



Școala de studii avansate a
Academiei Române



Institutul de Biologie și Patologie
Celulară „Nicolae Simionescu”

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

cu titlul

Efectul hormonilor androgeni asupra celulelor stromale mezenchimale/progenitoare implicate în regenerarea cardiovasculară

Susținută în data de 19.12.2018,

**Aula George Emil Palade a Institutului de Biologie și Patologie
Celulară „Nicolae Simionescu”**

Coordonator: Acad. Maya Simionescu

Doctorand: Popa Mirel Adrian

Teza de doctorat poate fi consultată la

Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”

CUPRINS

Listă abrevieri	8
Introducere și obiectivele generale ale tezei	11

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

I. Introducere	15
1. Hormonii androgeni	15
1.1. Efecte biologice	15
1.2. Sinteza și metabolismul	15
1.3. Receptorii pentru androgeni	17
1.4. Mecanisme de acțiune a hormonilor androgeni (acțiuni genomice vs. non-genomice)	19
2. Androgenii și bolile cardiovasculare	21
3. Caracteristicile celulelor stromale mezenchimale (MSC) și a celulelor endoteliale progenitoare (EPC) umane	24
4. Rolul MSC și EPC în remisia bolilor cardiovasculare	33
5. Interacțiunea dintre MSC, EPC, DHT și remisia bolilor cardiovasculare	41

CONTRIBUȚII PERSONALE

I. Studii privind efectul dihidrotestosteronului asupra proliferării, migrării și integrării MSC în secțiuni ventriculare murine

1. Introducere	46
2. Ipoteze și obiective generale	49
3. Materiale și metode	50
3.1. Culturi celulare	50
3.2. Teste de citotoxicitate, viabilitate și proliferare a MSC expuse la DHT	54
3.3. Analiza expresiei genice prin tehnica qRT-PCR	54
3.4. Analiza expresiei proteice prin Western Blot	54
3.5. Determinarea oxidului nitric (NO) produs de MSC tratate cu DHT	55
3.6. Prepararea secțiunilor de țesut cardiac murin	55
3.7. Evaluarea chemotaxiei MSC în prezența secțiunilor cardiace prin măsurarea impedanței celulare	57
3.8. Analiza prin tehnicile ELISA și Luminex a proteinelor secretate de MSC după interacțiunea cu țesutul cardiac	58

3.9. Determinarea prin imunohistochimie a aderenței și integrării MSC în secțiuni de țesut cardiac	58
3.10. Determinarea aderenței MSC și integrarea în secțiunile de țesut cardiac prin cuantificarea ADN folosind tehnica qRT-PCR	59
3.11. Determinarea modificărilor proteomului MSC stimulate cu DHT prin spectrometrie de masă	60
4. Analize statistice	60
5. Rezultate	61
5.1. Caracterizarea celulelor stem mezenchimale izolate din gelatina Wharton	61
5.2. DHT induce creșterea proliferării MSC în funcție de concentrație și de timp	64
5.3. În MSC, DHT induce reglarea expresiei genice a receptorului androgenilor (AR) și a genelor implicate în migrarea celulelor, EMMPRIN și MMP-9	67
5.4. DHT induce creșterea expresiei proteice a AR, EMMPRIN, angiogenina și MMP-9 în MSC	68
5.5 DHT stimulează producția de NO în MSC printr-un mecanism mediat de AR	70
5.6. Secțiunile de ventricul cardiac murin au o aderență crescută de plăcile pre-tratate cu collagen și o viabilitate tisulară nealterată de prezența substratului	72
5.7. Tratarea MSC cu DHT intensifică migrarea acestora către secțiunile cardiace murine	76
5.8. Stimularea cu DHT a MSC crește capacitatea acestora de aderare și integrare în secțiuni cardiace	77
5.9. Incubarea MSC pre-tratate cu DHT cu țesut cardiac crește secreția celulară de MMP-2 și MMP-9	79
5.10. Expunerea MSC tratate cu DHT la secțiuni de țesut ventricular crește sinteza celulară de angiogenină și VEGF	81
5.11. Modificarea citoscheletului de actină în MSC tratate cu DHT este demonstrată prin spectrometrie de masă	81
6. Discuții și concluzii parțiale	84

II. Cercetări asupra efectului dihidrotestosteronului asupra proliferării, migrării și integrării celulelor endoteliale progenitoare umane în secțiuni ventriculare murine

1. Introducere	90
2. Ipoteze și obiective generale	92
3. Materiale și metode	93
3.1. Izolarea și caracterizarea EPC	93
3.2. Obținerea și prepararea secțiunilor de cardiace murine	95
3.3. Teste de citotoxicitate, viabilitate și proliferare a EPC în prezența DHT	95
3.4. Caracterizarea moleculară a EPC prin tehnica PCR în timp real	96
3.5. Analiza expresiei proteice a EPC stimulate cu DHT prin Western Blot	96
3.6. Analiza în timp real a migrării EPC stimulate cu DHT folosind un	97

