



Università degli Studi di Sassari

Corso di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche

Coordinatore del corso: Prof.ssa Margherita Maioli

Curriculum: Neuroscienze

XXXV ciclo

Caratterizzazione di sostanze antiossidanti potenzialmente efficaci nelle patologie neurodegenerative mediate dallo stress ossidativo

Tutor:

Prof.ssa Franca Deriu

Cotutor:

Dott.ssa Rossana Migheli

Tesi di dottorato di:

Dott.ssa Giada Lostia

Anno accademico 2022-2023



La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Scienze Biomediche, curriculum Neuroscienze dell'Università degli Studi di Sassari, a.a. 2019/2022 – XXXV ciclo, con il sostegno di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2014-2020 Asse III - Istruzione e Formazione - Obiettivo Tematico 10 “Investire nell’istruzione, nella formazione e nella formazione professionale per le competenze e l’apprendimento permanente”.

Indice

Introduzione	1
Neurodegenerazione.....	2
Lo stress ossidativo nelle patologie neurodegenerative.....	3
Antiossidanti.....	6
Naloxone.....	7
(R)-(-)-linalolo.....	8
Acido Poli [3-(3,4-di-idrossifenil)] glicerico.....	9
Scopo Della Ricerca	10
Materiali e Metodi	12
Reagenti e soluzioni.....	13
Linea cellulare PC12	13
Trattamenti eseguiti.....	15
Saggio di vitalità MTT.....	16
Saggio di citotossicità LDH.....	16
Quantificazione dei ROS intracellulari.....	17
Apoptosi.....	17
Ciclo cellulare.....	18
Analisi statistica.....	18
Risultati	19
Risultati sull'effetto antiossidante del Naloxone.....	20

Risultati sulla proprietà antiossidante dell' (R)-(-)- linalolo.....	24
Risultati dell'effetto dell'Acido Poli [3-(3,4-di-idrossifenil) glicerico sulle cellule PC12.....	29
<i>Discussione</i>	33
<i>A Portsmouth</i>	38
<i>To be continued</i>	62
<i>Bibliografia</i>	69

Introduzione

Neurodegenerazione

Il termine neurodegenerazione interpreta il processo cronico e selettivo di morte cellulare a carico dei neuroni¹.

La neurodegenerazione è alla base di diverse malattie neurodegenerative, tra cui la malattia di Parkinson, la malattia di Alzheimer e la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA).

L'eziologia di queste patologie è ancora sconosciuta, tuttavia, le ipotesi sono molteplici: neurotossine esogene ed endogene, fattori ambientali, ereditarietà ed infezioni²⁻⁴.

Tra i diversi fattori alla base dell'insorgenza delle patologie neurodegenerative è ormai noto che lo stress ossidativo gioca un ruolo fondamentale⁵ e per questo negli ultimi decenni buona parte della letteratura si è concentrata sull'equilibrio esistente tra specie reattive dell'ossigeno, ROS, e antiossidanti endogeni.

Lo stress ossidativo nelle patologie neurodegenerative

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono delle molecole altamente reattive che vengono continuamente prodotte nelle cellule eucariotiche nel corso del normale metabolismo cellulare⁶. Di queste specie fanno parte sia le forme radicaliche, quali lo ione superossido (O_2^-) e il radicale idrossilico ($\bullet OH$), sia gli intermedi non radicalici come il perossido di idrogeno (H_2O_2)⁷.

Tra tutti gli organelli e gli enzimi che possono generare ROS all'interno della cellula, i mitocondri sono i principali responsabili⁸. In condizioni fisiologiche, infatti, la perdita di elettroni che si verifica durante la catena di trasporto elettronico mitocondriale (ETC), è responsabile della produzione di ROS per il 2% dell'ossigeno consumato⁹.

La presenza dei ROS in condizioni fisiologiche è fondamentale in quanto essi prendono parte ad importanti funzioni utili al nostro organismo¹⁰, come per esempio difendere le cellule da microrganismi patogeni¹¹.

Nel nostro organismo la quantità fisiologica di ROS prodotta è in equilibrio con la quantità di un pool di sostanze antiossidanti endogene che impedisce la sovrapproduzione di specie reattive dell'ossigeno. La rottura dell'equilibrio fisiologico fra la produzione di specie chimiche ossidanti (ROS) e la riduzione da parte dei sistemi di difesa antiossidanti induce un danno denominato stress ossidativo^{12,13}.

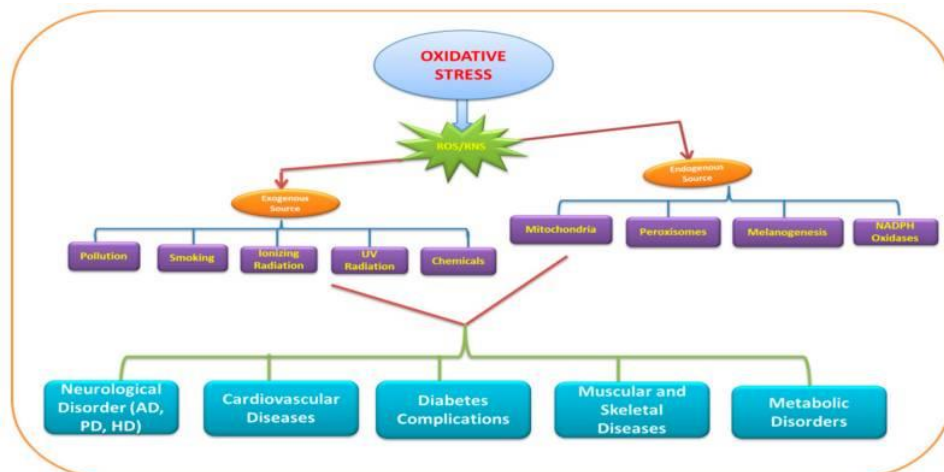


Figura 1. Rappresentazione delle fonti esogene ed endogene di specie reattive dell'ossigeno e malattie correlate allo stress ossidativo¹⁴.

Il cervello è altamente suscettibile allo stress ossidativo a causa dell'elevato consumo di ossigeno, dell'elevata attività mitocondriale, dell'elevato numero di catene laterali di acidi grassi polinsaturi inclini all'attacco dei radicali liberi, della presenza di metalli di transizione che partecipano attivamente alla generazione di ROS, dei bassi o moderati livelli di enzimi antiossidanti (come la catalasi, la superossido dismutasi e la glutazione perossidasi) e della potenziale auto-ossidazione di alcuni neurotrasmettitori ^{14,15}.

Negli ultimi decenni, una mole consistente di dati ha messo in luce che la presenza di elevati livelli di ROS è una caratteristica comune tra le popolazioni cellulari del sistema nervoso affette da diverse patologie neurodegenerative e che lo stress ossidativo non solo contribuisce all'esordio ma anche alla progressione del processo patogenetico.

La neurotossicità associata all'eccessiva produzione di ROS contribuisce al misfolding delle proteine, alla disfunzione mitocondriale e alla conseguente apoptosi cellulare¹⁶.

Nella *substantia nigra* dei pazienti affetti dal morbo di Parkinson sono stati riscontrati livelli elevati di lipidi, proteine e DNA ossidati, e livelli ridotti di glutazione¹⁷⁻¹⁹.

Studi effettuati sulla malattia di Alzheimer hanno messo in evidenza la relazione tra lo squilibrio ossidativo indotto dalla β -amiloide e gli elevati livelli di sottoprodotti della perossidazione lipidica, proteica e del DNA/RNA e la diminuzione dei livelli di antiossidanti, come l'acido urico, la vitamina C ed E, e di enzimi antiossidanti come la superossido dismutasi e la catalasi^{20,21}.

Nei pazienti affetti da SLA sono state osservate lesioni proteiche, perossidazione lipidica e ossidazione di DNA e RNA mediate dallo stress ossidativo²². Inoltre, i biomarcatori dello stress ossidativo, tra i quali la malondialdeide (prodotto della perossidazione lipidica), sono estremamente presenti nelle urine, nel fluido cerebro-spinale (CSF), nel sangue e nei singoli tessuti dei pazienti²².

Antiossidanti

Gli antiossidanti sono molecole endogene, sintetizzate dalle nostre cellule, o esogene, introdotte con la dieta quotidiana.

Le classificazioni si basano sul tipo di attività (enzimatica come la superossido dismutasi, o non enzimatica come il glutatione), sulle proprietà chimico-fisiche (ad esempio, idrofile o lipofile) e sulla struttura chimica (ad esempio, flavonoidi, polifenoli, ecc.)⁶.

Diversi antiossidanti naturali e/o sintetici, utilizzati da soli o in associazione, sono stati proposti per integrare e/o coadiuvare il trattamento farmacologico tradizionale dei disturbi neurodegenerativi

23

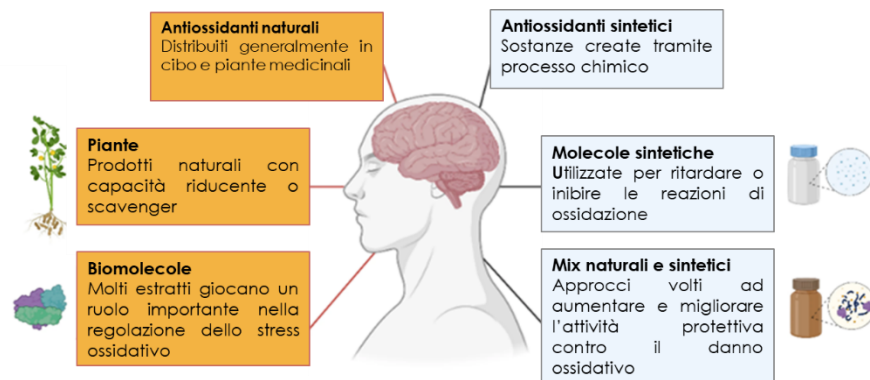


Figura 2. Antiossidanti naturali e sintetici nelle patologie neurodegenerative

Naloxone

Il naloxone (NLX) è un analogo strutturale sintetico della morfina e un efficace antagonista dei recettori oppioidi classici, ampiamente espressi sulle cellule del sistema nervoso centrale e periferico²⁴.

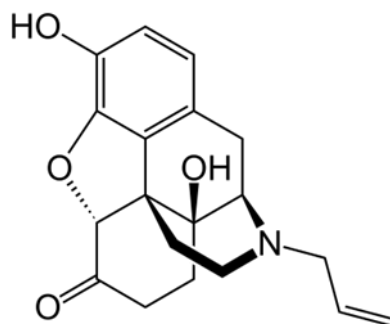


Figura 3. Naloxone

Il naloxone viene utilizzato clinicamente nel trattamento del sovradosaggio acuto da oppiacei e nella depressione respiratoria o centrale indotta dagli oppioidi²⁵.

La somministrazione di naloxone ha dimostrato essere utile nel trattamento di modelli sperimentali di ictus, ischemia miocardica e cerebrale, trauma cerebrale, lesioni del midollo spinale e shock settico²⁶⁻²⁸, in cui anche lo stress ossidativo svolge un ruolo significativo²⁹.

Studi condotti in vitro hanno dimostrato che il NLX può esercitare attività antiossidante sui lipidi²⁶ e ridurre lo stress ossidativo nei motoneuroni^{27,28,30}.

(R)-(-)-linalolo

Il Linalolo (3,7-dimetil-otta-1,6-dien-3-olo) è un composto monoterpenco di origine vegetale che si trova comunemente come componente volatile principale degli oli essenziali di oltre 200 piante ed erbe aromatiche^{31,32}, tra cui lavanda e basilico dolce.

A causa della presenza nella sua struttura di un centro di asimmetria, il linalolo esiste in natura come racemo dei due enantiomeri (R)-(-)-linalolo e (S)-(+)-linalolo³³.

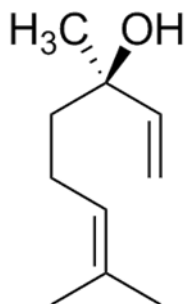


Figura 4. (R)-(-)-linalolo

Numerosi studi hanno dimostrato che il linalolo in forma racemica possiede diverse proprietà farmacologiche, tra le quali antiossidante e neuroprotettiva³⁴⁻³⁶.

In particolare, l'enantiomero (R)-(-)-linalolo (LIN) possiede effetti neuroprotettivi grazie alla sua capacità di ridurre lo stress ossidativo intracellulare durante le lesioni indotte dalla deprivazione di ossigeno-glucosio e dalla riossigenazione³⁷.

Acido Poli [3-(3,4-di-idrossifenil)] glicerico

L' Acido Poli[3-(3,4-di-idrossifenil)] glicerico (PDPGA) è un polimero (>1000 kDa), derivato dell'acido caffeico, e il costituente principale presente negli estratti acquosi delle piante *Symphytum asperum*, *Symphytum officinale*, *Symphytum caucasicum* ed *Ancusa antalica* della famiglia delle Boraginaceae³⁸.

Ogni unità strutturale ripetuta contiene tre gruppi funzionali reattivi, due gruppi idrossilici fenolici orto-correlati e un gruppo estere.

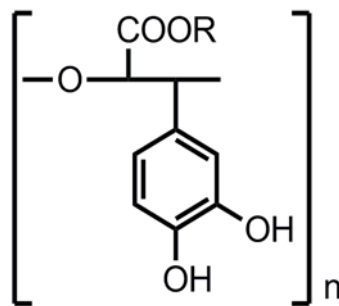


Figura 5. Unità strutturale ripetuta dell'acido Poli[3-(3,4-di-idrossifenil)] glicerico

Nella medicina tradizionale viene utilizzato come antinfiammatorio e come agente per la guarigione delle ferite³⁸.

In letteratura diversi sono gli studi che ne hanno dimostrato le sue diverse proprietà^{39,40} tra cui il suo effetto antiossidante⁴¹.

Scopo Della Ricerca

Lo scopo di questa tesi è stato quello di studiare nuovi approcci terapeutici a supporto della cura di malattie neurodegenerative mediate dallo stress ossidativo.

Gli obiettivi di questo lavoro sono stati quelli di testare l'azione farmacologica di diversi composti, naturali e no, coinvolgendo anche farmaci già noti in altri ruoli, in modelli cellulari di stress ossidativo.

Materiali e Metodi

Reagenti e soluzioni

Il Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM F12), la soluzione antibiotica Penicillina/Streptomicina (PEN/STREP) 10,000 U/mL, il siero bovino fetale (FBS), il siero equino (HS), e la tripsina 0.25% EDTA sono stati acquistati presso la ditta Thermo Fisher Scientific: Life Technologies Italia (Monza, Italia).

I Sali utilizzati per la preparazione della soluzione di tampone fosfato salino (PBS), il [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro] (MTT, 97,5%), la soluzione di perossido di idrogeno (H₂O₂,30%) e il kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit sono stati forniti dalla ditta Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

I kit ROS-ID® Total ROS Detection e CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay sono stati acquistati rispettivamente presso le ditte Enzo Life Science (Pero, Italia) e Promega (Milano, Italia).

(R)-(-)-linalolo e Naloxone presso la ditta Sigma-Aldrich (Milano, Italia). Acido Poli [3-(3,4-di-idrossifenil)] glicerico inviato dalla Tbilisi State Medical University, Georgia.

Linea cellulare PC12 (ATCC CRL-1721)

Le cellule PC12 sono cellule immortalizzate, isolate da un feocromocitoma della midollare surrenale di ratto, che rappresentano uno dei modelli in vitro maggiormente utilizzati in neurobiologia, per studi sulla neurotossicità, sulla neuroprotezione, sulla neurosecrezione, sulla neuroinfiammazione e sulla sinaptogenesi ⁴². Infatti, sebbene provengano da un feocromocitoma, sono caratterizzate dalla capacità di sintetizzare, secernere e metabolizzare catecolamine (dopamina, noradrenalina e adrenalina) e, se coltivate in presenza del fattore di crescita nervoso

(NGF), di differenziarsi morfologicamente e funzionalmente in neuroni⁴². Inoltre, le cellule PC12 essendo più sensibili agli ossidanti rispetto ad altre sono anche ampiamente utilizzate per lo studio dell'apoptosi e dei meccanismi antiossidanti⁴³.

Il terreno di crescita utilizzato per la coltura è il DMEM/F-12 addizionato con il 10% di HS, 5% di FBS e l'1% del mix di antibiotici PEN/STREP. Durante la crescita le cellule sono state mantenute in piastre Petri da 100 mm di diametro in incubatore alla temperatura di 37°C e in atmosfera umidificata al 5% di CO₂.

Trattamenti eseguiti:

Per studiare gli effetti dei seguenti composti, le cellule (tra 12°-25° passaggio) sono state staccate con tripsina-EDTA 0.25% e seminate su piastre multi-pozzetto da 96 (5×10^3 cellule/100 μ l) o da 6 (2×10^6 cellule/3 ml). Le cellule sono state quindi lasciate aderire al substrato per 24 h in incubatore a 37°C e successivamente sottoposte ai diversi trattamenti per i tempi stabiliti. Per tutti i saggi effettuati sono stati inseriti un campione di cellule non trattate (controllo) e un campione con il solo insulto ossidativo (H_2O_2 100 μ M).

Ogni esperimento è stato condotto in triplicato.

Naloxone

Per lo studio sul naloxone, le cellule PC12 sono state esposte per 24 h al trattamento con NLX cloridrato (25 e 50 μ g/ml)^{27,30,44} singolarmente e con NLX cloridrato (25 e 50 μ g/ml), applicato 30 minuti prima, in associazione con H_2O_2 (100 μ M).

(R)-(-)-linalolo

Lo studio sull'effetto del (R)-(-)-linalolo è stato effettuato esponendo le cellule PC12 a concentrazioni crescenti di linalolo (0.1, 10 and 100 μ M)^{35,37} per 24h. Per la valutazione dell'attività protettiva, il linalolo è stato somministrato come pretrattamento 20 minuti prima dell'aggiunta di H_2O_2 (100 μ M).

