

## Etapa II: Evaluarea *in vitro* si *in vivo* a efectelor anti-fibrotice ale noului complex DDS/flavonoide

### Rezumat etapa II.

În etapa II a fost realizată evaluarea *in vitro* a efectelor antifibrotice si a mecanismelor moleculare antifibrotice pentru complexul supramolecular OTX/ sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin (simplu si polimer) încărcat cu crisină (CHR) pe 2 tipuri de culturi celulare: cardiomiocite ( H9c2) și celule epiteliale retiniene (ARPE-19). Complexul supramolecular OTX/SBECDC/CHR a inhibat *in vitro* căile de semnalizare TGF $\beta$ /Gal-1; Gal-1, TGF $\beta$ 1, TGFBR1/2, SMAD2/4, precum și expresiile ERK, MAPK, NF-kB, ROS. De asemenea *in vivo* a avut effect de diminuarea a parametrilor hepatici serici, precum si a creatininei serice.

### Activitatea 1. Evaluarea *in vitro* a efectelor antifibrotice si a mecanismelor moleculare

#### I. Evaluarea pe culturi de cardiomiocite ( H9c2)

##### Material si metode

##### I.1.1 Cutura de celule H9c2

Celulele cardiace embrionare de șobolan H9c2 (2-1) (ECACC, UK) au fost cultivate în mediu Dulbecco Eagle modificat (DMEM; AU-L0101Aurogene, Italia), care conține d-glucoză normală (5,5 mM, NG) și suplimentat cu 10% ser fetal bovin inactivat (FBS), 1% L-Glutamină (L-Glu) și 1% soluție de penicilină/streptomycină (P/S), la 37°C într-o atmosferă de 5% CO<sub>2</sub>.

Ajunse la o confluență de 80%, celulele H9c2 au fost tripsinizate, însămânțate la o densitate celulară specifică pentru fiecare test și apoi expuse la o concentrație de glucoză normală (NG), concentrație mare de glucoză (HG; 33 mM d-glucoză) sau NG + 27,5 mM manitol (M; ca și control osmotic) timp de 48 de ore. Celulele au fost apoi tratate timp de 6 zile în mediu NG sau HG cu următoarele substanțe:

- crisină 0.399 mg/ml (CHR), dizolvată în NaCl;
- sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin 7.3 m/m% (SBECD), dizolvat în NaCl;
- sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin polymer 9,6 m/m% (SBECDP), dizolvat in NaCl;
- SBECD+0.095 mg/ml CHR (SBECD+CHR), dizolvat in NaCl;
- SBECDP+0.0836 mg/ml CHR (SBECDP+CHR), dizolvat in NaCl;
- DMSO 2.5% ca și vehicul pentru solubilizarea OTX008;
- OTX008 (0.75-1.25-2.50  $\mu$ M), dizolvat in DMSO 2.5%;
- OTX(2.5-1.25-0.75  $\mu$ M)-SBECD (2/a), dizolvat in NaCl;
- OTX(2.5-1.25-0.75  $\mu$ M)-SBECDP (2/b), dizolvat in NaCl;
- OTX(2.5-1.25-0.75  $\mu$ M)-SBECD-CHR (0.324 mg/ml) (2/a + CHR), dizolvat in NaCl;
- OTX(2.5-1.25-0.75  $\mu$ M)-SBECDP-CHR (0.399 mg/ml) (2/b + CHR), dizolvat in NaCl.

În timpul tratamentelor, celulele H9c2 au fost observate zilnic la microscopul optic. Au fost făcute trei experimente independente, fiecare efectuată în triplicat (N = 9).

##### I.1.2 Testul de viabilitate celulară

Celulele H9c2 au fost însămânțate la o densitate de  $1 \times 10^4$  celule/godeu în plăci cu 96 de godeuri, expuse la mediu NG, NG+M sau HG timp de 48 de ore și apoi tratate așa cum este descris mai sus.

La sfârșitul perioadei de expunere, la fiecare godeu s-a adăugat soluție de 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) (1:10 în mediu de cultură, 300 ul/godeu), incubat timp de 4 ore la 37°C și apoi îndepărtat. Fiecare godeu a fost spălat timp de 20 de minute cu izopropanol-HCl 0,2 N. Valorile densității optice (OD) au fost măsurate la 570 nm utilizând un cititor de plăci cu 96 de godeuri (iMark, Bio-Rad Laboratories, Italia).

### **1.1.3 Immunofluorescență**

Pentru analiza imunocitochimică, celulele H9c2 ( $25 \times 10^4$  celule/godeu) au fost însămânțate în plăci cu 24 de godeuri, expuse la mediu NG, NG+M sau HG timp de 48 de ore și apoi tratate așa cum este descris mai sus.

Celulele au fost fixate cu paraformaldehidă 4% și spălate cu soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) (AU-L0615 Aurogene, Italia). Apoi, pentru a inhiba legarea nespecifică a anticorpilor, celulele au fost incubate timp de 60 de minute în soluție de blocare cu 3% albumină serică bovină (BSA) (Sigma A7906) și 0,3% Triton X-100 (Sigma 93443) în PBS. Anticorpii primari au fost diluați în soluție de blocare (1% BSA, 0,1% Triton X-100) și lamele au fost incubate peste noapte la 4°C cu anticorpi primari Galectin 1 (Gal-1) (Cell Signaling 13888; diluție 1:200) și la NF- $\kappa$ B (Cell Signaling 6956; diluție 1:500). Anticorpi secundari marcați cu fluorescent anti-iepure (Invitrogen 11008; diluție 1:1000) și anti-șoarece (Invitrogen Technologies A10037; diluție 1:1000) au fost utilizați pentru a localiza antigenele specifice în fiecare lamă. Celulele au fost contracolorate și montate cu mediu de montare antifade VECTASHIELD cu 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Novus Biologicals H-1200-NB). Lamele marcate fluorescent au fost observate cu un microscop cu fluorescență (Leica, Wetzlar, Germania) și cu un microscop confocal cu fluorescență (LSM 710, Zeiss, Oberkochen, Germania). Imaginile de imunofluorescență au fost analizate cu software-ul Leica FW4000 (Leica, Wetzlar, Germania) și cu software-ul Zen Zeiss (Zeiss, Oberkochen, Germania). Procentul de celule pozitive din fiecare câmp de microscop a fost calculat prin numărul de celule pozitive (verzi sau roșii) a 400 de celule în patru câmpuri diferite de microscop pentru fiecare tratament, luând în considerare numai celulele contracolorate DAPI (albastru) ca profile pozitive. Datele au fost raportate ca procent mediu de celule pozitive / total de celule numărate  $\pm$  abatere standard (SD).

