



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

**TEZĂ DE DOCTORAT**

*Lipoproteine sintetice cu potențial terapeutic în ateroscleroză*

**REZUMAT**

Conducător științific: Acad. MAYA SIMIONESCU

Doctorand: Florina-Irina Tudorache

BUCUREȘTI

2023

## REZUMAT

Cuvinte cheie: Ateroscleroza, Apolipoproteine, Nanotehnologie, Reglare genica, Nanoparticule, ApoE, ApoA-I.

Număr total de pagini – 128

Număr de figuri în Partea I – 14

Număr de tabele în Partea I – 2

Număr de figuri în Partea II – 37

Număr de tabele în Partea II – 6

Referințe bibliografice – 327

Lucrări publicate în reviste indexate ISI în perioada stagiului de doctorat – 4 (2 autor principal)

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

Comunicări orale susținute la manifestări științifice internaționale – 2

Cursuri și specializări - 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 – 5

## INTRODUCERE ȘI OBIECTIVE

Ateroscleroza este una dintre principalele cauze de mortalitate în țările dezvoltate. Datele din literatură susțin că ateroscleroza este o boală multifactorială în care inflamația și dislipidemia se intersectează și că indiferent de inițiator, ambele participă din stadiile incipiente până la soarta finală a plăcii ateromatoase. Unul dintre factorii de risc majori în ateroscleroză este modificarea homeostaziei plasmatică, cum ar fi hipercolesterolemia. Aceasta afectează inițial celulele endoteliale, pe care le activează și ca urmare, acestea încep să exprime noi molecule de adeziune și factori chemotactici ce conduc la inițierea unui proces inflamator. Inflamația implică recrutarea de celule imune circulante care agravează și accelerează dezvoltarea ateromului [1]. Răspunsul inflamator inițial poate fi considerat ca un mecanism de apărare, dar amplificarea sa ulterioară accelerează ateroscleroza [2, 3]. De asemenea, componentele lipoproteinelor plasmatică, diverse structuri microbiene sau proteinele de șoc termic induc un proces inflamator care, de la sine, poate genera formarea plăcii aterosclerotice. Aproximativ jumătate dintre pacienți dezvoltă ateroscleroză în absența hipercolesterolemiei sistemice [4].

Deși întregul sistem vascular este expus factorilor de risc, ateroscleroza se dezvoltă preferențial în anumite zone precum punctele de ramificație, peretele exterior al bifurcațiilor, peretele interior al curburilor sau valvele cardiace, zone caracterizate prin variații ale stresului de curgere sau tulburări ale fluxului [5, 6]. Dezvoltarea ateromului este un proces continuu. Implicarea progresivă a celulelor rezidente și nerezidente vasculare și a produselor lor de secreție definește o secvență de etape consecutive care duc de la formarea de striuri lipidice, la placa fibro-lipidică și în cele din urmă, la ruptura plăcii și aterotromboză [2].

Lipoproteinele sunt structuri alcătuite în principal din lipide și proteine. Ele îndeplinesc funcția de transport a colesterolului, trigliceridelor și fosfolipidelor în plasmă. Lipoproteinele prezintă două componente: un înveliș extern hidrofil care conține apolipoproteine, fosfolipide și colesterol neesterificat și nucleul central hidrofob, alcătuit din colesterol esterificat și trigliceride. Apolipoproteinele asigură solubilitatea lipoproteinelor, dar sunt și cofactori enzimatici sau liganzi pentru receptori celulari specifici. Se cunosc patru clase majore de apolipoproteine: A, B, C și E. Apolipoproteina E (apoE) este o componentă a lipoproteinelor plasmatică, care participă la îndepărtarea lipoproteinelor aterogene din circulație. Studiile *in vitro* și *in vivo* au arătat că mutații ale apoE sunt asociate cu nivel crescut de colesterol și ateroscleroză prematură, atât în animale experimentale, cât și la oameni [7]. Nivelul fiziologic de apoE în plasmă este asociat cu scăderea riscului bolilor cardiovasculare, prin reducerea nivelului de lipoproteine aterogene circulante, prin efluxul de colesterol, dar și prin inhibarea expresiei moleculelor de adeziune la suprafața endotelială [8].

