

## Raportul Științific și Tehnic

**Nanosisteme de livrare a flavonoidelor cu ajutorul unor transportori supramoleculari  
care țintesc fibroza în complicațiile diabetului zaharat**

**PN-III-P4-ID-PCE-2020-1772**

### **Etapa de execuție III**

**Evaluarea *in vivo* a efectelor anti-fibrotice ale noului complex DDS/flavonoide pe un  
model experimental murin de diabet cronic**  
<https://proiecte.uvvg.ro/DDSFLAVODIA/>

Director proiect: Prof.dr. Anca Hermenean

Universitatea de Vest Vasile Goldiș din Arad

## Rezumat etapa III Evaluarea in vitro si in vivo a efectelor anti-fibrotice ale noului complex DDS/flavonoide

În etapa III s-a realizat evaluarea efectelor anti-fibrotice ale noului complex DDS/flavonoide pe un model experimental murin de diabet cronic. Au fost realizate analize histopatologice ale principalelor organe afectate de complicatiile diabetului cronic (ochi, rinichi, inima si ficat), evaluarea mecanismului molecular antifibrotic (TGF $\beta$ ), evaluarea remodelarii matricii extracelulare, precum si analiza ultrastructurala a acestor organe.

### **Rezultate Etapa planificate:**

- imagini microscopie optica, electronica (ochi, rinichi, inima si ficat); profilul expresiei genelor si proteinelor implicate in calea de semnalizare TGF $\beta$ ; profilul expresiei genelor si proteinelor TIMP si MMP 1, 3, 9, 13; 2 articole ISI; 1 cerere brevet; 2 conferinte; actualizare website

**Gradul de realizare:100%**

### **Obiective specifice si gradul de realizare:**

***Obiectivul 3. Evaluarea in vitro și validarea in vivo a efectelor antifibrotice ale noului DDS de flavonoide care vizează fibroza în complicațiile diabetului.***

A 3.1. Analize histopatologice (100%)

A 3.2. Evaluarea mecanismului molecular antifibrotic (100%)

A 3.3. Evaluarea remodelarii matricii extracelulare (100%)

A 3.4 Evaluarea efectelor antifibrotice prin analize de microscopie electronică (100%)

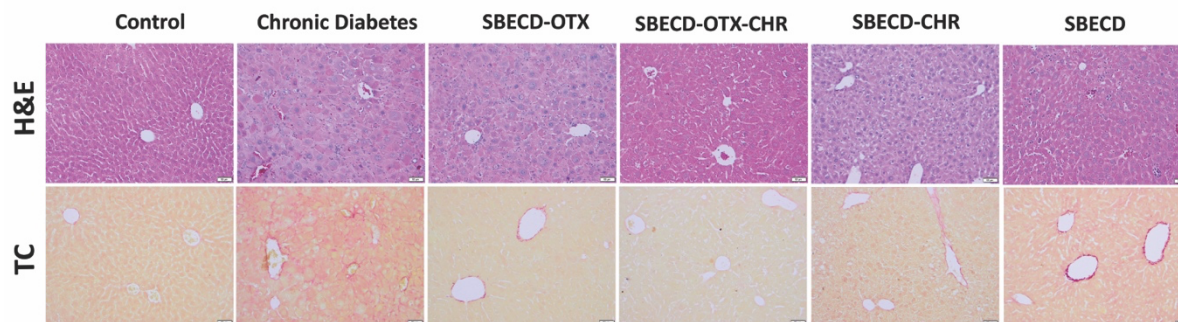
A 3.5.Diseminare [ 2 articole ISI; 2 conferinte; 1 cerere brevet (Publicat RO-BOPI 10/2022); actualizare website] (100%)

### **Descrierea activităților realizate în etapa III:**

#### **Activitatea 1. Analize histopatologice**

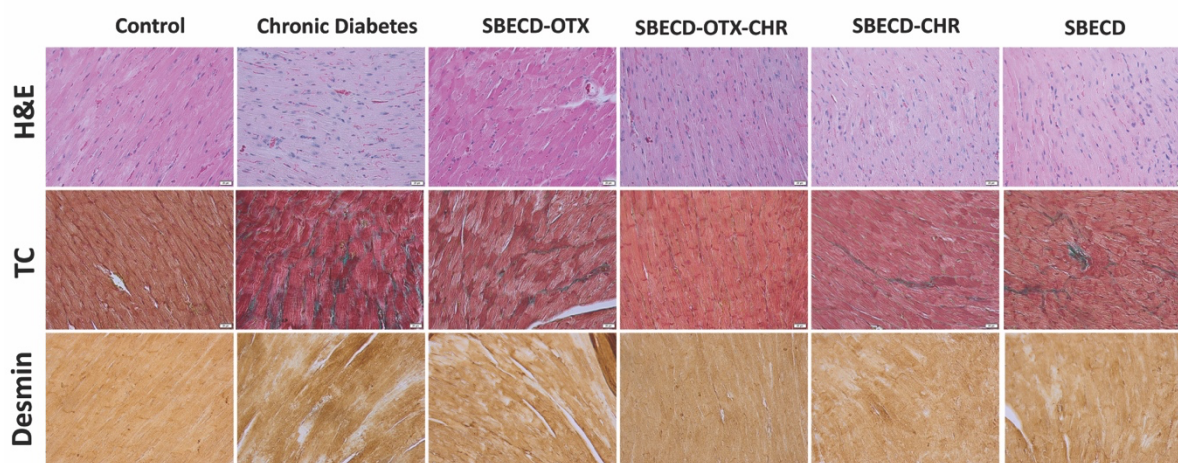
Analiza histopatologica a tesuturilor din loturile experimentale s-a realizat in coloratie H&E iar evidentierea colagenului in coloratie tricromica Fouchet van Gieson (ficat), respectiv Gomori pentru rinichi si ochi.

La examinarea histologică in colorație H&E, probele hepatice din grupul de control au evidențiat o arhitectură lobulară tipică, caracterizată prin vene centrilobulare și cordoane hepatocite radiante (Fig. 1). În schimb, speciamentele de ficat din grupul diabet cronic au prezentat atât steatoză microveziculară, cât și macroveziculară, congestia capilarelor sinusoide și infiltrarea parenchimului cu celulele inflamatorii. În plus, colorația tricromica a evidențiat prezența depozitelor de colagen atât în jurul venelor centrilobulare, zonelor periportale, cât și în parenchim. Loturile tratate cu SBECD și CHR-SBECD au prezentat o atenuare a alterarilor histopatologice comparativ cu grupul cu diabet cronic, totuși focare mici de fibroză și inflamație au fost încă evidente în special în jurul zonelor periportale. Pe de altă parte, țesuturile hepatice de la șoareci tratați cu CHR încapsulat în ciclodextrină-calixarene (DDS) au prezentat un aspect histologic aproape de cel al grupului de control.



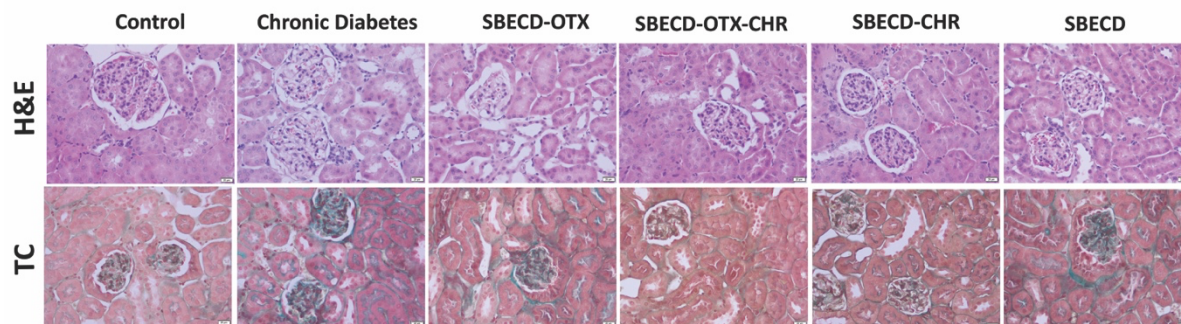
**Figura 1.** Aspectul histologic al tesutului hepatic pentru loturile experimentale. Col Hematoxilina&Eozina (H&E), Col. Tricromica Fouchet van Gieson (TC), IHC Desmin; 10x

Analiza histopatologica a tesutului cardiac la lotul de diabet cronic a evidentiat usoare modificari caracterizate prin infiltrate de celule inflamatorii, proliferare de colagen si moderate dezorganizari ale fibrelor miocardice, demonstrate de o imunopozitivitate mai redusa a desminei, unul dintre principalii markeri de analiza a integritatii structurale a miocardului (fig.2). Tratamentele efectuate au demonstrat o ameliorare, in special pentru lotul tratat cu SBECD-OTX-CHR, aspectul structural fiind aproape similar cu cel al lotului martor.



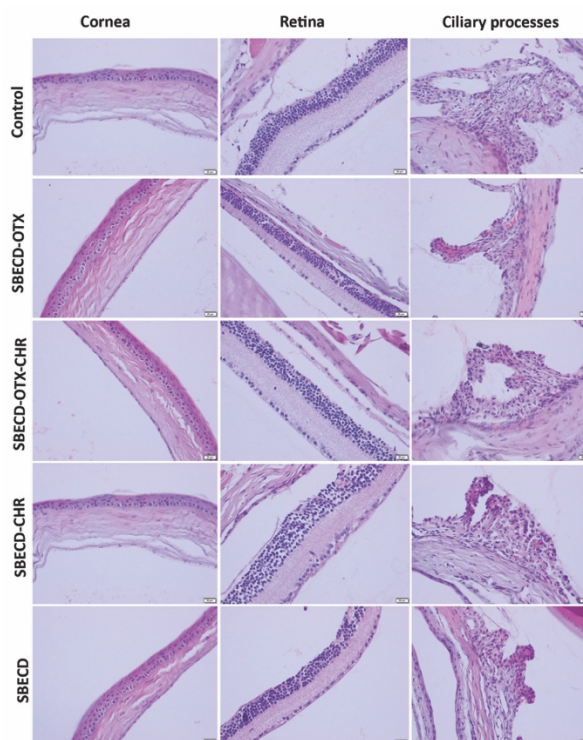
**Figura 2.** Aspectul histologic al tesutului cardiac pentru loturile experimentale. Col Hematoxilina&Eozina (H&E), Col. Tricromica Gomori (TC), IHC Desmin; 20x

Analiza histopatologica a tesutului renal la lotul de diabet cronic a evidentiat usoare modificari glomerulare caracterizate de expansiune mesangiala difuza, ingrosarea membranei bazale glomerulare si modificari ale capilarelor glomerulare (fig.3). Coloratia tricromica a evidentiat acumulare de colagen in special la nivel glomerular. Tratamentele efectuate au demonstrat o ameliorare, in special pentru lotul tratat cu SBECD-OTX-CHR, aspectul structural fiind aproape similar cu cel al lotului martor. Administrarea SBECD a avut cel mai putin efect protectiv renal, aspectul histologic fiind aproape de cel al lotului de diabet cronic.

