



**Academia Română**  
**Institutul de Biologie București**

# **TEZĂ DE DOCTORAT**

**Cercetări morfofuncționale asupra sistemului nervos trigeminal la  
nivelul bazei craniului**

## **REZUMAT**

Conducător de doctorat  
Cercetător științific gradul I  
Dr.Mirancea Nicolae

Doctorand  
Prof.Dr.Hab.Rusu Mugurel  
Constantin

București, 2016

# CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

INTRODUCERE	7
PARTEA GENERALĂ A TEZEI DE DOCTORAT	9
1	NOȚIUNI DE ANATOMIE CELULARĂ ULTRASTRUCTURALĂ 10
1.1	Organitele citoplasmatice 10
1.2	Citoscheletul 13
1.3	Incluziunile citoplasmatică 14
1.4	Nucleul 15
1.5	Organizarea organitelor în celulă 19
1.6	Siturile de atașament celular 19
2	DATE DIN LITERATURĂ PRIVIND MORFOGENEZA GANGLIONILOR NERVOȘI DE LA NIVELUL BAZEI CRANIULUI 21
2.1	Creasta neurală 22
2.2	Placodele ectodermale 26
3	DATE DIN LITERATURĂ ASUPRA ANATOMIEI GANGLIONARE ADULTE 29
3.1	Elemente de anatomie a ganglionului trigeminal 29
3.2	Microstructura sistemului nervos periferic 31
3.3	Anatomia ultrastructurală a țesutului nervos periferic 35
3.4	Micro- și ultrastructura nervilor periferici 41
3.5	Conexiunile centrale și periferice ale neuronilor trigeminali primari 42
3.6	Comunicările intercelulare ale neuronilor aferenți primari trigeminali 44
3.7	Receptorii c-kit în sistemele somestezice 44
3.8	Activarea circuitelor trigeminale nociceptive 47
3.9	Barierele hemato-neurale 49
4	ANATOMIA NIȘELOR STEM 51
4.1	Celulele stem și celulele progenitoare 51
4.2	Nișele celulare stem 52
PARTEA PERSONALĂ A TEZEI DE DOCTORAT	56
5	POTENȚIALUL STEM/PROGENITOR LA NIVELUL GANGLIONULUI TRIGEMINAL UMAN ADULT 57
5.1	Ipotezele de lucru 57
5.2	Material și metode 60
5.3	Rezultate – progenitorii neuronogliai 68
5.4	Rezultate – expresia neuronală a c-kit, celule interstițiale c-kit+, telocite trigeminale și progenitori vasculari endoteliali 72
5.5	Discuții – progenitorii neuronogliai trigeminali 94
5.6	Discuții – expresia c-kit în ganglionul trigeminal 104
5.7	Discuții – nișa stem pială și formarea de neovase intrinseci trigeminale 111
6	ROLUL CELULELOR SCHWANN ÎN REGENERAREA ȘI SUPRAVIEȚUIREA NEURONILOR TRIGEMINALI PERIFERICI 135
6.1	Introducere 136
6.2	Material și metodă 142

6.3	Rezultate	144
6.4	Discuții – obiectivarea morfologică a proceselor de de- și re-generare axonală intraganglionară	152
6.5	Discuții – semnalizarea glio-neuronală prin exozomi și vezicule extracelulare	159
7	ANATOMIE MITOCONDRIALĂ ALTERATĂ ÎN NEURONII TRIGEMINALI PERIFERICI, ÎN DIABET	165
7.1	Date din literatură	165
7.2	Material și metodă	177
7.3	Rezultate	178
7.4	Discuții	186
	CONCLUZIILE TEZEI DE DOCTORAT	193
	BIBLIOGRAFIE	195
	INDEX DE FIGURI ÎN TEXT	213
	ANEXA 1 – ARTICOLE ISI-WEB OF SCIENCE PUBLICATE DIN TEMATICA TEZEI DE DOCTORAT	223

## Cuvinte-cheie

ganglion trigeminal; imunohistochimie; microscopie electronică de transmisie; nișe stem; celule stem; celule progenitoare; telocite; celule Schwann; mitocondrii; ribozomi; plăci ribozomale periaxolemale.

