

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI  
ȘCOALA DOCTORALĂ  
DOMENIUL MEDICINĂ**

**Cercetări exploratorii ale nișelor stromale oculare**

***REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT***

**Conducător de doctorat:  
PROF. UNIV. DR. RUSU MUGUREL CONSTANTIN**

**Student-doctorand:  
dr.Petrea Claudia Elena**

**București, 2018**

# CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

---

<b>INTRODUCERE</b>	<b>4</b>
<b>PARTEA GENERALĂ A TEZEI DE DOCTORAT</b>	<b>6</b>
<b>LISTA DE ABREVIERI</b>	<b>7</b>
<b>1 ELEMENTE DE MORFOGENEZĂ OCULARĂ</b>	<b>8</b>
<b>1.1 FORMAREA VASCULARIZAȚIEI RETINIENE ȘI COROIDIENE</b>	<b>15</b>
1.1.1 SISTEMUL VASCULAR COROIDIAN EMBRIONAR	16
1.1.2 SISTEMUL VASCULAR HIALOID	19
1.1.3 VASCULARIZAȚIA RETINIANĂ	19
<b>1.1 MORFOGENEZA ANEXELOR OCULARE</b>	<b>21</b>
<b>2 ANATOMIA ORBITEI</b>	<b>25</b>
<b>2.1 PEREȚII ORBITEI</b>	<b>25</b>
<b>2.2 CONȚINUTUL ORBITEI</b>	<b>29</b>
<b>3 ELEMENTE DE MORFOLOGIE A GLOBULUI OCULAR</b>	<b>34</b>
3.1.1 TUNICA EXTERNĂ A GLOBULUI OCULAR	34
3.1.2 COROIDA	37
<b>4 ANATOMIA GLANDEI LACRIMALE</b>	<b>39</b>
4.1.1 SISTEMUL LACRIMAL	39
4.1.2 SISTEMUL SECRETOR LACRIMAL	39
4.1.2.1 Sistemul secretor bazal	39
4.1.2.2 Sistemul secretor reflex	40
4.1.3 GLANDA LACRIMALĂ PRINCIPALĂ	40
4.1.4 ANATOMIA MICROSCOPICĂ A GLANDEI LACRIMALE	41
4.1.5 GLANDE LACRIMALE ACCESORII	42
4.1.6 VASCULARIZAȚIA GLANDEI LACRIMALE	42
4.1.7 INERVAȚIA GLANDEI LACRIMALE	42
4.1.7.1 Reflexul lacrimal	42
<b>5 ELEMENTE DE ANATOMIE A TELOCITELOR</b>	<b>43</b>

<b>6</b>	<b>LIMFATICELE ORBITOOCULARE</b>	<b>46</b>
<hr/>		
	<b>PARTEA PERSONALĂ A TEZEI DE DOCTORAT</b>	<b>48</b>
<hr/>		
<b>7</b>	<b>CERCETĂRI IMUNOHISTOCHIMICE ȘI ULTRASTRUCTURALE ALE NIȘEI STROMALE SCLERALE</b>	<b>49</b>
<hr/>		
<b>7.1</b>	<b>INTRODUCERE</b>	<b>49</b>
<b>7.2</b>	<b>MATERIAL ȘI METODĂ</b>	<b>49</b>
7.2.1	MATERIAL BIOLOGIC	49
7.2.2	METODA IMUNOHISTOCHIMICĂ	50
7.2.3	MICROSCOPIA ELECTRONICĂ DE TRANSMISIE	51
<b>7.3</b>	<b>REZULTATE</b>	<b>51</b>
7.3.1	STUDIUL IMUNOHISTOCHIMIC	53
7.3.2	STUDIUL ULTRASTRUCTURAL	54
<b>7.4</b>	<b>DISCUȚII</b>	<b>68</b>
7.4.1	CONCEPTUL COMUN – FIBROBLAȘTII SCLERALI	68
7.4.2	FENOTIPURI CELULARE IMUNE LA NIVELUL SCLEREI	68
7.4.3	NIȘA STEM CORNEANĂ	69
7.4.3.1	Expresia CD34 în keratocitele stromei corneene	69
7.4.3.2	Fenotipul stromal stem mezenchimal și caracteristica imună a stromei corneene	70
7.4.3.3	Telocitele corneene	70
7.4.4	TRANSFORMAREA EPITELIAL-MEZENCHIMALĂ GENEAREAZĂ TELOCITE SCLERALE CU FENOTIP IMUN	72
7.4.5	EXPRESIA SCLERALĂ A ENDOGLINEI	74
7.4.6	NIȘA TELOCITARĂ SCLERALĂ	75
<hr/>		
<b>8</b>	<b>CERCETĂRI ULTRASTRUCTURALE ALE NIȘEI STROMALE COROIDIENE – LIMFATICELE COROIDEI</b>	<b>81</b>
<hr/>		
<b>8.1</b>	<b>INTRODUCERE</b>	<b>81</b>
<b>8.2</b>	<b>MATERIAL ȘI METODĂ</b>	<b>83</b>
<b>8.3</b>	<b>REZULTATE</b>	<b>84</b>
<b>8.4</b>	<b>DISCUȚII</b>	<b>85</b>
<hr/>		
<b>9</b>	<b>CERCETĂRI ULTRASTRUCTURALE ALE NIȘEI STROMALE A LAMINEI FUSCA</b>	<b>89</b>
<hr/>		
<b>9.1</b>	<b>INTRODUCERE</b>	<b>89</b>
<b>9.2</b>	<b>MATERIAL ȘI METODĂ</b>	<b>89</b>
9.2.1	MATERIAL BIOLOGIC	89
9.2.2	MICROSCOPIA ELECTRONICĂ DE TRANSMISIE	91
<b>9.3</b>	<b>REZULTATE</b>	<b>94</b>
<b>9.4</b>	<b>DISCUȚII</b>	<b>96</b>

<b>10 CERCETĂRI IMUNOHISTOCHIMICE ȘI ULTRASTRUCTURALE ALE NIȘEI STROMALE LACRIMALE</b>	<b>102</b>
<b>10.1 INTRODUCERE</b>	<b>102</b>
<b>10.2 MATERIAL ȘI METODĂ</b>	<b>103</b>
10.2.1 MATERIAL BIOLOGIC	103
10.2.2 METODA IMUNOHISTOCHIMICĂ	103
10.2.3 MICROSCOPIA ELECTRONICĂ DE TRANSMISIE	105
<b>10.3 REZULTATE</b>	<b>105</b>
10.3.1 STUDIUL IMUNOHISTOCHIMIC	105
10.3.2 STUDIUL ULTRASTRUCTURAL	110
<b>10.4 DISCUȚII</b>	<b>122</b>
10.4.1 TELOCITELE SPAȚIILOR INTERȘTIȚIALE	122
10.4.2 LIMFATICELE ORBITO-LACRIMALE	123
10.4.3 TRANSFORMAREA MEZENCHIMAL-ENDOTELIALĂ CONTRIBUIE LA FORMAREA DE NEOVASE	123
10.4.4 CELULELE STEM MEZENCHIMALE DOBÂNDESC FENOTIP LIMFENDOTELIAL	124
10.4.5 CELULE STEM MEZENCHIMALE DIN MĂDUVA OSOASĂ FACILITEAZĂ ATÂT ANGIOGENEZA CÂT ȘI LIMFANGIOGENEZA	124
10.4.6 CELULELE STEM MEZENCHIMALE AR PUTEA REZULTA PRIN TRANSFORMARE ENDOTELIAL-MEZENCHIMALĂ	125
10.4.7 TELOCITELE SUBEPITELIALE ÎN GLANDA LACRIMALĂ	126
10.4.8 POTENȚIALUL REGENERATIV AL GLANDEI LACRIMALE	126
10.4.9 TELOCITELE GLANDEI LACRIMALE DELIMITEAZĂ SPAȚIILE INTERȘTIȚIALE	127
10.4.10 VACUOLELE PRECURSOARE ALE LUMENELOR TUBILOR ENDOTELIALI	128
10.4.11 ANVELOPA NUCLEARĂ, VACUOLELE SPAȚIULUI PERINUCLEAR	128
<b>CONCLUZII</b>	<b>131</b>
<b>BIBLIOGRAFIE</b>	<b>133</b>
<b>INDEX DE FIGURI ÎN TEXT</b>	<b>151</b>
<b>INDEX DE TABELE ÎN TEXT</b>	<b>158</b>

## INTRODUCERE

Medicina personalizată și medicina regenerativă reprezintă direcții moderne în practica și cercetarea medicală. Potențialul regenerativ intrinsec al țesuturilor este determinat specific de compoziția celulară a nișelor stem, epiteliale sau stromale. Cum populația de celule stem sau progenitoare dintr-o nișă parcurge stadii de diferențiere cu diferențe subtile, identificarea statică a acestora păstrează o doză de neclaritate, care nu poate fi rezolvată complet nici în anatomia moleculară, nici prin cercetări *in vitro*. Telocitele (TC) sunt celule stromale cu prelungiri subțiri, lungi și moniliforme, denumite telopode; aceste procese celulare reprezintă identificatorii morfologici ai TC. Aceste TC sunt rezidenți uzuali în nișele stem stromale. Aceste celule au fost descrise pentru prima dată la noi în țară de grupul de cercetare condus de regretatul Acad.LM.Popescu. Telocitele de la nivelul globului ocular și anexelor acestuia au fost studiate extrem de puțin, necesitatea unor studii suplimentare fiind evidentă. Deși sunt extrem de numeroase publicații care raportează detalii privind TC, acestea nu au primit încă un imunofenotip specific și pot fi diagnosticate în principal doar pe baza prezenței telopodelor și pe secțiuni ultrafine. În prezent sunt diferite alte grupuri de cercetare care au adus argumente prin care subseturi de TC sunt alocate fie liniei endoteliale, fie unei populații generale de celule stromale, fără a putea fi considerate un tip celular distinct. Această heterogenitate a TC impune studii suplimentare. La nivelul globului ocular și anexelor acestuia studiile asupra microanatomiei limfatice sunt deasemenea insuficiente. Rezultatele cercetărilor anterioare sunt insuficiente pentru a putea permite o concluzie asupra existenței acestora în structuri histologice specifice. Mai mult, trebuie să remarc faptul că modelul ultrastructural al unui telocit nu este aproape deloc diferit de cel al unei celule endoteliale limfatice. Astfel, microscopia electronică trebuie să decidă dacă celulele stromale de la nivel ocular sunt unul sau altul din aceste două tipuri celulare. Am urmărit ca în cadrul tezei mele de doctorat să explorez în anatomia moleculară și cea ultrastructurală nișele stromale de la nivelul sclerei și coroidii, precum și de la nivelul glandei lacrimale, pentru a oferi date suplimentare atât asupra microcirculației limfatice și precursorilor acesteia, precum și privind TC oculare și lacrimale, aceste nișe tisulare reprezentând substratul practicii mele medicale curente.

