

Nanosisteme de livrare a flavonoidelor cu ajutorul unor transportori supramoleculari care tintesc fibroza in complicatiile diabetului zaharat

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

RAPORT STIINTIFIC – Faza 1 - 2021

Rezumatul etapei:

Linia celulară de celule epiteliale pigmentare retiniene adulte umane-19 (ARPE-19) și celulele cardiace H9c2 (2-1) de șobolan embrionar au fost cultivate pe mediu specific și la două zile după însămânțare, celulele au fost împărțite și expuse la 37°C și 5% CO₂ timp de 9 zile la: 5 mM d-glucoză (normal glucose, NG); 35 mM d-glucoză (Life Technologies A24940-01) (high glucose, HG); 5 mM d-glucoză și 30 mM manitol (Sigma 69-65-8) ca martor negativ (NG+M). Expunerea celulelor ARPE sau H9c2 la high glucose(35 mM, HG) timp de 9 zile a modificat semnificativ morfologia celulară și a redus procentul de viabilitate celulară în comparație cu celulele expuse la normal glucose sau în combinație cu manitol 30 mM (NG+M).

O creștere semnificativă a nivelurilor AP4S1 a fost evidentă în celulele HG sau tratamentele NG+M. Supraexprimarea AP4 a corelată cu o creștere semnificativă a procentului de celule pozitive Gal-1 în celulele ARPE și H9c2 expuse la HG, și care a fost absentă în celulele expuse la NG singur sau împreună cu manitol. În consecință, nivelurile de proteină Gal-1 au fost semnificativ crescute în celulele HG în comparație cu NG singur sau cu manitol (Activitatea A1.1.).

Atât ARPE, cât și celulele H9c2 au prezentat o supraexprimare a nivelurilor de ARNm TGF-β1, TGF-βR1 și TGF-βR2 în comparație cu celulele NG. Celulele NG+M nu au prezentat modificări ale nivelurilor de ARNm în comparație cu grupul NG. În mod similar, stimularea cu HG a celulelor ARPE sau H9c2 a crescut nivelurile pSMAD2, SMAD2 și SMAD4. Această suprareglare nu a fost demonstrată de celulele expuse la NG sau la NG+M (Activitatea A.2.1).

Celulele ARPE sau H9c2 expuse la HG au prezentat o creștere semnificativă a raportului MAPK P-p38 / p38, în comparație cu celulele expuse la NG și la NG+M. Fosforilarea p38 MAPK a fost corelată cu un procent mai mare de celule NF-kB pozitive și niveluri mai mari de proteine Nf-kB în tratamentul cu HG, precum și cu niveluri semnificativ crescute de ROS.

A 1.1. Studii in vitro ale supraexprimării Gal-1 în condiții hiperglicemice

Materiale si Metode

1) Culturi celulare

ARPE

Linia de celule epiteliale pigmentare retiniene adulte umane-19 (ARPE-19), obținută de la American Type Culture Collection (ATCC), au fost cultivate la 37°C și 5% CO₂ în amestecul de mediu/nutrienți modificat de la Dulbecco Eagle (DMEM/F12), Aurogene AU-L0093), cu o concentrație de glucoză de 5 mM. 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% NaHCO₃ (Thermo Fischer 25080094). La două zile după însămânțare, celulele au fost împărțite și expuse la 37°C și 5% CO₂ timp de 9 zile [1] la:

- 5 mM d-glucoză (normal glucose, NG);
- 35 mM d-glucoză (Life Technologies A24940-01) (high glucose, HG);
- 5 mM d-glucoză și 30 mM manitol (Sigma 69-65-8) ca și control negativ (NG+M).

Morfologia ARPE-19 a fost observată zilnic cu microscopul optic (Leica DMi1, Germania). După perioada de tratament, celulele și supernatantele au fost colectate și conservate pentru analiza. Pentru fiecare test, au fost efectuate trei experimente independente, fiecare făcut în triplicat.

