

PROGETTO DI RICERCA E PIANO DI FORMAZIONE

Titolo del Progetto:

VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ NEUROPROTETTIVA DI NANOIDROGEL CARICATI CON SULFORAFANE E ISOLIQUIRITIGENINA

(English title: EVALUATION OF THE NEUROPROTECTIVE ACTIVITY OF NANOHYDROGELS LOADED WITH SULFORAPHANE AND ISOLIQUIRITIGENIN)

TUTOR: Prof.ssa Cristina Angeloni

Le patologie neurodegenerative, tra cui l'Alzheimer, il Parkinson, la corea di Huntington e la sclerosi multipla, sono un gruppo di patologie eterogenee incurabili caratterizzate dalla graduale degenerazione della funzione e della struttura dei neuroni e dall'iperattivazione delle cellule neurogliali nel sistema nervoso centrale [1]. Ad oggi, i precisi meccanismi molecolari correlati alla patogenesi e alla progressione di queste patologie non sono ancora stati del tutto chiariti [2]. Tra i molti fattori di rischio, il processo di invecchiamento ha l'impatto più forte [3]. Sebbene ciascuna patologia presenti caratteristiche patologiche specifiche, sono stati identificati meccanismi molecolari comuni, come l'aggregazione di proteine mal ripiegate, il danno ossidativo, la disfunzione mitocondriale, il danno al DNA, la neuroeccitotossicità e la neuroinfiammazione [4][5]. Tra questi, infiammazione e stress ossidativo svolgono un ruolo critico sia nelle fasi iniziali e avanzate delle diverse patologie sia nell'invecchiamento [6-8].

Negli ultimi anni, sempre più studi hanno evidenziato il ruolo chiave del sistema immunitario nell'innescare e nella progressione della neurodegenerazione [9]. Le cellule della microglia sono le cellule immunitarie innate residenti nel sistema nervoso centrale e svolgono un ruolo importante nelle risposte infiammatorie [10]. Le cellule della microglia attivate possono essere divise in due fenotipi: M1 e M2 [11]. Il fenotipo M1 promuove l'infiammazione e il danno neuronale, mentre M2 regola le funzioni immunitarie e promuove la riparazione dei danni a livello del sistema nervoso centrale [12]. Le cellule della microglia con fenotipo M1 producono citochine infiammatorie come IL-1 β e TNF- α , specie reattive dell'ossigeno (ROS) e inducono l'attività della ossido nitrico sintasi (NOS). In contrasto, le cellule con fenotipo M2 secernono citochine anti-infiammatorie, come IL-10, e esprimono CD206, la citochina anti-infiammatoria CCL22 e arginasi 1 (Arg 1) [13]. Studi precedenti hanno dimostrato che diversi agenti inibitori della fenotipo M1 non hanno portato a benefici nel

trattamento delle patologie neurodegenerative [14], dimostrando che la sola inibizione delle microglia M1 non è sufficiente. Al contrario, stimolare l'attivazione del fenotipo M2 potrebbe essere una strategia più efficace nel controllo dell'infiammazione neurologica [15,16]. L'infiammazione è, inoltre, strettamente correlata allo stress ossidativo e il termine "oxinflammation" è stato proposto per descrivere il circolo vizioso che si instaura tra infiammazione cronica e stress ossidativo [17,18]. Molti dei protagonisti di questa intricata correlazione sono controllati dalla via di segnalazione Keap1/Nrf2/ARE, il principale regolatore dei geni antiossidanti e detossificanti di fase II [19]. Questa via ha anche un ruolo fondamentale nell'infiammazione e, quindi, possiede un grande potenziale nel trattamento della neurodegenerazione [20].