Acido Poli [3-(3,4-di-idrossifenil)] glicerico

Per lo studio dell'effetto dell'acido poli [3-(3,4-di-idrossifenil)] glicerico sullo stress ossidativo in un modello neuronale, le cellule PC12 sono state esposte a concentrazioni crescenti del composto (1-5-10-15-20-50 μ g/ml) singolarmente e in presenza di H_2O_2 (100 μ M), per 24h.

Saggio di vitalità MTT

Il saggio di vitalità MTT è un saggio colorimetrico che si basa sulla riduzione del colorante giallo solubile in acqua MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro] in formazano viola insolubile per azione degli enzimi reduttasi NAD(P)H-dipendenti mitocondriali, funzionali nelle cellule vitali.

Nel dettaglio, al termine dei trattamenti, il terreno di crescita è stato rimosso e per ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di una soluzione di MTT 0.65 mg/ml e incubati per 2 ore a 37° C. Allo scadere del tempo di incubazione, la soluzione di MTT in eccesso è stata rimossa e sono stati aggiunti 100 µl di DMSO per campione, per lisare le cellule e solubilizzare i cristalli di formazano. Successivamente la densità ottica (assorbanza) della soluzione è stata misurata alla lunghezza d'onda di 578 nm mediante spettrofotometro per piastre multi pozzetto (Bauty Diagnostic Microplate Reader). I dati ottenuti sono stati riportati come percentuale (%) di cellule vitali rispetto al gruppo di controllo.

Saggio di citotossicità LDH

Il saggio di citotossicità LDH è un saggio che consente di misurare quantitativamente la lattato deidrogenasi (LDH), un enzima citosolico stabile che viene rilasciato al momento della lisi cellulare. La LDH rilasciata nei surnatanti di coltura viene misurata con un test enzimatico accoppiato che determina la conversione di un sale di tetrazolio (iodonitrotetrazolio INT) in un prodotto rosso, il formazano. La quantità di colore formato è proporzionale al numero di cellule lisate quindi morte.

Al termine del tempo dei trattamenti, da ogni pozzetto è stato prelevato il terreno di coltura e la determinazione enzimatica dell'LDH è stata eseguita secondo quanto descritto nel protocollo del kit "CytoTox 96®"

Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega)”. L’assorbanza dei campioni è stata poi misurata alla lunghezza di 490 nm mediante un lettore Bauty Diagnostic Microplate Reader. I risultati sono stati espressi come % LDH di enzima rilasciato nel mezzo di coltura rispetto al gruppo di controllo.

Quantificazione dei ROS intracellulari

Il contenuto intracellulare di ROS è stato valutato utilizzando il kit ROS-ID® Total ROS detection (Enzo Life Science). Dopo il trattamento, le cellule sono state raccolte aggiungendo 400 µl di tripsina-EDTA 0,25%, centrifugate per 10 minuti a 1200 rpm e lavate in Wash Buffer. Successivamente, il pellet è stato incubato con la soluzione ROS detection (Oxidative Stress Detection Reagent, carboxy-H2DCFDA, in Wash Buffer) per 30 minuti al buio a 37° C. La quantificazione intracellulare di ROS è stata poi effettuata mediante il citometro FACSCANTO (Becton & Dickinson, USA). I dati sono stati analizzati con il software FACSDiva 2.2.

Apoptosi

L'analisi dell'apoptosi è stata effettuata mediante l'Annessina V e lo ioduro di propidio (PI) del kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Sigma Aldrich). Il saggio si basa sul legame dell'Annessina V-FITC alla fosfatidilserina esposta sul versante esterno della membrana plasmatiche delle cellule apoptotiche e sul legame del PI al DNA delle cellule con la membrana plasmatica danneggiata. Questa doppia marcatura consente di distinguere le cellule vitali da quelle apoptotiche (precoci e/o tardive) e da quelle necrotiche.

In dettaglio, le cellule sono state incubate con Binding Buffer 1X contenente Annexin V-FITC e PI per 15 minuti al buio e a RT. Al termine dell'incubazione, l'espressione dell'Annexina V-FITC è stata rilevata con il citometro a flusso FACSCANTO nei canali FITC e PI, mostrando rispettivamente l'apoptosi precoce e tardiva. I risultati ottenuti sono stati analizzati con il software FACSDiva 2.2.

Ciclo cellulare

L'analisi del ciclo cellulare è stata effettuata in quanto in grado di fornire delle informazioni sulla distribuzione delle cellule nelle varie fasi. Le cellule vengono marcate con il PI che si lega in proporzione alla quantità di DNA presente consentendo di determinare la ripartizione delle cellule nella fase G0/G1 rispetto alla fase S, G2 o M. Nello specifico, le cellule sono state lavate due volte con PBS e centrifugate a 1200 rpm per 10 minuti. Il pellet è stato fissato in etanolo freddo al 70% e successivamente marcato con PI per 15 minuti. Al termine del tempo di incubazione, l'analisi citometrica è stata effettuata con il citometro a flusso FACSCANTO (Becton & Dickinson, USA). La percentuale di cellule in ciascuna fase del ciclo cellulare è stata analizzata con il software ModFit LT 5.0.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita con il software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, USA). I dati sono stati analizzati utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA a una via) seguita dal test Bonferroni a confronto multiplo. Il livello di significatività è stato fissato a $p < 0,05$. I dati sono riportati negli esperimenti come media \pm SEM.

Risultati

Risultati sull'effetto antiossidante del Naloxone

Per testare l'eventuale proprietà antiossidante del NLX sulle cellule PC12, sono stati effettuati degli esperimenti di rilevamento dei ROS in presenza ed assenza di H₂O₂.

Come mostrato nella fig. 6, le cellule pretrattate con NLX 25 µg/ml e 50 µg/ml mostrano una produzione di ROS significativamente minore ($p < 0,05$; 27% e 28% rispettivamente) rispetto all' H₂O₂ (68%) e al controllo (48%).

L'esposizione al solo NLX, ad entrambe le concentrazioni testate (25 e 50 µg/ml), non produce cambiamenti rilevanti nei livelli di ROS rispetto al gruppo di controllo.

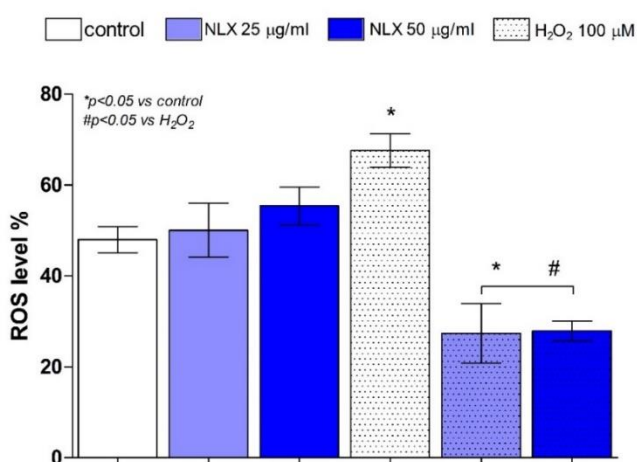


Figura 6. Livelli intracellulari di ROS su cellule PC12 dopo 24h di esposizione a H₂O₂ (100 µM) e naloxone (25 e 50 µg/ml). La quantità di ROS intracellulare è riportata come percentuale (%). (* $p < 0,05$ versus controllo) (# $p < 0.05$ versus H₂O₂).

Successivamente, è stato valutato l'effetto del NLX sull'apoptosi indotta da perossido di idrogeno. Dai risultati ottenuti, rappresentati nella fig. 7, il trattamento con NLX, ad entrambe le concentrazioni

testate (25 e 50 $\mu\text{g/ml}$), riduce in maniera statisticamente rilevante ($p < 0.05$) la percentuale di cellule in apoptosi indotta dall' H_2O_2 dal 68% al 55% e al 20%, rispettivamente.

Inoltre, il NLX alla concentrazione 25 $\mu\text{g/ml}$, ma non alla concentrazione 50 $\mu\text{g/ml}$, induce un sensibile aumento ($p < 0,05$) della percentuale di cellule apoptotiche (29%) rispetto al gruppo di controllo (11%).

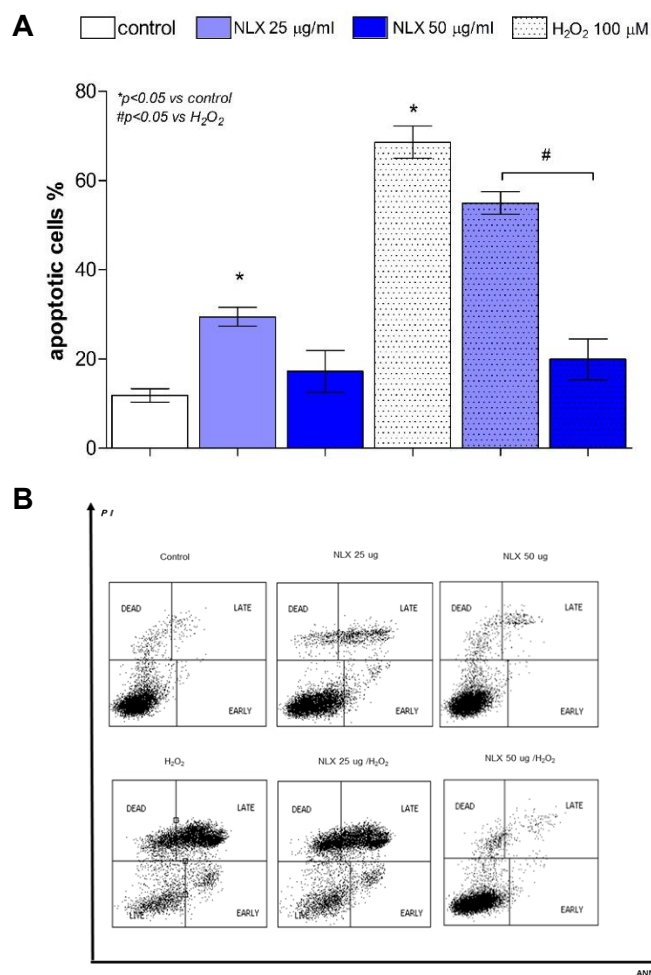


Figura 7. Analisi dell'apoptosi effettuata tramite citometria a flusso eseguita su cellule PC12 esposte per 24 ore al perossido di idrogeno in presenza di naloxone. A) I dati sono presentati come percentuale (%) di apoptosi totale (precoce e tardiva). (* $p < 0,05$ versus controllo) (#

$p < 0.05$ versus H_2O_2). B) Il grafico Dot Spot mostra le percentuali di PC12 nei vari stadi di apoptosi ed è rappresentativo di uno dei tre esperimenti indipendenti.

È stata poi effettuata l'analisi sulla distribuzione delle fasi del ciclo cellulare. Come evidenziato nella fig. 8, l'insulto ossidativo indotto dall' H_2O_2 porta ad aumento significativo ($p < 0.05$) della percentuale di cellule nella fase G2/M ed una leggera modifica delle fasi G0/G1 ed S rispetto al controllo. La presenza del NLX, ad entrambe le concentrazioni (25 e 50 $\mu g/ml$), induce una riduzione significativa ($p < 0.05$) delle cellule in quiescenza e riporta la distribuzione delle fasi del ciclo cellulare a quella del controllo.

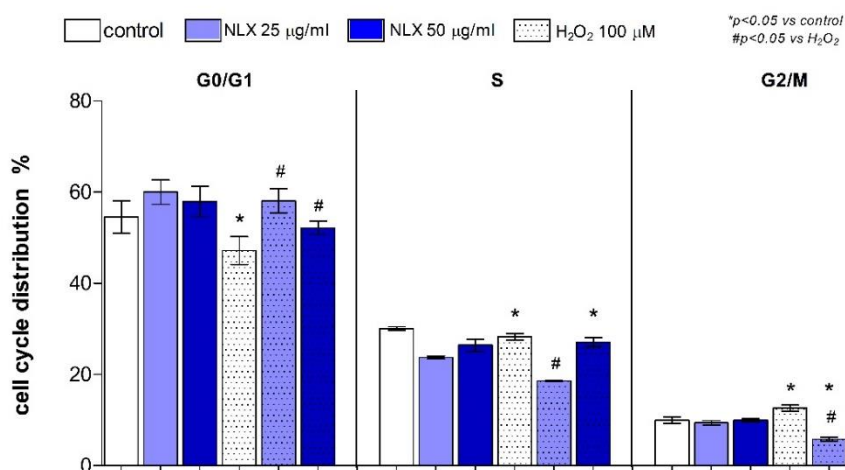


Figura 8. Effetto del naloxone in presenza di danno ossidativo indotto da perossido di idrogeno sulla distribuzione delle fasi del ciclo cellulare. I risultati sono riportati come percentuale (%) di cellule per ogni fase del ciclo cellulare (G0/G1, S, G2/M). (* $p < 0,05$ versus controllo) (# $p < 0.05$ versus H_2O_2).

Infine, è stato valutato l'effetto del NLX sul release di LDH. Come è mostrato nella fig. 9, il pretrattamento con il NLX, ad entrambe le

concentrazioni testate (25 e 50 $\mu\text{g/ml}$), riduce significativamente ($p < 0,05$) l'aumento di LDH indotto dall' H_2O_2 dal 29,5% al 10% e 13%, rispettivamente. Inoltre, l'esposizione del solo NLX, a 25 e 50 $\mu\text{g/ml}$, riduce in maniera significativa ($p < 0,05$; 6% e 10% rispettivamente) la percentuale di release di LDH rispetto al gruppo di controllo (20%).

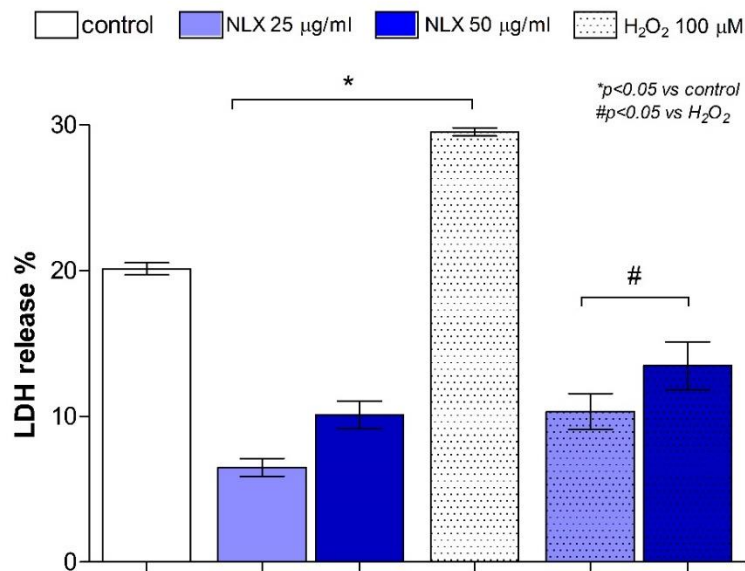


Figura 9. Livelli di rilascio di LDH in cellule PC12 esposte per 24 h a perossido di idrogeno e naloxone. I risultati sono indicati come rilascio percentuale (%) di LDH (* $p < 0,05$ versus controllo) (# $p < 0,05$ versus H_2O_2).

Risultati sulla proprietà antiossidante dell'(R)-(-)-linalolo

Il saggio MTT è stato eseguito per valutare l'effetto antiossidante dell'(R)-(-)-linalolo (0,1, 10 e 100 μM) in presenza di H_2O_2 (100 μM) nelle cellule PC12.

Come mostrato nella fig.10, la significativa ($p<0.05$) riduzione della vitalità cellulare indotta dall'esposizione all' H_2O_2 (68%) è contrastata in modo significativo ($p<0.05$) dal pretrattamento con LIN 0,1, 10 e 100 μM (74%, 80% e 79%, rispettivamente).

Inoltre, l'esposizione al LIN da solo nelle concentrazioni testate (0,1, 10 e 100 μM), non ha influenzato la vitalità cellulare rispetto al gruppo di controllo.

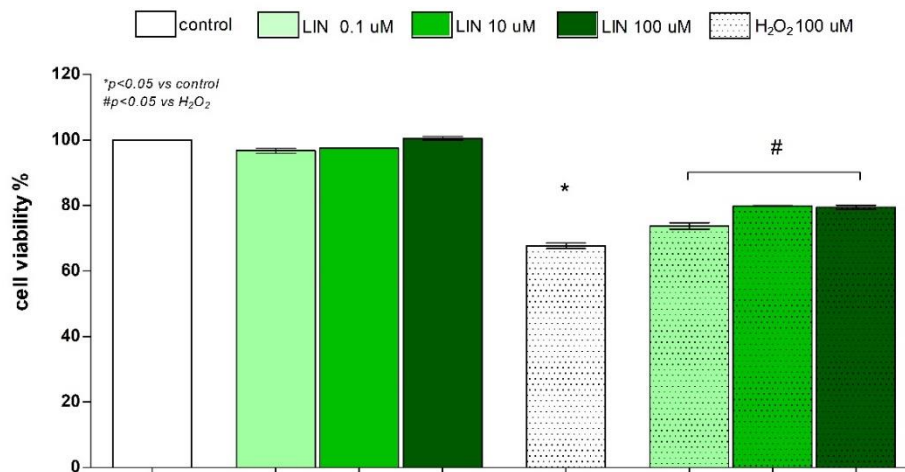


Figura 10. Vitalità cellulare delle cellule PC12 esposte a perossido di idrogeno e (R)-(-)-linalolo. Il saggio di vitalità è stato eseguito su cellule PC12 esposte per 24 h con LIN (0,1, 10 e 100 μM) singolarmente o in presenza di H_2O_2 (100 μM). (* $p<0.05$ versus controllo) (# $p<0.05$ versus H_2O_2).

