

Technische Universität Gebze DEEPA I-Studie

Auswirkungen auf die mitochondriale Gesundheit von Fibroblasten

In unserem Projekt im Zusammenhang mit Deepa I, einer dosis- und zeitabhängigen Lösung, die von Pyrosoft Sağlık A.Ş. im Technopark der Technischen Universität Gebze entwickelt wurde, wurden Verifizierungsverfahren an zwei verschiedenen Zelllinien (DeepA 1 LOT 1 & DeepA 1 LOT 2) durchgeführt. Bei der einen handelt es sich um Human Umbilical Vein Endothelial Cell (HUVEC), d.h. eine Fibroblasten-Endothelzelle, bei der anderen um eine Fibroblastenzelle von Mäusen. Da es sich um ein Endprodukt handelt, haben wir Experimente mit 2 verschiedenen Flaschen durchgeführt. Mit anderen Worten, wir haben die Proben aus 2 verschiedenen Flaschen, die wir als Charge 1 und Charge 2 bezeichnen, in der invivo-Zellkultur modelliert, insbesondere durch ihre Auswirkungen auf die mitochondriale Gesundheit.

Lebensfähigkeit der Mitochondrien und des Zellkerns

Insbesondere wurde die Lebensfähigkeit der Mitochondrien mit Hilfe einer Fluoreszenzfärbemethode untersucht. Ziel dieser Untersuchung war es, die Lebensfähigkeit der Zellen und die Gesundheit der Mitochondrien festzustellen. Die Zellen werden mit einem roten Farbstoff namens MitoSPY angefärbt, der spezifisch für Mitochondrien eingesetzt wird, und so kann ein Urteil darüber entwickelt werden, ob die Zellen gesund und in allgemein gutem Zustand sind. In ähnlicher Weise wurde bei denselben Zellen ein anderer Farbstoff namens DAPY verwendet. DAPY färbt den Zellkern an und gibt Aufschluss über eventuelle Schädigungen des Zellkerns. Der Schwerpunkt ist herauszufinden ob ein Produkt potentiell die Zelle schädigen kann bzw. ob es toxisch wirkt.

Messung und Auswirkung von oxidativem Stress innerhalb der Zelle

In diesen Experimenten ist der Kontext in Bezug auf die Toxizität herauszufinden. Damit ein Produkt den Zelltod in den Zellen auslösen kann, ist ihr Hauptwirkungsmechanismus der oxidative Stress. Das Ausmaß des oxidativen Stresses in den Zellen wurde mit einem Fluoreszenzfarbstoff namens DCFDE untersucht, um den oxidativen Stress zu messen. So wurde ein BIOSAFETY-Experiment durchgeführt, um festzustellen, wie dieses Produkt auf die Zellen wirkt, ob es möglicherweise den Zelltod auslöst und ob es unerwünschte Auswirkungen hat.

Auswirkung von NRF-2

Der NRF-2 Test wurde durchgeführt und das Überleben der Zellen und damit die antioxidative Wirkung durch einen weiteren Versuch erneut bestätigt.

Mit dem MTTSA-Test für die Lebensfähigkeit der Mitochondrien in den Zellen wurden quantitative Gesamtdaten ermittelt. Es wurde festgestellt, dass die Lebensfähigkeit der Zellen bei der Anwendung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu- oder abnahmen. Wenn die Mitochondrien der Zellen gesund sind, weist dies auf eine erhöhte Stoffwechselaktivität hin. Wenn MTTSA-Farbstoff auf die Zellen aufgetragen wird, werden lebende Zellen aufgrund der Stoffwechselaktivität zu violett gefärbten Kristallen. Wenn die Zellen leblos sind, erscheint eine Farbe zwischen gelb und braun. Während auch lebende Zellen, die nicht behandelt wurden, eine dunkelviolette Farbe aufweisen, kann man bei sterbenden Zellen hellere braungelbe Farben erkennen.