sistem original adaptat după testul "scratch assay"	
3.7. Evaluarea în timp real a chemotaxiei EPC către țesutul cardiac folosind sistemul xCELLigence	99
3.8. Analiza proteinelor secretate de EPC după menținerea lor în cultură cu țesutul cardiac (contact indirect) prin tehnica Luminex	100
3.9. Determinarea prin imunohistochimie a capacității de aderare/integrare a EPC puse în contact direct cu secțiunile de țesut cardiac	100
3.10. Determinarea prin qRT-PCR a aderenței/integrării EPC umane puse în contact direct cu secțiunile de țesut cardiac murin prin cuantificarea ADN-ului uman	101
3.11. Analiza profilului proteic al EPC stimulate sau nu cu DHT prin spectrometrie de masă	101
4. Analize statistice	102
5. Rezultate	103
5.1. Caracterizarea EPC izolate din sângele de cordon ombilical uman	103
5.2. DHT crește proliferarea EPC în funcție de concentrație și timp și nu afectează viabilitatea și morfologia celulelor	106
5.3. Stimularea cu DHT a EPC induce formarea mai rapidă a structurilor asemănătoare capilarelor printr-o cale de semnalizare dependentă de receptorul pentru androgeni	109
5.4. DHT induce în EPC reglarea expresiei genice a AR și a genelor implicate în migrarea celulelor, EMMPRIN, MMP-2 și MMP-9 precum și a genelor pro-angiogene VEGFR-2 și PlGF	110
5.5. DHT induce modificări ale expresiei proteice a AR, VEGFR-2, PlGF, EMMPRIN și MMP-9	112
5.6. Migrarea EPC stimulate cu DHT măsurată în timp real este direct corelată cu prezența AR	114
5.7. Incubarea EPC tratate cu DHT cu secțiuni de ventricul murine induce o creștere a secreției (în funcție de timp) a EMMPRIN, MMP-9, angiogenina și VEGF	116
5.8. Stimularea cu DHT a EPC crește capacitatea acestora de aderare și integrare în secțiuni cardiace	118
5.9. Stimularea cu DHT a EPC induce o creștere a migrării acestora către secțiunile cardiace murine	120
5.10. Modificarea citoscheletului de actină în EPC tratate cu DHT este demonstrată prin spectrometrie de masă	122
6. Discuții și concluzii parțiale	125
III. Concluzii generale	134
IV. Perspective	136
V. Referințe Bibliografice	137
VII. Lista de publicații ale autorului	159

REZUMAT

Cuvinte cheie: Celule stromale mezenchimale, celule endoteliale progenitoare, hormoni androgeni, dihidrotestosteronul, receptorul pentru androgeni, terapii celulare, boli cardiovasculare, sânge placentar, gelatina Wharton, secțiuni ventriculare murine.

Număr total de pagini – 165

Număr de figuri în partea de ”Stadiul actual de cunoștințe” - 11

Număr de figuri în partea de ” Contribuții originale”- 31

Număr de tabele - 5

Indicații bibliografice – 326

Lucrări publicate în reviste internaționale indexate ISI – 3 (1 autor principal)

Lucrări publicate în reviste internaționale indexate BDI -1 (1 autor principal)

Brevete naționale – 2

Rezumate publicate în reviste indexate ISI – 1

Lucrări în pregătire – 2

Comunicări orale susținute la manifestări științifice internaționale – 7 (2 autor principal)

Postere prezentate la manifestări științifice internaționale – 12 (11 autor principal)

Postere prezentate la manifestări științifice naționale – 1 (co-autor)

Comunicări orale susținute la manifestări științifice naționale – 1 (co-autor)

Cursuri și specializări - 2

Premii naționale – 3

Burse obținute pe durata programului doctoral – 2

Participarea la proiecte de cercetare internaționale/naționale – 4

Bolile cardiovasculare reprezintă principala cauză de mortalitate în întreaga lume. Deși, aflat în centrul a unui număr considerabil de cercetări, infarctul miocardic rămâne una din principalele tulburări cardiovasculare fatale, rezultat al obstrucției arterelor coronare și a distrugerii cardiomiocitelor.

Bolile sistemului cardiovascular afectează inima și vasele de sânge (artere, vene și capilare). Odată cu îmbătrânirea organismului au loc schimbări fiziologice și morfologice care modifică funcțiile sistemului cardiovascular și apariția riscului de boli cardiovasculare, uneori asimptomatice. Majoritatea afecțiunilor și deceselor survenite în urma bolilor cardiovasculare au ca principal factor declanșant ateroscleroza. Acest proces debutează cu îngroșarea și rigidizarea peretelui arterial datorită depunerilor de colesterol în structura peretelui, formându-se astfel plăci ateromatoase, ceea ce duce la obturarea fluxului sanguin. Ateroscleroza afectează toate arterele din organism. Debutul aterosclerozei la nivelul arterelor coronare este unul precoce, această afecțiune fiind denumită boală coronariană, care în stadiul avansat de dezvoltare poate provoca infarctul miocardic acut (IMA). IMA este urmarea obturării fluxului sanguin, ce reduce astfel aportul de oxigen miocardului, ducând în final la lezarea țesutului. Zona lezată devine astfel hipoxică, dând startul proceselor inflamatorii și ulterior de regenerare. Repararea inimii făcându-se prin cicatrizarea țesutului lezat.

Progresele recente în domeniul cercetării celulelor stem pentru regenerarea țesuturilor evidențiază potențiala utilizare a celulelor stem adulte pluripotente/precursorare pentru reconstrucția sau regenerarea diferitelor țesuturi fără a include probleme etice (Nesselmann *et al.* 2008; Karantalis & Hare 2015; Singh *et al.* 2016a). În acest context, celulele stromale mezenchimale multipotente (MSC) care sunt capabile să se transforme în diferite tipuri de celule au câștigat atenția pentru a servi ca instrument terapeutic pentru repararea/regenerarea permanentă a țesutului cardiac deteriorat. MSC-urile sunt de origine mezodermică și pot fi diferențiate în diferite tipuri de celule (celule endoteliale, osteoblaste, condrocite, adipocite, miocitare) atunci când sunt expuse factorilor de creștere specifici, moleculelor de semnalizare și factorilor de transcripție (Karantalis & Hare 2015).

