

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

*Interacțiuni dinamice între micromediu și cardiomiocite în
patologia ischemică cardiacă*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. HABIL. COSTACHE MARIANA

Student-doctorand:

FLOREA-GRĂMADĂ CĂS. CEAUȘU ZENAIDA

2022

Cuprins

Introducere.....pagina 8

I. Partea generală.....pagina 13

1. Caracterizarea morfologică și funcțională a populațiilor celulare cardiomiocitare și non-miocitare cardiacepagina 13

1.1. Caracterizarea morfologică și funcțională a cardiomiocitului lucrător.....pagina 13

1.2. Caracterizarea morfofuncțională și imunofenotipică a populațiilor celulare non-cardiomiocitare.....pagina 16

1.2.1. Identificarea și caracterizarea celulelor fibroblastice și miofibroblastice.....pagina 16

1.2.2. Identificarea și caracterizarea celulelor pericitare cardiacepagina 27

1.2.3. Identificarea și caracterizarea celulelor stem cardiace.....pagina 30

2. Caracteristici histologice și imunofenotipice ale matricei extracelularepagina 36

3. Dinamica populațiilor celulare non-miocitare și ale componentelor matriciale în leziunile ischemice cardiace.....pagina 41

II. Contribuții personale.....pagina 60

4. Ipoteza de lucru și obiectivele generale.....pagina 60

5. Metodologia generală a cercetării.....pagina 61

5.1. Caracterizarea eșantionului.....pagina 61

5.2. Prelevarea fragmentelor tisulare-tehnica de necropsie a cordului.....pagina 63

5.3. Examenul histopatologic în microscopie optică.....pagina 64

5.4. Examenul imunohistochimic.....pagina 66

5.5. Analiza statistică.....	pagina 69
6. Studiul I: Analiza și caracterizarea clinică și histopatologică a cazurilor selectate cu leziuni ischemice.....	pagina 70
6.1. Introducere (Ipoteza de lucru și obiective specifice).....	pagina 70
6.2. Material și metodă.....	pagina 71
6.3. Rezultate.....	pagina 73
6.4. Discuții.....	pagina 86
7. Studiul II: Identificarea și caracterizarea celulelor non-cardiomiocitare din micromediul cardiac în contextul leziunilor ischemice: fibroblaste/miofibroblaste, celule pericitare, celule stem, celule inflamatorii.....	pagina 91
7.1. Introducere (Ipoteza de lucru și obiective specifice).....	pagina 91
7.2. Material și metodă.....	pagina 93
7.3. Rezultate.....	pagina 95
7.4. Discuții.....	pagina 113
8. Studiul III: Identificarea și caracterizarea elementelor matricei extracelulare cardiace în cazul leziunilor ischemice cardiace.....	pagina 118
8.1. Ipoteza de lucru.....	pagina 118
8.2. Material și metodă.....	pagina 120
8.3. Rezultate.....	pagina 121
8.4. Discuții.....	pagina 136
9. Concluzii și contribuții personale.....	pagina 141
9.1. Concluzii.....	pagina 141
9.2. Contribuții personale.....	pagina 144
Bibliografie.....	pagina 147
Anexe.....	pagina 174

Lista cu abrevieri și simboluri

CD = *eng.* cluster of differentiation

CD34 = marker pentru vase sangvine

CD105 = marker de celule endoteliale activate

CD117 = marker de celule stem

Col I / IV = colagen I / IV

CS = celule stem

CSC = celule stem cardiace

ECM = *eng.* extracellular matrix

EGFR = receptor pentru factor de creștere epitelial

HE = Hematoxină Eozină

HVS = hipertrofie ventriculară stângă

ICAM-1/CD56 = moleculă de adeziune intercelulară

IHC = imunohistochimie

IL = interleukină

IMA = infarct miocardic acut

IMC = infarct miocardic cicatricial

KI67 = marker de proliferare celulară

MMP-9 = matrix metal-proteinază 9

PDGFR = *eng.* platelet-derived growth factor receptor

PMN = polimorfonucleare neutrofile

SMA = actina mușchiului neted

TGF- β = *eng.* transforming growth factor β

Tn-C = tenascin-C

TNF = *eng.* tumour necrosis factor

VG = van Gieson

VEGF = factorul de creștere al endoteliului vascular

VEGFR = receptorul factorului de creștere al endoteliului vascular

VIM = vimentina

VS = ventricul stâng

Problema fundamentală

Bolile ischemice cardiovasculare reprezintă principala cauză de morbiditate și mortalitate, în pofida îmbunătățirii considerabile a metodelor de diagnostic și terapie din ultimul deceniu. În prezent, în România, 2 din 3 adulți prezintă un grad de afectare cardiacă, independent, sau în asociere cu alte afecțiuni sistemice.

Din punct de vedere fiziopatologic, ischemia miocardică se produce în urma obstrucției lumenului unei artere coronare secundar rupturii unei plăci de aterom vulnerabile. Ischemia determină alterări profunde moleculare și ionice la nivelul miocardului afectat, urmate de scăderea funcției sistolice. Ischemia miocardică prelungită se însoțește de un front de necroză miocardică masivă care se extinde de la nivel endocardic spre zona epicardică.

Cordul uman are o capacitate regenerativă limitată, iar vindecarea miocardului ischemic se realizează prin formarea unei cicatrice fibroase. În evoluția fenomenelor post-infarct miocardic acut (post-IMA) se disting trei etape, fin orchestrate de o serie complexă de evenimente, care se suprapun parțial, inițiate de un răspuns inflamator marcat cu rol în curățarea zonei de infarct de detritusurile necrotice, urmat de o fază proliferativă, caracterizată prin diminuarea inflamației, proliferare miofibroblastică și apariția țesutului de granulație, finalizat prin constituirea cicatricii fibroase.

Spațiul dintre miocitele cardiace, cunoscut drept matrice extracelulară (ECM), este un micromediu unic, complex și dinamic, constituit dintr-o varietate largă celulară non-cardiomiocitară, reprezentată de: fibroblaste, miofibroblaste, celule pericitare, celule endoteliale și celule stem, distribuite într-o rețea proteică heterogenă, care include fibre de colagen, fibronectină, proteoglicani, matrix metal-proteinaze (MMP-aze) și proteine de suprafață pentru adeziunea celulară. Populația celulară non-cardiomiocitară cea mai dinamică, distribuită difuz interstitial, este reprezentată de fibroblaste, celule-suport ce intră în contact cu fibrele de colagen și alte fibroblaste, realizând o rețea tridimensională mecano-senzitivă, cu rol de sprijin pentru cardiomiocite. În timpul evoluției infarctului miocardic, fibroblastele cardiace suferă o tranziție fenotipică rapidă de la un fenotip secretor și de degradare a matrixului, la un fenotip miofibroblastic, cu rol în sintetizarea ECM, prin secreția de factori paracrini și producerea de colagen, fiind esențiale pentru formarea cicatricei post-IMA și fibroza cardiacă secundară cardiopatiei ischemice. În prezent se știe că vindecarea miocardului ischemic post-infarct se face prin depunerea unui colagen de tip 3 (fibre de reticulină) friabil, care este înlocuit în timp de colagen de tip I și II, mai robust, cu apariția fibrozei de substituție.

Concomitent se produce și o proliferare angiogenică cu densitate microvasculară înaltă, evidențiable imunohistochimic (IHC) prin receptor pentru factor de creștere epitelială (EGFR), matrix metal-proteinază 9 (MMP-9), CD34 și factorul de transformare al creșterii (TGF- β) în miocardul restant, precum și o creștere a variabilității expresiei IHC a unor molecule de adeziune în matricea extracelulară perilezională (ICAM-1/CD56).

