



Università degli Studi di Sassari

Corso di Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche

Coordinatore del corso: Prof. Andrea Fausto Piana

Curriculum: Neuroscienze

Referente di curriculum: Dott.ssa Rossana Migheli

XXXI ciclo

**Sviluppo di strategie per nuovi approcci
terapeutici nelle malattie neurodegenerative**

Tutor:

Dott.ssa Rossana Migheli

Tesi di dottorato di:

Dott.ssa Silvia Fancello

Anno accademico 2017-2018



Durante i tre anni di Scuola di Dottorato ho frequentato il laboratorio di Farmacologia del Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche e Sperimentali dell'Università degli Studi di Sassari e, per un periodo, il Dipartimento di Farmacia e Scienze Biomediche dell'Università di Portsmouth in Inghilterra (Erasmus Traineeship 2017/2018).

Indice

Introduzione	1
Neurodegenerazione e malattia di Parkinson.....	2
Stress ossidativo nel sistema nervoso centrale.....	4
Neurotossine e malattia di Parkinson.....	6
MPTP.....	6
Manganese.....	8
Cadmio.....	9
Antiossidanti naturali.....	11
Genisteina.....	11
Quercetina.....	12
Sistemi di drug delivery per la veicolazione di sostanze farmacologicamente attive..	14
Transferosomi.....	14
Nanoparticelle di chitosano.....	15
Beta (β)-ciclodestrine.....	16
Il metabolismo energetico cerebrale: un possibile ruolo neuroprotettivo dell'insulina nella disfunzione mitocondriale neuronale.....	18
Scopo della ricerca	24
Materiali e metodi	25
Reagenti e soluzioni.....	26
Colture cellulari.....	27
Cellule PC12.....	27
Cellule Caco-2.....	27
Trattamenti eseguiti.....	28
Transferosomi per il trasporto del flavonoide genisteina (GEN-TFs).....	28
Transferosoma per il trasporto di quercetina ed L-dopa (TF2-QL).....	28
Nanoparticelle a base di chitosano caricate con genisteina (NP-GEN).....	28
Beta (β)-ciclodestrine.....	29
Metabolismo glucidico neuronale.....	29
Metodi.....	30
Saggi di vitalità cellulare MTT e Trypan blue.....	30
Saggio di citotossicità LDH.....	30

Uptake.....	30
Quantificazione dei ROS intracellulari.....	31
Ciclo cellulare.....	31
Apoptosi.....	31
Microscopia confocale.....	32
Valutazione della fluorescenza intracellulare.....	32
Quantificazione della permeabilità transepiteliale.....	33
Analisi di glucosio e lattato su cellule PC12.....	34
Analisi statistica.....	34
Risultati	35
Risultati dei sistemi di drug delivery GEN-TFs.....	36
Risultati dei sistemi di drug delivery TF2-QL.....	44
Risultati delle nanoparticelle a base di chitosano NP-GEN.....	48
Risultati delle β -ciclodestrine.....	50
Risultati dell'analisi di glucosio e lattato su cellule PC12.....	57
Discussione	63
Work in progress	69
Bibliografia	78

Introduzione

Neurodegenerazione e malattia di Parkinson

Il tessuto nervoso, a differenza degli altri tessuti del corpo, è incapace di rinnovare le sue cellule le quali persistono durante l'intera vita dell'organismo. Questo implica che ogni neurone perso in seguito al normale processo di invecchiamento fisiologico o a causa di eventi patologici non verrà più sostituito¹. La neurodegenerazione è determinata da diversi meccanismi tra cui l'apoptosi e la necrosi^{2,3} ed è alla base di numerose malattie neurodegenerative tra cui la malattia di Parkinson (PD)⁴. Il morbo di Parkinson è una patologia caratterizzata dalla degenerazione dei neuroni dopaminergici della *substantia nigra pars compacta*. La morte dei neuroni dopaminergici è strettamente correlata alla deplezione dei livelli del neurotrasmettitore dopamina (DA) che determina disfunzioni nel movimento e nella coordinazione^{5,6}. Le ipotesi eziologiche sono ancora sconosciute, ma molteplici evidenze scientifiche descrivono il PD come una patologia multifattoriale dove espressione genica, fattori ambientali e neurotossine giocherebbero un ruolo fondamentale nello sviluppo e nel decorso clinico. Nella letteratura scientifica sono riportati vari studi eseguiti su modelli cellulari di parkinsonismo indotto al fine di indagare sui meccanismi eziopatogenetici del PD^{7,8}. Queste ricerche hanno dimostrato come lo stress ossidativo, generato da un'alterazione dell'equilibrio tra le specie reattive e il pool di antiossidanti deputati alla difesa del sistema nervoso centrale (SNC), svolga un ruolo importante nella patogenesi della malattia⁹. Infatti, diversi studi hanno dimostrato una drastica riduzione nei livelli di antiossidanti endogeni nella *substantia nigra* dei pazienti parkinsoniani¹⁰. Un contributo nell'aumentare lo stress ossidativo deriva dalla stessa dopamina (figura 1). Il metabolismo del neurotrasmettitore avviene ad opera delle monoamino ossidasi (MAO) e delle catecol-O-metiltransferasi (COMT) intracellulari, che degradando la DA producono sottoprodotti come perossido di idrogeno (H₂O₂) e altre specie reattive dell'ossigeno¹¹. Inoltre, la dopamina va incontro alla degradazione non enzimatica, ovvero la sua auto-ossidazione, che origina sottoprodotti tossici quali la 6-idrossidopamina (6-OH-DA) e il dopachinone¹². In aggiunta, il ferro bivalente (Fe²⁺) distribuito in elevate concentrazioni nella *substantia nigra* può prendere parte alle

reazioni di Fenton e di Haber-Weiss, insieme al perossido di idrogeno, e generare radicali idrossilici ($\bullet\text{OH}$) e anioni superossido (O_2^-). La L-3,4-diidrossifenilalanina (levodopa, L-dopa), è il precursore della sintesi della dopamina, ed è il farmaco d'elezione nella terapia della malattia di Parkinson impiegato per riportare la DA ai livelli fisiologici¹³. Il farmaco viene somministrato generalmente per via orale insieme ad un inibitore delle decarbossilasi periferiche per evitarne un suo precoce metabolismo nel circolo ed aumentare la sua biodisponibilità nel SNC. L'L-dopa risulta essere, ad oggi, il farmaco di prima scelta nella terapia del Parkinson, ma una vasta letteratura ne ha dimostrato fenomeni di ossidazione e autossidazione che contribuirebbero ad aggravare la condizione di stress ossidativo preesistente nella malattia di Parkinson^{14,15}.

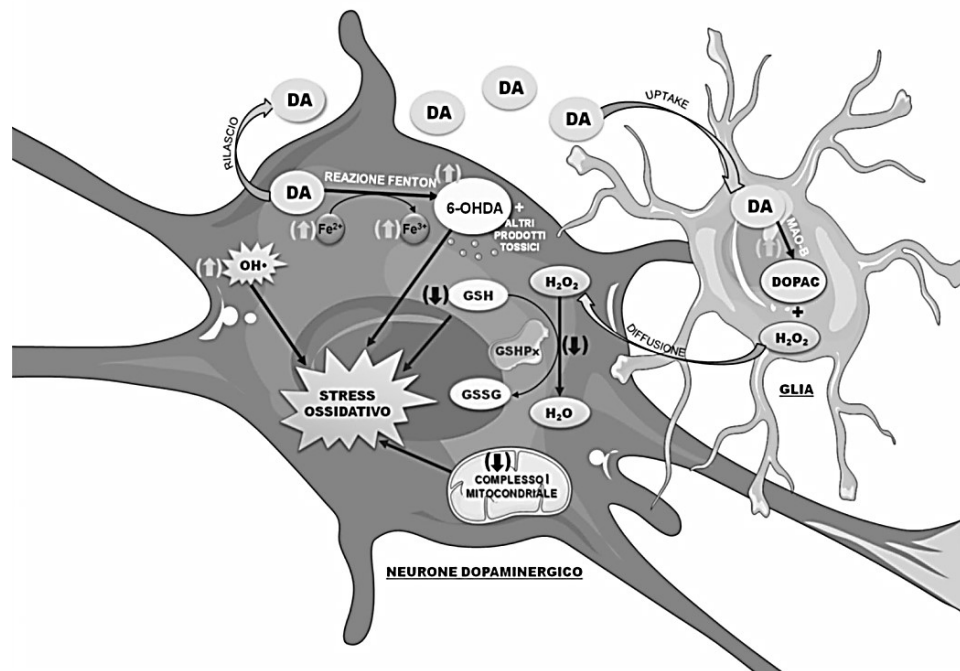


Figura 1. Malattia di Parkinson e radicali liberi. Neurone dopaminergico e cellula gliale. DA (dopamina); DOPAC (acido diidrossifenilacetico); H_2O_2 (perossido di idrogeno); MAO-B (monoamino ossidasi-B); Fe^{2+} (ione ferroso); Fe^{3+} (ione ferrico); 6-OHDA (6-idrossidopamina); GSH (glutazione ridotto); GSSG (glutazione ossidato); GSHPx (glutazione perossidasi); $\text{OH}\bullet$ (radicale idrossilico).

Stress ossidativo nel sistema nervoso centrale

L'ossigeno, nella sua forma biatomica (O_2), è la molecola essenziale per la sopravvivenza degli organismi aerobi. I vari distretti dell'organismo necessitano di un diverso fabbisogno di O_2 in relazione alle loro necessità¹⁶. Un abbondante consumo di ossigeno è evidente a livello cerebrale da parte di cellule come neuroni e astrociti; l'encefalo, infatti, pur rappresentando il 2% del peso corporeo complessivo è responsabile del 20% del consumo di ossigeno totale¹⁷. Ciononostante un eccesso di ossigeno, iperossia, determina tossicità cellulare¹⁸. Infatti l'ossigeno è presente nell'organismo anche nelle sue forme parzialmente ridotte, come i radicali liberi, molecole molto reattive che possono fungere da accettori e da donatori di elettroni. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) si distinguono in specie radicaliche come lo ione superossido (O_2^-), l'ossigeno singoletto (1O_2) e il radicale idrossilico ($\bullet OH$) e, specie non radicaliche come il perossido di idrogeno (H_2O_2)¹⁹. Durante i numerosi processi biochimici, il corpo umano produce continuamente ROS²⁰. Nei mitocondri, per esempio, avviene la fosforilazione ossidativa, processo essenziale per la produzione di ATP ed energia necessaria alle cellule per le loro funzioni²¹. Nello status fisiologico, la catena respiratoria mitocondriale produce ROS per circa il 2% dell'ossigeno consumato²² e rappresenta la fonte endogena primaria di specie reattive dell'ossigeno²³. Esistono tuttavia numerosi fattori esogeni che inducono un aumento della produzione di ROS nell'organismo, tra cui tossine ambientali e metalli pesanti quali manganese, cadmio, arsenico, rame e ferro. Le cellule possiedono sistemi antiossidanti in grado di contrastare l'azione delle specie reattive dell'ossigeno. Questi sistemi antiossidanti sono caratterizzati dalla loro attività riducente, capace di contrastare l'azione dannosa dei ROS. Il pool di antiossidanti comprende composti enzimatici, tra i quali la catalasi, la superossido dismutasi (SOD), la glutazione reduttasi, la glutazione perossidasi e, composti non enzimatici come il glutatione (GSH), le vitamine E, C ed A, i flavonoidi, e alcune proteine come l'albumina, la ferritina e le metallothioneine^{24,25}. In condizioni fisiologiche vi è un equilibrio tra produzione di

specie reattive dell'ossigeno e antiossidanti endogeni, uno squilibrio a favore dei ROS determina stress ossidativo che induce diversi danni alle cellule (figura 2)²⁶.

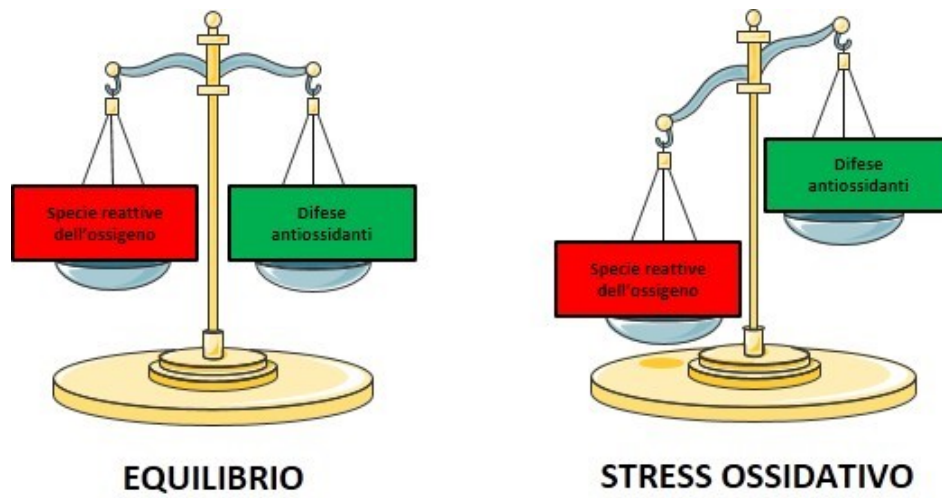


Figura 2. Stress ossidativo. Modificazione dell'equilibrio tra le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e le difese antiossidanti della cellula. ROS (in rosso); difese antiossidanti (in verde).

Neurotossine e malattia di Parkinson

MPTP. La neurotossina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidro-piridina (MPTP) è un sottoprodotto della sintesi della meperidina scoperto tra la fine degli anni '70 e i primi anni '80 all'interno di una comunità di tossicodipendenti. Questi soggetti svilupparono un parkinsonismo progressivo e irreversibile in seguito all'assunzione di una droga illegale per via endovenosa. La somiglianza neuropatologica e clinica tra l'intossicazione da MPTP e la malattia di Parkinson e, una risposta clinica sorprendente al trattamento con L-dopa hanno promosso l'impiego di questa neurotossina nella ricerca *in vivo* e *in vitro*²⁷. Nell'uomo e in modelli animali, l'esposizione all' MPTP induce la neurodegenerazione del sistema nigrostriatale con conseguente riduzione dei livelli di dopamina (DA)²⁸. Le alterazioni più significative nella deplezione del neurotrasmettitore dopamina sono state riscontrate nel nucleo caudato, nel putamen e nella *substantia nigra pars compacta*. Studi sui modelli MPTP realizzati nei primati hanno dimostrato che, oltre alla profonda perdita di DA striatale sono presenti variazioni extrastriatali di dopamina, noradrenalina e serotonina, spesso osservate nei pazienti affetti da PD idiopatico²⁹. Inoltre la tossicità e l'impatto della neurotossina MPTP è stata considerata anche nel midollo spinale³⁰ e nel sistema nervoso enterico³¹. In seguito alla sua somministrazione sistemica, l'MPTP attraversa la barriera ematoencefalica grazie alla sua elevata liposolubilità. La pro-tossina MPTP viene metabolizzata in 1-metil-4-fenil-2,3-diidropiridinio (MPDP) ad opera dall'enzima monoamino ossidasi B (MAO-B) negli astrociti. Mediante ossidazione spontanea, l'MPDP viene convertito in 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+), il composto tossico attivo. La reazione mediata dalle MAO-B è fondamentale per il metabolismo dell'MPTP e può essere inibita dalla pargilina, inibitore delle MAO-B, in grado di impedire il parkinsonismo indotto dall'MPTP (figura 3)³². L'MPP+ viene successivamente rilasciato nello spazio extracellulare attraverso meccanismi ancora non del tutto noti, che sfrutterebbero trasportatori specifici³³. La tossina attiva è una molecola polare, a differenza dell'MPTP, e risulta essere incapace di attraversare liberamente le membrane delle cellule

dopaminergiche; l'MPP+ sfrutta infatti la sua elevata affinità per il trasportatore della dopamina (DAT) che gli permette l'attraversamento delle membrane. Numerose evidenze scientifiche, in diversi modelli animali, hanno dimostrato che l'inibizione farmacologica del trasportatore DAT o l'inibizione della sua espressione previene la tossicità indotta dall'MPTP³⁴. All'interno del neurone dopaminergico, l'MPP+ esercita il suo effetto sul complesso I della catena di trasporto mitocondriale interrompendo il flusso di elettroni³⁵, determinando una rapida deplezione dei livelli di ATP³⁶ e la formazione di radicali liberi tra cui il perossinitrito³⁷. Il perossinitrito agisce ossidando i residui tirosinici delle proteine³⁸, danneggiando il DNA³⁹, incrementando l'aggregazione dell' α -sinucleina⁴⁰ e l'attivazione delle caspasi con conseguente attivazione della cascata apoptotica⁴¹. In corso di intossicazione indotta dall'MPTP si osserva un aumento del rilascio di dopamina all'interno della cellula mentre, nella porzione extracellulare l'auto-ossidazione della DA porta alla formazione di radicali liberi⁴². Inoltre, l'esposizione alla neurotossina è responsabile di fenomeni di eccitotossicità nelle cellule dopaminergiche⁴³ causati da una maggiore attivazione dei recettori NMDA da parte del glutammato extracellulare e un aumentato ingresso di Ca^{2+} nella cellula⁴⁴. L'MPTP è anche responsabile di fenomeni infiammatori caratterizzati dall'eccessivo rilascio di citochine pro-infiammatorie come IL-1 β , TNF- α o IFN- γ ⁴⁵.

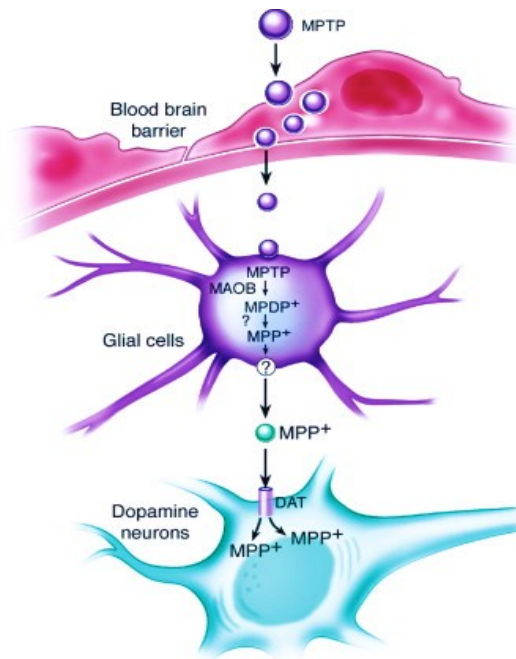


Figura 3. MPTP nel sistema nervoso centrale. Il metabolismo della neurotossina MPTP (immagine presa da: Dauer, W., Przedborski, S., 2003⁴⁶).

Manganese. Il manganese (Mn) è un metallo presente in tracce nell'ambiente, elemento essenziale per il mantenimento e la regolazione di numerose reazioni biochimiche cellulari⁴⁷. Infatti, nonostante il metallo risulti essere estremamente tossico per il sistema nervoso centrale, il manganese funziona come cofattore di diversi enzimi essenziali per le funzioni vitali, tra cui la glutammina sintetasi, l'arginasi, la piruvato decarbossilasi e la superossido dismutasi mitocondriale⁴⁸. L'esposizione ambientale al Mn può avvenire attraverso il consumo di acque contenenti elevati livelli di metallo e attraverso l'ingestione di preparati alimentari a base di soia^{49,50}. Una grande quantità di Mn viene inoltre rilasciata nell'atmosfera a seguito della combustione di metilciclopentadienil manganese tricarbonile (MMT), un additivo presente nella benzina⁵¹. L'esposizione al manganese è stata identificata come fattore di rischio per la salute di minatori, saldatori, ferrovieri, produttori di batterie e operai della meccanica automobilistica⁵²⁻⁵⁶. L'eccessivo accumulo di Mn nel sistema nervoso centrale innesca fenomeni di neurotossicità risultanti in un disturbo neurologico noto come manganismo. Il disturbo è caratterizzato da sintomi

analoghi a quelli del morbo di Parkinson idiopatico^{57,58}. Studi su primati non umani evidenziano una riduzione dei livelli dopamina nel caudato, nello striato, nel mesencefalo e nel globus pallidus in seguito all'esposizione al manganese⁵⁹⁻⁶¹. Inoltre, il Mn è capace di incrementare l'espressione dell' α -sinucleina in cellule PC12^{62,63}. Nello studio del meccanismo d'azione del manganese, numerose evidenze ne hanno suggerito l'interazione con altri oligoelementi come ferro, alluminio, zinco e rame nel sistema nervoso centrale^{64,65}. Il metallo, inoltre, è in grado di indurre un incremento del danno ossidativo⁶⁶.

Cadmio. Il cadmio è un metallo pesante presente nell'atmosfera sotto forma di catione bivalente complessato ad altri elementi (es. CdCl_2) comunemente impiegato nella produzione di schermi televisivi, laser, batterie e cosmetici. L'esposizione al cadmio avviene principalmente attraverso l'inalazione e l'ingestione e circa il 5-10% del metallo ingerito viene assorbito, mentre il suo assorbimento per via cutanea è trascurabile⁶⁷. Il fumo di sigaretta è considerato la fonte più significativa di esposizione al cadmio e numerose evidenze scientifiche sottolineano livelli elevati di Cd nel sistema circolatorio e renale dei fumatori rispetto ai non fumatori⁶⁸. Un'altra fonte comune di esposizione al cadmio è rappresentata dall'ingestione di alimenti contaminati (crostacei, verdure a foglia verde, riso prevalentemente di derivazione giapponese e cinese) e dall'utilizzo di acqua corrente contaminata. Il metallo è presente in tracce anche in alcuni integratori alimentari⁶⁹. Il cadmio induce lesioni tissutali attraverso diversi meccanismi d'azione tra cui lo stress ossidativo⁷⁰, la deplezione dei livelli di glutazione⁷¹, cambiamenti dell'espressione genica⁷², l'inibizione della sintesi del gruppo eme⁷³ e disfunzione mitocondriale con induzione di morte cellulare per apoptosi⁷⁴. Studi *in vivo* effettuati sul sistema nervoso centrale hanno dimostrato che il cadmio induce stress ossidativo e alterazioni istologiche delle membrane neuronali con conseguente riduzione dell'attività acetilcolinesterasica, aumento dei ROS e dei marcatori dello stress ossidativo e riduzione delle difese antiossidanti endogene (SOD2 e catalasi)⁷⁵. Questi fenomeni riconducibili all'esposizione al metallo sono dovuti all'apoptosi delle cellule corticali

nel sistema nervoso centrale, probabilmente a causa della fosforilazione della protein-chinasi II calcio/calmodulina-dipendente⁷⁶. Il Cd inoltre sarebbe responsabile dell'inibizione dell'afflusso dello ione calcio attraverso i canali adibiti al suo trasporto⁷⁷. Alcuni studi sono stati effettuati sulla linea cellulare PC12 in cui l'esposizione al cadmio ha indotto una significativa riduzione della vitalità cellulare, un aumento della percentuale di cellule apoptotiche e del rilascio del citocromo-c e un aumento dell'espressione della caspasi-3. Inoltre, il metallo ha indotto la fosforilazione delle MAP chinasi ERK, JNK e p38. L'inibizione di ERK e JNK, ma non di MAPK p38, ha protetto parzialmente le cellule dall'apoptosi, ha ridotto il rilascio del citocromo-c e l'espressione della caspasi-3. Nella loro totalità questi dati suggeriscono un ruolo fondamentale della via apoptotica mitocondriale mediata da ERK e JNK nel meccanismo di tossicità del cadmio in cellule PC12⁷⁸. Nella stessa linea cellulare, esposta al cadmio cloruro, è stato dimostrato l'effetto protettivo della L-teanina, aminoacido comunemente presente nel tè verde. L'aminoacido ha protetto la vitalità cellulare dall'effetto tossico del metallo, ha inibito l'apoptosi e ha ridotto la produzione di ROS. Questi risultati indicano ulteriormente un possibile meccanismo d'azione del cadmio mediato dall'apoptosi e dallo stress ossidativo⁷⁹.

Antiossidanti naturali

Genisteina. Il fitoestrogeno genisteina (GEN) (4',5,7-triidrossi-isoflavone) è un isoflavone isolato nel 1928 presente in alte concentrazioni nelle leguminose ed in particolare nella pianta della soia (figura 4). Numerosi studi *in vivo* e *in vitro* hanno evidenziato la stretta relazione tra una dieta ricca di alimenti a base di soia e la prevenzione di alcune forme tumorali (tumore al fegato, allo stomaco, al polmone, all'intestino e al seno). Ad oggi sono in corso di sviluppo diversi trials clinici basati sull'utilizzo della genisteina; di grande rilevanza sono i trials per la cura del tumore al seno e del tumore endometriale, rispettivamente in fase II e in fase I⁸⁰. Il meccanismo d'azione antitumorale della genisteina è ben noto in letteratura ed include principalmente l'inibizione della topoisomerasi II e l'arresto del ciclo cellulare nella fase G2/M⁸¹. Recenti evidenze scientifiche mettono in luce anche le potenti proprietà antiossidanti⁸² e l'effetto neuroprotettivo del fitoestrogeno in diverse linee cellulari⁸³. L'isoflavone infatti, giocherebbe un ruolo importantissimo attenuando la formazione delle placche di beta amiloide (A β)⁸⁴ ed il danno ossidativo ad esse associato tipico della malattia di Alzheimer^{85,86}. L'effetto neuroprotettivo è stato inoltre studiato su modelli cellulari di malattia di Parkinson, dove la genisteina ha mostrato effetti antiossidanti e antiapoptotici⁸⁷. Anche in modelli animali di malattia di Parkinson la genisteina ha ridotto lo stress ossidativo ed inoltre, ha incrementato i livelli di dopamina nella *substantia nigra pars compacta* ma non ha inibito l'espressione dell' α -sinucleina⁸⁸. L'effetto neuroprotettivo dell'isoflavone è inoltre dovuto alla sua capacità di modulare la risposta infiammatoria⁸⁹. L'applicazione della genisteina in terapia è comunque limitata a causa del suo elevato metabolismo, della bassa solubilità in soluzione acquosa e della bassa biodisponibilità orale⁹⁰, anche se comunque è in grado di attraversare la barriera ematoencefalica (BBB)⁸⁹. Studi recenti propongono infatti delivery systems innovativi per ottimizzare il trasporto e gli effetti antiossidanti e antiapoptotici della genisteina nel sistema nervoso centrale⁹¹.

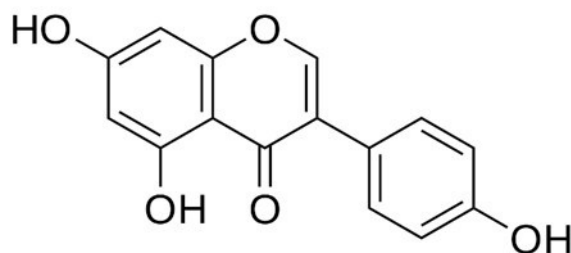


Figura 4. Genisteina. Formula di struttura.

Quercetina. La quercetina (3,3',4',5,7-pentaidrossiflavone) è un flavonoide contenuto in diversi tipi di verdura e frutta quali la cipolla rossa, la cipolla comune, il mirtillo e il fico⁹². Studi scientifici sempre più numerosi dimostrano il potenziale terapeutico della quercetina nella prevenzione e nel trattamento di diverse patologie quali le malattie cardiovascolari, le malattie neurodegenerative e alcune forme tumorali⁹³⁻⁹⁶. Il flavonoide sembra avere un ruolo nella modulazione dell'espressione genica e di diverse vie della trasduzione del segnale^{97,98}. Studi effettuati su modelli *in vitro* di malattie neurodegenerative mediate da stress ossidativo, come la malattia di Parkinson, dimostrano che, la quercetina, a basse concentrazioni (μM), esplica un'azione neuroprotettiva riducendo i ROS generati dal perossido di idrogeno, dalla 6-OHDA e dall'MPTP⁹⁹⁻¹⁰¹ attraverso l'attivazione di diversi pathway molecolari regolatori, come ad esempio la via mediata da Nrf2¹⁰². Nrf2 è un fattore nucleare coinvolto nella protezione dal danno ossidativo che sembrerebbe modulare la formazione di aggregati di proteine *misfolded* tipici della malattia di Alzheimer, di Parkinson, di Huntington e della sclerosi laterale amiotrofica (SLA)¹⁰³. L'attivazione del pathway di Nrf2 a sua volta incrementa i livelli di glutatione e attiva le proteine ERK e JNK¹⁰⁴. La quercetina ha un ruolo fondamentale anche nella neuroinfiammazione, tipica dei disordini neurodegenerativi; in particolare, la somministrazione del flavonoide induce una riduzione del rilascio di citochine proinfiammatorie da parte della microglia e degli astrociti¹⁰². La biodisponibilità della quercetina è molto bassa a causa del suo eccessivo metabolismo, infatti la quota di flavonoide assorbita viene ritrovata nel

plasma in forma di metaboliti glucuronati e metilati in grado di esplicare comunque l'effetto neuroprotettivo (figura 5)^{105,106}.

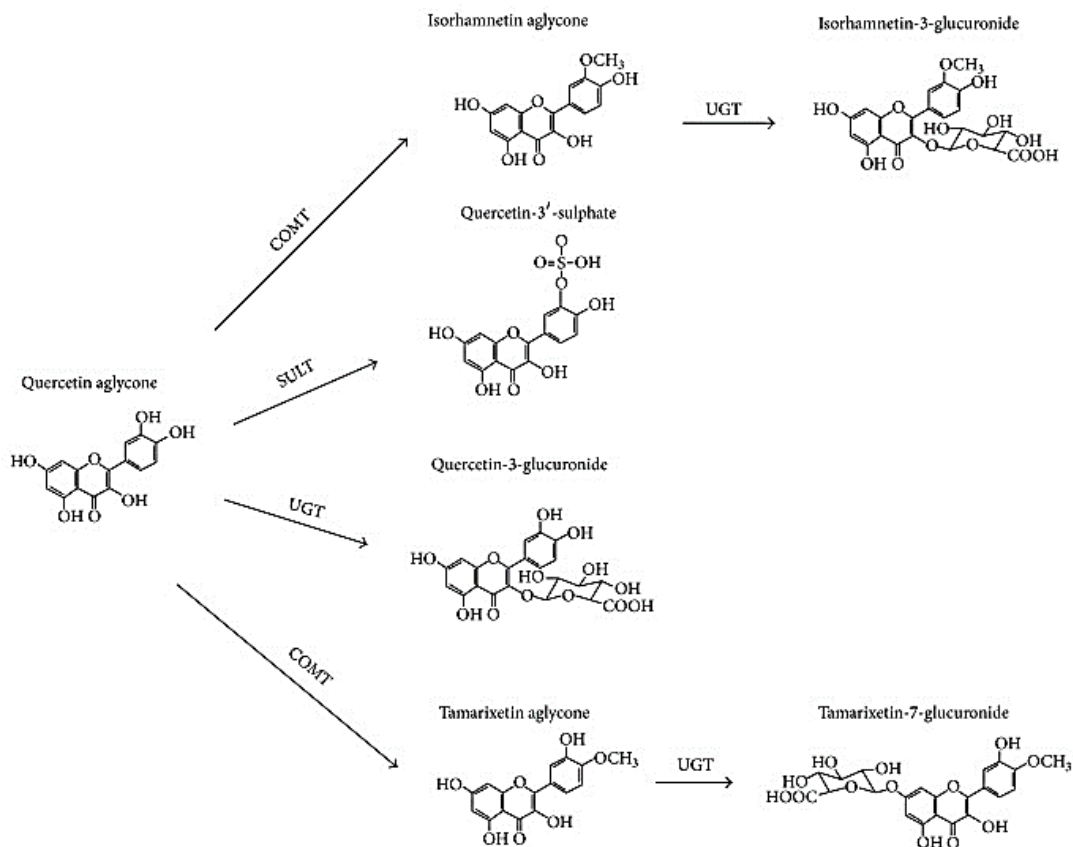


Figura 5. Metabolismo della quercetina. Struttura della quercetina e dei suoi principali metaboliti (immagine presa da: Lucio G. Costa et al., 2016¹⁰²).

