

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ**



***EFFECTUL NANOPARTICULELOR POLIMERICE
ASUPRA CELULELOR DENTARE
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT***

**Conducător de doctorat:
PROF. UNIV. DR. MARIA GREABU**

**Student-doctorand:
MARIA JUSTINA ROXANA VÎRLAN**

2017

Cuprins

Introducere.....	pagina 6
I. Partea generală.....	pagina 7
1. Nanoparticule polimerice	pagina 7
1.1. Nanoparticule (Generalități).....	pagina
1.2. Nanoparticule polimerice (Generalități).....	pagina 7
2. Nanoparticule din acid poli-lacto-co glicolic.....	pagina 7
2.1. Acidul poli-lacto-co-glicolic.....	pagina 7
2.2. Nanoparticule din acid poli-lacto-co-glicolic (Metode de sinteză)...	pagina 8
2.3. Nanoparticule din acid poli-lacto-co-glicolic (Utilizări).....	pagina 8
3. Nanoparticule din chitosan.....	pagina 8
3.1. Chitosan.....	pagina 8
3.2. Nanoparticule din chitosan (Metode de sinteză).....	pagina 8
3.3. Nanoparticule din chitosan (Utilizări).....	pagina 8
II. Contribuții personale.....	pagina 9
4. Ipoteza de lucru și obiectivele generale.....	pagina 9
5. Metodologia generală a cercetării.....	pagina 10
6. Evaluarea citotoxicității nanoparticulelor polimerice din acid poli-lacto-co-glicolic și a nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic acoperite de chitosan (Studiul 1).....	pagina 11
7. Captarea nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic și a nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic acoperite de chitosan de către keratinocitelor orale normale (KON)(Studiul 2).....	pagina 13
8. Captarea nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic și a nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic acoperite de chitosan de către keratinocitelor orale premaligne (POE9i) (Studiul 3)	pagina 15
9. Captarea nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic și a nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic acoperite de chitosan de către keratinocitelor orale maligne (5PT) (Studiul 4)	pagina 16
10. Captarea nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic și a nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic acoperite de chitosan de către fibroblastele orale normale (FON) (Studiul 5).....	pagina 17
11. Captarea nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic și a nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic acoperite de chitosan de către fibroblastele asociate cancerului oral (OSCC-1) (Studiul 6)	pagina 18
12. Captarea nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic și a nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic acoperite de chitosan de către celulele din pulpa dentară (CPD) (Studiul 7)	pagina 19
13. Captarea nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic și a nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic acoperite de chitosan de mucoasele artificiale orale (MAO) (Studiul 8)	pagina 20
14. Captarea nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic și a nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic acoperite de chitosan de către celulele canceroase orale CA1 și de către celule stem ale cancerului oral (CSC) (Studiul 9)	pagina 22
15. Concluzii și contribuții personale.....	pagina 24
Bibliografie.....	pagina 28

Lista cu lucrările științifice publicate

Articole publicate

1. **Virlan, M. J. R.**, Miricescu, D., Radulescu, R., Sabliov, C. M., Totan, A., Calenic, B., & Greabu, M. (2016). Organic Nanomaterials and Their Applications in the Treatment of Oral Diseases. *Molecules*, 21(2), 207 **ISI 2.861**
<http://www.mdpi.com/1420-3049/21/2/207/htm>
2. **Virlan, M.J.R.**, Miricescu, D., Totan, A., Greabu, M., Tanase, C., Sabliov, C.M., Calenic, B. (2015). Current uses of poly(lactic-co-glycolic acid) in the Dental Field :A comprehensive review. *Journal of Chemistry*, vol. 2015, Article ID 525832, 12 pages, 2015. doi:10.1155/2015/525832 **ISI 1.3**
<https://www.hindawi.com/journals/jchem/2015/525832/>
3. **Virlan, M.J.R.**, Calenic, B. , Zaharia, C. , Greabu, M. Silk fibroin and potential uses in regenerative Dental Medicine. *Stoma Edu J.*(2014);1(2): 32-39.
http://www.academia.edu/11611376/Silk_fibroin_and_potential_uses_in_regenerative_dentistry_-_a_systematic_review
4. Greabu, M., Totan, A., Miricescu, D., Radulescu, R., **Virlan, J.**, & Calenic, B. Hydrogen Sulfide, Oxidative Stress and Periodontal Diseases: A Concise Review., *Antioxidants (Basel)*. (2016) Jan 14;5(1), 3. pii: E3. doi: 10.3390/antiox5010003
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4808752/>
5. **Virlan, M.J.R.**, Calenic, B., Cimpan, M.R., Costea, D.E., Greabu, M. Chitosan modified poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles interaction with normal, precancerous keratinocytes and dental pulp cells. *Stoma Edu J.* 2017;4(1):16-26.
[http://www.stomaeduj.com/chitosan-modified-poly\(lactic-co-glycolic\)-acid-nanoparticles-interaction-with-normal-precancerous-keratinocytes-and-dental-pulp-cells/](http://www.stomaeduj.com/chitosan-modified-poly(lactic-co-glycolic)-acid-nanoparticles-interaction-with-normal-precancerous-keratinocytes-and-dental-pulp-cells/)

Prezentări la conferințe (Prezentări Orale)

1. **Maria Justina Roxana Vîrlan**, Daniela Elena Costea, Bogdan Calenic, Adrian Biddle, Ian Mackenzie, Cristina M. Sabliov, Alexandra Totan, Maria Greabu: "Selective Binding of Chitosan Nanoparticles to Cancer Stem Cells ", Congresul U.M.F. "Carol Davila", București, 2016; Lucrarea a fost premiată cu **Premiul Tînărului Cercetător**
2. **Maria Justina Roxana Vîrlan**, Bogdan Calenic, Daniela Miricescu, Gabriela Negroiu, Cristina M. Sabliov, Daniela Elena Costea, Mihaela Roxana Cîmpan, Maria Greabu ,

"Nanoparticule de chitosan cu aplicabilitate în Medicina Dentară " , Congresul DENTALL București, 2017

3. **Maria Justina Roxana Vîrlan**, "Nanostomatologia", Săptămâna Științifică, Facultatea de Medicină Dentară, U.M.F."Carol Davila" , București, 2017

Prezentări la conferințe (Poster)

1.**Maria Justina Roxana Vîrlan**, Bogdan Calenic, Daniela Miricescu, Daniela Elena Costea , **Cristina Sabliov** Maria Greabu " Effect of the PLGA nanoparticles on the normal and cancer keratinocytes ", Al XIX-lea Congres Internațional al UNAS, București, 2015

2. **Maria Justina Roxana Vîrlan**, Bogdan Calenic, Gabriela Negroiu, Cristina M. Sabliov, Daniela Elena Costea, Mihaela Roxana Cimpan and Maria Greabu, "Effect of Polymeric Nanoparticles on the Oral Cavity Cells", Al X-lea Congres Anual al Asociației Medicale Române, București, 2016

3. **Maria Justina Roxana Vîrlan**, Bogdan Calenic, Daniela Miricescu, Daniela Elena Costea, Gabriela Negroiu, Cristina M.Sabliov, Mihaela Roxana Cîmpan, Maria Greabu, " Organic nanoparticles for oral disease treatment", A 2-a Conferință Națională a Asociației de Medicină de Laborator din România, Timișoara, 2017

Capitole de carte

1. Iulia-Ioana Stanescu, **Justina Virlan**, Daniela Miricescu, Bogdan Calenic, Radu Radulescu, Mircea Tampa, Simona-Roxana Georgescu, Daniela Costea, Maria Greabu " Keratinocitele stem orale - caracterizare, mecanisme moleculare și roluri în țesutul epitelial oral normal și patologic ", Dermatologia la interfața cu alte discipline, Editura UMF Iași, 2015

Premii

1. **Premiul TÂNĂRULUI CERCETĂTOR** acordat la Congresul U.M.F. "Carol Davila" București 2016

Burse de cercetare

Proiectul POSDRU/159/1.5/S/135760 CERO – PROFIL DE CARIERĂ: CERCETĂTOR ROMÂN.

Stagii de cercetare

Institutul Blizzard, Universitatea Queen Mary din Londra, Marea Britanie

Facultatea de Stomatologie din Bergen, Universitatea din Bergen, Norvegia

Catedra de Patologie Orală, Spitalul Universitar Haukeland, Bergen, Norvegia

Lista cu abrevieri și simboluri

AH = acid hialuronic

Chi = chitosan

CPD = celule din pulpa dentară

FACS = fluorescence activated cell sorting

(sortarea activată prin fluorescența celulelor, tehnică de citometrie în flux)

FITC = fluorescein isothiocyanate (izotiocianat de fluoresceină)

FON = fibroblaste orale normale

KON = keratinocite orale normale

MAO = mucoasă artificială orală

MIF = microscop cu imunofluorescență

NP = nanoparticule

NP Chi = nanoparticule de chitosan

NP PLGA = nanoparticule de plga

NP PLGAChi = nanoparticule de plga acoperite cu chitosan

OSCC = oral squamous cell carcinoma (carcinom scuamos oral)

PLGA = acid poli-lacto-co-glicolic

QML= Queen Mary University of London

SMF = sistemul mononuclear fagocitar

SSTF = soluție salină tamponată cu fosfat

Introducere

În ultimii ani s-au dezvoltat foarte multe aplicații biomedicale ce includ nanoparticule, datorită capacității acestora de a transporta medicamente către diferite regiuni din organism. Nanoparticulele polimerice încep să fie experimentate și pentru aplicații ce vizează cavitatea orală. Cu toate acestea, interacțiunile nanoparticulelor cu celulele dentare sunt insuficient cunoscute.

Am ales această temă datorită importanței tot mai mari a nanotehnologiei în medicină și cred în necesitatea aprofundării studiilor referitoare la efectele nanoparticulelor asupra țesuturilor umane. Spre exemplu, efectul nanoparticulelor polimerice la nivelul celulelor dentare sau asupra celulelor din mucoasa orală este incomplet cunoscut. Succesul utilizării nanoparticulelor în terapia cancerului ar ajuta în viitor la salvarea multor vieți iar posibilele aplicații în medicina dentară ar putea îmbunătăți practica medicală dentară.

Studiul a fost posibil ca urmare a colaborării Catedrei de Biochimie Dentară a U.M.F. " Carol Davila" cu Universitatea din Louisiana (S.U.A.), Universitatea din Bergen (Norvegia) și Universitatea Queen Mary din Londra.

Noutatea acestei teze o reprezintă faptul că este primul studiu care abordează problema interacțiunii nanoparticulelor polimerice din acid poli-lacto-co-glicolic și a nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic acoperite de chitosan cu celulele din cavitatea orală. De asemenea este primul studiu care testează nanoparticulele polimerice pe țesuturi artificiale de mucoasă orală și primul studiu din România în care sunt cultivate țesuturi artificiale de mucoasă orală.

