

RAPORT ȘTIINȚIFIC FINAL

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

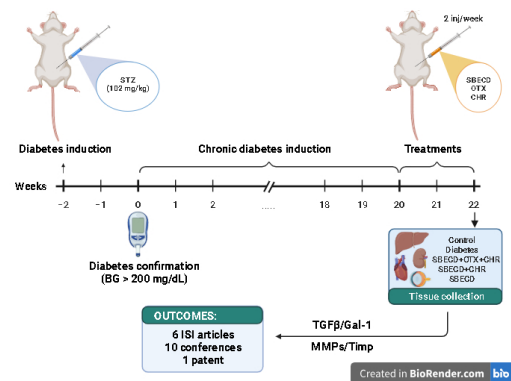
PN-III-P4-ID-PCE-2020-1772

<https://proiecte.uvvg.ro/DDSFLAVODIA/>

Director proiect: Prof.dr. Anca Hermenean
Universitatea de Vest Vasile Goldiș din Arad

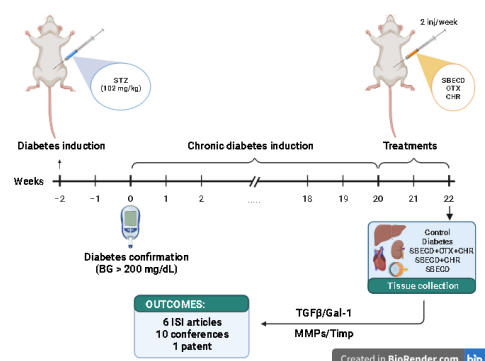
I. Rezumatul proiectului lb. romana

Diabetul și complicațiile sale constituie o amenințare semnificativă pentru sănătatea publică la nivel mondial. Scopul actualului proiect a fost de a dezvolta un nou nanosistem pentru eliberarea de flavonoide (crisina) folosind purtători supramoleculari prin utilizarea atât a calixarenelor, cât și a ciclodextrinelor, concepute pentru a viza căile de semnalizare TGFβ și Galectina-1 (Gal-1) pentru reversia fibrozei în complicațiile diabetului zaharat. Cercetarile noastre au contribuit la clarificarea rolului Gal-1 în progresia fibrozei în condiții de hiperglicemie prin studii *in vitro*. De asemenea, am realizat proiectarea, dezvoltarea și caracterizarea acestui nou drug-delivery system (DDS) pentru flavonoidul crisina care vizează fibroza în complicațiile diabetului și am brevetat acest produs inovativ. În plus, proprietățile antifibrotice ale DDS și mecanismele sale moleculare au fost evaluate *in vitro* și validate *in vivo* într-un model animal de diabet cronic. Indicatorii de rezultat includ 6 articole ISI, 10 prezentări la conferințe naționale și internaționale și 1 brevet. Investigațiile noastre au abordat întrebări cheie privind identificarea de noi ținte moleculare posibile și potențiale terapii farmacologice pentru a atenua fibroza în diabetul cronic. Rezultatele științifice ale acestui proiect ar putea duce la furnizarea de informații științifice practice care ar putea fi utilizate de companiile de biotehnologie și medicale.



II. Rezumatul proiectului lb. engleza

Diabetes and its complications constitute a significant global health threat. The current project's goal was to develop a new nanosystem for delivering flavonoids (chrysin) using supramolecular carriers by employing both calixarenes and cyclodextrins, designed to target TGFβ and galectin-1 (Gal-1) signaling pathways for resolving fibrosis in diabetes complications. Our research contributed to clarifying the role of Gal-1 in fibrosis progression under hyperglycemic conditions through *in vitro* studies. We also accomplished the design, development, and characterization of a new flavonoid DDS targeting fibrosis in diabetic complications and have patented this novel product. Furthermore, the antifibrotic properties of the DDS and its molecular mechanisms were evaluated *in vitro* and validated *in vivo* in an animal model of chronic diabetes. Outcome indicators include 6 ISI articles, 10 presentations at national and international conferences, and 1 patent. Our investigations have addressed key questions regarding the identification of new



possible molecular targets and potential pharmacological therapies to mitigate fibrosis in chronic diabetes. The project results could lead to the provision of practical scientific information that might be utilized by biotechnology and medical companies.

III. Obiectivele prevăzute/realizate

Scopul cercetarilor incluse in acest proiect a fost de a proiecta si dezvolta un nou sistem ternar drug-delivery pentru flavonoide în formulare de tip ciclodextrine-calixarene, conceput pentru a atenua fibroza în complicațiile diabetului prin țintirea căilor profibrotice TGFβ/Gal-1. In primul rand acest sistem supramolecular a combinat flavonoidul crisina cu β-ciclodextrină sulfobutilată (SBECD) pentru a îmbunătăți solubilitatea sa limitată în apă; apoi am integrat calixarena OTX008, cunoscută pentru proprietățile sale inhibitoare a lectinei galectina -1 (Gal-1), conferind potential pentru o activitatea antifibrotica duala data de crisina si de OTX.

Obiectivul 1. *Evaluarea rolului Gal-1 asupra progresiei fibrozei în condiții de hiperglicemie.*

Ne-am propus sa studiem rolul Gal-1 ca modulator al progresiei fibrozei, cu un accent deosebit pe efectele sale asupra semnalizării TGFβ și asupra implicării în remodelarea și depunerea componentelor matricei extracelulare (ECM). Am contribuit la elucidarea acestui aspect neexplorat studiind suprareglarea celulară a Gal-1 în condiții fiziologice sau hiperglicemice pe liniile celulare umane RPE ARPE-19 și, respectiv, embrionare de șobolan cardiac H9c2 (A1.1). În al doilea rând, am stabilit semnificația Gal-1 în promovarea procesului de fibrogeneză si implicarea in supraexprimarea caii de semnalizare TGF-β într-o buclă de feedback pozitiv (A1.2), mecanisme care pot fi in continuare considerate importante ținte farmacologice în complicațiile fibrotice ale diabetului cronic.

100% indeplinit (Activitatile A1.1; A1.2)

Obiectivul 2. *Proiectarea, dezvoltarea și caracterizarea unui nou DDS pentru flavonoide care vizează fibroza în complicațiile diabetului.* Acesta este un obiectiv cheie în care am realizat proiectarea, dezvoltarea si caracterizarea unui nou DDS supramolecular pentru flavonoidul crisina prin utilizarea atât a calixarenei OTX, cât și a ciclodextrinei (SBECD) (A2.1), cu scopul de a îmbunătăți solubilitatea și biodisponibilitatea crisinei.

100% indeplinit (Activitatile A2.1.)

Obiectivul 3. *Evaluarea in vitro și validarea in vivo a efectelor antifibrotice ale noului DDS pentru flavonoide care vizează fibroza în complicațiile diabetului.* Evaluarea efectelor biologice antifibrotice ale noului DDS s-a realizat atat in vitro (A 3.1.), precum și prin experimente in vivo (A 3.2. - A 3.7.). Am identificat mecanismele celulare si moleculare ale activitatii antifibrotice ale noului compus supramolecular ternar pe baza de calixarene-ciclodextrine.

100% indeplinit (Activitatile A 3.1. - A 3.7)

IV. Rezultate obținute

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

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

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).

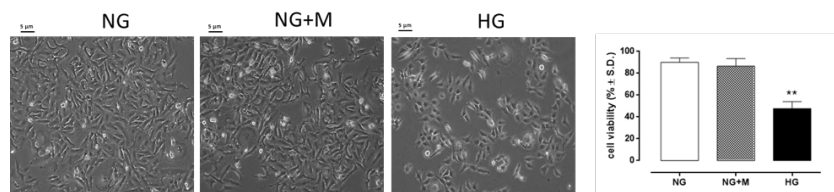


Figura 1. Morfologia celulelor ARPE si viabilitatea celulara in conditii experimentale

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 expuse la HG (56 ± 10 ; $P < 0,01$ vs NG), și absentă 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 sau în combinație cu manitol (fold= 10 ± 2 ; $P < 0,01$ vs NG).

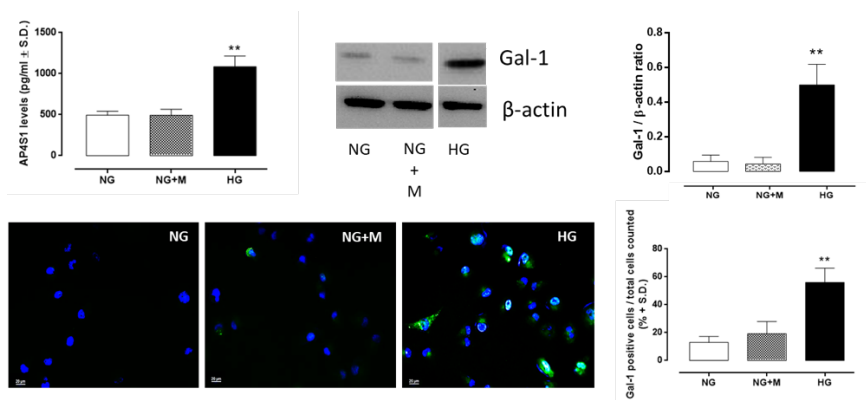


Figura 2. Axa AP4 / Galectin in celulele ARPE expuse la conditii normo- si hiperglicemice

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).