Come la genisteina, anche la quercetina, è caratterizzata da una bassa biodisponibilità, e in diversi studi si stanno caratterizzando sistemi di drug delivery basati su nanoparticelle di varia natura per favorire il trasporto del flavonoide e la sua azione antitumorale e antiossidante^{107,108}.

5. Sistemi di drug delivery per la veicolazione di sostanze farmacologicamente attive

Transferosomi. I transferosomi (nano-transferosomi transdermici) sono nanovesicole lipidiche nelle quali un volume acquoso è circondato completamente da una membrana fosfolipidica^{109,110} e sono costituite da un attivatore di membrana, generalmente un tensioattivo non tossico. La loro struttura può essere di tipo monolamellare (costituiti da un singolo doppio strato lipidico) o multilamellare (caratterizzati da strati concentrici di diversi doppi strati lipidici separati dalla fase acquosa). Le proprietà di questi sistemi possono variare in base alla loro grandezza (nm o μm), alla loro composizione lipidica, alla carica di superficie e al metodo di preparazione¹¹¹. I transferosomi possono contenere al loro interno sostanze farmacologicamente attive di varia natura, per esempio farmaci idrosolubili e liposolubili. Un farmaco di natura idrofilica può essere posizionato nel core di natura acquosa del sistema, mentre farmaci idrofobici possono essere trasportati posizionandosi nel doppio strato lipidico del carrier (figura 6)^{112,113}. L'utilizzo di questi carriers presenta vantaggi e limiti imposti dall'interazione degli stessi sistemi con l'ambiente cellulare. Numerosi studi hanno dimostrato che i principali meccanismi di internalizzazione dei transferosomi avvengono attraverso interazioni fisiche e specifiche con le componenti membranali della cellula (adsorbimento) e mediante endocitosi¹¹¹. Questi sistemi sono stati sfruttati per veicolare numerose classi di farmaci e molecole, quali antibiotici, materiale genetico e antiossidanti^{62,91,113}. I transferosomi, dotati di elevata deformabilità, risultano essere carriers adatti per la somministrazione transdermica e per la veicolazione di farmaci nel sistema nervoso centrale attraverso la mucosa nasale^{114,115}. La somministrazione intranasale dei farmaci rappresenta una metodica non invasiva al fine di bypassare la barriera ematoencefalica per veicolare farmaci direttamente al cervello sfruttando le connessioni anatomiche esistenti tra i nervi olfattivi e il trigemino¹¹⁶. Tuttavia, a causa della scarsa permeabilità della mucosa nasale, un requisito importante risulta essere l'ottimizzazione del processo di assorbimento

della formulazione attraverso lo sviluppo di appropriati sistemi di somministrazione¹¹⁷⁻¹²⁰. Un esempio di applicazione dei transferosomi è rappresentato dalla possibilità di trasportare antiossidanti naturali direttamente nel sistema nervoso centrale dove potrebbero svolgere un'azione protettiva nei confronti del danno ossidativo tipico delle malattie neurodegenerative, quali la malattia di Parkinson⁹¹.

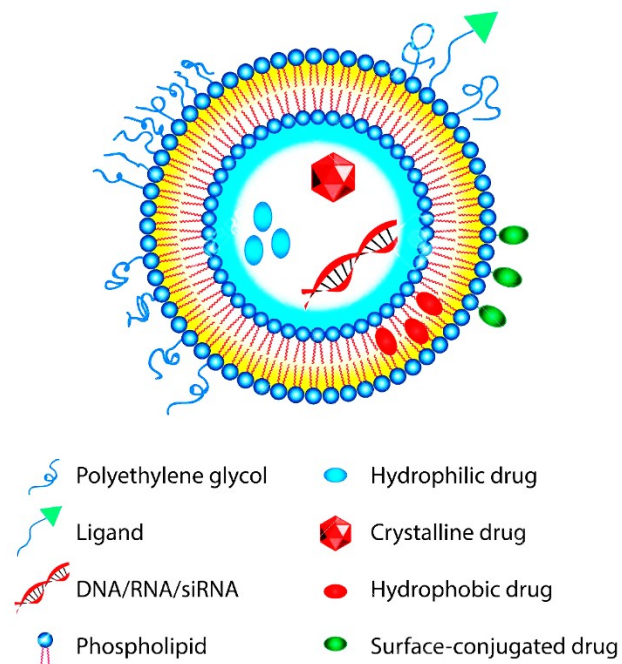


Figura 6. Rappresentazione grafica del transferosoma. Esempio della distribuzione delle varie componenti e di diversi farmaci nei compartimenti della struttura lipidica.

Nanoparticelle di chitosano. Il chitosano è un polimero naturale policationico, ottenuto dalla parziale deacetilazione della chitina costituente del guscio di artropodi e crostacei (figura 7). Il chitosano è per natura biodegradabile, dotato di elevata biocompatibilità e bassa immunogenicità. Queste caratteristiche fanno sì che questo polimero sia uno dei più studiati nella realizzazione di sistemi di drug delivery¹²¹. La carica positiva caratteristica del chitosano gli permette di interagire con molecole cariche negativamente, come ad esempio il DNA¹²². Nanoparticelle di

chitosano trovano la loro applicazione nella somministrazione di farmaci per via orale e nasale, nel rilascio sito specifico a livello intestinale e nel trasporto di vaccini e antitumorali^{123,124}. Le nanoparticelle possono essere quindi progettate per il trasporto e l'assorbimento di molecole di varia natura, tra cui ormoni e antiossidanti. Un esempio è riportato in uno studio in cui sono state preparate e caratterizzate nanoparticelle a base di chitosano caricate con insulina e, successivamente, sono state somministrate per via orale ad un gruppo di ratti. Le nanoparticelle si sono dimostrate ottimi sistemi di drug delivery dell'insulina per via orale in quanto hanno indotto un effetto ipoglicemizzante prolungato comparato a quello ottenuto mediante somministrazione sottocutanea dell'ormone¹²⁵. Ulteriori indagini, effettuate *in vitro* su cellule di epatocarcinoma di ratto (HepG2), hanno invece dimostrato un maggiore effetto antiossidante della quercetina complessata alle nanoparticelle di chitosano rispetto alla somministrazione del flavonoide libero^{126,127}. Questi sistemi di drug delivery, adeguatamente modificati, potrebbero rappresentare un metodo innovativo per la veicolazione di antiossidanti nel sistema nervoso centrale al fine di ridurre i livelli di stress ossidativo nelle malattie neurodegenerative.

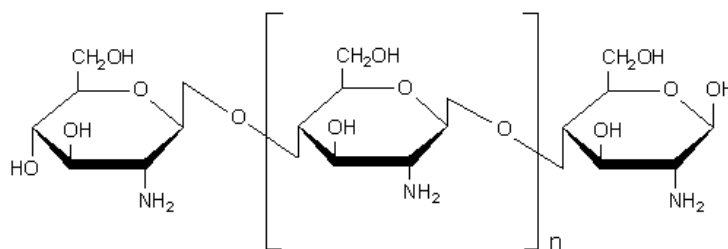


Figura 7. Chitosano. Formula di struttura.

Beta (β) ciclodestrine. Le ciclodestrine (CDs), sono degli oligosaccaridi macrociclici, caratterizzati da una forma di toroide o tronco di cono, ottenuti dall'amido mediante una reazione di transglicosilazione^{128,129}. Presentano una superficie costituita da numerosi gruppi $-OH$ che le rendono solubili in acqua e una cavità interna di natura idrofobica¹³⁰. Le ciclodestrine variano tra loro a seconda del

numero delle unità glucosidiche che le compongono. In particolare, le beta (β) ciclodestrine (β -CD), caratterizzate da 7 unità glucosidiche, sono quelle maggiormente utilizzate a scopi farmaceutici. Le β -CD hanno un diametro di media grandezza (circa 0.75 nm) che si presta all'internalizzazione di diversi tipi di farmaci e, grazie a questa caratteristica possono formare complessi di inclusione con differenti molecole di natura idrofobica (figura 8)^{128,131}. Le β -CD aumentano la solubilità e la biodisponibilità dei farmaci complessati^{128,132} ed esistono sotto forma di formulazioni realizzate per la somministrazione nasale, orale, oculare e dermica. Esse vengono definite con il termine di "penetration enhancer" perché aumentano il grado di assorbimento dei farmaci ed interagiscono con le membrane biologiche¹³³. Le β -CD possono quindi essere modificate per il trasporto di diverse molecole tra cui antiossidanti. Un esempio è la produzione e la caratterizzazione di una formulazione di β -ciclodestrine complessate alla quercetina al fine di aumentare la sua scarsa solubilità in acqua e ridurre il suo metabolismo¹³⁴. Anche questi sistemi di drug delivery potrebbero essere utilizzati per veicolare antiossidanti con lo scopo di ridurre lo stress ossidativo.

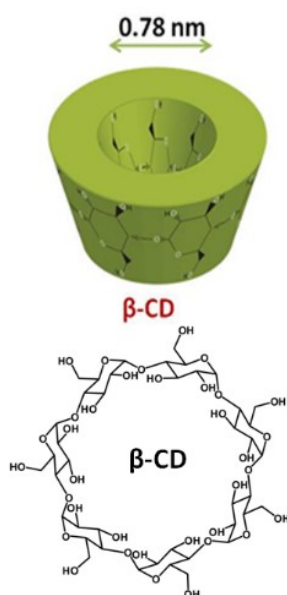


Figura 8. β -ciclodestrine. Rappresentazione grafica (immagine presa e modificata da: Chimica Organica "Vanvitelli").

6. Il metabolismo energetico cerebrale: un possibile ruolo neuroprotettivo dell'insulina nella disfunzione mitocondriale neuronale

Il glucosio rappresenta la fonte principale di energia del cervello dei mammiferi, dove i neuroni necessitano del più alto fabbisogno energetico rispetto ad altri tipi cellulari. Infatti il 70-80% dell'energia totale viene spesa dai neuroni, mentre la restante deve essere suddivisa tra astrociti, oligodendrociti e microglia^{135,136}. Il metabolismo glucidico è essenziale per la generazione di ATP e per il mantenimento delle riserve energetiche (il glicogeno degli astrociti). Un alterato metabolismo del glucosio è stato riconosciuto tra i fattori patogenetici di diverse malattie neurodegenerative tra cui la malattia di Parkinson^{135,137}. A livello cerebrale, il destino del glucosio intracellulare dipende dal tipo cellulare preso in analisi. Infatti, mentre il metabolismo neuronale risulta essere principalmente di tipo ossidativo (con produzione di CO₂, acqua e 30-36 molecole di ATP a seconda dell'efficienza della fosforilazione ossidativa a livello mitocondriale), quello astrocitario è prevalentemente di tipo glicolitico¹³⁸ (figura 9). Cambiamenti nel metabolismo energetico neuronale e, uno spostamento a favore della via esclusivamente glicolitica nell'utilizzazione del glucosio risulterebbero in una ridotta disponibilità del NADPH, stress ossidativo e morte cellulare¹³⁹.

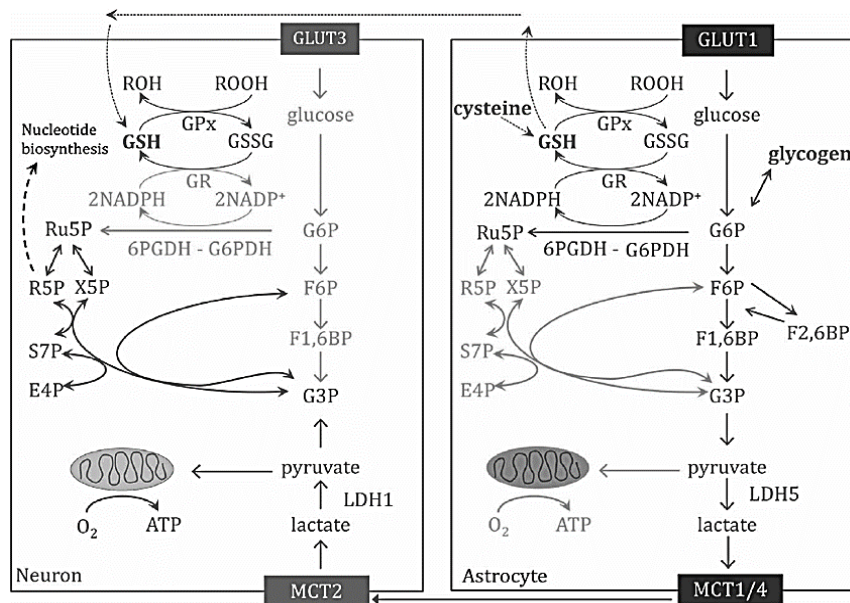


Figura 9. Il glucosio nel sistema nervoso centrale. Il metabolismo del glucosio nei neuroni e negli astrociti (immagine presa da: Stincone et al., 2015)¹³⁸.

A partire dagli anni '90, anche il lattato ha assunto un ruolo fondamentale nel metabolismo energetico neuronale, grazie alla teoria di Pellerin e Magistretti (2004). Secondo il modello "ANLS" (astrocyte-neuron lactate shuttle) da loro proposto (figura 10), esisterebbe un fondamentale cross-talk tra l'attività metabolica dell'astrocita e quella del neurone. L'astrocita, localizzato a cavallo tra i capillari cerebrali e l'ambiente extracellulare neuronale, sarebbe la cellula più idonea ad internalizzare il glucosio proveniente dal torrente plasmatico ed immetterlo nella via metabolica della glicolisi. A livello astrocitario avverrebbe la conversione del piruvato glicolitico in lattato ad opera dell'enzima lattato deidrogenasi-5 (LDH5). A questo punto, il lattato prodotto nell'astrocita verrebbe così rilasciato nello spazio extracellulare ed internalizzato dal neurone in grado di riconvertirlo (ad opera dell'LDH1) in piruvato da immettere nel ciclo di Krebs, così da soddisfare efficacemente le richieste energetiche del neurone¹⁴⁰. L'ipotesi di Pellerin e Magistretti¹⁴⁰, con l'effettivo trasporto del lattato dall'astrocita al neurone e il ruolo secondario del glucosio nell'attivazione neuronale, non è ancora supportata da sufficienti prove, infatti il modello ANLS rimane controverso e

oggetto di critiche e discussioni^{141,142}. È infatti dimostrato da diversi studi che il metabolismo cerebrale del lattato sia una fondamentale alternativa energetica soprattutto in condizioni quali ipossia ed esercizio fisico¹⁴³.

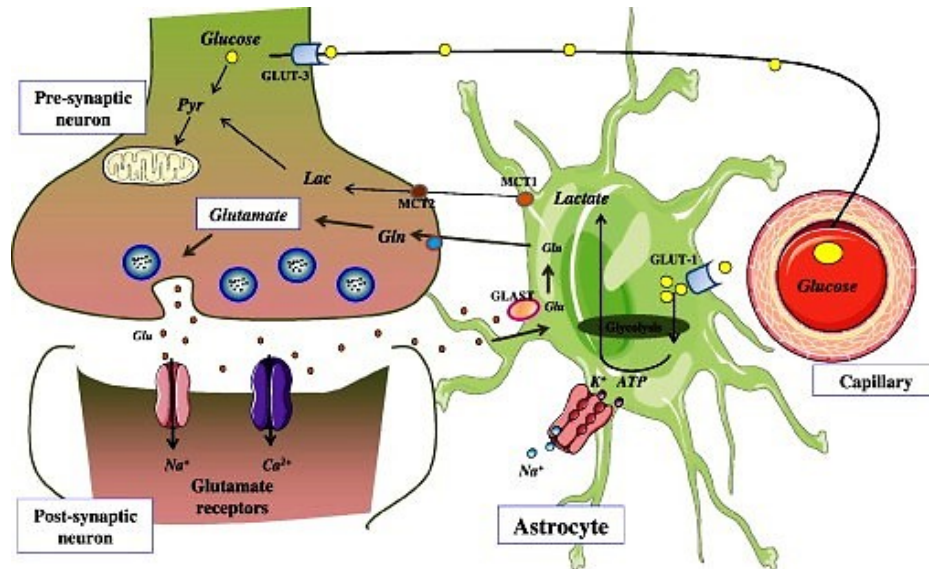


Figura 10. Il modello ANLS proposto da Pellerin e Magistretti (2004)¹⁴⁰ (immagine presa da: García-Cáceres et al., 2012)¹⁴⁴.

La fosforilazione ossidativa mitocondriale neuronale gioca quindi un ruolo fondamentale nella produzione di energia, nella generazione di specie reattive dell'ossigeno e nel fenomeno apoptotico. Una mancanza di energia cellulare, un'eccessiva produzione di radicali e una disregolazione dei processi di "morte programmata" sono stati riconosciuti come fattori centrali nello sviluppo di malattie neurodegenerative¹⁴⁵. Lo stress ossidativo e la disfunzione mitocondriale sono infatti correlati al fenomeno della neurodegenerazione fisiologica o, patologica come nella malattia di Parkinson^{20,146}. Un'altra caratteristica della disfunzione mitocondriale è l'esaltazione compensatoria della glicolisi anaerobia, resa necessaria dall'impossibilità di ossidare il glucosio; lo specchio di questa condizione è l'incremento dei livelli di lattato, tipico della sindrome di Leigh¹⁴⁷. Alcuni studi considerano il lattato un marker non invasivo di invecchiamento cerebrale¹⁴⁸.

In questo contesto si inserisce l'insulina e il suo ruolo fondamentale nella regolazione del metabolismo energetico. L'insulina è un ormone peptidico secreto dalle cellule β del pancreas che svolge essenziali effetti regolatori sul metabolismo glucidico, lipidico e proteico. La sintesi e il rilascio dell'insulina dipendono da diversi fattori, tra cui gli elevati livelli circolanti di glucosio, la presenza di aminoacidi liberi e di acidi grassi non esterificati, ma anche dagli stimoli neurali e ormonali dell'organismo¹⁴⁹. Dal punto di vista metabolico, l'insulina ha un'azione tipicamente anabolizzante. L'ormone stimola la glicolisi e glicogenosintesi mentre inibisce la gluconeogenesi e la glicogenolisi; stimola la lipogenesi inibendo la lipolisi e la chetogenesi; stimola la sintesi proteica e inibisce la proteolisi¹⁵⁰. Questi effetti sono conseguenti al legame dell'insulina alla subunità α del suo recettore (IR), che determina un cambiamento conformazionale che induce l'autofosforilazione dei residui tirosinici delle subunità β . L'autofosforilazione avvia l'attività tirosin chinasi della porzione intracellulare del recettore attivando una serie di reazioni a catena di fosforilazione che permettono di esplicare i diversi effetti dell'ormone (figura 11)¹⁵¹. L'insulina mantiene la glicemia su livelli fisiologici (70-99 mg/100 ml di plasma) favorendo l'uptake del glucosio attraverso l'esposizione dei trasportatori GLUT4 sulla superficie cellulare¹⁵².

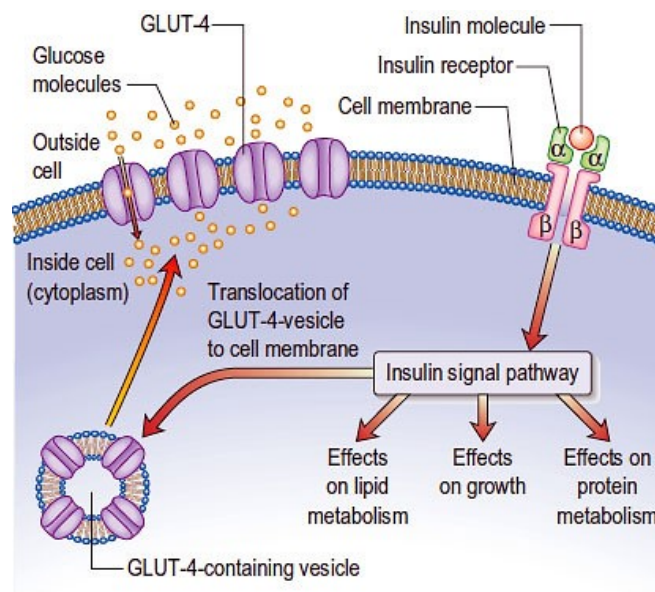


Figura 11. Interazione insulina-recettore. Il recettore insulinico e gli effetti della sua attivazione.

Fino a qualche anno fa, l'insulina è stata considerata un ormone dalla scarsa o dalla nulla attività sul sistema nervoso centrale, ma la ricerca negli ultimi decenni ha riconsiderato il suo ruolo. Infatti, a livello del sistema nervoso centrale, l'ormone influenza il comportamento alimentare e controlla le riserve energetiche corporee, regola il metabolismo del glucosio e dei grassi nel fegato e nel tessuto adiposo e, sembra correlata a vari aspetti riguardanti la memoria e la cognizione. L'insulina potrebbe persino giocare un ruolo nello sviluppo o nella progressione della malattia di Alzheimer¹⁵³. L'azione dell'insulina nel metabolismo energetico del glucosio non si esaurisce a livello della glicolisi, infatti viene attribuito all'ormone un ruolo essenziale anche nella preservazione della funzione mitocondriale. Già negli anni '80 è stato riconosciuto il ruolo dell'insulina nel ciclo di Krebs¹⁵⁴, ma oggi, viene confermato l'effetto sulla capacità ossidativa mitocondriale e sulla produzione di ATP, il cui normale funzionamento richiede un'attività insulinica non alterata. Attraverso la via metabolica mediata dal PI3K, l'insulina infatti gioca un ruolo essenziale nella sintesi delle proteine mitocondriali che compongono la catena respiratoria e rendono possibile la generazione di ATP¹⁵⁵.

Conseguentemente a quanto detto in precedenza, appare evidente che insulina ed MPTP svolgano due effetti diametralmente opposti sulla funzione mitocondriale: rispettivamente protettivo e tossico. A tal proposito, è interessante sottolineare la correlazione tra insulino-resistenza e malattia di Parkinson. Una serie di studi epidemiologici hanno riconosciuto diversi fattori di rischio per la malattia di Parkinson tra cui, un elevato indice di massa corporea (BMI)¹⁵⁶, elevati livelli di colesterolo totale¹⁵⁷ e lo sviluppo del diabete mellito di tipo 2¹⁵⁸. Questi dati epidemiologici hanno portato ad approfondire l'eventuale relazione tra insulino-resistenza e Parkinson che è diventata negli ultimi anni sempre più significativa. La convergenza tra due patologie apparentemente così distanti potrebbe risiedere proprio nella disfunzione mitocondriale che le accomuna. In entrambe le patologie, si ha una ridotta espressione e funzione del co-attivatore 1 del proliferatore gamma del perossisoma (PGC1 α), fattore fondamentale nella regolazione genica della

biogenesi mitocondriale, nella respirazione cellulare, nel metabolismo ossidativo e nella produzione di ROS¹⁵⁹. Si ritiene che le affinità tra malattia di Parkinson e insulino-resistenza non si fermano alla simile disfunzione mitocondriale, ma potrebbero coinvolgere anche altri aspetti quali la funzionalità del sistema lisosomiale, l'aggregazione proteica, la neuroinfiammazione, lo stress ossidativo, la trasmissione sinaptica e il metabolismo cerebrale del glucosio. Il signaling cerebrale dell'insulina interviene su tutti gli elementi appena citati, con effetto neuroprotettivo che diventa inefficiente o assente in caso di insulino-resistenza¹⁶⁰. Alcuni autori hanno dimostrato *in vivo* come l'insulino-resistenza porti ad una maggior vulnerabilità al danno indotto dall'MPTP e ad un'aumentata degenerazione nigrostriatale¹⁶¹. Queste evidenze hanno portato a valutare l'effetto dei farmaci utilizzati nel diabete sui modelli sperimentali di Parkinson. I farmaci più promettenti sono i tiazolidinedioni, farmaci che aumentano la sensibilità all'insulina e che si sono dimostrati in grado ridurre i danni tossici da MPTP¹⁶² e altre neurotossine, come la 6-idrossidopamina¹⁶³ e rotenone¹⁶⁴.

Scopo della ricerca

Ancora oggi, non essendo completamente note le cause dell'insorgenza delle malattie neurodegenerative, la ricerca di nuove strategie applicabili in terapia continua a suscitare grande interesse. Questo lavoro ha lo scopo di ipotizzare nuovi approcci terapeutici come coadiuvanti nella cura delle malattie del sistema nervoso centrale. Tra gli obiettivi di questo studio vi è quello di testare diversi sistemi di drug delivery (transferosomi, nanoparticelle di chitosano e β -ciclodestrine), come tali o legati a farmaci, al fine di valutarne l'azione farmacologica su diversi modelli cellulari di stress ossidativo e parkinsonismo indotto. Inoltre, attraverso la valutazione dei livelli di glucosio e lattato coinvolti nel metabolismo energetico cellulare, in seguito a danno da MPTP, si è cercato un nuovo approccio terapeutico coinvolgendo farmaci già noti in altri ruoli, come possibilità di ripristino delle condizioni fisiologiche.

Materiali e metodi

Reagenti e soluzioni

Il Dulbecco's modified eagle's medium/nutrient mixture F-12 (DMEM/F-12), il Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), la miscela antibiotica penicillina/streptomina (PEN/STREP), il siero fetale bovino (FBS), il siero equino (HS), la soluzione di tampone fosfato salino (PBS, NaCl 0.138 M; KCl 0.0027 M; pH 7.4), la tripsina, la soluzione hank's salt (HBSS), gli aminoacidi non essenziali (NEAA) e la soluzione di L-glutamina sono stati acquistati presso Life Technologies. Il trypan blue (TB), il bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, 97.5%), il 4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI), il bisbenzamide H 33342 trihydrochloride (hoechst 33342), lo ioduro di propidio (PI), l'RNasi A, la paraformaldeide (PFA), l'etanolo (EtOH) e il triton X-100 sono stati acquistati dalla ditta Sigma-Aldrich (Milano, Italia). Anche la neurotossina metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidro-piridina (MPTP), il manganese cloruro ($MnCl_2$), il cadmio cloruro ($CdCl_2$), la soluzione di acqua ossigenata (H_2O_2 , 30%) e l'antiossidante N-acetilcisteina (NAC) sono stati forniti dalla ditta Sigma-Aldrich (Milano, Italia). I kit ROS-ID[®] Total ROS Detection, LDH-Cytotoxicity Assay II e PE Annexin V Apoptosis Detection sono stati acquistati rispettivamente presso le ditte Enzo Life Sciences, BioVision e BD Pharmingen. La genisteina (GEN) è stata acquistata presso Farmalabor (Milano, Italia), la rodamina B isotiocianato (rhod-B), la quercetina (Q) e l'L-dopa (L) sono state acquistate dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia) mentre, la fluoresceina presso Fluka Analytical. L'insulina (Aspart, Novorapid Flexpen) è stata acquistata presso una locale farmacia e la pargilina è stata acquistata presso la ditta Sigma-Aldrich (Milano, Italia). La soluzione di tampone fosfato salino utilizzata per gli esperimenti di biosensoristica (contenente Ca^{2+} 0.68 mM, Mg^{2+} 0.49 mM, glucosio 1mM; PBS-glu; pH=7.4; filtrata 0.2 μ m) è stata preparata sciogliendo i rispettivi sali provenienti dalla ditta Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

Colture cellulari

Cellule PC12. La linea cellulare PC12 (ATCC CRL-1721), isolata da un feocromocitoma di ratto, rappresenta un ottimo modello per lo studio della differenziazione neuronale in quanto costituita da cellule dopaminergiche immortalizzate capaci di mimare le caratteristiche dominanti dei neuroni dopaminergici^{165,166}. Le cellule PC12 infatti sono caratterizzate dalla loro capacità di sintetizzare, secernere e metabolizzare il neurotrasmettitore dopamina¹⁶⁷. Il terreno di crescita completo utilizzato per la coltura è costituito da DMEM/F-12 addizionato con il 10% di HS, il 5% di FBS e l'1% della mix di antibiotici PEN/STREP. Il mantenimento della linea cellulare è avvenuto in piastre Petri da 100 mm di diametro alla temperatura di 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂.

Cellule Caco-2. La linea cellulare Caco-2 (ECACC UK), costituita da cellule epiteliali derivate da adenocarcinoma coloretale umano, è considerata un ottimo modello per gli studi di assorbimento e di trasporto dei farmaci attraverso la mucosa intestinale¹⁶⁸. Le cellule Caco-2 infatti differenziano in un monostrato di cellule polarizzate, caratterizzate da orletto a spazzola apicale, giunzioni serrate e resistenza elettrica elevata, esprimendo proprietà morfo-funzionali mimetiche dell'epitelio assorbente intestinale¹⁶⁹. La linea cellulare è stata propagata in fiasche T75 in DMEM addizionato con il 10% di FBS, l'1% della mix antibiotica PEN/STREP, l'1% di NEAA e l'1% di L-glutamina. Le cellule sono state coltivate in incubatore a 37°C al 5% CO₂.

Trattamenti eseguiti

Transferosomi per il trasporto del flavonoide genisteina (GEN-TFs). I sistemi di drug delivery basati su transferosomi contenenti il flavonoide genisteina (GEN-TFs) sono stati realizzati e forniti dal Dipartimento di Chimica e Farmacia dell'Università degli Studi di Sassari. I quattro drug delivery systems multilamellari si differenziano tra loro a seconda del tensioattivo costituente. I transferosomi fluorescenti GEN-TFs utilizzati in questo studio sono stati ottenuti aggiungendo la fluoresceina alle formulazioni e rispettando le stesse procedure preparative. Per valutare gli effetti dei sistemi di drug delivery, le cellule PC12 (12°-25° passaggio) sono state esposte al trattamento con GEN non legata ai transferosomi (30 μ M or 50 μ M) o GEN-TF1, -TF2, -TF3, -TF4 (30 μ M and 50 μ M) singolarmente o in associazione con H₂O₂ (75 μ M) per 24h⁹¹. Gli esperimenti, ripetuti in triplicato, sono stati effettuati in piastre da 24 pozzetti alla densità cellulare di 10⁵ cellule /pozzetto.