Sulla base dei risultati ottenuti, le due concentrazioni più alte (10 e 100 μM), sono state utilizzate per gli esperimenti successivi.

Mediante la quantificazione dei livelli extracellulari dell'enzima LDH è stato poi valutato l'effetto dell'(R)-(-)-linalolo sul danno di membrana indotto dal perossido di idrogeno. Come mostrato nella Fig. 11, il trattamento con l' H_2O_2 induce un aumento significativo (29% $p < 0.05$) del rilascio di LDH rispetto al gruppo di controllo (20%) che viene tuttavia significativamente ridotto ($p < 0.05$) dal pretrattamento con LIN 10 e 100 μM (18% e 21%, rispettivamente).

Inoltre, è evidente che il trattamento del solo LIN (10 e 100 μM) induce una riduzione significativa ($p < 0,05$) dei livelli extracellulari di LDH (7% e 6%, rispettivamente) rispetto al gruppo di controllo (20%).

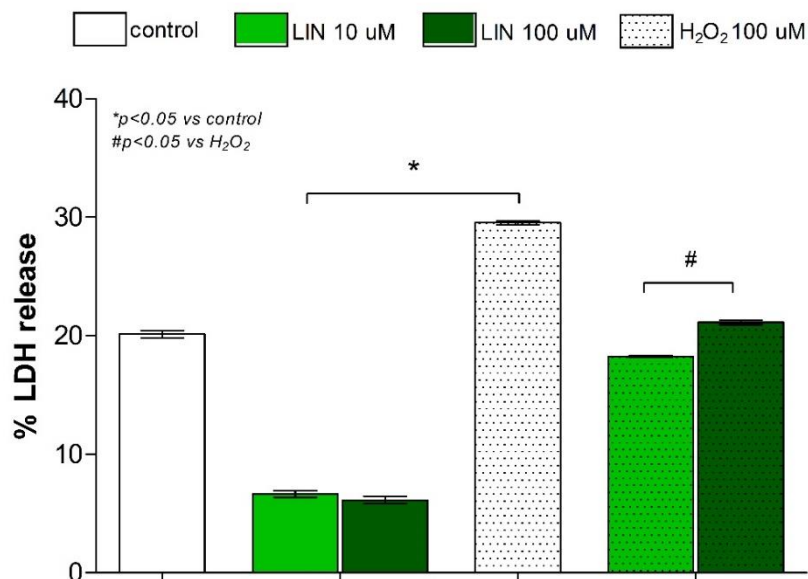


Figura 11. Rilascio di LDH in cellule PC12 dopo incubazione con LIN (10 e 100 μM) da solo e in presenza di H_2O_2 (100 μM). I risultati sono indicati come rilascio percentuale (%) di LDH. (* $p < 0,05$ versus control) (# $p < 0,05$ versus H_2O_2)

Successivamente, è stato valutato l'effetto del LIN sulla sovrapproduzione di ROS indotta dal perossido di idrogeno. Come è mostrato nel grafico (Fig.12) l'incremento dei ROS indotto dal perossido di idrogeno (68%) viene ridotto significativamente ($p < 0,05$) dal LIN 10 e 100 μM (32% e 33%, rispettivamente).

I livelli di ROS nelle cellule incubate solo con LIN non differiscono significativamente da quelli del gruppo di controllo.

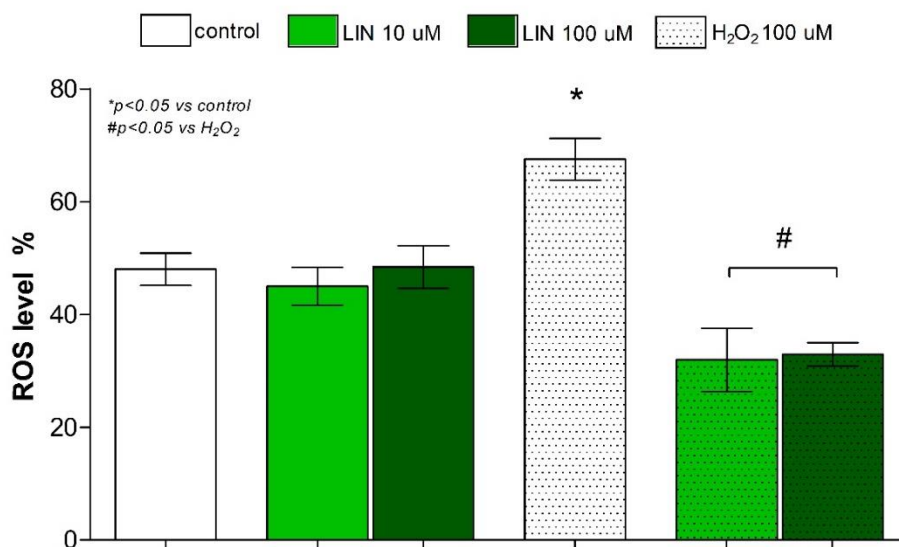


Figura 12. Effetto dell'(R)-(-)-linalolo sulla sovrapproduzione intracellulare di ROS indotta da H₂O₂, in cellule PC12. La quantità di ROS intracellulare è riportata come percentuale (%). (* $p < 0,05$ versus controllo) (# $p < 0.05$ versus H₂O₂).

Successivamente, l'effetto del LIN è stato valutato sull'aumento delle cellule apoptotiche indotto da H₂O₂. Dai risultati ottenuti (Fig.13) è emerso che l'aumento significativo ($p < 0.05$ vs gruppo di controllo) dell'apoptosi indotto dall' H₂O₂ (68%), viene ridotto significativamente ($p < 0.05$) da LIN 10 μM (54%) e LIN 100 μM (47%).

È inoltre evidente che il (R)-(-)-linalolo 10 μM , ma non 100 μM , aumenta significativamente ($p < 0,05$) l'apoptosi delle cellule PC12 dall'11% (gruppo di controllo) al 31%.

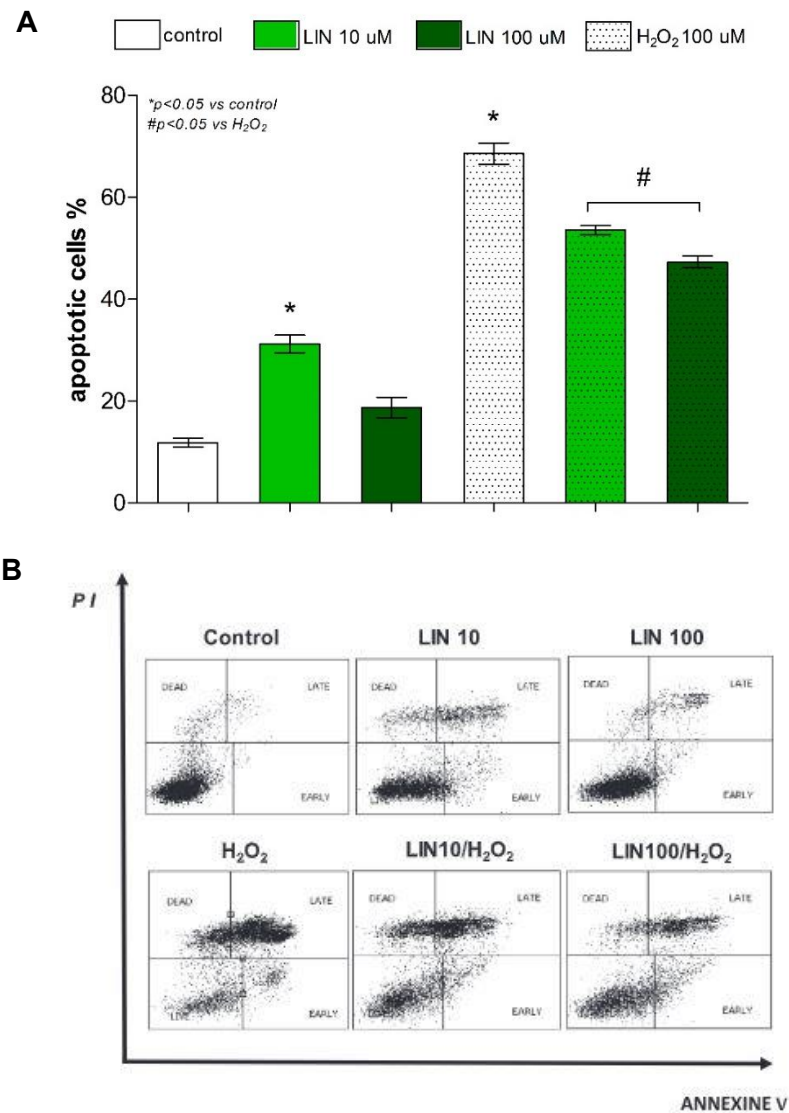


Figura 13. Quantificazione dell'apoptosi in cellule PC12 trattate con LIN senza e con H₂O₂ per 24 ore. A) Quantificazione delle percentuali di apoptosi totale (precoce e tardiva) in cellule PC12 misurata tramite citofluorimetro. (* $p < 0,05$ versus controllo) (# $p < 0,05$ versus H₂O₂). B) Profilo PI/Annexina V su cellule PC12.

Infine, si è valutato l'effetto dell'(R)-(-)-linalolo sulla distribuzione delle fasi del ciclo cellulare in presenza ed assenza di H₂O₂ (Fig.14).

L'esposizione delle PC12 all'H₂O₂ induce un aumento significativo ($p < 0.05$) del numero di cellule in fase G₂/M (12.6 %) rispetto al gruppo di controllo (10%) e induce leggere modifiche nella fase G₀/G₁. Tuttavia, il pretrattamento con il LIN, 10 e 100 μ M, riduce significativamente ($p < 0.05$) il numero di cellule stagnanti nella fase G₂/M (6.5%, 7% rispettivamente) rispetto al gruppo trattato con l'H₂O₂ e ripristina condizioni simili al controllo nelle diverse fasi del ciclo cellulare.

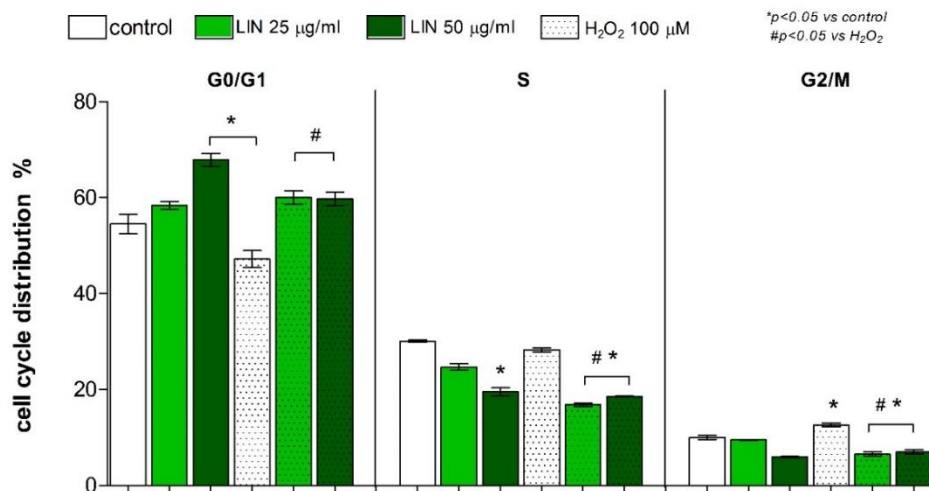


Figura 14. Effetto del trattamento dell'(R)-(-)-linalolo, da solo e in presenza di perossido di idrogeno, sulla distribuzione delle cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare. I risultati sono riportati come percentuale (%) di cellule per ogni fase del ciclo cellulare (G₀/G₁, S, G₂/M). (* $p < 0,05$ versus Control) (# $p < 0.05$ versus H₂O₂).

Risultati dell'effetto dell'Acido Poli [3-(3,4-di-idrossifenil)] glicerico sulle cellule PC12

È stata valutata la citotossicità e l'eventuale effetto antiossidante del dell'Acido Poli [3-(3,4-di-idrossifenil)] glicerico (PDPGA), alle concentrazioni 1-5-10-15-20-50 $\mu\text{g/ml}$, su cellule PC12 esposte a H_2O_2 (100 μM) per 24h con saggio MTT. Dai risultati ottenuti, mostrati nella fig.15, è emerso che l'acido poli [3-(3,4-di-idrossifenil)] glicerico, a nessuna delle concentrazioni testate (1-5-10-15-20-50 $\mu\text{g/ml}$), è in grado di prevenire la riduzione della vitalità cellulare indotta dall' H_2O_2 . Inoltre, il PDPGA, alle concentrazioni più alte di 1 $\mu\text{g/ml}$, riduce la vitalità cellulare in maniera significativa ($p < 0.05$) rispetto al controllo in modo concentrazione dipendente.

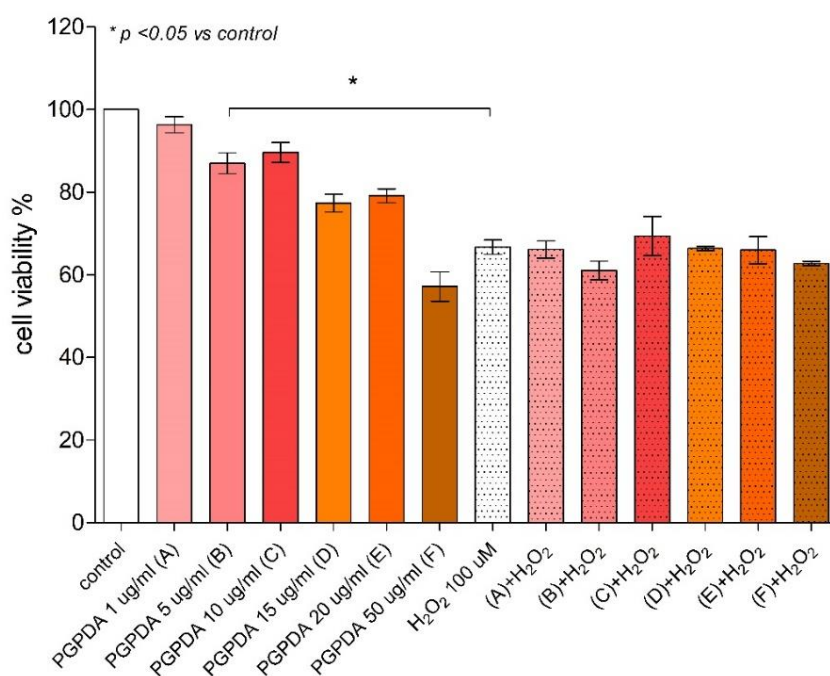


Figura 15. Vitalità cellulare delle cellule PC12 in seguito a trattamento con PDPGA da solo e in presenza di perossido di idrogeno. Le cellule sono state trattate con PDPGA (1-5-10-20-50 $\mu\text{g/ml}$) da solo e in presenza di H_2O_2 (100 μM) per 24 ore. (* $p < 0,05$ versus controllo)

Tra le concentrazioni testate, 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$, sono state individuate come ottimali e utilizzate negli esperimenti successivi.

In seguito, è stato valutato il possibile effetto protettivo di PDPGA sul danno di membrana indotto dal perossido di idrogeno attraverso il saggio LDH.

I dati ottenuti e mostrati nella fig.16, rivelano che la presenza di H_2O_2 induce un aumento significativo (48.9 %, $p<0.05$) del rilascio dell'LDH se confrontato con il controllo (28.6%). Il pretrattamento con PDPGA 10 $\mu\text{g/ml}$ e 20 $\mu\text{g/ml}$ riduce significativamente ($p<0.05$) il release di LDH (39,6% e 33.9%, rispettivamente) rispetto all' H_2O_2 .

L'acido poli [3-(3,4-di-idrossifenil)] glicerico da solo (10 e 20 $\mu\text{g/ml}$) non determina delle variazioni significative nel rilascio di LDH rispetto al controllo.

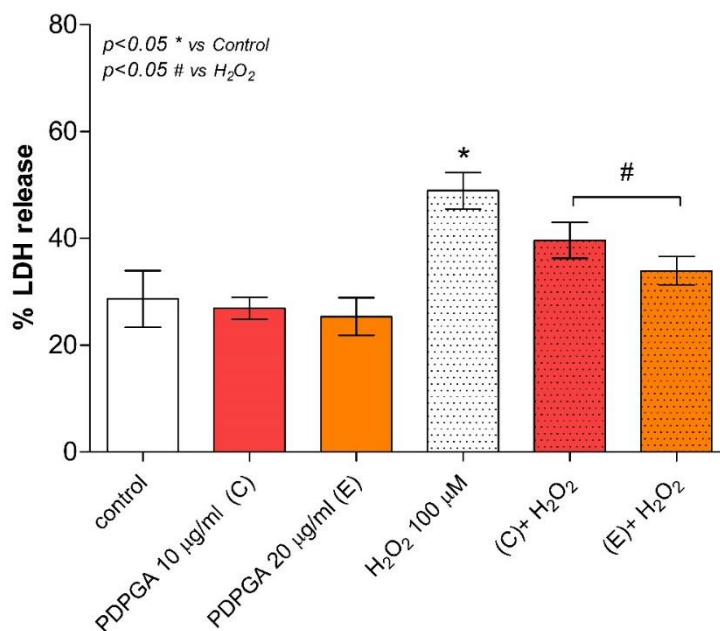


Figura 16. Rilascio di LDH in cellule PC12 dopo incubazione con PDPGA 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$ da solo e in presenza di H_2O_2 (100 μM). I risultati sono indicati come rilascio percentuale (%) di LDH (* $p<0,05$ versus controllo) (# $p<0.05$ versus H_2O_2).