Wundheilung

Der Hauptgrund für die Durchführung dieser Versuche sowohl an Mäusen als auch an menschlichen Zellen besteht darin, die Gesundheit der Tiere zu beobachten und ausreichende Daten für Tierversuche in der nächsten Phase zu erhalten und deren Kontinuität zu gewährleisten. Die Ethikkommission fordert diese vorläufigen Daten, bevor sie zur nächsten Phase, den INVIO-Tests, übergeht.

Ein weiteres Experiment ist das Wundheilungs-Experiment. Das Wundheilungs-Experiment zeigt, wie weit sich die Zellen von einem Ort zum anderen bewegen können. Normalerweise wachsen diese beiden Zelllinien, indem sie an einem Ort haften bleiben und sich nur wenig bewegen. Krebszellen wandern zum Beispiel durch Metastasierung oder Stammzellen. Ziel dieses Experiments ist daher sowohl die Migration, d. h. die Ankunft neuer Zellen im Wundgebiet bei einem Wundheilungsprozess, als auch die Teilung gesunder Zellen im Wundgebiet zu beobachten, um das Wundgebiet zu schließen. In diesem Versuch wird ein Wunde erzeugt und dann Deepa I verwendet, um zu sehen, wie lange es dauert, bis die Wunde in diesem Gebiet heilt. Wenn die getesteten Wirkstoffe die Wundheilung fördern, zeigen sie auch einen schnelleren Wundverschluss. Dies ist eines der wichtigsten Experimente, die in der Welt durchgeführt werden.

Ergebnisse:

Wie in Abbildung 1 bei Fibroblasten Zellen von Mäusen zu sehen ist, sind die Kontrollzellen (control) die unbehandelten und die darauffolgenden die behandelten Zellen. Es gibt keinen großen Unterschied zwischen den unbehandelten und den behandelten Zellen. Es gibt keine negativen Auswirkungen bei verschiedenen Verdünnungen von 1/10, 1/100, 1/1000, 1/5000, 1/10.000 beginnend mit sehr intensiver Lösung. Die Zellen sind lebendig, sie haben ihre Zellmorphologie nicht verloren.

Die Fibroblastenzellen sind dünn und lang. Nach den Ergebnissen der Experimente LOT-1 und LOT-2 (ABB. 1 und ABB. 2) zeigt die Tatsache, da diese dünnen und länglichen Zellen nicht in ihrer Anzahl reduziert werden, sondern generell vorhanden bleiben, dass die mitochondriale Lebensfähigkeit deutlich erkennbar ist, dieses Experiment funktioniert und dass die Anwendung des Produkts Deepa I in verschiedenen Konzentrationen eine positive Wirkung auf die Zellen unter allen Bedingungen hat.