### **1.1.4 Evaluarea acumulării speciilor reactive de oxigen (ROS)**

Nivelurile de ROS au fost detectate prin conversia probei fluorescente 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) în dichlorofluorescein (DFC) foarte fluorescent în interiorul celulelor prin acțiunea ROS. Celulele H9c2 au fost însămânțate în plăci cu 6 godeuri ( $7 \times 10^4$  celule/godeu), expuse la mediu NG, NG+M sau HG timp de 48 de ore și apoi tratate așa cum este descris mai sus. La sfârșitul perioadei de stimulare, celulele au fost încărcate cu 20  $\mu$ M DCFH-DA în mediu cu 5% FBS la 37°C timp de 30 min, apoi au fost tripsinizate. Producția totală de ROS intracelular a fost măsurată la un fluorimetru la o excitație de 485 nm și o emisie de 530 nm. Celulele au fost expuse la mediu 5% FBS fără DCFH-DA ca control negativ (CTR-) sau incubate cu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ M) 30 min înainte de tripsinizare ca și control pozitiv (CTR+).

### **1.1.5 qRT-PCR**

ARN-ul total a fost izolat din lizatele H9c2 conform protocolului kitului miRNeasy Mini (Qiagen, 217004). Concentrația și puritatea ARN au fost determinate utilizând spectrofotometrul NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific). Contaminarea ADN-ului genomic (gDNA) au fost eliminate din probele de ARN înainte de etapa de transcriere inversă (RT), efectuată pe sistemul Gene AMP PCR System 9700 (Applied Biosystems) utilizând kitul QuantiTect Reverse Transcription (205311,

Qiagen), conform protocolului. „Transcriere inversă cu eliminarea ADN-ului genomic pentru PCR cantitativă, în timp real”. Pasul final pentru analiza Real Time PCR (qPCR) a fost efectuat în triplicate la CFX96 Real-time System C1000 Touch Thermal Cyclers (BIORAD). Aceasta a fost realizată conform protocolului „RT-PCR în două etape (Protocol standard)”, utilizând kit-ul QuantiTect SYBR Green PCR (204143, Qiagen) și teste specifice QuantiTect Primer (249900, Qiagen) pentru Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) (QT00187796, Qiagen), Transforming Growth Factor  $\beta$  receptor 1 (TGF- $\beta$ R1) (QT00190953, Qiagen), Transforming Growth Factor  $\beta$  receptor 2 (TGF- $\beta$ R2) (QT01800596, Qiagen, Qiagen-Activated Protein Mito Erk1) Kinaza 3, MAPK3 - QT00176330) și genele Erk2 (sau Protein Kinaza 1 activată de mitogen, MAPK1 - QT00190379). Cuantificarea relativă a expresiei genelor a fost realizată prin utilizarea metodei  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , prin utilizarea GAPDH (QT01082004) ca genă de control.

### **I.1.6 Testul (ELISA)**

Testele ELISA au fost efectuate pentru a analiza nivelurile celulare ale protein kinazei activate de mitogen p38 (MAPK, fosforilat/total) (RayBiotech, CBEL-P38-1), SMAD 2 (SMAD2, fosforilat/total) (LSBio, LS-F1057-1) și SMAD 4 (SMAD4, total) (LSBio, LS-F2315-1).

### **I.1.7 Western Blotting**

După tripsinizare, celulele H9c2 au fost resuspendate în tampon RIPA (Sigma, R0278) care conține inhibitori de protează și fosfatază. După centrifugarea probelor la 12.000"rpm timp de 10"min la 4°C, nivelurile de proteine din supernatante au fost determinate prin Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, 500-0006). Proteinele au fost apoi separate pe 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) și apoi electrotransferate pe membrane de polyvinylidene difluoride (PVDF) (Merck Millipore, IPFL10100). Acestea au fost blocate timp de 1 oră cu o soluție salină tamponată cu 5% non-fat dry milk /Tris (Euroclone, EMR180500; Cell Signaling 12498) înainte de incubarea la 4°C peste noapte cu următorii anticorpi primari de șobolan: anti-Gal-1 (Invitrogen, PA595213; diluție 1:500, la iepure) și anti-Nf-kB (Cell Signaling 6956S; diluție 1:1000, la șoarece). Anticorpul secundar conjugat cu peroxidază de hrean anti-iepure (Santa Cruz, sc-2004; diluție 1:5000) sau anti-șoarece (Santa Cruz, sc-2005; diluție 1:5000) au fost utilizați pentru a incubă bloturile la temperatura camerei timp de 1 oră. Punctele imunoreactive au fost vizualizate printr-un sistem de chemiluminiscență îmbunătățit (ThermoFisher, 35055), apoi cuantificate cu software-ul VisionWorks Life Science de achiziție și analiză a imaginilor (UVP, Upland, CA, SUA) și exprimate ca unități densitometrice (DU). Nivelurile de proteină Gal-1 și NFkB au fost normalizate prin utilizarea nivelurilor de proteină  $\beta$ -actină (Santa Cruz sc-47778, diluție 1:1000).

### **I.1.8 Analiza statistică**

Rezultatele sunt raportate ca medie  $\pm$  abatere standard (SD). Semnificația statistică a fost determinată utilizând analiza unidirecțională a varianței (ANOVA) urmată de testul de comparație al lui Tukey. O valoare P mai mică de 0,05 a fost considerată semnificativă statistic.

