



**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): ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛΙΔΟΥ (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 6.1:** Εφαρμογή φυσικών προϊόντων και παραγώγων τους σε μοντέλα νευροεκφυλιστικών νόσων

**Παραδοτέο 6.1.Γ.** Ομάδα Εμμανουηλίδου

### **ΣΥΝΤΟΜΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ / ΕΙΣΑΓΩΓΗ (συνολικά για 6.1.)**

Ανάπτυξη καινοτόμων προκλινικών θεραπευτικών παρεμβάσεων για την αντιμετώπιση των νευροεκφυλιστικών νόσων Alzheimer (NA) και Parkinson (ΝΠ). Στόχος του είναι να αξιοποιηθεί η अपαράμιλλη Ελληνική βιοποικιλότητα μέσω της μοναδικής συλλογής του εργαστηρίου "Αξιοποίησης και Ανάπτυξης Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων" του Τμήματος Φαρμακευτικής, η οποία περιλαμβάνει 1500 φυτικά είδη και 9500 εκχυλίσματα καθώς και απομονωμένα σε καθαρή μορφή φυσικά προϊόντα. Αντικείμενο του παραδοτέου είναι να αναπτυχθεί μία καθετοποιημένη διαδικασία για την ανακάλυψη, ανάπτυξη και αξιοποίηση φυσικών προϊόντων σε μοντέλα νευροεκφυλιστικών νόσων. Συγκεκριμένα η προσέγγιση αυτή θα περιλαμβάνει μελέτες αλληλεπίδρασης μικρών μορίων με επιλεγμένους πρωτεϊνικούς στόχους μέσω μοριακής προσομοίωσης και σχέσεις δομής-δράσης (SAR), την στοχευμένη απομόνωση και δομική ταυτοποίηση νέων ενώσεων που προέρχονται από φυσικές πηγές και τον σχεδιασμό και σύνθεση νέων αναλόγων τους. Θα αξιοποιηθούν επίσης βιοδραστικά φυσικά προϊόντα, συστατικά της μεσογειακής διατροφής στους συγκεκριμένους στόχους λαμβάνοντας υπόψη τις υπάρχουσες επιδημιολογικές μελέτες. Τέλος, τα επιλεγμένα φυσικά και ημισυνθετικά μόρια τα οποία θα δείξουν in vitro δράση θα παραχθούν στη συνέχεια σε επαρκείς ποσότητες για πειραματικές μελέτες. Στην τελευταία φάση του έργου θα δοκιμαστούν οι 2-3 πιο ελπιδοφόρες χημικές ενώσεις στα κυτταρικά και ζωικά μοντέλα των NA και ΝΠ.

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

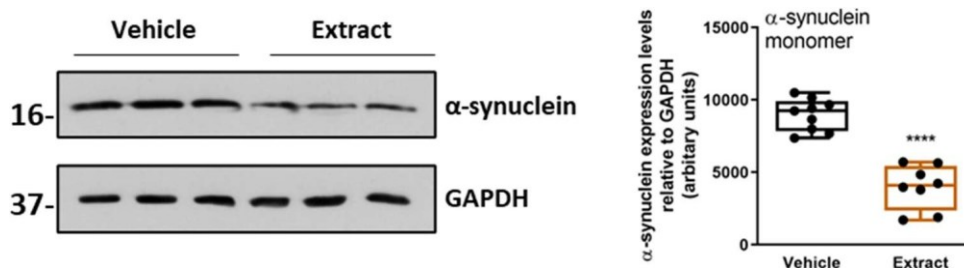
Για την αξιοποίηση των ουσιών που προέρχονται από φυτικά είδη και εκχυλίσματα ως φαρμακευτικές προσεγγίσεις στη ΝΠ, στο εργαστήριο της κ. Εμμανουηλίδου αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε μια αλληλουχία πειραματικών μεθοδολογιών (pipeline) με σκοπό τη δοκιμή και ανάδειξη ενώσεων που εμφανίζουν ανασταλτική δράση έναντι της συσσωμάτωσης της α-συνουκλεΐνης. Η υβριδική αυτή μεθοδολογία αποτελείται από τα εξής διακριτά βήματα: 1) In vitro δοκιμασία αναστολής της επιμήκυνσης ινιδίων α-συνουκλεΐνης (seed elongation assay), 2) Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT, 3) Έλεγχος των επιπέδων της συσσωματωμένης α-συνουκλεΐνης σε κύτταρα νευροβλαστώματος SHSY5Y [3] με χρήση ειδικής ELISA, 4) Αξιολόγηση της ενζυμικής δράσης των πρωτεολυτικών συστημάτων των κυττάρων (πρωτεάσωμα και λυσόσωμα), και 5) Αξιολόγηση δομικών παρεμβολών με χρήση μικροσκοπίας SEM. Οι παραπάνω διεργασίες έχουν τη δυνατότητα να εφαρμοστούν σε πολλά δείγματα (high-throughput) και οδηγούν στην