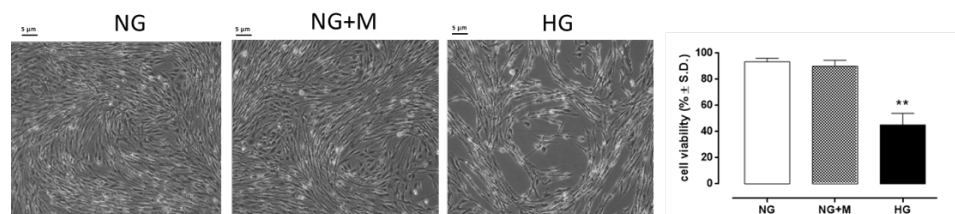


Figura 3. Morfologia celulelor H9c2 și viabilitatea celulară în condiții experimentale

B) Axa AP4 / Gal-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 %).

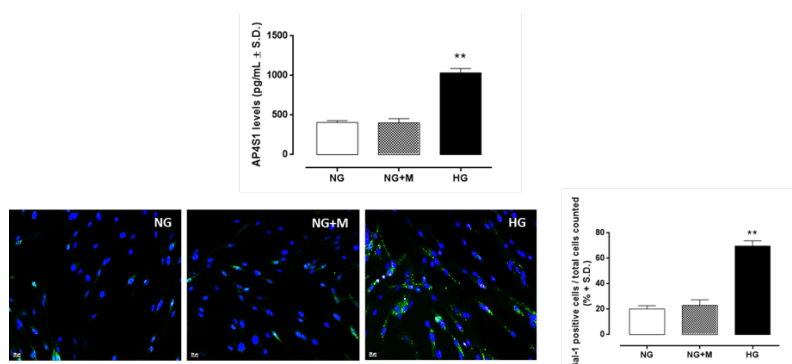


Figura 4. Axa AP4 / Galectin în celulele ARPE expuse la condiții normo- și hiperglicemice

Activitatea 1.2. Studii in vitro asupra supraexprimării cailor de semnalizare TGFβ1 în condiții hiperglicemice

Atât ARPE (vezi raportul etapa 2), cât și celulele H9c2 au prezentat o supraexprimare a nivelurilor de ARNm TGF-β1, TGF-βR1 și TGF-βR2 în HG comparativ cu celulele în condiții 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 obținută și în condiții experimentale de NG sau NG+M.

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-κB pozitive și niveluri mai mari de proteine NF-κB în tratamentul cu HG, precum și cu niveluri semnificativ crescute de ROS (vezi raportul etapa 2).

Calea de semnalizare p38 MAPK / NF-κB / ROS

Celulele H9c2 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).

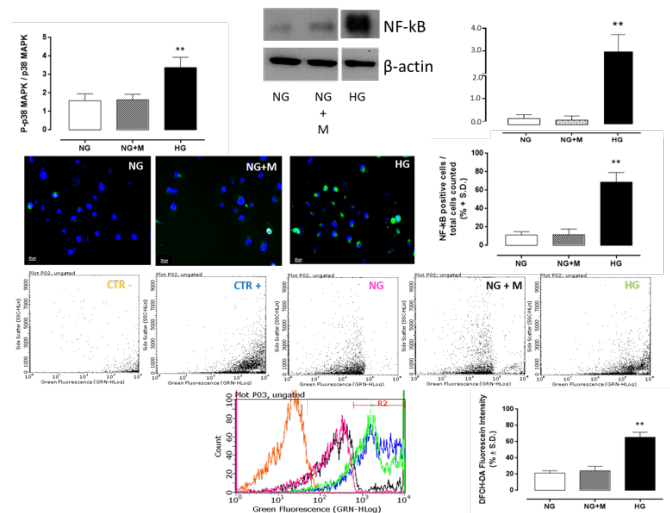


Figura 5. Calea de semnalizare p38 MAPK / NF-kB / ROS in celulele H9c2 expuse la HG

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).

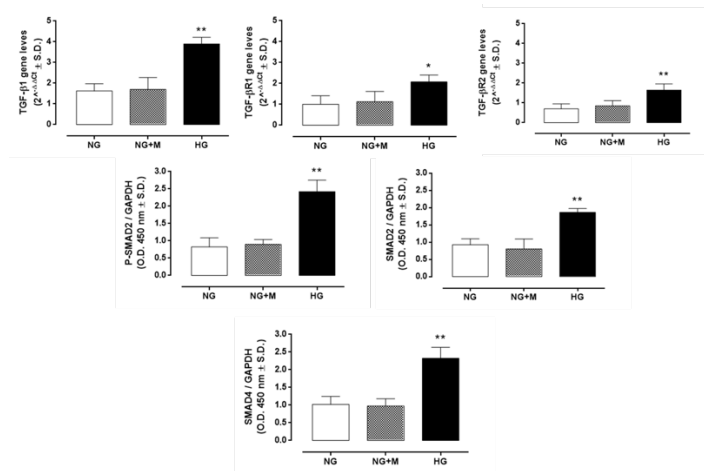


Figura 6. Calea de semnalizare TGF β / SMAD in celulele H9c2 expuse la HG

Calea de semnalizare p38 MAPK / NF- κ B / 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- κ B 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- κ B pozitive: 11 ± 3 ; % din DFCH-DA: 11 ± 3) și NG+M (% din celulele NF- κ B pozitive: 14 ± 3 ; % a DFCH-DA: 13 ± 3).

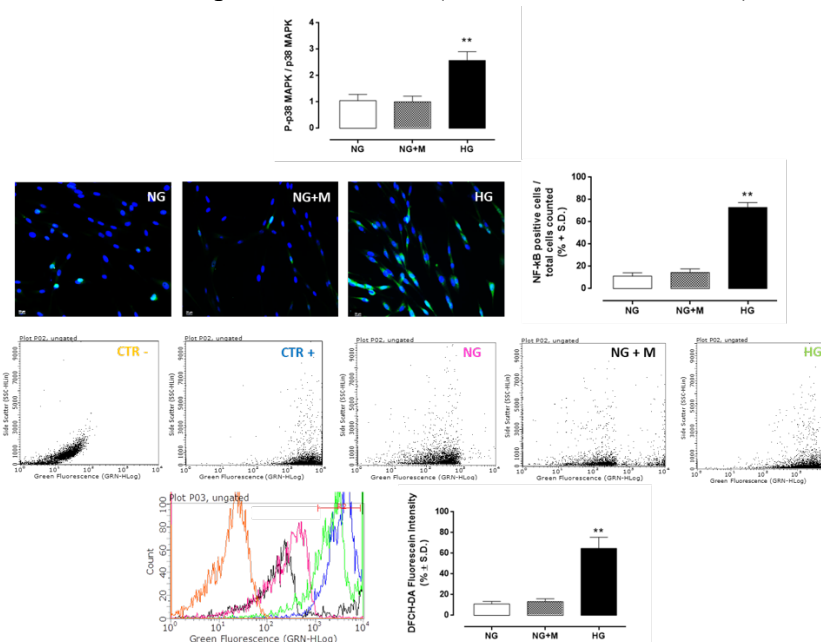


Figura 7. Calea de semnalizare p38 MAPK / NF- κ B / ROS in celulele H9c2 expuse la HG

A 2.1. Obținerea și caracterizarea noului complex supramolecular

Pentru obținerea și caracterizarea noului complex supramolecular au fost utilizate o varietate de tehnici de investigație propuse în propunerea proiect, dar și metodologii experimentale noi, cum ar fi dynamic light scattering, rezonanța magnetică nucleară, calorimetria cu scanare

diferențială și modelarea computațională, care au fost aplicate în special pentru a investiga interacțiunile moleculare din cadrul complexului ternar ciclodextrină-calixarene-CHR. (<https://doi.org/10.1101/2023.10.03.560552>).

Activitatea 3.1. Evaluarea *in vitro* a efectelor antifibrotice și a mecanismelor moleculare ale noului DDS

În această activitate am realizat evaluarea *in vitro* a efectelor antifibrotice și a mecanismelor moleculare antifibrotice pentru complexul supramolecular OTX/ sulfobutylether- β -ciclodextrin (simplu și polimer) încărcat cu crisină (CHR) pe 2 tipuri de culturi celulare: cardiomiocite (*H9c2*) și celule epiteliale retiniene (*ARPE-19*). Complexul supramolecular OTX/SBEC/CHR a inhibat *in vitro* căile de semnalizare TGF β /Gal-1; Gal-1, TGF β 1, TGFBR1/2, SMAD2/4, precum și expresiile ERK, MAPK, NF- κ B, ROS.

Viabilitatea celulară

Viabilitatea celulelor H9c2 nu a fost scăzută în mediul NG sau HG prin expunerea la CHR, SBEC, SBECD, SBECD+CHR, SBECDP+CHR, DMSO sau M. În plus, toate dozele de OTX testate (2,5-1,25-0,75 μ M) singure și în combinație cu SBEC/SBECD sau SBEC/SBECDP+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 SBEC/SBECDP a crescut semnificativ viabilitatea celulară la toate cele 3 doze analizate. OTX combinat cu SBEC/SBECDP+CHR a fost eficient începând de la 1,25 μ M. Interesant, doza maximă de OTX (2,5 μ M) a fost mai eficientă în creșterea viabilității celulelor atunci când a fost combinată cu SBEC/SBECDP sau SBEC+CHR (Figura 8).