Mai important, ele pot fi cultivate și pregătite pentru livrare într-un cadru *in vitro* (Karantalis & Hare 2015). MSC pot fi izolate din mai multe surse (țesut adipos, placentă, intestin, plămân, ficat, lichid amniotic, pulpă dentară, pulpă parodontală, inimă). Luate împreună, sursele

de țesuturi multiple și natura pluripotentă a MSC, împreună cu ușurința de expansiune *in vitro*, le face un instrument atractiv terapeutic pentru tratarea leziunilor cardiace.

În ultimul deceniu au fost observate mai multe studii clinice atât pe animale, cât și pe oameni, ce evaluează potențialul terapeutic al MSC în repararea leziunilor și funcțiilor cardiace (Nesselmann *et al.* 2008; Singh *et al.* 2016b). Deși au fost stabilite multe studii (nu toate) în care terapia cu MSC poate duce la o potențială ameliorare a neovascularizării, reducerea cicatricilor și recuperarea funcțională, un obstacol major al terapiei cu MSC îl reprezintă retenția scăzută a celulelor transplantate, adică 0,44% din MSC transplantate se regăsesc în miocard după 4 zile (Toma *et al.* 2002; Müller-Ehmsen *et al.* 2006). Acest lucru a condus la o cerere de optimizare suplimentară a terapiei MSC prin identificarea moleculelor care ar putea fi utilizate pentru a primi/trata MSC sau destinatarii pentru a crește capacitatea MSC de a regenera zona ischemică (Novotny *et al.* 2008). Deoarece s-a demonstrat că androgenii stimulează creșterea, influențează activitatea celulelor cardiovasculare (Yeap *et al.* 2003; Ikeda *et al.* 2005), promovează creșterea și angiogeneza în celulele endoteliale progenitoare (EPC) și celulele stromale mezenchimale (Cai *et al.* 2016), am presupus că androgenii pot facilita, de asemenea, aderarea și integrarea în țesutul ischemic atât a MSC cât și a EPC.

Celulele endoteliale (EC) sunt necesare pentru repararea țesuturilor și vindecarea rănilor, prin construirea unei rețele noi de vase de sânge. Interesant este faptul că, pe lângă EC reziduale, EPC circulante ce sunt derivate din măduva osoasă și splină, au fost găsite că participă activ la repararea vasculară. Prin urmare, accentul nostru principal a fost și studierea efectelor androgenilor asupra funcției EPC. Legătura dintre deficitul de testosteron și numărul redus de EPC circulante este un semn distinctiv al tulburărilor cardiovasculare, fiind demonstrată la pacienții hipogonadali (Foresta *et al.* 2006; Calogero *et al.* 2017).

Există numeroase dovezi ce sugerează un rol central al androgenilor în sănătatea cardiovasculară a bărbaților. În ciuda numeroaselor studii efectuate pentru a descifra rolurile precise ale testosteronului (T) în boala cardiovasculară (BCV), nu s-a ajuns la niciun acord cu privire la efectele protectoare sau dăunătoare ale T asupra sistemului cardiovascular (CVS). Prin urmare, este esențial să se clarifice modul în care T afectează CVS pentru a identifica riscurile și beneficiile potențiale ale terapiei de substituție cu testosteron (TST), utilizată din ce în ce mai mult de bărbații în vârstă.

Noi presupunem că androgenii modulează și procesele de remodelare vasculară asociate cu BCV. În prim plan se află capacitatea de migrare a MSC și EPC, capacitatea de răspuns pro-angiogen a ambelor tipuri celulare și nu în ultimul rând chemokinele activate ca răspuns al pre-tratamentului cu androgeni. Toate aceste procese fiind orientate înspre îmbunătățirea capacității de regenerare a ischemiei cardiovasculare.

Pentru a răspunde acestor întrebări, am utilizat dihidrotestosteronul (DHT), un metabolit al T, care imită efectele T și nu poate fi transformat în estradiol. Prin urmare, utilizarea DHT poate certifica faptul că efectele observate sunt doar androgene și nu sunt compromise prin conversia la estradiol.

Cunoscând toate cele enumerate mai sus, am emis ipoteza care stă la baza studiului lucrării de față, și anume: poate fi amplificată capacitatea MSC și EPC de aderare, integrare și proliferare prin pre-stimularea cu DHT în așa fel încât șansele regenerării ischemiilor cardiovasculare să fie îmbunătățite?

În **prima parte** a lucrării de doctorat sunt descrise succint aspecte teoretice legate de structura și acțiunile hormonilor androgeni, caracteristici și proprietăți ale celulelor stromale mezenchimale și ale celulelor endoteliale progenitoare, aspecte la zi ale terapiilor cu hormoni androgeni și celulele stromale/progenitoare în tratamentul bolilor cardiovasculare. Ce-a de-**a doua parte** a lucrării, care include contribuțiile originale ale prezentei teze de doctorat, este împărțită în două studii majore.

Primul studiu se referă la “**Studii privind efectul dihidrotestosteronului asupra proliferării, migrării și integrării MSC în secțiuni ventriculare murine**” și este caracterizat de două obiective generale:

- ❖ investigarea efectelor DHT asupra proliferării, migrării și aderării MSC de miocardul murin;
- ❖ evaluarea rolului AR în efectele modulatorie ale DHT asupra funcțiilor MSC.

Cel de-al doilea studiu se referă la “**Cercetări asupra efectului dihidrotestosteronului asupra proliferării, migrării și integrării celulelor endoteliale progenitoare umane în secțiuni ventriculare murine**” și este divizat în două părți:

- ❖ determinarea mecanismelor care intermediază efectele induse de DHT asupra funcțiilor de migrare/aderare a EPC în miocardul murin;
- ❖ evaluarea și interacțiunea dintre AR și activitatea EPC după tratamentul cu DHT.