## **Rezultate**

### **I.2.1 Viabilitatea celulară**

Viabilitatea celulelor H9c2 nu a fost scăzută în mediul NG sau HG prin expunerea la CHR, SBECD, SBECDP, SBECD+CHR, SBECDP+CHR, DMSO sau M. În plus, toate dozele de OTX testate (2,5-1,25-0,75  $\mu$ M) singure și în combinație cu SBECD/SBECDP (2/a, 2/b) sau SBECD/SBECDP+CHR (2/a+CHR, 2/b+CHR) nu au redus viabilitatea celulară în condiții de NG. Mai mult, ele conduc la o îmbunătățire

semnificativă a viabilității celulelor H9c2 expuse la HG. În special, OTX singur și în combinație cu SBECD/SBECDP (2/a, 2/b) a crescut semnificativ viabilitatea celulară la toate cele 3 doze analizate. OTX combinat cu SBECD/SBECDP+CHR (2/a+CHR, 2/b+CHR) a fost eficient începând de la 1,25 pM. Interesant, doza maximă de OTX (2,5 μM) a fost mai eficientă în creșterea viabilității celulelor atunci când a fost combinată cu SBECD/SBECDP (2/a, 2/b) sau SBECD+CHR (2/a+CHR) (Figura 1).

### **1.2.2 Morfologia celulară**

H9c2 cell morphology was not affected in NG or HG by the exposition to CHR, SBECD, SBECDP, SBECD+CHR, SBECDP+CHR, DMSO or M. Moreover, all the doses of OTX 2.5 μM alone and in combination with SBECD/SBECDP (2/a, 2/b) or SBECD/SBECDP+CHR (2/a+CHR, 2/b+CHR) did not alter cell viability in NG conditions (Figure 2A).

While H9c2 cells in HG showed marked edge blurring, shedding and shrunken, OTX alone and in combination with SBECD/SBECDP (2/a, 2/b) or with SBECD/SBECDP+CHR (2/a+CHR, 2/b+CHR) was able to reduce the cell shedding and shrunken, by partially restoring the elongated cardiomyocytes morphology (Figure 2B).

Morfologia celulelor H9c2 nu a fost afectată în NG sau HG prin expunerea la CHR, SBECD, SBECDP, SBECD+CHR, SBECDP+CHR, DMSO sau M. În plus, toate dozele de OTX 2,5 μM singure și în combinație cu SBECD/SBECDP (2/a, 2/b) sau SBECD/SBECDP+CHR (2/a+CHR, 2/b+CHR) nu au modificat viabilitatea celulară în condiții NG (Figura 2A).

În timp ce celulele H9c2 din HG au prezentat iregularități ale formei celulare, și micșorarea dimensiunilor, chiar și densității celulare, OTX singur și în combinație cu SBECD/SBECDP (2/a, 2/b) sau cu SBECD/SBECDP+CHR (2/a+CHR, 2/b+CHR) a reușit să reducă pierderea și micșorarea celulelor, prin restabilirea parțială a morfologiei cardiomiocitelor la forma alungită tipică (Figura 2B).

### **1.2.3 Calea de semnalizare TGF-β1**

Nivelurile de ARNm TGF-β1 au fost semnificativ up-regulate prin expunerea la HG în celulele H9c2, în timp ce s-a înregistrat o reducere semnificativă a expresiei genice în cazul celulelor H9c2 expuse la HG și tratate cu CHR, SBECD/SBECDP (2/a, 2/b) sau SBECD/SBECDP+CHR (2/a+CHR, 2/b+CHR). TGF-β1 a fost redus și în celulele expuse la HG și tratate cu OTX singur, 2/a și 2/b începând de la 0,75 μM, în timp ce a fost necesară o doză de 2/a+CHR și 2/b+CHR care să conțină OTX 1,25 pM pentru a reduce nivelurile de ARNm TGF-β1 în celulele HG. Reducerea maximă a TGF-β1 a fost observată în celulele HG expuse la 2/a, 2/b și 2/a+CHR care conține OTX 2,5 pM (Figura 3). Aceeași tendință a fost detectată pentru nivelurile de ARNm TGF-β1 (Figura 4) și TGF-β2 (Figura 5).

### **1.2.4. SMAD2 și SMAD4**

Ambele nivele de SMAD2 și SMAD4 nu au fost afectate de CHR, SBECD, SBECDP, SBECD+CHR, SBECDP+CHR, DMSO sau M în ambele NG sau HG (Figura 6, 7). Contrar, expunerea la HG crește în mod semnificativ nivelele de SMAD2 and SMAD4. Acestea sunt reduse în urma tratamentului cu OTX singur, 2/a and 2/b începând de la 0.75 μM OTX, în timp ce a fost necesară o doză de 2/a+CHR și 2/b+CHR care conține OTX 1,25 pM pentru a scădea nivelurile SMAD2 și SMAD4 în celulele H9c2 expuse la HG. Cea mai mare reducere a fost obținută cu 2/a, 2/b și 2/a+CHR care conține OTX 2,5 pM (Figura 6, 7).

### **I.2.5 p38 MAPK si Erk1/2**

Nivelurile P-p38/p38 MAPK, Erk1 și Erk 2 nu au fost afectate de CHR, SBECD, SBECDP, SBECD+CHR, SBECDP+CHR, DMSO sau M atât în NG, cât și în HG (Figura 8, 9, 10). Dimpotrivă, expunerea la HG a crescut semnificativ nivelurile acestora. Acestea au fost reduse numai de OTX, 2/a și 2/b începând de la 0,75 μM, în timp ce a fost necesară o doză de 2/a+CHR și 2/b+CHR care să conțină OTX 1,25 μM pentru a fi eficientă în reducerea P-p38/ p38 MAPK, Erk1 și Erk 2 cresc în celulele HG. S-a observat o scădere marcată a p38 MAPK, Erk1/2 cu 2/a, 2/b, 2/a+CHR care conține OTX 2,5 pM (Figura 8, 9, 10).