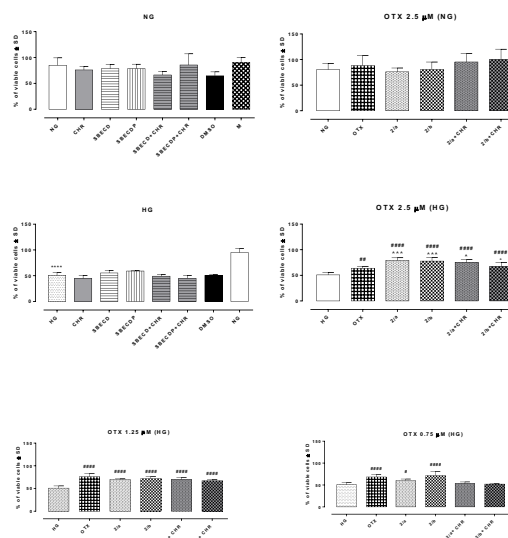


Figura 8: Viabilitatea celulelor H9c2 determinată prin test MTT și raportată ca % din viabilitatea celulară \pm SD. **NG** = 5.5 mM D-glucose; **HG** = 33 mM D-glucose; **CHR** = chrysin 0.399 mg/ml; **SBEC** = sulfobutylether- β -ciclodextrin 7.3 m/m%; **SBECDP** = sulfobutylether- β -ciclodextrin polymer 9,6 m/m%; **SBECD+CHR** = SBEC+0.095 mg/ml CHR; **SBECDP+CHR** = SBECDP+0.0836 mg/ml CHR; **DMSO** = dimethyl sulfoxide 2.5%; **M** = mannitol 27.5 mM; **OTX**

= OTX008 (2.5-1.25-0.75 μ M); **2/a** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD; **2/b** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD; **2/a + CHR** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD-CHR (0.324 mg/ml); **2/b + CHR** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD-CHR (0.399 mg/ml). **** P < 0.0001 vs NG### P < 0.01 and ##### P < 0.0001 vs HG; ^ P < 0.05 and ^^ P < 0.001 vs OTX; ° P < 0.05 vs 2/b.

Morfologia celulară

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 μ M singure și în combinație cu SBECD/SBECDP sau SBECD/SBECDP+CHR nu au modificat viabilitatea celulară în condiții NG (Figura 9A).

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 sau cu SBECD/SBECDP+CHR a reușit să reducă pierderea și micșorarea celulelor, prin restabilirea parțială a morfologiei cardiomiocitelor la forma alungită tipică (Figura 9B).

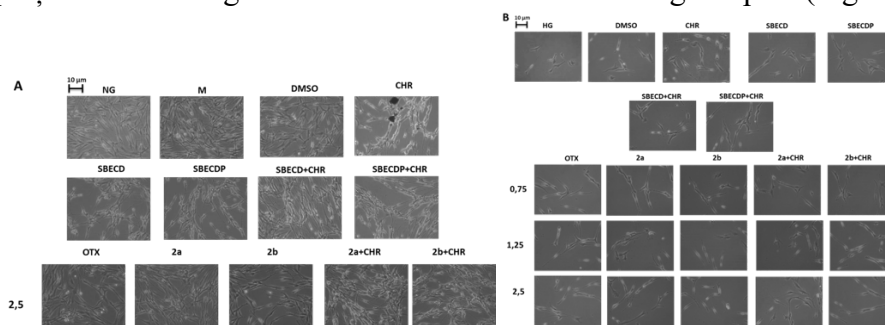


Figura 9: A) Analiza microscopică a celulelor H9c2 în NG și B) HG, după tratamentele cu diferiți compuși. **NG** = 5.5 mM D-glucose; **HG** = 33 mM D-glucose; **CHR** = chrysin 0.399 mg/ml; **SBECD** = sulfobutylether- β -cyclodextrin 7.3 m/m%; **SBECDP** = sulfobutylether- β -cyclodextrin polymer 9,6 m/m%; **SBECD+CHR** = SBECD+0.095 mg/ml CHR; **SBECDP+CHR** = SBECDP+0.0836 mg/ml CHR; **DMSO** = dimethyl sulfoxide 2.5%; **M** = mannitol 27.5 mM; **OTX** = OTX008 (2.5-1.25-0.75 μ M); **2/a** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD; **2/b** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD; **2/a + CHR** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD-CHR (0.324 mg/ml); **2/b + CHR** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD-CHR (0.399 mg/ml). 20X Magnification, scale bar = 10 μ m.

Calea de semnalizare TGF- β 1

Nivelurile de ARNm TGF- β 1 au fost semnificativ up-regulate prin expunerea la HG în celulele H9c2, în timp s-a înregistrat o reducere semnificativă a expresiei genice în cazul celulelor H9c2 expuse la HG și tratate cu CHR, SBECD/SBECDP sau SBECD/SBECDP+CHR (2/a+CHR, 2/b+CHR). TGF- β 1 a fost redus și în celulele expuse la HG și tratate cu OTX singur, 2/a și 2/b începând de la 0,75 μ M, 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- β 1 în celulele HG. Reducerea maximă a TGF- β 1 a fost observată în celulele HG expuse la 2/a, 2/b și 2/a+CHR care conține OTX 2,5 pM (Figura 10). Aceeași tendință a fost detectată pentru nivelurile de ARNm TGF- β R1 (Figura 11) și TGF- β R2 (Figura 12).

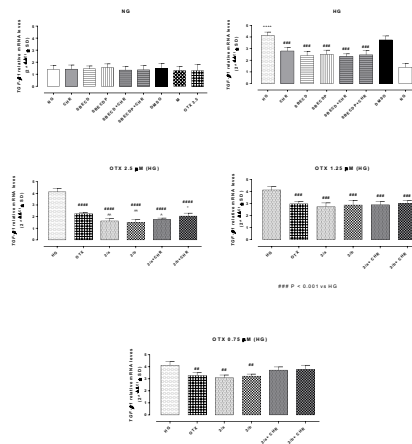


Figura 10: Nivelul de mRNA TGF- β 1, raportat ca $2^{\Delta\Delta Ct} \pm SD$, prin utilizarea GAPDH ca genă control. **NG** = 5.5 mM D-glucose; **HG** = 33 mM D-glucose; **CHR** = chrysin 0.399 mg/ml; **SBECD** = sulfobutylether- β -cyclodextrin 7.3 m/m%; **SBECDP** = sulfobutylether- β -cyclodextrin polymer 9,6 m/m%; **SBECD+CHR** = SBECD+0.095 mg/ml CHR; **SBECDP+CHR** = SBECDP+0.0836 mg/ml CHR; **DMSO** = dimethyl sulfoxide 2.5%; **M** = mannitol 27.5 mM; **OTX** = OTX008 (2.5-1.25-0.75 μ M); **2/a** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD; **2/b** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD; **2/a + CHR** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD-CHR (0.324 mg/ml); **2/b + CHR** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD-CHR (0.399 mg/ml). **** P < 0.0001 vs NG; ### P < 0.01, #### P < 0.001 and ##### P < 0.0001 vs HG; ^ P < 0.05 and ^^ P < 0.01 vs OTX; ° P < 0.05 vs 2/b.

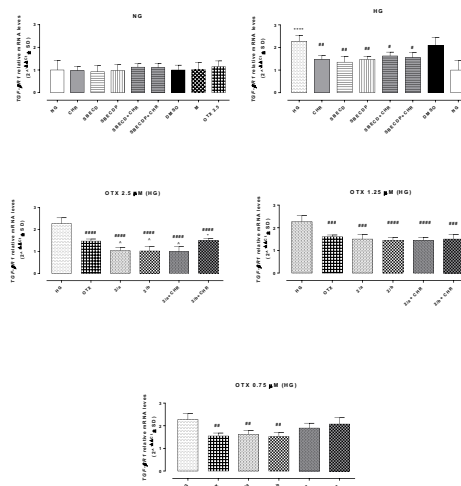


Figura 11: Nivelul de mRNA TGF- β R1, raportat ca $2^{\Delta\Delta Ct} \pm SD$, prin utilizarea GAPDH ca genă control. **NG** = 5.5 mM D-glucose; **HG** = 33 mM D-glucose; **CHR** = chrysin 0.399 mg/ml; **SBECD** = sulfobutylether- β -cyclodextrin 7.3 m/m%; **SBECDP** = sulfobutylether- β -cyclodextrin polymer 9,6 m/m%; **SBECD+CHR** = SBECD+0.095 mg/ml CHR; **SBECDP+CHR** = SBECDP+0.0836 mg/ml CHR; **DMSO** = dimethyl sulfoxide 2.5%; **M** = mannitol 27.5 mM; **OTX** = OTX008 (2.5-1.25-0.75 μ M); **2/a** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD; **2/b** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD; **2/a + CHR** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD-CHR (0.324 mg/ml); **2/b + CHR** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD-CHR (0.399 mg/ml). **** P < 0.0001 vs NG; # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001 and ##### P < 0.0001 vs HG; ^ P < 0.05 vs OTX; ° P < 0.05 vs 2/b.