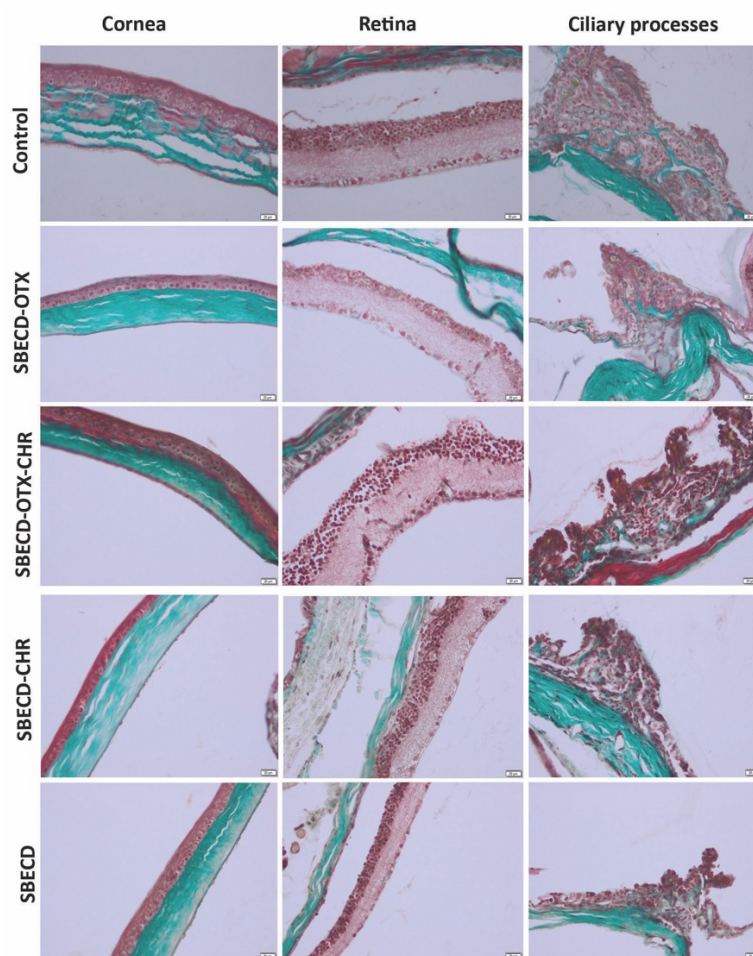


**Figura 3.** Aspectul histologic al corticalei renale pentru loturile experimentale. Col Hematoxilina&Eozina (H&E), Col. Tricromica Gomori (TC), 20x

Modificarile histopatologice in diabet cronic au fost observate atat la nivelul corneei, al retinei, cat si la nivelul proceselor ciliare (fig.4). Lotul de soareci diabetici au prezentat un epiteliu corneean îngroșat degenerat, cu celule epiteliale vacuolare. Stroma a prezentat pe alocuri fibre de colagen hialine degenerate. De asemenea endoteliul cornean ce captuseste membrana Descemet are membrana bazala ingrosata comparativ cu martorul. În ceea ce privește histologia retinei, lotul diabetic a prezentat o reducere semnificativa a grosimii acesteia. Nucleii straturilor granulare intern si extern au un aspect hipercrom iar stratul fotoreceptor este atrofiat comparativ cu lotul de control. Procesele ciliare au prezentat modificari histopatologice caracterizate in principal de congestia capilarelor sanguine si prezenta unui lumen lărgit. Nu s-au inregistrat proliferari de colagen (fig.5). Tratamentele efectuate au demonstrat o ameliorare, in special pentru lotul tratat cu SBECD-OTX-CHR, aspectul structural al structurilor oculare analizate fiind aproape similar cu cel al lotului martor. Administrarea SBECD a avut cel mai puțin efect protectiv, aspectul histologic fiind aproape de cel al lotului de diabet cronic.



**Figura 4.** Aspectul histologic al tesuturilor oculare pentru loturile experimentale in coloratie Hematoxilina&Eozina (H&E), Ob.20x



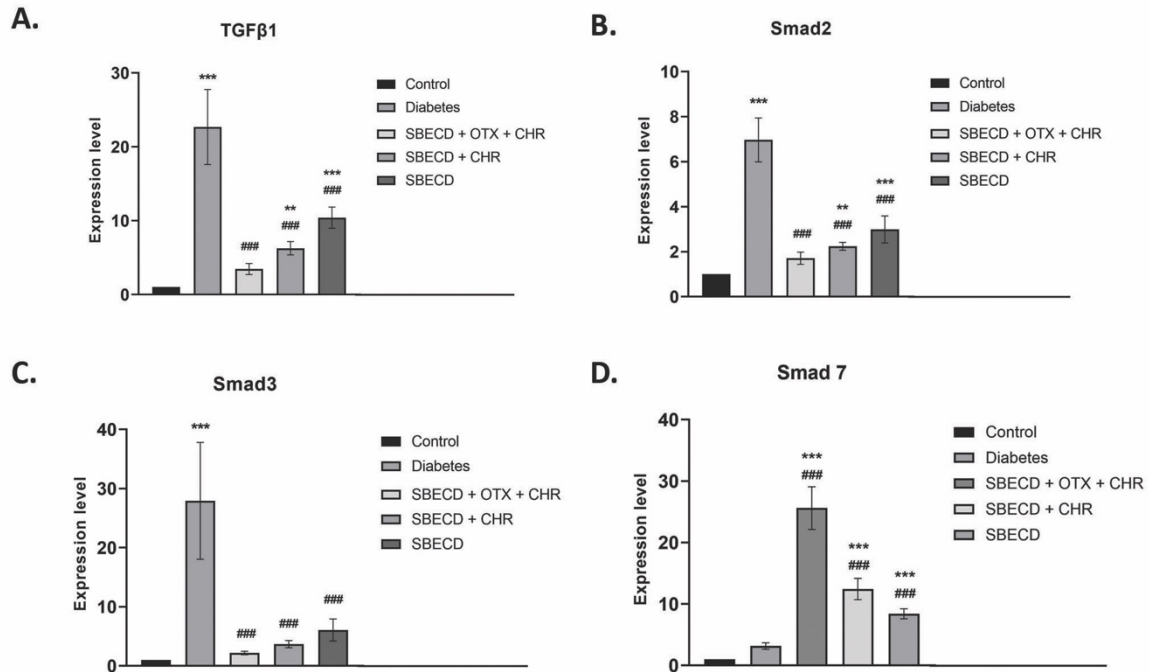
**Figura 5.** Aspectul histologic al tesuturilor oculare pentru loturile experimentale in coloratie tricromica Goldner. Ob.20x

## Activitatea 2. Evaluarea mecanismului molecular antifibrotic

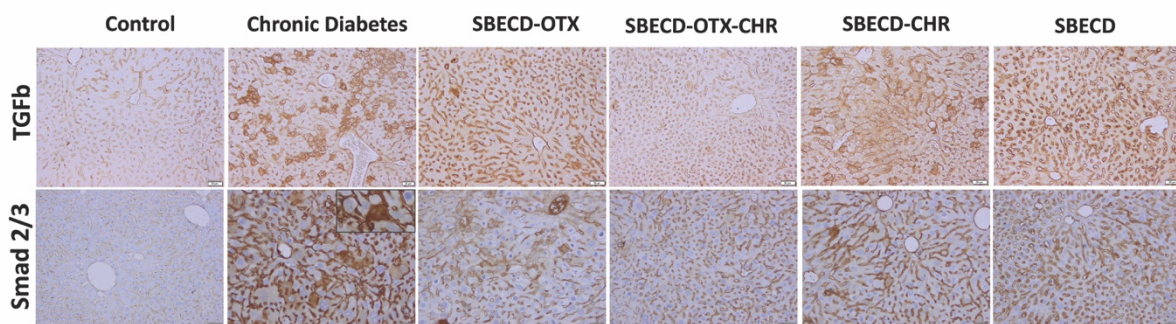
Hiperglicemia cronică la șoarecii diabetici a fost legată de o creștere semnificativă a expresiei genei TGF- $\beta$ 1 la nivel hepatic ( $p < 0,001$ ) (Fig.5). În comparație cu grupul cu diabet zaharat, grupul SBECD+OTX+CHR a prezentat o scădere substanțială cu 84,78% a ARNm TGF- $\beta$ 1. Reducerea expresiei TGF- $\beta$ 1 ca răspuns la administrarea CHR+SBECD, respectiv a SBECD a fost comparativ mai mică, de aproximativ 3,61 ori, respectiv de 2,17 ori, în comparație cu rezultatele obținute de SBECD+OTX+CHR. Analiza imunohistochimică a TGF- $\beta$ 1 a reflectat o tendință similară (fig.6).

Figura 5 ilustrează faptul ca in cazul lotului diabet, a existat o creștere semnificativă a nivelurilor de ARNm Smad 2 și Smad 3 și o scadere a expresiei genice a Smad 7 în comparație cu controlul ( $p < 0,001$ ). Tratamentul cu SBECD+OTX+CHR timp de două săptămâni a dus la

o reducere marcată a nivelurilor de ARNm Smad 2 cu 75,43% și o scădere a nivelurilor de ARNm Smad 3 cu 92,22%, comparativ cu grupul diabetic. În plus, a existat o creștere notabilă a expresiei ARNm Smad 7 cu 87,69% în comparație cu controlul pozitiv. Tratamentele cu CHR+SBECD și SBECD nu au prezentat o îmbunătățire la fel de semnificativă. Expresia imunohistochimică a Smad2/3 a confirmat aceste rezultate (fig.6).