Transferosoma per il trasporto di quercetina ed L-dopa (TF2-QL). Le nanovesicole (TF2-QL) contenenti quercetina (Q) o quercetina solubile (Q_s) ed L-dopa (L) sono state realizzate dal Dipartimento di Chimica e Farmacia dell'Università degli Studi di Sassari. La linea cellulare PC12 (12°-25° passaggio) è stata esposta per 24h a concentrazioni crescenti di TF2-QL o TF2- Q_sL (0.6, 6, 16 e 32 μ M) singolarmente o in associazione con MPTP (0.5 mM), MnCl₂ (0.75 mM) o CdCl₂ (30 μ M). Gli esperimenti sono stati ripetuti in triplicato ed effettuati in piastre da 24 pozzetti seminando 10⁵ cellule/pozzetto.

Nanoparticelle a base di chitosano caricate con genisteina (NP-GEN). Le nanoparticelle a base di chitosano caricate con genisteina (NP-GEN) sono state fornite dal Dipartimento di Chimica e Farmacia dell'Università degli Studi di Sassari. Le cellule PC12 (passaggio 12°-25°) sono state trattate per 24h con due diverse serie di NP-GEN (NP1-GEN e NP2-GEN) preparate rispettivamente in acetone ed etanolo e contenenti genisteina (30 μ M). Le formulazioni contengono inoltre diverse concentrazioni di chitosano: NP1-13 μ g e NP2-26 μ g. La concentrazione di GEN

invece è sempre la stessa (30 μM). Gli esperimenti sono stati effettuati in triplicato seminando 10^5 cellule/pozzetto in piastre da 24 pozzetti.

Beta (β)-ciclodestrine. Le β -ciclodestrine (A-CD, monomero), (B-52, monomero), (C-93, polimero), (D-60, monomero), (E-73, polimero), (F-29, polimero) sono state fornite dal Dipartimento di Chimica e Farmacia dell'Università degli Studi di Sassari. In questo studio, le linee cellulari PC12 (12°-25° passaggio) e Caco-2 (20°-40° passaggio) sono state trattate per tempi di esposizione differenti (15', 30', 1h e 24h) con diverse concentrazioni di β -ciclodestrine (0.5, 1, 2.5, 5 e 10 μM). Tutti gli esperimenti sono stati effettuati in triplicato.

Metabolismo glucidico neuronale. Lo studio del metabolismo glucidico neuronale è stato effettuato, in triplicato, in cellule PC12 (12°-25° passaggio) seminate alla densità di 3×10^6 cellule in petri da 60 mm di diametro. All'inizio di ogni esperimento è stato effettuato un cambio del mezzo di coltura con PBS-glu contenente i trattamenti farmacologici insulina (0.5U/mL) o pargilina (1 μM) e dopo 30 minuti sono state rilevate le concentrazioni di glucosio e lattato nel surnatante. Dopo 30 minuti dal cambio del medium le cellule sono state esposte a MPTP 1 mM per 6h. Le misurazioni successive di glucosio e lattato sono state effettuate a 2, 5 e 6h dal trattamento con MPTP.

Metodi

Saggi di vitalità cellulare MTT e Trypan blue. Il saggio di vitalità MTT è stato effettuato utilizzando il 3- (4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), colorante solubile, convertito dalle ossido-reduttasi mitocondriali delle cellule metabolicamente attive in sali blu insolubili di formazano. Nel dettaglio, l'MTT (1mg/mL) è stato aggiunto ad ogni campione e incubato per 4 ore a 37°C. Allo scadere del tempo di incubazione, le cellule sono state lavate con PBS e centrifugate per 15 minuti. Successivamente, il pellet è stato dissolto in 2 mL di isopropanolo ed infine la densità ottica misurata alla lunghezza d'onda di 570 nm (Bauty Diagnostic Microplate Reader). Il saggio di vitalità Trypan blue è stato effettuato parallelamente al saggio MTT. Il Trypan blue (0.4%) è stato aggiunto ad ogni campione trattato al termine degli esperimenti al fine di valutare la capacità di esclusione del colorante da parte delle cellule vitali. La conta delle cellule vitali e non, è stata effettuata mediante camera di Burker. I risultati di entrambe le analisi sono stati riportati come percentuale (%) di cellule vitali rispetto al gruppo di controllo.

Saggio di citotossicità LDH. Il saggio di citotossicità LDH ha permesso la quantificazione dell'enzima lattato deidrogenasi (LDH) nel mezzo di coltura dei campioni relativi allo studio dei GEN-TFs. Il rilascio dell'enzima citoplasmatico nel medium riflette l'entità del danno membranale indotto e di conseguenza, i livelli di LDH risultano essere direttamente proporzionali alla % di cellule morte. Al termine dei trattamenti, la procedura sperimentale per la determinazione enzimatica è stata eseguita come descritto nel manuale di istruzioni "LDH-Cytotoxicity Assay Kit II (BioVision)". Alla fine degli esperimenti, il valore di assorbanza è stato rilevato alla lunghezza d'onda di 440 nm mediante il lettore Bauty Diagnostic. I dati ottenuti sono stati espressi come (%) di enzima LDH rilasciato nel mezzo di coltura rispetto al gruppo di controllo.

Uptake. Per valutare l'internalizzazione del sistema di drug delivery GEN-TF2, le cellule PC12 sono state seminate in piastre da 6 pozzetti (1.5×10^6 cellule/pozzetto)

ed esposte al trattamento con la formulazione fluorescente GEN-TF2 (30 μ M and 50 μ M). Dopo 24h di incubazione, le cellule sono state lavate 3 volte con PBS e risospese in DMEM/F12 contenente 0.25% w/w di Trypan blue¹⁷⁰. L'uptake della formulazione GEN-TF2 è stato valutato attraverso il citofluorimetro FACSCANTO (Becton & Dickinson, USA) ed i dati ottenuti analizzati mediante il software DIVA 6.3 (BD Bioscience).

Quantificazione dei ROS intracellulari. Il contenuto intracellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS) è stato valutato mediante il kit ROS-ID® Total ROS Detection (Enzo Life Sciences). Le cellule PC12 seminate in piastre da 6 pozzetti (1.5x10⁶ cellule/pozzetto) sono state esposte per 24h a perossido di idrogeno (75 μ M) singolarmente o in presenza della formulazione GEN-TF2 (30 μ M). Successivamente, le cellule sono state lavate con Wash Buffer e incubate con la soluzione ROS Detection (Oxidative Stress Detection Reagent, carboxy-H2DCFDA, in Wash Buffer) per 30 minuti a 37°C al buio. La produzione intracellulare di ROS è stata quantificata mediante citofluorimetro FACSCANTO (Becton & Dickinson, USA) alla lunghezza d'onda Ex/Em: 490/525 nm.

Ciclo cellulare. Questa analisi è stata effettuata per lo studio degli effetti di GEN-TF2 sulle fasi del ciclo cellulare di cellule PC12 esposte a danno ossidativo. Le cellule PC12 seminate in piastra da 6 pozzetti alla densità di 1.5 x 10⁶ cellule/pozzetto sono state esposte al trattamento con GEN-TF2 (30 μ M) e H₂O₂ (75 μ M) per 24h. Dopo il trattamento le cellule sono lavate due volte con PBS e, successivamente fissate in EtOH 70%, trattate con RNasi A (10 μ g/ml) ed infine marcate con ioduro di propidio (100 μ g/ml) al buio per 30 minuti. L'analisi citometrica è stata effettuata mediante FACSCANTO (Becton & Dickinson, USA) e, l'analisi dei dati attraverso il software DIVA 6.3 (BD Bioscience).

Apoptosi. Lo studio dell'apoptosi è stato effettuato mediante il kit PE Annexin V Apoptosis Detection (BD Pharmingen) al fine di valutare gli effetti della formulazione GEN-TF2 sulla linea cellulare PC12 esposta a stress ossidativo. La colorazione con l'annexina V è tipicamente utilizzata in combinazione alla

colorazione vitale 7-ammino-actinomicina (7-AAD) per distinguere le cellule vitali da quelle apoptotiche (precoci e/o tardive) e da quelle necrotiche. Dopo il trattamento per 24h delle cellule PC12 con GEN-TF2 (30 μ M) e H₂O₂ (75 μ M), i campioni sono stati lavati con Annexin V binding buffer e incubati con Annexin V-PE/7-AAD per 15 minuti al buio a RT (20-25°C). L'analisi citometrica è stata effettuata attraverso lo strumento FACSCANTO (Becton & Dickinson, USA) e i dati analizzati mediante il software DIVA 6.3 (BD Bioscience).

Microscopia confocale. L'internalizzazione delle β -ciclodestrine è stata valutata in cellule Caco-2 piastrate su vetrini coprioggetto alla densità di 2×10^5 cellule/mL/pozzetto. Le cellule sono state esposte per 30 minuti al trattamento con le β -ciclodestrine fluorescenti A-CD, B-52 e C-93 (5 μ M) e successivamente lavate in PBS e fissate in 4% PFA. La colorazione nucleare è stata effettuata con DAPI (2 μ g/ml) in PBS tween 0.05% per 15 minuti al buio e, al termine dell'incubazione i campioni sono stati lavati in PBS e sigillati sul vetrino portaoggetto. L'osservazione dei preparati è stata effettuata attraverso un microscopio confocale laser-scanning (rodamina B isotiocianato Ex: 568 nm HeNe laser/Em: 623 nm) equipaggiato con obiettivo ad immersione Apochromatic 63x DIC oil (NA1.4) (LSM710; Zeiss, Oberkochen, Germania). Le immagini sono state analizzate mediante il software Zen2008 Light Edition (Zeiss, Oberkochen, Germania).

Valutazione della fluorescenza intracellulare. Questa tecnica è stata impiegata per valutare il segnale delle β -ciclodestrine fluorescenti proveniente dal compartimento intracellulare di cellule Caco-2. Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti con fondo nero alla densità di 2.5×10^4 cellule/pozzetto ed esposte al trattamento con A-CD, B-52 e C93 (5 μ M), dissolte in HBSS, per 15', 30' e 1h. Al termine dell'incubazione, le cellule sono state lavate quattro volte con HBSS e successivamente lisate con Triton X-100 all'1% al fine di ottenere il rilascio totale del contenuto intracellulare. L'intensità di fluorescenza è stata misurata servendosi del lettore di micropiastre SpectraMax i3x (molecular devices, USA) (rodamina B isotiocianato Ex: 568 nm/Em: 623 nm).

Quantificazione della permeabilità transepiteliale. Questa metodica è stata messa a punto ed ottimizzata con lo scopo di studiare la permeabilità transepiteliale delle β -ciclodestrine fluorescenti. Le cellule Caco-2 sono state seminate alla densità di 2×10^5 cellule/0.5 mL nel compartimento apicale di inserti transwell per piastre da 12 pozzetti pretrattati con collagene (porosità: $0.4 \mu\text{m}$, area: 1.12 cm^2). Il compartimento basolaterale dei pozzetti è stato riempito con 1.5 mL di medium completo. Le cellule sono state coltivate per 21 giorni a 37°C e $5\% \text{ CO}_2$, effettuando regolarmente (2 volte a settimana) cambi del mezzo di coltura nei compartimenti apicali e basolaterali dei transwell per ottenere un monostrato cellulare differenziato. L'integrità e lo sviluppo del monostrato cellulari è stato monitorato misurando la resistenza elettrica transepiteliale (TEER, espressa in $\Omega \text{ cm}^{-2}$) attraverso lo strumento EVOM Meter, World Precision Instruments, Inc. USA. Il monostrato cellulare di Caco-2 è stato considerato idoneo ai fini sperimentali al raggiungimento del valore di TEER maggiore a $700 \Omega \text{ cm}^{-2}$. Prima di effettuare i trattamenti, ogni singolo monostrato è stato lavato due volte con PBS, pre-incubato con HBSS per 20 minuti ed esposto ai trattamenti con le β -ciclodestrine fluorescenti A-CD, B-52 e C-93 ($5 \mu\text{M}$) dissolte in HBSS per 15', 30' e 1h a 37°C ¹⁷¹. Al termine dei tempi di incubazione, sono stati prelevati i campioni provenienti dal compartimento basolaterale per ciascun trattamento e ciascun monostrato cellulare nel compartimento apicale è stato lavato quattro volte con HBSS e lisato con Triton X-100 all'1%. Tutti i campioni sono stati caricati ed analizzati in piastre da 96 pozzetti con fondo nero e la quantificazione dell'intensità di fluorescenza è stata effettuata attraverso il lettore di micropiastre SpectraMax i3x (molecular devices, USA) (rodamina B isotiocianato Ex: 568 nm /Em: 623 nm). I valori ottenuti sono stati utilizzati per caratterizzare le singole β -ciclodestrine fluorescenti in base alla loro capacità di permeazione dal compartimento apicale a quello basolaterale; di seguito è stata riportata la formula per il calcolo dei coefficienti di permeabilità apparente:

$$P_{app} = (dQ/dt) \times (1/C_0 \times A)$$

(P_{app} : coefficiente di permeabilità apparente (cm/s); dQ/dt : velocità di permeabilità delle β -ciclodestrine (mol/s); C_0 : concentrazione iniziale delle β -ciclodestrine nel compartimento apicale (mol/ml); A : superficie di membrana dell'inserto (cm²).

Analisi di glucosio e lattato su cellule PC12. La costruzione dei biosensori per il glucosio e il lattato è stata effettuata secondo la metodica descritta in letteratura¹⁷². Le cellule PC12 (12°-25° passaggio) sono state trattate con pargilina (1 μ M), insulina (0.5 U/mL) e MPTP (1 mM) singolarmente o in co-somministrazione. I campioni di surnatante prelevati dalle colture, venivano iniettati in un micropozzetto (250 μ L) e il glucosio ed il lattato quantificati con l'ausilio dei biosensori. Tutti gli esperimenti sono stati riprodotti in triplicato ed effettuati in piastre Petri da 30 mm di diametro seminando le cellule ad una densità di 3×10^6 cellule/4mL medium/petri. Il surnatante di ogni campione è stato analizzato con i biosensori per il glucosio e per il lattato a 30', 120' e 300' di trattamento e, le correnti risultanti (nA) sono state poi convertite in concentrazioni (mM/L).

Analisi statistica. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato e i valori sono stati espressi come medie \pm gli errori standard con intervallo di confidenza del 95% ($p < 0.05$). Le differenze statistiche tra i campioni controllo e i diversi gruppi sperimentali sono state valutate utilizzando l'analisi One-Way ANOVA seguita da Newman-Keuls *post-hoc* test (unpaired t-test per le differenze tra gruppi) e *paired* t-test per le differenze all'interno del singolo gruppo mediante il software Graph-Pad Prism versione 5.0 (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, USA).

Risultati

Risultati dei sistemi di drug delivery GEN-TFs

Il saggio di vitalità cellulare MTT è stato utilizzato al fine di testare l'eventuale citotossicità dei sistemi di drug delivery GEN-TFs nelle cellule PC12. Come mostrato nella figura 12, l'esposizione per 24h alle formulazioni GEN-TF1, -TF2 e -TF4 (30 μ M) non ha indotto una riduzione significativa della vitalità cellulare rispetto al valore di controllo (rispettivamente 98%, 99% e 97%). Al contrario, la formulazione GEN-TF3 è risultata essere citotossica anche a concentrazioni di trattamento inferiori (dati non mostrati). Inoltre tutti i sistemi di drug delivery alla concentrazione di 50 μ M hanno indotto significative riduzioni della vitalità cellulare rispetto al controllo.

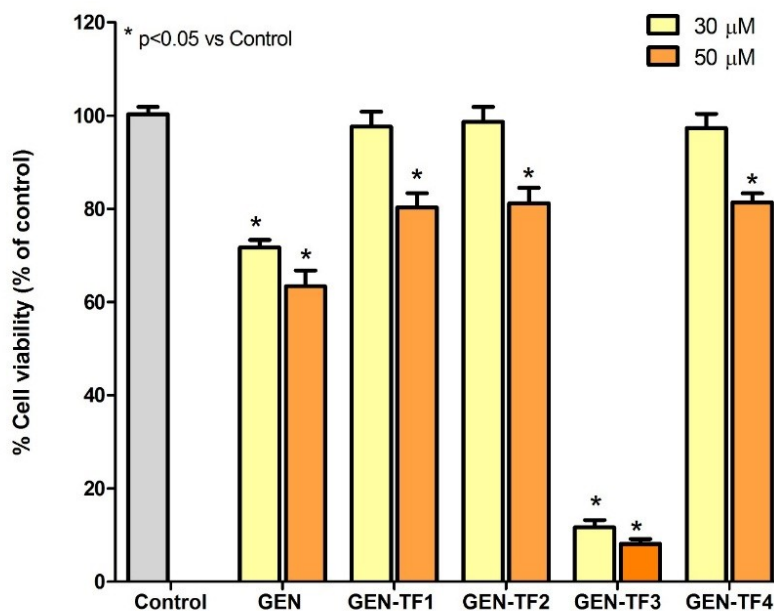


Figura 12. Screening delle formulazioni GEN-TFs in cellule PC12. L'analisi MTT è stata effettuata su cellule PC12 dopo 24h di esposizione a GEN-TF1, -TF2, -TF3 e -TF4 (30 μ M and 50 μ M). (* p <0.05 vs Control).

Successivamente, l'effetto dei GEN-TFs (30 μ M), eccetto GEN-TF3, è stato valutato in un modello di stress ossidativo indotto con perossido di idrogeno (75 μ M) in cellule PC12. Come mostrato nella figura 13a, il danno cellulare generato dal trattamento con H₂O₂ (40%) è stato attenuato in maniera significativa dalle formulazioni GEN-TF1 e GEN-TF2 (rispettivamente del 17% e del 21%), mentre GEN

non legata ai transferosomi (30 μM) e GEN-TF4 non hanno mostrato alcun effetto protettivo. Questi risultati sono stati confermati dal saggio di vitalità Trypan blue effettuato nelle stesse condizioni sperimentali (figura 13b). Sulla base dei dati ottenuti, gli esperimenti successivi sono stati effettuati utilizzando la formulazione GEN-TF2 (30 μM).

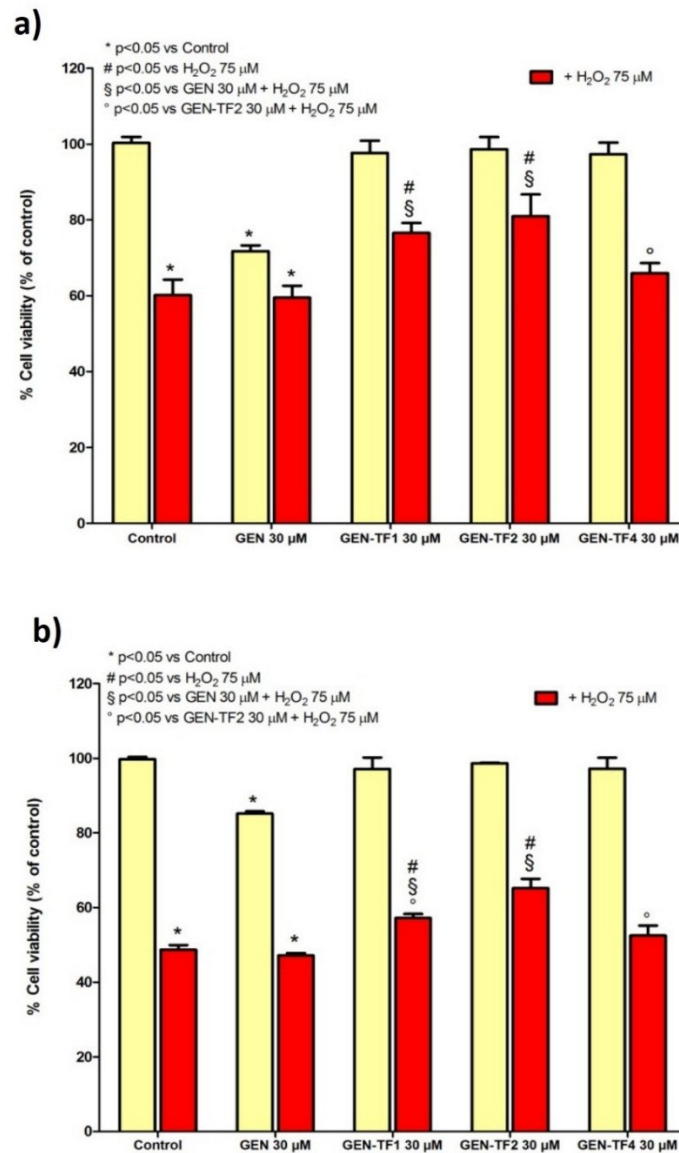


Figura 13. Effetti di GEN-TF1, -TF2 e -TF4 sulla vitalità di cellule PC12 esposte a perossido di idrogeno. Il saggio di vitalità MTT (a) e l'analisi Trypan blue (b) sono stati effettuati su cellule PC12 esposte per 24h alle formulazioni GEN-TF1, -TF2, -TF4 (30 μM) singolarmente o in presenza di H₂O₂ (75 μM). (*p < 0.05 vs Control) (#p < 0.05 vs H₂O₂ 75 μM) (§p < 0.05 vs GEN 30 μM + H₂O₂ 75 μM) (°p < 0.05 vs GEN-TF2 30 μM + H₂O₂ 75 μM).

Sulla formulazione indicata è stato effettuato un ulteriore saggio basato sulla valutazione dei livelli di lattato deidrogenasi (LDH), indice di tossicità cellulare, al fine di investigare ulteriormente sugli effetti protettivi della formulazione GEN-TF2. In presenza di solo perossido di idrogeno (75 μM) i livelli extracellulari dell'enzima LDH sono aumentati del 44% rispetto ai valori di controllo (figura 14), valori che vengono ridotti significativamente (del 20%) in presenza di GEN-TF2 (30 μM).

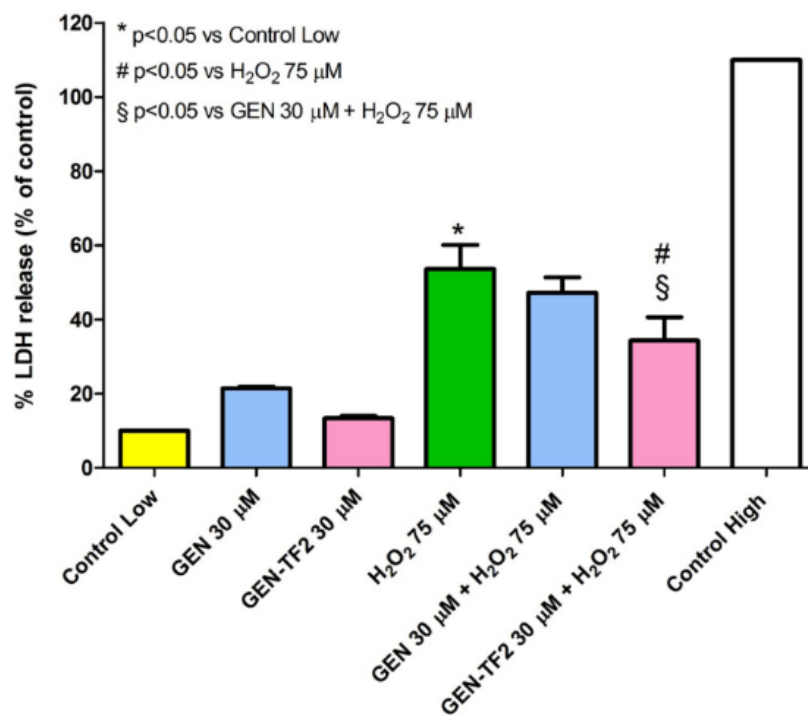


Figura 14. Effetto di GEN-TF2 (30 μM) sul rilascio di LDH in cellule PC12 trattate con H₂O₂ (75 μM) dopo 24h di esposizione. I risultati sono stati indicati come rilascio % di LDH. (*p < 0.05 vs Control) (#p < 0.05 vs H₂O₂ 75 μM) (§p < 0.05 vs GEN 30 μM + H₂O₂ 75 μM).

Al fine di analizzare la quota di internalizzazione della formulazione fluorescente di GEN-TF2 (30 μM) in cellule PC12 è stata effettuata l'analisi di citometria a flusso. La quantità di GEN-TF2 all'interno della cellula è stata indicata come percentuale (%) di cellule fluorescenti. Come mostrato nella figura 15, l'uptake di GEN-TF2 (37%) a 24h è risultato significativamente maggiore rispetto all'uptake osservato per la

genisteina non legata al transferosoma (GEN) (7%) a parità di concentrazione e tempo di esposizione. I risultati mostrano, inoltre, come l'internalizzazione del sistema GEN-TF2 abbia presentato un andamento dose-dipendente.

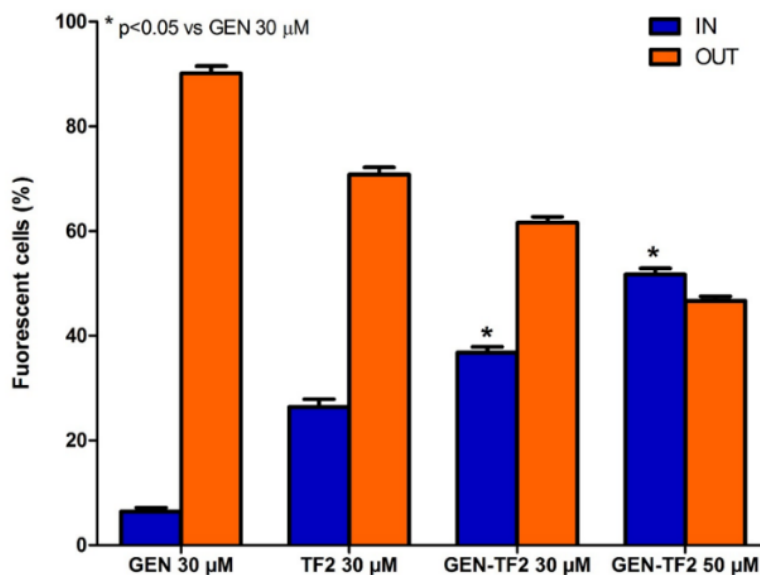


Figura 15. Uptake del sistema fluorescente GEN-TF2 (30 μM e 50 μM) studiato mediante citometria a flusso. La percentuale (%) di cellule fluorescenti è rappresentata come funzione di formulazione fluorescente GEN-TF2 internalizzata dopo 24h di esposizione al trattamento. (* $p<0.05$ vs GEN 30 μM).

Con lo scopo di valutare le proprietà antiossidanti di GEN-TF2 è stata quantificata la produzione di ROS intracellulari attraverso l'utilizzo del citofluorimetro. La quantità di specie reattive dell'ossigeno rilevata è risultata essere direttamente proporzionale all'intensità di fluorescenza emessa. Come evidente nella figura 16, il danno ossidativo indotto dal perossido di idrogeno (37%) è stato significativamente attenuato dalla formulazione GEN-TF2 (6%). Al contrario, la genisteina non legata al transferosoma (GEN) non ha mostrato alcuna capacità antiossidante e anzi, ha incrementato ulteriormente il danno generato dall' H_2O_2 (55%).

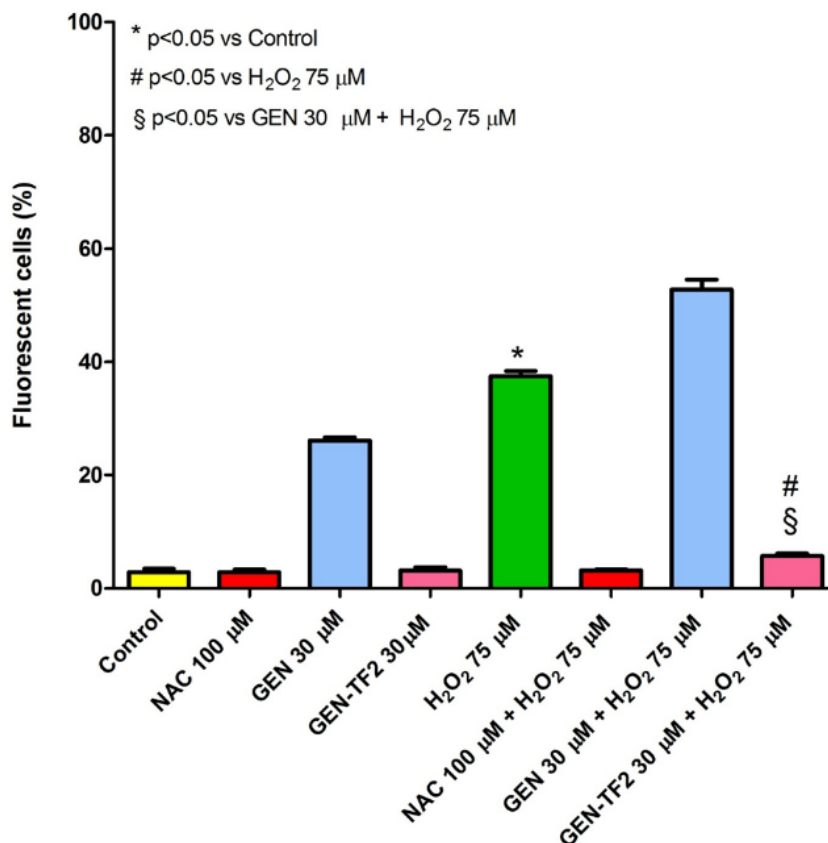


Figura 16. Produzione di ROS in cellule PC12 esposte per 24h a perossido di idrogeno (75 μM) in presenza di GEN-TF2 (30 μM). Percentuale (%) di cellule fluorescenti come funzione della produzione di ROS. (*p < 0.05 vs Control) (#p < 0.05 vs H₂O₂ 75 μM) (§p < 0.05 vs GEN 30 μM + H₂O₂ 75 μM).

Per investigare ulteriormente l'attività del sistema di drug delivery GEN-TF2 è stata effettuata l'analisi del ciclo cellulare. Lo studio è stato condotto mediante citometria a flusso. La figura 17 ha mostrato un incremento degli eventi in fase G2/M in seguito al trattamento con il solo perossido di idrogeno (31%) e con il perossido di idrogeno in associazione con GEN (30%), se paragonato al valore di controllo (10%). In presenza di GEN-TF2 e perossido di idrogeno, invece, la fase G2/M (12%) risulta paragonabile al gruppo di controllo.