Nonostante le numerose ricerche volte allo sviluppo di soluzioni efficaci nei confronti della neurodegenerazione, non esistono, ad oggi, terapie efficaci in grado di rallentare/arrestare la progressione della maggior parte delle patologie neurodegenerative. Dopo i numerosi insuccessi ottenuti in trial clinici condotti con composti diretti contro un singolo bersaglio molecolare, attualmente si riconosce che è necessario adottare un approccio pleiotropico a causa della natura multifattoriale di queste patologie [21]. In questo contesto, i composti bioattivi naturali rappresentano una fonte privilegiata di composti grazie al loro elevato profilo di sicurezza e potenziale multi-target. Tra di essi, il sulforafane (SFN), un isotiocianato derivato dal glucorafanina presente nelle brassicacee, e l'isoliquiritigenina (ILQ), un flavonoide principalmente presente nella radice di *Glycyrrhiza uralensis*, hanno mostrato un grande potenziale nel contrastare i meccanismi sottesi alla neurodegenerazione [22,23]. Tuttavia, l'utilizzo in vivo di questi composti è stato limitato a causa della relativa instabilità del SFN [24] e della bassa biodisponibilità dell'ILQ [25].

Lo scopo di questo progetto di ricerca è valutare l'effetto neuroprotettivo di un nuovo sistema di nanoidrogel caricati con SFN e ILQ in un modello in vitro di neuroinfiammazione.

I nanoidrogel (sintetizzati dai gruppi di ricerca della Prof.ssa Piera di Martino - Università di Chieti, Prof.ssa Roberta Censi - Università di Camerino e Prof.ssa Teresa Musumeci - Università di Catania) verranno prodotti partendo dalla coniugazione tra la sericina, by-product della lavorazione della seta, e l'acido ialuronico e verranno caricato con SFN e ILQ. Come modello di neuroinfiammazione verrà utilizzata la linea cellulare BV-2 attivata con lipopolisaccaride batterico (LPS)

Le cellule BV-2 saranno pre-trattate con SF, ILQ e i diversi NG caricati con SFN o ILQ per 2 ore prima dell'esposizione ad LPS (100 ng/mL) per ulteriori 24 ore. Per identificare le concentrazioni efficaci nei confronti della neuroinfiammazione verrà valutato il livello di ossido nitrico (NO) rilasciato nel mezzo di coltura mediante il reagente di Griess. Verrà poi valutata la modulazione dei

marcatori dei fenotipi M1 e M2. Per l'identificazione del fenotipo delle M1, verrà valutata l'espressione di TNF- α , IL-1 β , IL-18, IL-6, COX-2 e iNOS tramite RT-PCR. I livelli di TNF- α , IL-1 β , IL-18 e IL-6 saranno valutati anche mediante kit ELISA. COX-2, iNOS e i marcatori di superficie CD86 verranno valutati mediante analisi western blot (WB) utilizzando anticorpi specifici. Il fenotipo M2 sarà identificato valutando il livello proteico di CD206 e Arg-1 mediante WB e l'espressione di IL-10, IL-13 e IL-4 mediante RT-PCR e i loro livelli mediante kit ELISA. La traslocazione di NF-kB nel nucleo sarà indagata mediante microscopia confocale.

Per investigare se l'inibizione dell'attivazione delle cellule della microglia da parte dei diversi NG medi la neuroprotezione, saranno utilizzate co-culture di cellule BV-2 e cellule neuronali SH-SY5Y. Le cellule SH-SY5Y saranno differenziate per 7 giorni utilizzando l'acido retinoico e le co-culture microglia-neurone verranno eseguite posizionando inserti di microglia sulla parte superiore delle cellule SH-SY5Y. Le co-culture saranno trattate con gli NG. La vitalità delle cellule SH-SY5Y verrà valutata mediante il test MTT. L'espressione dei principali enzimi antiossidanti (NAD(P)H chinone ossidoreduttasi, tioredossina reduttasi, catalasi, SOD e eme-ossigenasi-1) e neurotrofine (NGF e BDNF) verrà misurata nelle cellule SH-SY5Y mediante RT-PCR. I dati sull'espressione verranno confermati mediante analisi WB utilizzando anticorpi specifici. La traslocazione del fattore nucleare-E2 correlato al fattore 2 (Nrf2) nel nucleo verrà valutata mediante microscopia a fluorescenza e analisi WB"

Il piano di formazione proposto vuole fornire competenze specifiche da acquisire presso i laboratori del Dipartimento di Scienza per la Qualità della Vita del nostro Ateneo ad un laureato di provata esperienza nel campo della ricerca Biochimica.