Remodelarea ventriculară stângă ce succede infarctului miocardic reprezintă baza structurală a insuficienței cardiace ischemice și cuprinde modificări pe termen variabil în ceea ce privește mărimea, forma, funcția, compoziția celulară și moleculară a ventriculului stâng. Factorii determinanți implicați în remodelare sunt reprezentați de mărimea zonei de infarct și de răspunsul reparator post-IMA. În prezent, limitarea zonei de ischemie se realizează prin reperfuzia precoce. În schimb, pentru manipularea răspunsului reparator cardiac, ce implică mecanisme complexe de interacțiune celulară și moleculară este necesară o cunoaștere aprofundată a interacțiunilor complexe dintre componentele celulare și structurale ale interstițiului cardiac. Regenerarea cardiacă se află sub controlul unor mecanisme moleculare complexe intra- și extracelulare, care în momentul stimulării corespunzătoare ar putea activa căile de sinteză de noi cardiomiocite din celulele interstițiale existente, ceea ce ar deschide noi perspective terapeutice în viitor.

Leziunile ischemice cardiace sunt asociate cu expansiunea interstițiului cardiac, care poate fi afectat atât în privința compoziției cantitative (sinteza în exces sau scăderea sintezei anumitor proteine), cât și prin modificări calitative, cu alterarea raportului dintre moleculele de colagen fibrilar și colagen non-fibrilar, însoțite de modificări marcante ale compoziției biochimice ale rețelei ECM. Componentele ECM interacționează continuu într-un mod dinamic cu elementele celulare cardiace, furnizând o rețea structurală stabilă, asigurând și coordonarea răspunsului umoral intercelular.

Ipoteza de lucru

Întrucât vindecarea miocardului post-ischemie se realizează prin formarea unei cicatrici fibroase, cercetările moderne vizează identificarea unor modalități reparatorii miocardice cu restabilirea funcției electro-mecanice cardiace. Printre metodele inovative pentru refacerea miocardului s-au propus: stimularea cardiomiocitelor endogene prin modularea căilor de semnalizare și reglarea elementelor ciclului celular, reprogramarea celulelor stromale rezidente prin expresia unor factori cardiogenici, stimularea celulelor sușă din nișele de celule stem cardiace prezente interstițial sau suplimentarea cu celule stem exogene. Până în prezent, cercetările în domeniu s-au axat cu precădere pe studiul și

caracterizarea cardiomiocitelor, atât în ceea ce privește distribuția lor la nivelul diverselor structuri cardiace (cavitățile atriale și ventriculare atât drepte cât și stângi, orificiile atrio-ventriculare, mușchii pilieri), precum și funcțiile îndeplinite în raport cu localizarea miocardică. De asemenea, proprietățile mușchiului cardiac, descifrate în prezent, au constituit tema multor cercetări de fiziopatologie. Având în vedere că majoritatea potențialelor metode de terapie implică populațiile celulare interstițiale și interacțiunile complexe moleculare este important de identificat și caracterizat exhaustiv micromediul cardiac și totalitatea populațiilor celulare non-cardiomiocitare. Majoritatea studiilor de cercetare fundamentală care vizează mecanisme moleculare sunt realizate utilizând modele animale, iar rezultatele obținute nu reflectă în totalitate fiziopatologia și structura complexă a țesutului cardiac uman. În consecință, o mare parte dintre rezultatele obținute în studiile pe modele animale nu pot fi utilizate în tratamentul uman.

Lucrarea de doctorat prezentă a încercat eliminarea acestui inconvenient, cel al originii țesutului studiat, prin realizarea cercetării pe fragmente tisulare umane și corelarea diagnosticului clinic cu modificările celulare complexe identificate microscopic. Deoarece majoritatea studiilor moderne din literatură au vizat caracterizarea individuală a unei populații celulare non-cardiomiocitare folosind modele animale, cercetarea doctorală prezentă își propune analiza complexă a multiplelor componențelor celulare și moleculare interstițiale cardiace aflate în inter-relație la nivelul miocardului ischemic, realizată pe țesut uman. Descrierea și caracterizarea fenomenelor ischemice acute cardiace vor permite în viitor tratamentul pacienților cu IMA prin terapie de revascularizație precoce, asociată cu terapie țintită antifibrotică care să limiteze zona de infarct și să reducă probabilitatea de apariție a modificărilor de remodelare ventriculară

Obiectivele studiului

Obiectivele generale ale cercetării doctorale au vizat analiza și caracterizarea morfologică și imunohistochimică a modificărilor în micromediul cardiac din leziunile ischemice, centrate pe populațiile celulare non-cardiomiocitare, având în vedere implicarea acestora în procesul reparator cardiac și potențialul terapeutic.

Realizarea obiectivelor a implicat:

- Documentarea și elaborarea criteriilor de selecție pentru alcătuirea loturilor de lucru;
- Recoltarea postnecropsică a fragmentelor cardiace de interes;
- Evaluarea histologică a cazurilor incluse în loturile de studiu;
- Testarea imunohistochimică pentru: VIM, SMA, CD34, CD56, CD68, CD117, MMP-9, Col I, Col IV și Tn-C;

- Identificarea și caracterizarea imunohistochimică a fibroblastelor din miocardul VS în lotul martor;
- Imunofenotiparea fibroblastelor și miofibroblastelor cardiace ventriculare în miocardul ischemic;
- Identificarea imunohistochimică a celulelor inflamatorii interstițiale la nivelul miocardului ischemic;
- Identificarea imunohistochimică a celulelor stem cardiace (CSC);
- Caracterizarea imunohistochimică a ECM;
- Coroborarea datelor obținute și analiza statistică a rezultatelor.

Cercetarea doctorală a fost realizată prin intermediul a trei studii morfopatologice și imunohistochimice aflate în interdependență unul față de celălalt, care s-au axat pe identificarea și caracterizarea din punct de vedere histopatologic și imunohistochimic a principalelor componente ale micromediului cardiac din leziunile ischemice. ECM are rol esențial în organizarea micromediului tisular, prin medierea interacțiunii miocit-interstițiu, creșterea, migrarea și diferențierea celulară, iar creșterea rigidității ECM afectează deopotrivă și aceste proprietăți.

Teza de doctorat prezintă a avut o serie de limitări, în primul rând de natură materială, nedispunând de tehnici de microscopie electronică și tehnici genetice pentru analiza ultrastructurală celulară și biomoleculară. Toate fragmentele tisulare au fost obținute în urma efectuării necropsiilor anatomo-patologice, la pacienți ce au avut diagnosticul de deces ischemia cardiacă.

În viitor, dezvoltarea tehnicilor de endobiopsiere cardiacă vor permite obținerea de țesut cardiac folosit pentru testarea imunohistochimică a unui panel de anticorpi care să ofere date despre procesul fibrotic, inflamație, compoziția celulară și moleculară a ECM și să deschidă calea spre o terapie cardiacă personalizată.

Metodologia generală a cercetării

Lucrarea de față este un studiu retrospectiv ce include fragmente de țesut cardiac recoltate de la un număr de 78 de pacienți decedați în perioada 2012-2021, cu patologie ischemică acută miocardică, selectați dintr-un număr total de 636 de necropsii efectuate în cadrul Departamentului de Anatomie Patologică al Spitalul Universitar de Urgență din București.

Criteriile de includere în studiu au fost reprezentate de: leziuni ischemice acute și cronice, infarct miocardic în diverse faze de evoluție și leziuni ischemice acute asociate cu infarcte miocardice vechi.

Criteriile de excludere din studiu au fost reprezentate de leziunile cardiace cronice non-ischemice, de tipul sclerolipomatozei, leziunilor miocardice degenerative, cardiopatiei hipertensive, leziunile infecțioase.

Lotul martor a fost constituit din 10 cazuri de țesut cardiac de la pacienți decedați, al căror diagnostic principal de deces a fost diferit de leziunile ischemice acute cardiace.

