

ACADEMIA ROMÂNĂ
INSTITUTUL DE BIOLOGIE ȘI PATOLOGIE CELULARĂ
„NICOLAE SIMIONESCU”

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

«Dezvoltarea și evaluarea funcționalității unor nanocărăuși de polifenoli utilizabili în terapia țintită a inflamației vasculare»

Susținută în data de 18.09.2020, Aula «George Emil Palade»,
Institutul de Biologie și Patologie Celulară «Nicolae Simionescu»

Conducător științific:

Acad. MAYA SIMIONESCU

Doctorand:

ELENA-VALERIA FUIOR

BUCUREȘTI

2020

Textul integral poate fi consultat la Biblioteca Institutului de Biologie și Patologie
Celulară «Nicolae Simionescu»

CUPRINS

LISTA ABREVIERILOR	6
INTRODUCERE ȘI OBIECTIVE	8
PARTEA I- STADIUL ACTUAL AL CUNOȘTIINȚELOR PRIVIND INFLAMAȚIA ȘI UTILIZAREA POLIFENOLILOR ÎNCORPORAȚI ÎN NANOPARTICULE ÎN TERAPIA ANTI-INFLAMATORIE	10
CAPITOLUL 1- INFLAMAȚIA: MECANISME IMPLICATE ȘI TERAPIILE ACTUALE	10
1.1. Inflamația și bolile asociate	10
1.2. Cascada inflamatorie	11
1.3. Căi de semnalizare în inflamație	13
1.4. Clase de proteine implicate în procesele inflamatorii	17
1.4.1. Citokine	17
1.4.2. Chemokine	21
1.4.3. Molecule de adeziune	24
1.5. Inflamația indusă de lipopolizaharid (LPS)	27
1.6. Abordări terapeutice actuale anti-inflamatoare	29
CAPITOLUL 2-ABORDĂRI ALTERNATIVE BAZATE PE POLIFENOLI ÎNCORPORAȚI ÎN NANOTRANSPORTORI ÎN TERAPIA INFLAMAȚIEI	33
2.1. Polifenoli-aspecte generale	33
2.2. Proprietățile anti-oxidante și anti-inflamatorii ale polifenolilor	35
2.3. Modularea microARN necodante	35
2.4. Modularea microbiotei intestinale	36
2.5. Limitări în utilizarea polifenolilor	37
2.6. Aplicații pe bază de nanoparticule (NP) ale polifenolilor anti-inflamatori	38
2.6.1. Activități anti-inflamatorii ale NP anorganice încărcate cu polifenoli	39
2.6.2. Activități anti-inflamatorii ale NP organice încărcate cu polifenoli	39
2.6.2.1. Nanoparticule polimerice	39
2.6.2.2. Nanoparticule de ciclodextrină	41
2.6.2.3. Nanoparticule lipidice	42
2.6.2.4. Nanoparticule pe bază de proteine	45
2.6.3. Acumularea pasivă și țintirea activă a nanoparticulelor la situsuri inflamatorii	46
2.6.4. Țintirea specifică a diferitelor tipuri celulare cu nanoparticule încărcate cu polifenoli	47

2.6.5. Studii clinice	50
2.6.6. Concluzii	53
PARTEA a II a- CONTRIBUȚII ORIGINALE	54
CAPITOLUL 3- PREPARAREA ȘI CARACTERIZAREA <i>IN VITRO</i> A NANOEMULSIILOR LIPIDICE ÎNCĂRCATE CU FLAVONOIDELE NARINGENINĂ ȘI HESPERETINĂ	54
3.1. Introducere și obiective	54
3.2. Materiale si metode	56
3.2.1. Reactivi	56
3.2.2. Prepararea nanoemulsiilor lipidice (LN) încărcate cu flavonoide	57
3.2.3. Prepararea nanoemulsiilor încărcate cu flavonoide și țintite la VCAM-1	58
3.2.4. Caracterizarea nanoemulsiilor încărcate cu flavonoide	59
3.2.4.1. Dimensiunea nanoparticulelor	59
3.2.4.2. Potențialul zeta al nanoparticulelor	60
3.2.4.3. Determinarea peptidei cuplate pe suprafața LN	60
3.2.4.4. Determinarea conținutului de flavonoid încapsulat în nanoemulsii lipidice	61
3.2.4.5. Eliberarea in vitro a flavonoidelor încorporate în nanoemulsii	62
3.2.4.6. Studii de stabilitate a nanoemulsiilor lipidice încărcate cu flavonoide	63
3.2.5. Culturi celulare	63
3.2.6. Test de viabilitate celulară	63
3.2.7. Preluarea nanoemulsiilor lipidice de către celulele endoteliale umane, linia EA.hy926	64
3.2.8. Testul de adeziune a monocitelor la celulele endoteliale	64
3.2.9. Testul de transmigrare a monocitelor	65
3.2.10. Imuno-blot	66
3.2.11. Prepararea extractelor nucleare și citosolice	67
3.2.12. Real Time PCR	67
3.2.13. Testul de hemocompatibilitate	68
3.2.14. Analiza statistică	68
3.3. Rezultate	68
3.3.1. Prepararea și caracterizarea nanoemulsiilor lipidice: dimensiune și potențial zeta	68
3.3.2. Eficiența de încapsulare	72
3.3.3. Stabilitatea nanoemulsiilor lipidice încărcate cu flavonoide	72
3.3.4. Eliberarea in vitro a flavonoidelor din nanoemulsii	73
3.3.5. Citotoxicitatea nanoemulsiilor încărcate cu flavonoide asupra celulelor endoteliale (CE) umane, linia EA.hy926	75