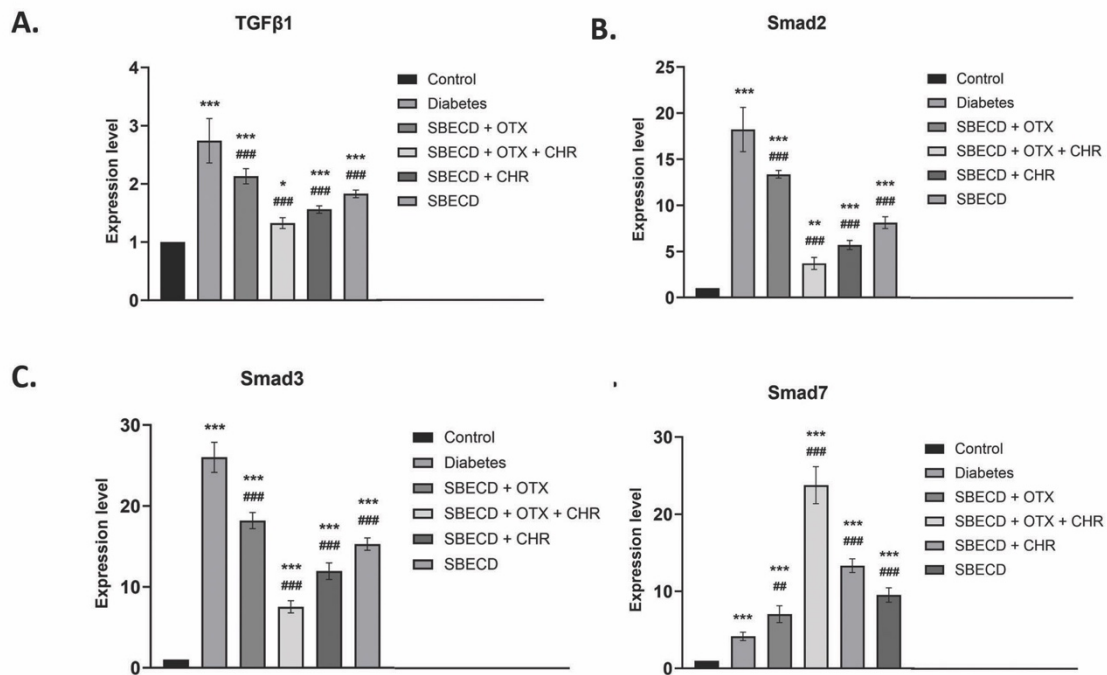


**Figura 5. Analiza activării caii de semnalizare profibrotică TGF-β1/Smad în tesuturile hepatice pentru loturile experimentale.** Expresia genică a TGF-β1, Smad 2, 3 și 7. Valorile sunt exprimate ca media (± SD) \*\*, \*\*\* Semnificatia statistica  $p < 0.01$  și  $p < 0.001$ , comparativ cu control. #### semnificatia statistica  $p < 0.001$  comparativ cu grupul diabetic.

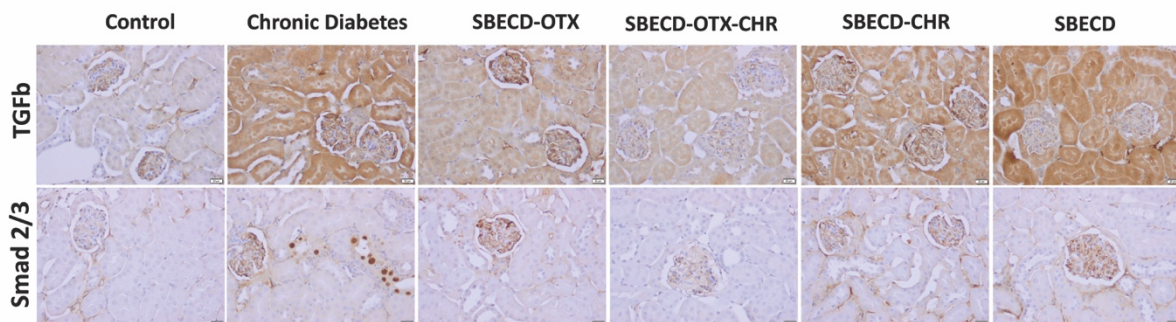


**Figura 6.** Expresia imunohistochimică a TGF-β1 și Smad 2/3 în tesuturile hepatice pentru loturile experimentale. Ob.10x

În cazul analizei moleculare la nivel renal, se înregistrează o creștere semnificativă a expresiei genei TGF- $\beta$ 1, Smad-2 și Smad-3 ( $p < 0,001$ ) comparativ cu lotul de control (Fig.7). Tratamentele cu SBECD+OTX+CHR, SBECD+ CHR și SBECD au prezentat o reducere semnificativă statistică ( $p < 0,001$ ) comparativ cu lotul de diabet. Contrar, expresia mRNA a Smad7 a înregistrat o creștere semnificativă după tratamente, cea mai semnificativă creștere înregistrându-se pentru lotul SBECD+OTX+CHR ( $p < 0,001$ ). Analiza imunohistochimică a TGF- $\beta$ 1 și Smad 2/3 a reflectat o tendință similară (fig.8).

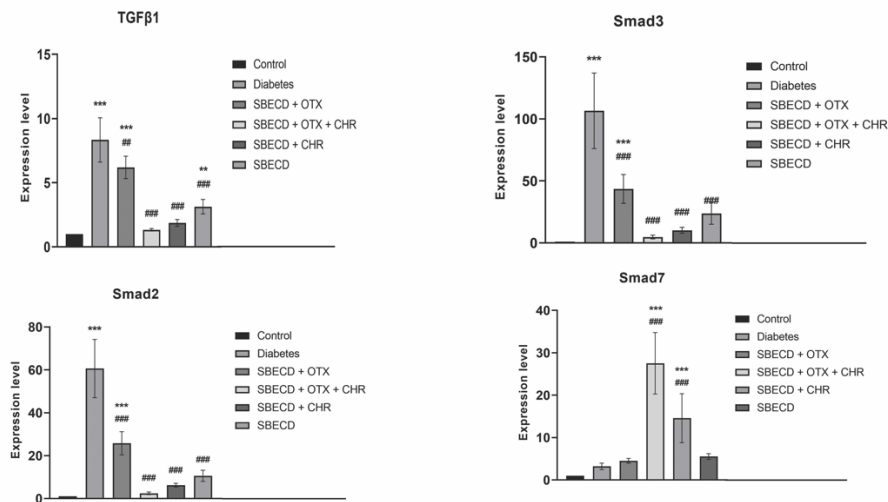


**Figura 7. Analiza activării căii de semnalizare profibrotică TGF- $\beta$ 1/Smad în tesuturile renale pentru loturile experimentale.** Expresia genică a TGF- $\beta$ 1, Smad 2, 3 și 7. Valorile sunt exprimate ca media ( $\pm$  SD) \*, \*\*, \*\*\* Semnificatia statistică  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  și  $p < 0,001$ , comparativ cu control. ### semnificatia statistică  $p < 0,001$  comparativ cu grupul diabet.



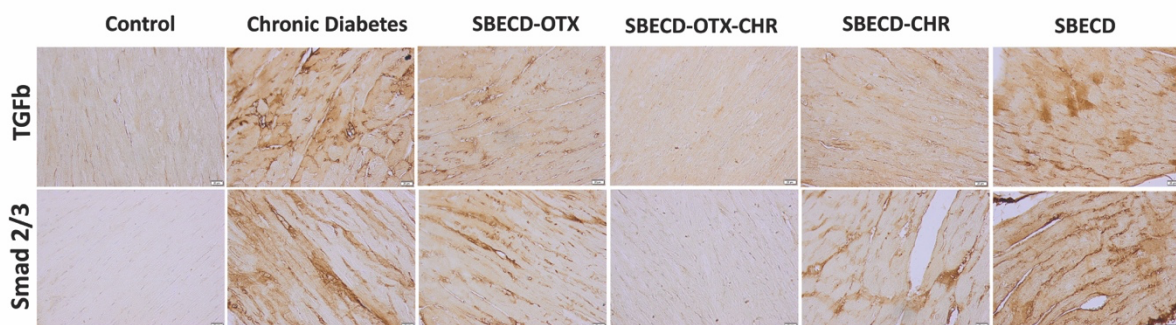
**Figura 8. Expresia imunohistochimică a TGF- $\beta$ 1 și Smad 2/3 în tesuturile renale pentru loturile experimentale. Ob.20x**

În comparație cu controlul, diabetul cronic a condus la o creștere semnificativă a expresiei genei TGF- $\beta$ 1 în tesutul cardiac (Fig 9) și la o imunopozitivitate intensă (Fig.10). Tratamentele cu SBECD+OTX, SBECD+OTX+CHR și SBECD+CHR au scăzut nivelurile de TGF-  $\beta$ 1 de 1,97 ori, de 19,11 ori și, respectiv, de 6,62 ori, în comparație cu grupul cu diabet. Același pattern a fost obținut pentru Smad2 și Smad3 (Fig 9 și 10). În schimb, expresia ARNm a Smad7 a fost semnificativ crescută în grupul SBECD+OTX+CHR de 12,7 ori în comparație cu diabetul zaharat (fig.9).



**Figura 9. Analiza activării căii de semnalizare profibrotice TGF-  $\beta$ 1/Smad în tesuturile cardiace pentru loturile experimentale.** Expresia genică a TGF-  $\beta$ 1, Smad 2, 3 și 7.

Valorile sunt exprimate ca media ( $\pm$  SD) \*, \*\*, \*\*\* Semnificatia statistica  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  și  $p < 0.001$ , comparativ cu control. #### semnificatia statistica  $p < 0.001$  comparativ cu grupul diabet.