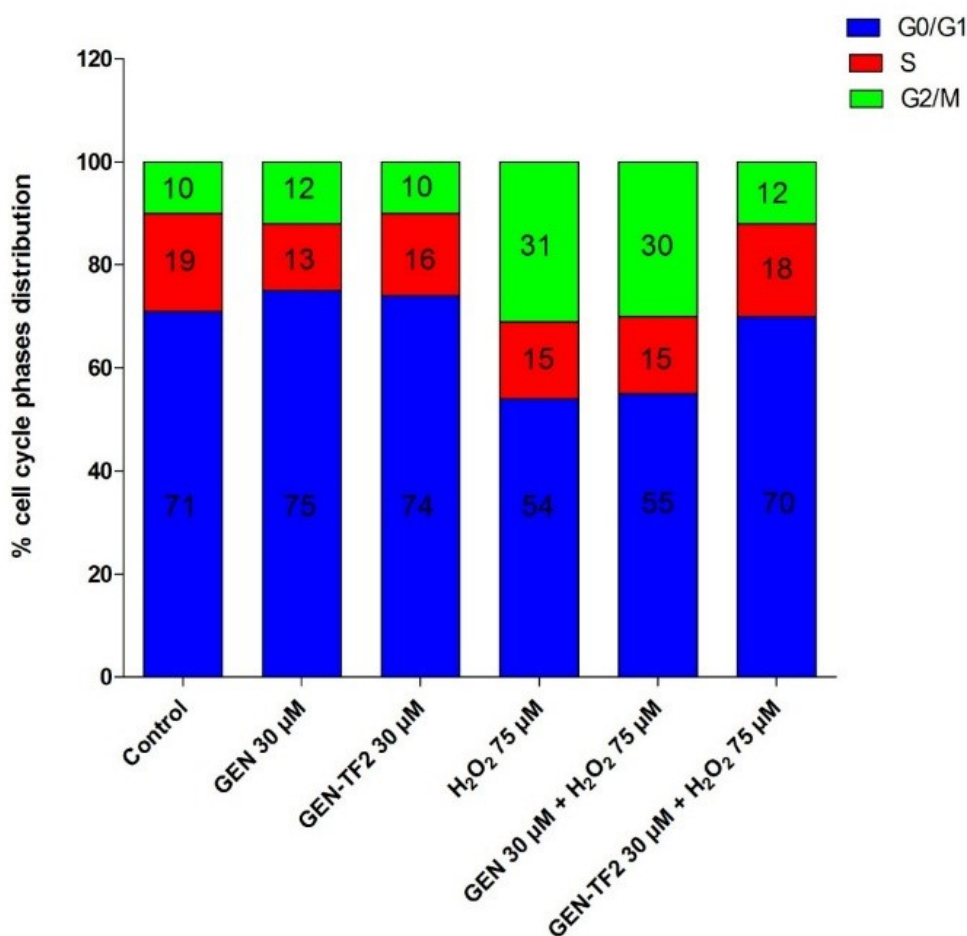


Figura 17. Analisi del ciclo cellulare di cellule PC12 dopo 24h di esposizione a H₂O₂ (75 µM) e GEN-TF2 (30 µM). Istogrammi rappresentativi della distribuzione degli eventi nelle diverse fasi del ciclo cellulare ottenuta mediante citofluorimetro.

Nella figura 18 è riportata l'analisi citometrica che ha permesso di individuare il potenziale effetto anti-apoptotico della formulazione in studio GEN-TF2. L'apoptosi totale indotta dal trattamento con perossido di idrogeno (40%) è stata significativamente ridotta dalla presenza di GEN-TF2 (9%). La formulazione ha riportato a valori di apoptosi simili al gruppo di controllo (7%). Un effetto anti-apoptotico minore rispetto a GENTF2 è stato riscontrato anche per GEN (18%).

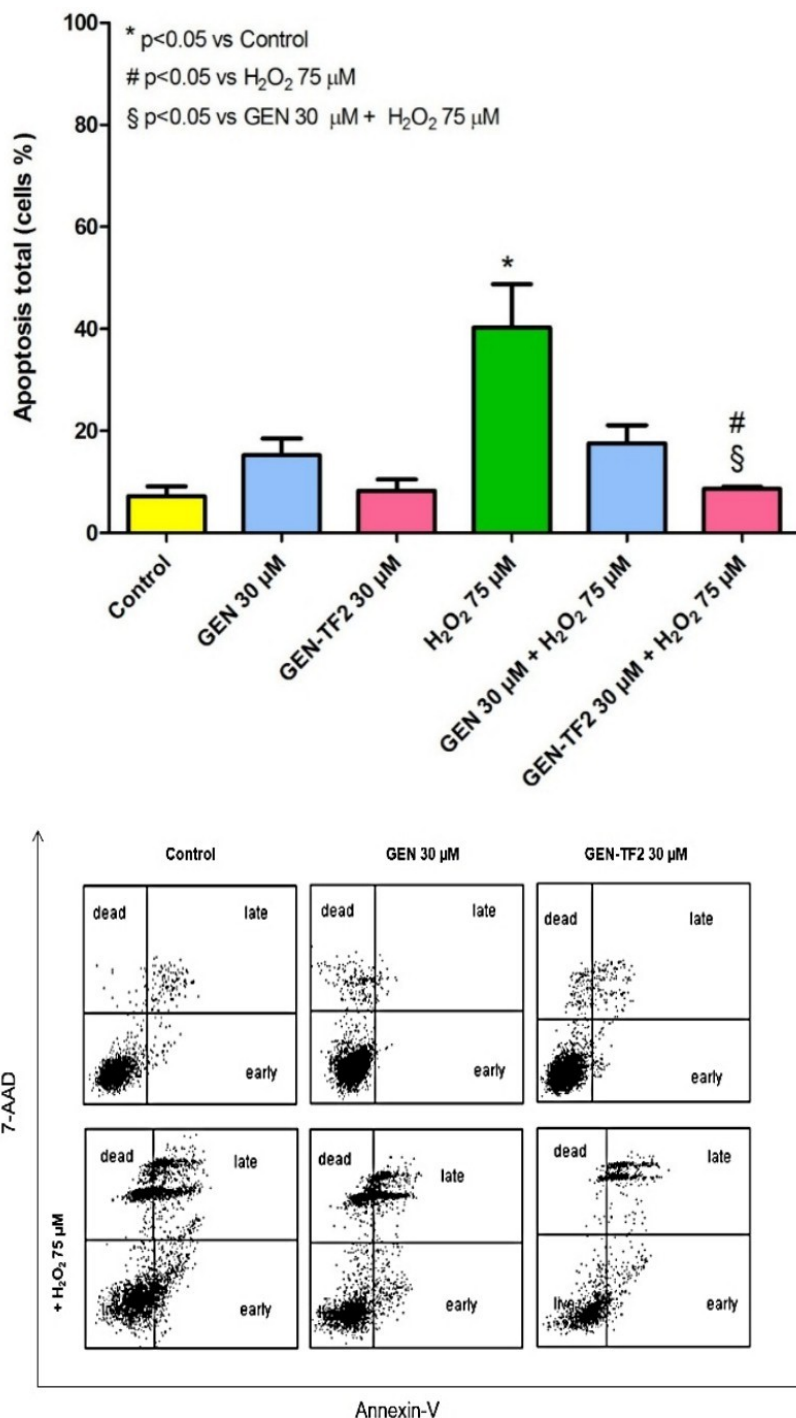


Figura 18. Valutazione dei livelli di apoptosi in cellule PC12 esposte per 24h a perossido di idrogeno (75 μM) e GEN-TF2 (30 μM). Percentuale (%) di apoptosi totale % in cellule PC12, misurata mediante citofluorimetro. (* $p < 0.05$ vs Control) (# $p < 0.05$ vs H₂O₂ 75 μM) (§ $p < 0.05$ vs GEN 30 μM + H₂O₂ 75 μM).

In supporto ai dati ottenuti sono stati riportati i risultati della fluorescenza nucleare di cellule PC12 esposte per 24h a perossido di idrogeno (75 μ M) e GEN-TF2 (30 μ M). Nella figura 19, è stata mostrata la capacità di GEN-TF2 (C) di proteggere l'integrità nucleare delle cellule PC12 dal danno indotto dall'acqua ossigenata (B).

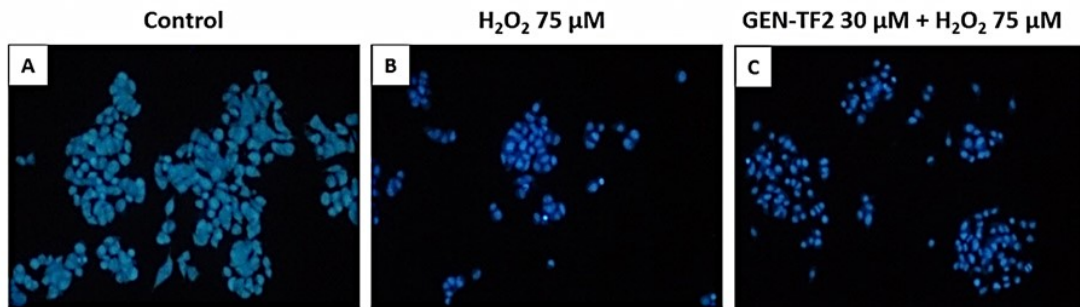


Figura 19. Microscopia a fluorescenza (Hoechst 33342) di cellule PC12 esposte a GEN-TF2 (30 μ M) e H₂O₂ (75 μ M) per 24h. A: Control; B: H₂O₂ (75 μ M); C: GEN-TF2 (30 μ M) + (H₂O₂ 75 μ M).

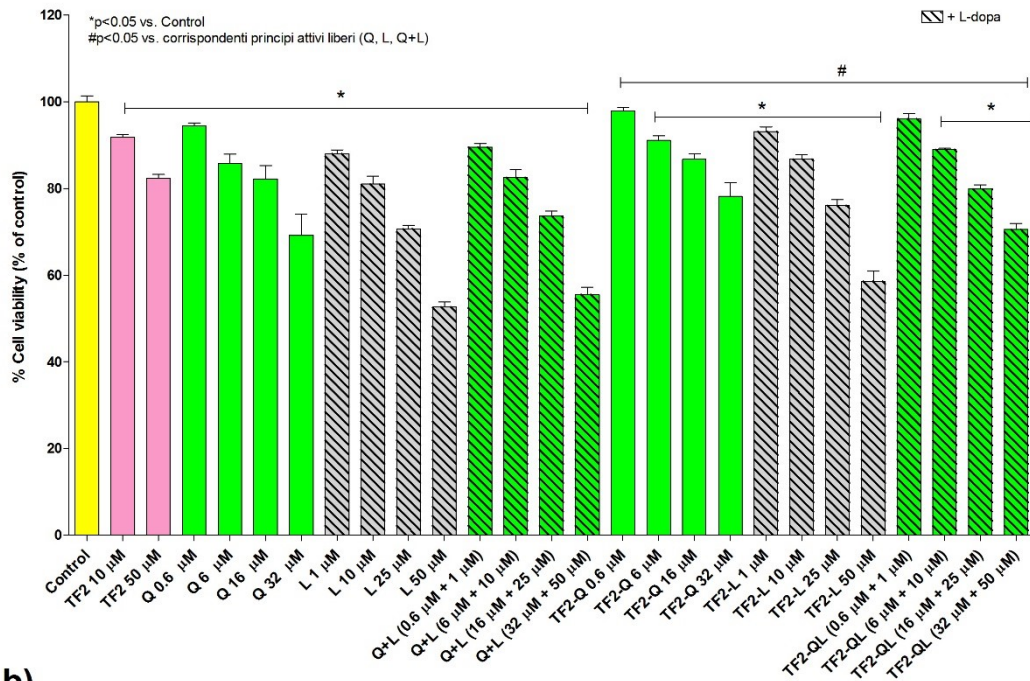
Risultati dei sistemi di drug delivery TF2-QL

L'analisi MTT ha permesso di valutare l'eventuale tossicità dei sistemi di drug delivery TF2-QL, contenenti la quercetina in forma solubile e non, in cellule PC12 dopo 24h di esposizione. Come visibile nella figura 20a, i trattamenti effettuati con i transferosomi TF2-Q, TF2-L, e con la formulazione TF2-QL hanno mostrato minore citotossicità rispetto ai corrispondenti principi attivi liberi Q, L e Q+L a parità di concentrazione. In particolare, l'esposizione alle più basse concentrazioni del transferosoma TF2-Q (0.6 μ M) e alla formulazione TF2-QL (0.6 μ M + 1 μ M) non ha indotto riduzioni significative della vitalità cellulare. Tutti i trattamenti hanno comunque mostrato un aumento della mortalità cellulare dose-dipendente.

Nella figura 20b, sono invece riportati i risultati relativi alla formulazione contenente la quercetina in forma solubile (Q_s). L'esposizione ai transferosomi TF2- Q_s , TF2-L e alla formulazione TF2- Q_s L non ha indotto riduzioni della vitalità cellulare rispetto ai corrispondenti principi attivi liberi Q_s , L e Q_s +L a parità di concentrazione. Anche in questo caso il trattamento con il transferosoma TF2- Q_s (0.6 μ M) e con la formulazione TF2- Q_s L (0.6 μ M + 1 μ M) non ha indotto variazioni nella vitalità cellulare. L'esposizione a concentrazioni più alte dei trattamenti ha determinato comunque un aumento dell'effetto citotossico dose-dipendente.

Sulla base dei dati ottenuti dallo screening si è scelto di proseguire utilizzando le concentrazioni di trattamento più basse: TF2-Q e TF2- Q_s (0.6 μ M), TF2-L (1 μ M) e TF2-QL e TF2- Q_s L (0.6 μ M + 1 μ M).

a)



b)

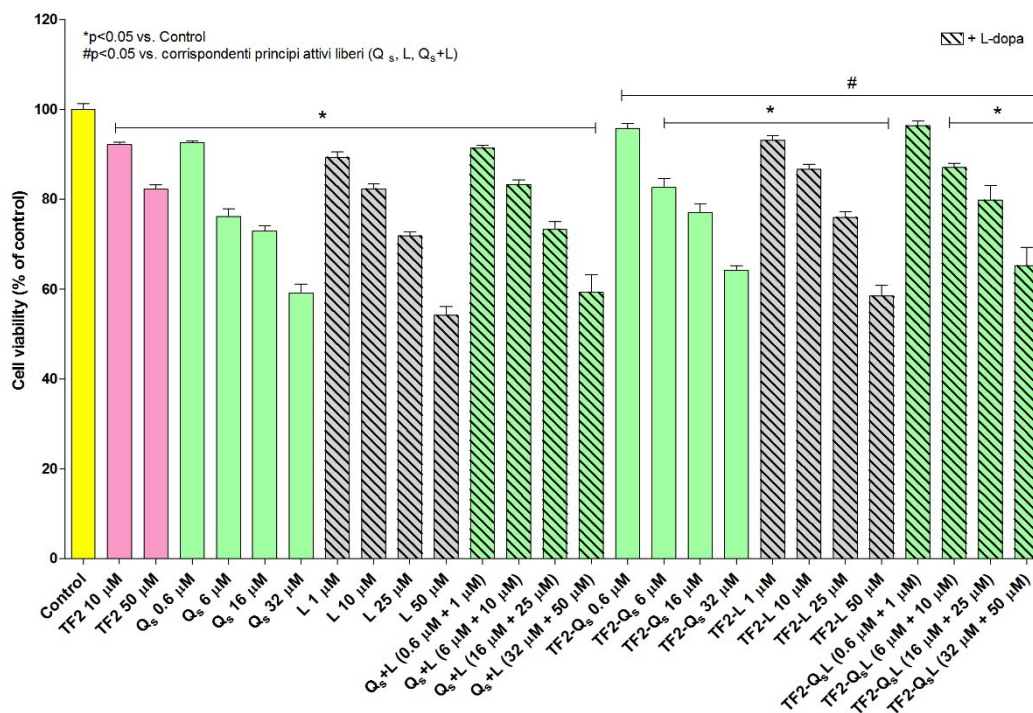


Figura 20. Screening dei sistemi di drug delivery TF2-QL in cellule PC12. L'analisi MTT è stata effettuata su cellule PC12 trattate per 24h con concentrazioni crescenti di Q, L, Q+L, TF2-Q, TF2-L e TF2-QL (a) e, Q_s, L, Q_s + L, TF2-Q_s, TF2-L e TF2-Q_sL (b). (*p<0.05 vs Control) (#p<0.05 vs corrispondenti principi attivi liberi).

L'effetto dei TF2-QL e TF2-Q_SL (0.6 μ M + 1 μ M) è stato successivamente valutato in cellule PC12 esposte per 24h a MPTP (0.5 mM), MnCl₂ (0.75 mM) e CdCl₂ (30 μ M). Come mostrato nella figura 21, il danno cellulare indotto dal trattamento con MPTP (37%) è stato attenuato significativamente dai transferosomi contenenti entrambi i principi attivi TF2-QL e TF2-Q_SL (rispettivamente del 19% e 14%). La formulazione TF2-QL ha mostrato maggiore capacità protettiva rispetto a TF2-Q_SL.

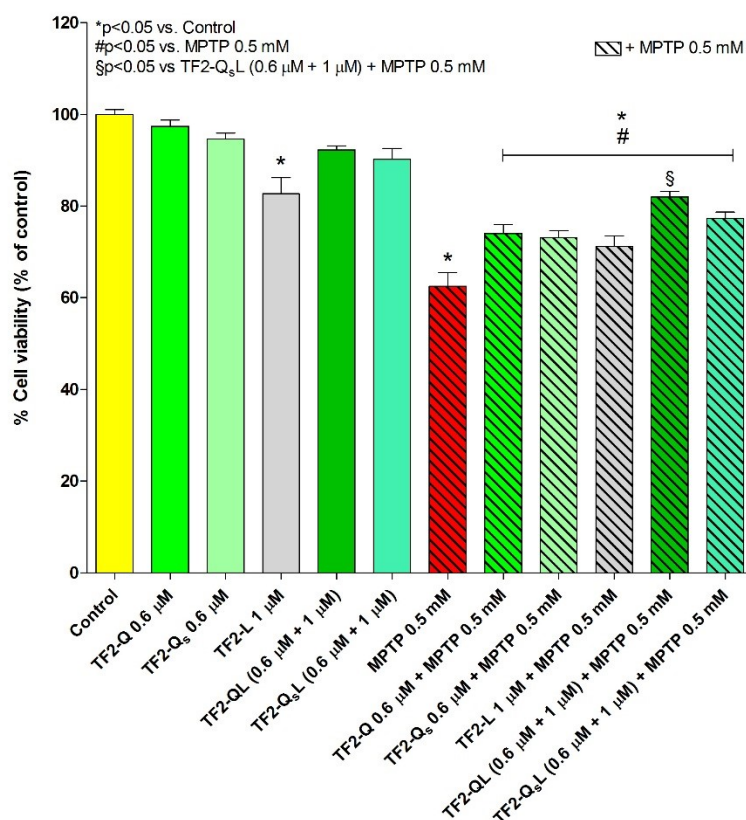


Figura 21. Effetti dei TF2-QL sulla vitalità di cellule PC12 esposte alla neurotossina MPTP. Il saggio di vitalità MTT è stato effettuato su cellule PC12 esposte per 24h alle formulazioni TF2-QL (0.6 μ M + 1 μ M) singolarmente o in presenza di MPTP (0.5 mM). (* p < 0.05 vs Control) (# p < 0.05 vs MPTP 0.5 mM) (§ p < 0.05 vs TF2-Q_SL (0.6 μ M + 1 μ M) + MPTP 0.5 mM).

Nessuna delle formulazioni TF2-QL ha invece mostrato effetti protettivi sul danno indotto dal manganese (figura 22a) e cadmio cloruro (figura 22b).

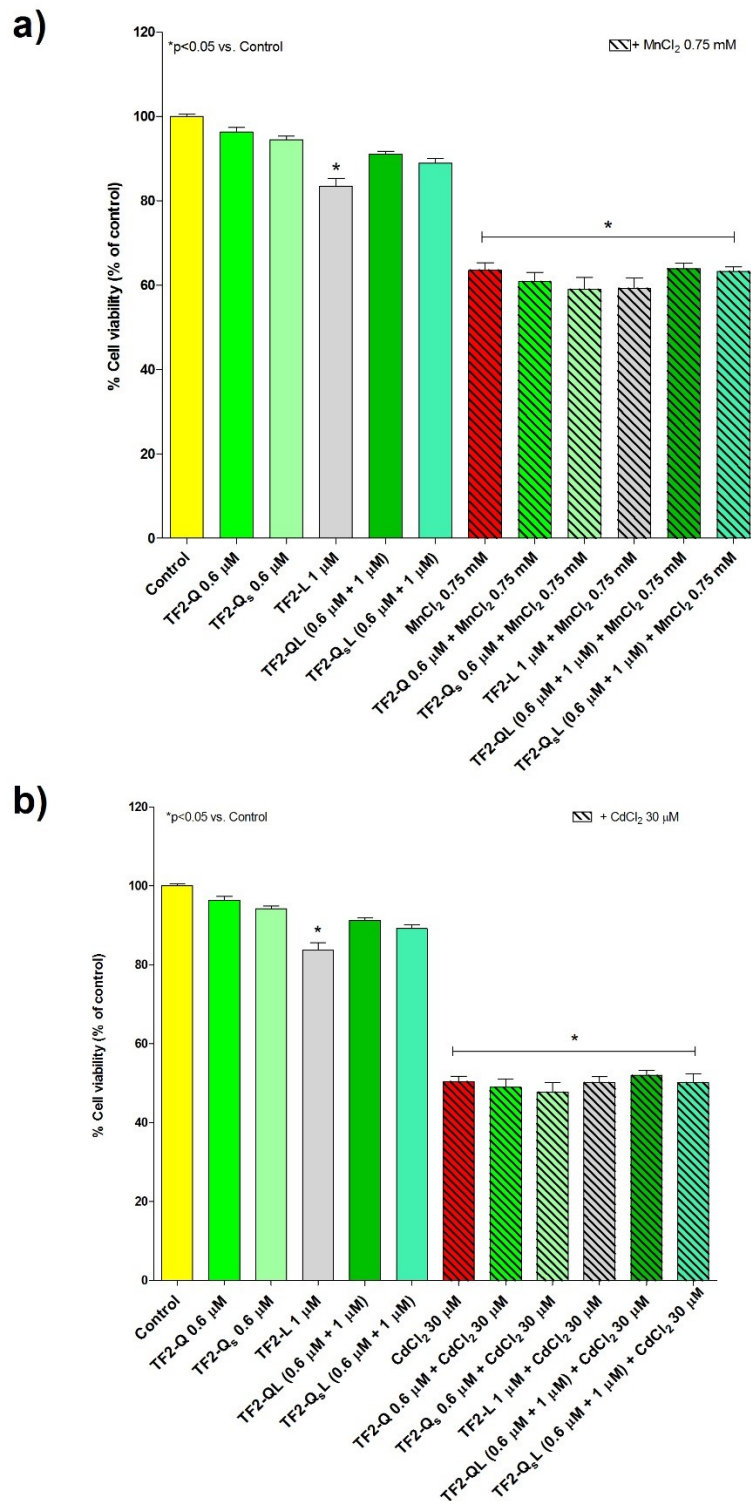


Figura 22. Effetti dei TF2-QL sulla vitalità di cellule PC12 esposte a manganese e cadmio cloruro. Il saggio di vitalità MTT è stato effettuato su cellule PC12 esposte per 24h alle formulazioni TF2-QL (0.6 μ M + 1 μ M) singolarmente o in presenza di MnCl₂ (0.75 mM) **(a)** o di CdCl₂ (30 μ M) **(b)**. (* $p < 0.05$ vs Control).

Risultati delle nanoparticelle a base di chitosano NP-GEN

Le due diverse formulazioni di chitosano NP1 and NP2, preparate rispettivamente in acetone ed etanolo e contenenti due diverse quantità di chitosano, sono state testate come tali o contenenti genisteina (GEN 30 μ M) in cellule PC12 per 24h. I risultati ottenuti mediante MTT assay (figura 23) non hanno mostrato variazioni nella vitalità cellulare dei campioni trattati con le formulazioni NP1-13 μ g, NP1-13 μ g (GEN), NP2-26 μ g, NP2-26 μ g (GEN) rispetto al gruppo di controllo.

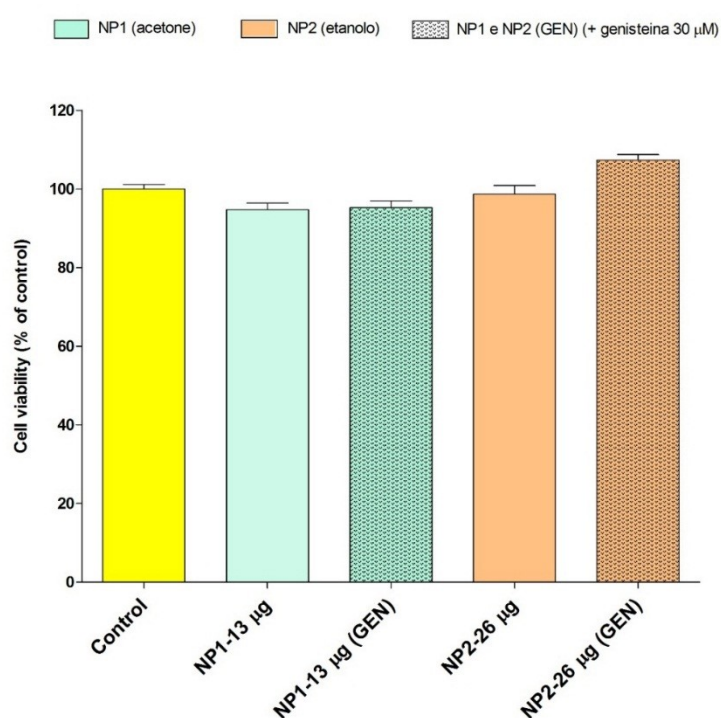


Figura 23. Effetti di due diverse serie di nanoparticelle a base di chitosano contenenti genisteina (NP1-GEN e NP2-GEN) sulla vitalità di cellule PC12. L'analisi MTT è stata effettuata su cellule PC12 esposte per 24h alle formulazioni NP1-13 μ g e NP2-26 μ g contenenti o meno genisteina 30 μ M (GEN).

Il saggio Trypan blue ha confermato i dati ottenuti mediante l'MTT. Come visibile nella figura 24 le nanoparticelle di chitosano (NP1 e NP2, testate come tali o

contenenti GEN) non hanno indotto alcun effetto citotossico sulla vitalità cellulare delle PC12.

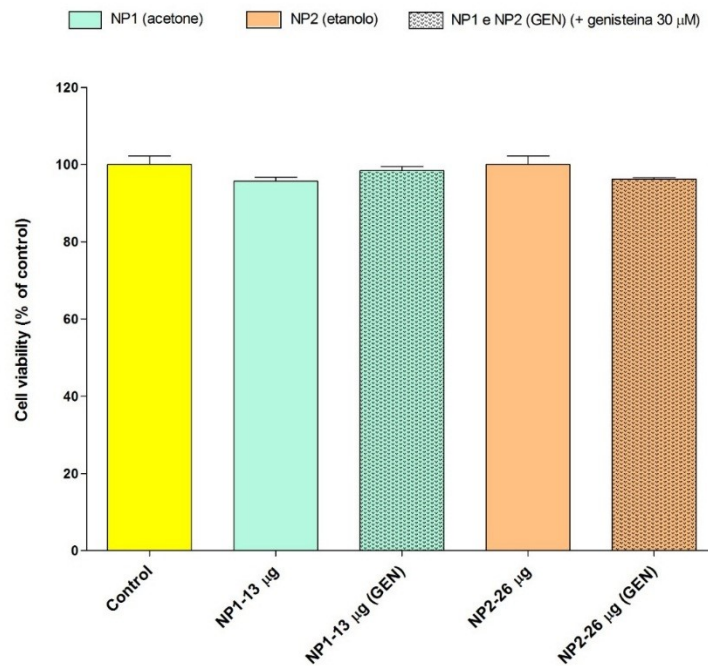


Figura 24. Effetti di due diverse serie di nanoparticelle a base di chitosano contenenti genisteina (NP1-GEN e NP2-GEN) sulla vitalità di cellule PC12. L'analisi Trypan blue è stata effettuata su cellule PC12 esposte per 24h alle formulazioni NP1-13 µg e NP2-26 µg contenenti o meno genisteina 30 µM (GEN).

