

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI

**ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ**

***CERCETĂRI STRUCTURALE ASUPRA ANATOMIEI
REGENERATIVE ȘI REMODELĂRII ÎN NIȘA STEM
CARDIACĂ***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF.DR.HAB. RUSU MUGUREL CONSTANTIN

Student-doctorand:

DR. IANCU CRISTIAN BOGDAN

ANUL 2019

CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

Lista de lucrări.....	6
1. INTRODUCERE.....	7
1.1. Motivația temei de cercetare.....	7
1.2. Importanța și actualitatea temei.....	7
1.3. Obiectivele științifice ale cercetării doctorale.....	7
1.4. Conținutul lucrării de doctorat.....	8
Listă de abrevieri.....	10
PARTEA GENERALĂ A TEZEI DE DOCTORAT.....	16
1. Elemente de cardiogeneză.....	17
1.5. Embriologie generală.....	17
1.6. Embriologia cardiacă.....	19
1.6.1. Formarea tubului cardiac.....	19
1.6.2. Formarea curburilor cordului.....	20
1.6.3. Formarea septurilor și valvelor.....	21
2. Elemente de anatomie și fiziologie cardiacă.....	23
2.1.1. Anatomia cordului.....	23
2.2. Structura histologică a cordului și învelișurilor sale.....	27
2.2.1. Structura histologică a miocardului.....	27
2.2.2. Structura histologică a învelișurilor cordului.....	28
2.2.3. Structura histologică a vaselor.....	29
2.2.4. Histologia sistemului excitoconductor.....	30
2.3. Fiziologia cardiacă.....	30
2.4. Limfaticele cordului.....	31
3. Nișele celulelor stem.....	33
3.1. Generalități.....	33
3.2. Conceptul de nișă stem.....	34
3.3. Nișa celulelor stem hematopoietice.....	34

3.3.1.	Celulele perivasculare ale nișei CSH.....	35
3.3.2.	Celulele endoteliale ale nișei CSH.....	36
3.4.	Nișa celulelor stem epiteliale.....	36
PARTEA PERSONALĂ A TEZEI DE DOCTORAT.....		39
4.	Anatomia moleculară a celulelor stem cardiace.....	40
4.1.	Introducere.....	40
4.2.	Celule stem cardiace.....	41
4.2.1.	Markeri timpurii ai celulelor stem.....	42
4.2.2.	Markeri ai celulelor stem cardiace (CSC).....	44
4.2.3.	Principalii markeri de suprafață ai CSC.....	45
4.2.4.	Principalii Factori de Transcripție ai Progenitorilor Cardiaci...	49
4.2.5.	Molecule de ARN reglatoare în diferențierea celulelor stem cardiace	50
5.	Telocitele cardiace în fibrilația atrială – aspecte critice.....	54
5.1.	Introducere.....	54
5.2.	Studii originale.....	55
5.3.	Discuții.....	60
6.	Cercetări de anatomie moleculară a nișei cardiace telocitare.....	62
6.1.	Introducere.....	62
6.2.	Reevaluarea telocitelor cardiace.....	62
6.2.1.	Materiale și Metodă.....	62
6.2.2.	Documentarea imaginilor.....	65
6.3.	Rezultate.....	66
6.3.1.	Telocitele sunt un tip celular controversat.....	71
6.3.2.	Inconsistența markerilor utilizați pentru identificarea telocitelor cardiace	72
6.3.3.	Expresia markerilor stem/progenitori în telocitele cardiace: semnificația c-kit.....	76
6.3.4.	Celulele cardiace endoteliale și telocitele.....	77
6.3.5.	Telocitele cardiace <i>versus</i> pericitele cardiace.....	78

6.3.6.	Markeri moleculari pericitari.....	81
6.4.	Subtipuri de pericite.....	90
6.4.1.	Celulele stem mezenchimale, elemente ale nișei perivasculare.	90
6.4.2.	Celulele interstițiale care exprimă CD34 pot aparține continuumului endotelial-pericitar-mezenchimal.....	92
6.4.3.	Telocitele cardiace nu au fost diferențiate de celulele limfatice.	94
6.5.	Concluzie.....	94
7.	Cercetări de anatomie moleculară și ultrastructurală în nișa epicardică și subepicardică	95
7.1.	Introducere.....	95
7.2.	Materiale și metodă.....	95
7.3.	Rezultate.....	99
7.4.	Discuții.....	104
7.4.1.	Limfaticele epicardului.....	104
7.4.2.	Celulele cardiace c-kit pozitive.....	104
7.4.3.	Identitatea telocitelor (sub)epicardice.....	105
7.4.4.	Expresia epicardică și subepicardică a podoplaninei.....	106
7.4.5.	Procesele de transdiferențiere epicardică.....	109
7.5.	Concluzii.....	111
8.	Prominina în nișa cardiacă.....	113
8.1.	Introducere.....	113
8.2.	Material și metodă.....	113
8.3.	Rezultate și discuții.....	115
9.	Subseturi de telocite subepicardice la nivelul manșonului venei cave superioare	123
9.1.	Introducere.....	123
9.2.	Material și metodă.....	126
9.3.	Rezultate.....	128
9.4.	Discuții și concluzii.....	132
10.	Concluzii.....	135

11. Bibliografie.....	137
12. Lista figurilor din text.....	177
13. Lista tabelelor din text.....	181
14. Anexe	182

Introducere

Dezvoltarea tehnicilor de biologie moleculară din ultimele două decenii au modificat conceptele privind embriologia cardiacă și au permis dezvoltarea studiului biologiei celulelor stem la nivelul embrionului și a celulelor multipotente în țesuturile adultului. O descoperire importantă a fost aceea că inima nu mai este un organ static ale cărui celule se află în stare de diferențiere terminală. Celulele cardiace, mai ales miocitele, ajung la un grad de reînnoire de aproximativ 50% de-a lungul vieții umane. La această particularitate contribuie celule rezidente ale cordului sau cele importate în cordul postnatal, clasificate ca celule stem, progenitori, precursori. Pentru a identifica diversele subpopulații de precursori cardiaci se folosesc baterii de markeri de suprafață, citoplasmatici și nucleari care detectează proteine specific tisulare prin metode imunohistochimice sau imunofluorescente, la care se adaugă studiul nanostructural al celulelor cu ajutorul microscopiei electronice sau prin disecție moleculară, la nivel de acizi nucleici și proteine.

Patologia cardiacă este cauză majoră de invaliditate și deces în populația activă și de aceea identificarea unui mecanism de stimulare a regenerării cardiace este o temă majoră în experimentele actuale. În ciuda cercetărilor continue, nișa stem cardiacă rămâne un subiect disputat datorită multitudinii studiilor cu rezultate contradictorii.

