

ACADEMIA ROMANA
INSTITUTUL DE BIOLOGIE SI PATOLOGIE CELULARA
„NICOLAE SIMIONESCU”

TEZA DE DOCTORAT

Dezvoltarea de terapii anti-inflamatoare directionate
folosind nanotransportori de medicamente

REZUMAT

Conducator stiintific:

Acad. MAYA SIMIONESCU

Doctorand:

STAN DANIELA

BUCURESTI

2013

1

CUPRINS

Cuvant inainte	8
Introducere si obiective	9

PARTEA I

Stadiul actual al cunostintelor privind utilizarea nanotransportorilor pentru realizarea unor terapii directionate anti-inflamatorii

1. Notiuni generale despre inflamatie	11
1.1. Molecule pro-inflamatorii secretate in inflamatie	12
1.1.1. Citokine	14
1.1.2. Chemokine	15
1.2. Recrutarea si transmigrarea leucocitelor la situsul inflamator	19
1.2.1. Molecule de adeziune implicate in adeziunea si transmigrarea leucocitelor	20
1.2.2. Procesul de transmigrare a leucocitelor	21
1.3. Incetarea procesului inflamator	23
1.4. Inflamatia cronica	26
1.4.1. Cauze	27
1.4.2. Rolul monocitelor/macrofagelor	28
1.4.3. Fibroza, caracteristica inflamatiei cronice	33
2. Utilizarea nanoterapiei in reducerea procesului inflamator	35
2.1. Introducere	35
2.2. Tipuri de transport al nanoparticulelor	37
2.3. Avantajele utilizarii nanosistemelor de transport tintite	40

2.4. Folosirea nanoparticulelor in terapia inflamatiei	41
2.4.1. Directionarea specifica a nanoparticulelor catre endoteliul activat	41
2.4.1.1. Tintirea moleculelor de adeziune: E-selectina, ICAM-1, VCAM-1, VLA-4	42
2.4.2. Transportul nanoparticulelor catre monocite/macrofage	47
- Marcarea monocitelor pentru studierea prin imagistica a proceselor pro-inflamatorii in atacul cerebral	47
- Transport de gene cu ajutorul nanoparticulelor catre monocite/macrofage pentru reducerea inflamatiei in artrita reumatoida	48
- Transport de gene cu ajutorul nanoparticulelor catre monocite/macrofage pentru reducerea inflamatiei in ateroscleroza	49
- Depletia monocite/macrofage	50

PARTEA aII-a CONTRIBUTII ORIGINALE

Abrevieri	52
I. Transportul tintit de nanocarausi de agenti terapeutici catre endoteliul vascular activat	54
I.1. Introducere si obiective	54
I.2. Materiale si metode	54
2.1. Prepararea diverselor tipuri de nanoparticule	54
2.1.1. Prepararea liposomilor	54
2.1.2. Prepararea nanoparticulelor lipidice	55
2.1.3. Cuplarea de liganzi la suprafata nanoparticulelor	57
2.2. Caracterizarea nanoparticulelor	59

2.2.1. Analiza nanoparticulelor prin microscopie electronica de transmisie	59
2.2.2. Determinarea dimensiunii nanoparticulelor prin imprastierea dinamica a luminii laser (DSL)	59
2.2.3. Determinarea eficientei de cuplare a liganzilor la suprafata liposomilor	60
2.2.3.1. Tehnica DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid))	60
2.2.3.2. Tehnica HPLC (High-performance liquid chromatography)	61
2.3. Determinarea exprimarii moleculei de adeziune celulara VCAM-1 pe suprafata celulelor endoteliale activate	61
2.3.1. Tehnica ELISA	62
2.3.2. Metoda de citometrie in flux	62
2.4. Studiul legarii si internalizarii liposomilor de catre celulele endoteliale	63
2.5. Testarea capacitatii liposomilor directionati catre molecula VCAM-1 de a se lega specific la aorta soarecilor ApoE-deficienti	64
2.6. Urmarirea transportului intracelular al nanoparticulelor caraus de inhibitor de JAK2/STAT3 in celulele endoteliale	66
I.3. Rezultate	69
3.1. Caracterizarea nanoparticulelor	69
3.1.1. Microscopie electronica de transmisie	69
3.1.2. Dimensiunea nanoparticulelor prin imprastierea dinamica a luminii laser (DSL)	70
3.1.3. Eficienta de cuplare a liganzilor la suprafata liposomilor	71
3.2. Exprimarea moleculei de adeziune celulara VCAM-1 pe suprafata celulelor endoteliale activate	73
3.3. Legarea liposomilor la suprafata celulelor endoteliale	74
3.4. Capacitatea liposomilor directionati catre VCAM-1 de a se lega specific la aorta soarecilor ApoE-deficienti	76