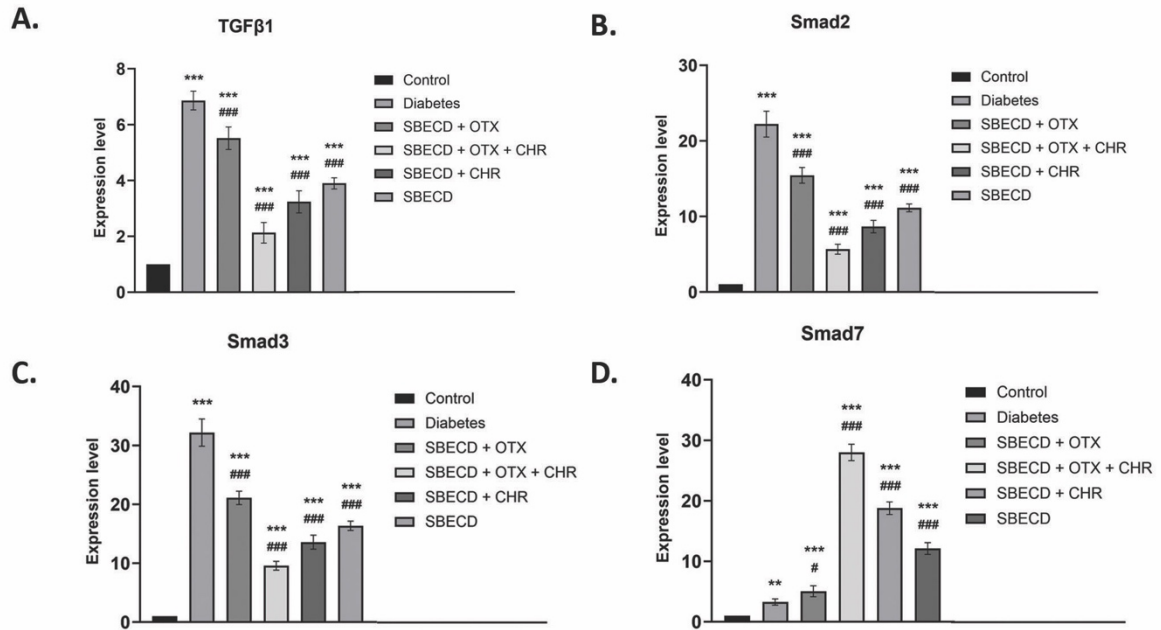


**Figura 10. Expresia imunohistochimică a TGF-  $\beta$ 1 și Smad 2/3 în tesuturile cardiace pentru loturile experimentale. Ob.20x**

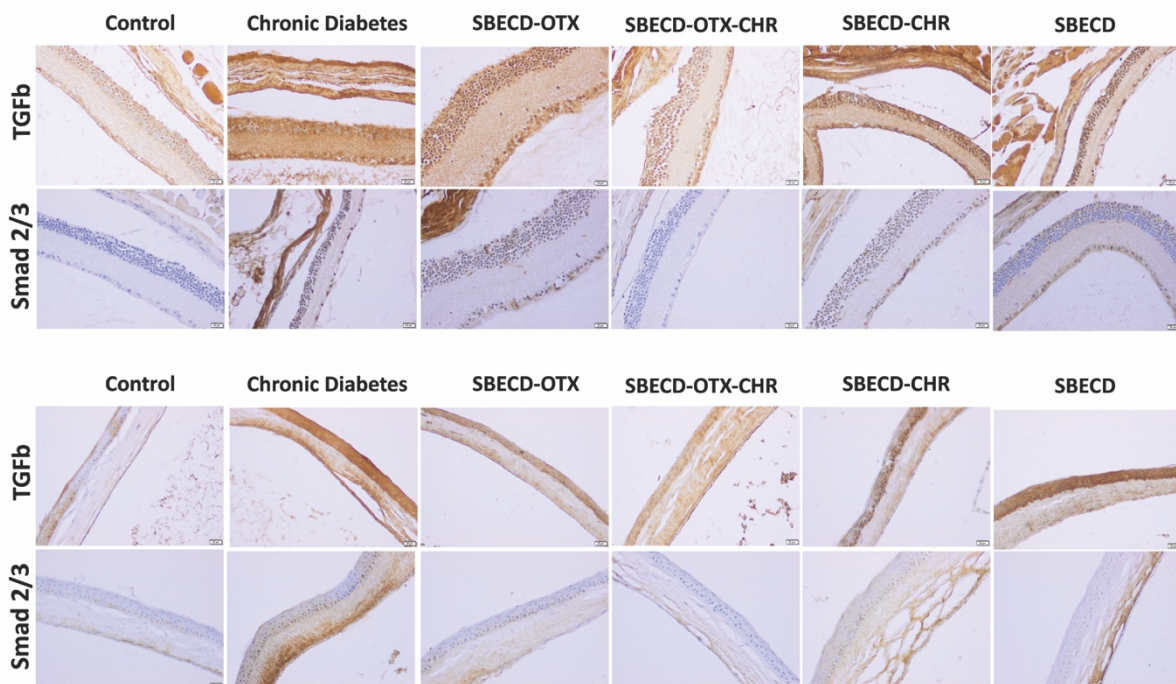
În tesuturile oculare expresia genică a căilor profibrotice TGF-  $\beta$ 1, Smad 2 și Smad 7 au fost semnificativ crescute la lotul de soareci diabetici față de control ( $p < 0.001$ ) și au scăzut semnificativ după tratamente comparativ cu controlul pozitiv (fig.11). În schimb expresia



mRNA Smad 7 a crescut semnificativ statistic fata de lotul de diabet. Expresia imunohistochimica a TGF-  $\beta$ 1 si Smad2/3 a avut acelasi pattern (fig.12).



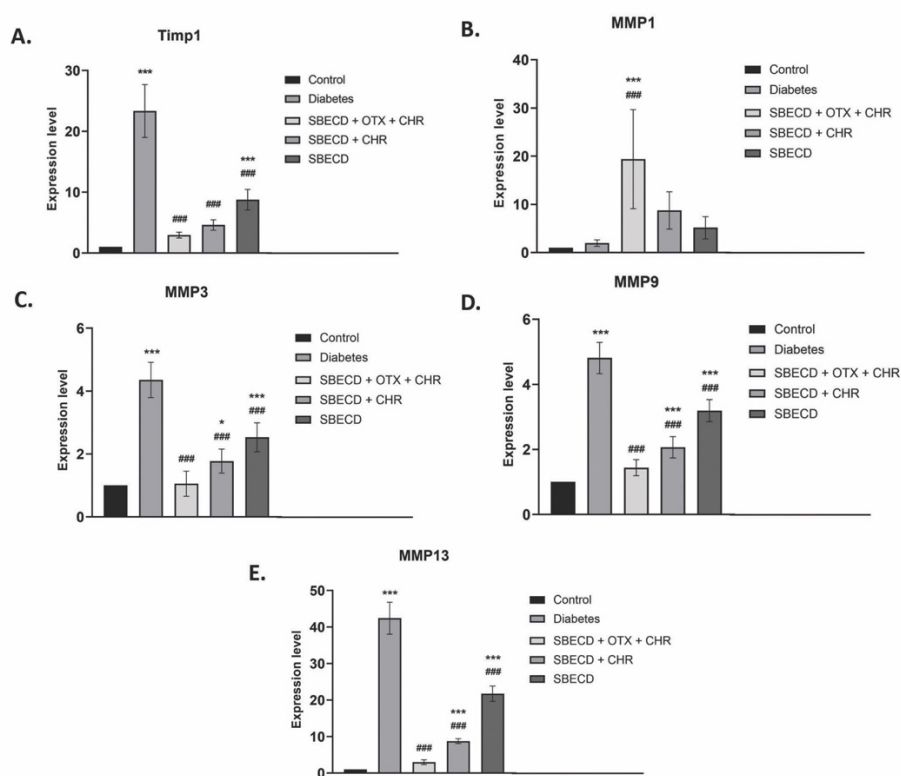
**Figura 11. Analiza activarii cai de semnalizare profibrotice TGF-  $\beta$ 1/Smad in tesuturile oculare pentru loturile experimentale.** Expresia genica a TGF-  $\beta$ 1, Smad 2, 3 si 7. Valorile sunt exprimate ca media ( $\pm$  SD) \*, \*\*, \*\*\* Semnificatia statistica  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  si  $p < 0.001$ , comparativ cu control. #### semnificatia statistica  $p < 0.001$  comparativ cu grupul diabet.



**Figura 12. Expresia imunohistochimica a TGF-  $\beta$ 1 si Smad 2/3 in tesuturile cardiace pentru loturile experimentale. Ob.20x**

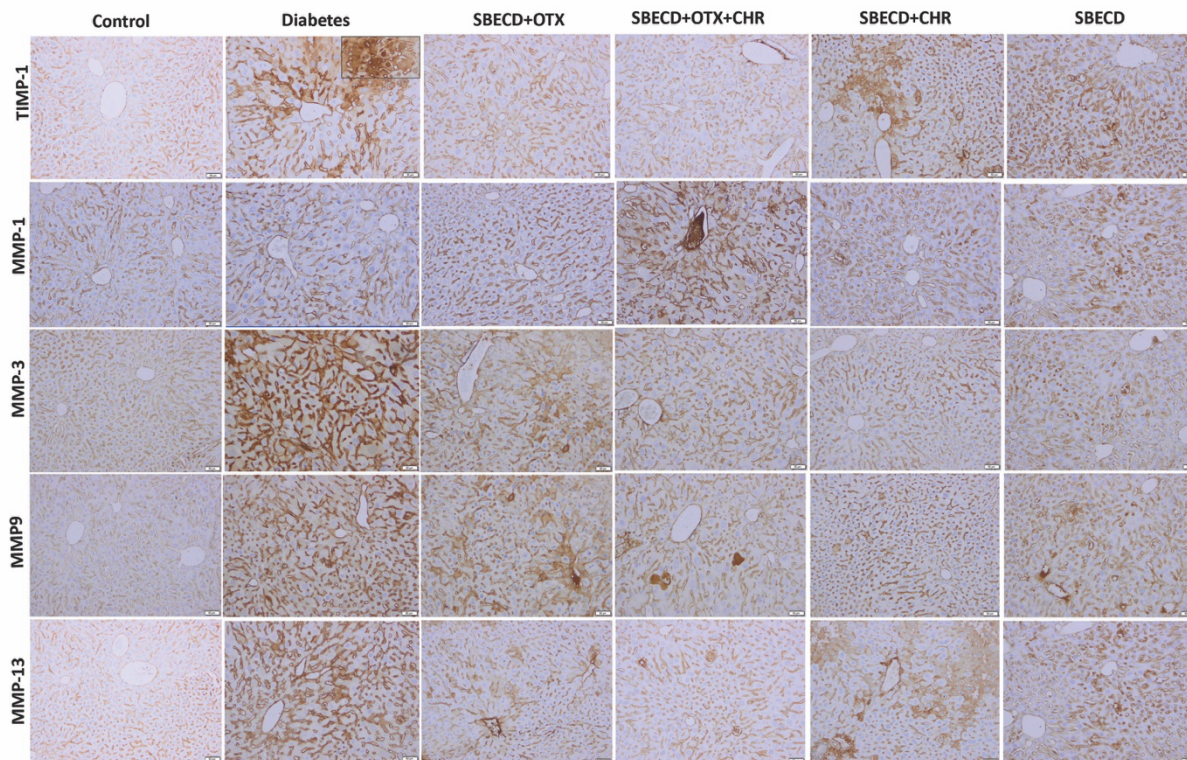
### Activitatea 3. Evaluarea remodelării matricii extracelulare

TIMP-1 acționează ca un inhibitor crucial al metaloproteinazelor matriceale (MMP), care sunt enzime responsabile de degradarea matricii extracelulare (ECM). Impactul CHR administrat prin DDS ciclodextrină-calixarenă asupra degradării ECM în ficatul fibrotic la șoareci cu diabet cronic indus de hiperglicemie, a fost evaluat prin măsurarea nivelurilor de ARNm ale TIMP-1 și metaloproteinazelor (fig.13). Analiza RT-PCR a arătat o creștere semnificativă a expresiei genei TIMP-1 în ficatul grupul diabetic, comparativ cu controlul ( $p < 0,001$ ). Livrarea CHR prin DDS ciclodextrină-calixarenă a scăzut substanțial nivelurile de ARNm de TIMP-1 la șoarecii diabetici ( $p < 0,001$ ). În schimb, expresia ARNm MMP-1 a fost semnificativ crescută în urma tratamentului, comparativ cu șoarecii diabetici ( $p < 0,001$ ). În mod remarcabil, în grupul SBECD+OTX+CHR, a existat o scădere de aproximativ 7,93 ori a expresiei TIMP-1 și o creștere de 19,38 ori a expresiei MMP-1 față de grupul diabetic ( $p < 0,001$ ). Expresia mRNA a MMP-3, MMP-9, MMP-13 a urmat același pattern ca și Timp-1. Rezultatele IHC pentru TIMP-1 și metaloproteinaze în țesuturile hepatice au reflectat modelele observate în expresia lor genică în grupurile experimentale (fig.14).