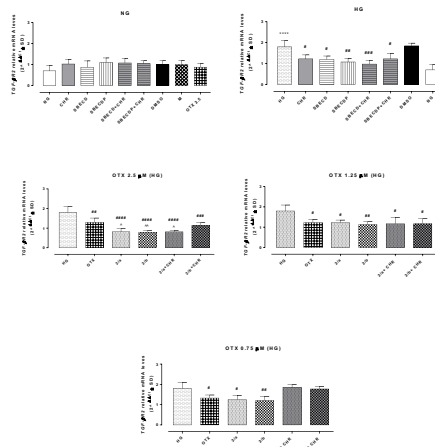


Figura 12: Nivelul de mRNA TGF- β 2, raportat ca $2^{-\Delta\Delta C_t} \pm SD$, prin utilizarea GAPDH ca genă control. **NG** = 5.5 mM D-glucose; **HG** = 33 mM D-glucose; **CHR** = chrysin 0.399 mg/ml; **SBECD** = sulfobutylether- β -cyclodextrin 7.3 m/m%; **SBECDP** = sulfobutylether- β -cyclodextrin polymer 9,6 m/m%; **SBECD+CHR** = SBECD+0.095 mg/ml CHR; **SBECDP+CHR** = SBECDP+0.0836 mg/ml CHR; **DMSO** = dimethyl sulfoxide 2.5%; **M** = mannitol 27.5 mM; **OTX** = OTX008 (2.5-1.25-0.75 μ M); **2/a** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD; **2/b** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD; **2/a + CHR** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD-CHR (0.324 mg/ml); **2/b + CHR** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD-CHR (0.399 mg/ml). **** P < 0.0001 vs NG; # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001 and #### P < 0.0001 vs HG; ^ P < 0.05 and ^^ P < 0.01 vs OTX.

SMAD2 și SMAD4

Ambele nivele de SMAD2 și SMAD4 nu au fost afectate de CHR, SBECD, SBECDP, SBECD+CHR, SBECDP+CHR, DMSO sau M in ambele NG sau HG (Figura 13, 14). 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 μ M 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 13, 14).

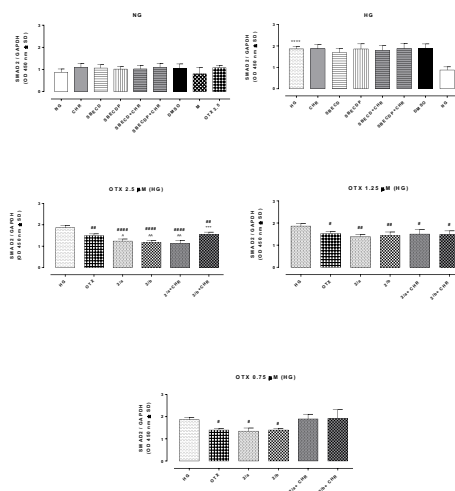


Figura 13 : Nivelurile proteinei SMAD2, raportate ca valori ale densității optice (OD) la 450 nm $\pm SD$ sunt calculate utilizând GAPDH ca si control. **NG** = 5.5 mM D-glucose; **HG** = 33 mM D-glucose; **CHR** = chrysin 0.399 mg/ml; **SBECD** = sulfobutylether- β -cyclodextrin 7.3 m/m%; **SBECDP** = sulfobutylether- β -cyclodextrin polymer 9,6 m/m%; **SBECD+CHR** = SBECD+0.095 mg/ml CHR; **SBECDP+CHR** = SBECDP+0.0836 mg/ml CHR; **DMSO** = dimethyl sulfoxide 2.5%; **M** = mannitol 27.5 mM; **OTX** = OTX008 (2.5-1.25-0.75 μ M); **2/a** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD; **2/b** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD; **2/a + CHR** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD-CHR (0.324 mg/ml); **2/b + CHR** =

OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD-CHR (0.399 mg/ml). **** P < 0.0001 vs NG; # P < 0.05, ## P < 0.01 and #### P < 0.0001 vs HG; ^ P < 0.05 and ^^ P < 0.01 vs OTX; °°° P < 0.001 vs 2/b.

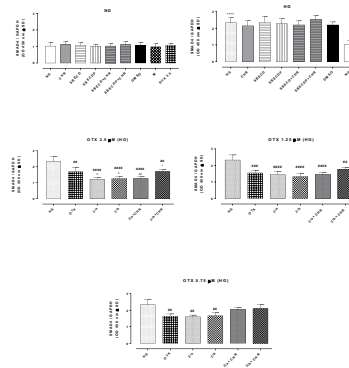


Figura 14: Nivelurile proteinei SMAD4, raportate ca valori ale densității optice 450 nm \pm SD sunt calculate utilizând GAPDH ca si control. **NG** = 5.5 mM D-glucose; **HG** = 33 mM D-glucose; **CHR** = chrysin 0.399 mg/ml; **SBECD** = sulfobutylether- β -cyclodextrin 7.3 m/m%; **SBECDP** = sulfobutylether- β -cyclodextrin polymer 9,6 m/m%; **SBECD+CHR** = SBECD+0.095 mg/ml CHR; **SBECDP+CHR** = SBECDP+0.0836 mg/ml CHR; **DMSO** = dimethyl sulfoxide 2.5%; **M** = mannitol 27.5 mM; **OTX** = OTX008 (2.5-1.25-0.75 μ M); **2/a** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD; **2/b** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD; **2/a + CHR** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD-CHR (0.324 mg/ml); **2/b + CHR** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD-CHR (0.399 mg/ml). **** P < 0.0001 vs NG; ## P < 0.01, ### P < 0.001 and #### P < 0.0001 vs HG; ^ P < 0.05 and ^^ P < 0.01 vs OTX; °°° P < 0.001 vs 2/b.

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 μ M, în timp ce a fost necesară o doză de 2/a+CHR și 2/b+CHR care să conțină OTX 1,25 μ M 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 15, 16, 17).

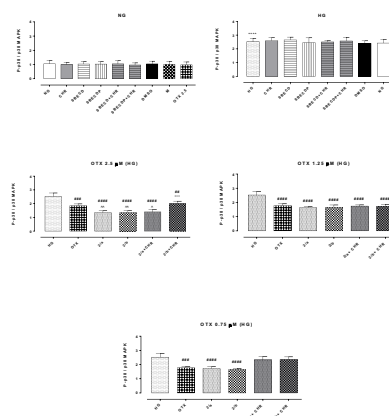


Figura 15: Raportul MAPK P-p38/p38, calculat ca valori ale densității optice (OD) la 450 nm \pm SD, sunt calculate utilizând GAPDH ca si control.. **NG** = 5.5 mM D-glucose; **HG** = 33 mM D-glucose; **CHR** = chrysin 0.399 mg/ml; **SBECD** = sulfobutylether- β -cyclodextrin 7.3 m/m%; **SBECDP** = sulfobutylether- β -cyclodextrin polymer 9,6 m/m%; **SBECD+CHR** = SBECD+0.095 mg/ml CHR; **SBECDP+CHR** = SBECDP+0.0836 mg/ml CHR; **DMSO** = dimethyl sulfoxide 2.5%; **M** = mannitol 27.5 mM; **OTX** = OTX008 (2.5-1.25-0.75 μ M); **2/a** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-

SBECD; **2/b** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD; **2/a + CHR** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD-CHR (0.324 mg/ml); **2/b + CHR** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD-CHR (0.399 mg/ml). *** P < 0.0001 vs NG; ## P < 0.01, ### P < 0.001 and #### P < 0.0001 vs HG; ^ P < 0.05 and ^^ P < 0.01 vs OTX; °°° P < 0.001 vs 2/b.

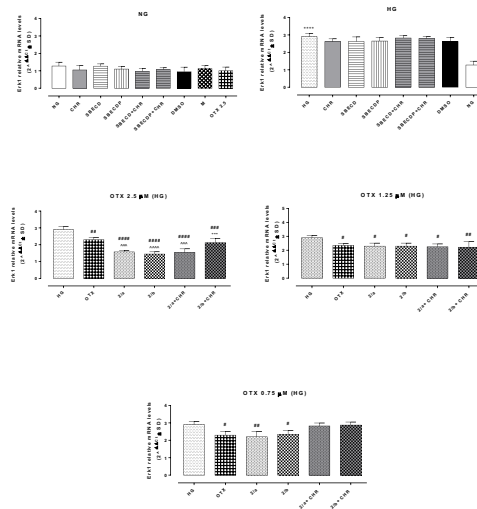


Figura 16: Nivelul mRNA Erk1, raportat ca $2^{-\Delta\Delta C_t} \pm SD$ și cuantificat prin utilizarea GAPDH ca și control. **NG** = 5.5 mM D-glucose; **HG** = 33 mM D-glucose; **CHR** = chrysin 0.399 mg/ml; **SBECD** = sulfobutylether- β -cyclodextrin 7.3 m/m%; **SBECDP** = sulfobutylether- β -cyclodextrin polymer 9,6 m/m%; **SBECD+CHR** = SBECD+0.095 mg/ml CHR; **SBECDP+CHR** = SBECDP+0.0836 mg/ml CHR; **DMSO** = dimethyl sulfoxide 2.5%; **M** = mannitol 27.5 mM; **OTX** = OTX008 (2.5-1.25-0.75 μ M); **2/a** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD; **2/b** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD; **2/a + CHR** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD-CHR (0.324 mg/ml); **2/b + CHR** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD-CHR (0.399 mg/ml). *** P < 0.0001 vs NG; # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001 and #### P < 0.0001 vs HG; ^^ P < 0.001 and ^^ P < 0.0001 vs OTX; °°° P < 0.001 vs 2/b.