Pentru îndeplinirea obiectivelor propuse în prezenta lucrare de doctorat am folosit o serie de tehnici de biochimie, biologie moleculară și culturi de celule care au fost descrise amănunțit în secțiunea „Materiale și metode” caracteristică fiecărui capitol. Pentru o mai bună reproductibilitate a rezultatelor obținute, am optimizat protocoalele de obținere a secțiunilor de inimi de șoarece și cel de optimizare a aderării secțiunilor de inimă de baza godeurilor plăcilor de cultură. Am pus la punct o metoda, brevetată, ce ne permite să măsurăm în timp real migrarea pe orizontală a celulelor pe baza impedanței celulare folosind dispozitivul xCELLigence. De asemenea, am optimizat metoda de cuantificare a celulelor umane din modelul de co-cultură directă dintre MSC/EPC și secțiunile inimilor murine folosind tehnica qRT-PCR.

Cunoscând toate cele enumerate mai sus, am emis ipoteza care stă la baza studiului lucrării de față, și anume: poate fi amplificată capacitatea MSC și EPC de aderare, integrare și proliferare prin pre-stimularea cu hormoni androgeni în așa fel încât șansele regenerării ischemiilor cardiovasculare să fie îmbunătățite?

În **prima parte** a lucrării de doctorat sunt descrise succint aspecte teoretice legate de structura și acțiunile hormonilor androgeni, caracteristici și proprietăți ale celulelor stromale mezenchimale și ale celulelor endoteliale progenitoare, aspecte la zi ale terapiilor cu hormoni androgeni și celulele stromale/progenitoare în tratamentul bolilor cardiovasculare. Ce-a de-**a doua parte** a lucrării, care include contribuțiile originale ale prezentei teze de doctorat, este împărțită în două studii majore.

Primul studiu se referă la “**Studii privind efectul dihidrotestosteronului asupra proliferării, migrării și integrării MSC în secțiuni ventriculare murine**” și este caracterizat de două obiective generale:

- ❖ investigarea efectelor DHT asupra proliferării, migrării și aderării MSC de miocardul murin;
- ❖ evaluarea rolului AR în efectele modulatorie ale DHT asupra funcțiilor MSC.

Cel de-al doilea studiu se referă la **“Cercetări asupra efectului dihidrotestosteronului asupra proliferării, migrării și integrării celulelor endoteliale progenitoare umane în secțiuni ventriculare murine”** și este divizat în două părți:

- ❖ determinarea mecanismelor care intermediază efectele induse de DHT asupra funcțiilor de migrare/aderare a EPC în miocardul murin;
- ❖ evaluarea și interacțiunea dintre AR și activitatea EPC după tratamentul cu DHT.

Pentru îndeplinirea obiectivelor propuse în prezenta lucrare de doctorat am folosit o serie de tehnici de biochimie, biologie moleculară și culturi de celule care au fost descrise amănunțit în secțiunea „Materiale și metode” caracteristică fiecărui capitol. Pentru o mai bună reproductibilitate a rezultatelor obținute, am optimizat protocoalele de obținere a secțiunilor de inimi de șoarece și cel de optimizare a aderării secțiunilor de inimă de baza godeurilor plăcilor de cultură. Am pus la punct o metoda, brevetată, ce ne permite să măsurăm în timp real migrarea pe orizontală a celulelor pe baza impedanței celulare folosind dispozitivul xCELLigence. De asemenea, am optimizat metoda de cuantificare a celulelor umane din modelul de co-cultură directă dintre MSC/EPC și secțiunile inimilor murine folosind tehnica qRT-PCR.

Creșterea speranței de viață este însoțită și de o cerere sporită de îmbunătățire a calității vieții și de o prevenire a bolilor legate de îmbătrânire. Deoarece deficitul de testosteron a fost sugerat a fi asociat BCV, numărul bărbaților ce sunt sub tratament cu suplimente de testosteron (TST) a crescut. Cu toate acestea, unele studii au raportat efecte adverse ale TST și creșterea mortalității datorită BCV. Prin urmare, este necesar să se înțeleagă rolul T în sănătatea cardiovasculară și dacă TST este benefic. Rolul EPC în regenerarea cardiovasculară este bine stabilit și se utilizează în prezent în terapia cardiovasculară. La bărbații hipogonadali s-a dovedit ca nivelurile mai scăzute de EPC este direct corelat cu predispoziția dezvoltării de boli cardiovasculare.

În concordanță cu aceste constatări, rezultatele originale demonstrează că ipotezele de la care am plecat în prezentul studiu sunt corecte, după cum urmează:

- DHT crește proliferarea și capacitatea de aderare a MSC la țesutul cardiac;
- În MSC, expresia proteică și genică a MMP-2, MMP-9 și EMMPRIN este modulată de către DHT;
- DHT crește migrarea și chemotaxia MSC către țesutul cardiac;
- Secreția de angiogenină, VEGF și NO – factori cheie în procesul regenerării țesutului ischemic este crescută în MSC stimulate cu DHT;
- Proteinele citoscheletului MSC implicate în migrarea celulară sunt activate în urma stimulării cu DHT;
- DHT induce creșterea proliferării, migrarea și capacitatea EPC de a alcătui rețele de tip capilar pe substrat de Matrigel® într-o manieră dependentă de AR;
- Activitatea proteolitică a EPC este reglată și de DHT prin creșterea expresiei EMMPRIN și MMP-9;
- Secreția de angiogenină, VEGF și PlGF- factori cheie implicați în debutul și desfășurarea proceselor de regenerare prin angiogeneză este crescută în EPC stimulate cu DHT;
- Prin stimulare cu DHT a EPC se activează grupe mari de proteine ce sunt implicate în semnalizarea răspunsului la rănire, vindecarea rănilor, procesul metabolic al compusului organonitrogen.