H9c2

Celulele H9c2 cardiace embrionare de șobolan (2-1) (ECACC, Regatul Unit) au fost cultivate în mediu Eagle modificat de Dulbecco (DMEM; AU-L0101Aurogene, Italia), care conține 5,5 mM d-glucoză și suplimentat cu 10% FBS inactivat la căldură, 1% L-Glu și 1% P/S, la 37°C sub o atmosferă de 5% CO₂. Apoi, celulele H9c2 au fost expuse la 37°C și 5% CO₂ timp de 48 de ore [2] la:

- 5.5 mM d-glucoză (normal glucose, NG);
- 33 mM d-glucoză (high glucose, HG);
- 5.5 mM d-glucoză + 27.5 manitol ca și control negativ (NG+M).

Morfologia celulelor H9c2 a fost observată zilnic cu microscopul optic (Leica DMi1, Germania). După perioada de tratament, celulele și supernatantele au fost colectate și conservate pentru analiza. Pentru fiecare test, au fost efectuate trei experimente independente, fiecare realizat în triplicat.

2) Testul de viabilitate celulară

Viabilitatea celulară a fost măsurată prin testul cu bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol2-il)-2,5-difeniltetrazoliu (MTT). Celulele ARPE-19 (6 × 10³ celule/godeu) și H9c2 (5 × 10³ celule/godeu) au fost însămânțate în plăci cu 96 de godeuri și expuse la NG, HG sau manitol, așa cum s-a descris anterior. La sfârșitul perioadei de tratament, soluția MTT (1:10 în mediu de cultură, 300 pl/godeu) a fost adăugată în fiecare godeu, incubată timp de 4 ore la 37°C și apoi îndepărtată. Fiecare godeu a fost apoi spălat la întuneric timp de 20 min 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, Italia).

3) *Immunofluorescență*

Pentru analiza imunocitochimică, ARPE-19 și H9c2 (ambele 25×10^4 celule/godeu) au fost placate pe lame în plăci cu 24 de godeuri și expuse la NG, HG sau manitol, așa cum s-a descris anterior. Celulele au fost fixate cu paraformaldehidă 4% și spălate cu 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. Anticorpul primar a fost diluat în tampon de blocare PBS (1% BSA, 0,1% Triton X-100) și lamele au fost incubate peste noapte la 4°C în anticorpi primari la Galectină 1 (Gal-1) (Cell Signaling 13888; diluția 1:200, rabbit).

Anticorpul secundar anti-rabbit marcat fluorescent (Invitrogen 11008; diluție 1:1000) a fost utilizat pentru a localiza antigenele specifice în fiecare lamă. Celulele au fost contracolorate și montate cu mediu de montare 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 câmpul microscopic a fost calculat prin numărul de celule pozitive verzi din 400 de celule analizate în patru câmpuri microscopice diferite pentru fiecare tratament, luând în considerare numai celulele contracolorate DAPI ca profile pozitive. Datele au fost raportate ca procent mediu de celule verzi pozitive / celule totale numărate \pm abatere standard (S.D.).

4) Western Blotting

După tripsinizare, celulele ARPE-19 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 supernatanți au fost determinate prin Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, 500-0006). Proteinele au fost apoi separate prin electroforeză pe gel de poliacrilamidă cu dodecil sulfat de sodiu 10% și apoi electrotransferate pe membrane de difluorură de poliviniliden (Merck Millipore, IPFL10100). Acestea au fost blocate timp de 1 oră cu o soluție salină tamponată cu lapte 5% degresat/Tris Buffered Saline (Euroclone, EMR180500; Cell Signaling 12498) înainte de incubarea la 4°C peste noapte cu următorii anticorpi primari anti-Gal-1 (ThermoFisher PA5-95213; 0,3 ug/mL). Anticorpul secundar anti-rabbit (Santa Cruz, sc-2004; diluție 1:5000) conjugat cu peroxidază de hrean a fost utilizat pentru a incuba probele la temperatura camerei timp de 1 oră. Imunoreactivitatea a fost vizualizată printr-un sistem de chemiluminiscentă (ThermoFisher, 35055), apoi cuantificată 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 au fost normalizate prin utilizarea nivelurilor de proteină β -actină (Santa Cruz sc-47778, diluție 1:1000).

