



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 / Εφαρμογή φυσικών προϊόντων και παραγώγων τους σε μοντέλο Νόσου Αλτσχάιμερ σε νηματοιειδή σκώληκα

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

**ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ):** ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΠΑΛΗΚΑΡΑΣ (ΕΚΠΑ)

## Εφαρμογή φυσικών προϊόντων και παραγώγων τους σε μοντέλα νευροεκφυλιστικών νόσων / Εφαρμογή φυσικών προϊόντων και παραγώγων τους σε μοντέλο Νόσου Αλτσχάιμερ σε νηματοιειδή σκώληκα

**ΕΕ6. Ανάπτυξη καινοτόμων προκλινικών θεραπευτικών παρεμβάσεων κατά της πρόωρης εμφάνισης νευροεκφυλιστικών νοσημάτων Alzheimer και Parkinson**

**Τίτλος Παραδοτέου: 6.1** Εφαρμογή φυσικών προϊόντων και παραγώγων τους σε μοντέλα νευροεκφυλιστικών νόσων

**B.** Εφαρμογή φυσικών προϊόντων και παραγώγων τους σε μοντέλο Νόσου Αλτσχάιμερ σε νηματοιειδή σκώληκα (Ομάδα Παληκαρά)

### **ΣΥΝΤΟΜΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ / ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Στο πλαίσιο της Ενότητας Εργασίας 6 εξετάστηκε η νευροπροστατευτική δράση τριών φυτικών μορίων (LS1, LS2 και LS3), τα οποία παρήχθησαν από την ομάδα του Καθ. Λέανδρου Σκαλτσούνη, σε μοντέλα νόσου Αλτσχάιμερ στον *C. elegans*. Στόχος ήταν ο προσδιορισμός μη τοξικών συγκεντρώσεων και η αξιολόγηση της επίδρασης των μορίων σε λειτουργικούς φαινοτύπους που σχετίζονται με νευροεκφύλιση.

### **ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΥΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΕ – ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ**

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές τοξικότητας για όλες τις ενώσεις, ώστε να αποκλειστούν συγκεντρώσεις που θα μπορούσαν να επηρεάσουν αρνητικά τη βιωσιμότητα και την αναπαραγωγή των ζώων. Εξετάστηκαν πέντε μη τοξικές συγκεντρώσεις (5 μΜ, 10 μΜ, 20 μΜ, 50 μΜ και 100 μΜ) για κάθε μόριο και πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση νευροπροστασίας σε διαγονιδιακά μοντέλα που εκφράζουν Αβ1-42 στους νευρώνες. Παράλληλα, διερευνήθηκε πιθανή επίδραση των μορίων στη μιτοφαγία και την αυτοφαγία.

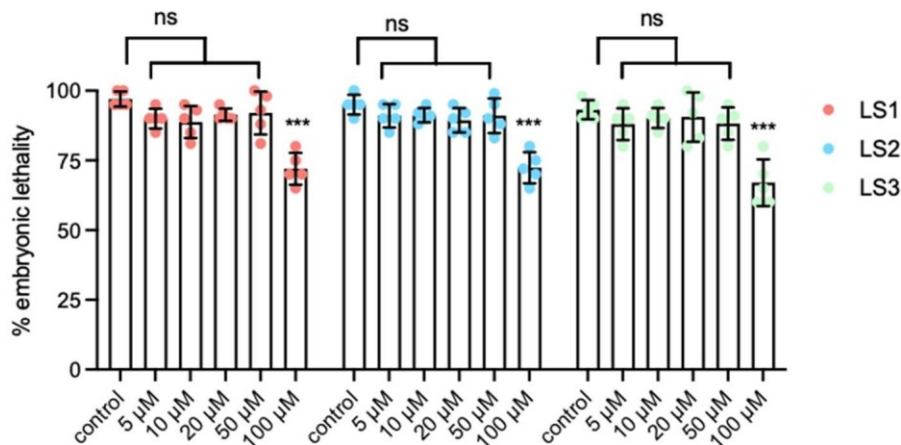
### **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

Κατά τη διάρκεια του έργου πραγματοποιήσαμε δοκιμές τοξικότητας για τα μόρια LS1, LS2 και LS3 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, με στόχο τον καθορισμό ασφαλούς εύρους δόσεων για τις επόμενες λειτουργικές μελέτες. Συγκεκριμένα, νηματώδεις αγρίου τύπου (N2) σταδίου L4 αναπτύχθηκαν παρουσία των υπό μελέτη συγκεντρώσεων των ενώσεων και αξιολογήθηκαν βασικοί δείκτες τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένων της επιβίωσης, της