Mai mult, unul dintre rezultatele foarte importante obținute în cadrul experimentelor o reprezintă datele referitoare la selectivitatea nanoparticulelor acoperite de chitosan față de celulele stem ale cancerului oral. Rezultatele promițătoare deschid calea unei noi direcții de cercetare în tratamentul cancerului oral. Datele obținute în cele 9 studii ale tezei de doctorat au fost publicate în articole ISI și BDI (prezentate în lista de publicații), iar anul trecut am obținut Premiul Tânărului Cercetător la Secțiunea Medicină Dentară (din cadrul Congresului U.M.F. " Carol Davila" 2016) pentru cercetările privind captarea selectivă a nanoparticulelor acoperite de chitosan de către celulele stem ale cancerului oral.

I. Partea generală (Stadiul actual al cunoașterii)

Capitolul 1. Nanoparticule polimerice

1.1. Nanoparticule (Generalități)

Nanoparticulele (NP) sunt dispersii de particule sau particule solide care au dimensiuni între 10 și 1000 nm (Mohanraj V.J., 2006). În literatura de specialitate se întâlnesc mai multe clasificări ale NP, cum ar fi de exemplu, împărțirea NP în două mari grupe: NP organice și NP anorganice (Andre M., 2016). Diferite substanțe pot fi încorporate, dizolvate, încapsulate sau atașate matricei NP: proteine, polizaharide, polimeri sintetici (Mohanraj V.J., 2006) sau variate biomolecule sau compuși activi.

1.2. Nanoparticule polimerice (Generalități)

NP polimerice sunt privite ca prima opțiune pentru a fi folosite în sisteme de eliberare controlată datorită numeroaselor avantaje pe care le au: 1) substanțele transportate de NP au un clearance aparent scăzut, timp de circulație și de înjumătățire crescut 2) NP polimerice sunt o opțiune favorabilă pentru administrarea orală a substanțelor cu o biodisponibilitate scăzută 3) NP polimerice pot fi modificate la suprafață pentru a permite țintirea anumitor regiuni din organism (Li B., 2017).

Capitolul 2. Nanoparticule din acid poli-lacto-co-glicolic

2.1. Acid poli-lacto-co-glicolic

Acidul poli-lacto-co-glicolic (PLGA) este unul dintre puținii polimeri aprobați de către Agenția Americană de Reglementare a Medicamentelor pentru aplicații clinice datorită faptului că este biodegradabil și biocompatibil (Chaubal M., 2002; Astete C.E., 2006; Li B., 2017; Kumari A., 2010). PLGA este sintetizat prin copolimerizarea acidului glicolic cu acidul lactic (Das S., 2016). În organismul uman acidul lactic și glicolic intră în ciclul Krebs, rezultând dioxid de carbon și apă (Kumari A., 2010).

2.2. Nanoparticule din acid poli-lacto-co-glicolic (Metode de sinteză)

Metodele de sinteză ale NP PLGA sunt foarte diverse. NP PLGA s-au fabricat în special prin următoarele tehnici: (1) metoda emulsificării difuziilor, (2) metoda evaporării solvenților, (3) metoda nanoprecipitării (Kumari A., 2010).

2.3. Nanoparticule din acid poli-lacto-co-glicolic (Utilizări)

NP PLGA au fost utilizate pentru a produce nanomedicamente, nanovaccinuri, sisteme de transport ale genelor, al factorilor de creștere sau al nanoantigenelor (Kumari A., 2010). Interesant este faptul că până acum PLGA este cel mai utilizat polimer sintetic în elaborarea de NP încărcate cu medicamente anticancer (Biondi M., 2008; Li B., 2017). Numeroase substanțe anticanceroase au fost încorporate cu succes în NP PLGA: paclitaxel, doxorubicină, 5-fluorouracil, cisplatină, dexametazonă (Kumari A., 2010). Totuși, proprietățile hidrofile scăzute ale PLGA limitează utilizările sale medicale, în special asocierile sale cu medicamente hidrofile (Wang Y., 2016).

Capitolul 3. Nanoparticule din chitosan

3.1. Chitosan

Chitosanul (Chi) este un polizaharid natural biodegradabil și biocompatibil. Acesta se extrage din chitină, un biopolimer marin, izolat din crustacee, al doilea cel mai abundent polimer din natură (Babu A., 2017). Chi este intens studiat în transportul de medicamente și gene, în ingineria tisulară, vindecarea rănilor, precum și pentru efectele sale antimicrobiene (Şenel S., 2004; Riva R., 2011; Li B., 2017).

3.2. Nanoparticule din chitosan (Metode de sinteză)

În literatură au fost menționate mai multe metode pentru prepararea NP Chi. Unele dintre cele mai frecvente tehnici sunt : (1) gelificarea ionotropică (2) tehnica complexurilor polielectrolitice (3) tehnica microemulsiilor (Kumari A., 2010).

3.3. Nanoparticule din chitosan (Utilizări)

NP din PLGA Chi ce încorporau lovastatină și tetraciclină au dus la regenerare osoasă în defectele parodontale la câini (Lee B.S., 2016). Mai mult, s-au produs și sealeri endodontici care încorporează NP Chi (DaSilva L., 2013; del Carpio-Perochena A., 2015a; Virlan M.J.R., 2016). Un grup de cercetători a folosit nanocomplexe de Chi fosforilat și fosfat de calciu amorf pentru remineralizări dentare (Zhang X., 2014). În 2015 au fost confecționate implanturi de titan acoperite cu NP Chi încărcate cu factori de creștere (Poth N., 2015; Virlan M.J.R., 2016). Aceste implanturi funcționalizate cu NP Chi au indus regenerare osoasă la animale (Poth N., 2015; Virlan M.J.R., 2016).

II. Contribuții personale

Capitolul 4.1. Ipoteza de lucru

Prin folosirea NP încărcate cu medicamente se reușește creșterea eficienței terapeutice a agenților farmacologic activ și se reduce intensitatea și incidența efectelor secundare asociate administrării medicamentelor pe cale generală (Kiessling F., 2014; Duncan R., 2011; Rizzo L.Y., 2013; Mohanraj V.J., 2006; Baetke S.C., 2015). Cele mai utilizate NP polimerice studiate în biomedicină sunt NP obținute din PLGA (Mittal G., 2007; Alqahtani S., 2015). Dar, sarcina negativă a NP PLGA scade interacțiunile NP cu membranele celulare încărcate tot negativ, iar opsonizarea rapidă a NP PLGA hidrofobe duce la îndepărtarea lor rapidă din circulație (Virvan M.J.R., 2017; Kumar M.R., 2004; Dyawanapelly S., 2016; Sah H., 2013). Pentru a îmbunătăți proprietățile NP PLGA, NP au fost acoperite cu un înveliș de Chi. Chi conține mai multe grupuri amino și hidroxil și poate să se lege în mod eficient la substraturile încărcate negativ (cum ar fi membranele celulare) prin interacțiuni electrostatice sau legături de hidrogen, îmbunătățind astfel înglobarea intracelulară a NP acoperite de Chi (Virvan M.J.R., 2017; Chronopoulou L., 2016; Friedman A.J., 2013).

Mai mult, studii recente au demonstrat că NP învelite de Chi prezintă o afinitate ridicată și se leagă preferențial la celulele cu o supraexpresie a receptorilor de suprafață CD44+ (Rao W., 2015; Ravari N.S., 2016). Celulele stem ale cancerului (CSC) oral prezintă o supraexpresie a receptorilor CD44+ (Biddle A., 2011, Harper L.J., 2010). Considerând faptul că în cancerul scuamos de cap și gât, CSC prezintă o expresie mărită a markerilor CD44 +, s-a ivit ipoteza că NP acoperite de Chi ar putea fi folosite pentru țintirea specifică a CSC orale. Ca o succesiune logică a apărut ideea posibilei selectivități a NP Chi (NP PLGAChi) față de celulele CD44 + (cum sunt de exemplu CSC orale).

Dimensiunea și suprafața NP joacă un rol crucial în determinarea interacțiunilor electrostatice ale NP cu membranele celulare și ca urmare, în internalizarea particulelor (Verma A., 2010; Faraji A.H., 2009; Labhasetwar V., 2005; Dyawanapelly S., 2016; Virvan M.J.R., 2017). De asemenea, și concentrația NP și timpul de expunere al acestora la diferite tipuri de celule fac diferența dintre un efect citotoxic și un comportament biocompatibil. Mucoasa orală este compusă dintr-o mare varietate de celule cu diferite proprietăți ce pot reacționa diferit la același tip de NP. De asemenea, condițiile patologice

ale cavității orale, cum ar fi stările precanceroase sau canceroase orale, pot modifica răspunsul celulelor orale umane la NP, datorită modificărilor din structura celulei.

Scopul studiului l-a reprezentat studierea interacțiunilor dintre celulele din cavitatea orală și NP PLGA sau NP PLGACHi. S-a evaluat astfel biocompatibilitatea NP PLGA și a NP PLGACHi cu celule orale. De asemenea, am studiat capacitatea NP PLGA și NP PLGACHi de a fi captate de celulele orale, aflate în stare normală sau patologică, în culturi celulare sau în țesuturi artificiale orale, după expunerea pentru variate perioade de timp la diferite concentrații de NP. O altă direcție de cercetare investigată a fost confirmarea ipotezei conform căreia NP acoperite de chitosan (NP PLGACHi) sunt preluate selectiv de celulele stem ale cancerului oral.

4.2. Obiectivele generale ale studiilor

Toate studiile prezentate au avut 3 obiective principale:

Obiectivul 1 : Cultura celulelor orale

Obiectivul 2: Expunerea celulelor orale la NP PLGA și la NP PLGACHi

Obiectivul 3 : Analiza interacțiunilor celulelor orale cu NP PLGA/ NP PLGACHi (analiza biocompatibilității NP cu celulele orale sau analiza captării NP de către celulele orale).

Capitolul 5.

Metodologia generală a cercetării

Cultura celulelor orale

Am utilizat o mare varietate de linii celulare orale: keratinocite orale normale KON, keratinocite premaligne POE9i, keratinocitea maligne 5PT, fibroblaste orale normale FON, fibroblaste orale asociate cancerului oral OSCC-1, celule din pulpa dentară CPD, precum și celule canceroase CA1 (ce conțin CSC orale).

Expunerea celulelor orale la nanoparticule

NP PLGA și NP PLGACHi au fost fabricate de Prof. Dr. Cristina Sabliov de la Louisiana State University și au fost caracterizate anterior (Navarro S.M. și colab., 2014; Navarro S.M. și colab., 2016; Triff M. și colab., 2015). Celulele KON, FON, CPD, POE9i și 5PT au fost expuse pentru 2h, 12h și 24h la următoarele concentrații de NP PLGA și NP PLGACHi: 5 μg/mL, 20 μg/mL și 200 μg/mL. OSCC-1 au fost testate la concentrațiile de 5 μg/mL, 20 μg/mL și 200 μg/mL NP PLGA și NP PLGACHi pentru 24h. Probele de mucoasă artificială orală umană (MAO) au fost expuse pentru 24h la 200 μg/mL NP

PLGACHi. Celulele canceroase CA1 și CSC au fost expuse pentru 24h la 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NP PLGA și 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NP PLGACHi.

