

HEALTHY NEURAL NETWORKS

DOPAMINERGIC PATHWAY DISRUPTION (PARKINSON'S)

AMYLOID & TAU PATHOLOGY (ALZHEIMER'S)

BRAINPRECISION

UNDERSTAND. TARGET. TRANSFORM.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΠΡΑΞΗΣ: TAEDR-0535850

Δράση «Εμβληματικές δράσεις σε διαθεματικές επιστημονικές περιοχές με ειδικό ενδιαφέρον για την σύνδεση με τον παραγωγικό ιστό» ID 16618

Εθνικό δίκτυο έρευνας για την ανάδειξη της γενετικής βάσης των νευροεκφυλιστικών νόσων Alzheimer και Parkinson, την ανίχνευση αξιόπιστων βιοδεικτών και την ανάπτυξη καινοτόμων υπολογιστικών τεχνολογιών και θεραπευτικών στρατηγικών στη βάση της ιατρικής ακριβείας (BRAIN PRECISION, TAEDR-0535850)

ΤΙΤΛΟΣ ΠΑΡΑΔΟΤΕΟΥ: Εφαρμογή φυσικών προϊόντων και παραγώγων τους σε μοντέλα νευροεκφυλιστικών νόσων.

ΕΝΟΤΗΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 6: Ανάπτυξη καινοτόμων προκλινικών θεραπευτικών παρεμβάσεων κατά της πρόωρης εμφάνισης νευροεκφυλιστικών νοσημάτων Alzheimer και Parkinson.

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ): ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ (ΕΚΠΑ)

Εφαρμογή φυσικών προϊόντων και παραγώγων τους σε μοντέλα νευροεκφυλιστικών νόσων.

Ενότητα Εργασίας 6: Ανάπτυξη καινοτόμων προκλινικών θεραπευτικών παρεμβάσεων κατά της πρόωρης εμφάνισης νευροεκφυλιστικών νοσημάτων Alzheimer και Parkinson

Τίτλος Παραδοτέου: Εφαρμογή φυσικών προϊόντων και παραγώγων τους σε μοντέλα νευροεκφυλιστικών νόσων. ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ, ΕΚΠΑ

ΣΥΝΤΟΜΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ / ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το παρόν παραδοτέο αφορά την ανάπτυξη και αξιολόγηση φυσικών και ημισυνθετικών παραγώγων με νευροπροστατευτική δράση σε πρότυπα μοντέλα νευροεκφυλιστικών νόσων. Το έργο υλοποιήθηκε στο πλαίσιο μίας ολοκληρωμένης και καθετοποιημένης ερευνητικής στρατηγικής, η οποία συνδυάζει τη χημεία φυσικών προϊόντων, τη φαρμακευτική χημεία, τις βιοφυσικές τεχνικές, τη βιολογική αξιολόγηση και τις υπολογιστικές μελέτες, με στόχο την ανάδειξη νέων υποψήφιων βιοδραστικών μορίων με εφαρμογές στη νευροπροστασία.

Η ερευνητική δραστηριότητα οργανώθηκε σε τέσσερις διακριτούς αλλά αλληλοσυμπληρούμενους άξονες. Ο πρώτος άξονας αφορούσε την ανάπτυξη και αξιολόγηση αναλόγων υδροξυτυροσόλης με προστατευτική δράση έναντι της νόσου Alzheimer, σε συνεργασία με την ομάδα Παληκάρá. Ο δεύτερος άξονας επικεντρώθηκε στον σχεδιασμό και τη σύνθεση αναλόγων καρβολίνης με στόχο την αναστολή συγκεκριμένων κινασών, κυρίως της DYRK1a και συγγενών ενζύμων, σε συνεργασία με την ομάδα Γαϊτάνου. Ο τρίτος άξονας αφορούσε την ανάπτυξη και προκαταρκτική αξιολόγηση αναλόγων της ολεοκανθάλης, ενός φυσικού προϊόντος με τεκμηριωμένη νευροπροστατευτική δράση, με έμφαση στη διερεύνηση της αλληλεπίδρασής τους με τη LOX5, ένζυμο που εμπλέκεται στην παθογένεια της νόσου Alzheimer. Ο τέταρτος άξονας αφορά τη σύνθεση υβριδίων τετραυδροκαναβινόλης – ολεοκανθάλης. Η κανναβιδιόλη (CBD) εμφανίζει τεκμηριωμένες νευροπροστατευτικές ιδιότητες, οι οποίες αποδίδονται στην αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική της δράση στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Προκλινικές μελέτες δείχνουν ότι η CBD παρεμβαίνει σε βασικούς παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς της νόσου Alzheimer, συμπεριλαμβανομένης της νευροφλεγμονής και της νευροτοξικότητας του β-αμυλοειδούς. Επιπλέον, η ικανότητά της να ρυθμίζει τη δραστηριότητα της 5-λιποξυγενάσης ενισχύει το ενδιαφέρον για την αξιοποίησή της σε πολυπαραγοντικές νευροπροστατευτικές προσεγγίσεις. Στην παρούσα φάση τα παράγωγα αυτά έχουν αξιολογηθεί μόνο έναντι της LOX5.

