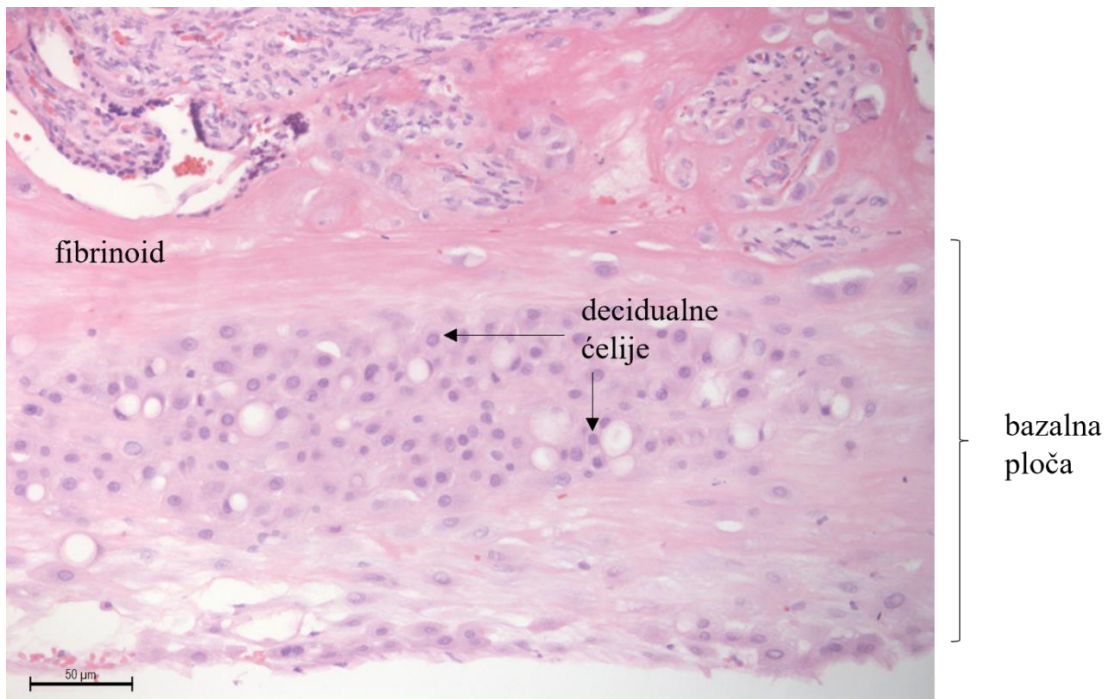


Slika 18. Horionske resice humane posteljice trećeg trimestra, 36. nedjelja gestacije (H&E bojenje, x200). Dominiraju terminale horionske resice, njihova stroma je ispunjena brojnim kapilarima u kojima se vide eritrociti, uočava se i stablo stem resica koje posjeduje velike krvne sudove.



Slika 19. Histološka građa terminalnih horionskih resica humane posteljice trećeg trimestra, 36. nedjelja gestacije (H&E bojenje, x400). Unutar strome terminalnih resica dominiraju kapilari ispunjeni eritrocitima, uočavaju se i malobrojni stromalni kanali; pored kolagenih vlakana u stromi uočavamo i fibroblaste; na površini resica nalazi se sloj sinciotrofoblastnih ćelija; uočavaju se i sincicijalni čvorovi.

Građa bazalne ploče humane posteljice trećeg trimestra je ista kao i građa bazalne ploče humane posteljice drugog trimestra (Slika 20).



Slika 20. Bazalna ploča humane posteljice trećeg trimestra, 36. nedjelja gestacije, (H&E bojenje, x200). Bazalnu ploču čine brojne poligonalne decidualne ćelije uronjene u fibrinoid.

5.2. CD34 IMUNOREAKTIVNOST

CD34 imunoreaktivne ćelije su prisutne u posteljicama sva tri trimestra. Hematopoetske matične ćelije su visoko imunoreaktivne tokom cijele gestacije. Prisutne su u različitim odjeljcima posteljice tokom gestacije. I endotelne ćelije krvnih sudova su visoko CD34 imunoreaktivne tokom sva tri trimestra. Fibroblasti su visoko CD34 imunoreaktivni tokom prva dva trimestra, dok je u trećem trimestru CD34 imunoreaktivnost odsutna (Tabela 3).

Tabela 3. Intenzitet i imunoreaktivnost CD34 pozitivnih ćelija u humanim posteljicama u različitim periodima razvoja.

Period razvoja	HSCs	Endotelne ćelije	Fibroblasti
Prvi trimestar	+++	+++	+++
Drugi trimestar	+++	+++	+++
Treći trimestar	+++	+++	–

5.2.1. CD 34 imunoreaktivnost u posteljicama prvog trimestra

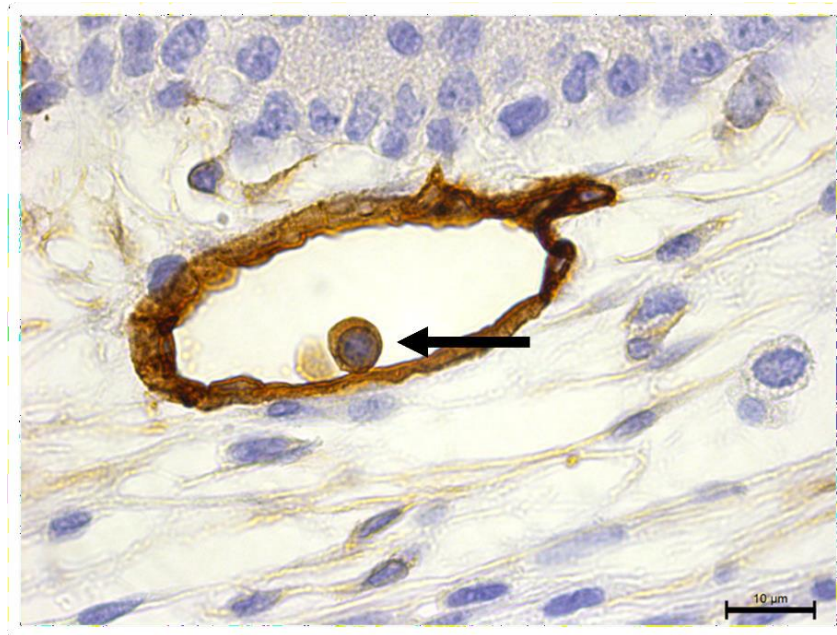
U tkivu posteljice prvog trimestra hematopoetske matične ćelije, endotelne ćelije krvnih sudova i fibroblasti su visoko CD34 imunoreaktivni.

Hematopoetske matične ćelije u posteljicama prvog trimestra pokazuju morfologiju sličnu limfocitima, sastoje se od centralno postavljenog okruglog jedra, okruženog pojasom citoplazme (Slika 21). Volumen citoplazme varira, dok promjer jedra je isti kod svih HSCs ćelija. Promjer HSCs ćelija se kreće od 6-7 μm . Nalazimo ih u svim uzorcima, od 7. do 14. nedjelje gestacije.

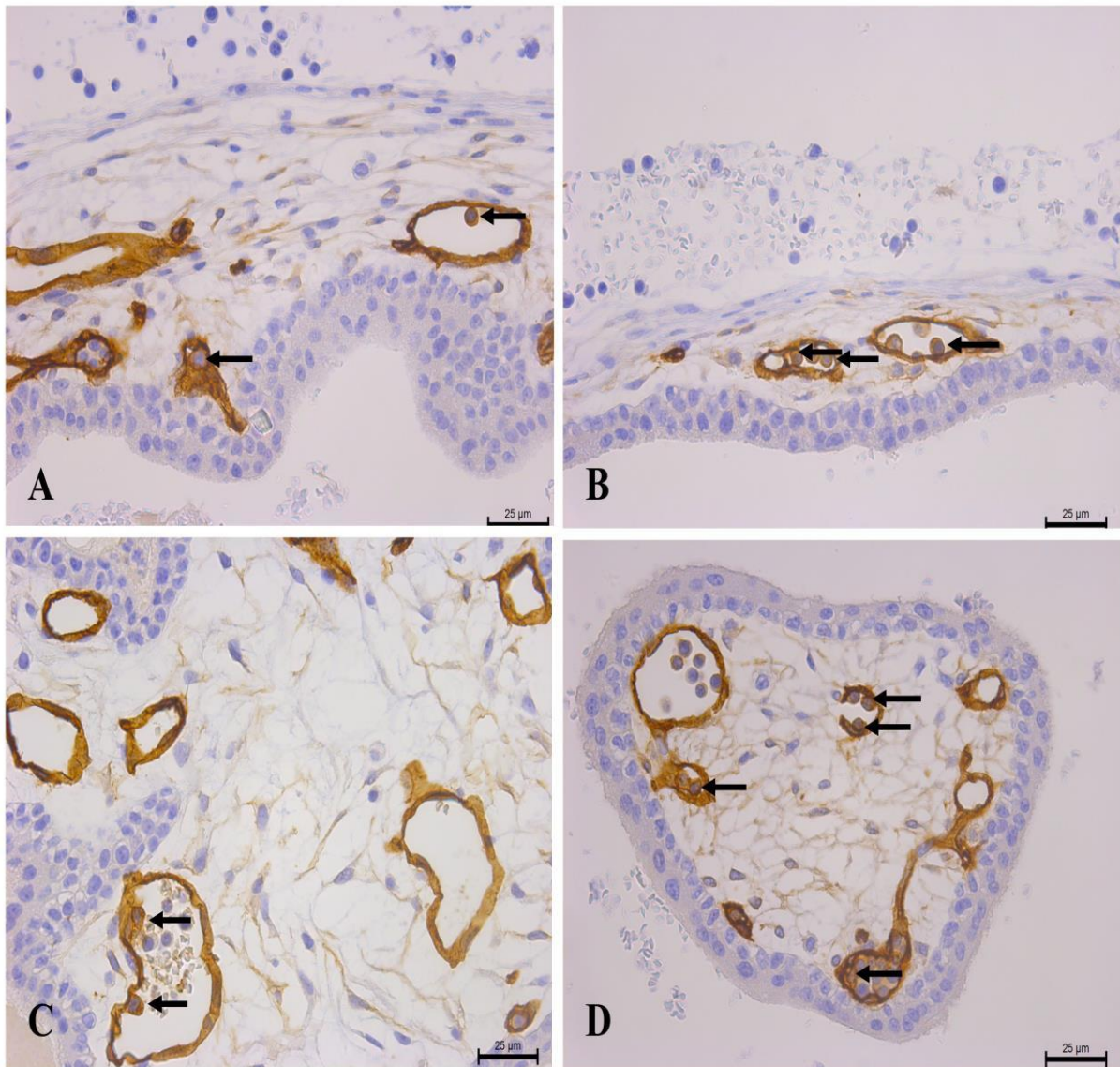
U prvom trimestru se nalaze uglavnom unutar krvnih sudova grupisane kao klasteri i u bliskom kontaktu sa endotelnim ćelijama. Prisutne su unutar krvnih sudova i horionske ploče i horionskih resica. Uočavaju se i rijetke pojedinačne ćelije u stromi horionske ploče i horionskih resica (Slika 22A, 22B, 22C i 22D).

U horionskoj ploči i horionskim resicama posteljica prvog trimestra nalazimo kontinuirani tip kapilara čije endotelne ćelije su visoko CD34 imunoreaktivne. Endotelne ćelije su pločastog oblika, posjeduju ovalno jedro koje prominira u lumen krvnog suda (Slika 22A, 22B, 22C i 22D).

Unutar mezenhima CD34 imunoreaktivnost pokazuju i fibroblasti, te se jasno vide njihovi citoplazmatski produžeci (Slika 22A, 22B, 22C i 22D).



Slika 21. CD34 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije u humanim posteljicama prvog trimestra (x1000). Hematopoetska matična ćelija pokazuje blizak kontakt sa endotelom krvnog suda, a sastoji se od centralno postavljenog okruglog jedra, okruženog pojasom citoplazme (strelica).



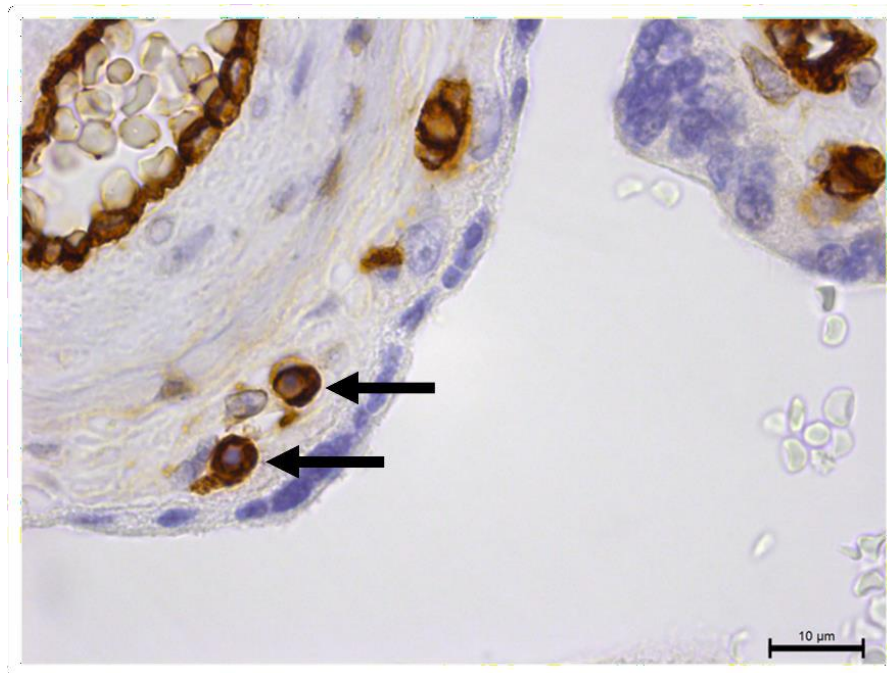
Slika 22. CD34 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije u humanim posteljicama prvog trimestra (x400). A, B) Unutar krvnih sudova horionske ploče prvog trimestra uočavaju se imunoreaktivne CD34 HSC ćelije u bliskom kontaktu sa endotelom krvnih sudova (strelica); C, D) CD34 imunoreaktivne ćelije se uočavaju unutar krvnih sudova u horionskim resicama takođe u bliskom kontaktu sa endotelom krvnih sudova (strelica), koji ispoljava CD34 imunoreaktivnost.

5.2.2. CD34 imunoreaktivnost u posteljicama drugog trimestra

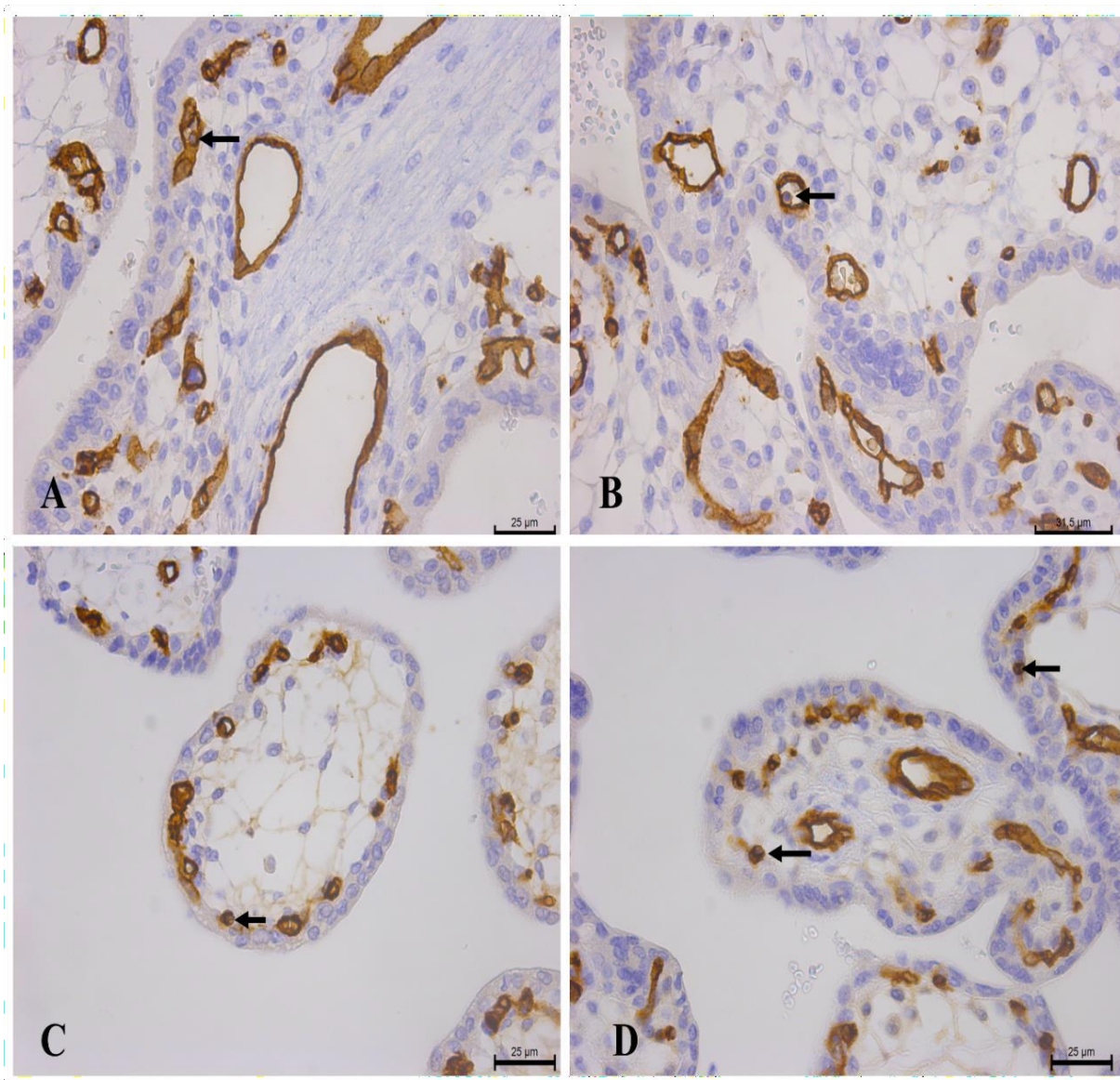
U tkivu posteljice drugog trimestra hematopoetske matične ćelije, endotelne ćelije i fibroblasti su CD34 imunoreaktivne.

Hematopoetske matične ćelije su visoko CD34 imunoreaktivne. HSCs ispoljavaju iste morfološke karakteristike kao i HSCs u prvom trimestru (Slika 23). Zadržavaju istu lokalizaciju kao i u prvom trimestru, nalazimo ih unutar krvnih sudova, unutar horionskih resica i u njihovoj stromi. Najgušće su raspoređene na periferiji horionske resice, neposredno ispod citotrofoblastnih ćelija (Slika 24A, 24B, 24C i 24D).

Endotelne ćelije krvnih sudova posteljice drugog trimestra su visoko CD34 imunoreaktivne. Unutar mezenhima CD34 imunoreaktivnost pokazuju i fibroblasti, te se jasno vide njihovi citoplazmatski produžeci (Slika 24A, 24B, 24C i 24D).



Slika 23. CD34 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije u humanim posteljicama drugog trimestra (x1000). Hematopoetske matične ćelije se uočavaju u mezenhimu horionske resice, a sastoji se od centralno postavljenog okruglog jedra, okruženog pojasom citoplazme (strelica).



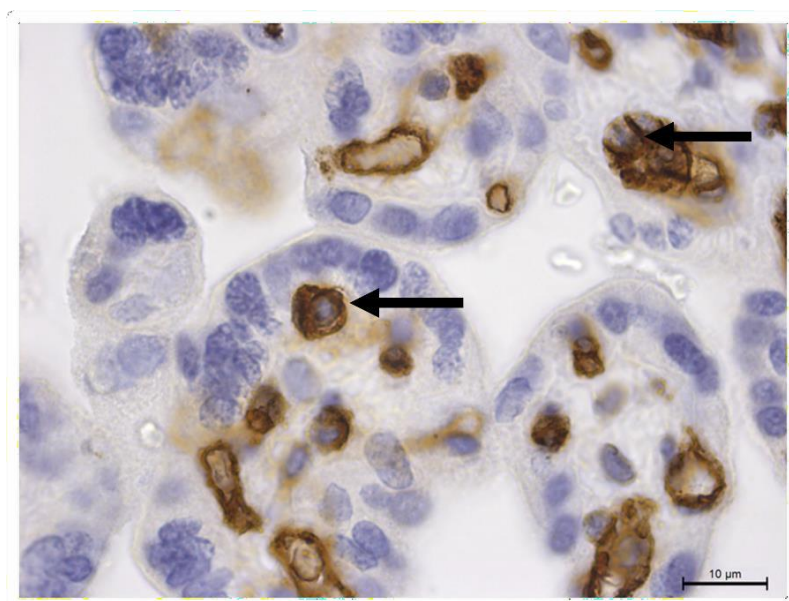
Slika 24. CD34 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije u humanim posteljicama drugog trimestra (x400). A, B) CD34 imunoreaktivne ćelije se uočavaju unutar krvnih sudova u horionskim resicama posteljica drugog trimestra (strelica); C, D) u stromi horionskih resica se uočavaju pojedinačne CD34 imunoreaktivne HSC ćelije (strelica).

5.2.3. CD34 imunoreaktivnost u posteljicama trećeg trimestra

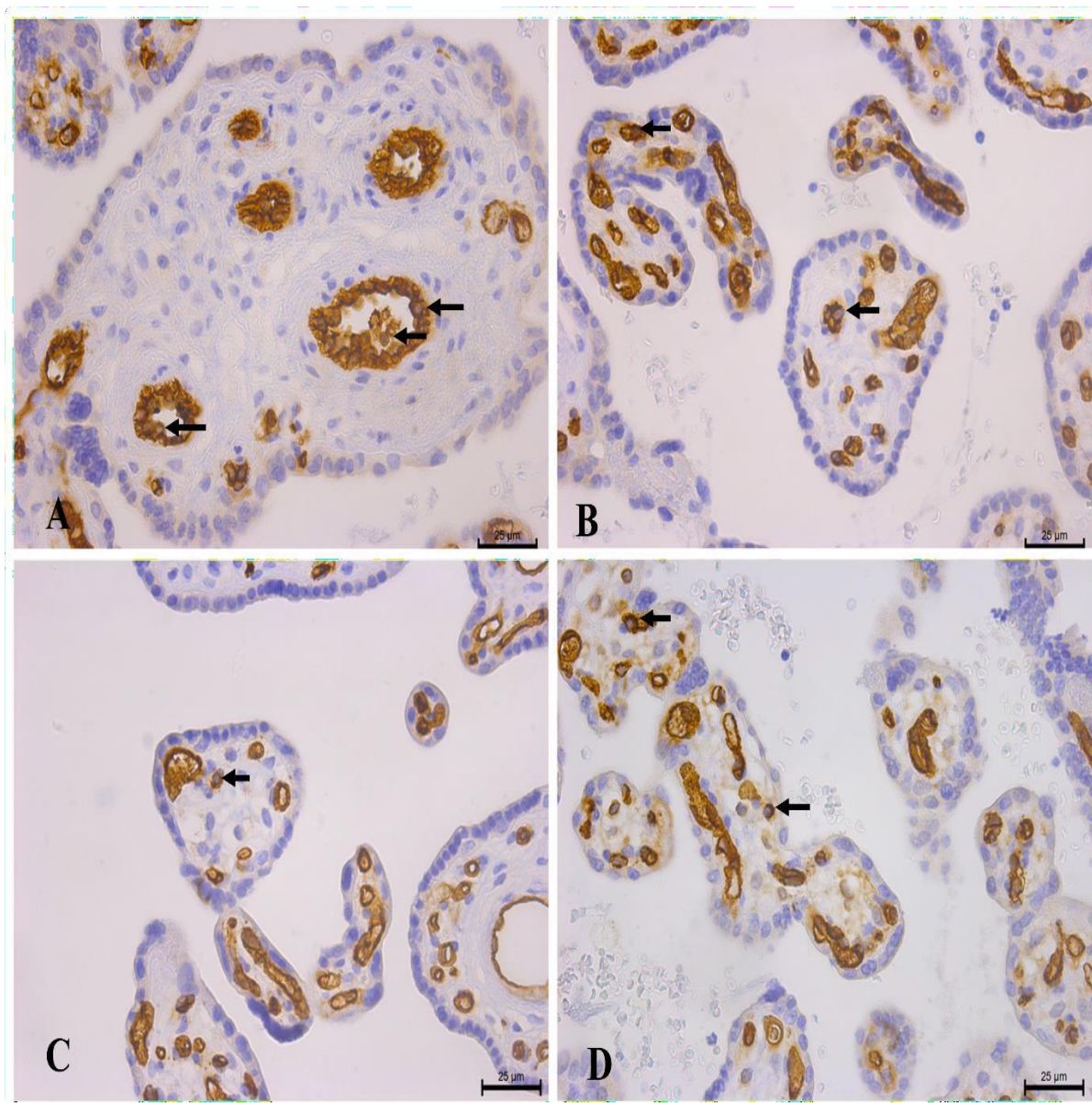
U tkivu posteljice trećeg trimestra hematopoetske matične ćelije i endotelne ćelije su CD34 imunoreaktivne.

Hematopoetske matične ćelije su visoko CD34 imunoreaktivne. HSCs ispoljavaju iste morfološke karakteristike kao i HSCs u prvom i drugom trimestru (Slika 25). Lokalizovane su unutar krvnih sudova i u bliskom su kontaktu sa endotelnim ćelijama krvnih sudova (Slika 26A i 26B). U velikim krvnim sudovima stabla horionskih resica HSCs su brojnije, dok se u kapilarima terminalnih resica uočavaju kao pojedinačne ćelije. Takođe, uočavamo ih i stromi horionske ploče i horionskih resica kao rijetke pojedinačne ćelije uronjene u mezenhim resica (Slika 26C i 26D).

Endotelne ćelije krvnih sudova u posteljici trećeg trimestra su visoko CD34 imunoreaktivne.



Slika 25. CD34 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije u humanim posteljicama trećeg trimestra (x1000). Hematopoetske matične ćelije se uočavaju u bliskom kontaktu sa endotelom krvnih sudova, a sastoje se od centralno postavljenog okruglog jedra, okruženog pojasom citoplazme (strelica).



Slika 26. CD34 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije u humanim posteljicama trećeg trimestra (x400). A, B) Unutar krvnih sudova stabla horionskih resica humanih posteljica trećeg trimestra se uočavaju CD34 imunoreaktivne HSC ćelije vezane za endotel krvnih sudova (strelica), koje takođe ispoljavaju CD34 imunoreaktivnost, u velikom broju, a unutar kapilara terminalnih resica se uočavaju pojedinačne CD34 imunoreaktivne HSC ćelije, takođe vezane za endotel kapilara; C, D) u stromi terminalnih horionskih resica se uočavaju pojedinačne CD34 imunoreaktivne HSC ćelije (strelice).

5.3. CD45 IMUNOREAKTIVNOST

CD45 imunoreaktivne ćelije su prisutne u humanim posteljicama u sva tri trimestra. Hematopoetske matične ćelije iskazuju visoku CD45 imunoreaktivnost tokom sva tri trimestra. Mogu se naći u različitim odjeljcima posteljice. Hofbauerove ćelije su visoko CD45 imunoreaktivne u prvom i drugom trimestru, dok je u trećem CD45 imunoreaktivnost odsutna (Tabela 4.).

Tabela 4. Intenzitet i imunoreaktivnosti CD45 pozitivnih ćelija u humanim posteljicama u različitim periodima razvoja

Period razvoja	HSCs	Hofbauerove ćelije
Prvi trimestar	+++	+++
Drugi trimestar	+++	+++
Treći trimestar	+++	-

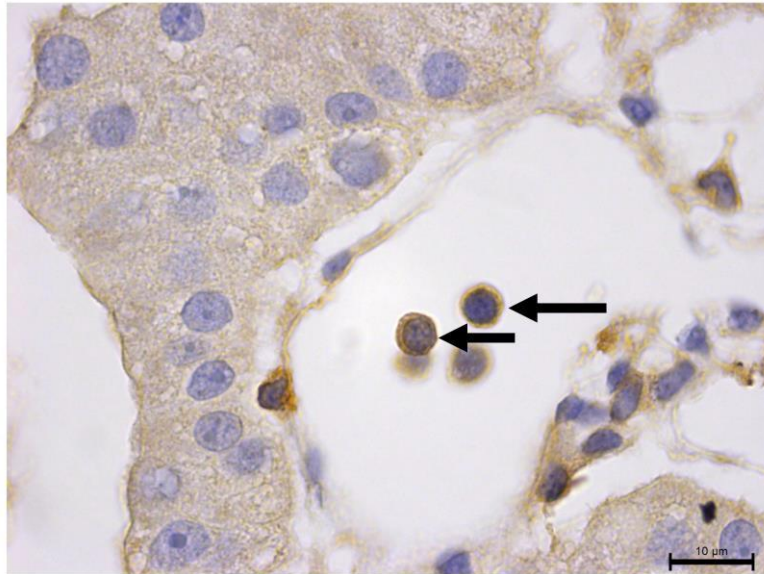
5.3.1. CD45 imunoreaktivnost u posteljicama prvog trimestra

U humanim posteljicama prvog trimestra hematopoetske matične ćelije i Hofbauerove ćelije su CD45 imunoreaktivne.

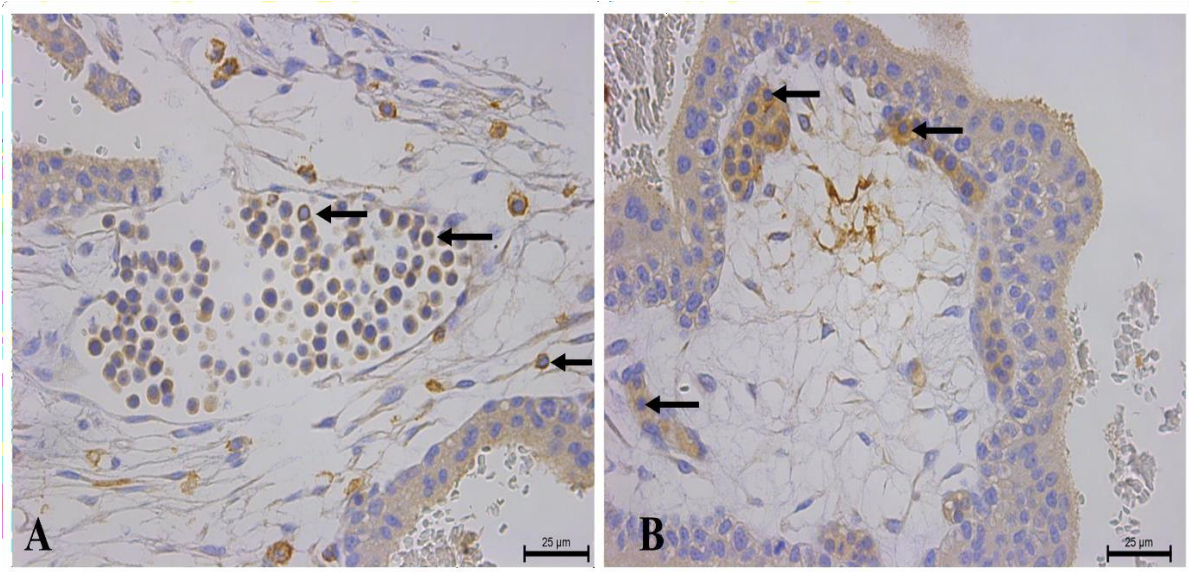
Hematopoetske matične ćelije su visoko CD45 imunoreaktivne. One ispoljavaju iste morfološke karakteristike kao i prethodno opisane CD34 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije (Slika 27). U najvećem broju ih nalazimo unutar lumena krvnih sudova horionske ploče i nezrelih intermedijalnih horionskih resica grupisane u klastere. Takođe, uočavaju se i kao pojedinačne ćelije u stromi mezenhimalnih i nezrelih intermedijalnih horionskih resica (Slika 28A i 28B).

Hofbauerove ćelije, odnosno posteljični makrofazi, su visoko CD45 imunoreaktivni. Uočavaju se u stromalnim kanalima nezrelih intermedijalnih resica. Veličina im je od 12 do 15 µm.

Posjeduju okruglo, ekscentrično postavljeno jedro promjera oko 6 μm i obilnu količinu citoplazme.



Slika 27. CD45 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije u humanim posteljicama prvog trimestra (x1000). Hematopoetske matične ćelije se uočavaju u lumenu krvnog suda, a sastoje se od centralno postavljenog okruglog jedra, okruženog pojasom citoplazme (strelice).



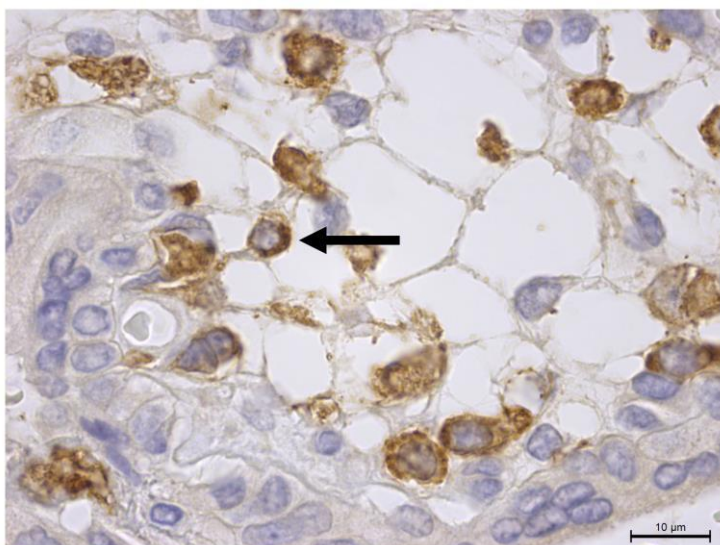
Slika 28. CD45 imunoreaktivnost u humanim posteljicama prvog trimestra (x400). A) Unutar lumena krvnih sudova i u stromi horionske ploče prvog trimestra uočavaju se pojedinačne visoko imunoreaktivne CD45 hematopoetske matične ćelije (strelica); **B)** unutar krvnih sudova horionskih resica prvog trimestra uočavaju se, u grupi, imunoreaktivne CD45 HSCs (strelica).