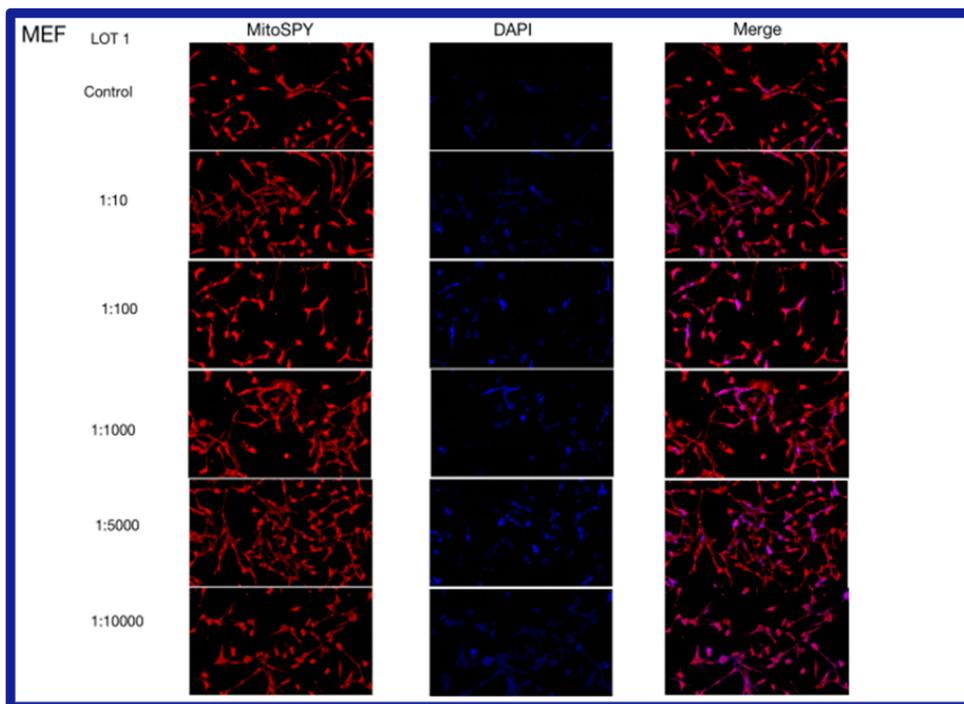


Abbildung 1: Ergebnisse von LOT 1

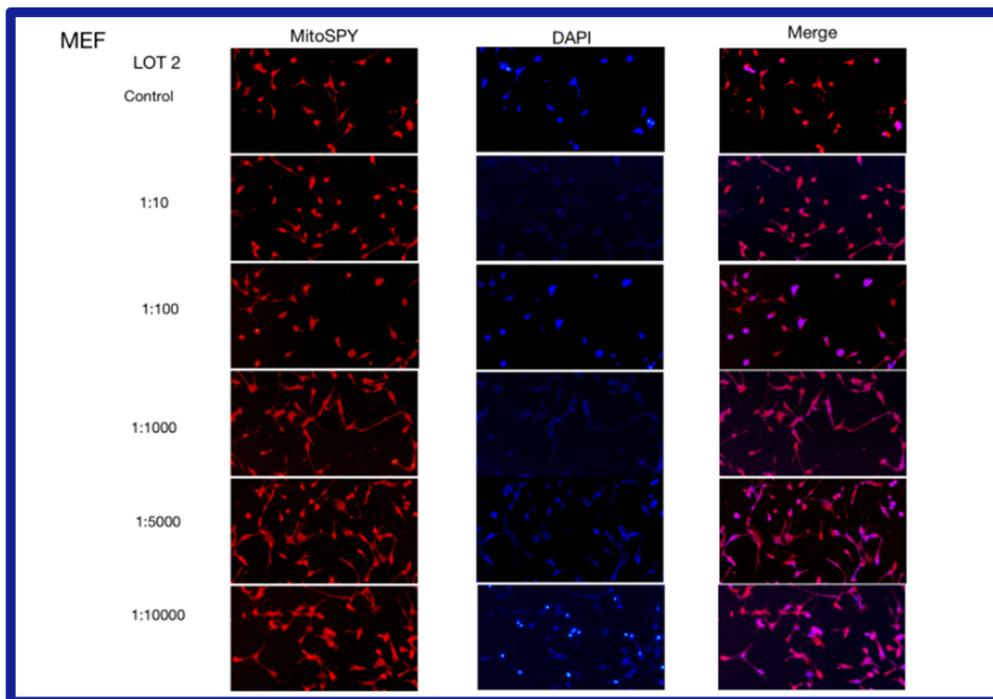


Abbildung 2: Ergebnisse von LOT 2

Um diesen Test zu verbessern, wurde eine ähnliche Situation in menschlichen Zellen (HUVEC) untersucht. Darüber hinaus wurden auch ROSS-Derivate untersucht, die durch mitochondrialen Stress verursacht wurden. Mit anderen Worten: Es wurde beobachtet, ob der Gehalt an reaktivem Sauerstoff anstieg oder nicht. Wie bekannt, werden viele antioxidative Enzyme in den Mitochondrien synthetisiert. Außerdem sind die Mitochondrien einer der wichtigsten Faktoren für oxidativen Stress. Aus diesem Grund ist es sehr wichtig, ROSS in Fällen, in denen Mitochondrien betroffen sind, gemeinsam zu untersuchen. Und die Ergebnisse sind sehr vielversprechend.