# Potențialul stem/progenitor la nivelul ganglionului trigeminal uman adult

## Ipotezele de lucru

(1) Sunt studii care au identificat expresia c-kit în unii neuroni senzitivi periferici. Chiar dacă rolul receptorilor c-kit este strâns legat de nocicepție, nu există studii suficiente care să extrapoleze la om rezultatele experimentelor pe animale. Am propus deci această ipoteză și am avut ca scop evaluarea expresiei c-kit în ganglionul trigeminal uman, în neuroni care să poată fi corelați cu circuite funcționale nociceptive și în tipuri celulare intraganglionare non-neuronale. (2) Expresia nestinei corespunde unui status celular nediferențiat. O subpopulație de celule progenitoare din ganglionii spinali exprimă nestina și a fost indicată ca jucând un rol în neuronogeneză. Se cunoaște și faptul că celule stem rezidente din ganglionii senzitivi se pot diferenția fie în neuroni, fie în celule Schwann. Scopul studiului acesta a fost de a testa expresia nestinei în ganglionul trigeminal uman adult. (3) Studii experimentale au demonstrat prezența în ganglionii senzitivi a celulelor progenitoare derivate din creasta neurală, nestin-pozitive. Aceste evidențe nu au mai fost documentate prin microscopie electronică de transmisie (TEM). Astfel, scopul acestui studiu a fost de a evalua în TEM dacă, sau nu, o subclasă de celule satelite gliale (CSG) ar putea să fie calificată ultrastructural pentru un fenotip progenitor, diferit de standardele ultrastructurale ale CSG. (4) La adult, telocitele (TC), care sunt celule fibroblastoide, ar putea fi considerate celule stem (stromale) mezenchimale (MSC) multipotente. Am urmărit realizarea unui studiu care să testeze expresia CD34 și a c-kit la nivelul gg.trigeminal uman adult; un studiu TEM al celulelor ganglionare fibroblastoide a fost adăugat. (5) Telocitele, definite în 2010 precum un nou tip celular, sunt celule caracterizate exclusiv morfologic, precum „*celule cu telopode*”, telopodele fiind prelungiri lungi, subțiri și moniliforme. Până în prezent nu au fost identificați markeri specifici pentru telocite, deși numeroase studii le asociază cu markeri de asemenea exprimați în celule endoteliale, precum CD34, vimentina, endoglina, VEGF; au mai fost apreciați ca având exprimare pozitivă în telocite  $\alpha$ -SMA și, inconstant, c-kit. A fost de asemenea discutat rolul activ al telocitelor în procesele de formare de neovase. Inconsistența evaluării unui fenotip molecular specific al telocitelor este demonstrată și de faptul că experimentele prin care s-a urmărit evaluarea telocitelor le sortează strict pe criteriul morfologic și nu pe baza unui anumit fenotip imunohistochimic. Am ridicat ipoteza că telocitele, mai mult decât a fi în fapt celule cu potențial stem sau progenitor, pot fi progenitori endoteliali. Am avut astfel ca scop demonstrarea ipotezei la nivel molecular și ultrastructural.

## Material și metode

Pentru acest studiu au fost prelevate specimene postautopsice – ganglioni trigeminali umani. Metode: imunohistochimie pe piese la parafină (IHC-P) și microscopie electronică de transmisie (TEM). Au fost folosiți următorii anticorpi primari: CD10; CD117/c-kit; CD146; CD31; CD34; CD45; CD68; c-erbB2; citokeratina 7 (CK7); factor von Willebrand (vWF); lanțul greu de miozină din mușchiul neted (SMM); nestină; neurofilamente; Stro-1; VEGFR-2; vimentină;  $\alpha$ -actina mușchiului neted ( $\alpha$ -SMA). Microscopia electronică de transmisie: preparare standard, secțiuni semifine și ultrafine. Explorare și documentare a grilelor în TEM.

## Progenitorii neuronogliai

Neuronii trigeminali primari au fost nestin-negativi. Un fenotip nestin pozitiv a fost identificat în celulele ale capsulelor satelite, precum și în celulele endoteliale ale microvaselor din ganglionul trigeminal. În TEM au fost identificate celule în contact cu neuronii, aparținând anvelopelor neuronale, însă diferite ultrastructural de CSG și caracterizate printr-un status inactiv: (a) talie celulară mică; (b) nucleu mic heterocromatic; (c) o mare cantitate de ribozomi liberi citoplasmatici; (d) puține mitocondrii, localizate perinuclear; (e) câteva cisterne, ocazional dilatate, de reticul endoplasmic rugos; (f) complexe Golgi absente; (g) mănunchiuri de filamente intermediare au fost observate ocazional, de regulă în localizare perinucleară. Am remarcat de asemenea prezența în regiunea perinucleară a progenitorilor neuronogliai a corpurilor multiveziculari. Unele astfel de celule progenitoare neuronogliale au prezentat fragmente cromatinice intracitoplasmatiche sugestive pentru caracterul lor proliferativ.