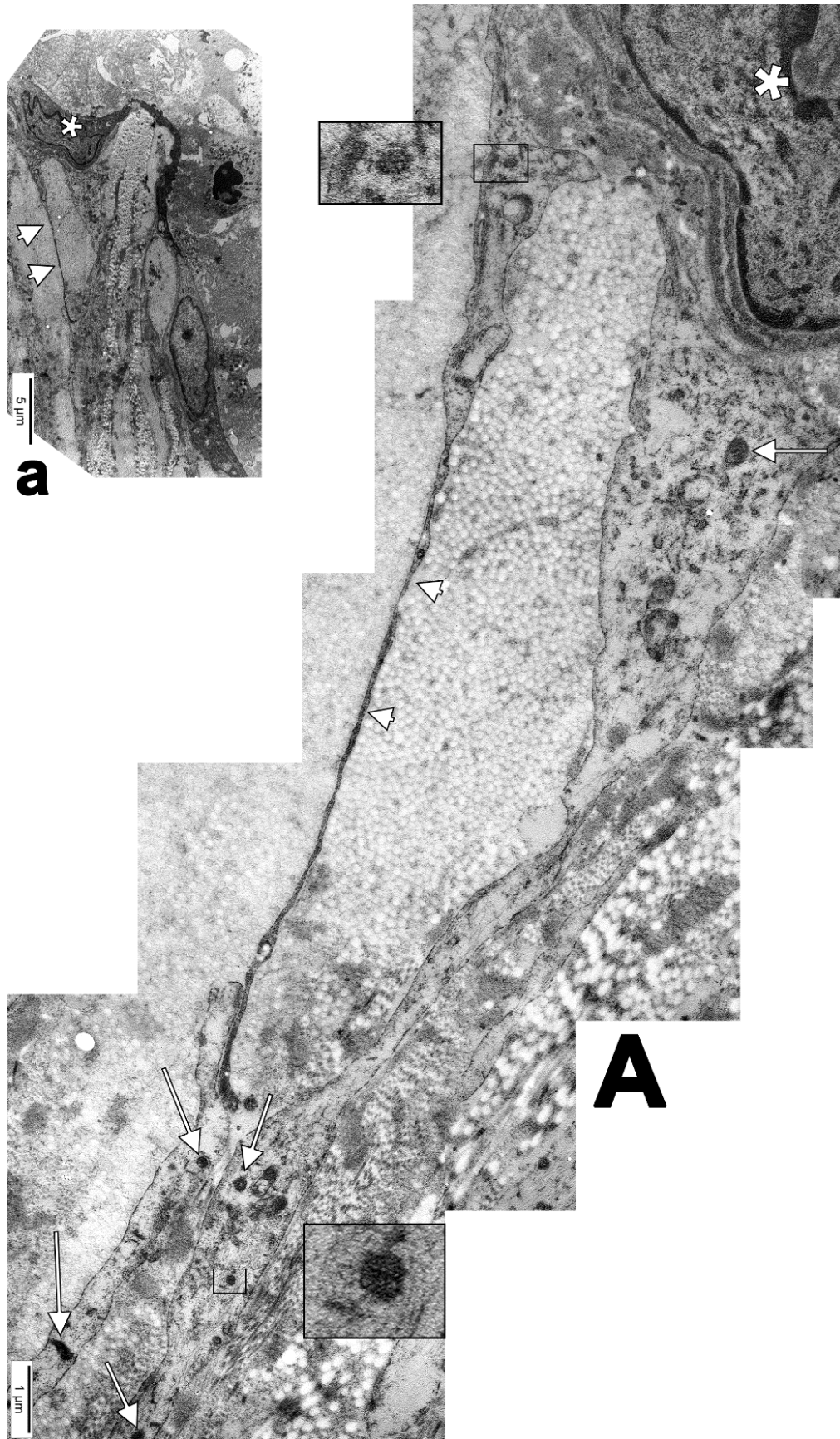
## CERCETĂRI IMUNOHISTOCHIMICE ȘI ULTRASTRUCTURALE ALE NIȘEI STROMALE SCLERALE

Sclera conține fibroblaști fuziformi care au potențialul de a participa în patologia imunologică oculară <sup>1</sup>. Din această perspectivă citologică, sclera apare precum o resursă tisulară adecvată pentru studiul TC <sup>2</sup>. Cu ani înainte ca Popescu și Faussone-Pellegrini (2010) să

propună TC precum un nou tip celular <sup>3</sup>, în microscopia electronică de transmisie fuseseră identificate celule cu prelungiri lungi și subțiri care corespund definiției morfologice a TC; în studiul realizat de Hisatomi și colab. (2007) astfel de celule au fost indicate ca fibroblaști sclerali <sup>4</sup>. Acești autori au realizat cercetări la șobolani <sup>4</sup> și au observat faptul că celulele stem hematopoietice (HSC) migrează în scleră și se amestecă cu fibroblaștii sclerali rezidenți pentru ca mai departe să se diferențieze în celule imune, precum macrofagele și celulele dendritice <sup>2</sup>. Scopul cercetărilor mele a fost astfel de a aprecia anatomia ultrastructurală și moleculară a celulelor stromale sclerale, mai ales a telocitelor sclerale.

Am utilizat piese oculare umane obținute după enucleere chirurgicală posttraumatică. Metodele utilizate au fost imunohistochimia la parafină și microscopia electronică de transmisie.

Am identificat la nivelul epiteliului conjunctival suprascleral expresia pozitivă în celulele poligonale ale stratului intermediar epitelial a CD146 și expresia pozitivă în epiteliul bazal a CD45, CD105 și vimentinei. Celulele epiteliului conjunctival bazal nu au exprimat CD34 și nici CD31, CD68, CD117/c-kit. Am identificat în scleră, înglobate în colagen, celule subțiri fuziforme, care proiectau prelungiri lungi și extrem de lungi, moniliforme, ceea ce corespunde definiției TC. Aceste TC-like sclerale au exprimat CD34, CD45, CD105 și vimentină. Ocazional, astfel de celule au exprimat CD68, însă nu am identificat expresii pozitive ale colagenului III, CD31, CD133 și CD146. Am identificat în matricea extracelulară colagenică sclerală o populație heterogenă ce celule cu prelungiri lungi, subțiri și ocazional moniliforme. Aceste prelungiri celulare au fost morfologic de două tipuri, telopode, atunci când procesele celulare erau moniliforme, sau filopode, dacă procesele celulare nu prezentau nici dilatații și nici conținut. Pe lângă morfologia prelungirilor celulare, o serie de alte caracteristici morfologice au sugerat faptul că sclera conține diferite subseturi de celule stromale. Primul subset de celule stromale sclerale a fost reprezentat de celule diferențiate cu un fenotip clar în microscopia electronică; aceste celule erau complet echipate cu organite uzuale precum mitocondrii, complexe Golgi, reticul endoplasmic rugos și ribozomi, citoscheletul fiind constituit de filamente intermediare, decelându-se deasemenea și caveole subplasmalemale și invaginări tapetate de clatrină. Am considerat aceste celule clare ca fiind celule hibride din punct de vedere morfologic, deoarece proiectau deopotrivă telopode cu emergență caracteristică din corpul celular și procese celulare subțiri rezultate prin reducerea progresivă a calibrului, pornind de la corpul celular. Unele astfel de celule fuziforme au prezentat nuclei deosebit de lungi. La nivelul acestor celule clare ale stromei sclerale am pus în evidență diferite substructuri



**Stromă sclerală umană adultă. Aspect general al unei rețele celulare stromale (a) studiat la rezoluție microscopică crescută (B, concatenare digitală a 6 micrografii). În vecinătatea unei celule stem mezenchimale (\*) cu raport nucleocitoplasmatic mare, invaginări nucleare, nucleu heterocromatinic și slabă diferențiere a organelor, se identifică o rețea de celule stromale, având în alcătuire și un telopod (vârfuri de săgeți). Toace aceste celule stromale conțin corpi Weibel-Palade (săgeți, două astfel de structuri sunt indicate în chenar și detaliate după mărire digitală).**

care au sugerat că celulele aparțin liniei endoteliale. Pentru a susține această ipoteză am apreciat în microscopia electronică și celulele endoteliale din episcleră în care am pus în evidență corpi Weibel-Palade cu conținut de microtubuli și forma longitudinală caracteristică de trabuc. Am găsit deasemenea structuri intracitoplasmice rotunde electronodense incomplet delimitate de membrane, în care am pus în evidență fie tubi groși, de 500-600Å conținuți într-o matrice mai puțin densă, fie tubi subțiri (200-230Å), dezorganizați, înglobați într-o matrice mai densă. Am identificat deasemenea celule stromale care conțineau, ca și celulele endoteliale, structuri electronodense cu tubi groși sau subțiri, precum și corpi Weibel-Palade maturi sau imaturi. Deasemenea am decelat conținutul polar de vezicule secretorii al unor astfel de celule cu conținut dens. Al doilea subset de celule stromale, cele întunecate, erau slab diferențiate și au prezentat fie morfologie fuziformă, fie erau multipolare. Prelungirile acestora au fost filopodiale iar celulele respective au conținut aproape exclusiv cisterne dilatate de reticul endoplasmic rugos și ribozomi, cu doar rare mitocondrii. Deoarece organele au fost slab reprezentate în aceste celule, cantitatea de citoplasmă perinucleară a fost mică iar nucleii heterocromatinici prezentau invaginări, le-am considerat celule stem stromale. Printre celulele stem stromale întunecate am găsit puține celule cu un conținut aproape exclusiv de microfilamente și corpi denși mioizi, pe care le-am considerat celule stem stromale mioide. Am pus deasemenea în evidență extensii nucleare lungi și subțiri în segmente subțiri ale corpului celular, care ar fi putut fi diagnosticate precum telopode dacă conținutul nuclear ar fi lipsit din acestea. Celule stem stromale întunecate au prezentat deasemenea picături lipidice citozolice și intranucleare, precum și corpi lamelari. Acestea din urmă au fost localizate deopotrivă în stroma sclerală și în nișele perivasculare ale episclerei.

