

Studio in vitro degli effetti citoprotettivi di nanoparticelle polimeriche di chitosano veicolanti principi attivi in risposta a stimoli esogeni di natura ossidativi (SubTask 2.2.6)



NUTRAGE
Consiglio Nazionale delle Ricerche

S. De Benedittis¹, M. R. Perri², M. G. Cipriani², D. Mainieri², E. Mazzotta³, R. Muzzalupo³, P. Spadafora¹, F. Cavalcanti¹, L. Citrigno¹, A. Cerantonio¹, B. M. Greco¹, A. Qualtieri¹

¹ - CNR, Istituto per la Ricerca e l'Innovazione Biomedica (IRIB), Unità di Mangone (CS); ² - CNR Istituto per i Sistemi Agricoli e Forestali del Mediterraneo (ISAFOM) Rende (CS); ³ - Dipartimento di Farmacia, Salute e Scienza della Nutrizione, Università della Calabria, Rende, (CS).

Scenario

Lo stress ossidativo gioca un ruolo fondamentale nella patogenesi delle malattie neurodegenerative, le quali, attualmente rappresentano un problema di salute globale e in costante incremento. Vi è pertanto, urgenza di promuovere ricerche rivolte alla definizione di sistemi antiossidanti capaci di proteggere/correggere i processi patologici in maniera mirata. I numerosi vantaggi in termini di biocompatibilità, scarsa tossicità attraversamento della barriera ematoencefalica hanno fatto sì che il chitosano (CHT) e i suoi derivati riscuotessero grande interesse per il trattamento di disordini neurologici. In tale contesto, le nanoparticelle (NPs) di CHT funzionalizzate veicolanti principi attivi naturali rappresentano una promettente strategia di intervento.



Caratterizzazione e biocompatibilità delle NPs di chitosano

NPs di chitosano coniugate con acido folico (FA-CHT NPs) sono state ottenute mediante gelificazione ionica

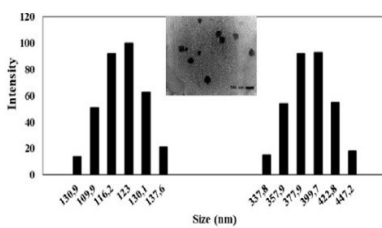


Figura 1

Figura 1. Le caratteristiche morfologiche analizzate mediante microscopia elettronica (TEM), hanno rivelato la presenza di NPs sferiche con superficie liscia. L'analisi dinamica light scattering (DLS) ha inoltre evidenziato NPs aventi:
average size = 202,4±5,8 nm
PI = 0,254
Z-potential = +35,9 ±1,04 mV

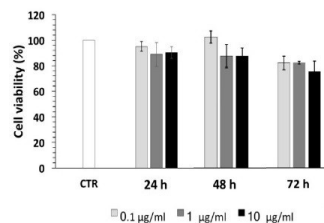


Figura 2

Figura 2. La citotossicità delle NPs vuote è stata testata in cellule HeLa mediante saggio MTT. I risultati hanno mostrato una vitalità cellulare superiore all'80% fino alle 72 ore di incubazione alle concentrazioni testate

Estratti idroalcolici di *Genziana Lutea* L.: analisi HPLC, potere antiossidante e citotossicità

Piante di *Genziana lutea* L. sono state raccolte nel Parco Nazionale del Pollino e i metaboliti secondari sono stati estratti dai diversi tessuti immediatamente dopo la raccolta con EtOH 80% a freddo per 24 ore

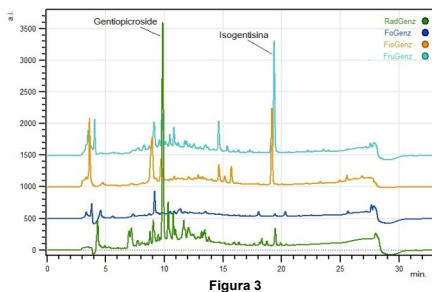


Figura 3

Figura 3. L'analisi RP-HPLC degli estratti ha evidenziato profili cromatografici tessuti specifici. Alcuni picchi cromatografici più abbondanti sono stati caratterizzati sulla base dei tempi di ritenzione e dei rispettivi spettri di assorbimento UV (non mostrati in figura).

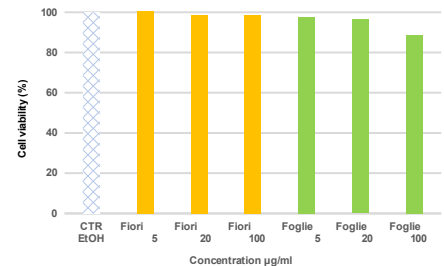


Figura 5

Figura 5. Gli effetti citotossici degli estratti di fiori e foglie di *Genziana Lutea* in cellule SH-SY5Y sono stati testati mediante saggi MTT. I risultati hanno mostrato riduzioni non significative della vitalità cellulare con una riduzione massima pari al 12,5% alla concentrazione di 100 µg/ml per l'estratto di foglie.

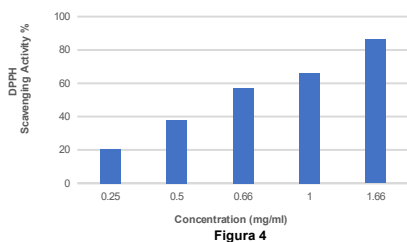


Figura 4

Figura 4. L'attività antiossidante di estratti di foglie di *Genziana Lutea* è stata testata mediante saggio DPPH che ha rivelato un'attività pari all'86% alla concentrazione di 1,66mg/ml.

Modello cellulare in uso

Cellule SH-SY5Y indifferenziate (neuroblast-like) sono ampiamente utilizzate come modello neuronale e risultano al contempo differenziabili in neuroni maturi che maggiormente rappresentano le condizioni neurocellulari *in vivo*. Attualmente il nostro gruppo è impegnato nel testare differenti protocolli sperimentali allo scopo di ottimizzare il differenziamento neuronale finale delle SH-SY5Y.

Figura 6. Immagini di microscopia ottica (40X) di SH-SY5Y differenziate utilizzando acido retinoico e progressive riduzioni di siero fetale bovino. (A) In contrasto di fase è evidente il fenotipo neuron-like con la presenza di processi simil-neuriti. (B) Immunofluorescenza della proteina-PGP9.5 (rosso), quale specifico marker neuronale, normalmente espressa in fibre nervose e corpi cellulari del sistema nervoso periferico e centrale, combinato con fluorescenza nucleare Hoechst 33342 (blu)

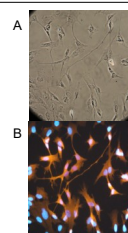


Figura 6

Indagini successive

Negli step successivi le NPs funzionalizzate per il targeting neuronale e mitocondriale saranno utilizzate per il drug delivery di sostanze antiossidanti, inclusi gli estratti vegetali oggetto di studio. Gli effetti citoprotettivi dei sistemi saranno investigati nel modello cellulare SH-SY5Y sottoposto a stress ossidativo.