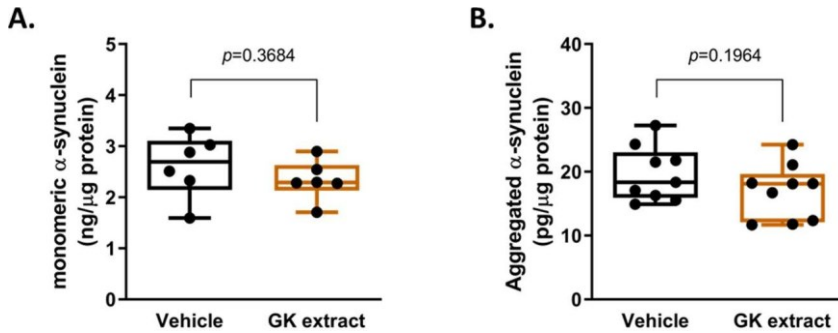
ανάδειξη ενώσεων οι οποίες αναστέλλουν τη συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης in vitro και σε κυτταρικά συστήματα.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

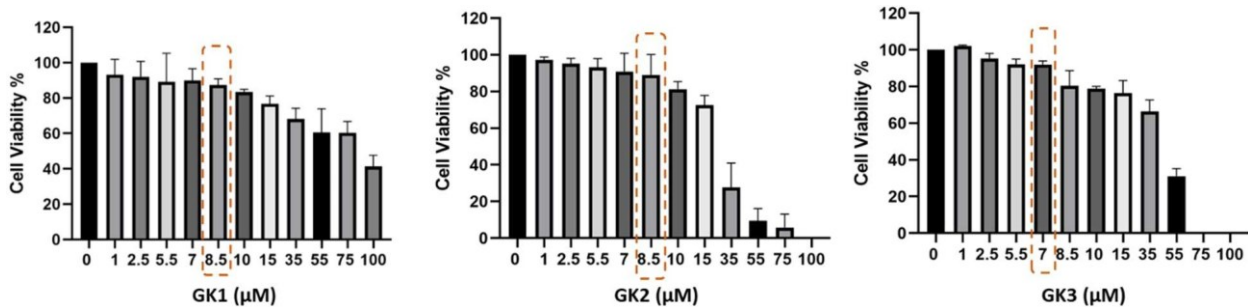
Σε συνεργασία με την ομάδα του Γ. Κόκοτου, η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε εφαρμόστηκε για την διερεύνηση ενός φυτικού εκχυλίσματος το οποίο φάνηκε να μειώνει σημαντικά τα επίπεδα της α-συνουκλεΐνης στο κυτταρικό μοντέλο SH-SY5Y μετά από 24 ώρες. Η δράση του φυτικού εκχυλίσματος διερευνήθηκε περαιτέρω χρησιμοποιώντας ειδικές δοκιμασίες ELISA για την ανίχνευση της συσσωματωμένης και της ολικής α-συνουκλεΐνης, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και οι δύο μορφές της α-συνουκλεΐνης μειώνονται αλλά όχι σε στατιστικά σημαντικά επίπεδα. Μετά από ανάλυση των βασικών συστατικών του εκχυλίσματος από την ομάδα του κ. Κόκοτου, τα τρία συστατικά του εκχυλίσματος (GK1, GK2, GK3) που ανακτήθηκαν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση δόθηκαν σε καθαρή μορφή στην ομάδα της κ. Εμμανουηλίδου με σκοπό να αποφασιστεί αν κάποια από αυτές είναι υπεύθυνη για τη μείωση της α-συνουκλεΐνης στα κύτταρα. Οι βέλτιστες συγκεντρώσεις των ουσιών αποφασίστηκαν μετά από δοκιμασία βιωσιμότητας MTT. Τα κύτταρα SH-SY5Y που υπερ-εκφράζουν την α-συνουκλεΐνη επωάστηκαν ξεχωριστά με κάθε μια από τις τρεις ουσίες για 24 ώρες. Ανάλυση των κυτταρικών εκχυλισμάτων με ανοσοσύτπωση κατά Western έδειξε ότι και οι τρεις ουσίες έχουν τη δυνατότητα να μειώνουν την α-συνουκλεΐνη κατά περίπου 40%. Περαιτέρω ανάλυση των εκχυλισμάτων χρησιμοποιώντας την ELISA για την συσσωματωμένη μορφή της α-συνουκλεΐνης έδειξε ότι μόνο η ουσία GK3 επιδρά στην ινδιαική/ολιγομερή μορφή της α-συνουκλεΐνης η οποία εν γένει έχει συσχετιστεί με την παθολογία στη ΝΠ. Συμπερασματικά, η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε ανέδειξε μία ουσία προερχόμενη από φυτικό εκχύλισμα η οποία δρα μειώνοντας την συσσωματωμένη α-συνουκλεΐνη και ως εκ τούτου μπορεί να έχει φαρμακευτική δράση. Οι ομάδες των Γ. Κόκοτου και Ε. Εμμανουηλίδου εργάζονται ήδη για την αποσαφήνιση του μηχανισμού δράσης της ουσίας GK3 στο συγκεκριμένο κυτταρικό σύστημα.