5) Analiza statistică

Rezultatele sunt raportate ca medie \pm S.D. din trei experimente independente, fiecare efectuată în triplicat. Semnificația statistică a fost determinată utilizând (ANOVA) urmată de testul de comparație al lui Tukey. O valoare P mai mică de 0,05 a fost considerată semnificativă pentru a respinge ipoteza nulă.

Rezultate

1) Celule ARPE

A) Viabilitatea celulară

Expunerea celulelor ARPE la HG (35 mM, HG) timp de 9 zile a modificat semnificativ morfologia celulară și a redus procentul de viabilitate celulară (48 ± 6 , $P < 0,01$ vs NG) în comparație cu celulele expuse numai la NG (5 mM). , NG; procent de viabilitate celulară: 90 ± 4) sau cu manitol 30 mM (NG+M; procent de viabilitate celulară: 87 ± 7).

B) Axa AP4 / Galectin 1

O creștere semnificativă a nivelurilor AP4S1 a fost evidentă în celulele HG (1086 ± 130 pg/ml; $P < 0,01$ vs NG) comparativ cu NG (494 ± 49 pg/ml) sau NG+M (493 ± 73 pg/ml). Supraexprimarea AP4 a fost paralelă cu o creștere semnificativă a procentului de celule pozitive Gal-1 în ARPE expus la HG (56 ± 10 ; $P < 0,01$ vs NG), care a fost absent în celulele ARPE expuse numai la NG (13 ± 4). %) sau cu manitol (19 ± 7 %). În consecință, nivelurile de proteină Gal-1 au fost semnificativ crescute în celulele HG în comparație cu NG singur sau în combinație cu manitol (fold= 10 ± 2 ; $P < 0,01$ vs NG).

2) Celule H9c2

A) Viabilitatea celulară

Expunerea celulelor H9c2 la HG (33 mM, HG) timp de 2 zile a modificat semnificativ morfologia celulelor și a redus procentul de viabilitate celulară (45 ± 9 , $P < 0,01$ vs NG) în comparație cu celulele expuse numai la glucoză normală (5,5 mM). , NG; procent de viabilitate celulară: 94 ± 3) sau cu manitol 27,5 mM (NG+M; procent de viabilitate celulară: 90 ± 5).

B) Axa AP4 / Galectin 1

O creștere semnificativă a nivelurilor AP4S1 a fost evidentă în celulele HG (1034 ± 54 pg/ml; $P < 0,01$ vs NG) comparativ cu NG (407 ± 23 pg/ml) sau NG+M (402 ± 53 pg/ml). Supraexprimarea AP4 a fost paralelă cu o creștere semnificativă a procentului de celule Gal-1 pozitive în celulele H9c2 expuse la HG (70 ± 4 ; $P < 0,01$ față de NG), care a fost absentă în celulele expuse numai la NG (20 ± 3). %) sau cu manitol (23 ± 4 %).

A 1.2. Studii in vitro asupra supraexprimării caii de semnalizare TGFβ1 în condiții hiperglicemice

Materiale and Metode

6) Culturi celulare

ARPE

Linia de celule epiteliale pigmentare retiniene adulte umane-19 (ARPE-19), obținută de la American Type Culture Collection (ATCC), au fost cultivate la 37°C și 5% CO₂ în amestecul de mediu/nutrienți modificat de la Dulbecco Eagle (DMEM/F12), Aurogene AU-L0093), cu o concentrație de glucoză de 5 mM. 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% NaHCO₃ (Thermo Fisher 25080094). La două zile după însămânțare, celulele au fost împărțite și expuse la 37°C și 5% CO₂ timp de 9 zile [1] la:

- 5 mM d-glucoză (normal glucose, NG);
- 35 mM d-glucoză (Life Technologies A24940-01) (high glucose, HG);
- 5 mM d-glucoză și 30 mM manitol (Sigma 69-65-8) ca și control negativ (NG+M).