Pacienții sau aparținătorii acestora au fost informați și și-au dat consimțământul pentru utilizarea țesuturilor prelevate în scop de diagnostic și cercetare. Studiul țesuturilor necropsice a fost condus în acord cu legislația națională privind utilizarea cadavrelor în scop de cercetare (inclusiv Legea 104/2003 privind manipularea cadavrelor umane) și cu principiile generale ale Declarației Universale ale Drepturilor Omului.

Din documentele medicale ale pacienților au fost analizate date generale referitoare la vârstă și gen, precum și date anamnestice referitoare la patologia clinică asociată: cardiacă, pulmonară, hepatică, diabet zaharat, obezitate. Datele clinice au fost ulterior coroborate cu diagnosticul macroscopic, microscopic și IHC elaborate după efectuarea necropsiilor.

Lucrarea este structurată în trei studii histopatologice și imunohistochimice, interconectate între ele, ce au avut drept scop analiza exhaustivă a micromediului cardiac din cadrul leziunilor ischemice, realizată pe un lot semnificativ de fragmente tisulare.

Studiul inițial, prezentat în cadrul capitolului 6, a vizat descrierea macroscopică și microscopică, în colorațiile uzuale HE și VG, ale leziunilor ischemice identificate, precum și analiza datelor clinice ale celor 78 de pacienți selectați, în vederea caracterizării imunohistochimice. Analiza afectării cardiace preexistente este deosebit de importantă deoarece pacienții cu IMA dezvoltă remodelare ventriculară postinfarct, ce se caracterizează printr-o dilatare ventriculară, asociată cu disfuncție sistolică un timp variabil, săptămâni sau luni, după producerea IMA. Dilatarea cavitaților ventriculare post-IMA se produce prin redistribuirea cardiomiocitelor restante și modificări ale matricei interstițiale sub acțiunea citokinelor și chemokinelor eliberate de către celulele inflamatorii.

În lotul studiat vârsta pacienților a fost cuprinsă între 47 și 95 ani, iar vârsta medie a fost 71,3 de ani, cu o ușoară preponderență masculină (48 bărbați : 30 femei). Cazurile au fost astfel selectate încât să cuprindă întreg spectrul leziunilor ischemice, așa cum este reprezentat în graficul din fig. 1.

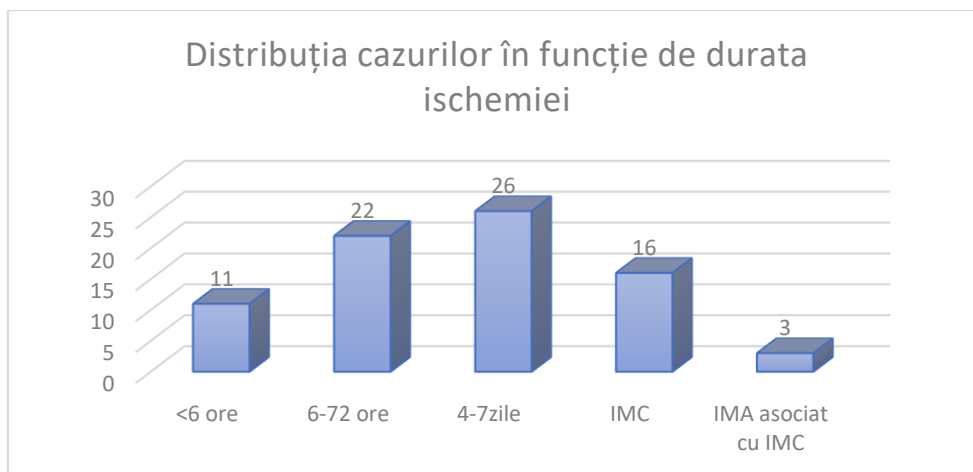


Fig.1: Distribuția cazurilor din lotul studiat în funcție de durata leziunii ischemice

Cazurile studiate au prezentat leziuni ischemice cu localizare variabilă la nivelul VS, majoritatea fiind situate la nivelul peretelui posterior și antero-lateral (fig.2).

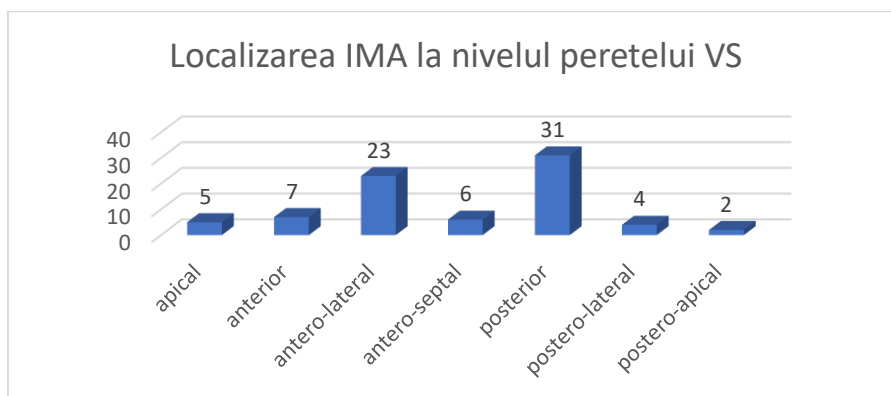


Fig. 2: Distribuția cazurilor în funcție de localizarea IMA

Din analiza datelor clinice obținute prin studierea foilor de observație clinică, coroborate cu aspectul macroscopic al cordului examinat în timpul necropsiei, am constatat că un procent de 92,3 % dintre pacienți (72 cazuri) au prezentat leziuni de cardiomiopatie hipertrofică și dilatativă.

În cazurile analizate numărul pacienților cu leziuni preexistente de cardiomiopatie dilatativă, caracterizate prin dilatare ventriculară cu reducerea funcției sistolice, a fost triplu față de numărul cazurilor asociate cu modificări de cardiomiopatie hipertrofică, caracterizate prin îngroșarea concentrică, circumferențială a peretelui VS. Aproximativ trei sferturi dintre cazurile analizate au asociat leziuni de ateromatoză coronariană și aortică. Microscopic, necroza cardiomiocitară se caracterizează prin dispariția nucleilor și eozinofilia

citoplasmatică intensă, cu dispariția striaiilor transversale. Distrucția celulară este urmată de infiltrarea zonei de infarct cu numeroase polimorfonucleare neutrofile, macrofage, limfocite, plasmocite și apariția țesutului de granulație (fig. 3).

La două cazuri leziunile ischemice extinse au fost asociate și cu ruptura peretelui cardiac. În aceste cazuri pacienții nu au prezentat comorbidități și nici leziuni cardiace preexistente episodului ischemic. Microscopic, s-a evidențiat IMA transmural întins cu durată de minim 72 de ore, soluție de continuitate la nivel epicardic cu bogată hemoragie în miocardul subjacent, ce disecă și distorsionează arhitectura tisulară, leziuni hipoxice miocardice, congestie vasculară, miocardofibroză interstițială și perivasculară și microfocare hemoragice interstițiale în țesutul conjunctivo-adipos subepicardic.

Microscopia optică clasică a relevat în toate cazurile din lotul de interes, cu antecedente patologice cardiace non-infarct, diverse grade de miocardofibroză interstițială și perivasculară, uneori și subendocardică, de la depuneri conjunctive discrete până la o scleroză accentuată, cu dezorganizarea și disocierea pe alocuri a fibrelor miocardice. Modificările fibrotice au fost evidențiate în colorația VG, sub formă de travee, arii cu forme și dimensiuni variate situate interstițial (fig.4).

