Πανελλήνια Ένωση Βιοεπιστημόνων

ΠΡΑΚΤΙΚΑ 13ου ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟΥ ΣΥΝΕΔΡΙΟΥ

«Μια νέα εποχή για τη Βιολογία: Ευκαιρίες και προκλήσεις στην μετά COVID εποχή»

9/12/2022 – 11/12/2022, Θεσσαλονίκη

Επιμέλεια
Πολύζος Αθανάσιος

ISBN: 978-618-81159-9-6

Επιμέλεια έκδοσης

Πολύζος Αθανάσιος

Εκδότης

Πανελλήνια Ένωση Βιοεπιστημόνων

ISBN

978-618-81159-9-6

Η **αναφορά σε άρθρο εντός των πρακτικών** θα πρέπει να γίνεται ως εξής (αναφέρεται υποθετικό παράδειγμα):

Επώνυμο, Μ. (2020). Τίτλος άρθρου. Στο Πολύζος Αθ., (Επιμ.). Πρακτικά εργασιών 13ου Πανελλήνιου Συνεδρίου Π.Ε.Β. «Μια νέα εποχή για τη Βιολογία: Ευκαιρίες και προκλήσεις στην μετά COVID εποχή», (σσ.χχ-χχ). Αθήνα: Πανελλήνια Ένωση Βιοεπιστημόνων ISBN: 978-618-81159-9-6

Σημείωση Επιμελητών και Π.Ε.Β.

Οι απόψεις των συγγραφέων δεν εκφράζουν απαραίτητα και τις απόψεις των επιμελητών και της Πανελλήνιας Ένωσης Βιοεπιστημόνων (Π.Ε.Β.).

Πίνακας περιεχομένων

Χαιρετισμός Πρόεδρων Οργανωτικής & Επιστημονικής Επιτροπής 8

Οργανωτική Επιτροπή 9

Επιστημονική Επιτροπή 10

Χορηγοί Συνεδρίου 12

Πρόγραμμα Συνεδρίου 13

ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΣΥΝΕΔΡΙΟΥ 22

Ι. ΟΜΙΛΙΕΣ 23

ΚΕΝΤΡΙΚΗ ΟΜΙΛΙΑ-1 : Models, evidence, bias and speculation: revisiting the COVID-19 pandemic 24

ΚΕΝΤΡΙΚΗ ΟΜΙΛΙΑ-2 : Ανταγωνισμός και συνεργασία από την εμφάνιση της ζωής μέχρι τις ανθρώπινες κοινωνίες 25

ΚΕΝΤΡΙΚΗ ΟΜΙΛΙΑ-3 : Μοριακοί μηχανισμοί γήρανσης και νευροεκφυλισμού 26

ΟΜΙΛΙΑ−1 : Βιολογική Εξέλιξη και Μοριακή Επιδημιολογία του Sars-CoV-2 στην Ελλάδα 27

ΟΜΙΛΙΑ−2 : Μοριακές και μεταβολικές αποκρίσεις θαλάσσιων οργανισμών στην αύξηση της θερμοκρασίας λόγω της κλιματικής αλλαγής 28

ΟΜΙΛΙΑ−3 : Το σημείο ελέγχου της αποκοπής στην κυτταροκίνηση: ένας νέος προστάτης της σταθερότητας των χρωμοσωμάτων 30

ΟΜΙΛΙΑ−4 : Συνθετική Βιολογία και Βιο-χυτήρια: Από το γονότυπο στον φαινότυπο 31

ΟΜΙΛΙΑ−5 : Ο ρόλος της γενετικής στην αιτιολογία των νευροαναπτυξιακών συνδρόμων - Το παράδειγμα του Συνδρόμου Gilles de la Tourette 32

ΟΜΙΛΙΑ−6 : Στοχευμένη αλληλούχηση υψηλής απόδοσης σε μικροβιακές κοινότητες: Κοινότυπες απαντήσεις σε ταξινομικά ερωτήματα ή απαραίτητο οικολογικό εργαλείο; 34

ΟΜΙΛΙΑ−7 : Ανθρώπινος πληθυσμός και θάλασσα στον αιώνα της κλιματικής αλλαγής 35

ΙΙ.ΣΤΡΟΓΓΥΛΕΣ ΤΡΑΠΕΖΕΣ 36

ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ−1: Γενομική και οι εφαρμογές της 37

ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ−2 : Ενωσιακές πολιτικές για την προστασία της βιοποικιλότητας 42

ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ−3 : Το παρόν και το μέλλον της κυτταρικής και γονιδιακής θεραπείας στην Ελλάδα. Ο ρόλος των Βιοεπιστημόνων. 44

ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ−4 : Τα σχολεία πάνε μουσείο. Τα μουσεία των τμημάτων Βιολογίας συνδέονται με την τοπική κοινωνία 46

ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ−5 : Συνθετική Βιολογία: καινοτόμες λύσεις σε σύγχρονες προκλήσεις στην υγεία και το περιβάλλον 48

ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ−6 : Ο ιός SARS-CoV-2 ως ζωονόσος: η φυσική προέλευσή του και η δυναμική της δευτερογενούς μετάδοσής του σε ζώα 50

ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ−7 : Υπεύθυνη Έρευνα και Καινοτομία στις Βιοεπιστήμες 53

ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ−8 : Η Έρευνα στην εποχή της Γονιδιωματικής 54

ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ−9 : Ο ρόλος, οι δυνατότητες και οι προοπτικές των βιολόγων στην διατήρηση και προστασία της βιοποικιλότητας και των οικοσυστημάτων. 56

ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ−10 : Επαγγελματικά Δικαιώματα Βιολόγων 59

ΑΝΟΙΧΤΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ : Βιοηθική και Βιολογία 60

ΙΙΙ.ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ 62

ΣΥΝΕΔΡΙΑ 1 63

Δημιουργία στελεχών γενετικού διαχωρισμού φύλου σε έντομα της οικογένειας Tephritidae 64

Χαρακτηρισμός της γενετικής δομής και καταγωγής των ελληνικών φυλών προβάτων με χρήση της μικροσυστοιχίας OvineSNP50 GenotypingBeadChip 67

Χαρακτηρισμός και Λειτουργική Ανάλυση Οσφρητικών Υποδοχέων της Μύγας της Μεσογείου 71

Μελέτη της γενετικής ποικιλότητας στα γονίδια vgll3 και six6 σε φυσικούς και εκτρεφόμενους πληθυσμούς στην τσιπούρα (Sparus aurata) και στο Ευρωπαϊκό λαβράκι (Dicentrarchus labrax) 74

In vitro συνθετική βιολογία: Ανάπτυξη ενός καινοτόμου πολυενζυμικού νανοβιοκαταλυτικού συστήματος για τη βιομετατροπή του CO_2 77

Εποχικές αλλαγές των γονιδίων του κύκλου της γλυκόλυσης στο εκτρεφόμενο είδος Sparus aurata 81

Το δυναμικό της μιτοχονδριακής αναπνοής του θερμικά “hardened” είδους Mytilus galloprovincialis 85

ΣΥΝΕΔΡΙΑ 2 89

Σύγχρονη εκπαιδευτική αξιοποίηση του έργου της Mary Anning 90

Μια αλεπού παίζει νέϋ για μια καμηλοπάρδαλη που χορεύει 93

Διερεύνηση εκπαιδευτικών αναγκών δασκάλων για τη δόμηση επιμορφωτικού προγράμματος που αφορά στη διδασκαλία των βιολογικών εννοιών στο Δημοτικό Σχολείο 97

Η συνεισφορά των επιστημολογικών πεποιθήσεων μαθητών Γ΄ Λυκείου στις πεποιθήσεις τους για τη βιολογική εξέλιξη των οργανισμών 101

Συγκριτική in vivo και in vitro ανάλυση της λειτουργίας των Νευρικών Βλαστικών Κυττάρων του ενήλικου εγκεφάλου, εργαστηριακών μυών και πληθυσμών αγρίων Mus musculus domesticus 104

ΣΥΝΕΔΡΙΑ 3 106

Οι ιδέες μαθητών και φοιτητών για την ανθρώπινη αναπαραγωγή: μια σύντομη επισκόπηση της βιβλιογραφίας 107

Γενετική επεξεργασία με έναν νέο Adenine Base Editor αδενοϊϊκό φορέα ως θεραπεία για τις β-αιμοσφαιρινοπάθειες 110

Λεντιϊκοί φορείς νέας γενιάς για την γονιδιακή θεραπεία της β-θαλασσαιμίας 113

Ο HIF-1α περιορίζει τον πολλαπλασιασμό των καρδιομυοβλαστών σε ένα μοντέλο πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων ανθρώπινης καρδιομυογένεσης 116

Ποσοτικοποίηση του χημικοθεραπευτικού παράγοντα 5-φθοροουρακίλη σε καλλιέργειες του προβιοτικού βακτηρίου Lactococcus lactis 119

Επίδραση της διατροφικής προσθήκης προνυμφών Tenebrio molitor που εκτράφηκαν με συστατικά αρωματικών-φαρμακευτικών φυτών στην έκφραση πρωτεϊνών Hsps και MAPKs της τσιπούρας Sparus aurata 122

Χημικός και βιολογικός χαρακτηρισμός του αιθανολικού εκχυλίσματος φύλλων του φυτού Haberlea rhodopensis 127

Ex vivo έκπτυξη HUDEP-2 και CD34+ τροποποιημένων κυττάρων με την εισαγωγή μιας κασέτας έκφρασης της συνθετικής πρωτεΐνης F36Vmpl 131

ΣΥΝΕΔΡΙΑ 4 134

Αλυσίδα αξίας για τις ελληνικές τουλίπες: Από τη διασπορά και το διεθνές ηλεκτρονικό εμπόριο στην ολοκληρωμένη διατήρηση απειλούμενων-προστατευόμενων ειδών και την πολύπλευρη έρευνα για αειφορική αξιοποίηση 135

Επίδραση της εγκατάλειψης γης και της κλιματικής αλλαγής στην ιστορική και μελλοντική χρήση ημι-ορεινών περιοχών του νομού Ιωαννίνων 139

Μελέτη ανθεκτικών περιβαλλοντικών και κλινικών στελεχών Escherichia coli 143

Μελέτη της απόκρισης της αχιβάδας Ruditapes decussatus σε αυξανόμενες θερμοκρασίες μέσω της γονιδιακής έκφρασης δύο μοριακών συνοδών (hsp) 146

Γενετική ταυτοποίηση του περιεχομένου εμπορικών εντομοάλευρων 150

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα και η φυλογενετική ταξινόμηση της καραβίδας εσωτερικών υδάτων Pontastacus leptodactylus από την Ελλάδα 153

Αποτίμηση του βακτηριακού προφίλ σε ιχθυοκαλλιέργειες με τη χρήση γονιδιωματικών τεχνολογιών 157

Χρήση βιολογικών δεικτών που προέρχονται από εργαλεία βασισμένα σε DNA αναλύσεις για τον προσδιορισμό της γεωγραφικής προέλευσης και γνησιότητας σε δύο ΠΟΠ προϊόντα Αυγοτάραχο Μεσολογγίου και Σταφίδα 161

ΣΥΝΕΔΡΙΑ 5 164

Χρήση μεθόδων μηχανικής εκμάθησης για την πρόβλεψη προτύπων βιοποικιλότητας 165

Αντιμετώπιση της βιοδιάβρωσης στα μνημειακά μάρμαρα με τη χρήση βιολογικού βιοκτόνου 168

Αντικατάσταση του θειώδη ανυδρίτη από το π-κουμαρικό οξύ: Μια “πράσινη” εναλλακτική τεχνολογία στη βιομηχανική οινοποίηση. 171

PnTXG : Μια αναδυόμενη θαλάσσια βιοτοξίνη στα οστρακοειδή 173

Η έκφραση του KLF2 (Krüppel-like factor 2) στους πνευμονικούς ινοβλάστες συνδέεται με την ανοσο-ινωτική τους συμπεριφορά σε περιβάλλον COVID-19 176

Μελέτη μη-κωδικών RNA μεταγράφων που εμπλέκονται στην αναπαραγωγική ικανότητα των θηλυκών κουνουπιών Aedes albopictus 180

Εργαστηριακή διερεύνηση υδατογενούς επιδημίας από Salmonella enterica enterica ser. Bovismorbificans 183

Διερεύνηση τροφιμογενούς επιδημίας από Salmonella enterica enterica ser. Give 186

ΣΥΝΕΔΡΙΑ 6 189

Δωρεά και μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων στην προ- και μετά- COVID-19 εποχή 190

Η μετάλλαξη T350G του E6 γονιδίου του Ιού των Ανθρώπινων Θηλωμάτων (HPV 16) κυριαρχεί στον καρκίνο του στοματοφάρυγγα. Δεδομένα από μελέτη μικρής ομάδας Ελλήνων ασθενών. 193

Προγνωστική και θεραπευτική χρησιμότητα της 25 – υδροξυκαλσιφερόλης D3 ορού σε ασθενείς με Covid-19: θεωρητική ή εφικτή; 196

Προσθέτοντας τη μεταβλητή των ανεμομεταφερόμενων γυρεοκόκκων στην εξίσωση της πανδημίας COVID-19 198

Μελέτες Πρόκλησης σε ανθρώπους– Human Challenge Studies & Βιοηθικά Ζητήματα. Η περίπτωση του SARS-CoV-2 201

Sars-Cov-2-ειδικά Τ-λεμφοκύτταρα ως θεραπεία της Covid-19 207

Συσχέτιση της HPV μόλυνσης με κυτταρολογικές αλλοιώσεις σε τεστ Παπανικολάου 211

Αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης μορίων σηματοδότησης σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος στη νόσο του Πάρκινσον 213

IV.ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ 217

Ετήσιος αντίκτυπος της πανδημίας Covid-19 και οι συνακόλουθοι περιορισμοί μετακίνησης στα επίπεδα της βιταμίνης D στη δυτική Ελλάδα 218

Εξόρυξη δεδομένων κειμένου για την ανάπτυξη βάσης δεδομένων για δυνητικά προβιοτικούς μικροοργανισμούς 221

Ταυτοποίηση του βακτηριακού στελέχους S3/K και χαρτογράφηση ολόκληρου του γονιδιώματος του – εύρεση μηχανισμών ανθεκτικότητας σε υψηλή συγκέντρωση εξασθενούς χρωμίου Cr(VI) και σε ακραία περιβάλλοντα – ακινητοποίηση του σε υποστρώματα με στόχο την αναγωγή υψηλών συγκεντρώσεων Cr(VI) 225

Προβιοτικές ιδιότητες και ανοσοτροποποιητική δράση γαστρεντερικών βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν από το εδώδιμο χερσαίο σαλιγκάρι Cornu aspersum maxima 229

Η οργάνωση της έμφυτης άμυνας στο σαλιγκάρι Cornu aspersum maxima και ο ρόλος των ανοσοκυττάρων κατά τη λοίμωξη με το στέλεχος Listeria monocytogenes SN3. 232

Μηχανισμοί που εμποδίζουν τη θραύση γεφυρών χρωματίνης στην κυτταροκίνηση 236

Απομόνωση πιθανών προβιοτικών μικροοργανισμών από την εντερική μικροχλωρίδα του χερσαίου σαλιγκαριού Cornu aspersum maxima από εκτροφείο της Νότιας Ελλάδας και διερεύνηση της ανοσοτροποποιητικής τους δράσης. 239

Μελέτη νέων μηχανισμών σχηματισμού της μιτωτικής ατράκτου. 243

Ο ρόλος των προβιοτικών μικροοργανισμών σε ασπόνδυλα σε καταστάσεις εντερικής λοίμωξης 246

Τρίτο καλοκαίρι πανδημίας COVID-19: Μια επιδημιολογική μελέτη για την COVID-19 στις Π.Ε. Δυτικής Μακεδονίας, Πέλλας και Ημαθίας 250

Εισβολείς στον Θερμαϊκό κόλπο 254

Μελέτη της ρύθμισης ογκοεπαγωγικών lncRNA από μεταγραφικούς παράγοντες ελέγχου κυτταρικών γενεαλογιών στον γαστρικό καρκίνο 258

Λειτουργική ανάλυση της ρύθμισης και του ρόλου μη κωδικοποιητών RNA στην καρκινογένεση του στομάχου 263

In vitro αξιολόγηση του προβιοτικού δυναμικού μικροβιακών απομονώσεων από ζυμούμενα τρόφιμα 267

Εποχική κατανομή κουνουπιών Anopheles sp., Culex sp. και Ochlerotatus sp. στη Δυτική Ελλάδα και συσχέτισή της με κλιματολογικά δεδομένα 271

Διερεύνηση καινοτόμων βιοδεικτών σε κρεοπαραγωγά ορνίθια μολυσμένα με Campylobacter jejuni 274

Προσδιορισμός και κατανομή του μικροβιώματος στο πεπτικό σύστημα εκτρεφόμενων χερσαίων σαλιγκαριών Cornu aspersum με αλληλούχηση του 16S rRNA γονιδίου 278

Διερεύνηση της μεθυλίωση του γονιδιώματος του Ιού των Ανθρώπινων Θηλωμάτων (HPV 16) σε περιπτώσεις καρκίνου Κεφαλής Τραχήλου 282

Προκαταρκτικά αποτελέσματα από τη διερεύνηση της παρουσίας Wolbachia σε πληθυσμούς του Ασιατικού κουνουπιού τίγρη, Aedes albopictus (Diptera:Culicidae) στον ελλαδικό χώρο 285

Ανάπτυξη multiplex PCR για τη μοριακή ταυτοποίηση τεσσάρων ειδών της οικογένειας Mullidae, διαθέσιμων στην Ελληνική αγορά 289

Ο εποχικός κύκλος φωτοσυνθετικών χρωστικών στο ίζημα μιας εύτροφης λίμνης 293

Αποδόμηση της φαινόλης από ελεύθερα και ακινητοποιημένα κύτταρα Pseudarthrobacter phenanthrenivorans Sphe3: βιοχημική και μεταγραφομική προσέγγιση του μεταβολικού μονοπατιού 296

“Άμελξη” της υποεπενδυματικής ζώνης: Βελτιστοποίηση της μεθόδου και διερεύνηση της δυνατότητας απομόνωσης ολιγοδενδρογλοιακών προγονικών κυττάρων 300

Γενετικός και μορφολογικός χαρακτηρισμός στελεχών δινοφυκών από την ομάδα Gonyaulacaleans 302

Αγκίστρωση της λιπάσης LIP2 στην κυτταρική επιφάνεια της Yarrowialipolytica για κατασκευή καινοτόμων βιοκαταλυτών με εφαρμογή στην παραγωγή βιοντίζελ 305

Ο ρόλος της αλληλεπίδρασης μεταξύ αιμοπεταλίων και νευρικών βλαστικών και προγονικών κυττάρων του ενήλικου εγκεφάλου, στη φωλεά της Υποεπενδυματικής Ζώνης στην ομοιόσταση, αλλά και ύστερα από απομυελίνωση του μεσολοβίου 308

Διερεύνηση της στάσης Βιοεπιστημόνων του Δ.Π.Θ. σχετικά με τις αρχές Υπεύθυνης Έρευνας και Καινοτομίας 311

Συγκριτική, in vivo και in vitro, ανάλυση της λειτουργίας των Νευρικών Βλαστικών και Προγονικών Κυττάρων του ενήλικου εγκεφάλου εργαστηριακών μυών και άγριων τρωκτικών του γένους Microtus 313

Μελέτη της αλληλεπίδρασης μιας νευροειδικής μεθυλοτρανσφεράσης της αργινίνης και της μεθυλοτρανσφεράσης της αργινίνης 1 316

Μελέτη της δράσης της ανθρώπινης ανασυνδυασμένης θυρεοτροπίνης σε φυσιολογικές και καρκινικές κυτταρικές σειρές θυρεοειδούς που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα της 319

Μελέτη των μηχανισμών ανάπτυξης ανθεκτικότητας στη βορτεζομίμπη σε κυτταρικές σειρές προστάτη 322

Χορήγηση καρφιλζομίμπης σε κυτταρικές σειρές προστάτη ανθεκτικές στη βορτεζομίμπη και μελέτη της βιωσιμότητας, του πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης και του οξειδωτικού στρες 325

Μία in—vitro μελέτη της αντικαρκινικής δράσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σε καρκινικές και φυσιολογικές κυτταρικές σειρές 328

Διερεύνηση σηματοδοτικών μονοπατιών και γονιδίων που εμπλέκονται στη βιολογία των κοκκωδών κυττάρων και στην ωρίμανση του ωοθυλακίου 331

Μελέτη της αγχώδους συμπεριφοράς ενηλίκων αρσενικών μυών μετά τη χορήγηση Κανναβιδιόλης 333

Αναγνώριση και κατασκευή νέων ισχυρών υποκινητών στη Yarrowia lipolytica για βιοζυμώσεις με βάση τη γλυκερόλη 336

Μακρά μη-κωδικοποιά RNA ως ρυθμιστές στο έμφραγμα του μυοκαρδίου 340

Επικαιροποίηση του annotation σε μη-κωδικοποιά RNA που επάγονται σε συνθήκες οξειδωτικού στρες 342

Ποιοτικός και ποσοτικός χαρακτηρισμός εξωσωμάτων μητρικού γάλακτος 344

Μελέτη ανάπτυξης προνυμφών Alphitobius diaperinus σε υπόστρωμα με μίγμα αρωματικών φαρμακευτικών φυτών 347

Ποσοτική Ανίχνευση Νοροϊού σε Δείγματα Αστικών Λυμάτων 351

Ταχεία ανίχνευση βιολογικών δεικτών σε δείγματα θαλασσινού νερού μέσω ολοκληρωμένου συστήματος βιοαισθητήρα 355

Η επίδραση της επιγενετικής κατάστασης ενός γονιδίου στη συχνότητα μεταλλάξεων του συστήματος CRISPR/Cas9 358

V.WORKSHOP 361

WORKSHOP-1 : Καινοτόμες Μεθοδολογίες Next Generation Sequencing – Εφαρμογές στην Έρευνα και τη Διάγνωση 362

WORKSHOP 2 : Βασικά βήματα διερεύνησης μιας τροφιμογενούς επιδημίας – Ο ρόλος της εργαστηριακής επιτήρησης 363

ΒΡΑΒΕΙΟ «ΦΩΤΗΣ ΚΑΦΑΤΟΣ» 364

Χαιρετισμός Πρόεδρων Οργανωτικής & Επιστημονικής Επιτροπής

Αγαπητές και αγαπητοί συνάδελφοι,
Αγαπητές και αγαπητοί Σύνεδροι,

Το 13ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Πανελλήνιας Ένωσης Βιοεπιστημόνων (Π.Ε.Β.) ξεκινά τις εργασίες του στους φιλόξενους χώρους του Κέντρου Διάδοσης Ερευνητικών Αποτελεσμάτων (ΚΕΔΕΑ) του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και θα διαρκέσει από τις 9 έως τις 11 Δεκεμβρίου 2022. Το 13ο Συνέδριο, με κεντρικό θέμα: *«Μια νέα εποχή για τη Βιολογία: Ευκαιρίες και προκλήσεις στην μετά COVID εποχή»,* διοργανώνεται από την Π.Ε.Β. σε συνεργασία με:

- το Τμήμα Βιολογίας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης,
- το Τμήμα Βιολογίας του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών,
- το Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης,
- το Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών,
- το Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων,
- το Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και
- το Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης.

Το Συνέδριό μας πραγματοποιείται σε μια περίοδο κατά την οποία αρχίζουμε να αντιλαμβανόμαστε τόσο την επίδραση της πανδημίας covid-19 σε όλους τους τομείς της ζωής μας όσο και τη σημασία των Βιοεπιστημών στην κατανόηση των φαινομένων της ζωής, με τη Βιολογία να βρίσκεται στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος όλης της ανθρωπότητας. Η πανδημία μας έδειξε πολλά και κυρίως το έλλειμμα στην κατανόηση του έμβιου κόσμου και τη σχέση μας με τη Βιολογία, την επιστήμη που έχει επιφορτισθεί με τα φαινόμενα της ζωής, τις διαρκείς αλληλεπιδράσεις του γενοτύπου, του περιβάλλοντος και του φαινοτύπου.

Στο Συνέδριό μας θα συμμετάσχουν με κύριες ομιλίες διακεκριμένοι επιστήμονες της Ελλάδας και του εξωτερικού, ενώ σημαντικό βάρος θα δοθεί σε συνεδρίες στρογγυλών τραπεζών, προφορικών και αναρτημένων ανακοινώσεων.

Σας καλωσορίζουμε στις εργασίες του Συνεδρίου μας με την ελπίδα ότι τα αποτελέσματα και τα διδάγματα του Συνεδρίου μας θα φανούν χρήσιμα στην έρευνα, την επιστήμη, την παιδεία, τον βιολογικό εγγραμματισμό, την κοινωνία των πολιτών, σε κάθε άνθρωπο για μια παγκόσμια υγεία και ευημερία, μέσα σε έναν υγιή πλανήτη.

Για την Οργανωτική Επιτροπή	Για την Επιστημονική Επιτροπή	Για το Δ.Σ της Π.Ε.Β.
Ζαχαρίας Σκούρας	**Ταβερναράκης Νεκτάριος**	**Απόστολος Βανταράκης**

Οργανωτική Επιτροπή

Πρόεδρος

Σκούρας Ζαχαρίας, Ομότιμος Καθηγητής Γενετικής, Τμήματος Βιολογίας Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Μέλη

Άνθης Λεωνίδας, Εκπαιδευτικός Δ.Ε., μέλος Δ.Σ. Π.Ε.Β.

Βανταράκης Απόστολος, Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πρόεδρος Δ.Σ. Π.Ε.Β.

Γαλάνης Αλέξης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

Καζάνης Ηλίας, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών

Κατωπόδης Γεώργιος, Εκπαιδευτικός Δ.Ε., Αντιπρόεδρος Δ.Σ. Π.Ε.Β.

Λαδουκάκης Εμμανουήλ, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Μαυραγάνη Μαρία, Εκπαιδευτικός Δ.Ε., μέλος Δ.Σ. Π.Ε.Β.

Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Παφίλης Παναγιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Πολύζος Αθανάσιος, Εκπαιδευτικός Δ.Ε., Ταμίας Δ.Σ. Π.Ε.Β.

Στάικου Αλεξάνδρα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Τσιαφούλη Μαρία, Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Φίλιου Μιχαέλα, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Χατζηδημητρίου Αναστασία, Διευθύντρια Ερευνών, Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών, Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης (ΙΝΕΒ, ΕΚΕΤΑ)

ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ ΣΥΝΕΔΡΙΟΥ

Μπογδάνου Μαρίνα, Γραμματέας Π.Ε.Β.

ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΑ ΣΥΝΕΔΡΙΟΥ : https://13pev.pev.gr/

Καρτσιώτης Θεόδωρος, Εκπαιδευτικός Δευτεροβάθμιας Εκπαίδευσης

ΓΡΑΦΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΟΥ

Αιμελίδης Ιωάννης, γραφίστας

Επιστημονική Επιτροπή

Πρόεδρος

Ταβερναράκης Νεκτάριος, Βιολόγος, Καθηγητής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης και Πρόεδρος του Δ.Σ. του ΙΤΕ, Μέλος της Ακαδημίας Αθηνών

Μέλη

Αδαμάκης Γιάννης, Επίκουρος καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Αλεξόπουλος Χάρης, Επίκουρος καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Βασιλειάδης Σωτήρης, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Βουλτσιάδου Ελένη, Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Γιάγκου Μηνάς, Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Γιακουντής Αντώνης, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ζάχος Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ζούρος Ελευθέριος, Ομότιμος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης, Αντεπιστέλλον Μέλος της Ακαδημίας Αθηνών

Καζάνης Ηλίας, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών

Καλαντίδης Κρίτων, Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Καρακάσης Ιωάννης, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Καρπούζας Δημήτριος , Καθηγητής, Πρόεδρος του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κόλλια Παναγούλα, Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Κολοβός Πέτρος, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

Κοντογιάννης Δημήτριος, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Λεονάρδος Γιάννης, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Μαραγκός Πέτρος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Μαυρικάκη Ευαγγελία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Παιδαγωγικό Τμήμα Δημοτικής Εκπαίδευσης, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Νταϊλιάνης Στέφανος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών

Πανίτσα Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, μέλος της Επιστημονικής και Διαχειριστικής επιτροπής του Βοτανικού Μουσείου Πανεπιστημίου Πατρών

Παντερής Εμμανουήλ, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο

Θεσσαλονίκης

Παπουτσοπούλου Σταματία, Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Παρμακέλης Αριστείδης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Βιολογίας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ραΐτσος Διονύσης, Επίκουρος καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Σανδαλτζόπουλος Ραφαήλ, Καθηγητής Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

Σαραφίδου Θεολογία, Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σγαρδέλης Στέφανος, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Σιδηροπούλου Κυριακή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τοκατλίδης Γιάννης, Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

Τσίκου Δανιέλα, Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Χατζηδημητρίου Αναστασία, Διευθύντρια Ερευνών, Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών, Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης (INEB, ΕΚΕΤΑ)

Χλίχλια Αικατερίνη, Καθηγήτρια, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

Ψαθά Νικολέττα, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Halley John, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Χορηγοί Συνεδρίου

ΑΡΓΥΡΟΙ ΧΟΡΗΓΟΙ

Roche

ΑΝΤΙΣΕΛ
ΑΦΟΙ Α. ΣΕΛΙΔΗ Α.Ε.

SB BioAnalytica
BIOTECHNOLOGY & ANALYTICAL SYSTEMS

ΜΕΓΑΛΟΙ ΣΥΝΕΡΓΑΤΕΣ

eMIA
cellular and molecular immunological applications

ΒΑΡΕΛΑΣ Α.Ε.
ΧΗΜΙΚΑ και ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ

ΚΥΡΙΟΙ ΥΠΟΣΤΗΡΙΚΤΕΣ

Ακαδημαϊκές Εκδόσεις
Βιβλία για τις επιστήμες της ζωής
www.academicbooks.gr

metrolab
DELIVERING VALUE

HOTEL abc
THESSALONIKI

LSC

Πρόγραμμα Συνεδρίου

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ 09-12-2022

Παρασκευή 9 Δεκεμβρίου 2022 | Αμφιθέατρο ΙΙ ΚΕΔΕΑ

09:00—10:00 **Προσέλευση – Παραλαβή φακέλων**

10:00—10:15 **ΧΑΙΡΕΤΙΣΜΟΙ**

10:15—11:00 **ΟΜΙΛΙΑ–1 (Με φυσική παρουσία)**
Βιολογική Εξέλιξη και Μοριακή Επιδημιολογία του Sars-CoV-2 στην Ελλάδα.
Δημήτρης Θάνος
Ακαδημαϊκός, Πρόεδρος του Επιστημονικού Συμβουλίου και Διευθυντής του Κέντρου Βασικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών

ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΗΣ: Απόστολος Βανταράκης
Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πρόεδρος Πανελλήνιας Ένωσης Βιοεπιστημόνων

11:00—11:30 **ΟΜΙΛΙΑ–2 (Με φυσική παρουσία)**
Μοριακές και μεταβολικές αποκρίσεις θαλάσσιων οργανισμών στην αύξηση της θερμοκρασίας λόγω της κλιματικής αλλαγής.
Βασίλειος Μιχαηλίδης
Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΗΣ: Αθανάσιος Τσίκληρας
Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

11:30—13:00 **ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ–1 (Διαδικτυακή/Υβριδική)**
Γενομική και οι εφαρμογές της.
Επιτροπή Υγείας Π.Ε.Β.

ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΗΣ: Ελένη Ρίζου
Εργαστηριακή Γενετίστρια, Τμήμα Γενετικής ΓΟΝΚ Ο Άγιος Σάββας, μέλος Δ.Σ. Π.Ε.Β.

Ευθύμιος Δημητριάδης MSc, Ph.D
Εργαστηριακός Γενετιστής/Μοριακός Βιολόγος, Διευθυντής Τμήματος Γενετικής, ΓΟΝΚ Ο Άγιος Σάββας
"Η Εφαρμογή των Τεχνολογιών Ανάλυσης του Γενετικού Υλικού στην Ογκολογία"

Ξένια Γουρζή Ph.D, ErCLG
Εργαστηριακή Γενετίστρια, Μονάδα Κληρονομικών Καρδιαγγειακών Παθήσεων, Ωνάσειο Νοσοκομείο
"Η γενετική στη διάγνωση των κληρονομούμενων καρδιαγγειακών νοσημάτων"

Μάρα Σιμοπούλου
Senior Κλινικός Εμβρυολόγος-Γενετιστής, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
"Προεμφυτευτική Γενετική Διάγνωση: το χρωμοσωμικό προφίλ του εμβρύου"

Ιωάννης Τρουγκάκος
Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας ΕΚΠΑ
"Νόσος COVID-19 και anti-SARS-CoV-2 mRNA εμβόλια"

13:00—15:00 **ΜΕΣΗΜΕΡΙΑΝΟ ΔΙΑΛΕΙΜΜΑ**
5' λεπτη παρουσίαση Roche

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ 09-12-2022

15:00—16:30 **ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ–2 (Διαδικτυακή)**
Ενωσιακές πολιτικές για την προστασία της βιοποικιλότητας.
Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΗΣ: Αριστείδης Παρμακέλης
Αναπληρωτής Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Βιολογίας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
"Βιοποικιλότητα και περιβαλλοντική ζημιά"

Σταυρούλα Πουλή
Προϊσταμένη ΣΥΓΑΠΕΖ/ΥΠΕΝ
"Το LIFEPROFILE και η εφαρμογή της περιβαλλοντικής ευθύνης"

Δρ. Παναγιώτης Ντζερεμές ΕΜΠ
"Η σημασία της χρήσης μεθόδων ανάλυσης επικινδυνότητας ως εργαλείων για την πρόληψη και την αποκατάσταση της περιβαλλοντικής ζημίας"

Δρ. Θεόδωρος Χατζηβασιλειάδης
Πάντειο Πανεπιστήμιο-ΙΑΠΑΔ
"Μέθοδος αποτίμησης κόστους περιβαλλοντικής ζημιάς. Μία ενδεικτική περίπτωση."

Κωνσταντίνος Τσαλακίδης
Γρύφων Περιβαλλοντική Συμβουλευτική
"Ζημία στη βιοποικιλότητα & χρηματοοικονομικές εγγυήσεις με την οπτική του ΠΔ 148 για την περιβαλλοντική ευθύνη: βήματα προόδου, τρέχουσες προκλήσεις."

16:30—17:00 **COFFEE BREAK**

17:00—18:30 **ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ–3 (Με φυσική παρουσία)**
Το παρόν και το μέλλον της κυτταρικής και γονιδιακής θεραπείας στην Ελλάδα.
Ο ρόλος των Βιοεπιστημόνων.
Τμήμα Βιολογίας Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΗΣ: Νικολέττα Ψαθά
Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Νικόλαος Ανάγνου
Ομότιμος Καθηγητής Βιολογίας, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

Μαρία Ρουμπελάκη
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Αναστασία Παπαδοπούλου
Βιοχημικός, PhD, Γ.Ν.Θ. "Γεώργιος Παπανικολάου"

18:30—19:30 **ΚΕΝΤΡΙΚΗ ΟΜΙΛΙΑ (ΔΙΑΔΙΚΤΥΑΚΗ)**
Models, evidence, bias and speculation: revisiting the COVID-19 pandemic.
Ιωάννης Ιωαννίδης
Stanford Prevention Research Center, Department of Medicine and Departments of Epidemiology and Population Health of Biomedical Data Science, and of Statistics, Stanford University, and Meta-Research Innovation Center at Stanford (METRICS), Stanford, CA, USA

ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΗΣ: Απόστολος Βανταράκης
Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πρόεδρος Πανελλήνιας Ένωσης Βιοεπιστημόνων

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ 09-12-2022

Παρασκευή 9 Δεκεμβρίου 2022 | Αμφιθέατρο ΙΙΙ ΚΕΔΕΑ

11:30—13:00 **Συνεδρία–1 Παρουσίασης προφορικών εργασιών**

ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΕΣ:

Δροσοπούλου Ελένη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Αντωνοπούλου Ευθυμία

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

15:00—16:30 **Συνεδρία–2 Παρουσίασης προφορικών εργασιών**

ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΕΣ:

Παντερής Εμμανουήλ-Νικόλαος

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Νικήτα Βενετία

ΕΔΙΠ, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

17:00—18:30 **WORKSHOP 2 (Με φυσική παρουσία)**

Βασικά βήματα διερεύνησης μιας τροφιμογενούς επιδημίας – Ο ρόλος της εργαστηριακής επιτήρησης.

ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΗΣ: Γεωργία Μανδηλαρά

Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας, Σχολή Δημόσιας Υγείας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Επιστημονική Υπεύθυνη Εθνικού Κέντρου Αναφοράς Σαλμονελών, Σιγκελών και λοιπών τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών

Παρασκευή 9 Δεκεμβρίου 2022 | INEB, ΕΚΕΤΑ

15:00—16:30 **WORKSHOP-1A (Με φυσική παρουσία)**

Καινοτόμες Μεθοδολογίες Next Generation Sequencing – Εφαρμογές στην Έρευνα και τη Διάγνωση.

ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΗΣ: Αναστασία Χατζηδημητρίου

Διευθύντρια Ερευνών, Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών, Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης

ΣΑΒΒΑΤΟ 10-12-2022

Σάββατο 10 Δεκεμβρίου 2022 | Αμφιθέατρο ΙΙ ΚΕΔΕΑ

09:00—10:00 **ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ–4 (Διαδικτυακή/Υβριδική)**
Τα σχολεία πάνε μουσείο. Τα μουσεία των τμημάτων Βιολογίας συνδέονται με την τοπική κοινωνία.
Τμήμα Βιολογίας Πανεπιστήμιο Πατρών

ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΗΣ: Ηλίας Καζάνης
Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών

Μαρία Πανίτσα
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, μέλος Επιστημονικής & Διαχειριστικής Επιτροπής Βοτανικού Μουσείου Πανεπιστημίου Πατρών

Γιώργος Μήτσαινας
Λέκτορας, μέλος της Επιστημονικής και Διαχειριστικής Επιτροπής του Ζωολογικού Μουσείου Πανεπιστημίου Πατρών

Δημήτρης Καζάνης
Μέλος Ε.ΔΙ.Π. Τομέα Οικολογίας-Ταξινομικής, Τμήμα Βιολογίας, πρώην Επιμελητής Βοτανικού Μουσείου, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Διονύσιος Γιουλάτος,
Καθηγητής, Ζωολογική Συλλογή Τμήματος Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκη

Ρεγγίνα Καρούσου,
Επίκουρη καθηγήτρια, Βοτανική Συλλογή Τμήματος Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκη

Αθηνά Κουλοπούλου,
Εκπαιδευτικός Δευτεροβάθμιας Εκπαίδευσης, Βιολόγος, MSc, 32ο ΓΕΛ Θεσσαλονίκης

10:00—11:00 **ΑΝΟΙΧΤΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ (Με φυσική παρουσία)**
Βιοηθική και Βιολογία.

ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΗΣ: Κώστας Μηλιάτκας
Δημοσιογράφος, Συγγραφέας, Βιολόγος

Χρύσα Αράπογλου
Δημοσιογράφος, Βιολόγος

Ελισάβετ Συμεωνίδου-Καστανίδου
Καθηγήτρια Νομικής Σχολής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκη

Απόστολος Βανταράκης
Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πρόεδρος Πανελλήνιας Ένωσης Βιοεπιστημόνων

Ζαχαρίας Σκούρας
Ομότιμος Καθηγητής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Πρόεδρος ΟΕ

11:00—11:30 **COFFEE BREAK**

11:30—12:00 **ΟΜΙΛΙΑ–3 (Διαδικτυακή)**
Το σημείο ελέγχου της αποκοπής στην κυτταροκίνηση:
ένας νέος προστάτης της σταθερότητας των χρωμοσωμάτων.
Γεώργιος Ζάχος
Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΗΣ: Μανώλης Λαδουκάκης
Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΣΑΒΒΑΤΟ 10-12-2022

12:00—13:30 **ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ–5 (Με φυσική παρουσία)**
Συνθετική Βιολογία: καινοτόμες λύσεις σε σύγχρονες προκλήσεις στην υγεία και το περιβάλλον.
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΗΣ: Καλλιόπη Παπαδοπούλου
Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
"Βιώσιμη Γεωργία βάσει σχεδιασμού"

Κωνσταντίνος Ματθιόπουλος
Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
"Ο ρόλος της ΣΒ στην ανάπτυξη της βιο-οικονομίας στην Ελλάδα"

Σταματία Παπουτσοπούλου
Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
"Εμβόλια και Συνθετική Βιολογία"

Δημήτριος Καρπούζας
Καθηγητής, Πρόεδρος του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
"Συνθετική Βιολογία και μικροοργανισμοί στην υπηρεσία του περιβάλλοντος"

13:30—14:00 **ΟΜΙΛΙΑ–4 (Με φυσική παρουσία)**
Συνθετική Βιολογία και Βιο-χυτήρια: Από το γονότυπο στον φαινότυπο.
Ρέννος Φραγκούδης
Υπεύθυνος του Edinburgh Genome Foundry

ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΗΣ: Καλλιόπη Παπαδοπούλου
Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

14:00—15:30 **ΜΕΣΗΜΕΡΙΑΝΟ ΔΙΑΛΕΙΜΜΑ**
5' λεπτη παρουσίαση SB BioAnalytica

15:30—16:00 **ΟΜΙΛΙΑ–5 (Με φυσική παρουσία)**
Ο ρόλος της γενετικής στην αιτιολογία των νευροαναπτυξιακών συνδρόμων -
Το παράδειγμα του Συνδρόμου Gilles de la Tourette.
Μαριάνθη Γεωργίτση
Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΗΣ: Αλέξης Γαλάνης
Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

16:00—17:30 **ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ–6 (Διαδικτυακή)**
Ο ιός SARS-CoV-2 ως ζωονόσος: η φυσική προέλευσή του
και η δυναμική της δευτερογενούς μετάδοσής του σε ζώα.
Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΗΣ: John Halley
Καθηγητής, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
"Η πανδημία μέσα από το πρίσμα της εξελικτικής οικολογίας"

Κωνσταντίνος Σ. Κυριάκης
Department of Pathobiology, College of Veterinary Medicine, Auburn University, USA
"SARS-CoV-2 και ζώα"

Γιώργος Παππάς
Ινστιτούτο Διαρκούς Ιατρικής Εκπαίδευσης Ιωαννίνων
"Η προέλευση του SARS-CoV-2- τι γνωρίζουμε πλέον, τι πρέπει ακόμη να μάθουμε"

Σπύρος Λύτρας
Υποψήφιος διδάκτορας, MRC-University of Glasgow Centre for Virus Research, Γλασκώβη
"Η εξελικτική γονιδιωματική του SARS-CoV-2 και των συγγενικών του ιών"

17:30—18:00 **COFFEE BREAK**

ΣΑΒΒΑΤΟ 10-12-2022

18:00—19:30 **ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ–7 (Με φυσική παρουσία)**
Υπεύθυνη Έρευνα και Καινοτομία στις Βιοεπιστήμες.
Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΗΣ: Αλέξης Γαλάνης
Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης
"Συνεργασία του Τμήματος Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής του ΔΠΘ με τη Β' Εκπαίδευση και τα σχολεία (γυμνάσια και λύκεια) του ν. Έβρου"

Αγλαΐα Παππά
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης
"Βασικές αρχές Υπεύθυνης Έρευνα και Καινοτομίας στις Βιοεπιστήμες"

Αριστοτέλης Παπαγεωργίου
Καθηγητής, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης
"Η συμβολή της κοινωνίας των πολιτών στη βιολογική έρευνα για το περιβάλλον και τη βιοποικιλότητα"

19:45—20:30 **ΚΕΝΤΡΙΚΗ ΟΜΙΛΙΑ (Με φυσική παρουσία)**
Ανταγωνισμός και συνεργασία από την εμφάνιση της ζωής μέχρι τις ανθρώπινες κοινωνίες.
Ελευθέριος Ζούρος
Ομότιμος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης, Αντεπιστέλλον Μέλος της Ακαδημίας Αθηνών

ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΗΣ: Ζαχαρίας Σκούρας
Ομότιμος Καθηγητής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Πρόεδρος ΟΕ

ΣΑΒΒΑΤΟ 10-12-2022

Σάββατο 10 Δεκεμβρίου 2022 | ΦΟΥΑΠΕ ΚΕΔΕΑ

11:00—18:00 **ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ – POSTER**

Σάββατο 10 Δεκεμβρίου 2022 | Αμφιθέατρο ΙΙΙ ΚΕΔΕΑ

09:00—10:30 **Συνεδρία–3 Παρουσίασης προφορικών εργασιών**
ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΕΣ:
Παναγούλα Κόλλια
Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Παπουτσοπούλου Σταματία
Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

11:30—13:00 **Συνεδρία–4 Παρουσίασης προφορικών εργασιών**
ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΕΣ:
Αριστοτέλης Παπαγεωργίου
Καθηγητής, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης
Βασιλειάδης Σωτήρης
Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

15:30—17:00 **Συνεδρία–5 Παρουσίασης προφορικών εργασιών**
ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΕΣ:
Γεωργία Μανδηλαρά
Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας, Σχολή Δημόσιας Υγείας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Επιστημονική Υπεύθυνη Εθνικού Κέντρου Αναφοράς Σαλμονελών, Σιγκελών και λοιπών τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών
Ταϊκου Δανιέλα
Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

18:00—19:30 **Συνεδρία–6 Παρουσίασης προφορικών εργασιών**
ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΕΣ:
Ελένη Ρίζου
Εργαστηριακή Γενετίστρια, Τμήμα Γενετικής ΓΟΝΚ Ο Άγιος Σάββας, μέλος Δ.Σ. Π.Ε.Β.
Γιακουντής Αντώνης
Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σάββατο 10 Δεκεμβρίου 2022 | ΙΝΕΒ, ΕΚΕΤΑ

09:30—11:00 **WORKSHOP-1Β (Με φυσική παρουσία)**
Καινοτόμες Μεθοδολογίες Next Generation Sequencing – Εφαρμογές στην Έρευνα και τη Διάγνωση.
ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΗΣ: Αναστασία Χατζηδημητρίου
Διευθύντρια Ερευνών, Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών, Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης

ΚΥΡΙΑΚΗ 11-12-2022

Κυριακή 11 Δεκεμβρίου 2022 | Αμφιθέατρο ΙΙ ΚΕΔΕΑ

09:30—11:00 **ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ–8 (Διαδικτυακή/Υβριδική)**
Η Έρευνα στην εποχή της Γονιδιωματικής.
Επιτροπή Τριτοβάθμιας Εκπαίδευσης και Έρευνας Π.Ε.Β.

ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΗΣ: Αναστασία Χατζηδημητρίου
Διευθύντρια Ερευνών, Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών, Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης

Θοδωρής Λούπης
Επιστημονικός Συνεργάτης ΙΙΒΕΑΑ
"Η αλληλούχηση νέας γενιάς στην ανακάλυψη νέων βιοδεικτών σε κακοήθειες"

Πέτρος Κολοβός
Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης
"Δυναμική του συνδυαστικού μεταγραφικού ρυθμιστικού δικτύου και ενεργοποίηση της αιμοποίησης"

Φώτης Ψωμόπουλος
Κύριος Ερευνητής, Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών, Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης
"Η πρόκληση της διαχείρισης δεδομένων στην εποχή της γονιδιωματικής"

11:00—11:30 **ΟΜΙΛΙΑ–6 (Με φυσική παρουσία)**
Στοχευμένη αλληλούχηση υψηλής απόδοσης σε μικροβιακές κοινότητες: Κοινότυπες απαντήσεις σε ταξινομικά ερωτήματα ή απαραίτητο οικολογικό εργαλείο;
Σάββας Γενίτσαρης
Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΗΣ: Ευφημία Παπαθεοδώρου
Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

11:30—12:00 **COFFEE BREAK**
5' λεπτη παρουσίαση ΑΝΤΙΣΕΛ

12:00—12:45 **ΚΕΝΤΡΙΚΗ ΟΜΙΛΙΑ (Με φυσική παρουσία)**
Μοριακοί μηχανισμοί γήρανσης και νευροεκφυλισμού.
Ταβερναράκης Νεκτάριος
Καθηγητής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστήμιου Κρήτης, Πρόεδρος του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας, Αντιπρόεδρος του Διοικητικού Συμβούλιου του Ευρωπαϊκού Ινστιτούτου Καινοτομίας και Τεχνολογίας

ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΗΣ: Ζαχαρίας Σκούρας
Ομότιμος Καθηγητής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Πρόεδρος ΟΕ

12:45—13:15 **ΟΜΙΛΙΑ–7 (Με φυσική παρουσία)**
Ανθρώπινος πληθυσμός και θάλασσα στον αιώνα της κλιματικής αλλαγής.
Ιωάννης Καρακάσης
Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΗΣ: Αλεξάνδρα Στάικου
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

ΚΥΡΙΑΚΗ 11-12-2022

13:15—14:45 **ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ–10 (Διαδικτυακή/Υβριδική)**
Επαγγελματικά Δικαιώματα Βιολόγων.
Π.Ε.Β. & Τμήματα

ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΗΣ: Ζαχαρίας Σκούρας
Ομότιμος Καθηγητής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Πρόεδρος ΟΕ

Απόστολος Βανταράκης
Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πρόεδρος Πανελλήνιας Ένωσης Βιοεπιστημόνων

Μηνάς Γιάγκου
Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Βιολογίας Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Αριστείδης Παρμακέλης
Αναπληρωτής Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Βιολογίας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Πέτρος Μαραγκός
Αναπληρωτής Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Δημήτριος Καρπούζας
Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Στέφανος Νταϊλιάνης
Αναπληρωτής Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών

Κρίτων Καλαντίδης
Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Γιάννης Τοκατλίδης
Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

14:45—15:00 **ΑΠΟΝΟΜΗ ΒΡΑΒΕΙΟΥ ΚΑΦΑΤΟΣ–ΛΗΞΗ ΣΥΝΕΔΡΙΟΥ**

Κυριακή 11 Δεκεμβρίου 2022 | Αμφιθέατρο ΙΙΙ ΚΕΔΕΑ

09:30—11:00 **ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ–9 (Με φυσική παρουσία)**
Ο ρόλος, οι δυνατότητες και οι προοπτικές των βιολόγων στην διατήρηση και προστασία της βιοποικιλότητας και των οικοσυστημάτων.
Επιτροπή Περιβάλλοντος Π.Ε.Β.

ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΗΣ: Μαρία Τσιαφούλη
ΕΔΙΠ, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Αθανάσιος Τσίκληρας
Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
"Θαλάσσια οικοκεντρική διαχείριση"

Λυδία Αλβανού
Βιολόγος MSc, PhD Εθνικό Πάρκο Δέλτα Αξιού-Λουδία-Αλιάκμονα ΜΔΠΠ Κεντρικής Μακεδονίας
"Η διαχείριση των Προστατευόμενων Περιοχών μέσα από τα μάτια μιας βιολόγου"

Νικόλαος Κρίγκας
Δρ. Βιολογίας, Εντεταλμένος Ερευνητής, Ινστιτούτο Γενετικής Βελτίωσης και Φυτογενετικών Πόρων, Ελληνικός Γεωργικός Οργανισμός Δήμητρα
"Από τη διατήρηση στην αειφορική αξιοποίηση αυτόχθονων φυτών της Ελλάδας: Εμπειρίες, προκλήσεις και ευκαιρίες"

Γιώργος Μερτζάνης
Δρ. Βιολογίας - Ζωολογίας / Επιστημονικός Υπεύθυνος Καλλιστώ
"Ο ρόλος των μεγάλων θηλαστικών στη διατήρηση της βιοποικιλότητας – η περίπτωση της καφέ αρκούδας"

ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΣΥΝΕΔΡΙΟΥ

Ι. ΟΜΙΛΙΕΣ

ΚΕΝΤΡΙΚΗ ΟΜΙΛΙΑ-1 : Models, evidence, bias and speculation: revisiting the COVID-19 pandemic

Ιωάννης Ιωαννίδης

Stanford Prevention Research Center, Department of Medicine and Departments of Epidemiology and Population Health of Biomedical Data Science, and of Statistics, Stanford University, and Meta-Research Innovation Center at Stanford (METRICS), Stanford, CA, USA

ΚΕΝΤΡΙΚΗ ΟΜΙΛΙΑ-2 : Ανταγωνισμός και συνεργασία από την εμφάνιση της ζωής μέχρι τις ανθρώπινες κοινωνίες

Ελευθέριος Ζούρος

Ομότιμος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης, Αντεπιστέλλον Μέλος της Ακαδημίας Αθηνών

Χημικοί σχηματισμοί με την ιδιότητα της αναπαραγωγής εμφανίστηκαν στον πλανήτη μας περίπου πριν 4 δισεκατομμύρια χρόνια. Από αυτούς προέκυψαν όλες οι μορφές της ζωής. Η εξέλιξη του φαινομένου της ζωής σημαδεύτηκε από σταθμούς, όπως η εμφάνιση των κυττάρων (που μπορεί να θεωρηθούν ως «κοινωνίες» γονιδίων), των σύνθετων πολυκύτταρων οργανισμών (που μπορεί να θεωρηθούν ως «κοινωνίες» κυττάρων) και των ακόμα πιο σύνθετων συνόλων ατόμων με κοινωνική οργάνωση. Τι είδους μηχανισμοί ευθύνονται για αυτήν την αύξηση της πολυπλοκότητας, στην κορυφή της οποίας βρίσκονται ο ανθρώπινος εγκέφαλος και οι ανθρώπινες κοινωνίες; Υπήρξαν ο ανταγωνισμός και η συνεργασία αντίπαλες ή συνεργατικές δυνάμεις στην αύξηση της πολυπλοκότητας του έμβιου κόσμου και, γενικότερα, στην πορεία της ζωής; Υπάρχει ένα όριο στην αύξηση της πολυπλοκότητας και ποιό μπορεί να είναι το τελικό αποτέλεσμα; Είναι δυνατόν ένα προϊόν αυτής της πορείας, ο άνθρωπος, να την ελέγξει και να την κατευθύνει; Ποιες είναι οι προϋποθέσεις για ένα τέτοιο ενδεχόμενο ;

ΚΕΝΤΡΙΚΗ ΟΜΙΛΙΑ-3 : Μοριακοί μηχανισμοί γήρανσης και νευροεκφυλισμού

Ταβερναράκης Νεκτάριος
Καθηγητής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστήμιου Κρήτης, Πρόεδρος του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας,
Αντιπρόεδρος του Διοικητικού Συμβούλιου του Ευρωπαϊκού Ινστιτούτου Καινοτομίας και Τεχνολογίας

Η γήρανση και οι συνοδές της παθολογικές καταστάσεις όπως οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες, αποτελούν ένα από τους διαρκώς αυξανόμενους παράγοντες ανθρώπινης αναπηρίας στις σύγχρονες κοινωνίες. Οι εκφυλιστικές ασθένειες του νευρικού συστήματος όπως οι ασθένειες Alzheimer's, Batten, Huntington's, Parkinson's και πολλές άλλες, είναι από τις πιο δραματικές παθολογικές καταστάσεις στον άνθρωπο, οι οποίες έχουν συχνά μοιραία κατάληξη. Κοινό χαρακτηριστικό όλων των νευροεκφυλιστικών ασθενειών είναι η προοδευτική αλλά και η μαζική απώλεια κυττάρων του νευρικού συστήματος τα οποία όπως είναι γνωστό, σε αντίθεση με άλλα είδη κυττάρων, είναι δύσκολο ως αδύνατο να αναπληρωθούν. Η εκτεταμένη αυτή απώλεια οδηγεί σε θεαματική μείωση των σωματικών και νοητικών λειτουργιών του ατόμου και τελικά στο θάνατο. Παρόμοια φαινόμενα καταστροφής των νευρικών κυττάρων με ανάλογες οδυνηρές συνέπειες παρατηρούνται επίσης σε περιπτώσεις ισχαιμικών εγκεφαλικών επεισοδίων, επιληψίας καθώς και κατάχρησης τοξικών η ναρκωτικών ουσιών. Παρόλο που η γήρανση είναι ένα από τα πιο θεμελιώδη βιολογικά φαινόμενα, το όποιο βιώνουν όλοι ανεξαιρέτως οι έμβιοι οργανισμοί, είναι ταυτόχρονα και ένα από τα λιγότερο κατανοητά. Ποιοι βιολογικοί μηχανισμοί είναι υπεύθυνοι για τη γήρανση των κυττάρων και κατ' επέκταση ολόκληρου του οργανισμού; Πως ελέγχονται; Στο πλαίσιο της ομιλίας θα αναλυθούν τα ευρήματα μελετών που στοχεύουν στην αποκάλυψη των μηχανισμών αυτών, κάτι που αναμένεται ότι θα διευκολύνει σημαντικά την ανάπτυξη αποτελεσματικών παρεμβάσεων με στόχο τη βελτίωση της ποιότητας ζωής στις μεγάλες ηλικίες.

ΟΜΙΛΙΑ−1 : Βιολογική Εξέλιξη και Μοριακή Επιδημιολογία του Sars-CoV-2 στην Ελλάδα

Δημήτρης Θάνος

Ακαδημαϊκός, Πρόεδρος του Επιστημονικού Συμβουλίου και Διευθυντής του Κέντρου Βασικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών

ΟΜΙΛΙΑ−2 : Μοριακές και μεταβολικές αποκρίσεις θαλάσσιων οργανισμών στην αύξηση της θερμοκρασίας λόγω της κλιματικής αλλαγής

Βασίλειος Μιχαηλίδης
Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Οι ανθρώπινες δραστηριότητες επηρεάζουν άμεσα ή έμμεσα το θαλάσσιο περιβάλλον αναπτύσσοντας στρεσσογόνες περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι συνθήκες αυτές και οι αντίστοιχοι στρεσσογόνοι παράγοντες προκαλούν την αρχική απόκριση των θαλάσσιων οργανισμών σε μοριακό, βιοχημικό και φυσιολογικό επίπεδο εντός λίγων ωρών ή μερών, επηρεάζοντας άμεσα τις κυτταρικές λειτουργίες και τελικά την φυσιολογική απόδοση των ατόμων, ενώ σε βάθος χρόνου, επηρεάζουν την οικολογία των πληθυσμών, συμπεριλαμβανομένης της προσαρμογής και επιτυχίας επιβίωσης τους. Οι φυσιολογικές αποκρίσεις είναι άμεσα υπεύθυνες για την ικανότητα ενός οργανισμού να αντιμετωπίσει τους παράγοντες καταπόνησης στο περιβάλλον και τη διατήρηση της ανάπτυξης και της αναπαραγωγής του. Σε μια εποχή όπου οι υδατοκαλλιέργειες τείνουν να αντικαταστήσουν την αλιεία των ψαριών, η κατανόηση των περιβαλλοντικών αλλαγών λόγω των ανθρώπινων επιδράσεων και της κλιματικής αλλαγής και αντιστοίχως των αποκρίσεων των εκτρεφόμενων θαλάσσιων ειδών σε διάφορα επίπεδα βιολογικής οργάνωσης είναι ζωτικής σημασίας για την εκτίμηση των περιβαλλοντικών κινδύνων και την λήψη μέτρων διαχείρισης των φυσικών πόρων. Επίσης οι εκτιμήσεις της φυσιολογικής απόδοσης των θαλάσσιων οργανισμών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό των επιπτώσεων της κλιματικής αλλαγής και αποτελεί μια απαραίτητη προϋπόθεση για τη διατήρηση των φυσικών πόρων και της βιοποικιλότητας. Ως εκ τούτου, η διαχείριση και διατήρηση των πληθυσμών και της βιοποικιλότητας οφείλουν να εστιάζουν πρωτίστως στις μεταβολές εντός του κυττάρου, αφού αποτελούν το αρχικό στάδιο σε ένα καταρράκτη αντιδράσεων που ενδεχομένως να οδηγήσουν στην κατάρρευση των πληθυσμών. Στην παρούσα ομιλία γίνεται αναφορά στην απόκριση των θαλάσσιων οργανισμών και κυρίως του εκτρεφόμενου είδους ψαριού *Sparus auarata* (τσιπούρα) και του μεσογειακού μυδιού *Mytilus galloprovincialis*. Αναφέρονται αποτελέσματα των τελευταίων δεκαπέντε ετών από έρευνα που έχει διεξαχθεί στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων του Τμήματος Βιολογίας του Α.Π.Θ. και πως αυτά συμβάλλουν στην κατανόηση των ορίων θερμικής αντοχής τους σε συνθήκες θερμικού στρες. Τα αποτελέσματα από μοριακές, μεταβολικές και φυσιολογικές αποκρίσεις δείχνουν ότι τόσο τα ψάρια όσο και τα μύδια αρχίζουν και καταπονούνται θερμικά πάνω από τους 26-27^{o}C. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται από πρόσφατες μαζικές θνησιμότητες των μυδιών λόγω της παρατεταμένης αύξησης της θερμοκρασίας πάνω από τους 28^{o}C στις ελληνικές θάλασσες. Τα αποτελέσματα συμβάλλουν ιδιαίτερα στην δημιουργία προγραμμάτων έγκαιρης προειδοποίησης για την λήψη μέτρων προστασίας των πληθυσμών των εκτρεφόμενων ειδών σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης στο πλαίσιο της κλιματικής. Επίσης βάσει των αποτελεσμάτων της έρευνας αναφέρονται

μέθοδοι βελτίωσης της θερμικής αντοχής των μυδιών, έτσι ώστε να μετριάζονται οι επιπτώσεις της αύξησης της θερμοκρασίας του θαλασσινού νερού στην θνησιμότητα των ατόμων των μυδιών. Συγκεκριμένα αποτελέσματα από την εφαρμογή της μεθόδου "hardening" δείχνουν έντονη γονιδιακή έκφραση που συμβάλλει στην μείωση της θνησιμότητας των μυδιών σε υψηλές θερμοκρασίες.

ΟΜΙΛΙΑ−3 : Το σημείο ελέγχου της αποκοπής στην κυτταροκίνηση: ένας νέος προστάτης της σταθερότητας των χρωμοσωμάτων

Γεώργιος Ζάχος
Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, το σημείο ελέγχου της αποκοπής συνεισφέρει στον ακριβή διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά την κυτταρική διαίρεση καθυστερώντας την ολοκλήρωση της κυτταροκίνησης (αποκοπή) όταν υπάρχει χρωματίνη που καθυστερεί μέσα στο διακυτταρικό κανάλι ανάμεσα στα θυγατρικά κύτταρα. Στα κύτταρα ανθρώπου, το σημείο ελέγχου της αποκοπής απαιτεί το σωστό εντοπισμό και τη βέλτιστη καταλυτική ενεργότητα της κινάσης Aurora B του πρωτεϊνικού Συμπλόκου Χρωμοσωμικών Επιβατών (CPC) στο ενδιάμεσο σώμα, και κορυφώνεται με την αναστολή πρωτεϊνών του συμπλόκου ESCRT-III για να καθυστερήσει το τελικό κόψιμο. Ανεπιτυχής επίλυση γεφυρών χρωματίνης (ινών εσφαλμένα διαχωρισμένου DNA οι οποίες ενώνουν τους θυγατρικούς πυρήνες) σε κύτταρα χωρίς λειτουργικό σημείο ελέγχου της αποκοπής, μπορεί να οδηγήσει σε θραύση των γεφυρών χρωματίνης ή σε δημιουργία τετραπλοειδών κυττάρων λόγω οπισθοχώρησης της κυτταροπλασματικής αύλακας. Με τη σειρά τους, τα παραπάνω ενδεχόμενα μπορούν να οδηγήσουν σε συσσώρευση βλαβών στο DNA και χρωμοσωμική αστάθεια, τα οποία συνδέονται με δημιουργία καρκίνου. Θα παρουσιάσουμε πρόσφατη πρόοδο στην κατανόηση των μηχανισμών του σημείου ελέγχου της αποκοπής και θα συζητήσουμε το ρόλο αυτού στη διασφάλιση της ακεραιότητας του γονιδιώματος σε επίπεδο χρωμοσωμάτων.

ΟΜΙΛΙΑ−4 : Συνθετική Βιολογία και Βιο-χυτήρια: Από το γονότυπο στον φαινότυπο

The Edinburgh Genome Foundry: a robotic setup for high-throughput bioengineering, from genotype to phenotype

Ρέννος Φραγκούδης
Υπεύθυνος του Edinburgh Genome Foundry

Biofoundries encourage the use of cutting-edge computational tools and automated workflows that are key to accelerating the engineering of biological systems. The Edinburgh Genome Foundry (EGF) at the University of Edinburgh is a core research facility that provides academic and industrial customers access to state-of-the-art equipment and automation infrastructure. We specialise in the miniaturised assembly of DNA constructs for fundamental and biotechnology-related research using a fully automated workflow on our highly integrated robotics platform. A custom suite of computational tools is utilised to automate the design of DNA sequences and facilitates interactions between the robotic platform, databases, and user interfaces in processes from project onboarding to quality control procedures. In addition to DNA assembly, the platform and integrated liquid handling systems are used for high-throughput automation of common molecular biology protocols, micro-organism transformation, and the development of bespoke assays. These workflows are complemented either by in-house instrumentation or through collaborations with internal research facilities for additional phenotypic screening such as next-generation sequencing, proteomics, and metabolomics.

Our recently acquired Beacon Optofluidics system from Berkeley Lights is an outstanding addition to our existing infrastructure and automation capabilities. The Beacon System allows the simultaneous analysis of thousands of cells in isolated chambers and enables users to implement workflows used for antibody discovery and cell line development. As the first of its kind in a European academic facility, EGF’s investment in the Beacon system has provided our customers with unparalleled access to state-of-the-art technology to perform high-throughput single-cell screening experiments.

Our advanced computational tools and automation technologies have been crucial in research projects such as gene therapy, vaccine development, and metabolic engineering. Expanding our toolkit to include the Beacon system is key to facilitating the development of previously unfeasible projects in both academia and industry.

ΟΜΙΛΙΑ−5 : Ο ρόλος της γενετικής στην αιτιολογία των νευροαναπτυξιακών συνδρόμων - Το παράδειγμα του Συνδρόμου Gilles de la Tourette

Μαριάνθη Γεωργίτση
Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

Οι νευροαναπτυξιακές διαταραχές (ΝΑΔ) αποτελούν ομάδα διαταραχών της ανάπτυξης με νευροβιολογική βάση. Αν και η εμφάνιση συμπτωμάτων διαπιστώνεται κατά την πρώιμη παιδική ηλικία (τυπικά 1-6 ετών), ορισμένα συμπτώματα ΝΑΔ συνεχίζονται και κατά την ενήλικη ζωή. Οι ΝΑΔ επηρεάζουν διάφορους τομείς της γνωστικής λειτουργίας και ευφυίας, της γλωσσικής και μη γλωσσικής επικοινωνίας, της κοινωνικο-συναισθηματικής ανάπτυξης ή/και των κινητικών λειτουργιών. Περιλαμβάνει γενικευμένες διαταραχές κατά τις οποίες πλήττεται σχεδόν το σύνολο των τομέων της ανάπτυξης, όπως η νοητική υστέρηση, ή λιγότερο γενικευμένες, όπως οι διαταραχές αυτιστικού φάσματος (ΔΑΦ), ή πιο εστιασμένες όπως η διαταραχή ελλειμματικής προσοχής με/χωρίς υπερκινητικότητα [ΔΕΠ(Υ)], οι διαταραχές επικοινωνίας (λόγου και ομιλίας), οι μαθησιακές δυσκολίες, όπως η Ειδική Μαθησιακή Διαταραχή (ΕΜΔ), και οι κινητικές διαταραχές, όπως η Διαταραχή Συντονισμού των Κινήσεων, τα χρόνια τικ (μυοσπάσματα) και το Σύνδρομο *Gilles de la Tourette* (GTS).

Ο **επιπολασμός** των ΝΑΔ συνολικά υπολογίζεται σε περίπου 15% παιδιών και εφήβων ηλικίας 3-17 ετών, ενώ φαίνεται να είναι ανεξάρτητος γεωγραφικής προέλευσης και εθνικότητας, πολιτισμικών παραμέτρων, κοινωνικο-οικονομικής διαστρωμάτωσης, θρησκεύματος ή τόπου διαμονής (αστικός ή αγροτικός).

Στο πεδίο μελέτης των πολυπαραγοντικών νοσημάτων, οι ΝΑΔ αποτελούν μία από τις πιο σύνθετες ομάδες φαινοτύπων των οποίων οι αιτιολογικές συνιστώσες (γενετική και περιβάλλον) αποτελούν αντικείμενο έντονης ερευνητικής δραστηριότητας. Η **κληρονομησιμότητα** των ΝΑΔ, όπως έχει υπολογισθεί από μελέτες διδύμων και μελέτες συσχέτισης σε κλίμακα ολικού γονιδιώματος, χαρακτηρίζεται υψηλή, ενώ ενδιαφέρον προκαλεί η **μεροληψία φύλου** που παρατηρείται σε αρκετές ΝΑΔ με τους άρρενες να διαγιγνώσκονται συχνότερα από τα θήλεα άτομα στον ίδιο πληθυσμό.

Παρά τη σημαντική εξέλιξη που έχει σημειωθεί τις τελευταίες δεκαετίες στις διαγνωστικές μεθόδους, αντιμετωπίζουμε ακόμη εμπόδια στο να κατανοήσουμε πώς η διαταραχή της λειτουργίας συγκεκριμένων νευρωνικών δικτύων επηρεάζει την ανθρώπινη επικοινωνία, τις κοινωνικές δεξιότητες, την ευφυία, και τη γλωσσική επικοινωνία, είτε μεμονωμένα σε μία ΝΑΔ είτε όταν συνυπάρχουν περισσότερες της μίας ΝΑΔ (**συννοσηρότητα**). Για παράδειγμα, μία ΔΑΦ μπορεί να συνυπάρχει με νοητική υστέρηση, ενώ η ΔΕΠ(Υ) διαγιγνώσκεται συχνά ως συννοσηρότητα σε άτομα με ΔΑΦ, GTS ή με ΕΜΔ, υποστηρίζοντας την τρέχουσα επιστημονική πεποίθηση ότι ένα κοινό αιτιοπαθολογικό, πιθανώς και γενετικό, υπόβαθρο χαρακτηρίζει αυτές τις διαταραχές. Για την ανάπτυξη βελτιωμένων εργαλείων διαχείρισης ή και θεραπείας – μελλοντικά – των ΝΑΔ, είναι καθοριστικής σημασίας να

ανακαλύψουμε νέους – και φυσικά να κατανοήσουμε καλύτερα τους ήδη γνωστούς ή ύποπτους – **παράγοντες κινδύνου**. Όπως και στα ψυχιατρικά νοσήματα, τα κριτήρια διάγνωσης των ΝΑΔ είναι πρωτίστως συμπεριφορικά και δε βασίζονται σε σταθμισμένους **βιολογικούς δείκτες**, ενώ για τα περισσότερα νευροαναπτυξιακά νοσήματα δεν υπάρχει φαρμακευτική θεραπεία.

Η εξέλιξη των μεθόδων ανάλυσης του ανθρώπινου γονιδιώματος με ανεπανάληπτη λεπτομέρεια και ταχύτητα, κυρίως χάρη στην **αλληλούχηση νέας γενιάς**, έχει δημιουργήσει τεράστιο όγκο γενετικών δεδομένων που αναμένεται να συμβάλλουν στη διαλεύκανση της γενετικής συνιστώσας των ΝΑΔ. Κοινές και σπάνιες σημειακές παραλλαγές του γονιδιώματος, όπως τα SNVs, κληρονομούμενες ή *de novo* δομικές παραλλαγές, όπως τα CNVs, αλλά και σπάνιες σωματικές μεταλλάξεις των νευρικών κυττάρων, καθώς και μεταβολές στο μεταγραφωμικό προφίλ των κυττάρων ασθενών με ΝΑΔ, βρίσκονται όλα υπό ενδελεχή μελέτη. Προσφάτως, δε, η έρευνα έχει εστιαστεί και στη **διασταυρούμενη ανάλυση** της γενετικής αρχιτεκτονικής διαφορετικών ΝΑΔ, αλλά και στο μεταίχμιο διαφορετικών ερευνητικών πεδίων, όπως η νευροαπεικονιστική γενετική και η αλληλεπίδραση ΚΝΣ-μικροβιώματος. Τα αποτελέσματα μεγάλων, διεθνών, και διεπιστημονικών κοινοπραξιών, καθώς και μετα- και μέγα-αναλύσεις, βλέπουν συνεχώς το φως της δημοσιότητας και δημιουργούν μεγάλες προσδοκίες τόσο για την **ανακάλυψη γενετικών παραγόντων προδιάθεσης** για τις ΝΑΔ όσο και για τη διαλεύκανση της σύνθετης παθοφυσιολογίας αυτών.

Στην παρουσίαση θα γίνει συνοπτική αναφορά των σημείων που προαναφέρθηκαν, αξιοποιώντας το GTS ως πρότυπο παράδειγμα ΝΑΔ, χάρη στη γνώση που έχει συσσωρευθεί τα τελευταία έτη. Το GTS, αν και λιγότερο συχνό σε σχέση με άλλες ΝΑΔ, παρουσιάζει υψηλή κληρονομησιμότητα, σημαντική μεροληψία φύλου, χαρακτηρίζεται από σημαντικά ποσοστά συννοσηρότητας με άλλες νευροαναπτυξιακές ή/και ψυχιατρικές διαταραχές, ωστόσο η γενετική του βάση ακόμη διερευνάται. Σημαντικό μέρος των δεδομένων που θα παρουσιασθούν για τη γενετική βάση του GTS είναι αποτέλεσμα της ερευνητικής δραστηριότητας που διεξάγεται κατά τα τελευταία 15 έτη από μέλη ΔΕΠ και επιστημονικούς συνεργάτες του Τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής του ΔΠΘ.

ΟΜΙΛΙΑ−6 : Στοχευμένη αλληλούχηση υψηλής απόδοσης σε μικροβιακές κοινότητες: Κοινότυπες απαντήσεις σε ταξινομικά ερωτήματα ή απαραίτητο οικολογικό εργαλείο;

Σάββας Γενίτσαρης
Επικουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Η αλληλούχηση υψηλής απόδοσης με στόχευση σε γενετικούς δείκτες (metabarcoding), όπως οι ευρέως διαδεδομένοι δείκτες της μικρής υποομάδας του rRNA (SSU rRNA) τόσο για τους προκαρυώτες (16S rRNA γονίδιο) όσο και τους μικροευκαρυώτες (18S rRNA γονίδιο), προκάλεσε την προηγούμενη δεκαετία μια εκρηκτική αύξηση του αριθμού των εργασιών που διερευνούσαν την ποικιλότητα μικροβιακών κοινοτήτων σε διάφορα ενδιαιτήματα, και έθεταν οικολογικά ερωτήματα σχετικά με το «ποιος, πού, πότε, γιατί και πώς» των οικοσυστημάτων. Ωστόσο, αυτή η επανάσταση οδήγησε σε ένα επαναλαμβανόμενο μοτίβο εργασιών, στις οποίες αναλύονται περιβαλλοντικά δείγματα με τη χρήση μεθόδων στοχευμένης αλληλούχησης και παρατίθενται τα αποτελέσματα βιοποικιλότητας και σύνθεσης των μικροβιακών κοινοτήτων χωρίς ουσιαστικό οικολογικό στόχο. Έτσι, παρόλο που η προσέγγιση αυτή προσφέρει τεράστιες δυνατότητες, έχει κατηγορηθεί για μαζική παραγωγή κοινότυπων ταξινομικών περιγραφών, και αρχίζει να αντικαθίσταται από μεταγονιδιωματικές αναλύσεις, οι οποίες διαθέτουν αρετές αλλά και αυτές αντιμετωπίζουν προκλήσεις. Τίθεται, επομένως, το ερώτημα: Έχουμε εξαντλήσει ήδη τις δυνατότητες της στοχευμένης αλληλούχησης, ή τελικά αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο προς αντιμετώπιση των σύγχρονων οικολογικών ερωτημάτων που σχετίζονται με τις λειτουργίες των μικροβιακών κοινοτήτων και τις αποκρίσεις τους στις αυξανόμενες εξωγενείς πιέσεις που επηρεάζουν τα οικοσυστήματα σε παγκόσμιες κλίμακες;

ΟΜΙΛΙΑ−7 : Ανθρώπινος πληθυσμός και θάλασσα στον αιώνα της κλιματικής αλλαγής

Ιωάννης Καρακάσης
Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΙΙ.ΣΤΡΟΓΓΥΛΕΣ ΤΡΑΠΕΖΕΣ

ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ−1: Γενομική και οι εφαρμογές της

Επιτροπή Υγείας Π.Ε.Β.

Συντονίστρια
Ελένη Ρίζου
Εργαστηριακή Γενετίστρια, Τμήμα Γενετικής ΓΟΝΚ Ο Άγιος Σάββας, μέλος Δ.Σ. Π.Ε.Β.

Οι Εφαρμογές των Τεχνολογιών Ανάλυσης του Γενετικού Υλικού στην Ογκολογία

Ευθύμιος Δημητριάδης
Εργαστηριακός Γενετιστής/Μοριακός Βιολόγος, Διευθυντής Τμήματος Γενετικής, ΓΟΝΚ Ο Άγιος Σάββας

Οι τεχνολογίες ανάλυσης του γενετικού υλικού έχουν γίνει σήμερα αναγκαίο εργαλείο στην καθημερινή κλινική πράξη στο χώρο της ογκολογίας .

Αυτό αποτυπώνετε και μέσα από την διαφαινόμενη κυριαρχία στην κλινική πράξη των λεγόμενων τεχνολογιών αλληλούχισης επόμενης γενιάς (Next Generetion Sequencing). Γιατί όμως οι μέθοδοι και τεχνολογίες ανάλυσης του καρκινικού γονιδιώματος έχουν ενσωματωθεί και θα συνεχίσουν να ενσωματώνονται στην κλινική πράξη σε όλα της τα στάδια? Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί σε δύο κυρίως λόγους. Ο ένας αφορά στο γενικό θεωρητικό πλαίσιο εντός του οποίου διεξάγεται η έρευνα και η κλινική πρακτική στην ογκολογία και ο δεύτερος αφορά στα πρακτικά αποτελέσματα από την εφαρμογή αυτών των τεχνολογιών. Το γενικό θεωρητικό πλαίσιο συμπεριλαμβάνει μεταξύ των άλλων την αποδοχή και εφαρμογή του αναγωγισμού ως διαδικασίας απόκτησης νέας γνώσης , την αποδοχή της κυτταρικής θεωρίας , την αποδοχή της θέσης ότι το DNA είναι το μόριο που ελέγχει την συγκρότηση και αναπαραγωγή κυττάρων και οργανισμών και κυρίως την αποδοχή της θεωρίας ότι ο καρκίνος είναι γενετική νόσος. Η λεγόμενη θεωρία των σωματικών μεταλλάξεων (somatic mutation theory) υποστηρίζει ότι οι βλάβες στο γενετικό υλικό των κυττάρων (ανεξάρτητα από τα αίτια που τις προκαλούν) είναι αυτές που ευθύνονται για την επαγωγή και εξέλιξη της καρκινογένεσης.

Το θεωρητικό πλαίσιο που διαμορφώνουν αυτές οι παραδοχές είχε και έχει ως συνέπεια μεταξύ των άλλων και την εστίαση του κύριου μέρους της έρευνας για τον καρκίνο στην μελέτη και καταγραφή των μεταβολών του καρκινικού γονιδιώματος. Σε αυτή την κατεύθυνση η έρευνα στο χώρο της βιολογίας και της ιατρικής συναντιέται και διαμορφώνεται και από τις εξελίξεις και τις καινοτομίες που προέρχονται από το σύνολο των λεγόμενων θετικών επιστημών (χημεία, φυσική , μαθηματικά, πληροφορική).

Οι εφαρμογές στην κλινική πράξη των τεχνολογιών ανάλυσης του καρκινικού γονιδιώματος αφορούν την χρήση των γενετικών ευρημάτων στην πρόληψη, διάγνωση , πρόγνωση –παρακολούθηση και την πρόβλεψη της ανταπόκρισης σε συγκεκριμένες θεραπείες. Η εισαγωγή στη κλινική πράξη των λεγόμενων στοχευόμενων θεραπειών είναι ίσως η εφαρμογή που καθιέρωσε την χρήση των μεθόδων ανάλυσης του γενετικού υλικού ως απαραίτητου στοιχείου στην κλινική πράξη. Η τάση που κυριαρχεί

σήμερα είναι η πανοραμικού τύπου ανάλυση του γενετικού υλικού κυρίως με την εφαρμογή της τεχνολογίας αλληλούχισης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing). Η τεχνολογία αυτή έχει την δυνατότητα ανάλυσης αλλαγών στο επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος (μεταλλάξεις, έκφραση, επιγενετικές μεταβολές) , ανάλυσης πολλαπλών στόχων, αυτοματισμού και ενσωμάτωσης σε μια πλατφόρμα πολλαπλών τεστ , δυνατότητα συνεχούς εξέλιξης ή και ανάλυσης και άλλων βιομορίων και προοπτικές συνεχούς μείωσης του κόστους των αναλύσεων.

Μερικές από τις προκλήσεις που καλούνται να αντιμετωπίσουν όλες οι τεχνολογίες ανάλυσης του γενετικού υλικού στην ογκολογία είναι η ετερογένεια των όγκων (στον χώρο και στον χρόνο) και αξιολόγηση των ευρημάτων (driver/passenger-actionable/non- actionable). Ο καρκίνος είναι μια εξαιρετικά σύνθετη νόσος και η αναζήτηση και υιοθέτηση μιας ενιαίας ή μονοσήμαντα προσανατολισμένης ερευνητικής προσέγγισης για όλες τις νεοπλασίες δεν μπορεί να δώσει απαντήσεις ακόμη και σε μερικά από τα πλέον βασικά ερωτήματα που αφορούν την ανάπτυξη και εξέλιξη των νεοπλασιών (πχ μετάσταση). Κατά συνέπεια η αναζήτηση και εφαρμογή μιας ενιαίας κλινικής προσέγγισης έχει εκ των πραγμάτων όρια και περιορισμούς. Η αντιμετώπιση των νεοπλασιών απαιτεί πολλαπλότητα προσεγγίσεων που σημαίνει και πολλαπλότητα επιπέδων ανάλυσης μεθόδων και στόχων. Ήδη οι αναλύσεις των μεταβολών του γενετικού υλικού αρχίζουν να συνδυάζονται και με τις αναλύσεις των μεταβολών στο επίπεδο των πρωτεϊνών.

Η γενετική στη διάγνωση των κληρονομούμενων καρδιαγγειακών νοσημάτων

Ξένια Γουρζή
Εργαστηριακή Γενετίστρια, Μονάδα Κληρονομικών Καρδιαγγειακών Παθήσεων, Ωνάσειο Νοσοκομείο

Οι κληρονομούμενες καρδιαγγειακές παθήσεις περιλαμβάνουν παθήσεις του σαρκομεριδίου, παθήσεις του ηλεκτρικού συστήματος της καρδιάς καθώς και παθήσεις της αορτής. Τα συμπτώματα των νόσων αυτών μπορεί να κυμαίνονται από πολύ ελαφριά έως πολύ σοβαρά, όπως η ανάπτυξη καρδιακής ανεπάρκειας ή ο αιφνίδιος θάνατος. Η αλματώδης ανάπτυξη της μοριακής γενετικής την τελευταία δεκαετία έχει παίξει σημαντικό ρόλο τόσο στην κατανόηση της παθογένεσης των νοσημάτων αυτών όσο και στην διάγνωση αυτών με τη γενετική εξέταση. Η γνώση του γονιδίου και συγκεκριμένα της μετάλλαξης στην οποία οφείλεται η νόσος βοηθά τον κλινικό γιατρό να οδηγηθεί σε προσαρμοσμένη για κάθε ασθενή θεραπευτική στρατηγική, κάτι που σήμερα ονομάζουμε ιατρική της ακρίβειας. Επιπλέον, δίνει στον κλινικό γιατρό την δυνατότητα να αναγνωρίσει έγκαιρα τους ασυμπτωματικούς συγγενείς του ασθενούς που βρίσκονται σε κίνδυνο να αναπτύξουν τη νόσο.

Ο γονιδιακός έλεγχος απαιτεί την συνεχή συνεργασία διαφορετικών ειδικοτήτων, καρδιολόγων, γενετιστών, γενετικών συμβούλων και μοριακών βιολόγων με στόχο την καλύτερη αντιμετώπιση των ασθενών με καρδιαγγειακές παθήσεις και των οικογενειών τους, καθώς και την προαγωγή της έρευνας

στην γενετική βάση των καρδιακών παθήσεων.

Προεμφυτευτική Γενετική Διάγνωση: το χρωμοσωμικό προφίλ του εμβρύου

Μάρα Σιμοπούλου
Senior Κλινικός Εμβρυολόγος-Γενετιστής, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή,
Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Οι εξελίξεις στη Μοριακή Βιολογία και τη Γενετική, καθώς και η πληρέστερη κατανόηση της Φυσιολογίας της αρχόμενης ζωής στο προεμφυτευτικό στάδιο ανάπτυξης, οδήγησαν στην ανάπτυξη και την εξέλιξη ενός σημαντικού Τομέα της Ιατρικής Γενετικής και της Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, αυτόν του Προεμφυτευτικού Γενετικού Ελέγχου (Preimplantation Genetic Testing, PGT). Ο εν λόγω έλεγχος πραγματοποιείται πάντα στο πλαίσιο της εξωσωματικής γονιμοποίησης και περιλαμβάνει την βιοψία κυττάρων του προεμφυτευτικού εμβρύου και τη διενέργεια γενετικής ανάλυσης με σκοπό την επιλογή αυτού που φέρει φυσιολογικό γενετικό υλικό προς εμβρυομεταφορά. Σήμερα η γενετική ανάλυση πραγματοποείται εφαρμόζοντας τεχνικές array CGH και αλληλούχισης νέας γενιάς (NGS), ενώ η βιοψία των εμβρυϊκών κυττάρων πραγματοποείται κυρίως στο στάδιο της βλαστοκύστης, την 5^{η} με 6^{η} ημέρα της ανάπτυξης μετά τη γονιμοποίηση. Ανάλογα με το αίτιο παραπομπής και με τον ειδικό στόχο της ανάλυσης, ο έλεγχος PGT διακρίνεται σε τρείς κατηγορίες: τον έλεγχο PGT για μονογονιδιακά νοσήματα (PGT-M), τον έλεγχο PGT για χρωμοσωμικές δομικές αναδιατάξεις και τον έλεγχο PGT για ανευπλοειδίες (PGT-SR). Στις περιπτώσεις PGT-M και PGT-SR υπάρχει ένα σαφές οικογενειακό γενετικό ιστορικό, όπου ένας οι και οι δύο εκ των υποψήφιων γονέων είναι φορείς είτε γονιδιακών μεταλλάξεων, είτε ισοζυγισμένων χρωμσοσωμικών αναδιατάξεων. Στις περιπτώσεις αυτές ο έλεγχος PGT μπορεί να προταθεί με σκοπό την ελαχιστοποίηση της πιθανότητας γέννησης νεογνού που να πάσχει από κάποιο νόσημα με γενετική βάση ή από μη ισοζυγισμένες χρωμοσωμικές αναδιατάξεις που οδηγούν σε απώλεια ή πλεονάσμα γενετικού υλικού. Αν και σε αρκετές περιπτώσεις τα ζευγάρια αυτά παρουσιάζουν επαναλαμβανόμενες αποβολές και υπογονιμότητα, αυτό δεν αποτελεί αναγκαία συνθήκη και ως εκ τούτου ο έλεγχος PGT και η εξωσωματική γονιμοποίηση, στο πλαίσιο της οποίας αυτός διενεργείται, μπορεί να προταθούν ως εναλλακτικές προσεγγίσεις προκειμένου να περιοριστεί η πιθανότητα απόκτησης πασχόντων τέκνων από γονείς-φορείς γονιδιακών νοσημάτων ή ισοζυγισμένων χρωμοσωμικών αναδιατάξεων, χωρίς κατά ανάγκη αυτοί να αντιμετωπίζουν υπογονιμότητα. Σε αντίθεση με τις παραπάνω κατηγορίες, ο έλεγχος PGT-A εφαρμόζεται στο πλαίσιο της εξωσωματικής γονιμοποίησης με σκοπό την επιλογή εμβρύων που φέρουν υψηλό δυναμικό ανάπτυξης και εμφύτευσης και φυσιολογική χρωμοσωμική σύσταση, χωρίς να υπάρχει υπόβαθρο μετάδοσης συγκεκριμένης γονιδιακής ή χρωμοσωμικής πάθησης στους απογόνους. Η αποτελεσματικότητα του ελέγχου PGT-A και το εάν και σε ποιους πρέπει να εφαρμόζεται αποτελεί σημείο αντιπαράθεσης για την επιστημονική κοινότητα. Τα πλέον πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα

συνηγορούν στο ότι ο έλεγχος PGT-A παρουσιάζει οφέλη όταν εφαρμόζεται σε γυναίκες ηλικίας μεγαλύτερης των 35 ετών, με βιοψία στο στάδιο της βλαστοκύστης και εφαρμογή τεχνικών array CGH ή NGS για τη διενέργεια της γενετικής ανάλυσης. Τα οφέλη αυτά αφορούν στη μείωση της πιθανότητας απώλειας κύησης και σε σχετική αύξηση του ποσοστού γέννησης ζώντων νεογνών, χωρίς ωστόσο το δεύτερο να επιβεβαιώνεται από όλες τις μελέτες. Στο πλαίσιο της ερμηνείας των αποτελεσμάτων του ελέγχου PGT-A για την επιλογή του καταλληλότερου εμβρύου για εμβρυομεταφορά, ιδιαίτερα περίπλοκη καθίσταται η ερμηνεία του μωσαϊκισμού, φαινόμενο στο οποίο παρατηρείται διαφορετική χρωμοσωμική σύσταση μεταξύ των κυττάρων στα οποία πραγματοποιείται χρωμοσωμική ανάλυση. Το φαινόμενο του μωσαϊκισμού είναι έντονο στο προεμφυτευτικό στάδιο της εμβρυϊκής ανάπτυξης και θεωρείται σε ένα βαθμό φυσιολογικό. Η απόφαση σχετικά με το ποιο είναι το «αποδεκτό» ποσοστού μωσαϊκισμού σύμφωνα με το οποίο ένα έμβρυο θα αξιολογείται ως ανευπλοειδές ή ευπλοειδές, με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, αποτελεί μία από τις πιο σημαντικές προκλήσεις της σύγχρονης Αναπαραγωγικής Ιατρικής και της Γενετικής του Ανθρώπου και πεδίο σύγχρονης έρευνας. Ο λόγος είναι πως η χρωμοσωμική σύσταση των κυττάρων του τροφοεξωδέρματος, κύτταρα του οποίου απομονώνονται κατά τη βιοψία, δεν αντιπροσωπεύει τη χρωμοσωμική σύσταση των κυττάρων της έσω κυτταρικής μάζας, η οποία αποτελεί τη καταβολή του εμβρύου. Πρόσθετες τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές με μεγάλο πληθυσμό και μακροχρόνια παρακολούθηση των απογόνων απαιτούνται προκειμένου να εξάγουμε εμπεριστατωμένα δεδομένα αναφορικά με την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα του ελέγχου PGT.

Νόσος COVID-19 και anti-SARS-CoV-2 mRNA εμβόλια

Ιωάννης Τρουγκάκος
Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας ΕΚΠΑ

Ο ιός SARS-CoV-2 χαρακτηρίζεται από υψηλή μεταδοτικότητα λόγω της ευρείας έκφρασης στο αναπνευστικό σύστημα τόσο του υποδοχέα ACE2 (θέση δέσμευσης της ιικής πρωτεΐνης ακίδας/Spike protein) όσο και των πρωτεασών (π.χ. TMPRSS2 και CTSB/L) που συμμετέχουν στη διαδικασία κυτταρικής επιμόλυνσης. Σε ηλικιωμένα άτομα ή σε άτομα με υποκείμενα νοσήματα η λοίμωξη μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρή νόσο COVID-19 που χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτες φλεγμονώδεις ανοσολογικές αποκρίσεις, ιστικές βλάβες και τελικά συστημική πολυοργανική κατάρρευση. Ο εμβολιασμός του πληθυσμού αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για την ανακοπή της πανδημίας COVID-19 και στα πλαίσια αυτά τα εμβόλια mRNA, τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί στη συνεχιζόμενη εκστρατεία εμβολιασμού, έχουν αναμφίβολα σώσει χιλιάδες ζωές. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες (ΑΕ) που έχουν αναφερθεί μετά τον εμβολιασμό, μπορεί να σχετίζονται με μια προφλεγμονώδη δράση των χρησιμοποιούμενων λιπιδικών νανοσωματιδίων ή του χορηγούμενου mRNA και/ή τη δρασή του χορηγούμενου αντιγόνου δηλαδή της πρωτεΐνης ακίδας του ιού. Η συνεχιζόμενη διεπιστημονική έρευνα

στα πεδία αυτά θα συνεισφέρει σημαντικά τόσο στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας της νόσου COVID-19, όσο και των ανοσοαποκρίσεων αλλά και των ΑΕ που έχουν αναφερθεί για τα mRNA εμβόλια, επιτρέποντας τη χάραξη συγκεκριμένων πολιτικών σχετικά με την εκστρατεία εμβολιασμού κατά της COVID-19.

Ευχαριστίες: Πρόγραμμα ΕΚΠΑ/ΕΛΚΕ "Μελέτη Γήρατος και Νοσημάτων του Γήρατος" (Κ.Ε. 19067)

ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ−2 : Ενωσιακές πολιτικές για την προστασία της βιοποικιλότητας

Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Συντονιστής

Αριστείδης Παρμακέλης

Βιοποικιλότητα και περιβαλλοντική ζημιά

Αριστείδης Παρμακέλης
Αναπληρωτής Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Βιολογίας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Το LIFEPROFILE και η εφαρμογή της περιβαλλοντικής ευθύνης

Σταυρούλα Πουλή
Προϊσταμένη ΣΥΓΑΠΕΖ/ΥΠΕΝ

Η σημασία της χρήσης μεθόδων ανάλυσης επικινδυνότητας ως εργαλείων για την πρόληψη και την αποκατάσταση της περιβαλλοντικής ζημίας

Δρ. Παναγιώτης Ντζερεμές
ΕΜΠ

Καθώς οι ανθρωπογενείς δραστηριότητες απειλούν τη βιοποικιλότητα με ολοένα και περισσότερα είδη να απειλούνται με εξαφάνιση, καταβάλλεται σημαντική προσπάθεια από κράτη και οργανισμούς για εφαρμογή πολιτικών ανάσχεσης αυτής της πορείας. Ορόσημο για τον ευρωπαϊκό χώρο αποτελεί η καθιέρωση της ευθύνης αυτού που ρυπαίνει να αναλαμβάνει τα απαραίτητα μέτρα για την προστασία του περιβάλλοντος και της βιοποικιλότητας ειδικότερα. Ωστόσο, παράλληλα με τους κανονισμούς, σημαντικό ζήτημα για την αντιμετώπιση πιθανών περιβαλλοντικών ζημιών αποτελεί ο σχεδιασμός στρατηγικών που θα εμποδίσουν/μετριάσουν τέτοιες ζημίες, ενισχύοντας την προστασία της βιοποικιλότητας. Με την παρούσα παρουσίαση επιδιώκεται να αναδειχθεί ο ρόλος της ανάλυσης επικινδυνότητας ως του εργαλείου εφαρμοσμένης επιστημονικής γνώσης μέσω του οποίου πραγματοποιείται η περιγραφή, η αξιολόγηση και η διαχείριση των περιβαλλοντικών κινδύνων, μέσα στο πλαίσιο της τρέχουσας στάθμης της γνώσης αλλά και των αβεβαιοτήτων. Το σημείο που τονίζεται είναι πως η χρήση τέτοιων μεθόδων ενισχύει δραστικά τη διαδικασία λήψης αποφάσεων από τους ενδιαφερόμενους για τους περιβαλλοντικούς κινδύνους φορείς

LIFEPROFILE : Εργαλείο αποτίμησης κόστους περιβαλλοντικής ζημιάς

Δρ. Θεόδωρος Χατζηβασιλειάδης
Πάντειο Πανεπιστήμιο-ΙΑΠΑΔ

Βάση της αρχής «ο ρυπαίνων πληρώνει» κατασκευάζουμε ένα εργαλείο οικονομικής αποτίμησης (ex-post & ex-ante) ενός περιβαλλοντικού ατυχήματος στον Ελλαδικό χώρο. Το κόστος υπολογίζεται με βάση των αναγκών του υπουργείου περιβάλλοντος (ΣΥΓΑΠΕΖ) σε καταστροφές του εδάφους, του νερού και της βιοποικιλότητας.

Αναζητώντας την αξία της βιοποικιλότητας που επηρεάστηκε ή καταστράφηκε, προβαίνουμε σε μία εκτίμηση του κόστους της «απώλειας» βιοποικιλότητας από πιθανό περιβαλλοντικό ατύχημα βάση των προτιμήσεων της κοινωνίας WTP. Για τον υπολογισμό της αξίας, θέτουμε διαφοροποίηση του κόστους σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά της βιοποικιλότητας, λαμβάνοντας υπόψη τόσο τα χαρακτηριστικά των ειδών όσο και των οικοσυστημάτων. Για την ανάλυση κάνουμε χρήση attributes που: (α) θα κατηγοριοποιούν τις περιοχές μελέτης σύμφωνα με τα γενικά χαρακτηριστικά τους, (β) θα αποτελούν δείκτες βιοποικιλότητας που θα περιγράφουν τα ειδικότερα (οικολογικά) χαρακτηριστικά κάθε περιοχής. Όλα τα attributes θα συσχετιστούν και με τα δεδομένα που θα συλλέξουμε από τη στρογγυλή τράπεζα των Βιοεπιστημόνων.

Ζημία στη βιοποικιλότητα & χρηματοοικονομικές εγγυήσεις με την οπτική του ΠΔ 148 για την περιβαλλοντική ευθύνη: βήματα προόδου, τρέχουσες προκλήσεις

Κωνσταντίνος Τσολακίδης
Γρύφων Περιβαλλοντική Συμβουλευτική

Η ουσιαστική εφαρμογή της πανευρωπαϊκής αρχής «ο ρυπαίνων πληρώνει» όπως στην χώρα μας κανονίζεται μέσω του Π.Δ. 148/2009, υπαγορεύει την περαιτέρω ενεργοποίηση όλων των εμπλεκομένων μερών στην ανάπτυξη μέσων και εργαλείων, τόσο εκτίμησης, όσο και οικονομικής αποτίμησης ζημιών στα προστατευόμενα είδη και στους φυσικούς οικοτόπους. Το πολύπλοκο αυτό ζήτημα που συνεχίζει να αποτελεί καίριο στοιχείο αδυναμίας εφαρμογής ολοκληρωμένων πολιτικών πρόληψης στις περισσότερες χώρες της Ευρώπης αποτελεί επίσης πρόσκομμα στο ζητούμενο της αύξησης του ενδιαφέροντος των φορέων εκμετάλλευσης αλλά και στην ευρύτερη παροχή μέσων χρηματοοικονομικής ασφάλειας

ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ−3 : Το παρόν και το μέλλον της κυτταρικής και γονιδιακής θεραπείας στην Ελλάδα. Ο ρόλος των Βιοεπιστημόνων.

Τμήμα Βιολογίας Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Συντονίστρια

Νικολέττα Ψαθά

Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Νικόλαος Ανάγνου

Ομότιμος Καθηγητής Βιολογίας, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

Μαρία Ρουμπελάκη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Αναστασία Παπαδοπούλου

Βιοχημικός, PhD, Γ.Ν.Θ. "Γεώργιος Παπανικολάου"

Η συγκεκριμένη στρογγυλή τράπεζα αφορά στην ενημέρωση του κοινού και ιδιαιτέρως των βιοεπιστημόνων σχετικά με την παρούσα κατάσταση της γονιδιακής και της κυτταρικής θεραπείας στην Ελλάδα σε ερευνητικό επίπεδο. Οι τρεις προσκεκλημένοι ομιλητές έχουν διακριθεί στους παραπάνω τομείς και έχουν ασχοληθεί με το πεδίο για περισσότερο από μία δεκαετία. Ο κ.Ανάγνου αποτελεί έναν από τους πρωτοπόρους της γονιδιακής θεραπείας σε παγκόσμιο επίπεδο, καθώς έχει εργαστεί στο χώρο από τις αρχές της ανάπτυξής του σε Ελλάδα και Αμερική. Το ερευνητικό του ενδιαφέρον μεταξύ άλλων περιλαμβάνει την ανάπτυξη νέων θεραπειών μέσω γονιδιακής προσθήκης για τις β-αιμοσφαιρινοπάθειες, γενετικές ασθένειες με κυρίαρχο χαρακτήρα στη χώρα μας και στην ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου. Η έρευνά του περιλαμβάνει την απάντηση των σύγχρονων προβλημάτων και αντιμετώπιση των περιορισμών των ιικών φορέων που χρησιμοποιούνται για τις παραπάνω ασθένειες. Πρόσφατα δημοσιευμένα αποτελέσματα από την ερευνητική του ομάδα στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, παρουσιάζουν μία νέα γενιά ιικών φορέων τόσο σε επίπεδο φακέλου όσο και σε επίπεδο ρυθμιστικών στοιχείων της διαγονιδιακής κασέτας με εξαιρετικά αποτελέσματα σε κύτταρα ασθενών. Η κ.Ρουμπελάκη έχει αφιερώσει ένα μεγάλο μέρος της πορείας της στη μελέτη των Μεσεγχυματικών Στελεχιαίων Κυττάρων και του πιθανού ρόλου και χρησιμότητάς τους στην κυτταρική θεραπεία. Τελευταία αποτελέσματα από την ερευνητική της ομάδα περιλαμβάνουν τον πλήρη χαρακτηρισμό του εκκριτώματος και πρωτεομικού και μοριακού προτύπου εμβρυικών ΜΣΚ. Οι μελέτες αυτές που πραγματοποιήθηκαν κατά κύριο λόγο στην Ιατρική Σχολή του ΕΚΠΑ υποδεικνύουν πως είναι εφικτή η απομόνωση εκκρινόμενων εξωκυττάριων κυστιδίων με θεραπευτικές ιδιότητες, αναπτύσσοντας έτσι μία νέα μέθοδο έμμεσης κυτταρικής ή ακυτταρικής θεραπείας. Με τα ΜΣΚ και το ρόλο τους στην αυτοανοσία έχει ασχοληθεί και η κ.Παπαδοπούλου κατά τη διάρκεια της διδακτορικής της διατριβής στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ.Γιάγκου Μηνά. Η μεταδιδακτορική της ερευνητική δραστηριότητα παραμένει στο χώρο της

ανοσοθεραπείας περιλαμβάνει ωστόσο πλέον τη δημιουργία αντι-ιικών και αντι-λευχαιμικών Τ-κυττάρων από υγιείς δότες και από ομφάλιο περιφερικό αίμα. Η έρευνα αυτή είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ενός καινοτόμου κλινικού πρωτοκόλλου με εφαρμογή στον SARS-Cov2 με πρωτοποριακά παγκοσμίως αποτελέσματα. Το πρωτόκολλο αυτό εφαρμόστηκε σε επίπεδο κλινικής δοκιμής στην Αιματολογική Κλινική του Νοσοκομείου Γ.Παπανικολάου υπό την επίβλεψη της κ.Παπαδοπούλου και της αιματολόγου Ε.Γιαννάκη. Οι παραπάνω ομιλίες υποδηλώνουν πως ο ευρύτερος τομέας της γονιδιακής και κυτταρικής θεραπείας είναι ιδιαίτερα ανεπτυγμένος στη χώρα μας με αποτελέσματα εφάμιλλης αξίας και εφαρμοσιμότητας με αντίστοιχα κέντρα του εξωτερικού.

ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ−4 : Τα σχολεία πάνε μουσείο. Τα μουσεία των τμημάτων Βιολογίας συνδέονται με την τοπική κοινωνία

Τμήμα Βιολογίας Πανεπιστήμιο Πατρών

Συντονιστής

Ηλίας Καζάνης

Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών

Μαρία Πανίτσα

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, μέλος Επιστημονικής & Διαχειριστικής Επιτροπής Βοτανικού Μουσείου Πανεπιστημίου Πατρών

Γιώργος Μήτσαινας

Λέκτορας, μέλος της Επιστημονικής και Διαχειριστικής Επιτροπής του Ζωολογικού Μουσείου Πανεπιστημίου Πατρών

Βοτανικό Μουσείο Πανεπιστημίου Αθηνών: 25 χρόνια προσέγγισης της μαθητικής κοινότητας

Δημήτρης Καζάνης

Μέλος Ε.ΔΙ.Π. Τομέα Οικολογίας-Ταξινομικής, Τμήμα Βιολογίας, πρώην Επιμελητής Βοτανικού Μουσείου,
Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τα Πανεπιστημιακά Μουσεία, που αποτελούν χώρους επαφής των παιδιών των μεγάλων αστικών κέντρων με τη βιοποικιλότητα, παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο, συμβάλλοντας αφενός στην περιβαλλοντική εκπαίδευση και αφετέρου κατευθύνοντας σε δραστηριότητες όπως η επιστήμη των πολιτών.

Στο Τμήμα Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ) έχουν ενταχθεί δύο μουσεία, το Ζωολογικό και το Βοτανικό Μουσείο, τα οποία αυτονομήθηκαν το έτος 1868 από το παλαιό Φυσιογραφικό Μουσείο, που φιλοξενούσε βοτανικές, ζωολογικές και ορυκτολογικές συλλογές, με έτος ίδρυσης το 1850. Οι συλλογές του Βοτανικού Μουσείου αποτελούνται κυρίως από αποξηραμένα δείγματα ειδών Σπερματοφύτων. Από τις συλλογές αυτές ως σημαντικότερες αξιολογούνται οι συλλογές των Θεόδωρου Ορφανίδη και Theodor von Heldreich, οι οποίοι στα μέσα του 19ου αιώνα θεμελίωσαν τη χλωριδική έρευνα στην Ελλάδα και προχώρησαν στην αναγνώριση πολλών νέων για την επιστήμη ειδών. Εκτός από τις συλλογές Σπερματοφύτων, στο Βοτανικό Μουσείο στεγάζονται δείγματα νέων για την επιστήμη ειδών φυκών και μυκήτων.

Για το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από την ίδρυσή του μέχρι και σήμερα, το Βοτανικό Μουσείο του ΕΚΠΑ παρέμενε άγνωστο για το ευρύτερο κοινό, αφού πρόσβαση στις συλλογές του επιτρέπεται μόνο σε εξειδικευμένους επιστήμονες και ερευνητές. Τον Νοέμβριο του 1997, στους χώρους του Βοτανικού Μουσείου εγκαινιάσθηκε μια μόνιμη έκθεση με θέμα ‘Αττικό Τοπίο και Περιβάλλον’. Η Έκθεση εστιάζει σε μία ποικιλία πτυχών του φυσικού και του ανθρωπογενούς περιβάλλοντος της Αττικής. Η

έκθεση αυτή αποτέλεσε το έναυσμα προσέγγισης του Βοτανικού Μουσείο με την εξω-ακαδημαϊκη κοινότητα και ειδικότερα με τη σχολική κοινότητα. Ο χώρος της έκθεσης αποτελεί ιδανικό χώρο ενημέρωσης και περιβαλλοντικής ευαισθητοποίησης των μαθητών, αλλά και των δασκάλων/καθηγητών τους. Όταν ζητηθεί από το προσωπικό του Μουσείου, παρέχεται η δυνατότητα σε ολιγομελείς ομάδες μαθητών (π.χ. ομάδες περιβαλλοντικής εκπαίδευσης) να παρακολουθήσουν σεμινάρια σε θέματα που σχετίζονται με τις εργασίες τους ή την καθημερινότητά τους (π.χ. δάση και δασικές εκτάσεις, δασικές πυρκαγιές, εθνικοί δρυμοί, κ.α.). Πρόσφατα, ξεκίνησαν και εκπαιδευτικές δραστηριότητες που εισάγουν τους μαθητές στις αρχές δημιουργίας και διατήρησης μιας βοτανικής συλλογής, από το πεδίο και τη συλλογή των φυτικών δειγμάτων μέχρι την αποξήρανσή τους και τη συντήρησή τους στα herbaria.

Διονύσιος Γιουλάτος,
Καθηγητής, Ζωολογική Συλλογή Τμήματος Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Ρεγγίνα Καρούσου,
Επίκουρη καθηγήτρια, Βοτανική Συλλογή Τμήματος Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Η επαφή των μαθητών Λυκείου με τα Μουσεία Φυσικών Επιστημών

Αθηνά Κουλοπούλου,
Εκπαιδευτικός Δευτεροβάθμιας Εκπαίδευσης, Βιολόγος, MSc, 32ο ΓΕΛ Θεσσαλονίκης

Στόχος της παρούσας ομιλίας είναι να παρουσιάσει την εμπειρία μας από την επαφή των μαθητών λυκείου με τα Μουσεία Φυσικών Επιστημών. Η εμπειρία αυτή έχει αποκτηθεί κατά τη διάρκεια επισκέψεων με ορισμένες τάξεις και αριθμό μαθητών, σε συγκεκριμένα μουσεία της Ελλάδας και του εξωτερικού.

Διαπιστώθηκε ότι τα Μουσεία Φυσικών Επιστημών είναι δυνατόν να αποτελέσουν σημαντικό παράγοντα ολοκλήρωσης της εκπαιδευτικής διαδικασίας, παρέχοντας ταυτόχρονα ποιοτική ψυχαγωγία και ενεργό μάθηση. Οι επισκέψεις σε αυτά συμβάλλουν στη διαμόρφωση της συναισθηματικής, αλλά και της κοινωνικής στάσης ζωής των μαθητών. Ευνοούν την ανάπτυξη αλληλεπιδραστικών και συνεργατικών στάσεων στους μαθητές, και τους εμπνέουν τον σεβασμό στο φυσικό περιβάλλον και τα έμβια όντα.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, κρίνεται μεγάλης σπουδαιότητας η συνεργασία μουσείων και σχολείου για καλύτερα μαθησιακά αποτελέσματα, καθώς και η χρησιμότητα ένταξης τέτοιων επισκέψεων στο αναλυτικό πρόγραμμα των σχολείων.

ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ−5 : Συνθετική Βιολογία: καινοτόμες λύσεις σε σύγχρονες προκλήσεις στην υγεία και το περιβάλλον

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Συντονίστρια
Καλλιόπη Παπαδοπούλου

Συνθετική Βιολογία και μικροοργανισμοί στην υπηρεσία του περιβάλλοντος

Δημήτριος Καρπούζας
Καθηγητής, Πρόεδρος του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Βιώσιμη Γεωργία βάσει σχεδιασμού

Καλλιόπη Παπαδοπούλου
Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ο ρόλος της ΣΒ στην ανάπτυξη της βιο-οικονομίας στην Ελλάδα

Κωνσταντίνος Ματθιόπουλος
Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Η έννοια της βιοοικονομίας αναπτύχθηκε τα τελευταία χρόνια και είναι απόρροια τριών βασικών παραγόντων: (α) της συνειδητοποίησης της ασύμμετρης καταστροφής του περιβάλλοντος από την τρέχουσα οικονομική μεγέθυνση των χωρών, η οποία βασίζεται κυρίως στη χρήση ρυπογόνων ορυκτών καυσίμων· (β) της γενικότερη τάσης για βιώσιμες στρατηγικές ανάπτυξης που θα βασίζεται σε φιλικότερες προς το περιβάλλον πηγές ενέργειας· (γ) της αναγνώρισης των δυνατοτήτων των βιοεπιστημών, και ιδιαίτερα της βιοτεχνολογίας, στη βιώσιμη ανάπτυξη. Υπό ευρεία έννοια, η βιοοικονομία ορίζεται ως η παραγωγή και χρήση ανανεώσιμων βιολογικών πόρων από τα χερσαία και υδάτινα οικοσυστήματα για την παραγωγή και παροχή προϊόντων, διαδικασιών και υπηρεσιών σε όλους τους τομείς του εμπορίου και της βιομηχανίας στο πλαίσιο ενός βιώσιμου, κυκλικού οικονομικού συστήματος. Κατά συνέπεια, οι πολιτικές βιοοικονομίας είναι συνυφασμένες με την καινοτομία και τη βιωσιμότητα, καθώς και την οικονομική ανάπτυξη και την απασχόληση.

Η συνθετική βιολογία, από την άλλη, αποτελεί την τελευταία εξέλιξη της βιοτεχνολογίας και αφορά τον επαναπρογραμματισμό και τη σύνθεση βιολογικών συστημάτων τα οποία δεν υφίστανται στη φύση, με στόχο την παραγωγή νέων προϊόντων ή διεργασιών επωφελών για τον άνθρωπο. Οι εφαρμογές της αγγίζουν ένα ευρύτατο φάσμα καθημερινών δραστηριοτήτων και αναγκών, από την απορρύπανση του περιβάλλοντος μέχρι τη δημιουργία νέας γενιάς εμβολίων, όπως τα mRNA εμβόλια για την COVID-19. Υπό αυτή την έννοια, λοιπόν, η ΣΒ αποτελεί βασικό μοχλό ανάπτυξης της βιοοικονομίας. Έτσι, όλα τα προηγμένα κράτη έχουν ήδη επεξεργαστεί ή επεξεργάζονται οδικούς χάρτες όπου περιγράφονται διεξοδικά οι ευκαιρίες που προσφέρει η ΣΒ στην ανάπτυξη της βιοοικονομίας και τα μέτρα που

απαιτούνται για την αξιοποίηση του δυναμικού των βιοεπιστημόνων προς την κατεύθυνση αυτή.

Εμβόλια και Συνθετική Βιολογία

Σταματία Παπουτσοπούλου
Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Η πρόσφατη πανδημία απέδειξε ότι το πιο ασφαλές μέτρο για την αντιμετώπιση της νόσου, βραχυπρόθεσμα όσο και μακροπρόθεσμα είναι η ενεργητική ανοσοποίηση του πληθυσμού, δηλαδή ο εμβολιασμός. Η προσπάθεια σε όλο τον κόσμο συνεχίζεται για τη δημιουργία πιο αποτελεσματικών εμβολίων. Σε αυτήν την προσπάθεια η επιστήμη της Συνθετικής Βιολογίας είχε και έχει σημαντικότατη συμβολή συνεισφέροντας στο σχεδιασμό των κατάλληλων αντιγόνων, στην επιτάχυνση της σύνθεσης νέων, καθώς και στη βελτιστοποίηση της λειτουργικότητας υπαρχόντων εμβολίων και των συνθηκών αποθήκευσης και μεταφοράς τους σε χώρες απομακρυσμένες από τον τόπο παρασκευής. Είναι σημαντικό ωστόσο να γνωρίζουμε ότι η Συνθετική Βιολογία έχει ευρύτατο φάσμα εφαρμογών, συμβάλλοντας όχι μόνο στην αντιμετώπιση ιικών λοιμώξεων, αλλά και στην αντιμετώπιση του καρκίνου, καθώς και στην υγιή γήρανση.

ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ−6 : Ο ιός SARS-CoV-2 ως ζωονόσος: η φυσική προέλευσή του και η δυναμική της δευτερογενούς μετάδοσής του σε ζώα

Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Συντονιστής
John Halley
Καθηγητής, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Η πανδημία μέσα από το πρίσμα της εξελικτικής οικολογίας

John Halley
Καθηγητής, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Οι μικροοργανισμοί που προκαλούν ασθένειες και αναφέρονται ως «παθογόνα» αποτελούν σημαντικό στοιχείο της βιοποικιλότητας και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο, όχι μόνο σε σχέση με τη δική τους ποικιλομορφία αλλά και στον τρόπο με τον οποίο διαμορφώνουν την δομή των οικοσυστημάτων. Το κυρίαρχο χαρακτηριστικό των «παθογόνων» είναι η ταχύτητα της εξέλιξής τους: Αυτή η διαφορά στην ταχύτητα (περίπου 100.000) ευνοεί τα μικροπαράσιτα. Για αυτό πιστεύουμε πως η «αντιπαράθεση» μικροπαρασίτων-ανώτερων οργανισμών οδήγησε στην «εφεύρεση» της σεξουαλικής αναπαραγωγής (που σημαίνει αύξηση της ποικιλομορφίας των γενοτύπων εντός του είδους, καθιστώντας έτσι δυσκολότερο το έργο των παρασίτων στην προσπάθειά τους να κυριαρχήσουν πάνω στους ξενιστές τους), στην αύξηση της βιοποικιλότητας (που θέτει ένα επιπλέον πρόβλημα στα παθογόνα, δηλαδή την ανάγκη να μεταπηδούν από είδος σε είδος) και στην ανομοιόμορφη κατανομή των πληθυσμών στο χώρο (αναγκάζοντας έτσι τα μικρόβια να υπερβούν και γεωγραφικά εμπόδια). Έτσι, η εμφάνιση όσο και η εξέλιξη πολλών ασθενειών δεν μπορούν να διαχωριστούν από τον οικολογικό τους ρόλο και την οικολογική τους προέλευση. Σε αυτό το στρογγυλό τραπέζι, κοιτάζουμε πως οι οικολογικοί ρόλοι έχουν παίξει σημαντικό ρόλο στην προέλευση και εξάπλωση του SARS-CoV-2.

SARS-CoV-2 και ζώα

Κωνσταντίνος Σ. Κυριάκης
Department of Pathobiology, College of Veterinary Medicine, Auburn University, USA
Center for Vaccines and Immunology, University of Georgia, Athens, GA, USA

Οι κορονοϊοί είναι οικογένεια ιών RNA, που προκαλούν λοιμώξεις σε θηλαστικά και πτηνά. Η ανάδυση του SARS-CoV-1 το 2003 αποτέλεσε σοβαρή προειδοποίηση πως κορονοϊοί προερχόμενοι από ζώα θα μπορούσαν να προκαλέσουν πανδημία στον άνθρωπο. Αυτό το σενάριο επιβεβαιώθηκε με την ανάδυση του SARS-CoV-2 και της πανδημίας COVID-19. Αν και μέχρι σήμερα δεν έχει αποσαφηνιστεί η προέλευση του SARS-CoV-2, ιοί με εξαιρετικά υψηλή γενετική συγγένεια με τον νέο κορονοϊό συναντώνται σε διάφορα ήδη νυχτερίδων, που φαίνεται πως αποτέλεσαν τη δεξαμενή του ιού, πριν αυτός περάσει στον άνθρωπο. Ήδη κατά τους πρώτους μήνες της πανδημίας, η κοινή γνώμη του

πλανήτη ανησυχούσε για την πιθανότητα μετάδοσης του SARS-CoV-2 σε ζώα και στη συνέχεια από τα ζώα στον άνθρωπο. Μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί σποραδικά περιστατικά μετάδοσης του ιού από τον άνθρωπο σε κατοικίδια ζώα, αλλά ποτέ μαζική μετάδοση από κατοικίδια στον άνθρωπο. Αντίθετα, στην Ολλανδία, τη Δανία και αλλού, είχαμε μετάδοση του SARS-CoV-2 από τον άνθρωπο σε εκτρεφόμενα μινκ, που στη συνέχεια μεταλλάχθηκε και μεταδόθηκε πίσω στον άνθρωπο. Τέλος, φαίνεται πως από τις αρχές του 2021 έχουμε τη μετάδοση και κυκλοφορία της παραλλαγής Δέλτα σε ελάφια με λευκή ουρά στη Β. Αμερική, που μπορεί να αποτελέσουν δεξαμενή του ιού και ενδεχομένως πηγή λοιμώξεων για τον άνθρωπο.

Η προέλευση του SARS-CoV-2- τι γνωρίζουμε πλέον, τι πρέπει ακόμη να μάθουμε

Γιώργος Παππάς
Ινστιτούτο Διαρκούς Ιατρικής Εκπαίδευσης Ιωαννίνων

Η συνεχιζόμενη συζήτηση για την προέλευση του SARS-CoV-2 οφείλεται εν μέρει στην απουσία ανεύρεσης ενός ενδιάμεσου ξενιστή μεταξύ των νυχτερίδων και του ανθρώπου, ή ενός τεκμηριωμένου επεισοδίου άμεσης μετάδοσης από νυχτερίδα σε άνθρωπο.

Υπέρ της φυσικής προέλευσης του ιού συνηγορεί το γεγονός πως η πανδημία αποτελεί μία από τις πολλές περιπτώσεις spillover ζωονόσου, περιλαμβανομένων και των, συγγενών, κορωνοϊών SARS και MERS. Αντίστοιχα spillover στον άνθρωπο με άλλους κορωνοϊούς από νυχτερίδες τεκμηριώνονται βάσει αντισωμάτων και πριν την πανδημία. Η διακίνηση και οι αγορές άγριων ζώων, ιδιαίτερα ανεπτυγμένες στην Κίνα, αποτελούν γνωστό προδιαθεσικό παράγοντα σε ανάδυση ζωονόσων, νέων και μη. Μια τέτοια αγορά φαίνεται να αποτέλεσε την πηγή, ή τουλάχιστον τον αρχικό πολλαπλασιαστή, της κυκλοφορίας του ιού.

Το μόνο επιχείρημα υπέρ της μη-φυσικής προέλευσης του ιού που μπορεί να έχει βάση είναι η γεωγραφική σύμπτωση με την εμφάνιση στην πόλη όπου εδρεύει ιολογικό εργαστήριο με μακρά πορεία στην έρευνα κορωνοϊών, αλλά και με ιστορικό δημιουργίας χιμαιρικών ιών. Τα υπόλοιπα επιχειρήματα των υπερασπιστών της μη-φυσικής προέλευσης δεν ευσταθούν: ο ιός δεν ήταν "προσαρμοσμένος" στον άνθρωπο, άλλωστε εξελίχθηκε στην διάρκεια της πανδημίας, γινόμενος πολύ αποτελεσματικότερος. Ούτε υπήρξε μυστικότητα σχετικά με κάποια κρούσματα άγνωστου παθογόνου το 2012 σε ορυχείο- υπήρξαν σχετικές δημοσιεύσεις.

Το μείζον πρόβλημα παρέμεινε η κρυπτικότητα στην πληροφόρηση από το κινεζικό κράτος, με καθυστέρηση στην επιδημιολογική επιτήρηση ανθρώπων (εξ ου και ένα μεγάλο κενό στα αναφερόμενα κρούσματα τις αρχές του 2020), αλλά και ζώων που πωλούνταν στην αγορά- αρχικό επίκεντρο. Καθυστέρηση υπήρξε και στην δημόσια ανακοίνωση του γονιδιώματος αλλά και των χαρακτηριστικών μετάδοσης του ιού, σύμφωνα με μαρτυρίες συνεργαζόμενων επιστημόνων του εξωτερικού. Κρυπτικότητα υπήρξε και σχετικά με την σύγκρουση συμφερόντων ορισμένων μελών επιτροπών που

διερεύνησαν την προέλευση του ιού.

Η εξελικτική γονιδιωματική του SARS-CoV-2 και των συγγενικών του ιών

Σπύρος Λύτρας
Υποψήφιος διδάκτορας, MRC-University of Glasgow Centre for Virus Research, Γλασκώβη

Η πανδημία της νόσου COVID-19 συνέπεσε με την ανάπτυξη του πεδίου της μοριακής επιδημιολογίας και της δειγματοληψίας πολλών ιών ζώων, με αποτέλεσμα να υπάρχουν πια περίπου 15 εκατομμύρια γονιδιώματα του ιού SARS-CoV-2, καθώς και πάνω από 150 γονιδιώματα συγγενικών κορωνοϊών που έχουν συλλεχθεί σε νυχτερίδες και άλλα ζώα. Για την κατανόηση της προέλευσης αυτού του νέου κορωνοϊού στους ανθρώπους, είναι απαραίτητο να μελετήσουμε τη φυλογενετική του σχέση με τους γνωστούς ιούς ζώων. Ένα χαρακτηριστικό των κορωνοϊών είναι ο συνεχής ανασυνδυασμός μεταξύ των γονδιωμάτων τους, με αποτέλεσμα κάθε κομμάτι των γονιδιωμάτων να αντιπροσωπεύει μια διαφορετική εξελικτική ιστορία. Λαμβάνοντας υπόψιν το φαινόμενο του ανασυνδυασμού, υπολογίζουμε πως ο άμεσος κοινός πρόγονος του SARS-CoV-2 και των κοντινότερων συγγενικών ιών για κάποια κομμάτια του γονιδιώματος μεταδιδόταν σε ασιατικές νυχτερίδες πριν από μονάχα 5 χρόνια. Η ίδια ανάλυση αποδεικνύει πως έχουμε σχεδόν την ίδια χρονική και γεογραφική εικόνα για την προέλευση του πρώτου ιού SARS (SARS-CoV). Στοχευμένη δειγματοληψία νυχτερίδων στη νότια Κίνα και τις χώρες της Ινδοσινικής χερσονήσου μπορεί να μας φέρει ακόμα πιο κοντά στην προέλευση αυτών των κορωνοϊών, καθώς και να βοηθήσει στην αποτροπή αντίστοιχων μελλοντικών πανδημιών.

ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ−7 : Υπεύθυνη Έρευνα και Καινοτομία στις Βιοεπιστήμες

Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

Συντονιστής
Αλέξης Γαλάνης

Συνεργασία του Τμήματος Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής του ΔΠΘ με τη Β' Εκπαίδευση και τα σχολεία (γυμνάσια και λύκεια) του ν. Έβρου

Αλέξης Γαλάνης
Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

Βασικές αρχές Υπεύθυνης Έρευνα και Καινοτομίας στις Βιοεπιστήμες

Αγλαΐα Παππά
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

Η συμβολή της κοινωνίας των πολιτών στη βιολογική έρευνα για το περιβάλλον και τη βιοποικιλότητα

Αριστοτέλης Παπαγεωργίου
Καθηγητής, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

Η Υπεύθυνη Έρευνα και Καινοτομία (Responsible Research and Innovation - RRI) είναι μια προσέγγιση που προβλέπει και αξιολογεί τις πιθανές επιπτώσεις και τις κοινωνικές προσδοκίες σε σχέση με την Έρευνα & Καινοτομία, με στόχο την προώθηση του σχεδιασμού της ως βιώσιμη και χωρίς αποκλεισμούς. Η Υπεύθυνη Έρευνα και Καινοτομία προϋποθέτει ότι κοινωνικοί φορείς συνεργάζονται μαζί κατά τη διάρκεια της έρευνας και καινοτομίας προκειμένου να ευθυγραμμιστούν καλύτερα, τόσο οι διαδικασίες, όσο και τα αποτελέσματα, με τις αρχές, τις ανάγκες και τις προσδοκίες της κοινωνίας. Η RRI περιλαμβάνει την τήρηση υψηλών δεοντολογικών προτύπων για την έρευνα, τη διασφάλιση της ισότητας των φύλων στην επιστημονική κοινότητα, την επένδυση των υπευθύνων χάραξης πολιτικής με την ευθύνη αποφυγής των βλαβερών επιπτώσεων της καινοτομίας, τη συμμετοχή των κοινοτήτων που επηρεάζονται από την καινοτομία και τη διασφάλιση ότι διαθέτουν τις απαραίτητες γνώσεις για να κατανοήσουν τις επιπτώσεις της, μέσω της προώθησης της επιστημονικής εκπαίδευσης και της ανοικτής πρόσβασης. Στη στρογγυλή τράπεζα θα παρουσιαστούν οι βασικές αρχές Υπεύθυνης Έρευνα και Καινοτομίας με έμφαση στις Βιοεπιστήμες (εκπαίδευση, ανοικτή πρόσβαση, ηθική και ακεραιότητα, ισότητα των φύλων, συμμετοχή των πολιτών) και παραδείγματα όπως η συνεργασία του Τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής του ΔΠΘ με τη Δευτεροβάθμια Εκπαίδευση και τα σχολεία (γυμνάσια και λύκεια) του ν. Έβρου, και η συμβολή της κοινωνίας των πολιτών στη βιολογική έρευνα για το περιβάλλον και τη βιοποικιλότητα.

ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ−8 : Η Έρευνα στην εποχή της Γονιδιωματικής

Επιτροπή Τριτοβάθμιας Εκπαίδευσης και Έρευνας Π.Ε.Β.

Συντονίστρια

Αναστασία Χατζηδημητρίου

Διευθύντρια Ερευνών, Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών, Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης

Η αλληλούχηση νέας γενιάς στην ανακάλυψη νέων βιοδεικτών σε κακοήθειες

Θοδωρής Λούπης

Επιστημονικός Συνεργάτης ΙΙΒΕΑΑ

Η αλληλούχιση νέας γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS) αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα άλματα της μοριακής βιολογίας των τελευταίων ετών. Μείωσε δραματικά το κόστος και τον χρόνο που απαιτείται για την αλληλούχιση DNA και RNA μορίων, επιτρέποντας την ταυτόχρονη ανάλυση χιλιάδων έως και εκατομμυρίων αλληλουχιών, για έναν μεγάλο αριθμό δειγμάτων σε διάστημα ελάχιστων ημερών. Η τεχνολογία NGS, εξυπηρετεί ένα ευρύ φάσμα αναλύσεων, από την ανίχνευση γενετικών παραλλαγών μικρής ή μεγάλης κλίμακας και την έκφραση γονιδίων, μέχρι την μελέτη μη-κωδικών μορίων RNA, εναλλακτικών μεταγράφων γονιδίων, επιγενετικών τροποποιήσεων της χρωματίνης ή ακόμα και της τριτοταγούς της δομής.

Η εφαρμογή του NGS στην βασική και μεταφραστική έρευνα του καρκίνου έχει συμβάλλει ουσιαστικά στην κατανόηση του μοριακού τοπίου των κακοηθειών και των υποκείμενων παθογενετικών μηχανισμών που τις χαρακτηρίζουν. Παράλληλα, έχει οδηγήσει στην ανακάλυψη ενός σημαντικού αριθμού νέων μοριακών βιοδεικτών, η εφαρμογή των οποίων στην κλινική πράξη βοηθά σημαντικά στην διάγνωση κακοηθειών, την πρόγνωση της νόσου, της διαστρωμάτωση κινδύνου, την παρακολούθηση των ασθενών αλλά και την επιλογή στοχευμένων φαρμακευτικών αγωγών, οδηγώντας στην αποτελεσματικότερη θεραπευτική τους προσπέλαση.

Ωστόσο, οι μεθοδολογίες NGS εγείρουν ζητήματα που σχετίζονται με την πολυπλοκότητα και τον όγκο των δεδομένων που παράγονται, ενώ παρά τον μεγάλο αριθμό επιστημονικών δημοσιεύσεων που αναφέρονται σε νέους βιοδείκτες, ελάχιστοι είναι αυτοί που τελικά εφαρμόζονται στην κλινική πράξη. Το γεγονός αυτό αναδεικνύει την ανάγκη για την αναζήτηση και ανάπτυξη κατάλληλων αναλυτικών εργαλείων και διαδικασιών, καθώς και την διενέργεια εκτεταμένων κλινικών μελετών, ικανών να υποστηρίξουν την εξαγωγή ισχυρών συμπερασμάτων, να προωθήσουν τη βιοϊατρική γνώση και να μας φέρουν ένα βήμα πιο κοντά στην Ιατρική Ακριβείας.

Δυναμική του συνδυαστικού μεταγραφικού ρυθμιστικού δικτύου και ενεργοποίηση της αιμοποίησης

Πέτρος Κολοβός
Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

Transcription factors are important to control developmental processes. Here we focus on the role of LDB1, TAL1 and GATA2/1 in early hematopoietic development. These transcription factors form the LDB1 complex which is present throughout life and during the entire process of hematopoietic development and differentiation. We performed functional studies at distinct stages of mouse hematopoiesis. We integrated multi-omic data to understand the regulatory roles of these transcription factors in developmental hematopoiesis. Our study provides new insights into how combinatorial actions and levels of transcription factors control a complex cell-developmental process, and we present a model that incorporates the transcription factors which drive the developmental lineage choice.

Η πρόκληση της διαχείρισης δεδομένων στην εποχή της γονιδιωματικής

Φώτης Ψωμόπουλος
Κύριος Ερευνητής, Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών, Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης

ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ−9 : Ο ρόλος, οι δυνατότητες και οι προοπτικές των βιολόγων στην διατήρηση και προστασία της βιοποικιλότητας και των οικοσυστημάτων.

Επιτροπή Περιβάλλοντος Π.Ε.Β.

Συντονίστρια
Μαρία Τσιαφούλη
ΕΔΙΠ, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Θαλάσσια οικοκεντρική διαχείριση

Αθανάσιος Τσίκληρας
Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Η αλιευτική εκμετάλλευση θεωρείται ιστορικά ως η υψηλότερη πίεση που ασκείται στους θαλάσσιους πληθυσμούς ψαριών και ασπόνδυλων αλλά και στα ενδιαιτήματά τους επηρεάζοντας συνολικά τη δομή και λειτουργία των θαλάσσιων οικοσυστημάτων, ενώ η υπεραλίευση είναι, σε παγκόσμιο επίπεδο, ο κύριος λόγος μείωσης των αποθεμάτων. Οι παραδοσιακές πρακτικές διαχείρισης της αλιείας και των θαλασσών ήταν (και παραμένουν σε πολλές περιοχές του κόσμου) ανθρωποκεντρικές με αποτέλεσμα να έχουν αποτύχει σε μεγάλο βαθμό να διατηρήσουν υγιή αποθέματα και οικοσυστήματα. Η επαγγελματική και ερασιτεχνική αλιεία επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό όλα τα επίπεδα βιολογικής οργάνωσης στη θάλασσα ενώ οι υπόλοιπες ανθρωπογενείς δράσεις (τουρισμός, ναυτιλία, οικιστική ανάπτυξη, εξορύξεις, ανεμογεννήτριες) συμπεριλαμβανομένης της κλιματικής αλλαγής πιέζουν ακόμη περισσότερο τα θαλάσσια οικοσυστήματα. Συνεπώς, χρειάζεται μια στροφή από την ανθρωποκεντρική θεώρηση των θαλάσσιων πληθυσμών και οικοσυστημάτων σε μια οικοκεντρική διαχείριση τόσο της αλιείας όσο και των θαλάσσιων οικοσυστημάτων γενικότερα. Για να επιτευχθεί αυτό το φιλόδοξο σχέδιο της αποκατάστασης της δομής και λειτουργίας των θαλάσσιων οικοσυστημάτων, των βιώσιμων αλιευτικών πρακτικών και της ισορροπίας μεταξύ διατροφικής ασφάλειας και υγείας των θαλασσών απαιτείται μια αποτελεσματική, διεπιστημονική, οικοσυστημική προσέγγιση στη διαχείριση. Η οικοσυστημική προσέγγιση στη διαχείριση είναι εξ ορισμού διεπιστημονική καθώς βασίζεται σε επιστημονικά δεδομένα που εμπεριέχουν πολλά πεδία των θαλασσίων βιο-επιστημών (βιολογία, ωκεανογραφία, βιοστατιστική, αλιεία), άλλων φυσικών επιστημών (φυσική, χημεία, οικολογία) αλλά και οικονομικών και κοινωνικών επιστημών. Μια από τις σημαντικότερες προκλήσεις της οικοκεντρικής διαχείρισης είναι ο συνδυασμός ετερόκλιτων συνόλων δεδομένων σε κοινή μορφή που θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν από οικοσυστημικά μοντέλα για την εξέταση σεναρίων διαχείρισης υπό το πρίσμα της κλιματικής αλλαγής και αβεβαιότητας.

Η διαχείριση των Προστατευόμενων Περιοχών μέσα από τα μάτια μιας βιολόγου

Λυδία Αλβανού
Βιολόγος MSc, PhD Εθνικό Πάρκο Δέλτα Αξιού-Λουδία-Αλιάκμονα ΜΔΠΠ Κεντρικής Μακεδονίας

Οι Προστατευόμενες Περιοχές (ΠΠ), η ραχοκοκαλιά της διατήρησης των οικοσυστημάτων και της βιοποικιλότητας, καλύπτουν το 24% της επιφάνειας του πλανήτη και επιβάλλεται να τις διαχειριζόμαστε αποτελεσματικά, γιατί έτσι μόνο διασφαλίζεται ο φυσικός πλούτος και η ευημερία των τοπικών κοινωνιών. Ωστόσο, στο πλαίσιο της περιβαλλοντικής τους διαχείρισης προκύπτουν καθημερινά πιέσεις ή δυνάμει απειλές για τους οικοτόπους και τα είδη ως αποτέλεσμα των ποικίλων ανθρωπογενών δραστηριοτήτων. Πώς οι απειλές αυτές θα μετατραπούν σε ευκαιρίες; Πώς θα πειστεί η τοπική κοινωνία και οι χρήστες ότι η περιφρούρηση του φυσικού κεφαλαίου δεν οδηγεί σε οικονομική απώλεια αλλά, αντιθέτως, προσδίδει προστιθέμενη αξία σε προϊόντα και υπηρεσίες; Οι διαχειριστές των ΠΠ (site managers) με εργαλεία τις διεθνείς συμβάσεις, την ενωσιακή και εθνική περιβαλλοντική νομοθεσία και πολιτική, εφαρμόζουν δράσεις παρακολούθησης, προστασίας-αποκατάστασης, ενημέρωσης-ευαισθητοποίησης και γνωμοδοτούν για σχεδιαζόμενες δραστηριότητες ή προτεινόμενα έργα συνεκτιμώντας τις πιθανές επιπτώσεις τους στα προστατευτέα αντικείμενα εισηγούμενοι ρυθμίσεις, περιορισμούς και περιβαλλοντικούς όρους. Ποιες είναι άραγε οι γνώσεις και δεξιότητες που πρέπει να αναζητάμε σε έναν ικανό και αποτελεσματικό site manager;

Από τη διατήρηση στην αειφορική αξιοποίηση αυτόχθονων φυτών της Ελλάδας: Εμπειρίες, προκλήσεις και ευκαιρίες

Νικόλαος Κρίγκας
Δρ. Βιολογίας, Εντεταλμένος Ερευνητής, Ινστιτούτο Γενετικής Βελτίωσης και Φυτογενετικών Πόρων, Ελληνικός Γεωργικός Οργανισμός Δήμητρα

Επισκοπείται το παγκόσμιο ενδιαφέρον (επιστημονικό, τουριστικό, εμπορικό) για τα αυτόχθονα και τα ενδημικά φυτά της Ελλάδας και συνοψίζεται η διασπορά των ελληνικών ενδημικών φυτών σε τράπεζες γενετικού υλικού και βοτανικούς κήπους ανά την υφήλιο, αλλά και εξαιτίας της ανεξέλεγκτης διαδικτυακής πώλησής τους από εξειδικευμένα εμπορικά φυτώρια του εξωτερικού. Διευκρινίζοντας το τοπίο σχετικά με τους νόμιμους πάροχους Ελληνικών Φυτογενετικών Πόρων (ΕΦΠ) σύμφωνα με την Οδηγία 511/2014 (Κύρωση Πρωτοκόλλου Ναγκόγια), προσδιορίζονται τα υπάρχοντα κενά αλλά και εναπομένουσες ευκαιρίες αποκλειστικής δυνατότητας αξιοποίησης των ΕΦΠ. Στη σύγχρονη εποχή, οι ΕΦΠ συχνά γίνονται αντικείμενο ληστρικής εκμετάλλευσης, ενώ ταυτόχρονα επιβάλλεται η αποτελεσματική επιτόπια διατήρησή τους, ειδικά όσων απειλούνται με εξαφάνιση ή/και ενδημούν αποκλειστικά στην Ελλάδα. Η εκτός τόπου διατήρηση με ιεράρχηση προτεραιοτήτων και ταυτόχρονη απόκτηση γνώσεων σχετικά με την αναπαραγωγή, εγκλιματισμό και καλλιέργεια των ΕΦΠ μπορεί να συμβάλλει τόσο στην επαναφορά επιλεγμένου υλικού στο φυσικό περιβάλλον (εφόσον χρειαστεί) όσο

και να επιτρέψει την αειφορική αξιοποίησή τους.

Ο ρόλος των μεγάλων θηλαστικών στη διατήρηση της βιοποικιλότητας – η περίπτωση της καφέ αρκούδας

Γιώργος Μερτζάνης
Δρ. Βιολογίας - Ζωολογίας / Επιστημονικός Υπεύθυνος Καλλιστώ

Η καφέ αρκούδα (*Ursus arctos*) ως μεγάλο θηλαστικό θεωρείται εδώ και (4) δεκαετίες από την διεθνή επιστημονική κοινότητα ως είδος «ομπρέλα» (umbrella species). Τα είδη αυτά επιλέγονται ως αντιπροσωπευτικά ενός οικοσυστήματος κυρίως όταν εκπονούνται σχέδια διατήρησης. Προστατεύοντας αυτούς τους οργανισμούς, άλλα είδη που αποτελούν μέρος της ίδιας βιοκοινότητας θα επωφεληθούν επίσης κάτω από την ίδια «ομπρέλα» διατήρησης. Ένα είδος «ομπρέλα» επιλέγεται συνήθως για να διευκολύνει τις στρατηγικές διατήρησης του οικοσυστήματος σε περιοχές όπου υπάρχει μεγάλος αριθμός ειδών που βρίσκονται σε οριακή θέση από άποψη διατήρησης ή όπου η πραγματική βιοποικιλότητα ενός οικοσυστήματος δεν είναι πλήρως γνωστή. Οι βιολογικές παράμετροι και οι οικολογικές λειτουργίες που χαρακτηρίζουν την καφέ αρκούδα (*Ursus arctos*) σε ότι αφορά τον ετήσιο κύκλο του είδους όπως: ποικιλομορφία χωροκράτειας, τροφοληψία/ζωοχωρία, χρήση αδιατάρακτων κατατμημάτων του δασικού ενδιαιτήματος συνδέονται ταυτόχρονα με ένα ευρύ φάσμα οργανισμών και λειτουργιών της βιοκοινότητας και των οικοσυστημάτων στα οποία διαβιεί η καφέ αρκούδα στην Ελλάδα.

ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ−10 : Επαγγελματικά Δικαιώματα Βιολόγων
Π.Ε.Β. & Πανεπιστημιακά Τμήματα

Συντονιστής

Ζαχαρίας Σκούρας
Ομότιμος Καθηγητής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Πρόεδρος ΟΕ

Απόστολος Βανταράκης
Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πρόεδρος Πανελλήνιας Ένωσης Βιοεπιστημόνων

Μηνάς Γιάγκου
Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Βιολογίας Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Αριστείδης Παρμακέλης
Αναπληρωτής Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Βιολογίας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Πέτρος Μαραγκός
Αναπληρωτής Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Δημήτριος Καρπούζας
Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Στέφανος Νταϊλιάνης
Αναπληρωτής Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών

Κρίτων Καλαντίδης
Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Γιάννης Τοκατλίδης
Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

Συζητήθηκαν θέματα που αφορούσαν το μέλλον των Βιολογικών Τμημάτων, το μέλλον των αποφοίτων τους, τα επαγγελματικά δικαιώματα των Βιολόγων και Βιοεπιστημόνων καθώς και διασύνδεση των Βιολογικών Τμημάτων με την Πανελλήνια Ενωση Βιοεπιστημόνων

ΑΝΟΙΧΤΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ : Βιοηθική και Βιολογία

Συντονιστής
Κώστας Μπλιάτκας
Δημοσιογράφος, Συγγραφέας, Βιολόγος

Χρύσα Αράπογλου
Δημοσιογράφος, Βιολόγος

Ελισάβετ Συμεωνίδου-Καστανίδου
Καθηγήτρια Νομικής Σχολής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκη

Απόστολος Βανταράκης
Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πρόεδρος Πανελλήνιας Ένωσης Βιοεπιστημόνων

Ζαχαρίας Σκούρας
Ομότιμος Καθηγητής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Πρόεδρος ΟΕ

Στην ανοιχτή συζήτηση αναλύθηκαν τα παρακάτω τρία θέματα:

1. Αντιμετώπιση αυξανόμενων ηθικών, νομικών και κοινωνικών προκλήσεων που δημιουργούνται από τα μεγάλα δεδομένα στην Εξατομικευμένη Ιατρική.

Αναμφίβολα οι βάσεις μεγάλων δεδομένων στον τομέα της Υγείας μπορούν να συντελέσουν καθοριστικά τόσο στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων και ιατροτεχνολογικών προϊόντων ή μεθόδων προς όφελος της θεραπείας και της πρόληψης, όσο και στον εξορθολογισμό των οικονομικών και ευρύτερα της δημόσιας πολιτικής για την Υγεία. Η ωφέλεια αυτή, ωστόσο, φαίνεται να μετριάζεται από κινδύνους που προκύπτουν στο επίπεδο της αυτονομίας και των εγγυήσεων της ιδιωτικότητας των υποκειμένων αυτών των ευαίσθητων πληροφοριών. Προς την κατεύθυνση αυτή, η Επιτροπή διαμόρφωσε συγκεκριμένες προτάσεις για τη χρήση των μεγάλων δεδομένων στην υγεία. Η ανάπτυξη εφαρμογών ιατρικής ακριβείας ανταποκρίνεται αναμφισβήτητα στην εξυπηρέτηση τόσο του κοινωνικού όσο και του ατομικού δικαιώματος στην Υγεία. Ωστόσο, είναι αναγκαίο να προσεχθούν ζητήματα που προκύπτουν κατά την εφαρμογή της ιατρικής ακριβείας ως προς την επεξεργασία μεγάλου όγκου ευαίσθητων δεδομένων (γενετικών, ιατρικών, τρόπου ζωής) και τη συλλογή βιολογικών δειγμάτων. Ως προς το δεύτερο, η Επιτροπή κρίνει ότι είναι ορθότερη η θέσπιση ειδικής σχετικής νομοθεσίας. Τέλος, λαμβάνοντας υπόψη το κόστος που συνεπάγεται η ανάπτυξη του εγχειρήματος της ιατρικής ακριβείας, η Επιτροπή επισημαίνει ότι η επένδυση πόρων από τον τομέα της Υγείας, δεν πρέπει να γίνεται επιλεκτικά. Πρέπει να τεκμηριώνεται με βάση αντικειμενικά κριτήρια, π.χ. επένδυση κατά προτεραιότητα για ασθένειες που αφορούν μεγάλο αριθμό προσώπων στον γενικό πληθυσμό – συμπεριλαμβανομένων των σπάνιων παθήσεων- με την προοπτική βέβαια της σταδιακής κάλυψης όλων των ασθενειών.

2. Αντιμετώπιση των ηθικών, νομικών και κοινωνικών ζητημάτων που τίθενται από τις νέες τεχνολογίες επεξεργασίας γονιδίων.

Μία από τις μεγαλύτερες γενετικές τεχνολογίες που ανακαλύφθηκαν είναι το CRISPR-Cas 9, ένα εργαλείο που μπορεί να αλλάξει το DNA στα κύτταρά μας. Η διαδικασία περιλαμβάνει την αποκοπή κακών γονιδίων στα κύτταρα ή την εισαγωγή καλύτερων. Υπάρχουν όμως κίνδυνοι. Συγκεκριμένα γονίδια που μπορεί να αυξήσουν την πιθανότητα μιας ασθένειας μπορούν να σας προστατεύσουν από άλλες ασθένειες, πράγμα που σημαίνει ότι η αφαίρεση τέτοιων γονιδίων δεν εξαλείφει όλες τις αλλαγές της εμφάνισης μιας ασθένειας. Επιπλέον, η επεξεργασία γονιδίων θα μπορούσε επίσης να οδηγήσει σε λάθη, όπως η απόσπαση τμημάτων του λάθος γονιδίου και ο κίνδυνος περαιτέρω βλαβών στην υγεία.

3. Παροχή ελάχιστου επιπέδου υγειονομικής περίθαλψης και μείωση των ανισοτήτων στον τομέα της υγείας παγκοσμίως.

Το μέσο προσδόκιμο ζωής παγκοσμίως έχει αυξηθεί κατά 20 χρόνια τις τελευταίες πέντε δεκαετίες, αλλά οι υπανάπτυκτες χώρες έχουν μείνει πίσω και υπάρχει έλλειψη ηθικού πλαισίου για την αντιμετώπιση αυτού του ζητήματος. Οι παγκόσμιοι και οι εθνικοί παράγοντες είναι ηθικά υπεύθυνοι για την επίτευξη κοινών στόχων που θα αντιμετωπίσουν αυτήν την παγκόσμια ανισότητα στην υγεία. Εκτείνεται πέρα από ένα θέμα υγείας. Είναι επίσης ένα παγκόσμιο ζήτημα ειρήνης, ένα παγκόσμιο ζήτημα ασφάλειας και ένα οικονομικό ζήτημα. Για παράδειγμα, εάν οι επιδημίες μαίνεται εκτός ελέγχου σε μέρη της Αφρικής, αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει σε διεθνή πολιτική αστάθεια, οικονομική αστάθεια κ.λπ.

ΙΙΙ.ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

ΣΥΝΕΔΡΙΑ 1

ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΕΣ

Δροσοπούλου Ελένη,
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Αντωνοπούλου Ευθυμία,
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Δημιουργία στελεχών γενετικού διαχωρισμού φύλου σε έντομα της οικογένειας Tephritidae

ΣΠΑΝΟΜΗΤΡΟΥ Αντωνία[1], ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ Γεώργιος[1], ΜΑΤΘΙΟΠΟΥΛΟΣ Κωνσταντίνος[1]
[1]*Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, 41500, Ελλάδα*
anspana@gmail.com, geopap@uth.gr, kmathiop@bio.uth.gr

Περίληψη
Τα Tephritidae είναι έντομα μεγάλης οικονομικής σημασίας λόγω των ευρύτατων καταστροφών που προκαλούν σε πλήθος φρούτων και λαχανικών. Φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος ελέγχου είναι η μέθοδος του στείρου εντόμου (SIT), όπου μεγάλες ποσότητες αρσενικών εντόμων στειρώνονται, απελευθερώνονται στον αγρό και ζευγαρώνουν με άγρια θηλυκά. Έτσι, η ωοαπόθεση στείρων αυγών οδηγεί στη μείωση του φυσικού πληθυσμού. Η εξαπόλυση μόνο αρσενικών βελτιώνει εξαιρετικά την αποτελεσματικότητα της SIT καθότι τα θηλυκά, αν και στείρα, εξακολουθούν να ανταγωνίζονται για ζευγάρωμα και να προκαλούν βλάβη στον καρπό με την ωοαπόθεση. Η παρούσα έρευνα στοχεύει στη δημιουργία στελέχους γενετικού διαχωρισμού φύλου στη Μεσογειακή μύγα μέσω της μοντελοποίησης, σχεδιασμού και δημιουργίας θερμοευαίσθητων μεταλλάξεων στο αυτοσωμικό γονίδιο *shibire* και μεταφοράς του αγρίου τύπου του γονιδίου στο Υ χρωμόσωμα των αρσενικών. Το αποτέλεσμα θα είναι η θανάτωση των θηλυκών ατόμων σε υψηλή θερμοκρασία, ενώ τα αρσενικά που θα φέρουν το αγρίου τύπου γονίδιο θα επιβιώνουν.

Λέξεις κλειδιά: SIT, Μεσογειακή μύγα, θερμοευαίσθητες μεταλλάξεις, ορθολογικός σχεδιασμός, CRISPR.

Εισαγωγή
Η διαπίστωση της αποτελεσματικότητας της εφαρμογής της SIT με την εξαπόλυση μόνο αρσενικών ατόμων, οδήγησε στη δημιουργία στελεχών γενετικού διαχωρισμού φύλου ήδη από τη δεκαετία του 1970 (Knipling 1955). Τα πλέον επιτυχημένα SIT στελέχη διαχωρισμού φύλου στη μύγα της Μεσογείου στηρίζονται στους γενετικούς δείκτες *white pupae (wp)* και *temperature-sensitive lethal (tsl)* (Fisher & Caceres 2000; Franz 2005). Τα στελέχη αυτά έχουν ως αποτέλεσμα αρσενικά άτομα αγρίου φαινοτύπου και θηλυκά άτομα λευκού χρώματος προνυμφών και συγχρόνως ευαίσθητων (δηλαδή θανατώνονται) σε λίγο ψηλότερη θερμοκρασία εκτροφής (29°C αντί 25°C). Τα στελέχη αυτά δημιουργήθηκαν με χημική μεταλλαξιγένεση και μετέπειτα μετατόπιση των άγριων αλληλομόρφων στο Υ χρωμόσωμα. Μόλις πρόσφατα, έπειτα από εκτεταμένες κυτταρογενετικές, γονιδιωματικές και μοριακές προσεγγίσεις, κατέστη δυνατός ο εντοπισμός του γονιδίου *wp* και η υπεύθυνη μετάλλαξη του φαινοτύπου της άσπρης προνύμφης (Ward et al., 2021). Αντίθετα, προσπάθειες που έχουν γίνει για την εύρεση του γονιδίου υπεύθυνο για τον *tsl* φαινότυπο έχουν αποτύχει.