Per studiare ulteriormente l'effetto del PDPGA, sono state effettuate analisi citometriche sulla sovrapproduzione di ROS e sull'apoptosi, indotte dal trattamento con H₂O₂ sulle PC12. I dati ottenuti relativi ad entrambe le analisi, mostrati nelle fig. 17 e 18, hanno evidenziato che nessuna delle due concentrazioni del PDPGA testate (10 e 20 µg/ml), ha contrastato l'aumento della produzione dei ROS intracellulare né ha ridotto l'apoptosi indotta dal perossido di idrogeno.

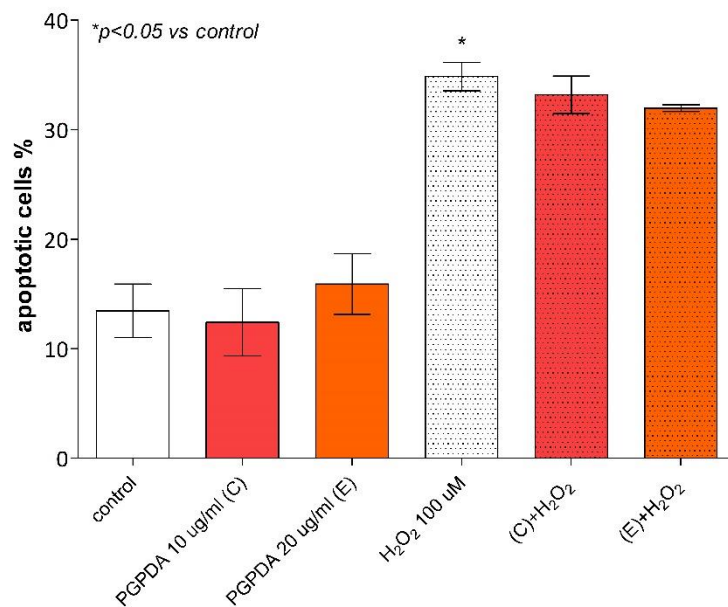


Figura 17. Quantificazione dell'apoptosi in cellule PC12 trattate con PDPGA (10 e 20 µg/ml) senza e con H₂O₂ (100 µM) per 24 ore. Quantificazione delle percentuali di apoptosi totale (precoce e tardiva) in cellule PC12 misurata tramite citofluorimetro. (* p<0,05 versus controllo).

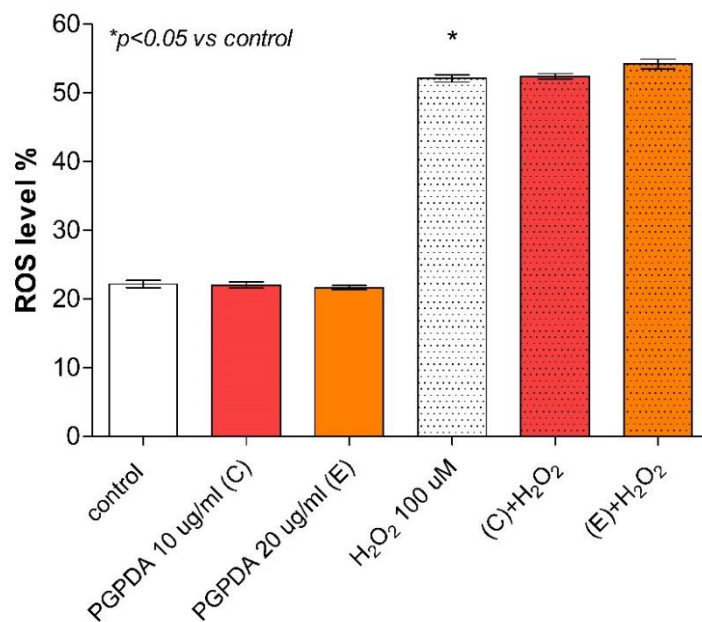


Figura 18. Effetto del PDPGA, 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$, sulla sovrapproduzione intracellulare di ROS indotta da H_2O_2 , in cellule PC12. La quantità di ROS intracellulare è riportata come percentuale (%). (* $p < 0,05$ versus controllo).

Discussione

Lo stress ossidativo è un meccanismo di danno cellulare determinato dallo squilibrio tra le specie ossidanti, caratterizzate da elevata reattività e instabilità chimica, e le difese antiossidanti endogene della cellula¹³.

È ormai risaputo infatti, che la disfunzione e la morte delle cellule neuronali dovute allo stress ossidativo contribuiscano alla patogenesi di disturbi neurodegenerativi, come la malattia di Alzheimer, il morbo di Parkinson e la Sclerosi Laterale Amiotrofica⁴⁵.

Negli ultimi anni, i notevoli progressi nella comprensione della neurodegenerazione sono purtroppo paralleli allo scarso successo nel trovare terapie efficaci in grado di arrestare la progressione della malattia. A questo proposito, è cresciuta l'attenzione e l'interesse verso composti antiossidanti, naturali e non, come fonte di agenti neuroprotettivi⁴⁶.

Gli antiossidanti, infatti, sono considerati un approccio promettente per rallentare la progressione e limitare l'entità della perdita di cellule neuronali e quindi per la prevenzione e trattamento delle patologie neurodegenerative^{45,47,48}. Lo scopo di questo studio è stato identificare nuovi agenti antiossidanti, di origine naturale e no, tra composti già conosciuti in letteratura per altre attività farmacologiche.

Durante il percorso di dottorato sono state testate le eventuali proprietà antiossidanti di tre sostanze, naloxone, (R)-(-)-linalolo in collaborazione con la prof.ssa Peana, e acido poli [3-(3,4-di-idrossifenil)] glicerico in collaborazione con la prof.ssa Gavini, osservandone l'effetto in un modello cellulare di PC12 in cui è stato indotto stress ossidativo con perossido di idrogeno. L'esposizione all'H₂O₂, infatti, induce l'aumento dei ROS oltre i livelli fisiologici e conduce le cellule verso il danno ossidativo^{49,50}.

Il Naloxone è un antagonista dei recettori oppioidi, ampiamente espressi sulle cellule del sistema nervoso centrale e periferico^{51,52}. La

presenza nella sua struttura di un gruppo idrossile permette di considerarlo un composto fenolico complesso ⁵³ e, considerati i polifenoli la più grande famiglia di antiossidanti, un potenziale antiossidante. I risultati ottenuti hanno mostrato che il naloxone possiede un'interessante proprietà antiossidante, proteggendo le cellule PC12 dal danno ossidativo indotto dal perossido di idrogeno. Gli esperimenti effettuati hanno rivelato la capacità del NLX di contrastare la sovrapproduzione intracellulare di ROS, come mostrato dal lavoro di Mikawa e colleghi ⁵⁴, e l'apoptosi, entrambi indotti dall'H₂O₂. Questi risultati sono coerenti con l'ipotesi che il NLX possa determinare una riduzione dose-dipendente del numero di cellule apoptotiche riducendo i livelli di ROS. Come è noto in letteratura, infatti, lo stress ossidativo è coinvolto nell'induzione dell'apoptosi⁵⁵ e diversi studi hanno riportato che la sovrapproduzione di ROS è causa di apoptosi ^{50,56}. A conferma dell'effetto antiossidante del NLX, i dati ottenuti dall'analisi della distribuzione delle fasi del ciclo cellulare e la determinazione dei livelli di release di LDH, hanno rivelato la capacità del NLX di prevenire l'aumento della percentuale di cellule stagnanti in fase G2/M e di ridurre il rilascio di LDH, conseguenti all'esposizione al perossido di idrogeno.

Questo lavoro ha permesso di dimostrare che il naloxone possiede un'interessante e significativa attività antiossidante e ha consentito di valutare la sua azione farmacologica da un altro punto di vista.

Lo studio è proseguito testando le proprietà antiossidanti e neuroprotettive di un altro composto, l'R-(-)-linalolo ampiamente utilizzato nell'industria alimentare e cosmetica, in condizioni di stress ossidativo. Diversi lavori scientifici riportano le proprietà antiossidanti del linalolo, monoterpene di origine naturale, nella sua forma racema^{34,35} e la capacità del suo enantiomero R di ridurre la morte

cellulare mediata dallo stress ossidativo in cellule neuronali HT-22 immortalizzate³⁵.

I risultati ottenuti in questo lavoro tramite un approccio convergente e complementare, hanno dimostrato che il LIN ha proprietà antiossidanti capaci di contrastare lo stress ossidativo. Il trattamento con il LIN a entrambe le concentrazioni testate, riporta la vitalità delle cellule PC12 esposte al perossido di idrogeno a valori simili a quelli del controllo e riduce il rilascio di LDH indotto dal danno ossidativo. Questo risultato è parzialmente in accordo con lo studio effettuato da Sabogal-Guáqueta et al. (2018)³⁶ che dimostra la capacità del linalolo racemico di proteggere i neuroni e gli astrociti riducendo il rilascio di LDH in un modello in vitro di eccitotossicità da glutammato. L'effetto protettivo del LIN è stato osservato nella riduzione dell'apoptosi, come dimostrato dallo studio di Yuan et al. (2021)⁵⁷, e nella riduzione della sovrapproduzione di ROS, indotti dall'H₂O₂. Come osservato precedentemente in questo studio, la riduzione dei ROS da parte del LIN potrebbe essere responsabile della diminuzione dell'apoptosi indotta da perossido di idrogeno. A completare l'indagine, i dati ottenuti dall'analisi sulla distribuzione del ciclo cellulare hanno mostrato che il LIN riduce la percentuale di cellule che ristagnano nella fase G2/M indotta dal perossido di idrogeno, confermando l'efficacia di questo composto nei confronti dello stress ossidativo. L'R-(-)-linalolo possiede capacità antiossidanti e neuroprotettive, che lo rendono un candidato promettente come coadiuvante nella gestione delle terapie delle patologie neurodegenerative correlate con lo stress ossidativo.

Una parte del terzo anno di dottorato è stata dedicata allo studio dell'acido [3-(3,4-diidrossifenil)] glicerico. In letteratura è riportato che il polimero naturale suddetto possiede attività antiossidante contro le specie reattive dell'ossigeno⁵⁸ ed è capace di ridurre la produzione di ROS nei neutrofili. Da una prima indagine tuttavia l'acido [3-(3,4-

diidrossifenil)] glicerico non ha mostrato una significativa attività neuroprotettiva sulle cellule PC12 nei confronti del danno ossidativo indotto da perossido di idrogeno. I risultati ottenuti, mostrano infatti che non modifica la percentuale di mortalità né la sovrapproduzione di ROS mediata dall' H_2O_2 . I dati ottenuti dal saggio LDH hanno evidenziato la capacità del PDPGA di ridurre il rilascio di lattato deidrogenasi indotto da perossido di idrogeno, indicandone un effetto protettivo nei confronti del danno ossidativo. Questo risultato interessante non è stato supportato dalle analisi precedenti e per questo non è possibile affermare che il PDPGA possieda attività antiossidante.

In conclusione, i risultati ottenuti da questo studio, condotto durante il percorso del dottorato, hanno rivelato che solo due delle tre sostanze oggetto di indagine, l'R-(-)-linalolo di origine naturale e il naloxone molecola sintetica, mostrano proprietà antiossidanti, utili per contrastare il processo neurodegenerativo mediato da stress ossidativo. I dati incoraggianti, ne fanno ipotizzare il loro possibile utilizzo nell'integrazione e come coadiuvanti nei trattamenti farmacologici tradizionali delle patologie neurodegenerative nelle quali lo stress ossidativo gioca un ruolo centrale.

A Portsmouth

Durante il periodo all'estero svolto presso la School of Pharmacy and Biomedical Sciences dell'Università di Portsmouth, sono stati effettuati studi di caratterizzazione farmaceutica dell'acido [3-(3,4-diidrossifenil)] glicerico, sostanza polimerica di origine naturale, precedentemente studiata nei laboratori di Sassari.

I polimeri sono macromolecole di origine naturale, sintetica o semisintetica usati in campo farmaceutico come eccipienti e per la preparazione di sistemi innovativi di drug delivery. In letteratura, è noto che sono diverse le proprietà attribuite ai polimeri di origine naturale, tra le quali la muco-adesione⁵⁹, cioè la capacità di una molecola di aderire alle mucose. Questo permette di prolungare il tempo di permanenza del medicinale e quindi anche del farmaco in esso incluso, nel sito di somministrazione prolungandone quindi l'azione farmacologica. Questo effetto è sfruttato, per esempio, nella somministrazione di farmaci per via buccale, vaginale e nasale ⁶⁰.

Alcuni autori riportano che caratteristiche strutturali specifiche come la presenza di un gruppo catecolico nella molecola, possono determinare in una sostanza la proprietà mucoadesiva ⁶¹. Il polimero considerato in questo studio, l'acido poli [3-(3,4-di-idrossifenil)] glicerico (PGPDA), presenta gruppi catecolici e quindi è potenzialmente una sostanza mucoadesiva.

In questo studio sono stati condotti una serie di test per valutare l'eventuale effetto muco adesivo del polimero attraverso la sua capacità di interagire con la mucina porcina di tipo II, glicoproteina presente nei secreti del tratto gastrico porcino, attraverso diverse metodiche quali: saggio turbidimetrico, analisi del potenziale zeta e della dimensione delle particelle, analisi spettrometrica mediante FTIR, NMR e imaging al SEM.

Tuttavia, l'assorbimento transmucoale di farmaci idrofili, come per esempio peptidi e proteine, è scarso con una conseguente bassa biodisponibilità. Per ovviare a ciò, una temporanea modificazione della struttura delle barriere epiteliali può essere necessaria. Questo effetto si può ottenere attraverso l'impiego di sostanze, chiamate promotori dell'assorbimento⁶². Tra i composti che presentano questa attività ci sono alcuni polimeri naturali come per esempio il chitosano.

Per determinare se PGPDA avesse questa proprietà, è stato miscelato con un farmaco modello, la genisteina, ed è stato valutato se la quantità di genisteina capace di attraversare un monostato epiteliale di cellule Caco-2 aumentasse in presenza del polimero. Le cellule Caco-2, provenienti da adenocarcinoma del colon umano sono considerate un ottimo modello di barriera intestinale umana^{63,64}.

L'effetto del polimero sul passaggio transepiteliale della genisteina, è stato determinato attraverso la quantificazione della genisteina, impiegando la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC).

Sempre durante la permanenza a Portsmouth, è stato intrapreso un altro progetto, che ha previsto la sintesi, la caratterizzazione e lo studio delle proprietà mucoadesive e antiossidanti (*in vitro* e su cellule) di un nuovo polimero costituito da alginato (Alg) e un catecolo di nuova sintesi indicato con la sigla DOP (Alg-DOP). L'alginato è stato utilizzato in quanto polimero polisaccaridico naturale con un'eccellente biocompatibilità e biodegradabilità e utilizzato per diverse applicazioni nel campo della biomedicina, tra i quali gli hydrogel e i sistemi di drug delivery⁶⁵. La scelta di utilizzare un catecolo per la sintesi di questo nuovo polimero è stata invece dettata dalla presenza di alcune caratteristiche chimiche simili al polimero utilizzato fino ad ora nei nostri studi. DOP, infatti, possiede due gruppi idrossilici in posizione orto, che condivide con l'acido poli [3-(3,4-di-idrossifenil)] glicerico e

che potrebbero conferirgli proprietà adesive. La caratterizzazione del nuovo polimero Alg-DOP è stata effettuata tramite analisi spettrometrica (UV, FTIR, NMR) per determinarne la struttura molecolare e chimica; la proprietà antiossidante in vitro mediante saggio CUPRAC-BCS e su cellule PC12 tramite saggio MTT; e l'analisi della proprietà mucoadesiva è stata determinata osservando la possibile interazione con la mucina porcina di tipo II attraverso saggio turbidimetrico.

Materiali e Metodi

Sintesi Alg-DOP

La sintesi di Alg-DOP è stata effettuata disciogliendo l'alginato di sodio, l'N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimmide (EDC), l'N-idrossisuccinimide (NHS) e DOP, in 100 ml di soluzione tampone PBS (50 mM, pH 5,5) sotto agitazione e a temperatura ambiente fino alla completa dissoluzione, nelle quantità riportate nella tab.1.

Prodotto	Alginato (g)	NHS (g)	EDC (g)	DOP (g)
Alg-DOP1	1.000	0.217	0.330	0.700
Alg-DOP2	1.000	0.500	0.700	1.300
Alg-DOP4	1.000	1.000	1.330	2.700

Tabella 1. Le diverse quantità di DOP utilizzate nella sintesi di Alg-DOP.

Il prodotto è stato purificato mediante precipitazione in etanolo per tre volte e successivamente liofilizzato.

Quantificazione spettrofotometrica di DOP

L'assorbanza UV è stata utilizzata per determinare il grado di modificazione dei derivati dell'alginato, come descritto da Y. R. Ji, et al. 2022 e Chi J. et al. 2022 ^{66,67}. In breve, da una soluzione madre di DOP (1,25 mg/ml) sono state preparate diluizioni nell'intervallo da 0,156 a 0,00975 mg/ml. L'assorbanza di queste soluzioni è stata letta a 280 nm per creare una curva di calibrazione. Le letture sono state effettuate utilizzando lo spettrofotometro Spectramax x13 Plate reader (Molecular Devices, USA).

Saggio turbidimetrico per determinazione muco-adesione

Le dispersioni di PDPGA (0.5-1-2-4 mg/ml e di Alg-DOP1/Alg-DOP2/Alg-DOP4 (0.5-1-2-4-8 mg/ml) in PBS e soluzione salina ipertonica (NaCl) sono state mescolate con la dispersione di mucina porcina di tipo II 4 mg/ml (1:1; v:v) e incubate per 30 minuti a temperatura ambiente e, successivamente, lette a $\lambda = 600$ nm utilizzando il lettore di piastre Spectramax x13 Plate reader (Molecular Devices, USA).

I valori ottenuti (n=3) sono stati poi analizzati secondo il metodo di He et al. ⁶⁶.