Faptul că în epiteliul conjunctival am identificat fenotipul bazal CD34-/CD45+/CD105+ iar în stroma sclerală toți cei trei markeri au fost exprimați pozitiv (CD34+/CD45+/CD105+) se poate explica după cum urmează. Fiind vorba de celule epiteliale bazale progenitoare, acestea nu exprimă CD34, care va fi exprimat doar la pierderea calității de celulă progenitoare, aspect pe care deja l-am comentat în acest capitol, bazându-mă pe discuțiile lui Pinnamaneni și Funderburgh (2012) și pe cele ale lui Diaz-Flores și colab. (2014). Faptul că atât CD45 cât și CD105 își păstrează expresia pozitivă atât în celule epiteliale cât și în celule/telocite stromale sclerale indică însă precis originea posibilă a telocitelor sclerale, prin transformare epitelial-mezenchimală. Acest proces de transdiferențiere și migrare epitelial-stromală este de asemenea indicat de expresia markerului mezenchimal – vimentina în celulele epiteliale bazale ale conjunctivei. Din această abordare, conjunctiva reprezintă una dintre nișele stem care

alimentează sclera stromală, asigură turnoverul celulelor stromale și are capacitatea de a interveni atât în răspunsurile imune ale sclerei cât și în procesele regenerative și reparatorii sclerale. Persistența expresiei CD45 și CD105 în telocitele sclerale poate indica un fenotip parțial diferențiat al acestora. Celulele endoteliale au o plasticitate deosebită și prin procesul de transformare endotelial-mezenchimală (TEndM) sunt convertite la un tip celular mezenchimal care va da naștere la fibroblaști precum și la celule osoase <sup>5</sup>. Ca și transformarea epitelial-mezenchimală (TEM), TEndM este indusă de TGF- $\beta$  <sup>5</sup> care, la rândul său, este inhibat de endoglină (CD105); deci prin influențarea negativă TGF- $\beta$  se pot inhiba procesele de TEndM și TEM <sup>5</sup> (aceste efecte se pot obține și prin expresia CD105). Din acest punct de vedere consider că expresia epitelială și stromală la nivelul conjunctivei și, respectiv, sclerei, a endoglinei (CD105), așa cum a reieșit din cercetările mele, poate reprezenta un element restrictiv al TEM, TEndM și fibrozei locale, potențând însă, pe de altă parte, formarea de celule ale liniei endoteliale. Acestea însă trebuie considerate atent, deoarece după cum am demonstrat, epiteliul conjunctival și stroma sclerală exprimă specific și CD45, markerul hematopoietic și leucocitar. Prezența în scleră a celulelor cu telopode, filopode și cu morfologii hibride și în diferite stadii de diferențiere sugerează o heterogenitate morfologică mare a populației de celule stromale sclerale <sup>2</sup>. Anterior a fost făcută recomandarea de a acorda atenție corect emergenței telopodiale și de a identifica morfologiile hibride <sup>6</sup>. În 2010, Popescu și Faussonne-Pellegrini au precizat că alte tipuri celulare cu prelungiri subțiri, diferite de TC, posedă prelungiri care se subțiază treptat de la originea lor din corpul celular, ceea ce le face diferite de telopode <sup>3</sup>. Aici am găsit celule fuziforme ale stromei sclerale care la un pol proiectau un telopod, iar la polul opus am identificat o prelungire non-telopodială, deci un aspect hibrid care face nesigură identificarea unui anumit tip celular doar pe baza evidențierii numai a telopodelor <sup>2</sup>. Mai mult, atunci când sunt apreciate TC în microscopia electronică de transmisie, telopodele trebuie diferențiate de filopode. Celulele endoteliale germinative precum și celulele endoteliale progenitoare sunt celule ce proiectează filopode și au rol în formarea de neovase sangvine <sup>7-12</sup>. Deasemenea celulele stem proiectează filopode <sup>13</sup>. În acest studiu au fost aduse pentru prima dată evidențe ale extensiei nucleare în telopode, ceea ce face unice aceste celule sclerale TC-like.

Picăturile lipidice sunt organite de depozitare lipidică ce se găsesc în majoritatea celulelor eucariote și sunt compuse dintr-o masă de esteri lipidici hidrofobă delimitată de un monostrat de fosfolipide de suprafață în care sunt înglobate proteine specifice <sup>29, 30</sup>. În studiul meu am găsit nu doar picături lipidice citozolice, ci și picături lipidice intranucleare, în celulele

stem stromale ale sclerei <sup>2</sup>. Sunt puține studii publicate care indică această posibilitate <sup>14</sup>. Hillman și Hillman (1973) au observat astfel de picături lipidice intranucleare, în microscopia electronică de transmisie, lucrând pe țesut de la embrioni de șoareci mutați  $t^{w32}/t^{w32}$  <sup>15</sup>. Layerenza și colab. (2013) au observat prin microscopie confocală incluziuni lipidice intranucleare în hepatocite, la șobolan *in vivo* și la celule Hep2 în culturi, precum și în nuclei izolați <sup>16</sup>. A fost postulat faptul că incluziunile lipidice intranucleare ar putea rezulta fie prin invaginarea anvelopei nucleare fie prin pătrunderea elementelor citoplasmice prin porii nucleari în nucleul lipsit de anvelopă nucleară <sup>17</sup>. S-au observat deasemenea în țesut hepatic uman, în microscopia electronică de transmisie, incluziuni lipidice citozolice, înconjurate parțial de compartimentul nuclear, precum și incluziuni lipidice intranucleare care nu erau delimitate prin membrane <sup>18</sup>. Adevăratele incluziuni lipidice intranucleare, care nu sunt delimitate de anvelopa nucleară, deci citozolice protruzive în nucleu, se găsesc în regiuni non-polare ale nucleului, așa cum incluziunile lipidice citozolice sunt la polii celulari. Deși au fost aduse evidențe de incluziuni lipidice intranucleare în celule hepatice, nu au mai fost prezentate dovezi și în alte localizări tisulare, cum este cea sclerală pe care am demonstrat-o aici <sup>2</sup>.

Corpii nucleari sunt considerați structuri uzuale la speciile care hibernează <sup>19,20</sup>. Proteina leucemiei promielcitare (PML) este o proteină supresoare a creșterii care intervine în leucemia acută respective <sup>21</sup>. Antigenul OML este asociat cu situsurile de transcripție <sup>21</sup>. Corpi nucleari PML se găsesc în toate celulele mamiferelor <sup>22</sup>. Proteina PML este denumită și MYL, RNF71, PP8675 sau TRIM19 <sup>23</sup>. Picăturile (incluziunile) lipidice intranucleare sunt asociate cu tipul I de reticul nucleoplasmic care extinde membrana nucleară internă, precum și cu corpi nucleari PML <sup>24</sup>. Knockdown-ul izoformei PML II conduce la reducerea semnificativă atât a incluziunilor lipidice intranucleare cât și a reticulului nucleoplasmic, iar supraexpresia PML-II le crește pe amândouă acestea <sup>24</sup>. Acest lucru indică rolul PML în formarea de incluziuni lipidice intranucleare <sup>24</sup>. Încă se dispută rolul [ractic al asociației dovedite dintre incluziunile lipidice intranucleare și corpii nucleari PML <sup>25</sup>.

Hisatomi și colab. (2007) au descoperit că sclera găzduiește celule imune și este populară de HSC. Unele studii au arătat faptul că proteina PML este caracteristică și relevantă funcțional pentru HSC <sup>2</sup>. Factorul de transcripție c-Myb are un rol principal în reglarea creșterii și în diferențierea HSC, când corpii nucleari cu proteina PML reglează activitatea c-Myb <sup>26</sup>. Proteina PML reprezintă un element esențial pentru auto-reînnoirea HSC iar deleția PML conduce la pierderea latenței HSC, ceea ce conduce la amplificarea acestora și epuizarea

consecutivă a nișelor stem <sup>27</sup>. Deasemenea s-a demonstrat faptul că metabolismul acizilor grași în aval de PML asigură energia pentru execuția adecvată a diviziunilor asimetrice ale HSC <sup>28</sup>.

Se poate astfel specula rezonabil că dacă incluziunile lipidice nucleare se asociază cu PML, iar PML pe de altă parte este un constituent esențial al HSC, celulele stem stromale sclerale nediferențiate sunt de bună seamă HSC <sup>2</sup>.

Am pus în evidență celule sclerale mioide, în microscopia electronică de transmisie <sup>2</sup>. Aceasta corespunde unui studiu anterior în care au fost utilizați anticorpi pentru alfa-actina de mușchi neted și în scleră și în coroida posterioară au fost evidențiate celule contractile non-vasculare care pot lua parte la reglarea unui status refractiv prin menținerea dimensiunilor oculare la presiuni intraoculare diferite <sup>29</sup>.

Corpii lamelari sunt organite de depozitare și secreție a lipidelor, pe seama cărora sunt alimentate domenii extracelulare cu componente lipidice specializate <sup>30</sup>. Corpii lamelari au fost identificați în diferite celule epiteliale, macrofage precum și în celulele musculare netede <sup>30</sup>. Prezintă interes în acest context faptul că în interstițiul renal au fost puse în evidență celule slab diferențiate care proiectau telopode și au conținut corpi lamelari <sup>31</sup>. În țesuturi cu rol de barieră au fost găsite organite similare corpiilor lamelari <sup>32</sup>.

Am pus în evidență de bună seamă HSC latente la nivelul nișei sclerale, aceste celule prezentând depozite caracteristice pentru factor von Willebrand, precum corpii Weibel-Palade care sunt specifici liniei endoteliale <sup>33-35</sup>, și organite electronodense care conțineau tubuli, destul de asemănătoare cu  $\alpha$ -granulele din trombocite și din megacariocite <sup>51,52</sup>. Acestea din urmă le-am denumit structuri  $\alpha$ -granule-like, deoarece localizarea în flanc a tubulilor din  $\alpha$ -granule diferă de topografia tubulilor identificată de mine <sup>2</sup>. S-a observat în microscopia electronică de transmisie faptul că corpii Weibel-Palade, după transducție pentru exprimarea factorului VIII, dobândesc o morfologie rotundă și apar precum structuri electronodense cu tubuli scurți și dezorganizați constituiți din factor von Willebrand <sup>36</sup>, care deasemenea se aseamănă cu structurile  $\alpha$ -granule-like <sup>2</sup>. Mai mult, am pus în evidență <sup>2</sup> vezicule dense în celule stromale ale sclerei, ceea ce susține studii precedente care au arătat că veziculele cu conținut de factor von Willebrand se localizează în celule ce conțin atât corpi Weibel-Palade, cât și  $\alpha$ -granule <sup>37,38</sup>, precum și în celule endoteliale progenitoare <sup>39</sup>. Secreția de factor von Willebrand în celulele endoteliale este polară <sup>35</sup>, model morfologic pe care l-am evidențiat și eu la celulele cu corpi Weibel-Palade <sup>2</sup>.

Nișa hematopoietică a fost studiată foarte bine și informațiile sunt importante pentru studiul mecanismelor care asigură tropismul HSC, bazate și pe rolul selectinelor <sup>40</sup>. E-selectina este exprimată în celulele endoteliale iar P-selectina se localizează în corpii Weibel-Palade <sup>40</sup>,  $\alpha$ -granule <sup>40</sup> și în macrofage <sup>41</sup>. La șoareci cu knockout de E-selectină și P-selectină s-a observat deficitul tropismului HSC <sup>42</sup>. Astfel, celulele stromei sclerale conținând depozite de factor von Willebrand ar putea avea rol în tropismul scleral al HSC <sup>2</sup>.