Rezultatele principale din prima parte a acestei teze edifică rolul DHT în creșterea, proliferarea și migrarea MSC și în promovarea integrării acestor celule în țesutul cardiac *in vitro*. Aceste efecte sunt însoțite de o creștere a expresiei de AR și a moleculelor cheie cunoscute pentru promovarea remodelării țesuturilor și angiogeneză (EMMPRIN, MMP-2, MMP-9, VEGF, angiogenină, NO). Aceste date originale cuprinse în primul studiu al prezentei teze de doctorat s-au concretizat în articolul cu titlul: "Dihydrotestosterone induces pro-angiogenic factors and assists homing of MSC into the cardiac tissue", are ca autori pe: **Popa MA***, Mihai MC*, Constantin A, Șuică V, Țucureanu C, Costache R, Antohe F, Dubey RK & Simionescu M (*

contribuție egală) și este publicată în anul 2018 în revista *Journal of Molecular Endocrinology* **60** 1–15. (doi:10.1530/JME-17-0185) (Factorul de impact în 2017 = 3.29).

Datele principale din a doua parte descifrează și un alt rol al DHT în urma stimulării EPC. Am demonstrat că DHT reglează funcția formării de tubi asemănători capilarelor a EPC prin creșterea numărului de structuri închise. Am demonstrat că AR este implicat în procesele de migrare celulară în prezența DHT. Mai mult decât atât, am arătat că DHT a reglat expresia proteinelor implicate în migrarea celulară, EMMPRIN și MMP-9, totodată și expresia proteinelor pro-angiogene este crescută ca urmare a prezenței DHT (VEGF, VEGFR-2, angiogenina și PlGF). Presupunem că DHT activează și calea de semnalizare PI3-k/AKT prin intermediul AR, cale ce îmbunătățește capacitatea de proliferare și migrare celulară a EPC (Liu et al. 2014). Prin urmare, cercetările noastre susțin conceptul efectelor protectoare ale androgenilor asupra funcției EPC prin stimularea formării de noi vase de sânge și prin îmbunătățirea integrității endoteliale. Aceste date originale fac parte dintr-un articol în curs de publicare.

Noile date obținute din experimentele noastre indică faptul că stimularea *in vitro* cu DHT a MSC și EPC păstrează proprietățile celulelor și crește semnificativ capacitatea de adeziune și proliferarea celulelor. Cu toate acestea, sunt necesare studii suplimentare pentru a determina mecanismele implicate în efectul DHT asupra supraviețuirii, mobilizării și stimulării MSC și EPC. Amplificarea potențialului de proliferare a MSC și EPC stimulate cu DHT, fără a afecta potențialul de acțiune, ar putea face din aceste celule nu doar simple candidate, ci o opțiune excelentă pentru medicina regenerativă vasculară și pentru bolile ischemice în general.

Perspective

Utilizarea terapeutică a celulelor stromale mezenchimale și a celulelor endoteliale progenitoare în tratamentul leziunilor cardiovasculare nu și-a atins încă potențialul din cauza eficienței reduse a greșării în țesutul lezat dar și a mecanismelor deficitare ale organismului gazdă. În această lucrare am demonstrat că pre-tratamentul MSC și EPC cu DHT îmbunătățește capacitatea de migrare celulară ca răspuns la stimuli ai secțiunilor cardiace și totodată crește profilul pro-angiogenic al celulelor stimulate.

Un viitor proiect ar avea la bază experimente în care să se investigheze mecanismele și efectele DHT asupra co-culturii dintre MSC și EPC co-cultivate în prezența secțiunilor murine. Având în vedere faptul că activitatea proteolitică a celulelor este stimulată de prezența DHT, este de observat și cum este influențat setul de citokine pro-inflamatorii din debutul fibrozei post ischemie.

Un pas intermediar al viitorului proiect este utilizarea celulelor stimulate cu DHT în ingineria tisulară ca suport pentru grefe *ex vivo*. Știut fiind faptul că celulele se comportă diferit în construct bidimensional, analizarea funcțiilor și moleculelor activate în urma cultivării în sistem tridimensional poate revela noi funcții. Accentul se va pune în continuare pe activitatea proteolitică a MMP și pe sinteza factorilor pro-angiogeni cărora li se va adăuga setul de citokine imuno-modulatoare specific ischemiei vasculare.

Înainte de a proceda la experimentele *in vivo*, toate datele experimentale vor fi trecute ca variabile într-un model de simulare *in silico* ce va fi dezvoltat având bază algoritmi de inteligență artificială. Acești algoritmi se vor structura sub formă de baze de date și rețele neuronale *in silico* ce vor simula posibile căi de acțiune a moleculelor de interes pe baza probabilităților. Respectiva analiză are ca scop eficientizarea studiilor *in vivo* și reducerea la minim a experimentelor de confirmare pe subiecte animale.

LUCRĂRI PUBLICATE PE DURATA PROGRAMULUI DOCTORAL

❖ Lucrări publicate în reviste indexate ISI – autor principal

1. **Popa MA^{*}**, Mihai MC^{*}, Constantin A, Șuică V, Țucureanu C, Costache R, Antohe F, Dubey RK & Simionescu M, 2018. Dihydrotestosterone induces pro-angiogenic factors and assists homing of MSC into the cardiac tissue. *Journal of Molecular Endocrinology* **60** 1–15. (doi:10.1530/JME-17-0185) (* contribuție egală) (IF in 2017 = 3.29).