Στη *D. melanogaster* μεταλλάξεις στο γονίδιο *shibire* συχνά οδηγούν σε θερμοευαίσθητους φαινότυπους αντίστοιχους με αυτόν του *tsl* (van der Bliek et al., 1991). Προκειμένου να παρακαμφθεί η χρονοβόρα και αμφιβόλου κατάληξης ταυτοποίηση του *tsl* γονιδίου, στην παρούσα έρευνα επιχειρούμε την αναδημιουργία θερμοευαίσθητων μεταλλάξεων του *shibire* στη μύγα της Μεσογείου, κατ' αντιστοιχία με εκείνες της *D. melanogaster*. Με τον τρόπο αυτό, η ταυτοποίηση ενός δεύτερου γενετικού δείκτη και ο συνδυασμός του με τον δείκτη του *wp* θα οδηγήσει στην δημιουργία σταθερών στελεχών διαχωρισμού φύλου, όμοιων με τα προαναφερθέντα.

Ορισμένες μεταλλάξεις του γονιδίου *shibire* στη *D. melanogaster* προκαλούν θανάτωση των προνυμφών σε θερμοκρασίες λίγο υψηλότερες (29°C) από τη θερμοκρασία εκτροφής της (25°C). Πιο συγκεκριμένα, η μετάλλαξη shi^{ts1} είναι μία σημειακή μετάλλαξη που οδηγεί στην αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου G15895417 σε A που έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή του αμινοξέος Gly268 σε Asp (Grigliatti et al., 1973) Το αντίστοιχο ορθόλογο γονίδιο υπάρχει στη Μεσογειακή μύγα και μάλιστα με πολύ υψηλή ομοιότητα (92%). Θεωρητικά, οι αντίστοιχες μεταλλάξεις θα πρέπει να έχουν τον ίδιο

φαινότυπο και στη Μεσογειακή μύγα και αυτός ήταν ο αρχικός μας στόχος. Όμως, η αναδημιουργία της αντίστοιχης μετάλλαξης *shi*^{ts1} στην Αυστραλιανή μύγα *Bactrocera tryoni* δεν είχε τον επιθυμητό φαινότυπο. Αντιθέτως, η μετάλλαξη αυτή αποδείχτηκε θανατογόνος, ακόμη και σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (21° C) και από τη θερμοκρασία εκτροφής (25° C) του εντόμου (Choo A et al., 2020), γεγονός που την καθιστά άχρηστη σε συνθήκες μαζικής εκτροφής και εκμετάλλευσης στην SIT.

Μεθοδολογία

1. Για να αποφευχθεί ένα αντίστοιχο αποτέλεσμα και στην περίπτωση της μύγας της Μεσογείου, προηγήθηκε μια προκαταρκτική σύγκριση της GTP επικράτειας (όπου βρίσκεται η *shi*^{ts1} μετάλλαξη) με τη βοήθεια υπολογιστικών μοντέλων των πρωτεϊνών *D. melanogaster* και *B. tryoni*, έτσι ώστε να εντοπίσουμε τις δομικές διαφορές που οδηγούν στον διαφορετικό φαινότυπο. Στη συνέχεια, έγινε μοντελοποίηση της Shibire πρωτεΐνης και στη *C. capitata*, προκειμένου να προβλεφθεί ο φαινότυπος της μετάλλαξης *Ccshi*^{ts1}, βάσει των δομικών ομοιοτήτων με τις δομικές αλλαγές των πρωτεϊνών της Shibire *D. melanogaster* ή της *B. tryoni*.
2. Με βάση τα αποτελέσματα των παραπάνω αναλύσεων σχεδιάζονται νέες μεταλλάξεις στο γονιδίωμα της *C. capitata*. Οι αντίστοιχες πρωτεΐνες της *C. capitata* με τις μεταλλάξεις αυτές θα αναλυθούν μεμονωμένα, και θα συγκριθούν δομικά μοντέλα των Shibire και των *B. tryoni* Shibire.
3. Έπειτα, θα γίνει εισαγωγή των μεταλλάξεων που προβλέπουν τον επιθυμητό φαινότυπο βάσει των υπολογιστικών μοντέλων στο γονιδίωμα της *Ceratitis capitata* μέσω CRISPR/Cas9 Homology Directed Repair.
4. Τέλος, προβλέπεται μεταφορά του αγρίου αλληλομόρφου *shibire* στο Y χρωμόσωμα ώστε να δημιουργηθεί λειτουργικό και εύχρηστο στέλεχος γενετικού διαχωρισμού φύλου (GSS, Genetic Sexing Strain).

Προκαταρκτικά αποτελέσματα

Μέχρι στιγμής έχουν πραγματοποιηθεί:

1. Ανάλυση της GTP επικράτειας της *D. melanogaster* αγρίου τύπου (χωρίς την μετάλλαξη) της GTP επικράτειας της *D. melanogaster* με την μετάλλαξη *shi*^{ts1} στις θερμοκρασίες 25°C και 29°C (4 μοντέλα).
2. Ανάλυση της GTP επικράτειας της *B. tryoni* αγρίου τύπου (χωρίς την μετάλλαξη) της GTP επικράτειας της *B. tryoni* με την μετάλλαξη *shi*^{ts1} στις θερμοκρασίες 25°C και 21°C (4 μοντέλα).
3. Ανάλυση της GTP επικράτειας της *C.capitata* αγρίου τύπου (χωρίς την μετάλλαξη) της GTP επικράτειας της *C.capitata* με την μετάλλαξη *shi*^{ts1} στις θερμοκρασίες 25°C και 21°C (4 μοντέλα).

Η μελέτη αυτή ανέδειξε τη δημιουργία ενός συγκεκριμένου υδρογονικού δεσμού σε όλα τα έντομα που εμφανίζουν θανατογόνο φαινότυπο (*D. melanogaster shi*^{ts1} 29°C, *B. tryoni shi*^{ts1} 25°C και 21°C). Ο δεσμός αυτός υπάρχει και στα μοντέλα της *C. capitata* GTP επικράτειας της με την μετάλλαξη *shi*^{ts1} στις θερμοκρασίες 21°C και 25. °C. Αυτό ίσως δείχνει ότι η *shi*^{ts1} δεν θα είναι μια επιτυχημένη μετάλλαξη, καθώς εμφανίζει δομικές ομοιότητες με τα μοντέλα της *B. tryoni* και όχι με αυτά της *D. melanogaster* στις θερμοκρασίες 25°C και 29°C. Αυτό μένει να επιβεβαιωθεί και εργαστηριακά.

Συμπέρασμα

Από τις δομικές αλλαγές που προκύπτουν και από τα προκαταρτικά αποτελέσματα έγινε μία αρχική πρόβλεψη για τον φαινότυπο στην *C. capitata* που μένει να αποδειχτεί και εργαστηριακά. Έτσι, θα διαπιστωθεί αν μέσω της μοντελοποίησης και του ορθολογικού σχεδιασμού μεταλλάξεων είναι εφικτό να προβλέπουμε τον φαινότυπο μιας μετάλλαξης και να δημιουργήσουμε εκείνη που θα μας δώσει τον επιθυμητό φαινότυπο θερμοευαισθησίας. Μακροπρόθεσμα, η εύρεση τέτοιων μεταλλάξεων και η μεταφορά τους στο Y χρωμόσωμα θα οδηγήσει στη δημιουργία αποτελεσματικών στελεχών γενετικού διαχωρισμού φύλου σε διάφορα έντομα για την μέθοδο SIT.

Βιβλιογραφία

Choo A et al., Precise single base substitution in the *shibire* gene by CRISPR/Cas9-mediated homology directed repair in *Bactrocera tryoni*. BMC Genet. 2020 Dec 18;21(Suppl 2):127. doi: 10.1186/s12863-020-00934-3.

Fisher & Caceres C (2000). *In* Area-wide control of fruit flies and other insect pests. Joint proceedings of the international conference on area-wide control of insect pests, 28 May-2 June, 1998 and the Fifth International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, Penang, Malaysia, 1-5 June, 1998, pp 543-550.

Franz G (2005) Genetic sexing strains in Mediterranean fruit fly, an example for other species amenable to large-scale rearing for the sterile insect technique. In *Sterile Insect Technique*, pp 427-451. Springer

Grigliatti TA, Hall L, Rosenbluth R et al. Temperature-sensitive mutations in Drosophila melanogaster. Molec Gen Genet 120**,** 107–114 (1973). https://doi.org/10.1007/BF00267238

Knipling. *Journal of Economic Entomology* **48**, 459-462 (1955).

Ward et al., (2021). White pupae phenotype of tephritids is caused by parallel mutations of a MFS transporter, NATURE COMMUNICATIONS (2021) 12:491 doi: 10.1038/s41467-020-20680-5.

Χαρακτηρισμός της γενετικής δομής και καταγωγής των ελληνικών φυλών προβάτων με χρήση της μικροσυστοιχίας OvineSNP50 GenotypingBeadChip

ΤΣΑΡΤΣΙΑΝΙΔΟΥ Βαλεντίνα[1,2], ΓΚΑΓΚΑΒΟΥΖΗΣ Κωνσταντίνος[1,2], ΤΣΑΛΚΙΤΖΙΔΟΥ Μαρία[1], ΜΟΥΛΙΣΤΑΝΟΣ Αριστοτέλης[1,2], ΚΑΡΑΪΣΚΟΥ Νικολέτα[1,2], ΒΟΥΡΑΚΗ Σωτηρία[1], ΑΡΓΥΡΙΑΔΟΥ Αγγελική[1], ΜΠΑΝΟΣ Γεώργιος[1,3], ΧΑΤΖΗΠΛΗΣ Δημήτρης[4], ΑΡΣΕΝΟΣ Γεώργιος[1], ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΙΔΗΣ Αλέξανδρος[1,2]

[1]Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Πανεπιστημιούπολη 54124, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα, tsarvale@bio.auth.gr, maria.tsalkitzidou@gmail.com, gagavou@bio.auth.gr, amoulist@bio.auth.gr, nikolbio@bio.auth.gr, svouraki@vet.auth.gr, argyrian@vet.auth.gr, arsenos@vet.auth.gr, atriant@bio.auth.gr
[2]Γονιδιωματική/Επιγενετική Ανάλυση και Μεταφραστική Έρευνα (GENeTres), Κέντρο Διεπιστημονικής Έρευνας και Καινοτομίας, Balkan Center 57001, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα
[3] Scotland's Rural College, Easter Bush, Midlothian EH25 9RG, UK, georgios.banos@sruc.ac.uk
[4] Διεθνές Πανεπιστήμιο της Ελλάδος, Σίνδος 57400, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα, chatz@ihu.gr

Περίληψη
Η εκτροφή των μικρών μηρυκαστικών αποτελεί σημαντική οικονομική δραστηριότητα της ελληνικής κτηνοτροφίας διαθέτοντας μία από τις πλουσιότερες γενετικές δεξαμενές από πολυάριθμες εγχώριες φυλές προβάτων. Η παρούσα μελέτη εστιάζει στον χαρακτηρισμό του γονιδιώματος ελληνικών φυλών προβάτου. Ένα σύνολο 1.008 προβάτων από 5 εγχώριες φυλές (Χίου, Φριζάρτα, Μπούτσκο, Μυτιλήνης, Πελαγονίας) γονοτύπηθηκε με την DNA μικροσυστοιχία OvineSNP50 Genotyping Bead Chip v2 και αναλύθηκε μαζί με διαθέσιμα δεδομένα από 38 φυλές προβάτου από όλο τον κόσμο (Sheep HapMap Project). Το γενετικό προφίλ των ελληνικών φυλών προβάτων φαίνεται πως έχει διαμορφωθεί από ποικίλες διεργασίες, όπως η γονιδιακή ροή μεταξύ ασιατικών και ευρωπαϊκών φυλών, η εντατικοποίηση των συστημάτων εκτροφής και η προσαρμογή στις τοπικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Επιπρόσθετα, η διαφοροποίηση των ατόμων σε επίπεδο φυλής ήταν χαρακτηριστική, υποδεικνύοντας την σημασία της γεωγραφικής καταγωγής της φυλής και την δυνατότητα ιχνηλασιμότητας της προέλευσης που μπορεί να συμβάλλουν στη δημιουργία γενετικής ταυτότητας.

Λέξεις-Κλειδιά
Φυλές, πρόβατο, DNA μικροσυστοιχίες, γενετικό προφίλ, καταγωγή

Εισαγωγή
Η δημιουργία των φυλών στα παραγωγικά ζώα είναι αποτέλεσμα μη τυχαίων διασταυρώσεων που συμβαίνουν εδώ και εκατοντάδες χρόνια εξασφαλίζοντας την βελτίωση των παραγωγικών χαρακτηριστικών τους σε συνδυασμό με προσαρμογή στις εκάστοτε τοπικές περιβαλλοντικές συνθήκες (Kijas et al. 2012). Η Ελλάδα διαθέτει μία από τις πλουσιότερες δεξαμενές ζωικών γενετικών πόρων στην περιοχή της Μεσογείου, λόγω της ιδιαίτερης γεωμορφολογίας, της γεωγραφικής θέσης και των διαδοχικών κυμάτων διασποράς των εξημερωμένων μικρών μηρυκαστικών με κατεύθυνση κυρίως από την Ασία προς την Ευρώπη (Mason 1967, Vigne 2011). Οι παγκόσμιες φυλές προβάτων έχουν μελετηθεί στο παρελθόν με σκοπό την κατανόηση της γενετικής ιστορίας και της εξέλιξης του είδους (Cianni et al. 2020, Kijas et al. 2012). Πρόσφατα, μία ειδο-ειδική DNA μικροσυστοιχία αναπτύχθηκε για τα πρόβατα με την επιλογή 52.152 απλών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) χρησιμοποιώντας περισσότερες από 75 διαφορετικές φυλές (Kijas et al. 2009). Παρόλο που η γενετική δομή και η ποικιλότητα των ελληνικών φυλών προβάτων έχει μελετηθεί με χρήση μικροδορυφορικών (Ligda et al. 2009, Loukovitis et al. 2016) και SNP δεικτών (Michailidou et al. 2018), η γενετική τους συγγένεια με τις παγκόσμιες φυλές καθώς και ο εκτενής χαρακτηρισμός των φυλών σε τοπικό επίπεδο δεν έχει διερευνηθεί. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της γενετικής δομής, της καταγωγής και της διαθέσιμης ποικιλότητας πέντε ελληνικών φυλών προβάτων.

Μέθοδοι

Απομόνωση DNA και γονοτύπηση

Το ολικό γενωμικό υλικό απομονώθηκε από δείγματα αίματος με το πρωτόκολλο της QIAamp DNA Mini and Blood Mini kit (QIAGEN, USA). Η ποιότητα και η συγκέντρωση των DNA δειγμάτων εκτιμήθηκε με την χρήση του φασματοφωτόμετρου Nanodrop και ο κατάλληλος όγκος μεταφέρθηκε σε πλάκες των 96 οπών. Η γονοτύπηση πραγματοποιήθηκε με την συστοιχία OvineSNP50 Genotyping BeadChip v2 (Illumina, Inc., U.S.) από την εταιρία Neogen (UK).

Δημιουργία γενετικής βάσης δεδομένων και ποιοτικός έλεγχος

Το σύνολο των 1.008 προβάτων που γονοτυπήθηκαν (Χίου=173, Φριζάρτα=367, Μπούτσκο=300, Μυτιλήνης=108, Πελαγονίας=60) ενσωματώθηκε σε κοινή βάση δεδομένων με 2.036 δημοσιευμένους γονοτύπους από 38 φυλές προβάτου (Kijas et al. 2012, Tsartsianidou et al. 2021). Στον ποιοτικό έλεγχο αφαιρέθηκαν οι φυλετικοί, μιτοχονδριακοί και μη χαρτογραφημένοι δείκτες χρησιμοποιώντας το λογισμικό PLINK v1.9 (Chang et al. 2015). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αφαίρεση των δεικτών που δεν έχουν γονοτυπηθεί σε ίσο ή μεγαλύτερο ποσοστό του 2% από το σύνολο των δειγμάτων και οι δείκτες με αλληλόμορφα συχνότητας μικρότερης του 2% (MAF) στο σύνολο της βάσης δεδομένων. Επιπλέον αφαιρέθηκαν τα άτομα με γονοτυπημένους δείκτες κάτω του 95%. Ακολούθως, ένα σύνολο 46.275 δεικτών παρέμειναν διαθέσιμοι προς ανάλυση για κάθε άτομο.

Ανάλυση κύριων συνιστωσών και προσμίξεων

Η πληθυσμιακή δομή μελετήθηκε με ανάλυση κύριων συνιστωσών όπου ένας πίνακας γονιδιωματικής συγγένειας δημιουργήθηκε, αναλύθηκε με χρήση του λογισμικού GEMMA (Zhou et al. 2012) και απεικονίστηκαν οι κύριες συνιστώσες. Επιπρόσθετα, μία ανάλυση προσμίξεων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού ADMIXTURE v1.3.0 (Alexander, Novembre & Lange 2009) με σκοπό την εύρεση της καταγωγής των ελληνικών φυλών.

Αποτελέσματα

Ανάλυση κύριων συνιστωσών

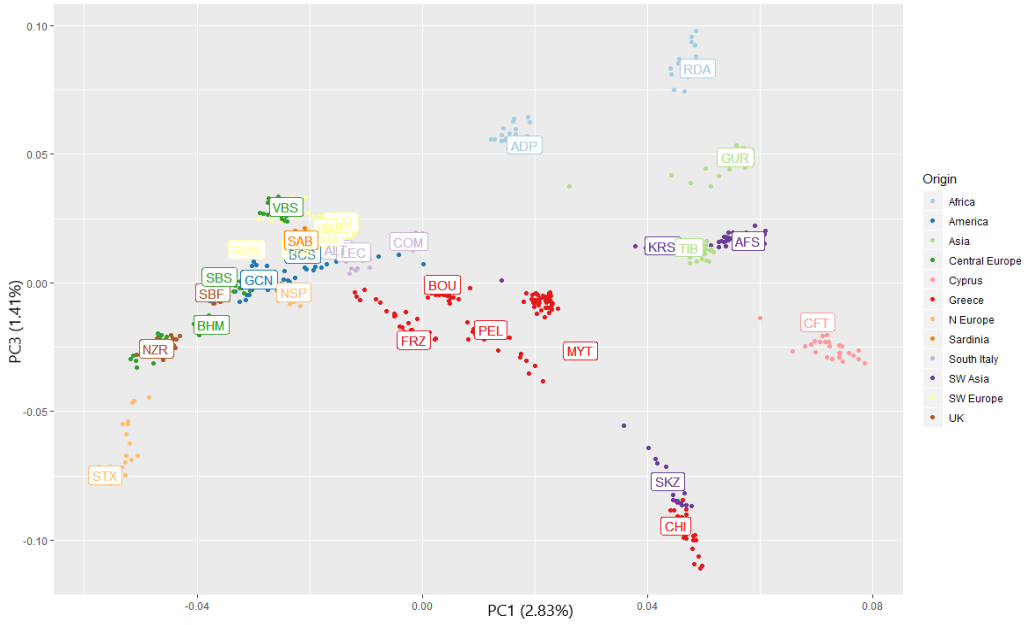
Η γενετική δομή του παγκόσμιου δείγματος προβάτων απεικονίζεται στην Εικόνα 1, φανερώνοντας μία ομαδοποίηση των φυλών με βάση την γεωγραφική προέλευση κάθε φυλής όπως έχει διαπιστωθεί και στο παρελθόν (Kijas et al. 2012, Naval-Sanchez et al. 2018). Οι ελληνικές φυλές διαφοροποιούνται επαρκώς και κατέχουν μία κεντρική, διακριτή θέση ανάμεσα στις Ασιατικές, Ευρωπαϊκές και Αφρικανικές φυλές.

Ανάλυση προσμίξεων

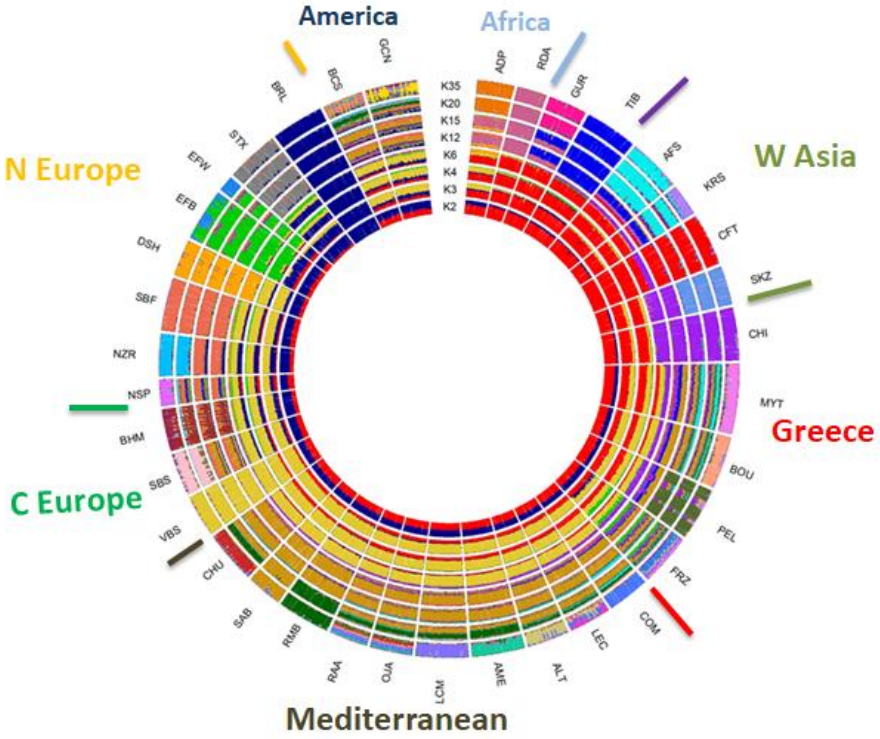
Τα αποτελέσματα της ανάλυσης προσμίξεων απεικονίζονται στην Εικόνα 2. Η Ασιατική και Ευρωπαϊκή γενετική καταγωγή είναι ευδιάκριτη για ένα υποθετικό αριθμό προγονικών πληθυσμών K=2 με διαφοροποίηση εντός ηπείρου σε μεγαλύτερες τιμές, όπως για παράδειγμα ο διαχωρισμός των φυλών της Μεσογείου για K=12. Ο βέλτιστος αριθμός προγονικών πληθυσμών αντιστοιχεί στον αριθμό 35, όπου οι φυλές χαρακτηρίζονται από μοναδική γενετική δομή με εξαίρεση δύο ισπανικές φυλές (OJA, RAA). Επιπρόσθετα, η φυλή Χίου διαφοροποιείται από τις υπόλοιπες τέσσερις ελληνικές φυλές.

Συμπεράσματα

Το γενετικό προφίλ των ελληνικών φυλών προβάτων φαίνεται πως έχει προκύψει από προγονικούς πληθυσμούς Ασιατικής και Ευρωπαϊκής προέλευσης σύμφωνα με τις αναλύσεις πληθυσμιακής δομής. Η γενετική δομή της ελληνικής φυλής Χίου διαφοροποιείται από τις υπόλοιπες τέσσερις ελληνικές φυλές που μελετήθηκαν λόγω καταγωγής από ασιατικές πλατύουρες φυλές και μετέπειτα γενετικής παρέκκλισης και επιλογής. Ο διαχωρισμός των ελληνικών φυλών επιτεύχθηκε με την χρήση της ειδο-ειδικής DNA μικροσυστοιχίας, παρέχοντας την δυνατότητα για ταυτοποίηση και επακόλουθη διαχείριση και διατήρηση των διαθέσιμων γενετικών πόρων.



Εικόνα 1. Ανάλυση κύριων συνιστωσών για τις παγκόσμιες φυλές προβάτων. Απεικονίζονται η πρώτη (άξονας χ) και η τρίτη κύρια συνιστώσα (άξονας ψ).



Εικόνα 2. Ανάλυση προσμίξεων των παγκόσμιων φυλών προβάτων για 2, 3, 4, 6, 12, 15, 20 και 35 (χαμηλότερη τιμή σφάλματος) προγονικούς πληθυσμούς.

Βιβλιογραφία

Alexander, D. H., Novembre, J. & Lange, K. (2009). Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Research*, 19, 1655-1664.

Ciani, E. et al., (2020). On the origin of European sheep as revealedby the diversity of the Balkan breedsand by optimizing population-genetic analysistools. *Genetics Selection Evolution*, 52, 25.

Chang, C. C et al. (2015) Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *GigaScience*, 4.

Kijas, J. W., et al. (2009). A genome wide survey of SNP variation reveals the genetic structure of sheep breeds. *PLoS One*, 4, e4668.

Kijas, J. W., et al. (2012). Genome-Wide Analysis of the World's Sheep Breeds Reveals High Levels of Historic Mixture and Strong Recent Selection. *PLoS Biology*, 10, e1001258.

Ligda, C., et al. (2009). Genetic analysis of Greek sheep breeds using microsatellite markers for setting conservation priorities. *Small Ruminant Research*, 83, 42-48.

Loukovitis, D., et al. (2016). Genetic diversity of Greek sheep breeds and transhumant populations utilizing microsatellite markers. *Small Ruminant Research*, 136, 238–242

Mason, I. L. (1967). *Sheep Breeds of the Mediterranean*. United Nations: Food and Agricultural Organization.

Michailidou, S., et al. (2018). Genomic diversity and population structure of three autochthonous Greek sheep breeds assessed with genome-wide DNA arrays. *Molecular Genetics and Genomics*, 293, 753-768.

Naval-Sanchez, et al. (2018). Sheep genome functional annotation reveals proximal regulatory elements contributed to the evolution of modern breeds. *Nature Communications*, 9, 859.

Tsartsianidou, V. et al. (2021). A comprehensive genome-wide scan detects genomic regions related to local adaptation and climate resilience in Mediterranean domestic sheep. *Genetics Selection Evolution*, 53, 90.

Vigne, J. D. (2011). The origins of animal domestication and husbandry: A major change in the history of humanity and the biosphere. *Comptes Rendus Biologies*, 334, 171-181.

Ευχαριστίες

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος SMARTER Horizon 2020 (772787, https://www.smarterproject.eu/).

Χαρακτηρισμός και Λειτουργική Ανάλυση Οσφρητικών Υποδοχέων της Μύγας της Μεσογείου

ΣΠΑΝΟΜΗΤΡΟΥ Αντωνία[1], ΠΑΠΑΔΟΥΛΗ Κλεοπάτρα[1], ΠΑΠΑΔΗΜΗΤΡΟΠΟΥΛΟΥ Αικατερίνη[1], ΓΑΪΤΑΝΙΔΗΣ Αλέξανδρος[2], ΣΚΟΥΛΑΚΗΣ Ευθύμιος[2], ΜΑΤΘΙΟΠΟΥΛΟΣ Κωνσταντίνος[1]

[1]*Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, 41500, Ελλάδα,* [2]*Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών, Αλέξανδρος Φλέμινγκ*

anspana@gmail.com, iamkleop@gmail.com, aikpapadim@uth.gr, Gaitanidis@fleming.gr, skoulakis@fleming.gr, kmathiop@bio.uth.gr

Περίληψη

Το οσφρητικό σύστημα διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στα έντομα, καθώς αναγνωρίζει και διακρίνει οσμές, οδηγώντας σε μια σειρά συμπεριφορών που σχετίζονται τόσο με τη σύζευξη όσο και με την εξεύρεση και αποδοχή των θέσεων ωοτοκίας. Η ωοαπόθεση, όμως, αποτελεί και τεράστια πηγή καταστροφών στην παραγωγή φρούτων και λαχανικών. Στην παρούσα έρευνα στοχεύουμε στον χαρακτηρισμό (deorphanization) διαφόρων οσφρητικών υποδοχέων της μύγας της Μεσογείου (*Ceratitis capitata*), ενός πολύ καταστροφικού εντόμου, μεγάλης οικονομικής σημασίας. Ο χαρακτηρισμός των υποδοχέων του θα μας προσφέρει μοναδικά εργαλεία για μια εντελώς διαφορετική προσέγγιση λογικού σχεδιασμού (rational design) νέας γενιάς προσελκυστικών, τα οποία θα είναι εξειδικευμένα να προσδένονται επιλεκτικά στους οσφρητικούς υποδοχείς, οδηγώντας τα έντομα στην πηγή του οσμηρού ερεθίσματος στο εσωτερικό μιας παγίδας, όπου στη συνέχεια θα θανατώνονται.

Λέξεις κλειδιά: δάκος, μύγα της Μεσογείου, οσφρητικό σύστημα, παγίδες, λογικός σχεδιασμός.

Εισαγωγή

Τα Tephritidae αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια εντόμων που ανήκουν στην τάξη Diptera και περιλαμβάνουν περισσότερα από 4000 είδη (Liquido et al.,1991). Τα περισσότερα από αυτά, αποτελούν έντομα μεγάλης οικονομικής σημασίας, αφού προκαλούν σημαντικές ποιοτικές και ποσοτικές καταστροφές στην παραγωγή φρούτων. Στην οικογένεια αυτή ανήκει και η μύγα της Μεσογείου *Ceratitis capitata* (Wiedemann) που αποτελεί ένα εξαιρετικά πολυφάγο έντομο και προσβάλλει πολλά διαφορετικά είδη ξενιστών (Liquido et al.,1991). Τα ενήλικα θηλυκά αποθέτουν τα αυγά τους στο εσωτερικό των καρπών-ξενιστών και οι προνύμφες αναπτύσσονται σε βάρος της σάρκας καταστρέφοντάς την. Ο έλεγχός τους γίνεται κυρίως με χημικά εντομοκτόνα, με επιπτώσεις τόσο στο περιβάλλον όσο και στη δημόσια υγεία.

Ένα σημαντικό κομμάτι της έρευνας για την αντιμετώπιση των εντόμων αυτών αποτελεί η αξιοποίηση των οσμών των ξενιστών τους. Η προσελκυστική δράση των οσμών των ξενιστών συνδέεται τόσο με τροφικά ερεθίσματα όσο και με ερεθίσματα που έχουν να κάνουν με την εξεύρεση θέσεων ωοτοκίας (καρποί) από τα θηλυκά (Katsoyannos et al., 1997).

Συνεπώς, ελκυστικά που θα βασίζονται σε φυσιολογικές αποκρίσεις σε συγκεκριμένες ουσίες θα οδηγήσουν στην ανάπτυξη εξειδικευμένων συστημάτων προσέλκυσης για την αντιμετώπιση των εντόμων. Τέτοιου είδους προσεγγίσεις θα ελαχιστοποιήσουν τη χρήση εντομοκτόνων, καθιστώντας τες φιλικές προς το περιβάλλον και ασφαλείς για τη δημόσια υγεία. Η ανακάλυψη και δημιουργία εξειδικευμένων συστημάτων προσέλκυσης και παγίδευσης/θανάτωσης έχει τεράστια σημασία τόσο για την παρακολούθηση των πληθυσμών όσο και για την αντιμετώπιση των εχθρών γεωργικής σημασίας.

Οσφρητικό σύστημα

Τα έντομα αντιλαμβάνονται τις οσμές με τη βοήθεια οσφρητικών οργάνων, που εντοπίζονται στην κεφαλή τους (Mayo et al., 1987; Sollai et., 2010). Τα όργανα αυτά είναι οι κεραίες (antennae) και οι

γναθικές προσαρκτίδες (maxillary palps), τα οποία καλύπτονται στην επιφάνειά τους από οσφρητικά τριχίδια (sensilla). Τα sensilla στο εσωτερικό τους περιέχουν από έναν μέχρι τέσσερις οσφρητικούς νευρώνες (OSNs – Olfactory Sensory Neurons). Κάθε οσφρητικός νευρώνας εκφράζει και χαρακτηρίζεται από οσφρητικούς υποδοχείς OR. Η αλληλεπίδραση ενός οσμογόνου μορίου με τους οσφρητικούς υποδοχείς προκαλεί την παραγωγή δυναμικών ενέργειας στους οσφρητικούς νευρώνες (Drimyli et al., 2016). Οι νευρικές απολήξεις του συνόλου των οσφρητικών νευρώνων καταλήγουν στον εγκέφαλο ο οποίος επεξεργάζεται το οσφρητικό σήμα. Επομένως, το οσφρητικό σύστημα αποτελεί ένα υπερευαίσθητο σύστημα διάκρισης οσμών, που καταλήγει τελικά στην εκδήλωση μιας συγκεκριμένης συμπεριφοράς. Παρόλο που μέχρι σήμερα υπάρχουν πολλά ευρήματα που αφορούν τη μορφολογία και την κατανομή των οσφρητικών τριχών στη μύγα της Μεσογείου, δεν υπάρχει καμία πληροφορία για το είδος των οσφρητικών νευρώνων σε αυτές, με συνέπεια να μην έχουν πραγματοποιηθεί λειτουργικές μελέτες των οσφρητικών υποδοχέων.

Στη δροσόφιλα (*Drosophila melanogaster*), αντιθέτως, έχουν χαρακτηριστεί και τα 60 γονίδια οσφρητικών υποδοχέων της (Song et al., 2008). Η διαθεσιμότητα πληθώρας πληροφοριών για την οργάνωση και τον τρόπο λειτουργίας της όσφρησης στη *Drosophila* καθιστά ευκολότερη τη μελέτη στοιχείων του οσφρητικού συστήματος ενός παρόμοιου οργανισμού, όπως η μύγα της Μεσογείου. Ο χαρακτηρισμός των οσφρητικών υποδοχέων και η συσχέτισή τους με συγκεκριμένες οσμές θα επιτρέψει το σχεδιασμό συνθετικών αγωνιστών των επιμέρους υποδοχέων, επάγοντας μια δυνητική ανταπόκριση, οδηγώντας τελικά τα έντομα στην πηγή του οσμηρού ερεθίσματος που μπορεί να είναι το εσωτερικό μιας παγίδας (Malnic 2007).

Μέθοδοι-Αποτελέσματα

Η επιλογή των υποδοχέων της μεσογειακής μύγας για τον χαρακτηρισμό τους βασίστηκε σε αναζήτηση ομολογιών με γονίδια υποδοχέων που έχουν χαρακτηριστεί στο συγγενικό είδος *D. melanogaster*, βάσει του προσδέτη που τους ενεργοποιεί. Οι οσμές που προτιμήθηκαν ήταν είτε φερομονών είτε οσμές ανθών ή τροφής. Έτσι, μέχρι στιγμής, επιλέχθηκαν και ενισχύθηκαν τέσσερις οσφρητικοί υποδοχείς, ομόλογοι της *Drosophila melanogaster*, τον Orco (Odorant receptor coreceptor), OR88a (απόκριση σε φερομόνες Ligands: methyl laurate (ML), methyl myristate, and methyl palmitate), OR19a (απόκριση σε φρουτώδεις οσμές, Ligand:valencene) και OR7a (απόκριση σε φρουτώδεις οσμές, Ligand: E2-hexenal). Προκειμένου να χαρακτηριστούν λειτουργικά οι παραπάνω υποδοχείς κλωνοποιήθηκαν στον φορέα μετασχηματισμού PUAST (P-element vector) και εισήχθησαν με μικροένεση σε έμβρυα δροσόφιλας.

Στα μετασχηματισμένα στελέχη *D. melanogaster* θα ακολουθήσουν πειράματα προσέλκυσης (ανταπόκρισης) σε οσμές μέσω ηλεκτροαντενογραμμάτων (EAGs), μετρώντας το ηλεκτρικό δυναμικό που παράγεται από την απόκριση στις οσμές, ώστε να προσδιοριστεί άμεσα αν υπάρχει αλληλεπίδραση των οσμών με τους αντίστοιχους υποδοχείς. Η τεχνική αυτή καταγράφει τη συνολική απόκριση των οσφρητικών νευρώνων που υπάρχουν στην κεραία. Αύξηση του μεγέθους της απόκρισης σε σύγκριση με τα φυσιολογικά άτομα σε κάποιες από τις οσμές αυτές θα σημαίνει ότι η αντίληψη της συγκεκριμένης οσμής πραγματοποιείται από τους οσφρητικούς υποδοχείς.

Τέλος, αφού θα έχουμε εντοπίσει τους υποδοχείς OR που ανταποκρίνονται σε μία σημαντική οσμή και που ιδανικά αποτελείται από ένα μόνο μόριο, θα σχεδιάσουμε πιο ισχυρά και σταθερά παράγωγα που θα διατηρούν τον χαρακτήρα της οσμής και θα απευθύνονται στον ίδιο υποδοχέα. Οι μοντελοποιημένες αυτές ενώσεις που θα έχουν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά θα παρασκευασθούν συνθετικά στο εργαστήριο και θα δοκιμαστούν για την ελκυστικότητά τους στα παραπάνω στελέχη δροσόφιλας σε συνθήκες είτε εργαστηρίου είτε υπαίθρου.

Συμπεράσματα

Η χρήση εντομοκτόνων και οι μη-ειδικές παγίδες εγκυμονούν μια σειρά κινδύνων για τη δημόσια υγεία και την ισορροπία των οικοσυστημάτων που οδηγούν αναπόφευκτα στην ανάγκη για βελτίωση των μεθόδων ελέγχου και ανάπτυξη μεθόδων εξειδικευμένων στο έντομο-στόχο, που η χρήση τους θα είναι

συμφέρουσα, εύκολη, γρήγορη, αποτελεσματική αλλά και εφαρμόσιμη από νομοθετικής απόψεως. Η ανάγκη για βελτίωση των μεθόδων καταπολέμησης με έμφαση στην ειδο-ειδικότητα οδηγεί στην εστίαση σε συγκεκριμένα μόρια με κρίσιμο ρόλο για τις βασικές λειτουργίες των εντόμων. Η συμπεριφορά του εντόμου και κατ' επέκταση η βιωσιμότητά του εξαρτάται από παράγοντες του οσφρητικού συστήματος, γεγονός που καθιστά το σύστημα αυτό ελκυστικό στόχο για τον έλεγχο των πληθυσμών. Η εμβάθυνση στα χαρακτηριστικά των επιμέρους μορίων του οσφρητικού συστήματος μπορεί να βοηθήσει στην ανάπτυξη ειδο-ειδικών προσεγγίσεων, για τον αποτελεσματικότερο έλεγχο και την καταπολέμηση εντόμων εχθρών.

Βιβλιογραφία

Drimyli E, Gaitanidis A, Maniati K, Turin L, Skoulakis EMC (2016). Differential electrophysiological responses to odorant isotopologues in Drosophilid antennae. eNeuro .0152-15.2016. doi:10.1523.

Katsoyannos BI, Kouloussis NA and Papadopoulos NT (1997). Response of *Ceratitis capitata* to citrus chemicals under semi-natural conditions. Entomol Exp Appl, 82(2), pp.181-188.

Liquido NJ, Shinoda LA & Cunningham RT (1991) Host plants of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): an annotated world review. Miscellaneous Publications, Entomological Society of America, 77, 1-52.

Malnic B (2007). Searching for the ligands of odorant receptors. Mol Neurobiol, 35(2), 175-181

Mayo I, Anderson M, Burguete J, Robles Chillida EM (1987) Structure of superficial chemoreceptive sensilla on the third antennal segment of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Int J Insect Morphol Embryol 16:131–141

Sollai G, Altea N, Masala C, Loy F, Liscia A, Crnjar R, Solari P (2010) EAG responses of the medfly *Ceratitis capitata* to fruit and foliage headspace of host-plants: a comparison between wild and lab reared insect populations. Abstract from the XXth Congress of European Chemoreception Research Organization, ECRO-2010, Avignon. Chem Senses 36:E79

Song H , Kwon J, Han H , Bae Y, Moon C (2008). First Contact to Odors: Our Current Knowledge about Odorant Receptor. *Sensors* 2008, *8*(10), 6303-6320; doi: 10.3390/s8106303

Μελέτη της γενετικής ποικιλότητας στα γονίδια vgll3 και six6 σε φυσικούς και εκτρεφόμενους πληθυσμούς στην τσιπούρα (Sparus aurata) και στο Ευρωπαϊκό λαβράκι (Dicentrarchus labrax)

ΝΙΚΟΛΑΟΥ Θεοπίστη[1]*, ΣΙΣΜΑΝΟΓΛΟΥ Σμαράγδα[1]* , ΜΟΥΛΙΣΤΑΝΟΣ Αριστοτέλης[1,2], ΓΚΑΓΚΑΒΟΥΖΗΣ Κωνσταντίνος[1,2], ΚΑΡΑΪΣΚΟΥ Νικολέττα[1,2], ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ Ευθυμία[1], ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΙΔΗΣ Αλέξανδρος[1,2], ΠΑΠΑΚΩΣΤΑΣ Σπύρος[3]
(*ισοδύναμη συνεισφορά)
[1]*Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, email: nikolaout@bio.auth.gr, smarsism@bio.auth.gr, amoulist@bio.auth.gr, gagavou@bio.auth.gr, nikolbio@bio.auth.gr, eantono@bio.auth.gr, atriant@bio.auth.gr.*
[2]*Genomics and Epigenomics Translational Research (GENeTres), Κέντρο Διεπιστημονικής Έρευνας και Καινοτομίας (ΚΕΔΕΚ-ΑΠΘ), Balkan Center, Θεσσαλονίκη.*
[3]*Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας, Διεθνές Πανεπιστήμιο Ελλάδας, email: spapakostas@ihu.edu.gr.*

Περίληψη
Η τσιπούρα και το λαβράκι παρουσιάζουν μεγάλη εμπορική αξία στην Ευρώπη και ιδιαίτερα στην Ελλάδα. Ο ρυθμός αύξησης είναι ίσως το σημαντικότερο χαρακτηριστικό για τα προγράμματα επιλογής στις ιχθυοκαλλιέργειες. Τα γονίδια *vgll3* και *six6* έχουν προσφάτως βρεθεί ότι καθορίζουν την ωρίμανση και την αύξηση στα ψάρια και έχουν εξελικτικά συντηρημένη λειτουργία. Στην εργασία αναλύονται DNA αλληλουχίες των γονιδίων *vgll3* και *six6* φυσικών και εκτρεφόμενων πληθυσμών τσιπούρας (20 πληθυσμοί συνολικά) και λαβρακιού (18 πληθυσμοί συνολικά). Βρέθηκαν μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) σε κάθε γονίδιο και σε κάθε είδος και διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση γονοτύπων μεταξύ φυσικών και εκτρεφόμενων πληθυσμών. Τα αποτελέσματα προσφέρουν μια πρώτη ένδειξη ότι τα εν λόγω γονίδια μάλλον σχετίζονται με την εκτροφή ή/και εξημέρωση (domestication) της τσιπούρας και του λαβρακιού. Συνεπώς, ο ενδεχόμενος ρόλος τους στην αύξηση και την ωρίμανση των ειδών αυτών χρήζει περαιτέρω μελέτης καθότι τα προγράμματα επιλογής στοχεύουν συνήθως σε χαρακτηριστικά αύξησης.

Λέξεις- κλειδιά
Dicentrarchus labrax, Sparus aurata, vgll3, six6, ιχθυοκαλλιέργειες

Εισαγωγή

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) αποτελεί ένα σαρκοφάγο οργανισμό που μετακινείται μεταξύ θαλάσσιων και υφάλμυρων νερών κυρίως του Ανατολικού Ατλαντικού ωκεανού για να τραφεί και να αναπαραχθεί. Το είδος χαρακτηρίζεται ως πρώτανδρο ερμαφρόδιτο, περνώντας τα πρώτα 2-3 χρόνια της ζωής του ως αρσενικό (Υφαντής 2017, Sola et al. 2007, Γκάνιας 2015).

Το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) κατανέμεται στη Μεσόγειο, στη Μαύρη Θάλασσα και στον Ατλαντικό Ωκεανό. Αποτελεί είδος ευρύαλο και ευρύθερμο, που είναι σαρκοφάγος καιροσκόπος θηρευτής (Vandeputte, Gagnaire & Allal 2019). Είναι είδος γονοχωριστικό και αναπαράγεται, κυρίως στην θάλασσα, έπειτα μεταναστεύει σε παράκτιες περιοχές και λίμνες για να αναπτυχθεί (Piferrer et al. 2005).

Τα δύο αυτά είδη έχουν μεγάλη οικονομική σημασία για την ελληνική ιχθυοκαλλιέργεια καθώς αποφέρουν σημαντικές εμπορικές απολαβές. Έτσι, λόγω της υψηλής ζήτησης είναι σημαντική η επίτευξη της ταχύτερης ανάπτυξής τους στις ιχθυοκαλλιέργειες, κατάσταση που μπορεί να επιτευχθεί μέσω προγραμμάτων γενετικής βελτίωσης.

Μελέτες στο σολομό του Ατλαντικού (*Salmo salar*) κατέδειξαν γονίδια που είναι εξελικτικά συντηρημένα από τον σολομό μέχρι τον άνθρωπο και τα οποία ερμηνεύουν ένα εξαιρετικά μεγάλο ποσοστό (της τάξεως του 40%) της διακύμανσης του χαρακτηριστικού της ωρίμανσης σε φυσικούς

πληθυσμούς του είδους. Το κύριο γονίδιο που συσχετίστηκε ήταν το *vgll3* (vestigial-like family member 3) που σχετίζεται με τη λιπογένεση του σολομού (Barson et al. 2015). Επιπρόσθετα, αναγνωρίστηκε και το γονίδιο *six6* (SIX Homeobox 6), το οποίο παίζει ρόλο στην ωρίμανση στο σολομό (Sinclair-Waters et al. 2020). Επομένως, τόσο το *vgll3* όσο και το *six6* αποτελούν γονίδια-στόχους για ενδεχόμενη συσχέτιση με την ταχύτητα ωρίμανσης στα δύο υπό εξέταση είδη.

Μέθοδοι

Απομονώθηκε DNA από πτερύγια τσιπούρας και λαβρακιού. Ενισχύθηκαν συγκεκριμένες περιοχές κάθε γονιδίου μέσω PCR και έγινε αλληλούχιση τους. Ο έλεγχο της ποιότητάς των αλληλουχιών, η στοίχιση τους και η εύρεση πολυμορφισμών πραγματοποιήθηκαν στο πρόγραμμα Geneious (Kearse et al. 2012). Μέσω στατιστικού πακέτου "R commander" (John Fox 2017) υπολογίσθηκε η συχνότητα των γονοτύπων και των αλληλομόρφων με τη χρήση του Wilcoxon test και ελέγχθηκε η επιρροή της προέλευσης των δειγμάτων με τη χρήση γενικευμένων γραμμικών μοντέλων. Για πολυμορφισμούς σε κωδικοποιούσες περιοχές εξετάστηκε το ενδεχόμενο αλλαγής της αμινοξικής ακολουθίας.

Αποτελέσματα

Τσιπούρα

Για το *vgll3* βρέθηκε ένας πολυμορφισμός στη θέση 9:24911884, με αλληλόμορφα G και A. Στα εκτρεφόμενα άτομα εμφανίζεται συχνότερα ο GG γονότυπος (p=0.0056), σε αντίθεση με τα άτομα φυσικών πληθυσμών, όπου παρατηρείται κυρίως ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο A (p=0.1416). Επίσης, σημαντικά περισσότερες είναι οι περιπτώσεις ετεροζυγωτίας στους φυσικούς πληθυσμούς.

Στο *six6* βρέθηκαν δύο πολυμορφισμοί με αλληλόμορφα C και T σε ιντρονική περιοχή, στις θέσεις 16:14406442 και 16:14406471. Στον πρώτο πολυμορφισμό στους φυσικούς πληθυσμούς επικρατούσε ο γονότυπος CC (p=0,0095), ενώ στους εκτρεφόμενους ο TT (p= 0,0004). Αντίστροφη κυριαρχία γονοτύπων παρατηρήθηκε στο δεύτερο πολυμορφισμό του γονιδίου.

Λαβράκι

Στο *vgll3* βρέθηκε ένας πολυμορφισμός, στην θέση 15:9203633, με αλληλόμορφα T και G. Ο πολυμορφισμός αυτός βρίσκεται σε εξώνιο και οδηγεί σε αλλαγή της σερίνης σε αλανίνη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στα εκτρεφόμενα άτομα παρατηρείται συχνότερα ο TT γονότυπος (p= 0,0395) ενώ για τους άλλους δύο γονότυπους δεν εμφανίζεται στατιστική σημαντικότητα.

Στο *six6* βρέθηκαν δύο πολυμορφισμοί, στις θέσεις 12:11591053 και 12:11591093, που δεν οδηγούν σε αλλαγή αμινοξέος (ιντρόνιο). Και για τους δύο πολυμορφισμούς, οι ετεροζυγώτες εμφανίζονται πιο συχνά στους φυσικούς πληθυσμούς (p=0,0030 και p=0,0105), ενώ οι εκτρεφόμενοι πληθυσμοί εμφανίζουν κυρίως τον TT γονότυπο (p=0,0035 και p=0,0017).

Συμπεράσματα

Η σύγκριση των γονοτύπων των εξεταζόμενων ατόμων σε επίπεδο προέλευσης (φυσικοί ή εκτρεφόμενοι πληθυσμοί) κατέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε όλους τους πολυμορφισμούς και στα δύο γονίδια. Αυτό, συνιστά μια πρώτη ένδειξη υπέρ του ρόλου αυτών των γονιδίων στην εκτροφή της τσιπούρας και του λαβρακιού (μέσω π.χ. της εφαρμογής προγραμμάτων επιλογής γεννητόρων). Το ενδεχόμενο ομομιξίας σε αυτές τις παρατηρήσεις δεν μπορεί να αποκλειστεί πλήρως, ωστόσο, δε φαίνεται πιθανό η ομομιξία από μόνη της να μπορεί να οδηγήσει σε τόσο σταθερά πρότυπα. Σημειώνεται ότι οι πέντε από τους έξι πολυμορφισμούς που βρέθηκαν στα δύο γονίδια ενδιαφέροντος κάθε είδους δεν προκαλούν αλλαγές στις τελικές πρωτεΐνες (συνώνυμοι πολυμορφισμοί), συνεπώς, η συσχέτιση αυτών των πολυμορφισμών με την ιχθυοκαλλιέργεια της τσιπούρας και του λαβρακιού πρέπει να οφείλεται στην επίδραση γειτονικών πολυμορφισμών (π.χ. σε ρυθμιστικές περιοχές). Συνολικά, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υπογραμμίζουν για πρώτη φορά ένα ενδεχόμενο ρόλο των γονιδίων *vgll3* και *six6* στην αύξηση και ανάπτυξη της τσιπούρας και του λαβρακιού, που συνδυαστικά με την εξελικτικά συντηρημένη λειτουργία τους, διεγείρουν το ενδιαφέρον για το πεδίο των

ιχθυοκαλλιεργειών. Συνεπώς επιτάσσεται λεπτομερέστερη διερεύνηση της συσχέτισης τους με τα χαρακτηριστικά αυτά και στην τσιπούρα και το λαβράκι.