Risultati delle β -ciclodestrine

Il saggio MTT è stato eseguito per valutare gli effetti di diverse β -ciclodestrine a concentrazioni crescenti (0.5, 1, 2.5, 5 e 10 μ M) e per tempi di esposizione differenti (15', 30', 1h e 24h) in cellule PC12 (figura 25a e 25b) e Caco-2 (figura 26a e 26b). Come visibile dalle figure 25a, 25b, 26a e 26b tutte le β -ciclodestrine hanno indotto una riduzione della vitalità in entrambe le linee cellulari proporzionale all'aumentare della concentrazione entro le 24h.

a)

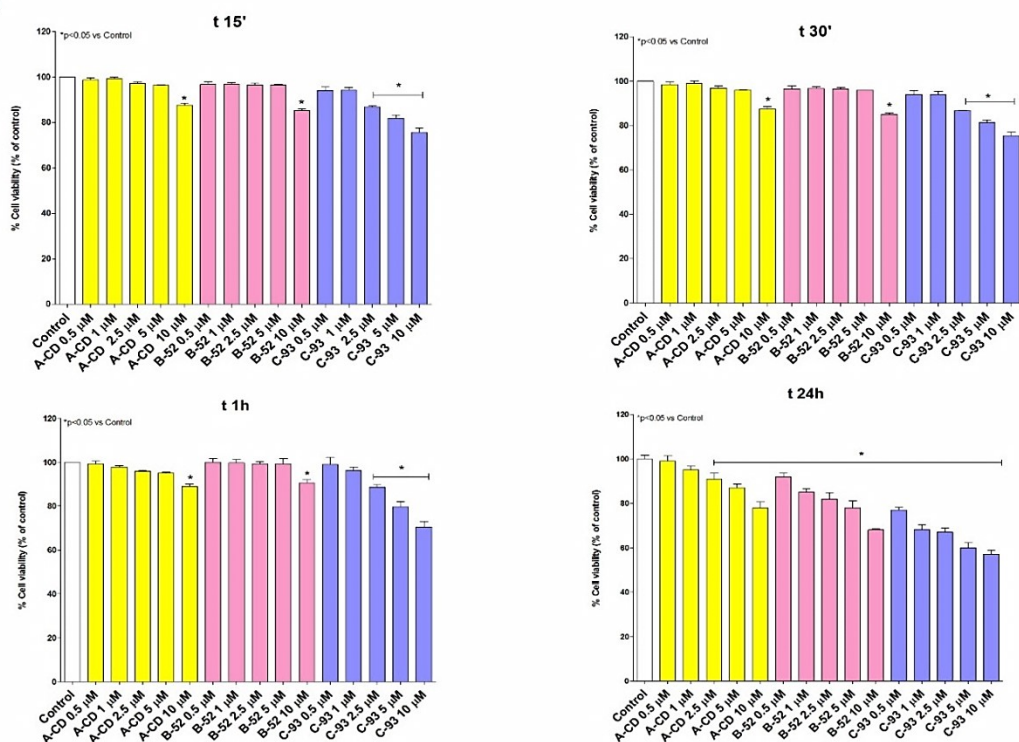


Figura 25a. Effetti di diverse concentrazioni di β -ciclodestrine in cellule PC12 a tempi di esposizione differenti. Il saggio MTT è stato eseguito in cellule PC12 esposte a A-CD, B-52, C-93 (0.5, 1, 2.5, 5 e 10 μ M) per 15', 30', 1h e 24h. (* $p < 0.05$ vs Control).

b)

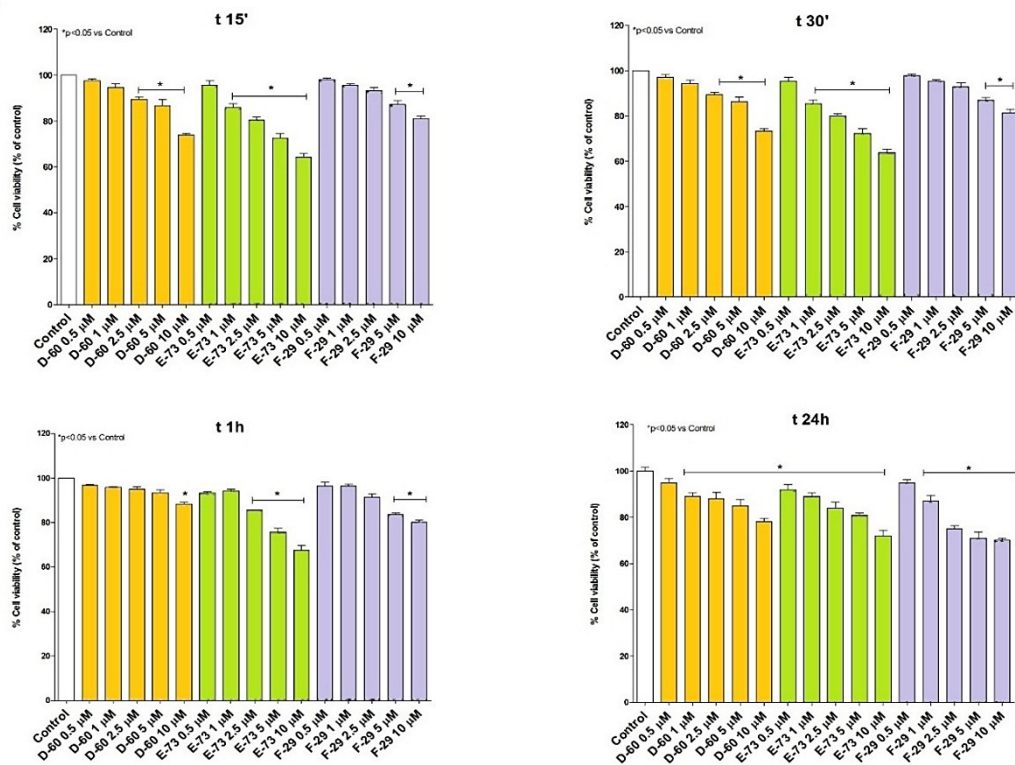


Figura 25b. Effetti di diverse concentrazioni di β -ciclodestrine in cellule PC12 a tempi di esposizione differenti. Il saggio MTT è stato eseguito in cellule PC12 esposte a D-60, E-73 e F-29 (0.5, 1, 2.5, 5 e 10 μ M) per 15', 30', 1h e 24h. (* $p < 0.05$ vs Control).

a)

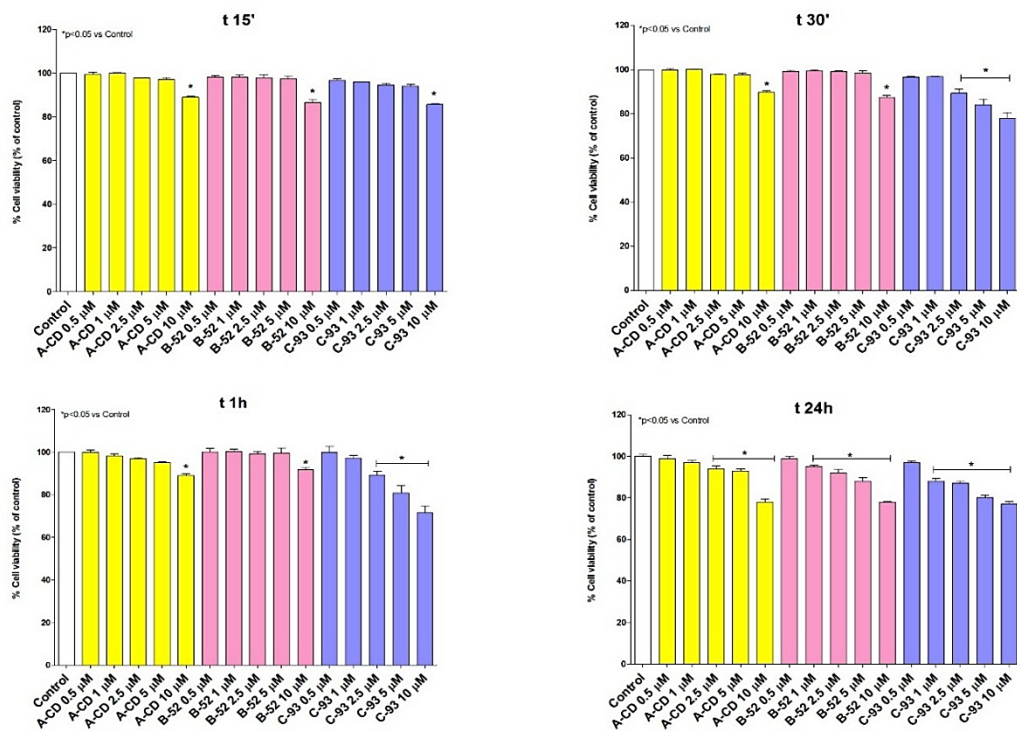


Figura 26a. Effetti di diverse concentrazioni di β -ciclodestrine in cellule Caco-2 a tempi di esposizione differenti. Il saggio MTT è stato eseguito in cellule Caco-2 esposte a A-CD, B-52, C-93 (0.5, 1, 2.5, 5 e 10 μ M) per 15', 30', 1h e 24h. (* $p < 0.05$ vs Control).

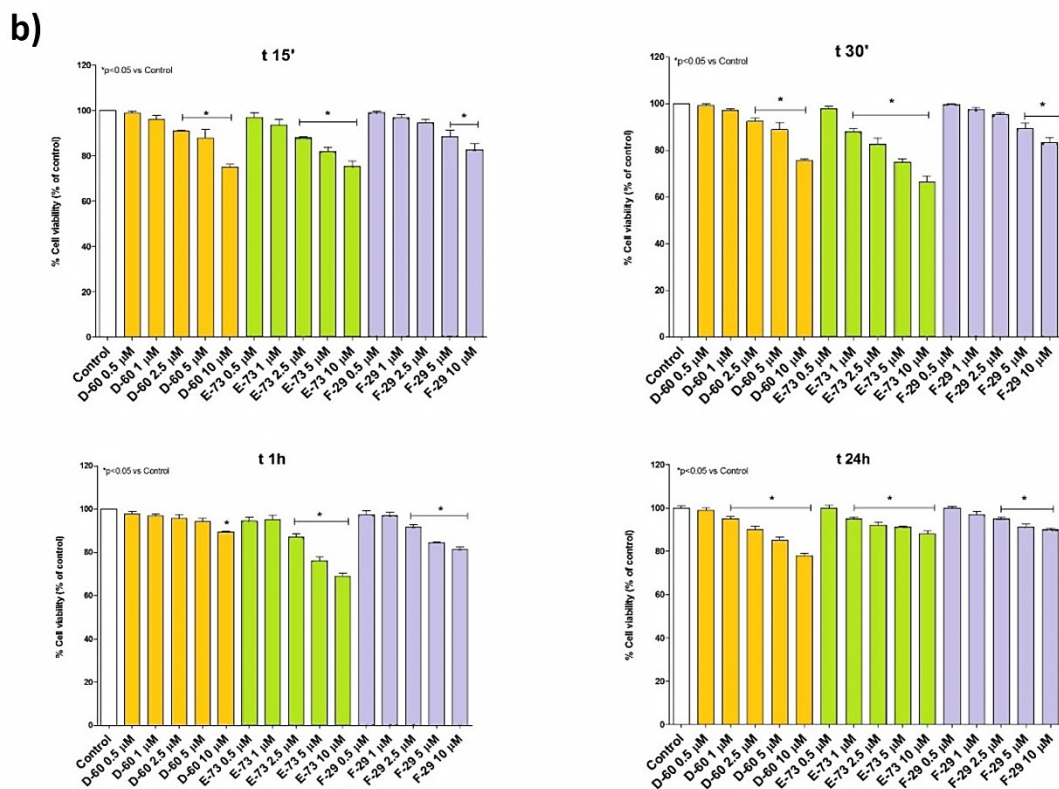


Figura 26b. Effetti di diverse concentrazioni di β -ciclodestrine in cellule Caco-2 a tempi di esposizione differenti. Il saggio MTT è stato eseguito in cellule Caco-2 esposte a D-60, E-73 e F-29 (0.5, 1, 2.5, 5 e 10 μ M) per 15', 30', 1h e 24h. (* $p < 0.05$ vs Control).

I monomeri A-CD e B-52 e il polimero C-93, gli unici disponibili nella versione fluorescente (coniugati alla rodamina B), non hanno mostrato effetti tossici in cellule Caco-2 sino alla concentrazione di trattamento di 5 μ M entro la prima ora di trattamento (figura 26a). Sulla base dei dati ottenuti dallo screening, le β -ciclodestrine fluorescenti A-CD, B-52 e C-93 (5 μ M) sono state quindi utilizzate per gli studi successivi di uptake e di assorbimento svolte presso l'Università di Portsmouth in Inghilterra.

L'uptake di A-CD, B-52 e C-93 (5 μ M), coniugate alla rodamina B, è stato valutato mediante microscopia confocale in cellule Caco-2 dopo 30 minuti di esposizione al trattamento (figura 27). Nell'immagine è mostrata l'internalizzazione delle β -ciclodestrine sotto forma di vescicole rosse. Come visibile dalla microscopia

confocale, il monomero B-52 ha mostrato una maggiore capacità di ingresso nel compartimento cellulare rispetto al monomero A-CD e al polimero C-93 (a parità di dose e tempo di esposizione).

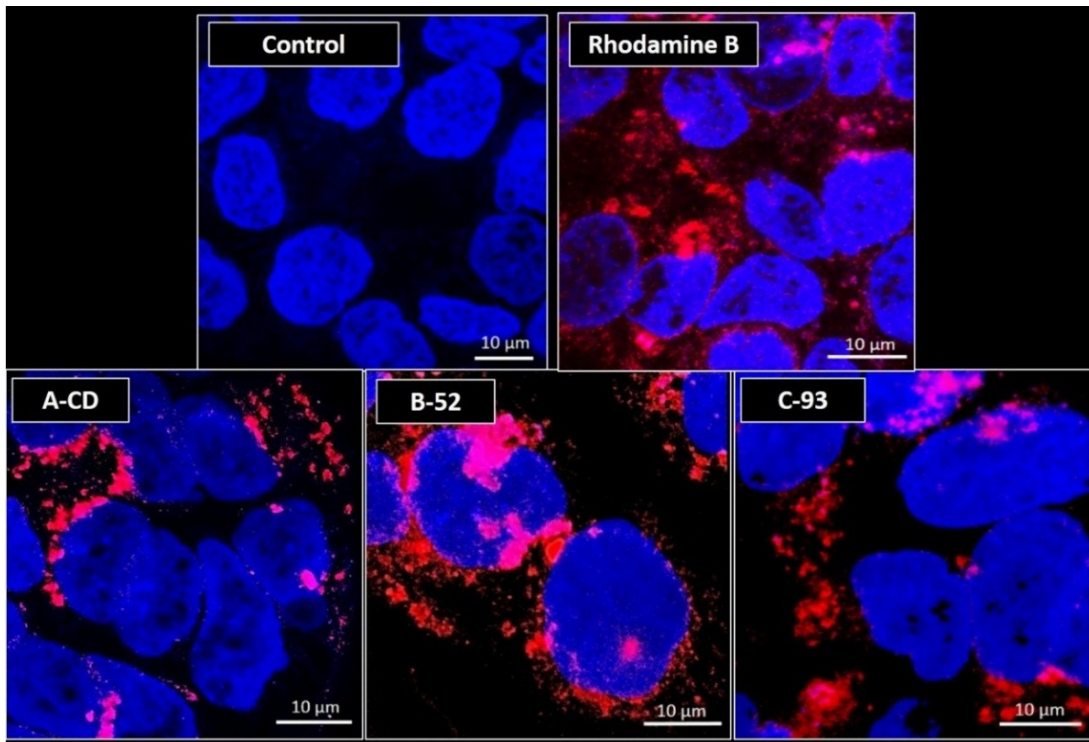


Figura 27. Analisi dell'uptake delle β -ciclodestrine coniugate alla rodamina B in cellule Caco-2 mediante microscopia confocale. L'internalizzazione delle β -ciclodestrine fluorescenti A-CD, B-52 e C-93 (5 μ M) è stata studiata in cellule Caco-2 dopo 30 minuti di esposizione al trattamento.

L'assorbimento delle β -ciclodestrine fluorescenti A-CD, B-52 e C-93 (5 μ M) è stato inoltre valutato a 15', 30' e 1h di esposizione in cellule Caco-2 come mostrato nella figura 28. L'analisi quantitativa è stata effettuata misurando l'intensità di fluorescenza dei singoli lisati cellulari. I risultati ottenuti non hanno evidenziato differenze significative tra i livelli di β -ciclodestrine internalizzate a diversi tempi di esposizione. L'intensità di fluorescenza intracellulare è stata indicata come uptake relativo di β -ciclodestrina (%) misurata nel compartimento intracellulare e per tutti i campioni il valore è stato pari al 38% circa.

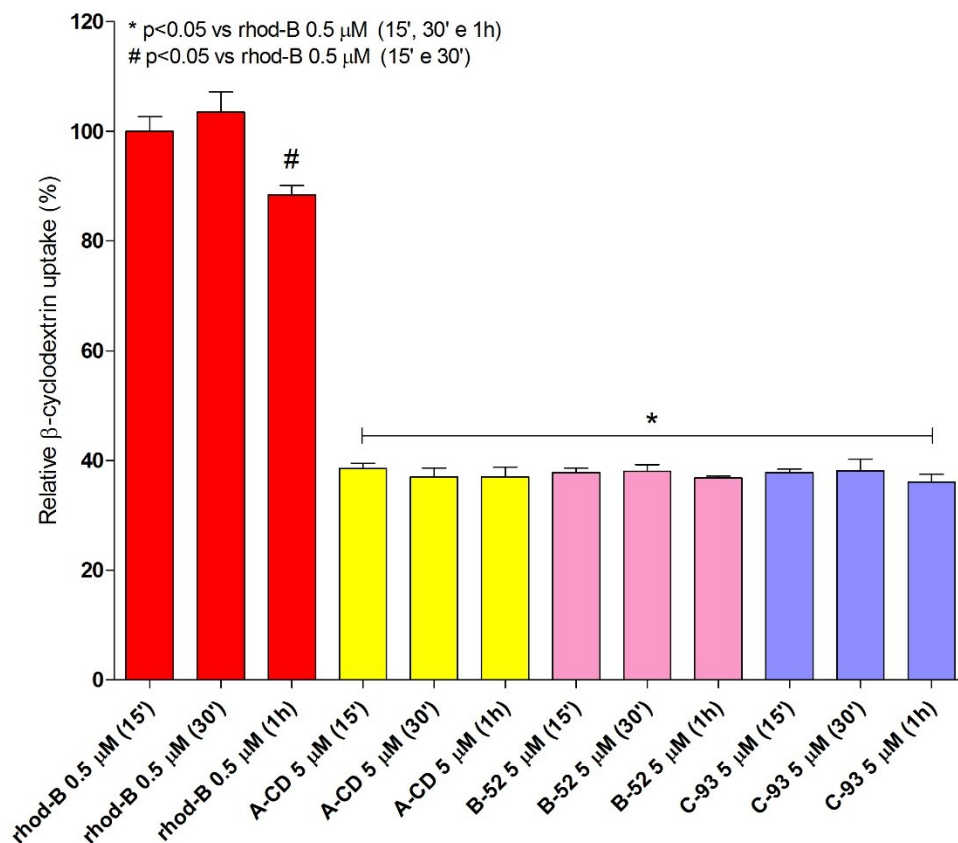


Figura 28. Uptake relativo delle β -ciclodestrine in cellule Caco-2. Valutazione dell'intensità di fluorescenza intracellulare in cellule Caco-2 esposte alle β -ciclodestrine fluorescenti A-CD, B-52 e C-93 (5 μ M) per 15', 30' e 1h. (* p <0.05 vs rhod-B 0.5 μ M 15', 30' e 1h) (# p <0.05 vs rhod-B 0.5 μ M 15' e 30').

La permeabilità delle singole β -ciclodestrine fluorescenti A-CD, B-52 e C-93 (5 μ M) è stata ulteriormente valutata in un monostrato di cellule Caco-2 a tempi di esposizione diversi (15', 30' e 1h) (figura 29). Durante gli esperimenti non sono state rilevate differenze significative nell'integrità del monostrato cellulare periodicamente monitorato attraverso i valori TEER. L'intensità di fluorescenza misurata nel compartimento intracellulare e nella camera basale dell'inserito ha rispecchiato proporzionalmente la quantità (%) di β -ciclodestrine effettivamente presente. Come mostrato nella porzione sinistra della figura 29a, l'intensità di fluorescenza rilevata nella frazione intracellulare del campione trattato con B-52 per 30' (49%) è stata significativamente maggiore di quella misurata nel campione C-93

a parità di tempo (42%). Allo stesso tempo sperimentale (30') la fluorescenza intracellulare registrata per C-93 (42%) è stata maggiore di quella misurata per A-CD (36%). Nella porzione basolaterale degli inserti, invece, non sono state registrate differenze significative di fluorescenza tra i diversi campioni (porzione destra della figura 29a). Nella figura 29b sono stati riportati i risultati relativi alle diverse efficienze di permeabilità transepiteliale delle molecole in studio. I dati ottenuti hanno evidenziato un'elevata capacità di permeazione del derivato B-52 a 30' rispetto a quella misurata per A-CD e C-93 a parità di tempo. A questo stesso tempo sperimentale, invece, non sono state evidenziate differenze significative nelle permeabilità di C-93 e A-CD.

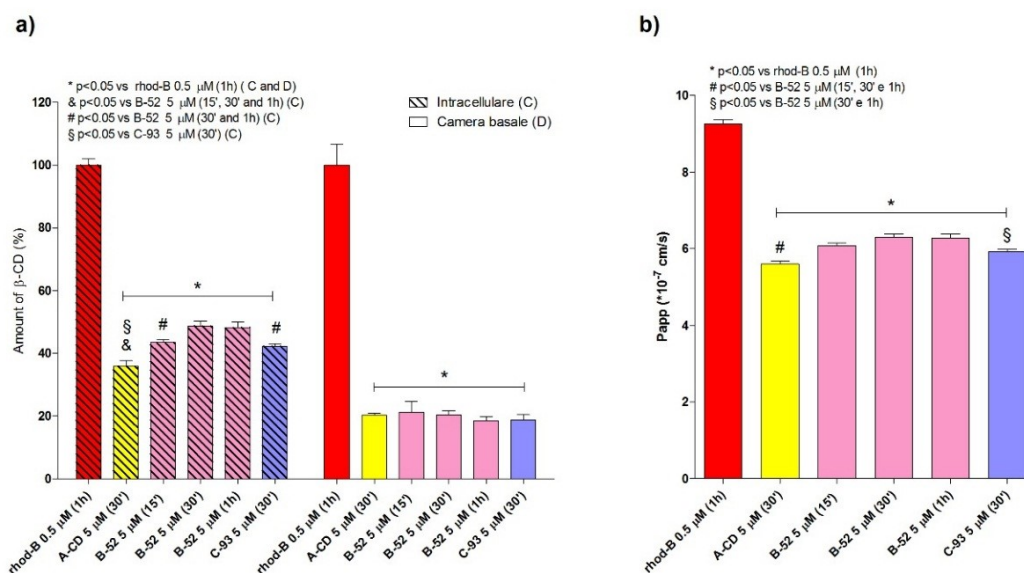


Figura 29. Uptake delle β -ciclodestrine fluorescenti in monostrato di cellule Caco-2 e valutazione della permeabilità transepiteliale. Gli esperimenti sono stati effettuati in transwell (PTFE) su monostrato cellulare di Caco-2 esposto a A-CD, B-52 e C-93 (5 μ M) per 15', 30' e 1h. L'intensità di fluorescenza dei campioni esposti a trattamento è stata misurata nel lisato intracellulare (porzione apicale dell'inserto) e nella porzione basolaterale **(a)**, mentre la permeabilità transepiteliale è stata calcolata per ogni campione ed espressa sotto forma di valori di permeabilità apparente (Papp) **(b)**. (*p<0.05 vs rhod-B 0.5 μ M 1h - C e D) (& p<0.05 vs B-52 5 μ M 15', 30' e 1h - C) (# p<0.05 vs B-52 5 μ M 30' e 1h - C) (§ p<0.05 vs C-93 5 μ M 30' - C).

Risultati dell'analisi di glucosio e lattato su cellule PC12

Lo studio sulle variazioni di glucosio e lattato extracellulari è stato effettuato in cellule PC12 esposte a insulina, pargilina e MPTP singolarmente o co-somministrate per 6h. I dati ottenuti per il gruppo di controllo (figura 30) non hanno evidenziato variazioni nei livelli di glucosio e lattato sia a 30' che a 120'. A 300', invece, è stata osservata una riduzione significativa del glucosio e un aumento significativo del lattato. Nel gruppo trattato con insulina (0.5U/mL), a 30' non sono state osservate variazioni significative dei livelli di glucosio rispetto al gruppo di controllo, mentre è stata evidenziata una significativa riduzione del lattato extracellulare. A 120', invece, è stata registrata una riduzione dei livelli di glucosio rimasta poi costante sino a 300'. In presenza di insulina sono stati registrati bassi livelli di lattato, rispetto al gruppo di controllo corrispondente, e questi valori sono rimasti inalterati a tutti i tempi sperimentali.

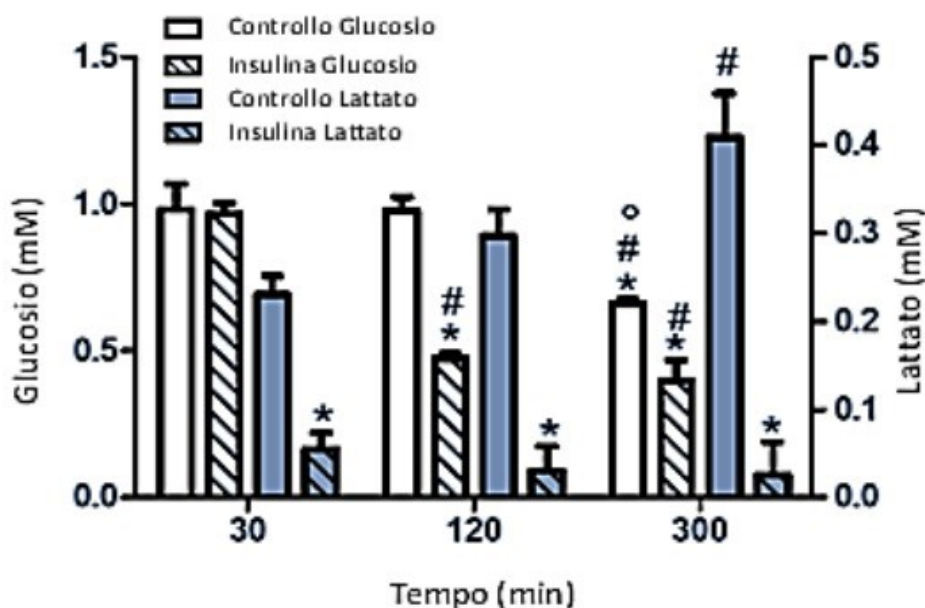


Figura 30. Effetto dell'insulina sui livelli di glucosio e lattato extracellulari in cellule PC12. Le cellule PC12 sono state trattate con insulina (0.5U/mL) in PBS-glu per 6h e i livelli di glucosio e lattato monitorati attraverso i biosensori a 30', 120' e 300'. (* $p < 0.05$ vs Tempo corrispondente) (# $p < 0.05$ vs Corrispondenti 30') (* $p < 0.05$ vs Corrispondenti 120').

Nel campione trattato con MPTP (1mM) (figura 31) è stata registrata una progressiva riduzione dei livelli di glucosio a 30', 120' e 300' paragonabile a quella evidenziata nel gruppo di controllo. I livelli di lattato, invece, hanno mostrato due andamenti differenti tra il gruppo di controllo e quello esposto alla neurotossina. A 30', 120' e 300' è stato osservato un aumento progressivo dei livelli di lattato nel gruppo di controllo mentre, nel gruppo trattato con MPTP è stata evidenziata una riduzione significativa dell'analita tra i 30' e i 120' seguita da un aumento a 300'.

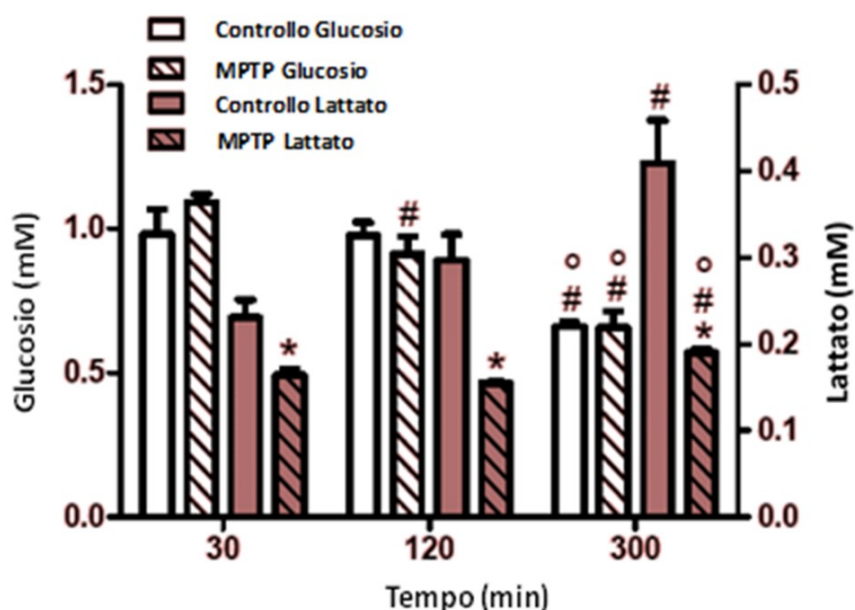


Figura 31. Effetto dell'MPTP sui livelli di glucosio e lattato extracellulari in cellule PC12. Le cellule PC12 sono state trattate con MPTP (1 mM) in PBS-glu per 6h e i livelli di glucosio e lattato monitorati attraverso i biosensori a 30', 120' e 300'. (* $p < 0.05$ vs Tempo corrispondente) (# $p < 0.05$ vs Corrispondenti 30') ($p < 0.05$ vs Corrispondenti 120').

Come visibile nella figura 32, il trattamento con pargilina (1 μ M) e MPTP (1 mM) ha indotto una riduzione progressiva dei livelli di glucosio extracellulare a 30', 120' e 300' paragonabile alla riduzione osservata nel gruppo esposto alla sola neurotossina. I livelli di lattato, invece, sono rimasti costanti nel tempo da 30' a 300'. L'unica variazione significativa nella concentrazione di lattato è stata evidenziata a 30' tra il gruppo esposto all' MPTP e quello trattato con pargilina e

MPTP. In quest'ultimo campione è stato registrato un aumento significativo dei livelli di lattato extracellulari.

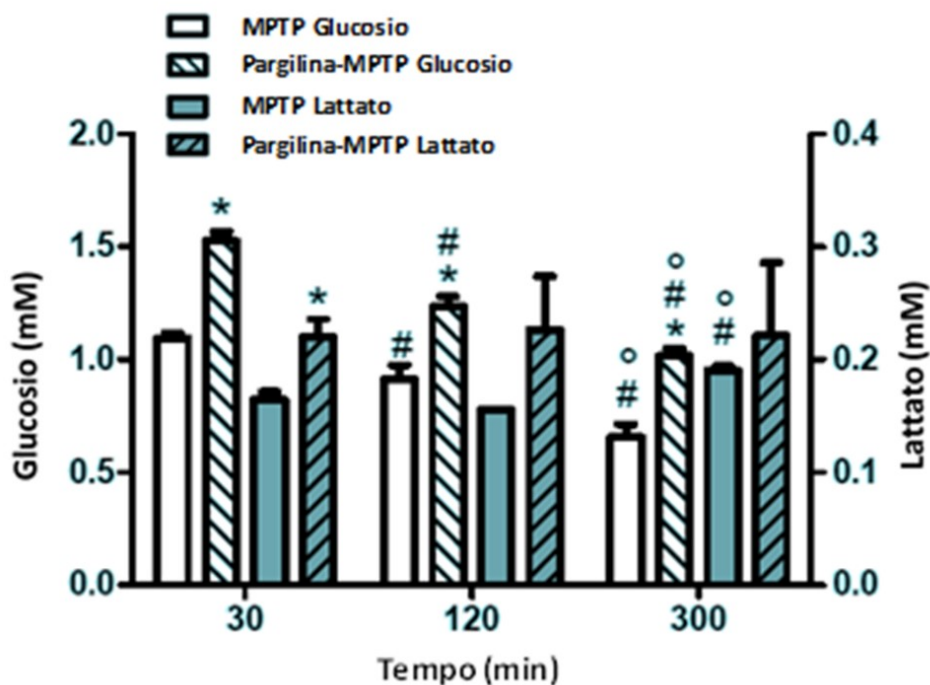


Figura 32. Effetto dell'MPTP e pargilina sui livelli di glucosio e lattato extracellulari in cellule PC12. Le cellule PC12 sono state trattate con MPTP (1 mM) e pargilina (1 μ M) in PBS-glu per 6h e i livelli di glucosio e lattato monitorati attraverso i biosensori a 30', 120' e 300'. (* $p < 0.05$ vs Tempo corrispondente) (# $p < 0.05$ vs Corrispondenti 30') (° $p < 0.05$ vs Corrispondenti 120').