### **I.2.6 Producția de ROS**

Nivelurile ROS în celulele NG H9c2 nu au fost crescute în urma tratamentului cu CHR, SBECD, SBECDP, SBECD+CHR, SBECDP+CHR, DMSO sau M (Figura 11A, C). Dimpotrivă, expunerea HG a crescut semnificativ conținutul celular de ROS. Acest lucru a fost redus semnificativ numai de OTX, 2/a și 2/b începând de la 0,75 pM, în timp ce a fost necesară o doză de 2/a+CHR și 2/b+CHR care să conțină OTX 1,25 pM pentru a reduce nivelurile de ROS în celulele HG. 2/a, 2/b și 2/a+CHR care conțin OTX 2,5 pM au fost cei mai eficienți compuși pentru a reduce nivelurile de ROS în celulele HG (Figura 11B, C).

### **I. 2.7 Nivelele de Gal-1 și NF-kB (doar pentru OTX)**

A significant increase of Gal-1 and NF-kB p65 positive cells was evident in H9c2 cardiomyocytes exposed to HG, compared to NG and M groups (Figure 12 and 13). H9c2 cells exposed to HG and stimulated with OTX008 1.25 μM and 2.5 μM exhibited a significant reduction in Gal-1 and NF-kB p65 positive stained cells (Figure 12 and 13).

O creștere semnificativă a celulelor pozitive Gal-1 și NF-kB p65 a fost evidentă în cardiomiocitele H9c2 expuse la HG, în comparație cu grupurile NG și M (Figura 12 și 13). Celulele H9c2 expuse la HG și stimulate cu OTX008 1,25 pM și 2,5 pM au prezentat o reducere semnificativă a celulelor imuno pozitive Gal-1 și NF-kB p65 (Figura 12 și 13).

## II. Evaluarea pe culturi de celule epiteliale retiniene (ARPE-19)

### Material si metode

#### II.1.1 Cultura celulară ARPE-19

Celulele umane ARPE-19, obținute de la American Type Culture Collection (ATCC), au fost cultivate la 37 °C și 5% CO<sub>2</sub> în mediu Eagle modificat Dulbecco F12 (DMEM/F12, Aurogene AU-L0093), cu o concentrație de glucoză de 5 mM (Life Technologies A24940-01). Mediul a fost suplimentat cu 10% ser fetal bovin inactivat termic (FBS) (AU-S181H Aurogene, Italia), 1% soluție de penicilină/streptomicina (P/S) (Aurogene Au-L0022), 1% L-Glutamină (L. -Glu), Hepes 5 mM (Thermo Fisher 15630080) și 7,5% NaHCO<sub>3</sub> (Thermo Fischer 25080094). La două zile după însămânțare, celulele ARPE-19 au fost împărțite și placate la diferite densități celulare pentru fiecare test. Celulele au fost apoi expuse în primele 3 zile la 37 °C și 5% CO<sub>2</sub> la 5 mM d-glucoză (NG); 35 mM d-glucoză (HG) și 30 mM manitol în NG (NG + M) (Sigma 69-65-8) ca martor negativ. Apoi, după 72 de ore de stimulare NG, NG+M sau HG, OTX008 (S6949, Selleckchem, Houston, TX 77014 USA) dizolvat în 0,1% g/v dimetil sulfoxid (DMSO) sau DMSO 0,1% a fost adăugat zilnic în mediu celular proaspăt (NG sau HG) până în ziua 9, după cum urmează:

- 5 mM d-glucoză + vehicul (NG);
- 5 mM d- glucoză + OTX008 10 μM (NG + OTX10);
- 35 mM d- glucoză + vehicul (HG);
- 35 mM d- glucoză + OTX008 2.5 μM (OTX 2.5);
- 35 mM d- glucoză + OTX008 5 μM (OTX 5);
- 35 mM d- glucoză + OTX008 10 μM (OTX 10).

Pentru observarea zilnică a morfologiei ARPE-19 cu microscopul optic (Leica DMI1, Mannheim, Germania), celulele au fost însămânțate în plăci cu 6 godeuri la o densitate de  $2 \times 10^5$  celule/godeu, precum și pentru izolarea proteinelor și ARN. După perioada de stimulare, celulele și supernatantele au fost colectate și conservate pentru analizele ulterioare. Pentru fiecare test, au fost efectuate trei experimente independente, fiecare făcut în trei exemplare.

#### II.1.2 Testul de viabilitate celulară

Viabilitatea celulară a fost măsurată prin testul 3-(4,5-dimetiltiazol2-il)-2,5-difeniltetrazoliu (MTT). Celulele ARPE-19 ( $6 \times 10^3$  celule/godeu) au fost însămânțate în plăci cu 96 de godeuri și expuse la NG sau HG, cu sau fără OTX, așa cum s-a descris anterior. La sfârșitul perioadei de stimulare, soluția MTT (1:10 în mediu de cultură, 300 uL/godeu) a fost adăugată în fiecare godeu, incubată timp de 4 ore la 37 °C și apoi îndepărtată. Fiecare godeu a fost apoi spălat timp de 20 de minute cu izopropanol-HCl 0,2 N. Valorile densității optice (OD) au fost măsurate la 570 nm folosind un cititor de plăci cu 96 de godeuri (iMark, Bio-Rad Laboratories, CA, SUA).

#### II.1.3 Analiza ROS

Nivelurile de ROS au fost detectate prin conversia probei fluorescente 2',7'-diacetat de diclorodihidrofluoresceină (DCFH-DA) în diacetat de diclorofluoresceină (DFC) foarte fluorescent în interiorul celulelor de către ROS. ARPE-19 au fost însămânțate în plăci cu 96 de godeuri ( $5 \times 10^3$  celule/godeu) și expuse la NG sau HG, cu sau fără OTX. La sfârșitul perioadei de stimulare, celulele au fost încărcate cu 20 pM DCFH-DA în mediu cu 5% FBS la 37 °C timp de 30 min și apoi au fost tripsinizate. Producția totală de ROS intracelular a fost măsurată cu un cititor de plăci fluorometrice

la o excitație de 485 nm și o emisie de 530 nm. Ambele tipuri de celule au fost expuse la mediu 5% FBS fără DCFH-DA ca și control negativ (CTR-) sau incubate cu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 pM) 30 de minute înainte de tripsinizare ca și control pozitiv (CTR+).