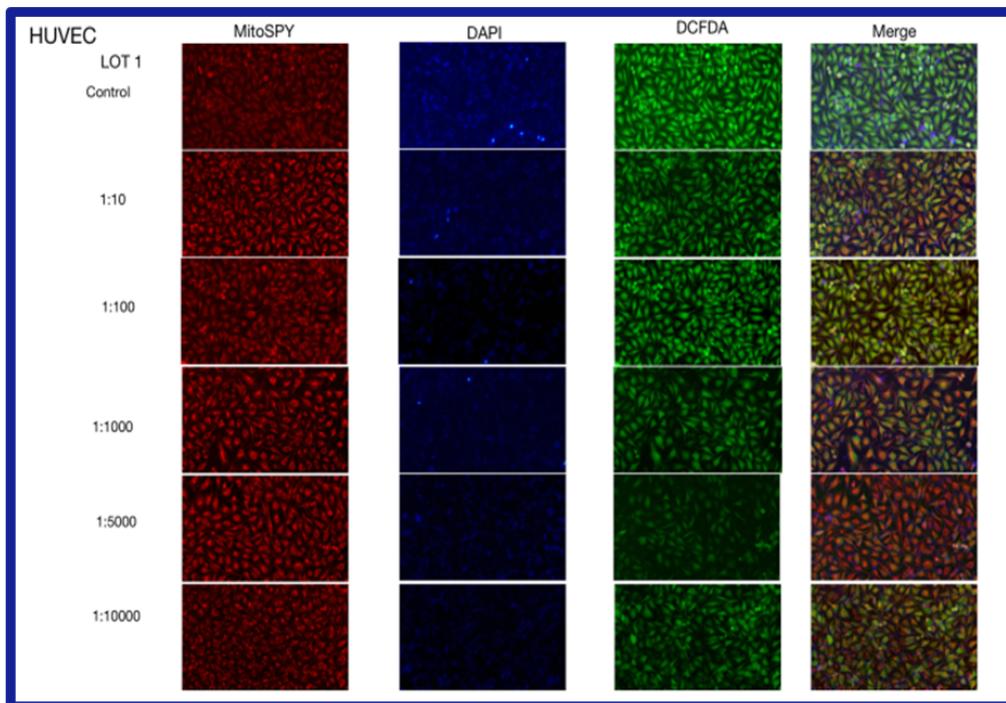


Abbildung 3: LOT 1 (HUVEC)

Betrachtet man LOT 1 und LOT 2 (**Abbildung 3**), so steigt MitoSPY in den Zellen der menschlichen Nabelvenen-Endothelzellen (HUVEC). Selbst bei der stärksten verdünnten Deepa-Konzentration ist auch eine leichte Verbesserung der mitochondrialen Gesundheit festzustellen. Gleichzeitig werden keine Probleme im Zellkern festgestellt.

DSFDY ist unser ROSS-Indikator. Es zeigt sich auch eine Abnahme der Menge von DSFDY. Wenn es notwendig ist, die Dosis zu optimieren, hat eine Dosis von 1/5.000 oder 1/1.000, die fast der von Pyrosoft empfohlenen Tagesdosis entspricht, äußerst erfolgreiche Ergebnisse bei den Zellen erzielt. Die Tatsache, dass die Mitochondrien zunehmen, während die ROSS-Mengen abnehmen, und dass ein gesundes Koexistenzmodell in den Zellen fortbesteht, wenn wir es zusammen betrachten, zeigt, dass es sich um ein sehr gutes Ergebnis für die Invitro-Bedingungen handelt.

In ähnlicher Weise haben wir für LOT 1 und LOT 2 (**Abbildung 4**) den Western-Block Test verwendet, der sowohl bei MEF als auch bei HUVECs eingesetzt wird. Das Ziel dieses Experiments ist es, das gesamte Protein in der Zelle zu isolieren und dann zu sehen, welche Proteinexpressionen durch den Wirkstoff in behandelten oder unbehandelten Proben verändert werden und wie die Zellen darauf reagieren. Wenn irgendetwas auf die Kommunikation in der Zelle einwirkt oder wenn die Zelle unter Stress oder irgendeinem Einfluss steht, führt sie die leistungsfähigsten biologischen Funktionen durch ihre Proteine entsprechend aus. Die Menge an Proteinen, die für die Zelle essentiell sind, bestimmt, welche Art von Reaktionsmechanismus sie auslösen wird. Aus diesem Grund wurden, ausgehend von dem ursprünglichen Experiment, in diesem Versuch auch die Mechanismen im Zusammenhang mit dem Überleben der Zelle, dem Zelltod und den verschiedenen Arten des Zelltods untersucht.