Analiza la microscopul cu imunofluorescență

S-a utilizat un microscop Zeiss up-right Axio Imager cu modul de slider ApoTome 2, utilizând obiectivele microscopului 403 sau 603 (Carl-Zeiss, Germany).

Cuantificarea încorporării nanoparticulelor de către celulele orale

Cuantificarea captării NP PLGACHi de către KON, FON, POE9i, 5PT, OSCC-1 și CPD a fost obținută cu ajutorul unui software de analiză, Icy software. Cuantificarea preluării NP de către celulele orale CA1 s-a realizat prin tehnici de citometrie în flux.

Analiza statistică a datelor

S-au calculat valorile medii și deviațiile standard. Analiza statistică a datelor s-a realizat folosind testul student t-test. $p < 0.05$ a fost considerat statistic semnificativ.

Capitolul 6. Studiul 1

Evaluarea citotoxicității nanoparticulelor polimerice din acid poli-lacto-co-glicolic și a nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic acoperite de chitosan

Scopul acestui studiu îl reprezintă evaluarea citotoxicității NP PLGA și NP PLGACHi asupra keratinocitelor orale normale (KON) și premaligne (POE9i).

Rezultate

S-a observat că nu există diferențe statistic semnificative între viabilitatea probele control și viabilitatea probele de celule KON și POE9 expuse timp de 24h la NP PLGA sau NP PLGACHi (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ și 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Puncte cheie

- NP PLGA nu au afectat semnificativ statistic viabilitatea KON
- NP PLGA nu au afectat semnificativ statistic viabilitatea POE9i
- NP PLGACHi nu au afectat semnificativ statistic viabilitatea KON
- NP PLGACHi nu au afectat semnificativ statistic viabilitatea POE9i

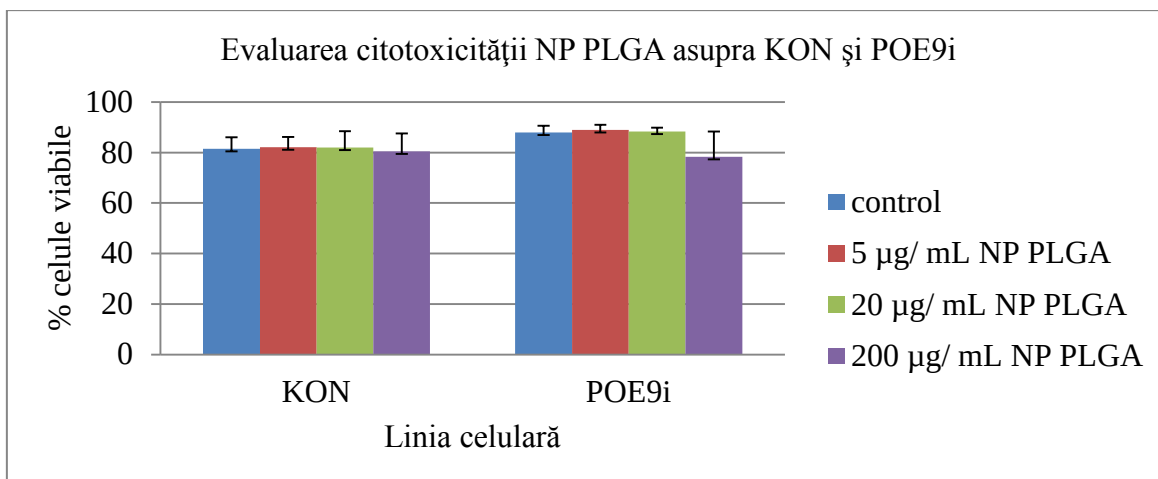


Figura 6.1. Evaluarea citotoxicității nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic asupra keratinocitelor orale umane

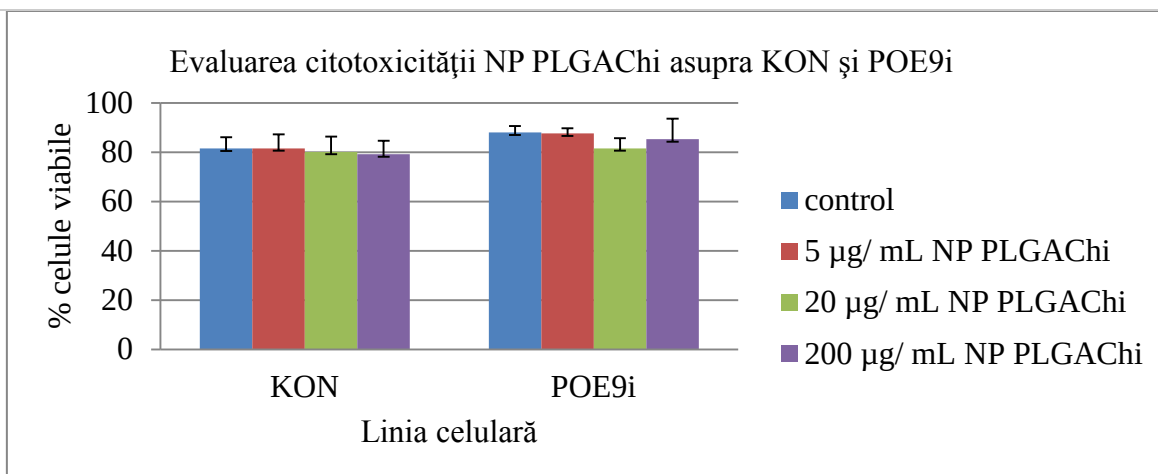


Figura 6.2. Evaluarea citotoxicității nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic acoperite de chitosan asupra keratinocitelor orale umane

Discuții

Rezultatele din acest studiu sunt în concordanță cu ideea biocompatibilității PLGA ce se desprinde din literatura de specialitate. Mura S. și colaboratorii săi susțin că NP PLGA afectează viabilitatea celulelor Calu-3 la concentrații de NP care sunt prea mari pentru a fi utilizate în clinică (Mura S., 2011). NP PLGA au fost testate și pe celulele pulmonare A549, fără să cauzeze efecte citotoxice după expunerea la concentrații de până la 5 mg/mL NP PLGA (Mura S., 2011; Tahara K., 2010). Celulele Caco-2 au demonstrat o viabilitate de peste 95%, chiar după incubarea pentru o zi la o concentrație de 500 µg/mL NP PLGACHi (Alqahtani S., 2015; Virlan M.J.R., 2017). Alți cercetători au raportat faptul că NP PLGACHi par să fie sigure chiar la concentrații mai mari de NP PLGACHi, ca de exemplu 20 mg/mL (Pawar D., 2013; Grabowski N., 2013; Tahara K., 2009; Dyawanapelly S., 2016; Virlan M.J.R., 2017). NP solide de Chi ce conțin tretinoină nu au

generat efecte citotoxice asupra celulelor HaCaT chiar și după expunerea la 500 $\mu\text{g/mL}$ NP (Ridolfi D.M., 2012; Virlan M.J.R., 2017). Și NP lecitină/Chi pot fi aplicate pe celulele dermale la concentrații de până la 200 $\mu\text{g/mL}$ NP fără să inducă scăderea viabilității celulare (Hafner A., 2011; Virlan M.J.R., 2017). O posibilă explicație pentru biocompatibilitatea ridicată a NP Chi ar putea fi faptul că Chi este mult mai toxic într-o formă liberă solubilă decât atunci când este încorporat în NP, când grupările amino pozitive ale Chi sunt angrenate în interacțiuni electrostatice (Sonvico F., 2006; Blažević F., 2016; Virlan M.J.R.).

Capitolul 7. Studiul 2

Captarea nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic și a nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic acoperite de chitosan de către keratinocitelor orale normale (KON)

Scopul studiului îl reprezintă evaluarea captării NP PLGA și a NP PLGACHi de către keratinocitele orale umane normale (KON).

Rezultate

NP PLGACHi utilizate în acest experiment pătrund în interiorul KON, spre deosebire de NP PLGA ce nu sunt captate de KON (Fig. 7.1.). După expunerea la 5 $\mu\text{g/mL}$ NP PLGACHi nu s-a evidențiat pătrunderea NP PLGACHi intracelular, la nici un interval de timp de expunere. Procentajul de KON ce au înglobat NP PLGACHi a fost de 91,83% $\pm 7,37$ după 12h expunere la 20 $\mu\text{g/mL}$ NP PLGACHi. 92,39% $\pm 1,34$ dintre KON expuse au arătat semne ale încorporării NP PLGACHi după 24h de expunere la 20 $\mu\text{g/mL}$ NP PLGACHi. După 2h de expunere la 200 $\mu\text{g/mL}$ NP PLGACHi, NP au intrat în 82,05% $\pm 2,29$ KON. NP PLGACHi NP au intrat în procent de 98,55 % $\pm 1,95$ în KON testate după 12h de expunere la 200 $\mu\text{g/mL}$ NP PLGA. Încorporare 100% în interiorul KON a fost observată după o zi de incubare cu 200 $\mu\text{g/mL}$ NP PLGACHi .

Puncte cheie

- *NP PLGACHi sunt captate de către KON*
- *Captarea NP PLGACHi de către KON este dependentă de concentrație și timp*
- *NP PLGA nu au pătruns în KON*

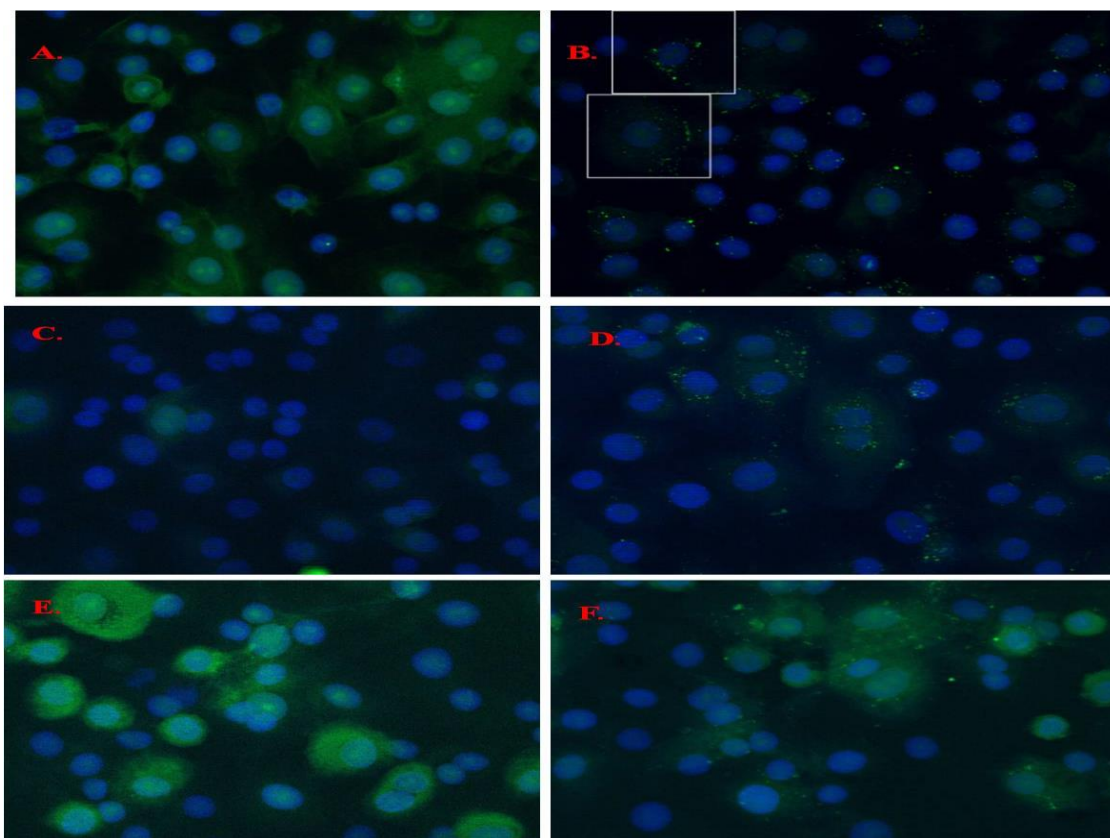


Figura 7.1. Captarea diferită a nanoparticulelor polimerice de către keratinocitele orale normale