Trebuie discutat dacă celulele stromei sclerale cu depozite de factor von Willebrand ar putea fi considerate celule imune, având aici în vedere faptul că trombocitele cu  $\alpha$ -granule sunt considerate celule imun-like <sup>41,43-45</sup>. Un studiu realizat după publicarea materialului editorial prin care TC erau propuse ca un nou tip celular a pornit de la considerentul uzual al sclerei formate din colagen și fibroblaști sclerali și a condus la identificarea prin imunohistochimie a unui potențial de activare imună al sclerei <sup>46</sup>. Autorii respectivi au identificat expresia sclerală a CD45 și CD68, concluzionând că celulele imune sclerale sunt importante fiziologic pentru globul ocular și pot contribui la homeostazia vasculară <sup>46</sup>. Expresia CD68, marker uzual al monocitelor și macrofagelor, corelată cu evidența mea a celulelor TC-like sclerale, se corelează și cu evidențe anterioare ale TC fagocitare-like CD34+ <sup>47</sup>. Rezultatele mele, ca și cele ale lui Schlereth și colab. (2015) sunt puțin diferite de studii pe scleră murină <sup>48</sup> în care au fost puse în evidență celule stem sau progenitoare care exprimă markeri mezenchimali, precum CD105, în acord cu rezultatele mele, însă nu exprimă markerii hematopoietici CD34 și CD45, ceea ce diferă de rezultatele mele. Niciunul dintre puținele studii existente nu a folosit CD133, marker hematopoietic pe care eu l-am găsit exprimat negativ în probele mele tisulare.

Ipoteza rolului celulelor sclerale în homeostazia microvasculară este întărită de fenotipul CD34+ al TC sclerale pe care l-am evidențiat, fiind cunoscut faptul că celulele linei mielomonocitare exprimă CD34 <sup>49</sup>. În studiul meu am evidențiat expresia izolată a CD68 în TC sclerale, un fenotip ce poate indica un subset de celule progenitoare circulante, denumite celule multipotente derivate din monocite sau progenitori mezenchimali derivați din monocite, care se cunoaște că exprimă deasemenea CD34 și CD45 <sup>50</sup>. S-a comentat posibilitatea ca celulele CD34+, care secretă VEGF și angiopoietina-1 ar putea fi inductori ai diferențierii monocitelor spre linia endotelială <sup>51</sup>. Astfel de celule stromale CD34+ se comportă precum celule stem mezenchimale după ce pierd expresia CD34 și au rol în creșterea, maturarea și diferențierea celulelor învecinate <sup>52</sup>.

În micromedii stromale normale și reparatorii se găsesc celule stromale fuziforme care sunt denumite fibrocite circulante, ce exprimă diferiți markeri, CD34, CD44, CD45, endoglina,

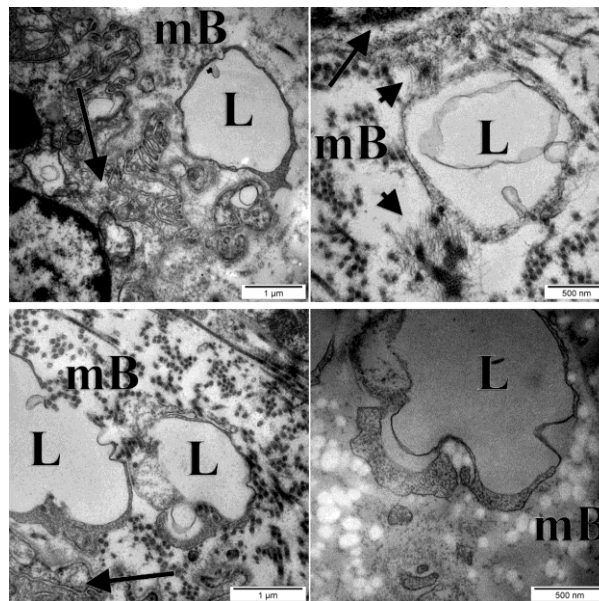
PDGFR- $\alpha$  și vimentină, având caracteristici morfologice și moleculare mixte, ale monocitelor, HSC și fibroblaștilor <sup>9</sup>, ceea ce susține ipoteza originii hematopoietice a acestora <sup>53-55</sup>. Fibrocitele CD34+ exprimă diferiți alți markeri, cum sunt și CD31 și CD13 <sup>49</sup>. Aceste fibrocite CD34+ au primit diferite nume, printre care și TC, comentându-se că probabil autorii respectivi nesesizând că se referă la același tip celular <sup>49</sup>.

## CERCETĂRI ULTRASTRUCTURALE ALE NIȘEI STROMALE COROIDIENE – LIMFATICELE COROIDEI

În prezent, limfaticele coroidiene sunt extrem de puțin documentate iar rezultatele existente sunt controversate <sup>56</sup>. Au fost aduse puține evidențe, la diferite specii, ale limfaticelor coroidiene iar structura limfatică sau alimfatică a coroidei la iepure este și aceasta controversată <sup>57,58</sup>. Am urmărit din aceste motive să explorez în microscopia electronică anatomia limfatică a coroidei. Pentru aceste cercetări am folosit patru iepuri adulți masculi (*Oryctolagus cuniculus*) cu greutate de 2,5 – 3 kg și vârste între 6 și 12 luni.

Am identificat cu acuratețe pe grile membrana Bruch interpusă între celulele epiteliale pigmentare ale retinei și stratul coriocardilar al coroidei. Imediat sub membrana bazală epitelială am pus în evidență limfatică inițială înglobată într-o matrice colagenică, prezentând lumene largi și neregulate, cu circumferințele având contur caracteristic de frunză de stejar. Aceste limfatică inițiale erau pline cu matrice omogenă, nu însă și colagen sau eritrocite. Am identificat la nivelul acestor limfatică inițiale vezicule de exocitoză. Limfaticele inițiale nu erau acoperite de lamine bazale și prezentau aparate fibrilare elastice de ancorare, realizate de filamente de ancorare înglobând insule de elastină. Celulele endoteliale ale limfaticelor inițiale din membrana Bruch a coroidei de iepure au prezentat deschideri largi care permiteau comunicarea dintre lumenele acestora și spațiul perilimfatic. În stratul coriocardilar am pus în evidență vase limfatică largi care au îndeplinit criteriile ultrastructurale de identificare a limfaticelor. Lumenele limfatică largi erau pline cu matrice limfatică non-colagenică și lipsită de eritrocite. Aceste vase avea lamina bazală discontinuă sau absentă, ceea ce a permis celulelor endoteliale respective să atașeze filamente de ancorare. În structura pereților limfatici nu am identificat pericite. Celulele limfangioendoteliale au prezentat interdigitații, imbricări și suprapuneri; deasemenea am pus în evidență joncțiuni strânse interendoteliale. Aceste celule au prezentat în citoplasme organite comune, precum mitrocondrii, reticul endoplasmic, ribozomi și polizomi. Au prezentat caveole subplasmalemale și vezicule de exocitoză. Deasemenea au prezentat ocazional fenestrații endoteliale închise prin diafragme.

În microscopia electronică de transmisie se identifică membrana Bruch (mB) imediat sub celulele epiteliale pigmentare ale retinei (săgeți). În membrana Bruch se află saci endoteliali limfatici (L) plini cu matrice densă non-colagenică și lipsiți de lamine bazale. Aceste limfatice inițiale au aspect caracteristic de frunză de stejar al circumferinței și sunt ancorați printr-un aparat fibrilar elastic format de fibrile de colagen și din elastină (vârfuri de săgeți).



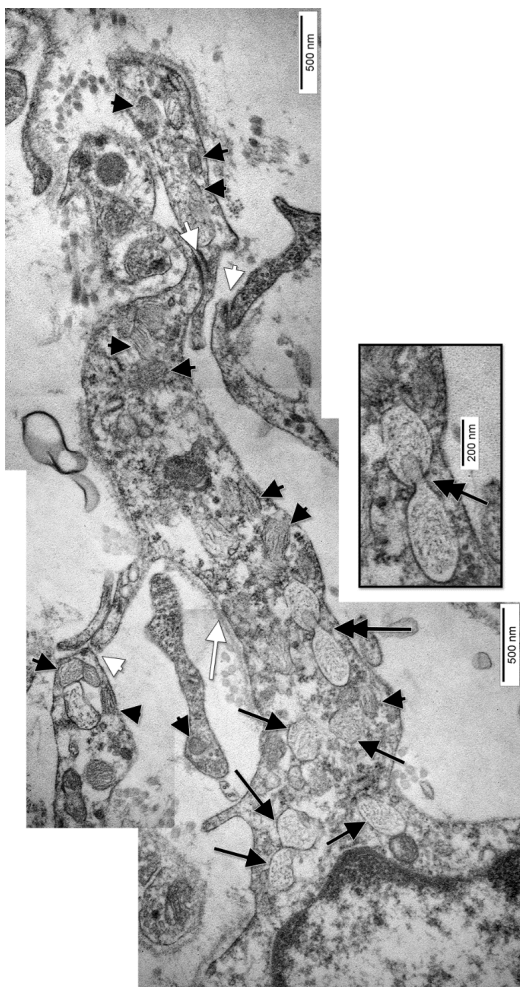
Koina și colab. (2015) studiază prin imunohistochimie și microscopie electronică limfaticile coroidiene la om <sup>59</sup>. Heindl și colab. (2015) contestă evidența limfaticelor coroidiene umane adusă de Koina și colab. (2015) <sup>60</sup>, la un an după ce Schroedl și colab. (2014) au publicat un Consens al detecției limfaticelor intraoculare prin imunohistochimie <sup>56</sup>. Este interesant că în același timp cu Koina și colab. (2015), grupul lui Heindl a publicat un studiu al markerilor limfatici la nivelul coroidei umane prin care au ajuns la concluzia că deși celule izolate au exprimat astfel de markeri, coroida nu conține vase limfatice clasice și astfel trebuie privită precum alimfatică <sup>61</sup>. Autorii din grupul lui Koina răspund <sup>62</sup> la criticile aduse de grupul lui Heindl și aduc în discuție faptul că nu trebuie anticipat că limfaticile au întotdeauna o morfologie clasică, invocând un studiu care demonstrase un sistem limfatic-like în creier, dependent de aquaporina 4. Acest studiu la care se face referire fusese realizat de Iliff și colab. (2012) care au definit sistemul „*glimfatic*”, o cale pancerebrală de transport al fluidelor care include influxul paraarterial de LCR subarahnoidian în interstițiul cerebral, urmat de clearance-ul fluidului interstițial prin vene de drenaj largi; faptul că această cale de drenaj LCR/lichid interstițial implică glia (astrocitele) prin transferul transastrocitar al apei, a dus la propunerea termenului specific respectiv al căii <sup>63</sup>. Glimfaticile drenează în limfaticile meningeale <sup>64-66</sup>. A fost de asemenea propusă ipoteza patogenezei glaucomului prin disfuncția căii glimfatică <sup>67</sup>.

## CERCETĂRI ULTRASTRUCTURALE ALE NIȘEI STROMALE A LAMINEI FUSCA

Luesma și colab. (2013) au identificat celule cu telopode în scleră și coroidă, la șoareci <sup>68</sup>, însă straturile de la joncțiunea sclerei cu coroida nu au fost evaluate în microscopia electronică de transmisie. Lamina fusca (LF) a fost descrisă fie precum stratul cel mai extern al

supracoroidei, fie ca stratul cel mai intern al sclerei și sunt cunoscute foarte puține lucruri despre aceasta <sup>69</sup>. Kelly și colab. (1983) au evaluat LF prin microscopie electronică de transmisie la hamsteri aurii și au descris o structură stratificată, alcătuită din câteva straturi de celule pigmentare acoperite de lamele fibroblastice externe <sup>70</sup>. Această morfologie face ca stratul fibroblastic extern al LF să adere la aspectul intern al stromei sclerale. Fibroblaștii din LF sunt interconectați strâns și pot fi utili pentru a izola interstițiul coroidian de fluidele circulante intra- și extraoculare <sup>71</sup>. În cadrul cercetărilor prin microscopie electronică de transmisie asupra globului ocular am urmărit să caracterizez ultrastructural și LF.