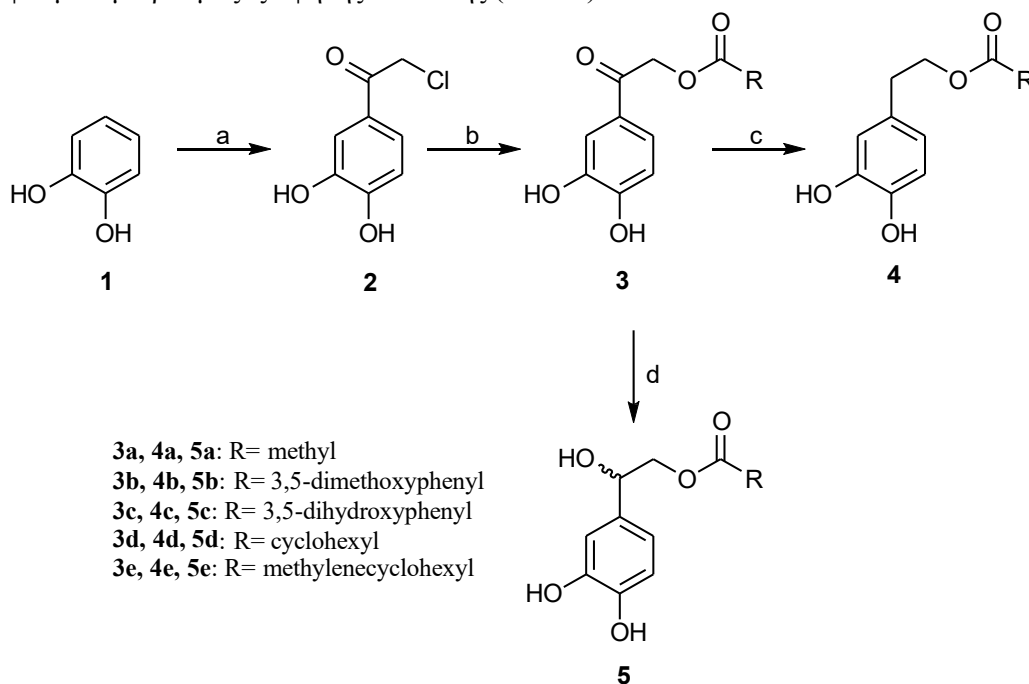
Οι εργασίες που υλοποιήθηκαν στο πλαίσιο των παραπάνω αξόνων έχουν αποδώσει δύο επιστημονικές δημοσιεύσεις, οι οποίες έχουν καταταχθεί στα περιοδικά *Biorganic Chemistry* (Design, synthesis and evaluation of novel hydroxytyrosol esters with protective activity against Alzheimer's disease Kalpaktsi Ioanna, Panara Anthi, Barbara Mavroidi, Giorgos Garcia Niforos, Amalia D. Kalampaliki, Eleftheria A. Georgiou, Fragopoulou Elizabeth, Tsarbopoulos Anthony, Alexios-Leandros Skaltsounis, Maria Pelecanou, Palikaras Kontantinos, Gikas Evangelos, and Ioannis K. Kostakis) και *Phytochemistry* (2'-Hydroxyoleacein from *Olea europaea*: Isolation, synthesis and anti-inflammatory evaluation, Christina Koutra, Stavros Beteinakis, Eleni V. Mikropoulou, Paul M. Jordan, Mattes Baumann, Oliver Werz, Ioannis K. Kostakis, Panagiotis Stathopoulos, Alexios-Leandros Skaltsounis) και βρίσκονται υπό αξιολόγηση, και μια ανακοίνωση σε επιστημονικά συνέδρια (Design and Synthesis of a Cannabidiol-Oleoside Hybrid Molecules Targeting Lipoxygenases for Inflammation Management, Georgia Vasalaki, Ioannis Kostakis, Philipp Dahlke, Paul M. Jordan, Oliver Werz, Leandros Skaltsounis, 73rd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural

Product Research (GA), Naples, Italy, 2025). Οι δημοσιεύσεις αυτές αποτυπώνουν τα κύρια επιστημονικά αποτελέσματα του έργου και τεκμηριώνουν τη μεθοδολογική αρτιότητα και τη διεθνή απήχηση της ερευνητικής δραστηριότητας. Τα σχετικά αρχεία υποβάλλονται συνημμένα.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΥΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΕ

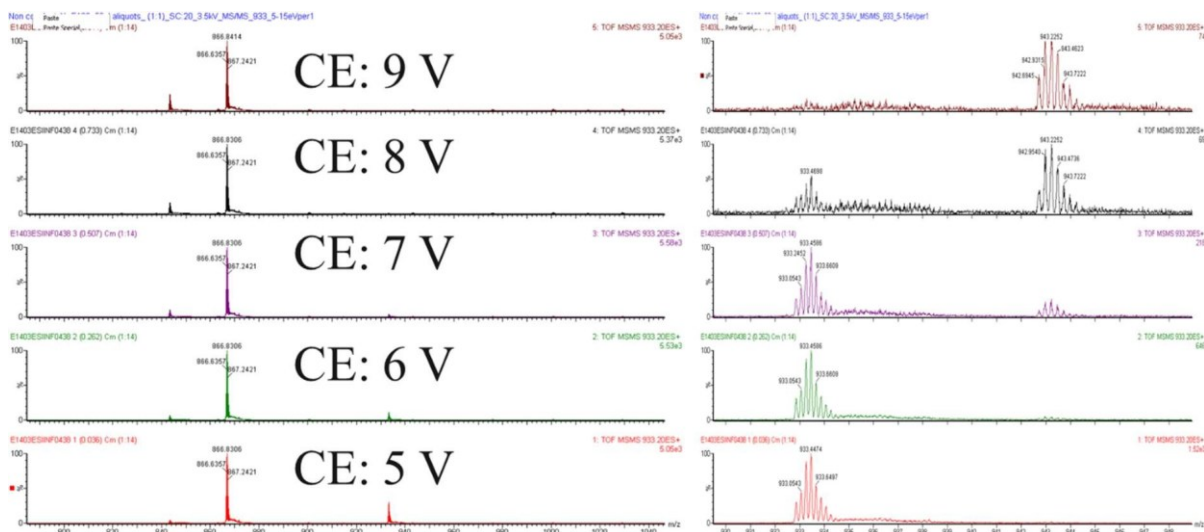
Στο πλαίσιο του πρώτου άξονα, ως φυσικό πρότυπο επιλέχθηκε η ελαιοευρωπαϊνή, βασικό συστατικό της ελιάς και χαρακτηριστικό μόριο της μεσογειακής διατροφής. Παρά τις ισχυρές αντιοξειδωτικές και αντιαμυλοειδογενείς της ιδιότητες, η φαρμακευτική αξιοποίηση της ελαιοευρωπαϊνής περιορίζεται από τη χημική της αστάθεια, κυρίως λόγω της υδρόλυσης του γλυκοσιδικού δεσμού. Για τον λόγο αυτό, σχεδιάστηκε και υλοποιήθηκε η σύνθεση μίας σειράς νέων υδροξυτυροσολικών εστέρων, στους οποίους το γλυκοσιδικό τμήμα αντικαταστάθηκε από λιπόφιλες υποκαταστάσεις.

Οι δομικές τροποποιήσεις αποσκοπούσαν στη βελτίωση της χημικής σταθερότητας, της λιποφιλίας και της ικανότητας των ενώσεων να αλληλεπιδρούν με το πεπτίδιο Αβ (Σχήμα 1). Όλες οι ενώσεις χαρακτηρίστηκαν πλήρως με φασματοσκοπία ^1H και ^{13}C NMR και φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (HRMS).



Σχήμα 1. Αντιδραστήρια και συνθήκες: a) chloroacetylchloride, POCl_3 ; b) suitable acid, NaH ; c) triethylsilane, $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$; d) H_2 , Pd/C , 50psi

Η βιοφυσική αξιολόγηση με τη βοήθεια φασματομετρίας μάζας έδειξε ότι τα νέα υδροξυτυροσολικά ανάλογα αλληλεπιδρούν άμεσα με το πεπτίδιο Αβ40, σχηματίζοντας σταθερά μη ομοιοπολικά σύμπλοκα.