#### **II.1.4 Immunofluorescență**

Pentru analiza imunocitochimică, celulele ARPE-19 (3 × 10<sup>3</sup> celule/godeu) au fost însămânțate în plăci cu 24 de godeuri și expuse la NG sau HG cu sau fără OTX, așa cum s-a descris anterior. Celulele au fost fixate cu paraformaldehidă 4% și spălate cu soluție salină PBS (AU-L0615 Aurogene, Italia). Apoi, pentru a inhiba legarea nespecifică a anticorpilor, celulele au fost incubate timp de 60 de minute în soluție de blocare cu 3% albumină serică bovină (BSA) (Sigma A7906) și 0,3% Triton X-100 (Sigma 93443) în PBS. Anticorpii primari au fost diluați în tampon de blocare PBS (1% BSA, 0,1% Triton X-100), iar plăcile au fost incubate peste noapte la 4 °C în anticorpi primari Gal-1 (Thermo Fisher PA5-95213; 0,7 μg/mL) și la NF-κB p65 (Cell Signaling 6956S; diluție 1:500). Au fost utilizați anticorpi secundari anti-iepure marcați cu fluorescent (Invitrogen 11.008; diluție 1:1000) și anti-soarece (Life Technologies A21202; diluție 1:1000) pentru a localiza antigenele specifice în fiecare godeu. Celulele au fost contracolorate și montate cu mediu de montare antifade VECTASHIELD cu 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Novus Biologicals H-1200-NB). Lamele marcate fluorescent au fost vizualizate cu un microscop cu fluorescență (Leica, Wetzlar, Germania) și cu un microscop confocal cu fluorescență (LSM 710, Zeiss, Oberkochen, Germania). Imaginile de imunofluorescență au fost analizate cu software-ul Leica FW4000 (Leica, Wetzlar, Germania) și cu software-ul Zen Zeiss (Zeiss, Oberkochen, Germania). Procentul de celule pozitive din fiecare câmp microscopic a fost calculat prin numărul de celule pozitive de 350 de celule în patru câmpuri de microscop diferite pentru fiecare tratament, luând în considerare numai celulele contracolorate DAPI ca profile pozitive. Datele au fost raportate ca procent mediu de celule pozitive/total de celule numărate ± abatere standard (SD).

#### **II.1.5 Testul *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)***

Testele ELISA au fost utilizate pentru a analiza nivelele celulare de p38 MAPK (phosphorylat/total) (RayBiotech, CBEL-P38-1), SMAD2 (LSBio, LS-F1057-1) și SMAD4 (LSBio, LS-F2315-1).

#### **II.1.6 Western Blotting**

After trypsinization, ARPE-19 cells were resuspended in RIPA buffer (Sigma, R0278) containing protease and phosphatase inhibitors to isolate protein content. After centrifuging samples at 12,000 rpm for 10 min at 4 °C, protein levels in the supernatants were determined by using a Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, 500-0006). For Western blotting analysis, proteins were separated on a 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and then electrotransferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Merck Millipore, IPFL10100). Membranes were blocked for 1 h with a 5% non-fat dry milk/Tris-buffered saline (TBS) solution (Euroclone, EMR180500; Cell Signaling 12498) before the incubation at 4 °C over-night with the following human primary antibodies: anti-Gal-1 (Thermo Fisher PA5-95213; 0.3 μg/mL in 3% blocking solution, to rabbit) and anti-NF-κB p65 (Cell Signaling 6956S; dilution 1:1000 in 3% blocking solution, to mouse). Horseradish peroxidase-conjugated secondary anti-rabbit (Santa Cruz, sc-2004; dilution 1:5000 in 3% blocking solution) or anti-mouse (Santa Cruz, sc-2005; dilution 1:5000 in 3% blocking solution) antibodies were used to incubate the blots at room temperature for 1 h. Immunoreactive bands were visualized by using an enhanced chemiluminescence system (Thermo Fisher, 35055), then quantified with VisionWorks Life Science Image Acquisition and Analysis software (UVP, Upland, CA, USA) and expressed as densitometric units (DU). Gal-1, NF-κB, and IκB-

$\beta$  protein levels were normalized by using  $\beta$ -actin protein levels (Santa Cruz sc-47778, dilution 1:1000 in 3% blocking solution, to mouse).

După tripsinizare, celulele ARPE-19 au fost resuspendate în tampon RIPA (Sigma, R0278) care conține inhibitori de protează și fosfatază pentru a izola conținutul de proteine. După centrifugarea probelor la 12.000 rpm timp de 10 min la 4°C, nivelurile de proteine din supernatante au fost determinate utilizând Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, 500-0006). Pentru analiza Western blotting, proteinele au fost separate pe un gel de electroforeză de poliacrilamidă cu dodecil sulfat de sodiu 10% (SDS-PAGE) și apoi electrotransferate pe membrane de difluorură de poliviniliden (PVDF) (Merck Millipore, IPFL10100). Membranele au fost blocate timp de 1 oră cu o soluție de lapte uscat fără grăsimi/soluție salină tamponată Tris (TBS) (Euroclone, EMR180500; Cell Signaling 12498) înainte de incubarea la 4 °C peste noapte cu următorii anticorpi umani primari: anti-Gal-1 (Thermo Fisher PA5-95213; 0,3  $\mu$ g/mL în soluție de blocare 3%, la iepure) și anti-NF- $\kappa$ B p65 (Cell Signaling 6956S; diluție 1:1000 în soluție de blocare 3%, la șoarece) . Au fost utilizați anticorpi anti- iepure secundar conjugați cu peroxidază de hrean (Santa Cruz, sc-2004; diluție 1:5000 în soluție de blocare 3%) sau anti-șoarece (Santa Cruz, sc-2005; diluție 1:5000 în soluție de blocare 3%) incubat la temperatura camerei timp de 1 oră. Benzile imunoreactive au fost vizualizate utilizând un sistem de chemiluminiscență îmbunătățit (Thermo Fisher, 35055), apoi cuantificate cu software-ul VisionWorks Life Science de achiziție și analiză a imaginilor (UVP, Upland, CA, SUA) și exprimate ca unități densitometrice (DU). Nivelurile de proteină Gal-1, NF- $\kappa$ B și I $\kappa$ B- $\beta$  au fost normalizate prin utilizarea nivelurilor de proteină  $\beta$ -actină (Santa Cruz sc-47778, diluție 1:1000 în soluție de blocare 3%, la șoarece).