Pentru aceste cercetări am folosit cinci șobolani rasa Wistar (12 luni, 280-300 g).



**Lamina fusca la șobolan Wistar, stratul fibroblastic extern, microscopie electronică de transmisie. Este prezentată o celulă stromală cu lamină bazală discontinuă (săgeată albă), care conține corpi Weibel-Palade în diverse stadii de maturare (vârfuri de săgeți negre) și structuri veziculare (secretory pods) (săgeți negre). Acestea din urmă pot apare interdigitate (săgeată neagră cu vârf dublu, detaliu mărit digital în chenar). Celulele stromale învecinate conțin deasemenea corpi Weibel-Palade (vârfuri de săgeți negre) și se conectează prin diferite subtipuri de joncțiuni adherens (vârfuri de săgeți albe).**

Stroma sclerală a fost identificată cu acuratețe pe grile, la microscopul electronic. Această stromă sclerală a conținut fascicule din fibre de collagen precum și celule stromale cu prelungiri lungi, subțiri și moniliforme care au fost diagnosticate morfologic precum telopode. Stratul extern al LF era aplicat pe aspectul intern al stromei sclerale și a fost populat abundant de celule TC-like ce proiectau telopode. Printre aceste celule am identificat microvase acoperite de lamină bazală endotelială, respectiv venule și capilare cu endotelii fenestrate. Am pus

deasemenea în evidență pericite microvasculare, mai puțin însă în capilarele fenestrate. Din punct de vedere anatomic/topografic, celulele TC-like ale LF au fost celule perivasculare. Identificarea anatomică precum țesut coroidian a fost respinsă deoarece pe grile nu am evidențiat celule pigmentare. Celulele TC-like fie au fost complet lipsite de lamină bazală fie au prezentat lamină bazală incompletă sau discontinuă. Celulele TC-like din LF au prezentat adeziuni intercelulare focale, precum și contacte strânse între telopode. Am pus în evidență vezicule de exocitoză asociate cu celulele TC-like, precum și rare caveole subplasmalemale. Am găsit frecvent în celulele TC-like ale LF corpi Weibel-Palade care se aflau în diferite stadii de maturare, după cum a rezultat din densitatea variabilă a matricei acestora, clară sau întunecată, din cantitatea de tubuli conținuți și de prezența unui înveliș de clatrină. Acești corpi Weibel-Palade au fost secționati longitudinal, prezentând aspect caracteristic de trabuc, oblic, sau transversal. Pe secțiunile transversale conținutul de tubuli al corpurilor Weibel-Palade a fost distribuit uniform. În LF am identificat, rar, structuri veziculare (*secretory pods*) care erau strâns asociate cu corpii Weibel-Palade, conțineau o matrice dantelată și erau ocazional intricate; membranele lor limitante erau unite cu corpi în formă de bastonaș având înveliș de clatrină, ceea ce a determinat o morfologie în rachetă de tenis, asemănătoare granulelor Birbeck. Dimensiunile corpurilor Weibel-Palade și ale structurilor ce imitau granulele Birbeck au fost identice.

Ochiul este un situs anatomic cu privilegii imune, deoarece grefele rezistă în absența imunosupresiei, ceea ce se datorează în parte lipsei unui sistem limfatic ocular clasic<sup>56</sup>. Imediat extern de tunica coriocardică au fost puse în evidență macrofage CD68+ și LYVE-1+ (receptor endotelial vascular limfatic) ce formează structuri reticulare și prezintă morfologie TC-like<sup>59</sup>. Markerul limfatic LYVE-1 este deasemenea exprimat și în celulele liniei mielomonocitare<sup>72</sup>. Astfel, celule derivate din măduva osoasă pot imita celulele endoteliale limfatice. Telocitele pot exprima CD34, care este marker endotelial, mezenchimal dar și hematopoietic, precum și conexina 43<sup>73</sup>, care este o proteină de joncțiune gap ce este exprimată în celulele endoteliale limfatice<sup>74</sup>. Nu am pus în evidență macrofage în stratul extern al LF însă am obiectivat faptul că celulele fibroblastice de la acest nivel au morfologie telocitară. Telocitele au caracteristici ultrastructurale similare cu cele ale celulelor endoteliale limfatice, inclusiv lamina bazală absentă sau discontinuă<sup>3</sup>, însă nu au fost comparate cu astfel de celule endoteliale în studii precedente orientate specific spre TC. Cu toate acestea, nu am evidențiat filamente de ancorare ca identificatori morfologici ai celulelor endoteliale limfatice, și nici matrice limfatică intraluminală, ca în capilarele limfatice<sup>75</sup>. Mai mult, conținutul consistent de corpi Weibel-

Palade ar putea indica faptul că celulele TC-like din LF aparțin liniei endoteliale sau sunt descendenți mielomonocitari, după cum a mai fost comunicat <sup>76,77</sup>. În ceea ce privește celulele endoteliale limfatice sunt diverse opinii privind corpii Weibel-Palade din citoplasma acestora, sunt studii care indică faptul că limfaticele oculare sunt lipsite de corpi Weibel-Palade <sup>59</sup> dar și studii care îi identifică în celulele endoteliale limfatice <sup>78</sup>. În ceea ce privește microcirculația limfatică oculară, sunt cercetări care susțin faptul că în coroidă ar exista un sistem limfatic-like <sup>79</sup>. Corprii Weibel-Palade maturi conțin CD63 <sup>80</sup>. Este interesant de observat în acest context faptul că au fost raportate celule cu structura și localizarea TC care exprimau CD63 <sup>81</sup>. În discuțiile respective nu s-a pus problema că CD63 ar fi marker de corpi Weibel-Palade <sup>75</sup>. Proteina de membrană P-selectina prezentă în corpii Weibel-Palade are un rol principal în inflamații <sup>82,83</sup> și este primul receptor care intervine în recrutarea leucocitelor din plasmă la nivel endotelial <sup>80</sup>. Deși sunt mecanisme diferite prin care CD63 și P-selectina sunt recrutate în corpii Weibel-Palade <sup>83</sup>, pierderea expresiei CD63 este similară fenotipic pierderii expresiei P-selectinei și conduce la reducerea recrutării endoteliale a leucocitelor <sup>80</sup>. Se poate astfel lua în considerare faptul că P-selectina, stocată în corpi Weibel-Palade din celulele TC-like ale LF ar putea avea rol în reparațiile endoteliale, recrutând leucocite din vasele LF <sup>75</sup>. Acest mecanism ar permite recrutarea și diapedeza leucocitelor în țesutul conjunctiv <sup>75</sup>. Granulele Birbeck-like au fost deasemenea puse în evidență în celule dendritice vasculare din aorta aterosclerotică, ceea ce a sugerat o relație apropiată între aceste celule dendritice și celulele Langerhans <sup>84</sup>. Celulele dendritice ale aortei au fost marcate cu un anticorp pentru un antigen (Lag) specific celulelor Langerhans și care nu marchează celule ale liniei mielomonocitare <sup>84</sup>. Astfel, nu pot face legătura între granulele Birbeck-like din progenitori endoteliali și cele din studiul meu însă am în vedere că astfel de granule Birbeck-like endoteliale au dimensiunea mai mică decât cea a corpiilor Weibel-Palade <sup>85</sup>. În studiul meu structurile respective au avut dimensiuni similare, ceea ce vine în acord cu alte cercetări care au găsit corpi Weibel-Palade fuzionați cu structurile veziculare (*secretory pods*) în cursul exocitozei factorului von Willebrand <sup>86</sup>.

## CERCETĂRI IMUNOHISTOCHIMICE ȘI ULTRASTRUCTURALE ALE NIȘEI STROMALE LACRIMALE

Glanda lacrimală este o componentă esențială a unității funcționale lacrimale la om iar orice alterare a acesteia poate conduce la sindromul de ochi uscat care, în prezent, nu are decât un tratament simptomatic și paleativ <sup>87</sup>. Unitatea funcțională lacrimală controlează secreția componentelor principale ale filmului lacrimal și menține stabilitatea acestuia, transparența corneei și calitatea imaginii proiectate pe retină <sup>87</sup>. Sindromul de ochi uscat este o afecțiune

multifactorială a lacrimilor și a suprafeței oculare care conduce la simptome de disconfort, tulburări vizuale și la instabilitatea filmului lacrimal cu potențiale daune ale suprafeței oculare, fiind însoțită de o creștere a osmolarității filmului lacrimal și de inflamația suprafeței oculare, conform International Dry Eye Workshop 2007 <sup>87</sup>. Din aceste fundamentări reiese importanța cercetărilor privind potențialul regenerativ intrinsec al glandei lacrimale pe care mi-am propus să îl apreciez prin imunohistochimie și microscopie electronică de transmisie.

Am utilizat glande lacrimale umane adulte obținute prin disecții anatomice la cadavre umane adulte. Pentru microscopie electronică de transmisie a glandei lacrimale am folosit cinci șobolani Wistar adulți masculi și doi iepuri adulți masculi (*Oryctolagus cuniculus*). Am aplicat markeri (CD10, CD34, CD117/c-kit, CD146,  $\alpha$ -SMA, Ki67, citokeratine) în imunohistochimia la parafină.

Am evidențiat expresia pozitivă a CD146 în celule endoteliale ale microvaselor din stroma glandei lacrimale și, rar, în celule mioepiteliale și în celule musculare netede vasculare. CD117-c-kit a prezentat expresie pozitivă membranară la nivelul celulelor epiteliale secretorii acinare, dar nu toți acinii au prezentat exclusiv acest fenotip imunohistochimic. Deasemenea, celule mioepiteliale au exprimat CD117/c-kit, precum și rare celule epiteliale conjunctivale. Expresia c-kit a fost prezentă și în celulele musculare netede vasculare ale vaselor de la nivelul stromei glandei lacrimale. La nivelul epiteliului conjunctival o serie de celule au exprimat markerul de proliferare Ki67 iar epiteliul respectiv a exprimat și citokeratina 18. Celulele musculare netede vasculare au exprimat  $\alpha$ -SMA. Expresia Ki67 a fost rară în celule mioepiteliale. Acestea din urmă au exprimat citokeratina 5 și, ocazional, lanțul greu al miozinei mușchiului neted. Citokeratinele 7 și 18 au fost consistent exprimate în celulele epiteliale ale acinilor glandular dar expresia acestor markeri epiteliali a fost pozitivă și în celule stromale izolate. CD10 și CD34 au prezentat expresie pozitivă la nivelul stromei unde au marcat tubi endoteliali cu lumene clare atașând structuri cu morfologie telopodială care au fost interpretate ca false telopode determinate de secțiuni tangențiale ale pereților endoteliali. Pe grilele cu secțiuni ultrafine am identificat adecvat epiteliul glandular, inclusiv celulele mioepiteliale glandulare, și stroma glandei lacrimale cu conținutul celular, microvascular și neural al acesteia. Tubii endoteliali au prezentat ocazional proiecții filopodiale intraluminale ale celulelor endoteliale. Am remarcat abundența celulelor liniei mieloide, macrofage și monocite, în stroma glandulară lacrimală. La ambele specii documentate în microscopia electronică, iepure și șobolan, am pus în evidență pe secțiunile ultrafine telocite și telopode subepiteliale, despărțite de celulele mioepiteliale acinare printr-un strat subțire de colagen și lamina bazală epitelială.