NP PLGACHi sunt încorporate în interiorul KON (**B.**, **D.** și **F.**) în comparație cu NP PLGA care nu sunt captate de către KON (**C.** și **E.**)

A. KON control

D. KON / 200 $\mu\text{g/mL}$ NP PLGACHi / 24h

B. KON/20 $\mu\text{g/mL}$ NP PLGACHi / 12h

E. KON / 20 $\mu\text{g/mL}$ NP PLGA / 2h

C. KON / 200 $\mu\text{g/mL}$ NP PLGA / 24h

F. KON / 20 $\mu\text{g/mL}$ NP PLGACHi / 2h

Discuții

Rezultatele sunt în acord cu studii anterioare care au arătat o înglobare mărită a NP polimerice fortificate cu Chi față de NP polimerice neacoperite de Chi (Wang Y., 2013; Bakhru S.H, 2012; Alqahtani S., 2015; Chronopoulou L., 2012; Dyawanapelly S., 2016; Virilan M.J.R., 2017). Într-un studiu din 2015, Alqahtani S. a arătat că la linia celulară Caco-2, NP PLGACHi au înglobat de 3,5 ori mai multe celule față de numărul de celule în care au intrat NP PLGA (Alqahtani S., 2015; Virilan M.J.R., 2017). Chronopoulos a raportat faptul că înglobarea NP PLGACHi pare să se facă mult mai rapid decât înglobarea NP PLGA în hepatocitele umane 3A și în fibroblastele 3T6 (Chronopoulou L., 2013; Virilan M.J.R., 2017). Este cunoscut faptul că NP cationice îmbunătățesc captarea celulară și deschid legăturile intercelulare strânse (Sah H., 2013). A fost semnalat faptul

că internalizarea particulelor pozitive de Chi se produce predominant prin endocitoză, iar suprafețele electropozitive datorită faptului că aderă mult mai ușor decât cele electronegative sau neutre la suprafețele membranare, sunt preluate mult mai facil de către membranele celulare electronegative (Chronopoulou L., 2013; Chuah L.H., 2014; Hillaireau H., 2009). Rezultatele din acest experiment confirmă faptul că acoperirea cu Chi a NP PLGA duce la o captare mult mai eficientă a NP de către KON.

Capitolul 8. Studiul 3

Captarea nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic și a nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic acoperite de chitosan de către keratinocitelor orale premaligne (POE9i)

Scopul studiului îl reprezintă evaluarea captării NP PLGA și a NP PLGACHi de către keratinocitele orale umane premaligne (POE9i).

Rezultate

NP PLGA nu au penetrat membrana celulelor POE9i . NP PLGACHi au pătruns în POE9i doar după expunerea la 20 $\mu\text{g/mL}$ NP PLGACHi și 200 $\mu\text{g/mL}$ NP PLGACHi.

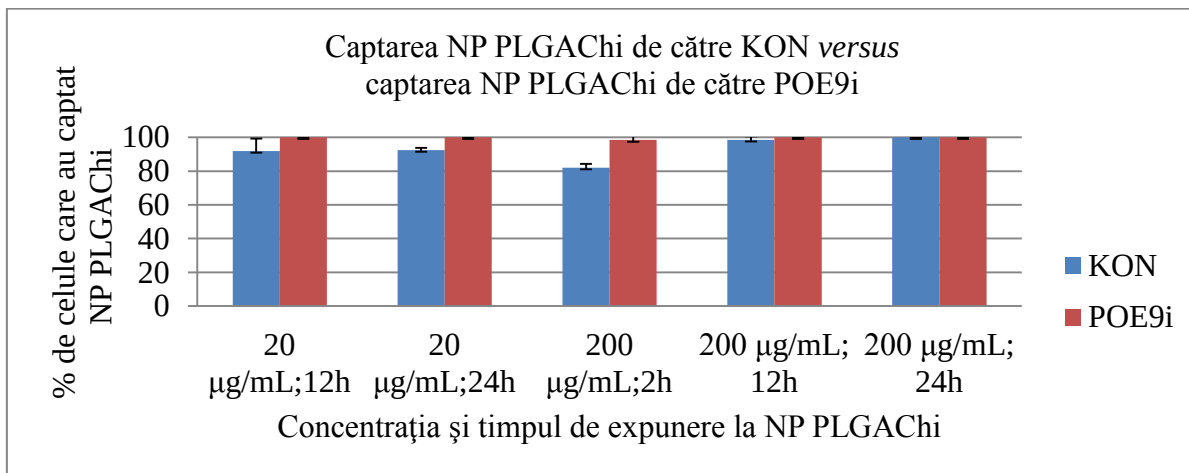


Figura 8.1. Comparație între captarea nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic acoperite de chitosan de către keratinocitele orale normale și de către keratinocitele orale premaligne POE9i

<i>Puncte cheie</i>	
<i>NP PLGACHi sunt captate de POE9i, dar NP PLGA nu sunt preluate de POE9i</i> <i>Captarea NP PLGACHi în interiorul POE9i este dependentă de concentrație și timp</i>	

Discuții

Se observă o preluare preferențială a NP PLGACHi de către keratinocitele precanceroase în detrimentul keratinocitelor normale. Într-un studiu anterior, Sahay G. și colaboratorii săi au emis ipoteza conform căreia culturile de celule epiteliale ce formează legături strânse unele cu altele nu au internalizat NP, în comparație cu celulele canceroase (ce nu aveau legături intercelulare strânse) care au internalizat NP (Sahay G., 2010; Virilan M.J.R., 2017). Această ipoteză ar putea explica și captarea preferențială a keratinocitelor premaligne față de cele normale de către NP PLGACHi.

Capitolul 9. Studiul 4

Captarea nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic și a nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic acoperite de chitosan de către keratinocitelor orale maligne (5PT)

Scopul studiului îl reprezintă evaluarea captării NP PLGA și a NP PLGACHi de către keratinocitele orale maligne 5PT.

Rezultate

NP PLGACHi au pătruns numai în celulele 5PT expuse la 200 $\mu\text{g/mL}$ NP PLGACHi timp de 12h și 24h. NP PLGA nu au fost captate de 5PT.

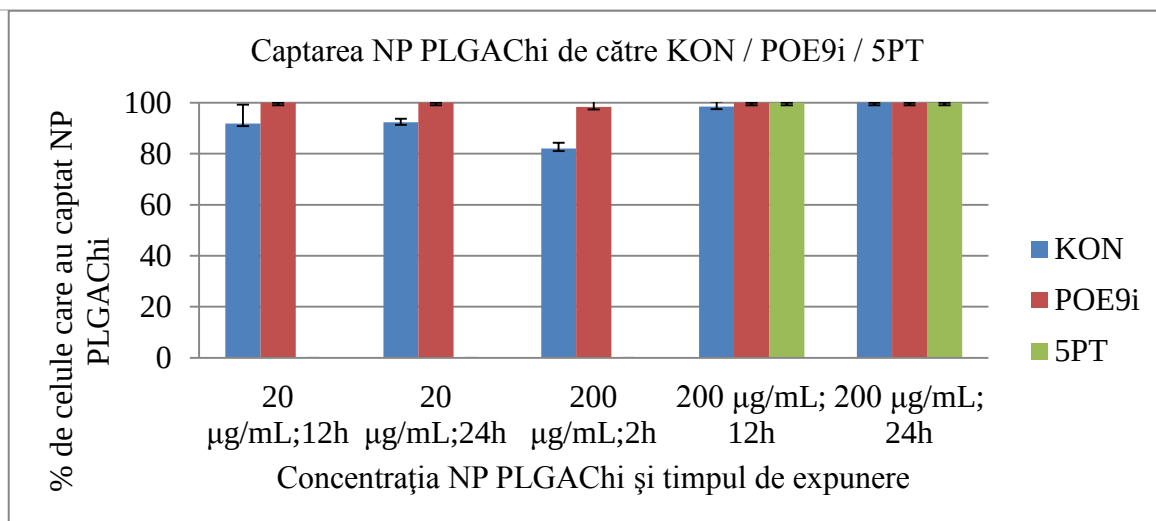


Figura 9.1. Comparație între captarea nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic acoperite de chitosan de către keratinocitele orale umane

Puncte cheie

- *NP PLGACHi sunt captate de 5PT, dar NP PLGA nu pătrund în celulele 5PT*
- *Captarea NP PLGACHi de către 5PT este dependentă de concentrație și timp*

Discuții

Captare mult întârziată a NP PLGACHi de către 5PT în comparație cu KON și POE9i, ar putea fi explicată de caracterul celulelor 5PT. Acestea sunt celule tumorale foarte agresive cu o viteză de diviziune ridicată. În comparație cu KON și POE9i, celulele 5PT este foarte posibil să fi suferit mult mai multe diviziuni în timpul intervalelor de expunere la NP, mărindu-și consistent populația, lucru ce ar putea interfera cu capacitatea acestora de captare a NP. Cu toate că inițial probele cu liniile celulare testate au avut acelaș număr de celule care au fost expuse la NP, în intervalul de expunere la NP, celulele 5PT au avut o rată de diviziune considerabil mai ridicată decât celelalte tipuri de keratinocite. Acest fapt ar fi putut interfera cu anumite capacități de preluare a NP PLGACHi. De asemenea mediul de cultură pentru 5PT este unul special pentru celule canceroase. Nu știm încă în ce măsură influențează componenții din mediul de cultură celular aglomerarea NP PLGACHi și pătrunderea acestora intracelular.

Capitolul 10. Studiul 5

Captarea nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic și a nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic acoperite de chitosan de către fibroblastele orale normale (FON)

Scopul studiului îl reprezintă evaluarea captării NP PLGA și a NP PLGACHi de către fibroblastele orale umane (FON).