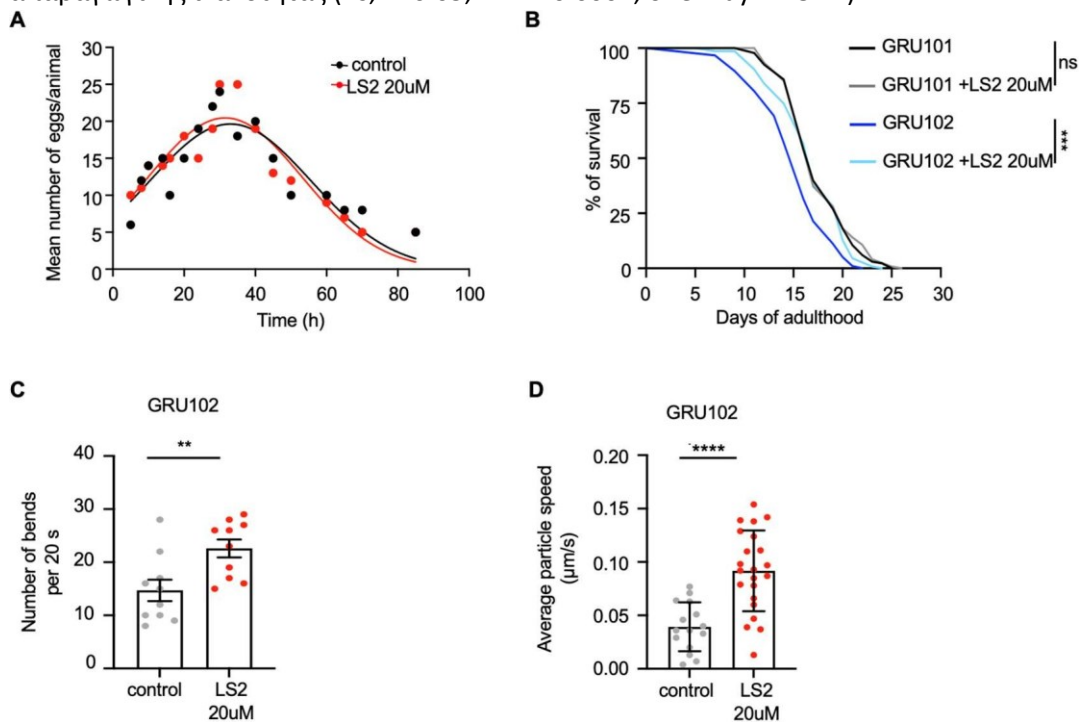
ωτοκίας/αναπαραγωγικής ικανότητας και της εμβρυϊκής ανάπτυξης/βιωσιμότητας (μέσω της εμβρυϊκής θνησιμότητας). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις δεν επηρέασαν σημαντικά τους παραπάνω δείκτες σε σχέση με τους μάρτυρες, υποδεικνύοντας καλή ανεκτικότητα των ενώσεων. Αντίθετα, μόνο στη συγκέντρωση 100  $\mu\text{M}$  παρατηρήθηκε εμφανής τοξικότητα, η οποία εκδηλώθηκε ως αυξημένη εμβρυϊκή θνησιμότητα, υποδηλώνοντας δοσοεξαρτώμενη επίδραση στις υψηλές συγκεντρώσεις (**Εικόνα 1**). Συνολικά, τα δεδομένα επιτρέπουν την επιλογή των μη τοξικών συγκεντρώσεων (<100  $\mu\text{M}$ ) για τη συνέχιση των πειραμάτων σε μοντέλα νευροεκφυλιστικών νόσων.