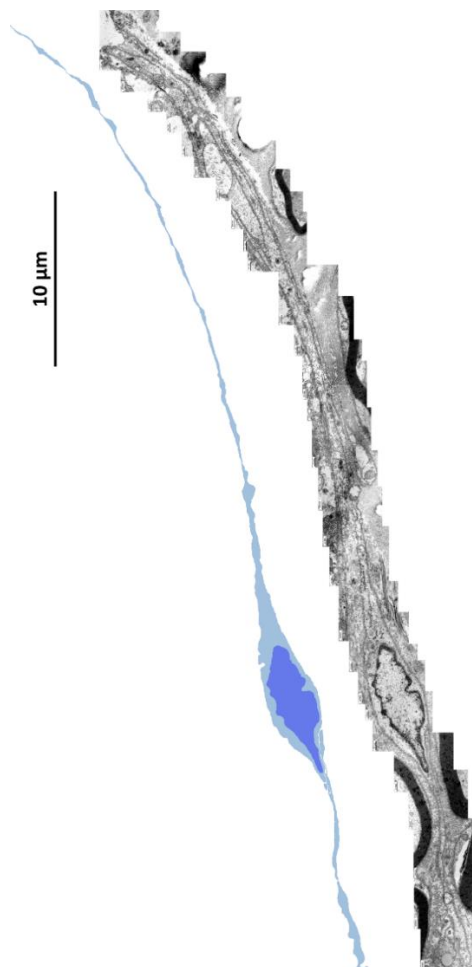
## Expresia c-kit în celule interstițiale și neuroni trigeminali periferici

Prin imunomarcare cu CD117/c-kit am identificat în ganglionul trigeminal două tipuri de neuroni: (i) neuroni trigeminali c-kit-pozitivi și (ii) neuroni trigeminali c-kit negativi. Procesele neuronale au exprimat de asemenea c-kit. De asemenea, am identificat fibre nervoase c-kit-pozitive în interstițiile inter-neurono-gliale. Am evidențiat și mastocite c-kit-pozitive, de regulă în vecinătatea microvaselor sanguine. Am realizat identificări ale expresiei c-kit și a neurofilamentelor (clona RT97) pe secțiuni succesive, în aceleași some neuronale. Am pus în evidență faptul că neuronii care exprimau c-kit erau negativi pentru RT97 iar neuronii c-kit negativi erau marcați evident cu RT97. Am făcut diferența clară între neuronii c-kit pozitivi și cei fals c-kit pozitivi care conțineau lipofuscină. Am identificat asemenea prelungiri celulare fine, moniliforme, cu un traiect circumferențial peste periferia unităților neurono-gliale, fie cu neuroni c-kit-pozitivi, fie cu neuroni care nu exprimau c-kit. Cele mai multe asemenea procese au fost intricate pe lamele de imunohistochimie cu anvelopele compuse din celule satelite gliale. În unele situații corpul celular al acestor celule a fost evidențiat, având morfologie fusiformă, distinct de celulele satelite. Aceste celule fusiforme nu au exprimat neurofilamente.

## Telocitele trigeminale

Aprecierea imunohistochimică a expresiei CD34 a condus la identificarea de celule interstițiale cu prelungiri lungi și moniliforme, formând o veritabilă rețea intraganglionară; am făcut distincția acestor celule cu celulele endoteliale CD34-pozitive ale patului microvascular intraganglionar, ultimele formând un șir dublu, cu hematii la interior. Rețelele stromale de celule fusiforme cu prelungiri lungi erau dispuse și în vecinătatea fasciculelor nervoase și microvaselor intraganglionare. Am identificat TC cu lungimi cuprinse între 15 μm și 53 μm. Acestea se găseau fie în poziție indiferentă în țesutul interstițial, sau învecinate cu microvase, fibre nervoase intraganglionare și unitățile neuronogliale. Am observat frecvent în jurul somelor celulare și telopodelor o lamină bazală discontinuă, intercalată între plasmalemă și fibrilele pericelulare de collagen. Am pus clar în evidență telopodele. Am identificat some celulare alungite, fusiforme, cu două telopode pornind din extremitățile acestora și, de asemenea, am observat some celulare triunghiulare în cazul TC cu trei telopode. Nucleul a fost ovoidal sau triunghiular, cu cromatină condensată marginalizată. Ocazional am observat 1-2 nucleoli. Telocitele trigeminale pe care le-am evaluat au prezentat caveole plasmalemale.