5.3.2. CD45 imunoreaktivnost u posteljicama drugog trimestra

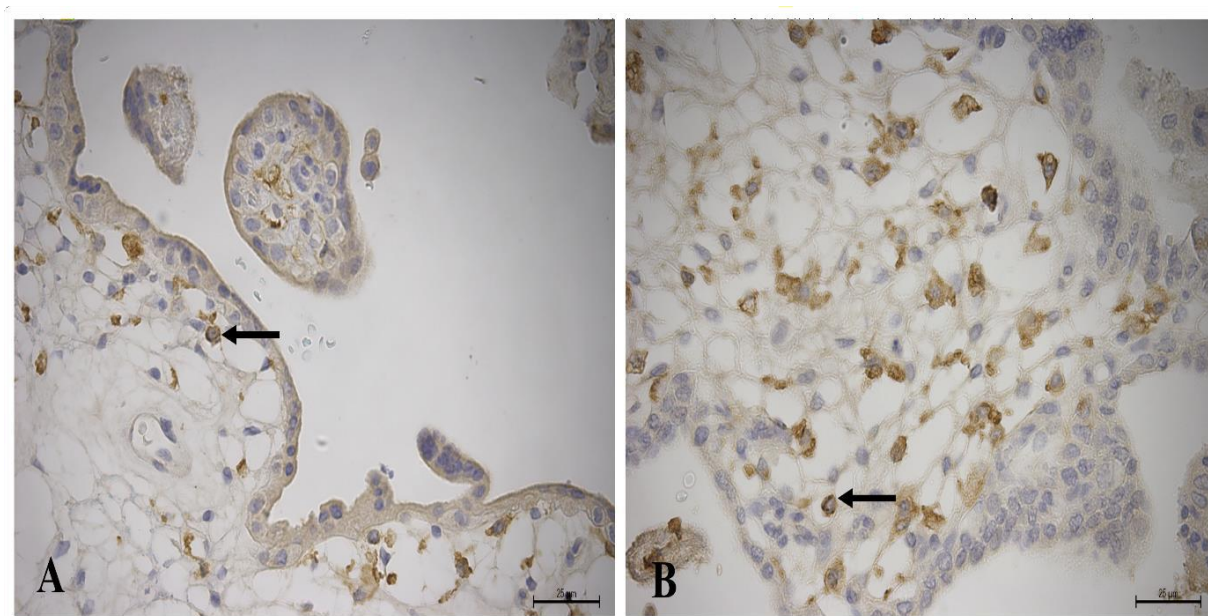
U humanim posteljicama drugog trimestra hematopoetske matične ćelije i Haubardove ćelije su CD45 imunoreaktivne.

Hematopoetske matične ćelije su visoko CD45 imunoreaktivne. HSCs izražavaju iste morfološke karakteristike kao i HSCs u prvom trimestru (Slika 29). Mogu se uočiti kao pojedinačne ćelije u lumenu velikih krvnih sudova stem horionskih resica. Takođe, nalazimo ih u mezenhimalnom vezivnom tkivu horionske ploče i intermedijarnih zrelih horionskih resica.

Haubardove ćelije u humanim posteljicama drugog trimestra su takođe visoko CD45 imunoreaktivne. Zadržavaju istu lokalizaciju u stromalnim kanalima horionskih resica, ali njihov broj raste u tkivu posteljice drugog trimestra (Slika 30A i 30B).



Slika 29. CD45 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije u humanim posteljicama drugog trimestra (x1000). Hematopoetske matične ćelije se uočavaju u mezenhimu horionske resice, a sastoje se od centralno postavljenog okruglog jedra, okruženog pojasom citoplazme (strelica).

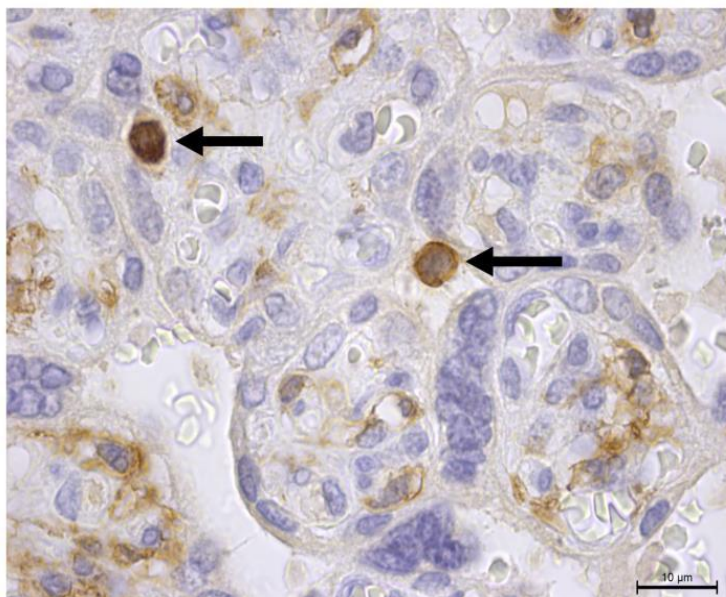


Slika 30. CD45 imunoreaktivnost u humanim posteljicama drugog trimestra (x400). A, B) visoko imunoreaktivne CD45 HSCs se uočavaju u stromi horionskih resica posteljica drugog trimestra kao pojedinačne ćelije (strelica).

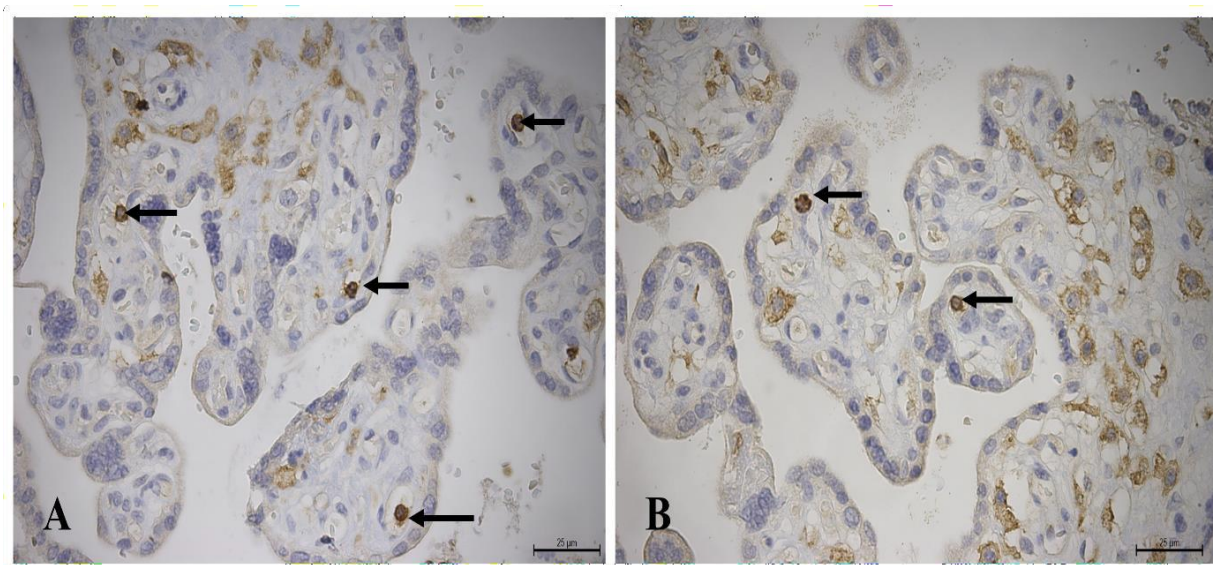
5.3.2. CD45 imunoreaktivnost u posteljicama trećeg trimestra

U tkivu posteljice trećeg trimestra hematopoetske matične ćelije su CD45 imunoreaktivne.

Hematopoetske matične ćelije su visoko CD45 imunoreaktivne. HSCs izražavaju iste morfološke karakteristike kao i HSCs u prvom i drugom trimestru (Slika 31). Lokalizovane su u krvnim sudovima horionske ploče i horionskih resica. Takođe, uočavamo ih i mezenhimu horionske ploče i u svim tipovima horionskih resica u posteljicama trećeg trimestra (Slika 32A i 32B).



Slika 31. CD45 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije u humanim posteljicama trećeg trimestra (x1000). Hematopoetske matične ćelije se uočavaju u lumenu krvnog suda, a sastoje se od centralno postavljenog okruglog jedra, okruženog pojasom citoplazme (strelica).



Slika 32. CD45 imunoreaktivnost u humanim posteljicama trećeg trimestra (x400). A, B) u stromi horionskih resica posteljica trećeg trimestra se uočavaju pojedinačne CD45 imunoreaktivne HSC ćelije (strelica).

5.4. CD117 IMUNOREAKTIVNOST

CD117 imunoreaktivne ćelije su prisutne u posteljicama sva tri trimestra. Hematopoetske matične ćelije zadržavaju visoku CD117 imunoreaktivnost tokom sva tri trimestra, dok se intenzitet sinciciotrofoblasta smanjuje tokom gestacije. Sinciciotrofoblasti su visoko CD117 imunoreaktivni tokom prva dva trimestra, dok je njihova imunoreaktivnost u trećem trimestru srednjeg intenziteta. Citotrofoblasti tokom prva dva trimestra su srednjeg stepena CD117 imunoreaktivnosti, dok je u trećem trimestru prisutna niska CD117 imunoreaktivnost. Hofbauerove ćelije su visoko CD117 imunoreaktivne tokom čitave gestacije (Tabela 5).

Tabela 5. Intenzitet i imunoreaktivnosti CD117 pozitivnih ćelija u humanim posteljicama u različitim periodima razvoja.

Period razvoja	HSCs	Sinciciotrofoblasti	Citotrofoblasti	Hofbauerove ćelije
Prvi trimestar	+++	+++	++	+++
Drugi trimestar	+++	+++	++	+++
Treći trimestar	+++	++	+	+++

5.4.1. CD117 imunoreaktivne ćelije u posteljicama prvog trimestra.

U tkivu posteljice prvog trimestra hematopoetske matične ćelije, trofoblastne ćelije, citotrofoblasti i sinciciotrofoblasti, kao i Hofbauerove ćelije su CD117 imunoreaktivne ćelije.

Hematopoetske matične ćelije su visoko CD117 imunoreaktivne. Morfološki ispoljavaju osobine slične limfocitima, veličina im je oko 7 mikrometara (Slika 33). Imaju centralno postavljeno okruglo jedro okruženo pojasom citoplazme. Smještene su kao grupa ćelija u lumenu krvnih sudova unutar horionske ploče i u nezrelim intermedijarnim horionskim resicama posteljice. Takođe, prisutne su i kao pojedinačne ćelije u stromi mezenhimalnih i nezrelim intermedijarnim horionskih resica (Slika 34A i 34B).

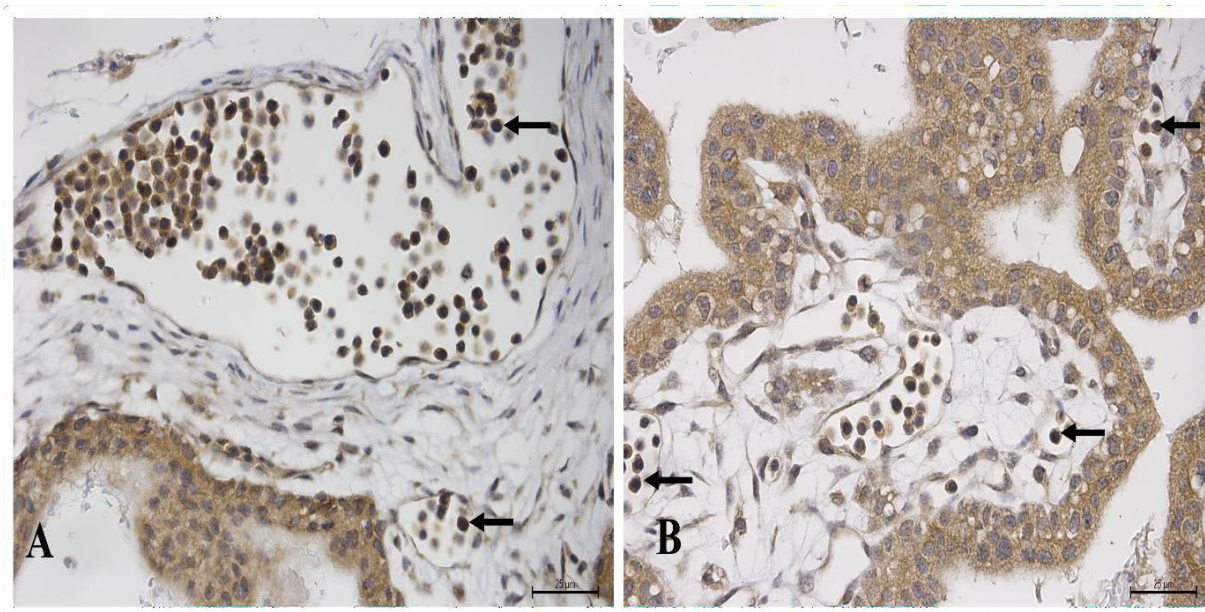
Sinciciotroblastne ćelije su visoko CD117 imunoreaktivne. Nalaze se na površini svih tipova horionskih resica. Cilindričnog su oblika, sa ovalnim jedrom i velikom količinom citoplazme, a veličina im se kreće od 8 do 10 μm .

Citotroblastne ćelije su srednjeg intenziteta CD117 imunoreaktivnosti. Smjestene su ispod sloja sinciciotroblasta. Posjeduju jasno vidljivo centralno postavljeno okruglo jedro okruženo obilnom citoplazmom. Promjer citotroblasta iznosi od 10 do 14 μm .

Hofbauerove ćelije u posteljicama prvog trimestra su visoko CD117 imunoreaktivne. Uočavaju se u stromalnim hodnicima intermedijarnih horionskih resica. Poligonalnog su oblika i posjeduju ekscentrično postavljeno okruglo jedro, okruženo velikom količinom citoplazme.



Slika 33. CD117 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije u humanim posteljicama prvog trimestra (x1000). Brojne hematopoetske matične ćelije u potpunosti ispunjavaju lumen krvnog suda (strelica). Hematopoetske matične ćelije se sastoje od centralno postavljenog okruglog jedra, okruženog pojasom citoplazme.



Slika 34. CD117 imunoreaktivnost u humanim posteljicama prvog trimestra (x400). A, B) visoko CD117 imunoreaktivne ćelije HSCs se uočavaju u stromi horionskih resica posteljica prvog trimestra kao pojedinačne ćelije (strelica).

5.4.2. CD117 imunoreaktivne ćelije u posteljicama drugog trimestra

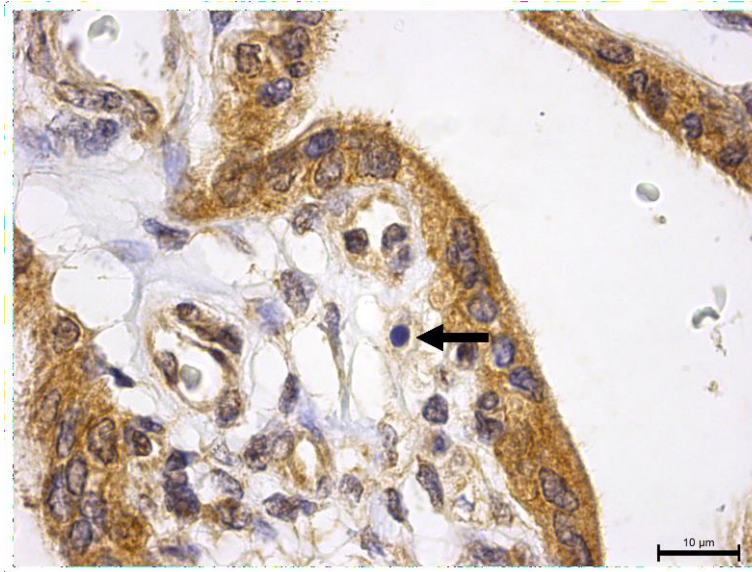
U tkivu posteljice drugog trimestra hematopoetske matične ćelije, trofoblastne ćelije, citotrofoblasti i sinciciotrofoblasti i Hofbauerove ćelije su CD117 imunoreaktivne ćelije.

Hematopoetske matične ćelije su visoko CD117 imunoreaktivne. Veličina im je oko 7 µm. Imaju centralno postavljeno okruglo jedro okruženo pojasom citoplazme (Slika 35). Hematopoetske matične ćelije nalazimo kao pojedinačne ćelije u stromi horionskih resica (Slika 36A i 36B).

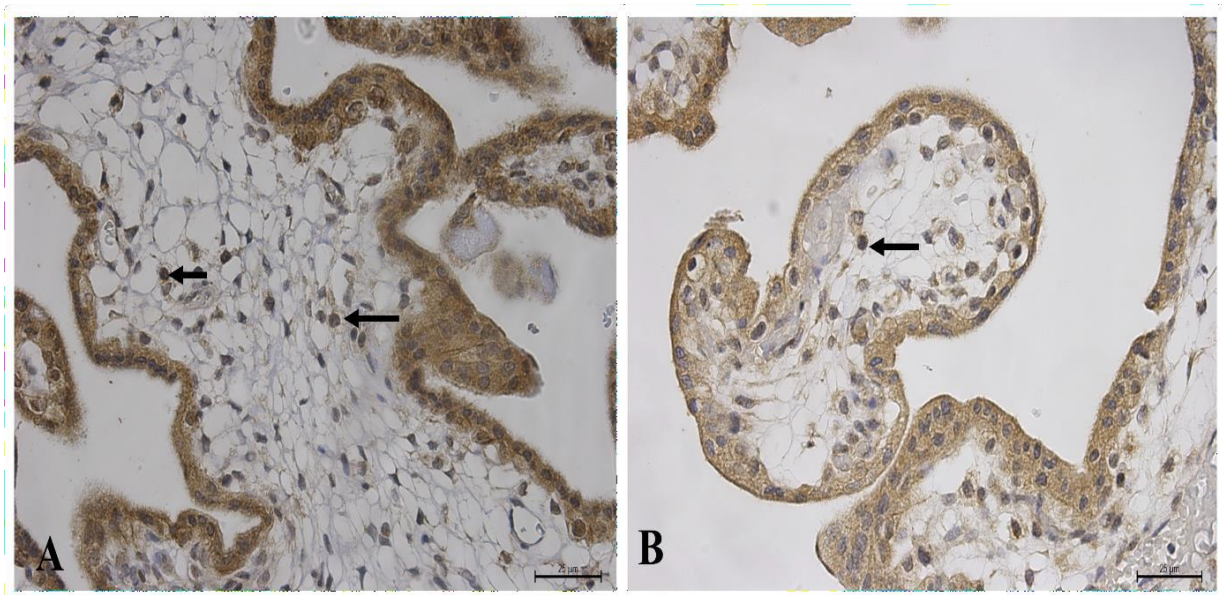
U humanim posteljicama drugog trimestra sinciciotrofoblast je visoko CD117 imunoreaktivan i nalazimo ih u zrelim intermedijarnim resicama.

Imunoreaktivnost citotrofoblastnih ćelija je srednjeg intenziteta u posteljicama drugog trimestra. Prisutne su u svim zrelim intermedijarnim resicama, ispod sinciciotrofoblasta.

Hofbauerove ćelije u posteljicama drugog trimestra su visoko CD117 imunoreaktivne. Brojne Hofbauerove ćelije se uočavaju u stromalnim hodnicima u zrelim intermedijarnim horionskim resicama.



Slika 35. CD117 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije u humanim posteljicama drugog trimestra (x1000). Hematopoetske matične ćelije se uočavaju u mezenhimu horionske resice (strelica), a sastoje se od centralno postavljenog okruglog jedra, okruženog pojasom citoplazme.

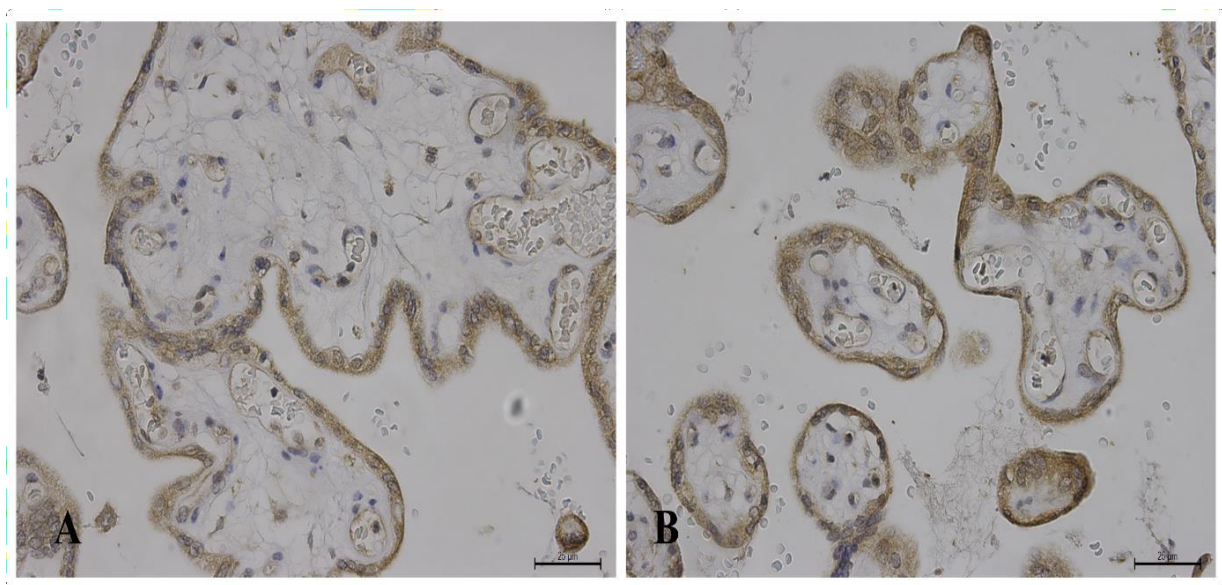


Slika 36. CD117 imunoreaktivnost u humanim posteljicama drugog trimestra (x400). A, B) visoko CD117 imunoreaktivne ćelije HSCs se uočavaju u stromi horionskih resica posteljica drugog trimestra kao pojedinačne ćelije (strelica).

5.4.3. CD117 imunoreaktivne ćelije u posteljicama trećeg trimestra

U tkivu posteljice trećeg trimestra trofoblastne ćelije, citotrofoblasti i sinciciotrofoblast su CD117 imunoreaktivne. Hematopoetske matične ćelije nisu prisutne u tkivu humane posteljice trećeg trimestra.

CD117 imunoreaktivnost trofoblastnih ćelija se smanjuje u tkivu humane posteljice u trećem trimestru, CD117 imunoreaktivnost sinciciotrofoblasta je srednjeg intenziteta, a citotrofoblasta niskog intenziteta (Slika 37A i 37B).



Slika 37. CD117 imunoreaktivnost u humanim posteljicama trećeg trimestra (x400). A, B) u stromi horionskih resica posteljica trećeg trimestra se ne uočavaju CD117 imunoreaktivne HSC ćelije, dok trofoblastne ćelije ispoljavaju CD117 imunoreaktivnost.

5.5. CD41 IMUNOREAKTIVNOST

CD41 imunoreaktivne ćelije su prisutne u posteljicama u sva tri trimestra. Hematopoetske matične ćelije su visoko CD41 imunoreaktivne u prva dva trimestra, dok se u trećem trimestru ne uočavaju. Fibroblasti su visoko CD41 imunoreaktivni tokom čitave gestacije (Tabela 6).

Tabela 6. Intenzitet i imunoreaktivnost CD41 pozitivnih ćelija u humanim posteljicama u različitim periodima razvoja

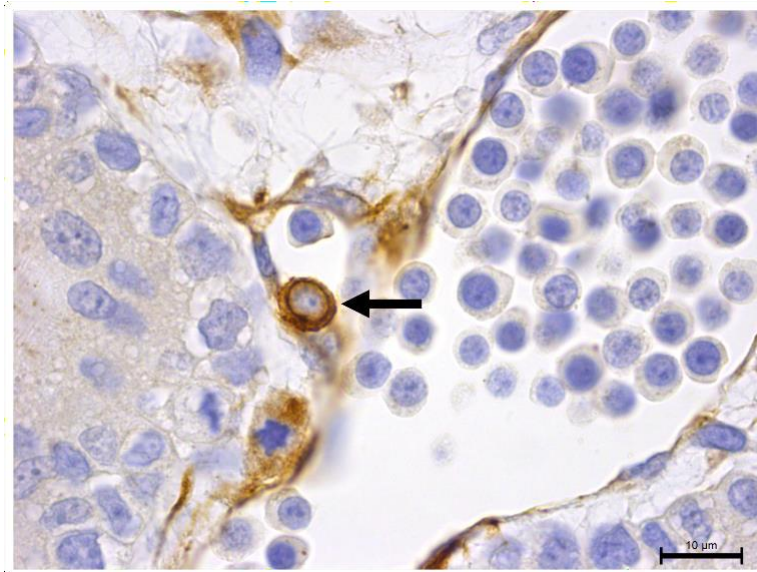
Period razvoja	HSCs	Fibroblasti
Prvi trimestar	+++	+++
Drugi trimestar	+++	+++
Treći trimestar	-	+++

5.5.1. CD41 imunoreaktivnost u posteljicama prvog trimestra

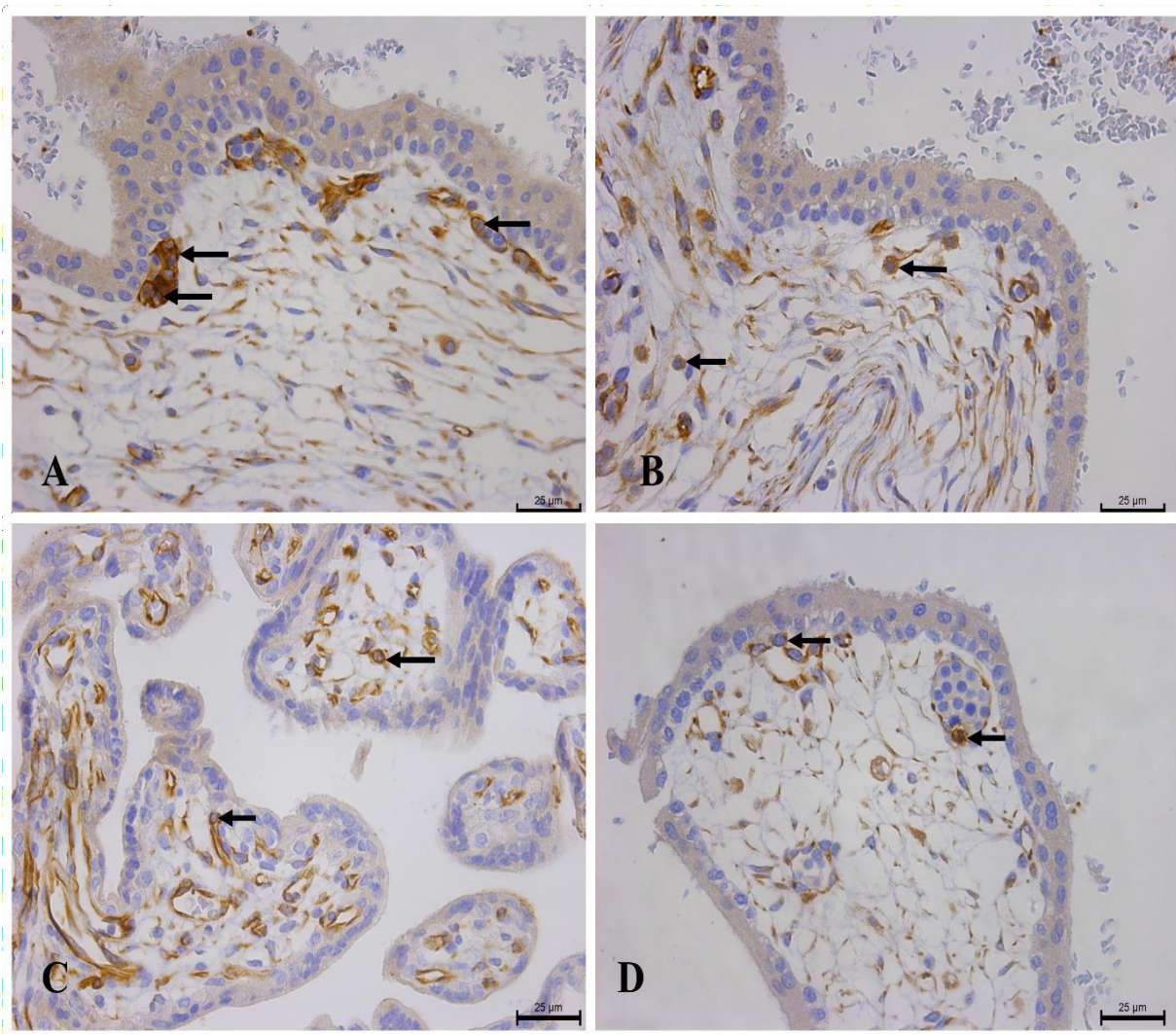
U tkivu posteljice prvog trimestra nalazimo CD41 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije i fibroblaste. CD41 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije su prisutne od 11. nedjelje gestacije.

Hematopoetske matične ćelije su visoko CD41 imunoreaktivne. Pokazuju istu morfologiju kao i CD34, CD45 i CD117 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije. Veličina im je od 6-7 mikrometara, jedro im je okruglog oblika i centralno postavljeno (Slika 38). U posteljicama prvog trimestra ih nalazimo u bliskom kontaktu sa endotelnim ćelijama krvnih sudova horionske ploče i horionskih resica (Slika 39A). Takođe, prisutne su i kao pojedinačne ćelije smještene duboko u mezenhimu horionske ploče i stromi horionskih resica (Slika 39B, 39C i 39D).

Fibroblasti su visoko CD41 imunoreaktivni. Jasno se uočavaju njihovi citoplazmatski produžeci u svim dijelovima posteljice.



Slika 38. CD41 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije u humanim posteljicama prvog trimestra (x1000). Hematopoetske matične ćelije se uočavaju u lumenu krvnog suda u bliskom kontaktu sa endotelom (strelica), a sastoje se od centralno postavljenog okruglog jedra, okruženog pojasom citoplazme.

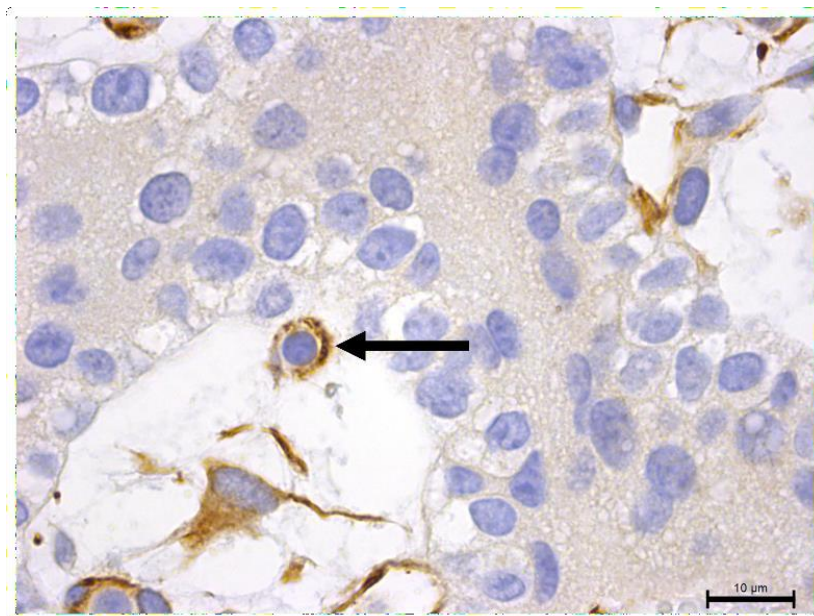


Slika 39. CD41 imunoreaktivne ćelije u humanim posteljicama prvog trimestra (x400). A) Unutar lumena krvnih sudova horionske ploče prvog trimestra uočavaju se visoko CD41 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije (strelica); **B)** u stromi horionske ploče prvog trimestra uočavaju se imunoreaktivne CD41 kao pojedinačne ćelije (strelica); **C, D)** visoko CD41 imunoreaktivne ćelije HSCs se uočavaju unutar krvnih sudova i u stromi horionskih resica posteljica prvog trimestra kao pojedinačne ćelije (strelica).

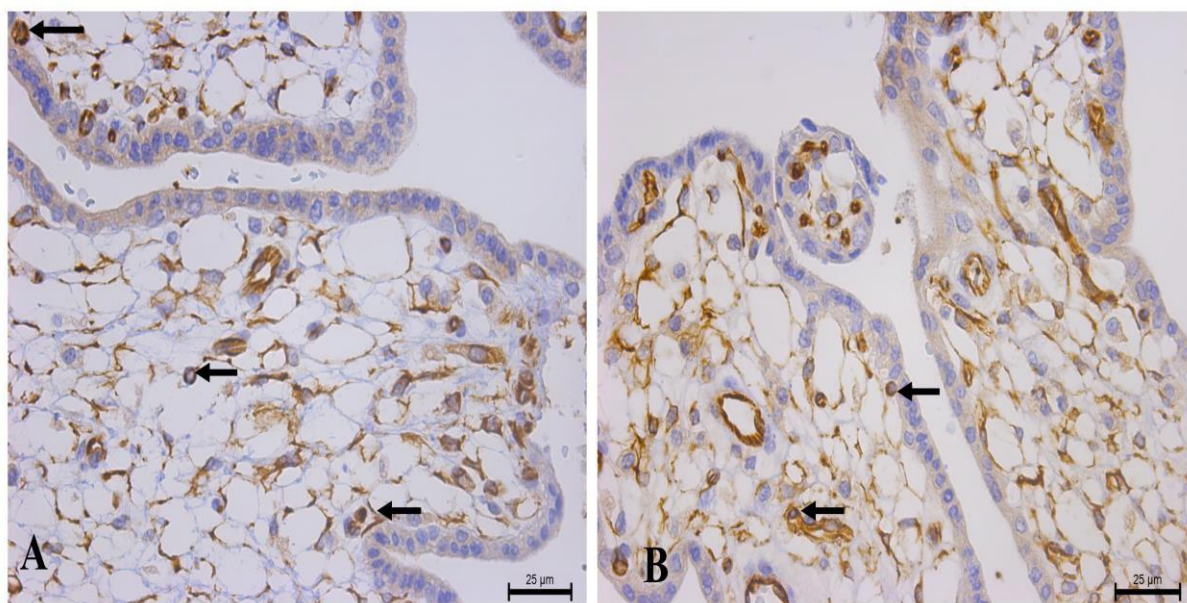
5.5.2. CD41 imunoreaktivnost u posteljicama drugog trimestra

U tkivu posteljice drugog trimestra nalazimo CD41 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije i fibroblaste. CD41 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije su prisutne do 22. nedjelje gestacije. Ispoljavaju iste morfološke karakteristike poput CD41 imunoreaktivnih HSC ćelija u prvom trimestru (Slika 40). Najveći broj je lokalizovan unutar mezenhima horionske ploče i strome horionskih resica kao pojedinačne ćelije (Slika 41A). Takođe, uočavaju se i unutar krvnih sudova, ali u manjem broju nego u prvom trimestru (Slika 41B).

Poput fibroblasta iz prvog trimestra, i u drugom trimestru nalazimo visoko CD41 imunoreaktivne fibroblaste iste morfologije i lokalizacije kao u prvom trimestru.