3.3.6. Internalizarea nanoemulsiilor lipidice de către CE activate cu TNF- α	76
3.3.7. Rolul funcțional al nanoparticulelor încărcate cu flavonoid în reducerea adeziunii și transmigrării monocitelor la/printre CE activate cu TNF- α	79
3.3.8. Reducerea expresiei MCP-1 în CE activate cu TNF- α de către nanoemulsiile lipidice încărcate cu flavonoide	81
3.3.9. Reducerea translocării nucleare a NF-kB în CE activate cu TNF- α de către nanoemulsiile lipidice încărcate cu flavonoide	82
3.3.10. Hemocompatibilitatea nanoemulsiilor lipidice încărcate cu flavonoide	83
3.4. Discuții	84
3.5. Concluzii	87
CAPITOLUL 4-BIODISTRIBUȚIA NANOEMULSIILOR LIPIDICE ÎNCĂRCATE CU NARINGENINĂ DETERMINATĂ CU AJUTORUL TRASORULUI INDOCYANINE GREEN (ICG)	88
4.1. Introducere și obiective	88
4.2. Materiale și metode	90
4.2.1. Reactivi	90
4.2.2. Prepararea nanoemulsiilor încărcate cu naringenină conținând ICG	91
4.2.3. Prepararea nanoemulsiilor încărcate cu naringenină conținând rodamină	92
4.2.4. Prepararea nanoemulsiilor țintite încărcate cu naringenină și ICG	92
4.2.5. Caracterizarea fizico-chimică a nanoemulsiilor	92
4.2.5.1. Dimensiunea nanoparticulelor	92
4.2.5.2. Potențialul zeta al nanoparticulelor	92
4.2.5.3. Determinarea conținutului de naringenină încorporată în nanoemulsii lipidice	92
4.2.6. Evaluarea stabilității nanoemulsiilor cu naringenină și ICG în prezența serului in vitro	93
4.2.7. Imagistică de fluorescență	93
4.2.8. Studii pe animale- Modelul experimental de inflamație murină indusă de LPS	93
4.2.9. Dozarea naringeninei în omogenate tisulare prin UHPLC	94
4.2.10. Analiza statistică	95
4.3. Rezultate	95
4.3.1. Caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor cu naringenină și ICG	95
4.3.2. Stabilitatea nanoemulsiilor încărcate cu naringenină și ICG în prezența serului	97
4.3.3. Eficiența radiantă a ICG încorporat în nanoemulsii	99
4.3.4. Biodistribuția nanoemulsiilor încărcate cu naringenină în modelul de inflamație murină indusă de LPS	100
4.3.4.1. Biodistribuția nanoemulsiilor încărcate cu naringenină evaluată prin eficiența radiantă a ICG	100

4.3.4.2. Biodistribuția nanoemulsiilor încărcate cu naringenină evaluată prin dozarea naringeninei prin UHPLC	108
4.4. Discuții	110
4.5. Concluzii	115
CAPITOLUL 5-VALIDAREA IN VIVO A EFECTELOR ANTI-INFLAMATOARE ALE NANOEMULSIILOR LIPIDICE ÎNCĂRCATE CU NARINGENINĂ	116
5.1. Introducere și obiective	116
5.2. Materiale si metode	116
5.2.1. Reactivi	116
5.2.2. Prepararea și caracterizarea nanoemulsiilor nețintite și tintite către VCAM-1, încărcate cu naringenină	117
5.2.3. Real Time PCR	117
5.2.4. Designul primerilor	118
5.2.5. Analiza statistică	118
5.2.6. Design experimental -Modelul experimental de inflamație acută indusă de LPS	118
5.3. Rezultate	119
5.4. Discuții	126
5.5. Concluzii	130
CONCLUZII GENERALE	131
BIBLIOGRAFIE TEZĂ	133
E. LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE ȘI COMUNICATE	157

Cuvinte cheie: inflamație, endoteliu activat, nanoparticule direcționate, nanoemulsii, VCAM-1, polifenol, flavonoid, naringenina, hesperetina, Indocyanine Green, TNF, LPS, transmigrare a monocitelor, adeziune a monocitelor