Astfel de telocite și telopode nu au prezentat lamină bazală și, în plus, de regulă doar un flanc, adepitelial, venea în contact cu fibrele de colagen. La nivelul podoamelor am decelat prezența unor structuri rotunde, electronodense, cu conținut tubular, care le-am indicat precum corpi Weibel-Palade-like. Telopodele au prezentat deasemenea caveole subplasmalemale iar la nivelul citoplasmei filamentele intermediare au apărut precum componente constante de citoschelet. La nivelul stromei glandulare am identificat limfatice inițiale cu lumen larg și nuclei protruzivi intraluminal ai celulelor endoteliale respective, lipsite de lamină bazală. Deasemenea am obținut evidența în microscopia electronică de transmisie de telopode care tapetau asimetric fascicule de colagen, delimitând spații interstițiale prelinfatice. Pe preparatele de la ambele specii investigate în microscopia electronică de transmisie am pus în evidență celule stromale puternic vacuolizate. Vacuolele respective erau pline cu o matrice laxă non-colagenică. La șobolan, anvelopa nucleară a acestor celule vacuolizate, probabil implicate în formare de lumen prin vasculo- sau limfvasculogeneză, a apărut distinctă de învelișul vacuolar. În glanda lacrimală la iepure am întâlnit elemente de anatomie celulară particulare, și anume: vacuolizarea spațiului perinuclear dintre membranele internă și externă ale anvelopei nucleare, cu protruzii intracitoplasmice (diverticuli ai spațiului perinuclear) și comunicarea directă a nucleoplasmei prin por nuclear, cu stroma pericelulară. Vacuolele intracelulare ale spațiului perinuclear, largi, erau învelite de membrana nucleară externă dublată de învelișul ribozomal caracteristic și conțineau porțiuni citoplasmice, cu același înveliș, probabil determinate de planul secțiunii ultrafine. Mai mult, astfel de vacuole largi ale spațiului perinuclear au prezentat, extrinsec și intrinsec, vacuole citoplasmice, ultimele probabil determinate de planul secțiunii. Vacuolizarea centrală a celulei prin spații perinucleare era dublată la exterior de vacuole citoplasmice. Este interesant de notat faptul că învelișul prin membrană nucleară externă al vacuolelor derivate din spațiul perinuclear prezenta porțiuni în care nu era dublat: (a) fie doar de ribozomi; (b) nici de ribozomi și nici de citoplasmă, căpătând astfel topografie plasmalemală. Este de asemenea important de notat că au fost segmente ale membranei nucleare externe care la nivelul spațiului perinuclear nu erau dublate de învelișul de ribozomi liberi însă diverticuli spațiului perinuclear de la acel nivel prezentau, atipic, membrană nucleară externă dublată de ribozomi liberi. Astfel de vacuole largi cu înveliș dublat de ribozomi liberi, deci provenind din membrana nucleară externă, au mai apărut pe grile iar în situațiile respective celulele au părut a prezenta filamente de ancorare specifice limfaticelor. În pliuri ale acestor vacuole derivate din lumenul anvelopei nucleare am identificat mitocondrii. Este important de notat aici că în stroma glandulară am identificat și structuri celulare cu lumene/vacuole, perivasculare sau învecinate

macrofagelor, cu matrice omogenă ocupând spațiile respective; la nivelul acestora spațiul luminal era tapetat de membrane simple și nu de membrane dublate de ribozomi.

Spațiul interstițial este principala sursă de limfă și un compartiment principal de fluide ale organismului însă existența, localizarea și structura spațiilor largi intertisulare și intratisulare este vag descrisă, ceea ce are importanță în raport cu definirea spațiului interstițial precum spațiu anatomic distinct <sup>88</sup>. Benias și colab. (2018) au pus în evidență în microscopia electronică de transmisie faptul că fasciculele de colagen sunt tapetate doar pe un flanc de celule subțiri, aplatizate, fusiforme în secțiunile transversale, cu citoplasmă puțină și nuclei alungiți, pe care le-au denumit celule fibroblast-like – acestea pot fi însă considerate morfologic precum telocite, după cum reiese din figura prezentată de autorii respectivi <sup>88</sup>. Gausas și colab. (1999) și Sherman și colab. (1993) au considerat în publicațiile lor faptul că au adus prima evidență a limfaticelor la nivelul glandei lacrimale, cele două studii fiind realizate de același grup de cercetători <sup>89,90</sup>. În 1993 Sherman și colab. au lucrat pe material biologic de la primate prin histochimie enzimatică în microscopie optică și electronică <sup>89</sup>. Aceștia discută în background-ul studiului publicat faptul că deși la acel moment canale limfatic veritabile fuseseră descrise în pleoape și în conjunctivă, existența limfaticelor endoteliale orbitale este controversată, unii autori fiind fermi în a indica inexistența acestora iar alții menționând succint drenajul limfatic al glandei lacrimale, fără însă a oferi detalii <sup>89</sup>. Este citat un studiu al lui Caplan (1974) privind sistemul limfatic al glandei lacrimale însă autorii apreciază că evidența limfaticelor respective nu este sustenabilă deoarece tehnicile de injectare folosite au fost nespecifice <sup>89</sup>.

Am identificat în microscopia electronică de transmisie celule stromale cu vacuole atât citoplasmatică cât și perinucleare. Prezența vacuolelor citoplasmatică poate indica formarea de noi tubi endoteliali, însă nu poate decela între endoteliul vascular și cel limfatic. Morfogeneza tubilor endoteliali și mecanismele de formare a lumenelor sunt încă neclare <sup>91</sup>. Vacuolele endoteliale au un rol important în formarea unor astfel de lumene, fiind descris în culturi de celule endoteliale faptul că se formează vacuole longitudinale care par a fi extrudate și conectate de la o celulă endotelială la următoarea; intervin deopotrivă fuziunea intracelulară și cea intercelulară a vacuolelor respective <sup>91</sup>.

Am identificat pe grile comunicarea directă a nucleoplasmei cu spațiul pericelular, pe calea porilor nucleari și, în continuare, prin anvelopa nucleară (membranele externă și internă și spațiul perinuclear sau lumenul anvelopei nucleare dintre acestea), prin citoplasmă și prin plasmalemă. Această morfologie nu are corelație identificabilă în referențialul disponibil. Se cunoaște faptul că anvelopa nucleară (AN) cuprinde două membrane, externă și internă,

separate printr-un spațiu luminal (lumenul AN) care este continuu cu cisternele reticulului endoplasmic rugos <sup>92</sup>. Din acest considerent structural bine cunoscut rezultă că diverticuli lumenului AN pe care i-am evidențiat ar putea fi la fel de bine diagnosticați morfologic precum cisterne dilatate ale reticulului endoplasmic rugos; ceea ce nu corespunde descrierilor uzuale este lipsa ribozomilor de la nivelul membranei externe a AN dar prezența lor la nivelul acelor diverticuli. Membranele externă și internă ale AN fuzionează la nivelul situsurilor complexelor nucleare care mediază transportul între citoplasmă și nucleoplasmă <sup>92</sup>. Membrana nucleară internă conține specific un set de proteine integrale de membrană care conectează AN la cromatină prin interacțiune directă sau indirectă <sup>92</sup>. Lamina nucleară, localizată sub membrana nucleară internă, este conectată la citoscheletul citoplasmatic prin complexul LINC format din proteinele Nesprin și SUN din, respectiv, membrana nucleară externă și cea internă; complexul LINC traversează lumenul AN <sup>92</sup>.

Datorită conexiunii lumenului AN cu cisternele reticulului endoplasmic rugos, acesta din urmă poate fi definit precum o rețea interconectată de membrane, cu compartimente structurale diferite, din care fac parte reticulul endoplasmic rugos cortical sau periferic și reticulul endoplasmic rugos perinuclear (sau AN), care înconjoară nucleul – deși cele două compartimente au continuitate între ele și lumen comun, au proprietăți morfofuncționale individuale <sup>93</sup>. Membrana nucleară externă este acoperită cu ribozomi însă conține situsuri de inserție la citoschelet cu rol în poziționarea nucleului <sup>93</sup> – probabil zonele de membrană nucleară externă pe care le-am identificat ca fiind lipsite de ribozomi au o funcție de aderență la citozol a vacuolelor lumenului AN pe care le-am identificat.

S-a discutat faptul că în nucleele celulelor plantelor și animalelor sunt invaginări ale AN care au un rol posibil în transportul nucleocitoplasmic și reglarea genică <sup>94</sup>. Nici acest model nu corespunde însă vacuolizării pe seama membranei nucleare externe pe care am identificat-o cu acuratețe. Dar, am identificat studii care descriu formarea de vezicule și de corpi multiveziculari din membrana nucleară externă <sup>95</sup>, precum și din membrana nucleară internă, ultimii fiind localizați intranuclear <sup>96</sup>. Aceștia sunt diferiți de endozomii tardivi denumiți deasemenea corpi multiveziculari, organite delimitate prin membrane ce conțin numeroase vezicule intraluminale care încapsulează transportul destinat degradării în lizozomi <sup>97</sup>. Conținutul veziculelor intraluminale poate fi eliberat în spațiul interstițial prin exozomi care rezultă după fuziunea corpurilor multiveziculari citozolici cu plasmalema <sup>97</sup>. Un studiu realizat prin microscopie electronică de transmisie a identificat corpi denși tapetați de membrane, cu conținut granular, localizați în lumenul AN <sup>98</sup>, comparabili morfologic cu cei pe care i-am pus în evidență în

stromal glandulară lacrimală. Au fost deasemenea identificate protruzii intracitoplasmice ale AN <sup>98</sup>. Autorii discută faptul că asocierea strânsă dintre ribozomi și reticulul endoplasmic cu AN face posibil ca lumenul AN să poată servi ca situs de depozitare sau stație în cursul translocării proteinelor dinspre nucleu spre citoplasmă, sau în sens invers <sup>98</sup>. Se discută deasemenea faptul că acei corpi denși din lumenul AN ar putea reprezenta extruzii de material nucleolar din nucleu în citoplasmă <sup>98</sup>. Vacuole largi perinucleare au fost identificate și în celulele epiteliale <sup>99</sup>. O morfologie similară celei identificate de mine este cea a celulelor renale mezangiale sau celulele polkissen ale lui Zimmermann, care prezintă aceeași caracteristică neobișnuită – saci nucleari polari (vacuolizări), cu ribozomi atașați, precum și vezicule încărcate cu ribozomi <sup>100</sup>. S-a observat că dimensiunea și numărul de astfel de saci nucleari se schimbă cu nivelurile de renină plasmatică și nivelul de sodiu, sacii nucleari se reduc odată cu reducerea reninei și cresc odată cu creșterea reninei (nivelul reninei plasmatică crește în diete sărate) <sup>100</sup>. Din această perspectivă este rezonabil de speculat că sacii nucleari ar putea fi markeri ultrastructurali ai deshidratării, deci un potențial pozitiv pentru stimularea prin renină a hidratării și deci de creștere a secreției lacrimale și reducere a posibilității de apariție a sindromului de ochi uscat. Astfel, identificarea de saci nucleari în stroma glandulară lacrimală poate fi un marker ultrastructural al homeostaziei glandulare.