3.5. Transportul intracelular al nanoparticulelor caraus de inhibitor de JAK2/STAT3 in celulele endoteliale	79
---	----

II. Dezvoltarea unui nanosistem pentru transportul specific de agenti terapeutici catre suprafata celulelor endoteliale activate in vederea inhibarii interactiunii chemokine-receptori 80

II.1. Introducere si obiective	80
II.2. Materiale si metode	82
2.1 Model experimental pentru studiul transmigrarii monocitelor prin monostratul de celule endoteliale	82
2.2. Prepararea liposomilor tinta-sensitivi directionati catre VCAM-1	84
2.3. Caracterizarea liposomilor tinta-sensitivi	85
2.4. Evaluarea stabilitatii liposomilor tinta-senzitivi	86
2.5. Determinarea legarii liposomilor tinta-senzitivi la suprafata celulelor endoteliale	87
2.6. Estimarea eliberarii markerului incorporat in liposomii tinta-senzitivi dupa legarea de suprafata celulelor endoteliale	88
2.7. Testarea capacitatii liposomilor tinta-senzitivi de a se lega specific de aorta soarecilor ApoE-deficienti	88
II.3. Rezultate	90
3.1. Efectul inhibarii interactiunii chemokine/receptori asupra transmigrarii monocitelor prin monostratul de celule endoteliale	90
3.2. Caracterizarea liposomilor tinta-senzitivi	95
3.2.1. Microscopie electronica de transmisie	95
3.2.2. Dimensiune si potential Zeta	95
3.3. Stabilitatea liposomilor tinta-senzitivi	97
3.3.1. Influenta temperaturii si a timpului de stocare asupra stabilitatii liposomilor tinta-senzitivi	97
3.3.2. Influenta serului asupra stabilitatii liposomilor tinta-senzitivi	98
3.4. Legarea liposomilor tinta-senzitivi la suprafata celulelor endoteliale	100
3.5. Eliberarea markerului incorporat in liposomii tinta-senzitivi dupa legarea de suprafata celulelor endoteliale	101

3.6. Legarea specifica a liposomilor tinta-senzitivi de aorta soarecilor ApoE-deficienti	103
--	-----

III. Utilizarea nanotehnologiilor pentru modularea functiilor

monocitelor/macrofagelor cu scopul de a reduce inflamatia placii aterosclerotice 104

III.1. Introducere si obiective	104
III.2. Materiale si metode	105
2.1. Determinarea productiei citokinei pro-inflamatoare, rezistina de catre monocitele expuse la concentratii crescute de glucoza	105
2.1.1. Determinarea exprimarii genice a rezistinei prin tehnica RT-PCR.....	108
2.1.2. Determinarea exprimarii proteice a rezistinei prin tehnica Western Blot	109
2.1.3. Detectia factorului de transcriptie NF-kB in fractia nucleara izolata din monocite	109
2.2. Determinarea interactiunii dintre liposomii cu clodronat si diverse tipuri celulare (monocite/macrofage, celulele peretelui vascular)	110
2.2.1. Obtinerea de liposomi cu clodronat	111
2.2.2. Determinarea internalizarii liposomilor multilamelari si unilamelari de catre diverse tipuri celulare	112
2.2.3. Evaluarea efectului incubarii cu diferite concentratii de liposomi cu clodronat asupra viabilitatii diverselor tipuri celulare	113
2.2.4. Investigarea apoptozei indusa de liposomi cu clodronat in diverse tipuri celulare	114
2.3. Inducerea apoptozei in monocite/macrofage cu ajutorul liposomilor cu clodronat si urmarirea efectelor interactiunii acestora cu celulele peretelui sangvin	115
2.3.1. Determinarea adeziunii monocitelor apoptotice la celulele peretelui vasului sangvin	116
2.3.2. Evaluarea efectului interactiunii dintre monocitele apoptotice si celulele musculare netede asupra cailor de semnalizare in celulele musculare netede	116
III.3. Rezultate	117