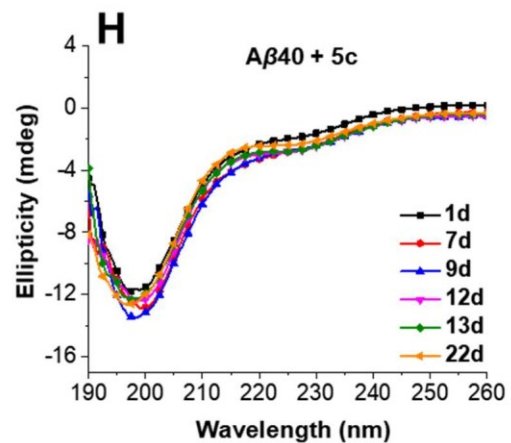
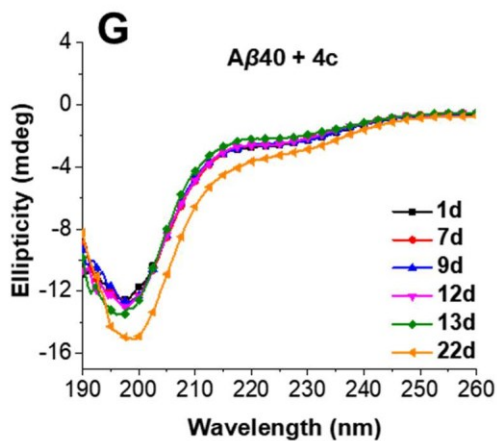
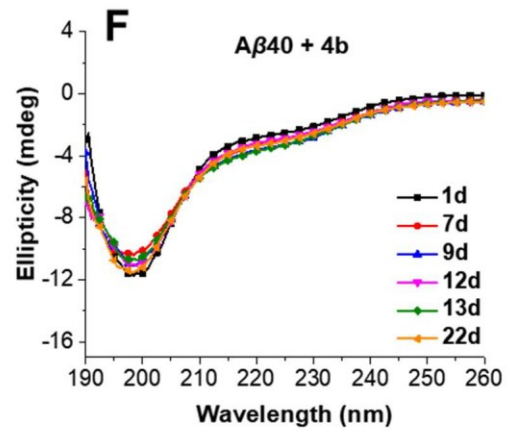
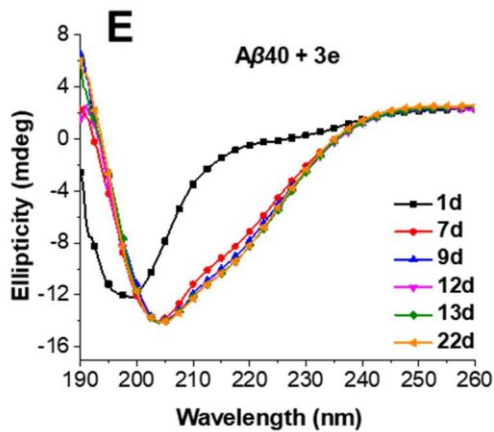
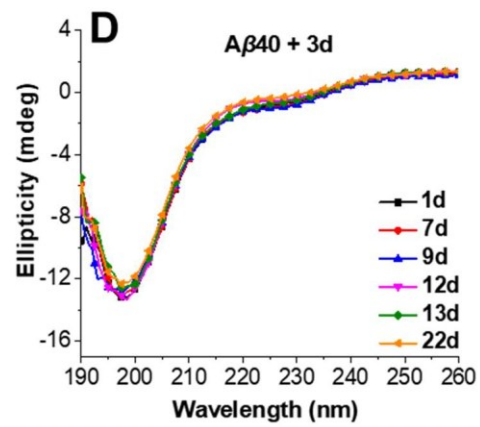
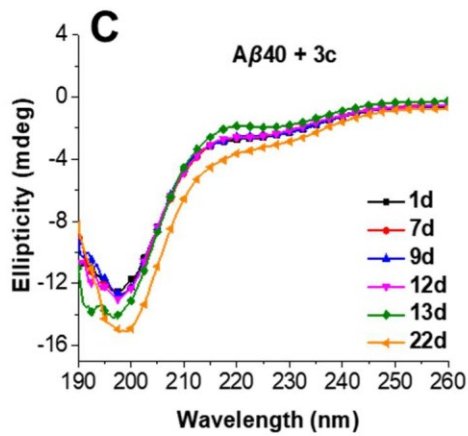
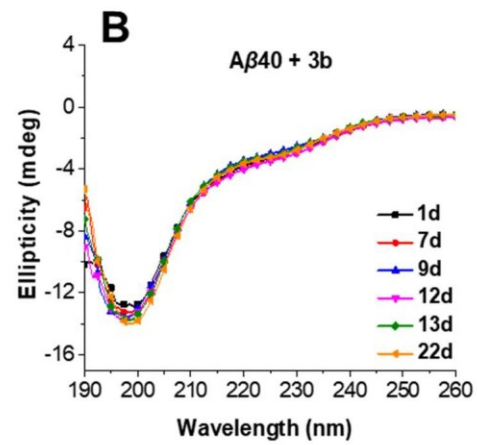
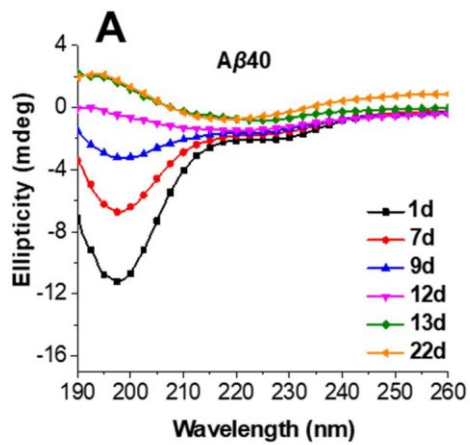


