



ACADEMIA ROMÂNĂ
Școala de Studii Avansate a Academiei Române
Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae
Simionescu”

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Nanoterapii inovatoare pentru boala valvei aortice în diabet

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
Acad. MAYA SIMIONESCU

DOCTORAND:
GEANINA VOICU

2022

Cuprins

INTRODUCERE	11
LISTĂ ABREVIERI	14
I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	17
I.1 Boala valvei aortice	17
I.1.1 Biologia și ontogeneza valvei aortice	17
I.1.1.1 Organizarea valvei aortice.....	17
I.1.1.2. Ontogeneza valvei aortice.....	18
I.1.1.3 Structura valvei aortice	18
a. Celule endoteliale valvulare (VEC)	18
b. Celule interstițiale valvulare (VIC).....	19
c. Alte tipuri celulare	20
I.1.2 Calcificarea valvei aortice (CVA).....	20
I.1.2.1. Epidemiologia calcificării valvei aortice	20
I.1.2.2. Factori de risc ai calcificării valvei aortice	21
I.1.2.3. Mecanismele celulare și moleculare ale calcificării valvei	22
a. Activarea celulelor endoteliale.....	23
b. Diferențierea celulelor interstițiale valvulare native (quaiescent, qVIC) în miofibroblaste	24
c. Osteodiferențierea celulelor valvulare interstițiale	25
d. Remodelarea matricei extracelulare.....	31
e. Formarea nodulilor de calcificare.....	32
I.1.2.4. Calcificarea valvei aortice (CVA) și ateroscleroza.....	33
I.1.2.5. Calcificarea valvei aortice în diabet.....	34
I.2 Abordări terapeutice în calcificarea valvei aortice.....	36
I.2.1 Înlocuirea chirurgicală a valvei aortice.....	36
I.2.2 Inhibitori ai moleculelor și căilor de semnalizare implicate în calcificarea valvei aortice	37
I.2.3 Statine	38
I.2.4 Alte tratamente	38
I.3 Folosirea nanoparticulelor în tratamentul bolilor cardiovasculare	39
I.3.1 Tipuri de nanoparticule	39
a. Nanoparticule pe bază de carbon	40
b. Dendrimeri	41
c. Nanoparticule polimerice	41
d. Nanoparticule lipidice	42

I.3.2 Modalități de transport (pasiv/activ) ale nanoparticulelor.....	44
I.3.2.1 Transportul pasiv al nanoparticulelor	45
I.3.2.2 Transportul activ al nanoparticulelor	46
I.3.3 Molecule utilizabile drept ținte în transportul direcționat al nanoparticulelor la valva aortică afectată	46
I.3.3.1 Molecule de adeziune celulară	47
a. Selectine	47
b. Integrine	49
c. Molecule de adeziune celulară din superfamilia imunoglobulinelor	49
I.3.3.2 Colagen tip IV	51
I.3.4 ARN de interferență	52
I.3.5 Folosirea ARN-ului de interferență în tratamentul bolilor cardiovasculare.....	55
I.4 Concluzii	57
II. CONTRIBUȚII ORIGINALE	59
STRATEGII NANOTERAPEUTICE PENTRU BLOCAREA PROCESULUI DE OSTEODIFERENȚIERE AL CELULELOR VALVULARE INTERSTIȚIALE (VIC)	60
II.1. Osteodiferențierea VIC indusă de concentrații crescute de glucoză și factori osteogeni - Rolul factorului de transcriere Runx2 în osteodiferențierea VIC	60
II.1.1. Introducere și obiective.....	60
II.1.2. Protocoale experimentale și metode de analiză.....	61
II.1.2.1. Materiale	61
II.1.2.2. Culturi celulare	62
a. Izolarea și cultivarea celulelor valvulare interstițiale (VIC)	62
b. Caracterizarea VIC	63
II.1.2.3. Determinarea exprimării proteice a moleculelor osteogene în VIC activate și osteodiferențiate.....	64
a. Dozarea proteinei totale din lizat celular prin metoda Amido Black	64
b. Identificarea și cuantificarea proteinelor prin tehnica Western Blot	65
II.1.2.4. Evaluarea microscopică a depozitelor de fosfatază alcalină	66
II.1.2.5. Determinarea activității fosfatazei alcaline și a concentrației de calciu în VIC osteodiferențiate.....	66
II.1.3. Rezultate.....	67
II.1.3.1. Caracterizarea VIC	67
II.1.3.2. Influența factorilor osteogeni și a concentrațiilor crescute de glucoză asupra exprimării moleculelor osteogene în VIC	68
II.1.3.3. Formarea depozitelor de fosfatază alcalină în VIC osteodiferențiate.....	70
II.1.3.4. Creșterea activității fosfatazei alcaline și a concentrației de calciu în VIC osteodiferențiate.....	70

II.1.4. Discuții	71
II.1.5. Concluzii	73
II.2. Folosirea poliplexelor C60-PEI/ARNsh pentru transportul intracelular de ARNsh-Runx2 și blocarea osteodiferențierii VIC	75
II.2.1. Introducere și obiective.....	75
II.2.2. Protocoale experimentale și metode de analiză.....	77
II.2.2.1. Materiale	77
II.2.2.2. Multiplicarea plasmidelor ARNsh-Runx2	77
a. Obținerea bacteriilor competente DH5α <i>E.coli</i>	77
b. Multiplicarea plasmidelor ARNsh în celule bacteriene competente DH5α <i>E.coli</i>	78
c. Izolarea plasmidelor ARNsh	80
II.2.2.3. Sinteza poliplexelor C60-PEI/ARNsh.....	81
II.2.2.4. Caracterizarea poliplexelor C60-PEI/ARNsh.....	82
a. Dimensiunea și potențialul Zeta al poliplexelor	82
b. Electroforeză în gel de agaroză	82
d. Test de viabilitate celulară	82
e. Preluarea poliplexelor C60-PEI/Cy3 de către VIC.....	83
f. Transfecția VIC cu poliplexe C60-PEI/pEYFP.....	83
II.2.2.5. Determinarea expresiei genice a moleculelor osteogene în VIC transfectate.....	84
a. Izolarea ARN-ului total	84
b. Revers-transcrierea ARN-ului în ADN complementar	85
c. Cuantificarea în timp real a polimerizării în lanț a ADNc (RT-PCR)	85
II.2.2.6. Determinarea exprimării proteice a moleculelor osteogene din VIC transfectate..	86
II.2.2.7. Evidențierea activității fosfatazei alcaline în VIC transfectate	87
a. Evaluarea microscopică a depozitelor de fosfatază alcalină.....	87
b. Cuantificarea activității fosfatazei alcaline.....	87
II.2.3. Rezultate.....	88
II.2.3.1. Caracterizarea poliplexelor C60-PEI/ARNsh.....	88
a. Dimensiune și potențial Zeta.....	88
b. Eficiența de împachetare a plasmidului ARNsh în poliplexe C60-PEI/ARNsh	88
c. Citotoxicitatea poliplexelor C60-PEI/ARNsh.....	89
d. Internalizarea poliplexelor C60-PEI/Cy3 în VIC	89
e. Transfecția VIC folosind poliplexele C60-PEI/pEYFP	89
II.2.3.2. Scăderea nivelului genic și proteic al Runx2 în VIC transfectate cu poliplexe C60-PEI/shRunx2	91
II.2.3.3. Scăderea exprimării proteice a moleculelor osteogene în VIC transfectate cu poliplexe C60-PEI/shRunx2	92