Analisi dimensione e carica superficiale delle particelle

50 μ l delle dispersioni di mucina porcina di tipo II 4 mg/ml, PDPGA 4 mg/ml e PDPGA 4mg/ml-mucina 4mg/ml, sono state raccolte dalla multi-well da 96 pozzetti utilizzata per il saggio turbidimetrico, diluite con 950 μ l di acqua deionizzata, risospese, trasferite su cuvetta specifica (dotata di elettrodi) e lette utilizzando il Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., GB).

Spettroscopia Infrarossa Trasformata di Fourier (FTIR) e Risonanza Magnetica Nucleare (NMR)

Le analisi FTIR e NMR sono state utilizzate per determinare la struttura molecolare e la composizione chimica di un campione (Alg-DOP) e l'interazione del polimero PDPGA con la mucina.

Per l'analisi FTIR, i campioni sono stati usati in forma liofilizzata. Gli spettri sono stati ottenuti utilizzando Varian FTIR 640-IR, ATR + Solution, ed analizzati con il software Resolution Pro FTIR (v5,3.0.1694) Agilent Technologies.

Per l'analisi NMR, i campioni sono stati preparati diluendo, poche gocce delle soluzioni in esame, in 1 ml di ossido di deuterio (D₂O).

Gli spettri sono stati poi ottenuti utilizzando lo spettrometro 400 MHz Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (JEOL, Oxford Instruments, Abingdon, UK) e analizzati tramite il software JEOL Delta (v5.0.1).

Imaging al Microscopio Elettronico a Scansione (SEM)

Le caratteristiche morfologiche dei campioni sono state osservate tramite analisi al SEM. I campioni di PDPGA/mucina/PDPGA-mucina in forma liofilizzata sono stati trasferiti e montati su pin stub. Dopo essere stati rivestiti d'oro, utilizzando uno sputter coater (Polaron e500, Quoram Technologies, UK), i campioni sono stati poi analizzati al JEOL JSM-6060 LV Scanning Electron Microscope.

Saggio antiossidante in vitro CUPRAC-BCS

Per testare l'attività antiossidante totale è stato utilizzato il saggio CUPRAC con l'uso del sale disodico dell'acido bathocuproinedisolfonico. I campioni in esame sono stati disciolti in acqua deionizzata e ulteriormente diluiti per ottenere una gamma di soluzioni di prova. Come standard sono stati utilizzati l'acido gallico e il trolox. Metodo illustrato da Campos et al. 2009⁶⁸.

Saggio di vitalità MTT

Le cellule PC12 sono state esposte per 24 ore con a) DOP 10-25-50-75-100 μM e Alg-DOP1/Alg-DOP2/Alg-DOP4 50-75-100 μM , b) DOP/Alg-DOP1/Alg-DOP2/Alg-DOP4 25 e 50 μM , in presenza e assenza di H_2O_2 100 μM (applicata 20 minuti dopo).

Allo scadere del tempo di trattamento, la valutazione della citotossicità e dell'eventuale effetto antiossidante sono stati effettuati mediante saggio MTT (vedi "Saggio MTT" nella sezione "Materiali e Metodi" a pag.22)

Test di permeabilità Caco-2 e cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC)

Le cellule sono state propagate in fiasche T75 con DMEM addizionato con il 10% di FBS, l'1% di aminoacidi non essenziali, l'1% di L-glutamina e l'1% della miscela antibiotica PEN/STREP, alla temperatura di 37°C e in atmosfera umidificata al 5% di CO_2 . Per ottenere una coltura monostrato, le cellule Caco-2 sono state seminate alla densità di 2×10^5 cellule/0.5 mL sul versante apicale di inserti transwell per piastre da 12 pozzetti (porosità: 0,4 μm , area: 1,12 cm^2) e il versante basolaterale dei pozzetti è stato riempito con 1.5 ml di medium completo. Il terreno di coltura è stato sostituito, in entrambi i compartimenti ogni 2-3 giorni, per 21 giorni totali necessari all'ottenimento di un monolayer cellulare differenziato. La misurazione della resistenza elettrica transepiteliale (TEER, espressa in Ohm cm^{-2}), attraverso lo strumento EVOM Meter (World Precision Instrument, Inc. USA), è stata utilizzata per valutare l'integrità e lo sviluppo del monostrato cellulare. I valori di TEER dei monostrati utilizzati per gli esperimenti avevano valori superiori ai 500 $\Omega \text{ cm}^{-2}$. Prima di effettuare i trattamenti, ogni singolo monostrato è stato lavato due volte in PBS, pre-incubato con HBSS e poi esposto apicalmente con genisteina (GEN) 100 mM da sola e in presenza di

PDPGA 50 µg/ml o chitosano 0.003 %, utilizzato come controllo, per 15-30-60-120 minuti a 37 °C (le concentrazioni utilizzate sono state individuate previa valutazione citotossicità tramite saggio MTT). Per ogni tempo di esposizione e per ogni condizione sperimentale, sono stati prelevati 300 µl provenienti dal compartimento basolaterale (tra i vari tempi sperimentali, il quantitativo di campione prelevato è stato reintegrato con HBSS). I campioni raccolti sono stati poi analizzati mediante metodo cromatografico liquido ad alte prestazioni (HPLC) secondo il metodo descritto da Zampieri et al (2013)⁶⁹.

Il contenuto di GEN per ciascun campione è stato determinato utilizzando una curva di calibrazione della genisteina precedentemente preparata (curva lineare nell'intervallo 0,1-75,0 µg/ml; R2 =0,99993). I dati riportati sono stati ottenuti dalla media di tre analisi indipendenti.

Proprietà dell'acido poli [3(3,4-di-idrossifenil)] glicerico (PDPGA)

Risultati

La determinazione della possibile proprietà muco-adesiva è stata effettuata osservando la presenza o assenza di interazione con la mucina porcina di tipo II, attraverso saggio turbidimetrico, analisi del potenziale zeta e della dimensione delle particelle, analisi spettrometrica mediante FTIR e imaging al SEM.

Dai risultati ottenuti tramite il saggio di turbidità (Tab. 2 e 3) è emerso che il valore di assorbanza (indicato in tabella come assorbanza reale, A_{act}) delle miscele di PDPGA-mucina sia in PBS che in NaCl risulta inferiore alla somma dei valori di assorbanza delle singole dispersioni (indicato in tabella come assorbanza teorica, A_{ther}) di PDPGA e mucina, e la differenza (indicata in tabella con ΔA) tra l'assorbanza reale e quella

teoretica mostra valori negativi, evidenziando secondo He et al.⁶⁶, l'assenza di interazione tra le due sostanze.

Dispersione in PBS	A_{ther}	A_{act}	ΔA	Interazione
PDPGA 0.5 mg/ml-Mucina 4 mg/ml	0.700	0.550 $\pm 0,006340602$	-0.150	No
PDPGA 1 mg/ml-Mucina 4 mg/ml	0.857	0.718 \pm 0,009094147	-0.139	No
PDPGA 2 mg/ml-Mucina 4 mg/ml	1.346	1.194 \pm 0,03961443	-0.152	No

PDPGA 4 mg/ml-Mucina 4 mg/ml	1.908	1.707± 0,01893158	-0.200	No
---	-------	----------------------	---------------	-----------

Dispersione in NaCl	Ather	Aact	ΔA	Interazione
PDPGA 0.5 mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,171	0,1285± 0,00459619	-0,042	No
PDPGA 1 mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,202	0,1695± 0,00671751	-0,033	No
PDPGA 2 mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,212	0,173667±0, 0124922	-0,038	No
PDPGA 4 mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,268	0,222833± 0,011077	-0,045	No

Tabelle 2,3. Valori ΔA delle miscele di PDPGA-mucina in due diversi solventi.

Successivamente, è stata effettuata l'analisi della dimensione delle particelle e della carica superficiale delle sostanze in esame per valutare eventuali modifiche di interazione della miscela rispetto alle sostanze singole. I risultati ottenuti, mostrano che nella miscela PDPGA-mucina non è rilevato nessun cambiamento nella dimensione delle particelle (dato non mostrato) suggerendo l'assenza di interazione tra le due sostanze. A confermare il risultato, è la mancanza di un cambiamento rilevante del valore di potenziale zeta (Fig. 19) della miscela PDPGA 4mg/ml-mucina 4mg/ml; infatti, seppur il valore ottenuto risulta significativamente ($p < 0.05$) minore (-58 mV) rispetto alla sola mucina 4mg/ml (-18.5 mV) e al solo PDPGA 4mg/ml (-46 mV), l'aumento del valore della negatività sembra essere relativo alla

somma delle cariche nette delle singole sostanze e non alla loro interazione.

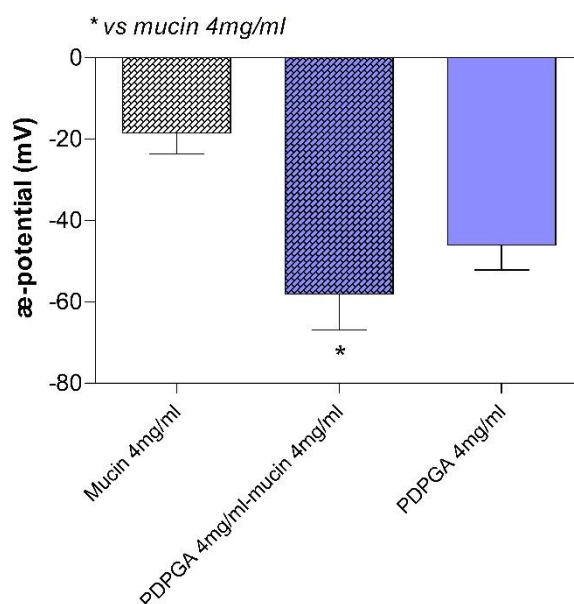


Figura 19. Carica superficiale netta (media \pm SD, n = 3)

In seguito, è stata effettuata l'analisi spettrometrica FTIR (Fig.20) in quanto capace di fornire delle informazioni sull'eventuale presenza e natura molecolare delle interazioni tra l'acido poli [3-(3,4-diidrossifenil)] glicerico e la mucina porcina di tipo II.

L'analisi dello spettro tramite FTIR ha rivelato che, gli spostamenti verso il blu dei picchi nella regione dei 3.300 cm^{-1} (assegnati allo stretching dell'NH), e nella regione dei $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ (assegnati alla banda amidica I dello stretching del C=O) che si verificano tra la mucina e la nicotina secondo X. Liao et al. 2016 ⁷⁰, non sono presenti nella miscela mucina-PDPGA. Questi risultati suggeriscono che le possibili interazioni tra le due molecole non hanno alcun effetto sulla struttura secondaria della proteina. Tuttavia, la riduzione dell'intensità del picco della mucina (intorno a 3.300 cm^{-1} assegnata alle vibrazioni O-H e N-H dei gruppi carbossilici ⁷¹), nella miscela rispetto alla soluzione con solo mucina, potrebbe indicare la possibile formazione di legami a idrogeno.

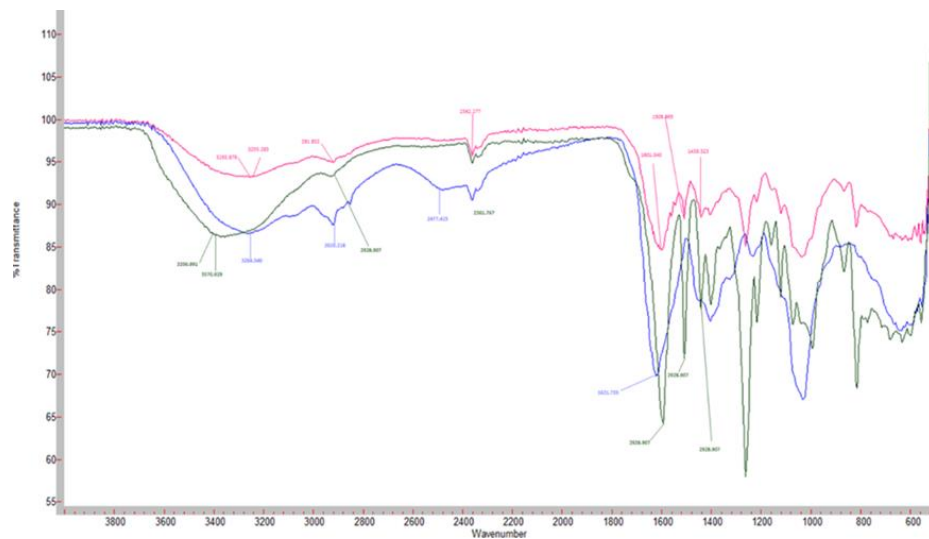


Figura 20. Spettri FTIR di campioni essiccati di mucina suina di tipo II (linea blu), PDPGA (linea verde) e PDPGA-mucina suina di tipo II (linea rosa).

Infine, per determinare le possibili interazioni tra PDPGA e mucina, è stata focalizzata l'attenzione su eventuali differenze morfologiche rispetto alle due sostanze separate, tramite imaging al SEM. Dalle immagini ottenute (Fig.21) emerge che la presenza di particelle di PDPGA ben distinte (indicate dalla freccia), nell'immagine relativa alla miscela PDPGA-mucina, è indicativa dell'assenza di interazione tra le due sostanze.

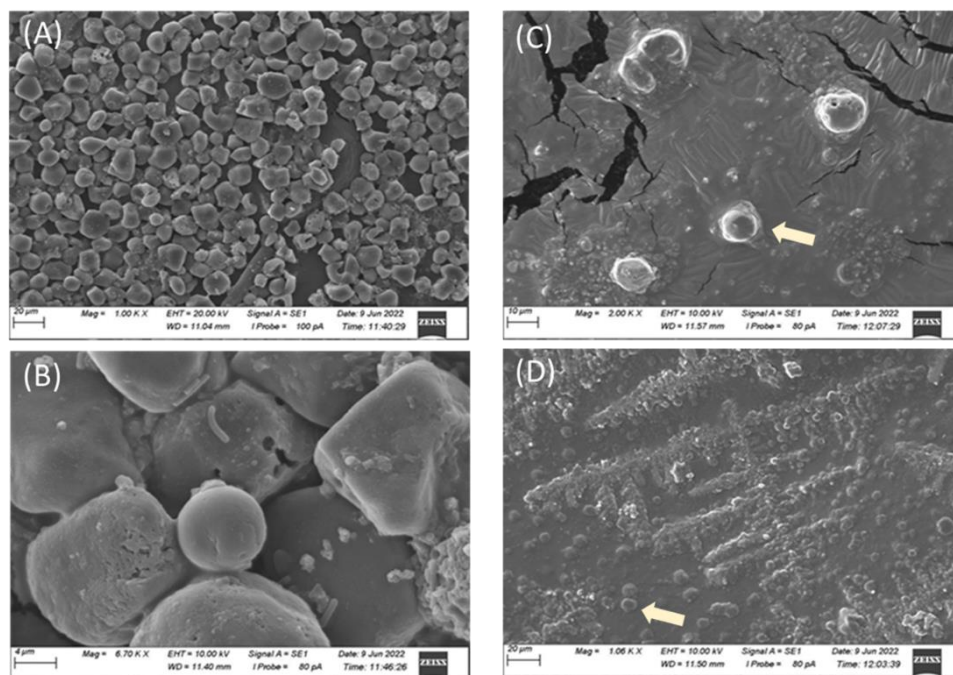


Figura 21. Immagini acquisite al Microscopio Elettronico a Scansione dei campioni liofilizzati di A) e B) mucina porcina di tipo II, C) PDPGA e D) PDPGA-mucina.

Successivamente è stato valutato l'effetto di promotore dell'assorbimento del PDPGA sul passaggio transepiteliale della genisteina, tramite quantificazione della genisteina all'HPLC (fig. 22). Dai risultati ottenuti è emerso che la quantità di genisteina rilevata nei campioni prelevati dal compartimento basolaterale dei monostrati cellulari trattati con genisteina e PDPGA, dopo 60 e 120 minuti, risulta significativamente minore ($p < 0,05$; 3,7 e 27,6 ng/20 μ l, rispettivamente) rispetto alla quantità rilevata nei campioni dei monostrati trattati con la sola genisteina (12,25 e 51,5 ng/20 μ l, rispettivamente). Inoltre, dai risultati emerge che la quantità di genisteina che passa dal compartimento apicale a quello basolaterale dei monostrati cellulari in presenza di PDPGA a 60 e 120 minuti, è simile

alla quantità di genisteina rilevata nei campioni basolaterali dei monostrati trattati anche con il chitosano (4,2 e 28,7 ng/20 μ l rispettivamente), utilizzato come controllo.