Lucrările publicate până acum m-au condus către ipoteza unui singur tip de celulă stem cardiacă, variantele observate până acum corespunzând unui continuum de fenotipuri celulare tranzitorii caracterizate printr-o mare variabilitate de markeri.

Ipoteza de lucru pe care mi-am bazat lucrarea a fost aceea că celulele progenitoare cardiace prezintă o “semnătură” morfologică și moleculară care permite identificarea și caracterizarea lor în preparatele histologice. Odată identificate, prin aplicarea unor tehnici de înaltă rezoluție, se poate rafina caracterizarea lor moleculară, obținându-se informații despre fenotipul lor, cu aplicații pentru medicina regenerativă.

Am definit următoarele obiective principale în cadrul acestei lucrări doctorale: (a) documentarea corespunzătoare din literatura de specialitate a semnăturilor moleculare corespunzătoare fenotipurilor celulare prezente în nișa stem cardiacă (b) realizarea de

cercetări originale de identificare imunohistochimică, studiu nanostructural și anatomie moleculară a nișelor stem atriale, ventriculare, epicardică.

PARTEA GENERALĂ A TEZEI DE DOCTORAT

Partea generală a Tezei de Doctorat cu titlul „Cercetări structurale asupra anatomiei regenerative și remodelării în nișa stem cardiacă” cuprinde în partea generală date rezultate din studiul referențialului specific. În primele două capitole ale părții generale am prezentat elemente de anatomie, fiziologie, histologie și embriologie a cordului. În capitolul trei am rezumat cele mai recente informații referitoare la tipurile celulare care pot fi găsite la nivelul nișelor stem clasice.

1. Elemente de cardiogeneză

Primul capitol prezintă morfogeneza cardiacă în contextul mai general al dezvoltării organismului uman în perioada embrionară. Subiectul este introdus printr-o prezentare a dezvoltării embriologice generale, urmată de o documentare detaliată privind embriogeneza și histomorfogeneza cardiacă. În acest capitol sunt prezentate informații privind embriogeneza miocardului și cea a endocardului, documentând și derivatele câmpurilor cardiace embrionare.

2. Elemente de anatomie și fiziologie cardiacă

În cadrul capitolului doi sunt documentate principalele elemente de configurație externă și internă a cordului, apoi este sistematizat în subcapitole elementele de anatomie structurală cardiacă. Prezentarea anatomiei cardiace normale este documentată atât la nivel microscopic cât și la nivelul structurilor histologice cardiace, la care se adaugă elemente de fiziologie cardiacă și detaliile mai rar prezentate de structură a vascularizației limfatice.

3. Nișele celulelor stem

În capitolul al treilea, ultimul al părții generale, am inclus o sinteză a studiului pe referențial privind nișele celulelor stem, element important pentru buna înțelegere a studiului personal. Astfel, sunt discutate în subcapitole distincte conceptul de nișă stem, cu particularizarea la nișa stem cardiacă și în strânsă legătură cu subiectul tezei și cu cercetările personale, nișa stem hematopoietică și nișa stem epitelială.

PARTEA PERSONALĂ A TEZEI DE DOCTORAT

În partea personală sunt prezentate review-urile și cercetările originale, astfel: în capitolul 4 - anatomia moleculară a celulelor stem cardiace, un review semistructurat documentat cu peste 90 de lucrări, în capitolul 5 - telocitele cardiace în fibrilația atrială –

aspecte critice, review sistematizat al literaturii de specialitate, în capitolul 6 - cercetări de anatomie moleculară a nișei cardiace telocitare, capitol realizat prin studiul probelor de mușchi papilar și miocard, în capitolul 7 - cercetări de anatomie moleculară în nișa epicardică și subepicardică, capitol realizat prin studiul probelor de perete atrial și ventricular, în capitolul 8 - prominina în nișa cardiacă, capitol realizat prin studiul probelor de perete atrial, în capitolul 9 - subseturi de telocite subepicardice la nivelul manșonului miocardic al venei cave superioare, capitol realizat pe probe recoltate de la nivelul joncțiunii atrului cu vena cavă superioară. La final sunt prezentate concluziile tezei de Doctorat și bibliografia cu peste patru sute cincizeci de referințe.

4. Anatomia moleculară a celulelor stem cardiace

Descoperirea celulelor stem cardiace (CSC), capabile de a reînnoi populația de cardiomiocite, au ridicat problema identificării cât și manipulării lor într-o manieră eficientă pentru a fi folosite pentru reconstrucția cardiacă post-accident ischemic (2). Studiile funcționale au arătat că diferențierea celulelor stem cardiace reproduce etapele observate în cursul dezvoltării embrionare (3).

Fiecărui stadiu este caracterizat de o semnătură moleculară specifică, bazată pe expresia anumitor markeri celulari (4), astfel de patternuri moleculare ajutând la identificarea celulară.

Au fost utilizați în special trei markeri pentru a izola CSC: c-Kit, Sca-1 și Isl-1, astfel se pot descrie mai multe clase de progenitori cardiaci: celule de tip satelit (SP), celule derivate din cardiosfere sau celule derivate din epicard (EPDC). Combinațiile dintre acești trei markeri principali și alți factori de transcripție, proteine de suprafață, molecule de ARN reglator, pot descrie chiar subclase de progenitori cardiaci (5). Acumularea acestor date conduce la ipoteza existenței unei celule stem cardiace unice, încă neidentificată, care se află la originea acestor precursori.

5. Telocitele cardiace în fibrilația atrială – aspecte critice

Fibrilația atrială (FA) este considerată a fi una dintre cauzele majore ale creșterii morbidității cardiovasculare: insuficiență cardiacă, accidente vasculare, demență vasculară, moarte subită, pentru a da numai câteva exemple.

Recent au fost publicate de către diverse echipe mai multe articole care au sugerat o posibilă implicare a telocitelor în aritmogeneză. Scopul acestui capitol a fost de a face o analiză sistematică pentru a identifica dacă există suficiente date pertinente care să susțină

această ipoteză. După o căutare sistematică a articolelor relevante care conțin date originale am putut identifica cinci articole inițiale pe baza cărora alți autori au dedus în lucrări ulterioare o asociere dintre telocite și fibrilația atrială (6-9).