II.2.3.4. Scăderea activității fosfatazei alcaline în VIC transfectate cu C60-PEI/shRunx2	95
a. Blocarea formării depozitelor de fosfatază alcalină.....	95
b. Scăderea activității enzimatică a fosfatazei alcaline	97
II.2.4. Discuții	98
II.2.5. Concluzii	100
II.3. Direcționarea specifică a lipopoliplexelor transportoare de ARNsh către ținte moleculare exprimate de VIC osteodiferențiate.....	101
II.3.1. Introducere și obiective.....	101
II.3.2. Protocoale experimentale și metode de analiză.....	103
II.3.2.1. Materiale	103
II.3.2.2. Culturi celulare în sistem bidimensional (2D) și tridimensional (3D).....	103
II.3.2.3. Evaluarea expresiei de colagen IV și VCAM-1 în VIC osteodiferențiate	104
II.3.2.4. Obținerea lipopoliplexelor transportoare de ARNsh (LPP/ARNsh) direcționate specific.....	105
II.3.2.5. Caracterizarea lipopoliplexelor (LPP)	107
a. Dimensiune și potențial Zeta, stabilitate coloidală și fizică.....	107
b. Colorare negativă pentru Microscopie Electronică de Transmisie (TEM).....	107
c. Efectul electroliților asupra stabilității lipopoliplexelor	108
d. Eficiența de încapsulare a plasmidului în lipopoliplexe	108
e. Determinarea cantității de peptid cuplat la suprafața lipopoliplexelor prin tehnica UHPLC.....	109
f. Citotoxicitatea lipopoliplexelor	109
g. Legarea lipopoliplexelor direcționate către colagen IV (ColIV-LPP/shRNA) la matricea extracelulară	110
h. Prelucarea LPP direcționate către colagen IV (ColIV-LPP/shRNA) sau VCAM-1 (V-LPP/shRNA) de către VIC	110
i. Testul de hemocompatibilitate	111
II.3.2.6. Transfecția VIC cu lipopoliplexele ColIV-LPP/shRunx2 și V-LPP/shRunx2 în condiții statice	112
a. RT-PCR.....	112
b. Western blot.....	113
II.3.2.7. Transfecția VIC cu lipopoliplexele ColIV-LPP/shRunx2 și V-LPP/shRunx2 în condiții dinamice	114
II.3.2.8. Determinarea activității fosfatazei alcaline și a concentrației de calciu în VIC cultivate în sistem 3D, transfectate cu lipopoliplexe ColIV-LPP/shRunx2 și V-LPP/shRunx2	115
II.3.2.9. Evidențierea depozitelor de calciu în VIC cultivate în sistem 3D și transfectate cu lipopoliplexe ColIV-LPP/shRunx2 și V-LPP/shRunx2.....	115
II.3.3. Rezultate.....	116

II.3.3.1. VIC osteodiferențiate prezintă o supraexprimare de colagen IV și VCAM-1	116
II.3.3.2. Caracterizarea lipopoliplexelor	118
a. Sinteza lipopoliplexelor	118
b. Dimensiunea, potențialul Zeta și structura lipopoliplexelor	119
c. Stabilitatea coloidală a lipopoliplexelor	120
d. Agregarea indusă de electroliți	121
e. Citotoxicitatea lipopoliplexelor	121
f. Legarea lipopoliplexelor direcționate către colagen IV (ColIV-LPP/shControl) la matricea extracelulară	121
g. Lipopoliplexele direcționate către colagen IV și VCAM-1 sunt preluate eficient de VIC osteodiferențiate	123
h. Hemocompatibilitatea lipopoliplexelor	125
II.3.3.3. Lipopoliplexele cărauși de shRunx2 determină scăderea expresiei moleculelor osteogene în VIC osteodiferențiate în sistem 2D.....	125
II.3.3.4. Lipopoliplexele cărauși de shRunx2 determină scăderea expresiei moleculelor osteogene în VIC osteodiferențiate în sistem 3D.....	130
II.3.3.5. Lipopoliplexele cărauși de shRunx2 determină scăderea activității fosfatazei alcaline și a concentrației de calciu în VIC osteodiferențiate în sistem 3D.....	132
II.3.4. Discuții	133
II.3.5. Concluzii	139
STRATEGII NANOTERAPEUTICE CAPABILE SĂ ÎNCETINEASCĂ PROCESUL DE CALCIFICARE AL VALVEI AORTICE ÎNTR-UN MODEL EXPERIMENTAL MURIN	141
II.4. Biodistribuția lipopoliplexelor transportoare de ARNsh <i>in vivo</i>	141
II.4.1. Introducere și obiective.....	141
II.4.2. Protocoale experimentale și metode de analiză.....	143
II.4.2.1. Materiale	143
II.4.2.2. Obținerea modelului experimental animal: șoarecele ApoE-deficient diabetic....	143
II.4.2.3. Evaluarea expresiei de colagen IV și VCAM-1 la nivelul valvei aortice	144
a. Obținerea de criosecțiuni din valvele aortice murine	144
b. Imunohistochimie.....	144
II.4.2.4. Obținerea lipopoliplexelor transportoare de ARNsh dublu direcționate către colagen IV și VCAM-1 (ColIV/V-LPP/ARNsh).....	145
II.4.2.5. Evaluarea biodistribuției LPP/ARNsh după injectarea intravenoasă în șoareci	145
a. Imagistică de fluorescență <i>ex vivo</i>	146
b. Evaluarea biodistribuției LPP/ARNsh după injectarea intravenoasă în șoareci	146
II.4.3. Rezultate.....	146
II.4.3.1. Evidențierea expresiei de colagen IV și VCAM-1 în valva aortică murină	146
II.4.3.2. Caracterizarea ColIV/V-LPP/ARNsh	147