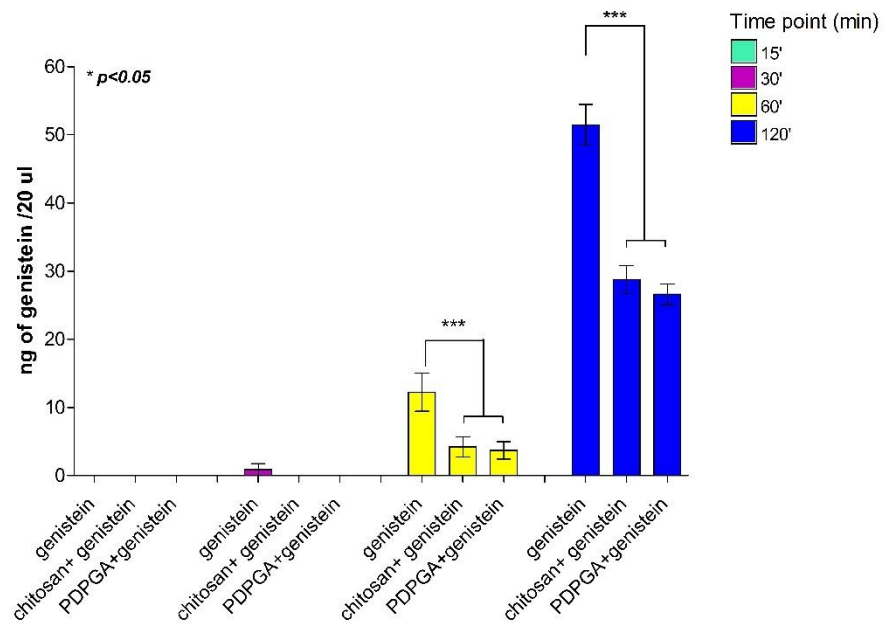


Figura 22. Quantificazione della genisteina a 15, 30, 60 e 120 minuti, mediante HPLC. I risultati sono riportati come ng di genisteina per 20 μ l di campione. (* $p<0.05$)

Conclusione

L'eventuale proprietà muco-adesiva del polimero naturale PDPGA, è stata valutata osservando la sua interazione con la mucina porcina di tipo II. I risultati ottenuti mediante le analisi turbidimetrica, sulla dimensione e carica superficiale delle particelle, FTIR e al SEM, hanno rivelato che il PDPGA non interagisce con la mucina e pertanto non possiede proprietà mucoadesive. Tuttavia, l'aumento della negatività nella carica superficiale della miscela PDPGA-mucina e la riduzione dell'intensità del picco della mucina della miscela rispetto alla mucina singola, potrebbe essere indicativo della possibile formazione di legami a idrogeno e quindi della presenza di interazioni di natura elettrostatica tra le due sostanze.

L'eventuale presenza di proprietà del PDPGA che possano essere utili per lo sviluppo di sistemi di drug delivery, è stata effettuata invece mettendo in relazione l'effetto sul passaggio della genisteina attraverso un monostrato di cellule Caco-2, con quello del chitosano, utilizzato come controllo. I risultati della quantificazione della genisteina ottenuti mediante HPLC, hanno rivelato che la genisteina che passa attraverso il monostrato in presenza di PDPGA, è inferiore, alla genisteina che passa in sua assenza. Inoltre, emerge che il PDPGA possiede un comportamento simile al chitosano, già noto per le sue proprietà di promotore dell'assorbimento ed utilizzato anche per questa sua proprietà nei sistemi per il drug delivery.

Questi risultati preliminari, pertanto, sembrano suggerire che il PDPGA moduli, nel tempo, il passaggio transepiteliale della genisteina e che quindi possa essere utilizzato in formulazioni per il rilascio controllato dei farmaci. Per poter confermare questa ipotesi, tuttavia, saranno necessarie ulteriori analisi di approfondimento.

Studio sul polimero Alg-DOP

Risultati

Alg-DOP è stato sintetizzato con una buona resa, come mostrato nella tab. 4.

Prodotto	Alginato (g)	NHS (g)	EDC (g)	DOP (g)	Resa (%wt)
Alg-DOP1	1.000	0.217	0.330	0.700	54.17
Alg-DOP2	1.000	0.500	0.700	1.300	55.65
Alg-DOP4	1.000	1.000	1.330	2.700	21.89

Tabella 4. Nella tabella è mostrata la resa in percentuale per ogni prodotto.

L'analisi UV utilizzata per determinare la quantità di DOP legata all'alginato (Fig. 23 A), mostra che la concentrazione di DOP aumenta con l'aumentare della quantità di DOP impiegata nella reazione di sintesi. La relazione tra la DOP impiegata nella reazione e DOP legato al polimero risulta lineare nell'intervallo di concentrazione testato (Fig.23 B).

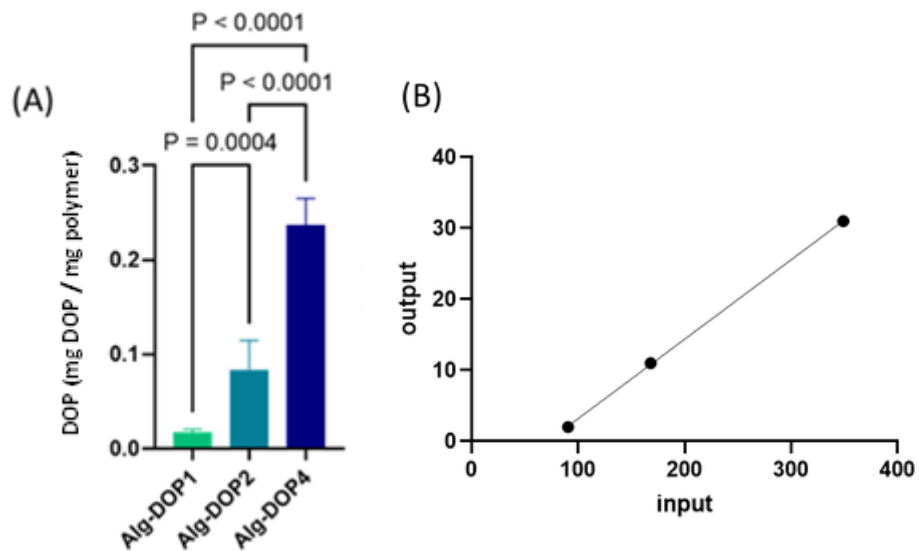


figura 23. (A) Grado di modifica dei polimeri di alginato-DOP. Dati presentati come media \pm SD, $n = 3$ ed analizzati con Oneway Anova ($p < 0,0001$), post hoc test di multicomparazione di Tukey). (B) Correlazione lineare tra la quantità di DOP utilizzata nella reazione (input) e la quantità di DOP innestata sul polimero di alginato (output). Le quantità di DOP sono espresse come moli di DOP ogni 100 moli di monomero di alginato.

Gli spettri FTIR (Figura 24) hanno confermato il successo della modifica del polimero. Nello spettro dell'alginato, i picchi assegnati ai residui G e M del polisaccaride sono stati identificati a 940, 883 e 815 cm^{-1} (Fig.24 B). Contrariamente a quanto osservato da Wang et al. 2013⁷² l'aggiunta di DOP non induce una diminuzione dell'intensità dei picchi assegnati al residuo M (fig.24 B). L'alginato presenta un'ampia banda di assorbimento intorno ai 3100 cm^{-1} che viene intensificata dall'aggiunta di DOP evidente in Alg-DOP1/2/4. Inoltre, in Alg-DOP1/2/4, si osservano a 1528 cm^{-1} (Fig.24 C) e 1243 cm^{-1} (Fig. 24 D), due nuovi picchi, la cui intensità aumenta con l'aumento della quantità di DOP innestato sulla catena di alginato.

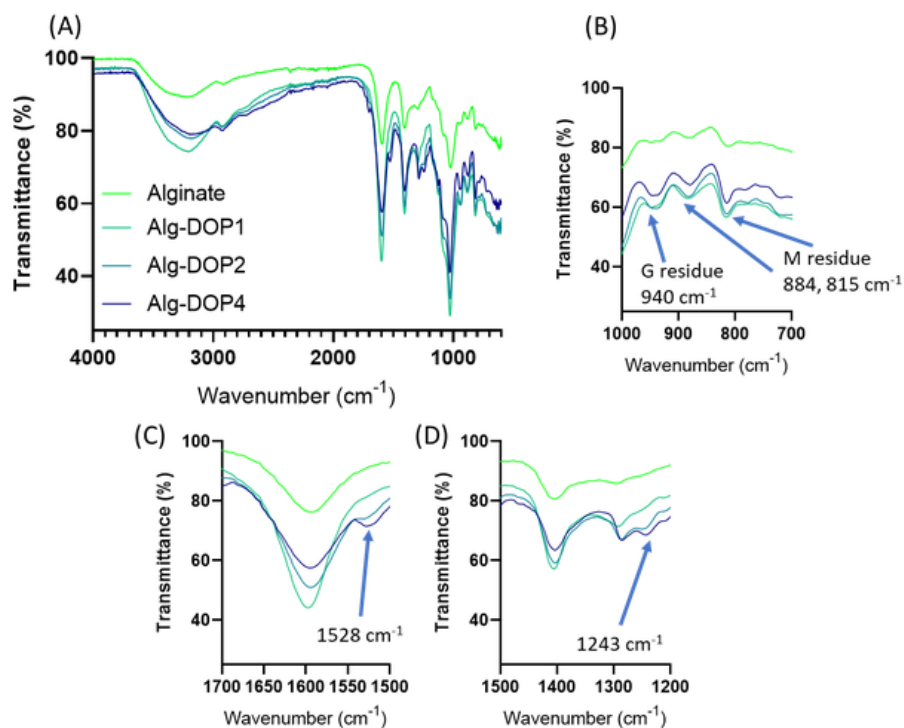


Figura 24. FTIR di (A) alginato e Alg-DOP1/2/4, (B) zoom tra 1000 e 700 cm-1, (C) zoom tra 1700 e 1500 cm-1 e (D) zoom tra 1500 e 1200 cm-1.

Nella fig. 25 A e B sono mostrati gli spettri NMR di DOP (A) che presenta due tripletti a δ 2,8 e 3,2 (assegnati ai protoni della catena etil-amminica) e picchi a δ 6,7 e 6,8 (assegnati ai 3 protoni aromatici), e dell'alginato (B) caratterizzato da più picchi nell'intervallo δ 3,5-5,2. Le assegnazioni (Fig. 25 B) del picco δ 5,1 (assegnato al protone in posizione 1 dell'unità dell'acido glucuronico G1) e del picco δ 4,65 (assegnato al protone in posizione 1 dell'unità dell'acido mannuronico M1) sono state fornite secondo MacDonald et al 2013⁷³.

Il rapporto tra gli integrali M1/G1 era 2,56; l'aggiunta di DOP alla struttura portante dell'alginato non ha causato grandi differenze e il G1/M1 per Alg-DOP2 e Alg-DOP4 non è stato influenzato mentre per Alg-DOP1 ha avuto un valore inferiore.

Questi dati potrebbero indicare che le molecole iniziali di DOP reagiscono preferenzialmente con l'unità di acido glucuronico, mentre con l'aumento del numero di molecole di DOP si ottiene una distribuzione più omogenea tra le unità M e G.

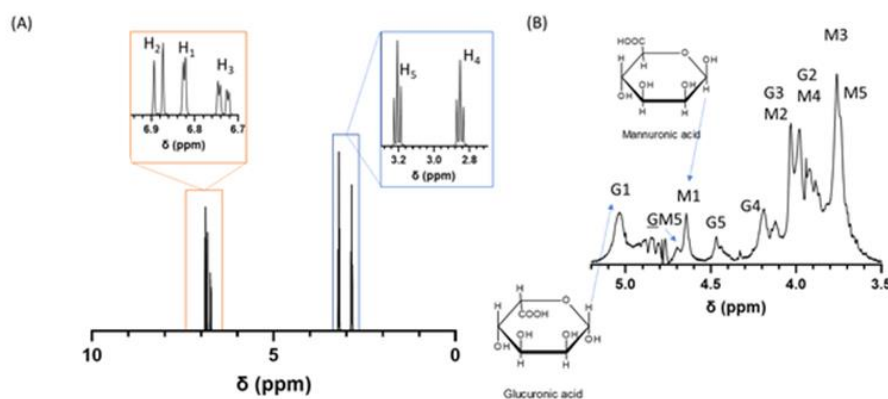


Figura 25. Spettro 1H-NMR di (A) DOP e (B) alginato.

Le soluzioni acquose di Alg-DOP1/Alg-DOP2/Alg-DOP4 sono state sottoposte alla valutazione dell'attività antiossidante mediante il saggio CUPRAC-BCS. I risultati sono stati espressi come capacità antiossidante equivalente di acido gallico (GEAC) e capacità antiossidante equivalente di Trolox (TEAC) dei campioni testati.

I risultati, mostrati nelle fig. 26, indicano che la GEAC e la TEAC di Alg-DOP1, Alg-DOP2 e Alg-DOP4 dopo 3 minuti e 1 ora, sono significativamente inferiori all'attività antiossidante espressa in GEAC e TEAC di DOP.

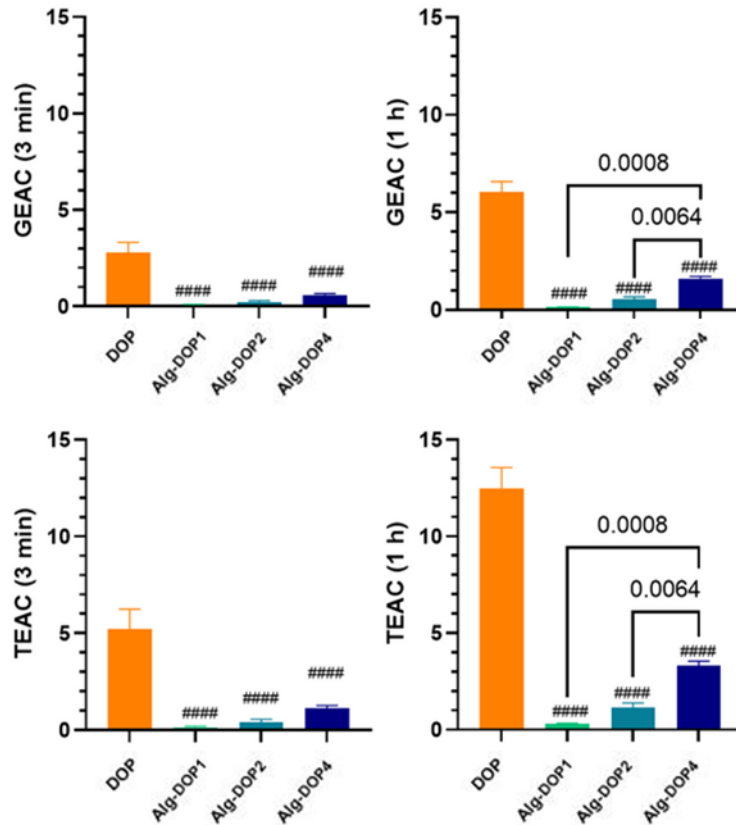


Figura 26. Attività antiossidante di DOP e Alg-DOP1, Alg-DOP2, Alg-DOP4 espressa come capacità antiossidante equivalente di acido gallico (GEAC) e capacità antiossidante equivalente di Trolox (TEAC). Dati riportati come media \pm SD (n = 3). (##### p < 0,0001 vs DOP).

Il saggio MTT è stato eseguito per valutare l'effetto citotossico (Figura 27 A) e antiossidante (Figura 27 B) di Alg-DOP1, Alg-DOP2 e Alg-DOP4 sulle cellule PC12.

Come mostrato nella figura 27 A, nessuna concentrazione di Alg-DOP1, Alg-DOP2 e Alg-DOP4 testata (25-50-100 μ M) ha mostrato effetti tossici nelle cellule PC12 dopo 24 h di esposizione.

Inoltre, I risultati ottenuti sull'attività antiossidante (Figura 27 B) hanno mostrato che la riduzione della vitalità cellulare indotta dall'esposizione all' H_2O_2 (52.7%) è stata contrastata in modo significativo (p<0,05) solo dal

pretrattamento con Alg-DOP2, 25 e 50 μM (66.4%, 66.1%,
rispettivamente).

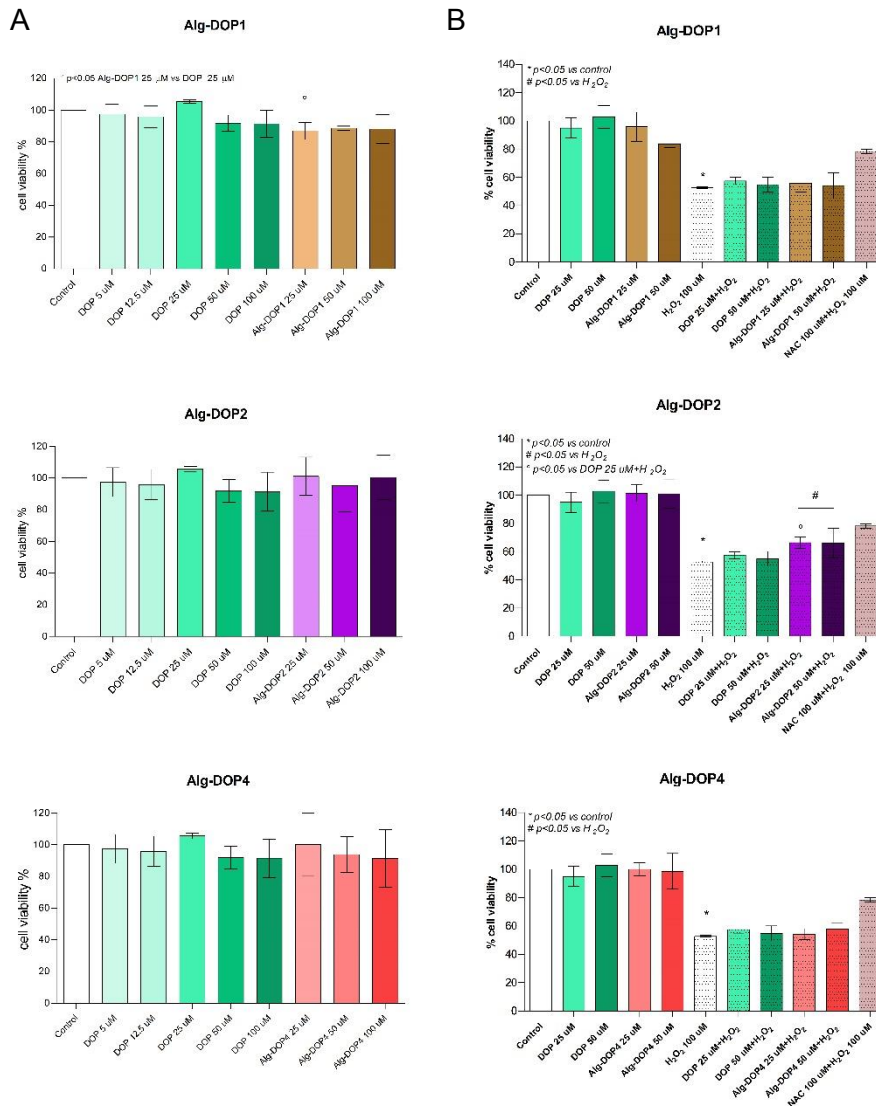


Figura 27. Vitalità cellulare delle cellule PC12 in seguito a trattamento con Alg-DOP 1, Alg-DOP2, Alg-DOP4 da solo (A) e in presenza di perossido di idrogeno (B). (* p < 0,05 versus controllo)

Infine, è stato effettuato il saggio turbidimetrico per determinare la possibile proprietà muco-adesiva di Alg-DOP1, Alg-DOP2 e Alg-DOP4,

osservando la presenza o l'assenza di interazione con la mucina porcina di tipo II.