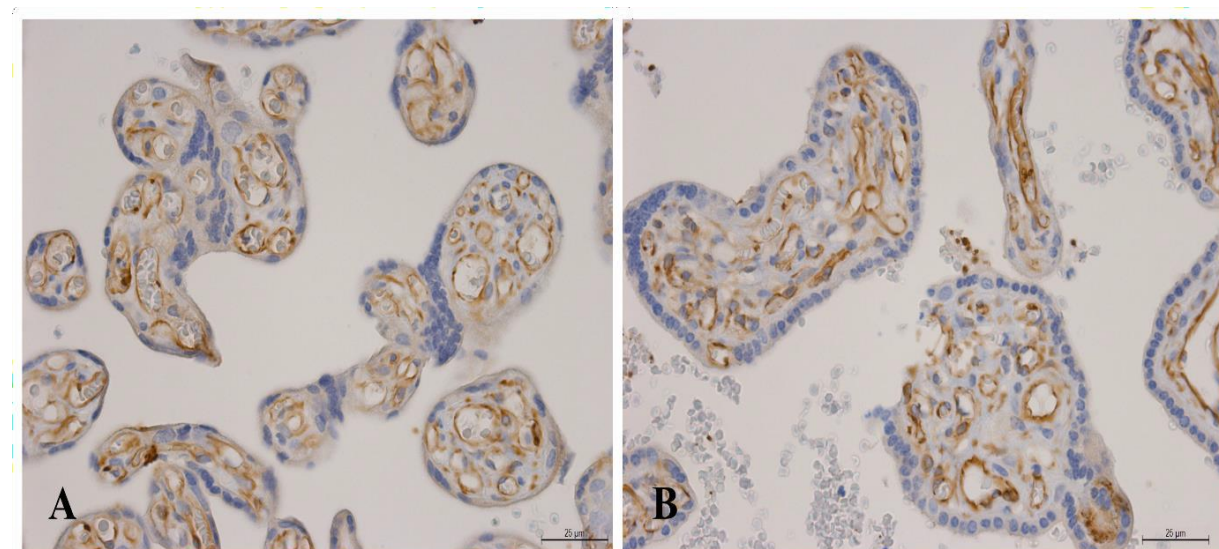
Slika 40. CD41 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije u humanim posteljicama drugog trimestra (x1000). Hematopoetske matične ćelije se uočavaju u lumenu krvnog suda u bliskom kontaktu sa endotelom (strelica), a sastoje se od centralno postavljenog okruglog jedra, okruženog pojasom citoplazme.



Slika 41. CD41 imunoreaktivne ćelije u humanim posteljicama drugog trimestra (x400). A, B) visoko CD41 imunoreaktivne ćelije HSCs se uočavaju unutar krvnih sudova i u stromi horionskih resica posteljica drugog trimestra kao pojedinačne ćelije (strelica).

5.5.3. CD41 imunoreaktivnost u posteljicama trećeg trimestra

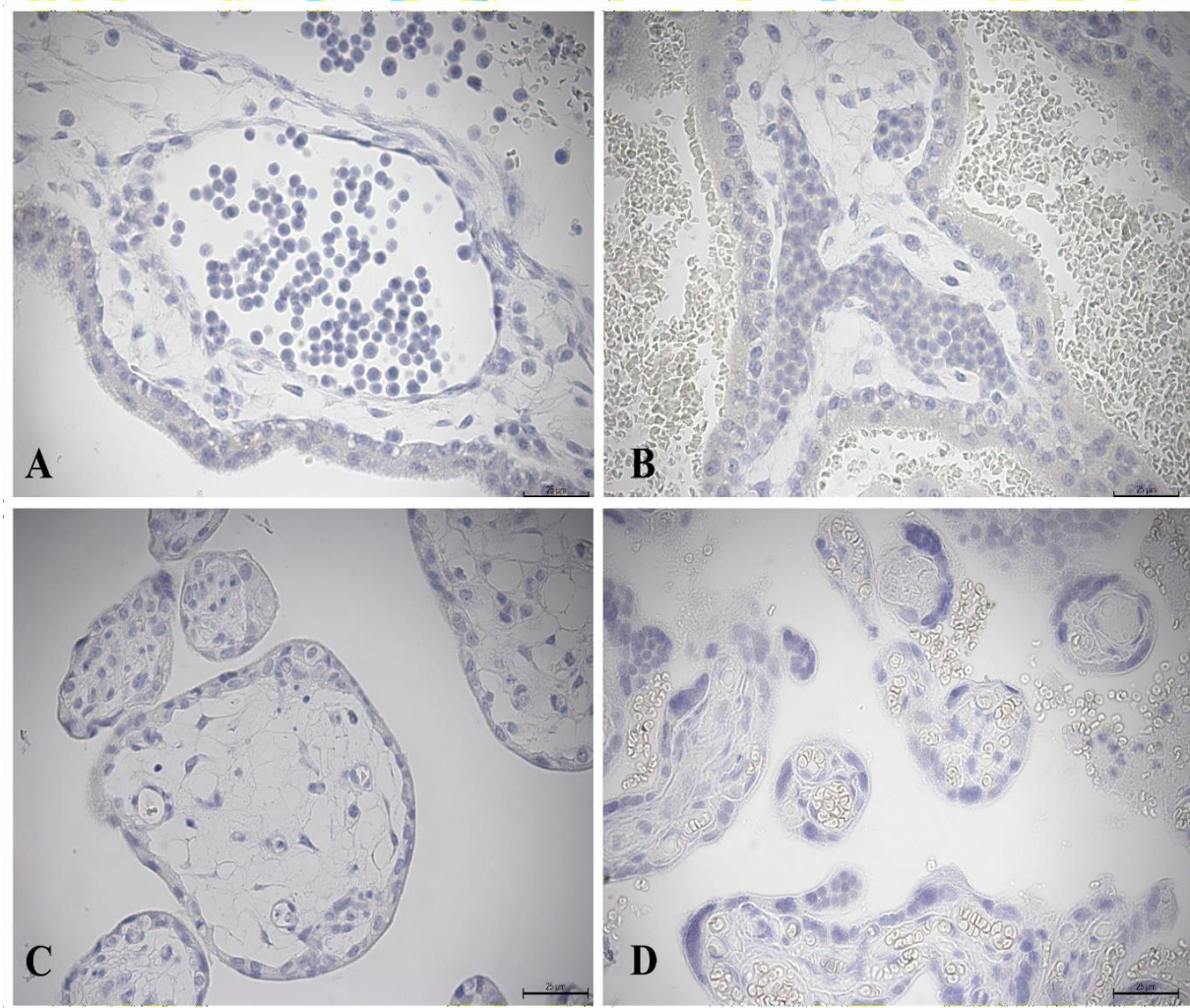
U tkivu posteljice trećeg trimestra nalazimo samo visoko CD41 imunoreaktivne fibroblaste (Slika 42A i 42B).



Slika 42. CD41 imunoreaktivne ćelije u humanim posteljicama trećeg trimestra (x400). A, B) u stromi horionskih resica posteljica trećeg trimestra se ne uočavaju CD41 imunoreaktivne HSC ćelije, dok CD41 imunoreaktivnost ispoljavaju samo fibroblasti.

5.6. CD38 IMUNOREAKTIVNOST

CD38 imunoreaktivne ćelije nisu prisutne u humanim posteljicama tokom čitave gestacije. (Slika 43.)



Slika 43. CD38 imunoreaktivne ćelije u humanim posteljicama prvog, drugog i trećeg trimestra (x400). A, B) u strukturama horionske ploče i horionskih resica humane posteljice prvog trimestra ne uočavaju se imunoreaktivne CD38 ćelije; C, D) u strukturama horionskih resica humane posteljice drugog i trećeg trimestra ne uočavaju se imunoreaktivne CD38 ćelije.

5.7. NUMERIČKA AREALNA GUSTINA HEMATOPOETSKIH MATIČNIH ĆELIJA U POSTELJICAMA RAZLIČITE STAROSTI

5.7.1. Numerička arealna gustina CD34 imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija

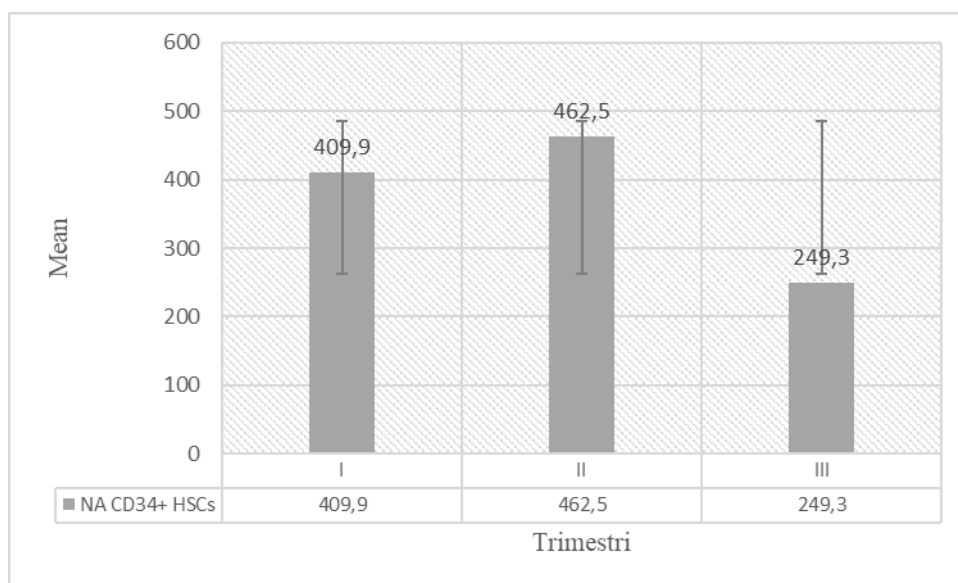
Numerička arealna gustina CD34 HSCs ćelija je najviša u drugom trimestru, njena srednja vrijednost je iznosila $462,5 \pm 174,8$. Vrijednosti N_A su nešto niže u prvom trimestru ($409,9 \pm 244,3$), dok su u trećem trimestru najniže i iznosila je $249,3 \pm 59,8$.

Primjenom T-testa za nezavisne uzorke, utvrđeno je da postoji značajna razlika u aritmetičkim sredinama između drugog i trećeg trimestra ($p=0,01$), te da nema statistički značajne razlike u aritmetičkim sredinama između prvog i drugog trimestra ($p=0,6$), niti u vrijednostima aritmetičkih sredina između prvog i trećeg trimestra ($p=0,07$), (Tabela 7), (Slika 44).

Tabela 7. Numerička arealna gustina CD34 imunoreaktivnih ćelija u humanim posteljicama prvog, drugog i trećeg trimestra.

Period razvoja	Srednja vrijednost	SD	<i>P</i>
Prvi trimestar	409,9	244,3	0,04*
Drugi trimestar	462,5	174,8	
Treći trimestar	249,3	59,8	

SD: standardna devijacija; statistička značajnost, $p \leq 0,05$; ** visoka statistička značajnost, $p < 0,001$.



Slika 44. Numerička arealna gustina CD34 imunoreaktivnih matičnih ćelija u humanim posteljicama prvog, drugog i trećeg trimestra (Student T test).

5.7.2 Numerička arealna gustina CD45 imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija

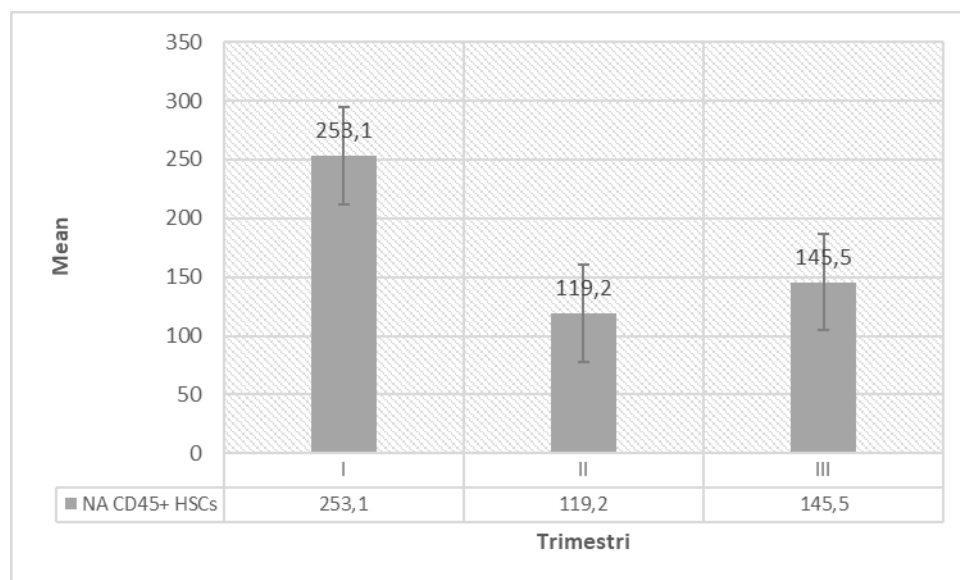
Numerička arealna gustina CD45 HSCs ćelija je najviša u prvom trimestru, njena srednja vrijednost je iznosila $253,1 \pm 165,6$, dok su najniže vrijednosti zapažene u drugom trimestru ($119,2 \pm 37,3$). Srednja vrijednost N_A u trećem trimestru je iznosila $145,5 \pm 27,2$.

S obzirom na to da je uočena statistički značajna razlika (ANOVA, $p < 0,05$), urađena je multipla komparacija da se vidi između kojih aritmetičkih sredina ima razlike. Primjenom T-testa za nezavisne uzorke, utvrđeno je da postoji značajna razlika u aritmetičkim sredinama između prvog i drugog trimestra ($p = 0,03$), te da nema statistički značajne razlike u aritmetičkim sredinama između drugog i trećeg trimestra ($p = 0,14$), niti u vrijednostima aritmetičkih sredina između prvog i trećeg trimestra ($p = 0,17$), (Tabela 8), (Slika 45).

Tabela 8. Numerička arealna gustina CD45 imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija u humanim posteljicama različitog perioda razvoja

Period razvoja	Srednja vrijednost	SD	P
Prvi trimestar	253,1	165,6	0,03*
Drugi trimestar	119,2	37,3	
Treći trimestar	145,5	27,2	

SD-standardna devijacija, statistička značajnost, $p \leq 0,05$; ** visoka statistička značajnost, $p < 0,001$, (Student T test).



Slika 45. Numerička arealna gustina CD45 imunoreaktivnih matičnih ćelija u humanim posteljicama prvog, drugog i trećeg trimestra (Student T test).

5.7.3. Numerička arealna gustina CD117 imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija

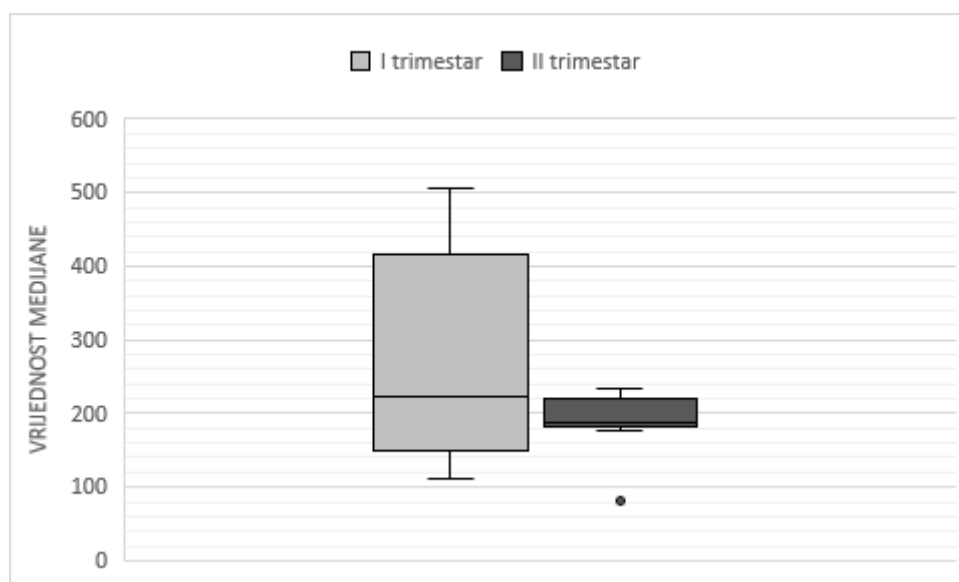
Numerička arealna gustina CD117 imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija je najviša u prvom trimestru i iznosila je $222,2 \pm 118,2$, dok je u drugom trimestru iznosila $187,5 \pm 23,8$. U trećem trimestru nisu prisutne hematopoetske matične ćelije.

Normalnost raspodjele numeričkih podataka je ispitivana Shapiro-Wilk testom ($p < 0,001$) (nije utvrđena normalnost raspodjele podataka), te se za dalju obradu podataka koristio Man-Vitni test. Nije utvrđena značajna razlika u medijanama između prvog i drugog trimestra ($p > 0,05$), (Tabela 9), (Slika 46).

Tabela 9. Numerička arealna gustina CD117 imunoreaktivnih hematopoteskih matičnih ćelija u humanim posteljicama različitog perioda razvoja

Period razvoja	Medijana	IQR	<i>P</i>
Prvi trimestar	222,2	118,2	0,18
Drugi trimestar	187,5	23,8	
Treći trimestar	0	0	

IQR: interkvartalni opseg; statistička značajnost, $p \leq 0,05$; ** visoka statistička značajnost, $p < 0,001$, (Man-Vitni test).



Slika 46. Numerička arealna gustina CD117 imunoreaktivnih ćelija u humanim posteljicama prvog, drugog i trećeg trimestra, (Man-Vitni test).

5.7.4. Numerička arealna gustina CD41 imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija

Srednja vrijednost numeričke arealne gustine CD41 imunoreaktivnih HSCs, na dva uzorka, iznosila je $54,1 \pm 1,9$ u prvom trimestru. Srednja vrijednost numeričke arealne gustine određena na četiri uzorka posteljice drugog trimestra iznosila je $49,6 \pm 8,7$. Zbog veličine uzorka nije bilo moguće izvršiti poređenje vrijednosti numeričke arealne gustine CD41 imunoreaktivnih ćelija (Tabela 10).

Tabela 10. Numerička arealna gustina CD41 imunoreaktivnih hematopoteskih matičnih ćelija u humanim posteljicama različitog perioda razvoja

Period razvoja	Srednja vrijednost	SD
Prvi trimestar n=2	54,1	1,9
Drugi trimestar n=4	49,6	8,7
Treći trimestar	0	0

SD-standardna devijacija, n-broj uzoraka

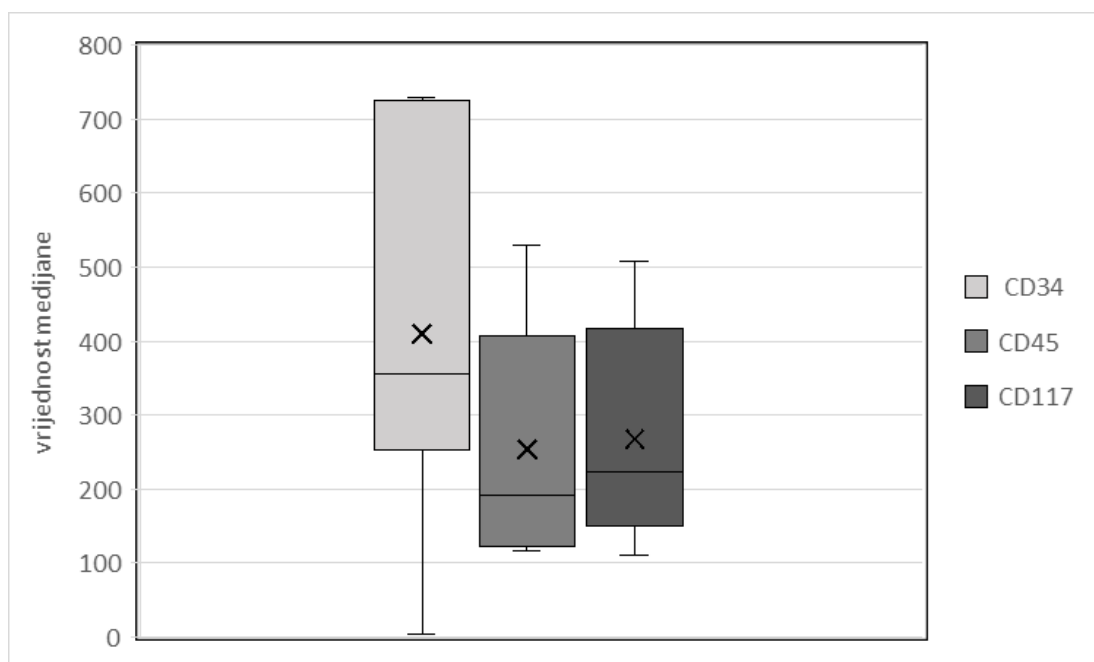
5.8. POREĐENJE NUMERIČKE AREALNE GUSTINE RAZLIČITIH POPULACIJA IMUNOREAKTIVNIH HEMATOPOETSKIH MATIČNIH ĆELIJA U PRVOM TRIMESTRU

Da bi smo utvrdili da li postoji statistički značajna razlika između N_A CD34, CD45 i CD117 imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija u prvom trimestru izvršili smo poredjenje srednjih vrijednosti izmjerenih N_A . Zbog malog broja uzoraka u kojima su detektovane CD41 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije, iste nisu korištene. Primjenom Kruskal-Wallis testa utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između N_A navedenih populacija hematopoetskih matičnih ćelija ($p=0,19$), (Tabela 11), (Slika 47).

Tabela 11. Zastupljenost različitih populacija HSCs u prvom trimestru.

HSCs	Median	IQR	<i>P</i>
CD34	354,9	379,8	0,19
CD45	190,9	207,3	
CD117	222,2	118,2	

Podaci su izraženi kao medijan (interkvartilni raspon: IQR). *statistička značajnost, $p \leq 0,05$; **vrlo visoka statistička značajnost, $p < 0,001$, (Kruskal-Wallis test).



*Podaci nisu normalno raspoređeni i prikazani su u obliku *box plota-a*.

Slika 47. *Box plot* srednjih vrijednosti numeričke arealne gustine CD34, CD117 i CD45 u prvom trimestru.

5.9. POREĐENJE NUMERIČKE AREALNE GUSTINE RAZLIČITIH POPULACIJA IMUNOREAKTIVNIH HEMATOPOETSKIH MATIČNIH ĆELIJA U DRUGOM TRIMESTRU

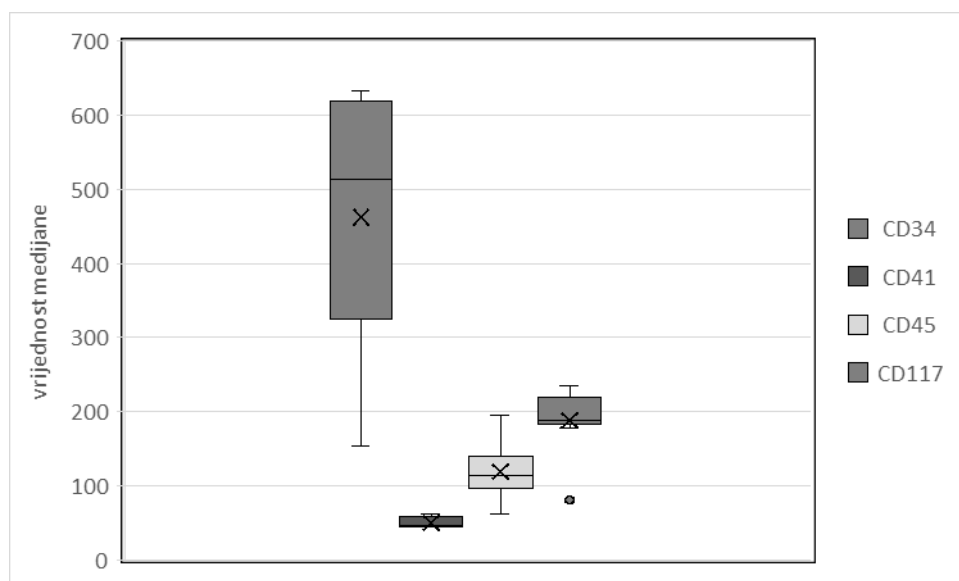
Da bi smo utvrdili da li postoji statistički značajna razlika između N_A različitih populacija imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija u posteljicama drugog trimestra, izvršili smo poredjenje srednjih vrijednosti izmjerenih N_A CD34, CD117, CD45 i CD41 imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija. Kruskal-Wallis testom je utvrđeno da postoji vrlo visoka statistička značajnost između ispitivanih grupa ($p < 0.001$), (Tabela 12), (Slika 48).

Tabela 12. Zastupljenost različitih populacija HSCs u drugom trimestru

HSCs	Median	IQR	<i>P</i>
CD34	513	282.6	<0.001**
CD45	114.2	29.5	
CD117	187.5	23.8	
CD41	45.8	6.6	

Podaci su izraženi kao medijan (interkvartilni raspon: IQR). *statistička značajnost, $p \leq 0,05$;

**vrlo visoka statistička značajnost, $p < 0,001$, (Kruskal-Wallis test).



*Podaci nisu normalno raspoređeni i prikazani su u obliku box plot-a.

Slika 48. Box plot medijana vrijednosti numeričke arealne gustine za CD34, CD117, CD45, CD41 u drugom trimestru.

6. DISKUSIJA

6.1. OPŠTA RAZMATRANJA

Humana posteljica, koja se do nedavno smatrala isključivo privremenim organom za razmenu materija između majke i fetusa tokom trudnoće, sve više privlači pažnju kao bogat i etički prihvatljiv izvor matičnih ćelija za potrebe regenerativne medicine. Kao privremeni, ali izuzetno kompleksan organ, posteljica sadrži više vrsta matičnih ćelija koje potiču iz fetalnih i majčinskih tkiva, uključujući hematopoetske matične ćelije, mezenhimalne matične ćelije, endotelne progenitorske ćelije, kao i trofoblastne ćelije [101, 102]. Ova raznolikost čini posteljicu jedinstvenim rezervoarom ćelija sa multipotentnim, pa čak i pluripotentnim osobinama, koje se mogu koristiti u terapiji brojnih oboljenja.

Hematopoetske matične ćelije iz posteljice, naročito one iz fetalne vaskularne komponente horionskih resica i iz krvnih sudova pupčanika, pokazale su visok kapacitet samoobnavljanja i sposobnost diferencijacije u sve krvne linije. Za razliku od odraslih hematopoetskih matičnih ćelija iz koštane srži, posteljične hematopoetske matične ćelije ispoljavaju veći proliferativni potencijal i manju imunogeničnost, što ih čini pogodnim za alogenu transplantaciju. Takođe, posteljica omogućava prikupljanje većih količina hematopoetskih ćelija, jer se može obrađivati čitava tkivna masa, a ne samo krvna komponenta, kao što je slučaj kod krvi iz pupčanika [103]. Uzimajući u obzir njenu dostupnost i činjenicu da se rutinski odbacuje nakon porođaja, posteljica predstavlja praktičan i neinvazivan izvor ćelija za kliničku upotrebu.

Tokom razvoja građa humane posteljice prolazi kroz različite faze razvoja koje se prilagođavaju potrebama rastućeg ploda. U prvom trimestru posteljica je u fazi intenzivnog razvoja i diferencijacije. Ključna struktura su horionske resice koje u ovoj fazi prolaze kroz tri stadija: primarne, sekundarne (mezenhimske) i tercijarne (definitivne) resice. Tercijarne resice, koje nastaju do 20. dana, sastoje se od sinciotrofoblastnih ćelija, citotrofoblastih ćelija i strome bogate mezenhimalnim ćelijama. U stromi se formiraju krvni kapilare, a prisutne su i Hofbauerove ćelije [6,7]. U ovom periodu trudnoće, plod se ne hrani direktno putem posteljice, jer ona još nije potpuno razvijena i funkcionalna. Ishrana ploda u ovom periodu odvija se prvenstveno putem žumančane vreće (viteline vreće), koja je glavni izvor hranjivih tvari, vitamina i minerala za embrion u ranim nedeljama razvoja, tačnije do 13. nedelje gestacije. Zato

se u ovom periodu razvoja prostori između horionskih resica nisu ispunjeni krvlju majke. Takođe, podatak koji govori u prilogu navedenog načina ishrane, je i sastav i debljina posteljične membrane. U posteljicam prvog trimestra krvni sudovi su smješteni duboko u stromi horionskih veziva, a od interviloznih prostora ih dijeli bogato vezivo i dva sloja trofoblastnih ćelija, što bi transport hranjivih materija i između krvi majke i krvi ploda bio izuzetno otežan. U ovom periodu promjer posteljične membrane iznosi i do 30 μm [34]. Žumančana vreća opskrbljuje plod nutrijentima sve dok posteljica ne preuzme tu funkciju, što se događa krajem prvog i početkom drugog trimestra. U prvom trimestru u izgradnji horionske ploče ne učestvuje amnionska membrana. Tek sa napredovanjem gestacije, krajem prvog i početkom drugog trimestra, dolazi do spajanja amnionske membrane sa horionskom pločom, te oni postaju jedna cijelina.

Sa napredovanjem gestacije dolazi do progresivnog povećanja zapremine svih slojeva posteljičnog tkiva, što odražava intenzivan razvoj i prilagođavanje posteljice potrebama rastućeg fetusa. Iako osnovna histološka građa horionske i bazalne ploče ostaje relativno stabilna tokom sva tri trimestra trudnoće, najizraženije morfološke i funkcionalne promene dešavaju se unutar horionskog stabla, koje predstavlja ključnu strukturu za razmenu gasova, nutrijenata i metaboličkih produkata između majke i ploda.

Tokom trudnoće, vaskularna arhitektura horionskih resica se značajno modifikuje. U stromi dolazi do progresivne angiogeneze, što dovodi do umnožavanja kapilara i formiranja gustog kapilarnog mrežnog sistema koji omogućava efikasniju fetoplacentarnu cirkulaciju. Paralelno sa tim, u stromi se uočava povećano prisustvo kolagenih vlakana, što doprinosi mehaničkoj stabilnosti resica. Istovremeno dolazi do postepenog nestajanja stromalnih kanala, čime se stroma sve više organizuje u kompaktniju i funkcionalno zreliju strukturu.

Dinamika trofoblastnih ćelija takođe se menja tokom gestacije. Citotrofoblast, koji u ranijim fazama trudnoće formira jasno izražen sloj ispod sinciciotrofoblasta, u kasnijim fazama sve više regredira. U trećem trimestru, sloj citotrofoblasta se gotovo u potpunosti povlači, ostavljajući sinciciotrofoblast kao jedini preostali sloj trofoblasta na površini horionskih resica. Ova promena doprinosi tanjenju barijere između majčine i fetalne krvi, što omogućava efikasniju razmenu materija u završnim fazama fetalnog razvoja.

Većina dostupnih istraživanja koja se bave procesom prenatalne hematopoeze sprovodi se primarno na animalnim modelima, uključujući različite sojeve miševa i pacova. U tim studijama primenjuju se sofisticirane eksperimentalne metode kao što su imunohistohemijska analiza, morfometrijske tehnike, protočni citometar i *in vitro* ćelijske kulture, koje omogućavaju

detaljno praćenje ekspresije specifičnih hematopoetskih markera i proučavanje funkcionalnih karakteristika ćelijskih populacija tokom embriogeneze. Ovakvi modeli su dragocijeni za razumjevanje osnovnih mehanizama hematopoeze, ali je važno napomenuti da postoje određene interspecies razlike u temporalnom i prostornom rasporedu hematopoetskih niša, ekspresiji markera, kao i u dinamici ćelijske diferencijacije, što mora biti uzeto u obzir prilikom interpretacije rezultata i njihove primene na ljudsku biologiju.

U okviru našeg istraživanja, oslanjajući se na prethodno validirane nalaze, koristili smo pet specifičnih imunofenotipskih markera za detekciju hematopoetskih matičnih ćelija, navedenih u poglavlju Materijal i metode, za koje je pokazano da imaju ključnu ulogu u ranom hematopoetskom razvoju. Ova strategija omogućila nam je preciznu identifikaciju i razlikovanje više različitih populacija hematopoetskih matičnih ćelija u humanom posteljičnom tkivu, koje do sada nisu bile u potpunosti karakterisane u kontekstu gestacione starosti i anatomskog položaja unutar posteljice.

Naši rezultati pružaju dodatne dokaze o kompleksnoj i višeslojnoj ulozi posteljice u hematopoetskoj ontogenezi. Posteljica, tradicionalno posmatrana kao organ odgovoran za transport hranljivih materija i gasova između majke i fetusa, sve više se prepoznaje i kao funkcionalna hematopoetska niša [104,105]. Naši podaci potvrđuju da posteljica poseduje dvostruku ulogu u ovom procesu: s jedne strane, djeluje kao aktivni hematopoetski organ sposoban za *de novo* produkciju rezidentnih HSCs ćelija, dok sa druge strane služi kao tranzitorna mikrookolina za hematopoetske ćelije koje migriraju iz drugih lokalizacija kao što su žumančana kesa, fetalna jetra ili kasnije fetalna koštana srž.

Posebno je značajno što su identifikovane populacije HSCs ćelija pronađene u različitim anatomskim regijama posteljice, uključujući horionske resice i intervillozni prostor što ukazuje na regionalnu specifičnost i moguću funkcionalnu diverzifikaciju hematopoetskih niša. Njihova distribucija i brojana zastupljenost pokazali su se kao dinamički parametri koji zavise od gestacione starosti, sa potencijalnim kliničkim implikacijama za izbor optimalnog vremena prikupljanja ćelija za potrebe terapijske upotrebe. Detektovane ćelije izražavale su markere karakteristične za rani stadijum hematopoeze, uključujući one povezane sa linijskom multipotentnošću, što dodatno ukazuje na prisustvo funkcionalno sposobnih progenitorskih populacija.

Na kraju, vrijedi naglasiti da su sve identifikovane ćelijske populacije nosile genetske i fenotipske karakteristike fetalnog porekla [106], čime se potvrđuje da posteljica, osim što ima ulogu u razmijeni materija između majke i ploda, aktivno doprinosi razvoju fetalnog

hematopoetskog sistema. Ova otkrića otvaraju vrata novim terapijskim mogućnostima, naročito u kontekstu prenatalne dijagnostike i ćelijskih terapija, uz potencijal za izolaciju autolognih fetalnih hematopoetskih matičnih ćelija sa minimalnim etičkim i proceduralnim rizicima.

Osim u hematologiji, HSC iz placente su pokazale potencijal i u imunoterapiji. Posebno su značajna istraživanja koja ukazuju na sposobnost diferencijacije placentalnih HSC u funkcionalne prirodne ćelije ubice (NK ćelije), koje poseduju sposobnost da prepoznaju i eliminišu tumorske i virusima inficirane ćelije bez prethodne senzibilizacije. NK ćelije dobijene iz placentalnih izvora su u prekliničkim i kliničkim studijama pokazale efikasnost u tretmanu limfoma, leukemija, kao i hroničnih virusnih infekcija otpornih na standardne antivirusne terapije [107,108].

Međutim, uprkos brojnim prednostima posteljice kao izvora matičnih ćelija, postoje i značajni izazovi koji trenutno ograničavaju njihovu širu kliničku primenu. Proces izolacije HSC iz posteljičnog tkiva je tehnički zahtevniji u poređenju sa izolacijom ćelija iz koštane srži ili pupčane krvi. Potrebna je enzimaska digestija i višestepena obrada tkiva kako bi se izdvojile ćelije u dovoljnoj količini i čistoći za kliničku upotrebu. Takođe, standardizacija procedura za čuvanje, proširivanje i kontrolu kvaliteta ćelijskih populacija još uvek je u razvoju.