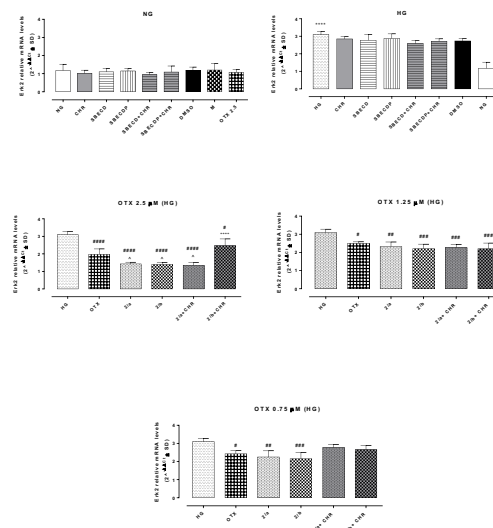


Figura 17: Nivelul mRNA Erk2, raportat ca $2^{-\Delta\Delta C_t} \pm SD$ și cuantificat prin utilizarea GAPDH ca și control. **NG** = 5.5 mM D-glucose; **HG** = 33 mM D-glucose; **CHR** = chrysin 0.399 mg/ml; **SBECD** = sulfobutylether- β -cyclodextrin 7.3 m/m%; **SBECDP** = sulfobutylether- β -cyclodextrin polymer 9,6 m/m%; **SBECD+CHR** = SBECD+0.095 mg/ml CHR; **SBECDP+CHR** = SBECDP+0.0836 mg/ml CHR; **DMSO** = dimethyl sulfoxide 2.5%; **M** = mannitol 27.5 mM; **OTX** = OTX008 (2.5-1.25-0.75 μ M); **2/a** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD; **2/b** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD; **2/a + CHR** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD-CHR (0.324 mg/ml); **2/b + CHR** = OTX(2.5-1.25-0.75 μ M)-SBECD-CHR (0.399 mg/ml).

mg/ml). **** P < 0.0001 vs NG; # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001 and #### P < 0.0001 vs HG; ^ P < 0.05 vs OTX; **** P < 0.0001 vs 2/b.

Nivelele de Gal-1 și NF-kB

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 18 și 19). 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.

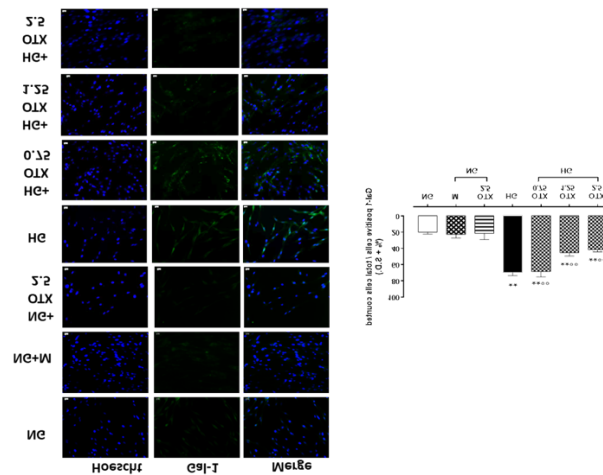


Figura 18: Imagini reprezentative de imunofluorescență ale cardiomiocitelor Gal-1 pozitive, raportate ca procent de celule Gal-1 pozitive (verde)/total de celule numărate (albastru) ± SD. Magnification = 10X; scale bar = 10 μM **NG** = 5.5 mM D-glucose; **HG** = 33 mM D-glucose; **M** = mannitol 27.5 mM; **OTX** = OTX008 (2.5-1.25-0.75 μM). ** P < 0.01 vs NG; °° P < 0.01 vs HG.

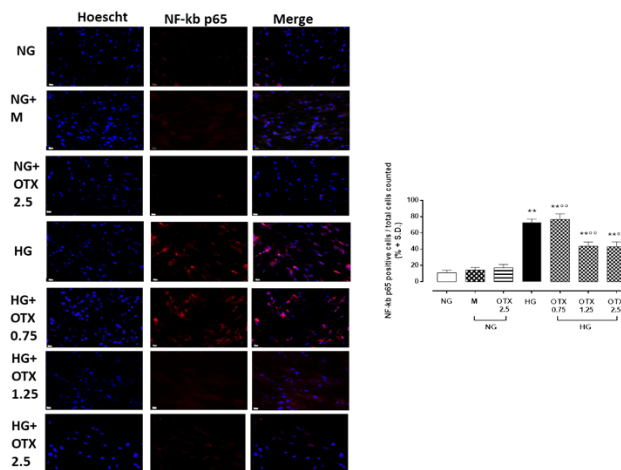


Figura 19: Imagini reprezentative de imunofluorescență ale cardiomiocitelor NF-kB p65 pozitive, raportate ca procent de celule Gal-1 pozitive (verde)/total de celule numărate (albastru) ± SD. Magnification = 10X; scale bar = 10 μM **NG** = 5.5 mM D-glucose; **HG** = 33 mM D-glucose; **M** = mannitol 27.5 mM; **OTX** = OTX008 (2.5-1.25-0.75 μM). ** P < 0.01 vs NG; °° P < 0.01 vs HG.

Rezultate similare au fost obținute și prin evaluarea pe culturi de celule epiteliale retiniene (*ARPE-19*) (vezi date prezentate pe website-ul proiectului)

Activitatea 3.2. Animale si protocolul experimental in vivo

Validarea efector antifibrotice a DDS a fost realizata 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.

Activitatea 3.3. Analize hematologice si biochimice

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)

Valorile transaminazelor serice si ale creatininei au fost semnificativ mai mari la 20 de săptămâni de diabet cronic. Tratamentele, cu excepția SBECd, au scăzut semnificativ valorile acestor indicatori biochimici (vezi raport etapa 2).

Activitatea 3.4. Analize histopatologice

La examinarea histologică cu colorație H&E, probele hepatice din grupul de control au evidențiat o arhitectură lobulară tipică, caracterizată prin vene centrilobulare și cordoane hepatocite radiante (Fig. 20). În schimb, speciemenle de ficat din grupul diabet cronic au prezentat atât steatoză microveziculară, cât și macroveziculară, congestia capilarelor sinusoidale și infiltrarea parenchimului cu celulele inflamatorii. În plus, colorația tricromică 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 alterărilor 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 prezent un aspect histologic aproape de cel al grupului de control.

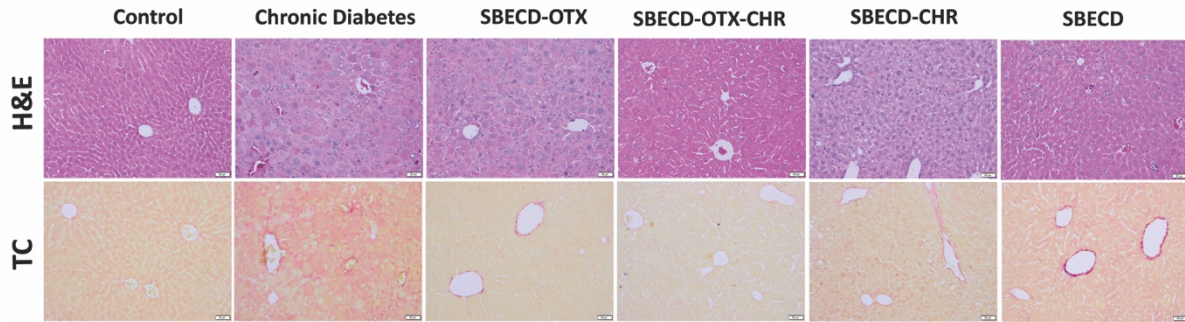


Figura 20. Aspectul histologic al tesutului hepatic pentru loturile experimentale. Col Hematoxilina&Eozina (H&E), Col. Tricromica Fouchet van Gieson (TC), IHC Desmin; 10x

Analiza histopatologica a tesutului cardiac la lotul de diabet cronic a evidentiat usoare modificari caracterizate prin infiltrate de celule inflamatorii, proliferare de collagen 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.21). 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.