Βιβλιογραφία

Γκάνιας, Κ. (2015). Καλλιέργεια ιχθύων: Παραδείγματα και εφαρμογές από την ελληνική ιχθυοκαλλιέργεια. Στο Βουλτσιάδου, Ε., κ.ά. 2015. *Υδατοκαλλιέργειες*. 7-12, Κάλλιππος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις.

Ζαρκάλας, Σ., & Παπαδάκη, Ε. (1999). *Φυσικοχημικοί παράγοντες που επηρεάζουν την καλλιέργεια των ειδών Sparus auratus και Dicentrarchus labrax (τσιπούρα, λαβράκι).* Πτυχιακή εργασία, Τ.Ε.Ι Μεσολογγίου, Σχολή Τεχνολόγων Γεωπόνων, Τμήμα Ιχθυοκαλλιέργειας & Αλιείας.

Υφαντής, Φ. (2017). *Μοντέλο ανάπτυξης τσιπούρας (Sparus aurata) για τη βέλτιστη εκτρεφόμενη παραγωγή ψαριών.* Πτυχιακή εργασία, Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Barson, N. J., et al. (2015). Sex-dependent dominance at a single locus maintains variation in age at maturity in salmon. *Nature*, 528, 405–408.

Fox, J. (2017). *Using the R Commander: A Point-and-Click Interface for R*. Boca Raton*:* Chapman & Hall/CRC Press.

Kearse, M., et al. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 28, 1647–9.

Piferrer, F., et al. (2005). Genetic, endocrine, and environmental components of sex determination and differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *General and Comparative Endocrinology*, 142, 102–110.

Sola, L., et al. (2007). Gilthead seabream-*Sparus aurata*. In Svåsand T., et al., *Genetic impact of aquaculture activities on native populations*, 47-54, Genimpact final scientific report (EU contract n. RICA-CT-2005-022802).

Sinclair-Waters, M., et al. (2020). Beyond large-effect loci: large-scale GWAS reveals a mixed large-effect and polygenic architecture for age at maturity of Atlantic salmon. *Genetics Selection Evolution*, 52, 9.

Vandeputte, M., Gagnaire, P. A., & Allal, F. (2019). The European sea bass: a key marine fish model in the wild and in aquaculture. *Animal Genetics*, 50, 195–206.

Volckaert, F. A. M., et al. (2008). European Sea Bass. In Kocher T. D. & Kole C., *Genome Mapping and Genomics in Fishes and Aquatic Animals*. 117–133, Berlin, Heidelberg: Springer.

Ευχαριστίες

Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του ερευνητικού έργου «Μελέτη Χαρακτηριστικών Σταδίων Ζωής Ειδών Ψαριών με Προσέγγιση Βιολογίας Συστημάτων για τη Βελτιώση της Παραγωγικότητας των Υδατοκαλλιεργειών της Μεσογείου» και χρηματοδοτήθηκε από το ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ..

In vitro συνθετική βιολογία: Ανάπτυξη ενός καινοτόμου πολυενζυμικού νανοβιοκαταλυτικού συστήματος για τη βιομετατροπή του CO_2

ΓΙΑΝΝΑΚΟΠΟΥΛΟΥ Αρχοντούλα, ΓΑΚΗΣ Χρήστος, ΣΠΥΡΟΥ Κωνσταντίνος, ΠΟΛΥΔΕΡΑ Αγγελική, ΓΟΥΡΝΗΣ Δημήτριος και ΣΤΑΜΑΤΗΣ Χαράλαμπος*

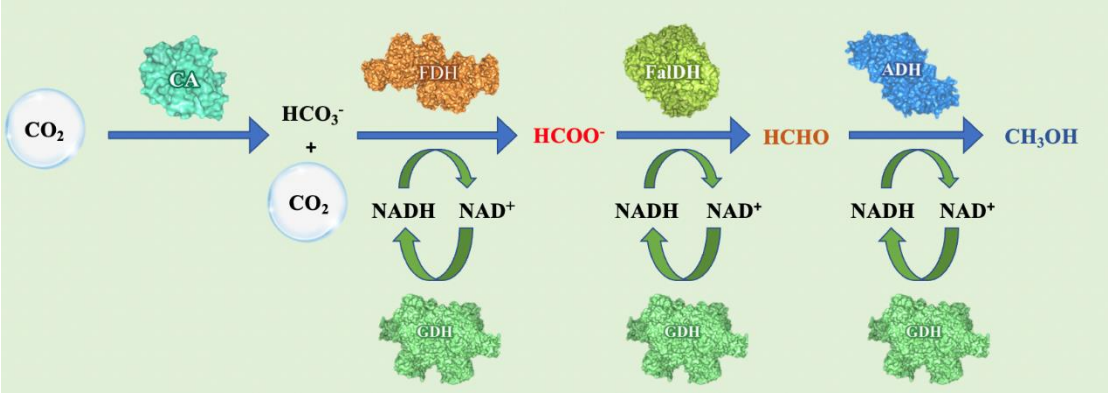
Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, Ελλάδα, arxontoula.gian@gmail.com
Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, Ελλάδα, chris.gakis1@gmail.com
Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης των Υλικών, Πολυτεχνική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, Ελλάδα, konstantinos.spyrou1@gmail.com
Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, Ελλάδα, apolyder@uoi.gr
Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης των Υλικών, Πολυτεχνική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, Ελλάδα, dgourni@uoi.gr
Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, Ελλάδα, *hstamati@uoi.gr

Περίληψη
Η εφαρμογή καινοτόμων και αποτελεσματικών συστημάτων βιομετατροπής του CO_2 αποτελεί πρόκληση για τη μείωση των επιπέδων του CO_2 στην ατμόσφαιρα. Η παρούσα εργασία περιγράφει την ανάπτυξη και το χαρακτηρισμό ενός *in vitro* πολυενζυμικού συστήματος για τη βιομετατροπή του CO_2 σε χημικά προστιθέμενης αξίας (όπως το φορμικό οξύ, τη φορμαλδεΰδη ή τη μεθανόλη). Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν και μελετήθηκαν 5 ένζυμα διαφορετικής πηγής προέλευσης, όπως η καρβονική ανυδράση, η αφυδρογονάση του φορμικού, η αφυδρογονάση του L-γλουταμικού, η αφυδρογονάση της φορμαλδεΰδης και η αλκοολική αφυδρογονάση. Τα προαναφερθέντα ένζυμα συν-ακινητοποιήθηκαν σε μια νέα κατηγορία νανοϋλικών, τα νανοϋλικά ιεραρχικά πορώδους άνθρακα (HPCs), τα οποία φέρουν την ικανότητα προσρόφησης και αποθήκευσης του CO_2. Τα HPCs αποδείχτηκαν αποτελεσματικοί φορείς για την συν-ακινητοποίηση των ενζύμων. Τα συστήματα που αναπτύχθηκαν, μελετήθηκαν ως προς τη δομική και λειτουργική τους σταθερότητα και αξιολογήθηκαν επίσης ως προς την δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης τους σε επαναλαμβανόμενους κύκλους βιομετατροπής του CO_2.

Λέξεις-κλειδιά
νανοβιοκατάλυση, πολυ-ενζυμικά συστήματα, βιομετατροπή του CO_2

Εισαγωγή
Η βιοκατάλυση αποτελεί πλέον ένα πολυτιμότατο εργαλείο της Βιοτεχνολογίας με πολυάριθμες εφαρμογές σε πλήθος τομέων όπως η υγεία, τα τρόφιμα, η ανάπτυξη φαρμάκων και η παραγωγή ενέργειας (Gkantzou κ.ά. 2021). Τα τελευταία χρόνια στρέφεται στην ανάπτυξη πολυενζυμικών βιοκαταλυτικών συστημάτων ως μια ιδιαίτερα υποσχόμενη τεχνολογία για την κατάλυση αλυσιδωτών αντιδράσεων. Οι πολυενζυμικές αλυσιδωτές αντιδράσεις, δηλαδή η ενσωμάτωση πολλαπλών βιοκαταλυτικών μετασχηματισμών με σκοπό την πραγματοποίηση μιας αντίδρασης διαδοχικών σταδίων, έχουν προσελκύσει το ερευνητικό ενδιαφέρον καθώς προσφέρουν νέες δυνατότητες στη σύνθεση προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Επιπλέον, παρέχουν την δυνατότητα ανάπτυξης προηγμένων μεταβολικών οδών που δεν εμφανίζονται στη φύση με σκοπό την κατάλυση βιοδιεργασιών με αυξημένο ενδιαφέρον, όπως η επεξεργασία και αξιοποίηση τοξικών ρυπαντών της ατμόσφαιρας (Giannakopoulou κ.ά. 2020). Για παράδειγμα, όπως είναι γνωστό, τα καυσαέρια των αυτοκινήτων, οι βιομηχανικές εκπομπές και άλλες ανθρωπογενείς δραστηριότητες έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του διοξειδίου του άνθρακα (CO_2), του κυριότερου «αερίου του θερμοκηπίου», η συγκέντρωση του οποίου στην ατμόσφαιρα, συμβάλλει στην υπερθέρμανση του πλανήτη και κατ' επέκταση στην κλιματική αλλαγή. Συνεπώς, κρίνεται ολοένα και πιο επιτακτική η ανάγκη ανάπτυξης μεθόδων δέσμευσης και αξιοποίησής του (Marques Netto κ.ά 2018).

Η πρόσφατη ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας παρέχει τη δυνατότητα σχεδιασμού και ανάπτυξης υλικών μεγέθους νανοκλίμακας, ικανών να αποθηκεύουν υψηλές ποσότητες CO_2 (Estevez κ.ά. 2018). Επιπλέον, τα υλικά αυτά δύναται συγχρόνως να αποτελέσουν και αποτελεσματικούς φορείς για την συν-ακινητοποίηση ενζύμων που μέσω μιας αλυσιδωτής αντίδρασης μπορούν να μετατρέψουν το αποθηκευμένο CO_2 σε ενώσεις βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος, όπως το φορμικό οξύ, ή η μεθανόλη (**Εικόνα 1.**). Μια τέτοια προσέγγιση θα μπορούσε δυνητικά να συμβάλλει εποικοδομητικά στο ζήτημα της υπερθέρμανσης του πλανήτη και της κλιματικής αλλαγής (Singh κ.ά. 2018). Στη συγκεκριμένη εργασία περιγράφεται η ανάπτυξη καινοτόμων πολυενζυμικών νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων μέσω της συν-ακινητοποίησης ενζύμων σε πρωτότυπα νανοδομημένα υλικά άνθρακα (HPC:Hierarchical Porous Carbon) και η εφαρμογή τους στη δέσμευση και βιομετατροπή του CO_2. Η δομή και η λειτουργία (δραστικότητα, λειτουργική σταθερότητα, επαναχρησιμοποίηση) των συστημάτων αυτών επίσης μελετήθηκε με πλήθος βιοχημικών και φασματοσκοπικών τεχνικών.



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση ενός *in vitro* πολυενζυμικού συστήματος βιομετατροπής του CO_2.

Μέθοδοι

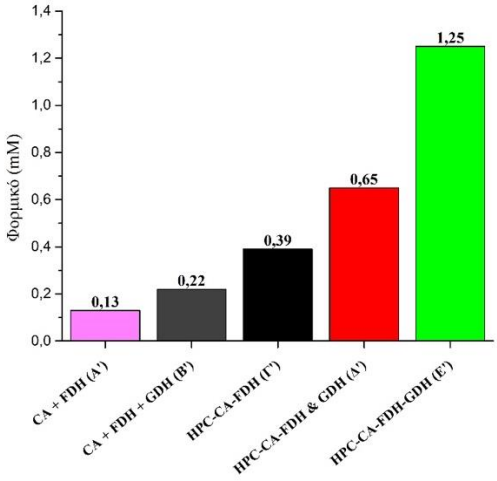
Μη ομοιοπολική ακινητοποίηση των ενζύμων CA, FDH και GDH σε HPCs

Αρχικά, ζυγίζεται η ποσότητα του φορέα ακινητοποίησης–HPCs. Ακολουθεί ανάδευση και διασπορά του νανοϋλικού με την βοήθεια υπέρηχων, σε θερμοκρασία δωματίου, για περίπου 30 λεπτά. Στη συνέχεια, ορισμένη ποσότητα ενζύμου διαλυτοποιείται στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα και προστίθεται στο διάλυμα των HPCs. Η αναλογία μάζας των ενζύμων CA, FDH, GDH ως προς τα HPCs είναι 2:1:1:2, αντίστοιχα 2 mg CA, 1 mg FDH, 1 mg GDH, 2 mg HPCs. Η διαλυτοποίηση των ενζύμων και η διασπορά των HPCs πραγματοποιείται σε διάλυμα φωσφορικού νατρίου 0,05 M pH 7, σε τελικό όγκο μίγματος ακινητοποίησης 8 mL (HPCs σε 5 mL buffer & "ενζυμικό κοκτέιλ" CA-FDH-GDH 3 mL buffer). Το μίγμα ακινητοποίησης τοποθετείται υπό ανάδευση για 2 ώρες, στα 170 rpm, στους 30 ^oC. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 4000 rpm για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο της πρώτης φυγοκέντρησης φυλάσσεται για τον προσδιορισμό του ποσοστού ακινητοποίησης. Στη συνέχεια, το ίζημα νανο-βιοκαταλύτη επαναδιαλυτοποείται και ξεπλένεται με 2 mL διαλύματος φωσφορικού νατρίου 0,05 M, pH 7,0 εις διπλούν, όπου το υπερκείμενο απορρίπτεται. Το τελικό ίζημα στεγνώνει υπό κενό σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια αποθηκεύεται στους 4 ^oC μέχρι να επαναχρησιμοποιηθεί.

Αποτελέσματα

Σύγκριση της απόδοσης φορμικού μεταξύ των διαφορετικών συστημάτων βιοκαταλυτικών συστημάτων

Με κριτήριο τη μέγιστη απόδοση φορμικού μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης βιομετατροπής του CO_2, συγκρίθηκαν τα εξής βιοκαταλυτικά συστήματα: Α') σύστημα των ελεύθερων ενζύμων CA και FDH, Β') σύστημα των ελεύθερων ενζύμων CA, FDH και GDH, Γ') σύστημα του συν-ακινητοποιημένου βιοκαταλύτη των ενζύμων CA και FDH (HPC-CA-FDH), Δ') σύστημα του συν-ακινητοποιημένου βιοκαταλύτη των CA και FDH και της ελεύθερης GDH (HPC-CA-FDH & GDH), και τέλος Ε') σύστημα του συν-ακινητοποιημένου βιοκαταλύτη των ενζύμων CA, FDH και GDH (HPC-CA-FDH-GDH), όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 2.**



Εικόνα 2. Σύγκριση της παραγωγής φορμικού στις 5 ώρες σε 5 διαφορετικά συστημάτων βιοκαταλυτών. Το κάθε σύστημα απεικονίζεται με διαφορετικό χρώμα. Με ρόζ χρώμα το σύστημα των ελεύθερων CA και FDH (Α΄), με γκρι χρώμα το σύστημα των ελεύθερων CA, FDH και GDH (Β'), με μαύρο χρώμα το σύστημα των συν-ακινητοποιημένων CA, FDH (Γ', αναλογία μάζας CA:FDH:HPCs, 1:1:1), με κόκκινο χρώμα το συν-ακινητοποιημένο σύστημα των CA, FDH (αναλογία μάζας CA:FDH:HPCs, 1:1:1) και της ελεύθερης GDH (Δ') και τέλος με πράσινο χρώμα το τρι-ενζυμικό συν-ακινητοποιημένο σύστημα των CA, FDH και GDH (Ε', αναλογία μάζας CA:FDH:GDH:HPCs, 2:1:1:2).

Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκαν *in vitro* πολυενζυμικά νανοβιοκαταλυτικά συστήματα για τη ενζυμική αναγωγή του αερίου CO_2 σε χημικά προστιθέμενης αξίας, όπως το φορμικό οξύ. Η ανάπτυξη αυτών των βιοκαταλυτικών συστημάτων πραγματοποιήθηκε μέσω της μη ομοιοπολικής συν-ακινητοποίησης των ενζύμων στα HPCs. Αρχικά, επιλέχθηκαν οι κατάλληλοι βιοκαταλύτες και μελετήθηκαν ως προς τη δραστικότητα και τα φαινόμενα κινητικά τους χαρακτηριστικά (K_m, V_{max}). Η επιτυχής συν-ακινητοποίηση των CA, FDH και GDH στα HPCs επιβεβαιώθηκε με φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (FTIR). Η απόδοση βιομετατροπής του CO_2 σε φορμικό από το ακινητοποιημένο σύστημα ήταν περίπου 6 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τη διάταξη των ελεύθερων ενζύμων. Παράλληλα, το σύστημα διατήρησε πάνω από την ημίσεια δραστικότητα του για δέκα επαναλαμβανόμενους κύκλους παραγωγής φορμικού έπειτα από 240 ώρες λειτουργίας. Επίσης, αναπτύχθηκε και ένα αποτελεσματικό σύστημα παραγωγής φορμαλδεΰδης, που απέδωσε περίπου 5 μM φορμαλδεΰδης σε 24 ώρες. Η αυξημένη απόδοση των συστημάτων αυτών σε συνδυασμό με τη λειτουργική τους σταθερότητα τα καθιστά ως ιδιαίτερα υποσχόμενα σε εφαρμογές αξιοποίησης του CO_2 βιομηχανικής κλίμακας.

Ενδεικτική Βιβλιογραφία

Estevez, L.; Barpaga, D.; Zheng, J.; Sabale, S.; Patel, R.L.; Zhang, J.G.; McGrail, B.P.; Motkuri, R.K. Hierarchically Porous Carbon Materials for CO_2 Capture: The Role of Pore Structure. *Industrial and Engineering Chemistry Research* **2018**, *57*, 1262–1268, doi:10.1021/acs.iecr.7b03879.

Giannakopoulou, A.; Gkantzou, E.; Polydera, A.; Stamatis, H. Multienzymatic Nanoassemblies: Recent Progress and Applications. *Trends in Biotechnology* **2020**, *38*, 202–216.

Gkantzou, E.; Chatzikonstantinou, A. v.; Fotiadou, R.; Giannakopoulou, A.; Patila, M.; Stamatis, H. Trends in the Development of Innovative Nanobiocatalysts and Their Application in Biocatalytic Transformations. *Biotechnology Advances* **2021**, *51*.

Marques Netto, C.G.C.; Andrade, L.H.; Toma, H.E. Carbon Dioxide/Methanol Conversion Cycle Based on Cascade Enzymatic Reactions Supported on Superparamagnetic Nanoparticles. *Anais da*

Academia Brasileira de Ciencias **2018**, *90*, 593–606, doi:10.1590/0001-3765201720170330.

Singh, R.K.; Singh, R.; Sivakumar, D.; Kondaveeti, S.; Kim, T.; Li, J.; Sung, B.H.; Cho, B.K.; Kim, D.R.; Kim, S.C.; et al. Insights into Cell-Free Conversion of CO2 to Chemicals by a Multienzyme Cascade Reaction. *ACS Catalysis* **2018**, *8*, 11085–11093, doi:10.1021/acscatal.8b02646.

Ευχαριστίες

Ο συγγραφέας Γ.Α. (Γιαννακοπούλου Αρχοντούλα) ευχαριστεί ιδιαίτερα το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) για τη χρηματοδότηση μέρους της παρούσας εργασίας που υλοποιήθηκε στα πλαίσια διδακτορικής διατριβής η οποία συγχρηματοδοτήθηκε από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», 2014-2020, στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας- Υποδράση 2: Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών ΙΚΥ σε υποψηφίους διδάκτορες των ΑΕΙ της Ελλάδας»

Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

ΕΣΠΑ 2014-2020
ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Επίσης, οι συγγραφείς θα ήθελαν να ευχαριστήσουν ιδιαίτερα και το Εμπειρίκιο Ίδρυμα.

Εποχικές αλλαγές των γονιδίων του κύκλου της γλυκόλυσης στο εκτρεφόμενο είδος Sparus aurata

ΜΑΚΡΗ Βασιλική[1],ΦΕΙΔΑΝΤΣΗΣ Κωνσταντίνος[1], ΓΙΑΝΤΣΗΣ Α. Ιωάννης[2], ΓΟΥΓΟΥΣΗ Αντωνία[1], ΝΑΘΑΝΑΗΛΙΔΗΣ Κοσμάς[3], ΜΙΧΑΗΛΙΔΗΣ Βασίλειος[1]

[1]*Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων, Τμήμα Ζωολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 54124, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα- makrivasil@bio.auth.gr, kfeidant@bio.auth.gr, agougousi@bio.auth.gr, michaeli@bio.auth.gr*

[2]*Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Μακεδονίας, 53100, Φλώρινα, Ελλάδα- igiantsis@uowm.gr*

[3]*Τμήμα Γεωπονίας, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Κωστάκιοι Άρτα, 47100, Άρτα, Ελλάδα- nathan@uoi.gr*

Περίληψη

Η ενέργεια διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανοχή στις περιβαλλοντικές συνθήκες, μεταξύ των οποίων η θερμοκρασία, ως κύριος παράγοντας πίεσης, επηρεάζει τις φυσιολογικές διεργασίες. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η έκφραση γονιδίων που συνιστούν δείκτες του μεταβολισμού της γλυκόλυσης. Πραγματοποιήθηκαν εποχικές δειγματοληψίες τσιπούρας στον Βόρειο Ευβοϊκό Κόλπο και απομονώθηκαν τέσσερις ιστοί (καρδιά, ήπαρ, ερυθρός και λευκός μυς). Εφαρμόστηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για τον προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέος (L-LDH), κινάση του πυροσταφυλικού οξέος (PK) ενώ παράλληλα με την χρήση φασματοφωτομετρικής μεθόδου εκτιμήθηκε η ενζυμική δραστικότητα τους. Τα αποτελέσματα έδειξαν έντονες μεταβολές στην έκφραση των γονιδίων σε επίπεδο mRNA συμβάλλοντας στη διερεύνηση της σχέσης της εποχικότητας με το μεταβολικό μονοπάτι της γλυκόλυσης,

Λέξεις-Κλειδιά: Μεταβολισμός, Γλυκόλυση, Αφυδρογονάση του Γαλακτικού Οξέος, Κινάση του Πυροσταφυλικού Οξέος, Τσιπούρα

Εισαγωγή

Η αποθήκευση ενέργειας είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό των οργανισμών, το οποίο χρησιμοποιείται για την εξοικονόμηση επαρκών ποσοτήτων ενέργειας προκειμένου να αποτραπούν οι διακυμάνσεις στη διαθεσιμότητα τροφίμων ή στη ζήτηση ενέργειας (Encomio & Chu, 2000). Τα κύτταρα χρειάζονται ATP για να διατηρήσουν τις ενεργειακές τους ανάγκες. Η γλυκόζη αποτελεί κύριο υπόστρωμα άνθρακα που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία ATP (Parra-Bonilla et al., 2010). Πολλές συνθήκες είναι στρεσσογόνες για τους θαλάσσιους οργανισμούς με την θερμοκρασία να αποτελεί τον κυριότερο στρεσσογόνο αβιοτικό παράγοντα (Selye, 1976). Σε υψηλές θερμοκρασίες προκαλείται η αύξηση του αναερόβιου μεταβολισμού λόγω υποξίας με σκοπό την παραγωγή ATP μέσω αναερόβιων οδών (Pörtner et al., 2004). Η τσιπούρα είναι από τα πιο σημαντικά και οικονομικά είδη που εκτρέφονται στην Ελληνική ιχθυοκαλλιέργεια και στόχος της παρούσας εργασίας είναι να συσχετίσει τις εποχικές μεταβολές της έκφρασης των γονιδίων και της ενζυμικής δραστηριότητας της αφυδρογονάσης του γαλακτικού οξέος και της κινάσης του πυροσταφυλικού οξέος με τις μεταβολές της θερμοκρασίας.

Μέθοδοι και Υλικά

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στον Βόρειο Ευβοϊκό Κόλπο και σε συνεργασία με την ιχθυοκαλλιέργεια Προμηθέας ΕΠΕ. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν με βάση την θερμοκρασία των προηγούμενων ετών σε δείγματα τσιπούρας όπου απομονώθηκε η καρδιά, το ήπαρ, ο ερυθρός και ο λευκός μυς. Η απομόνωση του RNA πραγματοποιήθηκε με χρήση Nucleozol (Macherey-Nagel) το οποίο κατόπιν μεταγράφηκε αντίστροφα σε cDNA με τη χρήση του PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara) και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 1., ενώ ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το ριβοσωμικό

γονίδιο L13a (Kaitetzidou et al. 2015). Η μέτρηση της ενζυμικής δραστικότητας πραγματοποιήθηκε στους 18ºC με την χρήση φασματοφωτομέτρου. Οι δραστικότητες των ενζύμων L-LDH και PK μετρήθηκαν μετά την οξείδωση του NADH στα 340 nm (συντελεστής απόσβεσης ε= 6,22 mM^{-1} cm^{-1}) (Driedzic & Almeida-Val, 1996; Hunter-Manseau et al., 2019).

Πίνακας 1. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων.

Γονίδιο	*Αλληλουχία Εκκινητών (5'-3')*	*Μέγεθος Προϊόντος*	*Αναφορά*
L-LDH	F:ATCCCGAACATCATCGTCAAGTA R: TTGATAACCTCGTAGGCTCC	368 bp	Παρούσα Εργασία (NCBI Reference Sequence: XM_030425767.1)
PK	F: CGCCCAGAAGATGATGATTGG R: ATTACACAGTCGGCCCATC	156 bp	Παρούσα Εργασία (NCBI Reference Sequence: KF 857579.1)
L13	F: TCTGGAGGACTGTCAGGGGCATGC R: AGACGCACAATCTTAAGAGCAG	148 bp	Kaitetzidou et al. (2015)

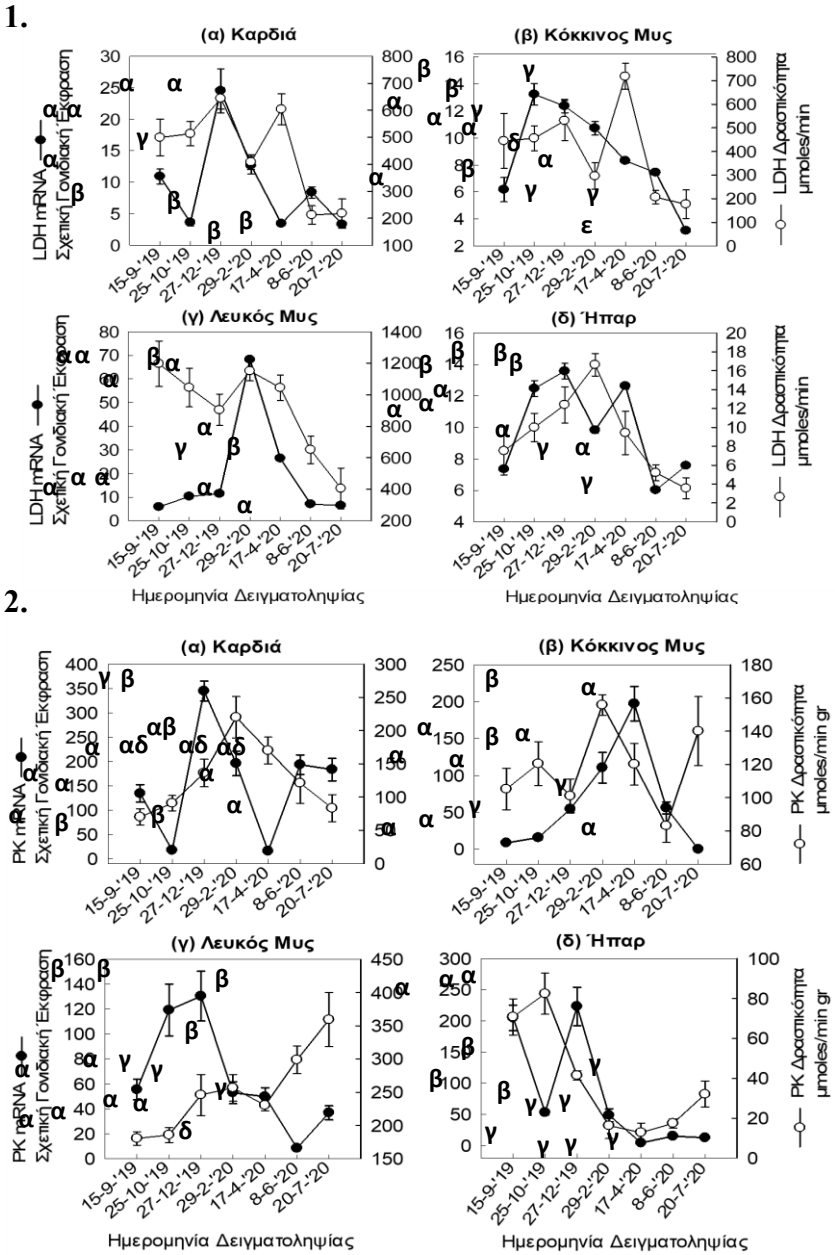
Αποτελέσματα

Το γονίδιο L-LDH στην καρδιά εμφάνισε τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης τον Δεκέμβριο. Η δραστικότητα του ενζύμου L-LDH έδειξε μειωμένη δραστικότητα τον Φεβρουάριο (Εικ.1α). Στον ερυθρό μυ, η έκφραση αυξήθηκε από τον Σεπτέμβριο έως τον Οκτώβριο σε αντίθεση με τον λευκό μυ στον οποίο παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση τον Φεβρουάριο. Ωστόσο, η δραστικότητα του ενζύμου στον ερυθρό μυ παρουσίασε απότομη αύξηση τον Απρίλιο (Εικ.1β). Στο λευκό μυ η ενζυμική δραστικότητα της L-LDH παρουσίασε πτώση από τον Φεβρουάριο έως τον Ιούλιο (Εικ.1γ). Στο ήπαρ, η έκφραση του γονιδίου L-LDH έδειξε μικρή αύξηση από τον Σεπτέμβριο έως τον Δεκέμβριο και η δραστικότητα του ενζύμου L-LDH αυξήθηκε από τον Σεπτέμβριο έως τον Φεβρουάριο (Εικ.1δ). Το γονίδιο PK εμφάνισε υψηλές τιμές τον Δεκέμβριο στην καρδιά ενώ η δραστικότητα του ενζύμου PK έδειξε αύξηση από τον Σεπτέμβριο έως τον Φεβρουάριο (Εικ.2α). Στον ερυθρό μυ η έκφραση αυξήθηκε σημαντικά από τον Σεπτέμβριο έως τον Απρίλιο και στο λευκό μυ παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση από τον Σεπτέμβριο έως τον Δεκέμβριο (Εικ.2β & Εικ.2γ) Ωστόσο, η δραστικότητα του ενζύμου PK στον ερυθρό μυ αυξήθηκε από τον Δεκέμβριο έως τον Φεβρουάριο και παρουσίασε έντονη αύξηση τον Ιούλιο. (Εικ.2β). Στο λευκό μυ η δραστικότητα του ενζύμου PK αυξήθηκε σταδιακά μέχρι τον Ιούλιο (Εικ.2γ) και στο ήπαρ παρατηρήθηκε πτώση από τον Οκτώβριο έως τον Φεβρουάριο (Εικ.2δ).

Συζήτηση

Η δραστικότητα του ενζύμου L-LDH και του PK αυξήθηκαν στον ερυθρό μυ τον Απρίλιο, στοιχείο που υποδηλώνει ενίσχυση του αναερόβιου μεταβολισμού. Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί σε διαφορετικά είδη ψαριών σε αύξηση της θερμοκρασίας (Iftikar et al., 2014). Η μειωμένη έκφραση του γονιδίου L-LDH και του γονιδίου PK υποδηλώνουν μείωση του αερόβιου μεταβολισμού. Στο λευκό μυ, που είναι ο βασικός αναερόβιος μυς (Hochachka & Somero, 2002), η δραστικότητα του ενζύμου L-LDH παρουσίασε απότομη αύξηση τον Απρίλιο και το ένζυμο PK αυξήθηκε τον Ιούλιο. Αυτό το αποτέλεσμα ενισχύει τη θεωρία πως οι μύες χρησιμοποιούν αναερόβιο μεταβολισμό για διατήρηση της ενέργειας σε υψηλές θερμοκρασίες (Hochachka & Somero, 2002). Επίσης, στην καρδιά παρατηρήθηκε αύξηση του γονιδίου L-LDH και του γονιδίου PK τον Δεκέμβριο. Πιθανόν η γλυκόζη να αυξήθηκε μέσω του αναερόβιου μεταβολισμού στην καρδιά και να μεταφέρθηκε σε άλλους ιστούς (ήπαρ) μέσω του αίματος. Σε άλλες μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι γαλακτικό οξύ παράγεται σε συνθήκες υποξίας στην καρδιά (Becker et al., 2013) και ότι τα περισσότερα είδη ψαριών χρησιμοποιούν τον αναερόβιο

μεταβολισμό της καρδιάς για να υποστηρίξουν την παραγωγή γαλακτικού οξέος (Gamperl and Driedzic, 2009).



Εικόνα 1. Η έκφραση και η ενζυμική δραστικότητα της αφυδρογονάσης του γαλακτικού οξέος (L-LDH) και της κινάσης του πυροσταφυλικού οξέος (PK) στους ιστούς (α) καρδιά, (β) ερυθρό μυ, (γ) λευκό μυ και (δ) ήπαρ στο είδος *Sparus aurata*.

Βιβλιογραφία

Becker, T.A. DellaValle, B. Gesser, H. & Rodnick, K.J. (2013). Limited effects of exogenous glucose during severe hypoxia and a lack of hypoxia-stimulated glucose uptake in isolated rainbow trout cardiac muscle. Journal of Experimental Biology, 216: 3422-3342.

Driedzic, W.R. &Almeida-Val, V.M.F. (1996). Enzymes of cardiacenergy metabolism in Amazonian teleosts and the fresh-waterstingray (*Potamotrygon hystrix*). Journal of Experimental Biology, 274: 327–333.

Enconomio, V. & Chu, F.L. (2000). The effect of PCBs on glycogen reserves in the eastern Oyster *Crasostrea virginica*. Marine Environmental Research, 50:45-9.

Gamperl, A.K. & Driedzic, W.R. (2009). Cardiovascular function and cardiac metabolism during environmental hypoxia. In Fish Physiology, Vol. 27 (ed. J.G. Richards, A.P. Farrell and C. J. Brauner), pp. 301-360. London: Elsevier.

Hochachka, P.W. & Somero, G.N. (2002). Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. New York: Oxford University Press.

Hunter-Manseau, F. Desrosiers, V. Le François, N.R. Dufresne, F. Detrich, H.W. Nozais, C. & Blier, P.U. (2019). From Africa to Antartica: Exploring the metabolicm of fish heart mitochondria across a wide thermal range. Front. Physiol, 10.

Iftikar FI, MacDonald, JR, Baker, D.W. Renshaw, G.M.C. & Hickey, J.R. (2014). Could thermal sensitivity of mitochondria determine species distribution in a changing climate? Journal of Experimental Biology, 217:2348-2357.

Kaitetzidou, E. Chatzifotis, S. Antonopoulou, E. & Sarropoulou, E. (2015). Identification, Phylogeny, and Function of fabp2 Paralogs in Two Non-Model Teleost Fish Species. Marine Biotechnology, 17(5).

Parra-Bonilla, G. Alvarez, D.F. Al-Mehdi, A.B. Alexeyev, M. & Stevens, T. (2010). Critical role for lactate dehydrogenase A in aerobic glycolysis that sustains pulmonary microvascular endothelial cell proliferation. American Journal of Physiology Lung. Cellular and Molecular Physiology (4): L513-22.

Pörtner H-O, Langenbuch, M. & Reipschläger, A. (2004). Biological impact of elevated ocean CO2 concentrations: Lessons from animal physiology and earth history. JOMS, 60: 705-718.

Selye, H. (1976). Stress in Health and disease 1st Edition. eBook ISBN: 9781483192215

Χρηματοδότηση

Το ερευνητικό έργο χρηματοδοτήθηκε από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ.) στο πλαίσιο του οποίου εκπονείται η διδακτορική διατριβή (Αριθμός Υποτροφίας: 750).

Το δυναμικό της μιτοχονδριακής αναπνοής του θερμικά "hardened" είδους Mytilus galloprovincialis

ΓΕΩΡΓΟΥΛΗΣ Ιωάννης[1], ΦΕΙΔΑΝΤΣΗΣ Κωνσταντίνος[1], ΓΙΑΝΤΣΗΣ Ιωάννης Α.[2], ΚΑΚΑΛΕ Ασημίνα[1], BOCK Christian[3], PORTNER Hans O.[3], SOKOLOVA Inna M[4], ΜΙΧΑΗΛΙΔΗΣ Βασίλειος[1]

1.Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων, Τομέας ΖωολογίαςDepartment of Zoology, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 54124 Θεσσαλονίκη,
georgoim@bio.auth.gr, kfeidant@bio.auth.gr, kakalesemina@gmail.com, michaeli@bio.auth.gr
2. Τομέας Ζωικών Επιστημών, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Μακεδονίας, 53100 Φλόρινα, igiants@agro.auth.gr
3.Alfred-Wegener-Institut, Helmholtz-Center for Polar and Marine Research, Integrative Ecophysiology, Postfach 120161, 27515 Bremerhaven, Germany, christian.bock@awi.de, hans.poertner@awi.de
4Department of Marine Biology, Institute for Biological Sciences, University of Rostock, A.-Einstein Str., 3, 18055 Rostock, Germany, inna.sokolova@uni-rostock.de

Περίληψη
Η θερμική ανοχή των ποικιλόθερμων οργανισμών μπορεί να αυξηθεί μετά από μια σύντομη έκθεση σε υποθανάτιες θερμοκρασίες, μια διαδικασία γνωστή ως "hardening". Στη παρούσα μελέτη, εξετάσαμε αυτή την ικανότητα του *Mytilus galloprovincialis* υπό την επίδραση υψηλών θερμοκρασιών (24, 26 και 28 °C). Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι το "hardening" μπορεί να αυξήσει την θερμοανθεκτικότητα, αντικατοπτρίζοντας ενισχυμένη μιτοχονδριακή δραστικότητα, μεταφορά οξυγόνου και αερόβια ικανότητα.

Λέξεις-κλειδιά:
θερμικό "hardening", θερμική καταπόνηση, μιτοχονδριακή αναπνοή, *Mytilus galloprovincialis*

Εισαγωγή

Η παγκόσμια αύξηση της θερμοκρασίας λόγω της κλιματικής αλλαγής, επηρεάζει τους θαλάσσιους οργανισμούς σε όλα τα επίπεδα της βιολογικής τους οργάνωσης (Hochachka & Somero 2002, Pörtner 2021). Πιο συγκεκριμένα, προηγούμενες μελέτες για το είδος *Mytilus galloprovincialis*, έχουν αποδείξει ότι η αύξηση της θαλάσσιας θερμοκρασίας πέρα από τους 24ºC προκαλεί οξειδωτική καταπόνηση, οδηγώντας σε ενεργειακή αναντιστοιχία, μεταβολική κατάπτωση και μεταστροφή από αερόβιο σε αναερόβιο μεταβολισμό, ενώ περαιτέρω αύξηση πέρα των 26°C-27°C αυξάνει την θνησιμότητα (Anestis et al. 2007, Feidantsis et al. 2020).

Η επαναλαμβανόμενη έκθεση ενός οργανισμού σε μια καταπόνηση θα μπορούσε να δημιουργήσει «μνήμη στρες» προκαλώντας ταχύτερη και πιο αποτελεσματική απόκριση σε μελλοντικές καταπονήσεις. Αυτό μπορεί να προκαλέσει εξαρτώμενη από το ερέθισμα πλαστικότητα, οδηγώντας σε φαινοτυπικές προσαρμογές της φυσιολογίας και της ανάπτυξης (Agrawal 2001, Ding, Fromm & Avramova 2012, Hilker at al. 2016, West-Eberhard 2003). Το θερμικό "hardening" ορίζεται ως μια ταχεία ευεργετική απόκριση, η οποία βελτιώνει την θερμοανθεκτικότητα αμέσως μετά την έκθεση του οργανισμού σε υποθανάτιες θερμοκρασίες (Bilyk, Clive & DeVries 2012, Bowler 2005, Precht 1973).

Στόχος της παρούσας έρευνας είναι η διερεύνηση της ικανότητας του θερμικού "hardening, του είδους *Mytilus galloprovincialis*, να αυξάνει την θερμική ανθεκτικότητα. Για το σκοπό αυτό θα μελετηθούν η μεταγραφική και η μετα-μεταγραφική ρύθμιση των μονοπατιών του μιτοχονδριακού ενεργειακού μεταβολισμού που εμπλέκονται στο φαινόμενο αυτό.

Μεθοδολογία

Ζώα

Μύδια *M. galloprovincialis* μάζας 25.82 ± 4.62 g και μήκος κελύφους 3.2 ± 0.15 cm συλλέχθηκαν από τοπική μυδοκαλλιέργεια, και μεταφέρθηκαν σε δεξαμενές 1000L σε θερμοκρασία νερού 18 °C ± 0.5 για 1 εβδομάδα για να εγκλιματιστούν.

Πειραματικός σχεδιασμός

Το πειραματικό μέρος διεξήχθη σε δύο φάσεις (θερμικό "hardening" και εγκλιματισμός).

Φάση θερμικού "hardening":. Ο πειραματικός σχεδιασμός βασίστηκε στη μέθοδο "Repeated-Critical Thermal Maxima (CTM)" του Hutchison (1961), με μικρές τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, ~200 μύδια μεταφέρθηκαν σε πλήρως αεριζόμενα, ειδικά διαμορφωμένα ενυδρεία με θερμοκρασία νερού στους 18°C, και εγκλιματίστηκαν για 1 εβδομάδα. Αρχικά η θερμοκρασία του νερού αυξήθηκε με ρυθμό 1,5^{o}C/min μέχρι τους 27^{o}C και τα ζώα παρέμειναν για 2,5 ώρες. Στη συνέχεια η θερμοκρασία μειώθηκε ξανά στους 18^{o}C και παρέμειναν για ανάρρωση 24 ώρες. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε συνολικά τέσσερις φορές. Τα μύδια αυτά ονομάστηκαν μύδια "hardened", ενώ τα υπόλοιπα μύδια που δεν χρησιμοποιήθηκαν ονομάστηκαν μύδια "non-hardened".

Φάση εγκλιματισμού: Μύδια "non-hardened" και μύδια "hardened" μεταφέρθηκαν σε τέσσερις νέες δεξαμενές με θερμοκρασία στους 18°C και παρέμειναν για 1 εβδομάδα για να εγκλιματιστούν. Στη συνέχεια, η θερμοκρασία των τριών δεξαμενών αυξήθηκε (1°C/ώρα) στους 24, 26 και 28°C, αντίστοιχα. Η τέταρτη δεξαμενή παρέμεινε στους 18°C και τα μύδια χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου. Δειγματοληψίες ιστών μανδύα πραγματοποιήθηκαν από κάθε δεξαμενή, και από τις 2 ομάδες μυδιών, στις 12 ώρες, 1, 3, 5, 10 και 15 ημέρες, καταψύχθηκαν σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκαν στους -80°C για μεταγενέστερη ανάλυση.

Πειραματικές και στατιστικές αναλύσεις

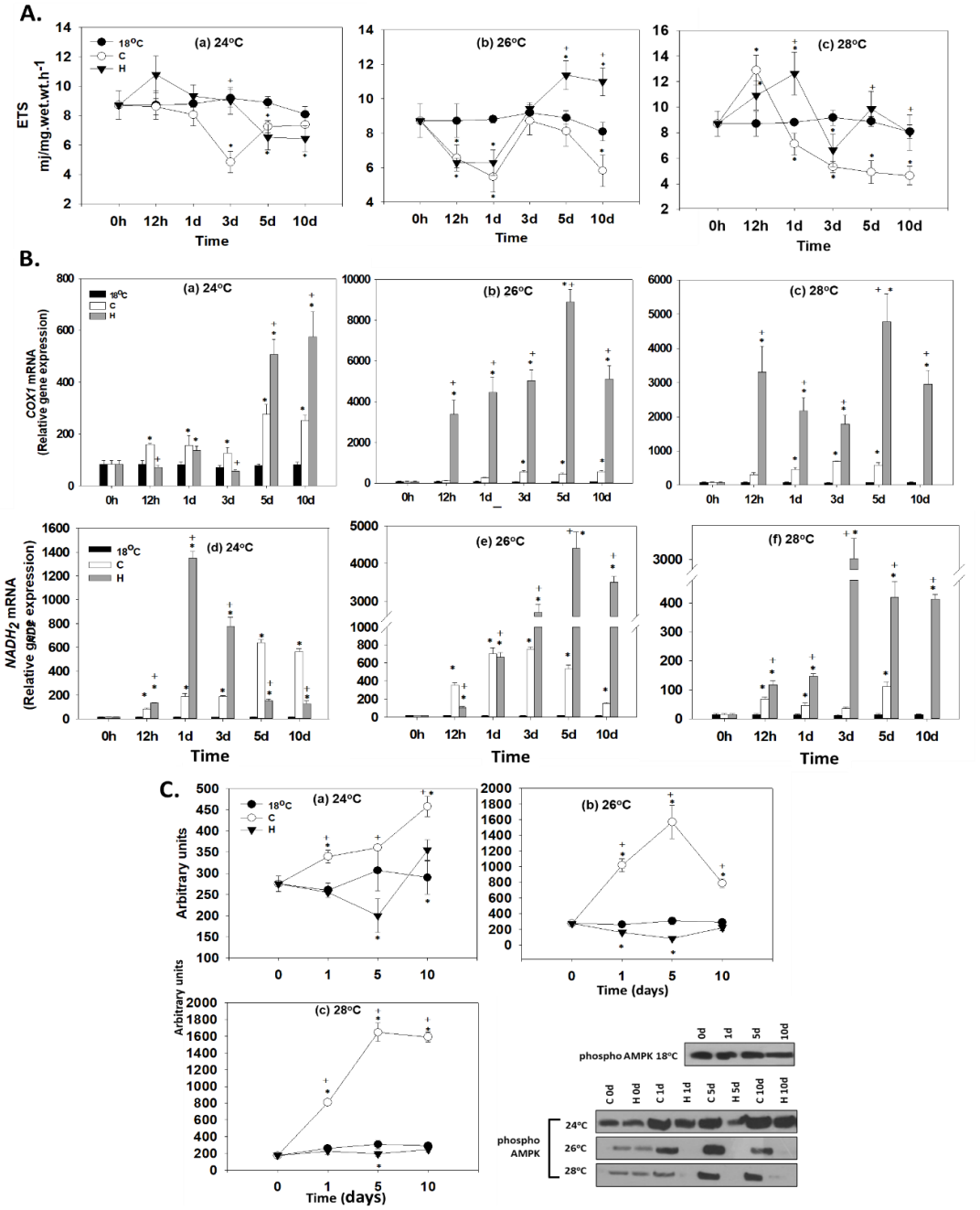
Πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις της έκφρασης των γονιδίων στόχων *COX1* και *NADH dehydrogenase subunit 2 (ND-2)* μέσω ποσοτικής real-time PCR, του ποσοτικού προσδιορισμού της phospho-AMPK μέσω SDS/PAGE / immunoblot ανάλυσης, καθώς και του προσδιορισμού της δραστικότητας του Electron Transfer System (ETS) σύμφωνα με τους Haider et al. (2018). Οι μεταβολές των παραπάνω δεικτών ελέγχθηκαν ως προς την σημαντικότητά τους σε επίπεδο 5% χρησιμοποιώντας one way ή two-way ANOVA, ανάλογα με τον αριθμό των παραγόντων που ελέγχονται κάθε φορά.

Αποτελέσματα

Σε όλες τις αυξημένες θερμοκρασίες (24, 26 και 28^{o}C) η δραστικότητα ETS μειώνεται σημαντικά στα μύδια "non-hardened" από τις πρώτες ώρες έκθεσης σε σχέση με τους 18^{o}C, σε αντίθεση με τα μύδια "hardened" που παρουσιάζουν παρόμοια ή ακόμα και αυξημένη δραστικότητα ETS (Εικ. 1A)

Επίσης παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης των γονιδίων *COX1* και *ND2*, και στις δυο υπό μελέτη ομάδες μυδιών, από τις πρώτες ώρες έκθεσης (Εικ. 1B). Πιο συγκεκριμένα, στους 24^{o}C, στα μύδια "hardened" παρατηρείται υψηλότερη έκφραση του *COX1* από την μετά την 5^{η} ημέρα έκθεσης καθώς και υψηλότερη έκφραση του *ND2* στις 3 πρώτες μέρες σε σχέση με τα μύδια "non-hardened", ενώ και τα 2 γονίδια παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερες εκφράσεις από τις πρώτες ώρες έκθεσης στους 26 και 28^{o}C.

Τέλος τα επίπεδα της phosphor AMPK, των "non-hardened" μυδιών είναι σημαντικά αυξημένα από τις πρώτες ώρες έκθεσης σε όλες τις υπό μελέτη θερμοκρασίες σε σχέση με τους 18oC, ενώ τα μύδια "hardened" διατηρούν χαμηλά επίπεδα, όμοια με αυτά των 18oC (Εικ. C).



Εικόνα 1. Αλλαγές στη (A) τη δραστηριότητα ETS, (B) στην σχετική έκφραση mRNA των *COX1* και *ND-2* και (C) στα επίπεδα φωσφορυλίωσης AMPK στον μανδύα των θερμικά "hardened" (H) και "non-hardened" (C) μυδιών *Mytilus galloprovincialis* όταν εκτίθεται στους 24°C (a,d), 26°C (b,e) και 28°C (c,f) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου στους 18°C. *p < 0,05 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 18°C, +p < 0,05 σε σύγκριση μεταξύ "hardened" (H) και "non-hardened" (C) μύδια.