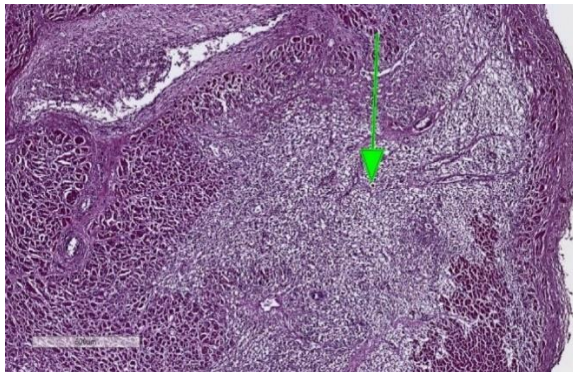


Fig.3. IMA cu durată 3-4 zile; arie de necroză miocardică înlocuită de țesut de granulație și vas sangvin adiacent, trombozat; HE, 40x

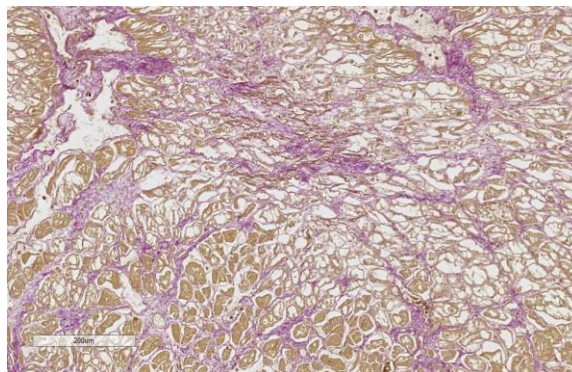


Fig.4. Cardiomiopatie hipertrofică; benzi de collagen cu grosime variabilă, identificate interstițial; VG, 40x

Studiul II, prezentat în cadrul capitolului 7, a vizat analiza și caracterizarea populațiilor de celule fibroblastice, miofibroblastice, celule pericitare, CSC și celule inflamatorii de la nivelul interstițiului cardiac din cadrul leziunilor ischemice, în raport cu faza de evoluție a IMA, precum și în funcție de localizarea IMA la nivelul peretelui VS. La întreg lotul de 78 de cazuri cu leziuni ischemice am studiat expresia IHC pentru vimentină

(VIM), α -actina mușchiului neted (SMA), CD34 și CD68, cu rol în identificarea populației de fibroblaste / miofibroblaste, caracterizarea neoangiogenezei postinfarct și a răspunsului inflamator.

În prima parte a studiului II am descris populația celulară cea mai dinamică și versatilă de la nivel cardiac, reprezentată de fibroblaste, aflată în dependență directă cu populația de celule miofibroblastice. Studii recente au arătat că fibroblastele reprezintă doar < 20% din celulele non-cardiomiocitare interstițiale, populația celulară cea mai numeroasă de la nivelul micromediului cardiac fiind reprezentată de celulele endoteliale, ca dovadă a vascularizației miocardice bogate.

Rezistența sporită la ischemie, distribuția ubicuitară în interstițiul cardiac, interacțiunea dinamică cu cardiomiocitele și potențialul de sinteză de mediatori pro-inflamatori, au făcut ca fibroblaste să fie considerate celule santinelă ce identifică leziunile ischemice și determină reacție inflamatorie.

Au fost descrise mai multe populații de celule fibroblastice: prin înglobarea de miofibrile contractile de tipul actinei se transformă în miofibroblaste, fibroblastele inflamatorii secretă diverse citokine și chemokine cu rol în orchestrarea reacției inflamatorii; au fost descrise fibroblaste cu proprietăți fagocitice și fibroblaste cu rol în neoangiogeneză.

Pentru identificarea fibroblastelor am utilizat imunocolorarea cu vimentină, iar pentru identificarea miofibroblastelor am realizat imunocolorarea cu SMA. Pe lotul ales am cercetat existența corelațiilor statistice între populația de celule fibroblastice și populațiile de celule fibroblastice și inflamatorii.

Populația cea mai abundentă de celule fibroblastice am identificat-o la pacienții cu IMA cu durata 3-4 zile. Pe măsura avansării ischemiei, populația fibroblastică descrește, fiind înlocuită de miofibroblaste. Nu am identificat variații ale populației fibroblastelor legate de vârsta pacientului.

În cazurile de IMA subendocardic reperfuția precoce prin intermediul fluxului sangvin de la nivelul cavitaților ventriculare a determinat activarea rapidă a mecanismelor compensatorii. Imunohistochimic am constatat creșterea în distribuție a fibroblastelor, cu dispoziție relativ uniformă, interstițială la nivelul miocardului perilezional.

În schimb, în cazurile în care nu s-a produs fenomenul de reperfuție precoce, obstrucția coronariană totală a avut drept consecință infarct miocardic extins, cu necroza transmurală marcată. În aceste cazuri populația fibroblastelor a fost redusă dramatic, fiind distrusă prin ischemie, împreună cu cardiomiocitele și majoritatea celulelor interstițiale.

Acest mecanism ar putea explica evoluția în cele două cazuri asociate cu ruptura peretelui cardiac, în care ischemia masivă a determinat și scăderea populației celulare fibroblastice.

Apariția miofibroblastelor este în corelație directă cu populația de fibroblaste prezente interstițial. Celulele miofibroblastice au fost identificate prin pozitivarea citoplasmatică la SMA cu grade variate ale intensității imunocolorării. Miofibroblastele sunt celule de talie medie, fusiforme, cu nucleu central, alungit și citoplasma redusă cantitativ, cu numeroase prelungiri, distribuite în interstițiul cardiac (fig.5).

Răspunsul inflamator este un proces complex care joacă un rol esențial în reparația cardiacă. Faza inițială este cea inflamatorie, cu durata cuprinsă între 3 și 72 de ore după producerea evenimentului ischemic. Faza inflamatorie ar putea fi, la rândul ei, subîmpărțită în trei faze succesive: o fază inițială de „alarmă” caracterizată prin eliberarea de diverse fragmente proteice din cardiomiocitele necrotice ce stimulează reacția inflamatorie ulterioară, faza de mobilizare leucocitară și faza de rezoluție a inflamației. Eliberarea de matrikinine rezultate din degradarea de către granulocite a fibrelor miocardice necrotice și a matricei celulare determină sinteza și acumularea de monocite la nivelul zonei de infarct.

Corelația directă statistic calculată între CD 68 și CD34 ($r = 0.534$, $p < 0.005$) ar putea explica rolul populației de celule histiocitare prezente în țesutul de granulație în apariția de noi structuri vasculare. Neoangiogeneza, la rândul ei, determină acumularea de noi celule inflamatorii la locul injuriei miocardice. Histiocitele stimulează neoangiogeneza prin sinteza de PDGF cu rol în creșterea activității mitotice a celulelor endoteliale și musculare a peretelui vascular.

În lotul studiat nu există corelații statistice între populația de celule fibroblastice identificate imunohistochimic cu VIM și infiltratul inflamator macrofagic, cele două variabile fiind independente statistic.

În studiul efectuat nu am identificat corelații statistice semnificative între infiltratul inflamator histiocitar și populația de celule miofibroblastice implicate în reparația cordului postinfarct. Deși ambele populații celulare au un rol important în sinteza diverselor citokine implicate în remodelare, dinamica populațiilor lor reprezintă markeri independenți.

O populație celulară la fel de numeroasă și versatilă precum cea fibroblastică, analizată în studiul al doilea a fost reprezentată de cea a celulelor pericitare, identificate IHC prin pozitivare la SMA.

Pericitele sunt celule vasculare incluse în membrana bazală microvasculară, ce mărginesc pereții capilarelor, venulelor și arteriolelor terminale. Alături de rolul în homeostazia microvasculară, o serie de studii au arătat că pericitele sunt implicate într-o

serie largă de răspunsuri celulare, incluzând: inflamație, fibroză, reparație tisulară și regenerare tisulară. Prezente și în țesutul cardiac normal, numărul pericitelor crește în condiții de IMA, fiind identificate cu precădere la nivelul țesutului de granulație tânăr.