Progresele recente în terapiile cardiovasculare au dus la dezvoltarea de noi agenți care vizează apolipoproteine specifice pentru a reduce riscul de ateroscleroză [9, 10].

Știința nanoparticulelor schimbă rapid perspectiva diferitelor domenii științifice și definește noi platforme tehnologice. Acest lucru este și mai evident în domeniul nanomedicinii în care au fost utilizate nanoparticulele ca instrument pentru tratamentul și diagnosticul multor boli [11]. Cu toate acestea, în ciuda imensului beneficiu conferit, există și restricționari ale acestei tehnologii care vizează efectele pe termen scurt și lung asupra organismului uman.

**Scopul** acestei teze de doctorat a fost determinarea unor mecanisme de reglare genică ce duc la diminuarea expresiei unor apolipoproteine și producerea de nanoparticule pe bază de fulerenol cuplate cu apoE (Full-apoE) care mimează particulele de lipoprotein, care ar putea fi utilizate pentru a compensa expresia scăzută a apoE.

**Ipoteza** noastră afirmă că nanoparticulele pe bază de fulerenol, având legate pe suprafață molecule de apoE (Full-apoE), imită lipoproteinele bogate în apoE, oferind beneficii anti-aterosclerotice semnificative, fără efecte secundare.

## STRUCTURA TEZEI DE DOCTORAT

În prima parte a tezei sunt prezentate datele din literatură care vizează funcțiile specializate ale lipoproteinelor și apolipoproteinelor asociate, împreună cu rolurile acestora în circulația lipidelor în plasmă și în dezvoltarea aterosclerozei (**Capitolul 1**), precum și exemple de noi terapii promițătoare care vizează apolipoproteine specifice și care ar putea reduce în cele din urmă riscul de ateroscleroză.

În **Capitolul 2** sunt sintetizate nanotehnologiile personalizate pentru țintirea celulelor implicate în dezvoltarea placilor aterosclerotice și principalele clase de nanoparticule utilizate în diagnosticul sau tratamentul aterosclerozei. De asemenea, au fost evidențiate metodele de sinteză, stabilitatea și principalele caracteristici antioxidante ale moleculei de fulerenol.

În partea a doua a tezei sunt prezentate rezultatele originale obținute asupra reglării genice a unor apolipoproteine importante în procesul de aterogeneză și sinteza unor nanoparticule cu potențial anti-aterosclerotic. În **capitolul 3** sunt prezentate rezultatele obținute *in vivo* și *in vitro* asupra reglării unor apolipoproteine implicate în dezvoltarea placilor aterosclerotice de către unele polihidrocarburi aromatice prezente în mediu: Bisfenol A (BPA) și Benzo(a)piren (BaP). Atât BPA cât și BaP activează factori de transcriere care se leagă la situsurile specifice de la nivelul promotorilor apolipoproteinelor apoA-I și/sau apoC-I și contribuie la dezvoltarea leziunilor aterosclerotice, prin mecanisme care implică activarea NF- $\kappa$ B sau AHR.

Metodele folosite și prezentate în **capitolul 4** au avut ca scop obținerea prin biotehnologie a proteinei apoE- $\epsilon$ 3 marcată și secretată de celule mamaliene, pentru a construi nanosisteme cu izoforma apoE- $\epsilon$ 3.

În **capitol 5** sunt prezentate metodele pentru obținerea de nanoparticule pe bază de fulerenol, complexate cu apoE și testarea efectului anti-aterosclerotic *in vivo* pe linia de șoareci apoE deficienți. Nanoparticulele obținute pe bază de fulerenol și apoE combină proprietățile anti-hiperlipidemice și anti-oxidative ale fulerenolului cu proprietățile anti-aterosclerotice și anti-inflamatorii ale apoE și pot reprezenta o strategie promițătoare pentru combaterea aterosclerozei.

## CONCLUZII GENERALE

Deși rezultatele clinice în bolile coronariene s-au îmbunătățit considerabil în ultimele câteva decenii, incidența infarctului miocardic și a accidentului vascular cerebral continuă să rămână ridicată. Nanotehnologia oferă o abordare unică prin dezvoltarea nanoparticulelor multifuncționale, specifice celulei. Aceasta va conduce spre noi frontiere în diagnosticare și terapie prin țintirea moleculelor implicate în procesele care conduc la ateroscleroză, păstrând astfel potențialul de îmbunătățire continuă a rezultatelor cardiovasculare.