3.1. Concentratia crescuta de glucoza induce exprimarea genica si proteica de rezistina in monocite	117
3.2. Insulina reduce exprimarea genica si proteica de rezistina in monocitele expuse la concentratii crescute de glucoza	120
3.3. Interactiunea dintre liposomii cu clodronat si diverse tipuri celulare (monocite/macrofage, celulele peretelui vascular)	127
3.3.1. Internalizarea liposomilor cu clodronat de catre diverse tipuri celulare	127
3.3.2. Efectul incubarii cu diferite concentratii de liposomi cu clodronat asupra viabilitatii diverselor tipuri celulare	129
3.3.3. Apoptoza indusa de liposomi cu clodronat in diverse tipuri celulare	131
3.4. Inducerea apoptozei in monocite/macrofage cu ajutorul liposomilor cu clodronat si urmarirea efectelor interactiunii acestora cu celulele peretelui sangvin	133
3.4.1. Liposomii cu clodronat determina cresterea activitatii Caspazei-3 in monocite	133
3.4.2. Monocitele apoptotice prezinta o adezivitate crescuta la celulele peretelui vasului sangvin	134
3.4.3. Interactiunea monocite apoptotice-celule musculare netede moduleaza fosforilarea proteinelor ERK si p38	135
3.4.4. Interactiunea dintre monocite apoptotice si celulele musculare netede determina scaderea proliferarii acestora	136
Rezultate si concluzii	141
Bibliografie	143
Lista lucrari publicate	155
Lucrari publicate in reviste nationale recunoscute CNCSIS	156
Lista lucrarilor prezentate la manifestari stiintifice	156
Lucrari prezentate la manifestari internationale aparute in reviste de specialitate cotate ISI (proceedings)	156
Postere la manifestari stiintifice internationale	157

Postere la manifestari stiintifice nationale 164

Granturi 165

Cuvinte cheie: inflamatiia, inflamatie acuta, inflamatie cronica, citokine, chemokine, celule endoteliale, celule musculare netede vasculare umane, monocite/macrofage, molecule de adeziune celulara, soareci apoE-deficienti, adeziune, transmigrare, nanoterapie, nanocarasi, nanoparticule lipidice, liposomi, antagonisti de receptori chemokinici, rezistina, MAPKinaze, clodronat, apoptoza.

Inflamatiia este un mecanism al sistemului imun innascut facand parte dintr-un raspuns biologic complex al tesutului vascular la stimuli nocivi (patogeni, celule deteriorate, iritanti). Rezultatul final al procesului inflamator este de a proteja organismul de raspandirea unor infectii si restaurarea structurala si functionala a tesuturilor afectate. In functie de severitatea reactiei, inflamatiia poate fi acuta, determinand in final eliminarea stimulilor inflamatori si revenirea tesutului la conditiile fiziologice, sau poate fi cronica ducand la exagerarea procesului inflamator si aparitia a diferite patologii. Inflamatiia cronica este implicata in numeroase patologii printre care: ateroscleroza, cancer, artrita reumatoida, scleroza multipla, bolile intestinale inflamatorii, Alzheimer, lupus eritematos sistemic, alergii, etc.