La nivelul peretelui capilarelor de neoformație din țesutul de granulație a fost identificată o populație numeroasă de celule pericitare prin pozitivare cu SMA. În cazurile analizate raportul celulelor endoteliale : celule pericitare = 3:1. Importanța identificării și caracterizării populației pericitare cardiace este datorată potențialului terapeutic în regenerarea miocardiocitară, atât prin implicarea în neoangiogeneză, cât și printr-un posibil switch urmat de sinteza de cardiomiocite.

Datorită rolului lor în inflamație, neoangiogeneză și în sinteza factorilor de creștere, utilizarea celulelor pericitare pare să aibă rezultate promițătoare în terapia leziunilor ischemice. Studii experimentale au arătat că administrarea pericitelor intramiocardic ar putea proteja cordul cu infarct împotriva remodelării, prin acțiunea angiogenică și antiapoptotică, datorată efectelor paracrine asupra cardiomiocitelor, fibroblastelor și celulelor vasculare.

Provocarea celui de al doilea studiu a fost reprezentată de identificarea la nivelul micromediului cardiac, prin imunocolorare cu CD 117 / c-kit, a celulelor stem endogene, situate în unități morfo-funcționale cardiace, cunoscute drept nișe de CSC.

Această entitate morfologică, nișa de CSC, furnizează o structură reglatorie pentru celulele stem și, prin intermediul micromediului, stimulează proliferarea cardiomiocitară, migrarea celulară și transformarea celulelor stem în cardiomiocite în cadrul reparației cardiace.

CSC endogene reprezintă o populație restrânsă de celule imature, ce are toate caracteristicile celulelor stem: autoregenerare, clonalitate, multipotență, capacitatea de diferențiere în cardiomiocite, celule musculare netede și celule endoteliale cu trăsături genotipice miocardiocitare, localizate preponderent la nivelul atriilor și pericardului ventricular și cu expresie imunohistochimică specifică reprezentată de pozitivare la anticorpii CD 117, CD 34, CD105, Rex1, Nanog și Sox2.

Analiza comparativă a zonelor de IMA cu zonele de IMC a arătat o creștere ușoară a celulelor c-kit+ la nivelul cordului cu leziuni ischemice vechi, asociate clinic cu diverse grade de hipertrofie musculară ventriculară (Fig.6).

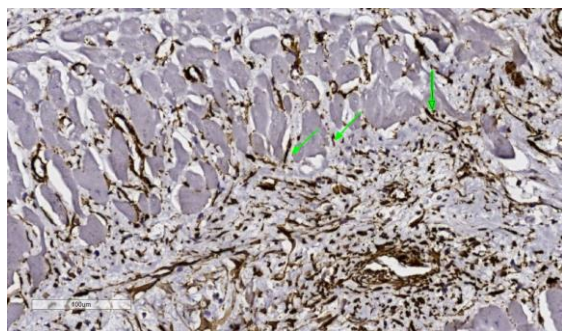


Fig.5. IMA cu durata 6 zile; proliferare de celule miofibroblastice; IHC, SMA, 200x

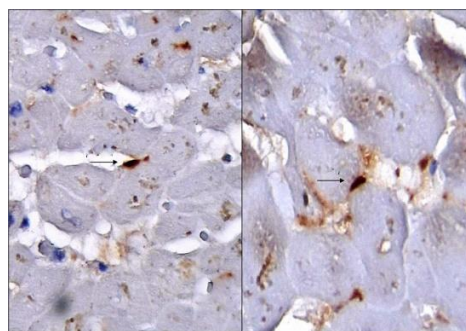


Fig.6. IMC 6-7 zile; CSC identificată interstitial; IHC, CD117, 400x

Studiul III a vizat analiza și caracterizarea compoziției ECM, prin testare IHC a principalilor “actori” cu rol în remodelare: Col I, Col IV, Tn-C, MMP 9 și CD34 la nivelul fragmentelor cardiace din lotul de 78 de cazuri și corelarea statistică a rezultatelor obținute.

Matricea colagenică cardiacă normală este constituită în principal (70%) din Col I, dispus predominant sub formă de benzi groase la nivelul epimisiumului și perimisiumului, în timp ce Col III formează benzi subțiri la nivel endomisial. Compoziția ECM are un rol determinant în evoluția proceselor regenerative și reparatorii cardiace. Modificările calitative și cantitative ale EMC determină creșterea rigidității ECM, care implică scăderea complianței ventriculare stângi, cu afectarea hemodinamicii ventriculare.

Fibroza miocardică este rezultatul unui dezechilibru în metabolismul colagenului, ce implică creșterea sintezei fibrelor de colagen, concomitent cu reducerea degradării lor. În procesul fibrotic sunt implicate mai multe tipuri celulare, fie prin acțiune directă (miofibroblastele), fie prin acțiune indirectă: macrofage, limfocite, celule endoteliale, cardiomiocite.

Cercetarea a urmărit dinamica Col I, colagen fibrilar, principalul constituent al ECM, în raport cu un tip de colagen non-fibrilar, Col IV, consecutiv evenimentelor ischemice. La nivelul miocardului restant am constatat depuneri de colagen, inițial fibre de colagen tip III, friabil, reprezentat de fibrele de reticulină, care este înlocuit apoi în evoluție de colagen mult mai robust, de tip I și II. Fibrele de reticulină realizează o rețea laxă, continuă, cu dispoziție perpendiculară pe cardiomiocite, comparativ cu fibrele de colagen I, mult mai dense, cu distribuție compactă, paralelă cu fibrele miocardice.

Toate cazurile studiate au prezentat creșterea fibrozei la nivelul ECM, comparativ cu lotul martor. Fragmentele cardiace din lotul studiat au prezentat îngroșare subendocardică

variabilă, obiectivată prin depunerea de benzi de Col I și Col IV și proliferare miofibroblastică.

Într-un număr de 45 cazuri, reprezentate de 26 de fragmente cu leziuni IMA cu durata 4-7 zile și 19 cazuri de IMA cu durata mai mare de 7 zile, la care pozitivarea interstițială pentru Col I a avut intensitate medie-mare (2-3), am realizat analiza statistică comparativă cu populația miofibroblastică identificată prin pozitivarea citoplasmatică la SMA. În cazurile analizate, am constatat creșterea depunerii interstițiale de Col I, concomitent cu creșterea populației de miofibroblaste, posibil datorită rolului pe care îl are această populație celulară în sinteza de Col I și reparația post IMA (Fig. 7).

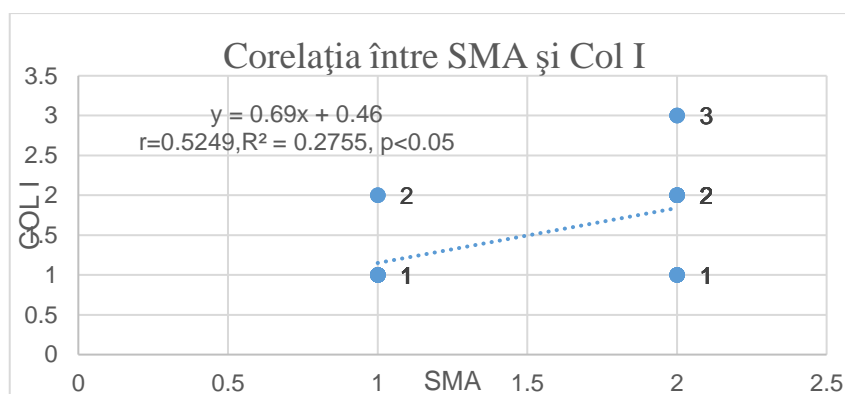


Fig. 7. Analiza comparativă, semnificativă statistic, între populația de miofibroblaste și fibrele de Col I

Analiza comparativă între imunoexpresia interstițială a Col I și Col IV realizată pe fragmentele cardiace cu leziuni ischemice acute și cronice nu a arătat corelații semnificative statistic între cele două variabile.