Dintr-un punct de vedere clinic, toate studiile menționate au eșuat în a stabili o legătură de cauzalitate între telocite (morfologie, locație, număr) și inițierea sau evoluția fibrilației atriale. Se poate spune că, din moment ce celulele interstițiale Cajal-like (ICLC) din manșoanele de fibrile circulare ale venelor pulmonare au fost indicate ca fiind implicate în aritmogenicitate (7), și o moarte a telocitelor cardiace a fost diagnosticată în fibrilația atrială (Popescu, 2011b) se ridică o puternică suspiciune a implicării telocitelor în stabilirea ritmului cardiac (10). Lucrări recente au început să arate că ar trebui reanalizată chiar definiția inițială a telocitelor (11-13). Înainte de a iniția o analiză a rolului telocitelor în fibrilația atrială, ar trebui făcută o analiză riguroasă și precisă asupra existenței telocitelor, natura lor și modalitatea lor de diferențiere față de alte celule stromale.

6. Cercetări de anatomie moleculară a nișei cardiace telocitare

Telocitele (TCs) sunt considerate a fi un tip controversat de celule care au fost descrise în nișele stem (14). Morfologic, ele sunt caracterizate prin prezența unor prelungiri particulare foarte lungi, subțiri, moniliforme, cărora li s-a dat numele de “telopode” (15, 16). Stabilirea fenotipului molecular al telocitelor cardiace este de asemenea un subiect disputat în special datorită folosirii unui număr mare de markeri moleculari, majoritatea nespecifici, cum ar fi CD117c-kit, CD34, vimentin, PDGFR α , PDGFR β , etc.

Pentru a demonstra și susține teoria conform căreia structurile celulare considerate anterior a fi telocite nu reprezintă, de fapt, un tip celular distinct am conceput un studiu imunohistochimic pe țesut cardiac recoltat postmortem de la zece subiecți, conform cu legislația în vigoare privind folosirea materialelor obținute de la cadavre în scop de cercetare.

Scopul studiului a fost de a determina dacă pot fi identificate celule interstițiale telocite-like care populează spațiul interstițial, în condițiile unei diferențieri clare de celulele murale ale microvascularizației.

Studiul imunohistochimic s-a efectuat cu ajutorul markerilor pentru CD31, CD34, PDGFR α , CD117/c-kit, și α -SMA (izoforma alfa a actinei mușchiului neted). Imaginile obținute au arătat, pe lamele marcate cu CD34, interstițiul miocardic s-a dovedit a conține o rețea de tubuli endoteliali care, atunci când sunt secționați transversal, au un lumen ce

poate lua aspectul de linii subțiri și moniliforme, asemănător cu o structură telopodică (fig 6-2).

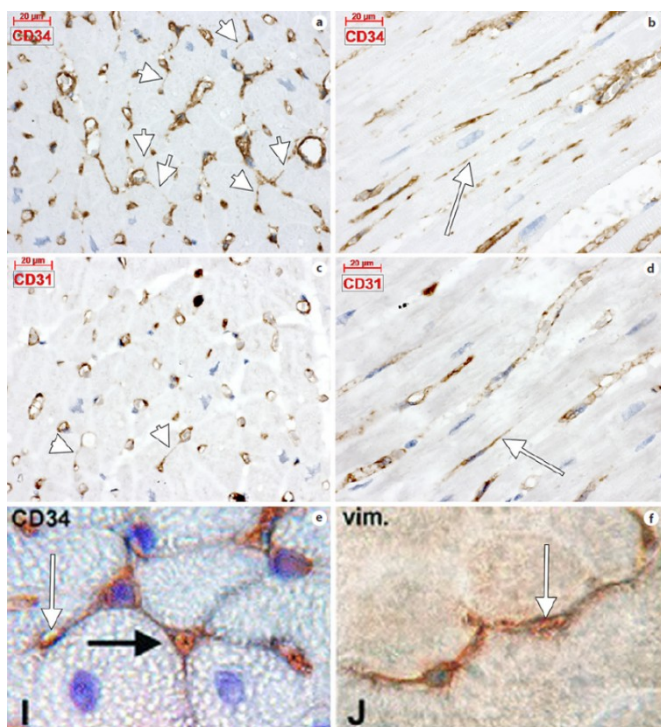


Fig.6-2 Mușchi papilar uman (adult). Expresia markerilor endoteliali CD34 (A, B) și CD31 (C, D) în miocardul uman adult demonstrează lipsa unei populații celulare fusiforme, subțiri, și așa-zise telocite nu pot fi identificate pe secțiuni bidimensionale transversale (cap de săgeată) și oblic-longitudinale (sageți). E și F: Legenda originală explică "(I) Adult: un telocit tipic (săgeată), care se află adiacent de un cardiomiocit este CD34⁺. (J) Adult: două telocite vimentin⁺ mărginesc cardiomiocite". Aceste "telocite" sunt la periferia unui spațiu îngust (am adăugat săgeți albe); ușor observabilă este și similitudinea dintre structurile patului microvascular cu imaginile noastre prezentate în panelurile A, B și E. Imaginile E și F au fost folosite cu permisiunea John Wiley and Sons (Număr de Licență: 4473481445164) referitor la articolul (1)

Diagnosticul diferențial îl face corecta identificare a luminei tubulilor, delimitată de endoteliu. De asemenea, pericitele miocardice și celulele musculare netede ale peretelui vascular au fost identificate cu precizie cu ajutorul anticorpului α -SMA (fig.6-4 A). Este de remarcat cum secțiunile tangente ale celulelor pericitare pot da o falsă impresie de structuri telopodice (fig.6-4). De asemenea, rețelele tridimensionale în organ de pericite PDGFR α , CD10 și CD117/c-kit pozitive pot da falsa impresie de telocite cardiace atunci când sunt observate pe preparatele de microscopie optică bidimensionale.

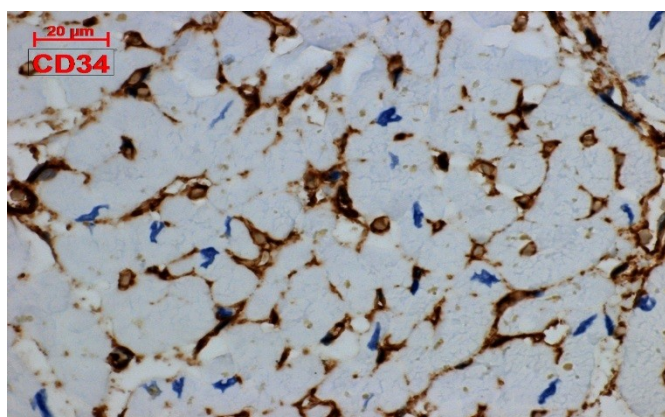


Fig.6-3 Expresia intramiocardică a CD34 este exclusiv endotelială.