Morfologia ARPE-19 a fost observată zilnic cu microscopul optic (Leica DMi1, Germania). După perioada de tratament, celulele și supernatantele au fost colectate și conservate pentru analiza. Pentru fiecare test, au fost efectuate trei experimente independente, fiecare făcut în triplicat.

H9c2

Celulele H9c2 cardiace embrionare de șobolan (2-1) (ECACC, Regatul Unit) au fost cultivate în mediu Eagle modificat de Dulbecco (DMEM; AU-L0101Aurogene, Italia), care conține 5,5 mM d-glucoză și suplimentat cu 10% FBS inactivat la căldură, 1% L-Glu și 1% P/S, la 37°C sub o atmosferă de 5% CO₂. Apoi, celulele H9c2 au fost expuse la 37°C și 5% CO₂ timp de 48 de ore [2] la:

- 5.5 mM d-glucoză (normal glucose, NG);
- 33 mM d-glucoză (high glucose, HG);
- 5.5 mM d-glucoză + 27.5 manitol ca și control negativ (NG+M).

Morfologia celulelor H9c2 a fost observată zilnic cu microscopul optic (Leica DMi1, Germania). După perioada de tratament, celulele și supernatantele au fost colectate și conservate pentru analiza. Pentru fiecare test, au fost efectuate trei experimente independente, fiecare realizat în triplicat.

2) Analiza speciilor reactive de oxigen (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. Celulele ARPE-19 și H9c2 au fost însămânțate în plăci cu 6

godeuri (ambele 7 x 10⁴ celule/godeu) și au fost expuse la glucoză normală, glucoză ridicată sau manitol, așa cum s-a descris anterior. La sfârșitul perioadei de stimulare, celulele au fost încărcate cu 20 μM 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 cu un cititor de plăci fluorimetrice 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 martor negativ (CTR-) sau incubate cu H₂O₂ (100 pM) 30 min înainte de tripsinizare, ca și control pozitiv (CTR+).

3) *Immunofluorescență*

Pentru analiza imunocitochimică, ARPE-19 și H9c2 (ambele 25 × 10⁴ celule/godeu) au fost placate pe lame în plăci cu 24 de godeuri și expuse la glucoză normală, glucoză ridicată sau manitol, așa cum s-a descris anterior. Celulele au fost fixate cu paraformaldehidă 4% și spălate cu soluție salină în (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. Anticorprii primari au fost diluați în tampon de blocare PBS (1% BSA, 0,1% Triton X-100) și lamele au fost incubate peste noapte la 4°C în anticorpi primari anti- NF-κB (Cell Signaling 6956; diluție 1:500, la șoarece). Au fost utilizați anticorpi secundari anti-șoarece marcați cu fluorescent (Life Technologies A21202; diluție 1:1000) 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 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 de microscop a fost calculat prin numărul de celule pozitive verzi din 400 de celule analizate 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 verzi pozitive / celule totale numărate ± abatere standard (S.D.).

4) *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Testele ELISA au fost efectuate atât pentru celulele ARPE-19, cât și pentru celulele H9c2 pentru a analiza nivelurile celulare ale proteinei kinazei activate de mitogen p38 (MAPK, fosforilată/total) (RayBiotech, CBEL-P38-1), SMAD Family Member 2 (SMAD2), fosforilat/total) (LSBio, LS-F1057-1) și SMAD 4 (SMAD4, total) (LSBio, LS-F2315-1). Testele ELISA competitive au fost utilizate pentru a cuantifica Adapter Related Protein Complex 4 Subunit Sigma 1 (AP4S1, total) (My Biosource, MBS7206462 pentru ARPE-19 și ARP, E02A1578 pentru H9c2).