Studiul de față a evidențiat modificări în microvascularizația cardiacă, atât sub aspect calitativ cât și cantitativ. Răspunsul angiogenic robust post-IMA debutează în țesutul miocardic adiacent zonei de IMA și se extinde ulterior la nivelul zonei de necroză miocardică. Din punct de vedere calitativ a fost evidențiată îngroșarea tunicii medii a arteriolelor de calibru mare și mediu și depunerea de collagen interstițial perivascular în jurul capilarelor. Hipoxia secundară ischemiei determină creșterea densității microvasculare identificată inițial în zona de infarct, în contextul țesutului de granulație. Modificările de neovascularizație se caracterizează prin apariția de numeroase vase mici, de tip capilar, cu lumen neregulat (fig.8).

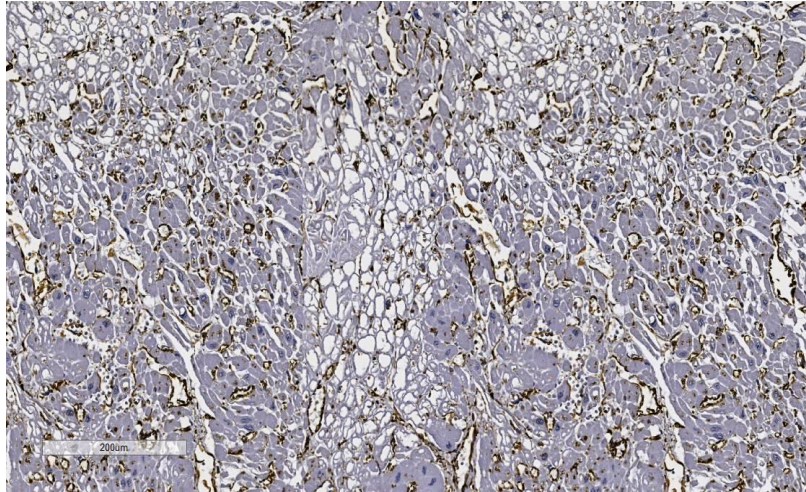


Fig.8. IMA cu evoluție de 7 zile; rețea de neovascularizație bogată, cu numeroase vase de calibru mediu și mic, dezvoltată în jurul unei zone de ischemie cronică prelungită; CD34, 100x

MMP-azele sunt sintetizate în faza inflamatorie a ischemiei, fiind implicate în reparația și remodelarea post-IMA. Studiul doctoral a vizat analiza expresiei MMP-9, citokină sintetizată precoce la nivelul miocardului ischemic.

În studiul actual am identificat imunohistochimic MMP-9 precoce la nivel tisular în cazurile de IMA cu durata mai mică de 3 ore. În lotul studiat imunoexpresia interstițială pentru MMP-9 a fost maximă în cazul leziunilor ischemice cu durata ischemiei cuprinsă între 3 ore și 3 zile. Pe fragmentele miocardice cu leziuni ischemice cu durata mai mare de 7 zile nu s-a mai detectat MMP-9, date în concordanță cu literatura de specialitate.

Tn-C este o proteină hexamerică multimodulară, fără expresie IHC în cordul normal, însă secretată și depozitată interstițial în leziunile cardiace caracterizate prin remodelare. Imunoexpresia Tn-C se corelează direct cu prezența miofibroblastelor în jurul zonei de infarct, ceea ce arată rolul Tn-C în remodelarea ventriculară post IMA.

Corelația statistică directă între populația celulară miofibroblastică și expresia Tn-C la nivelul ECM confirmă rolul pe care îl are sinteza Tn-C în fazele inițiale, inflamatorie și proliferativă, ale IMA. Analiza comparativă între imunoexpresia interstițială a Tn-C în cazurile de IMA cu durata ischemiei miocardice cuprinsă între 3 ore și 7 zile și populația de macrofage, identificată imunohistochimic cu CD 68, a arătat corelarea directă între cei doi markeri imunohistochimici. Imunoexpresia interstițială a Tn-C identificată la nivelul miocardului perilezional s-a corelat direct statistic, cu un indice de corelație Pearson $r = 0.53$ cu imunoexpresia, MMP-9.

Având în vedere că atât secreția MMP-9 cât și a Tn-C are loc precoce în evoluția IMA, ambii markeri fiind cunoscuți cu rol predictiv în apariția remodelării cardiace post-IMA, propun testarea IHC a acestor anticorpi pe biopsiile miocardice la pacienții cu ischemie acută, în scopul aplicării unei terapii țintite cardiace.

Concluzii și contribuții personale

Teza doctorală de față s-a axat pe cercetarea interacțiunilor dinamice între cardiomiocite și populațiile celulare non-cardiomiocitare din micromediul cardiac, având în vedere că bolile ischemice cardiovasculare reprezintă, în prezent, principala cauză de morbiditate și mortalitate. În studiul efectuat, procentul necropsiilor la pacienți decedați prin afecțiuni ischemice cardiace a fost de 12,2% din totalul necropsiilor efectuate la pacienți adulți decedați în perioada 2012-2021, în cadrul secției de Anatomie Patologică a SUUB.

În cadrul studiului I, prezentat în cap. 6, am realizat o analiza histologica exhaustivă pe un lot de 78 de cazuri de leziuni ischemice recoltate post-necropsic. Trei sferturi dintre cazurile analizate au asociat modificări importante de ateromatoză aortică și coronariană.

Capacitatea redusă de regenerare miocardică face ca vindecarea cordului post-infarct să se realizeze prin mecanisme complexe de fibroză de înlocuire, care implică interacțiuni dinamice între populațiile celulare interstițiale și ECM.

În cadrul studiului II, dezvoltat în cap.7, am realizat identificarea și caracterizarea imunohistochimică a populațiilor celulare non-cardiomiocitare interstițiale. Am constatat existența unei corelații directe între populațiile de celule fibroblastice și miofibroblastice, date asemănătoare cu cele existente în literatura de specialitate.

Populația celulară cardiacă cu cel mai mare potențial de modulare fenotipică și terapeutică este reprezentată de fibroblaste. Activarea fibroblastelor secundar leziunilor ischemice cardiace reprezintă un răspuns reparator critic cu rol în păstrarea geometriei și funcției cardiace. Modificările dinamice din timpul fazei proliferative generează semnale biochimice ce determină conversia fibroblastelor în miofibroblaste, precum și proliferarea unei rețele microvasculare de neoformație.

La nivelul interstițiului cardiac am identificat trei tipuri principale de fibroză: fibroză reparativă sau de înlocuire - ce implică constituirea de cicatrici fibro-conjunctive în zonele de necroză miocardică, fibroza reactivă - caracterizată prin depunerea de fibre colagenice în interstițiul cardiac, în jurul cardiomiocitelor și fibroza perivasculară.

Dezvoltarea fibrozei interstițiale miocardice se află într-un echilibru dinamic între factorii fibrolitici reprezentați de MMP-aze și colagenaze și factorii fibrogenici ce cresc depunerea de colagen. Fibroza de înlocuire implică formarea unei cicatrici dense, rezistente la acțiunea factorilor litici, ce crește rigiditatea pereților ventriculari și determină apariția aritmiilor și a insuficienței cardiace.