Συζήτηση

Η αυξημένη δραστικότητα του ETS, καθώς και τα αυξημένα επίπεδα μεταγραφικής έκφρασης των μιτοχονδριακών υπομονάδων *ND2* και *COX1* στις αυξημένες θερμοκρασίες, θα μπορούσε εν μέρει να αποδοθεί στην βελτίωση της μιτοχονδιακής αναπνοής λόγω της ενισχυμένης θερμοανθεκτικότητας των μυδιών που έχουν υποστεί το θερμικό "hardening". Αντίθετα, στα μύδια "non-hardened" τόσο η μεταγραφική έκφραση όσο και η ενζυμική δραστικότητα των παραπάνω, παραμένουν σε χαμηλότερα επίπεδα. Η ενισχυμένη μιτοχονδριακή δραστικότητα των μυδιών "hardening" ενισχύει την μεταφορά του οξυγόνου, οδηγώντας σε αυξημένη αερόβια ικανότητα και σύνθεση ATP για την κάλυψη των

υψηλών ενεργειακών αναγκών λόγω της αυξημένης θερμοκρασίας, μετριάζοντας έτσι το ενεργειακό στρες και υποστηρίζοντας την ενεργειακή ομοιόσταση (Sokolova 2013, 2021). Επιπλέον, η φωσφορυλίωση της AMPK αποτελεί αισθητήρα υποξίας και διαταραχής της ομοιόστασης του ATP (Hardie 2011). Τα χαμηλά επίπεδα φωσφορυλίωσης AMPK των μυδιών "hardening", υποδεικνύουν χαμηλότερη ευαισθησία στις αυξημένες θερμοκρασίες, διατήρηση του ενεργειακού δυναμικού και πιθανώς ενίσχυση της αερόβιας ικανότητας.

Βιβλιογραφία

Agrawal, A.A. (2001). Phenotypic plasticity in the interaction and evolution of species. *Science*, 294, 321–326

Anestis, A., Lazou, A., Portner, H. O. & Michaelidis, B. (2007). Behavioral and metabolic, and molecular stress responses of marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* during long-term acclimation at increasing ambient temperature. *American Journal of Physiology*, 293, R911–R921

Bowler, K. (2005). Acclimation, heat shock and hardening. *Journal of Thermal Bioogy*, 30, 125–130.

Bilyk, K.T., Clive, W.E. & DeVries, A.L. (2012). Heat hardening in Antarctic notothenioid fishes. *Polar Biology*. 35, 1447–1451

Ding, Y., Fromm, M. & Avramova, Z. (2012). Multiple exposures to drought 'train' transcriptional responses in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, 3, 1–9

Feidantsis, K., Giantsis, I.A., Vratsistas, A., Makri, S., Pappa, A.Z., Drosopoulou, E., Anestis, A., Mavridou, E., Exadactylos, A., Vafidis, D. & Michaelidis, B. (2020). Correlation between intermediary metabolism, Hsp gene expression, and oxidative stress-related proteins in long-term thermal-stressed *Mytilus galloprovincialis*. *American Journal of Physioogy*, 319, R264–R281

Hardie, D.G. (2011). AMP-activated protein kinase—An energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes & Development*, 25(18), 1895–1908

Hilker, M., Schwachtje, J., Baier, M., Balazadeh, S., Bäurle, I., Geiselhardt, S., Hincha, D.K., Kunze, R., Mueller-Roeber, B., Rillig, M.C., Rolff, J., Romeis, T., Schmülling, T., Steppuhn, A., van Dongen, J., Whitcomb, S. J., Wurst, S., Zuther, E. & Kopka, J. (2016). Priming and memory of stress responses in organisms lacking a nervous system. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 91(4)

Hochachka, P.W. & Somero, G.N. (2002). *Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution*. Oxford, New York. Oxford University Press.

Hutchison, V.H. (1961). Critical thermal maxima in salamanders. *Physiological and Biochemical Zoology*, 34, 92-125

Pörtner, H.O. (2021). Climate impacts on organisms, ecosystems and human societies: Integrating OCLTT into a wider context. *Journal of Experimental Biology*, 224, jeb238360

Precht, H. (1973). In *Temperature and Life* (edsPrecht, H. *et al.*), 302–348.

Sokolova, I. (2021). Bioenergetics in environmental adaptation and stress tolerance of aquatic ectotherms: Linking physiology and ecology in a multi-stressor landscape. *Journal of Experimental Biology*, 224(1), jeb236802

Sokolova, I.M. (2013). Energy-limited tolerance to stress as a conceptual framework to integrate the effects of multiple stressors. *Integrative and Comparative Biology*, 53(4), 597–608

West-Eberhard, M.J. (2003). *Developmental Plasticity and Evolution*. Oxford University Press, New York.

ΣΥΝΕΔΡΙΑ 2

ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΕΣ

Παντερής Εμμανουήλ-Νικόλαος,
Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
Νικήτα Βενετία,
ΕΔΙΠ, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Σύγχρονη εκπαιδευτική αξιοποίηση του έργου της Mary Anning

ΛΥΡΑΚΗΣ[1] Σταύρος, ΓΕΩΡΓΙΟΥ[2] Μάρθα, ΣΚΟΡΔΟΥΛΗΣ[3] Κωνσταντίνος
[1]Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο, std150361@ac.eap.gr
[2]Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, martgeor@biol.uoa.gr
[3]Παιδαγωγικό Τμήμα Δημοτικής Εκπαίδευσης, ΕΚΠΑ, kskordul@primedu.uoa.gr

Περίληψη
Οι ανακαλύψεις της Mary Anning έπαιξαν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της επιστήμης της Παλαιοντολογίας αν και η συνεισφορά της στην Επιστήμη αναγνωρίστηκε πολύ πρόσφατα. Σήμερα, υπάρχει πλούσια βιβλιογραφία για τη ζωή και το έργο της που έχει αξιοποιηθεί και για εκπαιδευτικούς σκοπούς. Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται οι διαφορετικές διδακτικές προτάσεις που έχουν γίνει διεθνώς και βασίζονται στο έργο της Mary Anning.

Λέξεις-κλειδιά
Mary Anning, εκπαίδευση, ιστορία της επιστήμης, φύση της επιστήμης

Εισαγωγή

Η Mary Anning ήταν Βρετανίδα συλλέκτρια απολιθωμάτων που έζησε και δραστηριοποιήθηκε στο πρώτο μισό του 19ου αιώνα στην περιοχή Lyme Regis της νοτίου Αγγλίας. Οι ανακαλύψεις της συνέβαλαν σημαντικά στην ανάπτυξη της Παλαιοντολογίας αλλά πάρα τη σπουδαιότητά τους, πέρασαν πολλές δεκαετίες μέχρι να αναγνωριστεί η συνεισφορά της Anning στην Επιστήμη (Davis 2012). Αν και το φύλο της στάθηκε σημαντικό εμπόδιο στην επιστημονική της δημοτικότητα, τα τελευταία χρόνια έχουν γραφτεί πολλά βιβλία για το έργο της και οι μέθοδοι και τα ευρήματά της αξιοποιούνται ακόμη και σε σχολικό επίπεδο.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να συγκεντρωθούν και να αναδειχτούν οι ποικίλοι τρόποι αξιοποίησης του έργου της Mary Anning στην εκπαίδευση.

Εκπαιδευτική αξιοποίηση του έργου της Mary Anning

Η Παλαιοντολογία είναι μία επιστήμη, που εκτός των άλλων Φυσικών Επιστημών (ΦΕ), σχετίζεται έντονα με τη Βιολογία και πιο συγκεκριμένα με την Εξέλιξη. Είναι γνωστός άλλωστε ο ρόλος και η συμβολή των απολιθωμάτων στον τομέα αυτό. Λαμβανομένης υπόψη της δυσκολίας που έχουν οι μαθητές στην κατανόηση, μάθηση αλλά ενίοτε και αποδοχή της θεωρίας της Εξέλιξης μέσω φυσικής επιλογής (Athanasiou, Katakos & Papadopoulou 2012), το παράδειγμα της Anning θα μπορούσε να αποτελεί μία πρόταση βελτίωσης των αντίστοιχων μαθησιακών αποτελεσμάτων. Ταυτόχρονα τα ευρήματά της θα μπορούσαν να συμβάλουν σε διαθεματικούς σχεδιασμούς βρίσκοντας εφαρμογές σε όλες τις ΦΕ.

Ακολούθως περιγράφονται διάφοροι τρόποι με τους οποίους μπορεί να διανθιστεί η διδασκαλία των ΦΕ στη σχολική τάξη, όπως έχουν ήδη προταθεί διεθνώς από επιστήμονες της εκπαίδευσης.

Παράλληλο κείμενο

Το παράλληλο κείμενο συνοδεύει συχνά ένα κύριο ανάγνωσμα στοχεύοντας στην καλύτερη κατανόησή του (multiple text comprehension) και αναφέρεται στη διαδικασία μέσω της οποίας οι μαθητές κατανοούν σύνθετα ζητήματα και έννοιες όχι από μια μόνο πηγή αλλά αξιοποιώντας διαφορετικά κείμενα (Rouet 2006).

Η ζωή και το έργο της Mary Anning συνδέει τη λογοτεχνία με τις ΦΕ μέσα από την ανάγνωση της βιογραφίας όπως στο βιβλίο *The Dragon in the Cliff: A Novel Based on the Life of Mary Anning*. Η

σύνδεση λογοτεχνίας και επιστήμης παρέχει στους μαθητές πρόσβαση σε ακριβείς επιστημονικές πληροφορίες μέσα σε κείμενο φιλικό προς τον αναγνώστη αναδεικνύοντας την αξιοποίηση των ιστορικών στοιχείων της επιστήμης (Lapp, Flood & Ranck-Buhr 1995).

Έτσι μια επίπονη διαδικασία για τους μαθητές, όπως η μελέτη παράλληλων κειμένων, που απαιτεί τη διαχείριση ενός μεγαλύτερου, ποσοτικά, όγκου πληροφοριών σε σχέση με την επεξεργασία ενός μόνο κειμένου καταλήγει πιο ευχάριστη και ταυτόχρονα πιο εποικοδομητική. Ωστόσο απαιτούνται και ποιοτικά διαφορετικές διεργασίες για αυτό το νοητικό εγχείρημα πράγμα που μαρτυρά την ενίσχυση της κριτικής σκέψης των μαθητών (Wiley, et al. 2009). Αν αναλογιστούμε πως το σχολικό εγχειρίδιο συμπιέζει μεγάλη ύλη και παρουσιάζει συμπυκνωμένα τα επιστημονικά δεδομένα, αντιλαμβανόμαστε ότι συχνά δε δίνονται επαρκείς πληροφορίες στους μαθητές για την πορεία της επιστημονικής σκέψης εκκινώντας από τα επιστημονικά φαινόμενα έως τα αποτελέσματα μίας έρευνας, πράγμα που είναι ουσιώδες συστατικό του τρόπου λειτουργίας και εξέλιξης της επιστήμης (Strømsø, Braten & Britt 2010).

Κατασκευή διοραμάτων

Τα διοράματα στη βιολογία είναι κατασκευές στις οποίες απεικονίζονται οργανισμοί στο φυσικό τους περιβάλλον. Πιο συγκεκριμένα απεικονίζουν ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς μέσα σε ένα οικοσύστημα. Επιπλέον, απεικονίζουν τη δράση των επιστημόνων στο πεδίο και προσφέρουν εξαιρετικές δυνατότητες όταν χρησιμοποιούνται σαν εργαλεία μάθησης (Reiss & Tunnicliffe 2011).

Ο σκοπός τους στη διδασκαλία, κυρίως όταν κατασκευάζονται από τους μαθητές, είναι να προάγουν την κατανόηση της ιστορίας της επιστήμης μέσα από τα γεγονότα που διηγείται κάθε διόραμα (McGregor & Gadd 2019). Υποστηρίζεται ότι η συνεργασία μεταξύ των μαθητών για να επιτύχουν έναν κοινό σκοπό, αυτόν της κατασκευής διοραμάτων, παρέχει μια χρήσιμη μαθησιακή εμπειρία για όλους. Προς αυτή την κατεύθυνση, η επιλογή μιας συγκεκριμένης διάστασης του θέματος που πραγματεύεται το διόραμα μπορεί να προσελκύσει το ενδιαφέρον του θεατή προς το διόραμα (Falk et al. 2004).

Στη μελέτη των McGregor και Gadd (2019), τα τρία διοράματα με θέμα τη Mary Anning περιλάμβαναν διάφορες σκηνές που περιγράφουν τη δράση της στο πεδίο. Στο πρώτο απεικονίζεται η ίδια στην παραλία. Δίπλα της βρίσκεται ο σκύλος που διατηρούσε ως κατοικίδιο ενώ γύρω της υπάρχουν κοχύλια που συμβολίζουν τα απολιθώματα. Στο δεύτερο παρέχονται οι επιπλέον απεικονίσεις ενός ιχθυόσαυρου καθώς και της παραθαλάσσιας τοποθεσίας όπου ανακαλύφθηκε ο σκελετός του. Το τρίτο επικεντρώνεται στη θάλασσα, στην παραλία και στον οικότοπο στην άκρη του γκρεμού. Η κατασκευή και η επεξεργασία της γραφικής απεικόνισης που παρείχαν τα διοράματα πενταπλασίασε την κατανόηση του τρόπου με τον οποίο εργαζόταν η Anning ανάμεσα στην ομάδα μαθητών που τα κατασκεύασε.

Τεχνική Interactive Historical Vignette (IHV)

Η τεχνική IHV είναι μια προσεκτικά σχεδιασμένη και επιστημονικά ακριβής ολιγόλεπτη εξιστόρηση ενός γεγονότος από τη ζωή ενός διάσημου επιστήμονα. Η επιλογή εξαρτάται από το θέμα που διδάσκεται και ο σχεδιασμός της δομής του προσφέρει ερεθίσματα στους μαθητές τόσο να συζητήσουν μεταξύ τους και με το διδάσκοντα όσο και να αναζητήσουν περισσότερες πληροφορίες για τον διάσημο επιστήμονα στον ελεύθερο χρόνο τους (Wandersee 1992).

Η τεχνική IHV έχει διπλό στόχο. Ο πρώτος είναι να δοθεί έμφαση στα ανθρώπινα χαρακτηριστικά της επιστήμης. Η ιστορία της επιστήμης είναι οι ιστορίες των ανθρώπων που συνεισέφεραν στην επιστημονική γνώση. Ο δεύτερος είναι να αναδειχθεί η διαδικασία της επιστήμης παρά τα αποτελέσματά της. Στην εκπαίδευση, συχνά δίνεται έμφαση στη γνώση που προσφέρει η επιστήμη σε βάρος της φύσης της επιστήμης (Wandersee & Roach 1995).

Έχει προταθεί ένα παράδειγμα της τεχνικής IHV βασισμένο στη ζωή της Mary Anning από τους Clary και Wandersee (2006). Το σενάριο περιγράφει μια συνομιλία μεταξύ της Anning και του De La Beche που περιστρέφεται γύρω από τους βελεμνίτες (εξαφανισμένοι πλέον οργανσμοί της ομοταξίας των

Κεφαλοπόδων). Η Anning του εξιστορεί την ιδέα της να πραγματοποιήσει τομές για να αποκαλύψει το εσωτερικό τους. Αυτή η ιδέα τελικά οδήγησε στην ανακάλυψη ότι οι βελεμνίτες διέθεταν μελανοφόρο σάκο. Δίνεται έμφαση στο συσχετισμό του αποξηραμένου μελανιού, που είχε ήδη παρατηρήσει σε απολιθώματα με το μελανοφόρο σάκο που διαθέτουν σύγχρονοι ζωικοί οργανισμοί. Κατά τη διάρκεια του διαλόγου παρεμβάλλονται ερωτήσεις προς τους μαθητές αναφορικά με τον τρόπο σκέψης ενός επιστήμονα. Επιπλέον, είναι εμφανής ο συσχετισμός των ευρημάτων της Anning με την εξελικτική διαδικασία. Με το πέρας του διαλόγου, προτείνεται περαιτέρω συζήτηση με θέμα τη σύγκριση των τρόπων με τους οποίους εργάζονταν οι επιστήμονες εκείνης της εποχής σε σχέση με τους σημερινούς επιστήμονες.

Συμπεράσματα

Η Mary Anning παρόλο που δεν έτυχε επιστημονικής αναγνώρισης εν ζωή, αποτελεί μέσα από το έργο της μία σπουδαία πηγή ενίσχυσης της γνώσης των μαθητών τόσο γύρω από ζητήματα Βιολογίας, όπως η Εξέλιξη μέσω φυσικής επιλογής, όσο και γύρω από ζητήματα ΦΕ γενικότερα. Η εκπαιδευτική αξιοποίηση του έργου της μάλιστα, σχετίζεται άμεσα με την κατανόηση της φύσης της επιστήμης και τη συμβολή της ιστορίας της, που αποτελούν εξάλλου σπουδαίες μαθησιακές επιδιώξεις της σύγχρονης εκπαίδευσης.

Βιβλιογραφία

Athanasiou, K., Katakos, E., & Papadopoulou, P. (2012). Conceptual ecology of evolution acceptance among Greek education students: the contribution of knowledge increase. *Journal of Biological Education*, *46*(4), 234-241.

Clary, R., & Wandersee, J. (2006). Mary Anning: She's More Than "Seller of Sea Shells at the Seashore". *The American Biology Teacher, 68*(3), pp. 153-157. doi:https://doi.org/10.1662/0002-7685(2006)68[153:MASMTS]2.0.CO;2

Davis, L. (2012). Mary Anning: Princess of Palaentology and Geological Lioness. *The Compass: Earth Science Journal of Sigma Gamma Epsilon, 84*(1), pp. 56-88.

Falk, J., Scott, C., Dierking, L., Rennie, L., & Cohen Jones, M. (2004). Interactives and Visitor Learning. *Curator, 47*(2), pp. 171-198. doi:https://doi.org/10.1111/j.2151-6952.2004.tb00116.x

Lapp, D., Flood, J., & Ranck-Buhr, W. (1995). Using Multiple Text Formats To Explore Scientific Phenomena In Middle School Classrooms. *Reading & Writing Quarterly, 11*(2), pp. 173-186. doi:10.1080/1057356950110206

McGregor, D., & Gadd, J. (2019). Constructing and Reviewing Dioramas: Supporting Beginning Teachers to Think About Their Use to Help Children Understand the Work of Natural History Scientists. In A. Scheersoi, & S. Tunnicliffe (Eds.), *Natural History Dioramas - Traditional Exhibits for Current Educational Themes* (pp. 139-157). Cham: Springer.

Reiss, M., & Tunnicliffe, S. (2011). Dioramas as depictions of reality and opportunities for learning in biology. *Curator The Museum Journal, 54*(4), pp. 447-459. doi:https://doi.org/10.1111/j.2151-6952.2011.00109.x

Rouet, J.-F. (2006). *The Skills of Document Use. From Text Comprehension to Web-Based Learning.* New York: Rouledge. doi:https://doi.org/10.4324/9780203820094

Strømsø, H., Braten, I., & Britt, A. (2010). Reading multiple texts about climate change: The relationship betweenmemory for sources and text comprehension. *Learning & Instruction, 20*, pp. 192-204.

Wandersee, J. (1992). The Historicality of Cognition: Implications for Science Education Research. *Journal of Research in Science Teaching, 29*(4), 423-434.

Wandersee, J., & Roach, L. (1995). Putting People Back Into Science: Using Historical Vignettes. *School Science and Mathematics, 95*(7), pp. 365-370.

Wiley, J., Goldman, S., Graesser, A., Sanchez, C., Ash, I., & Hemmerich, J. (2009). Source Evaluation, Comprehension, and Learning in Internet Science Inquiry Tasks. *American Educational Research Journal, 46*(4), 1060-1106.

Μια αλεπού παίζει νέϋ για μια καμηλοπάρδαλη που χορεύει

(2900 π.χ. Μουσείο Ashmolean Οξφόρδη)

ΣΤΑΜΑΤΑΚΗ Χαρά[1], ΜΑΚΡΑΚΗΣ Δημήτρης[2]
1.Μουσικό Σχολείο Ηρακλείου , charastam@gmail.com
2. Μουσικό Σχολείο Ηρακλείου, dinimak@gmail.com

Περίληψη
Η παρούσα εργασία πραγματεύεται τη σύνδεση του περιβάλλοντος με τη μουσική μέσω της αυτοσχέδιας κατασκευής ενός μουσικού οργάνου τύπου νέϋ. Πραγματοποιήθηκε επίσκεψη μαθητών Λυκείου σε περιοχές που αφθονούν τα καλάμια και τα παιδιά είχαν την ευκαιρία να κατασκευάσουν τον καλαμένιο αυλό νέϋ. Η δράση στοχεύει στην ανάδειξη των δυναμικών και ποικιλόμορφων σχέσεων του ανθρώπου με την φύση και την μουσική μέσα από μια βιωματική, διαδραστική εκπαιδευτική διαδικασία.

Λέξεις Κλειδιά
Περιβάλλον, αυτοσχέδιο μουσικό όργανο, νέϋ

Εισαγωγή

Η εκπαίδευση στις μέρες μας είναι μια πολύπλευρη δυναμική διαδικασία, θεμελιώδης για προσωπική και κοινωνική πρόοδο που συμβάλλει στη γνωστική, κοινωνική, συναισθηματική και αισθητική ανάπτυξή του ατόμου (Κοκκίδου 2016). Η εκπαίδευση με θέμα το περιβάλλον, μέσα στο περιβάλλον και για το περιβάλλον συνεισφέρει καθοριστικά στην επανεξέταση των πολυδιάστατων (Καλαχάνης 2007) και απόλυτα δυναμικών σχέσεων μεταξύ του περιβάλλοντος και των πολιτών (Ράπτης 2000). Μέσω αυτής διαμορφώνονται και αναμορφώνονται, αντιλήψεις και στάσεις δίνοντας την δυνατότητα έμπνευσης (Κυριακίδου & Πέτρου 2004)). Σε όλα αυτά η μουσική είναι «η τέχνη και η επιστήμη που ασχολείται με τους ήχους και σκοπός της είναι να εκφράζει, με κατάλληλους συνδυασμούς ήχων, ανθρώπινες ιδέες και συναισθήματα» (Χριστοφίλου 1985). Είναι φορέας πολιτισμού και έκφραση κουλτούρας (Treppiedi 2007), όπου συνυπάρχουν και συνδημιουργούν όλοι χωρίς διακρίσεις, ανασύροντας μνήμες και εμπειρίες, στα πλαίσια μιας μουσικής πολυπολιτισμικής πραγματικότητας (Dillon 2007) και επαναπροσδιορίζουν την θέση τους μέσα στο σχολείο και στην κοινωνία (Stasi 2007). Η οργάνωση ήχων συνδυάζει μελωδία, αρμονία, ρυθμό και ηχόχρωμα, χαρακτηριστικά που αναδύονται ίσως, κατά κύριο λόγο, από τη φύση. Οι ήχοι της φύσης επιδρούν ιδιαίτερα στον εγκέφαλο του ανθρώπου ενεργοποιώντας τον εγκεφαλικό φλοιό με νευρικό δυναμικό (Ετμεκτσόγλου 2016). Σε όλα τα παραπάνω, η κατασκευή μουσικών οργάνων ως εκπαιδευτική πρακτική έχει τεκμηριωμένη παιδαγωγική χρησιμότητα (Τσαφταρίδης 2005). Επίσης, η χρήση φυσικών υλικών για την κατασκευή μουσικών οργάνων υπό την επίδραση ιδεών, πεποιθήσεων και αξίων επιδρά δυναμικά σε μια εξέλιξη (Cuche 2001) που περιβάλλεται από ένα πολιτισμικό πλαίσιο (Σαρρής 2009). Κάθε παιδί αγαπά το αντικείμενο της δικής του κατασκευής και του αρέσει να αυτοσχεδιάζει με αυτό. Έτσι, συνδέοντας το συναίσθημα με τη γνώση, ως εμπειρία, ως έκφραση και επικοινωνία, μπορεί να οδηγηθεί σε μια βαθύτερη κατανόηση της αλληλεπίδρασης περιβάλλοντος και ανθρώπου (Ετμεκτσόγλου 2009).

Φύση και μουσικά όργανα / νέϋ

Η ιστορία των πνευστών μουσικών οργάνων είναι πολύ παλιά. Οι παλαιότερες κατασκευές που έχουν βρεθεί χρονολογούνται γύρω στα 40.000 π.Χ. και είναι τύπου φλογέρας φτιαγμένα από οστό πουλιών και από οστά μαμούθ (Higham et al 2014) και είτε έχουν κατασκευαστεί ως μουσικά όργανα είτε ως χρηστικά αντικείμενα είτε έχουν διαμορφωθεί από φυσικές επεμβάσεις (Τσαφταρίδης 2005). Πέτρες και λίθινες πλάκες, όπως τα διάφορα λιθόφωνα, τα κλαδιά από δένδρα, όπως οι claves-ξυλάκια, οι κούφιοι κορμοί πεσμένων δένδρων, όπως log-drum, οι σταλαγμίτες και οι σταλακτίτες και όστρακα θαλάσσιων ή χερσαίων οργανισμών, όπως όστρακα χελώνας είναι μερικά παραδείγματα (Cooke 2012).

Το καλάμι ή καλαμιά είναι ποώδες μονοκότυλο πολυετές φυτό, με πιθανή καταγωγή την Ασία και θεωρείται ενδημικό φυτό των Μεσογειακών χωρών, όπου συναντάμε συχνά το είδος Arundo donax, ιδανικό για κατασκευή πνευστών. Τα καλάμια βρίσκονται σε έλη, σε όχθες λιμνών και ποταμών, εχουν ριζώματα ή παραφυάδες, τα φύλλα τους είναι μακριά ταινιοειδή και στο πάνω μέρος τους έχουν μία μακριά ταξιανθία. Ο βλαστός τους είναι ξυλώδης συμπαγής ή κοίλος.

Ο όρος «νέϋ» προέρχεται από την αρχαία Περσική λέξη που σημαίνει καλάμι ή μπαμπού. Είναι ένα μακρόστενο πνευστό που συναντάται στις Αραβικές χώρες, το Ιράν και την κεντρική Ασία. Η χρήση του φαίνεται να γίνεται από τους αρχαίους Αιγύπτιους κατά την τρίτη π.Χ. χιλιετηρίδα. Τελετουργική παλέτα του 2900 π.χ. στο μουσείο Ashmolean της Οξφόρδης απεικονίζει μια αλεπού να παίζει νέϋ για μια καμηλοπάρδαλη που χορεύει Στην οθωμανική κλασική μουσική που αναπτύχθηκε και εξελίχθηκε μέσα από τα Σουφικά τάγματα και κυρίως από αυτό των Μεβλεβί που ιδρύθηκε από τον Τ. Ρουμίτον 13^{ο} αιώνα, γίνεται αναφορά στο νέϋ στις μυστικιστικές τελετές των Περιστρεφόμενων Δερβίσηδων. Αποτελεί το βασικό μουσικό όργανο της οθωμανικής κλασικής ή ημι-κλασικής μουσικής, που συμπληρώνεται αργότερα με ταμπουρά, πολίτικη λύρα, κανονάκι, μπεντίρ (Τζάβλα 2020) και ονομαζόταν ορχήστρα «incesaz» (Pennanen 2014).

Κριτήρια επιλογής θέματος / Μεθοδολογία

Η κατασκευή αυλού τύπου νέϋ πραγματοποιήθηκε το σχολικό έτος 2021-2022 από τους μαθητές της Β΄ Τάξη Λυκείου του Μουσικού Σχολείου Ηρακλείου. Αφορμή αποτέλεσαν οι μουσικές δεξιότητες των μαθητών που φοιτούν στο σχολείο και η επιθυμία τους να πραγματοποιηθεί μια δράση που να αφορά τη μουσική, υπό το πρίσμα της σύνδεσης της κατασκευής οργάνων και της επίδρασης του περιβάλλοντος. Ο συνδυασμός αυτός προωθεί συνεργατικές δράσεις, αναδεικνύει πολυεπίπεδα τη σχέση περιβάλλοντος και μουσικής, προσφέρει τη δυνατότητα βιωματικής μάθησης στηριζόμενη στην παρόρμηση, την παρατήρηση και τη δράση (Γεωργόπουλος 2014).

Το καλάμι που υπάρχει σε αφθονία, προσφέρεται για την κατασκευή αυλού. Είναι στρογγυλός σωλήνας κατά κύριο λόγο κούφιος και στα σημεία των κονδύλων μπορεί επίσης να ανοιχτεί εύκολα με ένα σκληρό και λεπτό κλαδί. Μπορεί να δουλευτεί εύκολα ακόμα και με λίθινα εργαλεία (μυτερές πέτρες) και να ανοιχτούν τρύπες ή να λειανθεί το πάνω μέρος όπου γίνεται η παραγωγή του ήχου. Συνηθισμένοι αυλοί από καλάμι είναι το κρητικό θιαμπόλι, η μαντούρα και το νέϋ. Το θιαμπόλι είναι μια φλογέρα όμοια με την ευρωπαϊκή και απαιτεί την κατασκευή σφυρίχτρας στο μέρος που εισέρχεται ο αέρας. Στη μαντούρα ο ήχος παράγεται από την ταλάντωση μιας φλούδας του καλαμιού που σχίζουμε χωρίς να αφαιρέσουμε. Το νέϋ το συναντάμε σε τρεις τύπους το τούρκικο, το περσικό και το αραβικό. Στο τούρκικο υπάρχει η προσθήκη ειδικού επιστόμιου που μπορεί να είναι από ξύλο, κέρατο, μέταλλο ή άλλα υλικά. Στο περσικό προσαρμόζεται μια σκληρή λεπτή ταινία (όπως του φιλμ). Στο αραβικό δεν έχουμε επιστόμιο αλλά μια καλά λειασμένη και μυτερή άκρη από όπου φυσάμε. Αυτό είναι και το ευκολότερο στην κατασκευή.

Σε πρωταρχικό στάδιο έγινε συζήτηση για το φυτό καλάμι και το νέϋ. Όταν πραγματοποιήθηκε η δράση και πριν αρχίσει η κατασκευή του, έγινε συζήτηση για το περιβάλλον στο οποίο βρισκόμασταν, η οποία εμπεριείχε ερωτήματα όπως: τι βλέπουν, τι ακούνε, τι μυρίζουν και γενικότερα τι παρατηρούν. Τέλος, εστιάσαμε στα παραποτάμια καλάμια που βρισκόταν στην περιοχή, έγινε επίδειξη κατασκευής και οι μαθητές έφτιαξαν τα δικά τους νέϋ.

Επίλογος

Μέσω της μουσικής εκπαίδευσης των μαθητών μπορεί να επιτευχθεί η ανάπτυξη συνείδησης για ηθικά, κοινωνικά και οικολογικά ζητήματα καθώς και πολιτισμική επίγνωση και αυτογνωσία (Κοκκίδου et al 2019). Η κατασκευή μουσικών οργάνων από φυσικά υλικά στα πλαίσια μια εκπαιδευτικής διαδικασίας στη φύση, ως διδακτικά υλικά (Τσαφταρίδης 1995), ως μουσικά όργανα (Abrashev & Gadjev 2006) , ως ηχητικά αντικείμενα (Wishart 1996), καθώς και ως φορείς κουλτούρας (Kartomi 1990), μπορεί να αποτελέσει μια εποικοδομητική εκπαιδευτική πρακτική με ιδιαίτερα θετικά αποτελέσματα.

Βιβλιογραφία

Γεωργόπουλος, Α. (2014). Περιβαλλοντική εκπαίδευση. Ζητήματα ταυτότητας. Αθήνα: Gutenberg.

Ετμεκτσόγλου, Ι., (2009). Η Ακουστική Οικολογία στο Σχολείο: Το Δάσος ως Πηγή και Διαμορφωτής των Ήχων του Περιβάλλοντος. 1ο Πανελλήνιο Διεπιστημονικό Συνέδριο Τέχνης & Περιβαλλοντικής Εκπαίδευσης 29-31 Μάϊος 2009 Η Τέχνη ως εργαλείο εκπαίδευσης για το περιβάλλον Παιδαγωγικές/Εκπαιδευτικές προσεγγίσεις για το Δάσος/Δέντρο & την Ανακύκλωση. Ίδρυμα Ευγενίδου

Ετμεκτσόγλου, Ι., (2016). Η επίδραση των ήχων της φύσης στον άνθρωπο: Μια θεωρητικήπροσέγγιση με εκπαιδευτικές προεκτάσεις», *2ο Πανελλήνιο Σεμινάριο «Ήχος και Φύση»,* Σέρρες: Κέντρο Περιβαλλοντικής Εκπαίδευσης Ποροΐων Σερρών.

Καλαχάνης, Κ., (2007). Αναζητώντας την προέλευση του Σύμπαντος- ύδωρ, άπειρον και αήρ,

Κοκκίδου, Μ. (2016). Μουσικοί γραμματισμοί στον απόηχο του μεταμοντερνισμού: από τηνάγνοια, στη συνείδηση. Στο Μ. Κοκκίδου & Ζ. Διονυσίου (Επιμ.), Μουσικός Γραμματισμός: Τυπικές και Άτυπες Μορφές Μουσικής Διδασκαλίας-Μάθησης (Πρακτικά 7ου Συνεδρίου της Ελληνικής Ένωσης για τη Μουσική Εκπαίδευση) (σσ. 3-36). Θεσσαλονίκη: Ε.Ε.Μ.Ε.

Κοκκίδου, Μ., Μυγδάνης, Γ., & Κονδυλίδου, Α. (2019). Η έννοια του πολιτισμού στο ΠρόγραμμαΣπουδών Μουσικής για το «Νέο Σχολείο»: Σημειωτική ανάλυση. Στο Κ. Παπαδημητρίου& Χ. Κωσταρής (Επιμ), Πρακτικά 4ο Πανελλήνιο Συνέδριο «Εκπαίδευση στον 21ο αιώνα: Σχολείο και Πολιτισμός» (σσ. 305-316). Αθήνα: ΕΚΕΔΙΣ

Κυριακίδου, Α., & Πέτρου Θ. (2004). Περιβαλλοντική εκπαίδευση: Καταγραφή προγραμμάτων στη δευτεροβάθμια εκπαίδευση του νομού Ηρακλείου την περίοδο 1997-2002. Διπλωματική Εργασία, Α.Τ.Ε.Ι. Ηρακλείου, Σχολή Επαγγελμάτων Υγείας & Πρόνοιας, Τμήμα Κοινωνικής Εργασίας,

Ράπτης, Ν., (2000) *Περιβαλλοντική Εκπαίδευση και αγωγή. Το Θεωρητικό πλαίσιο των επιλογών*Αθήνα:Τυπωθήτω-ΓιώργοςΔαρδανός.

Σαρρής, Δ. (2009). Από τα «αυτοσχέδια μουσικά όργανα» στην «πολιτισμική οργανολογία»; Μιαμελέτη περίπτωσης στην τριτοβάθμια εκπαίδευση. Εισήγηση στο συνέδριο *Καλλιέργεια της μουσικής τέχνης στην Ελλάδα της Ευρώπης*. 29-31 Μαΐου. Θεσσαλονίκη, Πανεπιστήμιο Μακεδονίας, Τμήμα Μουσικής Τέχνης και Επιστήμης.

Τζάβλα, Χ. (2020). Προσλήψεις και μετασχηματισμοί της «ανατολικής» μουσικής παράδοσης στησύγχρονη ελληνική μουσική δημιουργία. Πτυχιακή Εργασία. Φιλοσοφική Σχολή, Τμ. Μουσικών Σπουδών Εθνικό Καποδιστριακό Παν. Αθηνών

Τσαφταρίδης, Ν. (1995). Αυτοσχέδια μουσικά όργανα. Αθήνα: Νικολαΐδης

Τσαφταρίδης, Ν. (2005). Επιμόρφωση και Μουσική Αγωγή. Στο Κώστας Βρατσάλης (επιμ.),Διδακτική εμπειρία και παιδαγωγική θεωρία. Αθήνα: Νήσος. σσ. 230 – 259.Χριστοφίλου, Δ., Ι., *Θεωρία της μουσικής Πρώτη τάξη*, Αθήνα: Music Lovers, 1985, σ. 13.

Χριστοφίλου Ι. (1985) «Θεωρία της μουσικής», Music Lovers, Αθήνα.

Abrashev, B. - Gadjev, V. (επ.). (2006). The Illustrated Encyclopedia of Musical Instruments: FromAll Eras and Regions of the World. Konemann.

Cooke, P. "Slit-drum." In Grove Music Online. Oxford Music Online, (ανακτήθηκε 8/10/2022) http://www.oxfordmusiconline.com/subscriber/article/grove/music/25970

Cuche, D. (2001). Η έννοια της κουλτούρας στις Κοινωνικές Επιστήμες. Μτφρ. Λεοτσίνη, Μ. Αθήνα:Τυπωθήτω,)

Dillon, T., (2007) American Music History and Cultural Identity: What does music mean to us?

Higham, T.F.G., Douka, K., Wood, R., Bronk Ramsey, C., Brock, F., (...), Pinhasi, R. and Jacobi, R. 2014. The timing and spatio-temporal patterning of Neanderthal disappearance. Nature 512,306–309.

Kartomi, M. (1990). On concepts and classifications of musical instruments. Chicago: University of Chicago Press.

Pennanen, R. P. (2014) «The Nationalization of Ottoman Popular Music in Greece»,Ethnomusicology 48(1), σσ. 1-25.

Treppiedi, S. (2007) Rebels and Innovators, από http://www.unm.edu
Stasi, H., (2007) New Mexico Music Now and Then, http://www.unm.edu
Wishart, T. (1996). On sonic art. Amsterdam: Harwood Academic Publishers

Διερεύνηση εκπαιδευτικών αναγκών δασκάλων για τη δόμηση επιμορφωτικού προγράμματος που αφορά στη διδασκαλία των βιολογικών εννοιών στο Δημοτικό Σχολείο

ΤΖΟΒΛΑ Ειρήνη[1], ΚΕΔΡΑΚΑ Κατερίνα[1], ΚΑΡΑΛΗΣ, Θανάσης[2], ΛΑΒΙΔΑΣ, Κωνσταντίνος[2]
Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, etzovla@mbg.duth.gr
Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, kkedraka@mbg.duth.gr
Πανεπιστήμιο Πατρών, karalis@upatras.gr
Πανεπιστήμιο Πατρών, Lavidas@upatras.gr

Περίληψη
Το παρόν άρθρο αφορά στη διερεύνηση των εκπαιδευτικών αναγκών μιας ομάδας δασκάλων, οι οποίοι εκδήλωσαν ενδιαφέρον να παρακολουθήσουν ένα επιμορφωτικό πρόγραμμα που αξιοποιούσε Ψηφιακό Εκπαιδευτικό Περιεχόμενο (ΨΕΠ) και Ανοικτούς Εκπαιδευτικούς Πόρους στη διδασκαλία των βιολογικών εννοιών στο Δημοτικό Σχολείο. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι οι δάσκαλοι επιθυμούν να επιμορφωθούν σε όλες τις θεματικές του Προγράμματος Σπουδών (ΠΣ) με έμφαση στα περιβαλλοντικά θέματα και στα θέματα των ασθενειών και σε νέες δεξιότητες και πρακτικές που προάγουν το μαθητοκεντρικό μοντέλο, αξιοποιούν το ΨΕΠ, καλλιεργούν δεξιότητες επιστημονικής έρευνας και επιστημονικού γραμματισμού στους μαθητές.

Λέξεις-Κλειδιά: εκπαιδευτικές ανάγκες, επιμορφωτικό πρόγραμμα, διδασκαλία βιολογικών εννοιών, Δημοτικό Σχολείο

Εισαγωγή

Η διερεύνηση εκπαιδευτικών αναγκών δεν είναι μια τυχαία διαδικασία αλλά υλοποιείται με συστηματικό και δομημένο τρόπο ακολουθώντας συγκεκριμένη μεθοδολογία, που αποσκοπεί στην αντιμετώπιση συγκεκριμένων ελλειμμάτων της ομάδας-στόχου σε σχέση με το πλαίσιο αναφοράς (Καραλής, 2005). Αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι του σχεδιασμού των εκπαιδευτικών προγραμμάτων, γιατί αναδεικνύει τα χαρακτηριστικά, τις ιδιαιτερότητες και συγκεκριμένες ανάγκες και επιθυμίες της ομάδας-στόχου, η ικανοποίηση των οποίων ενεργοποιεί τη συμμετοχή, μειώνει τη διαρροή και αυξάνει την αποτελεσματικότητα του προγράμματος.

Σκοπός της έρευνας

Σκοπός της έρευνας ήταν ο εντοπισμός των εκπαιδευτικών αναγκών μιας συγκεκριμένης ομάδας δασκάλων, που εκδήλωσε ενδιαφέρον να πάρει μέρος σε ένα επιμορφωτικό πρόγραμμα που αφορούσε στη διδασκαλία των βιολογικών εννοιών στο Δημοτικό Σχολείο.

Μέθοδος

Αξιοποιώντας τα ερευνητικά αποτελέσματα πρότερης έρευνας (Tzovla & Kedraka, 2020a) σχεδιάστηκε και στάλθηκε στους δασκάλους ένα σύντομο ερωτηματολόγιο που διερευνούσε τις εκπαιδευτικές τους ανάγκες σχετικά με τη διδασκαλία των βιολογικών εννοιών στο Δημοτικό Σχολείο. Από τους πεντακόσιους εννιά (509) δασκάλους που συμμετείχαν στην αρχική έρευνα, τετρακόσιοι τριάντα (430) εκδήλωσαν ενδιαφέρον να συμμετάσχουν στο επιμορφωτικό πρόγραμμα. Σε αυτούς απεστάλη το ερωτηματολόγιο διερεύνησης εκπαιδευτικών αναγκών, προκειμένου να ληφθούν υπόψη οι ανάγκες τους στον σχεδιασμό του προγράμματος (Tzovla & Kedraka, 2021· Tzovla et al., 2021a· Tzovla et al., 2021b). Διακόσιοι ογδόντα εννιά (289) δάσκαλοι, απάντησαν το ερωτηματολόγιο, οι οποίοι και αποτέλεσαν το δείγμα της παρούσας έρευνας.

Εργαλείο έρευνας

Το ερωτηματολόγιο, που διερευνούσε τις εκπαιδευτικές ανάγκες των εκπαιδευτικών αποτελούνταν από 4 ερωτήσεις κλειστού τύπου και 2 ανοιχτού. Το παρόν άρθρο αφορά μόνο τις ερωτήσεις κλειστού τύπου. Πιο συγκεκριμένα, το ερωτηματολόγιο αποτελούνταν από 2 ερωτήσεις, διαβαθμισμένες στην κλίμακα

Likert που αφορούσαν: α) στις θεματικές ενότητες των βιολογικών εννοιών, οι οποίες εμπεριέχονται στο Πρόγραμμα Σπουδών (ΠΣ) του Δημοτικού και στις οποίες οι εκπαιδευτικοί θα ήθελαν να εμβαθύνουν περισσότερο και β) στην καλλιέργεια δεξιοτήτων σχετικά με διδακτικές μεθόδους και πρακτικές, που θα μπορούσαν να υποστηρίξουν τη διδασκαλία των βιολογικών εννοιών. Επιπλέον, περιείχε 2 ερωτήσεις πολλαπλής επιλογής σχετικά με γ) την προτιμώμενη μορφή και δ) την προτιμώμενη διάρκεια του εξ αποστάσεως προγράμματος

Αποτελέσματα

Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της περιγραφικής στατιστικής των αναγκών των συμμετεχόντων στην έρευνα σχετικά με τις θεματικές ενότητες στις οποίες αυτοί επιθυμούν να εμβαθύνουν περισσότερο.

Πίνακας 1: Θεματικές ενότητες των βιολογικών εννοιών, στις οποίες επιθυμούν να εμβαθύνουν περισσότερο (N=289)

	Καθόλου	Λίγο	Αρκετά	Πολύ	Πάρα πολύ
q1.1 Υγεία του ανθρώπου	0,3%	3,5%	19,4%	30,4%	46,4%
q1.2 Συστήματα του ανθρώπινου σώματος	0,7%	7,6%	21,8%	33,9%	36,0%
q1.3 Θέματα Οικολογίας	1,4%	7,6%	20,4%	32,9%	37,7%
q1.4 Ζώα	1,4%	15,9%	29,1%	32,5%	21,1%
q1.5 Φυτά	1,7%	14,5%	30,1%	32,2%	21,5%
q1.6 Ανόργανοι οργανισμοί	7,3%	18,7%	37,0%	23,5%	13,5%
q1.7 Εξέλιξη των ειδών	2,4%	10,7%	30,1%	27,7%	29,1%
q1.8 Περιβαλλοντικά θέματα/ προβλήματα	0,0%	5,9%	16,3%	24,9%	52,9%

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της διερεύνησης αναγκών που αφορούν στις δεξιότητες σε μεθόδους και πρακτικές, που οι συμμετέχοντες επιθυμούν να καλλιεργήσουν, προκειμένου να υποστηρίξουν τη διδασκαλία των βιολογικών εννοιών.

Πίνακας 2: Δεξιότητες που επιθυμούν να καλλιεργήσουν, προκειμένου να υποστηρίξουν τη διδασκαλία των βιολογικών εννοιών (N=289)

	Καθόλου	Λίγο	Αρκετά	Πολύ	Πάρα πολύ
q2.1 Σχεδιασμός, οργάνωση, υλοποίηση και αξιολόγηση ενός σχεδίου μαθήματος που αφορά στη διδασκαλία των βιολογικών εννοιών στο Δημοτικό Σχολείο	0,3%	3,1%	20,1%	33,2%	43,3%
q2.2 Οργάνωση διαθεματικών δραστηριοτήτων	0,3%	4,2%	20,1%	31,1%	44,3%
q2.3 Ανακαλυπτική - Διερευνητική μάθηση	0,3%	3,8%	14,5%	32,9%	48,4%
q2.4 Συνεργατική μάθηση	0,3%	3,1%	20,4%	32,5%	43,6%
q2.5 Αξιοποίηση πολλαπλών πηγών (έντυπου υλικού, αξιοποίηση ψηφιακών τεχνολογιών, Ψηφιακού Εκπαιδευτικού Περιεχομένου, Ανοιχτών Εκπαιδευτικών Πόρων κτλ)	0,0%	3,1%	15,9%	33,2%	47,8%
q2.6 Μάθηση σε αυθεντικά πλαίσια	0,3%	4,8%	18,7%	34,9%	41,2%
q2.7 Μέθοδος της αντεστραμμένης τάξης (Flipping Classrooms)	0,7%	6,6%	18,3%	30,4%	43,9%

Τέλος, στην ερώτηση που αφορούσε την προτιμώμενη μορφή του προγράμματος η πλειοψηφία επέλεξε

την ασύγχρονη μορφή (59,9%) και στην ερώτηση που αφορούσε στη διάρκεια αυτού το μεγαλύτερο ποσοστό (39,9%) επέλεξε 4-5 εβδομάδες.

Συζήτηση

Τα παραπάνω αποτελέσματα αποκαλύπτουν ότι οι συμμετέχοντες ενδιαφέρονται για τις βιολογικές έννοιες και είναι ιδιαίτερα ευαισθητοποιημένοι σε θέματα που μαστίζουν τον πλανήτη όπως είναι τα περιβαλλοντικά θέματα και τα θέματα των ασθενειών (Tzovla & Kedraka, 2020b). Αντίστοιχα, το ενδιαφέρον τους για επιμόρφωση σε νέες γνώσεις, δεξιότητες και πρακτικές παραπέμπει σε μια ομάδα εκπαιδευτικών που δεν εφησυχάζει, ενδιαφέρεται να εντάξει νέες μεθόδους στην καθημερινή εκπαιδευτική της πρακτική. Πιο συγκεκριμένα, το υψηλό ποσοστό των δασκάλων που δήλωσε ότι επιθυμεί να επιμορφωθεί σε δραστηριότητες Ανακαλυπτικής-Διερευνητικής μάθησης αναδεικνύει ότι αυτοί έχουν συνειδητοποιήσει την ανάγκη υιοθέτησης του μαθητοκεντρικού μοντέλου και της καλλιέργειας δεξιοτήτων επιστημονικής έρευνας και επιστημονικού γραμματισμού στους μαθητές, επισημάνσεις που κάνουν και οι Avery και Mayer (2012) και ο OECD (2007). Επιπρόσθετα, η ανάδειξη της αναγκαιότητας αξιοποίησης πολλαπλών πηγών μάθησης στην παρούσα έρευνα δηλώνει την αγωνία των δασκάλων να ανταποκριθούν στις ανάγκες των καιρών και να ακολουθήσουν τις νέες τάσεις της Παιδαγωγικής Επιστήμης, σύμφωνα με τις οποίες οι πολλαπλές πηγές μάθησης αποτελούν ένα αποτελεσματικό εργαλείο για τη διδασκαλία των βιολογικών εννοιών, καθώς συνεισφέρουν στην καλύτερη κατανόησή τους (Muppudathi & Pazhanivelu, 2012 Tzovla & Kedraka, 2020b).

Συμπεράσματα

Με βάση τα αποτελέσματα της αρχικής έρευνας και μετά από διερεύνηση των εκπαιδευτικών αναγκών των δασκάλων, που εκδήλωσαν ενδιαφέρον σχεδιάστηκε και υλοποιήθηκε ένα πρόγραμμα το οποίο αφορούσε αποκλειστικά δασκάλους, με στόχο τη βελτίωση της αυτοαποτελεσματικότητάς τους αναφορικά με τη διδασκαλία των βιολογικών εννοιών, η οποία και αξιολογήθηκε μετά το πέρας του προγράμματος. Το γεγονός ότι το πρόγραμμα ολοκλήρωσε σημαντικός αριθμός δασκάλων αποδεικνύει ότι η διερεύνηση των εκπαιδευτικών αναγκών διαδραματίζει σημαίνοντα ρόλο στην παρακολούθηση και ολοκλήρωση ενός προγράμματος, καθώς αυτό δομείται σύμφωνα με τις προσωποποιημένες τους εκπαιδευτικές ανάγκες με αποτέλεσμα να είναι στοχευμένο και να τις ικανοποιεί στο μεγαλύτερο δυνατό βαθμό.

Βιβλιογραφικές αναφορές

Καραλής, Θ.(2005). *Σχεδιασμός, Διοίκηση, Αξιολόγηση Προγραμμάτων, (Τόμος Β΄)* Πάτρα: Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο.

Avery, L. M., & Meyer, D. Z. (2012). Teaching science as science is practiced: Opportunities and limits for enhancing preservice elementary teachers' self-efficacy for science and science teaching. School *Science and Mathematics, 112(7),* 395-409.

Muppudathi, G., & Pazhanivelu, G. (2012). Effect of e-content on teaching biology at secondary level. *Journal of Contemporary Educational Research and Innovations, 2*(2), 31-33.

OECD (2007). *PISA 2006: Science Competencies for Tomorrow's World: Volume 1: Analysis.* Paris: PISA, OECD Publishing. https://doi.org/10.1787/9789264040014-en

Tzovla, E. & Kedraka, K. (2020a). Personal biology teaching efficacy beliefs and biology teaching outcome expectancy of in-service elementary teachers. European *Journal of Education Studies, 7*(10), 143-159. DOI: 10.46827/ejes.v7i10.3286 ISSN 2501 - 1111.