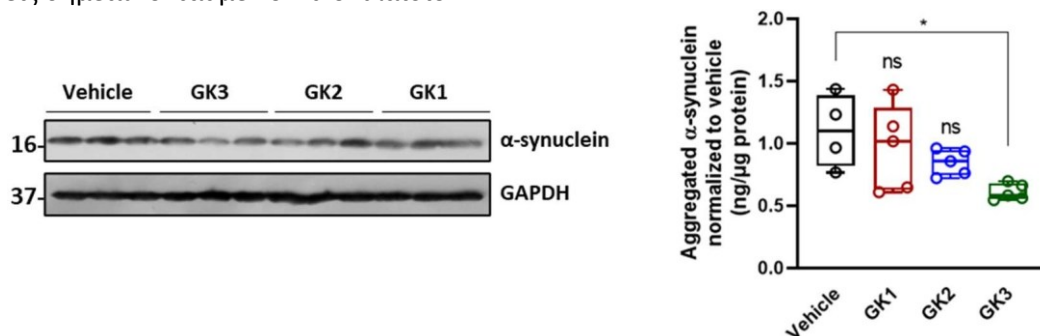
**Εικόνα 4. Το φυτικό εκχύλισμα GK μειώνει δραστικά τα επίπεδα της ενδοκυττάριας α-συνουκλεΐνης.** Κύτταρα SH-SY5Y που υπερεκφράζουν α-συνουκλεΐνη επωάστηκαν με 0,05 mg/ml εκχυλίσματος για 24 ώρες. Τα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν και αναλύθηκαν με ανοσοσύτπωση κατά Western. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης. Η σύγκριση των δειγμάτων έγινε με Student's t-test ( $p < 0.0001$ ).



**Εικόνα 5.** Το εκχύλισμα GK μειώνει τόσο την ολική όσο και την συσσωματωμένη  $\alpha$ -συνουκλεΐνη αλλά όχι σε στατιστικά σημαντικά επίπεδα. Η ολική (A) και η συσσωματωμένη (B)  $\alpha$ -συνουκλεΐνη μετρήθηκαν στα κυτταρικά εκχυλίσματα με ειδικές δοκιμασίες ELISA.



**Εικόνα 6.** Επιλογή βέλτιστων συγκεντρώσεων των ουσιών GK1, GK2, GK3. Οι ουσίες χορηγήθηκαν σε κύτταρα SH-SY5Y για 24 ώρες και η βιωσιμότητα των κυττάρων ελέγχθηκε με τη δοκιμασία MTT. Οι βέλτιστες συγκεντρώσεις σημειώνονται με κόκκινο πλαίσιο.



**Εικόνα 7.** Η ουσία GK3 μειώνει τη συσσωματωμένη μορφή της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Οι ουσίες χορηγήθηκαν σε κύτταρα SH-SY5Y για 24 ώρες σε συγκέντρωση 8  $\mu$ M. Η συσσωματωμένη μορφή της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης μετρήθηκε με ειδική δοκιμασία ELISA μετά από τη χορήγηση των ουσιών. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων έγινε με One-way Anova test ( $p=0.0162$ ).