Από τις τρεις ενώσεις, το LS2 παρουσίασε νευροπροστατευτική δράση, καθώς οδήγησε σε αυξημένη κινητικότητα σε διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν ανθρώπινη Αβ1-42 στους νευρώνες, γεγονός που υποδηλώνει βελτίωση λειτουργικών δεικτών νευροεκφύλισης. Για τη διερεύνηση του θεραπευτικού δυναμικού του LS2 (20  $\mu\text{M}$ ) σε επίπεδο οργανισμού, χρησιμοποιήσαμε δύο καλά χαρακτηρισμένα στελέχη *C. elegans* που μοντελοποιούν την τοξικότητα του αμυλοειδούς-β1-42 (Αβ1-42). Το στέλεχος GRU102, το οποίο εκφράζει σε όλους τους νευρώνες την ανθρώπινη πρωτεΐνη Αβ1-42, παρουσιάζει σημαντικές διαταραχές στη νευρομυϊκή και αισθητικοκινητική λειτουργία, αναπαράγοντας βασικά στοιχεία παθολογίας της νόσου Αλτσχάμερ, ενώ ως γενετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος GRU101 που δεν εκφράζει Αβ1-42. Αρχικά, προκειμένου να αποκλειστεί πιθανή τοξικότητα, χορηγήθηκε η ουσία LS2 σε ζώα αγρίου τύπου (N2) και αξιολογήθηκαν δείκτες ανάπτυξης και αναπαραγωγής, χωρίς να παρατηρηθούν διαφορές στην ανάπτυξη, στον ρυθμό αύξησης ή στην ωτοκία/παραγωγή απογόνων, επιβεβαιώνοντας ότι το LS2 είναι καλά ανεκτό και μη τοξικό (**Εικόνα 2A**). Στη συνέχεια, η χορήγηση LS2 δεν επηρέασε τη διάρκεια ζωής του στελέχους GRU101, υποδεικνύοντας απουσία μη ειδικών επιδράσεων στη μακροβιότητα (**Εικόνα 2B**). Αντίθετα, στο στέλεχος GRU102 το LS2 αποκατέστησε σημαντικά τη μειωμένη διάρκεια ζωής που προκαλείται από την έκφραση Αβ1-42, καταδεικνύοντας προστατευτική δράση σε συνθήκες πρωτεϊνοτοξικού στρες (**Εικόνα 2B**). Επιπλέον, το LS2 οδήγησε σε σημαντική βελτίωση της κινητικής απόδοσης των GRU102 ζώων, τόσο στη δοκιμασία κολύμβησης (αυξημένος αριθμός καμπών σώματος) όσο και στην κινητικότητα σε στερεό υπόστρωμα (αυξημένη ταχύτητα), υποστηρίζοντας ότι το LS2 βελτιώνει λειτουργικούς δείκτες νευροεκφύλισης (**Εικόνα 2C, D**). Συνολικά, τα αποτελέσματα αναδεικνύουν το LS2 ως μία μη τοξική ένωση με σαφή *in vivo* νευροπροστατευτική δράση έναντι της Αβ-εξαρτώμενης τοξικότητας και της συνακόλουθης λειτουργικής έκπτωσης.

Στο πλαίσιο της διερεύνησης του μηχανισμού δράσης του LS2, αξιολογήσαμε κατά πόσο η χορήγηση του επηρεάζει βασικούς κυτταροπροστατευτικούς άξονες που σχετίζονται με τη γήρανση και τη νευροεκφύλιση, όπως η ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων DAF-16/FOXO και HSF-1, η ενεργοποίηση της αυτοφαγίας, καθώς και η επίδραση στον σχηματισμό συσσωματωμάτων Tau. Συγκεκριμένα, νηματώδεις στο στάδιο L4 καλλιεργήθηκαν παρουσία LS2 (20  $\mu\text{M}$ ) έως την 4η ημέρα ενηλικίωσης, και πραγματοποιήθηκαν ποσοτικές αναλύσεις μέσω αντίστοιχων φθορίζοντων reporters/δεικτών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η θεραπεία με LS2 δεν οδήγησε σε στατιστικά σημαντικές μεταβολές σε κανέναν από τους παραπάνω δείκτες σε σύγκριση με τα δείγματα ελέγχου, υποδεικνύοντας ότι στις συγκεκριμένες συνθήκες το LS2 δεν ενεργοποιεί τον άξονα DAF-16 ή HSF-1, δεν μεταβάλλει τη βασική αυτοφαγική δραστηριότητα και δεν επηρεάζει σημαντικά τη δημιουργία/συσσώρευση Tau (**Εικόνα 3A-D**).