**Ganglion trigeminal uman adult. Imaginea rezultă după concatenarea digitală a 28 de micrografii de secțiune ultrafină; a fost realizată diagrama, prin supracolorare, redimensionare și alăturare. Se prezintă un telocit fusiform, cu procese lungi, subțiri și moniliforme (telopode).**



### **Nișa stem pială, celule stem stromale și progenitori endoteliali în ganglionul trigeminal**

În microscopia optică ganglionul trigeminal a apărut acoperit de un mezoteliu pial HER-2-pozitiv. Sub învelișul mezotelial am identificat o microstromă HER-2-pozitivă, ce îngloba tubi endoteliali. Stratul mezotelial acoperea deopotrivă fasciculele nervoase trigeminale și arteriolele piale. Unitățile neuronogliale erau acoperite de o microstromă HER-2-pozitivă, în care se aflau TC. În interstițiile intraganglionare am identificat expresia HER-2 în celule izolate de aspect fibroblastoid care, în unele instanțe, păreau a se alinia pentru a configura o morfologie tubulară de tip capilar. CD31 a fost exprimat în celulele endoteliale ale microvaselor intraganglionare; atunci când erau secționare longitudinal, celulele CD31-pozitive aveau o morfologie similară telocitelor. Sub mezoteliul pial am identificat cluster de celule CD31-pozitive care proiectau filopode și formau rețele vasculogenice. Microstroma din jurul unităților neuronogliale a exprimat și CD31. Celulele de la nivelul acestor unități vasculogenice intraganglionare (UVI) aveau morfologii variabile, inclusiv telocitare. Astfel de celule, precum și cele endoteliale, au exprimat și VEGFR-2. La nivelul UVI am identificat de asemenea celule nestin-pozitive ale liniei endoteliale; am identificat expresia nestinei și în celule ale capsulelor gliale ale neuronilor. Celule nestin-pozitive cu morfologie telocitară erau aplicate pe capsulele neuronale. Am găsit expresia CD10 și la nivelul UVI și în celule cu morfologie telocitară aplicate pe unitățile neuronogliale. Imunomarcarea cu c-kit a demonstrat expresia pozitivă consistentă a antigenului la nivelul stratului subpial, în mastocitele intraganglionare și în celule

