



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 πρωτοπόρων φαρμακευτικών ουσιών σε μοντέλα νευροεκφυλιστικών νόσων / Εφαρμογή πρωτοπόρων φαρμακευτικών ουσιών σε μοντέλα Νόσου Πάρκινσον σε *C. elegans*

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 πρωτοπόρων φαρμακευτικών ουσιών σε μοντέλα νευροεκφυλιστικών νόσων / Εφαρμογή πρωτοπόρων φαρμακευτικών ουσιών σε μοντέλα Νόσου Πάρκινσον σε *C. elegans*

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

**Τίτλος Παραδοτέου 6.2. Εφαρμογή πρωτοπόρων φαρμακευτικών ουσιών σε μοντέλα
νευροεκφυλιστικών νόσων**

Α. Εφαρμογή πρωτοπόρων φαρμακευτικών ουσιών σε μοντέλα Νόσου Πάρκινσον σε *C. elegans* (Ομάδα Παληκαρά)

ΣΥΝΤΟΜΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ / ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στο πλαίσιο της Ενότητας Εργασίας 6 αξιολογήθηκε η νευροπροστατευτική δράση τριών συνθετικών μορίων (GK1, GK2 και GK3), τα οποία παρήχθησαν από την ομάδα του Καθ. Γεωργίου Κόκοτου, σε μοντέλα νόσου Πάρκινσον στον *C. elegans*. Στόχος ήταν η επιλογή μη τοξικών συγκεντρώσεων και η αρχική διερεύνηση της ικανότητας των μορίων να προστατεύουν τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες έναντι α-συνουκλείνο-εξαρτώμενης νευροτοξικότητας.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΥΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΕ – ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν δοκιμές τοξικότητας, ώστε να διαπιστωθεί η ασφάλεια των μορίων σε βασικούς βιολογικούς δείκτες του νηματώδη, όπως ανάπτυξη, ωστοκία και εμβρυογένεση. Στη συνέχεια, εξετάστηκαν πέντε μη τοξικές συγκεντρώσεις για κάθε μόριο (10 μM , 50 μM , 100 μM και 300 μM) και πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της νευροπροστατευτικής δράσης με καταγραφή της επιβίωσης των ντοπαμινεργικών νευρώνων σε διαγονιδιακά μοντέλα που εκφράζουν α-συνουκλείνη. Παράλληλα, διερευνήθηκε ενδεχόμενη επίδραση των μορίων σε μηχανισμούς κυτταρικής ποιότητας όπως η μιτοφαγία και η αυτοφαγία.

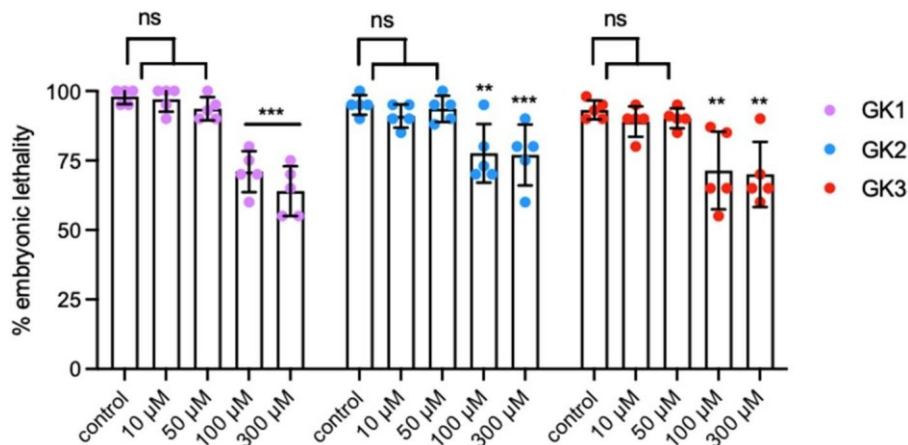
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στο πλαίσιο του έργου πραγματοποιήσαμε δοκιμές τοξικότητας για τα συνθετικά μόρια GK1 (GK718), GK2 (GK721) και GK3 (GK740) στον νηματώδη *C. elegans*, με στόχο τον καθορισμό ασφαλών συγκεντρώσεων για τη συνέχεια των πειραματικών προσεγγίσεων. Νηματώδεις αγρίου τύπου (N2) στο στάδιο L4 καλλιεργήθηκαν παρουσία των ενώσεων στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100 και 300 μM , ενώ ως βασικός δείκτης τοξικότητας χρησιμοποιήθηκε η εμβρυϊκή θνησιμότητα (% embryonic lethality), ως μέτρο διαταραχής της