Recent s-a ridicat problema cel puțin a unui subgrup de telocite cardiace care sunt de fapt celule endoteliale limfatice sau prelinfatice (LEC); nici acestea nu au fost diferențiate față de potențialele telocite cardiace (17).

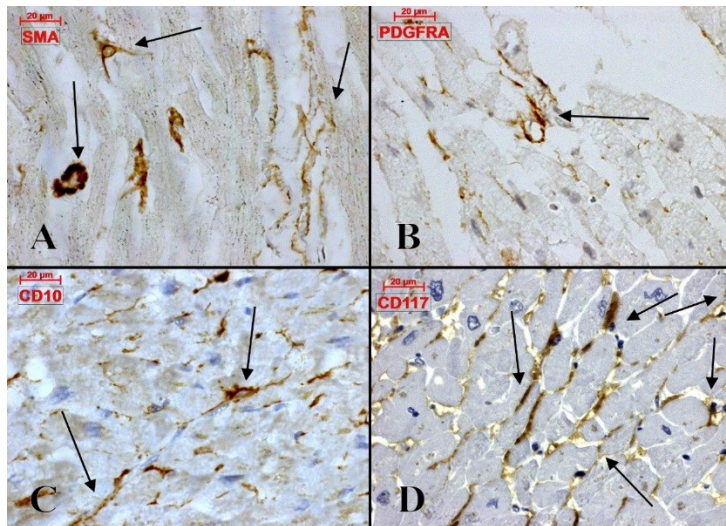


Fig.6-4 Expresia în pericitele miocardului uman adult a diferiți markeri (săgeți): A: α -SMA, B: PDGFR- α , C: CD10, D: CD117/c-kit. Secțiunile tangențiale prin pericite pot da greșita impresie a unor prelungiri considerabil mai mari – “telopode” (săgeți).

În concluzie, dacă entitatea morfologică “celulă cardiacă asemănătoare telocitului”, care a fost descrisă pe parcursul proceselor de transdiferențiere ale numeroaselor tipuri celulare care se află între spațiul abluminal și interstițiul perivascular, eșuează constant de aproape un deceniu în a fi caracterizată molecular, nu este necesar ca “telocitele” să fie recunoscute ca un tip celular aparte (18).

7. Cercetări de anatomie moleculară și ultrastructurală în nișa epicardică și subepicardică

Telocitele (TC) au fost propuse ca o entitate celulară stromală aparte (în 2010), pentru a fi diferențiate de alte celule interstițiale rezidente (14). Inițial au fost considerate a fi celule interstițiale Cajal-like (ICLCs) (19-26). Mai multe studii au încercat să caracterizeze prin multiple metode telocitele epicardice/ICLC epicardice în cadrul diferitelor specii (26-29). Totuși, aceste studii nu au reușit să convingă dacă celulele identificate sunt telocite epicardice care aparțin plexului limfatic subepicardic (Sappey), în condițiile în care anatomia limfaticelor cardiace este un subiect cunoscut de secole. Nici un studiu de până acum care s-a ocupat de ICLCs cardiace / telocite cardiace nu a părut să observe și să excludă contribuția la subiect a limfaticelor cardiace (30).

Am efectuat un studiu retrospectiv imunohistochimic pe șapte probe de țesut cardiac de adult arhivat la parafină, în căutarea unor dovezi suplimentare asupra compoziției celulare a nișei stromale epicardică și subepicardică.

Scopul studiului a fost de a testa expresia epicardică a CD117/c-kit, CD34, Citokeratina 7 (CK7), Ki67, PDGFR- α (receptorii factorilor de creștere derivați-plachetar) și a markerului limfatic D2-40 în probele de țesut cardiac uman (fig.7-1).

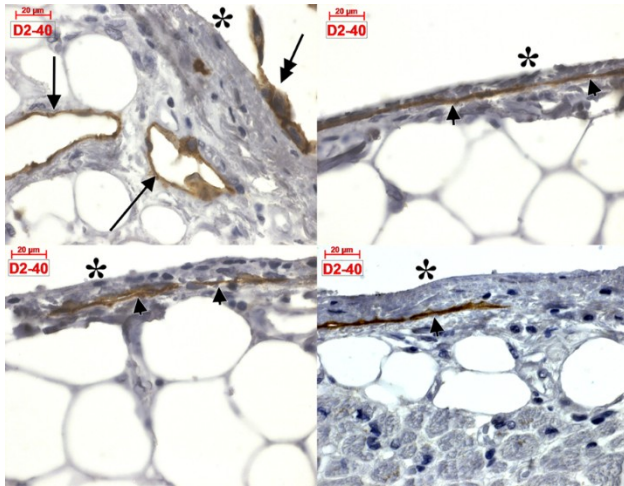


Fig.7-1 Peretele cordului de adult - apendicele (papilar) atrial stâng. Expresia epicardial și subepicardică a **podoplaninei** (D2-40). Deși epicardul a avut epitelul (*) superficial îndepărtat în cea mai mare parte, am identificat arii acoperite de celule mezoteliale hipertrofiate D2-40⁽⁺⁾ (săgeata dublă). Subepicardial au fost identificate vase limfatice D2-40⁽⁺⁾, ori cu perete subțire și lumenul aplatizat (capetele de săgeată), ori cu lumene mari și celule endoteliale care protruzionează intraluminal (săgeți). Aceste vase limfatice sunt situate imediat inferior stratului de celule submezoteliale D2-40⁽⁺⁾.

Celulele epicardiale mezoteliale exprimă D2-40, CK7, CD117/c-kit și PDGFR- α . De asemenea am identificat vase limfatice D2-40 pozitive la nivel subepicardic dar și celule izolate CK7 și D2-40 pozitive. Celulele fusiforme subiacente din stratul submezotelial au exprimat Ki-67 (fig.7-3) dar și celulele stromale și rețeaua de microtubuli endoteliali au fost PDGFR- α pozitive și CD34 pozitive.

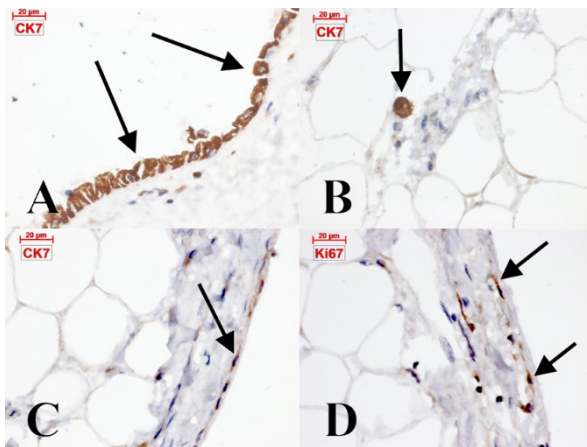


Fig.7-3 Peretele cordului de adult. Citokeratina 7 este exprimată în celulele epicardice (mezoteliale) A (săgeți), cât și în celule rotunde, izolate, situate subepicardic B (săgeți). În caseta C săgețile indică celule fusiforme, subțiri, situate imediat subepicardic care exprimă atât CK7, cât și markerul proliferativ Ki67 – D (săgeți).