progenitoare localizate în UVI. CD34 a marcat endoteliile microvasculare precum și UVI. Aceste rețele vasculogonice erau unite prin celule CD34- pozitive cu morfologie telocitară, celule identificate și la nivelul tecilor perineurale. În interstițiile ganglionare am găsit de asemenea celule de talie mică, izolate, cu raport nucleocitoplasmatic supraunitar, care exprimau CD34, proiectau, eventual, filopode subțiri și scurte, pe care le-am considerat celule stem/progenitoare. Celule histologic similare au exprimat și CD68, expresia pozitivă a CD68 fiind prezentă și în telocitele aplicate pe capsulele neuronale. Am găsit expresia izolată a Stro-1 în celule stem/progenitoare stromale localizate între unitățile neurogliale și în interiorul fasciculelor nervoase intraganglionare. Membranele neuronilor trigeminali au exprimat CD146; celulele satelite gliale au fost CD146-negative. Celulele endoteliale microvasculare au fost de asemenea CD146- pozitive, antigenul respectiv fiind de asemenea prezent la nivelul UVI. Am evidențiat de asemenea celule stem/progenitoare CD146- pozitive intraganglionare și intraneurale. De asemenea, pericitele și celulele musculare netede vasculare au exprimat CD146. Alfa-actina mușchiului neted ( $\alpha$ -SMA) a fost prezentă exclusiv la nivelul celulelor musculare netede vasculare și pericitelor, UVI fiind  $\alpha$ -SMA-negative. Am decelat expresia CK7 în celulele mezoteliale ale piei mater, în celulele adventiciale de la nivelul vaselor largi și în celule stromale intraganglionare izolate. Evaluarea interstițiilor ganglionare în microscopia electronică de transmisie a adus evidențe în suportul celor obținute prin imunohistochimie. Astfel, au fost obiectivate celule cu morfologie și ultrastructură caracteristică telocitelor. Diagnosticul anatomic al lumenelor capilare a permis diagnosticul diferențial între telocite și celule endoteliale, care, ultrastructural, sunt destul de asemănătoare. Diferențele ultrastructurale între telocite și fibroblaști au fost evidente, fibroblaștii prezentând un aparat de sinteză bine configurat. La nivelul mănunchiurilor neurovasculare intraganglionare cu vase de calibru mare am identificat celule cu fenotip ultrastructural progenitor, în situsuri perivasculare. Diferite celule au fost prezente pe grile în lumenele microvasculare, înglobate în patul de hematii; unele dintre aceste celule intravasculare, deci circulante, au prezentat un fenotip ultrastructural sugestiv pentru calitatea de celule stem/progenitoare. Celulele endoteliale ale microvaselor rezidente, precum și pericitele aplicate abluminal peste celulele endoteliale, au prezentat caracteristic plăci dense plasmalemale. Joncțiunile interendoteliale au fost de tip adherens și *tight junctions*. Am identificat de asemenea celule cu fenotip endotelial-like care prezentau vacuole largi, pe care le-am considerat precum capilare născânde; apartenența la linia endotelială a acestora a fost indicată de prezența intracitoplasmatică a corpilor Weibel-Palade, patognomonici pentru linia endotelială. Corpii Weibel-Palade am identificat și în celule endoteliale mature. Evidența unei structuri de tip Weibel-Palade într-o celulă progenitoare neuroglială îmi permite ipoteza potențialului angiogenic al acestor celule intricate cu celule satelite în capsulele neuronale. În stroma interstițială intraganglionară am identificat relativ frecvent celule cu un fenotip ultrastructural particular. Acestea au prezentat nuclei eucromatici, cu bordură de cromatină condensată, citoplasmă și prelungiri bine reprezentate, plasmalema prezentând caracteristic plăci dense plasmalemale. O altă particularitate a acestor celule a fost citoscheletul reprezentat de abundente filamente intermediare, acestea prezentându-se precum conținutul aproape exclusiv al citoplasmei. Am identificat rare mitocondrii și reticul endoplasmic rugos cu cisterne dilatate. Aparatul de semnalizare asociat plasmalemelor a inclus vezicule și caveole subplasmalemale. În matricea pericelulară am identificat corpi multiveziculari. Am remarcat de asemenea prezența unei lamine bazale, aplicată peste plasmalema acestor celule. Prezența corpilor Weibel-Palade în aceste celule stromale cu fenotip nediferențiat a indicat faptul că sunt celule progenitoare endoteliale. Caracterul progenitor a fost susținut și de morfologia nucleolară, precum și de evidența intracitoplasmatică a centrilor de organizare microtubulară în care se schițau doar formațiile caracteristice centriolilor. Evidența proceselor de vasculogeneză intraganglionară a fost demonstrată și de formarea rețelelor caracteristice de către progenitori endoteliali.



# Rolul celulelor Schwann în regenerarea și supraviețuirea neuronilor trigeminali periferici

Menținerea stabilă a structurii axonale este critică pentru funcția sa. Conceptul tradițional este cel conform căruia macromoleculele, precum proteinele, sunt sintetizate în soma neuronală și transmise în axon prin transport axoplasmic. Sunt însă grupuri de cercetare care combat această teorie și susțin sinteza locală în axon a proteinelor necesare pentru a suplimenta aportul din soma neuronală. O a treia teorie, modernă, indică precum un mecanism de aport suplimentar de proteine în axon transferul din glia adaxonală în axon prin vezicule extracelulare. Celulele Schwann (CS) reglează o serie de funcții axonale. Răspunsul CS la leziunile nervoase reprezintă baza regenerării și reparației nervilor în sistemul nervos periferic.