Σχήμα 2: Φάσμα ESI MS/MS του παραγώγου **3b**

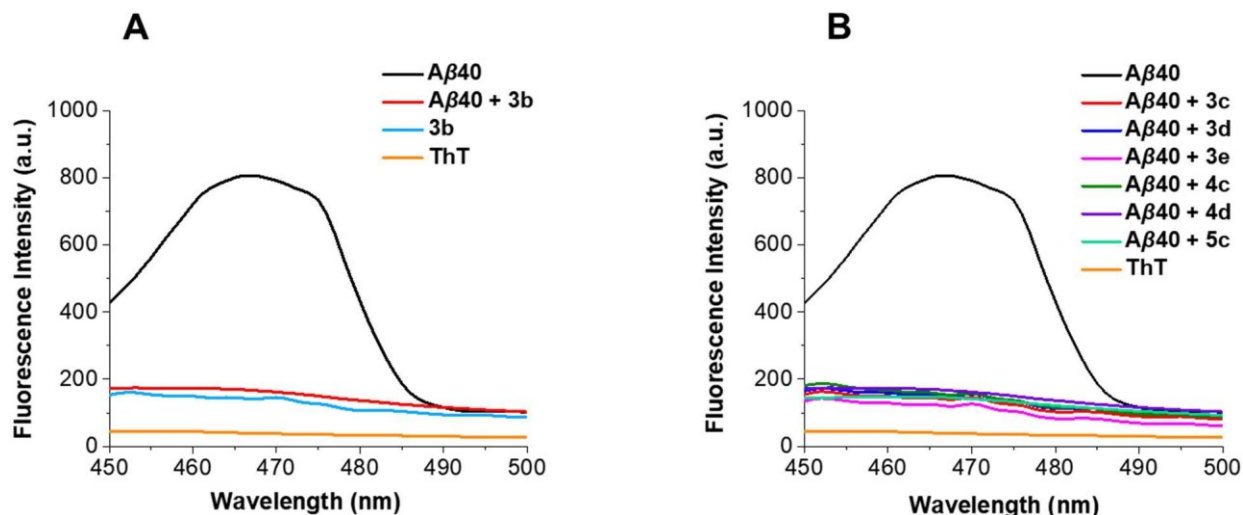
		Y				
		[Aβ-X]+5				
		CH ₃				
X	C=O	3a -	3b 50.4%	3c 29.5 %	3d 7.4%	3e 7.4%
	H	4a -	4b 18.4%	4c 4.3%	4d 0.6%	4e -
	OH	5a 1.4%	5b 25.8%	5c 8.4%	5d -	5e 0.5%

Πίνακας 1: Σχετική ικανότητα σχηματισμού συμπλόκων των παραγώγων της υδροξυτυροσόλης (HT) με το Αβ, όπως προσδιορίστηκε με ESI-HRMS. Οι τιμές αντιστοιχούν στο άθροισμα των σχετικών εντάσεων των συμπλόκων Αβ-Χ και Αβ-2Χ.

Μελέτες κυκλικού διχρωισμού και δοκιμασίες Thioflavin-T κατέδειξαν ότι οι ενώσεις αυτές παρεμποδίζουν τη διαρθρωτική μετάβαση του Αβ σε δομές πλούσιες σε β-πτυχωτά φύλλα, αναστέλλοντας τον σχηματισμό αμυλοειδικών ινιδίων. Παράλληλα, in vitro δοκιμασίες ανέδειξαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, τεκμηριώνοντας ένα πολυλειτουργικό προφίλ δράσης.



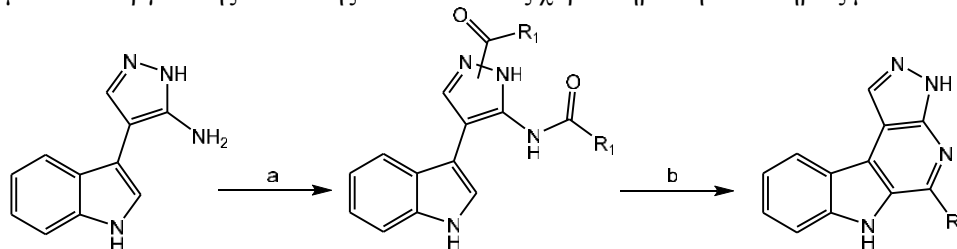
Σχήμα 3. Φάσματα CD του Αβ40 απουσία (3Α) και παρουσία των ενώσεων 3b, 3c, 3d, 3e, 4c, 4d και 5c (3B–3H) σε ρυθμιστικό φωσφορικό διάλυμα, pH 7,4. Τα φάσματα καταγράφηκαν σε χρονικό διάστημα 22 ημερών στους 33 °C. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά φάσματα από n = 3 ανεξάρτητα πειράματα.

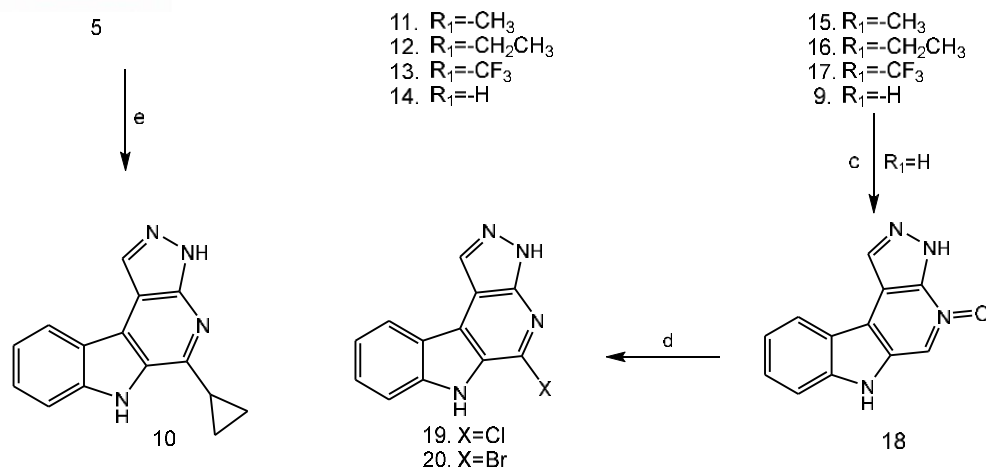


Σχήμα 4. (Α) Φάσματα ThT του Αβ40 απουσία και παρουσία της ένωσης 3b. Για λόγους σύγκρισης, στο γράφημα περιλαμβάνονται τα φάσματα φθορισμού της 3b μόνης της, καθώς και της ThT μόνης της. (Β) Φάσματα ThT του Αβ40 απουσία και παρουσία των ενώσεων 3b, 3c, 3d, 3e, 4c, 4d και 5c. Ο φθορισμός καταγράφηκε μετά από διέγερση στα 440 nm. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά φάσματα από n = 3 ανεξάρτητα πειράματα.

Με βάση τα συνολικά δεδομένα, η ένωση **3b** επιλέχθηκε για *in vivo* αξιολόγηση σε πρότυπα *Caenorhabditis elegans* που εκφράζουν ανθρώπινο Αβ42. Η ένωση δεν παρουσίασε τοξικότητα και οδήγησε σε σημαντική βελτίωση της επιβίωσης και των κινητικών λειτουργιών, παρέχοντας σαφή λειτουργική τεκμηρίωση της νευροπροστατευτικής της δράσης. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται αναλυτικά στην έκθεση της ομάδας Παληκαρά.