5) *Western Blotting*

După tripsinizare, celulele ARPE-19 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 metoda Bio-Rad Protein (Bio-Rad Laboratories, 500-0006). Proteinele au fost apoi separate prin electroforeză pe gel de poliacrilamidă cu dodecil sulfat de sodiu 10% și apoi electrotransferate pe membrane de difluorură de poliviniliden (Merck Millipore, IPFL10100). Acestea au fost blocate timp de 1 oră cu o soluție 5%

de lapte uscat degresat/Tris Buffered Saline (Euroclone, EMR180500; Cell Signaling 12498) înainte de incubarea la 4°C peste noapte cu anticorp uman primar anti-Nf-kB (Cell Signaling 6956S; diluție 1:1000). Anticorpul secundar anti-șoarece (Santa Cruz, sc-2005; diluție 1:5000) conjugat cu peroxidază de hrean a fost utilizat pentru a incuba probele la temperatura camerei timp de 1 oră. Imunoreactivitatea a fost vizualizată 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 proteine NFkB și IkbP au fost normalizate prin utilizarea nivelurilor de proteină p-actină (Santa Cruz sc-47778, diluție 1:1000).

6) *Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR (qRT-PCR)*

ARN-ul total a fost izolat din lizatele ARPE-19 și H9c2 utilizând kitul 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 transcripție inversă (RT), efectuată pe sistemul Gene AMP PCR System 9700 (Applied Biosystems) folosind kitul QuantiTect Reverse Transcription (205311, Qiagen), conform protocolului „Transcriere inversă cu eliminarea ADN-ului genomic pentru PCR cantitativ, în timp real”. Pasul final pentru analiza Real Time PCR (qPCR) a fost efectuat în triplicat pe CFX96 Real-time System C1000 Touch Thermal Cycler (BIORAD). Aceasta a fost efectuată 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 [Transforming Growth Factor β 1 (TGF- β 1): QT00000728 și QT00187796; Receptorul 1 al factorului de creștere transformator p (TGF-pR1): QT00083412 și QT00190953; Transforming Growth Factor β receptor 2 (TGF- β R2): QT00014350 și QT01800596). Cuantificarea relativă a expresiei genelor a fost realizată prin utilizarea metodei $2^{-\Delta\Delta Ct}$, prin utilizarea GAPDH (QT00079247 și QT01082004) ca genă de control.

7) *Analiza statistică*

Rezultatele sunt raportate ca medie \pm S.D. din trei experimente independente, fiecare efectuată în triplicat. Semnificația statistică a fost determinată utilizând (ANOVA) urmată de testul de comparație al lui Tukey. O valoare P mai mică de 0,05 a fost considerată semnificativă pentru a respinge ipoteza nulă.

Rezultate

Celule ARPE

A). Calea de semnalizare TGF β / SMAD

Celulele ARPE au prezentat o supraexprimare a TGF- β 1 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: $4,8 \pm 0,9$; $P < 0,01$ față de NG), TGF- β R1 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: $2,1 \pm 0,6$; $P < 0,05$ față de NG) și față de niveluri de ARNm a TGF- β R2 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: $2,8 \pm 0,3$; $P < 0,01$ vs NG) comparativ cu celulele NG ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ pentru TGF- β 1: $1,9 \pm 0,4$; $2^{-\Delta\Delta Ct}$ pentru TGF- β R1: 0.0121 ; $2^{-\Delta\Delta Ct}$ pentru TGF-pR2: $1,2 \pm 0,2$). Celulele NG+M nu au

prezentat modificări ale nivelurilor de ARNm în comparație cu grupul NG ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ pentru TGF- β 1: $2,0 \pm 0,4$; $2^{-\Delta\Delta Ct}$ pentru TGF- β R1: $1,2 \pm 0,2$; $2^{-\Delta\Delta Ct}$ pentru TGF- β R2: $1,1 \pm 0,2$).