In particolare, il piano di formazione è finalizzato a sviluppare le seguenti competenze del beneficiario dell'assegno:

1. Approfondimento della comprensione della neuro-infiammazione e dei meccanismi cellulari e molecolari ad essa correlati.
2. Acquisizione di competenze relative ai modelli in vitro di neuroinfiammazione, all'utilizzo di test biochimici per lo studio dell'infiammazione, alla supplementazione di composti nutraceutici per la modulazione della neuroinfiammazione.
3. Analisi dei dati ottenuti da queste sperimentazioni e trarre conclusioni sulla loro efficacia e sicurezza.
4. Identificazione delle concentrazioni ottimali di composti nutraceutici in grado di manifestare un effetto protettivo contro la neuroinfiammazione.

5. Capacità di avanzare ipotesi sull'utilizzo dei composti nutraceutici nella prevenzione delle patologie neurodegenerative, basate sui risultati delle ricerche condotte.
6. Definizione di dosaggi raccomandati per l'assunzione dei nutraceutici in modo da massimizzare i benefici e minimizzare i rischi.
7. Comunicazione dei risultati della ricerca in conferenze scientifiche, pubblicazioni scientifiche e seminari.

Questi obiettivi di formazione aiuteranno il ricercatore a diventare un esperto nel campo della nutraceutica anti-neuroinfiammatoria e a contribuire in modo significativo all'avanzamento della ricerca biochimica applicata a questo settore, offrendo benefici sia in termini di conoscenza scientifica che di salute pubblica.

Bibliografia

1. Golpich et al., *CNS Neurosci Ther* 2017, 23: 5–22
2. Kausar, et al., *Cells* 2018, 7, E274
3. Hou et al., *Nat Rev Neurol* 2019, 15: 565–581
4. Jellinger. *J Cell Mol Med* 2010, 14, 457–487
5. Bossy-Wetzell et al. *Nat Med* 2004, 10 Suppl, S2-9
6. Zhang et al., *Mediators Inflamm* 2020, 2020, 1921826,
7. Leszek et al., *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2016, 15, 329–336
8. Lau et al., *Subcell Biochem* 2007, 42, 299–318.
9. Frank-Cannon, et al. *Mol Neurodegener*, 2009, 4, 47
10. Ponomarev et al. *J Neurosci Res* 2005, 81, 374–389
11. Walker, et al.. *Alzheimers Res Ther* 2015, 7, 56
12. Kotter et al.. *Glia*, 2001, 35, 204–212
13. Peferoen et al. *J Neuropathol Exp Neurol* 2015, 74, 48–63
14. Guo et al. *Front Aging Neurosci* 2022, 14:815347
15. Wen et al. *Oncotarget* 2017, 8, 69370–69385
16. Zhang et al., *Front Cell Neurosci* 2018, 12, 531
17. Valacchi et al., *Front Physiol* 2018, 9, 858
18. Solleiro-Villavicencio et al. S. *Front Cell Neurosci* 2018, 12, 114
19. Michaličková et al. *Eur J Pharmacol.* 2020;873:172973
20. Ahmed et al. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2017, 1863, 585–597
21. Plazas et al., *Pharmacol Res* 2022, 177, 106126
22. Kim., *Int J Mol Sci* 2021, 22, 2929
23. Ramalingam et al., *Front Aging Neurosci* 2018, 10, 348
24. Van Eylen D, et al. *J Agric Food Chem.* 2007, 55:2163-70
25. Lee, Y.K. et al., *Planta Med* 2013, 79, 1656–1665