Ο δεύτερος άξονας του έργου επικεντρώθηκε στον σχεδιασμό και τη σύνθεση ετεροκυκλικών αναλόγων καρβολίνης με στόχο την αναστολή κινασών όπως οι CLK1, DYRK2 και GSG2. Οι ενώσεις σχεδιάστηκαν με βάση τον πυρήνα 4-(1H-indol-3-yl)-1H-pyrazol-3-amine, λαμβάνοντας υπόψη την επίδραση των υποκαταστατών και της ταυτομερίας στην ισχύ και εκλεκτικότητα δέσμευσης. Η σύνθεση πραγματοποιήθηκε μέσω κλασικών και αξιόπιστων μεθόδων οργανικής σύνθεσης και οι ενώσεις χαρακτηρίστηκαν πλήρως με NMR και HRMS.





Σχήμα 5. Αντιδραστήρια και συνθήκες: a) i) οξικός ή προπανοϊκό ή/τριφθοροοξικός ανυδρίτης, πυριδίνη, T=25°C, 24hrs, ii) μυρμηκικός αιθυλεστέρας, αυτόκλειστο, b) POCl₃, CH₃CN dry, T=70°C, 24hrs, c) m-CPBA, THF, T=25°C, 24hrs, d) POCl₃ ή POBr₃, DMF, T=25°C, 24hrs, e) κυκλοπροπανοκαρβοξυαλδεΐδη, 2% TFA, DMF, T=120°C, 24hrs

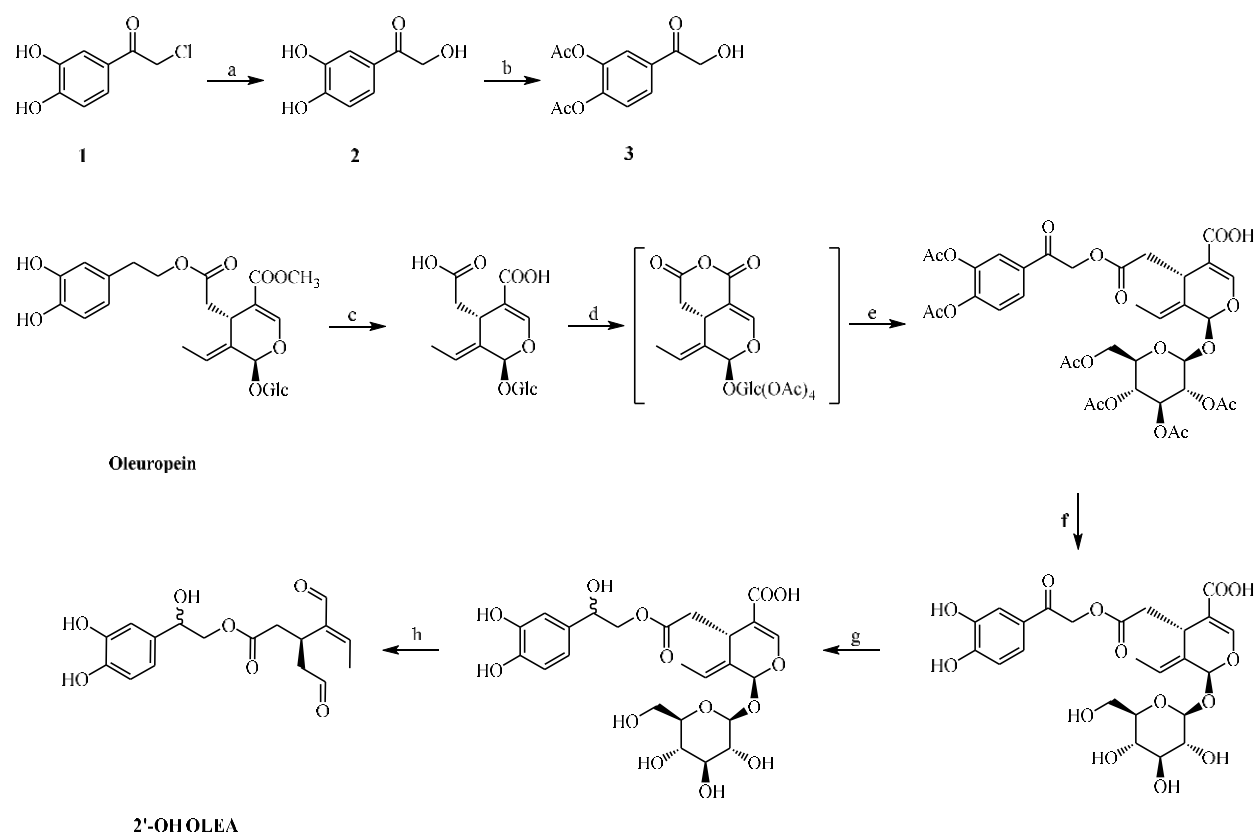
Η βιολογική αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με το εργαστήριο του Prof. Stefan Knapp και περιλάμβανε screening σε 110 πρωτεϊνικούς στόχους με τη μέθοδο DSF. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν τις κινάσες DYRK2, CLK1 και GSG2 ως κύριους στόχους, με την ένωση **91** να παρουσιάζει αυξημένη ισχύ και εκλεκτικότητα. Υπολογιστικές μελέτες docking υποστήριξαν τα πειραματικά δεδομένα και ανέδειξαν κρίσιμες μοριακές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες μπορούν να αξιοποιηθούν στον περαιτέρω σχεδιασμό βελτιστοποιημένων παραγώγων. Ακολούθως, η ένωση **19** αξιολογήθηκε από την ομάδα Γαϊτάνου με πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα όσον αφορά την νευροπροστασία. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται αναλυτικότερα στην έκθεση της ομάδας Γαϊτάνου.

Ο τρίτος άξονας του έργου επικεντρώθηκε στην ανάπτυξη αναλόγων της ολεοκανθάλης και στη διερεύνηση της αλληλεπίδρασής τους με την οδό της 5-λιποξυγενάσης (5-LOX). Η 5-λιποξυγενάση και οι σχετιζόμενες οδοί βιοσύνθεσης λιπιδικών μεσολαβητών διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης και του οξειδωτικού στρες, δύο βασικών παθοφυσιολογικών παραμέτρων που εμπλέκονται άμεσα στην εξέλιξη της νόσου Alzheimer. Πλήθος πειραματικών και κλινικών δεδομένων έχει καταδείξει ότι η αυξημένη έκφραση και δραστηριότητα της 5-LOX στον εγκέφαλο συνδέεται με ενίσχυση της νευροφλεγμονής, διαταραχή της συναπτικής λειτουργίας και αυξημένη παραγωγή του β-αμυλοειδούς. Η ενεργοποίηση της 5-LOX οδηγεί στη δημιουργία προφλεγμονωδών λευκοτριενίων, τα οποία ενισχύουν τη μικρογλοιακή ενεργοποίηση και αυξάνουν τη νευρωνική ευαλωτότητα σε παθολογικά ερεθίσματα. Υπό το πρίσμα αυτό, η αναστολή ενζύμων της οδού της 5-λιποξυγενάσης αναδεικνύεται ως ελκυστική στρατηγική για την έμμεση τροποποίηση φλεγμονωδών και οξειδωτικών μηχανισμών που σχετίζονται με τη νευροεκφύλιση. Στο πλαίσιο αυτό, η ανάπτυξη φυσικών ή ημισυνθετικών αναλόγων με ικανότητα παρέμβασης στη δραστηριότητα της 5-LOX παρουσιάζει ιδιαίτερο ερευνητικό και θεραπευτικό ενδιαφέρον.