În mod similar, stimularea cu HG a celulelor ARPE a crescut nivelurile de pSMAD2 ($1,9 \pm 0,5$ OD; $P < 0,01$ vs NG), SMAD2 ($1,3 \pm 0,2$ OD; $P < 0,01$ vs NG) și SMAD4 ($2,0 \pm 0,1$ OD; $P < 0,01$ vs NG). Aceste supraexprimări nu au fost demonstrate și în cazul celulele expuse la NG (pSMAD2: $0,5 \pm 0,2$; SMAD2: $0,5 \pm 0,1$; SMAD4: $0,6 \pm 0,3$ OD) sau la NG+M (pSMAD2: $0,6 \pm 0,3$; SMAD2: $0,03 \pm 0,3$; SMAD4: $0,7 \pm 0,2$ OD).

Celule H9c2

A) Calea de semnalizare p38 MAPK / NF-kB / ROS

Celulele ARPE expuse la HG au prezentat o creștere semnificativă a raportului MAPK P-p38 / p38 ($3,4 \pm 0,6$; $P < 0,01$ vs NG), comparativ cu celulele expuse la NG ($1,5 \pm 0,4$) și la NG+M ($1,6 \pm 0,3$). Fosforilarea p38 MAPK a fost corelată cu un procent mai mare de celule NF-kB pozitive (69 ± 11 ; $P < 0,01$ vs NG) și niveluri mai mari de proteine Nf-kB (ori = 100 ± 17) în tratamentul cu HG, precum și cu o creștere semnificativă a nivelurilor ROS (% din DFCH-DA: 66 ± 6 ; $P < 0,01$ vs NG).

B) Calea de semnalizare TGF β / SMAD

Celulele HG au prezentat o supraexprimare a TGF- β 1 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: $3,9 \pm 0,3$; $P < 0,01$ față de NG), TGF- β R1 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: $2,1 \pm 0,3$; $P < 0,05$ față de NG) și a nivelurilor de ARNm a TGF- β R2 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: $1,7 \pm 0,3$; $P < 0,01$ vs NG) comparativ cu celulele NG ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ pentru TGF- β 1: $1,6 \pm 0,4$; $2^{-\Delta\Delta Ct}$ pentru TGF- β R1: $\pm 0,140$; $2^{-\Delta\Delta Ct}$ pentru TGF- β R2: $0,7 \pm 0,2$). Celulele NG+M nu au prezentat modificări ale nivelurilor de ARNm comparativ cu grupul NG ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ pentru TGF- β 1: $1,7 \pm 0,6$; $2^{-\Delta\Delta Ct}$ pentru TGF- β R1: $1,1 \pm 0,5$; $2^{-\Delta\Delta Ct}$ pentru TGF- β R2: $0,8 \pm 0,3$).

În mod similar, stimularea cu HG a celulelor H9c2 a crescut pSMAD2 ($2,4 \pm 0,3$ OD; $P < 0,01$ vs NG), nivelurile de SMAD2 ($1,9 \pm 0,1$ OD; $P < 0,01$ vs NG) și SMAD4 ($2,3 \pm 0,3$ OD; $P < 0,01$ vs NG). Aceste supraexprimări nu au fost prezentate de celulele expuse la NG (pSMAD2: $0,8 \pm 0,3$; SMAD2: $0,9 \pm 0,2$; SMAD4: $1,0 \pm 0,2$ OD) sau la NG+M (pSMAD2: $0,9 \pm 0,1$; SMAD2: $0,03 \pm 0,2$; SMAD4: $1,0 \pm 0,2$ OD).