II.4.3.3. Biodistribuția ColIV/V-LPP/ARNsh în organe.....	147
II.4.3.4. Biodistribuția ColIV/V-LPP/ARNsh în valva aortică	149
II.4.3.5. Transfecția <i>in vivo</i> folosind lipopoliplexe dublu direcționate transportoare de plasmid ce codifică o proteină fluorescentă	150
II.4.4. Discuții	151
II.4.5. Concluzii	154
II.5. Evaluarea <i>in vivo</i> a efectelor terapeutice ale lipopoliplexelor transportoare de ARNsh-Runx2	155
II.5.1. Introducere și obiective.....	155
II.5.2. Protocoale experimentale și metode de analiză.....	155
II.5.2.1. Materiale	155
II.5.2.2. Prepararea ColIV/V-LPP transportoare de C60-PEI/shRunx2.....	156
II.5.2.3. Model experimental animal: șoarecele ApoE-deficient hiperlipemic diabetic.....	157
II.5.2.4. Tehnica Real-Time PCR (RT-PCR).....	158
II.5.2.5. Tehnica de imunohistochimie	159
II.5.2.6. Colorarea secțiunilor de valvă aortică murină cu Oil Red O.....	159
II.5.2.7. Evaluarea activității fosfatazei alcaline în valva aortică după tratamentul cu ColIV/V-LPP/ARNsh-Runx2	159
II.5.3. Rezultate.....	160
II.5.3.1. Scăderea expresiei genice a moleculelor implicate în CVA după tratamentul șoarecilor cu ColIV/V-LPP/ARNsh-Runx2	160
II.5.3.2. Scăderea exprimării proteice a moleculelor implicate în CVA după tratamentul șoarecilor cu ColIV/V-LPP/ARNsh-Runx2	161
II.5.3.3. Blocarea formării depozitelor lipidice la nivelul rădăcinii aortice murine după tratamentul șoarecilor cu ColIV/V-LPP/ARNsh-Runx2	162
II.5.3.4. Scăderea activității fosfatazei alcaline în valva aortică murină după tratamentul șoarecilor cu ColIV/V-LPP/ARNsh-Runx2	163
II.5.4. Discuții	164
II.5.5. Concluzii	168
CONCLUZII GENERALE	169
Bibliografie	172
VALORIFICAREA REZULTATELOR	214
LUCRĂRI PUBLICATE ÎN REVISTE INTERNAȚIONALE COTATE ISI (7 lucrări)	214
BREVETE	215
LUCRĂRI PREZENTATE LA MANIFESTĂRI ȘTIINȚIFICE INTERNAȚIONALE	216
PREMII	217
BURSA OBȚINUTĂ PE DURATA PROGRAMULUI DOCTORAL	217
FINANȚAREA CERCETĂRILOR (GRANTURI)	217

Cuvinte cheie: calcificare valvă aortică, celule valvulare interstițiale, osteodiferențiere, factor de transcriere Runx2, diabet, nanoterapii, poliplexe, lipopoliplexe direcționate, colagen IV, molecula de adeziune a celulelor vasculare VCAM-1, molecule osteogene, depozit de calciu

Număr total de pagini – 219

Număr de figuri în Partea I – 12

Număr de tabele în Partea I – 2

Număr de figuri în Partea II – 43

Număr de tabele în Partea II – 8

Referințe bibliografice – 462

Lucrări publicate în reviste indexate ISI în perioada stagiului de doctorat – 7 (2 autor principal)

Lucrări în pregătire – 2

Postere prezentate la manifestări științifice internaționale – 3 (autor principal)

Comunicări orale susținute la manifestări științifice internaționale – 1 (autor principal)

Brevete – 1

Bursă obținută 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

Calcificarea valvei aortice este o boală degenerativă care afectează 5% din populația de peste 65 ani, România fiind una dintre țările cu cea mai mare rată de mortalitate din Europa (<http://www.romedic.ro/stenoza-aortica>). Diagnosticarea timpurie și gestionarea tratamentului sunt de o importanță capitală în terapia bolii valvei aortice, întrucât nu există un tratament care să blocheze progresia acesteia. În cazul pacienților cu simptome grave, intervenția chirurgicală de înlocuire de valvă rămâne singura abordare (Kanwar et al., 2018; Lung et al., 2003), prognosticul sever al bolii nefiind influențat de medicația actuală folosită pentru tratarea simptomelor. Progresia calcificării valvei și necesitatea unei intervenții chirurgicale variază considerabil de la pacient la pacient, în majoritatea cazurilor obstrucția totală înregistrându-se în decurs de 2-5 ani de la instalarea calcificării (Owens et al., 2010).

Valva aortică este alcătuită din trei straturi de celule valvulare interstițiale (VIC) cu rol în menținerea homeostaziei valvei, separate de cavități printr-un strat de celule valvulare endoteliale (VEC) (Rutkovskiy et al., 2017). Principalul proces implicat în calcificarea valvei aortice este diferențierea osteoblastică a VIC sub influența factorului de transcriere asociat Runt 2 (Runx2)/Factorul de legare la nucleu 1 (Cbfa1). Runx2 determină creșterea expresiei unor molecule specifice VIC osteodiferențiate: fosfatază alcalină, osteocalcină, osteopontină, sialoproteină osoasă, și contribuie la depunerea activă de calciu (Hortells et al., 2018).

Deși alterarea metabolismului lipidelor și inflamația sunt implicate în inițierea calcificării valvei aortice, procesul activ de depunere a calciului este cel mai important în

progresia bolii (Pawade et al., 2015). Diabetul zaharat este un factor de risc și de predicție al degenerării valvei aortice, contribuind la progresia calcificării prin inducerea disfuncției celulelor endoteliale valvulare, remodelarea matricei extracelulare, instalarea inflamației și calcificarea ectopică (depunerea calciului în alte țesuturi decât cel osos) (Larrew et al., 2013).