❖ Lucrări publicate în reviste indexate ISI – co-autor

1. Corotchi MC^{*}, **Popa MA^{*}**, Remeș A, Sima LE, Gussi I & Lupu Plesu M, 2013. Isolation method and xeno-free culture conditions influence multipotent differentiation capacity of human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research and Therapy* **4** 81. (doi:10.1186/scrt232); (* contribuție egală) (IF in 2017 = 4.963);
2. Corotchi MC, Popa MA & Simionescu M, 2016. Testosterone stimulates proliferation and preserves stemness of human adult mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells. *Romanian Journal of Morphology & Embryology* **57** 75–80. (doi:10.1093/bioinformatics/btl627); (IF in 2017 = 0.811).

❖ Lucrări publicate în reviste indexate BDI – autor principal

1. **Popa MA^{*}** & Corotchi MC^{*}, 2015. An in vitro method for adhesion of fresh adult murine heart slices on Collagen - Coated surfaces. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology* **20** 35–39. (doi:10.ANN/RSCB-2015-0044:RSCB) (* contribuție egală).

❖ Rezumate publicate în reviste indexate ISI

1. Corotchi M.C.^{*} & Popa M.A.^{*}, 2015. Effects of 17- β estradiol in a novel co-culture system of human wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells with adult-heart murine ventricular slices on cardiac regeneration. *Atherosclerosis* 241 e93. (doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.04.326); (* contribuție egală).

❖ Lucrări în curs de publicare

1. Popa MA^{*}, Mihai (Corotchi) MC^{*}, Constantin A, Șuică V, Țucureanu C, Costache R, Antohe F, Dubey RK & Simionescu M. "The effect of dihydrotestosterone on proliferation, migration and integration of human progenitor endothelial cells in murine ventricular sections", (* contribuție egală);
2. Maria Cristina Mihai (Corotchi)*, Mirel Adrian Popa*, Viorel Iulian Suica, Felicia Antohe, Edwin K Jackson, Maya Simionescu, Raghvendra K Dubey. "Mechanism of 17- β Estradiol stimulated integration of human mesenchymal stem cells in heart tissue", (* contribuție egală).

❖ Brevete naționale

1. „Dispozitiv pentru modificarea plăcii de cultură celulară, și metoda de măsurare în timp real a deplasării celulelor în sistem *ex vivo*”- Nr. 131463/2018;
2. „Procedeu ex-vivo pentru grefarea celulelor endoteliale progenitoare în miocardul adult” – Nr. 162258/2018.

COMUNICĂRI ORALE SUSȚINUTE LA MANIFESTĂRI ȘTIINȚIFICE INTERNAȚIONALE - AUTOR PRINCIPAL

1. Maria Cristina Corotchi*, **Mirel Adrian Popa ***, Anca Remeș, Livia Elena Sima, Ilinca Gussi, Marilena Plesu (Lupu) (*equal contribution). “Isolation method and xeno-free culture conditions influence multipotent differentiation capacity of human Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells”, RAMSES Final Conference, 7-9 Mai 2013, Cairo, Egipt.
2. **Mirel Adrian Popa***, Maria Cristina Corotchi*, Maya Simionescu (* contribuție egală). ”DHT enhance migration and integration of mesenchymal stem cells toward heart tissue sections”. The 9th International Congress and the 35th Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology, 7-11 Iunie 2017, Iași, Romania

POSTERE PREZENTATE LA MANIFESTĂRI ȘTIINȚIFICE INTERNAȚIONALE - AUTOR PRINCIPAL

1. **Mirel Adrian Popa***, Anca Remes*, Maria Cristina Corotchi, Marilena Lupu (*equal contribution). “Gene and protein profiling of human Wharton’s Jelly-derived stem/progenitor cells upon exposure to endothelial differentiation conditions”, The 4th International Congress and the 30th Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology, 13-17 Iunie 2012, Satu-Mare, Romania și Debrecen, Ungaria; rezumat publicat în Buletinul Societății Naționale de Biologie Celulară, nr 40, pag 152.
2. Maria Cristina Corotchi*, **Mirel Adrian Popa ***, Anca Remeș, Livia Elena Sima, Ilinca Gussi, Marilena Plesu (Lupu) (*equal contribution). “Isolation method and xeno-free culture conditions influence multipotent differentiation capacity of human Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells”, RAMSES Final Conference, 7-9 Mai 2013, Cairo, Egipt.

3. Maria Cristina Corotchi*, **Mirel Adrian Popa ***, Anca Remeş, Livia Elena Sima, Ilinca Gussi, Marilena Plesu (Lupu) (*equal contribution). “Isolation method and xeno-free culture conditions influence multipotent differentiation capacity of human Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells”, The 5th International Congress and the 31th Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology, 5-9 Iunie 2013, Timișoara, Romania; rezumat publicat în Buletinul Societății Naționale de Biologie Celulară, nr 41, pag 122.
4. **Mirel Adrian Popa**, Maria Cristina Corotchi, Anca Remeş, Marilena Lupu. “Endothelial gene and protein expression in human Wharton’s jelly-derived stem/progenitor cells isolated in different conditions”, “7th Annual Congress of the German Society for Stem Cell Research”, 28-30 Octombrie 2013, Leipzig, Germania.
5. **Mirel Adrian Popa***, Maria-Cristina Corotchi*, Maya Simionescu (* contribuție egală).” Impact of dihydrotestosterone on human post-natal cord blood and matrix derived adult stem/progenitor cells” The 6th International Congress and the 32th Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology, 7-12 Iunie 2014, Târgu Mureș, Romania; rezumat publicat în Buletinul Societății Naționale de Biologie Celulară, nr 42, pag 65.
6. Maria-Cristina Corotchi*, **Mirel Adrian Popa***, Maya Simionescu (* contribuție egală).” Effects of 17- β estradiol on proliferation and cardiac integration of human Wharton’s Jelly-derived mesenchymal stem cells”. The 6th International Congress and the 32th Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology, 7-12 Iunie 2014, Târgu Mureș, Romania; rezumat publicat în Buletinul Societății Naționale de Biologie Celulară, nr 42, pag 67.
7. **Mirel Adrian Popa***, Maria-Cristina Corotchi*, Maya Simionescu (* contribuție egală). “Effect of dihydrotestosteron on adult stem cells derived from human post-natal cord blood and matrix”. 7th Santorini Conference “Biologie Prospective” Systems Medicine, Personalized Health and Therapy, 25-27 Septembrie 2014, Santorini, Grecia.