Un rol important in procesul inflamator il are activarea endoteliului. In conditii normale, endoteliul vascular este non-trombogenic si non-aderent. Schimbari in micromediul inconjurator afecteaza celulele endoteliale care vor exprima molecule de adeziune (VCAM-1, ICAM-1, E- si P-selectina, fractalkina), care prin legare la receptorii corespunzatori de pe suprafata leucocitelor si plachetelor conduc la recrutarea si aderarea acestora la endoteliu. Pe langa moleculele de adeziune, celulele endoteliale exprima si chemokine precum MCP-1 (CCL2), RANTES (CCL5), fractalkina (CX3CL1) care se leaga la receptori omologi de pe suprafata leucocitelor si impreuna cu moleculele de adeziune contribuie la adeziunea si transmigrarea acestora. Chemokinele se leaga la glicozaminoglicanii prezenti pe membrana celulelor endoteliale si ghideaza intrarea leucocitelor in peretele arterial. Monocitele sunt

atrase de chemokinele CCL2, CCL5 și CX3CL1 care activează receptorii CCR2, CCR5 și CX3CR1 de pe monocite.

Datorită implicării moleculelor de adeziune celulară și a chemokinelor în dezvoltarea bolilor cronice inflamatorii, intervenția terapeutică deschide noi oportunități pentru prevenirea și tratamentul acestor boli. Manipularea funcțională a sistemului de chemokine, cum ar fi inhibarea interacției chemokine/receptori chemokinici, prin utilizarea de antagoniști chemokinici (CA) sau antagoniști de receptori chemokinici (CRA) ar putea constitui o opțiune terapeutică importantă pentru prevenirea acumulării de celule inflamatorii și agravarea unor boli (aterogeneza, metastazare). Un mod de abordare pentru a modula direcționarea unui medicament către un situs specific este de a concepe vehicule de transport care să fie capabile să “livreze” medicamentul la situsul afectat. Călea cea mai promițătoare pentru direcționarea unor nanotransportori la situsuri specifice o reprezintă atașarea pe suprafața lor a unor liganzi care să poată transporta substanța activă în celulă sau să recunoască molecule țintă specifice.

Dat fiind asocierea inflamației cronice cu diverse boli și rolul jucat de adeziunea leucocitelor la endoteliu și migrarea subendotelială, această teză de doctorat și-a propus introducerea de diferite strategii terapeutice bazate pe nanoparticule cu scopul de a controla inflamația și de a interfera în pașii de recrutare ai leucocitelor. În prima parte vor fi prezentate aspecte actuale cu privire la utilizarea nanoparticulelor pentru realizarea unor terapii direcționate anti-inflamatorii. Partea originală a lucrării se concentrează pe (1) dezvoltarea unor nanotransportori de agenți terapeutici pentru realizarea unui transport țintit la endoteliul vascular activat cu scopul de a interfera selectiv cu disfuncția endotelială sau de a inhiba interacțiunea chemokine-receptori, pentru a preveni acumularea celulelor proinflamatorii în peretele vascular și (2) pe utilizarea nanoparticulelor pentru modularea funcțiilor monocitelor/macrofagelor cu scopul de a reduce inflamația plăcii aterosclerotice.

Prima parte a tezei prezintă stadiul actual al cunoștințelor și este organizată în 2 capitole.

Capitolul 1 prezintă noțiuni generale despre procesul inflamator. Patrunderea de patogeni proveniți de la microorganisme sau molecule proprii alterate, determină declanșarea unui răspuns inflamator acut caracterizat de infiltrarea de neutrofile în primele 6-24 de ore, după care, sunt înlocuite de monocite/macrofage. Are loc îndepărtarea agentului proinflamator cu vătămarea reversibilă a țesutului colateral, îndepărtarea debriurilor celulare de către macrofage și restaurarea homeostaziei țesutului cu refacerea completă a arhitecturii

tesutului initial. In cazul in care, nu este indus un raspuns inflamator corespunzator, stimulul persista, are loc infiltrarea de macrofage si limfocite care sintetizeaza citokine si chemokine ce amplifica raspunsul inflamator, determinand distrugerii tisulare ireversibile. Se produce fibrozarea – inlocuirea tesutului initial cu tesut conjunctiv. Inflamatiile cronice sunt implicate in numeroase patologii precum: ateroscleroza, bolile pulmonare obstructive cronice, artrita reumatoida, scleroza multipla, cancer, obezitate, astm, boli intestinale inflamatorii, dar si boli neurodegenerative.