Am identificat prezența de corpi multiveziculari în citoplasma adaxonală a CS, ceea ce a indicat rolul CS în semnalizarea glio-axonală prin capacitatea de a elibera exozomi. Frecvent am identificat dilatații și sferoide axonale. Morfologia respectivă a asociat straturi alternative, microveziculare și mielince subțiri, care înveleau axonul. Prezența axonului și lipsa, atât a compactării cât și a unui contur perixonal complet al mielinei, au indicat desfășurarea unor procese de regenerare la nivel axonal. Veziculele similare celor adaxonale au populat citoplasma perinucleară abaxonală a CS. Caracteristica regenerativă a fost susținută și de lipsa unei axoleme interpușe între axon și stratul microvezicular glial adaxonal. La nivelul unor sferoide axonii lipseau iar teaca de mielină, incompletă circumferențial și subțire, conținea doar microvezicule și vacuole largi. La interiorul tecii de mielină axonul ocupa un spațiu redus față de conținutul intramielinic, disproporționat mai mare, de microvezicule. O conformație ultrastructurală diferită de structurile regenerative discutate a fost reprezentată, la nivelul fibrelor mielinice cu mielină aparent indemnă și axoni anatomic nealterați, de morfologia porțiunilor adaxonale ale CS. La acel nivel am identificat fie (a) segmente celulare unice, îngustate, între axolemă și teaca de mielină (b) fie protruții cu aspect vezicular ale citoplasmei adaxonale a CS, fie (c) prelungiri aparent nanotubulare. Astfel de vezicule formau la nivelul axolemei buzunare de endocitoză cărora le corespundeau subaxolemale vezicule cu membrană dublă. Am remarcat conținutul granular, de ribozomi-like al acestor protruții/vezicule, aparent având rolul de a transfera axonilor conținut citoplasmatic glial. Am identificat de asemenea în axoni prezența ribozomilor, de regulă grupați în poliribozomi. Densitatea subaxolemală a ribozomilor a apărut evidentă în unele instanțe. Am identificat plăci ribozomale periaxoplasmice. Am decelat polarizarea ribozomilor la nivelul CS, către tecile de mielină învecinate. Aceste evidențe indică disponibilitatea morfologică a CS de a transfera material ribozomal în axoni, posibilitate care are un determinant anatomic pozitiv, acela al spațiului extracelular de valoare nulă prin care se face semnalizarea glioaxonală. La nivelul sferoidelor axonale tecile de mielină au apărut imature și incomplete, septate prin straturi microveziculare și asociate cu axoleme absente sau incomplete, indicând procese active de regenerare axonală.

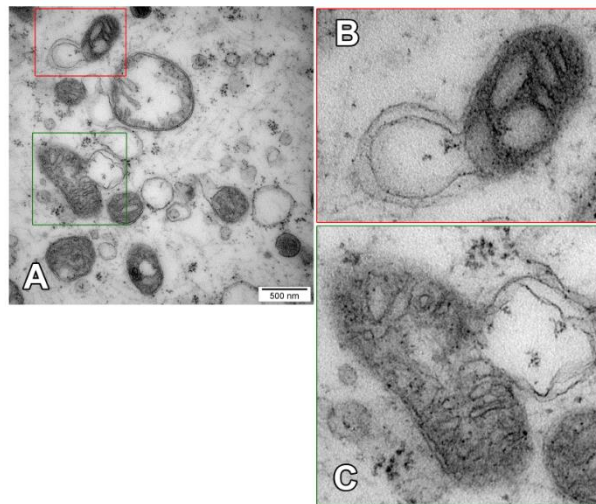
Rezultatele mele permit obiectivarea la nivelul ganglionului trigeminal a conceptului modern privind regenerarea axonală. După leziunea localizată a unui axon, distal de sediul leziunii se produce degenerarea Walleriană anterogradă, care afectează axonul, terminațiile acestuia și teaca de mielină; CS se dediferențiază și împreună cu macrofagele fagocitează resturile tecii de mielină. Aceste modificări au loc distal de leziune, propagându-se de-a lungul segmentului axonal distal; Cajal a descris însă și o degenerare retrogradă de tip Wallerian care se extinde înapoi în lungul fibrei nervoase cel mult până la primul nod Ranvier proximal de sediul leziunii. Distal de leziune axonul se dilată inițial (varicosități