Număr total de pagini – 159

Număr de figuri în Partea I - 12

Număr de tabele în Partea I – 6

Număr de figuri în Partea a II a - 50

Număr de tabele în Partea a II a - 11

Referințe bibliografice - 358

Lucrări publicate în reviste indexate ISI in perioada stagiului de doctorat - 9 (1 autor principal)

Lucrări în pregătire -1

Capitole carte -1

Postere prezentate la manifestări științifice internaționale-6 (autor principal)

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

Premii naționale - 2

Burse obținute pe durata programului doctoral -1 (bursă doctorală de la Academia Română)

Participarea la proiecte de cercetare naționale legate de tematica tezei de doctorat- 1

Introducere și obiective

Bolile cronice inflamatorii reprezintă cauza cea mai importantă a mortalității globale. La nivel mondial, peste 50% din populație suferă decese datorate atacurilor vasculare cerebrale, bolilor cronice respiratorii, cardiovasculare, cancerului, obezității și diabetului.

Procesul cronic inflamator este implicat în numeroase patologii aparent neînrudite, ca o caracteristică unificatoare ce pare să le conecteze dincolo de diversitatea fenotipică. *Mai probabil o cauză decât un efect*, inflamația de intensitate redusă, dar persistentă (cronică) este asociată cu așa-numitele „boli ale civilizației” precum bolile cardiovasculare, cancerul, boala obstructivă pulmonară cronică, diabetul, patologia neurodegenerativă. Conform statisticilor Organizației Mondiale a Sănătății, patologiiile menționate se situează între primele cinci cauze ale mortalității la nivel global.

Având în vedere importanța procesului inflamator în evoluția diferitelor disfuncții, noi termeni precum inflamația metabolică - „metaflamația” și inflamația asociată îmbătrânirii (în limba engleză „inflammageing”) au fost introduși recent în vocabularul medical pentru a descrie legătura dintre inflamație și bolile cronice metabolice (diabet de tip II, obezitate) și, respectiv, implicarea inflamației în procese fiziologice cum ar fi îmbătrânirea.

Actualmente, compușii anti-inflamatori de sinteză, steroidici și nesteroidici, reprezintă tratamentul de elecție. Cu toate acestea, utilizarea acestora atrage variate efecte secundare nedorite.

În ultimele decenii, compușii fitochimici au atras interesul ca alternativă la medicația convențională datorită profilului lor toxicologic sigur și acțiunii terapeutice în diferite boli. Dintre acești compuși, polifenolii-sub formă de compuși purificați sau ca extracte din diferite surse naturale-oferă numeroase oportunități terapeutice, prin inhibarea unor căi de semnalizare pro-inflamatoare.

Printre limitările utilizării terapeutice a polifenolilor pe scară largă sunt hidrosolubilitatea scăzută și, subsecvent, biodisponibilitatea redusă la administrare orală. Încorporarea acestor principii active în nanoparticule ar putea înlătura dezavantajele menționate, mai ales în condițiile dezvoltării de terapii pentru livrarea direcționată a compușilor bioactivi la situsurile inflamate, limitând atât disiparea substanței utile în circulația sistemică, cât și efectele secundare nedorite.

În acest context, endoteliul vascular reprezintă o țintă atractivă pentru nanoparticulele funcționalizate către moleculele de adeziune ce sunt supraexprimate pe suprafața celulei în condițiile activării de către diferiți agenți stresori.

Având în vedere efectele anti-inflamatorii benefice descrise pentru flavonoidele din citrice-naringenină și hesperetină, s-a preconizat că prin încorporarea într-un nanotransportor, direcționat specific prin administrare intravenoasă către situsurile vasculare inflamate, acești compuși ar avea o eficacitate terapeutică crescută.

Anterior, în cadrul Laboratorului de Nanoterapii, liposomi direcționați către molecula de adeziune VCAM-1 au fost eficienți în țintirea și reducerea activării endoteliului în ateroscleroză și cancer. Pe baza acestor date, a fost formulată ipoteza conform căreia, încapsularea celor două flavonoide, naringenina și hesperetina, în nanoemulsii lipidice direcționate către VCAM-1 ar putea fi utilizată pentru reducerea inflamației induse de TNF- α în celulele endoteliale.

În lucrarea de față ne-am propus și am realizat următoarele **obiective**: (1) conceperea, prepararea și caracterizarea de nanoparticule lipidice în scopul folosirii lor ca vectori pentru transportul țintit de polifenoli, cum sunt flavonoidele din citrice, naringenina și hesperetina; (2) încărcarea nanoparticulelor cu polifenolii menționați la obiectivul 1 și funcționalizarea acestora în vederea direcționării lor către o țintă moleculară relevantă în inflamația vasculară, anume molecula

de adeziune celulară VCAM-1; (3) validarea preclinică a nanoparticulelor lipidice, încărcate cu polifenoli, ca vectori anti-inflamatori prin studii *in vitro* și *in vivo*.