Complexitatea răspunsului fibroblastic asociat cu heterogenitatea condițiilor fiziopatologice fibrotice miocardice îngreunează dezvoltarea unor strategii anti-fibrotice în leziunile ischemice cardiace. Plasticitatea fenotipică a fibroblastelor cardiace ar putea fi dirijată utilizând strategii de reprogramare genică, prin supraexpresia unui set de factori de transcripție timpurii cardiaci, spre sinteza de cardiomiocite funcționale și repopularea miocardului distrus prin ischemie.

Analizând relația dintre infiltratul inflamator histiocitar și formarea de noi lumene vasculare, am constatat că cele două variabile prezintă o corelație directă, ceea ce explică rolul populației de celule histiocitare prezente în țesutul de granulație în apariția de noi structuri vasculare. Neoangiogeneza, la rândul ei, determină acumularea de noi celule inflamatorii la locul ischemiei miocardice. Histiocitele stimulează neoangiogeneza prin sinteza de PDGF cu rol în creșterea activității mitotice a celulelor endoteliale și musculare a peretelui vascular.

O contribuție importantă este reprezentată de identificarea în cadrul studiului II, cap.7, a CSC rezidente în interstițiul cardiac, în vecinătatea cardiomiocitelor și capilarelor vasculare, situate în unități morfo-funcționale numite nișe cardiace. Medicina regenerativă și terapiile bazate pe celule stem de care vor beneficia în viitor pacienții cu leziuni ischemice cardiace vor viza modificări la nivelul compoziției nișei cardiace, pentru stimularea turnoverului cardiomiocitar, migrării și diferențierii CSC în cardiomiocite adulte în timpul reparației cardiace.

Studiul privind analiza și caracterizarea ECM realizat în capitolul 8 are un caracter inovativ, atât prin multitudinea markerilor IHC investigați cât și prin centrarea asupra interrelațiilor dintre elementele celulare ale ECM și mediatorii umorali eliberați în timpul ischemiei.

Compoziția ECM influențează terapiile regenerative cardiace, în sensul că un micromediu cu rigiditate crescută determină hipertrofia cardiomiocitelor, scade viabilitatea celulelor stem cardiace rezidente interstițial și diminuează capacitatea de transformare a celulelor stem în cardiomiocite. Rolul fragmentelor matriciale în reglarea răspunsului celular

fibrogenic și angionogenic după producerea IMA nu este încă pe deplin elucidat, ceea ce deschide noi perspective în cercetările viitoare.

În cadrul capitolului 8 am realizat caracterizarea modificărilor de fibroză interstițială postischemică, prin analiza IHC a sintezei unui colagen fibrilar (Col I) și a colagenului non-fibrilar Col IV.

Leziunile ischemice cardiace și IMA se asociază cu modificări dinamice în compoziția și structura ECM. Utilizând tehnica de IHC, am identificat la nivelul ECM o serie de elemente celulare și structurale reprezentate de fibre de Col IV, fibre de Col I, MMP-9, Tn-C și o vascularizație bogată, elemente implicate în reparația post-ischemie, prin mecanisme de fibroză, hipertrofie cardiomiocitară și remodelare post-IMA. Interacțiunile complexe între această multitudine de factori generează un micromediu unic ce asigură funcționalitatea ritmică cardiomiocitară. Orice dezechilibru apărut la nivelul structurii sau compoziției matriciale determină afectarea rețelei reglatorii complexe cardiace, urmat de remodelare.

Sinteza de Col I are rol în realizarea unei rețele ce menține integritatea cardiacă, limitează expansiunea infarctului și previne remodelarea.

Inhibarea secreției de MMP-9 se asociază cu scăderea neoangiogenezei și scăderea fibrozei, ceea ce constituie un instrument valoros în terapia anti-IMA, pentru prevenirea remodelării și apariția insuficienței cardiace.

Cel mai important aspect clinic la pacienții cu IMA a fost reprezentat de remodelarea ventriculară post-infarct, care se caracterizează prin dilatare ventriculară, asociată cu disfuncție sistolică un timp variabil, săptămâni sau luni, după producerea IMA.

Dilatarea cavitaților ventriculare post-IMA se explică prin rearanjarea cardiomiocitelor restante și degradarea matricei interstițiale sub acțiunea MMP-azelor și celulelor inflamatorii.

În cadrul studiului III, din cap.8, am realizat identificarea Tn-C la nivelul interstițiului cardiac în fazele evolutive ale ischemiei, pe care le-am corelat cu datele clinice ale pacienților. Imunoexpresia Tn-C se corelează direct cu populația miofibroblastelor din vecinătatea zonei ischemice, ceea ce arată rolul Tn-C în recrutarea directă a fibroblastelor / miofibroblastelor în zona de ischemie miocardică și remodelare ventriculară post IMA. Tn-C stimulează migrarea fibroblastelor la locul injuriei miocardice, accelerează transformarea fibroblast-miofibroblast și promovează reparația miocardului, prin facilitarea acțiunilor reparatorii cardiace. Cele două cazuri de IMA complicate cu ruptură cardiacă au prezentat imunocolorare difuză interstițială la Tn-C, dovadă a sintezei în exces a Tn-C în faza

inflamatorie a IMA, asociată cu remodelare ventriculară, dilatarea cavităților ventriculare, răspuns inflamator abundent și soluție de continuitate cardiacă. Pe viitor testarea IHC a Tn-C pe endobiopsiile cardiace, corelată cu nivelul seric al Tn-C ar putea fi utilizate ca markeri predictivi pentru remodelarea cardiacă și apariția aritmiilor în cazul pacienților cu boli ischemice cardiace.

Răspunsul celular în cazul țesutului cardiac ischemic s-a caracterizat prin creșterea ECM, cu un răspuns matricelular crescut corelat cu nivelul inflamației, cu un gradient chemotactic crescut pentru recrutarea macrofagelor, ce au condus la sinteza crescută de colagen și formarea cicatricii fibroase.

Îngroșarea endocardului asociată cu creșterea țesutului fibro-conjunctiv subendocardic reprezintă un răspuns adaptativ al cordului la modificările de volum ale VS.

Identificarea Col IV la nivelul zonei de IMA este un indicator al rolului pe care îl are acesta în procesul de reparație post-ischemie. Distribuția Col IV la nivelul zonei de IMA este un proces dinamic, dependent temporal de momentul producerii ischemiei.

Dispoziția Col IV la nivelul ECM s-a caracterizat prin modificarea distribuției și scăderea intensității imunocolorării pericardice și cardiomiocitare, ca urmare a distrugerii membranelor bazale în timpul ischemiei.

Caracterizarea neovascularizației din micromediul cardiac prezentată în studiul III, din cap. 8, ar putea constitui baza de plecare într-o modalitate terapeutică promițătoare în tratamentul pacienților cu IMA reprezentată de terapia proangiogenică.

Prezentul studiu doctoral s-a confruntat și cu o serie de limitări, pe de o parte de natură materială, nedispunând de investigații de microscopie electronică și investigații genetice, care să întregescă tabloul modificărilor ischemice cardiace până la nivel molecular și genetic.

O altă limită a studiului a fost reprezentată de dificultatea obținerii eșantioanelor de investigat, care au fost recoltate exclusiv post-mortem (la necropsie), fără a avea posibilitatea de a recolta fragmente prin biopsie endomiocardică in vivo.

Ca direcție de cercetare viitoare este necesară caracterizarea proteomică și funcțională a tuturor populațiilor celulare prezente în ECM a codului uman, cu realizarea unor "hărți" de distribuție celulară cardiacă, cu rol în facilitarea unei terapii țintite viitoare. Având în vedere că răspunsul fibrotic este dependent de o serie de factori contextuali, este util de dezvoltat strategii de identificare a pacienților cu răspuns fibrotic excesiv și care ar putea beneficia de terapie țintită împotriva stimulilor fibrogenici.