Uprkos navedenim izazovima, kontinuirani napredak u tehnologijama ćelijske izolacije, kultivacije i genske modifikacije, kao i sve veći broj kliničkih ispitivanja, ukazuje na to da posteljica ima potencijal da postane jedan od ključnih izvora matičnih ćelija u savremenoj medicini, ne samo u lečenju hematoloških poremećaja, već i u širem spektru degenerativnih, imunoloških i malignih bolesti.

6.2. ANALIZA CD34 IMUNOREAKTIVNIH HEMATOPOETSKIH MATIČNIH ĆELIJA

U našem istraživanju nalazimo da su u humanim posteljicama najzastupljeniji profil CD34 imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija. CD34 je transmembranski glikoprotein koji se već decenijama koristi kao najpouzdaniji i najčešće korišten marker u identifikaciji i izolaciji hematopoetskih matičnih i progenitorskih ćelija kod ljudi. Njegova važnost leži u činjenici da omogućava selektivnu identifikaciju ćelija sposobnih za samoobnavljanje i diferencijaciju u sve linije krvnih ćelija, što je od ključne važnosti u terapijskim kontekstima, naročito kod transplantacije matičnih ćelija i liječenja hematoloških maligniteta.

Međutim, iako većina hematopoetskih matičnih i progenitorskih ćelija eksprimira CD34, važno

je napomenuti da sama prisutnost ovog markera nije dovoljna za pouzdanu identifikaciju matične ili progenitorske ćelije, jer postoje i druge ćelijske populacije koje mogu pokazivati CD34 imunoreaktivnost, uključujući endotelne ćelije i određene ćelije stromalnog porekla [109]. Uprkos tome, u kliničkoj praksi, prisustvo i visoka koncentracija CD34 imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija u uzorcima koštane srži ili periferne krvi i dalje predstavlja jedan od najvažnijih parametara prilikom procjene kvaliteta transplantata i predikcije hematopoetske obnove nakon transplantacije [83,110].

CD34 se ranije smatrao markerom rane hematopoeze, odnosno ćelije koje se nalaze u najnezrelijim fazama razvoja. Međutim savremena istraživanja su pokazala da CD34 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije, izolovane iz periferne krvi i koštane srži, posjeduju kapacitet za formiranje svih glavnih hematopoetskih kolonija in vitro, kao i sposobnost dugotrajne repopulacije hematopoetskog sistema in vivo. Ova saznanja potvrđuju da CD34 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije nisu samo indikator ranih hematopoetskih faza, već i funkcionalno sposobne ćelije sa potpunim multipotentnim kapacitetom [111].

CD34 imunoreaktivne ćelije nalazimo u humanim posteljicama od 7. nedjelje gestacije, mada podaci iz literature govore da je on prisutan u posteljicama i ranije, od 6 nedjelje gestacije. [107]. Nažalost, taj podatak ne možemo potvrditi jer u ovom istraživanju su korišteni uzorci starosti tek od 7. nedjelje gestacije.

CD34 imunoreaktivne ćelije su prisutne unutar krvnih sudova tokom čitave gestacije, ali zapažamo da je njihov broj unutar krvnih sudova najveći u prvom trimestru. Ta vaskularna povezanost pokazuje da je početna hematopoetska aktivnost usko povezana s vaskularnom mrežom u razvoju [112]. Uzimajući u obzir da se populacija CD34 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije statistički značajno ističe u poređenju sa drugim imunoprofilima hematopoetskih matičnih ćelija u svim ispitivanim regijama posteljice tokom prvog trimestra, postavlja se logična pretpostavka da se veliki broj ovih ćelija ne formira direktno u posteljici, već da potiče iz drugih primarnih hematopoetskih lokaliteta, poput žumancetne kese ili aorto-gonado-mezonefrosne regije. Preko cirkulacije, ove ćelije dospijevaju u posteljicu, gdje mogu nastaviti svoj razvoj ili prolaziti ka drugim mestima hematopoeze. Vjerovatno se radi o tzv. tranzitornim hematopoetskim ćelijama koje učestvuju u formiranju ranog hematopoetskog sistema. One potiču od ranih mezodermalnih progenitora koji pridonose stvaranju endotelnih i hematopoetskih linija iz hemangioblasta procesom poznatom kao hemangiogene diferencijacije koji je naprijed opisan [113]. S obzirom na to da je CD34 zajednički marker za endotelne ćelije

i hematopoetske matične ćelije, moguće je, da određen dio ove populacije nastaje direktno u posteljici prilikom razvoja njenih krvnih sudova iz hemangioblasta. Ovakav dvostruki razvojni potencijal dodatno komplikuje interpretaciju prisustva CD34 imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija u posteljici, jer one mogu pripadati i endotelnoj i hematopoetskoj liniji, što zahteva dodatnu analizu putem ko-ekspresije drugih specifičnih markera. Zato se u ovo istraćivanju nismo bazirali samo na jedna marker hematopoeze, već upotrebom i drugih markera omogućili preciznu indentifikaciju hematopoetskih matičnih ćelija. Posteljica u ovom slučaju predstavlja ne samo njihovu hematopotesku nišu koja stimuliše njihovu proliferaciju već i primarni hematopoetski organ [114,115].

Hematopoetske matične ćelije koje nalazimo u prvom trimestru posteljice će se u najvećem broju diferencirati u eritrocitnu lozu kako bi obezvjedilo odgovarajuće količine kiseonika za potrebe rastućeg fetusa. Ova diferencijacija je esencijalna kako bi se obezbijedile dovoljne količine eritrocita koji omogućavaju adekvatan transport kiseonika neophodan za intenzivan rast i metabolizam embriona i fetusa. Fetalni razvoj u ranim fazama odvija se u relativno hipoksičnim uslovima, što dodatno stimuliše proces eritropoeze putem povećane ekspresije faktora kao što je hipoksijom inducibilni faktor (engl. *Hypoxia-inducible factor*, HIF), koji direktno utiče na ekspresiju eritropoetina i drugih regulatora hematopoeze. Prvi talas hematopoeze, poznat kao primitivna hematopoeza, dešava se nezavisno od HSCs i uključuje formiranje primitivnih eritrocita u žumančanoj kesi. Međutim, ovaj talas je vremenski ograničen i nije dovoljan da zadovolji rastuće potrebe fetusa za kiseonikom. Primitivni eritrociti, koji se razvijaju u ovom periodu, imaju ograničen životni vijek i funkcionalni kapacitet, te se postepeno zamjenjuju produktima definitivne hematopoeze [116].

Zato, nakon sedme nedjelje gestacije, unutar krvnih sudova posteljice, pored hematopoetskih matičnih ćelija, sve češće se identifikuju i različiti oblici ranih eritroidnih ćelija, uključujući proeritroblaste, retikulocite i zrele eritrocite. Njihovo prisustvo ukazuje na aktivnu eritropoezu u ovoj fazi razvoja, što je u skladu sa povećanim potrebama fetusa za kiseonikom i transportnim kapacitetom krvi.

Morfološki, proeritroblasti mogu u histološkim preparatima ličiti na hematopoetske matične ćelije, što predstavlja potencijalni izvor greške prilikom kvantifikacije i interpretacije rezultata imunohistohemijskih i morfometrijskih analiza. Obje ćelijske populacije poseduju izraženo veliko okruglo jedro, prominentne nukleoluse i intenzivno bazofilnu citoplazmu, što otežava njihovo razlikovanje isključivo na osnovu histološke morfologije.

Ipak, postoje jasne razlike koje omogućavaju njihovu pouzdanu identifikaciju. Naime,

proeritroblasti su veće ćelije, sa prečnikom koji se kreće između 20 i 25 mikrometara, dok su hematopoetske matične ćelije značajno manje. Osim toga, proeritroblasti ne eksprimiraju CD34, marker karakterističan za matične i progenitorske hematopoetske ćelije. Umjesto toga, oni ispoljavaju specifične markere eritroidne linije - CD71 (transferin receptor), koji ukazuje na aktivan unos gvožđa neophodnog za sintezu hemoglobina, i CD235a (glikoforin A), koji je specifičan za površinu eritrocita i njihovih prekursora [117].

Zahvaljujući imunofenotipskoj karakterizaciji, moguće je precizno razlikovati hematopoetske matične ćelije od ćelija koje su već ušle u put diferencijacije ka eritroidnoj lozi, što je od ključne važnosti za pravilnu interpretaciju podataka i razumevanje dinamike hematopoeze unutar posteljice.

Bilo da se HSCs ćelije detektuju i kvantifikuju pomoću protočne citometrije koja omogućava precizno imunofenotipsko profilisanje ćelija na osnovu ekspresije površinskih markera, ili morfometrijske metode primenjene na histološkim i imunohistohemijskim preparatima, svi autori su saglasni da su CD34 imunoreaktivne ćelije najbrojnije u posteljicama drugog trimestra [118]. Ovakav nalaz je u skladu sa očekivanjima, imajući u vidu da sa napredovanjem trudnoće dolazi do kontinuiranog povećanja volumena posteljice i njenog vaskularnog kapaciteta. To fiziološko širenje posteljice povlači za sobom i proporcionalno umnožavanje svih njenih komponenti, uključujući i hematopoetske i potporne ćelijske populacije.

Zadržava se i vaskularna lokalizacija HSCs ćelija koja je sad prisutna u većini krvnih sudova, a zapaža se i stromalna lokalizacija CD34 imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija. Ovakva redistribucija i proširena prisutnost HSCs ćelija vjerovatno je rezultat složenih interakcija sa stromalnim i mezenhimalnim ćelijama posteljice, koje imaju ključnu ulogu u regulaciji hematopoetske aktivnosti. Te ćelije sekretuju niz hematopoetskih citokina i faktora rasta koji stvaraju pogodno mikrokruženje za opstanak, proliferaciju i diferencijaciju matičnih ćelija. Među najvažnijima su SCF (engl. *Stem cell factor*) koji je ključan za preživljavanje i proliferaciju HSCs, zatim IL-6, proinflamatorni citokin koji, u kontekstu fetalne hematopoeze, ima i hematopoetske efekte kao i CXCL12, poznat i kao SDF-1, (engl. *C-X-C Motif Chemokine Ligand 12*) koji je hemokinski ligand koji posreduje u homingu, zadržavanju i migraciji hematopoetskih matičnih ćelija unutar niše [119]. Ovi parakrini faktori doprinose održavanju dinamične ravnoteže između samoočuvanja i diferencijacije hematopoetskih matičnih ćelija i potvrđuju značaj posteljice kao aktivnog hematopoetskog organa tokom drugog trimestra fetalnog razvoja.

Pomak s primarno vaskularne lokalizacije na stromu upućuje da i stroma posteljica pruža potporno mikrokruženje za proliferaciju i diferencijaciju hematopoetskih matičnih ćelija, što

se odražava na širenje i migraciju ovih ćelija. Migracija CD34 imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija u stromalne regije horionske ploče i horionskih resica ukazuje na uspostavljanje specijalizirane hematopoetske niše u posteljici. Mezenhimalne ćelije posteljice ključni su faktori u ovoj niši, proizvodeći komponente ekstracelularnog matriksa koji utječu na odluke o sudbini hematopoetskih matičnih ćelija [120]. Zapaženo je da hipoksični uslovi u posteljici dodatno pojačavaju ekspanziju i mirovanje hematopoetskih matičnih ćelija, u skladu s okruženjem s niskim sadržajem kiseonika u ranim hematopoetskim nišama [121]. Povećanje broja HSC i njihova migracija u stromalne regije u drugom trimestru vjerojatno su priprema za njihov konačni prelaz u fetalnu jetru i koštanu srž.

Nakon 25. nedjelje gestacije drastično opada koncentracija CD34 imunoreaktivnih HSCs ćelija u posteljicama. Nalazimo da je njihova koncentracija u trećem trimestru za 46% niža nego njihova koncentracija u drugom trimestru. Koncentracija HSC s ćelija u posteljici u ovom periodu je niža nego u umbilikalnom transplantatu [106]. Iako im koncentracija opada, važno je istaknuti da su terminske posteljice izvor hematopoetskih ćelija, bilo da su one vezane za endotel krvnih sudova ili smjestene u stromi, jer se dugo smatralo da je posteljica aktivna samo tokom sredine gestacije [122]. Medjutim postoje istraživanja koja podupiru naše nalaze [123].

Primjećeno je da u trećem trimestru opadaju i vrijednosti N_A CD34 u drugim privremenim hematopoetskim nišama poput fetalne jetre [124] što potvrđuje teoriju da je u ovom periodu razvoja koštana srž u potpunosti preuzela dominantnu ulogu u procesu prenatalne hematopoeze. U studiji sporovednoj od strane Xiaowei i saradnici nalazimo da koštana srž počinje sa produkcijom HSCs ćelija od 20. nedjelje gestacije i svoj pik dostiže početkom trećeg trimestra [125,126].

Rezultati našeg istraživanja pokazuju da pored hematopoetskih progenitora i endotelne ćelije ispoljavaju visoku CD34 imunoreaktivnost. Posjedovanje zajedničkih markera potvrđuje njihovo zajedničko porijeklo te ukazuje da su hematopoeza i vaskulogeneza u posteljici sinhronizovani procesi [127].

6.3. ANALIZA CD45 IMUNOREAKTIVNIH HEMATOPOETSKIH MATIČNIH ĆELIJA

Poput CD34 imunoreaktivnih ćelija i populacija CD45 imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija je prisutna u posteljici tokom čitave gestacije. Njihova distribucija se registruje u različitim koncentracijama i unutar različitih anatomskih regija posteljice, uključujući

vaskularne, stromalne i perivaskularne zone počevši već od sedme nedjelje pa sve do kraja intrauterinog razvoja. Slične nalaze su potvrdili i brojni autori, koji su pokazali konzistentno prisustvo populacija CD45 imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija u posteljici u svim fazama gestacije [11,105,128].

CD45, poznat i kao leukocitni zajednički antigen, predstavlja transmembranski protein-tirozinfosfatazu koji je univerzalni marker hematopoetskih ćelija sa izuzetkom eritrocita i trombocita. Njegova ekspresija na površini ćelija označava hematopoetsko porijeklo i funkcionalnu zrelost ćelije unutar hematopoetske linije. Kada je u pitanju populacija hematopoetskih matičnih ćelija prisustvo CD45 imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija zajedno sa CD34 imunoreaktivnim matičnim ćelijama se često tumači kao indikator zrelijih i funkcionalno kompetentnih HSCs, sposobnih za formiranje svih tipova hematopoetskih kolonija in vitro, uključujući i mijeloidne i limfoidne linije te dugotrajnu rekonstrukciju hematopoetskog sistema nakon transplantacije tzv. LT-HSCs [129,130].

Iz tog razloga, koekspresija CD45 i CD34 se u kliničkom i eksperimentalnom kontekstu koristi kao ključni kriterijum za identifikaciju i selekciju transplantabilnih HSCs, naročito u terapiji leukemija, aplastične anemije i drugih hematoloških poremećaja.

Prisustvo CD45 imunoreaktivnih matičnih ćelija tokom čitavog gestacijskog perioda dodatno potvrđuje da posteljica nije samo pasivni transportni organ već i dinamično imunološko i hematopoetsko mikrokruženje, u kojem se istovremeno odvijaju procesi ćelijske migracije, sazrijevanja i diferencijacije.

Trenutno je dostupno relativno malo podataka o preciznoj histološkoj lokalizaciji CD45 imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija u humanoj posteljici. To je, dijelom, rezultat metodološkog pristupa većine dosadašnjih studija, koje su se prvenstveno oslanjale na protočnu citometriju u cilju određivanja ukupne koncentracije CD45 imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija, bez specifičnog fokusiranja na njihovu anatomsko-mikroskopsku distribuciju.

U okviru našeg istraživanja, međutim, uočili smo lokalizaciju CD45 imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija u svim fetalnim komponentama posteljice, uključujući horionsku ploču, horionske resice i intervilozne prostore. Ova zapažanja ukazuju na široku distribuciju CD45 imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelijskih populacija unutar posteljičnog fetalnog dela, kao i na njihovu potencijalnu ulogu u hematopoetskoj i imunološkoj regulaciji u različitim mikrosredinama.

Dinamički obrasci distribucije CD45 imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija pokazuju

sličnosti s populacijom CD34 imunoreaktivnih hematopoetskih ćelija, što implicira moguće zajedničke migratorne ili regulatorne mehanizme. Tokom prvog trimestra, CD45 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije su najbrojnije u vaskularnim strukturama horionske ploče i horionskih resica, što ukazuje na njihovu aktivnu cirkulaciju i moguću povezanost sa ranim hematopoetskim tokovima i formiranjem vaskularno-hematopoetskih niša.

Međutim, kako trudnoća napreduje, dolazi do postepenog smanjenja koncentracije CD45 imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija u ovim vaskularnim lokalizacijama, uz istovremenu pojavu njihove pretežno stromalne lokalizacije u kasnijim fazama gestacije. Ovo premještanje ćelijske populacije može se tumačiti kao refleksija promjene funkcionalne uloge ovih ćelija od migratornih i kolonizujućih ćelija u ranoj trudnoći, ka stabilnijim, diferencirajućim populacijama koje učestvuju u formiranju i održavanju hematopoetskih niša u fetalnom stromalnom tkivu posteljice.

Ovi nalazi podržavaju tezu da se, sličnom dinamikom kao kod CD34 imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija, i CD45 imunoreaktivne ćelijske populacije adaptiraju na promjene u arhitekturi i funkciji posteljice tokom gestacije, što dodatno osnažuje koncept posteljice kao aktivnog, promjenjivog i višefunkcionalnog hematopoetsko-imunološkog mikrokruženja.

Prostorni raspored CD45 imunoreaktivnih HSCs ćelija, prelazeći iz krvnih sudova i strome u prvom trimestru u pretežno stromalno prisustvo u kasnijoj gestaciji, nudi uvid u promjenjivu ulogu posteljice tokom vremena. Visoka vaskularna prisutnost usklađena je s potrebom za mobilizacijom i sistemskim sisanjem HSC-a za uspostavljanje konačne hematopoeze u fetalnoj jetri i drugim organima. Konzistentna stromalna lokalizacija tokom gestacije implicira da stroma može služiti kao rezervoar ili potporna niša, održavajući podskup HSC-a za potencijalnu upotrebu u razvoju fetusa ili imunološkoj modulaciji.

Postojanost HSC-a u stromi uprkos njihovoj smanjenoj prisutnosti u krvnim sudovima naglašava različite regulatorne mehanizme koji upravljaju njihovom lokalizacijom. To bi moglo ukazivati na to da stromalno mikrokruženje pruža znakove podrške, kao što su interakcije između ćelija ili komponente ekstracelularnog matriksa, koje zadržavaju HSC in situ čak i kada se ukupna populacija smanjuje [131,132].

Uprkos kontinuiranom prisustvu CD45 imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija u posteljici tokom čitave gestacije, njihova koncentracija je značajno niža u poređenju sa CD34 imunoreaktivnom populacijom i ne prati istu dinamiku promjene kroz trimestralne faze

trudnoće. Naši rezultati pokazuju da su najviše vrijednosti CD45 imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija prisutne u prvom trimestru, nakon čega dolazi do statistički značajnog opadanja. U drugom trimestru, vrijednosti CD45 imunoreaktivnih HSCs su bile niže za 47% u odnosu na prvi trimestar, a ova tendencija se održava i tokom trećeg trimestra.

Ova opadajuća koncentracija CD45 imunoreaktivnih HSCs sa progresijom gestacije može se tumačiti na više načina. Jedno od mogućih objašnjenja je da posteljica u ranoj trudnoći funkcionise kao ključna hematopoetska niša, pružajući povoljne uslove za održavanje i proliferaciju HSCs u fazi kada je fetalna jetra tek u nastanku, a koštana srž još uvijek nije funkcionalna. Kako trudnoća napreduje, glavne hematopoetske funkcije se postepeno premeštaju u druge organe, prije svega u jetru i zatim u koštanu srž, što dovodi do relativnog smanjenja potrebe za održavanjem aktivne hematopoeze u posteljici.

Drugo moguće objašnjenje uključuje migraciju CD45 imunoreaktivnih HSCs iz posteljice ka drugim hematopoetskim organima, u skladu sa poznatim obrascima fetalne hematopoeze. Ova migracija bi mogla biti praćena smanjenjem lokalne proliferacije i/ili regrutacije populacije hematopoetskih matičnih ćelija unutar posteljičnog mikrokruženja, što je potencijalno posljedica promjena u nivou hematopoetskih citokina i promjena u vaskularnoj arhitekturi.

Ovi nalazi dodatno podupiru hipotezu da posteljica ima vremenski ograničenu, ali funkcionalno značajnu hematopoetsku ulogu, dominantno izraženu u ranoj fazi gestacije, nakon čega se njena hematopoetska aktivnost postepeno gasi u korist definitivnih hematopoetskih organa fetusa.

Međutim, uzimajući u obzir da je populacija CD45 imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija izolovanih iz krvi pupčanika primarno orijentisana ka diferencijaciji u limfoidnu lozu [133], otvara se mogućnost da se dio ovih ćelija, prisutnih u posteljici tokom drugog trimestra, diferencira ne samo u limfoidne linije, već i u specijalizovane imunološke ćelije posteljice-Hofbauerove ćelije, fetalne posteljične makrofage.

Hofbauerove ćelije predstavljaju jedinu rezidentnu populaciju imunih ćelija u normalnoj, zdravoj humano posteljici i imaju ključnu ulogu u imunološkoj zaštiti fetusa, uključujući zaštitu od vertikalnog prenosa infekcija, kao i u regulaciji angiogeneze i remodelaciji ekstracelularne matrice [134].

Iako je u ranijim istraživanjima sugerisano da Hofbauerove ćelije potiču iz mezenhimalnih progenitorskih ćelija koje se diferenciraju u monocite, pojedini autori ukazuju na mogućnost alternativnog hematopoetskog porekla, konkretno iz CD45 imunoreaktivnih HSCs koje migriraju i diferenciraju se lokalno u makrofage u stromalnom tkivu horionskih resica.

Fenotipska analiza pokazuje da Hofbauerove ćelije eksprimiraju pan-makrofagni marker CD68, kao i aktivacione markere CD80, te mogu biti inducirane da eksprimiraju CD163, CD206, i CD209, što je u skladu s profilom alternativno aktiviranih (M2) makrofaga [135]. U našim nalazima, ove ćelije takođe pokazuju izraženu CD45 imunoreaktivnost, što dodatno podupire tezu da mogu poticati iz CD45 imunoreaktivnih hematopoetskih ćelija, a ne isključivo iz mezenhimalnih progenitora.

Hofbauerove ćelije su detektovane već od 18. dana nakon oplodnje, a njihovo prisustvo se održava tokom čitave trudnoće, iako u varijabilnom broju koji zavisi od gestacijskog perioda i fizioloških potreba fetalnog razvoja [136]. U periodu drugog i trećeg trimestra, kada uočavamo pad koncentracije CD45 imunoreaktivnih HSCs u posteljici, istovremeno se registruje porast broja Hofbauerovih ćelija u horionskim resicama. Ova obrnuta dinamika u distribuciji podržava hipotezu o mogućoj diferencijaciji CD45 imunoreaktivnih HSCs u posteljične makrofage kao odgovora na povećane imunološke potrebe posteljice i fetusa u srednjem i kasnom stadijumu trudnoće.

Ovakav razvojni put, ako se potvrdi dodatnim funkcionalnim i linija-sledbenim studijama, značio bi da CD45 imunoreaktivne HSCs u posteljici nemaju isključivo hematopoetsku ulogu u sistemske fetalnoj cirkulaciji, već i važnu ulogu u lokalnoj imunološkoj modulaciji kroz formiranje Hofbauerovih ćelija.

6.4. ANALIZA CD117 IMUNOREAKTIVNIH HEMATOPOETSKIH MATIČNIH ĆELIJA

U posteljici je identifikovana i populacija CD117 imunoreaktivnih hematopoetskih ćelija, koja dodatno potvrđuje kompleksnost i dinamiku hematopoetske aktivnosti ovog fetalnog organa. CD117 je receptor za faktor rasta matičnih ćelija (engl. *Stem cell factor*, SCF) i jedan je od ključnih markera prisutnih na površini ranih hematopoetskih progenitorskih ćelija, uključujući i funkcionalno multipotentne hematopoetske matične ćelije. Njegova ekspresija je često povezana sa ćelijama visokog proliferativnog potencijala, kao i sa procesima migracije i sazrijevanja unutar hematopoetskih niša.

Tokom prvog trimestra gestacije, CD117 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije pokazuju lokalizaciju unutar krvnih sudova posteljice, pri čemu se često organizuju u klastere i nalaze u bliskom kontaktu sa endotelnim ćelijama zida krvnog suda. Ova blizina ukazuje na

moguće međusobne interakcije između CD117 imunoreaktivnih HSCs i endotelne ćelije, što je u skladu sa konceptom da endotelne ćelije predstavljaju ključne komponente nišnog mikrookruženja koje podržava opstanak i proliferaciju hematopoetskih progenitora.

Kako gestacija napreduje, dolazi do smanjenja ukupnog broja CD117 imunoreaktivnim hematopoetskih matičnih ćelija, kao i do promjene njihove prostorne raspodjele. U drugom trimestru uočava se postepeni prelazak iz isključivo vaskularne ka stromalnoj lokalizaciji, sličan obrascu koji je ranije opisan za CD34 i CD45 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije. Međutim, ono što ovu populaciju izdvaja jeste jasno vremensko ograničenje njihove prisutnosti u posteljici. Naime, u analiziranim uzorcima nakon 26. nedjelje gestacije, CD117 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije nisu više detektovane, što implicira njihovo povlačenje ili diferencijaciju u druge ćelijske linije.

Ova potpuna regresija populacije CD117 imunoreaktivnih HSCs u trećem trimestru ukazuje na to da se njihova uloga svodi prvenstveno na rane faze fetalne hematopoeze, kada posteljica funkcionira kao aktivna hematopoetska niša. Odsustvo ovih ćelija u kasnijim stadijumima trudnoće može se objasniti njihovom migracijom ka centralnim hematopoetskim organima, poput fetalne jetre i koštane srži, ili njihovom diferencijacijom u zrelije progenitorske ćelije koje više ne ekspimiraju CD117.

Uprkos sličnostima u obrascu distribucije sa CD34 i CD45 imunoreaktivnim HSCs ćelijama, dinamička specifičnost populacije CD117 imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija, njena vremenska ograničenost i očekivana funkcionalna povezanost sa SCF-C-KIT signalizacijom, ukazuju na to da se radi o funkcionalno distinktnoj hematopoetskoj podpopulaciji, čija je uloga posebno izražena u inicijalnim fazama hematopoetskog razvoja.

Blizak kontakt hematopoetskih matičnih ćelija sa endotelne ćelijama krvnih sudova posteljice snažno sugerira da upravo endotelne ćelije igraju ključnu ulogu u regulaciji njihove proliferacije i održavanju funkcionalnosti u okviru vaskularne niše. Ovaj anatomski odnos ima i funkcionalnu osnovu, budući da su u više studija in vitro potvrđeni parakrini mehanizmi putem kojih endotelne ćelije direktno stimulišu rast i održavanje hematopoetskih populacija.

U tom kontekstu, Lin i saradnici su, koristeći ko-kulturu endotelne ćelije i HSCs, eksperimentalno pokazali da endotelne ćelije značajno stimulišu proliferaciju CD117 imunoreaktivnih hematopoetskih ćelija, potvrđujući tako njihovu regulatornu ulogu u ranim fazama hematopoetskog razvoja [137,138].

Molekularni mehanizmi ove interakcije obuhvataju sekreciju specifičnih rastnih i

kemotaktičkih faktora od strane endotelnih ćelija kao što je ranije spomenut SDF-1 / hemokin koji učestvuje u homingu, zadržavanju i migraciji HSCs u mikrookruženju i vaskularni endotelijalni faktor rasta (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF), angiogeni faktor koji pored uloge u vaskulogenezi, ima i dokazano stimulatívno dejstvo na proliferaciju hematopoetskih progenitora, uključujući CD117 imunoreaktivne HSCs ćelije [139].

Ova kombinovana aktivnost SDF-1 i VEGF stvara mikrookruženje koje u ranim fazama trudnoće podržava visok nivo proliferacije CD117 imunoreaktivni HSCs ćelija unutar vaskularnog prostora posteljice, što objašnjava njihovu visoku zastupljenost i karakterističnu lokalizaciju u prvom trimestru. Endotelne ćelije, kao integralna komponenta hematopoetske niše, na taj način ne samo da fizički podupiru, već aktivno regulišu hematopoetski potencijal posteljice putem precizno orkestriranih signalnih puteva.

Posteljica sadrži veći broj hematopoetskih matičnih ćelija tokom embrionalnog perioda razvoja, nego u kasnijem fetalnom periodu. Ovaj nalaz je u skladu sa shvatanjem da posteljica predstavlja privremenu, ali funkcionalno značajnu hematopoetsku nišu u ranim fazama ontogeneze.

Posebno je uočljivo da nakon 14. nedjelje gestacije, CD117 imunoreaktivne ćelije HSCs ćelije više nisu prisutne unutar vaskularnog sistema posteljice, što označava kraj njihove direktne uloge u lokalnoj hematopoezi. Sudbina ovih ćelija, prema trenutnim saznanjima i našim nalazima, može biti dvojaka. One mogu migrirati u druge hematopoetske niše, kao što je slučaj s drugim ranim hematopoetskim ćelijama, CD117 imunoreaktivne HSCs ćelije mogu napustiti posteljicu putem fetalne cirkulacije i kolonizovati sekundarne hematopoetske organe kao što su fetalna jetra, a kasnije i koštana srž, gdje će nastaviti svoj razvoj u skladu sa promjenama u mikrookruženju. Dok je drugi scenario lokalna diferencijacija u eritroidne progenitore. Alternativno, određeni broj CD117 imunoreaktivnih HSCs ćelija se može diferencirati lokalno u eritroidnu lozu, slično kao što je opisano za CD34 imunoreaktivne HSCs ćelije, koje su sposobne da daju proeritroblaste i dalje zrele oblike eritrocita [140,141].

Ova druga mogućnost je naročito vjerovatna s obzirom na fiziološku potrebu za velikim brojem eritrocita tokom fetalnog rasta. Kao što je ranije istaknuto, fetalni eritrociti imaju kraći životni vijek u poređenju sa adultnim oblikom, što zahtijeva kontinuiranu proizvodnju eritrocita kako bi se obezbijedio adekvatan transport kiseonika i održavanje homeostaze u ubrzano rastućem fetalnom organizmu.

U tom kontekstu, sve dostupne imunohistohemijske, morfometrijske i citometrijske analize

podržavaju pretpostavku da se najveći dio HSCs ćelija koje se detektuju tokom prva dva trimestra gestacije, uključujući i populaciju CD117 imunoreaktivni HSCs ćelija, diferencira upravo ka eritroidnoj lozi, kako bi se zadovoljile rastuće metaboličke potrebe fetusa.

Tokom drugog trimestra gestacije, u posteljici zaostaju samo pojedinačne hematopoetske matične ćelije, koje su sada isključivo lokalizovane u stromi horionskih resica. Ova promjena u distribuciji ukazuje na povlačenje HSCs ćelija iz vaskularnog prostora, što je u skladu sa ranije opisanim obrascem za CD117 imunoreaktivne HSCs ćelije. Iako se ukupni broj HSCs ćelija smanjuje, porast volumena posteljičnog tkiva u ovom periodu omogućava relativno održavanje njihove koncentracije.

Ipak, uprkos tom tkivnom širenju, zabilježen je pad koncentracije HSCs ćelija u drugom trimestru za oko 15,6% u odnosu na prethodni period, dok su u trećem trimestru u potpunosti odsutne u analiziranim uzorcima. Ova postepena regresija potvrđuje zaključak da posteljica gubi hematopoetsku funkciju kako trudnoća napreduje, te da se hematopoeza centralizuje u drugim organima.

Značajno je napomenuti da je lokalizacija HSCs ćelija u drugom trimestru ograničena na stromu, što ukazuje da njihova sudbina u ovom razvoju fazi zavisi od interakcija sa mezenhimalnim stromalnim ćelijama koje su rezidentne u posteljičnom stromalnom mikrookruženju [142]. Mezenhimalne ćelije su poznate po svojoj ulozi u podršci hematopoetskim nišama, ali njihova regulatorna moć je slabija u poređenju sa endotelih ćelijama. Za razliku od endotelih ćelija koje luče faktore poput VEGF i SDF-1 i stvaraju izuzetno pogodno okruženje za proliferaciju HSCs, mezenhimalne ćelije ne posjeduju jednak kapacitet da dugoročno održe funkcionalnu HSC populaciju [143].

Upravo zbog toga, i pored prisustva mezenhimalnih ćelija u posteljičnoj stromi, nije moguće održati zadovoljavajuću koncentraciju CD117 imunoreaktivnih HSCs ćelija tokom čitave gestacije [144,145]. Njihov ograničen hematopoetski potencijal vjerovatno doprinosi postepenom iščezavanju HSC populacije iz posteljice, čime se zatvara rana faza posteljične hematopoeze i prenosi glavna hematopoetska aktivnost na fetalne organe sa već razvijenim nišama - prvenstveno jetru, a kasnije i koštanu srž.

Rezultati našeg istraživanja pokazuju da, uz hematopoetske progenitorne ćelije i trofoblasti također pokazuju CD117 imunoreaktivnost, pri čemu trofoblasti posteljice u prvom trimestru pokazuju visok nivo imunoreaktivnosti. Međutim, intenzitet imunoreaktivnosti opada kako trudnoća napreduje. Budući da je CD117 marker za matične progenitorske ćelije, to nam

potvrđuje da trofoblasti posjeduju visoku sposobnost proliferacije i diferencijacije. Postoji i razlika u intenzitetu imunoreaktivnosti između citotrofoblasta i sinciciotrofoblasta. Citotrofoblasi pokazuju nižu imunoreaktivnost u drugom i trećem trimestru, što znači da se njihova sposobnost proliferacije i diferencijacije, smanjuje kako trudnoća napreduje [146].

6.5. ANALIZA CD41 IMUNOREAKTIVNIH HEMATOPOETSKIH MATIČNIH ĆELIJA

U okviru našeg istraživanja, u tkivu humane posteljice identifikovali smo i populaciju CD41 imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija. Ovaj nalaz se može smatrati jednim od najznačajnijih otkrića našeg rada, jer CD41 (poznat i kao integrin α IIb) predstavlja specifičan marker za tzv. rezidentne HSCs - odnosno one ćelije koje su nastale *in situ* u samoj posteljici, a ne putem kolonizacije iz drugih hematopoetskih niša.

Prethodne studije, posebno istraživanje Rhodes i saradnika, koje je koristilo transgene mišje modele Runx1-LacZ i Ncx1-knockout, pokazale su da su definitivne hematopoetske ćelije koje obuhvataju i mijelo-eritroidni i limfoidni potencijal formirane u posteljici, te da ekspimiraju upravo CD41 kao ključni fenotipski marker [147]. Ova otkrića potvrđuju da posteljica nije samo prolazno ili podržavajuće hematopoetsko mikrokruženje, već i autonomni izvor stvaranja hematopoetskih progenitora sa dugoročnim diferencijacionim kapacitetom.