Rezultate

NP PLGA nu au fost captate de FON, spre deosebire de NP PLGACHi care au pătruns în FON. După 12h de expunere la 20 $\mu\text{g/mL}$ NP PLGACHi, procentajul mediu de FON care au încorporat NP PLGACHi a fost de $89,47 \% \pm 6,33$. După 24h de expunere la 20 $\mu\text{g/mL}$ NP PLGACHi procentul de FON care au captat NP a scăzut la jumătate $41,70 \% \pm 6,07$. NP s-au mai observat în interiorul FON și după incubarea pentru 12h la 200 $\mu\text{g/mL}$ NP PLGACHi, în proporție de $15,07\% \pm 2,74$.

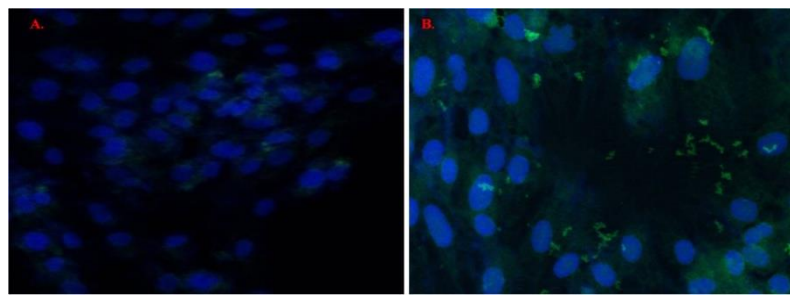


Figura 10.1. Captarea nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic acoperite de chitosan de către fibroblastele orale normale

A. FON control

B. FON /200 µg/mL NP PLGACHi

<i>Puncte cheie</i>
• <i>NP PLGACHi sunt capabile să pătrundă în interiorul FON</i> • <i>Captarea NP PLGACHi de către FON este dependentă de concentrație și timp</i> • <i>NP PLGA nu au pătruns în FON</i>

Discuții

S-a observat scăderea încorporării NP PLGACHi în interiorul FON odată cu creșterea concentrației NP și a timpului de expunere. O posibilă explicație ar putea fi o anumită aglomerare a NP PLGACHi în mediul de cultură. FON au fost cultivate în DMEM îmbogățit cu ser bovin fetal 10%. Nu se cunosc încă efectele exacte ale proprietăților mediului asupra NP PLGACHi.

Capitolul 11. Studiul 6

Captarea nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic și a nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic acoperite de chitosan de către fibroblastele asociate cancerului oral (OSCC-1)

Scopul studiului îl reprezintă evaluarea captării NP PLGA și a NP PLGACHi de către fibroblastele asociate cancerului oral (OSCC-1).

Rezultate

S-a remarcat captarea NP PLGACHi (dar nu și a NP PLGA) de către OSCC-1. S-a observat încorporarea NP PLGACHi în 100% din celulele OSCC-1 expuse la 5 µg/mL NP PLGACHi, 20 µg/mL NP PLGACHi și 200 µg/mL NP PLGACHi pentru 24h.

<i>Puncte cheie</i>
• <i>NP PLGACHi sunt capabile să pătrundă în interiorul OSCC-1</i> • <i>Captarea NP PLGACHi de către OSCC-1 este dependentă de concentrație și timp</i> • <i>NP PLGA nu au pătruns în OSCC-1</i>

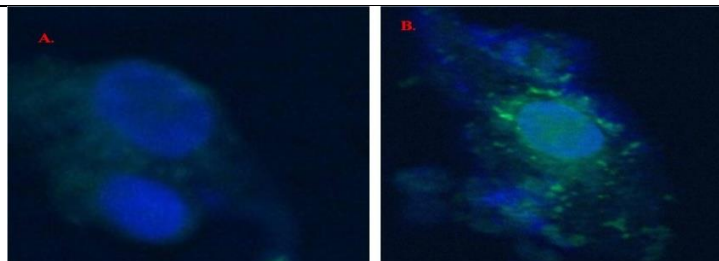


Figura 11.1. Captarea nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic acoperite de chitosan de către fibroblastele orale asociate cancerului oral OSSC-1

A. OSCC-1 control

B. OSCC-1 / 20 µg/mL NP PLGACHi NP / 24h

Discuții

Datele din acest studiu sunt diferite de cele obținute după incubarea FON cu NP PLGACHi (Capitolul 10). O posibilă explicație a preluării diferite observate în acest studiu a NP PLGACHi în interiorul OSCC-1 față de FON ar putea fi explicată prin diferențele dintre caracteristicile membranare ale acestor celule, sau legăturilor intercelulare diferite formate. O posibilă explicație ar putea fi și teoria lui Sahay G., menționată în Capitolul 8.

12. Studiul 7

Captarea nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic și a nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic acoperite de chitosan de către celulele din pulpa dentară (CPD)

Scopul studiului îl reprezintă evaluarea captării NP PLGA și a NP PLGACHi de către celulele din pulpa dentară (CPD).

Rezultate

<i>Puncte cheie</i>
• <i>NP PLGACHi nu au fost capabile să pătrundă în interiorul CPD</i> • <i>NP PLGA nu au fost capabile să pătrundă în interiorul CPD</i>

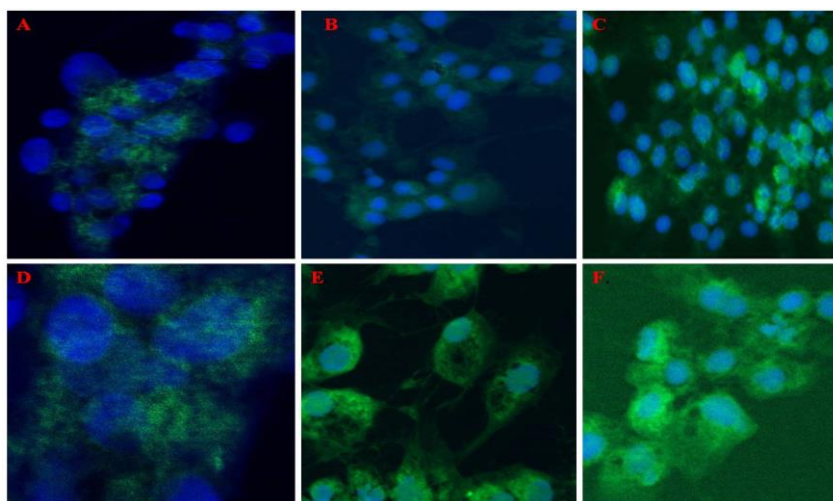


Figura 12.1. Captarea nanoparticulelor polimerice din acid poli lacto-co-glicolic acoperite sau nu cu chitosan, de către celulele din pulpa dentară (CPD)

Nu s-au observat diferențe semnificative între probele control (A. și C.), față de probele expuse la NP PLGA (C. și E.) și NP PLGACHi (B. și D.)

Discuții

Considerând faptul că la alte tipuri de celule au fost observat internalizări ale NP la intervale de timp mai mici sau mai mari decât cele folosite în studiul nostru (Alqahtani S., 2015; Chronopoulou L., 2013), experimente viitoare ar putea lua în considerare varianta testării CPD pe o paletă mai largă de concentrații și intervale de expunere la NP PLGA sau NP PLGACHi. NP PLGACHi ar putea fi folosite în anumite aplicații unde pătrunderea NP în interiorul CPD nu este de dorit, de exemplu în condiționările dentinare sau în tratamentele endodontice, în etapele după extirpările pulpare.

Capitolul 13. Studiul 8

Captarea nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic și a nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic acoperite de chitosan de mucoasele artificiale orale (MAO)

Scopul studiului îl reprezintă evaluarea captării NP PLGACHi de către țesuturile artificiale de mucoasă orală.

Rezultate

NP PLGACHi au fost capabile să penetreze straturile superficiale ale MAO după expunere timp de 24h la 200 $\mu\text{g/mL}$ NP PLGACHi (Fig. 13.1.).

Puncte cheie

- *NP PLGACHi sunt capabile să pătrundă în interiorul MAO*

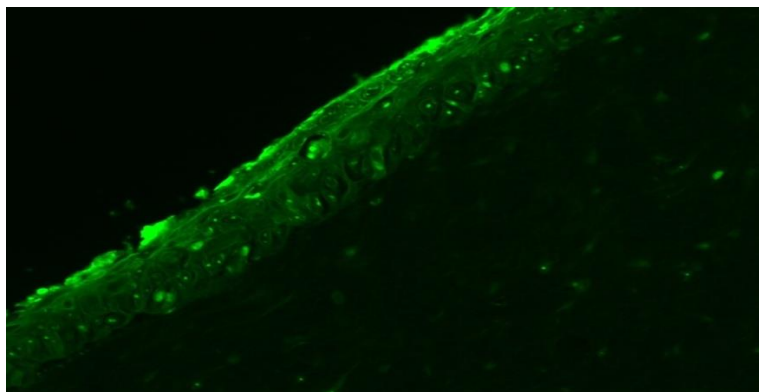


Figura 13.1. Evidențierea pătrunderii nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic acoperite de chitosan în interiorul mucoaselor artificiale orale

Discuții

Rezultatele obținute în studiile anterioare în 2D (culturile celulare într-un singur strat) sunt confirmate de experimentele 3D din acest studiu. În ultimii ani s-a pus un accent tot mai mare pe limitarea testării pe animale și pe dezvoltarea de țesuturi artificiale care să simuleze cât mai exact condițiile naturale. Folosirea MAO se aseamănă mult mai mult de condițiile din cavitatea bucală decât testele pe celulele. Astfel, se pot obține date mult mai bune referitoare la acțiunea diferiților compuși (medicamente, NP) asupra mucoasei orale. Dar, cu toate acestea, MAO nu pot substitui experimentele *in vivo* deoarece sunt compuse dintr-o biomatrice de collagen și celule epiteliale, fără alte componente ale unei mucoase naturale, cum ar fi celulele imune și componentele vasculare (Konstantinova V., 2016; Costea D.E., 2003; Virlan M.J.R., 2017). Mai mult, saliva poate să interfereze cu penetrarea NP în mucoasa orală și să îngreuneze penetrarea NP în interiorul epiteliului oral (Konstantinova V., 2016; Virlan M.J.R., 2017). Cum MAO nu au avut un strat protector de salivă, este dificil să estimăm influența salivei în înglobarea NP în interiorul mucoasei orale *in vivo*. Un alt factor important este că nu se cunoaște comportarea NP PLGACHi în salivă și dacă aceasta influențează în vreun fel aglomerarea particulelor sau captarea NP PLGACHi de către mucoasa orală. În plus, epiteliile orale suferă un proces natural de descumare, proces ce ar putea interfera cu profunzimea pătrunderii NP PLGACHi în interiorul mucoasei orale (Konstantinova V., 2016; Virlan M.J.R., 2017). Procesul de descumare nu a putut fi reprodus în aceste modele de MAO.

Capitolul 14. Studiul 9

Captarea nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic și a nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic acoperite de chitosan de către celulele canceroase orale CA1 și de către celulele stem ale cancerului oral (CSC)

Scopul studiului îl reprezintă evaluarea NP PLGA și a NP PLGACHi de către celulele canceroase orale CA1, precum și testarea ipotezei conform căreia NP acoperite de Chi sunt preluate selectiv de CSC orale.