Τα φύλλα ελιάς (*Olea europaea* L.) αποτελούν άφθονο υποπροϊόν της ελαιοκομίας, πλούσιο σε φαινολικά σεκοϊριδοειδή, ενώσεις με τεκμηριωμένες αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και νευροπροστατευτικές ιδιότητες. Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας αναπτύχθηκε μία ήπια και περιβαλλοντικά φιλική διαδικασία εκχύλισης, με στόχο την αξιοποίηση του φυτικού αυτού υλικού και την εις βάθος φυτοχημική και βιολογική διερεύνησή του. Φύλλα ελιάς της ποικιλίας «Λιανόλια», αποξηραμένα σε συνθήκες περιβάλλοντος, υποβλήθηκαν σε εκχύλιση με υπερήχους χρησιμοποιώντας νερό σε θερμοκρασία δωματίου, ακολουθούμενη από κατανομή

με οξικό αιθυλεστέρα. Η διαδικασία αυτή οδήγησε στην απομόνωση εκχυλίσματος εμπλουτισμένου σε σεκοϊριδοειδή, με κύριο συστατικό την ολεασεΐνη. Η ανάλυση HPLC–DAD επιβεβαίωσε την κυριαρχία της ολεασεΐνης, ενώ περαιτέρω διερεύνηση με LC-HRMS (Orbitrap) αποκάλυψε την παρουσία άγνωστου έως τότε μεταβολίτη με φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά συγγενή με αυτά της ολεασεΐνης.

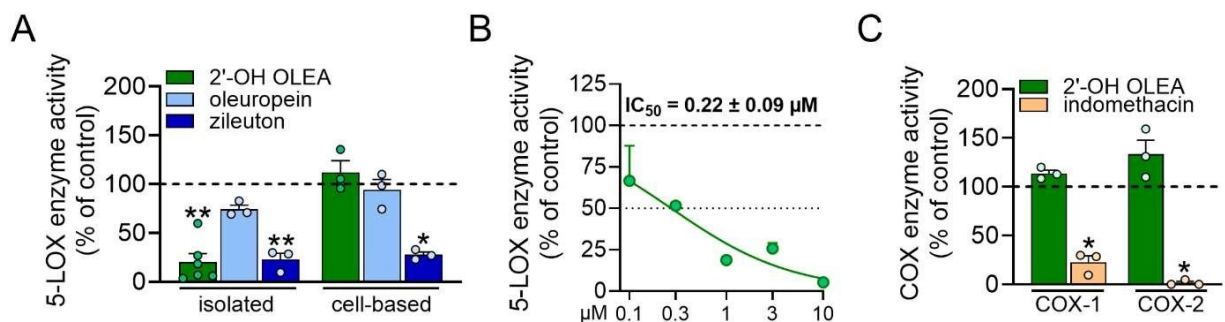
Ο καθαρισμός με MPLC και παρασκευαστική HPLC επέτρεψε την απομόνωση του νέου αυτού σεκοϊριδοειδούς. Ο πλήρης δομικός χαρακτηρισμός πραγματοποιήθηκε με συνδυασμό φασματοσκοπίας 1D και 2D NMR και ανάλυσης HRMS/MS, οδηγώντας στην ταυτοποίησή του ως 2'-υδροξυολεασεΐνη (2'-OH OLEA), μία φυσική ένωση που δεν είχε προηγουμένως αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία. Η ένωση απομονώθηκε ως περίπου ισομοριακό μίγμα των επιμερών (2'R) και (2'S), γεγονός που επιβεβαιώθηκε από τη διπλοποίηση χαρακτηριστικών σημάτων στα φάσματα NMR. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί περαιτέρω η δομική ανάθεση και να διασφαλιστεί επαρκές υλικό αναφοράς, η 2'-OH OLEA συντέθηκε επιτυχώς μέσω στοχευμένης σύνθεσης με αφετηρία την ολευροπεΐνη. Παράλληλα, απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν σε μικρές ποσότητες δύο συγγενή μεθοξυλιωμένα παράγωγα, η 3,3-διμεθοξυ-2'-υδροξυολεασεΐνη και η 3,3,2'-τριμεθοξυολεασεΐνη, αναδεικνύοντας τον χημικό πλούτο και τη μεταβολική πλαστικότητα των σεκοϊριδοειδών των φύλλων ελιάς υπό ήπιες συνθήκες επεξεργασίας.



Σχήμα 6. Αντιδραστήρια και συνθήκες: a. H₂O, 100 °C, 100W; b. Ac₂O, NaOH, H₂O; c. NaOH 4N, RT, 24 h; d. πυριδίνη, οξικός ανυδρίτης, RT, 3 h; e. Et₃N, DMAP, 3, ACN, RT, 3 h; f. Et₂NH, MeOH, RT, 6 h; g. CaBH₄, MeOH, RT, 4h; h. β-glucosidase, HOAc/NaOAc, pH 5, 37 °C, 53 h.

Η βιολογική αξιολόγηση της 2'-OH OLEA επικεντρώθηκε στη διερεύνηση της ικανότητάς της

να παρεμβάινει σε φλεγμονώδεις μηχανισμούς που σχετίζονται με τη δραστικότητα της 5-LOX. Η ένωση αξιολογήθηκε έναντι της απομονωμένης ανθρώπινης ανασυνδυασμένης 5-λιποξυγενάσης (5-LOX), καθώς και έναντι των ενζύμων COX-1 και COX-2. Η 2'-OH OLEA παρουσίασε ιδιαίτερα ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι της απομονωμένης 5-LOX, με τιμή IC_{50} $0,22 \pm 0,09 \mu M$, συγκρίσιμη με εκείνη του πρότυπου αναστολέα Zileuton. Αντιθέτως, δεν παρατηρήθηκε αναστολή της παραγωγής προϊόντων της 5-LOX σε κυτταρικό σύστημα, ούτε ανασταλτική δράση έναντι των απομονωμένων COX-1 και COX-2, γεγονός που υποδεικνύει επιλεκτική δράση σε επίπεδο καθαρού ενζύμου και αναδεικνύει τη 2'-OH OLEA ως μοριακό πρότυπο για περαιτέρω δομική και φαρμακολογική βελτιστοποίηση.