### **II.1.7 Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR (qRT-PCR)**

Total RNA was isolated from ARPE-19 lysates following the miRNeasy Mini kit (Qiagen, 217004). RNA concentration and purity was determined by using the NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Genomic DNA (gDNA) contaminations were eliminated from RNA samples before the Reverse Transcription (RT) step, carried out on the Gene AMP PCR System 9700 (Applied Biosystems) by using the QuantiTect Reverse Transcription kit (205311, Qiagen), according to the protocol "Reverse Transcription with Elimination of Genomic DNA for Quantitative, Real-Time PCR". The final step for Real Time PCR (qPCR) analysis was carried out in triplicate on the CFX96 Real-time System C1000 Touch Thermal Cycler (Biorad). This was performed according to the protocol "Two-Step RT-PCR (Standard Protocol)", by using the QuantiTect SYBR Green PCR Kit (204143, Qiagen) and specific QuantiTect Primer Assays (249900, Qiagen) for each gene tested [TGF- $\beta$ 1: QT00000728; TGF- $\beta$ R1: QT00083412; TGF- $\beta$ R2: QT00014350; Erk1 (or Mitogen-Activated Protein Kinase 3, MAPK3): QT02589321; Erk2 (or Mitogen-Activated Protein Kinase 1, MAPK1): QT00065933]. Relative quantization of gene expression was performed by using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method, by using GAPDH (QT00079247) as housekeeping control gene.

ARN-ul total a fost izolat din lizatele ARPE-19 în urma trusei miRNeasy Mini (Qiagen, 217004). Concentrația și puritatea ARN au fost determinate utilizând spectrofotometrul NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific). Contaminarea ADN-ului genomic (gDNA) au fost eliminate din probele de ARN înainte de etapa de transcriere inversă (RT), efectuată pe sistemul Gene AMP PCR System 9700 (Applied Biosystems) utilizând kitul QuantiTect Reverse Transcription (205311, Qiagen), conform protocolului "Reverse Transcription with Elimination of Genomic DNA for Quantitative, Real-Time PCR". Etapa finală pentru analiza PCR în timp real (qPCR) a fost efectuată în triplicat pe CFX96 Real-time System C1000 Touch Thermal Cycler (Biorad). Aceasta a fost realizată conform protocolului „Two-Step RT-PCR (Standard Protocol)”, utilizând kit-ul QuantiTect SYBR Green PCR (204143, Qiagen) și teste specifice QuantiTect Primer (249900, Qiagen) pentru fiecare genă testată [TGF-  $\beta$ 1:



QT00000728; TGF-pR1: QT00083412; TGF-pR2: QT00014350; Erk1 (sau Protein Kinaza 3 activată de mitogen, MAPK3): QT02589321; Erk2 (sau Protein Kinaza 1 activată de mitogen, MAPK1): QT00065933]. Cuantificarea relativă a expresiei genelor a fost realizată prin utilizarea metodei  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , prin utilizarea GAPDH (QT00079247) ca genă de control.

### **II.1.8 Analiza statistică**

Rezultatele sunt raportate ca media  $\pm$  SD a trei experimente independente, fiecare realizat în triplicat. Semnificația statistică a fost determinată utilizând analiza unidirecțională a varianței (ANOVA), urmată de testul de comparație al lui Tukey, folosind GraphPad Prism 6.0. O valoare p mai mică de 0,05 a fost considerată semnificativă pentru a respinge ipoteza nulă.

## **II.2. REZULTATE**

### **II.2.1 Viabilitatea celulară și morfologie**

The exposition of ARPE-19 cells to high glucose (35 mM, HG) significantly altered their morphology: they were elongated under normal glucose (5 mM, NG), appearing densely packed in colonies, and meanwhile became irregular and shrunken in HG, characterized by dissociation of cell colonies. HG also reduced the percentage of cell viability compared to cells exposed to NG alone or with mannitol 30 mM. HG cells exhibited a significant increment in cell viability when stimulated with OTX008 5  $\mu$ M and 10  $\mu$ M (Figure 14).

Expunerea celulelor ARPE-19 la concentrații ridicate de glucoză (35 mM, HG) le-a modificat semnificativ morfologia: alungite sub glucoză normală (5 mM, NG), apărând dens împachetate în colonii, respectiv neregulate și micșorate în HG, caracterizate prin disocierea coloniilor celulare. HG a redus, de asemenea, procentul de viabilitate celulară în comparație cu celulele expuse la NG singur sau cu manitol 30 mM. Celulele HG au prezentat o creștere semnificativă a viabilității celulare atunci când au fost stimulate cu OTX008 5  $\mu$ M și 10  $\mu$ M (Figura 14).

### **II.2.2 Expresia Gal-1**

ARPE-19 exposed to HG showed a marked increment in Gal-1-positive cells, which was absent in ARPE-19 cells exposed to NG alone or with M. HG cells stimulated with OTX008 5  $\mu$ M and 10  $\mu$ M exhibited a significant reduction in Gal-1-positive stained cells (Figure 15). Accordingly, Gal-1 protein levels were significantly increased in HG cells, while they were reduced in HG cells exposed to OTX008 5  $\mu$ M and 10  $\mu$ M (Figure 15). OTX alone did not modify the Gal-1 expression in NG-treated ARPE-19 even at the highest concentration of 10  $\mu$ M.

Celulele ARPE-19 expuse la HG a arătat o creștere marcată a celulelor Gal-1-pozitive, care a fost absentă în celulele ARPE-19 expuse doar la NG sau cu M. Celulele HG stimulate cu OTX008 5  $\mu$ M și 10  $\mu$ M au prezentat o reducere semnificativă a Gal -1-celule colorate pozitive (Figura 15). În consecință, nivelurile de proteină Gal-1 au fost semnificativ crescute în celulele HG, în timp ce au fost reduse în celulele HG expuse la OTX008 5  $\mu$ M și 10  $\mu$ M (Figura 15). OTX singur nu a modificat expresia Gal-1 în ARPE-19 tratat cu NG, chiar și la cea mai mare concentrație de 10  $\mu$ M.