Structura tezei de doctorat

Lucrarea este structurată în două părți principale, subdivizate în capitole.

Prima parte, alcătuită din două capitole, reprezintă o trecere în revistă a literaturii de specialitate și analizează stadiul actual al cunoștințelor privind inflamația și utilizarea polifenolilor încorporați în nanoparticule în terapia anti-inflamatorie. **Capitolul 1** se referă la mecanismele celulare și moleculare ale cascadei inflamatorii și la abordările terapeutice actuale care țintesc aceste evenimente. Sunt menționate principalele clase de agenți anti-inflamatori: glucocorticoizi, medicamente nesteroidice, statine, agenți biologici (inhibitori de citokine) și mecanismul acțiunii acestora. **Capitolul 2** reprezintă o recenzie a literaturii de specialitate referitoare la utilizarea polifenolilor încorporați în nanosisteme în scopuri anti-inflamatorii. Polifenolii reprezintă o clasă extinsă de compuși, metaboliți secundari ai plantelor, cu numeroase efecte terapeutice, anti-oxidante și anti-inflamatoare, antimicrobiene, anti-tumorale, anti-angiogenice și imunomodulatoare. Utilizarea terapeutică pe scara largă este însă împiedicată de hidrosolubilitatea și biodisponibilitatea scăzute. O strategie pentru îmbunătățirea biodisponibilității o reprezintă încorporarea polifenolilor în diferite formule de nanoparticule: liposomi, nanoemulsii. O serie de studii clinice au demonstrat că biodisponibilitatea polifenolilor poate fi îmbunătățită semnificativ prin nanoformulare. Studii preclinice și clinice au arătat efectele benefice ale polifenolilor încorporați în nanoparticule în diverse modele experimentale sau pacienți cu condiții inflamatorii asociate, date fiind disponibile cu precădere pentru curcumină și resveratrol. Datele recenzate recomandă nanotehnologia ca o soluție atractivă pentru a maximiza efectele terapeutice ale compușilor anti-inflamatori naturali, pentru o mai promptă utilizare clinică. De asemenea se evidențiază necesitatea explorării unei game mai diverse de compuși. Recenzia realizată în **Capitolul 2** a fost publicată în anul 2020 sub forma unui capitol de carte [1].

Partea a doua a lucrării cuprinde contribuțiile originale, organizate în trei capitole.

Capitolul 3 prezintă un studiu referitor la efectele anti-inflamatoare *in vitro* ale flavonoidelor din citrice-naringenină și hesperetină-încorporate în nanoemulsii lipidice utilizând linia de celule endoteliale umane EA.hy926.

Naringenina și hesperetina, principalele flavonoide din fructele citrice, fie în formă liberă, sau ca glicozide prezente în mod natural, sunt intens investigate în prezent pentru potențialul terapeutic în ateroscleroză și diabetul de tip II, două din patologiiile cu răspândire pandemică la nivelul societăților dezvoltate. Aceste flavonoidele exercită un spectru larg de activități: anti-oxidante, anti-inflamatoare, de reducere a glicemiei și lipemiei și îmbunătățire a parametrilor metabolici: corectează dislipidemia, cresc toleranța la glucoză și responsivitatea la insulină, reduc inflamația și adipozitatea.

O serie de studii anterioare din literatură au descris încorporarea acestor compuși în nanoparticule destinate mai ales administrării orale. Puține încercări de direcționare specifică a flavonoidelor din citrice la situsuri patologice în vederea creșterii concentrației locale efective au fost raportate în literatură. La momentul inițierii cercetărilor nu existau studii referitoare la nanoparticule direcționate conținând naringenină destinate administrării intravenoase.

În studiul prezentat în **Capitolul 3** este descrisă încorporarea naringeninei și hesperetinei, flavonoide cu hidrosolubilitate scăzută, în nanoemulsii lipidice. În plus, nanoparticulele au fost direcționate specific către molecula de adeziune celulară VCAM-1, supraexprimată pe suprafața endoteliului activat. Nanoemulsiile au fost testate funcțional *in vitro*.