8. Maria Cristina Corotchi*, **Mirel Adrian Popa***, Maya Simionescu (* contribuție egală).” Chemo-attraction of human Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells mediated by 17- β estradiol in cardiac integration” The 7th International Congress and the 33th Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology, 11-14 Iunie 2015, Baia Mare, Romania; rezumat publicat în Buletinul Societății Naționale de Biologie Celulară, nr 43, pag 104.
9. Maria Cristina Corotchi*, **Mirel Adrian Popa***, Maya Simionescu (* contribuție egală). ”Testosterone exposure enhances proliferation, adhesion and viability and preserves stemness of human stem cells” 41st WORLD CONGRESS OF ISMH - 19-21 Mai 2016, București, România.
10. **Mirel-Adrian Popa***, Maria-Cristina Mihai* (* contribuție egală).”In vitro adhesion of fresh adult murine heart slices on collagen-coated surfaces” 41st WORLD CONGRESS OF ISMH - 19-21 Mai 2016, București, România.
11. **Mirel Adrian Popa***, Maria Cristina Corotchi*, Maya Simionescu (* contribuție egală). ”MMPs are involved in migration and chemotaxis of DHT-stimulated mesenchymal stem cells toward heart tissue sections”. The 8th International Congress and the 34th Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology, 8-12 Iunie 2016, Băile Felix, Romania; rezumat publicat în Buletinul Societății Naționale de Biologie Celulară, nr 44, pag 104
12. **Mirel-Adrian Popa***, Maria-Cristina Mihai*, Alina Constantin, Viorel Șuică, Raluca Costache, Felicia Antohe, Raghvendra K Dubey, Maya Simionescu (* contribuție egală). ”Human mesenchymal stem cells migration proteins are upregulated by dihydrotestosterone treatment”. 12th CEEPC 2018. 24-26 Octombrie, București, România.

COMUNICĂRI ORALE SUSȚINUTE LA MANIFESTĂRI
ȘTIINȚIFICE INTERNAȚIONALE – CO-AUTOR

1. Marilena Lupu, Anca Remes, Maria Cristina Corotchi, **Mirel Adrian Popa**, Maya Simionescu, “Cellular and molecular mechanisms of umbilical cord stem/progenitor cells-induced vasculogenesis – implications for cardiovascular regeneration”, The 4th International Congress and the 30th Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology, 13-17 iunie 2012, Satu-Mare, Romania și Debrecen, Hungary.

POSTERE PREZENTATE LA MANIFESTĂRI ȘTIINȚIFICE
INTERNAȚIONALE - CO-AUTOR

1. Maria Cristina Corotchi*, Anca Remeș*, **Mirel Adrian Popa**, Livia Sima, Marilena Lupu (*equal contribution). “Characterization of multipotent differentiation capacity of human Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells isolated and expanded in xenobiotic-free conditions”, The 4th International Congress and the 30th Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology, 13-17 Iunie 2012, Satu-Mare, Romania și Debrecen, Hungary; rezumat publicat în Buletinul Societății Naționale de Biologie Celulară, nr 40, pag 151.
2. Maria Cristina Corotchi, Anca Remeș, **Mirel Adrian Popa**, Livia Sima, Marilena Lupu. ”Xenobiotic-free conditions applied for in vitro manipulation of Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells”, “7th Annual Congress of the German Society for Stem Cell Research”, 28-30 Octombrie 2013, Leipzig, Germania.
3. Ciprian Neagoe, **Mirel Adrian Popa**. ”Numerical simulation of leukocyte adhesion to endovascular surfaces”. 1st International Conference on Emerging Technologies in Materials Engineering EmergeMAT and 4th International Workshop on Materials under Extreme Conditions SUPERMAT. 14-16 Noiembrie 2018, București, România.

COMUNICĂRI ORALE ȘI POSTERE SUSȚINUTE LA
MANIFESTĂRI ȘTIINȚIFICE NAȚIONALE – AUTOR PRINCIPAL
ȘI CO-AUTOR

1. Maria Cristina Corotchi, **Mirel Adrian Popa**, Marilena Lupu. “Characterization of multipotent differentiation capacity of human Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells isolated and expanded in xenobiotic-free conditions”, RAMSES Annual International Workshop, 13-16 Septembrie 2012, Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu“, București, Romania

SPECIALIZĂRI ȘI CURSURI EFECTUATE

- ❖ Congresul „The first international society of regenerative medicine and surgery congress. New frontiers in regenerative medicine and surgery. Interdisciplinarity, research and clinical applications”, București, România, 15 - 16 mai **2015**.
- ❖ Congresul Internațional de Medicină Regenerativă. Medicină regenerativă; cercetare și aplicații clinice, București, România, 14 - 17 iunie **2017**