Dai risultati ottenuti (Tabelle 5 e 6) ed elaborati secondo il metodo di He et al. ⁶⁶ è emerso che il valore di assorbanza (indicato in tabella come assorbanza reale, *Aact*) delle miscele di Alg-DOP1-mucina/ Alg-DOP2-mucina/ Alg-DOP4-mucina sia in PBS che in NaCl, risulta inferiore alla somma dei valori di assorbanza delle singole dispersioni (indicato in tabella come assorbanza teoretica, *Atheor*) di Alg-DOP1/Alg-DOP2/Alg-DOP4 e mucina, e la differenza (indicata in tabella con ΔA) tra l'assorbanza reale e quella teoretica mostra valori negativi, evidenziando, la mancanza di interazione tra le due sostanze.

Tabelle 5 e 6

Dispersione in PBS	A theor	A act	ΔA	Interazione
Alg-DOP1 0.5mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,205	0,150±0,005	-0,0550	No
Alg-DOP1 1 mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,219	0,179±0,002	-0,040	No
Alg-DOP1 2 mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,210	0,161±0,006	-0,049	No
Alg-DOP1 4 mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,227	0,182±0,001	-0,045	No
Alg-DOP1 8mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,241	0,194±0,001	-0,047	No
Alg-DOP2 0.5mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,207	0,153±0,006	-0,053	No
Alg-DOP2 1 mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,224	0,182±0,002	-0,041	No
Alg-DOP2 2 mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,216	0,166±0,007	-0,050	No
Alg-DOP2 2 mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,242	0,205±0,004	-0,037	No
Alg-DOP2 8mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,269	0,213±0,004	-0,055	No
Alg-DOP4 0.5mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,205	0,153±0,008	-0,052	No
Alg-DOP4 1 mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,220	0,177±0,004	-0,042	No
Alg-DOP4 2 mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,216	0,163±0,004	-0,053	No
Alg-DOP4 4 mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,245	0,209±0,006	-0,035	No
Alg-DOP4 8 mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,259	0,195±0,002	-0,064	No

<i>Dispersione in NaCl</i>	A theor	A act	ΔA	Interazione
Alg-DOP1 0.5 mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,170	0,105±0,002	-0,064	No
Alg-DOP1 1 mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,187	0,141±0,003	-0,046	No
Alg-DOP1 2 mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,173	0,113±0,003	-0,060	No
Alg-DOP1 4 mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,189	0,114±0,001	-0,075	No
Alg-DOP1 8mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,208	0,145±0,001	-0,063	No
Alg-DOP2 0.5 mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,170	0,082±0,029	-0,088	No
Alg-DOP2 1 mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,188	0,118±0,0515	-0,069	No
Alg-DOP2 2 mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,177	0,091±0,0294	-0,086	No
Alg-DOP2 2 mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,200	0,116±0,026	-0,083	No
Alg-DOP2 8mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,225	0,146±0,0438	-0,078	No
Alg-DOP4 0.5 mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,171	0,109±0,008	-0,061	No
Alg-DOP4 1 mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,184	0,139±0,004	-0,044	No
Alg-DOP4 2 mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,173	0,112±0,004	-0,060	No
Alg-DOP4 4 mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,184	0,120±0,006	-0,063	No
Alg-DOP4 8 mg/ml- Mucina 4 mg/ml	0,200	0,147±0,002	-0,053	No

Tabelle 5 e 6. Valori ΔA delle miscele di Alg-DOP-mucina in due diversi solventi.

Conclusione

La caratterizzazione del polimero costituito da alginato e DOP ha rivelato che la metodica utilizzata per la sintesi è stata efficace e ha permesso di ottenere una buona resa di prodotto. Grazie alle analisi spettrometriche UV, FTIR ed NMR, è stato possibile determinare non solo la presenza ma anche la natura del legame tra l'alginato e DOP nei prodotti Alg-DOP1, Alg-DOP2 e Alg-DOP4. L'analisi UV ha rivelato che la quantità di DOP che si lega all'alginato aumenta con l'aumentare della quantità di DOP utilizzato durante la sintesi.

Lo studio sulla citotossicità nelle cellule PC12 hanno mostrato che Alg-DOP1, Alg-DOP2 e Alg-DOP4 alle concentrazioni testate non hanno effetti citotossici. Lo studio sulla proprietà antiossidante *in vitro* e su un modello cellulare di stress ossidativo, hanno mostrato invece che Alg-DOP1, Alg-DOP2 e Alg-DOP4 alle concentrazioni testate non hanno proprietà antiossidanti. I risultati ottenuti con il saggio CUPRAC-BCS hanno messo in evidenza come il legame di DOP con l'alginato riduca significativamente la capacità antiossidante di DOP innestato in Alg-DOP1, Alg-DOP2 e Alg-DOP4, rispetto a DOP da solo. A confermare parzialmente questa evidenza, i risultati ottenuti sulle cellule PC12, nei quali, Alg-DOP1 e Alg-DOP4 non sono capaci di contrastare la riduzione della vitalità cellulare indotta dal perossido di idrogeno. Tuttavia, l'unica eccezione si osserva in corrispondenza del pretrattamento con Alg-DOP2 25 e 50 μM , che mostra una blanda ma significativa attività protettiva sulle cellule PC12 esposte al perossido di idrogeno.

Infine, per quanto riguarda le proprietà mucoadesive, il saggio turbidimetrico effettuato, ha rivelato che né Alg-DOP1, né Alg-DOP2 e né Alg-DOP4, sembrano interagire con la mucina porcina.

Questi dati preliminari, tuttavia, saranno completati da ulteriori analisi, per poter essere confermati o meno.

To Be Continued

Studio dell'effetto dei composti Eugenolo, Resveratrolo e Vanillina su un modello cellulare neuronale di stress ossidativo

Negli ultimi mesi di dottorato è stata intrapresa un'indagine, in collaborazione con la prof.ssa Alessandra Peana, con l'obiettivo di valutare l'eventuale effetto antiossidante di alcune sostanze naturali, quali eugenolo, resveratrolo e vanillina, su un modello cellulare neuronale di stress ossidativo.

In letteratura, questi composti, estratti da piante medicinali, sono già conosciuti per avere un ampio spettro di attività farmacologiche⁷⁴⁻⁷⁸, per esempio antiproliferativa, immunomodulatoria, antiinfiammatoria ed antiossidante, e pertanto vengono utilizzati per differenti applicazioni sia nell'industria farmaceutica che alimentare.

Nello specifico, le cellule PC12 sono state trattate con eugenolo, resveratrolo e vanillina (25-50 μM) in assenza ed in presenza di H_2O_2 (100 μM), somministrata 20 minuti dopo, per 24 ore.

Allo scadere del tempo di esposizione, sono stati effettuati i saggi MTT ed LDH per valutare, rispettivamente, l'effetto delle suddette sostanze sulla vitalità cellulare in presenza e assenza di H_2O_2 , e sul danno di membrana indotto dal perossido di idrogeno.

Dai risultati ottenuti dal saggio MTT, è emerso che si ha una significativa riduzione ($p < 0.05$ vs controllo) della vitalità cellulare in presenza di H_2O_2 (64.31%) rispetto al controllo. Il pretrattamento con l'eugenolo 25 e 50 μM (Fig. 28 A), il resveratrolo 25 e 50 μM (Fig. 28 B) e la vanillina 25 e 50 μM (Fig. 28 C), inducono una significativa riduzione del danno indotto da H_2O_2 dal 64.31% al 79.73% e 73.9%; 79.2% e 71.8%; 76% e 71.8%, rispettivamente.

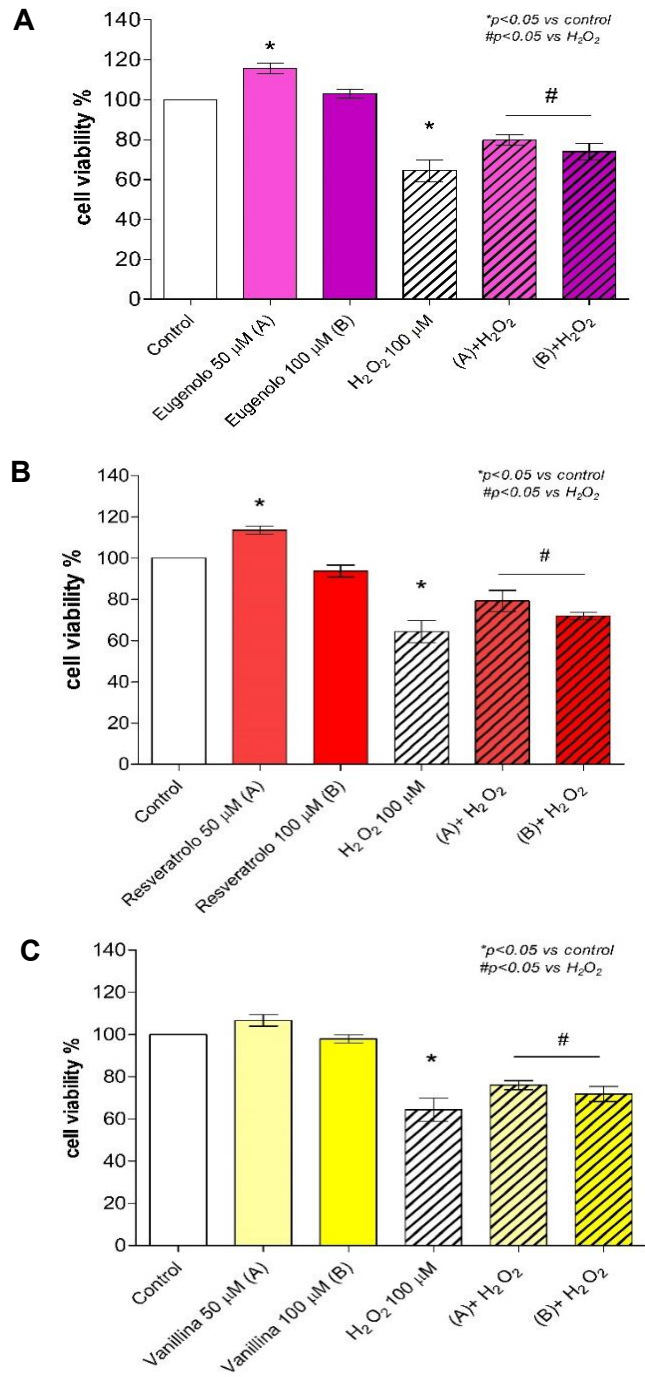


Figura 28. Effetto di A) eugenolo (25-50 μ M), B) resveratrolo (25-50 μ M) e C) vanillina (25-50 μ M) sulla vitalità delle cellule PC12 in assenza e presenza di H₂O₂ (100 μ M) dopo 24 ore di trattamento. I risultati sono indicati come percentuale (%) di cellule vitali (* $p < 0,05$ versus controllo) (# $p < 0,05$ versus H₂O₂).

I dati ottenuti dal saggio LDH rivelano che in presenza di danno ossidativo l'eugenolo, il resveratrolo e la vanillina, ad entrambe le concentrazioni testate (25 e 50 μM), riducono significativamente ($p < 0.05$) il rilascio di LDH dal 50,7% dell' H_2O_2 al 28.3 % e 32% con l'eugenolo (Fig.29 A), 32.8% e 32.2% con il resveratrolo (Fig.29 B), e al 32.3% e 26.9% con la vanillina (Fig. 29 C).

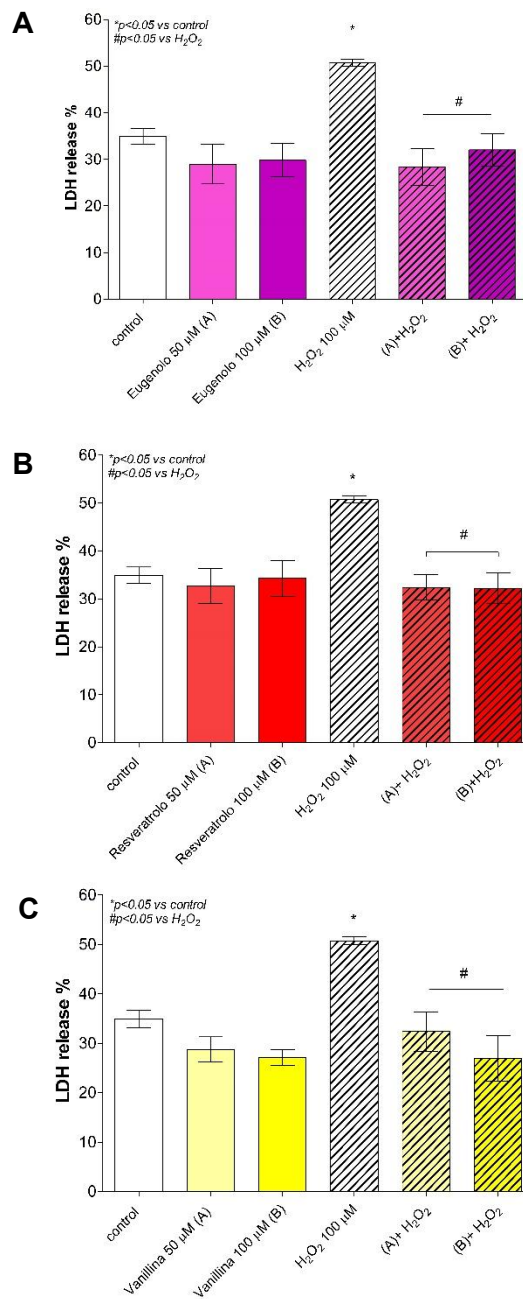


Figura 29. Quantificazione del rilascio extracellulare di LDH in cellule PC12 dopo 24 ore di incubazione con A) Eugenolo, B) resveratrolo e C) vanillina da sole e in presenza di H₂O₂. I risultati sono indicati come rilascio % di LDH (* p<0,05 versus controllo) (# p<0.05 versus H₂O₂).

I risultati preliminari ottenuti da questa indagine mostrano che l'eugenolo, il resveratrolo e la vanillina sono capaci di proteggere le cellule PC12 dal danno ossidativo indotto dal perossido di idrogeno.

Tuttavia, saranno effettuati ulteriori studi per valutare se, il meccanismo alla base della loro capacità di ridurre la mortalità indotta dal danno ossidativo, sia attribuibile ad una loro eventuale attività antiossidante.

Valutazione della citotossicità delle diverse formulazioni della molecola 2j

Durante il dottorato è stata testata l'eventuale citotossicità di una molecola di nuova sintesi, 1,3,4-ossadiazolo 2,5-disostituito (2j), sulla linea cellulare Caco-2, in collaborazione con la prof.ssa Elisabetta Gavini.

La molecola 2j già a basse concentrazioni presenta una buona attività antiproliferativa su diverse linee cellulari tumorali (in particolare le cellule del tumore alla cervice uterina)^{79,80} ma presenta delle caratteristiche chimico-fisiche che la rendono poco solubile in ambiente acquoso rendendone difficile la somministrazione.

Per questo motivo, per aumentarne la solubilità e la biodisponibilità, sono state preparate diverse formulazioni utilizzando delle micelle di surfactanti già noti, quali Benzalconio cloruro (BZ), Labrasol (LA), Gelucire 1 (G40) e Gelucire 2 (G48), e un sistema di inclusione in un nano-carrier polimerico biodegradabile (RP).

La parte di studio condotta, ha previsto l'esecuzione del saggio MTT per valutare l'effetto delle diverse formulazioni (2j 0.25 μ M BZ, 2j 0.25 μ M+G40, 2j 0.25 μ M+G48, 2j 0.25 μ M+LA e 2j 0.25 μ M+RP) sulla vitalità delle cellule Caco-2 dopo 24 ore di esposizione.

I risultati ottenuti, mostrati nella figura 30, mostrano che tutte le formulazioni, 2j 0.25 μ M+BZ, 2j 0.25 μ M+G40, 2j 0.25 μ M+G48, 2j 0.25 μ M+LA e 2j 0.25 μ M+RP, aumentano in maniera significativa ($p < 0.05$) (75.2%, 79.7%, 85.2%, 94.4% e 82.3%, rispettivamente) la percentuale di cellule vitali rispetto al gruppo di controllo 2j 0.25 μ M+DMSO (61.9%).