CD41 se generalno smatra markerom rane faze hematopoetskog razvoja, posebno onih HSCs koje se nalaze u prijelaznoj fazi između primitivnog i diferenciranog stanja. Njegova ekspresija ukazuje na aktivni razvojni potencijal ćelije ka formiranju zrelih krvnih linija, uključujući trombocitnu, eritroidnu, mijeloidnu i limfoidnu lozu [92,93]. Iako se CD41 najčešće vezuje za megakariocitnu diferencijaciju, njegova prisutnost na nespecijaliziranim progenitorima u ranim fazama hematopoeze ukazuje na širi razvojni kapacitet i dinamično razvojno stanje ćelije.

Stoga, prisustvo CD41 imunoreaktivnih HSCs u posteljičnom tkivu ne samo da potvrđuje autonomni hematopoetski potencijal posteljice, već dodatno osnažuje hipotezu da posteljica može predstavljati izvor funkcionalno kompetentnih, rezidentnih HSCs, sa ulogom koja prevazilazi samo prolaznu kolonizaciju iz drugih hematopoetskih niša.

Pojava CD41 imunoreaktivnih hematopoetskih ćelija u posteljici pokazuje izraženu prostornu povezanost sa velikim krvnim sudovima, što morfološki i funkcionalno podsjeća na procese poznate iz dorzalne aorte, kao i vitelinskih i umbilikalnih arterija, gdje se odvija tzv. hemogeni endotelijalni prelaz (engl. *Hemogenic endothelium transition*) - ključni trenutak u nastanku

definitivnih hematopoetskih ćelija [148].

U našim uzorcima, CD41 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije koje su lokalizovane u bliskom kontaktu sa endotelom velikih posteljičnih krvnih sudova, jasno ukazuju na njihov lokalni - rezidentni - razvojni status. Na osnovu njihove anatomske pozicije, fenotipske osobine i izraženosti markera karakterističnog za najranije hematopoetske progenitore, sa visokim stepenom sigurnosti možemo zaključiti da se radi o rezidentnim hematopoetskim matičnim ćelijama koje su nastale unutar posteljice, a ne migrirale iz drugih hematopoetskih niša.

Marker CD41 (integrin α IIb) se smatra pouzdanim indikatorom svih hematopoetskih progenitorskih ćelija koje se diferenciraju direktno iz embrionalnih pluripotentnih matičnih ćelija, posebno u najranijim fazama hematopoetskog razvoja [94]. U tom kontekstu, ćelije koje eksprimiraju CD41, a nalaze se na endotelijalnoj granici krvnih sudova, imaju najveći razvojni značaj jer ukazuju na direktnu hematopoetsku aktivnost samog posteljičnog vaskularnog endotela.

Međutim, za ostale CD41 imunoreaktivne HSCs ćelije koje su detektovane slobodno unutar lumena krvnih sudova, bez jasne povezanosti sa endotelnim slojem, nije moguće sa sigurnošću utvrditi njihovo poreklo. S obzirom na to da je cirkulacija u našim analiziranim uzorcima bila očuvana i neometana, moguće je da se dio tih ćelija nalazi u cirkulaciji kao rezultat prethodne hematopoetske aktivnosti drugih organa (npr. žumancetne kese, fetalne jetre), te ih ne možemo klasifikovati kao autentične rezidentne HSCs posteljičnog porekla.

Ovaj nalaz dodatno naglašava važnost mikrolokalizacije i konteksta ekspresije hematopoetskih markera, jer prisustvo određenog antigena nije samo po sebi dovoljan pokazatelj porijekla ili funkcionalnog statusa ćelije, već se mora tumačiti u skladu sa morfološkom pozicijom i histološkim mikrokruženjem.

CD41 imunoreaktivne ćelije nisu prisutne u posteljici tokom čitave gestacije nego su ograničene na period između 11. i 22. nedjelje gestacije. Takođe, u odnosu na ostale detektovane HSCs one su najmanje zastupljene, njihova koncentracija je statistički značajno niža u odnosu na ostale HSC ćelije u posteljici. Otkriveno je da je i njihova koncentracija u fetalnoj jetri niža od ostali profila HSC [149]. Ovaj nalaz podržava hipotezu da CD41 imunoreaktivne HSCs ćelije ne predstavljaju glavni tok fetalne hematopoeze, već da funkcionišu kao funkcionalna rezerva ili tranzitna veza između različitih hematopoetskih niša.

Naime, kvantitativne analize u AGM regiji, koja se smatra prvim definitivnim izvorom HSCs, pokazale su da ova regija ne proizvodi dovoljne količine HSCs da bi sama mogla da objasni broj HSCs detektovanih u fetalnoj jetri [150]. U tom kontekstu, populacija

CD41 imunoreaktivnih HSCs ćelija detektovanih u posteljici može imati kompenzatornu ili prelaznu funkciju u hematopoetskom sistemu fetusa, premošćujući nedostatak koji postoji između AGM regije i fetalne jetre.

Iako se ranije smatralo da je CD41 isključivo marker embrionalnih HSCs, novije studije na animalnim modelima su pokazale da ove ćelije mogu preživjeti dugoročno u koštanoj srži i aktivno učestvovati u adultnoj hematopoezi. Zanimljivo je da se njihov broj povećava sa starošću organizma, što otvara mogućnost da CD41 imunoreaktivne HSCs ćelije predstavljaju specifičnu podpopulaciju LT-HSCs koje su rezistentne na iscrpljivanje tokom životnog vijeka [94,151].

U tom smislu, CD41 imunoreaktivne ćelije koje smo identifikovali u posteljici mogu se tumačiti kao zrele i razvojno stabilne HSCs, sa potencijalom za dugoročno održavanje hematopoeze. Iako brojčano skromne, njihova precizna lokalizacija, fenotipski profil i razvojna dinamika ukazuju na specijalizovanu funkciju koja nadilazi ulogu privremenih embrionalnih progenitora.

6.6. ANALIZA CD38 IMUNOREAKTIVNIH HEMATOPOETSKIH MATIČNIH ĆELIJA

U humanoj populaciji, CD38 se smatra markerom nezrelih hematopoetskih matičnih ćelija, odnosno ćelija koje još nisu stekle sposobnost multipotentne diferencijacije u sve hematopoetske loze [77, 152–155]. Prisustvo ovog markera, koji se eksprimira na površini određenih subpopulacija HSCs, ukazuje na ćelije koje se nalaze u intermedijarnoj fazi razvoja, sa ograničenim regenerativnim potencijalom u poređenju sa primitivnijim HSCs koje ne eksprimiraju CD38.

Zanimljivo je da postoje značajne razlike u ekspresiji CD38 kod humnih HSCs u odnosu na animalne modele, što ukazuje na vrstama specifične fenotipske i funkcionalne osobine hematopoetskog sistema. Međutim, ono što je zajedničko za obje vrste jeste da ćelije mikrookruženja, poput stromalnih i endotelnih ćelija, mogu ekspimirati CD38 i na taj način regulisati stanje mirovanja HSCs putem parakrinih signala, čime se utiče na očuvanje njihove sposobnosti samoobnavljanja i otpornost na stres [156].

Dodatno, pojedini autori su povezali ekspresiju CD38 sa procesom starenja hematopoetskog sistema, navodeći da se intenzitet CD38 signalizacije povećava sa dobi i da ovaj marker može poslužiti kao indikator ćelijskog senescencijskog profila [157,158]. Takođe, ekspresija CD38

je često povezana s kasnijim fazama diferencijacije HSCs, kada ćelije postaju sve više usmjerene ka specifičnim lozama.

Sa druge strane, CD38 imunoreaktivne HSCs predstavljaju najprimitivniju i najmultipotentniju podpopulaciju, karakterisanu sposobnošću dugotrajnog samoodržavanja i otpornosti na stresne uslove. Ove ćelije su funkcionalno ključne za dugoročno obnavljanje hematopoetskog sistema, jer ostaju u "tihom" fazi, što ih štiti od iscrpljivanja i funkcionalnog gubitka [159].

U okviru našeg istraživanja, nismo detektovali CD38 imunoreaktivne HSCs u zdravom tkivu posteljice, što nam omogućava da zaključimo da posteljica sadrži isključivo zrelije HSCs populacije, koje su već prošle kroz rane faze linijske orijentacije i diferencijacije. Ovaj nalaz podržava tezu da je hematopoetska aktivnost posteljice ograničena na progenitorske i diferencirane populacije, bez značajnijeg prisustva primitivnih LT-HSCs koje karakteriše CD38-negativan status.

Takođe je važno napomenuti da CD38 nije isključivo marker HSCs, već da se ekspresija ovog proteina nalazi i na površini različitih zrelih leukocitnih ćelija, uključujući plazma ćelije, T-limfocite i NK ćelije. Njihova koncentracija je posebno povećana u patološkim stanjima, kao što su infekcije, inflamatorni odgovori i hematološki maligniteti. Stoga, odsustvo svih CD38 imunoreaktivnih ćelija u analiziranim uzorcima posteljice takođe služi kao dodatna potvrda da je materijal korišten isključivo zdravih posteljica, bez prisustva upalnih ili infekcijskih procesa.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata istraživanja histološke građe posteljice različite starosti i hematopoetskih matičnih ćelija u humanim posteljicama različite starosti dolazimo do sledećih zaključaka:

1. u humanim posteljicama su prisutne populacije CD34, CD45, CD117 i CD41 hematopoetskih matičnih ćelija;
2. u humanim posteljicama nisu prisutne populacije CD38 imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija;
3. humane posteljice tokom drugog trimestra sadrže najveći broj hematopoetskih matičnih ćelija;
4. sve detektovane populacije hematopoetskih matičnih ćelija ispoljavaju slične morfološke karakteristike u svim periodima gestacije. Veličina im je oko 6-7 mikrometara, posjeduju centralno postavljeno okruglo jedro okruženo užim ili širim pojasom citoplazme;
5. CD34 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije su prisutne u humanim posteljicama tokom čitave gestacije. U prvom trimestru su najbrojnije unutar krvnih sudova, a sa napredovanjem gestacije povećava se njihov broj i u stromi horionske ploče i horionskih resica, najveća N_A CD34 imunoreaktivnih matičnih ćelija je izmjerena u drugom trimestru (462,5);
6. CD45 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije su prisutne u humanim posteljicama tokom čitave gestacije; najbrojnije su unutar krvnih sudova tokom čitave gestacije, dok se u stromi horionske ploče i horionskih resica nalaze kao rijetke i pojedinačne ćelije; najveća N_A CD45 imunoreaktivnih matičnih ćelija je izmjerena u prvom trimestru (253,1);
7. CD117 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije su prisutne u humanim posteljicama u prvom i drugom trimestru, najbrojnije su unutar krvnih sudova u prvom trimestru, dok je u drugom trimestru izraženija njihova stromalna lokalizacija; najveća N_A CD117 imunoreaktivnih matičnih ćelija je izmjerena u prvom trimestru (222,2);
8. CD41 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije su prisutne u humanim posteljicama u periodu od 10. do 22. nedjelje gestacije, podjednako su zastupljene i unutar krvnih sudova i u stromi horionske ploče i horionskih resica; najveća N_A CD41 imunoreaktivnih matičnih ćelija je izmjerena u prvom trimestru (54,1);
9. u humanim posteljica tokom sva tri trimestra su najzastupljnije populacije CD34 imunoreaktivnih ćelija, odnosno nalazimo najviše vrijednosti N_A CD34 imunoreaktivnih ćelija; u prvom i drugom trimestru te vrijednosti prate i CD45 i CD117 imunoreaktivne

ćelije; N_A CD41 imunorektivnih ćelija ima najniže vrijednosti u odnosu na ostale detektovane populacije imunoreaktivnih hematopoetskih matičnih ćelija;

10. rezultati pokazuju da je posteljica bogat izvor zrelih hematopoetskih matičnih ćelija tokom čitave gestacije; od najvećeg značaja je prisustvo hematopoetskih ćelija u posteljicama trećeg trimestra jer prednosti upotreba posteljice za izolaciju hematopoetskih matičnih ćelija se zasnivaju na njenoj dostupnosti, a što se samo odnosi na zrele terminske posteljice; takođe, važno je da su prisutne zrele hematopoetske matične ćelije, odnosno one koje imaju sposobnost multilinearne diferencijacije, a to su CD34, CD117, CD45 i CD41 imunoreaktivne hematopoetske matične ćelije;
11. hematopoetske matične ćelije izolovane iz humane posteljice predstavljaju izuzetno važan i perspektivan izvor za potrebe regenerativne medicine i transplantacione terapije; njihova jedinstvena biološka svojstva, uključujući visok proliferativni kapacitet, sposobnost diferencijacije u sve krvne i imune ćelijske linije, kao i niža imunogeničnost, izdvajaju ih kao superiornu alternativu u poređenju sa tradicionalnim izvorima poput koštane srži i periferne krvi; za razliku od tih izvora, posteljica je lako dostupna, neinvazivna i etički prihvatljiva jer se prirodno odbacuje nakon porođaja, čime se eliminiše potreba za agresivnim intervencijama i smanjuje rizik za davaoca;
12. dodatna prednost posteljičnih hematopoetskih matičnih ćelija leži u njihovoj sposobnosti da se koriste kod nepovezanih primalaca sa nižim rizikom od razvoja graft-versus-host bolesti, što je ključna komplikacija u alogenim transplantacijama; takođe, mogućnost njihovog kombinovanja sa mezenhimalnim ćelijama iz iste placente dodatno pojačava terapijski efekat kroz imunomodulaciju i podršku hematopoezi;
13. u svijetlu rastućeg interesa za ćelijske terapije, hematopoetske matične ćelije iz posteljice imaju potencijal da postanu jedan od glavnih stubova personalizovane i regenerativne medicine budućnosti; dalja standardizacija procedura izolacije, očuvanja i primjene ovih ćelija može omogućiti njihovu širu kliničku upotrebu i znatno unaprijediti ishode u liječenju brojnih hematoloških, imunoloških i onkoloških oboljenja.

8. REFERENCE

1. Nikolić I, Rančić G, Radenković G, et al. Embriologija čoveka. Beograd. Data Status. 2018.
2. Camm J, Wong G, Pan Y, et al. Assessment of an AI-based tool for population-wide collection of placental morphological data. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2024. 299: 110–117.
3. Kong F, Fu Y, Shi H, et al. Placental Abnormalities and Placenta-Related Complications Following In-Vitro Fertilization: Based on National Hospitalized Data in China. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Jun 30;13:924070.
4. Griffith O. W. Novel tissue interactions support the evolution of placentation. *Journal of morphology*. 2021 282(7), 1047–1053.
5. Wamaitha E, Niakan K. Human Pre-gastrulation Development. *Current topics in developmental biology*, 2018, 128, 295–338.
6. Huppertz B. The anatomy of the normal placenta. *Journal of clinical pathology*, 2008 61(12), 1296–1302.
7. Todorović V. i sar. Ekstraembrionalne strukture. U *Embriologija čoveka i kongenitalne anomalije* (Urednik Nikolić I). Data Status, Beograd (u štampi).
8. Gauster M, Moser G, Wernitznig S, Kupper N, Huppertz B. Early human trophoblast development: from morphology to function. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 2022, 79(6), 345.
9. Huang C, Hsueh W, Chang W, et al. Establishment of the fetal-maternal interface: developmental events in human implantation and placentation. *Frontiers in cell and developmental biology* 11, 2023, 1200330.
10. Dietrich B, Haider S, Meinhardt G, Pollheimer J, Knöfler M. WNT and NOTCH signaling in human trophoblast development and differentiation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 2022, 79(6), 292.
11. Turco Y, Moffett A. Development of the human placenta. *Development (Cambridge, England)*, 2019, 146(22), dev163428.
12. Liu X, Wang G, Huang H et al. Exploring maternal-fetal interface with in vitro placental and trophoblastic models. *Front Cell Dev Biol*. 2023 Nov 14;11:1279227.
13. Guttmacher E, Maddox T, Spong Y. The Human Placenta Project: placental structure, development, and function in real time. *Placenta*, 2014, 35(5), 303–304.

14. Kojima J, Ono M, Kuji N, Nishi H. Human Chorionic Villous Differentiation and Placental Development. *Int J Mol Sci.* 2022 Jul 20;23(14):8003.
15. Kingdom J, Huppertz B, Seaward G, Kaufmann P. Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 2000, 92(1), 35–43.
16. Herrick EJ, Bordoni B. Embryology, Placenta. In: *StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan.*
17. Burton GJ, Watson AL, Hempstock J, Skepper JN, Jauniaux E. Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(6):2954–2959.
18. Menon R, Richardson S, Lappas M. Fetal membrane architecture, aging and inflammation in pregnancy and parturition. *Placenta*, 2019 79, 40–45.
19. Favaron O, Carvalho C, Borghesi J, Anunciação R, Miglino A. The Amniotic Membrane: Development and Potential Applications - A Review. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 2015, 50(6), 881–892.
20. Maurya K, Szwarc M, Lonard M, et al. . Decidualization of human endometrial stromal cells requires steroid receptor coactivator-3. *Frontiers in reproductive health*, 2022.4, 1033581.
21. Ljubojević V. Posteljica i amnion- morfofunkcionalne karakteristike i klinički značaj. Banja Luka, Medicinski fakultet Banja Luka, 2023.
22. Zhang X, Wei H. Role of Decidual Natural Killer Cells in Human Pregnancy and Related Pregnancy Complications. *Frontiers in immunology*, 2021, 12, 728291.
23. Erlebacher A. Immunology of the maternal-fetal interface. *Annual review of immunology*, 2013, 31, 387–411.
24. Kafili G, Niknejad H, Tamjid E, Simchi A. Amnion-derived hydrogels as a versatile platform for regenerative therapy: from lab to market. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 2024, 12, 1358977.
25. Mamede C, Carvalho J, Abrantes M, Laranjo M, Maia J, Botelho F. Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. *Cell and tissue research*, 2012, 349(2), 447–458.
26. Guo X, Zhang W, Lu J, et al. Amniotic miracle: Investigating the unique development and applications of amniotic membrane in wound healing. *Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and]*

- International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI), 2024, 30(7), e13860.
27. Burton J, Fowden L. The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 2015, 370(1663), 20140066.
 28. Sjaarda A, Ahrens A, Kuhr L, et al. Pilot study of placental tissue collection, processing, and measurement procedures for large scale assessment of placental inflammation. *PloS one*, 2018, 13(5), e0197039.
 29. Novak F. A brief review of the anatomy, histology, and ultrastructure of the full-term placenta. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 1991, 115(7), 654–659.
 30. Widdows K, Kingdom C, Ansari T. Double immuno-labelling of proliferating villous cytotrophoblasts in thick paraffin sections: integrating immuno-histochemistry and stereology in the human placenta. *Placenta*, 2009, 30(8), 735–738.
 31. Ortega A, Fraile-Martínez O, García-Montero C et al. The Pivotal Role of the Placenta in Normal and Pathological Pregnancies: A Focus on Preeclampsia, Fetal Growth Restriction, and Maternal Chronic Venous Disease. *Cells*, 2022, 11(3), 568.
 32. Iwaki T, Sandoval-Cooper MJ, Paiva M, Kobayashi T, Ploplis VA, Castellino FJ. Fibrinogen stabilizes placental-maternal attachment during embryonic development in the mouse. *Am J Pathol*. 2002 Mar;160(3):1021-34.
 33. Bank AM, Stowe ZN, Newport DJ, Ritchie JC, Pennell PB. Placental passage of antiepileptic drugs at delivery and neonatal outcomes. *Epilepsia*. 2017 May;58(5):e82-e86.
 34. Jovičić S, Ljubojević V, Barudžija M, Amidžić LJ, Škrbić R, Nikolić R. Influence of advanced maternal age and gestational age on the morphology of human placenta. *Scr Med*. 2024 Nov-Dec;55(6):727-34.
 35. Arumugasaamy N, Rock KD, Kuo CY, Bale TL, Fisher JP. Microphysiological systems of the placental barrier. *Adv Drug Deliv Rev*. 2020;161-162:161-175.
 36. Gupta R, Gupta R. *Reproductive and Developmental Toxicology (Second Edition)*, Chapter 68 - Placental Toxicity, Academic Press, 2017,
 37. Li Z, Kurosawa O, Iwata H. (2020). A Novel Human Placental Barrier Model Based on Trophoblast Stem Cells Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Tissue engineering. Part A*, 2020, 26(13-14), 780–791.
 38. Garnica D, Chan Y. The role of the placenta in fetal nutrition and growth. *Journal of the American College of Nutrition*, 1996, 15(3), 206–222.

39. Hay WW Jr. Placental-fetal glucose exchange and fetal glucose metabolism. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2006;117:321-39; discussion 339-40. PMID: 18528484; PMCID: PMC1500912, <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.000851>,
40. Illsley NP, Baumann MU. Human placental glucose transport in fetoplacental growth and metabolism. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020 Feb 1;1866(2):165359.
41. Brett E, Ferraro M, Yockell-Lelievre J, Gruslin A, Adamo B. Maternal–Fetal Nutrient Transport in Pregnancy Pathologies: The Role of the Placenta. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 16153-16185.
42. Jansson, T. Amino Acid Transporters in the Human Placenta. *Pediatr Res*, 2001, 49, 141–147.
43. Burton J, Fowden L, Thornburg L. Placental Origins of Chronic Disease. *Physiological reviews*, 2016, 96(4), 1509–1565.
44. Vaupel P, Multhoff G. Blood Flow and Respiratory Gas Exchange in the Human Placenta at Term: A Data Update. *Advances in experimental medicine and biology*, 2022, 1395, 379–384.
45. Gude M, Roberts T, Kalionis B, King G. Growth and function of the normal human placenta. *Thrombosis research*, 2004, 114(5-6), 397–407. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2004.06.038>
46. Colin T. Jones. Endocrine function of the placenta, *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism*, Volume 3, Issue 3, 1989, Pages 755-780,
47. Schumacher A. Brachwitz N, Sohr S, et al. Human Chorionic Gonadotropin Attracts Regulatory T Cells into the Fetal-Maternal Interface during Early Human Pregnancy. *J Immunol* 1 May 2009; 182 (9): 5488–5497.
48. Pérez-Pérez A, Toro A, Vilariño-García T, et al. Leptin action in normal and pathological pregnancies. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2018, 22(2),
49. Napso T, Yong J, Lopez-Tello J, Sferruzzi-Perri N. The Role of Placental Hormones in Mediating Maternal Adaptations to Support Pregnancy and Lactation. *Frontiers in physiology*, 2018, 9, 1091.
50. Velegrakis A, Sfakiotaki M, Sifakis S. Human placental growth hormone in normal and abnormal fetal growth. *Biomedical reports*, 2017, 7(2), 115–122.
51. Canu G, Ruhrberg C. First blood: the endothelial origins of hematopoietic progenitors. *Angiogenesis* 24,2021,199–211.
52. Gritz E, Hirschi K. Specification and function of hemogenic endothelium during embryogenesis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 2016, 73(8), 1547–1567.

53. Sommer A, Gomez E. Extraembryonic hematopoietic lineages-to macrophages and beyond. *Experimental hematology*, 2024, 136, 104285.
54. Palis J, Segel B. Developmental biology of erythropoiesis. *Blood reviews*, 1998, 12(2), 106–114.
55. Garcia-Alegria E, Menegatti S, Fadlullah H, Menendez P, Lacaud G, Kouskoff V. Early Human Hemogenic Endothelium Generates Primitive and Definitive Hematopoiesis In Vitro. *Stem cell reports*, 2018//11(5), 1061–1074.
56. Palis J, Malik J, Mcgrath E, Kingsley D. Primitive erythropoiesis in the mammalian embryo. *Int. J. Dev. Biol.* 2010, 54: 1011-1018.
57. Palis J, Koniski A. Functional Analysis of Erythroid Progenitors by Colony-Forming Assays. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2018, 1698, 117–132.
58. Mezu-Ndubuisi J, Maheshwari A. Role of macrophages in fetal development and perinatal disorders. *Pediatr Res* 90,2021,513–523.
59. Xu J, Matsuoka S, Yang C et al. Evidence for the presence of murine primitive megakaryocytopoiesis in the early yolk sac. *Blood*, 2001, 97(7), 2001, 2016–2022.
60. Ditadi A, Sturgeon M, Keller G. A view of human haematopoietic development from the Petri dish. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2017,18(1), 56–67. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.127>.
61. Baron H, Isern J, Fraser T. The embryonic origins of erythropoiesis in mammals. *Blood*, 119(21), 2012, 4828–4837.
62. Miah M, Goh I, Haniffa M. Prenatal Development and Function of Human Mononuclear Phagocytes. *Frontiers in cell and developmental biology*, 2021, 9, 649937.
63. Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: development and tissue specialization. *Annual review of immunology*, 2015, 33, 643–675.
64. Yamane, T. Cellular Basis of Embryonic Hematopoiesis and Its Implications in Prenatal Erythropoiesis. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 9346. <https://doi.org/10.3390/ijms21249346>
65. Seburg HB, Cattarossi G, Muller-Sieburg CE. Lifespan differences in hematopoietic stem cells are due to imperfect repair and unstable mean-reversion. *PLoS Comput Biol.* 2013 Apr;9(4):e1003006.
66. Zeng X, Xu Y, Wang B. Mechanisms and rejuvenation strategies for aged hematopoietic stem cells. *Journal of hematology & oncology*, 2020, 13(1), 31.
67. Cheng H, Zheng Z, Cheng T. New Paradigms on Hematopoietic Stem Cell Differentiation. *Protein Cell*, 2020, 11 (1), 34–44.

68. Mann Z, Sengar M, Verma YK, Rajalingam R, Raghav PK. Hematopoietic Stem Cell Factors: Their Functional Role in Self-Renewal and Clinical Aspects. *Front Cell Dev Biol.* 2022 Mar 24;10:664261.
69. Calvanese V, Mikkola A. The genesis of human hematopoietic stem cells. *Blood*,2023, 142(6), 519–532.
70. Nikolić I, Todorović V, Lačković V, et al. *Histologija i osnovna embriologija.* Beograd. Data Status. 2023.
71. Gao X, Xu C, Asada N, Frenette PS. The hematopoietic stem cell niche: from embryo to adult. *Development.* 2018 Jan 22;145(2):dev139691.
72. Bertrand Y, Kim D, Violette P, Stachura L, Cisson L, Traver D. Definitive hematopoiesis initiates through a committed erythromyeloid progenitor in the zebrafish embryo. *Development (Cambridge, England)*, 2007, 134(23), 4147–4156.
73. de Bruijn F, Speck A, Peeters C, Dzierzak E. Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo. *The EMBO journal*, 2000, 19(11), 2465–2474.
74. Gekas C, Rhodes E, Van Handel B, Chhabra A, Ueno M, Mikkola K. Hematopoietic stem cell development in the placenta. *The International journal of developmental biology*, 2010, 54(6-7), 1089–1098.
75. Dzierzak E, Robin C. Placenta as a source of hematopoietic stem cells. *Trends in molecular medicine*, 2010, 16(8), 361–367.
76. Gekas C, Dieterlen-Lièvre F, Orkin H, Mikkola K. The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Developmental cell*, 2005 8(3), 365–375.
77. Robin C, Bollerot K, Mendes S. Human placenta is a potent hematopoietic niche containing hematopoietic stem and progenitor cells throughout development. *Cell stem cell*, 2009, 5(4), 385–395.
78. Rhodes E, Gekas C, Wang Y. The emergence of hematopoietic stem cells is initiated in the placental vasculature in the absence of circulation. *Cell stem cell*, 2008, 2(3), 252–263.
79. Mikkola K, Gekas C, Orkin H, Dieterlen-Lievre F. Placenta as a site for hematopoietic stem cell development. *Experimental hematology*, 2005, 33(9), 1048–1054.
80. Moras M, Hattab C, Gonzalez-Menendez P. et al. Human erythroid differentiation requires VDAC1-mediated mitochondrial clearance. *Haematologica.* 2022 Jan 1;107(1):167-177.

81. Rix B, Maduro H, Bridge S, Grey W. Markers for human haematopoietic stem cells: The disconnect between an identification marker and its function. *Frontiers in physiology*, 2022, 13, 1009160.
82. Goodwin J, Laslett L, Rugg-Gunn J. The application of cell surface markers to demarcate distinct human pluripotent states. *Experimental cell research*, 2020, 387(1), 111749.
83. Sidney L, Branch M, Dunphy S, Dua H, Hopkinson A, Concise Review: Evidence for CD34 as a Common Marker for Diverse Progenitors, Stem Cells, Volume 32, Issue 6, June 2014, Pages 1380–1389.
84. Rakocevic J, Orlic D, Mitrovic-Ajtic O. et al. Endothelial cell markers from clinician's perspective. *Experimental and molecular pathology*, 2017,102(2), 303–313.
85. Cao M, Wong M, Sheehan K. CD34, CD4, and CD8 cell doses do not influence engraftment, graft-versus-host disease, or survival following myeloablative human leukocyte antigen-identical peripheral blood allografting for hematologic malignancies. *Experimental hematology*, 2005 33(3), 279–285.
86. Ratajczak,W, Luger S, Gewirtz A. The c-kit proto-oncogene in normal and malignant human hematopoiesis, *Tternatiohe Innal Journal Of Cell Cloning*, Volume 10, Issue 4, 1992, 205–214.
87. Escribano L, Ocqueteau M, Almeida J, Orfao A, San Miguel F. Expression of the c-kit (CD117) molecule in normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia & lymphoma*, 1998, 30(5-6), 459–466.
88. Koh M, Lee J, Kim C. Prognostic and clinicopathological value of CD90 expression in cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Translational cancer research*, 2021, 10(7), 3356–3363.
89. Shmelkov V, St Clair R, Lyden D, Rafii S. AC133/CD133/Prominin-1. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2005, 37(4), 715–719.
90. Bessy T, Candelas A, Souquet B, (2021). Hematopoietic progenitors polarize in contact with bone marrow stromal cells in response to SDF1. *The Journal of cell biology*, 2021, 220(11), e202005085.
91. Hashimoto K, Fujimoto T, Shimoda Y, Huang X, Sakamoto H, Ogawa M. Distinct hemogenic potential of endothelial cells and CD41+ cells in mouse embryos. *Development, growth & differentiation*, 2007, 49(4), 287–300.

92. Robin C, Ottersbach K, Boisset C, Oziemlak A, Dzierzak E. (2011). CD41 is developmentally regulated and differentially expressed on mouse hematopoietic stem cells. *Blood*, 2011, 117(19), 5088–5091.
93. Mitjavila-Garcia T, Cailleret M, Godin I. Expression of CD41 on hematopoietic progenitors derived from embryonic hematopoietic cells. *Development (Cambridge, England)*, 2002, 129(8), 2003–2013.
94. Horenstein L, Faini C, Morandi F et al. The Circular Life of Human CD38: From Basic Science to Clinics and Back. *Molecules* 2020, 25, 4844. <https://doi.org/10.3390/molecules25204844>.
95. Hartman R, Pellemounter L, Moon I et al. CD38 expression, function, and gene resequencing in a human lymphoblastoid cell line-based model system. *Leukemia & Lymphoma*, 2010, 51(7), 1315–1325.
96. Ngo N, Patel K, Isaacson G, Naresh N. Leukocyte common antigen (CD45) and CD5 positivity in an "undifferentiated" carcinoma: a potential diagnostic pitfall. *Journal of clinical pathology*, 2007, 60(8), 936–938..
97. Ogata K, Satoh C, Tachibana M, et al. Identification and hematopoietic potential of CD45- clonal cells with very immature phenotype (CD45-CD34-CD38-Lin-) in patients with myelodysplastic syndromes. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 2005, 23(5), 619–630.
98. Musa E, Salazar-Petres E, Arowolo A, Levitt N, Matjila M, Sferruzzi-Perri N. Obesity and gestational diabetes independently and collectively induce specific effects on placental structure, inflammation and endocrine function in a cohort of South African women. *The Journal of physiology*, 2023, 601(7), 1287–1306.
99. Whittington R, Cummings F, Ounpraseuth T, Aughenbaugh L, Quick M, Dajani K. Placental changes in diabetic pregnancies and the contribution of hypertension. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 2022, 35(3), 486–494.
100. Kališnik M, Eržen I, Smolej V. Temelji stereologije. Društvo za stereologijo in kvantitativno analizo slike (DSKAS): Ljubljana, 2002.
101. Keklik M, Deveci B, Celik S. et al. Safety and efficacy of mesenchymal stromal cell therapy for multi-drug-resistant acute and late-acute graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annals of hematology*, 2022, 102(6), 1537–1547.

102. Fu H, Sun X, Lin R, et al. Mesenchymal stromal cells plus basiliximab improve the response of steroid-refractory acute graft-versus-host disease as a second-line therapy: a multicentre, randomized, controlled trial. *BMC medicine*, 2024 22(1), 85.
103. Kurtzberg J, Laughlin M, Graham L, et al. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *The New England journal of medicine*, 1996, 335(3), 157–166.
104. Bárcena A, Muench O, Kapidzic M, Fisher J. A new role for the human placenta as a hematopoietic site throughout gestation. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 2009 16(2), 178–187.
105. Robin C, Bollerot K, Mendes S, et al. Human placenta is a potent hematopoietic niche containing hematopoietic stem and progenitor cells throughout development. *Cell stem cell*, 2009, 5(4), 385–395.
106. Azevedo N, Tavares P, Croy A, Pelajo-Machado M. Localization of transient immature hematopoietic cells to two distinct, potential niches in the developing mouse placenta. *Placenta*, 2016, 47, 1–11.
107. Guo X, Mahlaköiv T, Ye Q, et al. *CBLB* ablation with CRISPR/Cas9 enhances cytotoxicity of human placental stem cell-derived NK cells for cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer*. 2021 Mar;9(3):e001975.
108. Gleason J, Zhao Y, Raitman I, Kang L, He S, Hariri, R. Human placental hematopoietic stem cell derived natural killer cells (CYNK-001) mediate protection against influenza a viral infection. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 2022, 18(5), 2055945.
109. Ivanovic Z. Hematopoietic stem cells in research and clinical applications: The "CD34 issue". *World J Stem Cells*. 2010 Apr 26;2(2):18-23.
110. Azevedo N, Pelajo-Machado M. Mechanism of hematopoiesis and vasculogenesis in mouse placenta. *Placenta*, 2018, 69, 140–145.
111. Ramalingam P, Poulos G, Butler M. Regulation of the hematopoietic stem cell lifecycle by the endothelial niche. *Current opinion in hematology*, 2017, 24(4), 289–299.
112. Vogel W, Scheduling S, Kanz L, Brugger W. Clinical Applications of CD34+ Peripheral Blood Progenitor Cells (PBPC), *Stem Cells*, 2000, 18 (2), 87–92.
113. Raynaud M, Butler M, Halabi M, et al. Endothelial cells provide a niche for placental hematopoietic stem/progenitor cell expansion through broad transcriptomic modification. *Stem cell research*, 2013, 11(3), 1074–1090.
114. Hirschi KK. Hemogenic endothelium during development and beyond. *Blood*. 2012 May 24;119(21):4823-7.