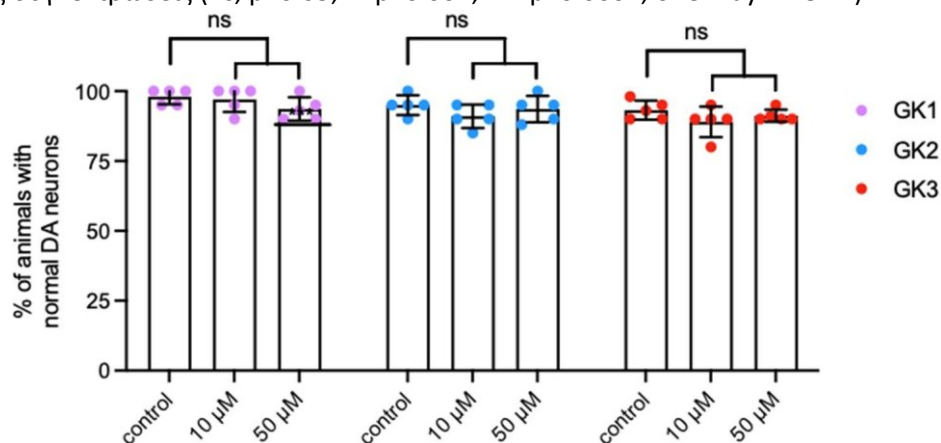
εμβρυϊκής ανάπτυξης και βιωσιμότητας των απογόνων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στις χαμηλές συγκεντρώσεις 10 και 50 μM δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές μεταβολές σε σχέση με τον μάρτυρα, υποδεικνύοντας καλή ανεκτικότητα των μορίων σε αυτό το εύρος (**Εικόνα 1**). Αντίθετα, στη συγκέντρωση 100 μM παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της εμβρυϊκής θνησιμότητας (ανάλογα με το μόριο), ενώ στη 300 μM η τοξικότητα ήταν εντονότερη, υποδεικνύοντας δοσοεξαρτώμενη τοξικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις (**Εικόνα 1**). Συνολικά, τα δεδομένα τεκμηριώνουν ότι οι συγκεντρώσεις 10–50 μM είναι μη τοξικές και κατάλληλες για περαιτέρω λειτουργικές μελέτες, ενώ οι ≥ 100 μM απαιτούν προσοχή λόγω αυξημένης εμβρυϊκής θνησιμότητας.

Στη συνέχεια, αξιολογήσαμε την επίδραση των συνθετικών μορίων GK1, GK2 και GK3 σε μη τοξικές συγκεντρώσεις (10 και 50 μM) στη βιωσιμότητα και μορφολογία των ντοπαμινεργικών νευρώνων σε νηματώδεις αγρίου τύπου (N2). Συγκεκριμένα, τα ζώα εκτέθηκαν στα μόρια από το στάδιο L4 έως την 4η ημέρα ενηλικίωσης, και ακολούθησε ποσοτική αξιολόγηση της ακεραιότητας των ντοπαμινεργικών νευρώνων (DA). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, στο συγκεκριμένο χρονικό διάστημα επώασης και στις παραπάνω συγκεντρώσεις, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στη μορφολογία ή στη βιωσιμότητα των DA νευρώνων σε σχέση με τους μάρτυρες, υποδεικνύοντας ότι τα GK μόρια δεν εμφανίζουν νευροτοξικότητα σε φυσιολογικό υπόβαθρο (**Εικόνα 2**). Με βάση αυτά τα δεδομένα, επιλέξαμε τη χαμηλότερη συγκέντρωση (10 μM) για τη συνέχεια, προκειμένου να εξεταστεί η δράση των μορίων σε διαγονιδιακά μοντέλα νόσου Πάρκινσον.