Rezultate

Linia de celule canceroase CA1 conține atât CSC (CD44+), cât și celule canceroase non stem (CD44-). La analiza cu citometrul în flux CSC au fost detectate cu anticorpii CD44 - PE (clona G44-26, BD Bioscience). Deoarece NP PLGA și NP PLGACHi sunt conjugate cu FITC, celulele care au captat NP PLGACHi au fost recunoscute ca fiind celule FITC+. NP PLGACHi au fost captate de celulele CA1 la toate concentrațiile folosite în studiu. Mai mult, s-a observat o anumită preferință și selectivitate a NP PLGACHi pentru celulele CD44+ față de restul populației de celule canceroase orale CA1 expuse la NP PLGACHi. Cea mai mare selectivitate a NP PLGACHi pentru celulele CD44+ a fost observată la concentrația de 20 μg/mL NP PLGACHi. NP PLGA folosite în acest studiu nu au intrat în celulele CA1 (și implicit nici în CSC din componența acestora), la concentrațiile testate.

Puncte cheie

- *NP PLGACHi au fost captate de CA1 și de CSC orale*
- *Captarea NP PLGACHi de către CA1 este dependentă de concentrație*
- *Captarea NP PLGACHi de către CSC este dependentă de concentrație*
- *NP PLGACHi se leagă selectiv la CA1 ce exprimă cantități ridicate de markeri CD44+ (CSC orale)*
- *NP PLGA nu au fost captate de CA1 și nici de CSC orale*

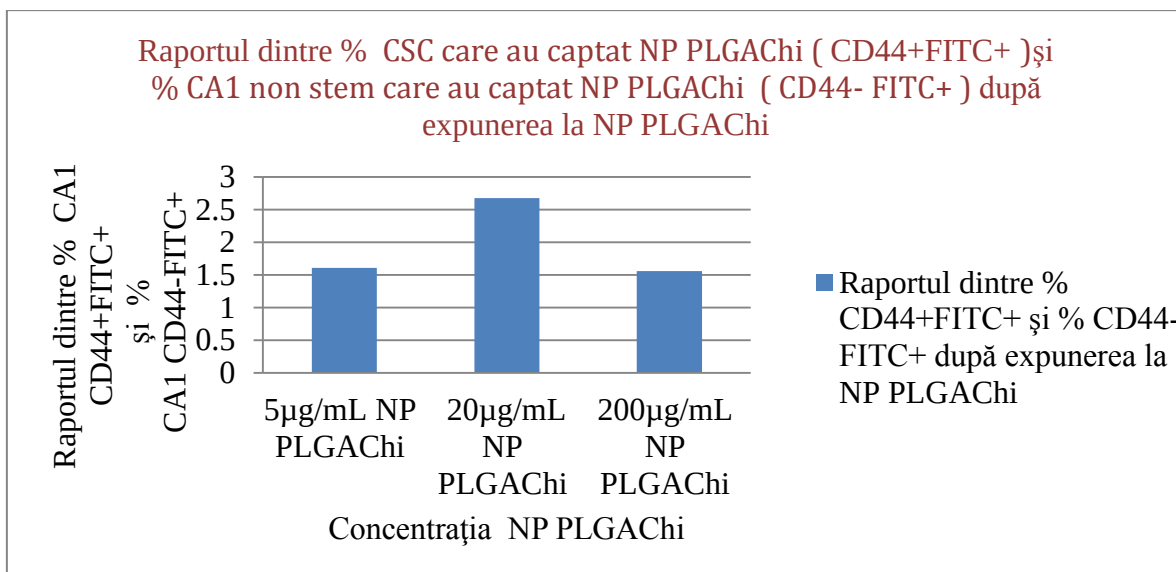


Figura 14.1. Captarea preferențială a nanoparticulelor din acid poli-lacto-co-glicolic acoperite de chitosan de către celulele CD44+ (celule stem canceroase)

Discuții

CSC orale sunt o subpopulație de celule canceroase care prezintă o supraexpresie a receptorilor CD44+, au proprietăți de inițiere a tumorilor și sunt considerate principala cauză pentru rezistența terapeutică a tratamentelor anticancer (Biddle A., 2016; Gemenetzidis E., 2015). CD44+ este o proteină de suprafață și un receptor biologic specific pentru acidul hialuronic (AH) (Wang T., 2017; Ravari N. S., 2016). Mai multe studii au confirmat ipoteza conform căreia AH are o afinitate marcată pentru proteina receptoare CD44+ și poate astfel să țintească preferențial celulele care prezintă o supraexpresie a CD44+ (Wang T., 2017, Ravari N. S., 2016). Chi este un polizaharid natural precum AH, deci putem să ne gândim la o preferință a Chi pentru celulele CD44+. Afinitatea ridicată a NP Chi la celulele CD44+ orale poate fi cauzată de o anumită afinitate a Chi pentru receptorii CD44+. Experimente recente au recunoscut abilitățile NP acoperite de Chi de a îmbunătăți transportul cu medicamente antitumorale (Elbaz N.M., 2016; Thakur C.K., 2016; Chen H., 2016; Nag M., 2016; Lin M., 2015; Mazzarino L., 2015). Articole anterioare au evidențiat de asemenea preferința NP acoperite de Chi pentru CSC. Într-un studiu recent NP acoperite de Chi ce conțineau doxorubicină au fost capabile să țintească și să elimine celulele "cancer stem like" (Rao W., 2015). Mai mult, NP formate din Chi, AH și Pluronic F127 ce transportau tot doxorubicină au fost capabile să elimine celulele "cancer stem like" (Wang H., 2015). Un alt studiu a arătat că NP de AH încărcate cu docetaxel și învelite cu Chi au fost mult mai eficiente împotriva celulelor CD44+ decât docetaxel în formă liberă, neînglobat în NP (Ravari N. S., 2016).

Capitolul 15

Concluziile tezei de doctorat

- Nanoparticulele polimerice din acid poli-lacto-co-glicolic (NP PLGA) sunt biocompatibile cu keratinocitele orale normale umane KON, precum și cu linia de keratinocite premaligne POE9i, în cazul expunerii celulelor la NP PLGA în concentrație de până la 200 $\mu\text{g/mL}$ și pentru un interval de timp de până la 24h
- NP PLGA acoperite cu chitosan (NP PLGACHi) sunt biocompatibile cu KON și cu POE9i în cazul utilizării NP PLGACHi în concentrație de până la 200 $\mu\text{g/mL}$ NP PLGA, pentru un interval de până la 24h
- Acoperirea suprafeței NP PLGA cu Chi nu influențează biocompatibilitatea NP față de keratinocitele orale umane
- Studiul oferă noi date referitoare la încorporarea NP polimerice din PLGA, acoperite sau nu de Chi, în interiorul celulelor orale normale sau patologice : keratinocite orale normale KON, keratinocite orale precanceroase POE9i, keratinocite orale canceroase 5PT, fibroblaste orale normale FON, fibroblaste asociate cancerului oral OSCC-1, precum și celule din pulpa dentară CPD
- NP PLGA acoperite de Chi s-au dovedit mult mai eficiente în a traversa membrana celulară a KON, POE9i, 5PT, FON și OSCC-1. Rezultatele *in vitro* au confirmat ideea penetrării mult îmbunătățite a NP PLGA acoperite de Chi în comparație cu NP PLGA simple în interiorul celulelor orale KON, POE9i, 5PT, FON și OSCC-1
- Acoperirea NP PLGA cu Chi îmbunătățește preluarea acestor NP de către KON, POE9i, 5PT, FON și OSCC-1
- Captarea NP PLGACHi de către KON, POE9i, 5PT, FON și OSCC-1 este dependentă de concentrație și timp
- NP PLGACHi sunt capabile să pătrundă în interiorul țesuturilor orale artificiale de mucoasă orală crescute *in vitro*
- NP PLGA nu sunt captate de către KON, POE9i, 5PT, FON și OSCC-1
- NP PLGACHi sunt recomandate a fi studiate ca viitoare sisteme de transport și eliberare controlată către mucoasa orală, în tratamentul afecțiunilor mucoasei orale, precum și în tratamentul afecțiunilor premaligne sau maligne orale
- Se poate observa preferința NP PLGACHi pentru keratinocite precanceroase față de keratinocitele orale normale, ceea ce le recomandă în terapia afecțiunilor maligne orale și,

mai relevant din punct de vedere medical, în prevenirea trecerii leziunilor premaligne în faza malignă

- NP PLGACHi nu sunt internalizate de către celulele din pulpa dentară
- NP PLGA nu sunt internalizate de către celulele din pulpa dentară
- NP PLGACHi utilizate în acest studiu nu sunt eligibile pentru aplicații dentare ce necesită pătrunderea NP în interiorul celulelor din pulpa dentară, deoarece NP PLGACHi nu pătrund în CPD
- Totuși, NP PLGACHi ar putea fi folosite în anumite aplicații unde pătrunderea NP în interiorul CPD nu este de dorit, de exemplu în condiționările dentinare sau în tratamentele endodontice, în etapele după extirpările pulpare
- S-a constatat legarea selectivă și captarea NP acoperite de Chi de către celulele cancerului oral ce exprimă cantități ridicate de receptori CD44+
- NP PLGACHi sunt internalizate preferențial de către CSC orale umane
- Rezultatele duc la o nouă direcție în tratamentul cancerului oral
- NP PLGACHi încărcate cu medicamente anticancer ar putea fi folosite pentru tratamentul CSC orale cu o mai mare eficiență. NP acoperite de Chi ar putea fi utilizate pentru a distruge într-un mod selectiv celulele inițiatoare de tumori CSC, ducând la o eficiență mai mare a tratamentului. De asemenea, NP Chi ar putea să micșoreze timpul de contact al medicamentelor anticancer cu țesuturile sănătoase, oferind o șansă de a transporta doze mai mari de substanță către țesuturile cancerigene, evitând țesuturile sănătoase și generând efecte secundare mult mai mici. NP Chi pot scădea astfel perioada și cantitatea de contact a celulelor sănătoase cu substanțele antitumorale, ducând la efecte adverse nedorite mult diminuate.