axonale) iar ulterior se rupe într-o serie de sfere tapetate de membrane (sferoide axonale), proces care evoluează distal de situsul leziunii. Dacă este posibilă regenerarea unui nou axon, distal de sediul leziunii, în sistemul nervos periferic, este necesară o teacă endoneurială (lamina bazală) intactă care să ghideze noul axon spre ținta periferică. Reduplicarea CS începe după leziuni iar înmugurirea axonilor la puțin timp după aceea. Dacă nu a fost afectată continuitatea tubulară a laminei bazale aceasta va acționa pentru ghidajul mugurilor (*sprouts*) axonali. Inițial aceștia sunt foarte mici și corespund unei singure CS; pe măsură ce cresc și se disociază fiecare va asocia o CS individuală. Pe măsură ce mugurii axonali se alungesc, CS se deplasează cu aceștia și vor ajunge să formeze și teci de mielină însă, dacă axonii neoformați nu fac contact cu țesuturi țintă vor degenera. Am identificat structuri înconjurate de teci de mielină subțiri și incomplete circumferențial la nivelul cărora am decelat abundență mitocondrială și veziculară. Aceste structuri corespund conurilor de creștere axonală la nivelul cărora au fost descrise ca fiind caracteristice mitocondriile numeroase, diverse vezicule și vacuole, neurotubulii și o cantitate mică de reticul endoplasmic neted; celulele non-axonale se plasează între conul de creștere și lamina bazală, aceasta din urmă putând conține o cantitate mică de reziduu celular. Am însă în vedere faptul că am identificat structuri învecinate, care aparent prezentau caracteristicile ultrastructurale ale unui con axonal de creștere, localizat proximal de un situs de întrerupere/degenerare axonală. Însă, la nivelul uneia dintre structurile respective am identificat prezența unei axoleme incomplete, iar la nivelul structurii vecine, anatomic comparabilă cu prima din punctul de vedere al stratului mitocondrial ce acoperea un miez microvezicular, nu am decelat înveliș axolemal. Acest fapt poate fi explicat prin aceea că morfologia sferoidelor axonale și cea a conurilor de creștere este comparabilă. O diferență în favoarea unui proces regenerativ pe care l-am identificat o reprezintă morfologia imatură a tecii de mielină, fără evidența unor leziuni ale acesteia. Sunt diverse insulte tisulare ce pot declanșa degenerarea axonilor, care răspund cu diverse morfologii, topologii și viteze. Sunt două modele morfologice ale degenerării axonale: (a) modelul „*dying back*” în care degenerarea fiecărui axon începe la capătul distal al acestuia și se deplasează retrograd și (b) modelul leziunii localizate (*focal lesion*) în care leziuni localizate determină degenerescența Walleriană a segmentului axonal localizat distal de sediul leziunii, segmentul proximal al axonului respectiv rămâne intact.

## **Anatomie mitocondrială alterată în neuronii trigeminali periferici, în diabet**

Neuronii ganglionilor senzitivi sunt expuși stressului oxidativ în diabet. Morfologiile mitocondriale alterate se datorează dinamicii mitocondriale dezechilibrate (fuziune, fisiune mitocondrială) și remodelării cristelor mitocondriale. Acest studiu a urmărit să evalueze în microscopia electronică de transmisie modificările mitocondriale în ganglioni trigeminali diabetici, sugestive pentru amorsarea apoptozei atunci când lipsesc semnele clasice ale acesteia din urmă. Au fost utilizați șobolani adulți rasa Wistar la care s-a realizat diabet experimental, indus cu streptozotocină. Am fost apreciate de asemenea specimene de țesut uman. În specimenele diabetice umane au fost identificate trei tipuri de distribuție: (a) mitocondrii mici electronodense rezultate aparent din procese de fisiune; (b) mitocondrii mici electronodense cu leziuni, precum veziculații de flanc, cu înveliș unic sau dublu, vezicule matriciale largi și leakage în citozol de specii reactive, amestecate cu mitocondrii mai alge, electronotransparente, dilatate și cu cristoliză; (c) mitocondrii electronotransparente prevalente. La șobolanii tratați cu streptozotocină am identificat prevalența distribuției mitocondriale de tip (c). Totuși, în neuronii nociceptivi a fost prezentă o distribuție diferită: mitocondrii mari și gigante, sugerând alterarea fisiunii

mitocondriale, fenestrații mitocondriale, vezicule matriciale interconectate prin criste lamelare și leakage mitocondrial în citozol.