Σχήμα 7. Επιδράσεις της 2'-OH OLEA στη δραστικότητα των ενζύμων LOX και COX. **(A)** Απομονωμένη ανθρώπινη 5-LOX ή ουδετερόφιλα προεπώσθησαν με $10 \mu M$ 2'-OH OLEA, $10 \mu M$ ολευροπεΐνη ή $3 \mu M$ zileuton· προστέθηκαν $20 \mu M$ AA ή διεγέρτης A23187 και αναλύθηκαν τα προϊόντα 5-LOX (LTB₄, trans-LTB₄, epi-trans-LTB₄, 5-HETE) με RP-HPLC. **(B)** Προσδιορισμός IC_{50} της 2'-OH OLEA για την απομονωμένη 5-LOX, δεδομένα ως % μάρτυρα \pm SEM, $n = 3$. **(C)** Απομονωμένη COX-1/COX-2 επώσθησε με $10 \mu M$ 2'-OH OLEA ή $10 \mu M$ ινδομεθακίνη και αξιολογήθηκε η δραστικότητά.

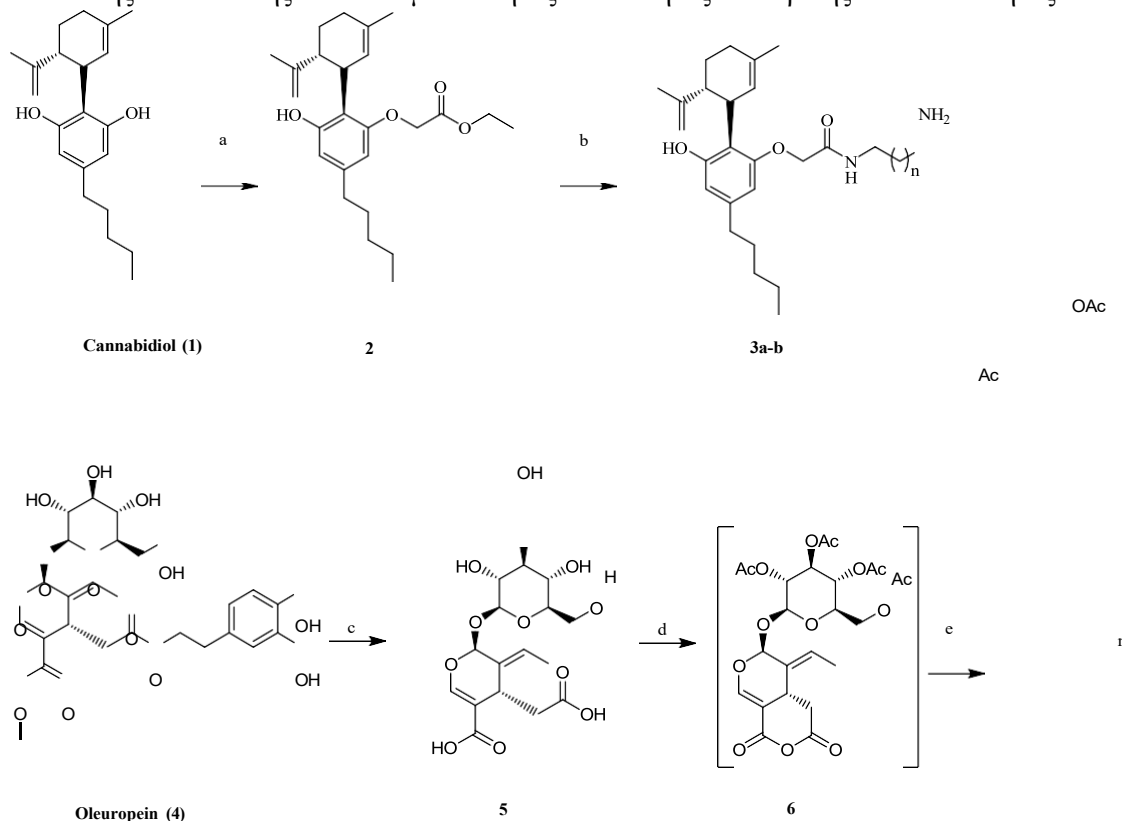
Όσον αφορά το τέταρτο σκέλος, αφορά την σύνθεση υβριδίων τετραϋδροκαναβινόλης-ολεοκανθάλης. Η κανναβιδιόλη (cannabidiol, CBD) αποτελεί το κυριότερο μη ψυχοδραστικό φυσικό συστατικό του *Cannabis sativa* και έχει προσελκύσει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον λόγω του ευρέος φαρμακολογικού της προφίλ, το οποίο περιλαμβάνει αντιφλεγμονώδη, αναλγητική, ανοσοτροποποιητική, αντιοξειδωτική και νευροπροστατευτική δράση. Έχει αναφερθεί ότι η CBD αλληλεπιδρά με το ενδοκανναβινοειδές σύστημα, παρουσιάζοντας ανταγωνιστική ή τροποποιητική δράση στους υποδοχείς CB1 και CB2. Η ενεργοποίηση του CB2 υποδοχέα συνδέεται στενά με φλεγμονώδεις διεργασίες και έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση ενζύμων της οικογένειας των λιποξυγενασών (LOXs), τα οποία διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη βιοσύνθεση προφλεγμονωδών λιπιδικών μεσολαβητών. Παράλληλα, έχει καταδειχθεί ότι η CBD, σε χαμηλές συγκεντρώσεις, αναστέλλει άμεσα τη δράση της 5-λιποξυγενάσης (5-LOX), μειώνοντας την παραγωγή λευκοτριενίων. Επιπλέον, η CBD φαίνεται να ενεργοποιεί την 15-LOX-1, η οποία εμπλέκεται στη βιοσύνθεση εξειδικευμένων προ-επιλυτικών μεσολαβητών (SPMs), που προάγουν την ενεργό επίλυση της φλεγμονής και την αποκατάσταση της ομοιόστασης. Μελέτες *in vivo* έχουν επιβεβαιώσει την ταυτόχρονη καταστολή της παραγωγής λευκοτριενίων και την αύξηση των επιπέδων SPMs, υποστηρίζοντας το θεραπευτικό δυναμικό της CBD σε φλεγμονώδεις παθολογικές καταστάσεις.