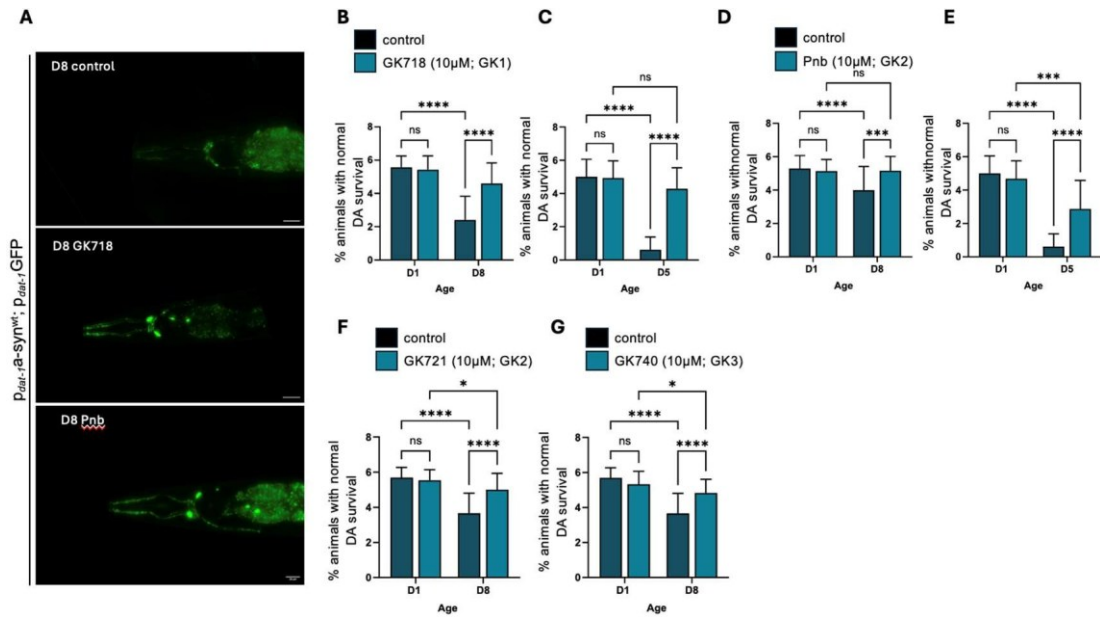
Στο πλαίσιο του έργου, χρησιμοποιήσαμε *in vivo* μοντέλα νόσου Πάρκινσον στον *C. elegans* που εκφράζουν είτε την ανθρώπινη α -συνουκλεΐνη αγρίου τύπου (α -syn^{wt}) είτε τη μεταλλαγμένη μορφή A30G (α -syn^{A30G}) σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες, προκειμένου να αξιολογήσουμε τη νευροπροστατευτική δράση υποψήφιων φαρμακευτικών ενώσεων. Η αποτελεσματικότητα των ενώσεων εκτιμήθηκε με βάση τη βιωσιμότητα και μορφολογία των ντοπαμινεργικών νευρώνων κατά τη γήρανση, ως δείκτες νευροεκφύλισης που σχετίζεται με την α -συνουκλεΐνη. Η ανάλυσή μας έδειξε ότι τέσσερα (4) μόρια παρουσίασαν σημαντική νευροπροστατευτική δράση στο μοντέλο που εκφράζει α -syn^{wt}, βελτιώνοντας την επιβίωση/ακεραιότητα των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Επιπλέον, από τις ενώσεις που εξετάστηκαν, το GK718/GK1 καθώς και το Panobinostat εμφάνισαν νευροπροστατευτική δράση όχι μόνο έναντι της αγρίου τύπου α -συνουκλεΐνης αλλά και στο πιο επιθετικό μοντέλο α -syn^{A30G}, υποδεικνύοντας ότι μπορούν να μετριάσουν τη νευροτοξικότητα που σχετίζεται με τη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη. Συνολικά, τα ευρήματα αυτά αναδεικνύουν τα GK718/ GK1 και Panobinostat ως ιδιαίτερα υποσχόμενες ενώσεις για περαιτέρω μηχανιστική διερεύνηση και αξιολόγηση σε προκλινικά πλαίσια.