Nella figura 33, è invece mostrato l'effetto di MPTP (1mM) e insulina (0.5 U/mL) sui livelli di glucosio e lattato extracellulari. I dati ottenuti hanno evidenziato una riduzione progressiva del glucosio nel tempo rispetto al gruppo trattato con MPTP a 30', 120' e 300'. I risultati sui livelli di lattato, invece, hanno mostrato un decremento significativo dell'analita a tutti i tempi sperimentali nel gruppo trattato con insulina e MPTP rispetto al gruppo trattato con la sola neurotossina.

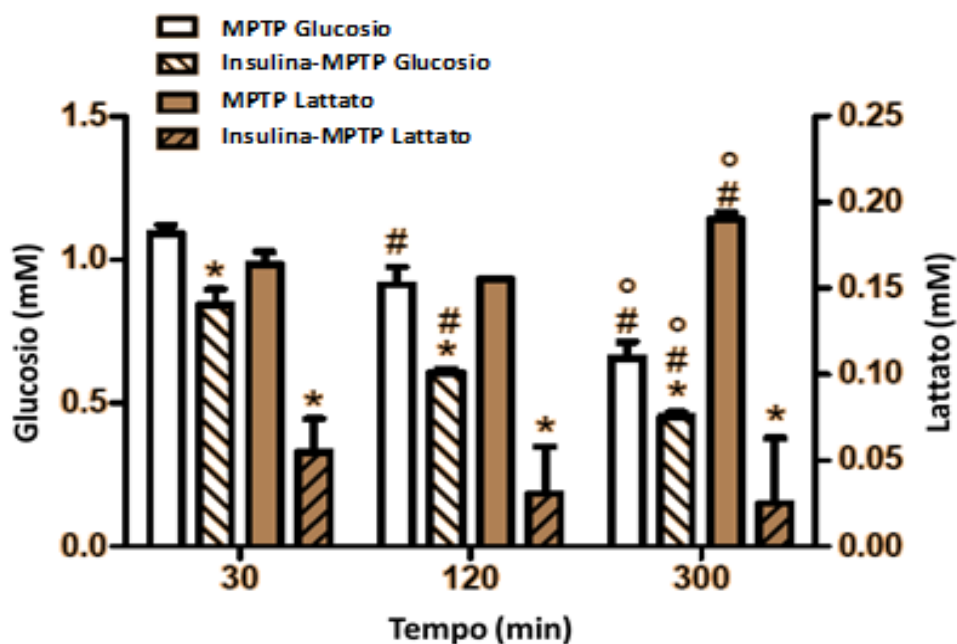


Figura 33. Effetto dell'MPTP e insulina sui livelli di glucosio e lattato extracellulari in cellule PC12. Le cellule PC12 sono state trattate con MPTP (1 mM) e insulina (0.5 U/mL) in PBS-glu per 6h e i livelli di glucosio e lattato monitorati attraverso i biosensori a 30', 120' e 300'. (* $p < 0.05$ vs Tempo corrispondente) (# $p < 0.05$ vs Corrispondenti 30') (° $p < 0.05$ vs Corrispondenti 120').

Nella figura 34 sono stati riportati i risultati ottenuti nel gruppo di cellule trattate con pargilina (1 μ M), insulina (0.5 U/mL) e MPTP 1mM. I dati ottenuti hanno mostrato una riduzione progressiva del glucosio extracellulare a 30', 120' e 300'. I trattamenti hanno indotto un decremento significativo nei livelli di lattato tra i 30' e i 120' rispetto al gruppo trattato con solo MPTP.

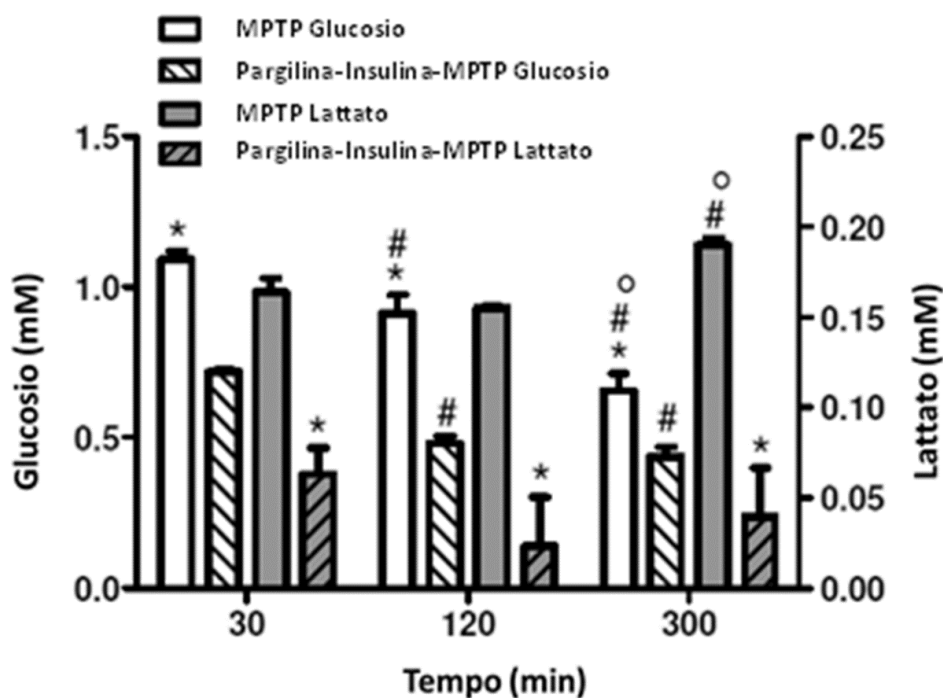


Figura 34. Effetto dell'MPTP, pargilina e insulina sui livelli di glucosio e lattato extracellulari in cellule PC12. Le cellule PC12 sono state trattate con MPTP (1 mM), pargilina (1 μ M) e insulina (0.5 U/mL) in PBS-glu per 6h e i livelli di glucosio e lattato monitorati attraverso i biosensori a 30', 120' e 300'. (* p <0.05 vs Tempo corrispondente) (# p <0.05 vs Corrispondenti 30') (\circ p <0.05 vs Corrispondenti 120').

Al termine degli esperimenti (6h) è stato effettuato il saggio Trypan blue al fine di valutare gli effetti di ciascun trattamento sulla vitalità cellulare e, i risultati ottenuti sono stati poi confrontati con i dati ottenuti dal saggio di vitalità MTT effettuato a 6h (figura 35). Entrambe le analisi hanno indicato una riduzione della vitalità delle cellule PC12 indotta dal trattamento con MPTP (1 mM) (13%). I risultati hanno mostrato un effetto protettivo dal danno indotto dalla neurotossina nelle cellule trattate con pargilina (1 μ M) (6%) o insulina (0.5 U/mL) (8%). La protezione dall'insulto è risultata essere più elevata quando pargilina e insulina sono state co-somministrate (10%).

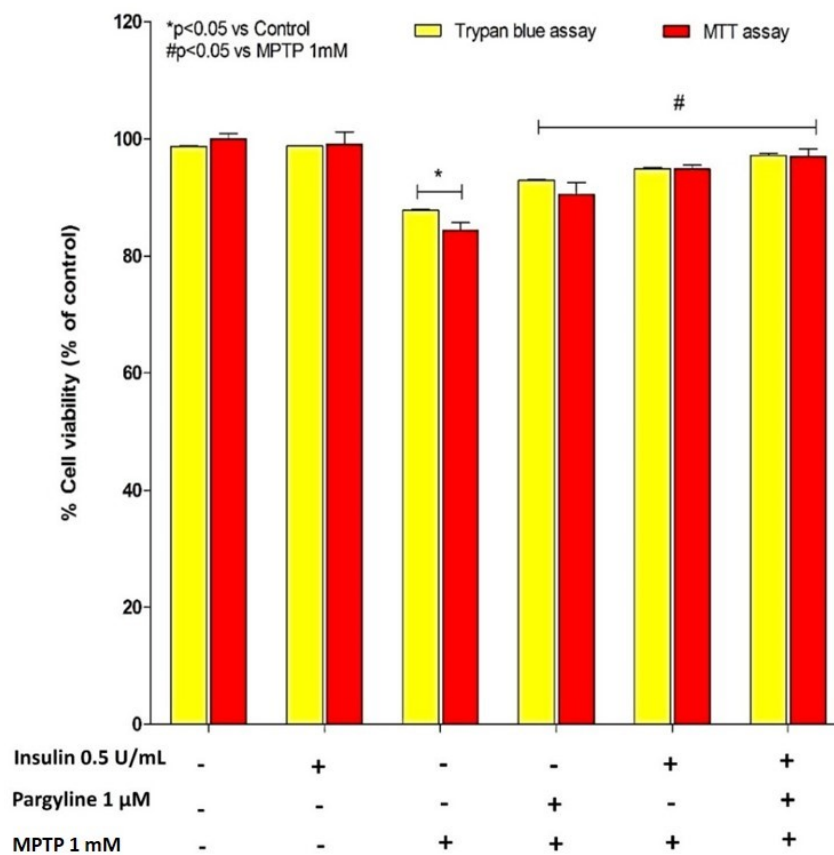


Figura 35. Effetti di pargilina, insulina e MPTP sulla vitalità di cellule PC12. Le cellule PC12 sono state esposte per 6h al trattamento con pargilina (1 μM), insulina (0.5 U/mL) e MPTP (1 mM) sole o co-somministrate. Successivamente i diversi campioni sono stati analizzati mediante saggio Trypan blue e MTT. (*p<0.05 vs Control) (#p<0.05 vs MPTP 1mM).

Discussione

Negli ultimi decenni una vasta letteratura scientifica ha dimostrato il ruolo dello stress ossidativo nella patogenesi di diverse malattie neurodegenerative tra cui la malattia di Parkinson^{9,173}. La definizione di stress ossidativo introdotta nel 1991, definisce il fenomeno come uno squilibrio tra la produzione di radicali liberi e le difese antiossidanti endogene della cellula¹⁷⁴. Le cellule neuronali risultano essere particolarmente vulnerabili al danno ossidativo a causa del loro elevato consumo di ossigeno ma, in condizioni fisiologiche, riescono comunque a mantenere il loro stato ridotto grazie al pool antiossidante endogeno¹⁷⁵. Quando la formazione di specie radicaliche, tra le quali, specie reattive dell'ossigeno (ROS), eccede la capacità antiossidante della cellula, si instaura lo stress ossidativo che danneggia le macromolecole biologiche e accelera il processo di invecchiamento fisiologico cellulare e i fenomeni neurodegenerativi^{176,177}. Lo sviluppo di nuove strategie con lo scopo di ripristinare il potere antiossidante intracellulare potrebbe ritardare e/o minimizzare il danno ossidativo e il fenomeno neurodegenerativo. Tra i composti più studiati sono conosciuti gli antiossidanti di natura polifenolica, tra cui i flavonoidi come curcumina, genisteina e quercetina¹⁷⁸, che mostrano proprietà neuroprotettive in diversi modelli di malattie neurodegenerative^{179,180}. Gli effetti terapeutici degli antiossidanti sui disturbi neurodegenerativi risultano essere spesso inefficaci a causa del dosaggio inadeguato e/o dei tempi di somministrazione non idonei^{176,181}. La nanotecnologia potrebbe potenzialmente modificare il trattamento delle malattie neurodegenerative, servendosi di sistemi di drug delivery, per veicolare antiossidanti nel SNC al fine di ridurre le specie reattive dell'ossigeno¹⁸². A tal proposito, nel presente studio, sono stati investigati gli effetti di diversi sistemi di drug delivery (transferosomi, nanoparticelle di chitosano e beta-ciclodestrine) su modelli cellulari di stress ossidativo e/o di parkinsonismo indotto e su modelli cellulari per lo studio dell'assorbimento e il trasporto di farmaci.

La prima parte di questo studio è stata dedicata alla valutazione degli effetti di diverse formulazioni di transferosomi contenenti il flavonoide genisteina (GEN-TFs) su cellule PC12. Lo screening ha permesso di verificare la biocompatibilità di tutte le formulazioni preparate con diversi tensioattivi: solo GEN-TF3 ha ridotto

significativamente la vitalità cellulare. La genisteina legata ai transferosomi (GEN-TFs) ha mostrato minore tossicità rispetto alla genisteina libera (GEN). Tra i GEN-TFs testati, è stato evidenziato un effetto protettivo da parte di GEN-TF2 nel modello di stress ossidativo indotto dal perossido di idrogeno. Negli studi di uptake, la formulazione GEN-TF2 si è dimostrata un sistema efficace per la veicolazione dell'antiossidante e ha favorito l'internalizzazione cellulare della genisteina rispetto alla capacità d'ingresso mostrata dal principio attivo libero (GEN)¹⁸³. L'azione protettiva di GEN-TF2 è paragonabile all'azione di N-acetil-L-cisteina (NAC), antiossidante endogeno ben noto in letteratura per la sua elevata azione riducente¹⁸⁴. La formulazione GEN-TF2, al contrario di GEN, è stata anche in grado di ripristinare la distribuzione fisiologica delle fasi del ciclo cellulare modificata dal trattamento con il perossido di idrogeno¹⁸¹. Inoltre, la formulazione studiata, rispetto a GEN, ha ridotto significativamente gli eventi apoptotici presenti nelle cellule PC12 esposte al perossido di idrogeno. GEN-TF2 potrebbe quindi rappresentare un efficiente sistema di drug delivery per migliorare l'azione della genisteina. L'effetto antiossidante e anti-apoptotico di GEN-TF2 consente di ipotizzarne un ruolo come coadiuvante nella terapia delle malattie stress ossidativo-correlate, come ad esempio la malattia di Parkinson⁹¹.

I risultati incoraggianti ottenuti nello studio del sistema di drug delivery GEN-TF2 hanno suscitato grande interesse e hanno portato alla realizzazione di un sistema più complesso in cui il transferosoma è stato caricato con due molecole diverse in associazione: quercetina ed L-dopa (TF2-QL). L'idea della ricerca è stata quella di ottenere una formulazione che contenesse due sostanze, l'antiossidante e il farmaco che collaborassero all'azione farmacologica. La quercetina, come la genisteina, è un flavonoide dotato di ottime capacità antiossidanti e neuroprotettive¹⁸⁵, mentre l'L-dopa è il farmaco d'elezione per la terapia della malattia di Parkinson¹⁸⁶. La quercetina potrebbe proteggere l'L-dopa dal metabolismo e dall'autossidazione e, il transferosoma potrebbe veicolare entrambi, il farmaco e l'antiossidante, nel sistema nigro-striatale. Gli esperimenti effettuati con la formulazione TF2-QL sono stati condotti in tre diversi modelli di

parkinsonismo indotto: MPTP¹⁸⁷, MnCl₂¹⁷⁰ e CdCl₂¹⁸⁸ in cellule PC12. I risultati hanno mostrato un effetto protettivo della formulazione TF2-QL nei confronti del danno indotto dalla neurotossina MPTP. Questo effetto non è stato evidenziato per i principi attivi liberi quercetina ed L-dopa associati a parità di concentrazione. La stessa formulazione invece non ha mostrato alcuna protezione nei modelli di parkinsonismo indotti con manganese e cadmio cloruro. In questo studio preliminare il sistema caricato con le due molecole ha mostrato migliore capacità di preservare la vitalità cellulare dal trattamento con neurotossine come MPTP, rispetto alle molecole libere. Questi risultati confermano ulteriormente l'efficacia del sistema di drug delivery.

Lo studio sui diversi drug delivery systems è proseguito testando un ulteriore tipo di carrier basato su nanoparticelle di chitosano per il trasporto della genisteina (NP-GEN)¹⁸⁹. La natura biodegradabile, l'elevata biocompatibilità e la bassa immunogenicità rendono il chitosano uno dei polimeri più utilizzati nella realizzazione di sistemi di drug delivery¹²¹. Le nanoparticelle di chitosano sono state preparate rispettivamente in acetone (serie 1, NP1-GEN) e in etanolo (serie2, NP2-GEN), caricate con una concentrazione nota di genisteina e sono state utilizzate per testarne la citotossicità. I trattamenti con entrambe le serie di nanoparticelle, NP1-GEN e NP2-GEN, non hanno indotto riduzioni della vitalità cellulare delle PC12 nonostante valori di pH diversi da quello fisiologico (range del pH: 4.90-5.60). La scelta della concentrazione dei trattamenti è stata effettuata sulla base della concentrazione di genisteina utilizzata nel lavoro precedente sui GEN-TFs⁹¹. Data la biocompatibilità e l'assenza di effetti citotossici *in vitro*, entrambe le serie di nanoparticelle potrebbero rappresentare promettenti e potenziali sistemi carrier.

Le indagini sui sistemi di drug delivery si sono concluse con lo studio relativo alle β -ciclodestrine, ampiamente utilizzate come eccipienti nelle formulazioni farmaceutiche, come solubilizzanti e promotori dell'assorbimento¹⁹⁰. Poiché non vi sono studi sulla cinetica delle β -ciclodestrine sui sistemi cellulari, l'obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare la farmacocinetica di diverse formulazioni di β -ciclodestrine attraverso l'uptake e la permeabilità transepiteliale in cellule Caco-2.

Il saggio di vitalità cellulare MTT ha identificato concentrazione e tempi ottimali di esposizione delle diverse molecole fluorescenti e non. Lo sviluppo di β -ciclodestrine coniugate con rodamina B, e quindi fluorescenti, rappresenta uno strumento prezioso per studiare l'internalizzazione delle molecole nei sistemi biologici¹⁹¹. Nel presente studio, attraverso la microscopia confocale si è evidenziato che dopo 30 minuti di incubazione tutte le β -ciclodestrine marcate, sia monomeriche che polimeriche, sono state internalizzate nel citoplasma delle cellule Caco-2 a confluenza seppure con qualche differenza. Le molecole monomeriche, più piccole, hanno oltrepassato le membrane biologiche con più facilità rispetto al polimero, che a causa del suo ingombro sterico ha mostrato maggiore difficoltà. La permeabilità transepiteliale delle molecole è stata inoltre valutata sul monostrato di cellule Caco-2. Le tre β -ciclodestrine marcate hanno mostrato velocità di attraversamento epiteliale diverse e, in particolare, il derivato monomerico B-52 ha mostrato una maggiore permeabilità. Anche in questo caso, la facilità di permeazione della molecola potrebbe essere dovuta alla sua piccola dimensione.

In conclusione le β -ciclodestrine monomeriche hanno mostrato maggiore abilità di ingresso e permeabilità nella cellula, caratteristiche legate alla loro struttura chimica e potrebbero essere maggiormente capaci di veicolare farmaci.

Nella seconda parte del dottorato è stato effettuato uno studio sul metabolismo glucidico, durante l'alterazione mitocondriale indotta da MPTP in cellule PC12, attraverso l'analisi dei livelli extracellulari di glucosio e lattato. E' stato possibile, quindi, valutare gli effetti del trattamento con pargilina e insulina da sole o in associazione, sul ruolo della funzione mitocondriale nel metabolismo energetico e nella vitalità cellulare. La pargilina, inibitore delle MAO, ha confermato gli effetti protettivi sulla tossicità indotta dal trattamento con MPTP ben nota in letteratura³². L'inibizione delle MAO impedisce la conversione dell'MPTP in MPP⁺ con conseguente azione protettiva sul complesso I della catena respiratoria¹⁹². Maggiori livelli di lattato sono stati misurati nell'associazione pargilina-MPTP, rispetto al campione esposto alla sola neurotossina, indicando un fisiologico metabolismo aerobico, indice di benessere cellulare. Inoltre, l'effetto neuroprotettivo della

pargilina è stato osservato anche in termini di vitalità cellulare, dove l'inibitore delle MAO ha mostrato una riduzione della mortalità cellulare rispetto alla sola neurotossina¹⁹². Durante i trattamenti con l'insulina, da sola o in associazione, è stata osservata una riduzione significativa dei livelli di glucosio extracellulare rispetto ai campioni esposti all'MPTP da solo. L'ormone, infatti, secondo il suo meccanismo d'azione, favorisce l'internalizzazione del glucosio extracellulare. Un aumento dell'internalizzazione di glucosio permette alla cellula di avere a disposizione, maggiore substrato energetico, favorendo il corretto funzionamento aerobico mitocondriale anche in presenza della neurotossina MPTP¹⁹³. I dati relativi alla associazione di pargilina e insulina in presenza di MPTP mostrano un'azione dominante dell'insulina sulla pargilina relativamente alle variazioni dei livelli di glucosio. Come per la pargilina, anche per l'insulina da sola o in associazione è stata evidenziata una maggiore vitalità cellulare rispetto a quella osservata con MPTP. In futuro, ulteriori studi potrebbero chiarire il ruolo della disfunzione mitocondriale e offrire importanti misure preventive e terapeutiche nella malattia di Parkinson.

In questo lavoro, si è cercato di ampliare le prospettive terapeutiche tradizionali, cercando nuovi approcci nelle cure di malattie neurodegenerative. A questo proposito è stato dimostrato che sistemi di drug delivery possono avere un effetto farmacologico e che farmaci già in uso possono essere utilizzati in ruoli diversi. Pertanto l'idea è quella di utilizzare sistemi già noti, in ruoli innovativi per ampliare la gamma delle terapie già disponibili.

Work in progress...

Negli ultimi mesi di dottorato è stata intrapresa un'interessante collaborazione con l'Ematologia dell'Università degli Studi di Sassari al fine di testare l'estratto alcolico di *Inula Viscosa*, pianta endemica sarda¹⁹⁴, raccolta a Febbraio 2018 all'Asinara, su tumori cellulari ematologici. Dalla letteratura è stato evidenziato un effetto antiproliferativo, antiossidante e anti-infiammatorio dell'estratto in differenti tipi cellulari^{195,196}. L'estratto di *Inula Viscosa*, infatti, rappresenterebbe un'importante fonte di sostanze farmacologicamente attive, in particolare di flavonoidi dotati delle attività sopracitate¹⁹⁷. Dai risultati ottenuti è stato mostrato un effetto antitumorale dell'estratto alcolico su cellule Raji, cellule di linfoma umano^{198,199}. Il saggio di vitalità Trypan blue ha permesso di apprezzare l'effetto dose-dipendente dell'estratto sulla vitalità cellulare dopo 24h di esposizione al trattamento (figura 36).

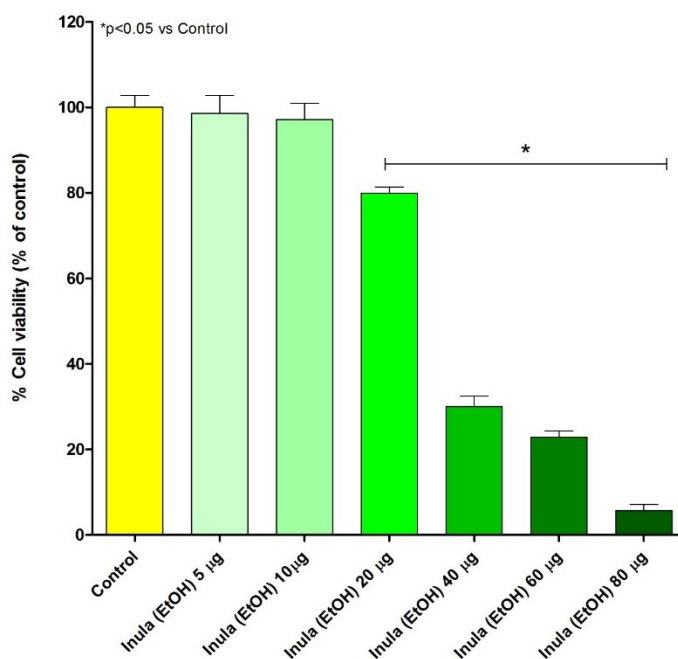


Figura 36. Analisi della vitalità cellulare mediante saggio Trypan blue. Screening di concentrazioni crescenti (5-80 µg) di *Inula Viscosa* (EtOH) su cellule Raji a 24h di esposizione al trattamento. (* $p < 0.05$ vs Control).

Analisi citometriche dei campioni esposti all'estratto hanno inoltre indicato la totale assenza della proteina Ki-67 (figura 37a), considerata indice, seppure specifico, di

proliferazione e, una “stasi” delle cellule nella fase G2/M (figura 37b) ad indicare un possibile effetto antitumorale.

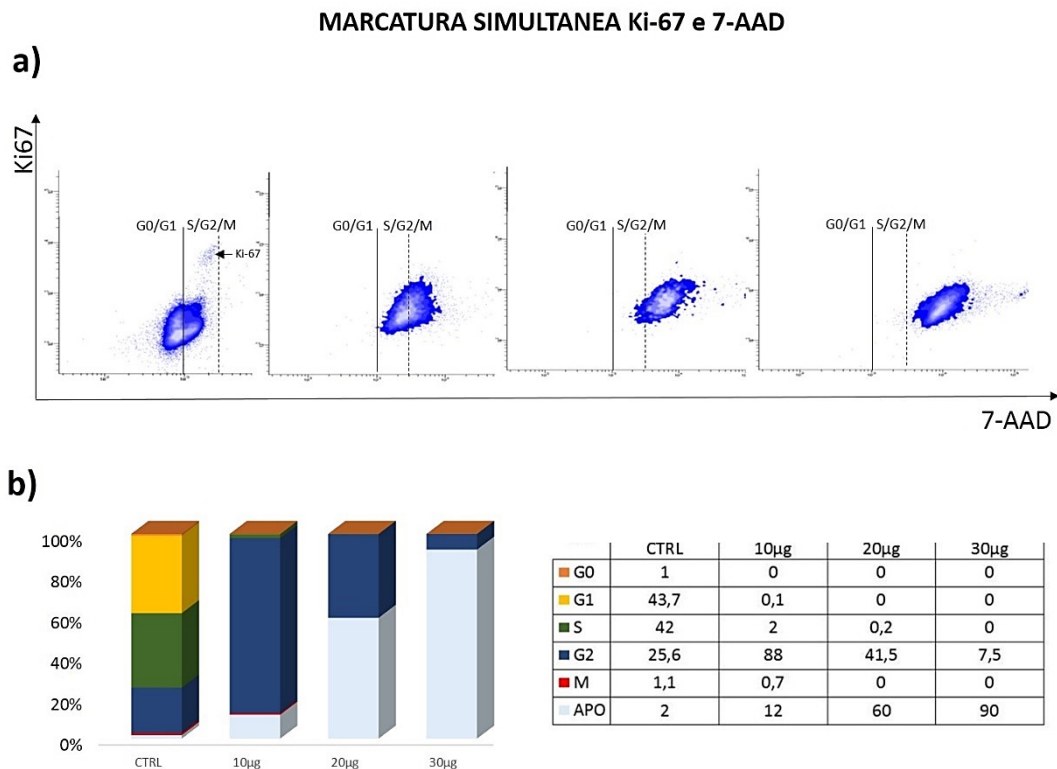


Figura 37. Marcatura simultanea con Ki-67 e 7-AAD di cellule Raji esposte all'estratto di Inula Viscosa. Le cellule Raji trattate per 24h con concentrazioni crescenti di inula Viscosa (10, 20 e 30 µg) sono state marcate con Ki-67 e 7-AAD e, le letture effettuate mediante citofluorimetro. Dot spot della marcatura simultanea Ki-67 (indicato dalla freccia) e 7-AAD (a); analisi delle fasi ciclo cellulare (7-AAD) espressa graficamente mediante istogrammi (b).

Si è indagato inoltre sul meccanismo di morte cellulare indotto dall'estratto di inula. La figura 38 ha mostrato un aumento degli eventi apoptotici proporzionale all'aumentare della dose di estratto con conseguente diminuzione della vitalità cellulare.

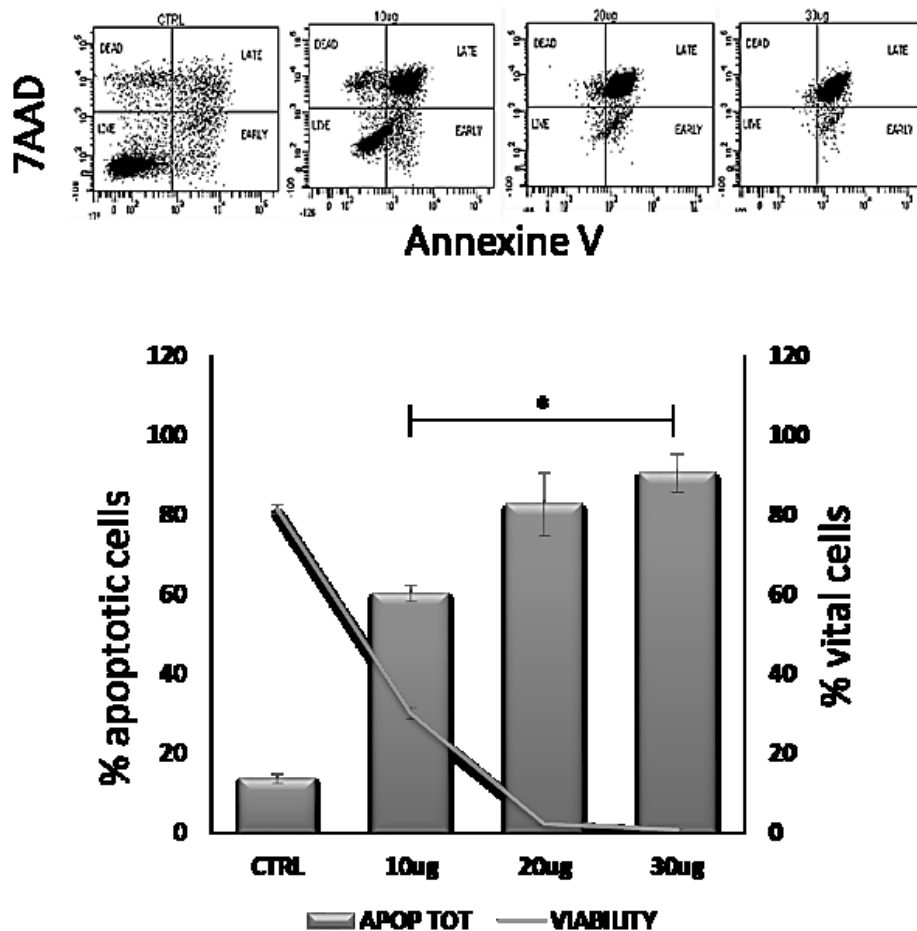


Figura 38. Analisi dell'apoptosi e marcatura con Annessina-V/7-AAD di cellule Raji esposte all'estratto alcolico di Inula Viscosa. L'apoptosi totale delle cellule Raji è stata valutata dopo 24h di incubazione con 10, 20 e 30 μg di estratto di Inula viscosa. Nella parte alta dell'immagine sono stati riportati i citogrammi relativi all'analisi dell'apoptosi. I dati numerici sono stati rappresentati come % di cellule apoptotiche (istogrammi) (* $p < 0.05$ vs control). Nello stesso grafico è stata anche rappresentata la vitalità cellulare % (linea).