Expresia markerului CD34 a fost pan-stromală, fără posibilitatea de a diferenția vreun tip celular stromal pe baza expresiei acestui marker (fig.7-8). Expresia CD117/c-kit, simultană și în celule epicardice (mezotelial), cât și în celule situate subepicardic nu identifică precis un tip celular (fig.7-6).

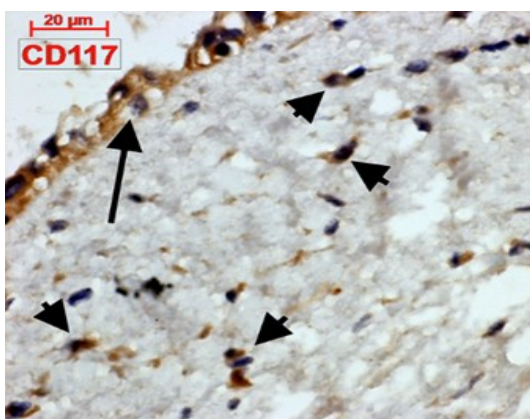


Fig.7-6 Peretele cordului de adult. CD117/c-kit este exprimat de către celule epicardice (mezotelial) – (săgeți) cât și de celule situate subepicardic – (vârfuri de săgeți).

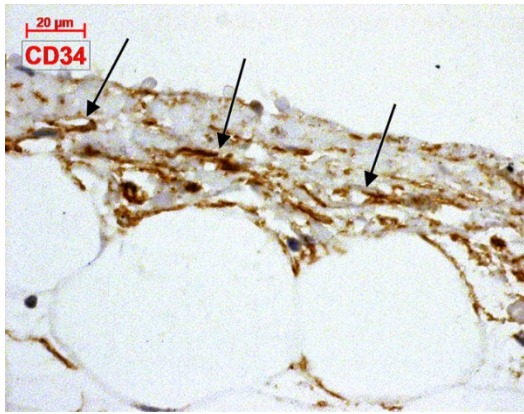


Fig.7-8 Peretele cordului de adult. Expresia submezotelială a CD34 include și celulele endoteliale marcate în stadiul incipient de formare a unor tubuli (săgeți).

Se poate trage concluzia că în complexul anatomic epicard – subepicard, o regiune care adăpostește diferite procese de transformare și transdiferențiere ale entităților celulare care se află aici, nu putem atribui caracteristici de tip definitoriu unor fenotipuri fluide care aparțin unor entități celulare care se află într-o transformare continuă.

8. Prominina în nișa cardiacă

Descrisă inițial la om, în ultima decadă prominina-1 (CD133) a devenit un important marker pentru celule progenitoare endoteliale (31), limfangiogenice (32), mioangiogenice (33). Epitopul AC133 este exprimat numai de celulele stem și progenitoare pe când CD133 se exprimă și în celulele diferențiate, de aceea epitopul AC133 este considerat unul dintre cei mai buni markeri de celulă stem.

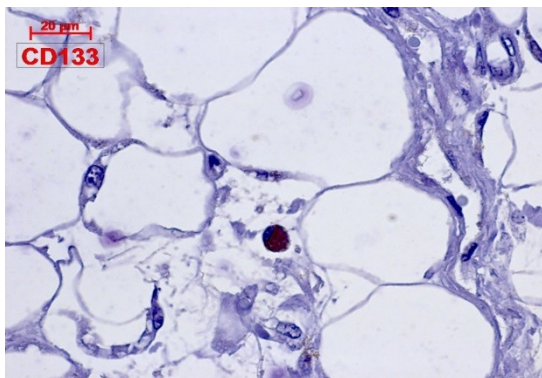


Fig.8-7 Zonă de țesut adipos înconjurat de fibre elastice, vase limfatice. Central o celulă CD133 pozitivă

Am efectuat un studiu retrospectiv imunohistochimic pe zece probe de țesut cardiac de adult arhivat la parafină, în căutarea unor dovezi suplimentare asupra originii celulelor CD133 pozitive din cord. Rezultatele obținute au demonstrat prezența unor celule CD133 pozitive cu o morfologie asemănătoare blaștilor limfoizi (fig.8-7).

9. Subseturi de telocite subepicardice la nivelul manșonului venei cave superioare

În acest capitol prezint o evaluare a ultrastructurii manșoanelor musculare de la nivelul venei cave superioare cu ajutorul microscopiei electronice de transmisie. Pornind

de la o cercetare bibliografică amănunțită în care nu am găsit referințe care să ateste identificarea celulelor interstițiale Cajal-like (ICLC)/telocite în manșoanele musculare din structura venelor cave superioare, am trecut la evaluarea ultrastructurii lor cu ajutorul microscopiei electronice de transmisie pentru a explora ipoteza prezenței sau absenței unui subtip de celule limfatice endoteliale și/sau celule endoteliale progenitoare a căror morfologie ultrastructurală să prezinte similarități cu celulele telocite-like.

Studiul a fost efectuat pe cord de leporide, toate procedurile fiind în concordanță cu normele bioetice în vigoare aprobate de Comitetul de Bioetică al U.M.F. Craiova (aprobarea #54/20.03.2014).

După ce am identificat și studiat mai mulți markeri ultrastructurali de la nivelul acestor celule am ridicat ipoteza apartenenței lor la liniile celulare endoteliale aflate în diverse stadii de maturizare. Imaginile obținute în MET demonstrând o origine endotelială a celulelor telocit-like supraadventiciale, dovedită de către diafragmele stomatale care închid caveola (fig.9-1, 9-2).