Principalele rezultate:

- ♦ S-a reușit încorporarea flavonoidelor cu eficiență $\geq 80\%$, iar nanoemulsiile au prezentat stabilitate bună *in vitro* în condițiile menținerii timp de 3 luni la 4°C sau o săptămână la 37°C.
- ♦ Caracterizarea fizico-chimică a indicat dimensiuni ale nanoparticulelor de ~200 nm, independent de încărcarea cu flavonoid și cuplarea cu peptida de recunoaștere a VCAM-1, iar indicii de polidispersie de ~0.2 au indicat omogenitatea populațiilor.
- ♦ Potențialul zeta al nanoparticulelor nedirecționate s-a situat în jurul valorii de -30 mV. Cuplarea cu peptida de recunoaștere a VCAM-1 a deplasat valorile potențialului zeta spre valori mai negative, proporțional cu cantitatea de peptidă cuplată.
- ♦ Studiile de eliberare *in vitro* în modelul săculețului de dializă au indicat că naringenina și hesperetina au fost eliberate din nanoemulsii cu o cinetică mai lentă decât compușii puri. Cinetica eliberării s-a desfășurat după un model Weibull (exponențială monofazică).
- ♦ Nanoemulsiile încărcate cu flavonoide nu au manifestat citotoxicitate *in vitro* pe linia de celule endoteliale umane EA.hy926 la concentrațiile testate (25, 50, 100 μM) și au prezentat hemocompatibilitate la șoareci apoE deficienți și C57/Black6.
- ♦ Nanoemulsiile încărcate cu flavonoide, nețintite sau țintite către endoteliu, sunt preluate de celulele endoteliale umane din linia EA.hy926 într-o manieră dependentă de doză și timp, dar dependentă de TNF- α doar în cazul endoteliului activat.
- ♦ Teste funcționale au arătat că flavonoidele încorporate în nanoemulsii, la o concentrație de 50 μM , au inhibat atât adeziunea cât și transmigrarea monocitelor THP-1 la/printru celulele endoteliale activate, printr-un mecanism care implică scăderea expresiei la nivel de genă și proteină a chemokinei pro-inflamatorii MCP-1 și reducerea translocării nucleare a NF- κB . Efectele au fost mai pronunțate în cazul nanoparticulelor direcționate.

Rezultatele acestui studiu au fost publicate în revista *Pharmaceutics* (factor de impact 4,773) [2].

În studiul prezentat în **Capitolul 4** am investigat biodistribuția nanoparticulelor ce încorporează naringenină într-un model experimental de inflamație acută indusă de LPS. Deoarece naringenina ca atare nu prezintă caracteristici spectrale care să permită evaluarea localizării nanoparticulelor *in situ*, pentru marcare am utilizat traserul de domeniu infraroșu apropiat Indocyanine Green (ICG) și am încercat să stabilim o corelație între distribuția fluorescenței ICG prin IVIS și concentrațiile de naringenină dozate prin HPLC. ICG este un traser intens investigat în prezent datorită tropismului pentru sistemul cardiovascular, ca alternativă la tehnici invazive și/sau toxice de investigație. Combinația naringenină/ICG în nanocărăuși nu a mai fost raportată în literatură și domeniul utilizării ICG în urmărirea biodistribuției unor substanțe active încorporate în nanosisteme de transport este unul de mare actualitate.

Principalele rezultate:

- ♦ Pentru evaluarea potențialului de țintire al nanoparticulelor încărcate cu naringenină și direcționate către molecula de adeziune celulară VCAM-1, am obținut în premieră nanoparticule ce co-incorporează naringenină și traserul NIR Indocyanine green (ICG). S-au obținut nanoemulsii

stabile timp de 3 luni la 4°C, conținând naringenină și ICG, nedirecționate sau direcționate la VCAM-1.

- ♦ Dimensiunile nanoparticulelor au fost ~220 nm, iar potențialul zeta a fost de ~ -40 mV.
- ♦ Nu s-au evidențiat modificări ale potențialului zeta datorită funcționalizării cu peptida de recunoaștere a VCAM-1, spre deosebire de cazul nanoemulsiilor ce conțin doar naringenină.
- ♦ ICG încorporat în nanoemulsiile a prezentat un semnal liniar de fluorescență pe domeniul 0-60 μM. Deși eficiența radiantă a fost de 10 ori mai scăzută decât a rodaminei, liniaritatea semnalului a fost superioară.
- ♦ Nanoemulsiile cu ICG și naringenină au fost stabile în prezența serului murin la 37°C *in vitro*.
- ♦ Pentru urmărirea biodistribuției nanoparticulelor, acestea au fost administrate intravenos într-un model experimental de inflamație indusă cu LPS la șoareci C57/Black6. Nanoemulsiile s-au distribuit nespecific în ficat, rinichi, plămâni, splină, creier, așa cum s-a demonstrat prin analiza *ex vivo* a organelor prin tehnica IVIS. Nanoemulsiile s-au distribuit specific la nivelul segmentului (inimă+aortă), ca și în aortele individuale. Distribuția selectivă a fost atribuită funcționalizării cu peptida de recunoaștere a VCAM-1, deoarece în aceleași condiții ICG liber s-a distribuit nespecific, iar nanoemulsiile au fost echivalente din punct de vedere al dimensiunilor și potențialului zeta, singura diferență constând în prezența peptidei de cuplare.
- ♦ Evaluarea concentrației de naringenină prin UHPLC a indicat o corelație satisfăcătoare cu datele de fluorescență, iar cauzele anumitor discrepante sunt analizate.