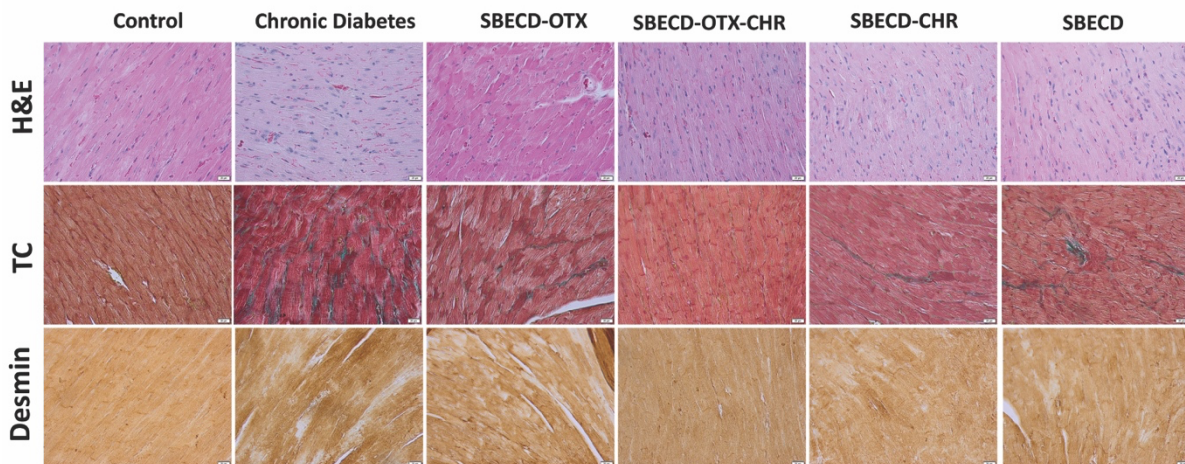


Figura 21. Aspectul histologic al tesutului cardiac pentru loturile experimentale. Col Hematoxilina&Eozina (H&E), Col. Tricromica Gomori (TC), IHC Desmin; 20x

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.22). Coloratia tricromica a evidentiat acumulare de collagen 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.

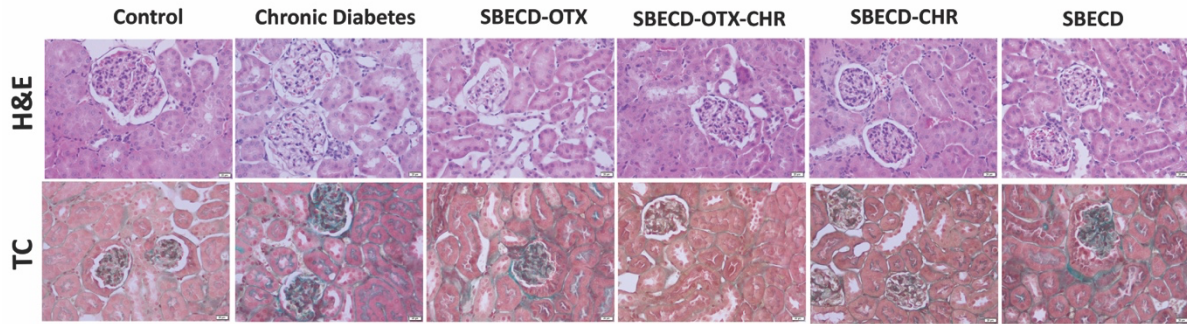


Figura 22. Aspectul histologic al corticalei renale pentru loturile experimentale. Col Hematoxilina&Eozina (H&E), Col. Tricromica Gomori (TC), 20x

Modificarile histopatologice in diabet cronic au fost observate atat la nivelul corneei, al retinei, cat si la nivelul proceselor ciliare (vezi raport etapa III).

Activitatea 3.5. Evaluarea mecanismului molecular antifibrotic

Hiperglicemia cronică la șoarecii diabetici a fost legată de o creștere semnificativă a expresiei genei TGF- β 1 la nivel hepatic ($p < 0,001$) (Fig.23). În comparație cu grupul cu diabet zaharat, grupul SBECD+OTX+CHR a prezentat o scădere substanțială cu 84,78% a ARNm TGF- β 1. Reducerea expresiei TGF- β 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- β 1 a reflectat o tendință similară (fig.24).

Figura 23 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.24).

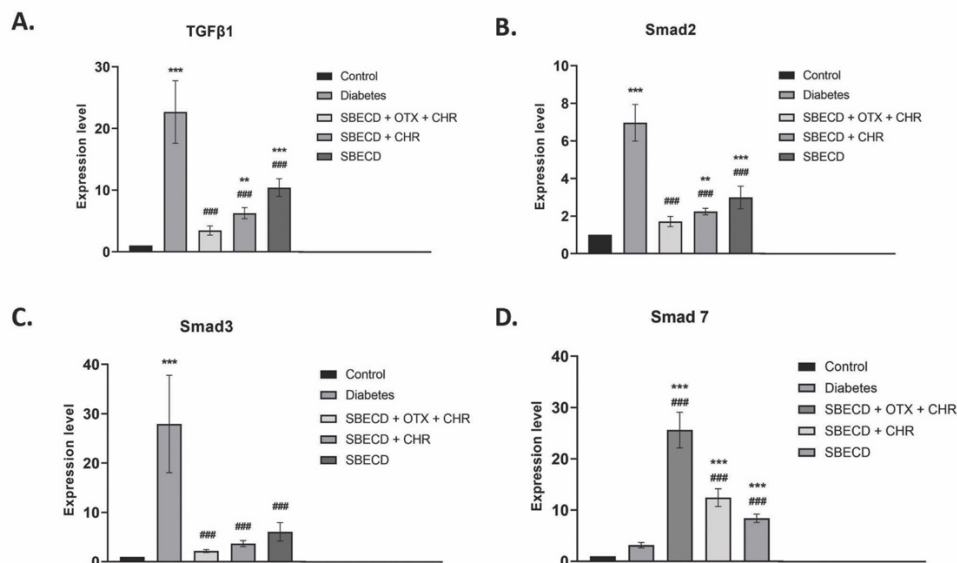


Figura 23. Analiza activarii caii de semnalizare profibrotice TGF- β 1/Smad in tesuturile hepatice pentru loturile experimentale. Expresia genica a TGF- β 1, Smad 2, 3 si 7. Valorile sunt exprimate ca media (\pm SD) **, *** Semnificatia statistica $p < 0.01$ si $p < 0.001$, comparativ cu control. ### semnificatia statistica $p < 0.001$ comparativ cu grupul diabet.

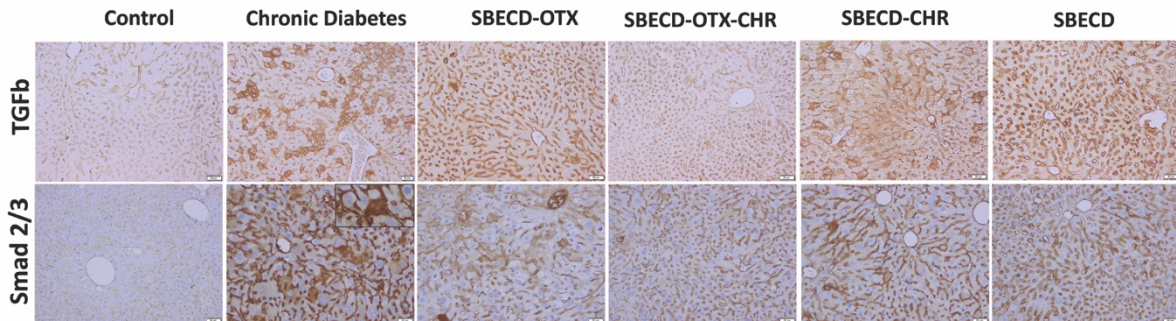


Figura 24. Expresia imunohistochimica a TGF- β 1 si Smad 2/3 in tesuturile hepatice pentru loturile experimentale. Ob.10x

In cazul analizei moleculare la nivel renal, se inregistreaza o creștere semnificativă a expresiei genei TGF- β 1, Smad-2 si Smad-3 ($p < 0,001$) comparativ cu lotul de control (Fig.25). Tratamentele cu SBECD+OTX+CHR, SBECD+ CHR si SBECD au prezentat o reducere semnificativ statistica ($p < 0.001$) comparativ cu lotul de diabet. Contrar, expresia mRNA a Smad7 a inregistrat o crestere semnificativa dupa tratamente, cea mai semnificativa crestere inregistrandu-se pentru lotul SBECD+OTX+CHR ($p < 0.001$). Analiza imunohistochimică a TGF- β 1 si Smad 2/3 a reflectat o tendință similară (fig.26).