### **II.2.3 Calea de semnalizare TGF- $\beta$ 1 / SMAD**

ARPE-19 cells exhibited a significant up-regulation of TGF- $\beta$ 1, Transforming Growth Factor  $\beta$  receptor 1 and Transforming Growth Factor  $\beta$  receptor 2 mRNA levels (Figure 16A). Similarly, the stimulation of ARPE-19 cells with HG increased SMAD2 and SMAD4 (Figure 16B). Conversely, ARPE-19 cells exposed to 5  $\mu$ M and 10  $\mu$ M OTX008 treatments exhibited a significant reduction of TGF-

$\beta 1$ , TGF- $\beta$ R1 and TGF- $\beta$ R2 (Figure 16A). In line with this reduction, also SMAD2 and SMAD4 levels were significantly decreased by OTX008 5  $\mu$ M and OTX008 10  $\mu$ M (Figure 16B).

Celulele ARPE-19 au prezentat o suprareglare semnificativă a nivelurilor de ARNm TGF-  $\beta$ 1, Transforming Growth Factor  $\beta$  receptorul 1 (TGF-  $\beta$ 1R1) și Transforming Growth Factor  $\beta$  receptor 2 (TGF-  $\beta$ 1R2) (Figura 16A). În mod similar, stimularea celulelor ARPE-19 cu HG a crescut SMAD2 și SMAD4 (Figura 16B). În schimb, celulele ARPE-19 expuse la tratamente OTX008 cu 5  $\mu$ M și 10  $\mu$ M au prezentat o reducere semnificativă a TGF-  $\beta$ 1, TGF-  $\beta$ R1 și TGF-  $\beta$ R2 (Figura 16A). În conformitate cu această reducere, și nivelurile SMAD2 și SMAD4 au fost semnificativ scăzute de OTX008 5  $\mu$ M și OTX008 10  $\mu$ M (Figura 16B).

#### **II.2.4 p38 MAPK, ERK1/2**

Both Erk1 and Erk2 mRNA levels were significantly increased in ARPE-19 cells exposed HG and reduced in HG cells treated with 5  $\mu$ M and 10  $\mu$ M OTX008 (Figure 17). Similarly, ARPE-19 cells exposed to HG showed a significant increase of P-p38 / p38 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) ratio, compared to cells exposed to NG and to NG+M. The ratio was significantly de-creased by OTX008 treatment at the doses of 5  $\mu$ M and 10  $\mu$ M (Figure 17).

Atât nivelurile de ARNm Erk1 cât și Erk2 au fost semnificativ crescute în celulele ARPE-19 expuse HG și reduse în celulele HG tratate cu 5  $\mu$ M și 10  $\mu$ M OTX008 (Figura 17). În mod similar, celulele ARPE-19 expuse la HG au arătat o creștere semnificativă a raportului protein kinazei activate de mitogen (MAPK) P-p38 / p38, în comparație cu celulele expuse la NG și la NG+M. Raportul a fost semnificativ scăzut prin tratamentul cu OTX008 la doze de 5  $\mu$ M și 10  $\mu$ M (Figura 17).

#### **II.2.5 Nivelele de NF-kB p65 si ROS**

Nivelele crescute de TGF- $\beta$ 1 au fost paralele cu un procent mai mare de NF-kB p65-pozitive în celulele HG. O reducere semnificativă a celulelor NF-kB p65-pozitive și a nivelurilor de proteine a fost observată în celulele HG tratate cu OTX008 5  $\mu$ M și 10  $\mu$ M (Figura 18

În consecință, nivelurile speciilor reactive de oxigen (ROS) au fost semnificativ crescute în celulele HG, în timp ce au fost reduse semnificativ prin tratamentele cu OTX008 la doze de 5  $\mu$ M și 10  $\mu$ M (Figura 19 A, B).

## Activitatea II. Animale si protocolul experimental in vivo

Experimentul a fost realizat pe șoareci adulți CD1. Aceștia provin din Biobaza Universității de Vest "Vasile Goldiș" din Arad care este autorizată pentru creșterea animalelor de laborator în scop de cercetare (aviz ANSVSA 862/05.04.2016) și unde animalele sunt cazate în condiții standard de crescătorie, conform normelor naționale și europene în vigoare.

Șoarecilor li s-a indus diabet printr-o singură injecție intraperitoneală cu STZ (streptozotocină) (102 mg/kg corp) proaspăt dizolvată în tampon citrat de 50mM (pH 4.5). Glicemia *à jeun* a fost măsurată la 2 săptămâni după injecția de STZ. Șoarecii cu valori ale glicemiei mai mari de 200 mg/dL în sânge au fost considerați șoareci cu diabet zaharat de tip 2 și au fost ținute timp de douăzeci de săptămâni până la începerea tratamentelor.

Șoarecii cu diabet cronic, precum și 10 animale sănătoase de aceeași vârstă au fost distribuiți aleator în 7 loturi experimentale: Lotul 1 – lotul control sănătos; Lotul 2 – lotul control diabetic sacrificat la 20 săptămâni; Lotul 3 – lotul OTX-SBECd, în cadrul căruia animalele cu diabet cronic de 20 săptămâni au primit 5 mg/kg OTX complexat cu SBECd pentru o solubilizare ușoară în ser fiziologic (4 injecții IP în 2 săptămâni); Lotul 4 – lotul OTX-SBECd-CHR, în cadrul căruia animalele cu diabet cronic de 20 săptămâni au primit 5 mg/kg OTX complexat cu SBECd și crisină (4 injecții IP în 2 săptămâni); Lotul 5 – SBECd-CHR, în cadrul căruia animalele cu diabet cronic de 20 săptămâni au primit CHR complexată cu SBECd în cantitate echivalentă cu lotul 5 (4 injecții IP în 2 săptămâni); Lotul 6 – SBECd, în cadrul căruia animalele cu diabet cronic de 20 săptămâni au primit SBECd necomplexat, adică agentul de solubilizare al OTX și CHR (4 injecții IP în 2 săptămâni). Tratamentele au fost aplicate de 2 ori/săptămână timp de 2 săptămâni prin administrare intraperitoneală.