Εικόνα 1. Δοσοεξαρτώμενη τοξικότητα των συνθετικών μορίων GK1, GK2 και GK3 σε *C. elegans* μέσω εμβρυϊκής θνησιμότητας. Η τοξικότητα αξιολογήθηκε με ποσοτικοποίηση της εμβρυϊκής θνησιμότητας (% embryonic lethality) ως δείκτη εμβρυϊκής βιωσιμότητας. Οι συγκεντρώσεις 10–50 μM δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τον μάρτυρα, ενώ στις συγκεντρώσεις 100 μM και κυρίως 300 μM παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της εμβρυϊκής θνησιμότητας, υποδεικνύοντας δοσοεξαρτώμενη τοξικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις (ns, $p > 0.05$; ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, one-way ANOVA).



Εικόνα 2. Τα συνθετικά μόρια GK718/GK1, GK721/GK2 και GK740/GK3 (10 και 50 μM) δεν επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των ντοπαμινεργικών νευρώνων σε αγρίου τύπου *C. elegans*. Η ακεραιότητα των ντοπαμινεργικών νευρώνων αξιολογήθηκε ως ποσοστό ζώων με φυσιολογικούς DA νευρώνες ($n=40$; $p > 0.05$; one-way ANOVA).



Εικόνα 3. Αξιολόγηση νευροπροστατευτικής δράσης υποψήφιων ενώσεων σε μοντέλα Πάρκινσον στον *C. elegans* που εκφράζουν $\alpha\text{-syn}^{wt}$ ή $\alpha\text{-syn}^{A30G}$. (Α) Αντιπροσωπευτικές εικόνες ντοπαμινεργικών νευρώνων σε διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν ανθρώπινη $\alpha\text{-syn}$ κλειδί, σε συνθήκες control και μετά από επώαση με επιλεγμένες ενώσεις. (Β–Γ) Ποσοτικοποίηση της ακεραιότητας/βιωσιμότητας των ντοπαμινεργικών νευρώνων κατά τη γήρανση σε μοντέλα που εκφράζουν $\alpha\text{-syn}^{wt}$ ή $\alpha\text{-syn}^{A30G}$, παρουσία ή απουσία των υπό εξέταση μορίων. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τέσσερις (4) ενώσεις εμφανίζουν νευροπροστατευτική δράση στο μοντέλο $\alpha\text{-syn}^{wt}$, ενώ το GK718/GK1 και το Panobinostat παρουσιάζουν επιπλέον προστατευτική δράση και στο μοντέλο $\alpha\text{-syn}^{A30G}$.

ΠΙΘΑΝΕΣ ΛΟΙΠΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Τα δεδομένα υποστηρίζουν την περαιτέρω αξιολόγηση του GK1 ως υποψήφιας φαρμακευτικής ουσίας για νευροπροστασία σε μοντέλα Πάρκινσον, ενώ απαιτούνται συμπληρωματικές μελέτες για τη διευκρίνιση του μηχανισμού δράσης του.