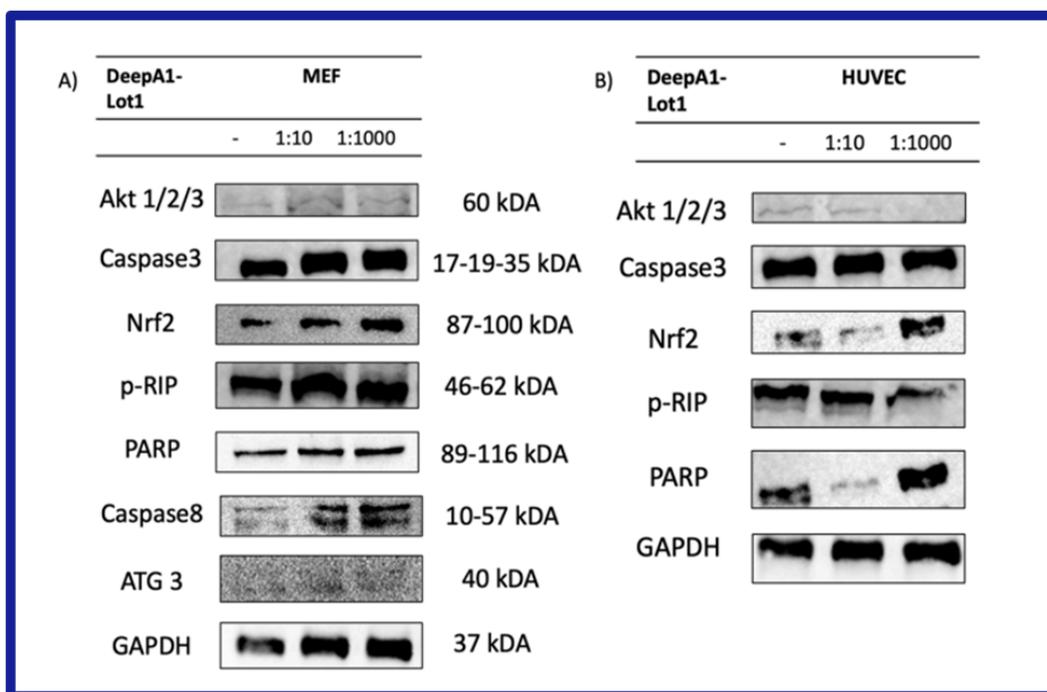


Abbildung 4: LOT 1 MEF - LOT 1 HUVEC

Keine Veränderung der CASPASE-Spiegels und der HUVECs. Caspasen sind Enzyme, die den Todesmechanismus in Zellen auslösen. Mit anderen Worten: Wenn eine Zelle einen programmierten Zelltod durchführt, steigt die CASPASE-Aktivität. Insbesondere CASPASE 3 ist die Terminator-CASPASE. CASPASE zerbricht wie eine Kapsel und bildet Proteine in kleineren Fragmenten. Daraus lässt sich schließen,

dass ein Todesereignis nicht ausgelöst wird, wenn CASPASE vollständig vorhanden ist.

Anhand dieses Experiments können wir sehen, dass die anderen Versuchsergebnisse korrekt sind.

Bei der Betrachtung von FOSFORIP ist es sehr wichtig zu sehen, dass NRF 2 ansteigt und die Nekrosepfade der Zellen heruntergefahren werden. Die Menge von FOSFORIP nimmt tatsächlich ab, wie beim Menschen beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass es deutlich wirksam ist. Auch bei PARP gibt es keine Schwankungen. Betrachtet man die GAPDH-Menge, so zeigt sich, dass sie unverändert ist. GAPDH wurde als Kontrolle verwendet und zeigte bei den Kontrollen keine Veränderung.