La momentul actual nu se cunosc ținte particulare sau terapii specifice pentru tratamentul bolii valvei aortice în asociere cu diabetul zaharat. Fiind o arie de interes cu evoluție rapidă, nanoterapia bolii valvei aortice are implicații pe plan medical, dar și socio-economic, efectele acesteia fiind îmbunătățirea condiției de viață, creșterea speranței de viață și scăderea morbidității și mortalității.

Scopul prezentei teze de doctorat a fost de a identifica mecanismele și moleculele implicate în osteodiferențierea celulelor valvulare interstițiale, proces principal în calcificarea valvei aortice în asociere cu diabetul zaharat, și dezvoltarea și aplicarea unor strategii nanoterapeutice țintite pentru blocarea acestui proces în vederea reducerii sau combaterii timpurii a calcificării valvei aortice.

Au fost propuse și realizate următoarele **obiective specifice**:

1. Studiul mecanismelor implicate în osteodiferențierea celulelor valvulare interstițiale (VIC) și identificarea de potențiale ținte terapeutice. În cadrul acestui obiectiv s-au descris modificările timpurii și avansate induse, *in vitro*, de concentrații crescute de glucoză și factori osteogeni în VIC.
2. Conceperea, obținerea și caracterizarea unor nanoparticule țintite pentru blocarea osteodiferențierii VIC și validarea efectului terapeutic al acestor nanoterapii folosind modele experimentale *in vitro*. S-au obținut și caracterizat poliplexe formate din fulerena C60-PEI complexată cu plasmide ARNsh și lipopoliplexe direcționate specific, formate prin încapsularea poliplexelor menționate în liposomi. Efectul terapeutic al nanoparticulelor a fost stabilit pe sisteme de culturi celulare bi- și tridimensionale de VIC osteodiferențiate cultivate în mediu cu o concentrație crescută de glucoză și factori osteogeni.
3. Validarea preclinică a nanoterapiilor dezvoltate folosind modelul experimental *in vivo* de șoarece ApoE-deficient hiperlipemic și diabetic. În cadrul acestui studiu s-a demonstrat acumularea lipopoliplexelor țintite obținute și caracterizate anterior *in vitro* în valva disfuncțională și efectul terapeutic al acestor nanoparticule în valva aortică a șoarecilor ApoE-deficienți hiperlipemici și diabetici.

Structura tezei de doctorat

Prezenta teză de doctorat este structurată în două părți principale, divizate în opt capitole.

Prima parte, alcătuită din trei capitole, cuprinde aspecte teoretice cu privire la biologia și patologia valvei aortice, dar și la principalele terapii abordate în boala valvei aortice. **Capitolul 1** descrie anatomia, fiziologia și ontogeneza valvei aortice, cu accent asupra principalelor mecanisme celulare și moleculare implicate în calcificarea valvei aortice în diabet. **Capitolul 2** prezintă pe scurt stadiul actual al abordărilor terapeutice în calcificarea valvei aortice, urmând ca în **Capitolul 3** să se detalieze diferitele tipuri de nanoparticule transportoare de ARN de interferență sau medicamente folosite ca tratament în bolile cardiovasculare, principalele căi de transport ale acestora la valva aortică și mecanismul de acțiune al ARN-ului de interferență în terapia valvei aortice calcificate. De asemenea, în acest capitol se face referire și la moleculele supraexprimate de valva aortică afectată, ce pot fi folosite în direcționarea nanoparticulelor (colagen IV, molecule de adeziune a celulelor vasculare).

Partea a doua a lucrării cuprinde contribuțiile originale, structurate în cinci capitole. În **primul capitol** este descris protocolul de osteodiferențiere al VIC aortice umane (oVIC) *in vitro* folosind mediu de cultură HGMO ce conține concentrații crescute de glucoză și factori osteogeni (acid ascorbic, dexametazonă și β -glicerofosfat), aplicabil atât în cultură bidimensională (2D), cât și tridimensională (3D). În fazele timpurii ale calcificării valvei aortice, după denudarea stratului de VEC, lipidele și celulele imune ajung în stratul subendotelial. Citokinele eliberate de celulele imune inițiază procesul inflamator, determinând remodelarea matricei extracelulare și tranziția fenotipică a VIC la miofibroblaste (aVIC), caracterizate prin supraexpresia actinei α a mușchiului neted și prezența fibrelor de stres. În stadiile avansate, ca răspuns la stimularea pro-osteogenică (inflamație, stres mecanic), are loc osteodiferențierea VIC, principalul proces implicat în calcificarea ectopică a foștelor valvulare. Se cunoaște că diabetul este unul dintre factorii acceleratori ai depunerii active de calciu în valva aortică (Bossé et al., 2009).

Principalele rezultate obținute:

- Mediul HGMO ce conține o concentrație crescută de glucoză și factori osteogeni induce osteodiferențierea VIC (oVIC) prin supraexprimarea moleculelor osteogene (fosfatază alcalină, osteopontină, sialoproteină osoasă, proteină morfogenică osoasă) și
- Creșterea anormală a activității enzimatică a fosfatazei alcaline și acumularea de calciu în oVIC.

Rezultatele acestui studiu au fost publicate în revista *Pharmaceutics* (factor de impact 6.321) (Voicu et al., 2020).

În **Capitolul 2** al tezei de doctorat este prezentat protocolul de formare al poliplexelor prin complexarea conjugatului fulerenă C60-polietilenimină (C60-PEI) cu plasmide ce conțin secvențe specifice short hairpin ARN (ARNsh) pentru factorul de transcriere Runx2 implicat în osteodiferențierea VIC, caracterizarea și efectul terapeutic indus de silențierea Runx2 în oVIC prin intermediul acestor poliplexe.