I risultati ottenuti, saranno completati da un'analisi di biologia molecolare che permetterà di valutare l'espressione di proteine specifiche che dovrebbero confermare l'effetto antitumorale dell'estratto e guidare la farmaco-terapia oncologica verso l'utilizzo di coadiuvanti naturali.

Infine si sta conducendo un altro studio sugli inibitori di pompe di estrusione, molecole di nuova sintesi, fornite Dipartimento di Chimica e Farmacia dell'Università degli Studi di Sassari. Queste molecole, sono già note in letteratura per essere impiegate nelle resistenze antibiotiche²⁰⁰ e nelle terapie antitumorali²⁰¹. Da nostri studi preliminari, le molecole sopracitate hanno mostrato un aumento del danno indotto da MPTP alle dosi più elevate su cellule PC12 (figura 39 e 40).

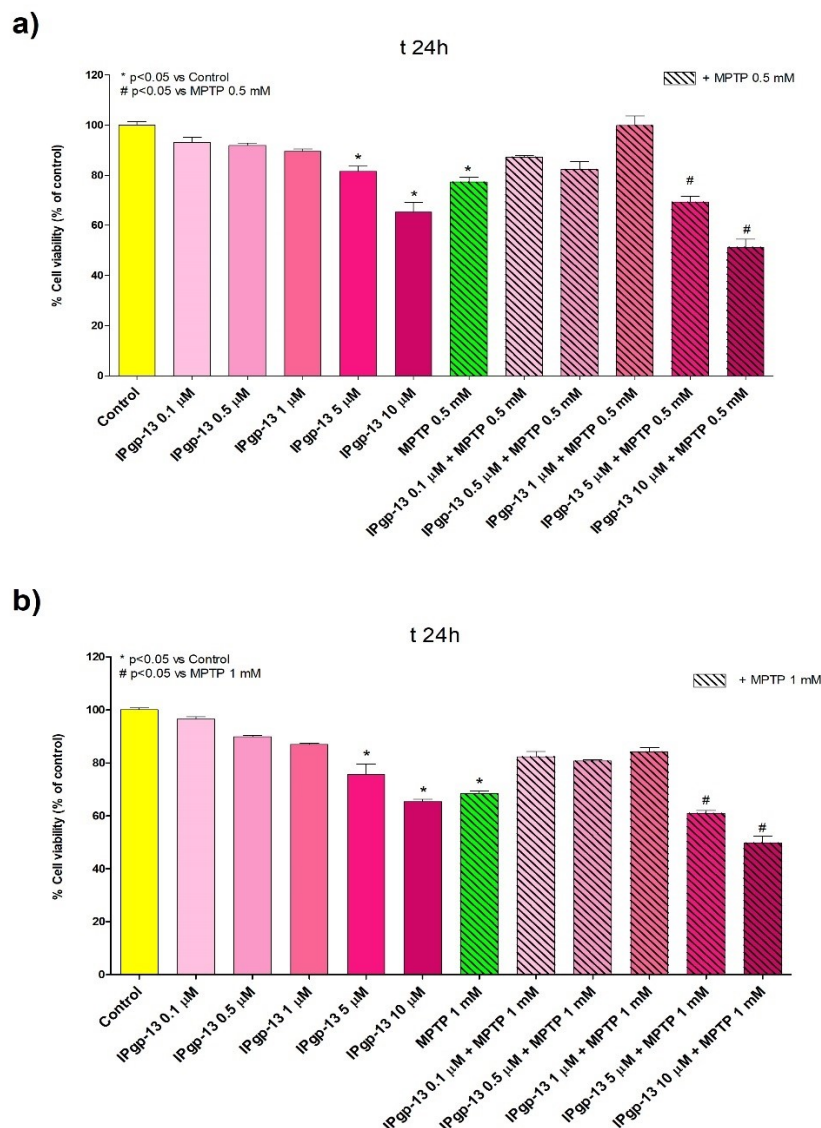


Figura 39. Effetto di concentrazioni crescenti di IPgp-13 su cellule PC12 esposte a MPTP per 24h. Il saggio di vitalità MTT è stato effettuato sulla linea cellulare PC12 esposta per 24h a concentrazioni crescenti della molecola IPgp-13 (0.1, 0.5, 1, 5 e 10 μ M) in presenza di MPTP (0.5 mM) **(a)** e 1 mM **(b)**. (* p <0.05 vs Control) (# p <0.05 vs MPTP 0.5 mM e 1 mM).

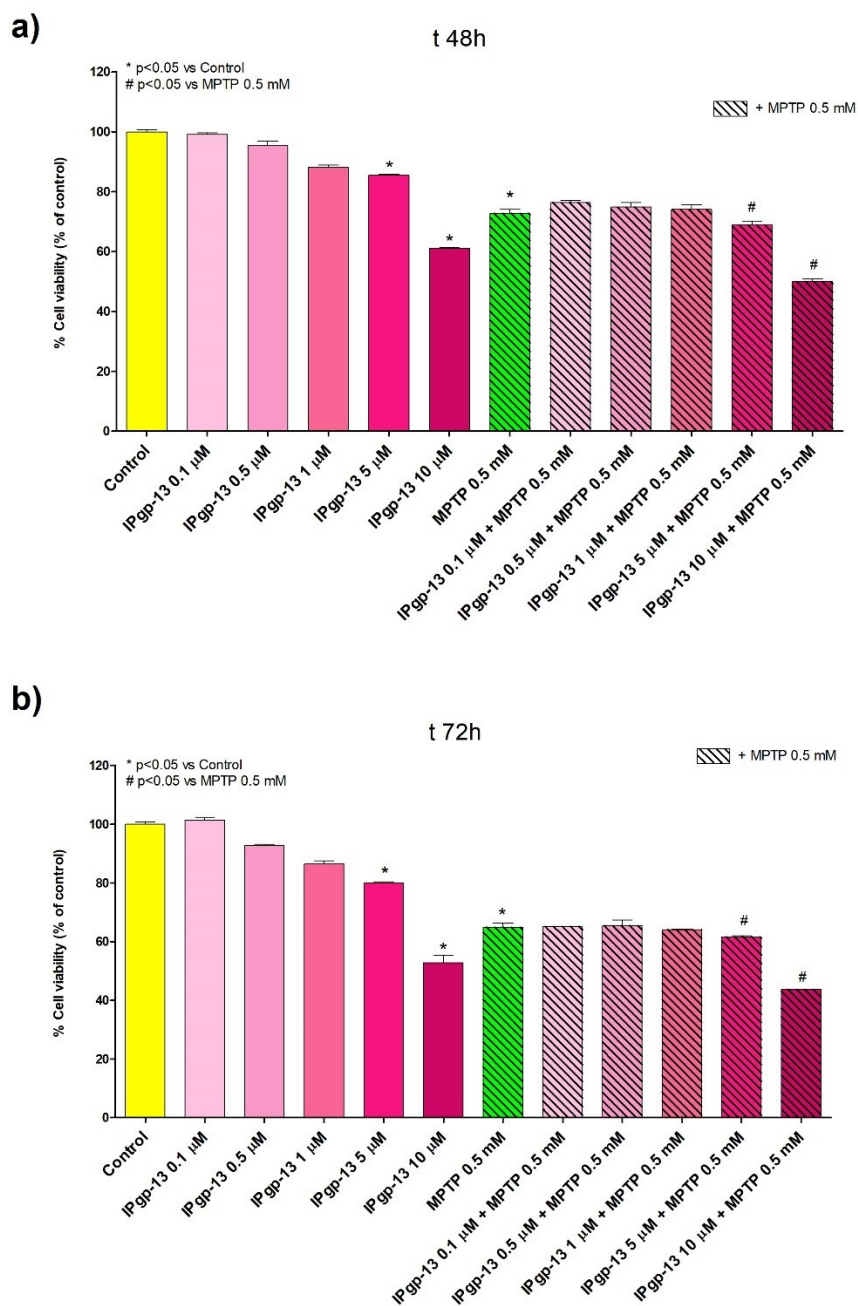
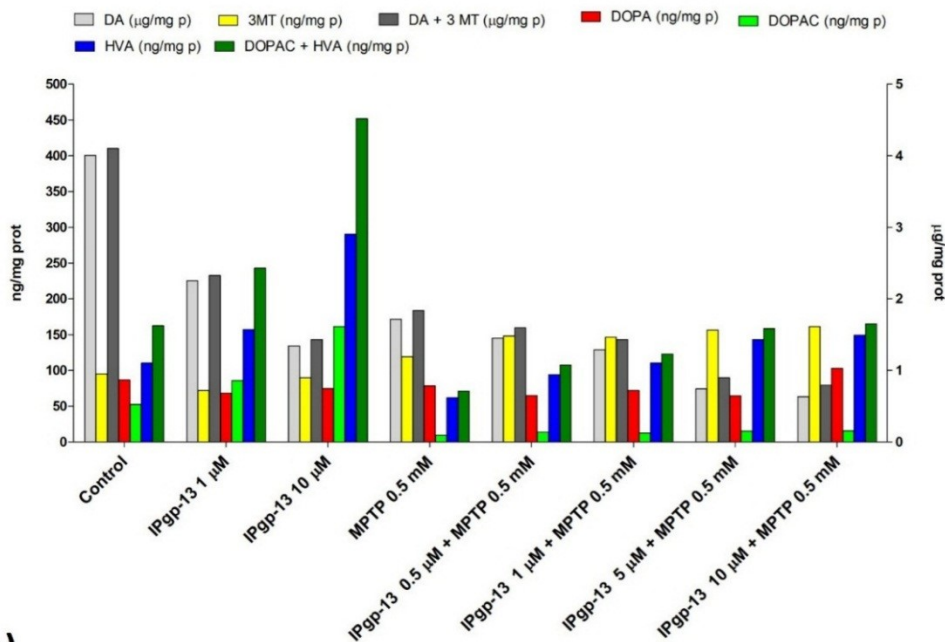


Figura 40. Effetto di concentrazioni crescenti di IPgp-13 su cellule PC12 esposte a MPTP per 48h e 72h. Il saggio di vitalità MTT è stato effettuato sulla linea cellulare PC12 esposta per 48h (a) e 72h (b) a concentrazioni crescenti della molecola IPgp-13 (0.1, 0.5, 1, 5 e 10 μ M) in presenza di MPTP (0.5 mM). (* $p < 0.05$ vs Control) (# $p < 0.05$ vs MPTP 0.5 mM).

Analisi neurochimiche sui campioni di cellule trattate con l'inibitore di pompa in presenza di MPTP hanno evidenziato variazioni dei livelli intracellulari ed extracellulari di dopamina e dei suoi metaboliti (figura 41 e 42).

a)



b)

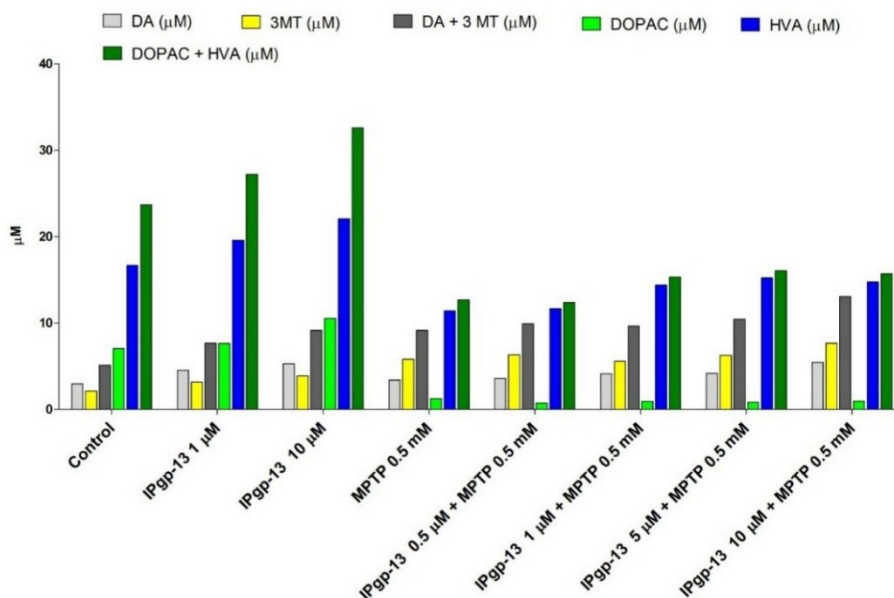


Figura 41. Effetto di concentrazioni crescenti di IPgp-13 sui livelli intracellulari (a) ed extracellulari (b) di dopamina e dei suoi metaboliti in cellule PC12 esposte a MPTP per 48h. L'analisi HPLC è stata effettuata sulla linea cellulare PC12 esposta per 48h a concentrazioni crescenti della molecola IPgp-13 (0.5, 1, 5 e 10 μ M) in presenza di MPTP (0.5 mM).

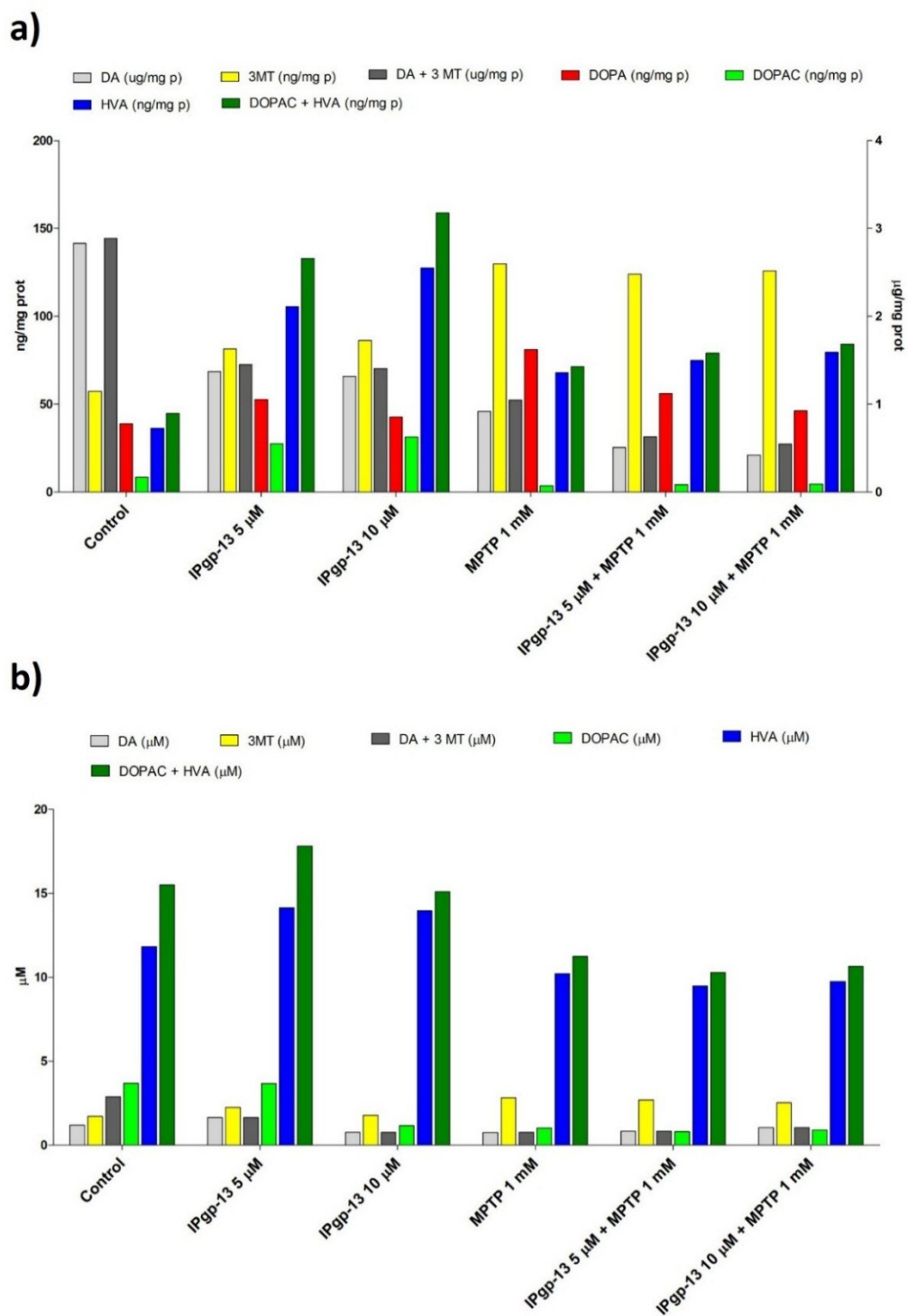


Figura 42. Effetto di concentrazioni crescenti di IPgp-13 sui livelli intracellulari (a) ed extracellulari (b) di dopamina e dei suoi metaboliti in cellule PC12 esposte a MPTP per 24h. L'analisi HPLC è stata effettuata sulla linea cellulare PC12 esposta per 24h a concentrazioni crescenti della molecola IPgp-13 (5 e 10 µM) in presenza di MPTP (1 mM).

I dati ottenuti conducono l'indagine alla valutazione degli effetti citotossici che questo tipo di molecole potrebbero avere sulle cellule, concentrando al loro interno non solo farmaci utili alla terapia ma anche neurotossine ambientali, batteri e metaboliti endogeni tossici.

In questa ultima parte di tesi sono state valutate sostanze attive da un'altra prospettiva, quella della citotossicità come strumento di terapia farmacologica da ampliare in un prossimo futuro.

Bibliografia

- 1 Illis, L. S. Central nervous system regeneration does not occur. *Spinal cord* **50**, 259-263, doi:10.1038/sc.2011.132 (2012).
- 2 Schweichel, J. U. & Merker, H. J. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* **7**, 253-266, doi:10.1002/tera.1420070306 (1973).
- 3 Clarke, P. G. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anatomy and embryology* **181**, 195-213 (1990).
- 4 Radi, E., Formichi, P., Battisti, C. & Federico, A. Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **42 Suppl 3**, S125-152, doi:10.3233/JAD-132738 (2014).
- 5 Gazewood, J. D., Richards, D. R. & Clebak, K. Parkinson disease: an update. *American family physician* **87**, 267-273 (2013).
- 6 Amano, S., Roemmich, R. T., Skinner, J. W. & Hass, C. J. Ambulation and Parkinson disease. *Physical medicine and rehabilitation clinics of North America* **24**, 371-392, doi:10.1016/j.pmr.2012.11.003 (2013).
- 7 Migheli, R. *et al.* Enhancing effect of manganese on L-DOPA-induced apoptosis in PC12 cells: role of oxidative stress. *Journal of neurochemistry* **73**, 1155-1163 (1999).
- 8 Shi, S. *et al.* KHSRP participates in manganese-induced neurotoxicity in rat striatum and PC12 cells. *Journal of molecular neuroscience : MN* **55**, 454-465, doi:10.1007/s12031-014-0367-7 (2015).
- 9 Dias, V., Junn, E. & Mouradian, M. M. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's disease* **3**, 461-491, doi:10.3233/JPD-130230 (2013).
- 10 Sian, J. *et al.* Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Annals of neurology* **36**, 348-355, doi:10.1002/ana.410360305 (1994).
- 11 Jenner, P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Annals of neurology* **53 Suppl 3**, S26-36; discussion S36-28, doi:10.1002/ana.10483 (2003).
- 12 Hattoria, N. *et al.* Toxic effects of dopamine metabolism in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders* **15 Suppl 1**, S35-38, doi:10.1016/S1353-8020(09)70010-0 (2009).
- 13 Serra, P. A., Pluchino, S., Marchetti, B., Desole, M. S. & Miele, E. The MPTP mouse model: cues on DA release and neural stem cell restorative role. *Parkinsonism & related disorders* **14 Suppl 2**, S189-193, doi:10.1016/j.parkreldis.2008.04.029 (2008).
- 14 Basma, A. N., Morris, E. J., Nicklas, W. J. & Geller, H. M. L-dopa cytotoxicity to PC12 cells in culture is via its autoxidation. *Journal of neurochemistry* **64**, 825-832 (1995).
- 15 Spencer, J. P., Jenner, P. & Halliwell, B. Superoxide-dependent depletion of reduced glutathione by L-DOPA and dopamine. Relevance to Parkinson's disease. *Neuroreport* **6**, 1480-1484 (1995).
- 16 Jez, M., Rozman, P., Ivanovic, Z. & Bas, T. Concise review: the role of oxygen in hematopoietic stem cell physiology. *Journal of cellular physiology* **230**, 1999-2005, doi:10.1002/jcp.24953 (2015).
- 17 Halliwell, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of neurochemistry* **97**, 1634-1658, doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x (2006).
- 18 Ahdab-Barmada, M., Moossy, J., Nemoto, E. M. & Lin, M. R. Hyperoxia produces neuronal necrosis in the rat. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **45**, 233-246 (1986).

- 19 Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E. & Offen, D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* **40**, 959-975 (2001).
- 20 Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P. & Mahajan, R. T. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current neuropharmacology* **7**, 65-74, doi:10.2174/157015909787602823 (2009).
- 21 Gandhi, S. & Abramov, A. Y. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2012**, 428010, doi:10.1155/2012/428010 (2012).
- 22 McCord, J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American journal of medicine* **108**, 652-659 (2000).
- 23 Angelova, P. R. & Abramov, A. Y. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. *FEBS letters* **592**, 692-702, doi:10.1002/1873-3468.12964 (2018).
- 24 Kadiiska, M. B. *et al.* Biomarkers of oxidative stress study V: ozone exposure of rats and its effect on lipids, proteins, and DNA in plasma and urine. *Free radical biology & medicine* **61**, 408-415, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.023 (2013).
- 25 Rizzo, A. M. *et al.* Endogenous antioxidants and radical scavengers. *Advances in experimental medicine and biology* **698**, 52-67, doi:10.1007/978-1-4419-7347-4_5 (2010).
- 26 Djordjevic, V. B. Free radicals in cell biology. *International review of cytology* **237**, 57-89, doi:10.1016/S0074-7696(04)37002-6 (2004).
- 27 J. William, D. L. The Case of the Frozen Addicts: How the Solution of a Medical Mystery revolutionized the Understanding of Parkinson's Disease
- 28 Moratalla, R. *et al.* Differential vulnerability of primate caudate-putamen and striosome-matrix dopamine systems to the neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 3859-3863 (1992).
- 29 Pifl, C., Schingnitz, G. & Hornykiewicz, O. Effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on the regional distribution of brain monoamines in the rhesus monkey. *Neuroscience* **44**, 591-605 (1991).
- 30 Barraud, Q. *et al.* Neuroanatomical study of the A11 diencephalospinal pathway in the non-human primate. *PLoS one* **5**, e13306, doi:10.1371/journal.pone.0013306 (2010).
- 31 Chaumette, T. *et al.* Neurochemical plasticity in the enteric nervous system of a primate animal model of experimental Parkinsonism. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* **21**, 215-222, doi:10.1111/j.1365-2982.2008.01226.x (2009).
- 32 Langston, J. W., Irwin, I., Langston, E. B. & Forno, L. S. Pargyline prevents MPTP-induced parkinsonism in primates. *Science* **225**, 1480-1482 (1984).
- 33 Russ, H., Staust, K., Martel, F., Gliese, M. & Schomig, E. The extraneuronal transporter for monoamine transmitters exists in cells derived from human central nervous system glia. *The European journal of neuroscience* **8**, 1256-1264 (1996).
- 34 Przedborski, S. *et al.* Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 4565-4571 (1996).

- 35 Suzuki, K., Mizuno, Y. & Yoshida, M. Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-like compounds on mitochondrial respiration. *Advances in neurology* **53**, 215-218 (1990).
- 36 Chan, P., DeLanney, L. E., Irwin, I., Langston, J. W. & Di Monte, D. Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain. *Journal of neurochemistry* **57**, 348-351 (1991).
- 37 Ischiropoulos, H. & al-Mehdi, A. B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS letters* **364**, 279-282 (1995).
- 38 Ara, J. *et al.* Inactivation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxynitrite and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 7659-7663 (1998).
- 39 Cosi, C. & Marien, M. Implication of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in neurodegeneration and brain energy metabolism. Decreases in mouse brain NAD⁺ and ATP caused by MPTP are prevented by the PARP inhibitor benzamide. *Annals of the New York Academy of Sciences* **890**, 227-239 (1999).
- 40 Hashimoto, M. *et al.* Oxidative stress induces amyloid-like aggregate formation of NACP/alpha-synuclein in vitro. *Neuroreport* **10**, 717-721 (1999).
- 41 Cassarino, D. S., Parks, J. K., Parker, W. D., Jr. & Bennett, J. P., Jr. The parkinsonian neurotoxin MPP⁺ opens the mitochondrial permeability transition pore and releases cytochrome c in isolated mitochondria via an oxidative mechanism. *Biochimica et biophysica acta* **1453**, 49-62 (1999).
- 42 Lau, Y. S., Fung, Y. K., Trobough, K. L., Cashman, J. R. & Wilson, J. A. Depletion of striatal dopamine by the N-oxide of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Neurotoxicology* **12**, 189-199 (1991).
- 43 Meredith, G. E. & Rademacher, D. J. MPTP mouse models of Parkinson's disease: an update. *Journal of Parkinson's disease* **1**, 19-33, doi:10.3233/JPD-2011-11023 (2011).
- 44 Meredith, G. E., Totterdell, S., Beales, M. & Meshul, C. K. Impaired glutamate homeostasis and programmed cell death in a chronic MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Experimental neurology* **219**, 334-340, doi:10.1016/j.expneurol.2009.06.005 (2009).
- 45 Kurkowska-Jastrzebska, I. *et al.* Decreased inflammation and augmented expression of trophic factors correlate with MOG-induced neuroprotection of the injured nigrostriatal system in the murine MPTP model of Parkinson's disease. *International immunopharmacology* **9**, 781-791, doi:10.1016/j.intimp.2009.03.003 (2009).
- 46 Dauer, W. & Przedborski, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* **39**, 889-909 (2003).
- 47 Erikson, K. M., Syversen, T., Aschner, J. L. & Aschner, M. Interactions between excessive manganese exposures and dietary iron-deficiency in neurodegeneration. *Environmental toxicology and pharmacology* **19**, 415-421, doi:10.1016/j.etap.2004.12.053 (2005).
- 48 Sidoryk-Wegrzynowicz, M. & Aschner, M. Manganese toxicity in the central nervous system: the glutamine/glutamate-gamma-aminobutyric acid cycle. *Journal of internal medicine* **273**, 466-477, doi:10.1111/joim.12040 (2013).
- 49 Wasserman, G. A. *et al.* Water manganese exposure and children's intellectual function in Araihasar, Bangladesh. *Environmental health perspectives* **114**, 124-129, doi:10.1289/ehp.8030 (2006).

- 50 Krachler, M., Domej, W. & Irgolic, K. J. Concentrations of trace elements in osteoarthritic knee-joint effusions. *Biological trace element research* **75**, 253-263, doi:10.1385/BTER:75:1-3:253 (2000).
- 51 Finkelstein, M. M. & Jerrett, M. A study of the relationships between Parkinson's disease and markers of traffic-derived and environmental manganese air pollution in two Canadian cities. *Environmental research* **104**, 420-432, doi:10.1016/j.envres.2007.03.002 (2007).
- 52 Lander, F., Kristiansen, J. & Lauritsen, J. M. Manganese exposure in foundry furnacemen and scrap recycling workers. *International archives of occupational and environmental health* **72**, 546-550 (1999).
- 53 Cotzias, G. C. & Greenough, J. J. The high specificity of the manganese pathway through the body. *The Journal of clinical investigation* **37**, 1298-1305, doi:10.1172/JCI103718 (1958).
- 54 Roth, J. A. & Garrick, M. D. Iron interactions and other biological reactions mediating the physiological and toxic actions of manganese. *Biochemical pharmacology* **66**, 1-13 (2003).
- 55 Wang, D., Du, X. & Zheng, W. Alteration of saliva and serum concentrations of manganese, copper, zinc, cadmium and lead among career welders. *Toxicology letters* **176**, 40-47, doi:10.1016/j.toxlet.2007.10.003 (2008).
- 56 Lucchini, R., Bergamaschi, E., Smargiassi, A., Festa, D. & Apostoli, P. Motor function, olfactory threshold, and hematological indices in manganese-exposed ferroalloy workers. *Environmental research* **73**, 175-180, doi:10.1006/enrs.1997.3702 (1997).
- 57 Lucchini, R. G., Martin, C. J. & Doney, B. C. From manganism to manganese-induced parkinsonism: a conceptual model based on the evolution of exposure. *Neuromolecular medicine* **11**, 311-321, doi:10.1007/s12017-009-8108-8 (2009).
- 58 Olanow, C. W. Manganese-induced parkinsonism and Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1012**, 209-223 (2004).
- 59 Neff, N. H., Barrett, R. E. & Costa, E. Selective depletion of caudate nucleus dopamine and serotonin during chronic manganese dioxide administration to squirrel monkeys. *Experientia* **25**, 1140-1141 (1969).
- 60 Chandra S, S. R., Shukla G. Regional distribution of metals and biogenic amines in the brain of monkeys exposed to manganese. *Toxicol Lett.* **4**, 189-192 (1979).
- 61 Bird, E. D., Anton, A. H. & Bullock, B. The effect of manganese inhalation on basal ganglia dopamine concentrations in rhesus monkey. *Neurotoxicology* **5**, 59-65 (1984).
- 62 Cai, T. *et al.* Manganese induces the overexpression of alpha-synuclein in PC12 cells via ERK activation. *Brain research* **1359**, 201-207, doi:10.1016/j.brainres.2010.08.055 (2010).
- 63 Hirata, Y. Manganese-induced apoptosis in PC12 cells. *Neurotoxicology and teratology* **24**, 639-653 (2002).
- 64 Aschner, M., Vrana, K. E. & Zheng, W. Manganese uptake and distribution in the central nervous system (CNS). *Neurotoxicology* **20**, 173-180 (1999).
- 65 Lai, J. C., Minski, M. J., Chan, A. W., Leung, T. K. & Lim, L. Manganese mineral interactions in brain. *Neurotoxicology* **20**, 433-444 (1999).
- 66 Li, G. J., Zhang, L. L., Lu, L., Wu, P. & Zheng, W. Occupational exposure to welding fume among welders: alterations of manganese, iron, zinc, copper, and lead in body fluids and the oxidative stress status. *Journal of occupational and environmental*

- medicine / American College of Occupational and Environmental Medicine* **46**, 241-248 (2004).
- 67 Bernhoft, R. A. Cadmium toxicity and treatment. *TheScientificWorldJournal* **2013**, 394652, doi:10.1155/2013/394652 (2013).
- 68 Friberg, L. Cadmium. *Annual review of public health* **4**, 367-373, doi:10.1146/annurev.pu.04.050183.002055 (1983).
- 69 Abernethy, D. R., Destefano, A. J., Cecil, T. L., Zaidi, K. & Williams, R. L. Metal impurities in food and drugs. *Pharmaceutical research* **27**, 750-755, doi:10.1007/s11095-010-0080-3 (2010).
- 70 Matovic, V., Buha, A., Bulat, Z. & Dukic-Cosic, D. Cadmium toxicity revisited: focus on oxidative stress induction and interactions with zinc and magnesium. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **62**, 65-76, doi:10.2478/10004-1254-62-2011-2075 (2011).
- 71 Valko, M., Morris, H. & Cronin, M. T. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current medicinal chemistry* **12**, 1161-1208 (2005).
- 72 Wang, B., Li, Y., Shao, C., Tan, Y. & Cai, L. Cadmium and its epigenetic effects. *Current medicinal chemistry* **19**, 2611-2620 (2012).
- 73 Schauder, A., Avital, A. & Malik, Z. Regulation and gene expression of heme synthesis under heavy metal exposure--review. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer* **29**, 137-158 (2010).
- 74 Zhiheng Zhou, C. W., Haibai Liu, Qin Hai Huang, Min Wang and Yixiong Lei. Cadmium Induced Cell Apoptosis, DNA Damage, Decreased DNA Repair Capacity, and Genomic Instability during Malignant Transformation of Human Bronchial Epithelial Cells. *Int J Med Sci.* **11** **246**, 246 (2014).
- 75 Shagirtha, K., Muthumani, M. & Prabu, S. M. Melatonin abrogates cadmium induced oxidative stress related neurotoxicity in rats. *European review for medical and pharmacological sciences* **15**, 1039-1050 (2011).
- 76 Chen, S. *et al.* CaMKII is involved in cadmium activation of MAPK and mTOR pathways leading to neuronal cell death. *Journal of neurochemistry* **119**, 1108-1118, doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07493.x (2011).
- 77 Bodereau-Dubois, B. *et al.* Transmembrane potential polarization, calcium influx, and receptor conformational state modulate the sensitivity of the imidacloprid-insensitive neuronal insect nicotinic acetylcholine receptor to neonicotinoid insecticides. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **341**, 326-339, doi:10.1124/jpet.111.188060 (2012).
- 78 Chenyang Jiang, Y. Y., Feifei Hu, Qiwen Wang, Kangbao Zhang, Yi Wang, Jianhong Gu, Xuezhong Liu, Jianchun Bian and Zongping Liu. Cadmium Induces PC12 Cells Apoptosis via an Extracellular Signal-Regulated Kinase and c-Jun N-Terminal Kinase-Mediated Mitochondrial Apoptotic Pathway. *Biological trace element research* **Volume 158**, pp 249–258 (2014).
- 79 Ben, P. *et al.* Protective Effect of L-Theanine on Cadmium-Induced Apoptosis in PC12 Cells by Inhibiting the Mitochondria-Mediated Pathway. *Neurochemical research* **40**, 1661-1670, doi:10.1007/s11064-015-1648-4 (2015).
- 80 Spagnuolo, C. *et al.* Genistein and cancer: current status, challenges, and future directions. *Adv Nutr* **6**, 408-419, doi:10.3945/an.114.008052 (2015).