C) Calea de semnalizare p38 MAPK / NF-kB / ROS

Celulele H9c2 expuse la HG au prezentat o creștere semnificativă a raportului MAPK P-p38 / p38 ($2,6 \pm 0,3$; $P < 0,01$ vs NG), comparativ cu celulele expuse la NG ($1,0 \pm 0,2$) și la NG+M ($1,0 \pm 0,2$). Fosforilarea p38 MAPK a fost corelată cu un procent mai mare de celule NF-kB pozitive în tratamentul cu HG (73 ± 4 ; $P < 0,01$ vs NG), precum și cu niveluri semnificativ crescute de ROS (% din DFCH-DA: 65 ± 11 ; $P < 0,01$ vs NG). Acestea au fost mai mici în celulele stimulate cu NG (% din celulele NF-kB pozitive: 11 ± 3 ; % din DFCH-DA: 11 ± 3) și NG+M (% din celulele NF-kB pozitive: 14 ± 3 ; % a DFCH-DA: 13 ± 3).

Referinte bibliografice

1. Maisto R.; Oltra M.; Vidal-Gil L.; Martínez-Gil N.; Sancho-Pellúz J.; Di Filippo C.; Rossi S.; D'Amico M.; Barcia J.M.; Romero F.J. ARPE-19-derived VEGF-containing exosomes promote neovascularization in HUVEC: the role of the melanocortin receptor 5. *Cell Cycle*, 2019, 18(4): 413-24, doi: 10.1080/15384101.2019.1568745.
2. Trotta M.C.; Maisto R.; Alessio N.; Hermenean A.; D'Amico M.; Di Filippo C. The melanocortin MC5R as a new target for treatment of high glucose-induced hypertrophy of the cardiac H9c2 cells, *Front Physiol.*, 2018, 9:1475, doi: 10.3389/fphys.2018.01475.

A 2.1. Obținerea și caracterizarea noului complex supramolecular

Materiale and Metode

1. Materiale

Calixarene 0118 (OTX008) a fost achiziționat de la Selleck Chemicals GmbH. Sarea de sodiu a β -ciclodextrinei sulfobutilată (SBECD) (DS~4) și polimerul de beta-ciclodextrină sulfobutilată solubil (SBECDPolymer) au fost achiziționate de la Cyclolab SRL (Budapesta, Ungaria). Chrysin (5,7-Dihidroxi flavona) a fost achiziționată de la Alfa Aesar (de ThermoFisher Scientific, Kandel, Germania), iar toți ceilalți reactivi sunt de la Sigma.

2. Metode

2.1. Teste de solubilitate

2.1.1. Solubilizarea OTX008 cu SBECD și SBECDPolymer

La început s-au preparat soluțiile 7,3 m/m% SBECD și 9,6 m/m% SBECDpolymer folosind apă ultrapură (sistem Millipore Direct-Q 5UV, Merck Millipore, Burlington, MA, SUA), apoi OTX008 a fost dizolvat în soluțiile de ciclodextrină la 0,75 mg/ml pentru a obține soluții de OTX-SBECD și OTX-SBECDPolymer.

2.1.2. Solubilizarea crisinei în soluțiile OTX008-ciclodextrine

Crizina a fost adăugată în exces la soluțiile OTX-SBECDPolymer și OTX-SBECDP preparate prin metoda 2.1.1. și agitate în flacoane închise timp de 72 de ore la temperatura camerei. După incubare, probele au fost centrifugate la 11000 rpm timp de 10 minute, supernatantul limpede a fost îndepărtat și concentrația de crizină dizolvată a fost măsurată cu spectrofotometru UV (Shimadzu UV-1900) la 270 nm. Solubilizarea crisinei a fost de asemenea efectuată în soluții de polimer 7,3 m/m% SBECD și 9,6 m/m% SBE β CDPolymer fără OTX008 cu aceeași incubare și preparare a probei.