115. Nishikawa E, Matsumoto T, Isige M, Tsuji T, Muchisima H, Takahashi S. Comparison of capacities to maintain hematopoietic stem cells among different types of stem cells derived from the placenta and umbilical cord. *Regenerative therapy*, 2016, 4, 48–61.
116. Medvinsky A, Rybtsov S, Taoudi S. Embryonic origin of the adult hematopoietic system: Advances and questions. *Development*, 2011, 138(6), 1017–1031.
117. Kuruvilla J, Widness A, Nalbant D, et al. A Method to Evaluate Fetal Erythropoiesis from Postnatal Survival of Fetal RBCs. *The AAPS journal*, 2015, 17(5), 1246–1254.
118. Biasini M, Botrè F, de la Torre X. et al. Age-Markers on the Red Blood Cell Surface and Erythrocyte Microparticles may Constitute a Multi-parametric Strategy for Detection of Autologous Blood Transfusion. *Sports Med - Open* 9, 2023, 113.
119. Alvarez-Silva M, Belo-Diabangouaya P, Salaün, Dieterlen-Lièvre F. Mouse placenta is a major hematopoietic organ. *Development*, 2003, 130(22), 5437–5444.
120. Samundeshwari L, Kattaru S, Kodavala S, Chandrasekhar C, Sarma K. Differentiation ability of hematopoietic stem cells and mesenchymal stem cells isolated from human peripheral blood. *Frontiers in cell and developmental biology*, 2024, 12, 1450543.
121. Biezeman H, Nubiè M, Oburoglu L. Hematopoietic cells emerging from hemogenic endothelium exhibit lineage-specific oxidative stress responses. *The Journal of biological chemistry*, 2024 300(11), 107815.
122. Wei Y, Zhang E, Yu L, et al. Dissecting embryonic and extraembryonic lineage crosstalk with stem cell co-culture. *Cell*, 2023, 186(26), 5859–5875.e24.
123. Serikov V, Hounshell C, Larkin S, et al. Human term placenta as a source of hematopoietic cells. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 2009, 234(7), 813–823.
124. Vladičić Mašić J, Nikolić I, Todorović V, Jović M, Petrović V, Mašić S, et al. Numerička arealna gustina CD34 i CD117 imunoreaktivnih hematopoetskih ćelija u jetri humanog embriona i fetusa. *Biomedicinska istraživanja*. 2019;10(2):111-7.
125. Zheng Z, He H, Tang T, et al. Uncovering the emergence of HSCs in the human fetal bone marrow by single-cell RNA-seq analysis. *Cell stem cell*, 2022, 29(11), 1562–1579.e7.
126. Xie X, Gou F, Zheng Z, Zhang Y, Zhang Y, Dong F, Cheng T, Cheng H. Decoding human bone marrow hematopoietic stem and progenitor cells from fetal to birth. *iScience*, 2024 27(8), 110445..
127. Hassanpour M, Salybekov A, Kobayashi S, Asahara T. CD34 positive cells as endothelial progenitor cells in biology and medicine. *Frontiers in cell and developmental*

- biology, 2023 11, 1128134.
128. Kuchma D, Kyryk M, Svitina M, Shablii M, Lukash L, Lobyntseva S, Shablii A. Comparative Analysis of the Hematopoietic Progenitor Cells from Placenta, Cord Blood, and Fetal Liver, Based on Their Immunophenotype. *BioMed research international*, 2015, 418752.
 129. McKinney-Freeman SL, Naveiras O, Yates F, Loewer S, Philitas M, Curran M, Park PJ, Daley GQ. Surface antigen phenotypes of hematopoietic stem cells from embryos and murine embryonic stem cells. *Blood*. 2009 Jul 9;114(2):268-78.
 130. Cortegano I, Serrano N, Ruiz C, et al. CD45 expression discriminates waves of embryonic megakaryocytes in the mouse. *Haematologica* 2019;104(9):1853-1865;.
 131. Battiwalla M, Hematti P. Mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Cytotherapy*. 2009;11(5):503-15.
 132. Burnham J, Daley-Bauer P, Horwitz M. Mesenchymal stromal cells in hematopoietic cell transplantation. *Blood advances*, 2020 4(22), 5877–5887.
 133. Rutella S, Bonanno G, Marone M, et al. Identification of a novel subpopulation of human cord blood CD34-CD133-CD7-CD45+lineage- cells capable of lymphoid/NK cell differentiation after in vitro exposure to IL-15. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2003, 171(6), 2977–2988.
 134. Thomas R, Naidu P, Appios A, McGovern N. The Ontogeny and Function of Placental Macrophages. *Frontiers in immunology*, 2021, 12, 771054.
 135. Swieboda D, Johnson EL, Beaver J, et al. Baby's First Macrophage: Temporal Regulation of Hofbauer Cell Phenotype Influences Ligand-Mediated Innate Immune Responses across Gestation. *J Immunol*. 2020 May 1;204(9):2380-2391.
 136. Yang H, Chelariu-Raicu A, Makri D, et al. Updates of placental macrophages: Origins, molecular markers, functions, and related diseases. *Journal of reproductive immunology*, 2023, 157, 103942.
 137. Lin F, Wang S, Xiong H, Liu Y, Li X, Huang C. Role of microvascular endothelial cells on proliferation, migration and adhesion of hematopoietic stem cells. *Biosci Rep*. 2020 Mar 27;40(3):BSR20192104.
 138. Ottersbach K, Dzierzak E. The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region. *Developmental cell*, 2005, 8(3), 377–387.
 139. Chi Y, Jin Y, He Z, Yu T. Detection of cytokines in supernatant from hematopoietic stem/progenitor cells co-cultured with mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells. *Cell Tissue Bank*. 2014, 15, 397–402 10.1007/s10561-013-9404-y

140. Kosmider O, Buet D, Gallais I, Denis N, Moreau-Gachelin F. Erythropoietin down-regulates stem cell factor receptor (Kit) expression in the leukemic proerythroblast: role of Lyn kinase. *PloS one*, 2009 4(5), e5721.
141. McIver C, Katsumura R, Davids E. et al. Exosome complex orchestrates developmental signaling to balance proliferation and differentiation during erythropoiesis. *eLife*, 2016, 5, e17877.
142. Honilla X, Lara M, Llano-León M, et al. Mesenchymal Stromal Cells from Perinatal Tissues as an Alternative for Ex Vivo Expansion of Hematopoietic Progenitor and Stem Cells from Umbilical Cord Blood. *International journal of molecular sciences*, 2023, 24(21), 15544.
143. Vellasamy S, Sandrasaigaran P, Vidyadaran S, George E, Ramasamy R. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells derived from human placenta tissue. *World J Stem Cells*. 2012 Jun 26;4(6):53-61.
144. Tanaka Y, Sanchez V, Takata, N, et al. Circulation-independent differentiation pathway from extraembryonic mesoderm toward hematopoietic stem cells via hemogenic angioblasts. *Cell reports* 2014, 8(1), 31–39.
145. Hou M, Han J, Li G, et al. Multipotency of mouse trophoblast stem cells. *Stem cell research & therapy* 2020, 11(1), 55.
146. Yang G, Fan X, Liu Y, et al. Immunomodulatory Mechanisms and Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells. *Stem cell reviews and reports*, 2023, 19(5), 1214–1231.
147. Kumaravelu P, Hook L, Morrison M, Ure J, et al. Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs): role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver. *Development (Cambridge, England)*, 2002, 129(21), 4891–4899.
148. Gekas C, Graf T. CD41 expression marks myeloid-biased adult hematopoietic stem cells and increases with age. *Blood*, 2013, 121(22), 4463–4472.
149. Miao R, Chun H, Feng X, Gomes C, Choi J, Pereira P. Competition between hematopoietic stem and progenitor cells controls hematopoietic stem cell compartment size. *Nature communications*, 2022, 13(1), 4611.
150. Yamamoto R, Wilkinson C, Ooehara J. Large-Scale Clonal Analysis Resolves Aging of the Mouse Hematopoietic Stem Cell Compartment. *Cell stem cell*, 2018, 22(4), 600–607.e4.
151. Ibneeva L, Singh SP, Sinha A, et al. CD38 promotes hematopoietic stem cell dormancy.

PLoS Biol. 2024 Feb 29;22(2):e3002517.

152. Wisniewski D, Affer M, Willshire J. et al. Further phenotypic characterization of the primitive lineage— CD34+CD38–CD90+CD45RA– hematopoietic stem cell/progenitor cell sub-population isolated from cord blood, mobilized peripheral blood and patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood Cancer Journal* 1, 2011, e36.
153. Higuchi Y, Zeng H, Ogawa M. CD38 expression by hematopoietic stem cells of newborn and juvenile mice. *Leukemia* 17, 2003, 171–174. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402785>.
154. Glisovic-Aplenc T, Diorio C, Chukinas A, et al. CD38 as a pan-hematologic target for chimeric antigen receptor T cells. *Blood advances*, 2023, 7(16), 4418–4430.
155. Chini CCS, Peclat TR, Warner GM, et al. CD38 ecto-enzyme in immune cells is induced during aging and regulates NAD⁺ and NMN levels. *Nat Metab.* 2020 Nov;2(11):1284-1304.
156. Song Z, Park S.H, Mu WC. et al. An NAD⁺-dependent metabolic checkpoint regulates hematopoietic stem cell activation and aging. *Nat Aging* 4, 2024, 1384–1393.
157. Batsali AK, Georgopoulou A, Mavroudi I, Matheakakis A, Pontikoglou CG, Papadaki HA. The Role of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Derived Extracellular Vesicles (MSC-EVs) in Normal and Abnormal Hematopoiesis and Their Therapeutic Potential. *J Clin Med.* 2020 Mar 20;9(3):856.
158. Sarvar DP, Effatpanah H, Akbarzadehlaleh P, Shamsasenjan K. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles: novel approach in hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cell Res Ther.* 2022 May 16;13(1):202.
159. Phinney D.G, Prockop D.J. Concise review: Mesenchymal stem/multipotent stromal cells: The state of transdifferentiation and modes of tissue repair—Current views. *Stem Cells* 2007, 25, 2896–2902.

LISTA SKRAĆENICA

- AGM region** (engl. *Aorta-gonad-mesonephros region*) – Aortno-gonadomezonefrosni region
- bFGF** (engl. *Basic fibroblast growth factor*) – Bazični fibroblastni faktor rasta
- BFU-E** (engl. *Burst-Forming Unit-Erythroid*) – Jedinica za stvaranje eritroidnih kolonija
- CD** (engl. *Cluster of differentiation*) – Klaster diferencijacije
- CFCs** (engl. *Colony-Forming Cells*) – Čelije sa sposobnošću formiranja kolonija
- CFU-E** (engl. *Colony-Forming Unit-Erythroid*) – Jedinica sposobna za formiranje eritroidnih kolonija
- CFU-GM** (engl. *Colony-Forming Unit-Granulocyte-Macrophage*) – Jedinica sposobna za formiranje granulocitno-makrofagnih kolonija
- CFU-M** (engl. *Colony-Forming Unit-Macrophage*) – Jedinica sposobna za formiranje makrofagnih kolonija
- CFU-Meg** (engl. *Colony-Forming Unit-Megakaryocyte*) – Jedinica sposobna za formiranje megakariocitnih kolonija
- CLPs** (engl. *Common Lymphoid Progenitors*) – Zajednički limfoidni progenitori
- CMPs** (engl. *Common Myeloid Progenitors*) – Zajednički mijeloidni progenitori
- c-Myb** (engl. *cellular Myb*) – Transkripcioni faktor za proliferaciju i diferencijaciju hematopoetskih progenitora
- CSF-1** (engl. *Colony-Stimulating Factor 1*) – Faktor rasta koji stimulira rast kolonije 1
- CXCL12 (SDF-1)** – Hemokin koji učestvuje u migraciji i zadržavanju hematopoetskih matičnih ćelija u koštanoj srži, kao i u razvoju različitih tkiva
- EGF** (engl. *Epidermal Growth Factor*) – Epidermalni faktor rasta
- EMP** (engl. *Erythro-Myeloid Progenitors*) – Eritroidno-mijeloidni progenitori
- GATA1** – GATA1 vezujući protein (transkripcioni faktor)
- GMPs** (engl. *Granulocyte-Macrophage Progenitors*) – Granulocitno-makrofagni progenitori
- HPCs** (engl. *Hematopoietic Progenitor Cells*) – Hematopoetske progenitorske ćelije
- HSC** (engl. *Hematopoietic Stem Cell*) – Hematopoetska matična ćelija
- HSCs** (engl. *Hematopoietic Stem Cells*) – Hematopoetske matične ćelije
- IGF** (engl. *Insulin-like Growth Factors*) – Insulinu slični faktori rasta
- IL** (engl. *Interleukins*) – Interleukini
- IL6** (engl. *Interleukin 6*) – Interleukin 6
- KGF** (engl. *Keratinocyte Growth Factor*) – Keratinocitni faktor rasta
- KLF1** (engl. *Kruppel-like Factor 1*) – Transkripcioni faktor Krueppelov faktor 1
- LMP** (engl. *Lympho-Myeloid Progenitors*) – Limfoidno-mijeloidni progenitori
- LT-HSCs** (engl. *Long-Term Hematopoietic Stem Cells*) – Dugoživeće hematopoetske matične ćelije
- MEPs** (engl. *Megakaryocyte-Erythrocyte Progenitors*) – Megakariocitni-eritrocitni progenitori

NA (engl. *Numerical Areal Density*) – Numerička arealna gustina

NK ćelije (engl. *Natural Killer Cells*) – Ćelije prirodne ubice

Notch signaling pathway (engl. *Notch signaling pathway*) – Notch signalni put, ključan za diferencijaciju, proliferaciju i apoptozu ćelija

Runx1 (engl. *Runt-related Transcription Factor 1*) – Transkripcioni faktor povezan s runtom

SCF (engl. *Stem Cell Factor*) – Stimulativni faktor matičnih ćelija

SDF-1 (engl. *Stromal Cell-Derived Factor 1*) – Faktor 1 koji potiče iz stromalnih ćelija

ST-HSCs (engl. *Short-Term Hematopoietic Stem Cells*) – Kratkotrajne hematopoetske matične ćelije

TGF- α (engl. *Alpha-Transforming Growth Factor*) – Alfa transformirajući faktor rasta

TGF- β (engl. *Beta-Transforming Growth Factor*) – Beta transformirajući faktor rasta

TNF α (engl. *Tumor Necrosis Factor alpha*) – Faktor nekroze tumora alfa

VEGF (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*) – Vaskularni endotelni faktor rasta

Wnt signaling pathway (engl. *Wnt signaling pathway*) – Sekretorni signalni molekuli koji regulišu procese poput ćelijske proliferacije, diferencijacije, migracije i polariteta

BIOGRAFIJA

Sanja Jovičić rođena je 9. decembra 1988. godine u Tesliću. Osnovno obrazovanje završila je u rodnom gradu, a srednje obrazovanje stekla u Srednjoj medicinskoj školi u Doboju. Studije medicine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Banjoj Luci upisala je 2007. godine, a diplomirala 2013. godine, stekavši zvanje doktora medicine.

Profesionalnu karijeru započela je iste godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Banjoj Luci, na Katedri za histologiju i embriologiju, gdje je učestvovala u izvođenju nastave i istraživačkom radu.

Stručno usavršavanje nastavila je kroz specijalizaciju iz dermatovenerologije, koju je uspješno završila 2023. godine, stekavši zvanje specijaliste dermatologije. Tokom specijalizacije i nakon njenog završetka, radila je u Klinici za kožne i polne bolesti Univerzitetskog kliničkog centra Republike Srpske, gdje je stekla bogato iskustvo u kliničkoj dijagnostici i liječenju dermatoloških oboljenja.

Od osnivanja Centra za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci aktivna je članica istraživačkog tima, s fokusom na histološka i razvojna istraživanja.

Doktorske studije upisala je 2016. godine na istom fakultetu, usmjerivši se na naučnoistraživački rad u oblasti histologije. Tokom doktorskih studija učestvovala je u realizaciji više naučnih i stručnih projekata, izlagala radove na domaćim i međunarodnim naučnim skupovima i objavljivala rezultate istraživanja u relevantnim stručnim časopisima.

Doktorska disertacija pod nazivom „*Hematopoetske matične ćelije u humanim posteljicama različite starosti – imunohistohemijsko i morfometrijsko istraživanje*“ predstavlja rezultat višegodišnjeg predanog rada i posvećenosti nauci u oblasti histologije i embriologije.

U svom daljem profesionalnom razvoju ostaje posvećena kliničkom i naučnoistraživačkom radu, s posebnim interesovanjem za histologiju, regenerativnu medicinu, matične ćelije i dermatopatologiju.

Udata je i majka dvije djevojčice.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

**Изјављујем
да је докторска дисертација**

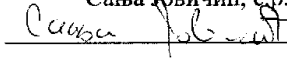
Наслов рада Хематопоетске матичне ћелије у хуманим постељицама различите старости-
имунохистохемијско и морфометријско истраживање

Наслов рада на енглеском језику Hematopoietic Stem Cells in Human Placentas of Different Ages-
Immunohistochemical and Morphometric study

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да докторска дисертација, у цјелини или у дијеловима, није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Бањој Луци, дана 12.05.2025. године

Потпис докторанта
Сања Јовичић, с.р.



Изјава 2

Изјава којом се овлашћује Универзитет у Бањој Луци да докторску дисертацију учини јавно доступном

Овлашћујем Универзитет у Бањој Луци да моју докторску дисертацију под насловом Хематопоеетске матичне ћелије у хуманим постељицама различите старости-имунохистохемијско и морфометријско истраживање која је моје ауторско дјело, учини јавно доступном.

Докторску дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

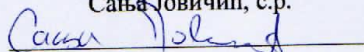
Моју докторску дисертацију похрањену у дигитални репозиторијум Универзитета у Бањој Луци могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (*Creative Commons*) за коју сам се одлучио/ла.

- Ауторство
- Ауторство – некомерцијално
- Ауторство – некомерцијално – без прераде
- Ауторство – некомерцијално – дијелити под истим условима
- Ауторство – без прераде
- Ауторство – дијелити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Бањој Луци, дана 12.05.2025. године

Потпис докторанта
Сања Јовичић, с.р.



Изјава 3

Изјава о идентичности штампане и електронске верзије докторске дисертације

Име и презиме аутора Сања Јовичић

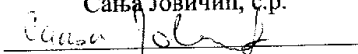
Наслов рада Хематопоеетске матичне ћелије у хуманим постелицама различите
старости-имунохистохемијско и морфометријско истраживање

Ментор Проф. др Иван Р. Николић
Коментор Проф. др Весна Љубојевић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације идентична електронској
верзији коју сам предао/ла за дигитални репозиторијум Универзитета у Бањој Луци.

У Бањој Луци, дана 12.05.2025. године

Потпис докторанта
Сања Јовичић, с.р.



ADDENDUM



Influence of Advanced Maternal Age and Gestational Age on the Morphology of Human Placenta

Sanja Jovičić,^{1,2} Vesna Ljubojević,^{2,3} Maja Barudžija,^{1,2} Ljiljana Amidžić,^{1,4} Ranko Škrbić,^{1,5,6} Ivan R Nikolić⁷

Abstract

Background/Aim: The placenta is an extraembryonic organ necessary for foetal development. Due to its availability and high content of stem cells and growth factors, placenta tissue has found its application in regenerative medicine. The aim of this paper was to determine whether the age of the pregnant woman or the gestational age affects the morphology of the term placenta and whether placentas of advanced maternal age are suitable for application in regenerative medicine.

Methods: In this research 30 placentas of healthy pregnant women, aged from 18 to 42 years and from 36 up to 41 weeks of gestational age were used for analyses. Tissue samples were stained with standard haematoxylin and eosin staining and immunohistochemical staining with anti-CD34 antibody. The parameters of volume density of chorionic villi, intervillous spaces and fibrinoids, as well as the thickness of the placental barrier were determined.

Results: The volume densities of chorionic villi and fibrinoids were higher in placentas of advanced maternal age, as well as in placentas of gestational age from 38 to 41 weeks of gestation, while the volume of intervillous spaces was lower in these groups. With increased maternal and gestation age, the placental membrane thickens.

Conclusion: When sampling placentas for regenerative medicine purposes, only the placentas from pregnant women younger than 35 years of age and whose gestational age are not exceeding 38 weeks should be selected.

Key words: Placenta; Maternal age, advanced; Morphometry.

1. Centre for Biomedical Research, Faculty of Medicine, University of Banja Luka, Banja Luka, The Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina.
2. Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, University of Banja Luka, Banja Luka, The Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina.
3. University Clinical Centre of the Republic of Srpska, Banja Luka, The Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina.
4. Department of Human Genetics, Faculty of Medicine, University of Banja Luka, Banja Luka, The Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina.
5. Department of Pharmacology, Toxicology and Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Banja Luka, Banja Luka, The Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina.
6. Department of Pathologic Physiology, First Moscow State Medical University IM Sechenov, Moscow, Russia.
7. Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, University of Niš, Niš, Serbia.

Citation:

Jovičić S, Ljubojević V, Barudžija M, Amidžić LJ, Škrbić R, Nikolić IR. Influence of advanced maternal age and gestational age on the morphology of human placenta. Scr Med. 2024 Nov-Dec;55(6):727-34.

Corresponding author:

SANJA JOVIČIĆ
E: sanja.jovicic@med.unibl.org
T: 0038751234100

Received: 11 July 2024

Revision received: 24 September 2024

Accepted: 24 September 2024

Introduction

The placenta is an extraembryonic temporary organ that develops in the uterus of a pregnant woman with the aim of establishing a unique exchange of substances between the mother and the foetus. It is the only organ that consists of two tissues of different origins, the tissue of the mother and the tissue of the foetus. Maternal tissue or decidua basalis consists of large eosinophilic decidual cells surrounded by fibrinoid. The foetal part consists of the chorionic plate, chorionic vil-

li and the spaces between the villi that are filled with maternal blood.^{1,2} In addition to being necessary for foetal growth and development, placental tissue has found its place in experimental and regenerative medicine.³

In recent years, there has been a great interest in the use of placental tissue in regenerative medicine due to the fact that placental tissue contains a large number of stem cells and growth factors

and it is also easily available after childbirth. With this interest new protocols for placental tissue sampling are being developed and new criteria are being introduced for the selection of optimal placental tissue since not every placenta is considered adequate. In addition to the already well-known and standardised application of amnion in wound healing, other parts of the placenta are also used in various forms for regenerative purposes.⁴⁻⁶ It is worth emphasising that only healthy placenta can be used for these purposes. Disorders in the structure and function of the placenta lead to disorders in the growth and development of the foetus. Impaired health of the pregnant woman affects the structure and function of the placenta, whether it is infectious diseases or chronic non-communicable diseases such as diabetes or hypertension that are widely present in the population. Such pregnancies are marked as risky and require intensive monitoring.^{2,7}

It is a well-known fact that as a woman's age increases, so does the possibility of infertility and if pregnancy occurs, it is considered as risky pregnancy. In pregnancies at advanced maternal age, there is an increased risk for placental dysfunction, preeclampsia, reduced foetal growth or premature birth.^{8,9} It is well known that pregnant women aged 35 and over at the time of delivery are designated as pregnancies at advanced maternal age.^{10,11} In recent years there is a noticeable trend of getting married later and as a result the age limit for having offspring is shifting and there are more and more pregnancies at advanced maternal age today.

Although pregnancy at advanced maternal age is associated with numerous complications, there are just a few studies that have dealt with the morphology of the human placentas of pregnancies at advanced maternal age.¹² Additionally, numerous studies have shown that chronic diseases such as diabetes affect the morphology of the placenta and that this cannot be used as a biological material for regenerative purposes.^{2,13}

The aim of this study was to analyse the morphology of the placenta in healthy pregnant women in order to determine whether the age of the pregnant woman and the gestational age affect the morphology of the term placenta, as well as to determine whether these can be used as criteria for selection of placental tissue as biological materials in regenerative medicine.

Methods

Selection of placentas

The study was performed in accordance with the standards set by the latest revision of the Declaration of Helsinki. After obtaining the consent of the competent Ethics Committee, (decision No: 18/4.167/21), placentas of gestational age from 36 to 41 weeks of gestation were sampled in the Clinic of Gynaecology and Obstetrics of the University Clinical Centre of the Republic of Srpska, Banja Luka (UCC RS). Only placentas from healthy pregnancies that ended by vaginal delivery were included in the study. In order to avoid the influence of certain diseases on the morphology of the placenta, only pregnant women who had no history of cardiovascular diseases, diabetes or any of the infectious conditions during pregnancy were included in the study. According to the maternal and/or gestational age the placentas were divided into two groups. The control group (CON) consisted of the placentas of postpartum women who were under 35 years old and the second group consisted of postpartum women over 35 years old (AMA) and considered as advanced maternal age group. According to gestational age, they were younger (CON) or older than 38 weeks of gestation (OGA). There were 15 placentas in each group from which tissue was further sampled.

Tissue sampling and histological staining

From all placentas at the middle distance from the umbilical cord and the edge of the placenta, a 2 cm section of tissue covering the full thickness of the placenta, from the chorionic to the basal plate, was sampled. After 48 h of fixation in 4 % formaldehyde, tissue samples were processed in a Leica tissue processor and embedded into paraffin blocks. All samples were cut at a thickness of 5 micrometres and stained by routine staining with haematoxylin and eosin, as well as by immunohistochemical staining with CD34 monoclonal antibody (Anti-CD34 monoclonal antibody (QBEND-10), dilution 1:100, *Abcam*, Cambridge, United Kingdom). Antibodies were unmasked by boiling for 20 min in a citrate buffer with a pH value of 6. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubating the tissue for 10 min with 3 % hydrogen peroxide (*Abcam*). Non-specific background staining was blocked by the ultra-vision block. At room temperature for 30 minutes, it was incubated with the primary antibody. For

visualisation the HRP/DAB IHC detection system (*Abcam*) was used. Mayer's haematoxylin was used for contrast staining. The analysis of the obtained samples was performed using a binocular Leica DM 6000 microscope, equipped with a Leica DFC310FX camera.

Morphometry analyses

Using *ImageJ* (version 18.0) the volume density of chorionic villi (VVchr), intervillous space (VVivs) and fibrinoids (VVfr), as well as the thickness of the placental barrier were determined. Volume density is a measure of the percentage representation of the examined placental structures in relation to the entire placental tissue. The number of examined visual fields (N) was determined according to the formula $N = (20 \times SD/X)^2$, where SD is the standard deviation and X is the mean value of the results obtained in a pilot study on 20 visu-

al fields.¹⁴ Volume density (VV) was determined as the quotient of points falling on the examined morphological element (Vf) with the total number of points of the test system (Vt), ie $VV = Vf / Vt$.

Statistical analyses

The statistical software package *Rcmdr* (version 2.8-0) was used for statistical analysis. All results were considered statistically significant if $p < 0.05$ and highly statistically significant if $p < 0.001$. In the examples where highly statistically significant results were obtained, the level of statistical significance (< 0.001) was recorded. Given that numerical data were analysed, the coefficient of variation ($CV \leq 30\%$ - homogeneous data, normal distribution), values of skewness (from -3 to +3 - normal distribution) and kurtosis (from -1 to +1) were used to determine the normality of the distribution.

Results

The results showed that third trimester placentas, ie mature placentas, mostly contained intermediate and terminal chorionic villi. This type of villi had a smaller stroma and a larger number and volume of blood vessels in order to be able to meet the increase in exchange of substances that is needed for a larger fruit. On the surface of the chorionic villus, there were trophoblast cells, which were separated from the mesenchyme by the basement membrane. In this period of development, most of the villi are covered with syncytiotrophoblasts, so a greater number of syncytial nodes could be seen. Syncytiotrophoblast represents a continuous layer of cytoplasm with a larger number of nuclei. A larger amount of fibrinoids was also present in mature placentas (Figure 1).

The VVchr of placenta of control group, less than 38 weeks of gestation, ranged from 27.9 % to 43.5 %, while in placentas of older gestational age it was higher and ranged from 43.3 % to 63.6 % (CON: mean \pm SD = 37.9 ± 4.9 , OGA: mean \pm SD = 55.6 ± 4.6). The VVivs of placentas with control group ranged from 56 % to 69.6 %, while in the older gestational age group it was from 32.2 % to 52.9 % (CON: mean \pm SD = 61.4 ± 4.9 ; OGA: mean \pm SD = 39.2 ± 5.3). The VVfr of control group placentas ranged from 0.3 to 1.1 % and in the older

gestational age group it ranged from 2.0 to 11.2 % (CON: mean \pm SD = 0.7 ± 0.2 ; OGA: mean \pm SD = 5.1 ± 2.5). There was a statistically significant difference between the examined groups (Figure 2).

The VVchr of placentas in pregnant women under the age of 35, control group (CON) ranged from 28.9 % to 63.6 % and in pregnant women with advanced maternal age (AMA) from 29.7 to 58.5 (CON: mean \pm SD = 48.8 ± 10.2 , AMA: mean \pm SD = 42.4 ± 10.1). The VVivs in the control group ranged from 38.7 % to 64.4 % and in the advanced maternal age group from 32.5 % to 69.6 % (CON: mean \pm SD = 47.9 ± 12 ; AMA: mean \pm SD = 55.4 ± 12.5). The VVfr of pregnant women in the control group ranged from 0.9 % to 9.2 % and in AGA from 0.4 % to 11.6 % (CON: mean \pm SD = 3.4 ± 2.5 , AMA: mean \pm SD = 2.2 ± 3.1). There was no significant statistical difference between these two groups (Figure 2).

The average value of the thickness of the placental barrier in placentas with a gestational age of less than 38 weeks, control group was $5.07 \mu\text{m}$ and placentas with an older gestational age was $5.94 \mu\text{m}$, CON: mean \pm SD = 5.1 ± 0.2 , OGA: mean \pm SD = 5.9 ± 0.5 . There was a significant statistical difference between these two groups (Figure 3 and 4).

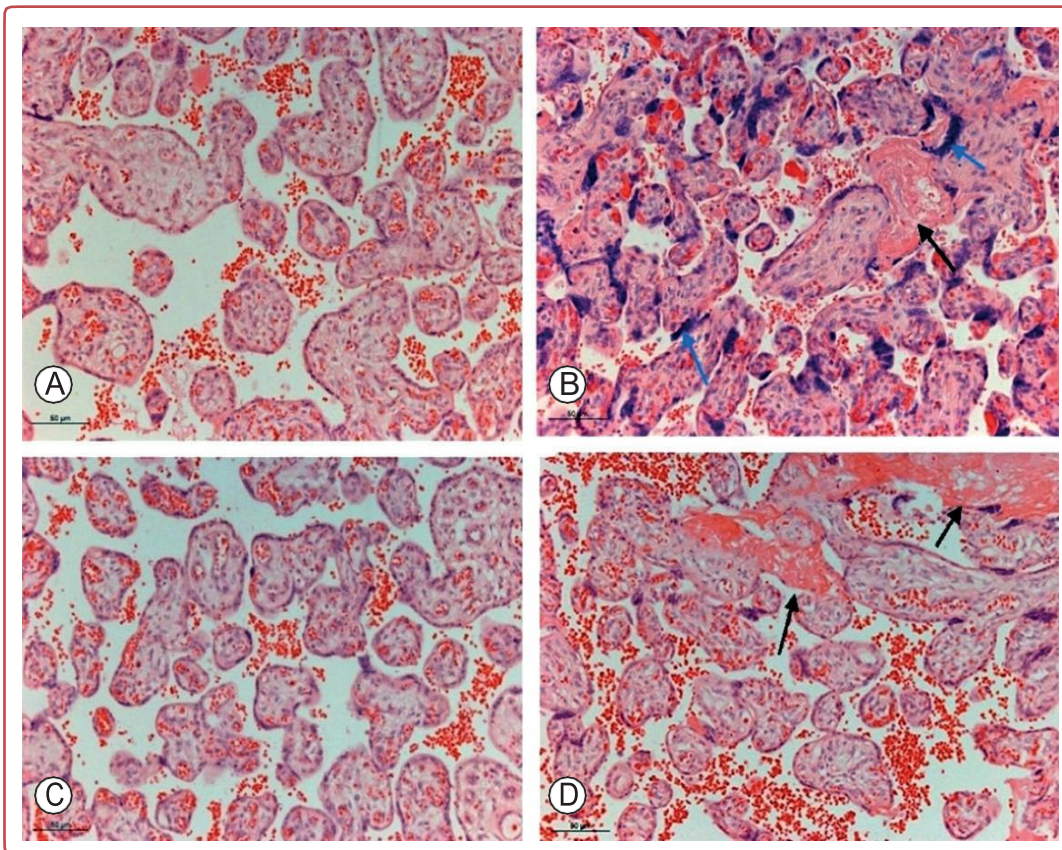


Figure 1: Chorionic villi of the placenta, haematoxylin and eosin (H & E) stain, magnification 20 x, scale bar 50 μm; A) control group, gestational age of below 38 weeks of pregnancy, B) older gestational age, gestational age of more than 38 weeks of pregnancy, C) control group, maternal age below 35 years, D) advance maternal age.

The image shows more compact structure of advanced maternal age placenta and older gestational age placenta (gestational age of more than 38 week), decrease in volume of intervillous space, increase in the volume of chorionic villi and fibrinoid (black arrow), presence of abundant syncytial nodes (blue arrow).

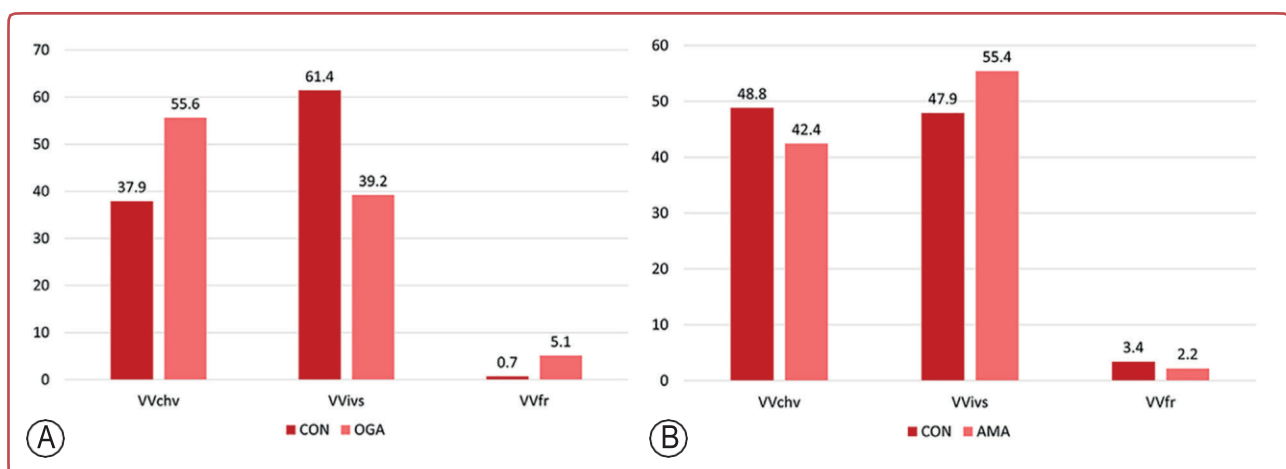


Figure 2: (A) Influence of gestational age on the volume of chorionic villi (VVchv), space between villi (VVivs), placental fibrinoid (VVfr) in control group (CON) and in older gestational age group (OGA). Increased VVchv and VVfr and reduced VVivs in OGA group, $p < 0,001$, Student *t*-test. (B) Influence of maternal age on VVchv, Vvivs and VVfr between control group (CON) and advance maternal age group (AMA). A small difference in placental tissue volume between groups, $p = 0.11$, Student *t*-test.