În această lucrare, am analizat reglarea a unor apolipoproteine importante în procesul de aterogeneză de către substanțele prezente în mediu: bisfenol A (BPA) și benzo[a]piren (BaP). Pornind de la ipoteza că efectele pro-aterogenice ale BPA sunt mediate, cel puțin parțial, de reglarea negativă a genei APOA-I, conducând astfel la o cantitate scăzută de HDL anti-aterosclerotic, am investigat dacă BPA modulează expresia genei APOA-I și mecanismele moleculare implicate în această reglare. Rezultatele obținute pe șoarecii LDLR<sup>-/-</sup> tratați cu BPA au arătat că (i) BPA a crescut aria leziunilor aterosclerotice în aortele șoarecilor LDLR<sup>-/-</sup>; (ii) a scăzut nivelurile HDL și apoA-I și a crescut concentrațiile plasmatice de colesterol și trigliceride; (iii) mecanismul acestui proces implică activarea căilor NF-kB și în consecință, reducerea expresiei apoA-I în ficat. Datele noastre au demonstrat că promotorul APOA-I conține situsuri funcționale de legare a NF-kB care sunt responsabile pentru reglarea expresiei genice APOA-I indusă de BPA.

De asemenea, am investigat potențialul modulator al BaP asupra expresiei unor apolipoproteine cheie în metabolismul lipidic: apoA-I, apoC-I și apoE, și am urmărit un posibil mecanism prin care BaP modulează expresia acestor apolipoproteine, prin studii *in vitro*, în hepatocite. Rezultatele acestui studiu arată că BaP induce reglarea apoA-I și apoC-I în hepatocite printr-un mecanism dependent de Aryl hidrocarbon receptor (AHR). AHR se leagă la situsurile active din promotorii apoA-I și apoC-I și conduce la scăderea expresiei apoA-I, respectiv creșterea expresiei apoC-I, în hepatocite, ceea ce determină un potențial risc pentru dezvoltarea și menținerea placilor aterosclerotice. Un posibil mecanism de reglare a acestor apolipoproteine pe baza rezultatelor obținute și a ceea ce se cunoaște din literatura ar putea fi atât direct prin AHR, cât și indirect prin dimerizarea altor factori de transcriere.

În finalul lucrării am abordat strategii nanotehnologice care țintesc regresia placilor aterosclerotice. Pentru aceasta am aprofundat tehnicile de inginerie genetică pentru obținerea de

plasmide care să exprime apoE recombinantă. Cu aceste plasmide, am transfectat stabil celule mamaliene care au sintetizat și secretat apoE în mediul de cultură, de unde am putut izola proteina de interes, prin cromatografie de afinitate. Am utilizat această proteină în scopul obținerii unor nanoparticule cu potențial terapeutic în ateroscleroză.

Nanoparticulele cu apoE, au fost utilizate pentru tratarea șoarecilor apoE deficienți și am observat câteva beneficii anti-aterosclerotice semnificative. Rezultatele obținute în urma administrării nanoparticulelor Full-apoE (NP Full-apoE) derivatizate la șoarecii apoE<sup>-/-</sup> aterosclerotici au arătat că NP Full-apoE: (i) au fost incluse în fracțiile HDL și VLDL; (ii) au fost distribuite în principal în ficat, dar și în alte țesuturi (cum ar fi creier, plămân și rinichi); (iii) au determinat o expresie hepatică crescută a moleculelor importante implicate în metabolismul lipidic (cum ar fi apoA-I, ABCA1, SR-B1 și sortilina); (iv) au determinat o scădere a nivelului de colesterol plasmatic și (v) au inhibat evoluția plăcilor aterosclerotice. Nanoparticulele pe bază de fulerenol care poartă complexat cu apoE-ε3 combină proprietățile anti-hiperlipidemice și anti-oxidative ale fulerenolului cu proprietățile anti-aterosclerotice și antiinflamatorii ale apoE-ε3 și pot reprezenta o strategie promițătoare pentru ateroscleroză.