PREMII NAȚIONALE OBTINUTE

- ❖ Premiul pentru cea mai bun poster (Locul 1) - **Mirel Adrian Popa***, Anca Remeș*, Maria Cristina Corotchi, Marilena Lupu (*equal contribution). “Gene and protein profiling of human Wharton’s Jelly-derived stem/progenitor cells upon exposure to endothelial differentiation conditions”, The 4th International Congress and the 30th Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology, 13-17 Iunie 2012, Satu-Mare, Romania și Debrecen, Ungaria;
- ❖ Premiul pentru cea mai bun poster (Locul 1) - Maria Cristina Corotchi*, Anca Remeș*, **Mirel Adrian Popa**, Livia Sima, Marilena Lupu (*equal contribution). “Characterization of

multipotent differentiation capacity of human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells isolated and expanded in xenobiotic-free conditions", The 4th International Congress and the 30th Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology, 13-17 Iunie 2012, Satu-Mare, Romania și Debrecen, Hungary; rezumat publicat în Buletinul Societății Naționale de Biologie Celulară, nr 40, pag 151;

- ❖ Premiul primit pentru brevetul cu Nr. 131463/2018 de la UEFISCDI (Unitatea Executivă pentru Finanțarea Învățământului Superior, a Cercetării, Dezvoltării și Inovării).

BURSE OBTINUTE PE DURATA PROGRAMULUI DOCTORAL ȘI FINANȚAREA CERCETĂRILOR

- Academiei Române prin cadrul SCOSAR (2013-2016);
- POSDRU/159/1.5/s/133391 " Programe doctorale și post-doctorale de excelență pentru formarea de resurse umane înalt calificate pentru cercetare în domeniile Științele Vieții, Mediului și Pământului" (Aprilie 2014 – Decembrie 2015).

❖ Colaborator în granturi naționale și internaționale:

1. *"RAMSES: Reinforcement of the Adult stem cell research area through Mobility and Scientific networking between Egypt, Romania and a German consortium for Strengthening the international scientific competency"*. Grant agreement no. 245691 (Noiembrie 2011-August 2013);
2. *"Investigarea mecanismelor moleculare ale integrării și vasculogenezei aferente celulelor stem umane derivate din cordonul ombilical; implicații pentru regenerarea cardiovasculară"*, acronim "RE-CORD", PNCDI-II tip TE (Noiembrie 2011 – Iunie 2013);
3. *„Effects of sex steroid on adult stem/progenitor cell mediated cardiovascular regeneration ”*, Romanian-Swiss Research Programme (Ianuarie 2013 – Iunie 2016);
4. *"Îmbunătățirea competitivității instituționale în domeniul diabetului de tip 1 prin dezvoltarea unui concept inovator de imunoterapie cu celule stromale mezenchimale - DIABETER"* (Aprilie 2018- prezent).

BIBLIOGRAFIE

- Cai JJ, Wen J, Jiang WH, Lin J, Hong Y & Zhu YS 2016 Androgen actions on endothelium functions and cardiovascular diseases. *Journal of Geriatric Cardiology* **13** 183–196. (doi:10.11909/j.issn.1671-5411.2016.02.003)
- Calogero AE, Giagulli VA, Mongioi LM, Triggiani V, Radicioni AF, Jannini EA & Pasquali D 2017 Klinefelter syndrome: cardiovascular abnormalities and metabolic disorders. *Journal of Endocrinological Investigation* **40** 705–712. (doi:10.1007/s40618-017-0619-9)
- Foresta C, Caretta N, Lana A, De Toni L, Biagioli A, Ferlin A & Garolla A 2006 Reduced Number of Circulating Endothelial Progenitor Cells in Hypogonadal Men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **91** 4599–4602. (doi:10.1210/jc.2006-0763)
- Ikeda Y, Aihara KI, Sato T, Akaike M, Yoshizumi M, Suzaki Y, Izawa Y, Fujimura M, Hashizume S, Kato M *et al.* 2005 Androgen receptor gene knockout male mice exhibit impaired cardiac growth and exacerbation of angiotensin II-induced cardiac fibrosis. *Journal of Biological Chemistry* **280** 29661–29666. (doi:10.1074/jbc.M411694200)
- Karantalis V & Hare JM 2015 Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease. *Circulation Research* **116** 1413–1430. (doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.303614)
- Müller-Ehmsen J, Krausgrill B, Burst V, Schenk K, Neisen UC, Fries JWU, Fleischmann BK, Hescheler J & Schwinger RHG 2006 Effective engraftment but poor mid-term persistence of mononuclear and mesenchymal bone marrow cells in acute and chronic rat myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **41** 876–884. (doi:10.1016/j.yjmcc.2006.07.023)
- Nesselmann C, Ma N, Bieback K, Wagner W, Ho A, Konttinen YT, Zhang H, Hinescu ME & Steinhoff G 2008 Mesenchymal stem cells and cardiac repair. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **12** 1795–1810. (doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00457.x)
- Novotny NM, Ray R, Markel TA, Crisostomo PR, Wang M, Wang Y & Meldrum DR 2008 Stem Cell Therapy in Myocardial Repair and Remodeling. *Journal of the American College of Surgeons* **207** 423–434. (doi:10.1016/j.jamcollsurg.2008.04.013)
- Singh A, Singh A & Sen D 2016a Mesenchymal stem cells in cardiac regeneration: a detailed progress report of the last 6 years (2010–2015). *Stem Cell Research & Therapy* **7** 82. (doi:10.1186/s13287-016-0341-0)
- Singh AA, Singh AA & Sen D 2016b Mesenchymal stem cells in cardiac regeneration: a detailed progress report of the last 6 years (2010–2015). *Stem Cell Research & Therapy* **7** 82. (doi:10.1186/s13287-016-0341-0)
- Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ & Kessler PD 2002 Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* **105** 93–98. (doi:10.1161/hc0102.101442)
- Yeap BB, Liu PY, Death AK & Handelsman DJ 2003 Androgens and cardiovascular disease. *Endocrine Reviews* **17** 269–276. (doi:10.1210/er.2003-0005)