În total au fost utilizați 70 de șoareci CD1 (7 loturi x 10 animale = 70 șoareci).

Recoltarea probelor biologice a fost realizată după eutanasierea animalelor în vederea efectuării de analize biochimice, histologice/imunohistochimie, microscopie electronică și biologie moleculară. S-au recoltat ochii animalelor, ficatul, rinichii, inima, creierul și sânge.

## Activitatea III. Analize hematologice si biochimice

Sângele a fost recoltat în tuburi Eppendorf imediat după anestezia animalelor. Serul a fost separat prin centrifugare 10 minute la 3000 rpm și păstrat la -80°C până la sacrificarea tuturor loturilor. Determinarea glicemiei din sânge s-a realizat cu ajutorul unui glucometru, la începutul tratamentului pentru stabilirea șoarecilor diabetici care au intrat în loturile experimentale, precum și la finalul tratamentelor aplicate, înainte de sacrificare.

S-a determinat nivelul AST (TGO) – aspartataminotransferaza, ALT (TGP) - alaninaminotransferaza și CREA – creatinină din toate probele cu ajutorul unui analizor de biochimie Mindray BS-120 (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd., Nanshan, Shenzhen, China).

Toti șoarecii diabetici au prezentat valori ale glicemiei foarte mari (aprox. 600 mg/dl) la douăzeci de săptămâni după instalarea patologiei (glicemii mai mari de 200 mg/dl) (fig.20).

Valorile transaminazelor serice și ale creatininei au fost semnificativ mai mari la 20 de săptămâni de diabet cronic (fig.21). Tratamentele, cu excepția SBECd, au scăzut semnificativ valorile acestor indicatori biochimici.

## Activitatea IV. Diseminare

### Articole ISI:

1. **Anca Hermenean**, Daniela Oatis, Hildegard Herman, Alina Ciceu, Giovanbattista D'Amico, Maria Consiglia Trotta, Galectin 1—A Key Player between Tissue Repair and Fibrosis, *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23, 5548. <https://doi.org/10.3390/ijms23105548>

**Q1** BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY; *Rank in Category: 69 of 296*

*Impact factor: 6,208 (2021)*

2. Maria Consiglia Trotta, Francesco Petrillo, Carlo Gesualdo, Settimio Rossi, Alberto Della Corte, Judit Váradi, Ferenc Fenyvesi, Michele D'Amico, **Anca Hermenean**, Effects of the Calix[4]arene Derivative Compound OTX008 on High Glucose-Stimulated ARPE-19 Cells: Focus on Galectin-1/TGF- $\beta$ /EMT Pathway, *Molecules* **2022**, 27, 4785. <https://doi.org/10.3390/molecules27154785>

**Q2** BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY; *Rank in Category: 114 of 296*

*Impact factor: 4,927 (2021)*

3. Maria Consiglia Trotta†, Carlo Gesualdo†, Francesco Petrillo, Caterina Claudia Lepre, Alberto Della Corte, Giancuomo Cavasso, Giulia Maggiore, **Anca Hermenean**, Francesca Simonelli, Michele D'Amico and Settimio Rossi, Resolution of Inflammation in Retinal Disorders: Briefly the State, *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23(9), 4501; <https://doi.org/10.3390/ijms23094501>

**Q1** BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY; *Rank in Category: 69 of 296*

*Impact factor: 6,208 (2021)*

### ISI Meeting Abstracts

1. Hermenean, A ; Lepre, CC ; Varadi, J ; Fenyvesi, F ; Trotta, MC ; Galdiero, M; Cotoraci, C; D'Amico, M. Galectin-1 inhibition by OTX008 in high glucose-stimulated H9c2 cardiomyocytes as a new tool to regulate cardiovascular hypertrophy, FEBS OPEN BIO, vol.12, page 144-144, suppl.1, Special issue, Meeting abstract P-01.3-019, 2022

2. Trotta, MC; Petrillo, F; Gesualdo, C; Lepre, CC; Rossi, S; Della Corte, A; Varadi, J; Fenyvesi, F; D'Amico, M; Hermenean, A . The inhibition of Galectin-1 in high glucose-stimulated ARPE-19 cells by OTX008 through TGF-beta/EMT pathway. FEBS OPEN BIO Volume, vol.12, page 144-144, suppl.1, Special issue, Meeting abstract P-01.3-018, 2022

### Participare la conferințe internaționale

1. Hermenean, A ; Lepre, CC ; Varadi, J ; Fenyvesi, F ; Trotta, MC ; Galdiero, M; Cotoraci, C; D'Amico, M. Galectin-1 inhibition by OTX008 in high glucose-stimulated H9c2 cardiomyocytes as a new tool to regulate cardiovascular hypertrophy IUBMB-FEBS 2022, 9-14 July 2022, Lisbon, Portugal (poster)

2. Trotta, MC; Petrillo, F; Gesualdo, C; Lepre, CC; Rossi, S; Della Corte, A; Varadi, J; Fenyvesi, F; D'Amico, M; Hermenean, A . The inhibition of Galectin-1 in high glucose-stimulated ARPE-19

cells by OTX008 through TGF-beta/EMT pathway, IUBMB-FEBS 2022, 9-14 July 2022, Lisbon, Portugal (poster)

3. Trotta MC, Carlo Gesualdo, Caterina Claudia Lepre, Marina Russo, Francesco Petrillo, Settimio Rossi, Judit Váradi, Ferenc Fenyvesi, Michele D'Amico and Anca Hermenean, The inhibition of Galectin-1 : new insights for treatment of diabetic complications, International Pathology Conference of the Victor Babes Institute Bucharest, 17-19 november 2022 (prezentare orală)

### **Brevet Oficiul de Stat pentru invenții și mărci (OSIM)**

Cerere de brevet nr. 00327 din 14.06.2022 cu titlul "*Nanosistem supramolecular "drug delivey" de livrare a flavonoidelor pe bază de derivat de calix[4]arene (OTX008) și sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin (SBECD) și procedeu de obținere*", Publicat RO-BOPI 10/2022 din 28.10.2022