Principalele rezultate obținute:

- Conform caracterizării fizico-chimice, poliplexele au dimensiuni de ~ 250 nm la rapoarte N/P mai mari de 25, iar potențialul Zeta crește dependent de raportul N/P, fiind de +15 mV la raportul N/P=25.
- Poliplexele sunt citocompatibile cu VIC umane la toate rapoartele N/P investigate (10, 15, 20, 25).
- Poliplexele sunt preluate eficient de către VIC, fapt dovedit de prezența intracelulară a punctelor roșii reprezentând plasmidul fluorescent Cy3.
- Poliplexele au o capacitate de transfecție ridicată la raportul N/P=25.
- Testele funcționale au arătat că poliplexele ce conțin secvențele plasmidiale ARNsh numerotate cu sh_1 și sh_2 (C60-PEI/sh_1, C60-PEI/sh_2) reduc exprimarea proteică a factorului de transcriere Runx2, dar și a altor proteine implicate în activarea și osteodiferențierea VIC (α SMA, Smad2/3, pSmad2/3, fosfatază alcalină, osteopontină, sialoproteină osoasă, proteină morfogenică osoasă 4).
- Poliplexele C60-PEI/sh_1, C60-PEI/sh_2 scad activitatea fosfatazei alcaline după o singură sau o dublă transfecție a oVIC. Activitatea scăzută a fosfatazei alcaline se menține mai mult de o săptămână de la ultima transfecție (până la 21 zile).

Rezultatele acestui studiu au fost publicate în revista *Pharmaceutics* (factor de impact 6.321) (Voicu et al., 2020).

Capitolul 3 prezintă protocolul de obținere al lipopoliplexelor ce presupune încapsularea poliplexelor preformate C60-PEI/sh_1 la raportul N/P=25 în liposomi anionici stabiliți cu

polietilenglicol și direcționarea lor specifică către molecule supraexprimate de oVIC: colagenul IV și molecula de adeziune a celulelor vasculare VCAM-1. De asemenea, aceste nanoparticule sunt caracterizate și prin evaluarea potențialului lor de a bloca diferențierea osteoblastică a VIC cultivate în sistem 2D și 3D.

În ciuda eficienței ridicate de transfecție *in vitro*, utilizarea poliplexelor *in vivo* nu a avut efecte terapeutice semnificative, din cauza sarcinilor pozitive ce determină interacțiunea nespecifică cu proteine plasmatice și acumularea acestor poliplexe în ficat și splină (Fischer et al., 2004). Pentru creșterea stabilității poliplexelor în circulația sangvină și pentru a îmbunătăți rata de transfecție, scăzând în același timp toxicitatea, acestea pot fi încapsulate în liposomi stabilizați steric cu polietilenglicol (Ko și Bickel, 2012), ceea ce permite și funcționalizarea liposomilor în vederea unui transport direcționat către situsul afectat (Călin și Mânduțeanu, 2017).

Principalele rezultate obținute:

- oVIC prezintă o supraexpresie a colagenului IV și VCAM-1, molecule ce pot fi folosite pentru direcționarea lipopoliplexelor.
- S-au obținut lipopoliplexe prin încapsularea poliplexelor C60-PEI/sh_1 în liposomi anionici, folosind tehnica de evaporare în fază inversă.
- Caracterizarea fizico-chimică a indicat dimensiuni medii ale lipopoliplexelor de ~ 200 nm și un potențialul Zeta negativ, de -30 mV, acestea fiind dispersii apoase stabile coloidal și electrolitic.
- Lipopoliplexele ColIV-LPP/shControl și V-LPP/shControl sunt cito- și hemocompatibile și sunt preluate într-o proporție crescută de oVIC.
- Lipopoliplexele ColIV-LPP/shRunx2 și V-LPP/shRunx2 determină reducerea semnificativă a nivelului genic și proteic al Runx2 în oVIC, atât în sistem 2D, cât și 3D, ceea ce are ca efect și reducerea nivelelor altor molecule osteogene implicate în osteodiferențierea VIC (osteopontină, sialoproteină osoasă, proteină morfogenică osoasă 2).
- Testele funcționale au arătat că transfecția oVIC cu ColIV-LPP/shRunx2 și V-LPP/shRunx2 scade activitatea fosfatazei alcaline și blochează formarea depozitelor de calciu, printr-un mecanism ce implică scăderea nivelului de Runx2.

Rezultatele acestui studiu au fost publicate în revista International Journal of Molecular Sciences (factor de impact 6.009) (Voicu et al., 2022).

Capitolul 4 cuprinde rezultate obținute *in vivo*, pe un model animal de șoarece ApoE-deficient diabetic și hiperlipemic injectat intravenos cu lipopoliplexe dublu direcționate către colagen IV și VCAM-1 (ColIV/V-LPP/shControl). S-a investigat biodistribuția acestor lipopoliplexe la nivelul organelor murine, și în special la nivelul valvei aortice, lipopoliplexele fiind marcate cu rodamină-DSPE pentru evaluarea localizării lipopoliplexelor în organe *ex vivo* prin tehnica IVIS. Datorită fotostabilității și emisiei în spectrul vizibil, rodamina este folosită cu succes în studiile de imagistică și de microscopie de fluorescență (de Almeida et al., 2007).

Principalele rezultate obținute:

- Valvele aortice ale șoarecilor ApoE-deficienți diabetici și hiperlipemici prezintă o expresie crescută de colagen IV și VCAM-1.
- Lipopoliplexele ColIV/V-LPP/shControl se localizează specific la nivelul valvei aortice, biodistribuția fiind corelată cu prezența expresiei ridicate de colagen IV și VCAM-1 în valvă.
- Expresia fluorescentă a proteinei YFP la nivelul valvelor aortice se menține până la 48 ore de la injectarea ColIV/V-LPP/pEYFP.

Rezultatele prezentate în **Capitolul 5** demonstrează efectul terapeutic al lipopoliplexelor dublu direcționate transportoare de secvențe ARNsh-Runx2 într-un model animal de șoarece ApoE-deficient diabetic și hiperlipemic.

Principalele rezultate obținute:

- Lipopoliplexele ColIV/V-LPP/shRunx2 scad expresia genică și proteică a Runx2 în valva aortică, determinând și reducerea expresiei genice a osteopontinei, osteocalcinei și fosfatazei alcaline. ColIV/V-LPP/shRunx2 determină scăderea nivelului genic de Runx2 și în alte organe (plămân, rinichi, ficat), dar fără semnificație statistică.
- Reducerea nivelului de Runx2 blochează depunerea lipidelor și scade activitatea fosfatazei alcaline în valva aortică.