Studiul și descrierea detaliată a modificărilor epigenetice, angiogenezei, cascadei apoptozei ale ECM în leziunile ischemice și insuficiența cardiacă, precum și rolul reglator al MMP-azelor, mARN și TIMP-azelor, vor furniza cheia pentru terapia țintită viitoare la pacienții cu leziuni ischemice.

Bibliografie (selectivă)

- [1] Karbassi E, Fenix A, Marchiano S, Muraoko N, Nakamura K, Yang X, Murry CE. Cardiomyocyte maturation: advances in knowledge and implications for regenerative medicine. *Nat Rev Cardiol*, 17(6): 341–359, 2020
- [2] MacGrogan D, Munch J, de la Pompa JL. Notch and interacting signalling pathways in cardiac development, disease, and regeneration. *Nat. Rev. Cardiol* 15, 685–704, 2018
- [3] Venugopal H, Hanna A, Humeres C, Frangogiannis NG. Properties and Functions of Fibroblasts and Myofibroblasts in Myocardial Infarction. *Cells*, 11(9), 1386, 2022
- [4] Frangogiannis NG. Cardiac fibrosis: cell biological mechanisms, molecular pathways and therapeutic opportunities. *Mol Aspects Med*, 65, 70–99, 2019
- [5] Tallquist MD. Cardiac fibroblast diversity. *Annu Rev Physiol*, 82, 63–78, 2020
- [6] Doppler SA, Carvalho C, Lahm H, Deutsch MA, Dreßen M, Puluca N, Lange R, Krane M. Cardiac fibroblasts: more than mechanical support. *J Thora. Dis*, 9, Suppl 1, 2017
- [7] Alex L, Frangogiannis NG. The cellular origin of activated fibroblasts in the infarcted and remodeling myocardium. *Circ Res*, 122, 540–2, 2018
- [8] Nikolaos G. Frangogiannis. Cardiac fibrosis. *J Cardiovas Res*, 117, 1450-1488, 2021
- [9] Darby IA, Zakuan N, Billet F, Desmouliere A. The myofibroblast, a key cell in normal and pathological tissue repair. *Cell Mol Life Sci*, 73, 1145–1157, 2016
- [10] Shinde AV, Humeres C, Frangogiannis NG. The role of alpha-smooth muscle actin in fibroblast-mediated matrix contraction and remodeling. *Biochim Biophys Acta*, 1863(1), 298–309, 2017
- [11] Lee LL, Khakoo AY, Chintalgattu V. Cardiac pericytes function as key vasoactive cells to regulate homeostasis and disease. *FEBS Open Bio*, 11, 207–225, 2021
- [12] Alex L, Tuleta I, Harikrishnan V, Frangogiannis NG. Validation of Specific and Reliable Genetic Tools to Identify, Label, and Target Cardiac Pericytes in Mice. *Journal of American Heart Association*, 11, e023171, 2022
- [13] Bianco P, Cao X, Frenette PS et al. The meaning, the sense and the significance Translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat Med*, 19, 35–42, 2013

- [14] Nakada Y, Canseco DC, Thet S, Abdisalaam S, Asaithamby A, Santos CX, Shah AM, Zhang H, Faber JE, Kinter MT, Szweda LI, Xing C, Hu Z, Deberardinis RJ, Schiattarella G, Hill JA, Oz O, Lu Z, Zhang CC, Kimura W, Sadek HA. Hypoxia induces heart regeneration in adult mice. *Nature*, 541(7636), 222-227, 2017
- [15] Müller P, Heiko Lemcke H, Robert David R. Stem Cell Therapy in Heart Diseases – Cell Types, Mechanisms and Improvement Strategies. *Cell Physiol Biochem*, 48, 2607-2655, 2018
- [16] Goldsmith EC, Bradshaw AD, Zile MR, Spinale FS. Myocardial Fibroblast-Matrix Interactions and Potential Therapeutic Targets. *J Mol Cell Cardiol*, 0, 92–99, 2014
- [17] Litviňukova M, Talavera-Lopez C, Maatz H, Reichart D, Worth CL, Lindberg EL, Kanda M, Polanski K, Heinig M, Lee M, et al. Cells of the adult human heart. *Nature*, 588, 466–472, 2020
- [18] Pinto AR, Ilinykh A, Ivey MJ, Kuwabara JT, D’Antoni ML, Debuque R, Chandran A, Wang L, Arora K, Rosenthal NA, et al. Revisiting cardiac cellular composition. *CircRes*, 118, 400–409, 2016
- [19] Ong SB, Hernandez-Resendiz S, Crespo-Avilan GE et al. Inflammation following acute myocardial infarction: multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities. *Pharmacology & Therapeutics*, 186, 73–87, 2018
- [20] Hasan AS, Luo L, Yan C et al. Cardiosphere-derived cells facilitate heart repair by modulating M1/M2 macrophage polarization and neutrophil recruitment. *PLoS One*, 11, 10, 2016
- [21] Samsonraj R, Raghunath M, Nurcombe V, Hu j, van Wijnen aj, Cool SM. Concise review: multifaceted characterization of human mesenchymal stem cells for use in regenerative medicine. *Stem cells translational medicine*, 6, 2173–2185, 2017
- [22] Frangogiannis NG. The extracellular matrix in ischemic and nonischemic heart failure. *Circulation Research*, 125, 117–146, 2019
- [23] van Hinsbergh VW, Koolwijk P. Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovascular Research*, 78, 203–212, 2008
- [24] Imanaka-Yoshida K; Tawara I; Yoshida T. Tenascin-C in cardiac disease: A sophisticated controller of inflammation, repair, and fibrosis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*, 319, C781–C796, 2020
- [207] Frangogiannis NG. The extracellular matrix in ischemic and nonischemic heart failure. *Circulation Research*, 125, 117–146, 2019

[25] Imanaka-Yoshida, K. Tenascin-C in Heart Diseases—The Role of Inflammation. *Int. J. Mol. Sci*, 22, 5828, 2021

[26] Zheng M, Jacob J, Hung SH, Wang J. The Hippo Pathway in Cardiac Regeneration and Homeostasis: New Perspectives for Cell-Free Therapy Biomolecules in the Injured *Heart*, 10, 1024, 1-15, 2020

LISTA DE LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE ÎN REVISTE DE SPECIALITATE

1. **Ceașu Z**, Socea B, Dimitriu MCT, Predescu D, Constantin VD, Bacalbașa N, Cîrstoveanu C, Costache M, Ceașu M. Dormant cardiac stem cells: A promising tool in cardiac regeneration. *Exp Ther Med.*, 20(4), 3452-3457, 2020.
<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2020.9015>
2. **Ceașu Z**, Socea B, Costache M, Predescu D, Șerban D, Smarandache CG, Pacu I, Alexandru HH, Davițoiu AM, Jacotă-Alexe F, Cîrstoveanu C, Dimitriu MCT, Pleș L, Ceașu M. Fibroblast involvement in cardiac remodeling and repair under ischemic conditions. *Exp Ther Med.*, 21(3), 269, 2021.
<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2021.9700>
3. **Ceașu Z**, Popa M, Socea B, Gorecki GP, Costache M, Ceașu M. Influence of the microenvironment dynamics on extracellular matrix evolution under hypoxic ischemic conditions in the myocardium. *Exp Ther Med.*, 23(3), 199, 2022.
<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2022.11122>
4. **Ceașu Z**, Socea B, Dimitriu M, Gheorghiu D, Pacu I, Bacalbasă N, Serban D, Costache M, Ceașu M. Immunohistochemistry and Biochemistry Features of Interstitial Mesenchymal Cells in Ischemic Cardiac Diseases. *Rev. Chim.*, 71(7), 436-443, 2020.
<https://doi.org/10.37358/RC.20.7.8261>