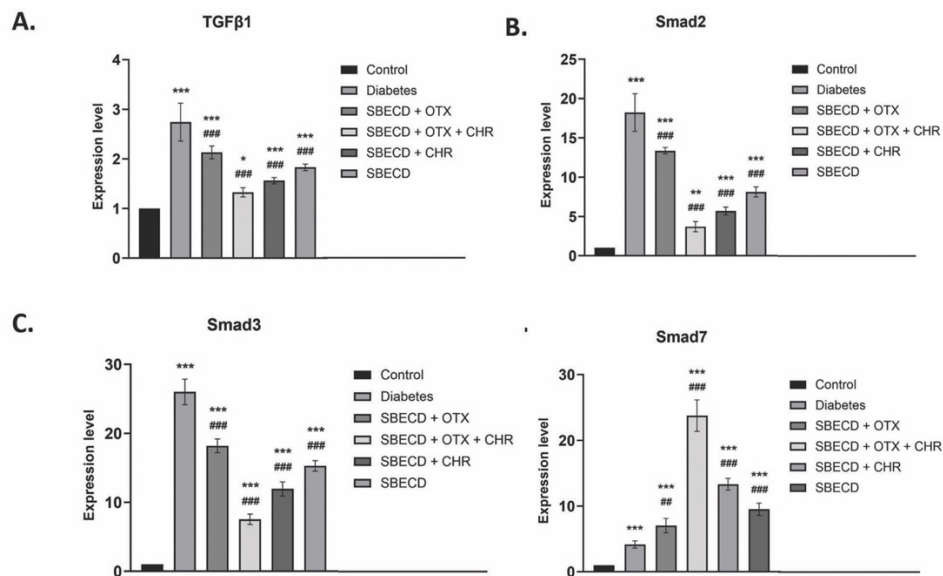


Figura 25. Analiza activarii caii de semnalizare profibrotice TGF- β 1/Smad in tesuturile renale pentru loturile experimentale. Expresia genica a TGF- β 1, Smad 2, 3 si 7. Valorile sunt exprimate ca media (\pm SD) *, **, *** Semnificatia statistica $p < 0.05$, $p < 0.01$ si $p < 0.001$, comparativ cu control. ### semnificatia statistica $p < 0.001$ comparativ cu grupul diabet.

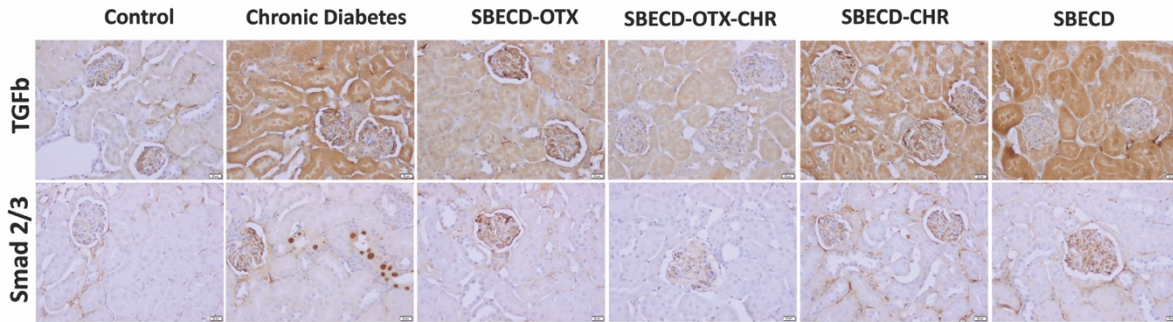


Figura 26. Expresia imunohistochimica a TGF- β 1 si Smad 2/3 in tesuturile renale pentru loturile experimentale. Ob.20x

Rezultate similare s-au obtinut si pentru tesuturile cardiace si oculare (vezi raport etapa 3).

Activitatea 3.6.Evaluarea remodelarii 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.27). 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.28).

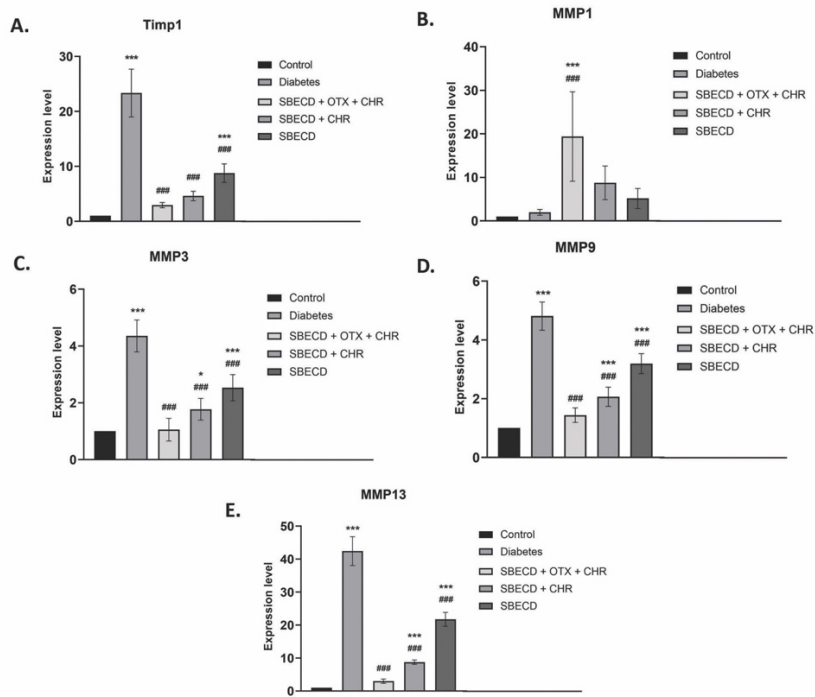


Figura 27. Crisina incapsulata in sistemul calixarena-ciclodextrina moduleaza matricea extracelulara hepatica. Expresia mRNA pentru Timp-1, MMP-1, MMP-3, MMP-9, MMP-13; Valorile sunt exprimate ca media (\pm SD) **, *** Semnificatia statistica $p < 0.01$ si $p < 0.001$ comparativ cu control. ### Semnificatia statistica $p < 0.001$ comparativ cu diabet

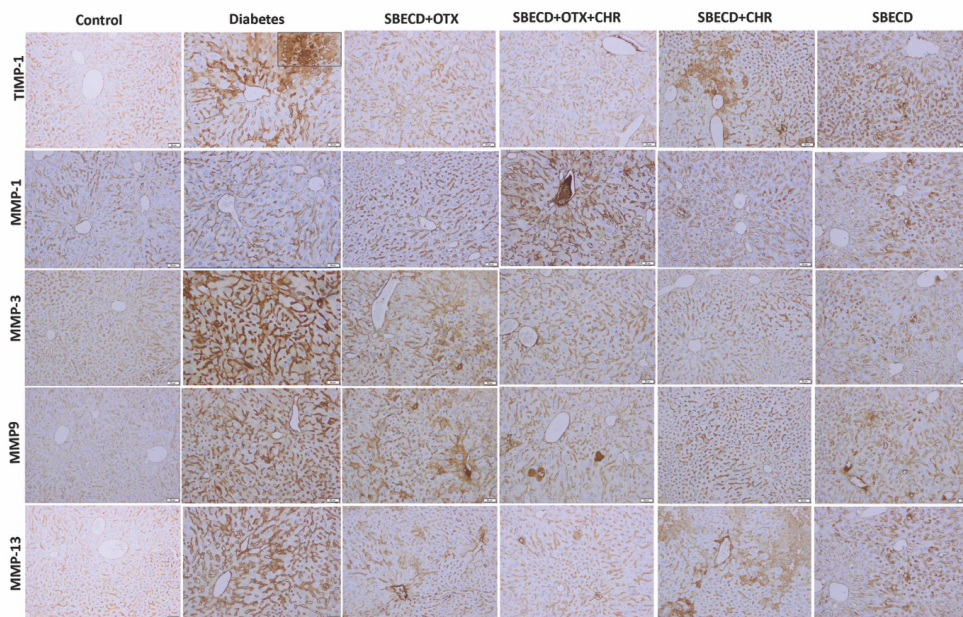


Figura 28. Expresia imunohistochimica a Timp-1, MMP-1, MMP-3, MMP-9, MMP-13 in tesuturile hepatice pentru loturile experimentale. Ob.10x

Rezultate similare s-au obtinut si pentru tesuturile renale, cardiace si oculare (vezi raport etapa 3).

Activitatea 3.7. Evaluarea efectelor antifibrotice prin analize de microscopie electronica

În probele de ficat de control, au fost observate hepatocite normale cu nuclei caracteristici, organite și glicogen, împreună cu rare picături lipidice (Fig.29). 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.29b) și creștere a activității celulelor hepatice stelate (Fig.29b,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 colagen (Fig.29e). Infiltrarea celulelor imune a fost prezentă (Fig.29d). Post-tratament cu SBECD+CHR, structura ficatului are aspectul ultrastructural similar controlului, rezultat îmbunătățit și mai mult de sistemul ternar care conține crisină (Fig.29f). Cu toate acestea, tratamentul cu SBECD singur nu a reușit să inverseze modificările arhitecturale, cu prezența semnificativă a lipidelor și a colagenului încă evidentă (Fig.29 g-i).