Rezultatele obținute în cadrul tezei de față au condus la următoarele **concluzii cu caracter original:**

- Concentrațiile crescute de glucoză și factorii osteogeni (acid ascorbic, dexametazonă, β -glicerofosfat) determină o creștere dependentă de timp a exprimării proteice a moleculelor osteogene implicate în activarea (actina α a mușchiului neted) și osteodiferențierea celulelor valvulare interstițiale (VIC) (Runx2, fosfatază alcalină, sialoproteină osoasă, osteopontină). Creșterea nivelului proteic al moleculelor osteogene se asociază cu activitatea ridicată a fosfatazei alcaline și creșterea concentrației de calciu în VIC osteodiferențiate, creșterea fiind direct proporțională cu perioada de expunere la factori osteogeni.
- Nanopoliplexele formate prin complexarea fulerenei (C60)-PEI cu plasmide ARNsh-Runx2 sunt citocompatibile și realizează un transport intracelular eficient de plasmide ARNsh, determinând scăderea nivelului proteic al moleculelor osteogene Runx2, actina α a mușchiului neted, Smad2/3, fosfatază alcalină, sialoproteină osoasă, osteopontină, proteină morfogenică osoasă 4, precum și reducerea activității fosfatazei alcaline.
- Lipopoliplexele formate prin încapsularea poliplexelor C60-PEI/ARNsh-Runx2 în liposomi funcționalizați cu peptide ce recunosc specific colagenul IV și VCAM-1 (ColIV-LPP/ARNsh-Runx2 și V-LPP/ARNsh-Runx2), molecule supraexprimate în valva aortică disfuncțională, sunt nanotransportori adecvați pentru transportul direcționat de plasmide ARNsh-Runx2 *in vivo*. Aceste lipopoliplexe țintite determină scăderea semnificativă a expresiei genice și proteice a moleculelor osteogene în VIC osteodiferențiate cultivate în două sisteme de cultură, bidimensional în monostrat și tridimensional în construcții de tip hidrogel obținut din rădăcină aortică porcină. De asemenea, activitatea fosfatazei alcaline și concentrația de calciu scad semnificativ după transfecția cu lipopoliplexele ColIV-LPP/ARNsh-Runx2 și V-LPP/ARNsh-Runx2.
- *In vivo*, într-un model animal de șoarece ApoE-deficient hiperlipemic diabetic, lipopoliplexele dublu direcționate către colagen IV și VCAM-1 se acumulează selectiv la nivelul valvei aortice disfuncționale. Administrările repetate de lipopoliplexe reduc leziunile aterosclerotice prin scăderea expresiei factorilor osteogeni Runx2, osteopontină, osteocalcină, fosfatază alcalină implicați în calcificarea valvei aortice.

Această teză de doctorat aduce următoarele **contribuții originale:**

- Stabilirea unui model *in vitro* de osteodiferențiere a celulelor valvulare interstițiale.

- ▶ Silențierea factorului de transcriere Runx2 poate reprezenta o strategie nouă terapeutică, eficientă în blocarea osteodiferențierii VIC și a progresiei bolii valvei aortice.
- ▶ Dezvoltarea de nanocărăuși de ARNsh specific pentru Runx2, țintiți către valva aortică afectată și adecvați pentru administrarea *in vivo*. Acești nanocărăuși sunt lipopoliplexe, și anume liposomi ce încapsulează poliplexe C60-PEI/ARNsh-Runx2, funcționalizați cu peptide de recunoaștere a colagenului IV și a moleculei de adeziune a celulelor vasculare 1 (VCAM-1). Lipopoliplexele blochează diferențierea osteoblastică a celulelor valvulare interstițiale *in vitro* și calcificarea valvei aortice *in vivo*, prin reducerea nivelului factorului de transcriere Runx2 și a altor proteine osteogene (osteopontină, sialoproteină osoasă, fosfatază alcalină, osteocalcină și proteina morfogenică osoasă).

VALORIFICAREA REZULTATELOR

Rezultatele obținute în perioada programului doctoral din cadrul Institutului de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu” al Academiei Române au fost valorificate astfel:

- publicate în **7 lucrări în reviste indexate ISI: 2 ca prim-autor și 5 în calitate de co-autor**
- prezentate în cadrul **conferințelor internaționale** sub forma **unei prezentări orale și a 3 postere**
- incluse într-o **aplicație de brevet la OSIM.**

Unul dintre articolele publicate în calitate de prim-autor a fost selectat pentru a ilustra coperta revistei „International Journal of Molecular Sciences” în numărul din aprilie 2022, “VCAM-1 targeted nanocarriers of shRNA-Runx2 for calcific valve disease treatment”. Rezultatele cercetării au fost premiate de UEFISCDI prin acordarea a 4 premii.

LUCRĂRI PUBLICATE ÎN REVISTE INTERNAȚIONALE COTATE ISI (7 lucrări)

Prim-autor (2):

1. **Geanina Voicu**, Daniela Rebleanu, Cristina Ana Mocanu, Gabriela Tanko, Ionel Droc, Cristina Mariana Uritu, Mariana Pinteala, Ileana Manduteanu, Maya Simionescu, Manuela Calin, VCAM-1 Targeted Lipopolyplexes as Vehicles for Efficient Delivery of shRNA-Runx2 to Osteoblast-Differentiated Valvular Interstitial Cells; Implications in Calcific Valve Disease Treatment, International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23, 3824; **IF** în 2022 6.009

2. **Geanina Voicu**, Daniela Rebleanu, Cristina Ana Constantinescu, Elena Valeria Fuior, Letitia Ciortan, Ionel Droc, Cristina Mariana Uritu, Mariana Pinteala, Ileana Manduteanu, Maya Simionescu, Manuela Calin, Nano-Polyplexes Mediated Transfection of Runx2-shRNA Mitigates the Osteodifferentiation of Human Valvular Interstitial Cells, *Pharmaceutics*, 2020, 12, 507; **IF** în 2020 6.321

Co-autor (5):