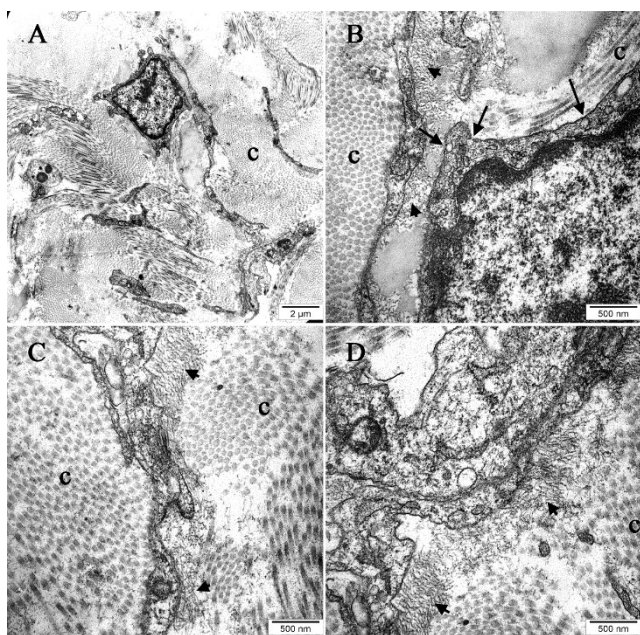


Fig.9-1 Venă cavă superioară, iepure, microscopie electronică de transmisie. A: vedere generală; B,C,D: detalii la rezoluție mărită ale celulei din panelul (A). O celulă stromală (A) inclusă în colagen (c) proiectează un telopod ce atașează filamente de ancorare (B,C,D, vârfuri de săgeți) și prezintă caveole subplasmalemale închise de diafragme stomatale (B, săgeți).

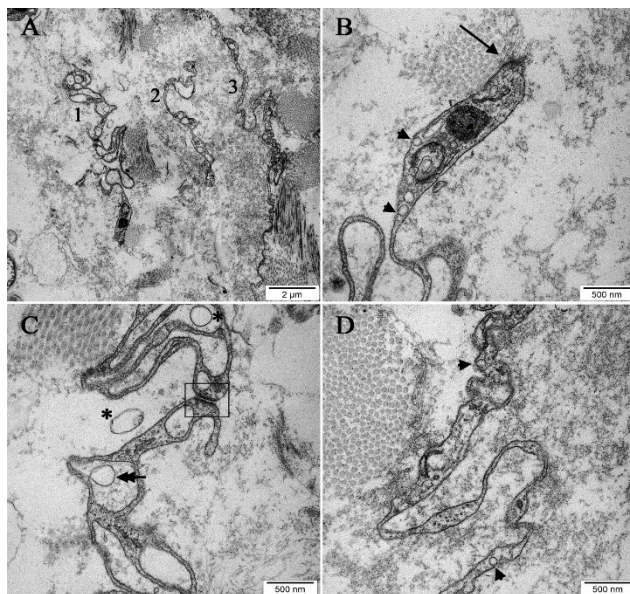


Fig.9-2 – Venă cavă superioară, iepure, microscopie electronică de transmisie. Sunt evaluate trei telopode distincte (A, vedere generală, 1, 2, 3). Acestea atașează filamente de ancorare (B, săgeată), prezintă caveole subplasmalemale închise de diafragme stomatale (B, D, vârfuri de săgeți), eliberează vezicule (C, săgeata cu vârf dublu) și au în vecinătate astfel de vezicule de exocitoză (C, *). Două astfel de telopode sunt conectate printr-o joncțiune de tip aderente (C, chenar).

Telocitele sunt un tip celular discutabil, caracterizat printr-o morfologie particulară: celulele prezintă prelungiri foarte lungi considerate caracteristice – telopodele – însă acestea nu sunt incluse în vocabularul “Terminologia Histologica”, publicat online de către FIPAT (Programul Federativ Internațional de Terminologie Anatomică) (34, 35). Posibilul fenotip al progenitorului acestui tip celular este din ce în ce mai mult devoalat de către diverse studii (34, 36-39).

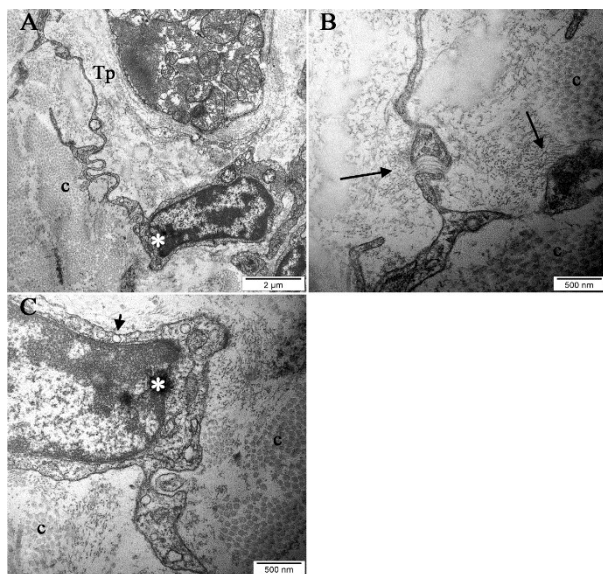


Fig.9-4 Venă cavă superioară, iepure, microscopie electronică de transmisie. A: aspect general; B,C: detalii la rezoluție microscopică mărită. O celulă (*) înglobată în collagen (c) poate fi considerată telocit deoarece proiectează un telopod (Tp) sinuos. Acest telopod atașează filamente de ancorare (B, săgeți) iar corpul celular prezintă caveole închise prin diafragme stomatale (C, vârf de săgeată)

Mai multe lucrări recente au sugerat o similitudine între telocitele cardiace și linia celulară endotelială (36, 37), ceea ce am demonstrat și prin lucrarea de față în situația particulară a manșoanelor musculare ale venei cave superioare (fig.9-4, 9-5).

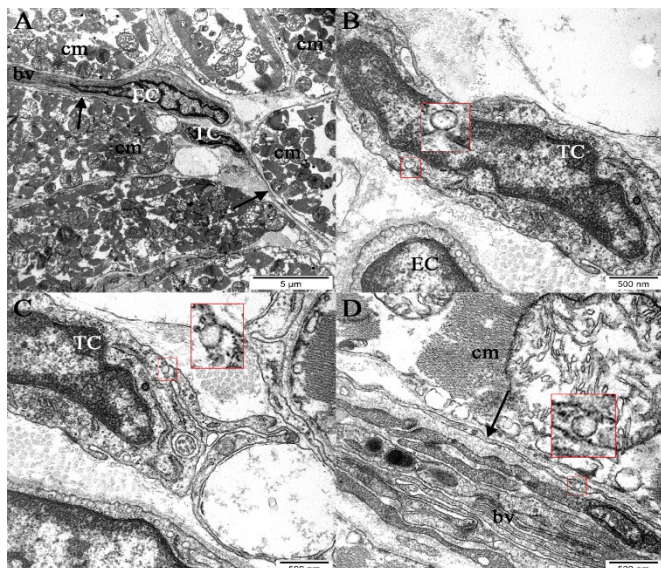


Fig.9-5 Venă cavă superioară, iepure, microscopie electronică de transmisie. A: vedere generală, B,C,D: detalii la rezoluție crescută. Un telocit (TC) stromal proiectează telopode (A, D, săgeți) aplicate pe sarcolema cardiomiocitelor (cm) învecinate. bv: vas sangvin. Celulele endoteliale vasculare (EC) sunt acoperite de procese pericitare. TC și telopodele respective prezintă caveole cu diafragme stomatale (B,C,D, chenare, detalii mărite digital).