Capitolul 2 prezinta cateva notiuni introductive despre utilizarea nanoterapiei in reducerea procesului inflamator. Numeroase celule si mediatori, implicati in inflamatie, pot fi folositi ca markeri fie in tintire, fie in detectarea stadiului bolii.

Prezentarea pacientilor in stadiile tarzii ale bolii, incapacitatea unor organisme de a raspunde la modelele de terapie actuala, dar si imbunatatirea activitatii biologice prin incapsularea unor agenti farmacologici/medicamente in nanoparticule au condus la dezvoltarea unei noi strategii de terapie si diagnosticare – nanoteragnostice, care isi presupune atat diagnosticarea cat si tratarea pacientului.

Deoarece medicamentele neincorporate pot difuza usor din/in vasul de sange, conducand la o scadere a substantei active la locul afectat, s-a trecut la incapsularea lui in nanoparticule care, odata ce au parasit vasul sangvin nu se mai intorc datorita dimensiunii lor mari avand loc o acumulare progresiva la locul afectat. Adaugarea de peptide sau anticorpi la suprafata nanocarurilor, capabili sa recunoasca molecule exprimate de celulele afectate poate conduce la un transport directionat de substante active, in tesutul afectat.

In Partea a II a - "Contribuții originale", sunt prezentate rezultatele obtinute din experimentele care au avut ca scop controlarea inflamatiei si posibilitatea de a interfera in pasii de recrutare ai leucocitelor. Astfel, lucrarea de fata s-a centralizat pe indeplinirea a trei mari obiective principale:

- I. transportul tintit la endoteliul vascular activat utilizand nanotransportori de agenti terapeutici pentru a interfera selectiv cu disfunctia endoteliala,
- II. dezvoltarea unui nanosistem pentru transportul specific de compusi la suprafata celulelor endoteliale activate in vederea inhibarii interactiunii chemokine-receptori, cu scopul de a preveni acumularea celulelor proinflamatorii in peretele vascular
- III. utilizarea nanotehnologiei pentru modularea functiilor monocitelor/macrofagelor pentru a reduce inflamatiile placii aterosclerotice.

In capitolul I am prezentat transportul tintit de nanocarausi cu agenti terapeutici catre endoteliul vascular activat. In inflamatie, endoteliul joaca un rol important. Expunerea excesiva si sustinuta la mediatori pro-inflamatori conduce la disfunctia endoteliala care se traduce, in parte, prin exprimarea pe suprafata a moleculelor de adeziune celulara (ex: E- si P- selectina, VCAM-1 si ICAM-1) care mediaza recrutarea si adeziunea leucocitelor la endoteliu. Inducerea sau exprimarea crescuta de molecule specifice ofera oportunitati pentru transportul selectiv de agenti terapeutici la endoteliul afectat dintr-un anumit segment vascular. Pentru realizarea unui transport selectiv la endoteliul vascular activat, au fost folosite diferite nanosisteme de transport (liposomi, nanoparticule lipidice) si s-a evaluat capacitatea de tintire a nanotransportorilor la endoteliul vascular activat comparativ cu endoteliul normal, eficienta de internalizare a nanoparticulelor de catre celulele endoteliale, precum si efectele terapeutice ale compusului incorporat in nanoparticule. In acest scop, s-au realizat studii in vitro pe culturi de celule endoteliale si de asemenea a fost urmarita eficienta de tintire a endoteliului vascular cu ajutorul liposomilor folosind modele animale de soareci transgenici care dezvolta ateroscleroza (soareci ApoE-deficienti). Rezultatele obtinute atat in vitro cat si in vivo indica o legare specifica a liposomilor directionati catre VCAM-1 si faptul ca liposomii obtinuti pot fi folositi in continuare ca transportori de medicamente la endoteliul ce acopera placa ateromatoasa.