**Neuron trigeminal adult diabetic (diabet tip 2). Vezicule mitocondriale herniate (A), detaliate la mărire crescută (chenare roșu și verde, C, respectiv D). Se decelează dubla membrană veziculară formată de membrana mitocondrială externă și membrana mitocondrială limitantă internă.**

## Concluzii

1. Centrul de control periferic, localizat la nivelul bazei craniului, al sistemului trigeminal este reprezentat de ganglionul trigeminal al lui Gasser. Deși extrem de multe studii, mai ales experimentale, au investigat acest ganglion din punctul de vedere al neurotransmisiei și neuromodulării trigeminale, a fost ignorat aproape complet potențialul regenerativ la acest nivel. Acest potențial există cu certitudine după cum reiese din cercetările mele exploratorii.
2. Deși în anatomia microscopică uzuală unitățile neuronogliale ale ganglionilor senzitivi periferici sunt considerate a fi compuse din neuroni periferici și celule satelite gliale, am pus în evidență prin imunohistochimie și am confirmat rezultatele în microscopia electronică de transmisie, faptul că în alcătuirea capsulelor gliale ale neuronilor periferici trigeminali se găsesc și celule nediferențiate pe care le-am indicat precum progenitori neuronogliale. Deși morfologic acești progenitori par a fi orientați către linia celulară glială, nu se poate exclude potențialul acestora în neuronogeneza trigeminală periferică. Prezența de corpi Weibel-Palade în progenitorii neuronogliale poate indica un proces de transdiferențiere a acestor progenitori, mai ales dacă se ia în considerare stroma abundent microvasculară a ganglionului trigeminal.
3. Populația neuronală periferică este heterogenă. Cu toate acestea imunomarcarea cu c-kit poate reprezenta un instrument util pentru evaluarea neuronilor trigeminali nociceptivi și pentru a investiga selectiv interacțiunile posibile dintre neuroni și celulele satelite adiacente. Imunomarcarea doar cu c-kit nu poate asocia ferm acest marker cu nocicepția dar având în vedere că neuronii trigeminali nociceptivi sunt săraci în neurofilamente, evidența adusă de mine leagă neuronii trigeminali c-kit pozitivi de calea trigeminală nociceptivă.

4. Am studiat în imunohistochimie și microscopie electronică de transmisie celulele stromale ale ganglionului trigeminal. Inițial acestea au îndeplinit criteriile pentru a fi indicate precum celule interstițiale Cajal-like. Ulterior, prin schimbarea terminologică au fost indicate precum telocite. Telocitele însă reprezintă doar o caracteristică morfologică a celulelor și în prezent nu a fost identificat un fenotip molecular cert al acestora. Cercetările mele au adus argumente convingătoare privind un subset, cel puțin, de telocite trigeminale, care se califică drept progenitori endoteliali. Rolul acestora în mentenanța patului microvascular trigeminal este deosebit de important pentru funcția ganglionară.
5. O teorie modernă privind regenerarea nervilor indică precum mecanism de aport suplimentar de proteine în axon transferul din glia adaxonală în axon prin vezicule extracelulare, precum exozomii. Transferul de macromolecule de la celulele Schwann la axoni a fost reconsiderat, ca fiind mediat de vezicule. În prezent a fost pusă în evidență prezența exozomilor și microveziculelor în celulele gliale de la nivelul sistemului nervos central, însă astfel de evidențe în sistemul nervos periferic lipsesc. Am obținut evidențe inedite privind semnalizarea prin microvezicule și exozomi la nivelul ganglionului trigeminal uman adult, proces de care sunt responsabile celulele Schwann ganglionare. Faptul că astfel de procese regenerative axonale implică dediferențieri ale celulelor gliale, impune ca și celulele Schwann să fie incluse în nișa stem ganglionară adultă. Mai mult, transferul de ribozomi în axonii trigeminali face din celulele Schwann jucători relevanți în menținerea integrității funcționale a nervului trigemen. Posibilitatea comunicării glio-axonale prin canale nanotubulare nu poate fi ignorată, însă studii ulterioare trebuie să aprofundeze acest aspect. De asemenea, nanostructuri nou identificate, precum argozomii sau organitele vezicolo-vacuolare trebuie validate temeinic pentru a fi asociate cu celulele Schwann.
6. Modelul ultrastructural al leziunilor mitocondriale în neuronii periferici trigeminali poate oferi indicii privind inițierea apoptozei prin mecanism intrinsec, chiar și atunci când semnele clasice ale apoptozei nu sunt prezente. Studii ulterioare, combinând tehnici biochimice și ultrastructurale ar permite o mai bună cuantificare a gradului în care leziunile mitocondriale, cu modificări ale membranelor mitocondriale și deversare în citosol, ar putea folosi precum semne sugestive pentru punctul fără de întoarcere al apoptozei.