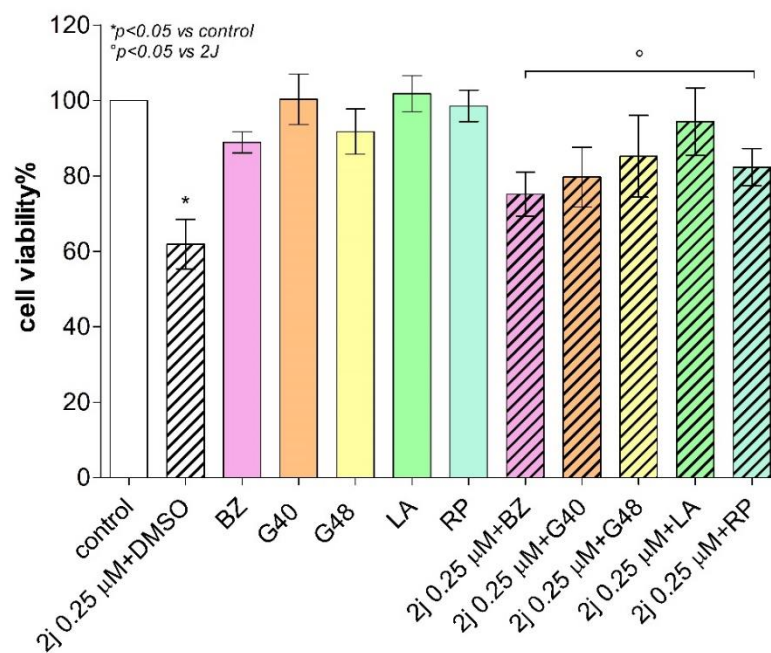


Figura 30 . Vitalità cellulare delle cellule Caco-2 esposte per 24 h a diverse formulazioni della molecola 2j. A) I risultati della vitalità, ottenuti tramite saggio MTT, sono indicati come percentuale (%) di cellule vitali. (* $p < 0,05$ versus controllo) (° $p < 0.05$ versus 2j 0.25 μM +DMSO).

I dati ottenuti mostrano che tutte le formulazioni testate, e in particolar modo 2j+G48 e 2j+LA, riducono significativamente la citotossicità della molecola 2j. Queste formulazioni, pertanto, si prestano come ottimi candidati per lo sviluppo di sistemi di drug delivery atti a migliorare le prestazioni della molecola.

Ulteriori indagini saranno tuttavia effettuate al fine di esplorarne in maniera più approfondita l'applicabilità.

Bibliografia

1. Janicki Hsieh, S., Alexopoulou, Z., Mehrotra, N., Struyk, A. & Stoch, S. A. Neurodegenerative Diseases: The Value of Early Predictive End Points. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **111**, 835–839 (2022).
2. Jellinger, K. A. Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update. *J Cell Mol Med* **14**, 457–487 (2010).
3. Patrick, K. L., Bell, S. L., Weindel, C. G. & Watson, R. O. Exploring the “Multiple-Hit Hypothesis” of Neurodegenerative Disease: Bacterial Infection Comes Up to Bat. *Front Cell Infect Microbiol* **9**, 138 (2019).
4. Gan, L., Cookson, M. R., Petrucelli, L. & La Spada, A. R. Converging pathways in neurodegeneration, from genetics to mechanisms. *Nat Neurosci* **21**, 1300–1309 (2018).
5. Gandhi, S. & Abramov, A. Y. Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2012**, 428010 (2012).
6. Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P. & Mahajan, R. T. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Curr Neuropharmacol* **7**, 65–74 (2009).
7. Yang, S. & Lian, G. ROS and diseases: role in metabolism and energy supply. *Mol Cell Biochem* **467**, 1–12 (2020).
8. Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* **417**, 1–13 (2009).
9. Kausar, S., Wang, F. & Cui, H. The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Generation and Its Implications for Neurodegenerative Diseases. *Cells* **7**, 274 (2018).
10. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. & Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* **160**, 1–40 (2006).
11. Herb, M. & Schramm, M. Functions of ROS in Macrophages and Antimicrobial Immunity. *Antioxidants* **10**, 313 (2021).
12. Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S. & Kalayci, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J* **5**, 9–19 (2012).

13. Pizzino, G. *et al.* Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev* **2017**, 8416763 (2017).
14. Singh, A., Kukreti, R., Saso, L. & Kukreti, S. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules* **24**, 1583 (2019).
15. Cui, K., Luo, X., Xu, K. & Ven Murthy, M. R. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* **28**, 771–799 (2004).
16. Nakamura, T., Cho, D.-H. & Lipton, S. A. Redox regulation of protein misfolding, mitochondrial dysfunction, synaptic damage, and cell death in neurodegenerative diseases. *Exp Neurol* **238**, 12–21 (2012).
17. Bosco, D. A. *et al.* Elevated levels of oxidized cholesterol metabolites in Lewy body disease brains accelerate α -synuclein fibrilization. *Nat Chem Biol* **2**, 249–253 (2006).
18. Nakabeppu, Y., Tsuchimoto, D., Yamaguchi, H. & Sakumi, K. Oxidative damage in nucleic acids and Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience Research* **85**, 919–934 (2007).
19. Puspita, L., Chung, S. Y. & Shim, J.-W. Oxidative stress and cellular pathologies in Parkinson's disease. *Mol Brain* **10**, 53 (2017).
20. Praticò, D. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: a reappraisal. *Trends Pharmacol Sci* **29**, 609–615 (2008).
21. Zhao, Y. & Zhao, B. Oxidative Stress and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2013**, e316523 (2013).
22. Mendez, E. F. & Sattler, R. Biomarker development for C9orf72 repeat expansion in ALS. *Brain Res* **1607**, 26–35 (2015).
23. Nuzzo, D. *et al.* New Neuroprotective Effect of Lemon IntegroPectin on Neuronal Cellular Model. *Antioxidants* **10**, 669 (2021).
24. Cheng, W. *et al.* HSP60 is involved in the neuroprotective effects of naloxone. *Mol Med Rep* **10**, 2172–2176 (2014).
25. van Dorp, E. L., Yassen, A. & Dahan, A. Naloxone treatment in opioid addiction: the risks and benefits. *Expert Opinion on Drug Safety* **6**, 125–132 (2007).
26. Koréh, K., Seligman, M. L., Flamm, E. S. & Demopoulos, H. B. Lipid antioxidant properties of naloxone in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **102**, 1317–1322 (1981).

27. Hsu, Y.-Y. *et al.* Nanomolar Naloxone Attenuates Neurotoxicity Induced by Oxidative Stress and Survival Motor Neuron Protein Deficiency. *Neurotox Res* **25**, 262–270 (2014).
28. Wang, X. *et al.* Naloxone attenuates ischemic brain injury in rats through suppressing the NIK/IKK α /NF- κ B and neuronal apoptotic pathways. *Acta Pharmacol Sin* **40**, 170–179 (2019).
29. Kim, G. H., Kim, J. E., Rhie, S. J. & Yoon, S. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Exp Neurobiol* **24**, 325–340 (2015).
30. Chen, C. J., Liao, S. L., Chen, W. Y., Hong, J. S. & Kuo, J. S. Cerebral ischemia/reperfusion injury in rat brain: effects of naloxone. *Neuroreport* **12**, 1245–1249 (2001).
31. Aprotosoiaie, A. C., Hăncianu, M., Costache, I.-I. & Miron, A. Linalool: a review on a key odorant molecule with valuable biological properties: Linalool: a key odorant molecule. *Flavour Fragr. J.* **29**, 193–219 (2014).
32. Raguso, R. A. More lessons from linalool: insights gained from a ubiquitous floral volatile. *Current Opinion in Plant Biology* **32**, 31–36 (2016).
33. Peana, A. T. *et al.* (-)-Linalool produces antinociception in two experimental models of pain. *European Journal of Pharmacology* **460**, 37–41 (2003).
34. Celik, S. & Ozkaya, A. Effects of Intraperitoneally Administered Lipoic Acid, Vitamin E, and Linalool on the Level of Total Lipid and Fatty Acids in Guinea Pig Brain with Oxidative Stress Induced by H₂O₂. *BMB Reports* **35**, 547–552 (2002).
35. Sabogal-Guáqueta, A. M. *et al.* Linalool attenuates oxidative stress and mitochondrial dysfunction mediated by glutamate and NMDA toxicity. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **118**, 109295 (2019).
36. Sabogal-Guáqueta, A. M., Posada-Duque, R., Cortes, N. C., Arias-Londoño, J. D. & Cardona-Gómez, G. P. Changes in the hippocampal and peripheral phospholipid profiles are associated with neurodegeneration hallmarks in a long-term global cerebral ischemia model: Attenuation by Linalool. *Neuropharmacology* **135**, 555–571 (2018).
37. Park, H., Seol, G. H., Ryu, S. & Choi, I.-Y. Neuroprotective effects of (-)-linalool against oxygen-glucose deprivation-induced neuronal injury. *Arch. Pharm. Res.* **39**, 555–564 (2016).

38. Barbakadze, V. *et al.* Poly[3-(3,4-dihydroxyphenyl)glyceric Acid], A New Biologically Active Polymer from *Symphytum Asperum* Lepech. and *S. Caucasicum* Bieb. (Boraginaceae). *Molecules* **10**, 1135–1144 (2005).
39. Barbakadze, V. *et al.* Poly[3-(3,4-dihydroxyphenyl)glyceric acid] from *Anchusa italica* roots. *Nat Prod Commun* **5**, 1091–1095 (2010).
40. Shrotriya, S. *et al.* Poly[3-(3, 4-dihydroxyphenyl) glyceric acid] from Comfrey exerts anti-cancer efficacy against human prostate cancer via targeting androgen receptor, cell cycle arrest and apoptosis. *Carcinogenesis* **33**, 1572–1580 (2012).
41. Barthomeuf, C. M., Debiton, E., Barbakadze, V. V. & Kemertelidze, E. P. Evaluation of the dietetic and therapeutic potential of a high molecular weight hydroxycinnamate-derived polymer from *Symphytum asperum* Lepech. Regarding its antioxidant, antilipoperoxidant, antiinflammatory, and cytotoxic properties. *J Agric Food Chem* **49**, 3942–3946 (2001).
42. Wiatrak, B., Kubis-Kubiak, A., Piwowar, A. & Barg, E. PC12 Cell Line: Cell Types, Coating of Culture Vessels, Differentiation and Other Culture Conditions. *Cells* **9**, 958 (2020).
43. Muthaiyah, B., Essa, M. M., Chauhan, V. & Chauhan, A. Protective effects of walnut extract against amyloid beta peptide-induced cell death and oxidative stress in PC12 cells. *Neurochem Res* **36**, 2096–2103 (2011).
44. Seo, S. *et al.* Naloxone induces endoplasmic reticulum stress in PC12 cells. *Molecular Medicine Reports* **9**, 1395–1399 (2014).
45. Moosmann, B. & Behl, C. Antioxidants as treatment for neurodegenerative disorders. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **11**, 1407–1435 (2002).
46. Nuzzo, D. Role of Natural Antioxidants on Neuroprotection and Neuroinflammation. *Antioxidants* **10**, 608 (2021).
47. Marino, A., Battaglini, M., Moles, N. & Ciofani, G. Natural Antioxidant Compounds as Potential Pharmaceutical Tools against Neurodegenerative Diseases. *ACS Omega* **7**, 25974–25990 (2022).
48. Morén, C., deSouza, R. M., Giraldo, D. M. & Uff, C. Antioxidant Therapeutic Strategies in Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 9328 (2022).

49. Rassa, G. *et al.* Intranasal Delivery of Genistein-Loaded Nanoparticles as a Potential Preventive System against Neurodegenerative Disorders. *Pharmaceutics* **11**, 8 (2019).
50. Langasco, R. *et al.* Increasing protective activity of genistein by loading into transfersomes: A new potential adjuvant in the oxidative stress-related neurodegenerative diseases? *Phytomedicine* **52**, 23–31 (2019).
51. Berríos-Cárcamo, P. *et al.* A Novel Morphine Drinking Model of Opioid Dependence in Rats. *Int J Mol Sci* **23**, 3874 (2022).
52. Withdrawal: Rink-Jan Lohman, Karnaker Reddy Tupally, Ajit Kandale, Peter J. Cabot, Harendra S. Parekh (2022) Design and development of novel, short, stable dynorphin-based opioid agonists for safer analgesic therapy. *Br J Pharmacol*; <https://doi.org/10.1111/bph.15862>. *British Journal of Pharmacology* n/a,.
53. Kancheva, V. D. *et al.* Natural Chain-Breaking Antioxidants and Their Synthetic Analogs as Modulators of Oxidative Stress. *Antioxidants* **10**, 624 (2021).
54. Mikawa, K., Akamatsu, H., Nishina, K., Uesugi, T. & Niwa, Y. Naloxone scavenges reactive oxygen species. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* **50**, 1171–1173 (2006).
55. Santos, J. R., Gois, A. M., Mendonça, D. M. F. & Freire, M. A. M. Nutritional status, oxidative stress and dementia: the role of selenium in Alzheimer’s disease. *Frontiers in Aging Neuroscience* **6**, (2014).
56. Chen, Y. *et al.* Morphine Can Inhibit the Growth of Breast Cancer MCF-7 Cells by Arresting the Cell Cycle and Inducing Apoptosis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **40**, 1686–1692 (2017).
57. Yuan, C. *et al.* Linalool Alleviates A β 42-Induced Neurodegeneration via Suppressing ROS Production and Inflammation in Fly and Rat Models of Alzheimer’s Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2021**, 1–10 (2021).
58. Merlani, M. *et al.* Enantioselective synthesis and antioxidant activity of 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-glyceric acid--basic monomeric moiety of a biologically active polyether from *Symphytum asperum* and *S. caucasicum*. *Chirality* **22**, 717–725 (2010).
59. Brannigan, R. P. & Khutoryanskiy, V. V. Progress and Current Trends in the Synthesis of Novel Polymers with Enhanced Mucoadhesive Properties. *Macromolecular Bioscience* **19**, 1900194 (2019).

60. Shaikh, R., Raj Singh, T. R., Garland, M. J., Woolfson, A. D. & Donnelly, R. F. Mucoadhesive drug delivery systems. *J Pharm Bioallied Sci* **3**, 89–100 (2011).
61. Saiz-Poseu, J., Mancebo-Aracil, J., Nador, F., Busqué, F. & Ruiz-Molina, D. The Chemistry behind Catechol-Based Adhesion. *Angewandte Chemie International Edition* **58**, 696–714 (2019).
62. Matalqah, S. M. *et al.* Chitosan Nanoparticles as a Novel Drug Delivery System: A Review Article. *Curr Drug Targets* **21**, 1613–1624 (2020).
63. Artursson, P. Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. *J Pharm Sci* **79**, 476–482 (1990).
64. van Breemen, R. B. & Li, Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **1**, 175–185 (2005).
65. Sun, J. & Tan, H. Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. *Materials (Basel)* **6**, 1285–1309 (2013).
66. Ji, Y.-R., Young, T.-H., Tsai, T.-Y., Chen, J.-S. & Chen, K.-C. Dopamine-Modified Alginate Hydrogel with Effectiveness and Safety for Preoperative Localization of Lung Nodules. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **7**, 4637–4644 (2021).
67. Chi, J. *et al.* Novel dopamine-modified oxidized sodium alginate hydrogels promote angiogenesis and accelerate healing of chronic diabetic wounds. *International Journal of Biological Macromolecules* **203**, 492–504 (2022).
68. Campos, C., Guzmán, R., López-Fernández, E. & Casado, A. Evaluation of the copper(II) reduction assay using bathocuproinedisulfonic acid disodium salt for the total antioxidant capacity assessment: the CUPRAC-BCS assay. *Anal Biochem* **392**, 37–44 (2009).
69. Zampieri, A. L. T. de C. *et al.* Biodegradable polymeric nanocapsules based on poly(DL-lactide) for genistein topical delivery: obtention, characterization and skin permeation studies. *J Biomed Nanotechnol* **9**, 527–534 (2013).
70. Liao, X. *et al.* Probing into the Interaction of Nicotine and Bovine Submaxillary Mucin: NMR, Fluorescence, and FTIR Approaches. *Journal of Spectroscopy* **2016**, 1–9 (2016).
71. Curnutt, A., Smith, K., Darrow, E. & Walters, K. B. Chemical and Microstructural Characterization of pH and [Ca²⁺] Dependent Sol-Gel Transitions in Mucin Biopolymer. *Sci Rep* **10**, 8760 (2020).

72. Wang, X. *et al.* Dopamine-Modified Alginate Beads Reinforced by Cross-Linking via Titanium Coordination or Self-Polymerization and Its Application in Enzyme Immobilization. *Ind. Eng. Chem. Res.* **52**, 14828–14836 (2013).
73. MacDonald, L. C. & Berger, B. W. A polysaccharide lyase from *Stenotrophomonas maltophilia* with a unique, pH-regulated substrate specificity. *J Biol Chem* **289**, 312–325 (2014).
74. Barboza, J. N., da Silva Maia Bezerra Filho, C., Silva, R. O., Medeiros, J. V. R. & de Sousa, D. P. An Overview on the Anti-inflammatory Potential and Antioxidant Profile of Eugenol. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2018**, e3957262 (2018).
75. Jagdeo, J. *et al.* Dose-dependent antioxidant function of resveratrol demonstrated via modulation of reactive oxygen species in normal human skin fibroblasts in vitro. *J Drugs Dermatol* **9**, 1523–1526 (2010).
76. Jing, X., Cheng, W., Wang, S., Li, P. & He, L. Resveratrol induces cell cycle arrest in human gastric cancer MGC803 cells via the PTEN-regulated PI3K/Akt signaling pathway. *Oncol Rep* **35**, 472–478 (2016).
77. Zhong, L. *et al.* Protective effect of ethyl vanillin against A β -induced neurotoxicity in PC12 cells via the reduction of oxidative stress and apoptosis. *Exp Ther Med* **17**, 2666–2674 (2019).
78. Bezerra-Filho, C. S. M. *et al.* Therapeutic Potential of Vanillin and its Main Metabolites to Regulate the Inflammatory Response and Oxidative Stress. *Mini Rev Med Chem* **19**, 1681–1693 (2019).
79. Nieddu, V. *et al.* Synthesis and Antineoplastic Evaluation of Novel Unsymmetrical 1,3,4-Oxadiazoles. *ACS Publications*
<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.jmedchem.6b00468> (2016)
doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00468.
80. Weidong, L. *et al.* Target identification of a novel unsymmetrical 1,3,4-oxadiazole derivative with antiproliferative properties. *J Cell Physiol* **236**, 3789–3799 (2021).