De asemenea, rezultatele preliminare arata faptul ca AG490, atat incapsulat in nanoparticule transportoare cat si liber, contribuie la scaderea adeziunii monocitelor la endoteliul activat prin inhibarea caili Jak2/STAT3, iar efectul inhibitorului este crescut prin incapsularea in nanovehicule.

Capitolul al II-lea este axat pe obtinerea unui nanosistem pentru transportul specific de agenti terapeutici, capabil sa se destabilizeze si sa elibereze controlat compusul incorporat, la suprafata celulei tinta. Acesti nanotransportori pot constitui vehicule de transport eficiente pentru o eliberare controlata de antagonisti de receptori chemokinici la suprafata endoteliului activat care sa blocheze interactia chemokine/receptori chemokinici si sa impiedice astfel, transmigrarea leucocitelor in spatiul subendotelial.

Infiltrarea leucocitelor este puternic reglata de chemokine. Chemokinele sunt polipeptide mici, inalt specializate, care functioneaza ca reglatori ai traficului celular prin interactiunile realizate cu receptorii cuplati cu proteina G de pe suprafata leucocitelor. In cercetarile noastre am studiat efectul unor antagonisti de receptori chemokinici asupra adeziunii si infiltrarii monocitelor prin monostratul de celule endoteliale mimand conditiile

inflamatorii. Utilizand sistemul Xcelligence, am urmarit in timp real: 1) formarea monostratului de celule endoteliale; 2) efectul citokinei pro-inflamatorii TNF- α asupra celulelor endoteliale; 3) adeziunea si infiltrarea monocitelor si 4) efectul protector al antagonistilor de receptori chemokinici asupra integritatii monostratului. Datele indica faptul ca, blocarea receptorilor chemokinici CCR2 si CCR5 poate reduce semnificativ transmigrarea prin endoteliu, aceasta realizandu-se printr-o descrestere a acumularii monocitelor in peretele vasului sangvin si reducerea procesului inflamator. Insa, testarea experimentală si clinica a unor potentiali inhibitori de chemokine si ai receptorilor lor pentru tratamentul bolilor inflamatorii, au evidentiat efecte imunologice secundare. Transportul local de antagonisti de receptori chemokinici in anumite zone poate constitui o strategie mai buna pentru a incetini sau intrerupe procesul inflamator. Conceperea de vehicule de transport care sa fie capabile sa "livreze" medicamentul la situsul afectat este o cale promitatoare in tratarea inflamatiei. Astfel, pentru a obtine un beneficiu terapeutic prin tintirea specifica a endoteliului activat, am conceput liposomi tinta senzitivi capabili sa elibereze compusul incorporat dupa legarea la tinta. Acestia pot constitui vehicule de transport eficiente pentru o eliberare controlata de antagonisti de receptori chemokinici la suprafata endoteliului activat care sa blocheze interactia chemokine/receptori chemokinici si sa impiedice transmigrarea leucocitelor in spatiul subendotelial.

In capitolul al III-lea am urmarit modularea functiilor monocitelor/macrofagelor folosind nanotehnologia, cu scopul de a reduce inflamatia placii aterosclerotice.