**Principalele contribuții originale ale acestei lucrări sunt:**

- (i) mecanismul de reglare genică pentru APOA-I ca răspuns la activitatea BPA, prin activarea NF-κB și identificarea situsurilor responsabile de legare a factorilor de transcriere de pe promotorul genei APOA1, având în consecință scăderea expresiei genice APOA-I.
- (ii) reglarea genică a APOA-I și APOC-I ca răspuns la BaP prin activarea AHR și translocarea în nucleu, unde se leagă la promotorii acestor gene inducând o scădere a APOA-I și o creștere a APOC-I, ceea ce indică un mecanism pro-aterosclerotic.
- (iii) obținerea de vectori plasmidiali care să codifice apoE recombinantă și transfecția stabilă a celulelor endoteliale (bEnd.3) și macrofage (RAW 293.7) care să exprime proteina apoE glicozilată în mediul de creștere al celulelor.
- (iv) Conceperea și caracterizarea nanoparticulelor pe bază de fulerene cuplate cu apoE și validarea *in vivo* a efectelor anti-aterosclerotice ale Full-apoE.

## VALORIFICAREA REZULTATELOR

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

- publicate în 4 lucrări în reviste indexate ISI: 1 ca prim-autor, 1 în calitate de co-autor și 2 recenzii;
- prezentate în cadrul conferințelor naționale și internaționale sub forma a 2 prezentări orale și 6 postere.

## ACTIVITĂȚI DESFĂȘURATE ÎN CADRUL STAGIULUI DE DOCTORAT

### Lucrări publicate în reviste internaționale cotate ISI:

1. *Apolipoprotein E - A Multifunctional Protein with Implications in Various Pathologies as a Result of Its Structural Features.* (Review) \***Tudorache IF**, \*Trusca VG, Gafencu AV. *Comput Struct Biotechnol J.* 2017 Jun 6;15:359-365. doi: 10.1016/j.csbj.2017.05.003. eCollection 2017. PMID: 28660014
2. *The Mechanism of Bisphenol A Atherogenicity Involves Apolipoprotein A-I Downregulation through NF- $\kappa$ B Activation.* Trusca VG, Dumitrescu M, Fenyo IM, **Tudorache IF**, Simionescu M, Gafencu AV. *Int J Mol Sci.* 2019 Dec 12;20(24):6281. doi: 10.3390/ijms20246281. PMID: 31842455
3. *Synthetic lipoproteins based on apolipoprotein E coupled to fullereneol have anti-atherosclerotic properties.* **Tudorache IF**, Bivol VG, Dumitrescu M, Fenyo IM, Simionescu M, Gafencu AV. *Pharmacol Rep.* 2022 Aug;74(4):684-695. doi: 10.1007/s43440-022-00379-8. Epub 2022 Jul 5. PMID: 35790693.
4. *Apolipoprotein A-II, a Player in Multiple Processes and Diseases.* (Review) \*Florea G, \***Tudorache IF**, Fuior EV, Ionita R, Dumitrescu M, Fenyo IM, Bivol VG, Gafencu AV. *Biomedicines.* 2022 Jul 2;10(7):1578. doi: 10.3390/biomedicines10071578. Free PMC article. PMID: 35884883

### Comunicări orale la manifestări științifice naționale și internaționale:

1. Biotechnological approaches for labeling of apolipoprotein E secreted by mammalian cells, SRBC 2016

2. Apolipoprotein E gene regulation by ligand-activated AHR, Advanced Course on Crossroads of Atherosclerosis, Immunology & Lipids (AIL); EAS 2016