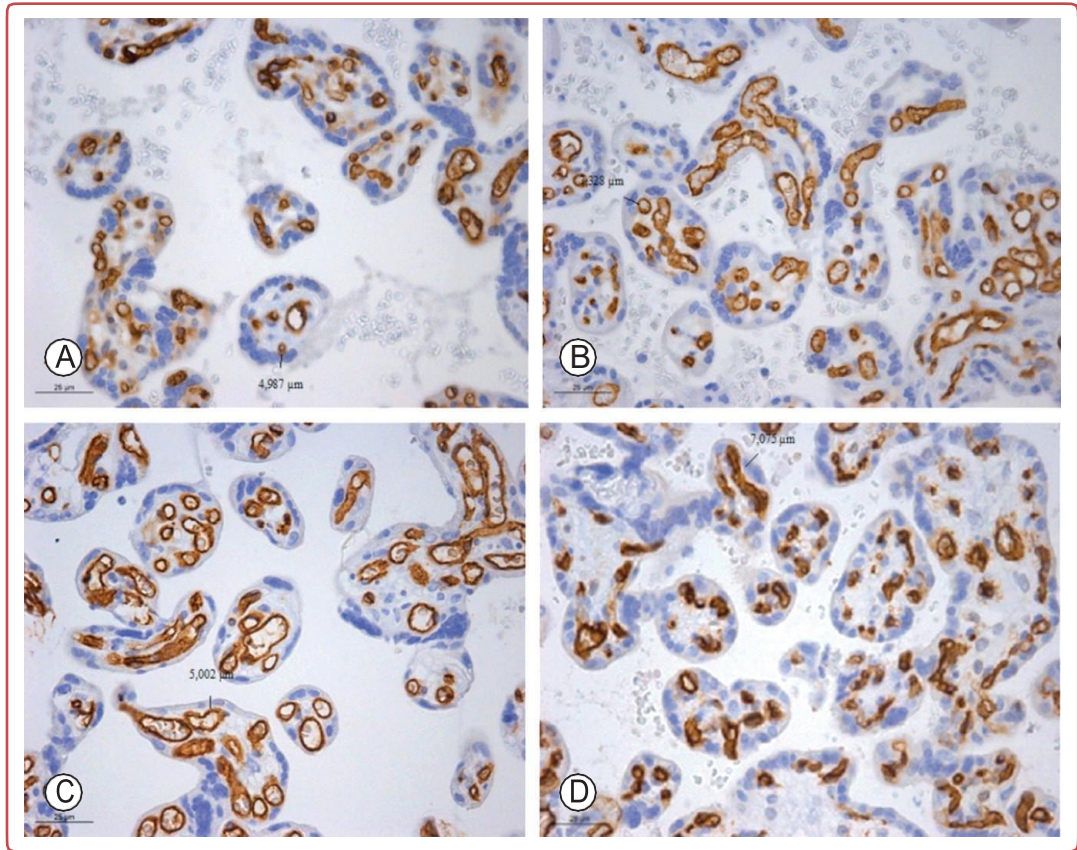


Figure 3: Immunohistochemical analysis of chorionic villi of the placenta. Immunohistochemical staining with CD34 antibodies, magnification 40 x, scale bar 25 μm; A) control group, gestational age of below 38 weeks of pregnancy, B) older gestational age, gestational age of more than 38 weeks of pregnancy, C) control group, maternal age below 35 years, D) advanced maternal age. The image shows immunopositive endothelial cells of blood vessels of chorionic villi and components of the placental membrane, increased thickness of placental membrane in the images B and D (scale bar).

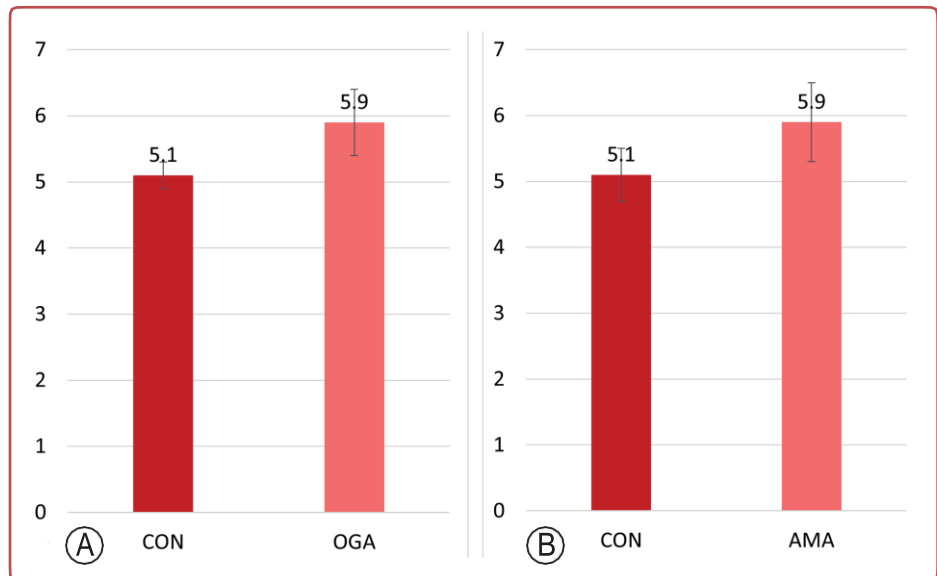


Figure 4: Influence of gestational age on placental membrane thickness represented in μm. A) control group (CON), older gestational age group (OGA), significant increase in the thickness of the placental membrane of placenta OGA group, $p = 0.0003$, Student t -test. B) Influence of maternal age of control group (CON) and advanced maternal age (AMA) on placental membrane thickness represented in μm, significant increase in the thickness of the placental membrane of AMA placentas $p = 0.0003$, Student t -test.



Comparing the thickness of the placental membrane in pregnant women of different ages, the values were lower in younger pregnant women, control group and their average value was 5.15 μm , while in the advanced maternal age group, the average value was 5.89 μm , CON: mean \pm SD = 5.1 \pm 0.4, AMA: mean \pm SD = 5.9 \pm 0.6. There was a significant statistical difference between these two groups (Figure 3 and 4). However, the thickness of the placental barrier structures was higher and more dependent to the gestational age than to the pregnant woman age.

Discussion

As the interest in using the placenta for research purposes grows, it is necessary to systematise the criteria for their selection. The morphometry as a fairly objective method was used to assess tissue morphology on a histological section. The results of this study clearly showed that with increasing maternal age and gestational age, there is an increase in the volume of villus tissue and thickening of the placental barrier, accompanied by the reduction of intervillous space volume.

The maternal part of the placenta consists of decidua basalis and intervillous space filled with maternal blood, while the foetal part consists of the chorionic plate, composed of amnion, chorion and villi. Placental villi, surrounded by maternal blood, represent the basic transport unit of this temporary organ. All the exchange between the mother and the foetus takes place at the level of the placental membrane, which is made up of trophoblastic cells, the endothelium of the blood vessels inside the villi and the connective tissue that is inserted between them.^{15,16} It is known that the average thickness of the placental membrane is 5 μm . Any change in the structure of this membrane can lead to disorders in the exchange of substances between the mother and the foetus, as well as the fact that the morphology of the placenta is a reflection of the mother's state of health. This statement has been proven by numerous studies in which the influence of chronic non-communicable diseases has been taken into consideration.^{13,17,18} In addition to the age of the mother, the influence of the gestational age on the volumes of the examined structures was also monitored. Placentas of gestational age from the 36th week to the 41st week are considered

mature placentas and in this period of time it is safe to terminate the pregnancy with childbirth. In practice, a certain number of pregnancies of healthy pregnant women ends with childbirth in the period from the 36th to the 38th week of gestation, so it is possible to sample such placentas. The most common indications for childbirth at this gestational age are multiple pregnancies, or in the case when the previous pregnancy ended by Caesarean section and the interval between pregnancies is short. With increasing gestational age, there is an increase in the volume of terminal villi and a decrease in the volume of intervillous space, which shows that a decreased volume of maternal blood is present in the intervillous space, as well as an increase in the foetus's need for nutrition and oxygen due to its growth.

As expected, there was also an increase in fibrinoid volume in placentas of higher gestational age and the recorded difference was statistically significant, which correlates with the findings of other researchers.^{19,20} Marković et al in their research showed that the placentas of adolescent pregnant women have a lower birth weight and decreased volumes of chorionic villi compared to pregnant women who are older than eighteen years. They also showed that although these are healthy pregnant women, these pregnancies are considered risky because the foetuses are born with a lower body weight.²¹ When the volumes of chorionic villi and intervillous space in presented examined groups according to the age of the pregnant woman were compared, the difference obtained was not statistically significant. However, results showed that with the increase in gestation and the age of the pregnant woman, there was thickening of the placental membrane. The multiplication of the connective tissue between the endothelial cells and the trophoblast was found and increase in the volume of the trophoblast, thickness of the placental barrier increased to 7.01 μm . There was a small number of studies that dealt with the morphology of human placentas in pregnancies at advanced maternal age. This issue has been mostly studied in animal model. Napso et al found that in Sprague Dawley female rats of older age (6-9 months equivalent to 35 years) the volumes of the placental membrane increased at the expense of the increase in the volume of trophoblasts and the connective tissue between the endothelium and trophoblasts. The multiplication of connective tissue in this area only hinders the exchange of substances between

the mother and the foetus, which also leads to an increase in oxidative stress in the placenta.^{8,22}

Trophoblast cells are key cells for the growth and development of the placenta. Apart from their role in the exchange of gases and nutrients, they have a metabolic and endocrine role and are largely responsible for the secretion of human chorionic gonadotropin.²³ Their activity is mostly influenced by the transforming growth factor-TGF- β , so that any change in trophoblast volume leads to disruption of the dynamics of the cell itself and consequent inhibition of this signalling pathway.²⁴

Although the age of the pregnant woman itself did not lead to major changes in the volume of the examined structures, there are still discrete changes at the level of the placental membrane and possible disruptions in its dynamics. Since in the group of pregnant women of advanced maternal age the placentas were of different gestational ages, there was a possibility that the gestational age still has a greater influence on the morphology than the age of the pregnant woman itself, because after all, these were healthy individuals.

Limitations of this study is that is based only on morphometry as a research method. But as stated earlier, it is a fairly objective method to assess tissue morphology on a histological section that does not require use of additional fundings.

Conclusion

The study indicates that both maternal age and gestational age significantly affect placental morphology, with notable increases in the volume of villus tissue and thickening of the placental barrier as these factors rise. However, the changes were more closely associated with gestational age than with maternal age, particularly in healthy pregnancies. Therefore, when selecting placental tissue for regenerative research, only placentas from women under 35 years old and with gestational ages up to 38 weeks should be selected.

Ethics

This research was approved by the Ethical Committee of the Faculty of Medicine of the University of Banja Luka, decision No 18/4.167/21, dated 4 October 2021.

Acknowledgement

None.

Conflicts of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Funding

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Data access

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable individual request.

Author ORCID numbers

Sanja Jovičić (SJ):
0009-0002-8245-1405
Vesna Ljubojević (VLJ):
0009-0001-6585-2285
Maja Barudžija (MB):
0009-0007-9441-7569
Ljiljana Amidžić (LJA):
0009-0001-3436-1694
Ranko Škrbić (RŠ):
0000-0002-6643-1781
Ivan R Nikolić (IN):
0009-0003-8548-0751

Author contributions

Conceptualisation: SJ, IN
 Methodology: SJ, VLJ, IN
 Software: SJ, VLJ, MB, LJA, IN
 Validation: SJ, VLJ, MB, LJA, IN
 Formal analysis: SJ, MB, LJA, IN
 Investigation: SJ, LJA
 Resources: SJ
 Data curation: SJ, VLJ, MB, LJA
 Writing - original draft: SJ
 Writing - review and editing: RŠ, IN
 Visualisation: SJ, VLJ, MB, LJA, RŠ, IN
 Supervision: RŠ, IN
 Project administration: SJ

References

- Nikolić I, Rančić G, Radenković G, Lačković V, Todorović V, Mitić D, Mihailović D. [Human embryology]. Beograd: Data Status; 2018. Serbian.
- Carrasco-Wong I, Moller A, Giachini FT, Lima VV, Toledo F, Stojanova J, et al. Placental structure in gestational diabetes mellitus. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020; 1866(2):165535. doi: 10.1016/j.bbadis.2019.165535.
- Hu Z, Luo Y, Ni R, Hu Y, Yang F, Du T, Zhu Y. Biological importance of human amniotic membrane in tissue engineering and regenerative medicine. *Mater Today Bio.* 2023;22: 100790. doi: 10.1016/j.mtbio.2023.100790.
- Roy A, Mantay M, Brannan C, Griffiths S. Placental tissues as biomaterials in regenerative medicine. *Biomed Res Int.* 2022;6751456. doi: 10.1155/2022/6751456.
- Beeravolu N, McKee C, Alamri A, Mikhael S, Brown C, Perez-Cruet M, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human umbilical cord and fetal placenta. *J Vis Exp.* 2017;(122):55224. doi: 10.3791/55224.
- Protzman NM, Mao Y, Long D, Sivalenka R, Gosiewska A, Hariri RJ, et al. Placental-derived biomaterials and their application to wound healing: a review. *Bioengineering (Basel).* 2023;10(7):829. doi: 10.3390/bioengineering10070829.
- Zaza A, Pudwell J, Bainbridge S, Connor K, Smith GN. Placental morphology and the prediction of underlying cardiovascular risk factors. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2021;263:56-61. doi: 10.1016/j.ejogrb.2021.05.046.
- Hirata Y, Katsukura Y, Henmi Y, Ozawa R, Shimazaki S, Kurosawa A, et al. Advanced maternal age induces fetal growth restriction through decreased placental inflammatory cytokine expression and immune cell accumulation in mice. *J Reprod Dev.* 2021;67(4):257-64. doi: 10.1262/jrd.2021-034.
- Fretts RC, Schmittlidl J, McLean FH, Usher RH, Goldman MB. Increased maternal age and the risk of fetal death. *N Engl J Med.* 1995;333(15):953-7. doi: 10.1056/NEJM199510123331501.
- Pinheiro RL, Areia AL, Mota Pinto A, Donato H. Advanced maternal age: adverse outcomes of pregnancy, a meta-analysis. *Acta Med Port.* 2019;32(3):219-226. doi: 10.20344/amp.11057.
- de Jongh BE, Mackley A, Jain N, Locke R, Paul DA. Effects of advanced maternal age and race/ethnicity on placental weight and placental weight/birthweight ratio in very low birthweight infants. *Matern Child Health J.* 2015;19(7):1553-8. doi: 10.1007/s10995-014-1662-1.
- Lean SC, Heazell AEP, Dilworth MR, Mills TA, Jones RL. Placental dysfunction underlies increased risk of fetal growth restriction and stillbirth in advanced maternal age women. *Sci Rep.* 2017 Aug 29;7(1):9677. doi: 10.1038/s41598-017-09814-w.
- De Luccia TPB, Ono E, Menon R, Borbely AU, Mattar R, Richardson L, et al. The effect of gestational diabetes mellitus on the fetal compartment. *J Reprod Immunol.* 2021;145: 103314. doi: 10.1016/j.jri.2021.103314.
- Kališnik M, Eržen I, Smolej V. [Foundations of stereology]. Ljubljana: Društvo za stereologijo in kvantitativno analizo slike (DSKAS); 2002. Slovenian.
- Nikolić I, Todorović V, Lačković V, eds. [Histology and basic embryology]. Beograd: Data Status; 2023. Serbian.
- Li H, Peng H, Hong W, Wei Y, Tian H, Huang X, et al. Human placental endothelial cell and trophoblast heterogeneity and differentiation revealed by single-cell RNA sequencing. *Cells.* 2022;12(1):87. doi: 10.1016/j.jri.2021.103314.
- Knöfler M, Haider S, Saleh L, Pollheimer J, Gamage TKJB, James J. Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. *Cell Mol Life Sci.* 2019 Sep;76(18):3479-96. doi: 10.1007/s00018-019-03104-6.
- Owaki Y, Watanabe K, Iwasaki A, Saitou T, Matsushita H, Wakatsuki A. Placental hypoplasia and maternal organic vascular disorder in pregnant women with gestational hypertension and preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2021;34(3):353-9. doi: 10.1080/14767058.2019.1608175.
- Ramić S, Zigić Z, Alecković M. Stereological analysis of mature human placenta of pregnant women of different age. *Bosn J Basic Med Sci.* 2006;6(2):7-10. doi: 10.17305/bjbm.2006.3161.
- Starikov R, Has P, Wu R, Nelson DM, He M. Small-for-gestational age placentas associate with an increased risk of adverse outcomes in pregnancies complicated by either type I or type II pre-gestational diabetes mellitus. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2022;35(9):1677-82. doi: 10.1080/14767058.2020.1767572.
- Marković S, Cerovac A, Kunosić S, Ramić S, Bećirović E. Stereological analysis of terminal villi, intervillous space and fibrinoid of adolescent placentas and birth weight of newborns. *Med Glas (Zenica).* 2020;17(1):145-50. doi: 10.17392/1055-20.
- Napso T, Hung YP, Davidge ST, Care AS, Sferruzzi-Perri AN. Advanced maternal age compromises fetal growth and induces sex-specific changes in placental phenotype in rats. *Sci Rep.* 2019 Nov 28;9(1):16916. doi: 10.1038/s41598-019-53199-x.
- Gauster M, Moser G, Wernitznig S, Kupper N, Huppertz B. Early human trophoblast development: from morphology to function. *Cell Mol Life Sci.* 2022;79(6):345. doi: 10.1007/s00018-022-04377-0.
- Haider S, Lackner AI, Dietrich B, Kunihs V, Haslinger P, Meinhardt G, et al. Transforming growth factor- β signaling governs the differentiation program of extravillous trophoblasts in the developing human placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2022;119(28). doi: 10.1073/pnas.2120667119.



Article

Dynamic Changes of Immunoreactive CD34, CD117, and CD41 Hematopoietic Stem Cells in Human Placentas of Different Gestational Ages

Sanja Jovicic^{1,2,*} , Ivan R. Nikolic³, Ljiljana Amidžić^{1,4} , Vesna Ljubojevic^{2,5}, Maja Barudzija^{1,2} and Ranko Skrbic^{1,6}

- ¹ Centre for Biomedical Research, Faculty of Medicine, University of Banja Luka, 78000 Banja Luka, Bosnia and Herzegovina; ljiljana.amidzic@med.unibl.org (L.A.); maja.barudzija@med.unibl.org (M.B.); ranko.skrbic@med.unibl.org (R.S.)
 - ² Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, University of Banja Luka, 78000 Banja Luka, Bosnia and Herzegovina; vesna.ljubojevic@med.unibl.org
 - ³ Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, University of Niš, 18000 Niš, Serbia; inikolic@junis.ni.ac.rs
 - ⁴ Department of Human Genetics and Cell Biology, Faculty of Medicine, University of Banja Luka, 78000 Banja Luka, Bosnia and Herzegovina
 - ⁵ Ophthalmology Clinic, University Clinical Center Banja Luka, 78000 Banja Luka, Bosnia and Herzegovina
 - ⁶ Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Medicine, University of Banja Luka, 78000 Banja Luka, Bosnia and Herzegovina
- * Correspondence: sanja.jovicic@med.unibl.org

Abstract: Background: The process of prenatal hematopoiesis occurs in various anatomical locations, including the placenta. The placenta is not merely a temporary hematopoietic reservoir, but it is one of the key sites for the synthesis of hematopoietic stem cells (HSCs). This study aimed to investigate the presence, distribution, and immunoprofiles of HSCs in the human placenta during different gestational periods. **Materials and Methods:** Placental samples of different gestational ages (first, second, and third trimesters) were analyzed using classical hematoxylin and eosin staining and immunohistochemical staining for CD34, CD117, and CD41 markers, with HSC quantification through numerical areal density (N_A). **Results:** Highly immunoreactive CD34 HSCs were present in placentas throughout gestation, while highly immunoreactive CD117 and CD41 HSCs were observed during the first two trimesters. In the first trimester, HSCs were found within the lumen of blood vessels and as individual cells in the mesenchyme of chorionic villi. With advancing gestation, the number of HSCs in the mesenchyme of chorionic villi increased. **Conclusions:** Immunoreactive CD34, CD117, and CD41 cells are present in significant proportions in various parts of the placenta throughout gestation, indicating that the placenta provides a substantial proportion of HSCs for hematopoiesis.

Keywords: hematopoiesis; hematopoietic stem cells; human placenta



Academic Editor: Simon J. Conway

Received: 3 February 2025

Revised: 29 March 2025

Accepted: 27 April 2025

Published: 9 May 2025

Citation: Jovicic, S.; Nikolic, I.R.; Amidžić, L.; Ljubojevic, V.; Barudzija, M.; Skrbic, R. Dynamic Changes of Immunoreactive CD34, CD117, and CD41 Hematopoietic Stem Cells in Human Placentas of Different

Gestational Ages. *J. Dev. Biol.* **2025**, *13*, 16. <https://doi.org/10.3390/jdb13020016>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Hematopoiesis is the process of blood cell formation. Hematopoietic stem cells (HSCs) sustain the blood system by generating blood cells of all lineages through multipotent progenitors [1,2]. During prenatal life, the hematopoietic system has the following two key roles: rapidly generating mature blood cells essential for fetal growth and development and establishing a reservoir of HSCs required for postnatal life. These cells have the ability to self-renew and differentiate into two types of multipotent cells, myeloid and lymphoid.

Their division can produce either multipotent cells or differentiated unipotent stem cells, which further divide and differentiate into morphologically recognizable cells of a single lineage [3,4].

In postnatal life, hematopoiesis occurs exclusively in the bone marrow, but during prenatal development, it takes place at different anatomical sites across three waves [5,6].

The first wave begins extraembryonically, around day 7 of embryogenesis, in the yolk sac, generating primitive red blood cells, macrophages, and a few megakaryocytes. Blood islands form in the extraembryonic mesoderm, producing these primitive blood cells [7]. The second wave, definitive hematopoiesis independent of HSCs, also starts in the yolk sac around day 8 of embryonic development. Lymphomyeloid progenitors and erythromyeloid progenitors migrate to the fetal liver, supporting embryonic survival during mid-gestation [8]. The third wave, HSC-dependent hematopoiesis, occurs in the aorta–gonad–mesonephros region, initially in the dorsal aorta and later in major arteries (vitelline and umbilical arteries) and the chorionic plate mesenchyme of the placenta. From these locations, HSCs migrate to temporary hematopoietic niches, such as the liver, placenta, spleen, and bone marrow [9]. In 2005, researchers proposed that the placenta is not just a reservoir of HSCs derived from other locations but also a site of hematopoiesis [10,11].

The placenta, a temporary organ essential for normal fetal growth and development, is unique in consisting of tissues of dual origin—maternal and fetal. Its role is critical in fetal development, with numerous functions. Placental development begins around days 7–8 post-fertilization with the implantation of the blastocyst into the decidually transformed endometrium, influenced by pro-inflammatory cytokines and prostaglandin E3 [12].

It is hypothesized that the development of placental blood vessels parallels HSC development, as endothelial cells and HSCs share common progenitors. The hematopoietic microenvironment of the placenta is a dynamic and multifaceted niche that supports early blood cell development. It includes various cells, extracellular matrix components, growth factors, cytokines, and adhesion molecules, creating a specialized environment that enables HSC proliferation, differentiation, and maintenance during critical fetal development stages. This microenvironment promotes HSC proliferation while preventing premature differentiation into various cell lineages [13].

Hematopoietic stem cells exhibit morphological characteristics similar to small- or medium-sized lymphocytes, with diameters of 7–8 μm . They possess a centrally located round nucleus surrounded by a cytoplasmic rim. Identification relies on surface-expressed markers, such as CD34 and CD117, which have been widely used for detecting hematopoietic stem cells [4,13].

HSC types in the placenta present a challenge in distinguishing HSCs originating in the placenta from those arriving via circulation from other hematopoietic niches. Studies using Runx1-lacZ and Runx1+/- knockout mice, which lack cardiac activity and blood flow to the placenta, have identified CD41 immunoreactive HSC populations [14].

CD34 is a transmembrane phosphoglycoprotein initially identified on HSCs and progenitor cells, including pluripotent hematopoietic stem cells (PHSCs) and colony-forming units (CFU-GEMM). CD34 expression is almost universally associated with hematopoietic cells and is also found on endothelial cells and embryonic fibroblasts [15–17].

CD117 (c-kit) is a class III tyrosine kinase transmembrane receptor for stem cell factor, encoded by the proto-oncogene c-kit. It identifies human HSC populations with high proliferation and self-renewal potential and is expressed on germ cells, melanocytes, mast cells, and interstitial cells of Cajal [18,19].

CD41 (integrin αIIb) is a heterodimeric integral membrane protein and a marker for early embryonic HSCs, and it is also expressed on platelets and megakaryocytes [20].

Using placentas post-delivery in regenerative medicine is a current trend due to their availability and the abundance of stem cells and growth factors they contain. While the placenta's role in hematopoiesis is established, the exact localization, distribution, and differentiation potential of HSCs isolated from the placenta remain incompletely defined.

This study aims to determine the presence of hematopoietic stem cells in placentas of different gestational ages, their localization within the placenta, and their abundance using numerical areal density (N_A), to evaluate the placenta as a suitable source for HSCs isolation.

2. Materials and Methods

2.1. Placenta Sampling

This study was conducted in accordance with the latest revision of the Helsinki Declaration, with approval from the Ethics Committee (No: 18/4.167/21). Placental samples were collected at the Clinic for Gynecology and Obstetrics and the Pathology Department of the University Clinical Center of the Republika Srpska (UCC RS). Placentas were sampled in all periods of gestation in the first, second, and third trimesters (Table 1). In the human population, pregnancy lasts 40 weeks and is divided into trimesters, the first lasting from 0–13 weeks of gestation, the second up to 14–27 weeks of gestation, and the third trimester from 28 to 40 weeks of gestation. Placentas of the first trimester were sampled at the Department of Pathology of the UCC RS, as part of intratubal pregnancies that were referred to for pathohistological verification after fallopian tube rupture. Already existing pathohistological paraffin molds from the department's collection were used, and all parts of the placenta were preserved where there was no coagulum and inflammatory infiltrate that could interfere with the visualization and analysis of the placental tissue. Placentas of the second trimester were sampled after premature births within this gestation. Only samples without macroscopically visible deviations were included in this study. Placentas of the third trimester were sampled at the Clinic for Gynecology and Obstetrics, after vaginal delivery. Our recent study demonstrated that advanced maternal age impacts placental morphology [21]. Therefore, all samples were obtained from healthy pregnant women under 35 years old, with no history of chronic non-communicable diseases, infections, or smoking.

Table 1. The number of samples included in the study, allocated to different groups based on trimesters of development and weeks of gestation.

Development Period	WGA	Placentas N
First Trimester N = 14	7	2
	8	2
	9	3
	10	1
	11	4
	12	2
Second Trimester N = 12	19	5
	20	5
	23	2

Table 1. *Cont.*

Development Period	WGA	Placentas N
Third Trimester N = 10	28	1
	35	1
	36	5
	37	3

WGA—weeks of gestational age, N—number of placentas of a given gestational age.

2.2. Tissue Processing

Samples from ectopic pregnancies included the entire circumference of the fallopian tube. Second- and third-trimester samples were 2 × 2 cm in size, covering the full thickness of the placenta from the chorionic to basal plate. After 48 h of fixation in 4% formaldehyde, the samples were processed in a Leica TP1020 tissue processor, embedded in paraffin blocks, sectioned into 4 µm slices, and stained using hematoxylin-eosin and immunohistochemistry for CD34 (anti-CD34 monoclonal antibody, 1:100, Abcam, Cambridge, UK), CD117 (c-Kit monoclonal antibody, 1:100, Invitrogen, Waltham, MA, USA), and CD41 (rabbit polyclonal anti-CD41 antibody, 1:200, Invitrogen). Antigen retrieval was performed by heating in citrate buffer (pH 6) for 20 min. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% hydrogen peroxide. Nonspecific background staining was blocked using UltraVision Block (Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA, USA). Primary antibodies were incubated at room temperature for 30 min, and visualization was performed using the HRP/DAB IHC detection system (Abcam). Counterstaining was performed with Mayer's hematoxylin. Analyses were conducted using a Leica DM6000 microscope equipped with a Leica DFC310FX camera.

The intensity of immunoreactivity for CD34, CD117, and CD41 was semi-quantitatively graded as low (+), moderate (++), or high (+++).

2.3. Morphometric Analysis

In order to quantify CD34, CD117, and CD41 immunopositive hematopoietic cells, we determined their numerical areal density and the average number of cells in 1 mm² of tissue (N_A) with the ImageJ software (version 18.0). Numerical areal density represents the number of analyzed cells, CD34, CD117, and CD41 immunoreactive cells, relative to the surface area of the field of view. Numerical areal density was calculated using the formula $N_A = N/A$, where N is number of analyzed immunoreactive cells (N), and A is the field of view area.

The number of examined fields of view (N) was determined using the formula $N = (20 \times SD/X)^2$, where SD is the standard deviation and X is the mean value of results obtained in a pilot study conducted on 20 fields of view (Kališnik M, 2002) [22].

2.4. Statistical Analysis

The statistical analysis of the collected data was performed using the R 4.2.3 statistical software package.

Descriptive statistics were used to determine frequencies, measures of central tendency, and measures of variability and for the graphical representation of the results.

The Chi-square test (χ^2 , Chi-square Test) was used to compare the frequencies of occurrence of categorical variables in independent samples.

The statistical analysis of numerical data and the selection of an appropriate test depended on the distribution of numerical data. The normality of distribution was determined

based on skewness values (from -3 to $+3$ indicating normal distribution) and kurtosis values (from -1 to $+1$ indicating normal distribution), as well as the Shapiro–Wilk test.

Student's *t*-test (*t*-test for two independent samples) was used to compare the mean values of two independent samples with a normal distribution of numerical data. In cases of deviation from normal distribution, the Mann–Whitney U test was applied for two samples.

The homogeneity of variances for more than two groups was tested using Levene's test. After statistical analysis and the application of Levene's test, ANOVA ($p > 0.05$ from Levene's test) or the Kruskal–Wallis Test ($p < 0.05$ from Levene's test) was used.

All results were considered statistically significant if $p \leq 0.05$ and highly statistically significant if $p < 0.001$. In cases where highly statistically significant results were obtained, the level of statistical significance (<0.001) was reported.

3. Results

The differences in placental structure across various gestational periods are most pronounced in the composition of the chorionic villi. In first-trimester placentas, up to the 10th week of gestation, mesenchymal chorionic villi are the most abundant, along with a few immature intermediate villi. The number of immature intermediate villi increases after the 10th week of gestation. During the second trimester, mature intermediate villi dominate, while in the third trimester, both mature intermediate and terminal villi are present.

The mesenchymal type of villi consists of mesenchymal stroma with sparse blood vessels, whose lumen is not visible. The stroma is surrounded by two layers of trophoblastic cells, which are cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts. Immature intermediate villi contain numerous stromal channels within their stroma, formed by the merging of cytoplasmic extensions from stromal cells. Numerous blood vessels are observed within the stroma. On the surface of the villi, the syncytiotrophoblast layer is more pronounced, with individual cytotrophoblastic cells located beneath it. In intermediate and terminal villi, the number of blood vessels within the stroma increases, while only the syncytiotrophoblast is observed on the surface (Figure 1).

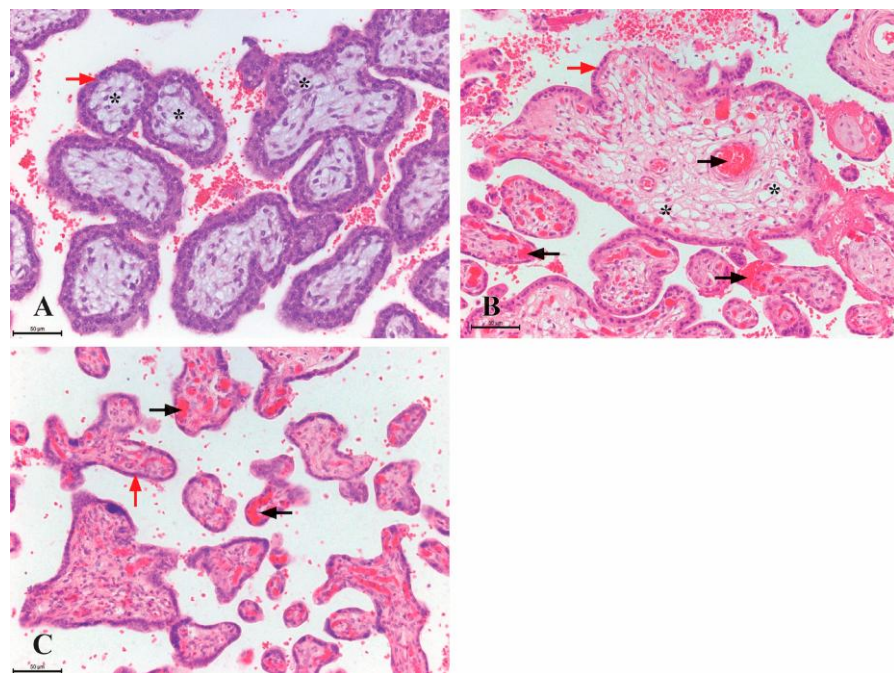


Figure 1. Histological structure of chorionic villi in the human placenta (H&E staining, $\times 200$, scale bar $50 \mu\text{m}$). (A) The mesenchymal type of chorionic villi from first-trimester placentas (8th week of

gestation); the villi are predominantly composed of mesenchymal connective tissue (marked with a star) and are encased by two distinct layers of trophoblastic cells (red arrow), and no blood vessels are evident within the stroma. (B) The intermediate type of chorionic villi from second-trimester placentas (23rd week of gestation); the stroma contains numerous stromal channels (indicated by a star) and blood vessels filled with erythrocytes (black arrow), these structures are surrounded by a single layer of trophoblastic cells (red arrow). (C) Terminal chorionic villi from third-trimester placentas (36th week of gestation); the stroma is densely vascularized, containing numerous blood vessels (black arrow), while the surface is covered by a continuous layer of syncytiotrophoblasts (red arrow).

The CD34 immunoreactive cells are present in placentas across all trimesters, exhibiting consistent morphology throughout. These cells are approximately 7 μm in size, round in shape, with a centrally located round nucleus surrounded by a variable amount of cytoplasm. During the first trimester, highly immunoreactive CD34 hematopoietic stem cells (+++) are abundant, appearing as clusters within the lumen of blood vessels in the chorionic plate and chorionic villi. In the second-trimester placenta samples, the CD34 immunoreactive cells are observed within the mesenchyme of placental villi as individual cells. In the third-trimester placenta samples, the highly immunoreactive CD34 hematopoietic stem cells are located in the mesenchyme of villi and the chorionic plate. However, these cells are absent from the lumen of blood vessels (Figure 2).

The mean values of N_A of CD34 immunoreactive HSCs at different gestational ages are shown in Table 2. A significant difference was observed between the means of the second and third trimesters ($p = 0.01$). However, no statistically significant difference was found between means of the first and second trimesters ($p = 0.6$) or between means of the first and third trimesters ($p = 0.07$).

Table 2. The mean value and standard deviations of N_A of CD34 immunoreactive HSCs in human placenta in three trimesters.