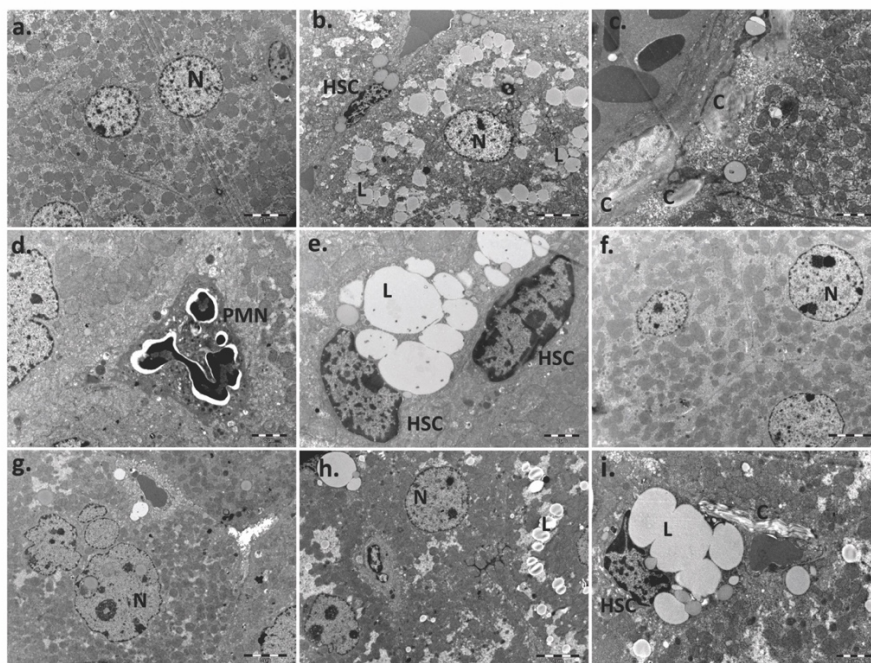


Figura 29. Crisina incapsulata in sistemul calixarena-ciclodextrina restabilește aspectul ultrastructural al ficatului; a. Control; b-e. Diabet; f. SBECD+OTX+CHR; g. SBECD+CHR; h, i. SBECD; HSC-celule hepatice stelate; N-nucleu; C-colagen; PMN-neutrofile; L-lipide

Lotul de soareci diabetic au prezentat ultrastructura cardiaca modificata fata de control caracterizata prin proliferare de colagen (fig.30b) si acumulare de picaturi lipidice (fig.20c) si activitate fagocitara crescuta (fig.30 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.30h,i).

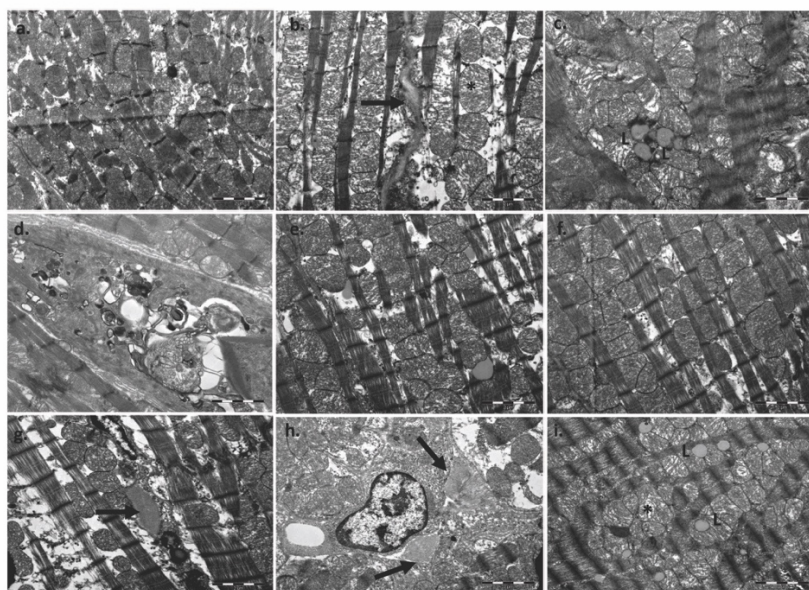


Figura 30. Crisina incapsulata in sistemul calixarena-ciclodextrina restabilește aspectul ultrastructural cardiac; a. Control; b-d. Diabet; e. SBECD+OTX; f. SBECD+OTX+CHR; g. SBECD+CHR; h, i. SBECD; sageata – collagen, L-lipide, asterix- mitocondrii cu criste rarefiate

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.31b-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.31h,i).

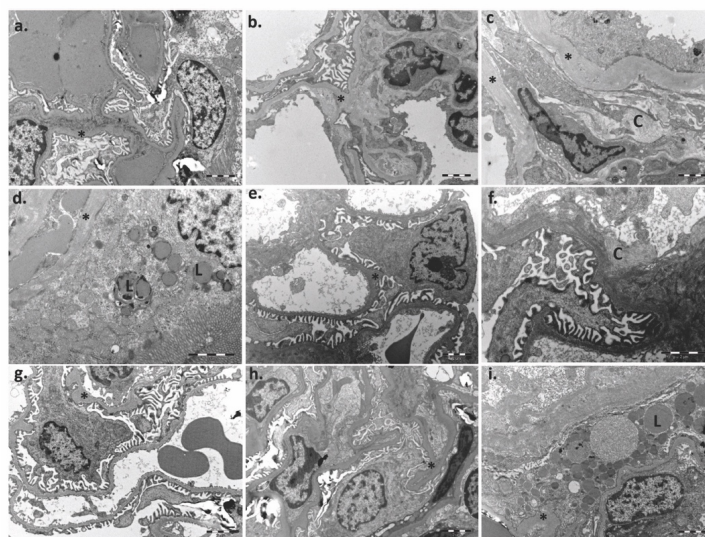


Figura 31. Crisina incapsulata in sistemul calixarena-ciclodextrina restabilește aspectul ultrastructural glomerular; a. Control; b-d. Diabet; e-f. SBECD+OTX; g. SBECD+OTX+CHR; h. SBECD+CHR; i. SBECD; asterix – membrane bazale glomerulare; L-lipide; C – collagen

V. Indicatori de rezultat realizați

Nr. crt.	Indicatori planificați	Nr.	Indicatori realizați	Nr.
1.	Articole ISI	5	Articole ISI reviste Q1 si Q2 AIS	6
2.	Meeting Abstracts	0	Meeting Abstracts indexate ISI	2
3.	Participari conferinte nationale/internationale	5	Prezentari orale si poster	10
4.	Brevet	1	Cerere de brevet nr. 00327 din 14.06.2022 Publicat RO-BOPI 10/2022 din 28.10.2022	1

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>, IF: 6,208 (2021), **Q2 AIS**
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- β /EMT Pathway**, *Molecules* 2022, 27, 4785. <https://doi.org/10.3390/molecules27154785>, IF: 4,927 (2021), **Q2 AIS**
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>, Impact factor: 6,208 (2021); **Q2 AIS**
4. 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, proof 6.12.2023), **Q1 AIS**
5. 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**
6. 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- β and Galectin-1 Mediated Pathways in Diabetic Liver Fibrosis**, *Molecular Pharmacology*, MOLPHARM-AR-2023-000858 (in evaluate); **Q1 AIS**

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

Participări la conferințe internaționale:

1. Fenyvesi Ferenc, Váradi Judit, Bácskay Ildikó, Vecsernyés Miklós, Anca Hermenean, Simultaneous application of calixarene and cyclodextrin for solubility improvement, Gyógyszerkémiai és Gyógyszertechnológiai Szimpózium '21, Herceghalom 2021. szeptember 20-21 Prezentare orală.
2. 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
3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. 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- β -cyclodextrin (SBE β 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
7. 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- β -cyclodextrin (SBE β CD) nanoformulation alleviate fibrosis associated with chronic diabetes, 2nd Annual Conference on Global Nanotechnology - NanoSeries 2023, Madrid 18-22 iunie 2023, prezentare orală
8. 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- β -cyclodextrin (SBE β CD) nanoformulation alleviate tissue fibrosis associated with chronic diabetes, International Chemistry Conference CHEMMET 2023, 26-28.06.2023 (online), prezentare orală
9. 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- β -cyclodextrin (SBE β 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 orală

10. 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

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- β -cyclodextrin (SBECD) și procedeu de obținere”, Publicat RO-BOPI 10/2022 din 28.10.2022

VI. Impactul estimat al rezultatelor obținute

Rezultatele acestor cercetari subliniază potențialul terapeutic al noului sistem drug delivery pe baza de derivat de calix[4]arenă OTX008 și SBECD pentru a furniza flavonoidul crisina, ca un modulator potential al fibrogenzei în complicațiile diabetului cronic. Sistemul ternar a redus în mod eficient expresia Galectinei-1 și a perturbat cascada de semnalizare TGF- β /Smad, ducând la o scădere a activității fibrotice in vitro și in vivo la nivelul ficatului, rinichilor, tesutului cardiac și ocular ai soarecilor cu diabet cronic. Aceste rezultate sugerează un avantaj terapeutic substanțial pentru gestionarea și eventual reversia fibrozei în complicațiile diabetului zaharat. Reducerea nivelurilor de α -SMA, un marker al activității miofibroblastelor, precum și modularea TIMP/MMPs și modelarea matricii extracelulare, coroborează eficacitatea anti-fibrotică a acestui complex ternar. Prin țintirea și modularea factorilor specifici celulari și moleculari ai fibrozei, studiul nostru oferă o bază promițătoare pentru strategii noi de tratament în bolile fibrotice.

Impactul stiintific așteptat al rezultatelor proiectului (1) potențialul de a avansa semnificativ cunoștințele in domeniu, prin introducerea de noi concepte sau abordări și prin deschiderea de noi domenii sau direcții de cercetare in patologia moleculara; (2) identificarea de noi tinte farmacologice și cai de semnalizare moleculare pentru tratamentul potential al fibrozei tisulare

Director Proiect,

Prof.dr.habil.Anca Hermenean