Coroborate, aceste date susțin utilitatea nanoparticulelor încărcate cu ICG în urmărirea localizării după administrarea intravenoasă la șoarece. În plus, ele arată că nanoparticulele țintite către VCAM-1 s-au localizat preferențial în anumite situsuri ale endoteliului activat, unde au eliberat agentul activ.

Capitolul 5 se referă la studiul efectelor anti-inflamatoare ale nanoparticulelor încorporând naringenină *in vivo* într-un model experimental de inflamație indusă de LPS. Rezultatele experimentelor de qRT-PCR pe organe prelevate de la șoareci cu inflamație indusă de LPS au confirmat potențialul terapeutic al naringeninei încorporate în nanoemulsiile. Datele noastre arată la animalele tratate cu nanoparticule țintite, o reducere a expresiei genice a unor markeri inflamatori precum TNF-α, IL-1β, MCP-1, RANTES, VCAM-1 și ICAM-1. Sumarul cazurilor în care nanoemulsiile încărcate cu naringenină au avut un efect mai puternic în reducerea expresiei genice a markerilor inflamatorii în varianta țintită către VCAM-1 comparativ cu cea nețintită este prezentat în Tabelul 1.

Molecula	Diferențe cu semnificație statistică	Diferențe fără semnificație statistică
TNF- α	rinichi	Inimă, plămâni, creier
IL-1 β	plămâni	Inimă
MCP-1		Rinichi, plămân, splină, creier, inimă
RANTES	creier	Plămâni, inimă
VCAM-1	plămâni	Splină, inimă
ICAM-1		Plămâni, inimă, creier

Tabelul 1. Sumarul cazurilor în care nanoemulsiile încărcate cu naringenină au avut un efect mai puternic în varianta țintită către VCAM-1 comparativ cu cea nețintită în reducerea expresiei genice a markerilor inflamatori evaluați.

Deși diferențe statistice semnificative între nanoemulsiile țintite către VCAM-1 și cele nețintite s-au înregistrat doar în câteva situații punctuale (IL-1 β în plămâni, TNF- α în rinichi, RANTES în creier, VCAM-1 în plămâni), totuși evaluarea de ansamblu a panelului de markeri inflamatori indică o tendință anti-inflamatoare.

Această lucrare aduce următoarele **contribuții originale**:

- (i) conceperea și caracterizarea nanoemulsiilor lipidice care încorporează flavonoide din citrice;
- (ii) funcționalizarea acestora cu o peptidă de recunoaștere a moleculei de adeziune VCAM-1;
- (iii) demonstrarea preluării specifice a nanoemulsiilor direcționate la VCAM-1 de către celulele endoteliale umane activate cu TNF- α ;
- (iv) validarea activității anti-inflamatoare *in vitro* prin reducerea adeziunii și transmigrării monocitelor la/prin endoteliu;
- (v) conceperea și caracterizarea nanoemulsiilor lipidice încărcate cu naringenină și etichetate fluorescent prin co-încorporarea fluorocromului NIR, Indocyanine Green;
- (vi) urmărirea țintirii specifice a endoteliului *in vivo* folosind un model murin de inflamație, pe baza determinării fluorescenței NIR a nanoemulsiilor lipidice;
- (vii) validarea *in vivo* a efectelor anti-inflamatoare ale nanoemulsiilor încărcate cu naringenină.

REFERINTE:

1. **Fuior E**, Calin M: Nanoparticle-based delivery of polyphenols for the treatment of inflammation-associated diseases in *Advances and Avenues in the Development of Novel Carriers for Bioactives and Biological Agents* 1st Edition, Elsevier (2020) (capitol carte)
2. **Fuior EV**, Deleanu M, Constantinescu CA, Rebleanu D, Voicu G, Simionescu M, Calin M. Functional Role of VCAM-1 Targeted Flavonoid-Loaded Lipid Nanoemulsions in Reducing

Endothelium Inflammation. Pharmaceutics. 2019;11(8). pii: E391. doi: 10.3390/pharmaceutics11080391(IF 4,77).

LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE ȘI COMUNICATE

In perioada desfășurării stagiului de doctorat (2015-2020) au fost publicate următoarele lucrări:

UN CAPITOL ÎNTR-O MONOGRAFIE APĂRUTĂ ÎN STRĂINĂTATE

Fuior, E.V., Calin, M. 2020. Nanoparticle-based delivery of polyphenols for the treatment of inflammation-associated diseases in *Advances and Avenues in the Development of Novel Carriers for Bioactives and Biological Agents* (editor Singh M et al.) ELSEVIER, Academic Press, pp 343-382, eBook ISBN: 9780128199183

LUCRĂRI PUBLICATE IN REVISTE INTERNATIONALE COTATE ISI:

ARTICOLE ORIGINALE : 1 LUCRARE PRIM-AUTOR SI 8 LUCRĂRI CO-AUTOR

1. **Fuior E.V.**, Deleanu M., Constantinescu C.A., Rebleanu D., Voicu G., Simionescu M., Calin M. Functional Role of VCAM-1 Targeted Flavonoid-Loaded Lipid Nanoemulsions in Reducing Endothelium Inflammation. Pharmaceutics. 2019; 11(8):391. doi: 10.3390/pharmaceutics11080391. (factor de impact 4,77).
2. Constantinescu C.A., **Fuior E.V.**, Rebleanu D., Deleanu M., Simion V., Voicu G., Escriou V., Manduteanu I., Simionescu M., Calin M. Targeted Transfection Using PEGylated Cationic Liposomes Directed Towards P-Selectin Increases siRNA Delivery into Activated Endothelial Cells. Pharmaceutics. 2019;11(1):47. doi: 10.3390/pharmaceutics11010047. (factor de impact 4,77)
3. Voicu G., Rebleanu D., Constantinescu C.A., **Fuior E.V.**, Ciortan L., Droc I., Uritu C.M., Pinteala M., Manduteanu I., Simionescu M., Calin M. Nano-Polyplexes Mediated Transfection of Runx2-shRNA Mitigates the Osteodifferentiation of Human Valvular Interstitial Cells. Pharmaceutics. 2020;12(6):507. doi: 10.3390/pharmaceutics12060507. (factor de impact 4,84)
4. Trusca V.G., **Fuior E.V.**, Kardassis D., Simionescu M., Gafencu A.V. Int J Mol Sci. The Opposite Effect of c-Jun Transcription Factor on Apolipoprotein E Gene Regulation in Hepatocytes and Macrophages. 2019;20(6):1471. doi: 10.3390/ijms20061471.
5. Trusca V.G, **Fuior E.V.**, Fenyó I.M., Kardassis D., Simionescu M., Gafencu A.V. Differential action of glucocorticoids on apolipoprotein E gene expression in macrophages and hepatocytes. PLoS One. 2017;12(3):e0174078. doi: 10.1371/journal.pone.0174078.
6. Roman C, **Fuior E.V.**, Trusca V.G., Kardassis D., Simionescu M., Gafencu A.V. Biochem Biophys Thyroid hormones upregulate apolipoprotein E gene expression in astrocytes. Res Commun. 2015;468(1-2):190-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.132.
7. Niculescu L.S., Simionescu N., **Fuior E.V.**, Stancu C.S, Carnuta M.G., Dulceanu M.D., Raileanu M., Dragan E., Sima A.V. Inhibition of miR-486 and miR-92a decreases liver and plasma cholesterol levels by modulating lipid-related genes in hyperlipidemic hamsters. Mol Biol Rep. 2018;45(4):497-509. doi: 10.1007/s11033-018-4186-8.

8. Brehar F.M., Gafencu A.V., Trusca V.G., **Fuior E.V.**, Arsene D., Amaireh M, Giovani A., Gorgan M.R. Preferential Association of Lissencephaly-1 Gene Expression with CD133+ Glioblastoma Cells. *J Cancer*. 2017;8(7):1284-1291. doi: 10.7150/jca.17635.

9. Trusca V.G., Mihai A.D., **Fuior E.V.**, Fenyo I.M., Gafencu A.V. High levels of homocysteine downregulate apolipoprotein E expression via nuclear factor kappa B. *World J Biol Chem*. 2016;7(1):178-87. doi: 10.4331/wjbc.v7.i1.178.

2 RECENZII :

1. **Fuior E.V.**, Gafencu A.V. Apolipoprotein C1: Its Pleiotropic Effects in Lipid Metabolism and Beyond. *Int J Mol Sci*. 2019;20(23):5939. doi: 10.3390/ijms20235939.

2. Trusca V.G., **Fuior E.V.**, Gafencu A.V. Beyond Lipoprotein Receptors: Learning from Receptor Knockouts Mouse Models about New Targets for Reduction of the Atherosclerotic Plaque. *Curr Mol Med*. 2015;15(10):905-31. doi:10.2174/1566524016666151123110310.