Concluzii

1. După finalizarea dezvoltării cardiace, un mic număr de celule precursorare rămân dormante în țesutul cardiac și acestea sunt, probabil, responsabile de procese regenerative desfășurate în timpul vieții adulte. Cordul nu mai este considerat un organ post mitotic, el posedă o plasticitate deosebită, la baza proceselor regenerative stând celulele stem adulte din nișa cardiacă. Caracterizarea lor și înțelegerea mecanismelor moleculare care stau la baza activării lor în procesele regenerative pot contribui la dezvoltarea de noi terapii eficiente în patologia cardiacă. Studiul pe referențial a comparat o varietate de experimente (nestandardizate) cât și rezultatele folosirii intensive de modele animale care au generat până în prezent o pleoră de rezultate contradictorii.
2. Evaluarea anatomiei moleculare a nișei endomiocardice a arătat că entitatea morfologică “celulă cardiacă asemănătoare telocitului” poate fi descrisă pe parcursul proceselor de transdiferențiere ale numeroaselor tipuri celulare care se află între spațiul abluminal și interstițiul perivascular. Experimentele realizate au arătat că atunci când

pentru caracterizarea moleculară se folosesc markeri comuni cu alte tipuri celulare (fibroblaste, celule endoteliale progenitoare, pericite, celule endoteliale limfatice) nu este necesar ca telocitele să fie recunoscute ca un tip celular aparte.

3. Evidențierea expresiei mai multor markeri specifici atât în epicardul mezotelial cât și în celulele stromale subepicardice demonstrează prezența unei nișe stem progenitoare și desfășurarea unor procese de transdiferențiere și transformare ale entităților celulare care se află aici, indiferent dacă sunt rezidente permanente sau se află în tranzit.

4. Studiul promininei în nișa cardiacă ne-a permis să emitem ipoteza originii celulelor CD133⁺ din cord din celule progenitoare hematopoietice (migrate) sau din celule endoteliale progenitoare, sugerată mai ales în lumina proceselor de de-diferențiere și transdiferențiere pe care le pot parcurge celulele progenitoare.

5. Cercetările anatomiei moleculare a nișei perivascularare de la nivelul manșonului miocardic al venei cave superioare derulate cu ajutorul microscopiei electronice de transmisie demonstrează o origine endotelială a celulelor telocit-like supraadventiciale, dovedită de către diafragmele stomatale care închid caveola. Filamentele de ancorare ale acestor telocite ne duc cu gândul la o fază precoce a dezvoltării rețelei limfatice.

6. Pentru a reprezenta o resursă valabilă în studiile de medicină regenerativă, anatomia moleculară în nișa epicardică trebuie reinterpretată prin folosirea a cât mai multe combinații posibile de markeri moleculari (de suprafață, de citoplasmă, de nucleu), tehnici de microscopie confocală, microscopie multifoton, microscopie electronică tridimensională.

Lista de lucrări

1. Iancu, Cristian Bogdan; Iancu, Daniela; Rențea, Irina; Hostiuc, Sorin; Dermengiu, Dan; Rusu, Mugurel Constantin; Molecular signatures of cardiac stem cells, Rom Journal Morphol Embryol, 56 2015 4 1255-1262 IF=0.912
2. Hostiuc, Sorin; Negoii, Ionuț; Dogăroiu, Cătălin; Drima, Eduard; Iancu, Cristian Bogdan; Cardiac telocytes. From basic science to cardiac diseases. I. Atrial fibrillation, Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger, 218 2018 83-87 Urban & Fischer IF=1.852
3. Iancu, Cristian B; Rusu, Mugurel C; Mogoanță, Laurențiu; Hostiuc, Sorin; Grigoriu, Mihai; Myocardial Telocyte-Like Cells: A Review Including New Evidence, Cells Tissues Organs, 206 2018 16-25 Karger Publishers IF=1.275

4. Iancu, Cristian Bogdan; Rusu, Mugurel Constantin; Mogoanță, Laurențiu; Hostiuc, Sorin; Toader, Oana Daniela; The Telocytes in the Subepicardial Niche, Applied Sciences, 9 2019 8 1615 Multidisciplinary Digital Publishing Institute IF=1.689

Mulțumiri

Aduc aici mulțumiri Domnului Prof. Dr. Mugurel Rusu, Conducătorul Științific al Tezei mele de Doctorat și Domnului Conf. Dr. Sorin Hostiuc pentru ajutorul acordat în managementul activității de publicare a rezultatelor originale în literatura de specialitate.

Bibliografie selectivă

1. Bani D, Formigli L, Gherghiceanu M, Fausone-Pellegrini MS. Telocytes as supporting cells for myocardial tissue organization in developing and adult heart. Journal of cellular and molecular medicine. 2010;14(10):2531-8.
2. Zhang H, Wang H, Li N, Duan CE, Yang YJ. Cardiac progenitor/stem cells on myocardial infarction or ischemic heart disease: what we have known from current research. Heart failure reviews. 2014;19(2):247-58.
3. Anversa P, Kajstura J, Leri A, Bolli R. Life and death of cardiac stem cells: a paradigm shift in cardiac biology. Circulation. 2006;113(11):1451-63.
4. Bondue A, Tannler S, Chiapparo G, Chabab S, Ramialison M, Paulissen C, et al. Defining the earliest step of cardiovascular progenitor specification during embryonic stem cell differentiation. The Journal of cell biology. 2011;192(5):751-65.
5. Smith AJ, Lewis FC, Aquila I, Waring CD, Nocera A, Agosti V, et al. Isolation and characterization of resident endogenous c-Kit⁺ cardiac stem cells from the adult mouse and rat heart. Nature protocols. 2014;9(7):1662-81.