Tzovla, E., & Kedraka, K. (2020b). Teaching Biology in Primary Education. *International Journal of Educational Technology and Learning, 8*(2), 91-97. DOI: 10.20448/2003.82.91.97

Tzovla E., & Kedraka, K. (2021). Exploring Teachers' Views on the Impact of an Online Distance Learning Course on Their Self-Efficacy Beliefs. *International Journal of Learning and Development 11*(3). doi:10.5296/ijld.v11i3

Tzovla, E., Kedraka, K., & Kaltsidis, C. (2021). Investigating In-service Elementary School Teachers' Satisfaction with Participating in MOOC for Teaching Biological Concepts. *Eurasia Journal of*

Mathematics, Science and Technology Education, 17(3), em1946. https://doi.org/10.29333/ejmste/9729

Tzovla, E., Kedraka, K., Karalis, T., Kougiourouki, M, & Lavidas, K. (2021). Effectiveness of in-service elementary school teacher professional development MOOC: an experimental research. *Contemporary Educational Technology 13*(4) ep324 DOI: https://doi.org/10.30935/cedtech/11144

Η συνεισφορά των επιστημολογικών πεποιθήσεων μαθητών Γ΄ Λυκείου στις πεποιθήσεις τους για τη βιολογική εξέλιξη των οργανισμών

ΜΠΑΙΤΕΛΜΑΝ Ανδρεανή[1], ΛΟΙΖΟΥ Θεονίτσα[2], ΧΑΤΖΗΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ Σαλώμη[2]
[1]Πανεπιστήμιο Κύπρου, baytel@ucy.ac.cy
[2] Λύκειο Παραλιμνίου, Κύπρος, theoniloizou@yahoo.gr
[2] Λύκειο Παραλιμνίου, Κύπρος,sallyhk3@gmail.com

Περίληψη
Στην παρούσα ερευνητική εργασία διερευνάται η συνεισφορά των επιστημολογικών πεποιθήσεων μαθητών Γ΄Λυκείου στις πεποιθήσεις τους για τη βιολογική εξέλιξη των φυτών, των ζώων και του ανθρώπου. Στην έρευνα αυτή συμμετείχαν πενήντα δύο (52) μαθητές της Γ΄ Λυκείου. Οι επιστημολογικές πεποιθήσεις, καθώς και οι πεποιθήσεις των συμμετεχόντων όσον αφορά στη βιολογική εξέλιξη αξιολογήθηκαν χωριστά, με τη χρήση ερωτηματολογίων και συνετεύξεων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι επιστημολογικές πεποιθήσεις των μαθητών Γ΄Λυκείου προβλέπουν τις πεποιθήσεις τους για την εξέλιξη των ζώων και των φυτών, αλλά όχι τις πεποιθήσεις τους για την εξέλιξη του ανθρώπου. Ειδικότερα, οι μαθητές με σχετικά ανεπτυγμένες επιστημολογικές πεποιθήσεις, κυρίως πεποιθήσεις για την «πηγή της γνώσης», έχουν πιο θετικές επιστημολογικές πεποιθήσεις για την εξέλιξη των ζώων και φυτών, από τους μαθητές με λιγότερο ανεπτυγμένες επιστημολογικές πεποιθήσεις. Επίσης, τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι οι πεποιθήσεις των μαθητών για την εξέλιξη του ανθρώπου σχετίζονται περισσότερο με τη θρησκευτική τους δέσμευση.

Λέξεις-κλειδια
Βιολογική εξέλιξη των οργανισμών, Επιστημολογικές πεποιθήσεις, Μαθητές Γ΄Λυκείου, Πεποιθήσεις

Εισαγωγή
Παρόλο που η θεωρία της εξέλιξης των οργανισμών αποτελεί την κεντρική οργανωτική αρχή και ενοποιητική θεωρία της Βιολογίας, εντούτοις παραμένει μια από τις πλέον παρεξηγημένες και ελάχιστα κατανοητή θεωρία της σύγχρονης επιστήμης (To, Tenenbaum & Hogh, 2017).

Σχετικά πρόσφατα, διάφοροι ερευνητές άρχισαν να εξετάζουν παράγοντες που, δυνητικά, συνεισφέρουν στην εννοιολογική κατανόηση της βιολογικής εξέλιξης των οργανισμών, π.χ. επιστημολογικές πεποιθήσεις, διαισθητικές παρανοήσεις, ιδέες και πεποιθήσεις για την εξέλιξη, θρησκευτικές και κοινωνικές πεποιθήσεις, συναισθηματικές προκαταλήψεις γύρω από την εξέλιξη των οργανισμών, κ.λπ. (Evans et al. 2010, Harms & Reiss 2019,Rosengren et al. 2012).

Στην παρούσα έρευνα, επεκτείνουμε αυτή τη γραμμή έρευνας διερευνώντας τις σχέσεις μεταξύ των επιστημολογικών πεποιθήσεων και των πεποιθήσεων μαθητών Γ΄ Λυκείου όσον αφορά στη βιολογική εξέλιξη των οργανισμών πριν από τη διδασκαλία της. Η έρευνα αυτή, στοχεύει να συνεισφέρει στο θεωρητικό πλαίσιο για την αποτελεσματικότερη διδασκαλία και κατανόηση της βιολογικής εξέλιξης..

Στην εκπαιδευτική έρευνα, οι επιστημολογικές πεποιθήσει αναφέρονται στις πεποιθήσεις των μαθητών (και άλλων ατόμων) για τη φύση της γνώσης (τι πιστεύει κανείς ότι είναι η γνώση) και τη φύση της μάθησης (πώς μαθαίνει κανείς) (Hofer & Pintrich1997). Από την άλλη, οι πεποιθήσεις ενός ατόμου για μια επιστημονική έννοια (π.χ. εξέλιξη) θεωρούνται οι προσωπικές αλήθειες ή προσωπικές απόψεις του για τον κόσμο. Αυτές οι προσωπικές αλήθειες δεν καθορίζονται με τα ίδια επιστημολογικά κριτήρια όπως η επιστημονική γνώση. Αντίθετα, αυτές βασίζονται σε υποκειμενικά κριτήρια και συχνά συνδέονται με το συναίσθημα (Cavallo & McCall 2008, Sinatra et a. 2003)

Μέθοδος
Δείγμα της έρευνας
Στην έρευνα αυτή συμμετείχαν 52 μαθητές της Γ΄ Λυκείου (31 γυναίκες και 21 άνδρες) σε δημόσιο

σχολείο δευτεροβάθμιας εκπαίδευσης στην Κύπρο. Οι μαθητές είναι χριστιανοί ορθόδοξοι στο θρήσκευμα και είχαν ως μάθημα επιλογής τη βιολογία.

Ερευνητικό ερώτημα

Στην παρούσα μελέτη, για να διερευνήσουμε τη συνεισφορά των επιστημολογικών πεποιθήσεων μαθητών Γ΄Λυκείου στις πεποιθήσεις τους για τη βιολογική εξέλιξη των φυτών, των ζώων και του ανθρώπου, θέσαμε το ακόλουθο ερευνητικό ερώτημα:

Πόσο καλά μπορούν να προβλέψουν οι επιστημολογικές πεποιθήσεις των μαθητών Γ΄Λυκείου τις πεποιθήσεις τους για τη βιολογική εξέλιξη των φυτών, των ζώων και του ανθρώπου, πριν από τη διδασκαλία της θεωρίας της εξέλιξης των οργανισμών;

Μέσα συλλογής δεδομένων

Οι επιστημολογικές πεποιθήσεις των μαθητών μετρήθηκαν μέσω ερωτηματολογίου 30 δηλώσεων με βάση το μοντέλο πολλαπλών διαστάσεων που αφορά στη φύση της γνώσης (Βεβαιότητα, Απλότητα Ανάπτυξη της γνώσης) και της μάθησης (Πηγή, Αιτιολόγηση της γνώσης) (Baytelman et al.,. 2020, Baytelman & Constantinou, 2016), καθώς και μέσω ημι-δομημένων συνεντεύξεων. Οι πεποιθήσεις των μαθητών για τη βιολογική εξέλιξη των φυτών, των ζώων και του ανθρώπου μετρήθηκαν μέσω ερωτηματολογίου 4 δηλώσεων, καθώς και ημι-δομημένων συνεντεύξεων.

Όσον αφορά στα δύο ερωτηματολόγια, οι εκπαιδευτικοί κλήθηκαν να δηλώσουν με βάση την κλίμακα Likert τεσσάρων διαβαθμίσεων (1=Διαφωνώ πλήρως, 2=Διαφωνώ, 3=Συμφωνώ, 4=Συμφωνώ πλήρως) τον βαθμό που τους αντιπροσώπευε η κάθε δήλωση. Με βάση την κλίμακα Likert του ερωτηματολογίου για τις επιστημολογικές πεποιθήσεις, ψηλά αποτελέσματα, με βάση τις απαντήσεις των ερωτηθέντων, αντιπροσωπεύουν ανεπτυγμένες και ώριμες επιστημολογικές πεποιθήσεις, ενώ χαμηλά αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν λιγότερο ανεπτυγμένες και ώριμες επιστημολογικές πεποιθήσεις. Με βάση την κλίμακα Likert του ερωτηματολογίου για τις πεποιθήσεις για την εξέλιξη των φυτών, των ζώων και του ανθρώπου, ψηλά αποτελέσματα, με βάση τις απαντήσεις των ερωτηθέντων, αντιπροσωπεύουν θετικές πεποιθήσεις για την εξέλιξη των οργανισμών, ενώ χαμηλά αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν λιγότερο θετικές πεποιθήσεις.

Αποτελέσματα

Για να απαντήσουμε στο ερευνητικό ερώτημα, υπολογίστηκαν οι συσχετίσεις Pearson προκειμένου να διερευνηθεί κατά πόσο οι μεταβλητές συσχετίζονταν στατιστικά σημαντικά, θετικά ή αρνητικά, μεταξύ τους. Στη συνέχεια, για να απαντηθεί κατά πόσο οι επιστημολογικές πεποιθήσεις των μαθητών, προβλέπουν τις προσωπικές τους πεποιθήσεις για την εξέλιξη των ζώων, των φυτών και του ανθρώπου, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις γραμμικής παλινδρόμησης.

Οι τιμές συσχέτισης Pearson έδειξαν ότι υπήρχε ασθενής θετική συσχέτιση μεταξύ της διάστασης της «πηγής γνώσης» των επιστημολογικών πεποιθήσεων και των πεποιθήσεων για την εξέλιξη των ζώων και φυτών ($r = .33$, $p < .05$; $r = .34$, $p < .05$). Οι αναλύσεις παλινδρόμησης αποκάλυψαν παρόμοιο μοτίβο. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας τις πεποιθήσεις για την εξέλιξη των ζώων, των φυτών και του ανθρώπου ως εξαρτημένες μεταβλητές και τις διαστάσεις των επιστημολογικών πεποιθήσεων ως προβλεπτικές μεταβλητές, οι αναλύσεις γραμμικής παλινδρόμησης αποκάλυψαν ότι υπάρχει μια ασθενής στατιστικά σημαντική προβλεπτική σχέση μεταξύ της διάστασης «πηγή γνώσης» των επιστημολογικών πεποιθήσεων και των πεποιθήσεων για την εξέλιξη ζώων και φυτών ($R^2=.13$, $p < .05$; $R^2=.14$, $p < .05$).

Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν κάποια σχέση μεταξύ επιστημολογικών πεποιθήσεων και πεποιθήσεων για την εξέλιξη του ανθρώπου. Οι συνεντεύξεις των μαθητών έδειξαν παρόμοιο μοτίβο και επιπλέον έδειξαν ότι οι πεποιθήσεις των μαθητών για την εξέλιξη του ανθρώπου σχετιζόταν με τον βαθμό της θρησκευτικής δέσμευσής τους

Συμπεράσματα

Η παρούσα μελέτη επεκτείνει την υπάρχουσα έρευνα που εξετάζει τις σχέσεις μεταξύ επιστημολογικών πεποιθήσεων και πεποιθήσεων όσον αφορά στη βιολογική εξέλιξη, υποδεικνύοντας μια στατιστικά σημαντική προβλεπτική σχέση μεταξύ της διάστασης «πηγής γνώσης» των επιστημολογικών πεποιθήσεων και των πεποιθήσεων για την εξέλιξη των ζώων και των φυτών, αλλά όχι του ανθρώπου. Με βάση τα αποτελέσματα, διαφαίνεται ότι παρόλο που η θρησκεία και η επιστήμη μπορούν να θεωρηθούν ως «μη επικαλυπτόμενες magisteria» (Gould, 1997), παιδαγωγικά μπορούν να επικαλύπτονται μεταξύ τους στο μυαλό ενός μαθητή, καθιστώντας δύσκολη τη μάθηση της βιολογικής εξέλιξης.

Βιβλιογραφία

Baytelman A, Iordanou K, Constantinou CP.(2020). Epistemic beliefs and prior knowledge as predictors of the construction of different types of arguments on socioscientific issues. *J Res Sci Teach. 57*, 1199–1227

Baytelman, A., & Constantinou, C. P. (2016). Development and validation of an instrument to measure student beliefs on the nature of knowledge and learning (in Greek). *Themes of Science and Technology in Education, 9(3),* 151–172.

Cavallo A, & McCall D. (2008) Seeing may not mean believing: examining students' understandings and beliefs in evolution. *The American Biology Teacher, 70*(9):522–530.

Evans, E. M., Spiegel, A. N., Gram, W., Frazier, B. N., Tare, M., Thompson, S., et al. (2010). A Conceptual guide to natural history museum visitors' understanding of evolution. *Journal of Research in Science Teaching, 47,* 326–353.

Gould, S. J. (1997). Nonoverlapping magisteria. *Natural History, 106,* 16–22.

Harms, U. & Reiss, M.J. (2019). *Evolution Education Re-Considered Understanding What Works*. Springer Nature, Switzerland.

Hofer, B. K., & Pintrich, P. R. (1997). The development of epistemological theories: Beliefs about knowledge and knowing their relation to learning. *Review of Educational Research, 67*(2), 88–140.

Rosengren, K. L., Brem, S. K., Evans, E. M. & Sinatra, G. M. (Eds). (2012). *Evolution Challenges Integrating Research and Practice in Teaching and Learning about Evolution*. Oxford: Oxford University Press.

Sinatra, G. M., Southerland, S. A., McConaughy, F., & Demastes, J. W. (2003). Intentions and beliefs in students' understanding and acceptance of biological evolution. *Journal of Research in Science Teaching, 40(5),* 510–528.

Συγκριτική in vivo και in vitro ανάλυση της λειτουργίας των Νευρικών Βλαστικών Κυττάρων του ενήλικου εγκεφάλου, εργαστηριακών μυών και πληθυσμών αγρίων Mus musculus domesticus

ΡΑΠΤΗ Αθανασία, ΜΗΤΣΑΙΝΑΣ Γεώργιος, ΚΑΖΑΝΗΣ Ηλίας Εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, gnt13@yahoo.gr Εργαστήριο Βιολογίας Ζώων, Πανεπιστήμιο Πατρών, mitsain@upatras.gr
Εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, ikazanis@upatras.gr

Περίληψη
Στην εργασία αυτή μελετώνται συγκριτικά οι λειτουργίες των νευρικών βλαστικών κυττάρων της υποεπενδυματικής ζώνης (SEZ), μεταξύ άγριων και εργαστηριακών μυών *Mus musculus domesticus*. Συγκεκριμένα, εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες επηρεάζουν την νευρογένεση και δεδομένου ότι τα άγρια και τα εργαστηριακά ζώα ανήκουν στο ίδιο υποείδος, αλλά η διαβίωσή τους και τα χρωμοσωμικά τους χαρακτηριστικά, διαφοροποιούνται, τα καθιστούν ιδανικά για αξιολόγηση της μεταφοράς πειραματικών συμπερασμάτων στην κλινική πράξη. Αυτό επιτυγχάνεται τόσο με *in vitro* πειράματα κυτταροκαλλιέργειας από πρωτογενώς απομονωμένα NBK της SEZ, όσο και με in vivo πειράματα ιστολογίας και ανοσοφθορισμό. Τα *in vitro* αποτελέσματα συνηγορούν υπέρ του ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφοροποιήσεις των NBK μεταξύ άγριων και εργαστηριακών μυών, όμως τα *in vivo* αποτελέσματα αποδεικνύουν εμφατικά ότι στα άγρια ζώα η νευρογένεση μειώνεται. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στο ότι τα ζώα προς μελέτη της εργασίας είχαν διπλοειδή χρωμοσωματικό αριθμό, 2n=26-30 που επαληθεύει ότι οι Robertsonian συντήξεις, επηρεάζουν τη νευρογένεση.

Λέξεις-Κλειδιά
Νευρογένεση, Robertsonian συντήξεις, SEZ, Βλαστοκύτταρα, 2n

Εισαγωγή
Τα μεταγεννητικά νευρικά βλαστοκύτταρα και προγονικά κύτταρα του εγκεφάλου (NSPCs) συγκεντρώνονται στις νευρογενετικές φωλιές, μια εξ' αυτών είναι η υποεπενδυματική ζώνη, συμβάλλοντας στην αναγνώριση οσμών, τη μάθηση, τη μνήμη. Επίσης, είναι γνωστό πως η δραστηριότητά τους μπορεί να τροποποιείται από εξωγενείς και εγγενείς παράγοντες όπως η άσκηση, το στρες και ο εμπλουτισμός του περιβάλλοντος (Obernier, Alvarez-Buylla, 2019). Ακόμη, στους άγριους μύες εμφανίζεται ένα φαινόμενο μοναδικής χρωμοσωματικής αναδιάταξης του υποείδους, πέρα από τους πολυμορφισμούς ετεροχρωματίνης, που ονομάζεται Robertsonian σύντηξη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του διπλοειδούς χρωμοσωματικού αριθμού (2n), μιας και ακροκεντρικά χρωμοσώματα συντήκονται μεταξύ τους και δημιουργούν μετακεντρικά (Capilla et al., 2014). Εδώ, διερευνούμε αν τα νευρικά βλαστικά κύτταρα των εργαστηριακών μυών εμφανίζουν διαφορές στην λειτουργία τους σε σχέση με άγριους μύες *Mus musculus domesticus*, που έχουμε συλλέξει από το φυσικό τους περιβάλλον, αν αναλογιστούμε ότι ο τρόπος διαβίωσής τους αλλά και η χρωμοσωματική τους σύσταση διαφέρουν.

Μέθοδοι
Χρησιμοποιούμε για τις αναλύσεις μας τόσο εργαστηριακά ζώα (n=13) *Mus musculus domesticus* όσο και άγρια (n=11). Μάλιστα επιλέγουμε να κρατήσουμε 5 μήνες σε συνθήκες εργαστηρίου έξι από τα άγρια, θα καλούνται στο εξής εργαστηριοποιημένα, προκειμένου να διαπιστώσουμε αν η συμπεριφορά των βλαστοκυττάρων τους θα τείνει προς τα άγρια ή τα εργαστηριακά ζώα. Απομονώνουμε από κάθε ζώο τον μυελό των οστών, για να προσδιορίσουμε τον διπλοειδή χρωμοσωματικό του αριθμό και ταυτόχρονα απομονώνουμε και τον εγκέφαλο από τον οποίο το ένα εγκεφαλικό ημισφαίριο θα αξιοποιηθεί για ιστολογική ανάλυση (*in vivo*) και το δεύτερο για κυτταροκαλλιέργεια (*in vitro*). Τελικά, με ανοσοφθορισμό και μέσω του συνεστιακού μικροσκοπίου θα ληφθούν εικόνες για να γίνει η ανάλυση αποτελεσμάτων.

Αποτελέσματα

Καταρχάς, τα άγρια ζώα που καρυοτυπήθηκαν είχαν εύρος διπλοειδούς χρωμοσωματικού αριθμό n=26-30, ενώ τα εργαστηριακά ζώα έχουν 2n=40. Επίσης, τα *in vivo* αποτελέσματα δείχνουν ότι η νευρογένεση μειώνεται στα άγρια και εργαστηριοποιημένα σε σχέση με τα εργαστηριακά, αφού τόσο η πυκνότητα κυττάρων της υποεπενδυματικής τους ζώνης όσο και η πυκνότητα των Dcx+ και PCNA+ κυττάρων και τα ποσοστά τους μειώνονται. Από την άλλη τα *in vitro* αποτελέσματα δεν δίνουν μια ξεκάθαρη εικόνα μείωσης και διαφοροποιούνται από P0 σε P2 φάση.

Συμπεράσματα

Τελικά σύμφωνα με τα *in vivo* αποτελέσματα η νευρογένεση μειώνεται στους άγριους μύες σε σχέση με τους εργαστηριακούς και αυτό φαίνεται να οφείλεται στο γεγονός ότι ο χρωμοσωματικός αριθμός μειώνεται λόγω των Robertsonian συντήξεων. Προηγούμενη μελέτη έχει δείξει ότι οι άγριοι μύες σε σχέση με τους εργαστηριακούς,έχουν στατιστικώς σημαντικά αυξημένα επίπεδα πυκνότητας Dcx+ και PCNA+ κυττάρων και των αντίστοιχων ποσοστών τους, όμως τα επίπεδα αυτά μειώνονται όσο μειώνεται και ο διπλοειδής χρωμοσωματικός αριθμός. Τα *in vitro* αποτελέσματα δεν έδειξαν μεγάλες διαφοροποιήσεις μεταξύ των πειραματικών ομάδων των αγρίων, εργαστηριοποιημένων και εργαστηριακών μυών που σημαίνει ότι όταν τα νευρικά βλαστικά κύτταρα απομονώνονται και καλλιεργούνται υπό τις ίδιες συνθήκες, εμφανίζουν ισοδύναμη συμπεριφορά, άρα η διαφοροποίηση του διπλοειδούς χρωμοσωματικού αριθμού δεν επηρεάζει πιθανόν τα ίδια τα κύτταρα, αλλά το περιβάλλον τους.

Βιβλιογραφία

Capilla et al., (2014); Genetic recombination variation in wild Robertsonian mice: on the role of chromosomal fusions and Prdm9 allelic background. Proc Biol Sci, 281: p1786. doi: 10.1098/rspb.2014.0297.

Obernier and Alvarez-Buylla, (2019); Neural stem cells: origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain. Development, 146 (4): dev156059. doi:10.1242/dev.156059

ΣΥΝΕΔΡΙΑ 3

ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΕΣ

Παναγούλα Κόλλια,
Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Παπουτσοπούλου Σταματία,
Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Οι ιδέες μαθητών και φοιτητών για την ανθρώπινη αναπαραγωγή: μια σύντομη επισκόπηση της βιβλιογραφίας

ΑΜΠΑΤΖΙΔΗΣ Γεώργιος[1] & ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ Πηνελόπη[2]
[1]*Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, gampatzidis@uth.gr*
[2]*Πανεπιστήμιο Δυτικής Μακεδονίας, ppapadopoulou@uowm.gr*

Περίληψη
Φαίνεται πως μέχρι την ηλικία των 11 ετών οι μαθητές έχουν ήδη σχηματίσει μια θεμελιώδη κατανόηση για την ανθρώπινη αναπαραγωγή. Ωστόσο, έρευνες με μαθητές/φοιτητές διαφορετικών ηλικιών δείχνουν πως εκείνοι εκφράζουν μια σειρά παρανοήσεων σχετικά με διάφορες πτυχές της ανθρώπινης αναπαραγωγής. Η ελλιπής κατανόηση της λειτουργίας του αναπαραγωγικού συστήματος έχει συνδεθεί με μη προγραμματισμένες εγκυμοσύνες και αυξημένη συχνότητα σεξουαλικώς μεταδιδόμενων νοσημάτων. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, σε αυτή την εργασία επιχειρούμε μια επισκόπηση των ιδεών μαθητών και φοιτητών σχετικά με την ανθρώπινη αναπαραγωγή. Συζητιούνται διδακτικές προεκτάσεις, όπως η ανάγκη αλλαγών στα σχετικά σχολικά βιβλία και το πρόγραμμα σπουδών.

Λέξεις-κλειδιά
Επισκόπηση βιβλιογραφίας, ανθρώπινη αναπαραγωγή, ιδέες μαθητών, ιδέες φοιτητών

Εισαγωγή

Φαίνεται πως μέχρι την ηλικία των 11 ετών οι μαθητές έχουν ήδη σχηματίσει μια θεμελιώδη κατανόηση σχετικά με πτυχές της ανθρώπινης αναπαραγωγής (Hadjichambis et al. 2016). Ωστόσο, έρευνες με μαθητές/φοιτητές διαφορετικών ηλικιών ανά τον κόσμο δείχνουν ότι εκείνοι εκφράζουν μια σειρά παρανοήσεων σχετικά με το θέμα της ανθρώπινης αναπαραγωγής. Η ελλιπής κατανόηση της λειτουργίας του αναπαραγωγικού συστήματος έχει συνδεθεί με μη προγραμματισμένες εγκυμοσύνες και αυξημένη συχνότητα σεξουαλικώς μεταδιδόμενων νοσημάτων (Donati et al. 2000, Sydsjö et al. 2006). Από την άλλη πλευρά, φαίνεται πως οι μαθητές που παρουσιάζουν σημαντική κατανόηση σε θέματα αναπαραγωγής είναι πιο πιθανό να υιοθετήσουν πρακτικές που προστατεύουν τη σεξουαλική τους υγεία (Walker & Milton, 2006). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, αποφασίσαμε να πραγματοποιήσουμε μια σύντομη επισκόπηση των ιδεών μαθητών και φοιτητών διαφόρων ηλικιών σε θέματα ανθρώπινης αναπαραγωγής.

Επισκόπηση των ιδεών μαθητών και φοιτητών για την ανθρώπινη αναπαραγωγή

Όταν μαθητές προσχολικής εκπαίδευσης ερωτηθούν για την προέλευση του μωρού, αναφέρουν πως το μωρό βρέθηκε στην κοιλιά της μαμάς με τους εξής τρόπους: (α) ο μπαμπάς και η μαμά παντρεύτηκαν, (β) το ήθελε η μαμά, (γ) το έφερε ο Θεός ή η Παναγία, (δ) ο γιατρός το έβαλε στην κοιλιά της μαμάς, (ε) ο μπαμπάς το έβαλε στην κοιλιά της μαμάς (Zogza & Christopoulou 2004), (στ) υπήρχε πάντα μέσα στην κοιλιά της μαμάς (Goldman & Goldman 1982). Σχετικά με τη γέννηση του μωρού, οι περισσότεροι μαθητές προσχολικής εκπαίδευσης θεωρούν πως ο γιατρός το βγάζει από την κοιλιά της μαμάς με κάποιου τύπου επέμβαση, χωρίς να μπορούν να εντοπίσουν το μέρος του σώματος από το οποίο βγαίνει (Χριστοπούλου & Ζόγκζα, όπ. ανάφ. στο Ζόγκζα 2007).

Οι μαθητές δημοτικής εκπαίδευσης εκφράζουν εναλλακτικές αντιλήψεις αντίστοιχες με εκείνες των μαθητών προσχολικής εκπαίδευσης αναφορικά με την προέλευση των μωρών. Συγκεκριμένα, αναδεικνύονται οι απόψεις πως τα παιδιά προέρχονται από (α) απλή σωματική επαφή των γονέων («οι γονείς αγκαλιάζονται»), (β) συναισθηματική σχέση των γονέων («οι γονείς αγαπιούνται»), (γ) κοινωνική σχέση των γονέων («οι γονείς παντρεύονται»), (δ) τη δράση ενός υπερφυσικού παράγοντας («Θεός, Χριστός, Παναγία») (Χριστοπούλου & Ζόγκζα, όπ. αναφ. στο Ζόγκζα 2007). Ακόμα, κάποιοι μαθητές δημοτικής εκπαίδευσης αναφέρουν πως το μωρό προϋπάρχει ως μινιατούρα στο σπερματοζωάριο του μπαμπά ή το ωάριο της μαμάς ή πως όταν η μαμά τρώει περισσότερο από ό,τι

συνήθως μπορεί να αναπτυχθεί ένα παιδί στην κοιλιά της (Berends & Caron 1994).

Σε μια έρευνα στην οποία ζητήθηκε από μαθητές δημοτικής εκπαίδευσης να σημειώσουν τα όργανα πάνω σε μια εικόνα του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος, πολλοί από εκείνους δεν μπορούσαν αρχικά να αναγνωρίσουν τι εικονιζόταν. Όταν στη συνέχεια οι ερευνητές διευκρίνισαν πως παρουσίαζε το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα, τότε μεγάλος αριθμός από τους μαθητές σημείωσαν μόνο τη λέξη «κόλπος» σε ολόκληρη την εικόνα. Το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα ήταν πιο εύκολα αναγνωρίσιμο από τους μαθητές, ωστόσο πολλοί δεν μπορούσαν να σημειώσουν σωστά τη θέση των όρχεων ή της ουρήθρας (Hurwitz et al. 2016).

Αντίστοιχα, σε έρευνα με μαθητές 13-14 ετών, όταν τους ζητήθηκε να δείξουν πού βρίσκονται τα αναπαραγωγικά όργανα πάνω σε εικόνες ανδρικού και γυναικείου σώματος μόλις το 32% των αγοριών και το 40% των κοριτσιών υπέδειξαν σωστά τη θέση τουλάχιστον των μισών οργάνων του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος (Sydsjö et al. 2006). Η επίδοση των μαθητών ήταν σαφώς καλύτερη στην περίπτωση των ανδρικών αναπαραγωγικών οργάνων, καθώς πάνω από το 75% αγοριών και κοριτσιών υπέδειξαν σωστά τη θέση τουλάχιστον των μισών οργάνων.

Προβλήματα στην αντίληψη των αναπαραγωγικών οργάνων αναδύονται και σε εκπαιδευόμενους μεγαλύτερων ηλικιών. Για παράδειγμα, σε ερώτηση σχετικά με τα εξωτερικά αναπαραγωγικά όργανα της γυναίκας σε μια έρευνα με φοιτητές ενός παιδαγωγικού τμήματος δημοτικής εκπαίδευσης (142 γυναίκες και 6 άντρες), 54 από τους συμμετέχοντες ανέφεραν τον κόλπο ενώ κάποιοι ανέφεραν τη μήτρα (Veiga et al. 2006). Ακόμα, σε μια έρευνα με φοιτητές ενός προγράμματος επιστημών της εκπαίδευσης στην Ελλάδα, όταν οι συμμετέχοντες ρωτήθηκαν για τα όργανα του αντρικού και του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος, λίγοι από εκείνους ανέφεραν (α) εσωτερικά αντρικά αναπαραγωγικά όργανα όπως ο προστάτης, και (β) εξωτερικά γυναικεία αναπαραγωγικά όργανα όπως η κλειτορίδα (Ampatzidis, Georgakopoulou, & Kapsi 2021).

Τέλος, πολλοί μαθητές φαίνεται να αγνοούν πως η γονιμοποίηση γίνεται στις σάλπιγγες προτείνοντας διαφορετικά όργανα, όπως η μήτρα, ως το μέρος που γίνεται η συνάντηση σπερματοζωαρίου και ωαρίου (Sydsjö et al. 2006). Παρόμοιες ιδέες αναδύονται και στη σκέψη μελλοντικών δασκάλων: 42 από τους συμμετέχοντες της έρευνας των Veiga et al. (2006) πρότειναν ως όργανο στο οποίο πραγματοποιείται η γονιμοποίηση τις ωοθήκες, τη μήτρα και τον τράχηλο. Στην έρευνα των Ampatzidis, Georgakopoulou, & Kapsi (2021) το ποσοστό των φοιτητών που απάντησαν πως η γονιμοποίηση γίνεται στη μήτρα ήταν μεγαλύτερο από το ποσοστό εκείνων που υπέδειξαν τις σάλπιγγες ως το όργανο στο οποίο γίνεται η γονιμοποίηση.

Διδακτικές προεκτάσεις

Η σύντομη επισκόπηση των ιδεών των μαθητών/φοιτητών για την αναπαραγωγή που επιχειρήσαμε δείχνει πως η κατανόησή τους σχετικά με το αντρικό και γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα παρουσιάζεται σε αρκετά σημεία ελλιπής. Η έρευνα στις αντιλήψεις των μαθητών/φοιτητών για την αναπαραγωγή φαίνεται να υποδεικνύει την ανάγκη (α) ανάπτυξης κατάλληλου διδακτικού υλικού και τεχνικών που υποστηρίζουν την οικοδόμηση κατανόησης για την ανθρώπινη αναπαραγωγή και (β) λήψης μέτρων σχετικά με τα σχολικά βιβλία (π.χ. κατάλληλη παρουσίαση του αντρικού και γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος – η έρευνα έχει δείξει πως τα εξωτερικά γυναικεία αναπαραγωγικά όργανα εμφανίζονται σπάνια στα σχετικά βιβλία, Ampatzidis & Armeni 2021, 2022) και το πρόγραμμα σπουδών (π.χ. ευρύτερη παρουσία θεμάτων αναπαραγωγής).

Βιβλιογραφία

Ζόγκζα, Β. (2007). *Η βιολογική γνώση στην παιδική ηλικία-ιδέες των παιδιών και διδακτικές προσεγγίσεις*. Αθήνα: Μεταίχμιο.

Ampatzidis, G., & Armeni, A. (2021). Analysis of illustrations concerning human reproduction included in Greek secondary education textbooks. *Mediterranean Journal of Education*, *1*(2), 46–54.

Ampatzidis, G., & Armeni, A. (2022). Human Reproduction in Greek Secondary Education Textbooks (1870s to Present). In K. Korfiatis & M. Grace (Eds.), *Current Research in Biology Education: Selected Papers from the ERIDOB Community* (pp. 257–268). Cham: Springer International Publishing.

Ampatzidis, G., Georgakopoulou, D., & Kapsi, G. (2021). Clitoris, the unknown: What do postgraduate students of educational sciences know about reproductive physiology and anatomy? *Journal of Biological Education*, *55*(3), 254–263.

Berends, M. M., & Caron, S. L. (1994). Children's Understanding and Knowledge of Conception and Birth: A Developmental Approach. *Journal of Sex Education and Therapy*, *20*(1), 18–29.

Donati, S., Medda, E., Spinelli, A., & Grandolfo, M. E. (2000). Sex education in secondary schools: An Italian experience. *Journal of Adolescent Health*, *26*(4), 303–308.

Goldman, R. J., & Goldman, J. D. G. (1982). How Children Perceive the Origin of Babies and the Roles of Mothers and Fathers in Procreation: A Cross-National Study. *Child Development*, *53*(2), 491–504.

Hadjichambis, A. C., Georgiou, Y., Paraskeva-Hadjichambi, D., Kyza, E. A., & Mappouras, D. (2016). Investigating the Effectiveness of an Inquiry-Based Intervention on Human Reproduction in Relation to Students' Gender, Prior Knowledge and Motivation for Learning in Biology. *Journal of Biological Education*, *50*(3), 261–274.

Hurwitz, L. B., Lauricella, A. R., Hightower, B., Sroka, I., Woodruff, T. K., & Wartella, E. (2016). "When You're a Baby You Don't Have Puberty": Understanding of Puberty and Human Reproduction in Late Childhood and Early Adolescence. *The Journal of Early Adolescence*, *37*(7), 925-947.

Sydsjö, G., Selling, K. E., Nyström, K., Oscarsson, C., & Kjellberg, S. (2006). Knowledge of reproduction in teenagers and young adults in Sweden. *The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care: The Official Journal of the European Society of Contraception*, *11*(2), 117–125.

Veiga, L., Teixeira, F., Martins, I., & Meliço-Silvestre, A. (2006). Sexuality and human reproduction: A study of scientific knowledge, behaviours and beliefs of Portuguese future elementary school teachers. *Sex Education*, *6*(1), 17–29.

Walker, J., & Milton, J. (2006). Teachers' and parents' roles in the sexuality education of primary school children: A comparison of experiences in Leeds, UK and in Sydney, Australia. *Sex Education*, *6*(4), 415–428.

Zogza, V., & Christopoulou, G. (2004). Where do babies come from? The ideas of 5-year-old children about human reproduction and birth. In M. Ergazaki, J. Lewis & V. Zogza (Eds.), *Trends in biology education: Research in the new biology era* (pp. 59–72). Patras, Greece: University of Patras.

Γενετική επεξεργασία με έναν νέο Adenine Base Editor αδενοϊϊκό φορέα ως θεραπεία για τις β-αιμοσφαιρινοπάθειες

ΠΑΣΧΟΥΔΗ Κυριακή [1], ΓΙΑΝΝΑΚΗ Μαρία[2], ΓΕΩΡΓΑΚΟΠΟΥΛΟΥ Αφροδίτη[3], LI Chang[4], ΝΙΖΑΜΗΣ Ευάγγελος[5], ΒΛΑΧΑΚΗ Ευθυμία[6], ΜΠΕΤΑ Χριστίνα[7], ΠΑΝΤΟΥ Αγάπη[8], ΙΝΤΖΟΥ Θεοδώρα[9], ΣΑΚΕΛΛΑΡΗ Ιωάννα[10], ΨΑΘΑ Νικολέττα[11], LIEBER Andre[12], ΓΙΑΝΝΑΚΗ Ευαγγελία[13]

Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ. «Γ. Παπανικολάου», paschoudik@gmail.com-1
Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ. «Γ. Παπανικολάου», giannakimar@hotmail.com-2
Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ. «Γ. Παπανικολάου» aphroditegeo@hotmail.com-3
University of Washington, Seattle, USA, cli1239@uw.edu-4
University of Thessaly, enizamis@gmail.com
Τμήμα Ιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Ιπποκράτειο Γενικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης, efivlachaki@yahoo.gr-5
Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ. «Γ. Παπανικολάου», christina.beta1@gmail.com-6
Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ. «Γ. Παπανικολάου»,agapantou@gmail.com-7
Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ. «Γ. Παπανικολάου», tea.ville.loa@gmail.com-8
Αιματολογική Κλινική, ΜΜΜΟ, ΓΝΘ. «Γ.Παπανικολάου», bmt@gpapanikolaou.gr-9
Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, npsatha@bio.auth.g-10
University of Washington, Seattle, USA, lieber00@uw.edu-11
Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ. «Γ. Παπανικολάου», University of Washington, Seattle, eyannaki@uw.edu -12

Περίληψη
Η γονιδιακή θεραπεία των β-αιμοσφαιρινοπαθειών μέσω γονιδιακής τροποποίησης αποτελεί μία καινοτόμα προσέγγιση. Στην παρούσα εργασία διερευνάται η χρήση ενός μη-ενσωματούμενου, αδενοϊϊκού Adenine Base Editor φορέα (ABE-HDAd5/35++), που στοχεύει στην εισαγωγή της μετάλλαξης A>G στην θέση -113 ανοδικά των γονιδίων της γ-σφαιρίνης, με σκοπό την επανενεργοποίησή της. Παράλληλα, ο ιικός φορέας διαθέτει μία μεταλλαγμένη ισομορφή του MGMT γονιδίου για θετική επιλογή των διαμολυσμένων κυττάρων μετά την έκθεση σε O6BG/BCNU. $CD34^+$ κύτταρα από ασθενείς δότες με β-θαλασσαιμία ή δρεπανοκυτταρική αναιμία διαμολύνθηκαν με τον ABE-HDAd5/35++. Ακολούθησε έλεγχος του ποσοστού στόχευσης με NGS και της έκφρασης γ-σφαιρίνης με κυτταρομετρία ροής και HPLC. Το ποσοστό στόχευσης για την θέση -113 ανοδικά των γονιδίων της γ-σφαιρίνης ήταν 60% μετά από επιλογή παρουσία O6BG/BCNU. Η επιτυχής στόχευση οδήγησε σε σημαντικά υψηλότερη έκφραση της γ-σφαιρίνης, πτώση των ROS και σε βελτιωμένα χαρακτηριστικά του θαλασσαιμικού φαινοτύπου. Συνοπτικά, προτείνεται μία εναλλακτική θεραπεία των β-αιμοσφαιρινοπαθειών που στηρίζεται στην επανενεργοποίηση της ενδογενούς γ-σφαιρίνης.

Λέξεις-κλειδιά: β-θαλασσαιμία, αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, γονιδιακή θεραπεία, Adenine base editors, γενετική τροποποίηση

Εισαγωγή

Η β-αιμοσφαιρινοπάθειες αποτελούν το πιο συχνά μονογονιδιακά κληρονομήσιμο νόσημα παγκοσμίως. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η β-θαλασσαιμία και η δρεπανοκυτταρική αναιμία. Η β-θαλασσαιμία χαρακτηρίζεται από μειωμένη σύνθεση (β^+/β^+) ή πλήρης ανεπάρκεια της β-σφαιρίνης (β^0/β^0) (Higgs, Engel, and Stamatoyannopoulos 2012a). Η δρεπανοκυτταρική αναιμία οφείλεται σε σημειακή μετάλλαξη στο έκτο κωδικόνιο της β-σφαιρίνης που οδηγεί στην έκφραση μίας μεταλλαγμένης μορφής της β-αιμοσφαιρίνης της β^s. (Rees, Williams, and Gladwin 2010). Η θεραπεία τους είναι κυρίως

συμπτωματική ενώ μόνη θεραπεία πλήρους ίασης αποτελεί η μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων.(Higgs, Engel, and Stamatoyannopoulos 2012b)
Τα τελευταία χρόνια, η ανάπτυξη της γονιδιακής θεραπείας για την θεραπεία μονογονιδιακών νοσημάτων, αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη προσέγγιση. Τα τρέχοντα πρωτόκολλα γονιδιακής θεραπείας για τις β-αιμοσφαιρινοπάθειες περιλαμβάνουν την απομόνωση των $CD34^+$ κυττάρων (HSCs), την *ex vivo* γενετική τροποποίηση τους με ενσωμάτωση του γονιδίου της β- ή γ-σφαιρίνης, μέσω θεραπευτικών λεντι-ιικών φορέων και την έγχυση των γενετικά διορθωμένων κυττάρων στους ασθενείς, μετά από χορήγηση πλήρως μυελοκατασταλτικού σχήματος. Ωστόσο, σημαντικό μειονέκτημα παραμένει η ημι-τυχαία ενσωμάτωση του διαγονιδίου στο γονιδίωμα των κυττάρων-στόχων, κατά προτίμηση κοντά σε ενεργά γονίδια, αυξάνοντας δυνητικά την πιθανότητα μεταλλαξιγένεσης. (Psatha, Papayanni, and Yannaki 2018).

Η γονιδιακή επεξεργασία σε συγκεκριμένες θέσεις του γονιδιώματος αποτελεί μία καινοτόμα και αποτελεσματική προσέγγιση. Τα τελευταία χρόνια το σύστημα CRISPR-Cas9 έχει χρησιμοποιηθεί με στόχο είτε την επανενεργοποιήση της γ-σφαιρίνης είτε την in situ επιδιόρθωση μεταλλάξεων που οδηγούν στην εμφάνιση των αιμοσφαιρινοπαθειών. Παρά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα, που προκύπτουν η διπλή θραύση του γονιδιώματος έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση χρωμοσωμικών αναδιατάξεων και φαινόμενα χρωμοθρύψης.(Leibowitz et al. 2021; Turchiano et al. 2021) Εξίσου αποτελεσματική και ίσως ασφαλέστερη προσέγγιση αποτελούν οι base editors μέσω των οποίων επιτυγχάνεται στοχευμένες αλλαγές στην αλληλουχία των βάσεων. Συγκεκριμένα, οι Adenine base editors καταλύουν στοχευμένη μετατροπή A>G(Jeong, Song, and Bae 2020). Είναι γνωστό ότι η κληρονομική παραμονή της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης (HPFH) σε ασθενείς που πάσχουν από β-αιμοσφαιρινοπάθειες (Steinberg 2020). Στόχος της μελέτης είναι η επανενεργοποίηση της έκφρασης της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης (HbF) με γονιδιακή επεξεργασία ως θεραπευτική προσέγγιση της β-αιμοσφαιρινοπαθειών .

Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ένας μη-ενσωματούμενος, αδενοϊϊκός φορέας (HDAd5/35++), υψηλής συγγένειας με τον υποδοχέα-CD46 των $CD34^+$ κυττάρων που φέρει ως διαγονίδιο το σύστημα Adenine Base Editor (ABE)(Gaudelli et al. 2020), το οποίο αποτελείται από μία καταλυτικά ανενεργή Cas9 συντιγμένη με την απαμινάση TAdA* καθώς και ένα gRNA που στοχεύει ανοδικά των υποκινητών των γονιδίων της γ-σφαιρίνης με σκοπό την στοχευμένη εισαγωγή της HPFH σχετιζόμενης μετάλλαξης A>G στην θέση -113. Παράλληλα, με στόχο την ex vivo έκπτυξη των γενετικά τροποποιημένων κυττάρων, ο ιικός φορέας κωδικοποιεί μία μεταλλαγμένη ισομορφή του *MGMT* γονιδίου, που προσδίδει ανθεκτικότητα έναντι των χημικοθεραπευτικών φαρμάκων O6BG/BCNU. (Li and Lieber 2019)

Μέθοδοι

Κρυοσυντηρημένα $CD34^+$ κύτταρα που απομονώθηκαν από ασθενείς με β-θαλασσαιμία και $CD34^+$ κύτταρα που απομονώθηκαν από μη-κινητοποιημένο περιφερικό αίμα ασθενών με δρεπανοκυτταρική αναιμία, καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο παρουσία κυτοκινών, διαμολύνθηκαν με τον HDAd-ABE για 48 ώρες, σε πιάτα χαμηλής προσκόλλησης και ακολούθησε επιλογή των γενετικά τροποποιημένων κυττάρων μετά από καλλιέργεια παρουσία 50μM O6BG/35μM BCNU. Πριν και μετά την διαμόλυνση ελέγχθηκε η επίδραση της διαμόλυνσης στον ανοσοφαινότυπο των κυττάρων.

Ακολούθησε καλλιέργεια των γενετικά και μη τροποποιημένων κυττάρων σε μεθυλοκυτταρίνη για την ανάπτυξη ερυθρών/μυελικών αποικιών και σε μέσο ερυθροειδικής διαφοροποίησης. Με αλληλούχιση νέας γενιάς (NGS) ελέγχθηκε το ποσοστό στόχευσης στην θέση -113. Με το πέρας των καλλιεργειών, προσδιορίστηκε με κυτταρομετρία ροής και HPLC το ποσοστό έκφρασης της γ-σφαιρίνης και των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS). Ακολούθησε μικροσκοπική παρατήρηση της μορφολογίας κυτταροφυγοκεντρημάτων (cytospins), έπειτα από χρώση May-Grunwald και Giemsa.

Αποτελέσματα

Η γενετική τροποποίηση A>G στην θέση -113 ανοδικά των *HBG1/2* γονιδίων, δεν επηρέασε τον αρχέγονο χαρακτήρα των κυττάρων (%$CD34^+$/$CD38^-$/$CD90^+$), την κλωνογενή ικανότητα και τον ρυθμό έκπτυξης κατά την ερυθροειδική διαφοροποίηση. Αξίζει να σημειωθεί πως τα διαμολυσμένα κύτταρα εμφάνισαν υψηλότερο ρυθμό έκπτυξης συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Η επιλογή των διαμολυσμένων κυττάρων με την χρήση O6BG/BCNU είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού μετατροπής A>G στην θέση -113 από 25% σε 60%. Παράλληλα, τόσο στα δρεπανοκυτταρικά όσο και στα θαλασσαιμικά δείγματα, στο τέλος της ερυθροειδικής διαφοροποίησης παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφραση της γ-σφαιρίνης μετά από διαμόλυνση με τον HDAd-ABE ικό φορέα, η οποία ήταν μεγαλύτερη έπειτα από in vitro επιλογή με O6BG/BCNU. Μετά από έλεγχο με HPLC παρατηρήθηκε πως η επανενεργοποιήση της ενδογενούς γ-σφαιρίνης οδήγησε σε αποκατάσταση της ισορροπίας των σφαιρινών. Τέλος, αυξημένη έκφραση γ-σφαιρίνης οδήγησε σε βελτίωση παθοφυσιολογικών χαρακτηριστικών των νόσων. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε πτώση των επιπέδων ελευθέρων ριζών οξυγόνου και βελτίωση του παθολογικού φαινοτύπου των κυττάρων. Έπειτα από μικροσκοπική παρακολούθηση παρατηρήθηκε αυξημένος αριθμός ερυθροβλαστών που βρίσκονταν στα όψιμα στάδια της ερυθροειδικής διαφοροποίησής και ώριμων ερυθροκυττάρων, στις πειραματικές ομάδες που έλαβαν τον ικό φορέα σε αντίθεση με την ομάδα ελέγχου.

Συμπεράσματα

Συνοπτικά, προτείνεται μία εναλλακτική θεραπευτική προσέγγιση για τη γονιδιακή θεραπεία των β-αιμοσφαιρινοπαθειών, μέσω χρήσης του άδενο-ικού φορέα HDAd-ABE ως πλατφόρμα μεταφοράς ενός καινοτόμου συστήματος γενετικής τροποποίησης που στοχεύει στην επανενεργοποίηση της γ-σφαιρίνης.

Βιβλιογραφία

Gaudelli, Nicole M. et al. 2020. “Directed Evolution of Adenine Base Editors with Increased Activity and Therapeutic Application.” *Nature Biotechnology* 38(7): 892–900.

Higgs, Douglas R., James Douglas Engel, and George Stamatoyannopoulos. 2012a. “Thalassaemia.” *The Lancet* 379(9813): 373–83.

Jeong, You Kyeong, Beomjong Song, and Sangsu Bae. 2020. “Current Status and Challenges of DNA Base Editing Tools.” *Molecular Therapy* 28(9): 1938–52. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.07.021.

Leibowitz, Mitchell L. et al. 2021. “Chromothripsis as an On-Target Consequence of CRISPR–Cas9 Genome Editing.” *Nature Genetics* 53(6): 895–905. http://dx.doi.org/10.1038/s41588-021-00838-7.

Li, Chang, and André Lieber. 2019. “Adenovirus Vectors in Hematopoietic Stem Cell Genome Editing.” *FEBS Letters* 593(24): 3623–48.

Psatha, Nikoletta, Penelope-Georgia Papayanni, and Evangelia Yannaki. 2018. “A New Era for Hemoglobinopathies: More Than One Curative Option.” *Current Gene Therapy* 17(5): 364–78.

Rees, David C., Thomas N. Williams, and Mark T. Gladwin. 2010. “Sickle-Cell Disease.” *The Lancet* 376(9757): 2018–31. http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61029-X.

Steinberg, Martin H. 2020. “Fetal Hemoglobin in Sickle Hemoglobinopathies: High Hbf Genotypes and Phenotypes.” *Journal of Clinical Medicine* 9(11): 1–10.

Turchiano, Giandomenico et al. 2021. “Quantitative Evaluation of Chromosomal Rearrangements in Gene-Edited Human Stem Cells by CAST-Seq.” *Cell Stem Cell* 28(6): 1136-1147.e5. https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.02.002.