Contribuții personale

Consider că au fost atinse obiectivele de cercetare fixate pentru cele 9 studii prezentate în cuprinsul tezei de doctorat. Am cultivat o mare varietate de celule orale normale și patologice ce au fost ulterior testate la două tipuri de NP polimerice, NP PLGA și NP PLGACHi (Capitolele 6-14). Apoi am realizat analiza interacțiunilor celulelor orale cu NP polimerice utilizând teste de viabilitate (Capitolul 6), tehnici de MIF (Capitolele 7-13) și citometrul în flux de tip FACS (Capitolul 14). În timpul experimentelor am învățat să izolez celule primare orale normale (Capitolul 6, Capitolul 10, Capitolul 12) și canceroase (Capitolul 14), precum și să cultiv *in vitro* țesuturi de mucoasă artificială orală (Capitolul 13). Rezultatele studiilor prezentate în teză au indicat

nu numai penetrarea NP PLGACHi în interiorul celulelor orale (normale și cancerose) (Capitolele 7-11), dar mai ales o penetrare selectivă a NP PLGACHi în interiorul celulelor stem ale cancerului oral (Capitolul 14). Am observat de asemenea și captarea mult mai rapidă a NP PLGACHi de către keratinocitele precanceroase față de keratinocitele orale normale (Capitolul 8). Interesant este faptul că NP PLGA din acest studiu nu au fost preluate de nici o linie celulară orală (Capitolele 7-11) iar CPD nu au captat nici NP PLGA și nici NP PLGACHi (Capitolul 12). Captarea NP PLGACHi de către celulele mucoasei orale, în culturi celulare 2D sau 3D orientează utilizarea NP PLGACHi spre a fi utilizate în transportul de substanțe active către mucoasa orală, în vederea vindecării anumitor afecțiuni ale țesuturilor cavității orale (Capitolul 13). De asemenea NP PLGACHi ar putea fi utilizate și în viitoare tratamente endodontice (Capitolul 12). Preferința NP PLGACHi pentru keratinocite precanceroase față de keratinocitele orale normale, recomandă utilizarea acestor NP în terapia afecțiunilor maligne orale și, mai relevant din punct de vedere medical, în prevenirea trecerii leziunilor premaligne în faza malignă (Capitolul 8). De asemenea, selectivitatea NP PLGACHi cu celulele CD44+ ar putea fi folosită și în oncologie, sau în alte ramuri medicale (Capitolul 14). NP PLGACHi ar putea fi studiate și pentru tratamentul altor tipuri de cancer ce prezintă celule stem cu supraexpresie a receptorilor CD44+ (Capitolul 14).

Din punct de vedere tehnico-economic, acest studiu a necesitat mulți reactivi și metode de analiză foarte scumpe. Experimentele au fost posibile ca urmare a colaborării cu Universitatea din Bergen, Norvegia unde am desfășurat cea mai mare parte a experimentelor (Capitolele 6-13). În plus, ca urmare a bursei de cercetare POSDRU/159/1.5/S/135760 CERO – PROFIL DE CARIERĂ: CERCETĂTOR ROMÂN am beneficiat de o bursă de mobilitate la Universitatea Queen Mary din Londra unde am putut efectua Studiul 9 (Capitolul 14). Doamna Profesor Cristina Sabliov de la Louisiana State University din S.U.A. ne-a furnizat NP polimerice utilizate în acest studiu (Capitolul 5). Analiza datelor la MIF fost posibilă cu ajutorul Institutului de Biochimie al Academiei Române din București (Capitolul 5).

Una dintre limitările studiului o reprezintă faptul că am utilizat 3 intervale de expunere și 3 concentrații de NP pentru compararea captării NP de către celulele orale. Studii viitoare ar trebui să folosească o paletă mai largă de concentrații de NP și de intervale de expunere (Capitolele 6-13). Considerând faptul că am realizat testarea biocompatibilității NP PLGA și a NP PLGACHi cu două tipuri de celule orale (Capitolul

6), ar fi util continuarea testării biocompatibilității NP polimerice cu o varietate mai mare de celule orale, izolate de la mai mulți pacienți.

Cu toată că studiul s-a concentrat pe multe tipuri de celule orale, o direcție viitoare de cercetare ar fi și testarea NP PLGA și NP PLGACHi și pe alte celule din cavitatea bucală, de exemplu celulele din ligamentul parodontal, celule osoase sau papilele linguale. De asemenea, ar trebui continuate experimentele pe țesuturi de mucoasă orală pentru mai multe intervale de expunere la NP PLGACHi. Cultivarea țesuturilor artificiale orale necesită reactivi și timp. Utilizarea țesuturilor artificiale oferă mult mai multe date decât studiile pe celule, fără necesitatea folosirii animalelor de laborator. Acesta este însă primul studiu din România în care se utilizează țesuturi artificiale orale crescute în laborator.

Noutatea studiului o reprezintă faptul că am realizat primul studiu care abordează problema interacțiunii nanoparticulelor polimerice NP PLGA și a NP PLGACHi cu celulele din cavitatea orală. De asemenea este primul studiu care testează nanoparticule polimerice pe țesuturi artificiale de mucoasă orală și primul studiu din România în care sunt cultivate țesuturi artificiale de mucoasă orală. Mai mult, unul dintre rezultatele foarte importante obținute în cadrul experimentelor o reprezintă datele referitoare la selectivitatea nanoparticulelor acoperite de chitosan față de celulele stem ale cancerului oral. Rezultatele promițătoare deschid calea unei noi direcții de cercetare în tratamentul cancerului oral. În plus, nanoparticulele de chitosan ar putea fi utilizate și în alte tipuri de cancere ce prezintă celule stem cu o supraexpresie a proteinei receptoare CD44. Astfel, NP PLGACHi ar putea fi utilizate nu numai în viitoare tratamente ale cancerului oral, dar și al altor tipuri de afecțiuni maligne. Pentru rezultatele cercetărilor despre selectivitatea NP acoperite de chitosan cu celulele stem ale cancerului oral am obținut Premiul Tânărului Cercetător la Congresul Universității de Medicină și Farmacie "Carol Davila" 2016.

Rezultatele promițătoare obținute în cele 9 studii desfășurate de mine în timpul doctoratului, indică utilitatea aprofundării studiului NP PLGACHi pentru diferite aplicații în medicina dentară, precum și în tratamentul cancerului oral sau al leziunilor premaligne orale.

Bibliografie selectivă

1. Alqahtani, S.; Simon, L.; Astete, C.E.; Alayoubi, A.; Sylvester, P.W.; Shen, Y.; Xu, Z.; Kaddoumi, A.; Nazzal, S.; Sabliov, C.M. Cellular uptake, antioxidant and antiproliferative activity of entrapped α -tocopherol and γ -tocotrienol in poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA) and chitosan covered PLGA nanoparticles (PLGA-Chi). *Journal of Colloid and Interface Science*, 2015, 445, 243-251.
2. André, E.M.; Passirani, C.; Seijo, B.; Sanchez, A.; Montero-Menei, C. N. Nano and microcarriers to improve stem cell behaviour for neuroregenerative medicine strategies: Application to Huntington's disease. *Biomaterials*, 2016, 83, 347-362.
3. Babu, A.; Ramesh, R. Multifaceted Applications of Chitosan in Cancer Drug Delivery and Therapy. *Marine Drugs*, 2017, 15(4), 96.
4. Baetke, S.C.; Lammers, T.G.G.M.; Kiessling, F. Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer. *The British Journal of Radiology*, 2015, 88(1054), 20150207.
5. Bellamy, C.; Shrestha, S.; Torneck C.; Kishen A. Effects of a bioactive scaffold containing a sustained transforming growth factor- β 1-releasing nanoparticle system on the migration and differentiation of stem cells from the apical papilla. *Journal of Endodontics*, 2016, 42(9), 1385-1392.
6. Biddle, A.; Gammon, L.; Fazil, B.; Mackenzie, I.C. CD44 staining of cancer stem-like cells is influenced by down-regulation of CD44 variant isoforms and up-regulation of the standard CD44 isoform in the population of cells that have undergone epithelial-to-mesenchymal transition. *PloS One*, 2013, 8(2), e57314.
7. Blažević F.; Milekić T.; Romić M.D.; Juretić, M.; Pepić, I.; Filipović-Grčić, J.; Lovrić, J.; Hafner, A. Nanoparticle-mediated interplay of chitosan and melatonin for improved wound epithelialisation. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 146, 445-454.
8. Chauhan, V. P.; Stylianopoulos, T.; Martin, J.D.; Popović, Z.; Chen, O.; Kamoun, W.S. ; Bawendi, M.G.; Fukumura, D.; Jain, R.K. Normalization of tumour blood vessels improves the delivery of nanomedicines in a size-dependent manner. *Nature Nanotechnology*, 2012, 7(6), 383–388.
9. Chen, H.; Nan, W.; Wei, X.; Wang, Y.; Lv, F.; Tang, H.; Li, Y.; Zhou, C.; Lin, J.; Zhu, W.; Zhang, Q. Toxicity, pharmacokinetics, and in vivo efficacy of biotinylated chitosan surface-modified PLGA nanoparticles for tumor therapy. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2016, 45(6), 1115-1122.

10. Chronopoulou, L.; Nocca, G.; Castagnola, M. Chitosan based nanoparticles functionalized with peptidomimetic derivatives for oral drug delivery. *New Biotechnology*, 2016, 33(1), 23-31.
11. Chuah, L.H.; Roberts, C.J.; Billa, N.; Abdullah, S.; Rosli R. Cellular uptake and anticancer effects of mucoadhesive curcumin-containing chitosan nanoparticles. *Colloids and surfaces B: biointerfaces*, 2014, 116:228-236.
12. Da, S.; Khuda-Bukhsh, A.R. PLGA-loaded nanomedicines in melanoma treatment: Future prospect for efficient drug delivery. *The Indian Journal of Medical Research*, 2016, 144(2), 181-193.
13. DaSilva, L.; Finer, Y.; Friedman, S.; Basrani, B.; Kishen, A. Biofilm formation within the interface of bovine root dentin treated with conjugated chitosan and sealer containing chitosan nanoparticles. *Journal of Endodontics*, 2013, 39, 249–253.
14. Del Carpio-Perochena (A) A.; Kishen, A.; Shrestha, A.; Bramante, C.M. Antibacterial properties associated with chitosan nanoparticle treatment on root dentin and 2 types of endodontic sealers. *Journal of Endodontics*, 2015, 41(8), 1353-1358.
15. Del Carpio-Perochen (B), A.; Bramante, C.M.; Duarte, M.A.H.; de Moura, M.R.; Aouada, F.A.; Kishen, A. Chelating and antibacterial properties of chitosan nanoparticles on dentin. *Restorative Dentistry & Endodontics*, 2015, 40, 195–201.
16. Dyawanapelly, S.; Koli, U.; Dharamdasani, V.; Jain, R.; Dandekar, P. Improved mucoadhesion and cell uptake of chitosan and chitosan oligosaccharide surface-modified polymer nanoparticles for mucosal delivery of proteins. *Drug Delivery and Translational Research*, 2016, 6(4), 365-379.
17. Elbaz, N.M.; Khalil, I.A.; Abd-Rabou, A.A.; El-Sherbiny, I. M. Chitosan-based nano-in-microparticle carriers for enhanced oral delivery and anticancer activity of propolis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 92, 254-269.
18. Friedman, A.J.; Phan, J.; Schairer, D.O. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of chitosan–alginate nanoparticles: A targeted therapy for cutaneous pathogens. *Journal of Investigative Dermatology*, 2013, 133(5), 1231-1239.
19. Gemenetzidis, E.; Gammon, L.; Biddle, A.; Emich, H.; Mackenzie, I.C. Invasive oral cancer stem cells display resistance to ionising radiation. *Oncotarget*, 2015, 6(41), 43964.
20. Grabowski, N.; Hillaireau, H.; Vergnaud, J. Toxicity of surface-modified PLGA nanoparticles toward lung alveolar epithelial cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013, 454(2), 686-694.