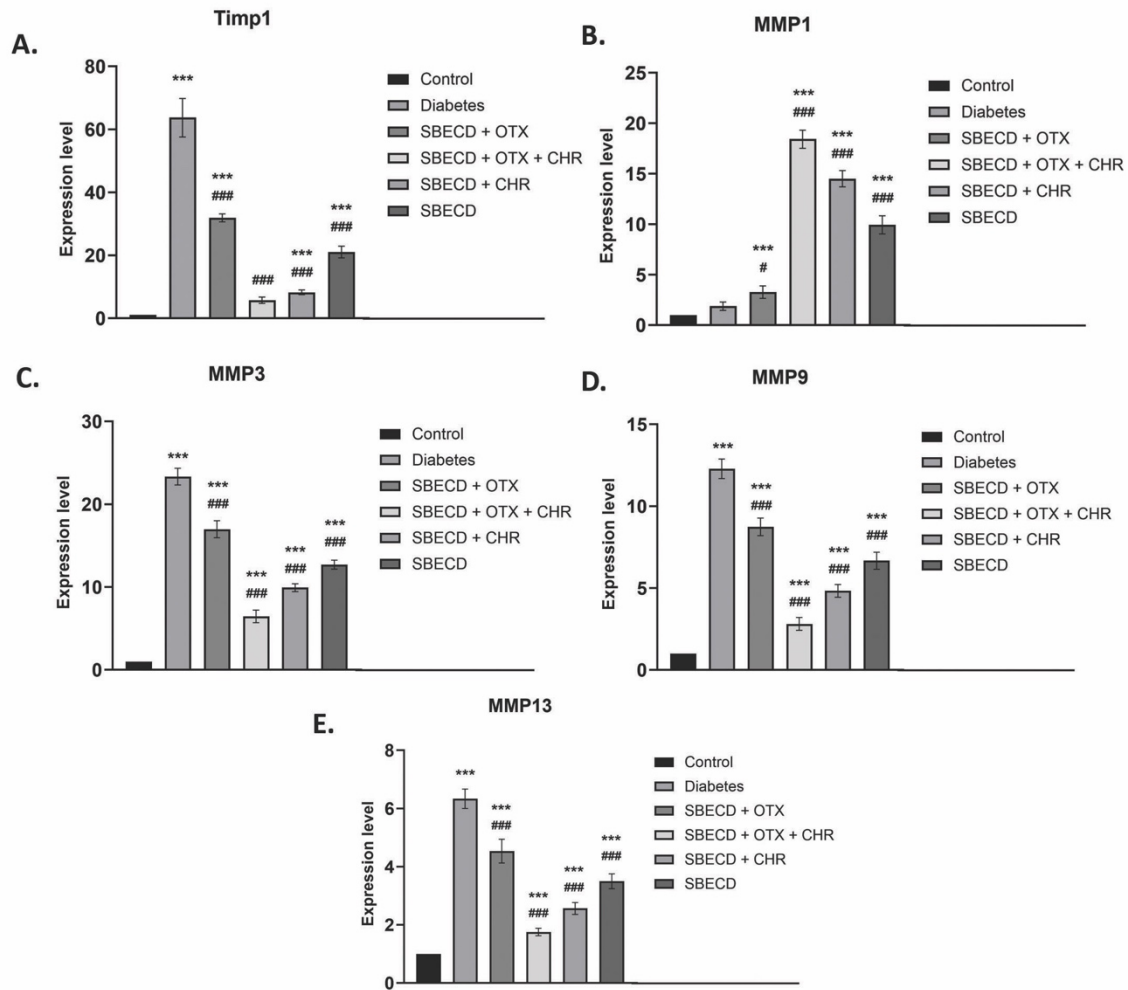
**Figura 13. Crisina incapsulata in sistemul calixarena-ciclodextrina moduleaza matricea extracelulara hepatica.** Expresia mRNA pentru Timp-1, MMP-1, MMP-3, MMP-9, MMP-

13; Valorile sunt exprimate ca media ( $\pm$  SD) \*\*, \*\*\* Semnificatia statistica  $p < 0.01$  si  $p < 0.001$  comparativ cu control. #### Semnificatia statistica  $p < 0.001$  comparativ cu diabet

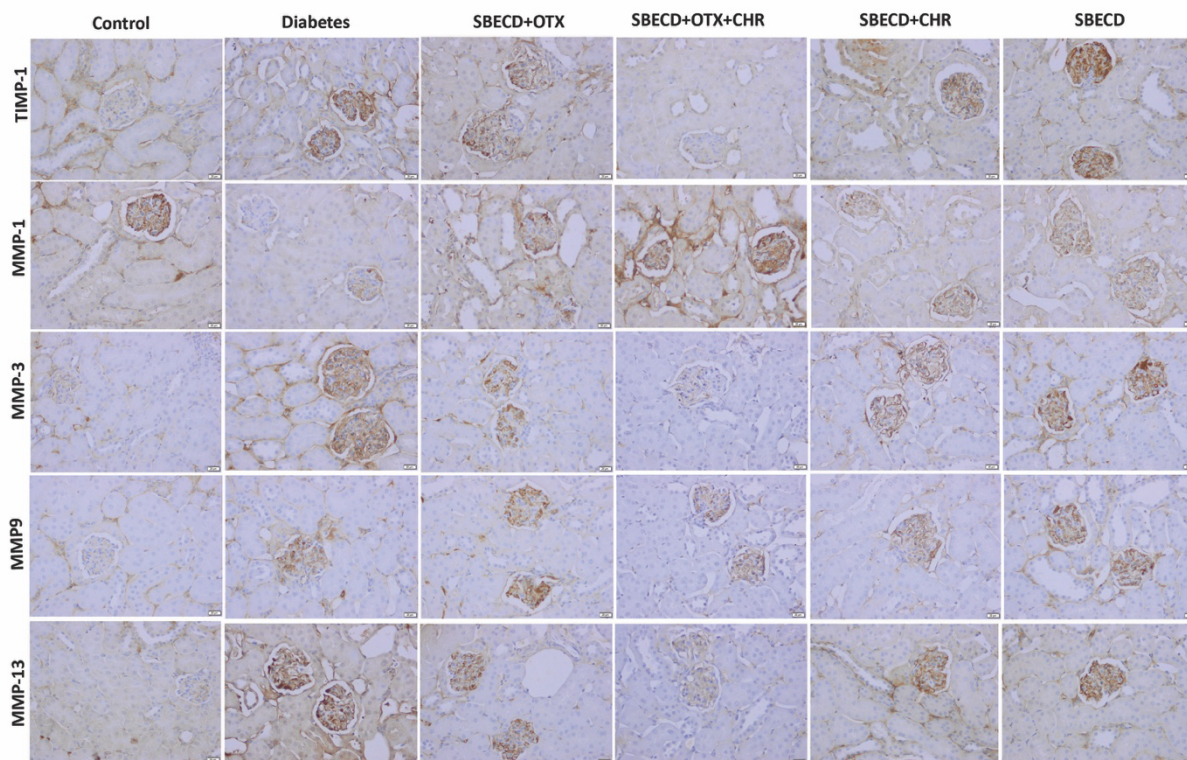


**Figura 14.** Expresia imunohistochimica a Timp-1, MMP-1, MMP-3, MMP-9, MMP-13 in tesuturile hepatice pentru loturile experimentale. Ob.10x

La nivel renal s-a inregistrat o crestere semnificativa a expresiei genice a TIMP-1, MMP-3, MMP-9 si MMP-13 pentru lotul diabet ( $p < 0.001$ ) comparativ cu controlul (fig.15). Tratamentele au reusit sa reduca semnificativ expresia genelor TIMP-1, MMP-3, MMP-9 si MMP-13 comparativ cu grupul diabet cronic. Contrar, mRNA MMP-1 a fost crescuta semnificativ in urma tratamentelor comparativ cu lotul de diabet ( $p < 0.001$ ). Rezultatele IHC pentru TIMP-1 și metaloproteinaze în țesuturile hepatice au reflectat modelele observate în expresia lor genică în grupurile experimentale (fig.16).