## CONCLUZII

1. Originea posibilă a telocitelor sclerale este din epiteliul conjunctival prin transformare epitelial-mezenchimală. Din această abordare, conjunctiva reprezintă una dintre nișele stem care alimentează sclera stromală, asigură turnoverul celulelor stromale și are capacitatea de a interveni atât în răspunsurile imune ale sclerei cât și în procesele regenerative și reparatorii sclerale.
2. Expresia epitelială și stromală la nivelul conjunctivei și sclerei a endoglinei poate reprezenta un element restrictiv al proceselor de transformare endotelial/epitelial-mezenchimală dar care potențează celulele liniei endoteliale. Acestea însă trebuie considerate atent, deoarece expresia epitelială și stromală a CD45, markerul hematopoietic și leucocitar, implică, posibil, și mecanisme imune în remodelarea locală a țesuturilor.

3. Telocitele CD34+/CD45+/CD105+/CD68± sclerale pot fi privite precum celule ale unei populații stem/progenitoare colaterale, însă rezultate mai degrabă prin procese de transformare epitelial-mezenchimală și endotelial-mezenchimală.
4. Telocitele coroidiene conțin corpi Weibel-Palade, fiind însă diferite de celulele endoteliale vasculare, ceea ce a orientat diagnosticul lor ca celule endoteliale limfatice, corelabil cu prezența cunoscută a celulelor cu fenotip molecular limfatic într-o coroidă cunoscută precum alimfatică.
5. Identificarea corpilor Weibel-Palade în celule cu fenotip molecular disputat, precum celulele limfatice ale coroidei, poate oferi precizări clare privind linia celulară investigată.
6. Lamina fusca ar putea reprezenta un rezervor de celule endoteliale progenitoare care intervin în procesele de neovascularizație coroidiană. Trebuie realizate experimente care să identifice dacă celulele conținând corpi Weibel-Palade din lamina fusca intervin în vasculogeneza coroidiană, sau în limfangiogeneză, sau în ambele. Lamina fusca poate fi considerată un situs de depozitare a precursorilor endoteliali cu telopode.
7. Sunt foarte puține studii ultrastructurale, incluzând și cercetările mele, care au documentat limfaticele inițiale la nivelul membranei Bruch, ceea ce recomandă ca rezultatele comunicate să fie apreciate corespunzător și detaliate prin cercetări viitoare. Astfel, vor rezulta clarificări care să susțină sau nu existența unei circulații limfatice coroidiene.
8. Cercetările de anatomie moleculară la nivelul glandei lacrimale arată faptul că celulele mioepiteliale joacă un rol de pivot între nișa epitelială și nișa stromală, cele două nișe suplinindu-se reciproc prin transdiferențiere cu dublu sens, epitelial-mezenchimală și mezenchimal-epitelială. Evidențele obținute aici *in situ* trebuie însă întărite prin cercetări *in vitro* care să urmărească expresia citokeratinelor asociată fenotipului molecular stem/progenitor al liniilor celulare specifice.
9. Telocitele subepiteliale lacrimale reprezintă un subset celular al stromei lacrimale care poate realiza, precum în alte localizări subepiteliale, un rol important în homeostazia morfofuncțională a nișelor stem lacrimale.
10. Identificarea de saci nucleari tapetați de ribozomi și de vacuole încărcate cu ribozomi în celule din stroma glandulară lacrimală poate fi un marker ultrastructural al homeostaziei glandulare.

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Harrison SA, Mondino BJ, Mayer FJ. Scleral fibroblasts. Human leukocyte antigen expression and complement production. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:2412-9.
2. Petrea CE, Craitoiu S, Vrapciu AD, Manoiu VS, Rusu MC. The telopode- and filopode-projecting heterogeneous stromal cells of the human sclera niche. *Ann Anat* 2018.
3. Popescu LM, Faussonne-Pellegrini MS. TELOCYTES - a case of serendipity: the winding way from Interstitial Cells of Cajal (ICC), via Interstitial Cajal-Like Cells (ICLC) to TELOCYTES. *J Cell Mol Med* 2010;14:729-40.
4. Hisatomi T, Sonoda KH, Ishikawa F, et al. Identification of resident and inflammatory bone marrow derived cells in the sclera by bone marrow and haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Ophthalmol* 2007;91:520-6.
5. van Meeteren LA, ten Dijke P. Regulation of endothelial cell plasticity by TGF-beta. *Cell Tissue Res* 2012;347:177-86.
6. Rusu MC, Nicolescu MI, Jianu AM, Lighezan R, Manoiu VS, Paduraru D. Esophageal telocytes and hybrid morphologies. *Cell Biol Int* 2012;36:1079-88.
7. Derjac-Arama A-I, Sarafoleanu C, Rusu MC, Vereanu A. Schneiderian membrane adult vasculogenesis evaluated by CD31 and CD34 expression and morphological arrangement. *Romanian Journal of Rhinology* 2015;5:225-8.
8. Ilie CA, Rusu MC, Didilescu AC, Motoc AG, Mogoanta L. Embryonic hematopoietic stem cells and interstitial Cajal cells in the hindgut of late stage human embryos: evidence and hypotheses. *Ann Anat* 2015;200:24-9.
9. Rusu MC, Didilescu AC, Stanescu R, et al. The mandibular ridge oral mucosa model of stromal influences on the endothelial tip cells: an immunohistochemical and TEM study. *Anat Rec (Hoboken)* 2013;296:350-63.
10. Rusu MC, Motoc AG, Pop F, Folescu R. Sprouting angiogenesis in human midterm uterus and fallopian tube is guided by endothelial tip cells. *Anat Sci Int* 2013;88:25-30.
11. Stanescu R, Didilescu AC, Jianu AM, Rusu MC. Angiogenesis in the reparatory mucosa of the mandibular edentulous ridge is driven by endothelial tip cells. *Rom J Morphol Embryol* 2012;53:375-8.
12. Rusu MC, Poalelungi CV, Vrapciu AD, et al. Endocardial tip cells in the human embryo - facts and hypotheses. *PLoS One* 2015;10:e0115853.
13. Manea CM, Rusu MC, Constantin D, Manoiu VM, Moldovan L, Jianu AM. Ultrastructural features of human adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells. *Rom J Morphol Embryol* 2014;55:1363-9.
14. Gao Q, Goodman JM. The lipid droplet-a well-connected organelle. *Front Cell Dev Biol* 2015;3:49.
15. Hillman N, Hillman R. Ultrastructural studies of tw32/tw32 mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol* 1975;33:685-95.
16. Layerenza JP, Gonzalez P, Garcia de Bravo MM, Polo MP, Sisti MS, Ves-Losada A. Nuclear lipid droplets: a novel nuclear domain. *Biochim Biophys Acta* 2013;1831:327-40.
17. Leduc EH, Wilson JW. An electron microscope study of intranuclear inclusions in mouse liver and hepatoma. *J Biophys Biochem Cytol* 1959;6:427-30.
18. Uzbekov R, Roingeard P. Nuclear lipid droplets identified by electron microscopy of serial sections. *BMC Res Notes* 2013;6:386.
19. Malatesta M, Zancanaro C, Martin TE, et al. Cytochemical and immunocytochemical characterization of nuclear bodies during hibernation. *Eur J Cell Biol* 1994;65:82-93.
20. Malatesta M, Cardinali A, Battistelli S, et al. Nuclear bodies are usual constituents in tissues of hibernating dormice. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 1999;254:389-95.
21. Grande MA, van der Kraan I, van Steensel B, et al. PML-containing nuclear bodies: their spatial distribution in relation to other nuclear components. *J Cell Biochem* 1996;63:280-91.
22. Dellaire G, Bazett-Jones DP. PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *Bioessays* 2004;26:963-77.
23. Bernardi R, Pandolfi PP. Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:1006-16.
24. Ohsaki Y, Kawai T, Yoshikawa Y, Cheng J, Jokitalo E, Fujimoto T. PML isoform II plays a critical role in nuclear lipid droplet formation. *J Cell Biol* 2016;212:29-38.
25. Farese RV, Jr., Walther TC. Lipid droplets go nuclear. *J Cell Biol* 2016;212:7-8.
26. Dahle O, Bakke O, Gabrielsen OS. c-Myb associates with PML in nuclear bodies in hematopoietic cells. *Exp Cell Res* 2004;297:118-26.
27. Lallemand-Breitenbach V, de The H. Hematopoietic stem cells burn fat to prevent exhaustion. *Cell Stem Cell* 2012;11:447-9.
28. Ito K, Carracedo A, Weiss D, et al. A PML-PPAR-delta pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Med* 2012;18:1350-8.
29. Poukens V, Glasgow BJ, Demer JL. Nonvascular contractile cells in sclera and choroid of humans and monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:1765-74.
30. Schmitz G, Muller G. Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids. *J Lipid Res* 1991;32:1539-70.