21. Greabu, M.; Totan, A.; Miricescu, D.; Radulescu, R.; **Virlan, J.**; Calenic, B. Hydrogen sulfide, oxidative stress and periodontal diseases: A concise review. *Antioxidants*, 2016, 5(1), 3.
22. Hafner, A.; Lovrić, J.; Pepić, I.; Filipović-Grčić, J. Lecithin/ chitosan nanoparticles for transdermal delivery of melatonin. *Journal of Microencapsulation*, 2011, 28(8), 807-815.
23. Harper, L.J.; Costea, D.E.; Gammon, L.; Fazil, B.; Biddle, A.; Mackenzie, I.C. Normal and malignant epithelial cells with stem-like properties have an extended G2 cell cycle phase that is associated with apoptotic resistance. *BMC Cancer*, 2010, 10, 166.
24. Hillaireau, H.; Couvreur, P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2009, 66(17), 2873-2896.
25. Konstantinova, V.; Ibrahim, M.; Lie, S.A.. Nano-TiO₂ penetration of oral mucosa: in vitro analysis using 3D organotypic human buccal mucosa models. *Journal of Oral Pathology & Medicine* , 2017, 46(3), 214-222.
26. Kumari, A.; Yadav, S.K.; Yadav, S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010, 75(1), 1-18.
27. Lee, B.S.; Lee, C.C.; Wang, Y.P. Controlled-release of tetracycline and lovastatin by poly (D, L-lactide-co-glycolide acid)-chitosan nanoparticles enhances periodontal regeneration in dogs. *International Journal of Nanomedicine*, 2016, 11, 285-297.
28. Lee, H.Y.; Jeong, Y.I.; Choi, K.C. Hair dye-incorporated poly- γ -glutamic acid/glycol chitosan nanoparticles based on ion-complex formation. *International Journal of Nanomedicine.*, 2011, 6, 2879-2888.
29. Lee, S.Y.; Koak, J.Y., Heo, S.J.; Kim, S.K.; Lee, S.J.; Nam, S.Y. Osseointegration of anodized titanium implants coated with poly (lactide-co-glycolide)/basic fibroblast growth factor by electrospray. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 2010, 25(2).
30. Li, B.; Li, Q.; Mo, J.; Dai, H. Drug-loaded polymeric nanoparticles for cancer stem cell targeting. *Frontiers in Pharmacology*, 2017, 8.
31. Lin, M.; Wang, D.; Liu, S. Cupreous complex-loaded chitosan nanoparticles for photothermal therapy and chemotherapy of oral epithelial carcinoma. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, 7(37), 20801-20812.
32. Mazzarino, L.; Borsali, R.; Lemos-Senna, E. Mucoadhesive films containing chitosan-coated nanoparticles: a new strategy for buccal curcumin release. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014, 103(11), 3764-3771.

33. Mazzarino, L.; Loch-Neckel, G.; Bubniak Ldos S. Curcumin-loaded chitosan-coated nanoparticles as a new approach for the local treatment of oral cavity cancer. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2015, 15(1), 781-791.
34. Mohanraj, V.J., Chen, Y. Nanoparticles-a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2006, 5(1), 561-573.
35. Mura, S.; Hillaireau, H.; Nicolas, J.; Le Droumaguet, B.; Gueutin, C.; Zanna, S.; Fattal, E. Influence of surface charge on the potential toxicity of PLGA nanoparticles towards Calu-3 cells. *International Journal of Nanomedicine*, 2011, 6, 2591-2605.
36. Nag, M.; Gajbhiye, V.; Kesharwani, P.; Jain, N.K. Transferrin functionalized chitosan-PEG nanoparticles for targeted delivery of paclitaxel to cancer cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2016, 148, 363-370.
37. Navarro, S.M.; Darensbourg, C.; Cross, L. Biodistribution of PLGA and PLGA/chitosan nanoparticles after repeat-dose oral delivery in F344 rats for 7 days. *Therapeutic Delivery*, 2014, 5(11), 1191-1201.
38. Navarro, S.M.; Morgan, T.W.; Astete, C.E. Biodistribution and toxicity of orally administered poly (lactic-co-glycolic) acid nanoparticles to F344 rats for 21 days. *Nanomedicine (Lond)*, 2016, 11(13), 1653-1669.
39. Naves, L.; Dhand, C.; Almeida, L.; Rajamani, L.; Ramakrishna, S.; Soares, G. Poly (lactic-co-glycolic) acid drug delivery systems through transdermal pathway: an overview. *Progress in Biomaterials*, 2017, 1-11.
40. Pawar, D.; Mangal, S.; Goswami, R.; Jaganathan, K.S. Development and characterization of surface modified PLGA nanoparticles for nasal vaccine delivery: effect of mucoadhesive coating on antigen uptake and immune adjuvant activity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2013, 85(3), 550-559.
41. Poth, N.; Seiffart, V.; Gross, G.; Menzel, H.; Dempwolf, W. Biodegradable chitosan nanoparticle coatings on titanium for the delivery of BMP-2. *Biomolecules*, 2015, 5, 3-19.
42. Rao, W.; Wang, H.; Han, J. Chitosan-decorated doxorubicin-encapsulated nanoparticle targets and eliminates tumor reinitiating cancer stem-like cells. *ACS Nano*, 2015, 9(6), 5725-5740.
43. Ravari, N.S.; Goodarzi, N.; Alvandifar, F.; Amini, M.; Souri, E.; Khoshayand, M.R.; Dinarvand, R. Fabrication and biological evaluation of chitosan coated hyaluronic acid-docetaxel conjugate nanoparticles in CD44+ cancer cells. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016, 24(1), 21.

44. Ridolfi, D.M.; Marcato, P.D.; Justo, G.Z.; Cordi, L.; Machado, D.; Durán, N. Chitosan-solid lipid nanoparticles as carriers for topical delivery of tretinoin. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 2012, 93, 36-40.
45. Riva, R.; Ragelle, H.; des Rieux, A.; Duhem, N.; Jérôme, C.; Préat, V. Chitosan and chitosan derivatives in drug delivery and tissue engineering. *Chitosan for Biomaterials II (Advances of Polymer Sciences)*, 2011, 19-44. Springer Berlin Heidelberg.
46. Rizzo, L. Y.; Theek, B.; Storm, G.; Kiessling, F.; Lammers, T. Recent progress in nanomedicine: therapeutic, diagnostic and theranostic applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 2013, 24(6), 1159-1166.
47. Sah, H.; Thoma, L.A.; Desu, H.R.; Sah, E.; Wood, G. C. Concepts and practices used to develop functional PLGA-based nanoparticulate systems. *International Journal of Nanomedicine*, 2013, 8, 747-765.
48. Sahay, G.; Kim, J.O.; Kabanov, A.V.; Bronich, T.K. The exploitation of differential endocytic pathways in normal and tumor cells in the selective targeting of nanoparticulate chemotherapeutic agents. *Biomaterials*, 2010, 31(5), 923-933.
49. Sonvico, F.; Cagnani, A.; Rossi, A. Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction. *International Journal of Pharmaceutics*, 2006, 324(1), 67-73.
50. Stănescu, I.I.; **Virlan, J.**; Miricescu, D.; Calenic, B.; Radulescu, R.; Tampa, M.; Georgescu, S.R.; Costea, D.; Greabu, G. Keratinocitele stem orale - caracterizare, mecanisme moleculare și roluri în țesutul epitelial oral normal și patologic, *Dermatologia la interfața cu alte discipline*, Editura UMF Iași, 2015.
51. Tahara, K.; Sakai, T.; Yamamoto, H.; Takeuchi, H.; Hirashima, N.; Kawashima, Y. Improved cellular uptake of chitosan-modified PLGA nanospheres by A549 cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, 382(1-2), 198-204.
52. Tahara, K.; Yamamoto, H.; Kawashima, Y. Cellular uptake mechanisms and intracellular distributions of polysorbate 80-modified poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres for gene delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2010, 75(2), 218-224.
53. Thakur, C.K.; Thotakura, N.; Kumar, R.; Kumar, P.; Singh, B.; Chitkara, D.; Raza, K. Chitosan-modified PLGA polymeric nanocarriers with better delivery potential for tamoxifen. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 93, 381-389.
54. Trif, M.; Florian, P.E.; Roseanu, A.; Cytotoxicity and intracellular fate of PLGA and chitosan-coated PLGA nanoparticles in Madin-Darby bovine kidney (MDBK) and human

- colorectal adenocarcinoma (Colo 205) cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2015, 103(11), 3599-3611.
55. Verma, A.; Stellacci, F. Effect of surface properties on nanoparticle–cell interactions. *Small*, 2010, 6(1), 12-21.
 56. **Virlan, M.J.R.**; Calenic, B.; Zaharia, C.; Greabu, M. Silk fibroin and potential uses in regenerative Dental Medicine. *Stoma Edu Journal*, **2014**, 1(2), 32-39.
 57. **Virlan, M.J.R.**; Miricescu, D.; Totan, A.; Current uses of poly (lactic-co-glycolic acid) in the den-tal field: A comprehensive review. *Journal of Chemistry*, 2015, Article ID 525832.
 58. **Virlan, M. J. R.**; Miricescu, D.; Radulescu, R.; Sabliov, C. M.; Totan, A.; Calenic, B.; Greabu, M. Organic Nanomaterials and Their Applications in the Treatment of Oral Diseases. *Molecules*, 2016, 21(2), 207.
 59. **Virlan, M.J.R.**; Calenic, B.; Cimpan, M.R.; Costea, D.E.; Greabu, M. Chitosan modified poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles interaction with normal, precancerous keratinocytes and dental pulp cells. *Stoma Edu Journal*, 2017, 4(1), 16-26.
 60. Wang, H.; Agarwal, P.; Zhao, S. Hyaluronic acid-decorated dual responsive nanoparticles of Pluronic F127, PLGA, and chitosan for targeted co-delivery of doxorubicin and irinotecan to eliminate cancer stem-like cells. *Biomaterials*. 2015, 72, 74-89.
 61. Wang, T.; Hou, J.; Su, C.; Zhao, L.; Shi, Y. Hyaluronic acid-coated chitosan nanoparticles induce ROS-mediated tumor cell apoptosis and enhance antitumor efficiency by targeted drug delivery via CD44. *Journal of Nanotechnology*, 2017, 15(1), 7.
 62. Wang, Y.; Li, P.; Kong, L. Chitosan-modified PLGA nanoparticles with versatile surface for improved drug delivery. *AAPS PharmSciTech.*, 2013, 14(2), 585-592.
 63. Wang, Y.; Li, P.; Truong-Dinh Tran, T.; Zhang, J.; Kong, L. Manufacturing techniques and surface engineering of polymer based nanoparticles for targeted drug delivery to cancer. *Nanomaterials*, 2016, 6(2), 26.
 64. Zhang X.; Li, Y.; Sun, X.; Kishen, A.; Deng, X.; Yang, X.; Wang, H.; Cong, C.; Wang, Y.; Wu, M. Biomimetic remineralization of demineralized enamel with nano-complexes of phosphorylated chitosan and amorphous calcium phosphate. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2014, 25, 2619–2628.