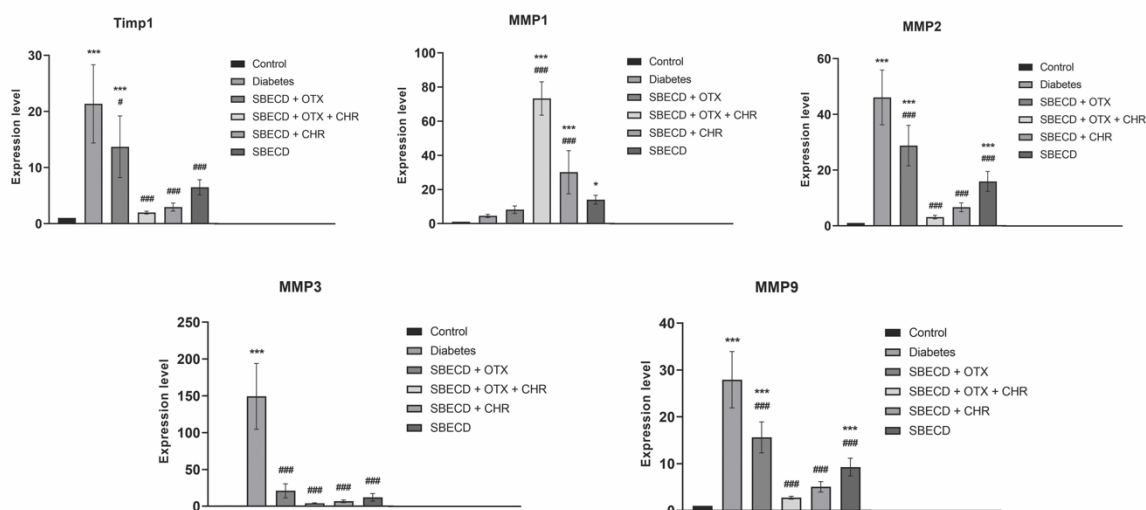


**Figura 15. Crisina incapsulata in sistemul calixarena-ciclodextrina moduleaza matricea extracelulara renala.** Expresia mRNA pentru Timp-1, MMP-1, MMP-3, MMP-9, MMP-13; Valorile sunt exprimate ca media ( $\pm$  SD) \*\*, \*\*\* Semnificatia statistica  $p < 0.01$  si  $p < 0.001$  comparativ cu control. ### Semnificatia statistica  $p < 0.001$  comparativ cu diabet

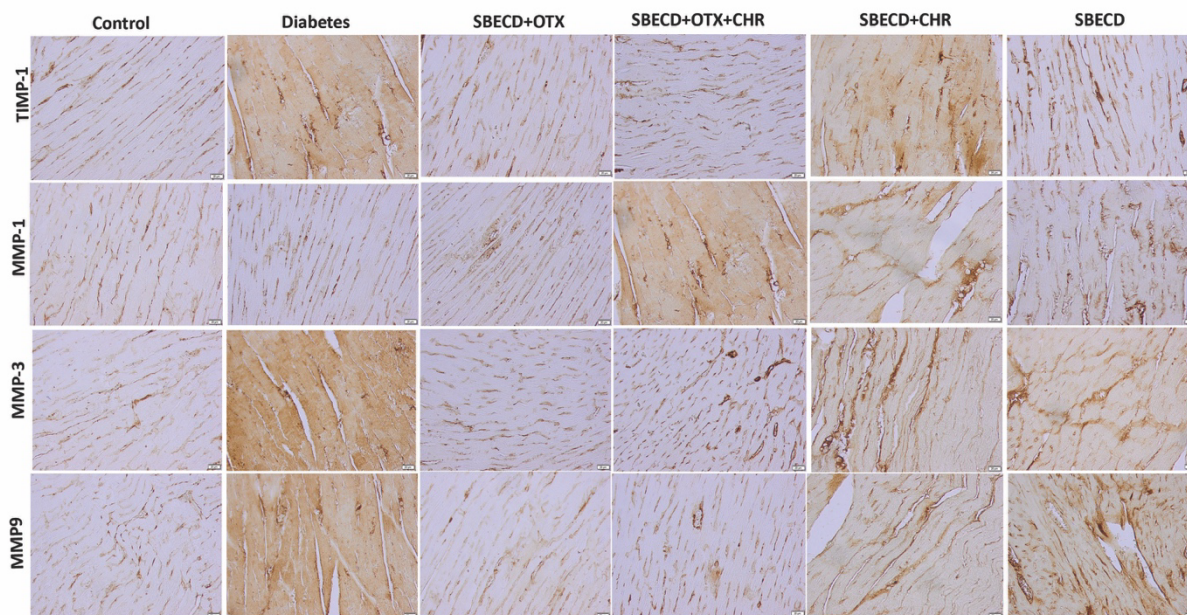


**Figura 16.** Expresia imunohistochimica a Timp-1, MMP-1, MMP-3, MMP-9, MMP-13 in tesuturile renale pentru loturile experimentale. Ob.20x

Rezultatele analizei moleculare a tesutului cardiac, au indicat faptul că grupul cu diabet a prezentat niveluri de expresie considerabil crescute ale genelor TIMP-1, MMP-2, -3 și -9 în comparație cu grupul de control ( $p < 0,001$ ). Tratamentele aplicate au redus efectiv aceste expresii ARNm comparativ cu grupul cu diabet ( $p < 0,001$ ). În schimb, expresia ARNm MMP-1 a fost semnificativ crescută în urma tratamentelor față de grupul cu diabet ( $p < 0,001$ ). Mai exact, în grupul de tratament SBECD+OTX+CHR, expresiile TIMP-1, MMP-2, MMP-3 și MMP-9 au scăzut de aproximativ 29,04, 15,12, 58,77 și, respectiv, 19,41 ori, comparativ cu grupul cu diabet. În schimb, expresia genei MMP-1 a crescut semnificativ după tratamentul cu SBECD+OTX+CHR în comparație cu diabetul ( $p < 0,001$ ) (Fig.17).

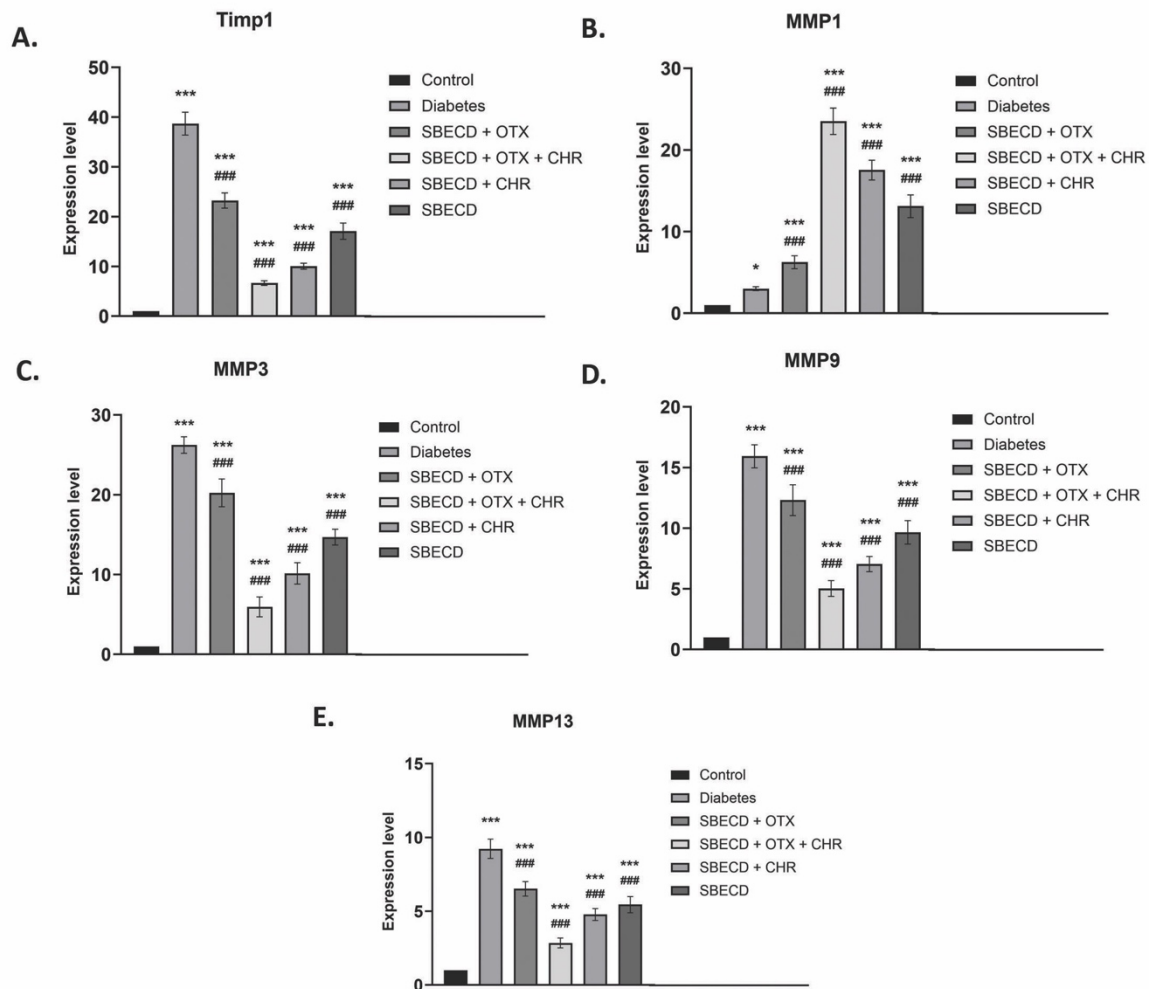


**Figura 17. Crisina incapsulata in sistemul calixarena-ciclodextrina moduleaza matricea extracelulara cardiaca.** Expresia mRNA pentru Timp-1, MMP-1, MMP-3, MMP-9, MMP-13; Valorile sunt exprimate ca media ( $\pm$  SD) \*\*, \*\*\* Semnificatia statistica  $p < 0.01$  si  $p < 0.001$  comparativ cu control. ### Semnificatia statistica  $p < 0.001$  comparativ cu diabet



**Figura 18.** Expresia imunohistochimica a Timp-1, MMP-1, MMP-3, MMP-9, MMP-13 in tesaturile cardiace pentru loturile experimentale. Ob.20x

Rezultatele analizei moleculare a tesuturilor oculare, au indicat faptul că grupul cu diabet a prezentat niveluri de expresie considerabil crescute ale genelor TIMP-1, MMP-2, -3 și -9 în comparație cu grupul de control ( $p < 0,001$ ) (fig.19). Tratamentele aplicate au redus efectiv aceste expresii ARNm comparativ cu grupul cu diabet ( $p < 0,001$ ). In schimb, expresia ARNm MMP-1 a fost semnificativ crescută în urma tratamentelor față de grupul cu diabet ( $p < 0,001$ ).