Soluțiile limpezi de crizină au fost congelate la -110 ° C, iar probele au fost liofilizate folosind un uscător prin congelare ScanVac CoolSafe (Labogene, Allerød, Danemarca). Complexele au fost depozitate la -20 ° C până când au fost utilizate în experimente ulterioare.

2.1.3. Analiza Phase-solubility

Soluțiile 7,3 m/m% SBECD, 9,6 m/m% SBECDPolymer, OTX-SBECD și OTX-SBECDPolymer au fost preparate și diluate în plăci cu 96 de godeuri cu apă ultrapură. S-a adăugat o cantitate în exces de crizină în fiecare godeu, placa a fost sigilată cu sigilant pentru plăci și a fost agitată timp de 72 de ore la temperatura camerei. Probele au fost filtrate cu o placă de filtrare MultiScreen SolvInert cu 96 godeuri (dimensiunea porilor 0,45 μ m, PTFE, Merck Millipore Ltd. Tullagreen, Irlanda) utilizând un colector de vid MultiScreen Resist (EMD Millipore Corporation, Burlington MA, SUA). Supernatantele limpezi au fost plasate pe o placă Greiner UV-Star® cu 96 de godeuri. Probele au fost măsurate la 270 nm cu un cititor de microplăci Thermo Fisher Multiskan Go (Thermo Fisher, Waltham, MA, SUA).

2.1.4. Măsurarea distribuției mărimii complexelor de ciclodextrină prin metoda DLS

Distribuția dimensională a particulelor în soluție SBECD 7,3 m/m%, soluție SBECDPolymer 9,6 m/m%, soluții OTX-SBECD și OTX-SBECDPolymer cu crisina complexată după testul de solubilitate în fază sau fără crisină, a fost determinată cu Nano-ZS Malvern Zetasizer (Malvern Instruments, Malvern, Marea Britanie).

2.1.5. Determinarea solubilității crisinei dependentă de pH

Soluțiile SBECD 7,3 m/m% au fost preparate în tampon acetat de sodiu - acid acetic cu diferite valori ale pH-ului (pH= 3,65; 5,75; 7,45; 9,95) și plasate într-o placă 96. Cantitatea în exces de crisină a fost adăugată în godeuri, placa a fost sigilată, iar solubilitatea crisinei a fost determinată așa cum este descrisă la 2.1.3.

Într-o altă configurație experimentală, pH-ul soluțiilor de 7,3 m/m% SBECD și OTX-SBECD a fost stabilit la 8,64 și 3,65 cu soluție de acetat de sodiu 0,2 M și respectiv HCl 0,1 M și testul de solubilizare a crisinei a fost efectuat așa cum s-a descris mai sus.

A 1.4. Diseminare

Participări la conferințe internaționale:

Fenyvesi Ferenc, Váradi Judit, Bácskay Ildikó, Vecsernyés Miklós, Anca Hermenean, Simultaneous application of calixarene and cyclodextrin for solubility improvement, Gyógyszerkéimiai és Gyógyszertechnológiai Szimpózium '21, Herceghalom 2021. szeptember 20-21 **Prezentare orală.**

Ferenc Fenyvesi, Judit Váradi, Hildegard Herman, Cornel Balta, Anca Hermenean, Application of cyclodextrins and calixarenes in the nanoformulations of bioactive compounds, 42nd Anniversary Symposium Of The Institute Of Cellular Biology And Pathology "Nicolae Simionescu" and 38th Annual Scientific Session Of The Romanian Society For Cell Biology. Virtual. Book of abstracts, p. 53 **Prezentare orală**

Maria Consiglia Trotta, Petrillo, Gesualdo, Rossi R, D'Amico M, Anca Hermenean, **Effects of the calix[4]arene derivative compound OTX0088 on high glucose-stimulated ARPE19 cells: focus on Galectin-1/TGFβ/EMT pathway (manuscript)**