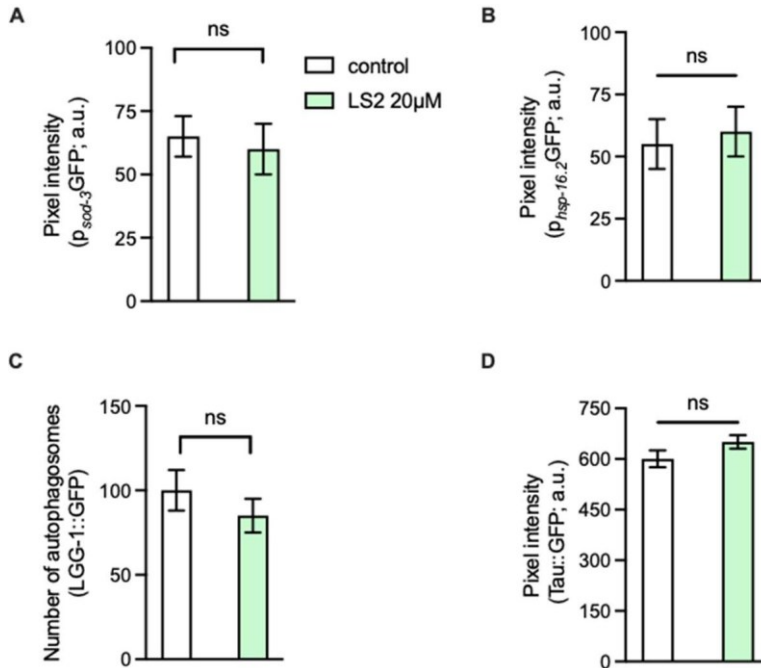


**Εικόνα 1. Αξιολόγηση τοξικότητας των LS1, LS2 και LS3 σε *C. elegans* μέσω εμβρυϊκής θνησιμότητας.** Νηματώδεις αγρίου τύπου (N2) στο στάδιο L4 καλλιεργήθηκαν παρουσία των ενώσεων LS1, LS2 και LS3 στις συγκεντρώσεις 5, 10, 20, 50 και 100 μΜ. Η τοξικότητα αξιολογήθηκε μέσω της εμβρυϊκής ανάπτυξης/βιωσιμότητας, με μέτρηση της εμβρυϊκής θνησιμότητας (% embryonic lethality), καθώς και μέσω δεικτών επιβίωσης και αναπαραγωγικής ικανότητας (ns,  $P > 0.05$ , \*\*\* $P < 0.0001$ , one-way ANOVA).



**Εικόνα 2. Το LS2 δεν είναι τοξικό και μετριάζει φαινότυπους που προκαλούνται από το αμυλοειδές-β στον *C. elegans*.** (A) Η χορήγηση LS2 δεν επηρεάζει την παραγωγή αυγών σε σύγκριση με τους μη θεραπευμένους μάρτυρες, υποδεικνύοντας την απουσία αναπαραγωγικής τοξικότητας. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως ο μέσος αριθμός αυγών ανά ζώο με την πάροδο του χρόνου. (B) Ανάλυση επιβίωσης νηματωδών ελέγχου (GRU101) και νηματωδών που εκφράζουν αμυλοειδές-β (GRU102) παρουσία ή απουσία LS2 (20 μΜ). Η θεραπεία με LS2 δεν μεταβάλλει τη διάρκεια ζωής του στελέχους ελέγχου GRU101, ενώ αποκαθιστά σημαντικά τη μειωμένη διάρκεια ζωής των ζώων GRU102 που εκφράζουν

παγκοιλιακά (pan-neuronally) Αβ1–42. Η στατιστική σημαντικότητα αξιολογείται με τη δοκιμασία log-rank (Mantel–Cox) (\*\* $p < 0.001$ ; ns,  $p > 0.05$ ). (C) Η κινητική απόδοση των ζώων GRU102 αξιολογείται με τη δοκιμασία κολύμβησης (thrashing). Τα ζώα που έλαβαν LS2 εμφανίζουν σημαντική αύξηση στον αριθμό καμπών σώματος ανά 20 s σε σύγκριση με τους μη θεραπευμένους μάρτυρες, υποδεικνύοντας βελτιωμένη νευρομυϊκή λειτουργία (\*\* $p < 0.01$ ). (D) Ταχύτητα έρπιν των νηματωδών GRU102 σε στερεό υπόστρωμα. Η χορήγηση LS2 αυξάνει σημαντικά τη μέση ταχύτητα κίνησης σε σχέση με τα μη θεραπευμένα ζώα, αντανακλώντας βελτιωμένη αισθητικοκινητική απόδοση (\*\* $p < 0.0001$ ).



**Εικόνα 3. Η ουσία LS2 (20 µM) δεν επηρεάζει την ενεργοποίηση DAF-16/FOXO, HSF-1, την αυτοφαγία ή τη συσσώρευση Ταυ σε *C. elegans*.** (A) Ποσοτικοποίηση της έντασης σήματος του reporter του DAF-16/FOXO. (B) Ποσοτικοποίηση της έντασης σήματος του reporter του HSF-1. (C) Ποσοτικοποίηση του αριθμού αυτοφαγοσωμάτων μέσω LGG-1::GFP. (D) Ποσοτικοποίηση της έντασης σήματος Tau::GFP ως δείκτης συσσώρευσης/σχηματισμού συσσωματωμάτων Ταυ. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ control και LS2 σε κανέναν δείκτη ( $n=40$ ; ns,  $p > 0.05$ ; t-test).

### ΠΙΘΑΝΕΣ ΛΟΙΠΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Τα αποτελέσματα της ΕΕ3 αναδεικνύουν το LS2 ως υποψήφια φυσική ένωση με πιθανή αξία νευροπροστασίας σε μοντέλα νευροεκφυλιστικών νόσων, ενώ θέτουν τη βάση για περαιτέρω μελέτες που θα διερευνήσουν λεπτομερέστερα τον μηχανισμό δράσης του.