Development Period	Mean	SD	<i>p</i>
First Trimester	409.9	244.3	
Second Trimester	462.5	174.8	0.04 *
Third Trimester	249.3	59.8	

Data are expressed as mean \pm SD; * statistical significance, $p \leq 0.05$, ANOVA.

Highly immunoreactive CD34 expression (+++) was also observed in endothelial cells of placental blood vessels (Figure 2).

Highly immunoreactive CD117 cells (+++), morphologically resembling HSCs, are present in the placentas of the first and second trimesters. These cells, similar to CD34-positive cells, are approximately 7 μm in size, round in shape, with a centrally located round nucleus surrounded by a variable amount of cytoplasm (Figure 3). In the first trimester placenta sample the highly immunoreactive CD117 HSCs cells can be found in clusters within the lumen of blood vessels in the chorionic plate and villi, as well as individually within the mesenchyme of villi. In the second trimester, these cells can be observed only within the mesenchyme of chorionic villi (Figure 3).

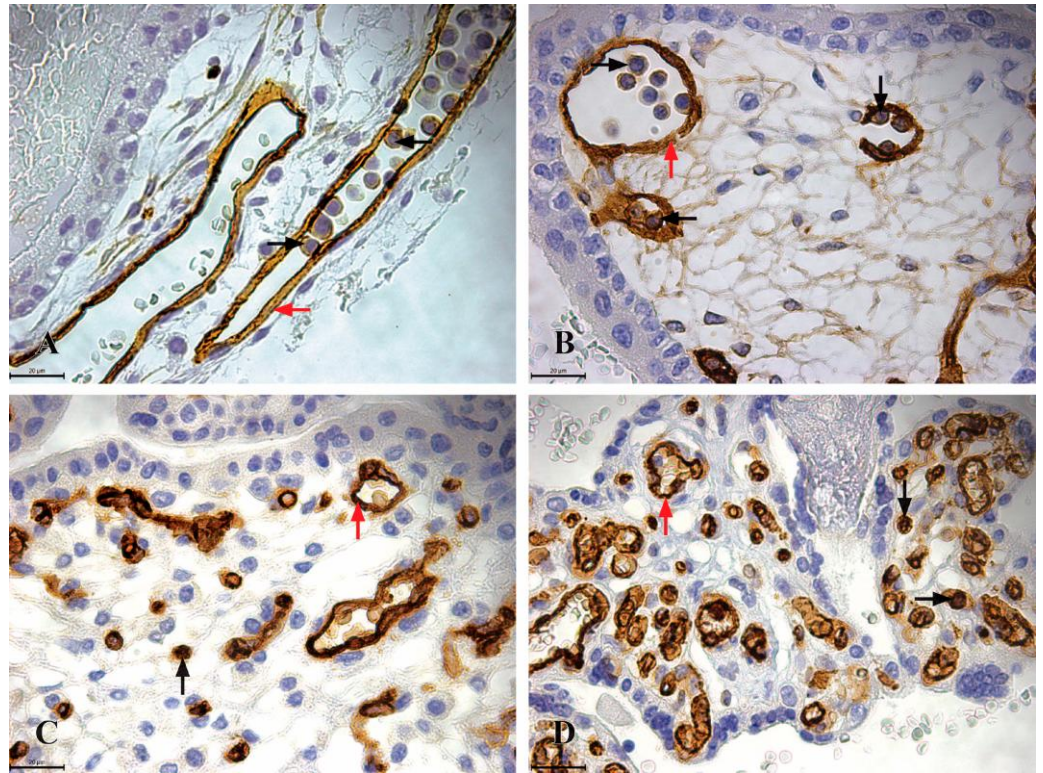


Figure 2. CD34 Immunoreactivity in the chorionic plate and chorionic villi of human placentas from the first, second, and third trimesters ($\times 630$, scale bar $20\ \mu\text{m}$). (A) Chorionic plate of a first-trimester placenta (11th week of gestation), where highly immunoreactive CD34 HSCs (+++) are clustered within the lumen of blood vessels (black arrow), and endothelial cells within the blood vessels of the chorionic plate exhibit strong CD34 immunoreactivity; (B) chorionic villi of a first-trimester placenta (11th week of gestation), with highly immunoreactive CD34 HSCs (+++) grouped in clusters within the lumen of blood vessels; (C) chorionic villi of a second-trimester placenta (22nd week of gestation), where highly immunoreactive CD34 HSCs (+++) are located as individual cells in the mesenchyme of the chorionic villi (black arrow), and endothelial cells also display strong CD34 immunoreactivity (red arrow); (D) chorionic villi of a third-trimester placenta (36th week of gestation), where highly immunoreactive CD34 HSCs (+++) are present as individual cells in the mesenchyme of the chorionic villi (black arrow), while endothelial cells continue to exhibit strong CD34 immunoreactivity (red arrow).

Trophoblastic cells, including cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts, express CD117 immunoreactivity in all trimesters, although its intensity decreases with advancing gestation. Cytotrophoblasts are uniform, cuboidal cells with a central nucleus and abundant cytoplasm. They exhibit high CD117 immunoreactivity (+++) in the first trimester but low reactivity (+) in the second and third trimesters. Syncytiotrophoblasts are irregularly shaped, variably sized cells. These show high CD117 immunoreactivity (+++) in the first and second trimesters, which decreases to moderate reactivity (++) in the third trimester (Figure 3).

The medians of N_A of CD117 immunoreactive HSCs at different gestational ages are shown in Table 3. No significant statistical difference was found in the medians between the first and second trimesters ($p > 0.05$).

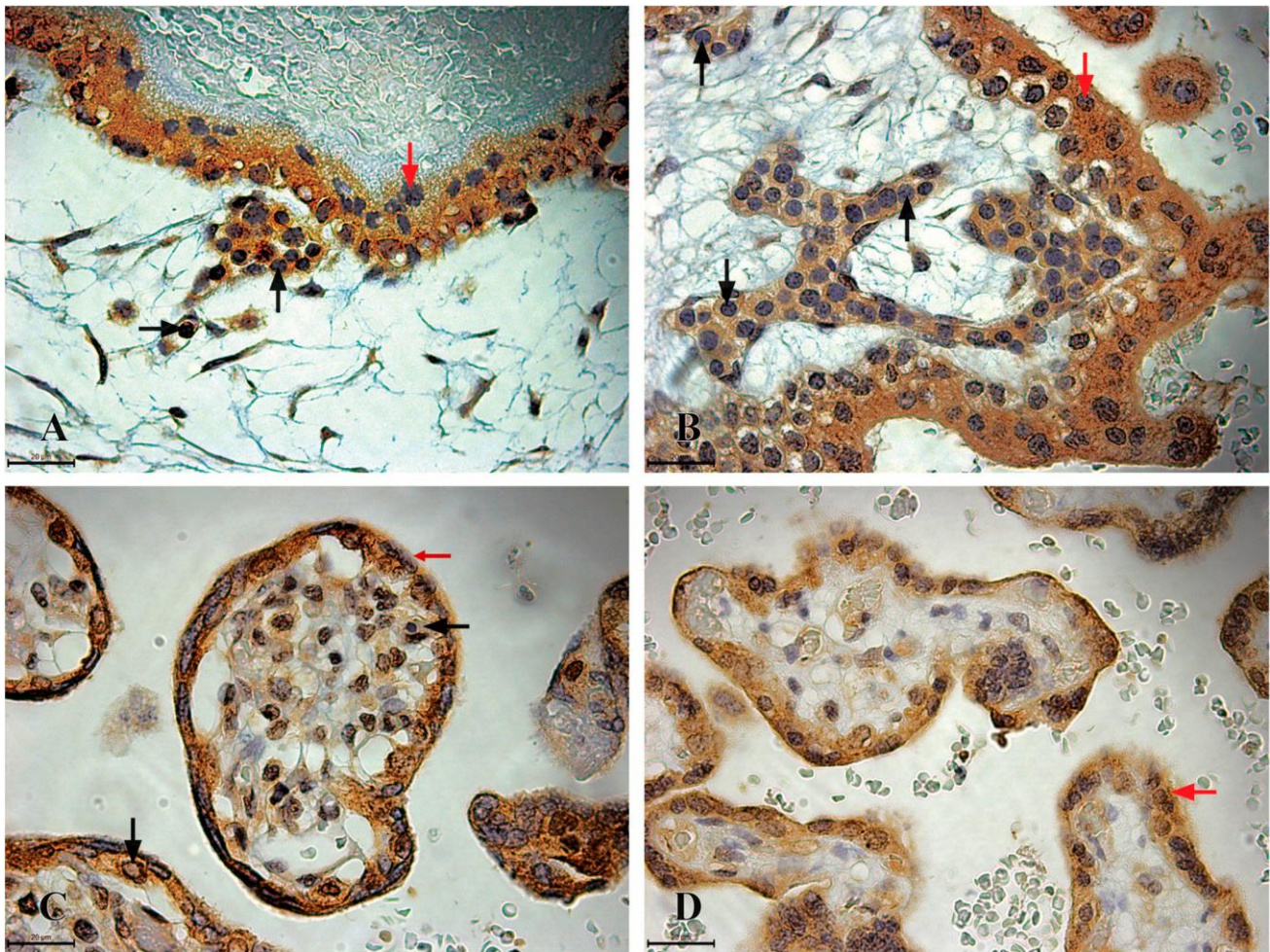


Figure 3. CD117 immunoreactivity in the chorionic plate and chorionic villi of human placentas from the first, second, and third trimesters. (A) The chorionic plate of a first-trimester placenta (11th week of gestation), where highly immunoreactive CD117 HSCs (+++) are clustered within the lumen of blood vessels (black arrow), and trophoblastic cells exhibit strong CD117 immunoreactivity (red arrow); (B) the chorionic villi of a first-trimester placenta (11th week of gestation), where highly immunoreactive CD117 HSCs (+++) completely fill the lumen of a blood vessel; (C) the chorionic villi of a second-trimester placenta (22nd week of gestation), where highly immunoreactive CD117 HSCs (+++) are present as individual cells within the mesenchyme of the chorionic villi (black arrow), and trophoblastic cells also display strong CD117 immunoreactivity (red arrow); (D) the chorionic villi of a third-trimester placenta (36th week of gestation), where only trophoblastic cells demonstrate moderate CD117 immunoreactivity (++), which is indicated by the red arrow, while immunoreactive CD117 HSCs are absent.

Table 3. The values of N_A of CD117 immunoreactive HSCs in human placentas in three trimesters.

Development Period	Median	IQR	<i>p</i>
First Trimester	222.2	118.2	0.18
Second Trimester	187.5	23.8	
Third trimester	0	0	

Data are expressed as median (interquartile range: IQR), Man-Vitni test.

CD41 immunoreactive cells first appear after the 11th week of gestation up to 22 weeks of gestation, and they are localized exclusively within the mesenchyme of chorionic villi. These cells exhibit high immunoreactivity (+++) and share the same morphological features

as CD34 and CD117-positive cells. In the second trimester, the number of CD41 cells decreases while maintaining their first-trimester localization. In the third-trimester placenta samples, the CD41 immunoreactive cells are absent (Figure 4).

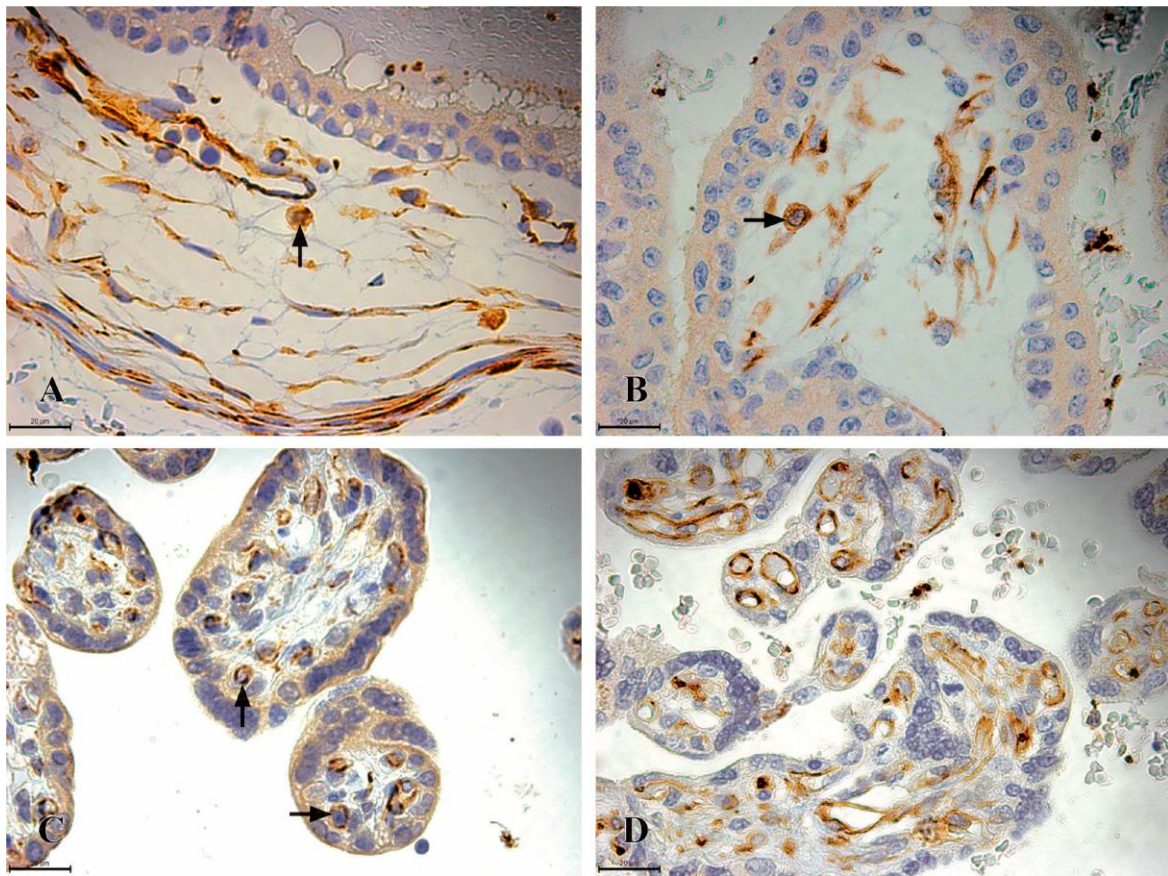


Figure 4. CD41 immunoreactivity in the chorionic plate and chorionic villi of human placentas from the first, second, and third trimesters. (A) The chorionic plate of a first-trimester placenta (11th week of gestation), where highly immunoreactive CD41 HSCs (+++) are observed as individual cells located in the mesenchymal connective tissue of the chorionic plate (black arrow); (B) the chorionic villi of a first-trimester placenta (11th week of gestation), with highly immunoreactive CD41 HSCs (+++) observed as individual cells situated in the mesenchymal connective tissue; (C) the chorionic villi of a second-trimester placenta (22nd week of gestation), where highly immunoreactive CD41 HSCs (+++) are located as individual cells in the mesenchyme of the chorionic villi (black arrow); (D) in the chorionic villi of a third-trimester placenta (36th week of gestation) CD41 immunoreactive cells are not present.

The mean value of N_A of CD41 immunoreactive HSCs at different gestational ages are shown in Table 4. No significant statistical difference was found in the means between the first and second trimesters ($p > 0.05$) (Table 4).

Table 4. The values of N_A of CD41 immunoreactive HSCs in human placentas in three trimesters.

Development Period	Mean	SD	<i>p</i>
First Trimester	50.9	11.16	0.46
Second Trimester	56.2	12.7	
Third Trimester	0	0	

Data are expressed as mean \pm standard deviations (SD), Student *t* test.

In order to determine whether there are differences in the concentrations of various immunophenotypes of HSCs cells in the first and second trimesters, we compared the

mean values of N_A CD34, CD117, and CD41 immunoreactive cells in the first and second trimesters. The mean values of N_A of CD34 immunoreactive cells were statistically significantly higher compared to the mean values of N_A of CD117 and CD41 immunoreactive cells in the first trimester, ($p < 0.05$). In the second trimester, the mean values of N_A of CD34 immunoreactive cells were also higher than the mean values of N_A of CD117 and CD41 immunoreactive cells. The difference between the groups in the second trimester was statistically significant ($p \leq 0.001$), (Table 5).

Table 5. Differences in N_A values among various types of HSCs during the first and second trimesters.

HSCs	First Trimester			Second Trimester		
	Mean	SD	<i>p</i>	Median	IQR	<i>p</i>
CD34	409.9	244.3		462.5	174.8	
CD117	267.5	145.8	0.003 *	187.5	23.8	0.0002 **
CD41	50.9	11.6		54.9	18.4	

Data are expressed as median (interquartile range, IQR), mean, and standard deviation (SD); * statistical significance, $p \leq 0.05$; ** very high statistical significance, $p < 0.001$, Kruskal–Wallis test, ANOVA.

4. Discussion

The placenta represents a rich source of hematopoietic stem cells with diverse profiles and phenotypes. Besides functioning as a temporary hematopoietic niche, it is also a primary site of HSC development during embryogenesis [11,23]. HSCs are present in the placenta throughout the entire gestational period [24]. Our study confirmed the presence of CD34 immunoreactive HSC populations throughout gestation, while CD117 immunoreactive cell populations were found between the 7th and 24th weeks of gestation, and CD41 immunoreactive cell populations were found only between the 11th and 22nd weeks of gestation.

The CD34 immunoreactive cell population was the most abundant, reaching its peak during the second trimester. Similarly, the populations of CD117 and CD41 cells were most numerous in the second trimester, suggesting the migration of HSCs from the placenta to other hematopoietic niches by the end of this period.

After the 24th week of gestation, the presence of CD34 immunoreactive HSCs in the placenta decreases significantly, coinciding with the establishment of hematopoiesis in the fetal liver and bone marrow, which become the main hematopoietic sites during later gestation [25]. During the first two trimesters, the placenta exhibits higher N_A of CD34 and CD117 cells compared to the fetal liver, whereas these values significantly increase in the liver after the 24th week of gestation. The advantages of using HSCs from the placenta for therapeutic purposes, as compared to traditional sources, are primarily rooted in their availability. Therefore, the discovery of a population of CD34 immunoreactive cells in term placentas is highly significant.

Although CD34 is a key marker for blood progenitor cells, it is also expressed by endothelial cells and embryonic fibroblasts. However, based on the morphology of the cells, their location, and the intensity of immunopositivity, it can be confidently concluded that these cells are the HSCs. The quantification of immunoreactive cells using flow cytometry often provides total concentrations of all CD34-expressing cells, including endothelial cells and fibroblasts, which may explain the discrepancy between our results and those of other studies [15,26–28]. Earlier studies have emphasized that HSCs are restricted to the chorion and chorionic villi [29]. However, we observed that, in addition to being located in the mesenchyme of the chorionic villi, populations of CD34 and CD117 immunoreactive cells were also present within blood vessels. We hypothesize that HSCs within the blood vessels are not primarily generated in the placenta but are transported there via blood from other hematopoietic niches. In contrast, cells localized in the mesenchyme of the placental

villi likely originate in the placenta from hemangioblasts or mesenchymal progenitors. Supporting this is the finding that CD41 immunoreactive cells are exclusively present in the mesenchyme of chorionic villi, which was previously confirmed to be a marker of HSCs generated in the placenta [14].

This dual origin of HSCs in the placenta may also explain the differences in N_A values for CD34 and CD117 populations. It is believed that CD117 immunoreactive cells originate from mesenchymal progenitors, while CD34 immunoreactive cells are derived from hemangioblasts [30,31]. Since the N_A values of CD34 immunoreactive cells are higher compared to the other populations studied, it can be concluded that placental HSCs are predominantly of hemangioblast origin. The labyrinthine vasculature, along with mesenchymal stem cells (MSCs), which are also part of the placental niche, provides the necessary conditions for HSC self-renewal, proliferation, and differentiation. This is reflected in the higher abundance of HSCs in the mesenchyme compared to the lumen of blood vessels in the placenta [13,32].

The majority of HSCs in blood vessels differentiates into erythrocytes by the 14th week of gestation to ensure adequate oxygen supply to the growing fetus. The placenta is likely the primary site where erythrocyte maturation begins, including the loss of erythroblast nuclei under the influence of mesenchymal and Hofbauer cells [33].

The results of our study indicate that, in addition to hematopoietic progenitors, trophoblast cells also exhibit CD117 immunoreactivity, with trophoblasts of the first-trimester placenta showing high levels of immunoreactivity. However, the intensity of immunoreactivity decreases as gestation progresses. Since CD117 is a marker for stem progenitor cells, these trophoblast cells possess a high capacity for proliferation and differentiation. Their numbers, as well as their ability to proliferate and differentiate, decrease as pregnancy advances [34].

It is important to note that the identified HSCs in the placenta have the potential for proliferation, indicating that they are mature cells and can be used as transplants. Populations of CD34 and CD117 immunoreactive cells have the ability for multilineage and definitive differentiation [4,29,35,36].

The placenta has long been recognized as a significant biological material in regenerative medicine. However, the application of placental stem cells remains largely at the level of clinical studies. Due to its availability and size, the term placenta could provide a greater quantity of hematopoietic stem cells compared to traditional sources such as bone marrow-derived HSCs. Additionally, one of the first published reports on successful HSC transplantation from the placenta highlighted its potential application in unrelated recipients without triggering adverse reactions, such as graft-versus-host disease (GVHD). GVHD, which remains the most significant complication and leading cause of mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [37]. Protocols have been developed that incorporate the use of placental MSC in GVHD therapy [38,39]. Placental MSCs are also utilized to stimulate the proliferation and differentiation of HSCs derived from other sources [40]. This direct interaction, specifically the stimulation of HSCs by placental MSCs, could be one of the key reasons to prioritize placenta-derived HSCs. Beyond their direct transplantation potential, placental HSCs can differentiate into various cell lineages. Notably, natural killer (NK) cells derived from placental HSCs have shown promising results not only in lymphoma treatment but also in combating viral infections resistant to conventional therapies [41,42]. However, despite these advantages, the isolation of HSCs from the placenta remains more complex compared to traditional sources, presenting a challenge for widespread clinical application.

5. Conclusions

The placenta is a dynamic hematopoietic microenvironment that contains diverse populations of hematopoietic stem cells. Immunoreactive cells expressing CD34, CD117, and CD41 are present in various regions of the placenta throughout gestation, contributing significantly to hematopoiesis.

Since the term placenta is available after birth, it can serve as a valuable source of HSCs. Future research should focus on optimizing conditions for the clinical application of HSCs isolated from the placenta.

Author Contributions: Conceptualization, S.J. and I.R.N.; methodology, S.J. and I.R.N.; software, S.J. and M.B.; validation, S.J., I.R.N. and R.S.; formal analysis, S.J.; investigation, S.J.; resources, S.J.; data curation, S.J.; writing—original draft preparation, S.J.; writing—review and editing, I.R.N. and R.S.; visualization, V.L. and L.A.; supervision, I.R.N. and R.S.; project administration, R.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Part of this study was funded by grants for scientific projects (No. 451-03-65/2024-03/200113) provided by the Ministry of Science, Technological Development, and Innovation of the Republic of Serbia.

Institutional Review Board Statement: This study was conducted in accordance with the latest revision of the Helsinki Declaration, with approval from the Ethics Committee Faculty of Medicine, University of Banja Luka (No: 18/4.167/21).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in this study.

Data Availability Statement: All data supporting the findings can be found within the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Thambyrajah, R.; Bigas, A. Notch Signaling in HSC Emergence: When, Why and How. *Cells* **2022**, *11*, 358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Lee, J.Y.; Hong, S.H. Hematopoietic Stem Cells and Their Roles in Tissue Regeneration. *Int. J. Stem Cells.* **2020**, *13*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Gekas, C.; Rhodes, K.E.; Van Handel, B.; Chhabra, A.; Ueno, M.; Mikkola, H.K. Hematopoietic stem cell development in the placenta. *Int. J. Dev. Biol.* **2010**, *54*, 1089–1098. [[CrossRef](#)]
4. Anjos-Afonso, F.; Bonnet, D. Human CD34⁺ hematopoietic stem cell hierarchy: How far are we with its delineation at the most primitive level? *Blood* **2023**, *142*, 509–518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Park, J.E.; Jardine, L.; Gottgens, B.; Teichmann, S.A.; Haniffa, M. Prenatal development of human immunity. *Science* **2020**, *368*, 600–603. [[CrossRef](#)]
6. Waas, B.; Maillard, I. Fetal hematopoietic stem cells are making waves. *Stem Cell Investig.* **2017**, *4*, 25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. McGrath, K.E.; Palis, J. Hematopoiesis in the yolk sac: More than meets the eye. *Exp. Hematol.* **2005**, *33*, 1021–1028. [[CrossRef](#)]
8. Dzierzak, E.; Philipsen, S. Erythropoiesis: Development and differentiation. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2013**, *3*, a011601. [[CrossRef](#)]
9. Lacaud, G.; Kouskoff, V. Hemangioblast, hemogenic endothelium, and primitive versus definitive hematopoiesis. *Exp. Hematol.* **2017**, *49*, 19–24. [[CrossRef](#)]
10. Gekas, C.; Dieterlen-Lièvre, F.; Orkin, S.H.; Mikkola, H.K. The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Dev. Cell* **2005**, *8*, 365–375. [[CrossRef](#)]
11. Mikkola, H.K.; Gekas, C.; Orkin, S.H.; Dieterlen-Lievre, F. Placenta as a site for hematopoietic stem cell development. *Exp. Hematol.* **2005**, *33*, 1048–1054. [[CrossRef](#)]
12. Griffith, O.W. Novel tissue interactions support the evolution of placentation. *J. Morphol.* **2021**, *282*, 1047–1053. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Azevedo Portilho, N.; Pelajo-Machado, M. Mechanism of hematopoiesis and vasculogenesis in mouse placenta. *Placenta* **2018**, *69*, 140–145. [[CrossRef](#)]
14. Rhodes, K.E.; Gekas, C.; Wang, Y.; Lux, C.T.; Francis, C.S.; Chan, D.N.; Conway, S.; Orkin, S.H.; Yoder, M.C.; Mikkola, H.K. The

emergence of hematopoietic stem cells is initiated in the placental vasculature in the absence of circulation. *Cell Stem Cell* **2008**, *2*,

15. Sidney, L.E.; Branch, M.J.; Dunphy, S.E.; Dua, H.S.; Hopkinson, A. Concise review: Evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells* **2014**, *32*, 1380–1389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Song, Y.; Yang, J.; Li, T.; Sun, X.; Lin, R.; He, Y.; Sun, K.; Han, J.; Yang, G.; Li, X.; et al. CD34⁺ cell-derived fibroblast-macrophage cross-talk drives limb ischemia recovery through the OSM-ANGPTL signaling axis. *Sci. Adv.* **2023**, *9*, eadd2632. [[CrossRef](#)]
17. AbuSamra, D.B.; Aleisa, F.A.; Al-Amoodi, A.S.; Jalal Ahmed, H.M.; Chin, C.J.; Abuelela, A.F.; Bergam, P.; Sougrat, R.; Merzaban, J.S. Not just a marker: CD34 on human hematopoietic stem/progenitor cells dominates vascular selectin binding along with CD44. *Blood Adv.* **2017**, *1*, 2799–2816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Maillard, L.; Sanfilippo, S.; Domenech, C.; Kasmi, N.; Petit, L.; Jacques, S.; Delezoide, A.L.; Guimiot, F.; Eladak, S.; Moison, D.; et al. CD117^{hi} expression identifies a human fetal hematopoietic stem cell population with high proliferation and self-renewal potential. *Haematologica* **2020**, *105*, e43–e47. [[CrossRef](#)]
19. Escribano, L.; Ocqueteau, M.; Almeida, J.; Orfao, A.; San Miguel, J.F. Expression of the c-kit (CD117) molecule in normal and malignant hematopoiesis. *Leuk. Lymphoma* **1998**, *30*, 459–466. [[CrossRef](#)]
20. Hashimoto, K.; Fujimoto, T.; Shimoda, Y.; Huang, X.; Sakamoto, H.; Ogawa, M. Distinct hemogenic potential of endothelial cells and CD41⁺ cells in mouse embryos. *Dev. Growth Differ.* **2007**, *49*, 287–300. [[CrossRef](#)]
21. Jovićić, S.; Ljubojević, V.; Barudžija, M.; Amidžić, L.J.; Škrbic, R.; Nikolić, I.R. Influence of advanced maternal age and gestational age on the morphology of human placenta. *Scr. Med.* **2024**, *55*, 727–734. [[CrossRef](#)]
22. Kališnik, M.; Eržen, I.; Smolej, V. *Foundations of Stereology*; Društvo za Stereologijo in Kvantitativno Analizo Slike: Ljubljana, Slovenia, 2002.
23. Dzierzak, E.; Robin, C. Placenta as a source of hematopoietic stem cells. *Trends Mol. Med.* **2010**, *16*, 361–367. [[CrossRef](#)]
24. Robin, C.; Bollerot, K.; Mendes, S.; Haak, E.; Crisan, M.; Cerisoli, F.; Lauw, I.; Kaimakis, P.; Jorna, R.; Vermeulen, M.; et al. Human placenta is a potent hematopoietic niche containing hematopoietic stem and progenitor cells throughout development. *Cell Stem Cell* **2009**, *5*, 385–395. [[CrossRef](#)]
25. Vladičić-Mašić, J.; Nikolić, I.; Todorović, V.; Jović, M.; Petrović, V.; Mašić, S.; Dukić, N.; Zec'ević, S. Numerical areal density of CD34 and CD117 immunoreactive hematopoietic cells in human fetal and embryonic liver. *Biomed. Istraživanja* **2019**, *10*, 111–117. [[CrossRef](#)]
26. Ferrero, I.; Rustichelli, D.; Castiglia, S.; Gammaitoni, L.; Polo, A.; Pautasso, M.; Geuna, M.; Fagioli, F. Inter-laboratory method validation of CD34⁺ flow-cytometry assay: The experience of Turin Metropolitan Transplant Centre. *eJIFCC* **2023**, *34*, 220–227.
27. Popescu, D.M.; Botting, R.A.; Stephenson, E.; Green, K.; Webb, S.; Jardine, L.; Calderbank, E.F.; Polanski, K.; Goh, I.; Efremova, M.; et al. Decoding human fetal liver haematopoiesis. *Nature* **2019**, *574*, 365–371. [[CrossRef](#)]
28. Notta, F.; Doulatov, S.; Laurenti, E.; Poepl, A.; Jurisica, I.; Dick, J.E. Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science* **2011**, *333*, 218–221. [[CrossRef](#)]
29. Muench, M.O.; Kapidzic, M.; Gormley, M.; Gutierrez, A.G.; Ponder, K.L.; Fomin, M.E.; Beyer, A.I.; Stolp, H.; Qi, Z.; Fisher, S.J.; et al. The human chorion contains definitive hematopoietic stem cells from the fifteenth week of gestation. *Development* **2017**, *144*, 1399–1411. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Sahai-Hernandez, P.; Pouget, C.; Eyal, S.; Svoboda, O.; Chacon, J.; Grimm, L.; Gjøen, T.; Traver, D. Dermomyotome-derived endothelial cells migrate to the dorsal aorta to support hematopoietic stem cell emergence. *eLife* **2023**, *12*, e58300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Kennedy, M.; D'Souza, S.L.; Lynch-Kattman, M.; Schwantz, S.; Keller, G. Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures. *Blood* **2007**, *109*, 2679–2687. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Tanaka, Y.; Sanchez, V.; Takata, N.; Yokomizo, T.; Yamanaka, Y.; Kataoka, H.; Hoppe, P.S.; Schroeder, T.; Nishikawa, S. Circulation-independent differentiation pathway from extraembryonic mesoderm toward hematopoietic stem cells via hemogenic angioblasts. *Cell Rep.* **2014**, *8*, 31–39. [[CrossRef](#)]
33. Van Handel, B.; Prashad, S.L.; Hassanzadeh-Kiabi, N.; Huang, A.; Magnusson, M.; Atanassova, B.; Chen, A.; Hamalainen, E.I.; Mikkola, H.K. The first trimester human placenta is a site for terminal maturation of primitive erythroid cells. *Blood* **2010**, *116*, 3321–3330. [[CrossRef](#)]
34. Hou, M.; Han, J.; Li, G.; Kwon, M.Y.; Jiang, J.; Emani, S.; Taglauer, E.S.; Park, J.A.; Choi, E.B.; Vodnala, M.; et al. Multipotency of mouse trophoblast stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* **2020**, *11*, 55. [[CrossRef](#)]
35. Serikov, V.; Hounshell, C.; Larkin, S.; Green, W.; Ikeda, H.; Walters, M.C.; Kuypers, F.A. Human term placenta as a source of hematopoietic cells. *Exp. Biol. Med.* **2009**, *234*, 813–823. [[CrossRef](#)]
36. Czechowicz, A.; Palchaudhuri, R.; Scheck, A.; Hu, Y.; Hoggatt, J.; Saez, B.; Pang, W.W.; Mansour, M.K.; Tate, T.A.; Chan, Y.Y.; et al. Selective hematopoietic stem cell ablation using CD117-antibody-drug-conjugates enables safe and effective transplantation with immunity preservation. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 617. [[CrossRef](#)]
37. Kurtzberg, J.; Laughlin, M.; Graham, M.L.; Smith, C.; Olson, J.F.; Halperin, E.C.; Ciocchi, G.; Carrier, C.; Stevens, C.E.; Rubinstein, P. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N. Engl. J. Med.* **1996**, *335*, 157–166. [[CrossRef](#)]

38. Keklik, M.; Deveci, B.; Celik, S.; Deniz, K.; Gonen, Z.B.; Zararsiz, G.; Saba, R.; Akyol, G.; Ozkul, Y.; Kaynar, L.; et al. Safety and efficacy of mesenchymal stromal cell therapy for multi-drug-resistant acute and late-acute graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Ann. Hematol.* **2023**, *102*, 1537–1547. [[CrossRef](#)]
39. Fu, H.; Sun, X.; Lin, R.; Wang, Y.; Xuan, L.; Yao, H.; Zhang, Y.; Mo, X.; Lv, M.; Zheng, F.; et al. Mesenchymal stromal cells plus basiliximab improve the response of steroid-refractory acute graft-versus-host disease as a second-line therapy: A multicentre, randomized, controlled trial. *BMC Med.* **2024**, *22*, 85. [[CrossRef](#)]
40. Nishikawa, E.; Matsumoto, T.; Isige, M.; Tsuji, T.; Mugisima, H.; Takahashi, S. Comparison of capacities to maintain hematopoietic stem cells among different types of stem cells derived from the placenta and umbilical cord. *Regen. Ther.* **2016**, *4*, 48–61. [[CrossRef](#)]
41. Guo, X.; Mahlaköiv, T.; Ye, Q.; Somanchi, S.; He, S.; Rana, H.; DiFiglia, A.; Gleason, J.; van der Touw, W.; Hariri, R.; et al. CBLB ablation with CRISPR/Cas9 enhances cytotoxicity of human placental stem cell-derived NK cells for cancer immunotherapy. *J. Immunother. Cancer* **2021**, *9*, e001975. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Gleason, J.; Zhao, Y.; Raitman, I.; Kang, L.; He, S.; Hariri, R. Human placental hematopoietic stem cell derived natural killer cells (CYNK-001) mediate protection against influenza a viral infection. *Hum. Vaccines Immunother.* **2022**, *18*, 2055945. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.