6. Gherghiceanu M, Hinescu ME, Andrei F, Mandache E, Macarie CE, Faussonne-Pellegrini M-S, et al. Interstitial Cajal-like cells (ICLC) in myocardial sleeves of human pulmonary veins. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2008;12(5a):1777-81.
7. Morel E, Meyronet D, Thivolet-Bejuy F, Chevalier P. Identification and distribution of interstitial Cajal cells in human pulmonary veins. *Heart Rhythm*. 2008;5(7):1063-7.
8. Nguyen BL, Fishbein MC, Chen LS, Chen P-S, Masroor S. Histopathological substrate for chronic atrial fibrillation in humans. *Heart Rhythm*. 2009;6(4):454-60.
9. Vandecasteele T, Cornillie P, Vandeveld K, Logothetidou A, Couck L, Loon G, et al. Presence of Ganglia and Telocytes in Proximity to Myocardial Sleeve Tissue in the Porcine Pulmonary Veins Wall. *Anatomia, Histologia, Embryologia*. 2017;46(4):325-33.
10. Rusu MC, Pop F, Hostiuc S, Curca G, Jianu A, Paduraru D. Telocytes form networks in normal cardiac tissues. *Histology and histopathology*. 2012;27(4):807.
11. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Garcia M, Saez F, Diaz-Flores JL, Valladares F, 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. *Histology and histopathology*. 2014;29(7):831-70.
12. Rusu M, Hostiuc S, Vrapciu A, Mogoantă L, Mănoiu V, Grigoriu F. Subsets of telocytes: Myocardial telocytes. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*. 2017;209:37-44.
13. Varga I, Kyselovič J, Galfiova P, Danisovic L. The Non-cardiomyocyte Cells of the Heart. Their Possible Roles in Exercise-Induced Cardiac Regeneration and Remodeling. In: Xiao J, editor. *Exercise for Cardiovascular Disease Prevention and Treatment: From Molecular to Clinical, Part 1*. Singapore: Springer Singapore; 2017. p. 117-36.
14. 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. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2010;14(4):729-40.
15. Rusu MC, Cretoiu D, Vrapciu AD, Hostiuc S, Dermengiu D, Manoiu VS, et al. Telocytes of the human adult trigeminal ganglion. *Cell Biol Toxicol*. 2016;32(3):199-207.
16. El Maadawi ZM. A Tale of Two Cells: Telocyte and Stem Cell Unique Relationship. *Adv Exp Med Biol*. 2016;913:359-76.
17. Rusu MC, Hostiuc S. Critical review: Cardiac telocytes vs cardiac lymphatic endothelial cells. *Ann Anat*. 2018;222:40-54.
18. Iancu CB, Rusu MC, Mogoanta L, Hostiuc S, Grigoriu M. Myocardial Telocyte-Like Cells: A Review Including New Evidence. *Cells, tissues, organs*. 2019:1-10.
19. Cretoiu D, Ciontea SM, Popescu LM, Ceafalan L, Ardeleanu C. Interstitial Cajal-like cells (ICLC) as steroid hormone sensors in human myometrium: immunocytochemical approach. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2006;10(3):789-95.
20. Gherghiceanu M, Hinescu ME, Andrei F, Mandache E, Macarie CE, Faussonne-Pellegrini MS, et al. Interstitial Cajal-like cells (ICLC) in myocardial sleeves of human pulmonary veins. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2008;12(5A):1777-81.
21. Gherghiceanu M, Hinescu ME, Popescu LM. Myocardial interstitial Cajal-like cells (ICLC) in caveolin-1 KO mice. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2009;13(1):202-6.
22. Hinescu ME, Gherghiceanu M, Mandache E, Ciontea SM, Popescu LM. Interstitial Cajal-like cells (ICLC) in atrial myocardium: ultrastructural and immunohistochemical characterization. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2006;10(1):243-57.
23. Hinescu ME, Popescu LM. Interstitial Cajal-like cells (ICLC) in human atrial myocardium. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2005;9(4):972-5.
24. Kostin S, Popescu LM. A distinct type of cell in myocardium: interstitial Cajal-like cells (ICLCs). *Journal of cellular and molecular medicine*. 2009;13(2):295-308.

25. Pieri L, Vannucchi MG, Fausone-Pellegrini MS. Histochemical and ultrastructural characteristics of an interstitial cell type different from ICC and resident in the muscle coat of human gut. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2008;12(5B):1944-55.
26. Suci L, Popescu LM, Regalia T, Ardelean A, Manole CG. Epicardium: interstitial Cajal-like cells (ICLC) highlighted by immunofluorescence. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2009;13(4):771-7.
27. Popescu LM, Manole CG, Gherghiceanu M, Ardelean A, Nicolescu MI, Hinescu ME, et al. Telocytes in human epicardium. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2010;14(8):2085-93.
28. Popescu LM, Gherghiceanu M, Manole CG, Fausone-Pellegrini MS. Cardiac renewing: interstitial Cajal-like cells nurse cardiomyocyte progenitors in epicardial stem cell niches. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2009;13(5):866-86.
29. Gherghiceanu M, Popescu LM. Human epicardium: ultrastructural ancestry of mesothelium and mesenchymal cells. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2009;13(9A):2949-51.
30. Rusu MC, Hostiuc S. Critical review: Cardiac telocytes vs cardiac lymphatic endothelial cells. *Ann Anat*. 2019;222:40-54.
31. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 2000;95(3):952-8.
32. Salven P, Mustjoki S, Alitalo R, Alitalo K, Rafii S. VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells. *Blood*. 2003;101(1):168-72.
33. Shmelkov SV, Meeus S, Moussazadeh N, Kermani P, Rashbaum WK, Rabbany SY, et al. Cytokine preconditioning promotes codifferentiation of human fetal liver CD133+ stem cells into angiomyogenic tissue. *Circulation*. 2005;111(9):1175-83.
34. Varga I, Danisovic L, Kyselovic J, Gazova A, Musil P, Miko M, et al. The functional morphology and role of cardiac telocytes in myocardium regeneration. *Can J Physiol Pharmacol*. 2016:1-5.
35. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Garcia MP, Saez FJ, Diaz-Flores L, Jr., Valladares F, 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(7):831-70.
36. Grigoriu F, Hostiuc S, Vrapciu AD, Rusu MC. Subsets of telocytes: the progenitor cells in the human endocardial niche. *Rom J Morphol Embryol*. 2016;57(2 Suppl):767-74.
37. Rusu MC, Hostiuc S, Vrapciu AD, Mogoanta L, Manoiu VS, Grigoriu F. Subsets of telocytes: Myocardial telocytes. *Ann Anat*. 2017;209:37-44.
38. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Gonzalez-Gomez M, Diaz-Flores L, Jr., Valladares F, Rancel N, et al. Telocyte Behaviour During Inflammation, Repair and Tumour Stroma Formation. *Adv Exp Med Biol*. 2016;913:177-91.
39. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Pino Garcia M, Gonzalez M, Diaz-Flores L, Francisco Madrid J. Telocytes as a Source of Progenitor Cells in Regeneration and Repair Through Granulation Tissue. *Current stem cell research & therapy*. 2016;11(5):395-403.