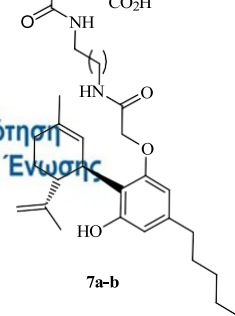
Αντίστοιχα, τα σεκοϊριδοειδή της ελιάς, όπως η ολευροπεΐνη, ο ολεοσίδης και η ολεοκανθάλη,

τα οποία απαντώνται στα φύλλα και στους καρπούς του *Olea europaea* L., έχουν αναγνωρισθεί για τις έντονες αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές τους. Οι ενώσεις αυτές έχουν συσχετιστεί με ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων, συμπεριλαμβανομένων καρδιοπροστατευτικών, νευροπροστατευτικών και αντικαρκινικών επιδράσεων. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η ολεοκανθάλη και η ολεασεΐνη αναστέλλουν αποτελεσματικά τη δράση της 5-LOX, ενώ δεδομένα από το εργαστήριό μας καταδεικνύουν ότι σεκοϊριδοειδή τύπου ολεοσίδη παρουσιάζουν αυξημένη ανασταλτική ισχύ έναντι του ενζύμου.

Η σύζευξη δύο βιοδραστικών φυσικών προϊόντων σε ένα ενιαίο μόριο συνιστά μία ελκυστική στρατηγική για την ανάπτυξη ενώσεων πολλαπλού μηχανισμού δράσης. Η μοριακή υβριδοποίηση επιτρέπει τη συνδυαστική στόχευση διαφορετικών βιολογικών οδών, με δυνητικά βελτιωμένη αποτελεσματικότητα και μειωμένη τοξικότητα. Στο πλαίσιο αυτό, διατυπώθηκε η υπόθεση ότι η σύζευξη της CBD με σεκοϊριδοειδή της ελιάς, όπως η ολεοσίδη ή η ολεοκανθάλη, θα μπορούσε να διατηρήσει ή και να ενισχύσει την αντιφλεγμονώδη δράση, μέσω συνδυαστικής ρύθμισης της οδού της 5-LOX και σχετιζόμενων φλεγμονωδών μηχανισμών.

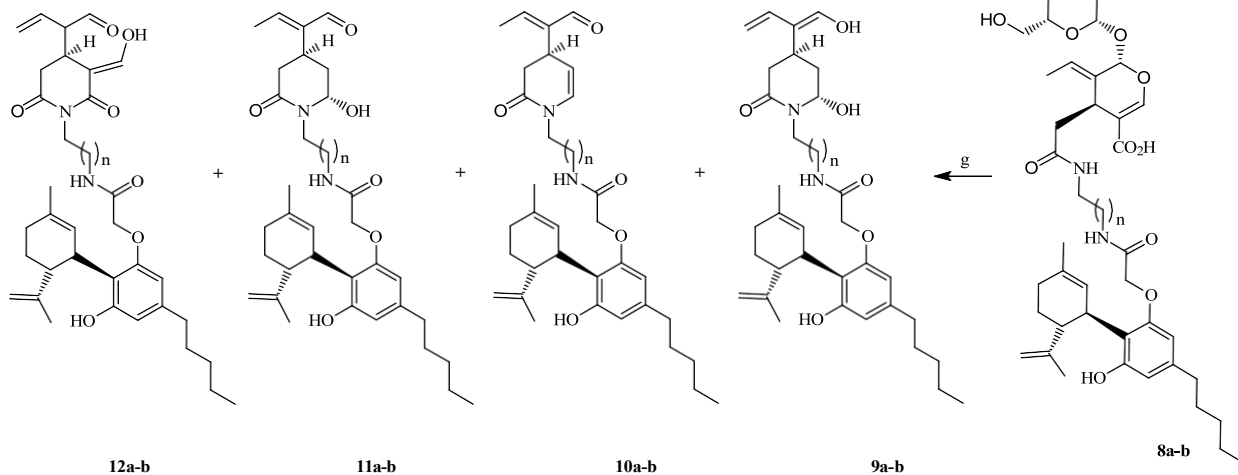
Για τον σκοπό αυτό, αναπτύχθηκαν και συντέθηκαν υβριδικά μόρια CBD–ολεοσίδης και CBD–ολεοκανθάλης, μέσω εύκαμπτων, χαμηλού μοριακού βάρους συνδετικών ομάδων, σχεδιασμένων ώστε να διατηρούν τις φαρμακοφόρες περιοχές και των δύο φυσικών προϊόντων. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στη μελέτη της σχέσης δομής–δραστηριότητας, διερευνώντας την επίδραση του μήκους και της λιποφιλίας του συνδέτη στη βιολογική δραστηριότητα. Η βιολογική αξιολόγηση των υβριδίων πραγματοποιήθηκε τόσο σε σύστημα απομονωμένου ανθρώπινου ανασυνδυασμένου ενζύμου 5-LOX, όσο και σε κυτταρικά συστήματα με ανθρώπινα ουδετερόφιλα, επιτρέποντας τη συνολική εκτίμηση της άμεσης ενζυμικής αναστολής αλλά και της αποτελεσματικότητας σε συνθήκες κυτταρικής πολυπλοκότητας.





a: n=1, NHCH₂CH₂NH

b: n=3, NHCH₂CH₂CH₂CH₂NH



Τα αποτελέσματα ανέδειξαν ότι ορισμένα υβριδικά μόρια εμφανίζουν σημαντικά αυξημένη ανασταλτική ισχύ έναντι της 5-LOX, σε σύγκριση με τη μητρική ένωση CBD, υποστηρίζοντας τη στρατηγική της μοριακής υβριδοποίησης ως αποτελεσματική προσέγγιση για την ανάπτυξη νέων αντιφλεγμονωδών παραγόντων με πολυπαραγοντικό μηχανισμό δράσης.

5-LOX activity, cell-free			
compound	% remaining at 1 μ M (vs. control)	% remaining at 10 μ M (vs. control)	IC ₅₀ (μ M)
10a	103.5 \pm 22.3	59.9 \pm 5.3	n.d. (> 10)
10b	31.1 \pm 5.9	18.8 \pm 0.4	0.47 \pm 0.09
11a	47.4 \pm 7.0	20.2 \pm 1.3	0.92 \pm 0.13
11b	24.8 \pm 2.8	12.3 \pm 1.6	0.36 \pm 0.08
12a	51.8 \pm 7.6	27.4 \pm 2.1	0.88 \pm 0.20
12b	72.5 \pm 6.1	28.1 \pm 4.8	n.d.
13a	81.0 \pm 5.9	24.0 \pm 3.8	5.16 \pm 0.25
13b	49.6 \pm 1.6	12.4 \pm 2.1	1.37 \pm 0.20
CBD	83.7 \pm 4.9	23.1 \pm 1.6	2.57 \pm 0.30

Πίνακας 2. Αναστολή της 5-LOX ενώσεις σε cell-free δοκιμασία.