Macrofagele sunt esentiale in procesul inflamator care insoteste aterogeneza, incepand de la formarea striurilor lipidice pana la procesele ce duc la ruptura placii si la sindroame coronariene acute. Unul din obiective a fost sa urmarim productia unei citokine proinflamatoare recent descoperita, rezistina, de catre monocitele umane ca urmare a expunerii lor la concentratii crescute de glucoza. De asemenea, am investigat mecanismele implicate in efectul administrarii de liposomi cu clodronat (tratament ce conduce la depletia monocitelor/macrofagelor) asupra viabilitatii celulelor peretelui vascular (celulele endoteliale-CE si celulele musculare netede-CMN) si a monocitelor si macrofagelor. Am studiat efectele interactiunii monocitelor apoptotice cu celulele peretelui vascular uitandu-ne la adeziunea monocitelor/macrofagelor la celulele endoteliale, celulele musculare netede, precum si modificarile ce apar in proliferare (PCNA) si in caile de semnalizare intracelulara (MAPKinazele: p38 si ERK) din celulele musculare netede.

Rezultatele obtinute arata faptul ca: (1) concentratia crescuta de glucoza induce semnificativ exprimarea rezistinei in monocitele umane U937 (ARNm si proteina); (2) MAPKinazele p38, ERK1/2 si JNK precum si factorul de transcriptie NF-kB sunt implicati in acest mecanism; (3) insulina reduce semnificativ expresia de rezistina indusa de glucoza crescuta, independent de caile de semnalizare MAPKinazice PI3K, ERK1/2 sau p38.

Experimentele realizate pentru studiul efectelor administrarii de liposomi cu clodronat asupra celulelor peretelui vascular si a monocitelor/macrofagelor arata faptul ca liposomii unilamelari mici sunt preluati in special de catre celulele endoteliale si musculare netede, pe cand liposomii multilamelari sunt internalizati de catre monocitele umane U937, macrofagele murine Raw 264.7 si macrofage peritoneale izolate de la soareci. Studiile de viabilitate pe tipurile celulare enumerate mai sus au aratat ca viabilitatea celulelor endoteliale si musculare netede nu este afectata semnificativ de MLV si SUV cu clodronat incapsulat, pe cand, in cazul macrofagelor activitatea biologica a clodronatului incapsulat in MLV este mai mare comparativ cu clodronatul liber avand loc o scadere semnificativa a viabilitatii lor, tipul de moarte celulara indusa fiind apoptoza.

Inducerea apoptozei in monocite determina schimbari in interactiunile lor cu celulele peretelui vascular. Comunicarea dintre celulele apoptotice si celulele musculare netede determina o scadere a proliferarii cu 35% si a fosforilarii MAPKinazelor p 38 (~35%) si ERK (70%) in celulele musculare. De asemenea, monocitele in care a fost indusa apoptoza cu ajutorul liposomilor cu clodronat manifesta o adeziune crescuta la celulele peretelui sangvin in comparatie cu monocitele normale.

In urma rezultatelor obtinute pe diverse modele experimentale in care s-a indus inflamatia si folosindu-se diferite tipuri de nanotransportori, se pot trage urmatoarele concluzii generale: 1) liposomii directionati catre VCAM-1 sunt capabili sa transporte medicamente la CE activate, 2) nanoparticulele lipidice pot fi folosite pentru transportul intracelular in celule endoteliale a substantelor hidrofobe, 3) nanosistemul de transport tinta senzitiv dezvoltat poate furniza local agenti terapeutici, in vecinatatea endoteliului vascular activat si 4) liposomii pot fi capabili sa transporte substante active pentru modularea functiilor monocitelor /macrofagelor in scopul reducerii procesului inflamator.

Studiile efectuate in acesta lucrare sunt de natura aplicativa, scopul final fiind acela de a controla si reduce procesul inflamator utilizand diferite strategii terapeutice bazate pe nanotransportori.

Numar de figuri in prima parte – 17
Numar de figuri in partea originala (Partea a II-a) – 40
Indicatii bibliografice – 177
Lucrari publicate in reviste internationale cotate ISI – 10
Lucrari publicate in reviste nationale recunoscute CNCSIS – 2
Rezumate ale lucrarilor prezentate la manifestari stiintifice internationale – 48
Rezumate ale lucrarilor prezentate la manifestari stiintifice nationale - 6
Specializari si cursuri efectuate – 4
Participarea la proiecte de cercetare – 4 nationale, 2 internationale.