31. Qi G, Lin M, Xu M, Manole CG, Wang X, Zhu T. Telocytes in the human kidney cortex. *J Cell Mol Med* 2012;16:3116-22.
32. Raymond AA, Gonzalez de Peredo A, Stella A, et al. Lamellar bodies of human epidermis: proteomics characterization by high throughput mass spectrometry and possible involvement of CLIP-170 in their trafficking/secretion. *Mol Cell Proteomics* 2008;7:2151-75.
33. Rusu MC, Manoiu VS, Popescu VM, Ciuluvica RC. Endothelial progenitor cells populate the stromal stem niche of tympanum. *Folia Morphol (Warsz)* 2017.
34. Weibel ER. Fifty years of Weibel-Palade bodies: the discovery and early history of an enigmatic organelle of endothelial cells. *J Thromb Haemost* 2012;10:979-84.
35. van Buul-Wortelboer MF, Brinkman HJ, Reinders JH, van Aken WG, van Mourik JA. Polar secretion of von Willebrand factor by endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1989;1011:129-33.
36. Bouwens EA, Mourik MJ, van den Biggelaar M, et al. Factor VIII alters tubular organization and functional properties of von Willebrand factor stored in Weibel-Palade bodies. *Blood* 2011;118:5947-56.
37. Cramer EM, Meyer D, le Menn R, Breton-Gorius J. Eccentric localization of von Willebrand factor in an internal structure of platelet alpha-granule resembling that of Weibel-Palade bodies. *Blood* 1985;66:710-3.
38. Cramer EM, Vainchenker W, Vinci G, Guichard J, Breton-Gorius J. Gray platelet syndrome: immunoelectron microscopic localization of fibrinogen and von Willebrand factor in platelets and megakaryocytes. *Blood* 1985;66:1309-16.
39. Hatzopoulos AK, Folkman J, Vasile E, Eiselen GK, Rosenberg RD. Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from mouse embryos. *Development* 1998;125:1457-68.
40. Quesenberry PJ, Becker PS. Stem cell homing: rolling, crawling, and nesting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:15155-7.
41. von Hundelshausen P, Weber C. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res* 2007;100:27-40.
42. Frenette PS, Subbarao S, Mazo IB, von Andrian UH, Wagner DD. Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:14423-8.
43. Morrell CN, Aggrey AA, Chapman LM, Modjeski KL. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood* 2014;123:2759-67.
44. Trzeciak-Ryczek A, Tokarz-Deptula B, Deptula W. Platelets--an important element of the immune system. *Pol J Vet Sci* 2013;16:407-13.
45. Speth C, Loffler J, Krappmann S, Lass-Flörl C, Rambach G. Platelets as immune cells in infectious diseases. *Future Microbiol* 2013;8:1431-51.
46. Schlereth SL, Kremers S, SchrodL F, Cursiefen C, Heindl LM. Characterization of Antigen-Presenting Macrophages and Dendritic Cells in the Healthy Human Sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016;57:4878-85.
47. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Garcia MP, et al. Uptake and intracytoplasmic storage of pigmented particles by human CD34+ stromal cells/telocytes: endocytic property of telocytes. *J Cell Mol Med* 2014;18:2478-87.
48. Tsai CL, Wu PC, Fini ME, Shi S. Identification of multipotent stem/progenitor cells in murine sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:5481-7.
49. Barth PJ, Westhoff CC. CD34+ fibrocytes: morphology, histogenesis and function. *Curr Stem Cell Res Ther* 2007;2:221-7.
50. Brunasso AM, Massone C. Update on the pathogenesis of Scleroderma: focus on circulating progenitor cells. *F1000Res* 2016;5.
51. Schatteman GC, Awad O. Hemangioblasts, angioblasts, and adult endothelial cell progenitors. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004;276:13-21.
52. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Garcia MP, et al. CD34+ stromal cells/fibroblasts/fibrocytes/telocytes as a tissue reserve and a principal source of mesenchymal cells. Location, morphology, function and role in pathology. *Histol Histopathol* 2014;29:831-70.
53. Ogawa M, LaRue AC, Mehrotra M. Plasticity of hematopoietic stem cells. *Best Pract Res Clin Haematol* 2015;28:73-80.
54. Ebihara Y, Masuya M, Larue AC, et al. Hematopoietic origins of fibroblasts: II. In vitro studies of fibroblasts, CFU-F, and fibrocytes. *Exp Hematol* 2006;34:219-29.
55. LaRue AC, Masuya M, Ebihara Y, et al. Hematopoietic origins of fibroblasts: I. In vivo studies of fibroblasts associated with solid tumors. *Exp Hematol* 2006;34:208-18.
56. Schroedl F, Kaser-Eichberger A, Schlereth SL, et al. Consensus statement on the immunohistochemical detection of ocular lymphatic vessels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55:6440-2.
57. Gomez DG, Manzo RP, Fenstermacher JD, Potts DG. Cerebrospinal fluid absorption in the rabbit. Optic pathways. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1988;226:1-7.
58. Junghans BM, Crewther SG, Crewther DP, Pirie B. Lymphatic sinusoids exist in chick but not in rabbit choroid. *Aust N Z J Ophthalmol* 1997;25 Suppl 1:S103-5.
59. Koina ME, Baxter L, Adamson SJ, et al. Evidence for lymphatics in the developing and adult human choroid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56:1310-27.
60. Heindl LM, Kaser-Eichberger A, Schlereth SL, et al. Sufficient Evidence for Lymphatics in the Developing and Adult Human Choroid? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56:6709-10.

61. Schrodli F, Kaser-Eichberger A, Trost A, et al. Lymphatic Markers in the Adult Human Choroid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56:7406-16.
62. Chan-Ling T, Koina ME, Arfuso F, et al. Author Response: Sufficient Evidence for Lymphatics in the Developing and Adult Human Choroid? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56:6711-3.
63. Iliff JJ, Wang M, Liao Y, et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid beta. *Sci Transl Med* 2012;4:147ra11.
64. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* 2015;523:337-41.
65. Louveau A, Plog BA, Antila S, Alitalo K, Nedergaard M, Kipnis J. Understanding the functions and relationships of the glymphatic system and meningeal lymphatics. *J Clin Invest* 2017;127:3210-9.
66. Tarasoff-Conway JM, Carare RO, Osorio RS, et al. Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 2015;11:457-70.
67. Wostyn P, Van Dam D, Audenaert K, Killer HE, De Deyn PP, De Groot V. A new glaucoma hypothesis: a role of glymphatic system dysfunction. *Fluids Barriers CNS* 2015;12:16.
68. Luesma MJ, Gherghiceanu M, Popescu LM. Telocytes and stem cells in limbus and uvea of mouse eye. *J Cell Mol Med* 2013;17:1016-24.
69. Nickla DL, Wallman J. The multifunctional choroid. *Prog Retin Eye Res* 2010;29:144-68.
70. Kelly DE, Hageman GS, McGregor JA. Uveal compartmentalization in the hamster eye revealed by fine structural and tracer studies: implications for uveoscleral outflow. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983;24:1288-304.
71. Hageman GS, Kelly DE. Fibrillar and cytoskeletal substructure of tight junctions: analysis of single-stranded tight junctions linking fibroblasts of the lamina fusca in hamster eyes. *Cell Tissue Res* 1984;238:545-57.
72. Chen L, Cursiefen C, Barabino S, Zhang Q, Dana MR. Novel expression and characterization of lymphatic vessel endothelial hyaluronate receptor 1 (LYVE-1) by conjunctival cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:4536-40.
73. Hatta K, Huang ML, Weisel RD, Li RK. Culture of rat endometrial telocytes. *J Cell Mol Med* 2012;16:1392-6.
74. Munger SJ, Davis MJ, Simon AM. Defective lymphatic valve development and chylothorax in mice with a lymphatic-specific deletion of Connexin43. *Dev Biol* 2017;421:204-18.
75. Petrea CE, Rusu MC, Manoiu VS, Vrapciu AD. Telocyte-Like Cells Containing Weibel-Palade Bodies in Rat Lamina Fusca. *Ann Anat* 2018.
76. Rusu MC, Hostiu S, Vrapciu AD, Mogoanta L, Manoiu VS, Grigoriu F. Subsets of telocytes: Myocardial telocytes. *Ann Anat* 2017;209:37-44.
77. Grigoriu F, Hostiu S, Vrapciu AD, Rusu MC. Subsets of telocytes: the progenitor cells in the human endocardial niche. *Rom J Morphol Embryol* 2016;57:767-74.
78. Sleeman JP, Krishnan J, Kirkin V, Baumann P. Markers for the lymphatic endothelium: in search of the holy grail? *Microsc Res Tech* 2001;55:61-9.
79. Nakao S, Hafezi-Moghadam A, Ishibashi T. Lymphatics and lymphangiogenesis in the eye. *J Ophthalmol* 2012;2012:783163.
80. Doyle EL, Ridger V, Ferraro F, Turmaine M, Saftig P, Cutler DF. CD63 is an essential cofactor to leukocyte recruitment by endothelial P-selectin. *Blood* 2011;118:4265-73.
81. Ardeleanu C, Bussolati G. Telocytes are the common cell of origin of both PECOMAs and GISTs: an evidence-supported hypothesis. *J Cell Mol Med* 2011;15:2569-74.
82. Kawecki C, Lenting PJ, Denis CV. von Willebrand factor and inflammation. *J Thromb Haemost* 2017;15:1285-94.
83. Harrison-Lavoie KJ, Michaux G, Hewlett L, et al. P-selectin and CD63 use different mechanisms for delivery to Weibel-Palade bodies. *Traffic* 2006;7:647-62.
84. Bobryshev YV, Ikezawa T, Watanabe T. Formation of Birbeck granule-like structures in vascular dendritic cells in human atherosclerotic aorta. Lag-antibody to epidermal Langerhans cells recognizes cells in the aortic wall. *Atherosclerosis* 1997;133:193-202.
85. Kohn S, Friedman-Birnbaum R. Rod-shaped bodies resembling birbeck granule-like structures in endothelial cells of dermal capillaries in generalized granuloma annulare. *J Dermatol* 2001;28:5-11.
86. Valentijn KM, van Driel LF, Mourik MJ, et al. Multigranular exocytosis of Weibel-Palade bodies in vascular endothelial cells. *Blood* 2010;116:1807-16.
87. Tiwari S, Ali MJ, Vemuganti GK. Human lacrimal gland regeneration: Perspectives and review of literature. *Saudi J Ophthalmol* 2014;28:12-8.
88. Benias PC, Wells RG, Sackey-Aboagye B, et al. Structure and Distribution of an Unrecognized Interstitium in Human Tissues. *Sci Rep* 2018;8:4947.
89. Sherman DD, Gonnering RS, Wallow IH, et al. Identification of orbital lymphatics: enzyme histochemical light microscopic and electron microscopic studies. *Ophthalm Plast Reconstr Surg* 1993;9:153-69.
90. Gausas RE, Gonnering RS, Lemke BN, Dortzbach RK, Sherman DD. Identification of human orbital lymphatics. *Ophthalm Plast Reconstr Surg* 1999;15:252-9.
91. Kamei M, Saunders WB, Bayless KJ, Dye L, Davis GE, Weinstein BM. Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles in vivo. *Nature* 2006;442:453-6.
92. De Magistris P, Antonin W. The dynamic nature of the nuclear envelope. *Current Biology* 2018;28:r487-r97.
93. Kvam E, Goldfarb DS. Structure and function of nucleus-vacuole junctions: outer-nuclear-membrane targeting of Nvj1p and a role in tryptophan uptake. *J Cell Sci* 2006;119:3622-33.

94. Uemura T, Yoshimura SH, Takeyasu K, Sato MH. Vacuolar membrane dynamics revealed by GFP-AtVam3 fusion protein. *Genes Cells* 2002;7:743-53.
95. Kilarski W, Jasinski A. The formation of multivesicular bodies from the nuclear envelope. *J Cell Biol* 1970;45:205-11.
96. Conti CJ, Klein-Szanto AJ. Nuclear multivesicular bodies in cultured hamster cells. *Experientia* 1973;29:850-1.
97. Neel BA, Zong H, Backer JM, Pessin JE. Identification of Atypical Peri-Nuclear Multivesicular Bodies in Oxidative and Glycolytic Skeletal Muscle of Aged and Pompe's Disease Mouse Models. *Front Physiol* 2015;6:393.
98. Chemes HE, Fawcett DW, Dym M. Unusual features of the nuclear envelope in human spermatogenic cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 1978;192:493-512.
99. Frasca JM, Auerbach O, Parks V, Stoeckenius W. Electron Microscope Observations of Nuclear Evagination in Bronchial Epithelium. *Exp Mol Pathol* 1965;4:340-55.
100. Sottirai VS, Malvin RL. Polkissen cells and their possible role in renin secretion. *Nephron* 1978;22:558-69.