1. Cristina Ana Mocanu, Elena Valeria Fuior, **Geanina Voicu**, Daniela Rebleanu, Florentina Safciuc, Mariana Deleanu, Ioana Madalina Fenyo, Virginie Escriou, Ileana Manduteanu, Maya Simionescu, Manuela Calin, P-selectin targeted RAGE-shRNA lipoplexes alleviate atherosclerosis-associated inflammation, *Journal of Controlled Release*, 2021, 338, pp. 754–772; **IF** în 2021 10.61
2. Elena Valeria Fuior, Cristina Ana Mocanu, Mariana Deleanu, **Geanina Voicu**, Maria Anghelache, Daniela Rebleanu, Maya Simionescu, Manuela Calin, Evaluation of VCAM-1 Targeted Naringenin/Indocyanine Green-Loaded Lipid Nanoemulsions as Theranostic Nanoplatfroms in Inflammation, *Pharmaceutics*, 2020, 12(11), pp. 1–21, 1066; **IF** în 2020 6.321
3. Monica Tucureanu, Alexandru Filippi, Nicoleta Alexandru, Cristina Ana Constantinescu, Letitia Ciortan, Razvan Macarie, Mihaela Vadana, **Geanina Voicu**, Sabina Frunza, Dan Nistor, Agneta Simionescu, Dan Teodor Simionescu, Adriana Georgescu, Ileana Manduteanu, Diabetes-induced early molecular and functional changes in aortic heart valves in a murine model of atherosclerosis, *Diabetes and Vascular Disease Research*, 2019, 16(6), 562-576; **IF** în 2019 2.707
4. Elena Valeria Fuior, Mariana Deleanu, Cristina Ana Constantinescu, Daniela Rebleanu, **Geanina Voicu**, Maya Simionescu, Manuela Calin, Functional Role of VCAM-1 Targeted Flavonoid-Loaded Lipid Nanoemulsions in Reducing Endothelium Inflammation, *Pharmaceutics*, 2019, 11(8), 391; **IF** în 2019 4.773
5. Cristina Ana Constantinescu, Elena Valeria Fuior, Daniela Rebleanu, Mariana Deleanu, Viorel Simion, **Geanina Voicu**, Virginie Escriou, Ileana Manduteanu, Maya Simionescu, Manuela Calin, Targeted Transfection Using PEGylated Cationic Liposomes Directed Towards P-Selectin Increases siRNA Delivery into Activated Endothelial Cells, *Pharmaceutics*, 2019, 11(1), 47; **IF** în 2019 4.773

BREVETE

1. OSIM aplicație nr. A/00811, inventatori Calin Manuela, Rebleanu Daniela, Constantinescu Cristina Ana, **Voicu Geanina**, Deleanu Mariana, Manduteanu Ileana: „Procedeu de obținere a nanocărașilor utilizați pentru vectorizarea acidului ribonucleic (ARN) de interferență și livrarea țintită la celulele valvei aortice”

LUCRĂRI PREZENTATE LA MANIFESTĂRI ȘTIINȚIFICE INTERNAȚIONALE:

Prezentări orale (1):

1. **Geanina Voicu**, Daniela Rebleanu, Elena Valeria Fuior, Cristina Ana Mocanu, Maria Anghelache, Mihaela Turtoi, Florentina Safciuc, Ileana Manduteanu, Maya Simionescu, Manuela Calin, VCAM-1 targeted lipopolyplexes carrying Runx2-shRNA mitigate the osteodifferentiation of 3D-cultured human valvular interstitial cells, Al 42-lea Simpozion Aniversar al Institutului de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu” și a 38-a Sesiune Științifică Anuală a Societății Române de Biologie Celulară cu participare internațională, București, 2021.

Postere (3):

1. **Geanina Voicu**, Cristina Ana Mocanu, Daniela Rebleanu, Agneta Simionescu, Maya Simionescu, Ileana Manduteanu, Manuela Calin, Down-regulation of Runx2 by C60-PEI/shRNA-Runx2 polyplexes reduces the osteodifferentation of valvular interstitial cells, Workshop Theravaldis, București, 2020
2. **Geanina Voicu**, Cristina Ana Constantinescu, Daniela Rebleanu, Agneta Simionescu, Maya Simionescu, Ileana Manduteanu, Manuela Calin, Polyplexes carrying a shRNA plasmid down regulate the transcription factor Runx2 in valvular interstitial cells exposed to high glucose concentrations and osteogenic factors, Praga, 2019
3. **Geanina Voicu**, Cristina Ana Constantinescu, Daniela Rebleanu, Agneta Simionescu, Maya Simionescu, Ileana Manduteanu, Manuela Calin, High glucose concentrations potentiate the induction of osteoblast phenotype of valvular interstitial cells exposed to osteogenic factors, The 11th National congress with international participation and The 37th Annual Scientific session of Romanian Society of Cell Biology (sub egida Academiei Române), Constanța, 2019

PREMII

Premierea rezultatelor cercetării UEFISCDI:

1. Cristina Ana Mocanu, Elena Valeria Fuior, **Geanina Voicu**, Daniela Rebleanu, Florentina Safciuc, Mariana Deleanu, Ioana Madalina Fenyo, Virginie Escriou, Ileana Manduteanu, Maya Simionescu 1 and Manuela Calin, Journal of Controlled Release, 2021, 338, pp. 754–772; **IF** în 2021 10.61
2. **Geanina Voicu**, Daniela Rebleanu, Cristina Ana Constantinescu, Elena Valeria Fuior, Letitia Ciortan, Ionel Droc, Cristina Mariana Uritu, Mariana Pinteala, Ileana Manduteanu, Maya Simionescu, Manuela Calin, Nano-Polyplexes Mediated Transfection of Runx2-shRNA Mitigates the Osteodifferentiation of Human Valvular Interstitial Cells, Pharmaceutics 2020, 12, 507; **IF** în 2020 6.321
3. Elena Valeria Fuior, Cristina Ana Mocanu, Mariana Deleanu, **Geanina Voicu**, Maria Anghelache, Daniela Rebleanu, Maya Simionescu, Manuela Calin, Evaluation of VCAM-1 Targeted Naringenin/Indocyanine Green-Loaded Lipid Nanoemulsions as Theranostic Nanoplatfroms in Inflammation, Pharmaceutics, 2020, 12(11), pp. 1–21, 1066; **IF** în 2020 6.321
4. Elena Valeria Fuior, Mariana Deleanu, Cristina Ana Constantinescu, Daniela Rebleanu, **Geanina Voicu**, Maya Simionescu, Manuela Calin, Functional Role of VCAM-1 Targeted Flavonoid-Loaded Lipid Nanoemulsions in Reducing Endothelium Inflammation, Pharmaceutics, 2019, 11(8), 391; **IF** în 2019 4.773