1 MANUSCRIS IN PREPARARE (PRIM-AUTOR)

1. Fuior, E.V., Constantinescu, C.A., Voicu, G., Deleanu, M., Anghelache M, Rebleanu, D., Simionescu, M., Calin, M. 2020 Evaluation of the therapeutic effects of naringenin incorporated in nanoemulsions in experimental acute inflammation (*manuscris în preparare*)

LUCRĂRI PREZENTATE LA MANIFESTĂRI ȘTIINȚIFICE INTERNAȚIONALE: 6

1. Fuior, E.V., Voicu, G., Deleanu, M., Rebleanu, D., Constantinescu, C. A., Safciuc, F., Simionescu, M., Calin, M. *VCAM-1 targeted flavanone-loaded lipid nanoemulsions exert anti-inflammatory effects on activated endothelial cells*, BAHH2Workshop “Modern Biotechnological Advances for Human Health” organizat de INCDSB și International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, 28-31 mai 2019, București, Book of Abstracts p.75 (poster)

2. Fuior, E.V., Deleanu, M., Constantinescu, C. A., Rebleanu, D., Voicu, G., Simionescu, M., Calin, M. *Flavonoids-Loaded Lipid Nanoemulsions Protect Against Endothelial Inflammation By A Mechanism Involving NF-κB Transcription Factor and MCP-1 Chemokine*, Al 11 lea Congres Național cu participare internațională și a 37a sesiune anuală a Societății Române de Biologie Celulară (sub egida Academiei Române), 20-23 iunie 2019, Constanța, Book of Abstracts p. 128 (poster)

3. Fuior, E.V., Voicu, G., Deleanu, M., Rebleanu, D., Constantinescu, C.A., Safciuc, F., Simionescu, M., Călin, M. *VCAM-1 targeted flavanone-loaded lipid nanoemulsions exert anti-inflammatory effects on activated endothelial cells*– Simpozion aniversar IBPC “An incredible 40-year journey to uncover cell’s secrets for the benefit of human health”, 19-20 septembrie 2019, București, România (poster)

4. Fuior, E.V., Deleanu, M., Voicu, G., Rebleanu, D., Constantinescu, C.A., Safciuc, F, Simionescu, M., Calin, M. *Preparation and characterization of endothelium-targeted flavonoid-loaded lipid nanoemulsions*– The 36th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology and the 10th

National Congress with International Participation: 6-9 iunie 2018, Craiova, România (poster)- premiul I la secțiunea POSTERE

5. Fuior, E.V., Voicu, G., Deleanu, M., Rebleanu, D., Constantinescu, C.A., Safciuc, F., Simionescu, M., Calin, M. *VCAM-1 targeted naringenin-loaded lipid nanoemulsions reduce monocyte adhesion to activated endothelial cells*- International Conference on Nanotechnology and Bioscience, 24-28 septembrie 2018, Heraklion, Creta, Grecia (NanoBio 2018 Abstract Book, p. 153, WS1-P21)

6. Fuior E.V., Voicu G., Deleanu M., Rebleanu D., Constantinescu C.A., Safciuc F., Simionescu M., Calin M.– *VCAM-1 targeted naringenin-loaded lipid nanoemulsions reduce monocyte adhesion to activated endothelial cells* –“Advances in proteomics and progress in precision medicine”: 24-26 Octombrie 2018, București, România (poster FrPo11, Program Booklet p.14)

LUCRĂRI PREZENTATE LA MANIFESTĂRI ȘTIINȚIFICE NAȚIONALE: 1

LUCRARE

Fuior E.V. -*Reducerea activării endoteliului cu ajutorul nanoemulsiilor lipidice încărcate cu polifenoli*, Școala de Vară INTERA 3 “Nanoparticule inteligente pentru livrarea direcționată de compuși bioactivi: preparare, caracterizare, aplicații” 23-24 mai 2019, București (prezentare orală)

BURSE OBTINUTE PE DURATA PROGRAMULUI DOCTORAL: 1 (BURSĂ DOCTORALĂ DE LA ACADEMIA ROMÂNĂ)

PREMII : 2

Fuior, E.V., Deleanu, M., Voicu, G., Rebleanu, D., Constantinescu, C.A., Safciuc, F., Simionescu, M., Calin, M. *Preparation and characterization of endothelium-targeted flavonoid-loaded lipid nanoemulsions*– The 36th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology and the 10th National Congress with International Participation: 6-9 iunie 2018, Craiova, România (poster)- premiul I la secțiunea POSTERE

Fuior, E.V., Deleanu, M., Constantinescu, C.A., Rebleanu, D., Voicu, G., Simionescu, M., Calin, M. 2019. Functional Role of VCAM- 1 Targeted Flavonoid-Loaded Lipid Nanoemulsions in Reducing Endothelium Inflammation. *Pharmaceutics*, 11(8):391. doi:10.3390/ pharmaceutics11080391 (Factor de impact 4,77)-premiu UEFICDI-Premierea rezultatelor cercetării PRECISI 2019.

FINANȚAREA CERCETĂRILOR:

Proiect INTERA3: “**Nanobioparticule inteligente concepute pentru vectorizarea compusilor bioactivi in terapia inflamatiei vasculare**” în cadrul proiectului complex “Terapii inteligente pentru boli non-comunicabile, bazate pe eliberarea controlată de compuși farmacologici din celule încapsulate după manipulare genetică sau bionanoparticule vectorizate”, PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0697/ Contract **UEFISCDI nr. 13PCCDI/2018** Director: Dr. Manuela Călin