**Postere la manifestări științifice naționale și internaționale:**

1. Apolipoprotein E gene regulation by omeprazole activated AHR/ARNT complex, *Irina Grosu, Violeta Trusca, Anca Gafencu*, SRBC 2015.
2. Biotechnological approaches to prepare synthetic lipoproteins with therapeutic potential in atherosclerosis; *Irina F. Tudorache, Violeta G. Trusca, Elena V. Fuior, Anca V. Gafencu*, EAS 2017.
3. Regulation of apolipoproteins by ligand-activated aryl hydrocarbon receptor; *Irina F. Tudorache, Violeta G. Trusca, Anca V. Gafencu*, BIT 2017
4. Benzo(a)pyrene -activated AHR regulates apolipoproteins expression in hepatocytes; *Irina F. Tudorache, Violeta G. Trusca, Anca V. Gafencu*, EAS 2018
5. Fullerenol – based nanoparticles carrying apolipoprotein E; *Irina. F. Tudorache, M. Dumitrescu, V.G. Trusca, M.I. Fenyo, M. Simionescu, A.V. Gafencu*, MMT 2021
6. Anti-atherosclerotic properties of fullerlenol- based nanoparticles carrying apoE3; *Irina. F. Tudorache, M. Dumitrescu, V.G. Trusca, M.I. Fenyo, M. Simionescu, A.V. Gafencu*, SRBC 2021

**Specializări și cursuri efectuate:**

1. EAS Advanced Course on Crossroads of Atherosclerosis, Immunology & Lipids (AIL) Amsterdam, The Netherlands, 22 March - 25 March, 2016.

**Participarea la proiecte de cercetare:**

1. Combined hormonal treatment-induced gene transactivation of anti-atherosclerotic proteins as an innovative therapeutic approach for atherosclerosis.
2. Genetically engineered apolipoproteins immobilized on nanoparticles: a Molecular Trojan horse targeting atherosclerotic plaque.
3. Intelligent therapies for non-communicable diseases based on controlled release of pharmacological compounds from encapsulated engineered cells and targeted bionanoparticles.
4. Demonstration of the enhanced anti-atherosclerotic potential of apolipoprotein E targeted



to the activated endothelium by fusion with VCAM-1 binding peptide.

5. Apolipoprotein A-II derived peptides with anti-atherosclerotic potential.

### **BURSA OBȚINUTĂ PE DURATA PROGRAMULUI DOCTORAL**

Bursă de doctorat: Academia Română (SCOSAAR): 2015-2018

### **FINANȚAREA CERCETĂRILOR:**

PN-II-RU-TE-2014-4-2660. Transactivarea genelor pentru proteine anti-aterosclerotice prin tratamente hormonale combinate, cu abordare terapeutică în ateroscleroză, director de proiect Dr. Violeta Trușcă;

PN-II-RU-TE-2014-4-2143. Apolipoproteine generate prin inginerie genetică immobilizate pe nanoparticule: un cal troian molecular pentru țintirea plăcii aterosclerotice, Director de proiect Dr. Anca Gafencu;

Academia Română -SCOSAAR

## Bibliografie selectivă:

1. Libby, P., et al., *Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice*. J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(23): p. 2129-38.
2. Manduteanu, I. and M. Simionescu, *Inflammation in atherosclerosis: a cause or a result of vascular disorders?* J Cell Mol Med, 2012. **16**(9): p. 1978-90.
3. Horejsi, B. and R. Ceska, *Apolipoproteins and atherosclerosis. Apolipoprotein E and apolipoprotein(a) as candidate genes of premature development of atherosclerosis*. Physiol Res, 2000. **49 Suppl 1**: p. S63-9.
4. Millonig, G., G.T. Malcom, and G. Wick, *Early inflammatory-immunological lesions in juvenile atherosclerosis from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY)-study*. Atherosclerosis, 2002. **160**(2): p. 441-8.
5. VanderLaan, P.A., C.A. Reardon, and G.S. Getz, *Site specificity of atherosclerosis: site-selective responses to atherosclerotic modulators*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(1): p. 12-22.
6. Simionescu, N., et al., *Prelesional events in atherogenesis. Accumulation of extracellular cholesterol-rich liposomes in the arterial intima and cardiac valves of the hyperlipidemic rabbit*. Am J Pathol, 1986. **123**(1): p. 109-25.
7. Zannis, V.I., et al. *8 Lipoproteins and atherogenesis*. 2004.
8. Gaudreault, N., et al., *Macrophage-specific apoE gene repair reduces diet-induced hyperlipidemia and atherosclerosis in hypomorphic Apoe mice*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e35816.
9. Ritchie, H. and M. Roser. *Causes of Death*. 2018.
10. Linton, M.F., et al., *The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis*, in *Endotext*, K.R. Feingold, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).
11. Foroozandeh, P. and A.A. Aziz, *Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles*. Nanoscale Res Lett, 2018. **13**(1): p. 339.