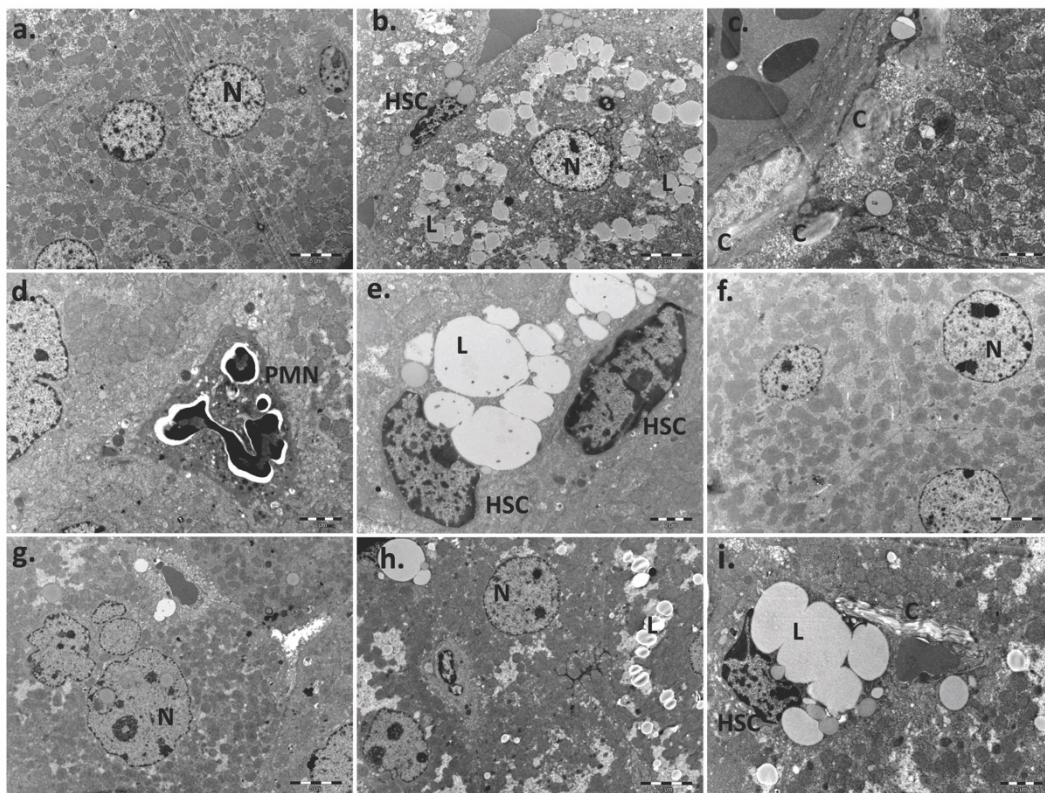
**Figura 19. Figura 17. Crisina incapsulata in sistemul calixarena-ciclodextrina moduleaza matricea extracelulara din tesuturile oculare.** Expresia mRNA pentru Timp-1, MMP-1, MMP-3, MMP-9, MMP-13; Valorile sunt exprimate ca media ( $\pm$  SD) \*\*, \*\*\* Semnificatia statistica  $p < 0.01$  si  $p < 0.001$  comparativ cu control. #### Semnificatia statistica  $p < 0.001$  comparativ cu diabet

#### Activitatea 4. Evaluarea efectelor antifibrotice prin analize de microscopie electronica

Probele tisulare ficat, rinichi, ochi, inima din toate loturile experimentale (2 probe/lot) au fost în prealabil fixate în sol. 2.7% glutaraldehidă în 0.1M tampon fosfat, apoi spălate în 0.15 M so.tampon fosfat (pH 7.2), și postfixate în 2% soluție de acid osmic acid în 0.15 M tampon fosfat. Deshidratarea a fost realizată în acetona, urmată de includerea în rășină epoxidică (Epon 812). Secțiunile ultrafine de 70 nm grosime au fost realizate la un ultramicrotom Leica EM UC7. Contrastarea grilelor a fost realizată cu soluții de acetat de uranil și citat de plumb. Secțiunile au fost examinate la un microscop electronic TEM TEM (Morgagni268) la 80 kV.

Achizițiile de date s-au realizat utilizând o camera CCD MegaView III și un software iTEM SIS software.

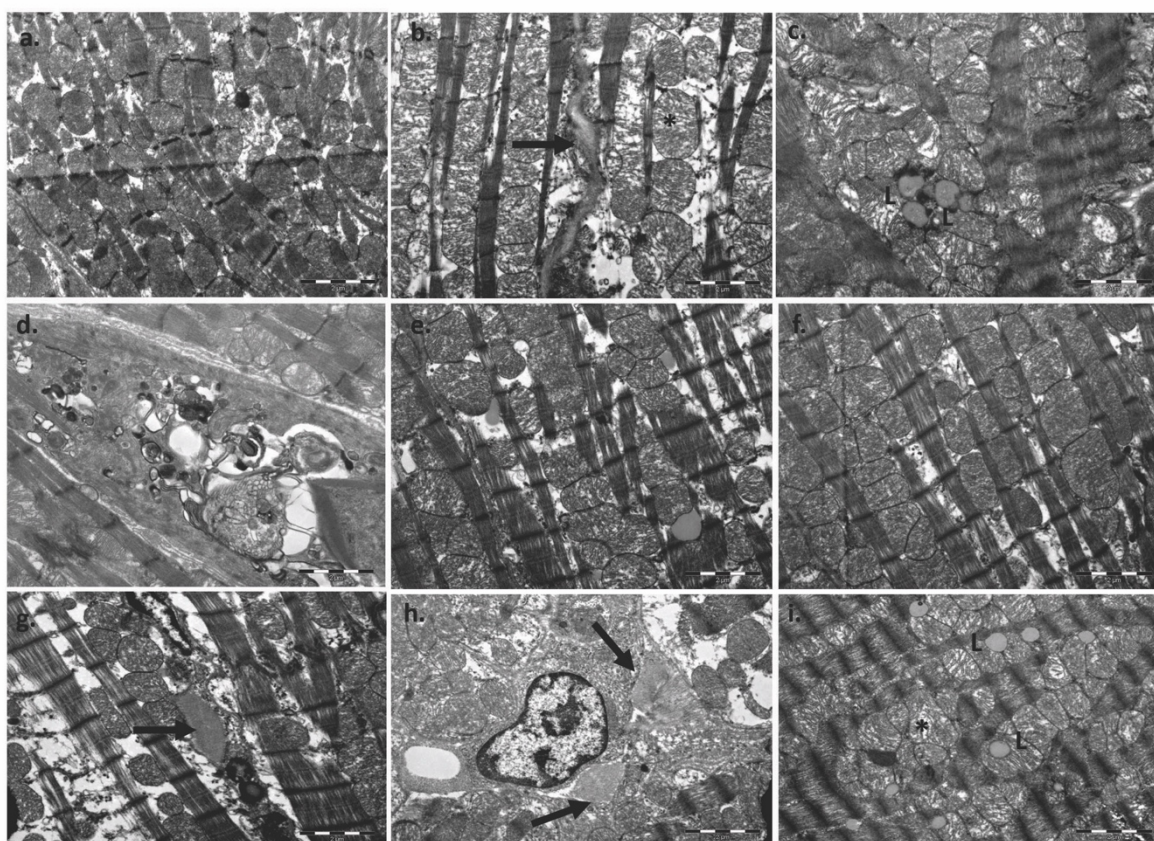
În probele de ficat de control, au fost observate hepatocite normale cu nuclei caracteristici, organite și glicogen, împreună cu rare picături lipidice (Fig.20). S-au remarcat, de asemenea, endoteliul capilarelor sinusoide cu aspect normal, separate de spațiul lui Disse, și canalicule biliare căptușite cu microvilozități. Probele de ficat din grupul de diabet au evidențiat acumulare de lipide (Fig.21b) și creștere a activității celulelor hepatice stelate (Fig.20b,4e), în timp ce mitocondriile hepatocitelor nu au fost afectate. Între hepatocite, canaliculele biliare lărgite nu aveau microvilozități, iar spațiul Disse a fost mărit din cauza depunerii de collagen (Fig.20e). Infiltrarea celulelor imune a fost prezentă (Fig.20d). Post-tratament cu SBECD+CHR, structura ficatului are aspectul ultrastructural similar controlului, rezultat îmbunătățit și mai mult de sistemul ternar care conține crisină (Fig.20f). Cu toate acestea, tratamentul doar cu SBECD nu a reușit să inverseze modificările arhitecturale, cu prezența semnificativă a lipidelor și a collagenului încă evidentă (Fig.20 g-i).



**Figura 20. Crisina incapsulata in sistemul calixarena-ciclodextrina restabilește aspectul ultrastructural al ficatului;** a. Control; b-e. Diabet; f. SBECD+OTX+CHR; g. SBECD+CHR; h, i. SBECD; HSC-celule hepatice stelate; N-nucleu; C-colagen; PMN-neutrofile; L-lipide