- 81 Pham, J., Brownlow, B. & Elbayoumi, T. Mitochondria-specific pro-apoptotic activity of genistein lipidic nanocarriers. *Molecular pharmaceutics* **10**, 3789-3800, doi:10.1021/mp4004892 (2013).
- 82 Rahman Mazumder, M. A. & Hongsprabhas, P. Genistein as antioxidant and antibrowning agents in in vivo and in vitro: A review. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **82**, 379-392, doi:10.1016/j.biopha.2016.05.023 (2016).
- 83 Soni, M., White, L. R., Kridawati, A., Bandelow, S. & Hogervorst, E. Phytoestrogen consumption and risk for cognitive decline and dementia: With consideration of thyroid status and other possible mediators. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **160**, 67-77, doi:10.1016/j.jsbmb.2015.10.024 (2016).
- 84 Liao, W., Jin, G., Zhao, M., Yang, H. The effect of genistein on the content and activity of β -and γ -Secretase and protein kinase C in A-Injured hippocampal neurons. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **112**, 182–185 (2013).
- 85 Sadhukhan, P., Saha, S., Dutta, S., Mahalanobish, S. & Sil, P. C. Nutraceuticals: An emerging therapeutic approach against the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Pharmacological research* **129**, 100-114, doi:10.1016/j.phrs.2017.11.028 (2018).
- 86 Ma, W. *et al.* Genistein as a neuroprotective antioxidant attenuates redox imbalance induced by beta-amyloid peptides 25-35 in PC12 cells. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* **28**, 289-295, doi:10.1016/j.ijdevneu.2010.03.003 (2010).
- 87 Wu, H. C. *et al.* Neuroprotective effects of genistein on SH-SY5Y cells overexpressing A53T mutant alpha-synuclein. *Neural regeneration research* **13**, 1375-1383, doi:10.4103/1673-5374.235250 (2018).
- 88 Siddique, Y. H., Naz, F., Jyoti, S., Ali, F. & Rahul. Effect of Genistein on the Transgenic Drosophila Model of Parkinson's Disease. *Journal of dietary supplements*, 1-14, doi:10.1080/19390211.2018.1472706 (2018).
- 89 Du ZR, F. X., Li N, Qu JX, Feng L, Chen L, Chen WF. G protein-coupled estrogen receptor is involved in the anti-inflammatory effects of genistein in microglia. *Phytomedicine* **43**, 11-20, doi:10.1016/j.phymed.2018.03.039 (2018 Apr 1).
- 90 Yang, Z., Kulkarni, K., Zhu, W. & Hu, M. Bioavailability and pharmacokinetics of genistein: mechanistic studies on its ADME. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* **12**, 1264-1280 (2012).
- 91 Langasco, R., Fancello, S., Rassu, G., Cossu, M., Cavalli, R., Galleri, G., Giunchedi, P., Migheli, R., Gavini, R. Increasing protective activity of Genistein by loading into transfersomes: a new potential adjuvant in the oxidative stress-related neurodegenerative diseases? *Phytomedicine*, doi:10.1016/j.phymed.2018.09.207 (September 2018).
- 92 S. Bhagwat, D. B. H., J.M. Holden. USDA database for the flavonoid content of selected foods. *U.S. Department of Agriculture, USA, Beltsville* (2014).
- 93 Boots, A. W., Haenen, G. R. & Bast, A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *European journal of pharmacology* **585**, 325-337, doi:10.1016/j.ejphar.2008.03.008 (2008).
- 94 Dajas, F. Life or death: neuroprotective and anticancer effects of quercetin. *Journal of ethnopharmacology* **143**, 383-396, doi:10.1016/j.jep.2012.07.005 (2012).

- 95 Russo, M., Spagnuolo, C., Tedesco, I., Bilotto, S. & Russo, G. L. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. *Biochemical pharmacology* **83**, 6-15, doi:10.1016/j.bcp.2011.08.010 (2012).
- 96 Serban, M. C. *et al.* Effects of Quercetin on Blood Pressure: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Journal of the American Heart Association* **5**, doi:10.1161/JAHA.115.002713 (2016).
- 97 W. Wang, C. S., L. Mao, P. Ma, F. Liu, J. Yang, Y. Gao. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends in Food Science & Technology* **56**, 21-38 (2016).
- 98 Magalingam, K. B., Radhakrishnan, A., Ramdas, P. & Haleagrahara, N. Quercetin glycosides induced neuroprotection by changes in the gene expression in a cellular model of Parkinson's disease. *Journal of molecular neuroscience : MN* **55**, 609-617, doi:10.1007/s12031-014-0400-x (2015).
- 99 Ossola, B., Kaariainen, T. M. & Mannisto, P. T. The multiple faces of quercetin in neuroprotection. *Expert opinion on drug safety* **8**, 397-409, doi:10.1517/14740330903026944 (2009).
- 100 Mercer, L. D., Kelly, B. L., Horne, M. K. & Beart, P. M. Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in primary rat mesencephalic cultures. *Biochemical pharmacology* **69**, 339-345, doi:10.1016/j.bcp.2004.09.018 (2005).
- 101 Arredondo, F. *et al.* After cellular internalization, quercetin causes Nrf2 nuclear translocation, increases glutathione levels, and prevents neuronal death against an oxidative insult. *Free radical biology & medicine* **49**, 738-747, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.020 (2010).
- 102 Costa, L. G., Garrick, J. M., Roque, P. J. & Pellacani, C. Mechanisms of Neuroprotection by Quercetin: Counteracting Oxidative Stress and More. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2016**, 2986796, doi:10.1155/2016/2986796 (2016).
- 103 Gan, L. & Johnson, J. A. Oxidative damage and the Nrf2-ARE pathway in neurodegenerative diseases. *Biochimica et biophysica acta* **1842**, 1208-1218, doi:10.1016/j.bbadis.2013.12.011 (2014).
- 104 Saw, C. L. *et al.* The berry constituents quercetin, kaempferol, and pterostilbene synergistically attenuate reactive oxygen species: involvement of the Nrf2-ARE signaling pathway. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **72**, 303-311, doi:10.1016/j.fct.2014.07.038 (2014).
- 105 Moon, J. H., Tsushida, T., Nakahara, K. & Terao, J. Identification of quercetin 3-O-beta-D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. *Free radical biology & medicine* **30**, 1274-1285 (2001).
- 106 Shirai, M. *et al.* Effect of a conjugated quercetin metabolite, quercetin 3-glucuronide, on lipid hydroperoxide-dependent formation of reactive oxygen species in differentiated PC-12 cells. *Free radical research* **40**, 1047-1053, doi:10.1080/10715760600794287 (2006).
- 107 Men, K. *et al.* Nanoparticle-delivered quercetin for cancer therapy. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* **14**, 826-832 (2014).
- 108 Gupta, P., Authimoolam, S. P., Hilt, J. Z. & Dziubla, T. D. Quercetin conjugated poly(beta-amino esters) nanogels for the treatment of cellular oxidative stress. *Acta biomaterialia* **27**, 194-204, doi:10.1016/j.actbio.2015.08.039 (2015).

- 109 Koo, O. M., Rubinstein, I. & Onyuksel, H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* **1**, 193-212, doi:10.1016/j.nano.2005.06.004 (2005).
- 110 Wen, M. M. *et al.* Nanotechnology-based drug delivery systems for Alzheimer's disease management: Technical, industrial, and clinical challenges. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **245**, 95-107, doi:10.1016/j.jconrel.2016.11.025 (2017).
- 111 Akbarzadeh, A. *et al.* Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale research letters* **8**, 102, doi:10.1186/1556-276X-8-102 (2013).
- 112 Johnston, M. J. *et al.* Characterization of the drug retention and pharmacokinetic properties of liposomal nanoparticles containing dihydrosphingomyelin. *Biochimica et biophysica acta* **1768**, 1121-1127, doi:10.1016/j.bbamem.2007.01.019 (2007).
- 113 Jain N., J. R., Thakur N., Gupta B.P., Jain D.K., Banveer J., Jain S. Nanotechnology a safe and effective drug delivery system. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* **3** 159-165 (2010).
- 114 Salama, H. A., Mahmoud, A. A., Kamel, A. O., Abdel Hady, M. & Awad, G. A. Brain delivery of olanzapine by intranasal administration of transfersomal vesicles. *Journal of liposome research* **22**, 336-345, doi:10.3109/08982104.2012.700460 (2012).
- 115 Aboud, H. M., Ali, A. A., El-Menshawe, S. F. & Elbary, A. A. Nanotransfersomes of carvedilol for intranasal delivery: formulation, characterization and in vivo evaluation. *Drug delivery* **23**, 2471-2481, doi:10.3109/10717544.2015.1013587 (2016).
- 116 Pardeshi, C. V. & Belgamwar, V. S. Direct nose to brain drug delivery via integrated nerve pathways bypassing the blood-brain barrier: an excellent platform for brain targeting. *Expert opinion on drug delivery* **10**, 957-972, doi:10.1517/17425247.2013.790887 (2013).
- 117 Gavini, E. *et al.* Mucoadhesive microspheres for nasal administration of cyclodextrins. *Journal of drug targeting* **17**, 168-179, doi:10.1080/10611860802556842 (2009).
- 118 Gavini, E. *et al.* Influence of polymeric microcarriers on the in vivo intranasal uptake of an anti-migraine drug for brain targeting. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* **83**, 174-183, doi:10.1016/j.ejpb.2012.10.010 (2013).
- 119 Rassu, G. *et al.* Solid microparticles based on chitosan or methyl-beta-cyclodextrin: a first formulative approach to increase the nose-to-brain transport of deferoxamine mesylate. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **201**, 68-77, doi:10.1016/j.jconrel.2015.01.025 (2015).
- 120 Yalcin, A. *et al.* Neuroprotective Effects of Engineered Polymeric Nasal Microspheres Containing Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on beta-Amyloid (1-42)-Induced Toxicity. *Journal of pharmaceutical sciences* **105**, 2372-2380, doi:10.1016/j.xphs.2016.05.017 (2016).
- 121 R.A.A., M. Chitin and the human body. *Advances in Chitin Sciences*, 448-461 (1995).
- 122 Richardson, S. C., Kolbe, H. V. & Duncan, R. Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA. *International journal of pharmaceuticals* **178**, 231-243 (1999).

- 123 Zheng X., L. J., Deng L., Xiong Y., Chen J. Preparation and characterization of magnetic cationic liposome in gene delivery. *International journal of pharmaceutics* **366**, 211-217 (2009).
- 124 Agnihotri, S. A., Mallikarjuna, N. N. & Aminabhavi, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **100**, 5-28, doi:10.1016/j.jconrel.2004.08.010 (2004).
- 125 Li X, Q. J., Xie Y, Zhang X, Hu S, Xu Y, Lu Y, Wu W. Nanoemulsions coated with alginate/chitosan as oral insulin delivery systems: preparation, characterization, and hypoglycemic effect in rats. *Int J Nanomedicine* **8**, 23-32, doi:10.2147/IJN.S38507 (2013).
- 126 DenitsaAluani, V. e. a. Evaluation of biocompatibility and antioxidant efficiency of chitosan-alginate nanoparticles loaded with quercetin. *International Journal of Biological Macromolecules* **103**, 771-782 (2017).
- 127 Tzankova, V. *et al.* Hepatoprotective and antioxidant activity of quercetin loaded chitosan/alginate particles in vitro and in vivo in a model of paracetamol-induced toxicity. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **92**, 569-579, doi:10.1016/j.biopha.2017.05.008 (2017).
- 128 Loftsson, T., Jarho, P., Masson, M. & Jarvinen, T. Cyclodextrins in drug delivery. *Expert opinion on drug delivery* **2**, 335-351, doi:10.1517/17425247.2.1.335 (2005).
- 129 Zhu X., S. J., Wu J. Study on the inclusion interactions of B-cyclodextrin and its derivative with dyes by spectrofluorimetry and its analytical application. *Talanta* **72**, 237-242 (2007).
- 130 López-Nicolás J.M., R.-B. P., García-Carmona F. C. Cyclodextrins and antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr* **54**, 251-276 (2012).
- 131 Li Z., W. M., Wang F., Gu Z., Du G., Wu J., Chen J. γ -Cyclodextrins: A review on enzymatic production and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77** 245-255 (2007).
- 132 Salustio, P. J. *et al.* Advanced technologies for oral controlled release: cyclodextrins for oral controlled release. *AAPS PharmSciTech* **12**, 1276-1292, doi:10.1208/s12249-011-9690-2 (2011).
- 133 Uekama K., H. F., Arima H. Recent Aspect of Cyclodextrin-Based Drug Delivery System *Journal J Incl Phenom Macrocycl Chem.* , 3-8. (2006).
- 134 Zheng, Y. & Chow, A. H. Production and characterization of a spray-dried hydroxypropyl-beta-cyclodextrin/quercetin complex. *Drug development and industrial pharmacy* **35**, 727-734, doi:10.1080/03639040802526805 (2009).
- 135 Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G. A. & Meisel, A. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends in neurosciences* **36**, 587-597, doi:10.1016/j.tins.2013.07.001 (2013).
- 136 Camandola, S. & Mattson, M. P. Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration. *The EMBO journal* **36**, 1474-1492, doi:10.15252/emj.201695810 (2017).
- 137 Dienel, G. A. Fueling and imaging brain activation. *ASN neuro* **4**, doi:10.1042/AN20120021 (2012).

- 138 Stincone, A. *et al.* The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* **90**, 927-963, doi:10.1111/brv.12140 (2015).
- 139 Herrero-Mendez, A. *et al.* The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nature cell biology* **11**, 747-752, doi:10.1038/ncb1881 (2009).
- 140 Pellerin, L. & Magistretti, P. J. Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* **10**, 53-62, doi:10.1177/1073858403260159 (2004).
- 141 Chih, C. P. & Roberts, E. L., Jr. Energy substrates for neurons during neural activity: a critical review of the astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **23**, 1263-1281, doi:10.1097/01.WCB.0000081369.51727.6F (2003).
- 142 Dienel, G. A. Lack of appropriate stoichiometry: Strong evidence against an energetically important astrocyte-neuron lactate shuttle in brain. *Journal of neuroscience research* **95**, 2103-2125, doi:10.1002/jnr.24015 (2017).
- 143 Overgaard, M. *et al.* Hypoxia and exercise provoke both lactate release and lactate oxidation by the human brain. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **26**, 3012-3020, doi:10.1096/fj.11-191999 (2012).
- 144 Garcia-Caceres, C., Fuente-Martin, E., Argente, J. & Chowen, J. A. Emerging role of glial cells in the control of body weight. *Molecular metabolism* **1**, 37-46, doi:10.1016/j.molmet.2012.07.001 (2012).
- 145 Huttemann, M., Lee, I., Samavati, L., Yu, H. & Doan, J. W. Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling. *Biochimica et biophysica acta* **1773**, 1701-1720 (2007).
- 146 Kong, Y., Trabucco, S. E. & Zhang, H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and the mitochondria theory of aging. *Interdisciplinary topics in gerontology* **39**, 86-107, doi:10.1159/000358901 (2014).
- 147 Thompson Legault, J. *et al.* A Metabolic Signature of Mitochondrial Dysfunction Revealed through a Monogenic Form of Leigh Syndrome. *Cell reports* **13**, 981-989, doi:10.1016/j.celrep.2015.09.054 (2015).
- 148 Ross, J. M. *et al.* High brain lactate is a hallmark of aging and caused by a shift in the lactate dehydrogenase A/B ratio. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 20087-20092, doi:10.1073/pnas.1008189107 (2010).
- 149 Wilcox, G. Insulin and insulin resistance. *The Clinical biochemist. Reviews* **26**, 19-39 (2005).
- 150 Sonksen, P. & Sonksen, J. Insulin: understanding its action in health and disease. *British journal of anaesthesia* **85**, 69-79 (2000).
- 151 Youngren, J. F. Regulation of insulin receptor function. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **64**, 873-891, doi:10.1007/s00018-007-6359-9 (2007).
- 152 Saltiel, A. R. & Kahn, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**, 799-806, doi:10.1038/414799a (2001).
- 153 Gray, S. M., Meijer, R. I. & Barrett, E. J. Insulin regulates brain function, but how does it get there? *Diabetes* **63**, 3992-3997, doi:10.2337/db14-0340 (2014).

- 154 Bessman, S. P., Mohan, C. & Zaidise, I. Intracellular site of insulin action: mitochondrial Krebs cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 5067-5070 (1986).
- 155 Boirie, Y. Insulin regulation of mitochondrial proteins and oxidative phosphorylation in human muscle. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **14**, 393-394 (2003).
- 156 Hu, G. *et al.* Body mass index and the risk of Parkinson disease. *Neurology* **67**, 1955-1959, doi:10.1212/01.wnl.0000247052.18422.e5 (2006).
- 157 Hu, G., Antikainen, R., Jousilahti, P., Kivipelto, M. & Tuomilehto, J. Total cholesterol and the risk of Parkinson disease. *Neurology* **70**, 1972-1979, doi:10.1212/01.wnl.0000312511.62699.a8 (2008).
- 158 Hu, G., Jousilahti, P., Bidel, S., Antikainen, R. & Tuomilehto, J. Type 2 diabetes and the risk of Parkinson's disease. *Diabetes care* **30**, 842-847, doi:10.2337/dc06-2011 (2007).
- 159 Aviles-Olmos, I., Limousin, P., Lees, A. & Foltynie, T. Parkinson's disease, insulin resistance and novel agents of neuroprotection. *Brain : a journal of neurology* **136**, 374-384, doi:10.1093/brain/aws009 (2013).
- 160 Athauda, D. & Foltynie, T. Insulin resistance and Parkinson's disease: A new target for disease modification? *Progress in neurobiology* **145-146**, 98-120, doi:10.1016/j.pneurobio.2016.10.001 (2016).
- 161 Choi, J. Y., Jang, E.H., Park, C.S., Kang, J.H. Enhanced susceptibility to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity in high-fat diet-induced obesity. *Free radical biology & medicine* **38**, pp. 806-816. (2005).
- 162 Dehmer, T., Heneka, M. T., Sastre, M., Dichgans, J. & Schulz, J. B. Protection by pioglitazone in the MPTP model of Parkinson's disease correlates with I kappa B alpha induction and block of NF kappa B and iNOS activation. *Journal of neurochemistry* **88**, 494-501 (2004).
- 163 Lee, E. Y., Lee, J. E., Park, J. H., Shin, I. C. & Koh, H. C. Rosiglitazone, a PPAR-gamma agonist, protects against striatal dopaminergic neurodegeneration induced by 6-OHDA lesions in the substantia nigra of rats. *Toxicology letters* **213**, 332-344, doi:10.1016/j.toxlet.2012.07.016 (2012).
- 164 Corona, J. C., de Souza, S. C. & Duchen, M. R. PPARgamma activation rescues mitochondrial function from inhibition of complex I and loss of PINK1. *Experimental neurology* **253**, 16-27, doi:10.1016/j.expneurol.2013.12.012 (2014).
- 165 Fujita, K., Lazarovici, P. & Guroff, G. Regulation of the differentiation of PC12 pheochromocytoma cells. *Environmental health perspectives* **80**, 127-142 (1989).
- 166 Karten, B., Hayashi, H., Campenot, R. B., Vance, D. E. & Vance, J. E. Neuronal models for studying lipid metabolism and transport. *Methods* **36**, 117-128, doi:10.1016/j.ymeth.2004.11.004 (2005).
- 167 Goldstein, D. S. *et al.* Vesicular uptake blockade generates the toxic dopamine metabolite 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde in PC12 cells: relevance to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* **123**, 932-943, doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07924.x (2012).
- 168 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. *Journal of pharmaceutical sciences* **79**, 476-482 (1990).

- 169 Hidalgo, I. J., Raub, T. J. & Borchardt, R. T. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* **96**, 736-749 (1989).
- 170 Pinna, A., Malfatti, L., Galleri, G., Manetti, R., Cossu, S., Rocchitta, G., Migheli, R., Serra, P.A., Innocenzi, P. Ceria nanoparticles for the treatment of Parkinsonlike diseases induced by chronic manganese intoxication. *RSC Adv.* **5**, 20432 (2015).
- 171 D'Antuono, I., Garbetta, A., Linsalata, V., Minervini, F. & Cardinali, A. Polyphenols from artichoke heads (*Cynara cardunculus* (L.) subsp. *scolymus* Hayek): in vitro bio-accessibility, intestinal uptake and bioavailability. *Food & function* **6**, 1268-1277, doi:10.1039/c5fo00137d (2015).
- 172 Rocchitta, G. *et al.* Simultaneous telemetric monitoring of brain glucose and lactate and motion in freely moving rats. *Analytical chemistry* **85**, 10282-10288, doi:10.1021/ac402071w (2013).
- 173 Hauser, D. N. & Hastings, T. G. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism. *Neurobiology of disease* **51**, 35-42, doi:10.1016/j.nbd.2012.10.011 (2013).
- 174 Sies, H. Role of Reactive Oxygen Species in Biological Processes. *Klin Wochenschr* **69**, 965-968, doi:Doi 10.1007/Bf01645140 (1991).
- 175 Rizzo, A. M. *et al.* Endogenous antioxidants and radical scavengers. *Biological Reactive Intermediates Iv* **698**, 52-67, doi:10.1007/978-1-4419-7347-4_5 (2010).
- 176 Kim, G. H., Kim, J. E., Rhie, S. J. & Yoon, S. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Experimental neurobiology* **24**, 325-340, doi:10.5607/en.2015.24.4.325 (2015).
- 177 Rego, A. C. & Oliveira, C. R. Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochemical research* **28**, 1563-1574 (2003).
- 178 Kumar, S. & Pandey, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *TheScientificWorldJournal* **2013**, 162750, doi:10.1155/2013/162750 (2013).
- 179 Spagnuolo, C. *et al.* Neuroprotective Role of Natural Polyphenols. *Current topics in medicinal chemistry* **16**, 1943-1950 (2016).
- 180 Spagnuolo, C., Moccia, S. & Russo, G. L. Anti-inflammatory effects of flavonoids in neurodegenerative disorders. *European journal of medicinal chemistry* **153**, 105-115, doi:10.1016/j.ejmech.2017.09.001 (2018).
- 181 Liu, H., Liu, W., Zhou, X., Long, C., Kuang, X., Hu, J., Tang, Y., Liu, L., He, J., Huang, Z., Fan, Y., Jin, G., Zhang, Q., Shen, H. Protective effect of lutein on ARPE-19 cells upon H₂O₂-induced G2/M arrest. *Mol. Med. Rep.* **16** 2069-2074 (2017).
- 182 Sandhir, R., Yadav, A., Sunkaria, A. & Singhal, N. Nano-antioxidants: An emerging strategy for intervention against neurodegenerative conditions. *Neurochemistry international* **89**, 209-226, doi:10.1016/j.neuint.2015.08.011 (2015).
- 183 Li, J., Cheng, X., Chen, Y., He, W., Ni, L., Xiong, P., Wei, M. . Vitamin E TPGS modified liposomes enhance cellular uptake and targeted delivery of luteolin: An in vivo/in vitro evaluation. *Int. J. Pharm.* **512** 262-272 (2016).
- 184 Tavakkoli, M., Miri, R., Jassbi, A.R., Erfani, N., Asadollahi, M., Ghasemi, M., Saso, L., Firuzi, O. *Carthamus*, *Salvia* and *Stachys* species protect neuronal cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Pharm Biol.* **52**, 1550-1557 (2014).

- 185 Abarikwu, S. O., Pant, A. B. & Farombi, E. O. Dietary antioxidant, quercetin, protects sertoli-germ cell coculture from atrazine-induced oxidative damage. *Journal of biochemical and molecular toxicology* **26**, 477-485, doi:10.1002/jbt.21449 (2012).
- 186 Celesia, G. G. & Wanamaker, W. M. L-dopa-carbidopa: combined therapy for the treatment of Parkinson's disease. *Diseases of the nervous system* **37**, 123-125 (1976).
- 187 Desole, M. S. *et al.* Role of oxidative stress in the manganese and 1-methyl-4-(2'-ethylphenyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced apoptosis in PC12 cells. *Neurochemistry international* **31**, 169-176 (1997).
- 188 Yuan Y, W. Y., Hu FF, Jiang CY, Zhang YJ, Yang JL, Zhao SW, Gu JH, Liu XZ, Bian JC, Liu ZP. Cadmium Activates Reactive Oxygen Species-dependent AKT/mTOR and Mitochondrial Apoptotic Pathways in Neuronal Cells. *Biomed Environ Sci.* **29** 117-126, doi:10.3967/bes2016.013 (2016).
- 189 Cai L, Y. R., Hao X, Ding X. Folate Receptor-targeted Bioflavonoid Genistein-loaded Chitosan Nanoparticles for Enhanced Anticancer Effect in Cervical Cancers. *Nanoscale Res Lett.* **12**, doi:10.1186/s11671-017-2253-z. (2017).
- 190 Kurkov, S. V. & Loftsson, T. Cyclodextrins. *International journal of pharmaceutics* **453**, 167-180, doi:10.1016/j.ijpharm.2012.06.055 (2013).
- 191 Reti-Nagy, K. *et al.* Endocytosis of fluorescent cyclodextrins by intestinal Caco-2 cells and its role in paclitaxel drug delivery. *International journal of pharmaceutics* **496**, 509-517, doi:10.1016/j.ijpharm.2015.10.049 (2015).
- 192 Cohen, G. & Kesler, N. Monoamine oxidase inhibits mitochondrial respiration. *Annals of the New York Academy of Sciences* **893**, 273-278 (1999).
- 193 Chenal, J., Pierre, K. & Pellerin, L. Insulin and IGF-1 enhance the expression of the neuronal monocarboxylate transporter MCT2 by translational activation via stimulation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *The European journal of neuroscience* **27**, 53-65, doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05981.x (2008).
- 194 Barbaferi, M., Dadea, C., Tassi, E., Bretzel, F. & Fanfani, L. Uptake of heavy metals by native species growing in a mining area in Sardinia, Italy: discovering native flora for phytoremediation. *International journal of phytoremediation* **13**, 985-997, doi:10.1080/15226514.2010.549858 (2011).
- 195 Schinella, G. R., Tournier, H. A., Prieto, J. M., de Buschiazzo, P. M. & Rios, J. L. Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life sciences* **70**, 1023-1033, doi:10.1016/S0024-3205(01)01482-5 (2002).
- 196 Talib, W. H., Abu Zarga, M. H. & Mahasneh, A. M. Antiproliferative, Antimicrobial and Apoptosis Inducing Effects of Compounds Isolated from *Inula viscosa*. *Molecules* **17**, 3291-3303, doi:10.3390/molecules17033291 (2012).
- 197 Kheyar-Kraouche, N., da Silva, A. B., Serra, A. T., Bedjou, F. & Bronze, M. R. Characterization by liquid chromatography-mass spectrometry and antioxidant activity of an ethanolic extract of *Inula viscosa* leaves. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **156**, 297-306, doi:10.1016/j.jpba.2018.04.047 (2018).
- 198 Drexler, H. G., Matsuo, Y. & Minowada, J. Proposals for the characterization and description of new human leukemia-lymphoma cell lines. *Human cell* **11**, 51-60 (1998).
- 199 Drexler, H. G. & Minowada, J. History and classification of human leukemia-lymphoma cell lines. *Leukemia & lymphoma* **31**, 305-316, doi:10.3109/10428199809059223 (1998).

- 200 Sun, J., Deng, Z. & Yan, A. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and biophysical research communications* **453**, 254-267, doi:10.1016/j.bbrc.2014.05.090 (2014).
- 201 Hernandez, A., Serrano-Bueno, G., Perez-Castineira, J. R. & Serrano, A. Intracellular proton pumps as targets in chemotherapy: V-ATPases and cancer. *Current pharmaceutical design* **18**, 1383-1394 (2012).