Darüber hinaus wurde KASPAZ 8 in Mäusezellen analysiert, und es wurde keine Veränderung festgestellt. ATG 3 wurde analysiert und zeigte ebenfalls keine Veränderungen. Auch AKS1-2-3 zeigte keine übermäßige onkogene Aktivität in Bezug auf Survivor. Die angegebene Aktivität hat keinen Einfluss auf eine übermäßige Zellvermehrung.

Wie in **Abbildung 5** dargestellt, haben wir einen Test der Zellebensfähigkeit von Proben zwischen 2 verschiedenen LOT-Behandlungen durchgeführt. Das Ergebnis von 3 separaten Experimenten mit mindestens 4 technischen Wiederholungen ist, dass es weder zum Zelltod noch zu einer übermäßigen Zellproliferation führt. Die Lebensfähigkeit der Mitochondrien in den Zellen, so wie sie sie sind, ist sichergestellt.

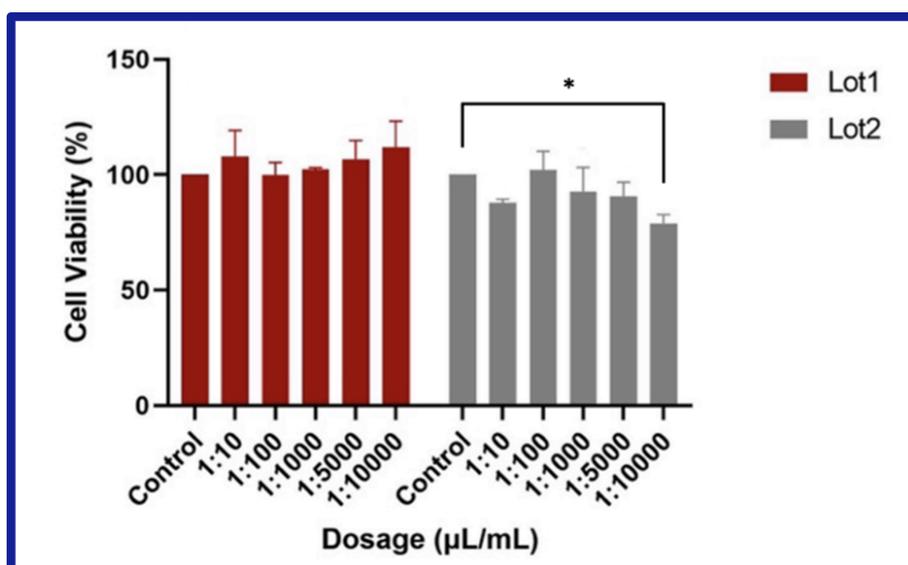


Abbildung 5: LOT 1 - LOT 2

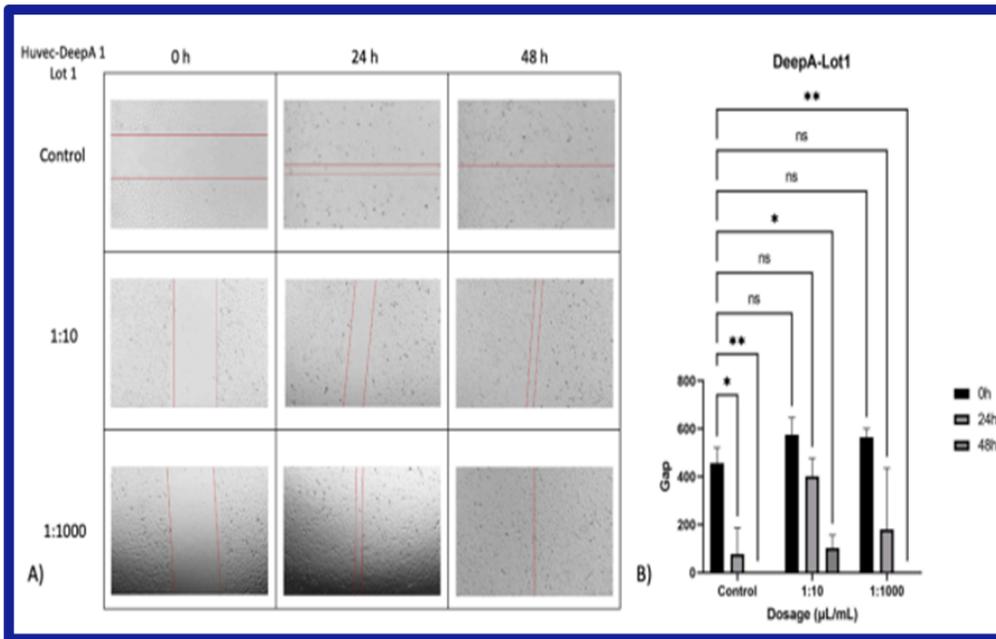


Abbildung 6 - LOT 1

Abbildung 6 und Abbildung 7 zeigen Schnitte und ihre Wundheilung in der Zellkultur. Wenn die Forschungsassistentin die Petrischale mit der Pipettenspitze