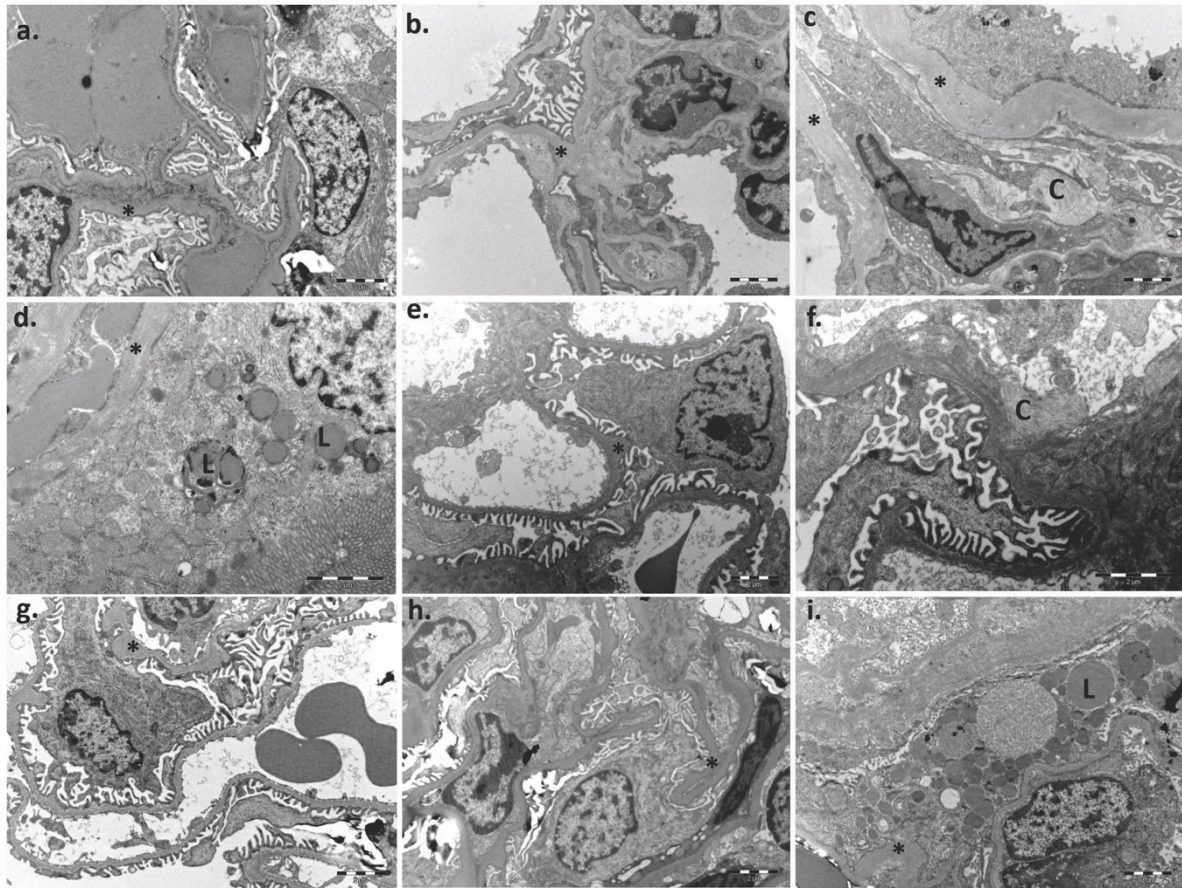


Lotul de soareci diabetic au prezentat ultrastructura cardiaca modificata fata de control caracterizata prin proliferare de collagen (fig.21b) si acumulare de picaturi lipidice (fig.21c) si activitate fagocitara crescuta (fig.21 d). Pe alocuri, mitocondriile prezinta criste rarefiate. Modificarile sunt prezente si dupa tratamentele cu SBECD+OTX si SBECD+CHR, chiar daca mai atenuate comparativ cu controlul pozitiv. Cele mai bune rezultate s-au obtinut cu SBECD+OTX+CHR si cele mai slabe cu SBECD (fig.21h,i).



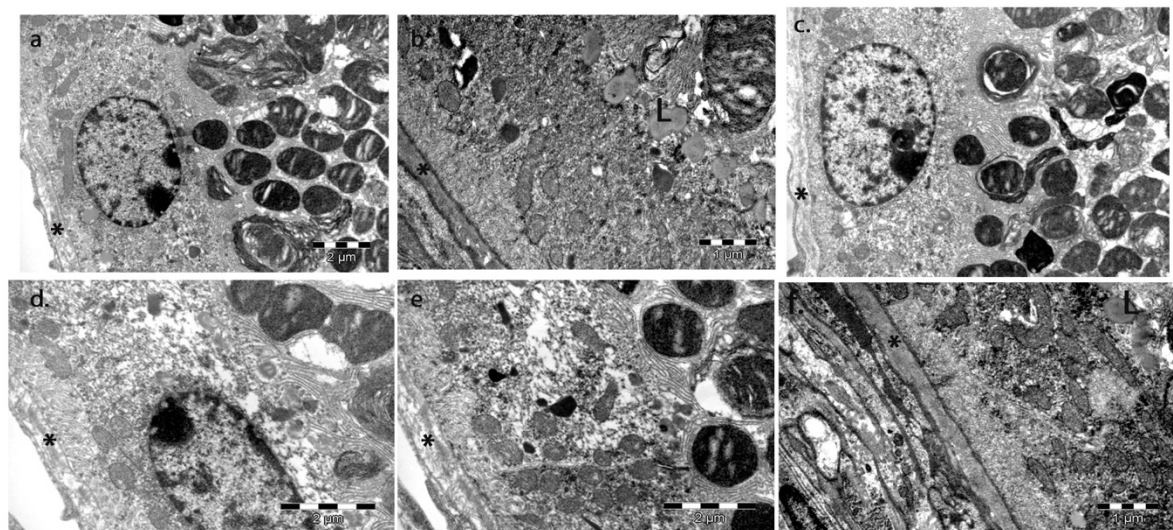
**Figura 21. Crisina incapsulata in sistemul calixarena-ciclodextrina restabilește aspectul ultrastructural cardiac;** a. Control; b-d. Diabet; e. SBECD+OTX; f. SBECD+OTX+CHR; g. SBECD+CHR; h, i. SBECD; sageata – collagen, L-lipide, asterix- mitocondrii cu criste rarefiate

Aspectul ultrastructural al glomerulilor renali este modificat in cazul rinichilor soarecilor cu diabet cronic, caracterizate prin ingrosari ale membranelor bazale glomerulare, acumulare de matrice mezangiala si incarcari de lipide, acumulari de collagen (fig.22b-d). Modificarile sunt prezente si dupa tratamentele cu SBECD+OTX si SBECD+CHR, chiar daca mai atenuate comparativ cu controlul pozitiv. Cele mai bune rezultate s-au obtinut cu SBECD+OTX+CHR si cele mai slabe cu SBECD (fig.22h,i).



**Figura 22. Crisina incapsulata in sistemul calixarena-ciclodextrina restabilește aspectul ultrastructural glomerular;** a. Control; b-d. Diabet; e-f. SBECD+OTX; g. SBECD+OTX+CHR; h. SBECD+CHR; i. SBECD; asterix – membrane bazale glomerulare; L-lipide; C - collagen

Membrana Bruch este ingrosata si electronodensa la lotul diabetic si are un aspect normal la loturile tratate, cu exceptia lotului care a primit SBECD. De asemenea lipidele sunt acumulate in celulele epiteliale retiniene la lotul diabetic si SBECD (fig.23).



**Figura 23. Crisina incapsulata in sistemul calixarena-ciclodextrina restabilește aspectul ultrastructural al epitelului pigmentar retinian;** a. Control; b. Diabet; c. SBECD+OTX; d. SBECD+OTX+CHR; e. SBECD+CHR; f. SBECD; asterix membrana Bruch, L – lipide

## Activitatea IV. Diseminare

### Articole ISI:

1. Maria Consiglia Trotta, Hildegard Herman, Alina Ciceu, Bianca Mladin, Marcel Rosu, Caterina Claudia Lepre, Marina Russo, Ildikó Bácskay, Ferenc Fenyvesi, Raffaele Marfella, Anca Hermenean\*, Cornel Balta and Michele D'Amico (\*corresponding author), **Chrysin-based supramolecular cyclodextrin-calixarene drug delivery system: a novel approach for attenuating cardiac fibrosis in chronic diabetes**, *Frontiers Pharmacology*, Manuscript ID: 1332212, DOI: 10.3389/fphar.2023.1332212 (articol acceptat publicare), Q1 AIS

2. Anca Hermenean, Eleftheria Dossi, Alex Hamilton, Maria Consiglia Trotta, Marina Russo, Caterina Claudia Lepre, Csilla Sajtos, Ágnes Ruzsnyák, Judit Váradi, Ildikó Bácskay, Michele D'Amico and Ferenc Fenyvesi, **Chrysin directing an enhanced solubility through the formation of a supramolecular cyclodextrin-calixarene drug delivery system: a potential strategy in antifibrotic diabetes therapeutics**, *Pharmaceuticals*, Manuscript ID pharmaceuticals-2767387, *Pharmaceuticals* 2023, 16, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx> (in evaluate) and bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2023.10.03.560552>; Q1 AIS

3. Cornel Balta, Hildegard Herman, Alina Ciceu, Maria Consiglia Trotta, Bianca Mladin, Marcel Rosu, Daniela Oatis, Caterina Claudia Lepre, Marina Russo, Victor Eduard Peteu, Mihaela Gherghiceanu, Ferenc Fenyvesi, Michele D'Amico, Coralia Cotoraci, and Anca Hermenean, **Chrysin-Loaded Calixarene-Cyclodextrin Ternary Drug Delivery System Inhibits TGF- $\beta$  and Galectin-1 Mediated Pathways in Diabetic Liver Fibrosis**, *Molecular Pharmacology*, MOLPHARM-AR-2023-000858 (in evaluate); Q1 AIS

### Participare la conferințe naționale/internaționale

1. Maria Consiglia Trotta, Cornel Balta, Alina Ciceu, Herman Hildegard, Caterina Lepre, Judit Váradi, Ferenc Fenyvesi, Coralia Cotoraci, Michele D'Amico, and Anca Hermenean, Protective effects of chrysin in calixarene 0118 (OTX008) and sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin (SBE $\beta$ CD) nanoformulation on diabetes-associated cardiac fibrosis – *in vitro* and *in vivo* studies, Conference on Research and Development for Therapeutical Purposes III, University of Debrecen, Hungary, 1 febr. 2023, prezentare orală

2. Anca Hermenean, Maria Consiglia Trotta, Cornel Balta, Alina Ciceu, Herman Hildegard, Caterina Lepre, Judit Váradi, Ferenc Fenyvesi, Coralia Cotoraci, Michele D'Amico Chrysin in calixarene 0118 (OTX008) and sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin (SBE $\beta$ CD) nanoformulation alleviate fibrosis associated with chronic diabetes, 2nd Annual Conference on Global Nanotechnology - NanoSeries 2023, Madrid 18-22 iunie 2023, prezentare orală

3. Anca Hermenean, Maria Consiglia Trotta, Cornel Balta, Alina Ciceu, Herman Hildegard, Caterina Lepre, Judit Váradi, Ferenc Fenyvesi, Coralia Cotoraci, Michele D'Amico, Chrysin in calixarene 0118 (OTX008) and sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin (SBE $\beta$ CD) nanoformulation alleviate tissue fibrosis associated with chronic diabetes, International Chemistry Conference CHEMMET 2023, 26-28.06.2023 (online), prezentare orală

4. Anca Hermenean, Maria Consiglia Trotta, Cornel Balta, Alina Ciceu, Herman Hildegard, Caterina Lepre, Judit Váradi, Ferenc Fenyvesi, Michele D'Amico, Assessment of Chrysin's Protective Potential in Nanoformulations Containing Calixarene 0118 (OTX008) and Sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin (SBE $\beta$ CD) against Liver Fibrosis in Diabetes: Insights from In Vitro and In Vivo Investigation, Conference Transnational Multiplier event of REALME

project - A Mixed Reality E-Learning Platform Dedicated for Medical Engineering, Universitatea Politehnica Bucuresti, 18-19.10.2023, prezentare orala  
5. Anca Hermenean, Chrysin-Based Supramolecular Cyclodextrin-Calixarene Drug Delivery System: A Novel Approach for Attenuating Cardiac Fibrosis in Diabetes, International Pathology Conference of the Victor Babes Institute Bucharest, 2-4 november 2023, prezentare orala

Director Proiect,  
*Prof.dr.habil.Anca Hermenean*