BURSA OBTINUTĂ PE DURATA PROGRAMULUI DOCTORAL

Bursă de doctorat: Academia Română (SCOSAAR): 2017-2020

FINANȚAREA CERCETĂRILOR (GRANTURI):

1. **PN-II-RU-TE-2014-4-1837**

Proiect de cercetare pentru stimularea constituirii de tinere echipe de cercetare independente

Titlul proiectului: Nanoterapii țintite către endoteliu, proiectate pentru silențierea receptorului pentru produșii de glicare avansată (RAGE) în ateroscleroză (NANORAGE)

Perioada: 2015-2017

Director de proiect: Dr. Manuela Călin

2. POC ID P_37_298; 115/13.09.2016

Programul Operațional Competitivitate, Axa prioritară 1: Cercetare, dezvoltare tehnologică și inovare (CDI) în sprijinul competitivității economice și dezvoltării afacerilor

Titlul proiectului: Terapii țintite pentru boala valvei aortice în diabet (THERAVALDIS)

Perioada: 2016 - 2020

Director de proiect: Dr. Agneta Simionescu

3. 13PCCDI/2018

Proiecte complexe realizate în consorții Cercetare Dezvoltare Inovare

Titlul proiectului: Terapii inteligente pentru boli non-comunicabile, bazate pe eliberarea controlată de compuși farmacologici din celule încapsulate după manipulare genetică sau bionanoparticule vectorizate (INTERA)

Perioada: 2018-2020

Director de proiect: Acad. Maya Simionescu

4. PN-III-P4-ID-PCCF-2016-0050

Proiecte complexe de cercetare de frontieră

Titlul proiectului: Mimarea mecanismelor viului prin abordări ale chimiei supramoleculare, în cinci dimensiuni

Perioada: 2018-2022

Director de proiect: Dr. Aatto Laaksonen

5. PN-II-P4-ID-PCE-2020-2465

Proiecte de cercetare exploratorie

Titlul proiectului: Terapie direcționată bazată pe nanocarrieri biomimetici pentru rezoluția inflamației în ateroscleroză (NANORES)

Perioada: 2021-2023

Director de proiect: Dr. Manuela Călin.

Referințe:

1. Bossé, Y.; Miqdad, A.; Fournier, D.; Pépin, A.; Pibarot, P.; Mathieu, P., 2009. Refining Molecular Pathways Leading to Calcific Aortic Valve Stenosis by Studying Gene Expression Profile of Normal and Calcified Stenotic Human Aortic Valves, *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 2(5), pp. 489–498
2. Calin, M.; Manduteanu, I., 2017. Emerging Nanocarriers-based Approaches to Diagnose and Reduce Vascular Inflammation in Atherosclerosis, *Current Medicinal Chemistry*, 24(6), pp. 550–567
3. de Almeida, R. F. M.; Borst, J.; Fedorov, A.; Prieto, M.; Visser, A. J. W. G., 2007. Complexity of Lipid Domains and Rafts in Giant Unilamellar Vesicles Revealed by Combining Imaging and Microscopic and Macroscopic Time-Resolved Fluorescence, *Biophysical Journal*, 93(2), pp. 539–553
4. Fischer, D.; Osburg, B.; Petersen, H.; Kissel, T.; Bickel, U., 2004. Effect of poly(ethylene imine) molecular weight and pegylation on organ distribution and pharmacokinetics of polyplexes with oligodeoxynucleotides in mice, *Drug Metabolism and Disposition*, 32(9), pp. 983–992
5. Hortells, L.; Sur, S.; St. Hilaire, C., 2018. Cell Phenotype Transitions in Cardiovascular Calcification, *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 5
6. <http://www.romedic.ro/stenoza-aortica>
7. Iung, B., 2003. A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease, *European Heart Journal*, 24(13), pp. 1231–1243
8. Kanwar, A.; Thaden, J. J.; Nkomo, V. T., 2018. Management of Patients With Aortic Valve Stenosis, *Mayo Clinic Proceedings*, 93(4), pp. 488–508
9. Ko, Y. T.; Bickel, U., 2012. Liposome-Encapsulated Polyethylenimine/Oligonucleotide Polyplexes Prepared by Reverse-Phase Evaporation Technique, *AAPS PharmSciTech*, 13(2), pp. 373–378
10. Larrew, T.; Chow, J.; Schulte, J.; Simionescu, D.; Simionescu, A., 2013. The roles of various metabolic enzymes in diabetic cardiomyopathy—in vivo and in vitro approach, *Cardiovascular Pathology*, 22(3), pp. e48
11. Owens, D. S.; Katz, R.; Takasu, J.; Kronmal, R.; Budoff, M. J.; O'Brien, K. D., 2010. Incidence and Progression of Aortic Valve Calcium in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA), *The American Journal of Cardiology*, 105(5), pp. 701–708
12. Pawade, T. A.; Newby, D. E.; Dweck, M. R., 2015. Calcification in Aortic Stenosis, *Journal of the American College of Cardiology*, 66(5), pp. 561–577
13. Rutkovskiy, A.; Malashicheva, A.; Sullivan, G.; Bogdanova, M.; Kostareva, A.; Stensløkken, K.; Fiane, A.; Vaage, J., 2017. Valve Interstitial Cells: The Key to Understanding the Pathophysiology of Heart Valve Calcification, *Journal of the American Heart Association*, 6(9)
14. Simionescu, N.; Vasile, E.; Lupu, F.; Popescu, G., 1986. Prelesional events in atherogenesis: Accumulation of extracellular cholesterol-rich liposomes in the

- arterial intima and cardiac valves of the hyperlipidemic rabbit, *American Journal of Pathology*, 123(1)
15. 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., 2020. Nano-Polyplexes Mediated Transfection of Runx2-shRNA Mitigates the Osteodifferentiation of Human Valvular Interstitial Cells, *Pharmaceutics*, 12(6), pp. 507
 16. Voicu, G.; Rebleanu, D.; Mocanu, C. A.; Tanko, G.; Droc, I.; Uritu, C. M.; Pinteala, M.; Manduteanu, I.; Simionescu, M.; Calin, M., 2022. VCAM-1 Targeted Lipopolyplexes as Vehicles for Efficient Delivery of shRNA-Runx2 to Osteoblast-Differentiated Valvular Interstitial Cells; Implications in Calcific Valve Disease Treatment, *International Journal of Molecular Sciences*, 23, pp. 3824-3847