ankratzt, werden die Zellen, die sich vorher dort befanden, verletzt, sie werden aus diesem Bereich herausgehoben und es bildet sich ein Wundspalt in diesem Bereich. Dies ist ein Experiment in LOT 1 an HUVEC-Zellen, menschlichen Zellen. In diesem Experiment scheint sich der Wundspalt innerhalb von 48 Stunden ohne Narbenbildung zu schließen. Wenn wir Deepa I anwenden, zeigt sich, dass bei einer Verdünnung von 1/1000 die Wundbehandlung sehr erfolgreich durchgeführt wird und Deepa I bei der Wundbehandlung außergewöhnlich effizient ist.

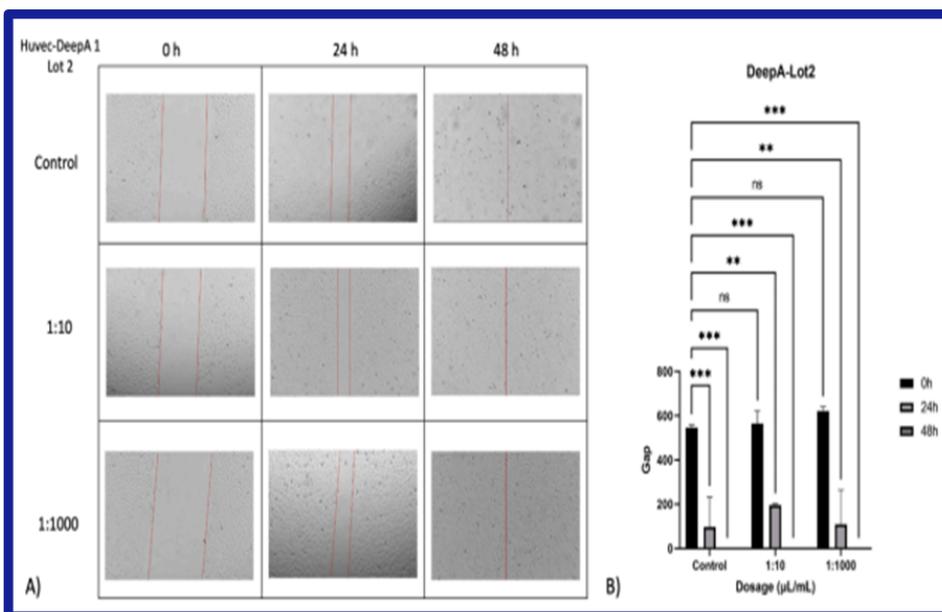


Abbildung 7 - LOT 2

REFERENZEN:

- Arisan, Elif Damla et al. 2022: "MicroRNA 1307 ist ein potenzielles Ziel für die SARS-CoV-2-Infektion: Ein In-vitro-Modell". ACS Omega 7(42): 38003–14. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c05245>.
- Ilhan, Elif et al. 2022. "The Role of Multilayer Electrospun Poly (Vinyl Alcohol)/ Gelatin Nanofibres Loaded with Fluconazole and Cinnamaldehyde in the Potential Treatment of Fungal Keratitis". 176(Juli)