Λεντιϊκοί φορείς νέας γενιάς για την γονιδιακή θεραπεία της β-θαλασσαιμίας

ΠΑΣΧΟΥΔΗ Κυριακή[1], ΚΙΡΤΣΟΥ Αλεξάνδρα[2], ΒΑΣΙΛΟΥΔΗΣ Ιωάννης-Νίνος[3], ΜΠΕΤΑ Χριστίνα[4], ΠΙΠΕΡΙΔΟΥ Χαρούλα[5], ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ Φώτης[6], ΓΕΩΡΓΟΛΟΠΟΥΛΟΣ Γρηγόριος[7], ΓΙΑΝΝΑΚΗ Ευαγγελία[8], ΨΑΘΑ Νικολέττα[9]

Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ. «Γ. Παπανικολάου», paschoudik@gmail.com-1
Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ. «Γ. Παπανικολάου» alexandrakirtsou@gmail.com-2
Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ. «Γ. Παπανικολάου» ninos.vasiloudis@gmail.com-3
Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ. «Γ. Παπανικολάου» christina.beta1@gmail.com-4
Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ. «Γ. Παπανικολάου» piperidou.ch@gmail.com-5
Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ. «Γ. Παπανικολάου» fotispap00@gmail.com-6
Altius Institute for Biomedical Sciences, Seattle, georgolog@gmail.com-7
Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ. «Γ. Παπανικολάου», University of Washington, Seattle, eyannaki@uw.edu-8
Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, npsatha@bio.auth.gr- 9

Περίληψη
Η γονιδιακή θεραπεία αποτελεί την πιο πρόσφατα ανεπτυγμένη θεραπευτική μέθοδο για τη β-θαλασσαιμία, με θετικά έως τώρα αποτελέσματα. Παρά τη σχετική επιτυχία, υπάρχουν σαφείς περιορισμοί που σχετίζονται με το σχεδιασμό των θεραπευτικών φορέων. Για την επαρκή παραγωγή β-σφαιρίνης απαιτείται η ύπαρξη ενός ισχυρού ενισχυτή που θα επάγει υψηλή έκφραση του διαγονιδίου. Το μεγάλο μέγεθος της ρυθμιστικής αυτής περιοχής (β-globin LCR) που φτάνει τα 3kb, επιδρά αρνητικά στους τίτλους των παραγόμενων ιών και μειώνει δραστικά τη διαμολυσματική τους ικανότητα οδηγώντας σε μειωμένη αποδοτικότητα και υψηλό κόστος θεραπείας. Πρόσφατα, ταυτοποιήσαμε στο ανθρώπινο γονιδίωμα έναν αριθμό νέων, ερυθροειδικών, μικρού μεγέθους, ισχυρών μεταγραφικών ενισχυτών. Οι νέοι αυτοί ενισχυτές εκλέχθηκαν ως προς την ασφάλεια και αποτελεσματικότητα τους μετά από την εισαγωγή τους σε θεραπευτικούς ιικούς φορείς για τις β-αιμοσφαιρινοπάθειες. Παρατηρήθηκε πως δύο από αυτούς τους ενισχυτές μπορούν να αντικαταστήσουν αποτελεσματικά τον β-LCR, αυξάνοντας την ιική παραγωγή και την ικανότητα διαμόλυνσης, διατηρώντας παράλληλα το θεραπευτικό αποτέλεσμα.

Λέξεις κλειδιά
β-θαλασσαιμία, αιμοσφαιρινοπάθειες, αιμοποιητικά στελεχιαία κύτταρα, γονιδιακή θεραπεία, λεντιικοί φορείς

Εισαγωγή

Η β-θαλασσαιμία αποτελεί την πιο κοινή μονογονιδιακή ασθένεια παγκοσμίως και χαρακτηρίζεται από μειωμένη ή πλήρης απουσία έκφρασης της β-σφαιρίνης. Η συμβατική θεραπεία για την β-θαλασσαιμία περιλαμβάνει συνεχείς μεταγγίσεις αίματος και θεραπεία αποσιδήρωσης, με την αλλογενή μεταμόσχευση στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων να αποτελεί την μόνη θεραπεία πλήρους ίασης (Higgs, Engel, and Stamatoyannopoulos 2012).

Τις τελευταίες τρεις δεκαετίας η ραγδαία εξέλιξη της γονιδιακής θεραπείας κατέστησε εφικτή την εισαγωγή ενός θεραπευτικού γονιδίου με στόχο την πρόκληση ενός νοσοτροποποιητικού αποτελέσματος (Cavazzana and Mavilio 2018). Είναι γνωστό πως η κληρονομική παραμονή της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης (HPFH), που χαρακτηρίζεται από υψηλά ποσοστά γ-σφαιρίνης στην ενήλικη ζωή, βελτιώνει κλινικά τον θαλασσαιμικό φαινότυπο. Επομένως ως θεραπευτικό διαγονίδιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο το φυσιολογικό γονίδιο της β-σφαιρίνης, όσο και της γ-σφαιρινης (Ferrari,

Cavazzana, and Mavilio 2017; Martyn et al. 2018). Εναλλακτικά, έχει με παρόμοια επιτυχία χρησιμοποιηθεί σε κλινικές μελέτες ένα shRNA που στοχεύει τον κύριο ρυθμιστή της καταστολής της γ-σφαιρίνης, BCL11A(Liu et al. 2018). Η ανάγκη ωστόσο για συνεχή και ισχυρή έκφραση του θεραπευτικού διαγονιδίου απαιτεί την ύπαρξη ενός ισχυρού ενισχυτή, όπως ο μLCR (micro Locus Control Region) που φυσιολογικά αποτελεί τμήμα της ρυθμιστικής περιοχής των γονιδίων των β-σφαιρινών. Σημαντικό μειονέκτημα της προσέγγισης αποτελεί το αυξημένο μέγεθος του μLCR (3kb) μειώνει σημαντικά τον ιικό τίτλο και την ικανότητα διαμόλυνσης (Kumar et al. 2001). Παράλληλα, η ενεργότητά του και σε άλλες κυτταρικούς τύπους πέρα της ερυθράς σειράς αυξάνει την πιθανότητα μεταλλαξιγένεσης.

Μετά από ενδελεχή έλεγχο του γονιδιώματος του ανθρώπου για ερυθροειδικές cis-ρυθμιστικές αλληλουχίες μέσω DNaseI sequencing που πραγματοποιήθηκε στο Altius Institute for Biomedical Sciences, Seattle, USA, εντοπίστηκαν 5.000 στοιχεία με πιθανή ιδιότητα ερυθροειδικού ενισχυτή. Από την παραπάνω μελέτη ταυτοποιήθηκαν δύο ισχυροί ενισχυτές (ρυθμιστικές αλληλουχίες των γονιδίων PPARA και PVT1) μικρού μεγέθους (<300bp) που αποκτούν προσβάσιμη μορφή χρωματίνης σε διαφορετικά στάδια της ερυθροειδικής διαφοροποίησης. Αντικατάσταση του μLCR από τους νέους, μικρού μεγέθους ερυθροειδικούς ενισχυτές θα μπορούσε να οδηγήσει σε βελτίωση του ιικού τίτλου και αύξηση της έκφρασης του διαγονιδίου.

Στόχος

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας μιας νέας γενιάς λεντιικών φορέων, που διαθέτουν τις πρόσφατα ταυτοποιημένες αλληλουχίες νέων ενισχυτών και η σύγκριση της αποτελεσματικότητάς τους με τον ευρέως χρησιμοποιούμενο μLCR. Οι λεντιικοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία κωδικοποιούν είτε το shRNA που στοχεύει στην αποσιώπηση της έκφρασης του BCL11A, είτε το γονίδιο της γ-σφαιρίνης.

Μέθοδοι

Κρυοσυντηρημένα $CD34^+$ κύτταρα που απομονώθηκαν από ασθενείς με β-θαλασσαιμία σε προηγούμενη κλινική μελέτη κινητοποίησης, καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο παρουσία κυτοκινών και ακολούθησε διαμόλυνση με τους λεντιικούς φορείς μLCR-shRNA(ομάδα ελέγχου) και PVT1-shRNA, καθώς και με τους αντίστοιχους ιικούς φορείς που φέρουν το θεραπευτικό γονίδιο της γ-σφαιρίνης (μLCR+γ-σφαιρίνη και PVT1+γ-σφαιρίνη). Έπειτα από δύο μέρες τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο ερυθροειδικής διαφοροποίησης καθώς και σε ημιστέρρεο μέσο μεθυλοκυτταρίνης με στόχο τον έλεγχο της κλωνογενούς ικανότητας των κυττάρων. Κατά την διάρκεια της ερυθροειδικής καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ικανότητας έκπτυξης και διαφοροποίησης των CD34+ κυττάρων. Στο τέλος της καλλιέργειας με κυτταρομετρία ροής προσδιορίστηκαν τα ποσοστά έκφρασης γ-σφαιρίνης και ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS). Με HPLC ταχτοποιήθηκε το ποσοστό των σφαιρινών και με Real-time PCR ο αριθμός των ιικών αντιγράφων ανά κύτταρο, που αντικατοπτρίζει την διαμολυσματική ικανότητα των ιικών φορέων. Τέλος, ακολούθησε μικροσκοπική παρατήρηση της μορφολογίας κυτταροφυγοκεντρημάτων (cytospins), έπειτα από χρώση May-Grunwald και Giemsa.

Αποτελέσματα

Έπειτα από διαμόλυνση και καλλιέργεια των CD34+ κυττάρων σε μέσο ερυθροειδικής διαφοροποίησης παρατηρήθηκε πως η διαμόλυνση με τους δύο ιικούς φορείς απέδωσε ένα πλεονέκτημα επιβίωσης και πολλαπλασιασμού στα τροποποιημένα κύτταρα. Παρατηρήθηκε επίσης σημαντική αύξηση στην έκφραση της γ-σφαιρίνης στα εμπύρηνα ερυθροκύτταρα (66.72±1.95% PVT1-shRNA και 59.23±1.6% μLCR-shRNA vs 50.53±3.62% στα μη-διαμολυσμένα κύτταρα, αντίστοιχα, *p=0.04, **p=0.004). Η αύξηση της έκφρασης της γ-σφαιρίνης στα ώριμα ερυθροκύτταρα ωστόσο ήταν σημαντική παρατηρήθηκε μόνο στην πειραματική ομάδα PVT1-shRNA σε σχέση με τα κύτταρα που δεν έλαβαν τον ιικό φορέα (29.82±3.18% vs 17.6±0.66%, αντίστοιχα *p=0.01). Στην περίπτωση των ιικών φορέων που φέρουν το διαγονίδιο της γ-σφαιρίνης υπό τον έλεγχο του μLCR ή του PVT1 παρατηρήθηκε

υψηλότερη αύξηση μετά την ενσωμάτωση του PVT1+γ-σφαιρίνη ικού φορέα τόσο στα εμπύρηνα (46,3% μLCR+γ-σφαιρίνη vs 60,3 PVT1+γ-σφαιρίνη vs 36,7% στα μη διαμολυσμένα κύτταρα) όσο και στα απύρηνα ώριμα ερυθροκύτταρα (22,6% μLCR+γ-σφαιρίνη vs 56,4% PVT1+ γ-σφαιρίνη vs 27,5% στα μη διαμολυσμένα κύτταρα). Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και με HPLC, όπου παρατηρήθηκε αποκατάσταση της αναλογίας β-σφαιρινών προς α-σφαιρίνη και με τη χρήση των λεντιικών φορέων που φέρουν ως ενισχυτή τον PVT1. Η υψηλή έκφραση της γ-σφαιρίνης και η ισορροπία του λόγου των σφαιρινών στα διαμολυσμένα κύτταρα είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση των επιπέδων ROS, την αναστολή της καθήλωσης των θαλασσαιμικών ερυθροβλαστών στα πρωιμότερα στάδια διαφοροποίησης καθώς και αυξημένο ποσοστό τελικώς διαφοροποιημένων ερυθροκυττάρων.

Συμπεράσματα

Συμπερασματικά η εισαγωγή του νέου μικρού ερυθροειδικού ενισχυτή PVT1 σε θεραπευτικούς λεντιικούς φορείς για την γονιδιακή θεραπεία της β-θαλασσαιμίας αποδεικνύεται εξίσου αν όχι περισσότερο αποτελεσματική ως προς την επαγωγή της έκφρασης της γ-σφαιρίνης, συγκριτικά με τον έως τώρα ευρέως χρησιμοποιούμενο μLCR. Αυτή η παρατήρηση σε συνδυασμό με τον αποδεδειγμένο υψηλότερο ικό τίτλο κατά την παραγωγή των νέων ικών φορέων υποστηρίζουν την υπεροχή τους ως προς τους μέχρι τώρα χρησιμοποιούμενους φορείς. Συνολικά, αναπτύξαμε μία νέα γενιά λεντιικών φορέων με στόχο την βελτιστοποίηση των πρωτοκόλλων γονιδιακής θεραπείας για την β-θαλασσαιμία.

Βιβλιογραφία

Cavazzana, Marina, and Fulvio Mavilio. 2018. “Gene Therapy for Hemoglobinopathies.” *Human Gene Therapy* 29(10): 1106–13.

Ferrari, Giuliana, Marina Cavazzana, and Fulvio Mavilio. 2017. “Gene Therapy Approaches to Hemoglobinopathies.” *Hematology/Oncology Clinics of North America* 31(5): 835–52.

Higgs, Douglas R., James Douglas Engel, and George Stamatoyannopoulos. 2012. “Thalassaemia.” *The Lancet* 379(9813): 373–83.

Kumar, Mukesh, Brian Keller, Ndeye Makalou, and Richard E. Sutton. 2001. “Systematic Determination of the Packaging Limit of Lentiviral Vectors.” *Human Gene Therapy* 12(15): 1893–1905.

Liu, Nan et al. 2018. “Direct Promoter Repression by BCL11A Controls the Fetal to Adult Hemoglobin Switch.” *Cell* 173(2): 430-442.e17. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.016.

Martyn, Gabriella E. et al. 2018. “Natural Regulatory Mutations Elevate the Fetal Globin Gene via Disruption of BCL11A or ZBTB7A Binding.” *Nature Genetics* 50(4): 498–503. http://dx.doi.org/10.1038/s41588-018-0085-0.

Ο HIF-1α περιορίζει τον πολλαπλασιασμό των καρδιομυοβλαστών σε ένα μοντέλο πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων ανθρώπινης καρδιομυογένεσης

ΔΑΙΟΥ Αγγελική[1], ΠΕΤΑΛΙΔΟΥ Αικατερίνη[1], ΣΑΡΡΗ Πολυξένη-Παναγιώτα[1], ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ Ι. Ελευθέριος[1], ΣΙΩΚΑΤΑΣ Γεώργιος[1], ΜΟΥΣΚΕΦΤΑΡΑ Θωμαή[2], ΤΣΙΒΟΓΛΟΥ Ευθύμιος[1], ΚΟΤΤΑΡΙΔΗ Χριστίνα[1], ΓΚΙΚΑ Γ. Ελένη[2], KUZNETSOV N. Jeffim[3,4], DYKXHOORN Derek[5,6], HARE M. Joshua[3,5], ΛΑΖΟΥ Αντιγόνη[7], ΧΑΤΖΗΣΤΕΡΓΟΣ Ε. Κωνσταντίνος[1,3,8]

[1]Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης & Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, angeldaiou@bio.auth.gr, apetalid@bio.auth.gr, polysarr@bio.auth.gr, lefterispap97@gmail.com, georsiok@bio.auth.gr, tsivoglo@bio.auth.gr, ckottaridi@bio.auth.gr, kchatzistergos@bio.auth.gr
[2]Biomic_Auth, Κέντρο Βιοανάλυσης και Τεχνολογιών Omics, Κέντρο Διεπιστημονικής Έρευνας και Καινοτομίας ΑΠΘ, mouskeftara32@gmail.com, gkikae@auth.gr
[3]Interdisciplinary Stem Cell Institute and Departments of [4]Ophthalmology, [5]Medicine, [6]Human Genetics and [8]Cell Biology, University of Miami Miller School of Medicine, Miami, FL, USA, jkuznetsov@med.miami.edu, ddykxhoorn@med.miami.edu, jhare@med.miami.edu
[7]Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων, Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, lazou@bio.auth.gr

Περίληψη
Οι καρδιομυοπάθειες αποτελούν τη συχνότερη αιτία νοσηρότητας και θνητότητας παγκοσμίως. Η απουσία αποτελεσματικών πρακτικών για τη θεραπεία τους οφείλεται στην αδυναμία της ανθρώπινης καρδιάς να αντικαθιστά καρδιομυοκύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη. Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, ο πολλαπλασιασμός των καρδιομυοκυττάρων συνδέεται με την αναερόβια επαγωγή γλυκόλυσης από τον μεταγραφικό παράγοντα HIF-1α (Hypoxia Inducible Factor-1α). Ωστόσο, μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία που συνηγορούν στην οξυγονοεξαρτώμενη δράση του HIF-1α, ενώ, επιπλέον, οι σχετικές έρευνες έχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα όσον αφορά τον ρόλο του εν λόγω παράγοντα στην καρδιακή μυογένεση. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε *in vitro* μοντέλο ανθρώπινων επαγόμενων πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων, τα οποία διαφοροποιήθηκαν στοχευμένα προς καρδιομυοκύτταρα, και διερευνήθηκε ο ρόλος του HIF-1α στον κυτταρικό μεταβολισμό και πολλαπλασιασμό. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι ο HIF-1α σταθεροποιείται με οξυγονοανεξάρτητο τρόπο, επάγοντας αερόβια γλυκόλυση και περιορίζοντας τον πολλαπλασιασμό των καρδιομυοβλαστών. Επομένως, η στόχευση του παράγοντα HIF-1α θα μπορούσε να συμβάλει αποτελεσματικά στη θεραπεία των καρδιομυοπαθειών.

Λέξεις-κλειδιά
Ανάπτυξη καρδιομυοκυττάρων, πολλαπλασιασμός καρδιομυοκυττάρων, HIF-1α, hiPSCs, καρδιακή διαφοροποίηση

Εισαγωγή
Σε αντίθεση με ορισμένους οργανισμούς, όπως το ψάρι ζέβρα, ορισμένα ουρόδηλα αμφίβια και οι νεογέννητοι μύες και γουρούνια, οι οποίοι μπορούν να αναγεννούν πλήρως μεγάλο τμήμα του κοιλιακού μυοκαρδίου τους μετά από τραυματισμό, ο άνθρωπος διαθέτει ελάχιστη ενδογενή αναγεννητική ικανότητα (Daiou et al. 2021). Μάλιστα, έχει δειχθεί ότι σχεδόν το σύνολο των καρδιομυοκυττάρων που απαρτίζουν την ενήλικη ανθρώπινη καρδιά έχουν προκύψει κατά την εμβρυογένεση, ενώ μετά τη γέννηση παρατηρείται διακοπή του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων της καρδιάς. Συνεπώς, καθίσταται αναγκαία η ενδελεχής διερεύνηση των μηχανισμών που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό των καρδιομυοκυττάρων κατά την ανάπτυξη και αναγέννηση του μυοκαρδίου. Πρόσφατες μελέτες συνδέουν τον πολλαπλασιασμό των καρδιομυοκυττάρων με την παροδική επαγωγή γλυκόλυσης, μέσω του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα 1α (HIF-1α) (Guimarães-Camboa et al. 2015, Janbandhu, V. et al. 2022, Menendez-Montes, I. et al. 2016, Mohamed, T. M., Abouleisa, R., & Hill, B. G. 2022, Semenza, G. L. 2014). Ωστόσο, το εάν η επαγωγή γλυκόλυσης από τον HIF-1α εξαρτάται από το οξυγόνο αλλά και το ενδεχόμενο ο παράγοντας αυτός να προωθεί ή να καταστέλλει τον

πολλαπλασιασμό των καρδιομυοκυττάρων, παραμένουν αμφιλεγόμενα.

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι ο *in vitro* προσδιορισμός του ρόλου του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α στην ανθρώπινη καρδιακή μυογένεση, και συγκεκριμένα στον κυτταρικό μεταβολισμό και πολλαπλασιασμό.

Μέθοδοι

Μέσω του συστήματος CRISPR-Cas9, πραγματοποιήθηκε ολική απαλοιφή του HIF-1α (HIF1α-KO) σε ανθρώπινα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (hiPSCs). Τα hiPSCs άγριου τύπου (WT) και τα HIF1α-KO υποβλήθηκαν σε χημικώς καθορισμένη, σταδιο-ειδική διαφοροποίηση προς καρδιομυοκύτταρα, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες O_2 και υπό την παρουσία 5% CO_2. Για τη διερεύνηση του μεταβολικού προφίλ των δύο κυτταρικών τύπων, πραγματοποιήθηκε αέριος χρωματογραφία και φασματομετρία μαζών (GC-MS) στο εξωκυτταρικό περιβάλλον ώριμων, πλήρως διαφοροποιημένων καρδιομυοκυττάρων. Η ανάλυση κυτταρικού κύκλου, καθώς και η επίδραση του HIF-1α στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αξιολογήθηκαν με κυτταρομετρία ροής, μετά από χρώση WT και HIF1α-KO κυττάρων με ιωδιούχο προπίδιο, σε διαφορετικά στάδια της καρδιακής διαφοροποίησης. Ο ρόλος του HIF-1α στον πολλαπλασιασμό των διαφοροποιούμενων WT και HIF1α-KO καρδιομυοβλαστών τεκμηριώθηκε περαιτέρω μετά από ποσοτική εκτίμηση του κλάσματος μιτωτικών καρδιομυοβλαστών με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού για την ιστόνη H3 φωσφορυλιωμένη στη σερίνη-10 (PH3S10), καθώς και με ανοσοστύπωμα πρωτεϊνών για το πυρηνικό αντιγόνο πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων (PCNA).

Αποτελέσματα

Η απαλοιφή του HIF-1α δεν ανέδειξε εμφανείς διαφορές στην ικανότητα διαφοροποίησης των hiPSCs σε παλλόμενα καρδιακά μυοκύτταρα. Αναλύσεις ανοσοστυπώματος πρωτεϊνών και συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού κατέδειξαν ισχυρή, οξυγονοανεξάρτητη επαγωγή και πυρηνική μετατόπιση του HIF-1α στους WT, αλλά όχι στους HIF1α-KO καρδιομυοβλάστες. Η σταθεροποίηση του HIF-1α κορυφώθηκε την 7η ημέρα της διαφοροποίησης και στη συνέχεια ελαττώθηκε. Ποσοτική ανάλυση των εξωκυττάριων μεταβολιτών ανέδειξε αυξημένα επίπεδα γαλακτικού οξέος ($p=0,004$) και μειωμένα επίπεδα D-Γλυκόζης ($p=0,02$) σε WT έναντι των HIF1α-KO καρδιομυοκυττάρων. Επιπλέον, οι εξωκυτταρικές συγκεντρώσεις αρκετών ενδιάμεσων μεταβολιτών του κύκλου Krebs με δράση αναστολέα υδροξυλασών της προλίνης (PHDs) αυξήθηκαν σημαντικά στα κύτταρα WT έναντι των HIF1α-KO ($p<0,05$). Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής ιωδιούχου προπιδίου έδειξε ~43% αύξηση σε μιτωτικές διαιρέσεις (φάση G2M) στους HIF1α-KO έναντι WT καρδιομυοβλαστών, την ημέρα 7 της καρδιακής διαφοροποίησης. Η σημαντική αύξηση στην πολλαπλασιαστική ισχύ των HIF1α-KO καρδιομυοβλαστών επιβεβαιώθηκε περαιτέρω μέσω ανοσοστυπώματος του πυρηνικού αντιγόνου πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων (PCNA), καθώς και με ποσοτική ανάλυση της φωσφωρυλιωμένης ιστόνης H3 στη σερίνη-10 (PH3S10) ($p<0,001$), σε εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού.

Συμπεράσματα

Κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ανθρώπινης καρδιομυογένεσης, ο HIF-1α σταθεροποιείται παροδικά μέσω μηχανισμών ανεξάρτητων από το οξυγόνο, που περιλαμβάνουν αναστολή των PHDs από ενδιάμεσους μεταβολίτες του κύκλου Krebs, και μετατοπίζει τον κυτταρικό μεταβολισμό προς αερόβια γλυκόλυση, περιορίζοντας τον πολλαπλασιασμό των καρδιομυοβλαστών. Τα αποτελέσματά μας αναμένεται να οδηγήσουν στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων, με στόχο την παρεμπόδιση της σταθεροποίησης του HIF-1α στα καρδιομυοκύτταρα και την επανείσοδό τους στον κυτταρικό κύκλο, για την αναγέννηση του μυοκαρδίου ως απόκριση σε καρδιακές παθήσεις.

Ενδεικτική βιβλιογραφία

Daiou, A., Petalidou, K., Siokatas, G., Papadopoulos, E. I., & Hatzistergos, K. E. (2021). Developmental

and regenerative biology of cardiomyocytes. *International Journal of Developmental Biology*, 66(1-2-3), 59-75.

Guimarães-Camboa, N., Stowe, J., Aneas, I., Sakabe, N., Cattaneo, P., Henderson, L., ... & Zambon, A. C. (2015). HIF1α represses cell stress pathways to allow proliferation of hypoxic fetal cardiomyocytes. *Developmental cell*, 33(5), 507-521.

Janbandhu, V., Tallapragada, V., Patrick, R., Li, Y., Abeygunawardena, D., Humphreys, D. T., ... & Harvey, R. P. (2022). Hif-1a suppresses ROS-induced proliferation of cardiac fibroblasts following myocardial infarction. *Cell Stem Cell*, 29(2), 281-297.

Menendez-Montes, I., Escobar, B., Palacios, B., Gómez, M. J., Izquierdo-Garcia, J. L., Flores, L., ... & Martin-Puig, S. (2016). Myocardial VHL-HIF signaling controls an embryonic metabolic switch essential for cardiac maturation. *Developmental cell*, 39(6), 724-739.

Mohamed, T. M., Abouleisa, R., & Hill, B. G. (2022). Metabolic determinants of cardiomyocyte proliferation. *Stem Cells*, 40(5), 458-467.

Semenza, G. L. (2014). Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease. *Annual review of physiology*, 76, 39-56.

Ποσοτικοποίηση του χημικοθεραπευτικού παράγοντα 5-φθορουρακίλη σε καλλιέργειες του προβιοτικού βακτηρίου Lactococcus lactis

ΜΑΪΛΙΑΝ Άννα[1], ΒΛΙΩΡΑ Αγγελική[2], ΜΑΥΡΟΜΑΤΗΣ Πέτρος[3], ΤΟΥΡΑΚΗ Μαρία[4]

1.*Εργ. Γεν. Βιολογίας, Τομέας Γ.Α.Μ.Β., Τμήμα Βιολογίας, Σ.Θ.Ε., Α.Π.Θ.*, amailian@bio.auth.gr
2.*Εργ. Γεν. Βιολογίας, Τομέας Γ.Α.Μ.Β., Τμήμα Βιολογίας, Σ.Θ.Ε., Α.Π.Θ.*, angevlio@bio.auth.gr
3.*Εργ. Γεν. Βιολογίας, Τομέας Γ.Α.Μ.Β., Τμήμα Βιολογίας, Σ.Θ.Ε., Α.Π.Θ.*, petrosmt@bio.auth.gr
4.*Εργ. Γεν. Βιολογίας, Τομέας Γ.Α.Μ.Β., Τμήμα Βιολογίας, Σ.Θ.Ε., Α.Π.Θ.*, touraki@bio.auth.gr

Περίληψη
Η 5-φθορουρακίλη (5-FU), ένα κοινό χημειοθεραπευτικό στην αντιμετώπιση καρκίνων του παχέος εντέρου, δρα αναστέλλοντας την παραγωγή πρόδρομων ενώσεων θυμιδίνης οδηγώντας σε βλάβες του DNA και τελικά σε κυτταρικό θάνατο. Η θανατηφόρα τοξικότητα συσχετίζεται με ανεπάρκεια της αφυδρογονάσης δευδροπυριμιδινών. Η ήπια τοξικότητα αντιμετωπίζεται με τη χορήγηση προβιοτικών. Δεν έχουν μελετηθεί οι πιθανές αλληλεπιδράσεις του φαρμάκου με τους χορηγούμενους μικροοργανισμούς. Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε πρωτόκολλο για την εκχύλιση και ποσοτικοποίηση της 5-FU σε κύτταρα και θρεπτικό μέσο καλλιέργειας του προβιοτικού βακτηρίου *Lactococcus lactis*. Πειράματα χορήγησης 5-FU (50 μg/mL) σε καλλιέργειες *L. lactis* για 24h, έδειξαν μείωση επιπέδων του φαρμάκου στο θρεπτικό μέσο στα 39,4 μg/mL και είσοδο στα βακτηριακά κύτταρα (5,4 μg/mL). Η μείωση των επιπέδων του φαρμάκου δεν αντιστοιχεί στην αποικοδόμηση του από αβιοτικούς παράγοντες.Τα αποτελέσματα μας παρέχουν ένα εργαλείο για τη μελέτη της 5-FU σε καλλιέργειες μικροοργανισμών και υποδεικνύουν πρόσληψη και πιθανή βιομετατροπή του φαρμάκου *in vitro*.

Λέξεις-κλειδιά
5-Φθορουρακίλη, Καρκίνος παχέος εντέρου, προβιοτικά, *Lactococcus lactis*, HPLC

Εισαγωγή

Το κοινό χημειοθεραπευτικό 5-φθορουρακίλη (5-FU) χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση καρκίνων του γαστρεντερικού σωλήνα και δρα παρεμποδίζοντας το βιοχημικό μονοπάτι αύξησης της πρόσληψης και χρήσης ουρακίλης (Dushinsky, Pleven & Heidelberger 1957, Shirasaka 2009). Η ίδια η 5-FU δεν έχει κυτταροτοξικές επιδράσεις όμως μετά από αλληλεπίδραση με φωσφορυλιωμένα σάκχαρα παράγονται ενεργοί μεταβολίτες με αντικαρκινικές ιδιότητες. Ένας από τους κυριότερους είναι η 5-μονοφωσφορική φθοροδεοξυουριδίνη (FdUMP) (Longley, Harkin & Johnston 2003).
Οι παρενέργειες που προκαλεί η 5-FU έχουν συσχετιστεί με διαταραχή της ομοιόστασης του εντερικού μικροβιώματος και περιλαμβάνουν εμετό και διάρροια. Για την καταπολέμηση ή ακόμη και την εξάλειψη αυτών των συμπτωμάτων προτείνεται η χορήγηση κοκτέιλ προβιοτικών πολλά από τα οποία περιέχουν βακτήρια του γένους *Lactococcus* (Osterlund et al. 2007, Darbandi et al. 2020). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η βιοδιαθεσιμότητα στοματικά χορηγούμενων φαρμάκων μπορεί να επηρεαστεί από την βιομετατροπή ή την συσσώρευση τους από μικροοργανισμούς του εντερικού μικροβιώματος (Sousa et al. 2008). Ταυτόχρονα, στελέχη *L. lactis* που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στην 5-FU φαίνεται να διαθέτουν διαφορετικούς μηχανισμούς μετατροπής της ουρακίλης σε dUMP (Martinussen & Hammer 1994).

Αν και υπάρχει πληθώρα μεθόδων για την ποσοτικοποίηση της 5-FU σε βιολογικά δείγματα, δεν έχει αναφερθεί μέθοδος που να ειδικεύεται στην ποσοτικοποίηση της σε μικροβιακές καλλιέργειες (Breda & Barattè 2010).

Στην παρούσα έρευνα αναπτύχθηκε πρωτόκολλο για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της ουρακίλης και 5-FU σε κύτταρα και θρεπτικό μέσο καλλιέργειας του προβιοτικού βακτηρίου *L. lactis* με χρήση

υψηλής απόδοσης χρωματογραφία υγρών (HPLC). Ακολούθησαν δοκιμασίες χορήγησης του φαρμάκου σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες της μέσης θανατηφόρου δόσης (LC50). Η παρούσα εργασία παρέχει ένα εργαλείο για προσιτή και οικονομική μελέτη των αλληλεπιδράσεων της 5-FU με μικροοργανισμούς *in vitro*.

Μεθοδολογία

Για την ανάπτυξη του *L. lactis* σε υγρή και στερεή καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε το μέσο BHI (Brain Heart Infusion) σε ζωμό για την υγρή καλλιέργεια και άγαρ για στερεή. Ελέγχθηκε η μορφολογία αλλά και ο ρυθμός ανάπτυξης των βακτηρίων. Επιπλέον προσδιορίστηκαν η τοξικότητα της 5-FU στο βακτήριο, ώστε να οριστεί η συγκέντρωση που είναι ικανή να σκοτώσει το 50% του βακτηριακού πληθυσμού (LC_{50}), με έκθεση του βακτηρίου σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις 5-FU για 24h.

Για τον έλεγχο του μεταβολισμού της 5-FU παρασκευάστηκε ελάχιστο θρεπτικό μέσο αλάτων (Basal Salts Medium-BSM) με κύρια πηγή άνθρακα την 5-FU, ώστε το βακτήριο να αναγκαστεί να προσλάβει το φάρμακο για να αναπτυχθεί, σε διάστημα 24 ωρών, αλλά και για την παραγωγή δειγμάτων χωρίς προσμίξεις για ανάλυση στην HPLC. Για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε BSM, προηγήθηκε καλλιέργεια 24 ωρών στο BHI, φυγοκέντρηση και επαναιώρηση του ιζήματος σε BSM. Στο σημείο αυτό προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα 5-FU ώστε η τελική της συγκέντρωση να είναι 50μg/mL, μικρότερη της LD_{50}.

Έγινε λήψη δείγματος (0.5 mL) στις 0 και στις 24h. Ως ώρα 0 ορίστηκε η χρονική στιγμή προσθήκης του φαρμάκου στην καλλιέργεια. Για την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν 0.5 g θειικού αμμωνίου (1:1 w/v) και στη συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρήθηκε και υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE, C_{18}). Ακριβώς πριν από την ανάλυση προστέθηκε το αναλυτικό πρότυπο 5-Βρωμοουρακίλη (5-BrU) σε τελική συγκέντρωση 50μg/mL. Για την ανάλυση του βακτηριακού ιζήματος (0,1gr) προηγήθηκε της παραπάνω διαδικασίας ομογενοποίηση σε 0.5 mL H_2O που περιείχε 0.05% v/v μυρμηκικό οξύ (1:5 *v/v*),.

Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε σε όργανο HPLC-DAD ($LC20_{AD}$, Shimadzu) με τη μέθοδο βαθμιδωτής έκλουσης (A : ddH_2O με 0.05% μυρμηκικό και ακετονιτρίλιο (95:5 v/v), B: ddH_2O με 0.05% μυρμηκικό και ακετονιτρίλιο (5:95 v/v)). Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της προσδιοριζόμενης ουσίας προηγήθηκε η κατασκευή πρότυπης καμπύλης τόσο για το υπερκείμενο καλλιέργειας όσο και για τα κύτταρα των βακτηρίων.

Αποτελέσματα

Η Μέση Θανατηφόρος Συγκέντρωση (LC50) υπολογίστηκε από την εξίσωση ευθείας της καμπύλης προσδιορισμού θνησιμότητας (%) των κυττάρων συναρτήσει της συγκέντρωσης του φαρμάκου, στα 63,4 μg/mL. Οι πρότυπες καμπύλες προσδιορισμού της 5-FU ήταν $y = 0.0054x + 0.104$, $R^2=0.999$ για το μέσο και $y = 0.0052x + 0.078$, $R^2=0.999$ για τα κύτταρα.

Όσον αφορά το υπερκείμενο, όπως φαίνεται στον Πίνακα 1, μετά το πέρας 24 ωρών η συγκέντρωση της 5-FU είχε μειωθεί σε 39,4μg/mL, δηλαδή το βακτήριο είχε απομακρύνει το 11,3% του φαρμάκου. Από την άλλη, τα κύτταρα *L. lactis* από την ίδια καλλιέργεια BSM 24 ωρών είχαν 5,4 μg/mL 5-FU (Πίνακας 1.).

Πίνακας 1: Μείωση συγκέντρωσης 5-FU στο υπερκείμενο κυττάρων L. lactis και πρόσληψή της από τα κύτταρα

Χρόνος(h)	*Μέση υπολογισμένη συγκέντρωση 5-FU (μg/ml)*	
	Υπερκείμενο	Κύτταρα
0	49.4	0.0
24	39.4	5.4

Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα μας υποδεικνύουν πως το είδος *L. lactis* έχει τη δυνατότητα να συσσωρεύει και πιθανώς να μετασχηματίζει τον χημειοθεραπευτικό παράγοντα 5-FU. Απαιτούνται περαιτέρω έρευνες που θα περιλαμβάνουν και άλλα είδη προβιοτικών μικροοργανισμών καθώς και μελέτη της μεταβολικής τύχης της 5-FU σε καλλιέργειες μικροβίων μετά το χρονικό περιθώριο των 24 ωρών. Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο για την μελέτη της αλληλεπίδρασης του φαρμάκου με την εντερική μικροχλωρίδα και της πιθανής επιρροής που μπορεί να έχει στην αποτελεσματικότητα της θεραπείας ασθενών. Τέλος, αξίζει να πραγματοποιηθεί έλεγχος και ποσοτικοποίηση των κυριότερων μεταβολιτών της 5-FU σε καλλιέργειες μικροοργανισμών προκειμένου να εξεταστεί το ενδεχόμενο μετατροπής του φαρμάκου σε ανενεργά παράγωγα.

Βιβλιογραφία

Breda, M. & Barattè, S. (2010). A review of analytical methods for the determination of 5-fluorouracil in biological matrices. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 397, 1191–1201.

Daniel, B. Longley, D., Harkin, P. & Johnston P.G. (2003). 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies, *Nature Reviews Cancer* 3, 330–38.

Darbandi, A., Mirshekar, M., Shariat, A., Moghadam, M. T., Lohrasbi, V., Asadolahi, P. & Talebi, M. (2020). The effects of probiotics on reducing the colorectal cancer surgery complications: A periodic review during 2007-2017. *Clinical nutrition* (Edinburgh, Scotland), 39, 2358–2367.

Dushinsky, R., Pleven, E. & Heidelberger, C. (1957). The synthesis of 5-fluoropyrimidines. *J Am Chem Soc.*, 79, 4559–60.

Martinussen, J. & Hammer, K. (1994). Cloning and characterization of upp, a gene encoding uracil phosphoribosyltransferase from *Lactococcus lactis*, *J Bacteriology*, 176, 6457–6463.

Osterlund, P., Ruotsalainen, T., Korpela, R., Saxelin, M., Ollus, A., Valta, P., Kouri, M., Elomaa, I. & Joensuu, H. (2007). Lactobacillus supplementation for diarrhoea related to chemotherapy of colorectal cancer: a randomized study, *Br J Cancer*, 97, 1028–1034.

Shirasaka, T. (2009). Development history and concept of an oral anticancer agent S-1 (TS-1): its clinical usefulness and future vistas, *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 39, 2–15.

Sousa, T., Paterson, R., Moore, V., Carlsson, A., Abrahamsson, B., & Basit, A. (2008). The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs, *Intern. J Pharm.*, 363, 1–25.

Επίδραση της διατροφικής προσθήκης προνυμφών Tenebrio molitor που εκτράφηκαν με συστατικά αρωματικών-φαρμακευτικών φυτών στην έκφραση πρωτεϊνών Hsps και MAPKs της τσιπούρας Sparus aurata

ΠΑΝΤΕΛΗ Νικόλας[1], ΚΟΝΤΟΓΕΩΡΓΙΟΥ Παναγιώτα[1], ΧΑΤΣΑΤΟΥΡΙΑΝ Χριστίνα[1], ΚΟΛΥΓΑΣ Μάρκος[2], ΜΠΙΤΧΑΒΑ Κωνσταντίνα[3], ΓΚΟΥΒΑ Ευαγγελία[2], ΧΑΤΖΟΠΟΥΛΟΣ Αχιλλέας[2], ΓΡΗΓΟΡΙΑΔΟΥ Κατερίνα[4], ΑΝΔΡΕΑΔΗΣ Στέφανος[4], ΑΘΑΝΑΣΙΟΥ Χρήστος[5], ΓΙΑΝΝΕΝΑΣ Ηλίας[6], ΜΠΟΝΟΣ Ελευθέριος[2], ΝΑΘΑΝΑΗΛΙΔΗΣ Κοσμάς[2], ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ Ευθυμία[1]

[1]Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 54124, Θεσσαλονίκη, email: nkpanteli@bio.auth,gr, panagiota.kontogeorgiou@gmail.com, cachristi@bio.auth.gr, eantono@bio.auth.gr
[2]Τμήμα Γεωπονίας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 47100, Άρτα, email: kolygasmarkos@gmail.com, egouva@uoi.gr, chatzopoul@gmail.com, nathan@uoi.gr, ebonos@uoi.gr
[3]Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 11855, Αθήνα, email: bitchava@aua.gr
[4]Ινστιτούτο Γενετικής Βελτίωσης και Φυτογενετικών Πόρων, ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ, 57001 Θεσσαλονίκη, email: katgrigoriadou@elgo.gr, sandreadis@elgo.gr
[5]Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 38446, Βόλος, email: athanassiou@uth.gr
[6]Τμήμα Κτηνιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 54124, Θεσσαλονίκη, email: igiannenas@vet.auth.gr

Περίληψη
Τα έντομα αποτελούν εναλλακτική πηγή πρωτεϊνών στις ιχθυοτροφές δεδομένου ότι έχουν υψηλή διατροφική αξία, ενώ η εκτροφή τους έχει χαμηλό οικολογικό αποτύπωμα. Παρότι διάφορες μελέτες έχουν εστιάσει στην υποκατάσταση του ιχθυαλεύρου με εντομοάλευρα, εντούτοις ο συνδυασμός τους με αρωματικά-φαρμακευτικά φυτά (ΑΦΦ) δεν έχει διερευνηθεί. Αλλαγές στη διατροφή των οργανισμών δύναται να επιφέρουν μεταβολική καταπόνηση. Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η μελέτη της επίδρασης εντομοαλεύρων από προνύμφες *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), εμπλουτισμένων με υπολείμματα ΑΦΦ στην έκφραση πρωτεϊνών-μελών των Hsps και MAPKs στο ήπαρ και το λευκό μυ της τσιπούρας (*Sparus aurata*). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα εντομοάλευρα, αυτούσια ή εμπλουτισμένα, επέφεραν σημαντική ($p < 0.05$) επαγωγή των Hsps στους δύο ιστούς, με εξαίρεση την Hsp90 στο λευκό μυ, όπου η συμπερίληψη ΑΦΦ δεν οδήγησε σε αλλαγές συγκριτικά με τα ιχθυάλευρα. Στο ήπαρ, ο συνδυασμός εντομοάλευρων και ΑΦΦ οδήγησε σε ενεργοποίηση της p38 MAPK, ενώ δε παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο λευκό μυ.

Λέξεις κλειδιά: *Tenebrio molitor*, διατροφική καταπόνηση, ιχθυοτροφές, υδατοκαλλιέργεια

Εισαγωγή
Οι υδατοκαλλιέργειες αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους τομείς παραγωγής τροφίμων για την κάλυψη των ανθρώπινων διατροφικών απαιτήσεων (Deutsch et al. 2007). Ωστόσο, η εκτροφή ψαριών υψηλού τροφικού επιπέδου στηρίζεται στην εκμετάλλευση μικρών πελαγικών ψαριών για την παραγωγή ιχθυάλευρων (Hardy 2010), μια περιβαλλοντικά και οικονομικά μη βιώσιμη πρακτική. Προκειμένου να διασφαλιστεί η βιώσιμη ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών, είναι επιτακτική η ανάδειξη εναλλακτικών πηγών πρωτεΐνης για τη μερική ή/και ολική υποκατάσταση των ιχθυαλεύρων. Τα έντομα συμπεριλαμβάνονται στη φυσική διατροφή πολλών ειδών ψαριών και αποτελούν σημαντική πηγή πρωτεϊνών, ενέργειας, λιπαρών οξέων και βιταμινών (van Huis 2013, Henry et al. 2015), ενώ η εκτροφή τους έχει χαμηλό οικολογικό αποτύπωμα (Oonincx & de Boer 2012). Συμπερίληψη εντομοαλεύρων έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε εμπορικά είδη της Μεσογειακής ιχθυοκαλλιέργειας (Mastoraki et al. 2020, 2022, Panteli et al. 2021). Από την άλλη, τα αρωματικά φαρμακευτικά φυτά είναι γνωστά για τις αντιβακτηριακές και αντιοξειδωτικές τους ικανότητες σε παθογόνα ψαριών (Athanasiou et al. 2019,

Mandalakis et al. 2021), και επάγουν την αντιοξειδωτική ικανότητα σε έντομα (Andreadis et al.2022). Εντούτοις, δεν έχουν χρησιμοποιηθεί συνδυαστικά με τα εντομοάλευρα στη σίτιση ψαριών.

Επιπλέον, μεταβολές στη διατροφή και ανεπάρκεια θρεπτικών συστατικών μπορεί να πυροδοτήσουν κυτταρικές αποκρίσεις καταπόνησης, συμπεριλαμβανομένων τόσο της επαγωγής των πρωτεϊνών θερμικού πλήγματος (Heat shock proteins, HSPs) όσο και της φωσφορυλίωσης των ενεργοποιημένων από μιτογόνα πρωτεϊνικών κινασών (MAPKs) (Feidantsis et al. 2014). Τόσο οι Hsps όσο και οι MAPKs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε σημαντικές κυτταρικές διεργασίες και συμβάλλουν στη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης (Wegele, Müller & Buchner 2004, Sun et al. 2015). Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της πρωτεϊνικής έκφρασης μελών των Hsps και MAPKs στο ήπαρ και το λευκό μυ της τσιπούρας *Sparus aurata*, έπειτα από σίτιση με εντομοάλευρα αυτούσια ή εμπλουτισμένα με αρωματικά-φαρμακευτικά φυτά (ΑΦΦ).

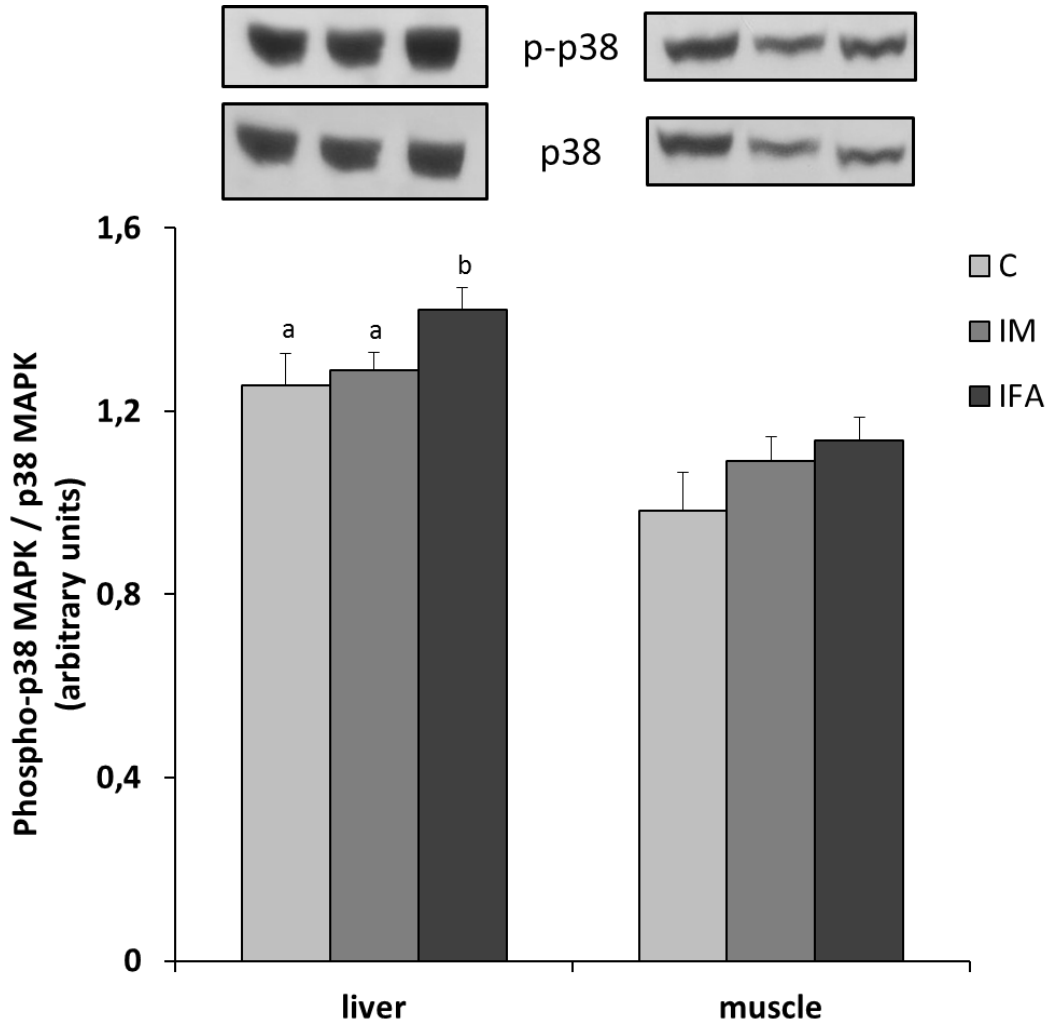
Μέθοδοι

Το διατροφικό πείραμα διεξήχθη σε παραγωγική μονάδα της Θεσπρωτίας. Συγκεκριμένα, ενήλικα άτομα τσιπούρας βάρους 207,19 (±1,47) g κατανεμήθηκαν σε τρεις ομάδες σε πλωτούς κλωβούς (500 άτομα/κλωβό, 3 επαναλήψεις/ομάδα). Τρεις ισοπρωτεϊνικές και ισοθερμιδικές ιχθυοτροφές χορηγήθηκαν για διάστημα 12 εβδομάδων: α) Ομάδα μαρτύρων που διατράφηκαν με συμβατική ιχθυοτροφή, β) Ομάδα στο σιτηρέσιο της οποίας προστέθηκε 10% άλευρο από προνύμφες *Tenebrio molitor* που αναπτύχθηκαν σε συμβατικό υπόστρωμα, γ) Ομάδα στο σιτηρέσιο της οποίας προστέθηκε 10% άλευρο από προνύμφες *Tenebrio molitor* που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με υπολείμματα απόσταξης ρίγανης (40,83), θυμαριού (1,66), δενδρολίβανου (1,66) και φασκόμηλου (1,66), καθώς και λιναρόσπορο (16,66), πίτα βιομηχανικής κάνναβης (16,66), πάστα ελιάς (16,66) και κρίταμο (4,16 g/kg τροφής εντόμου).

Η μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών Hsps και MAPKs πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western Blot. Εν συντομία, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση ολικής πρωτεΐνης από δείγματα ήπατος και λευκού μυ και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης μέσω της μεθόδου Bradford. Ίσες ποσότητες πρωτεΐνης (80 μg), διαχωρίστηκαν με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυκρυλαμιδίου και ηλεκτρομεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Οι μεμβράνες επωάστηκαν με ειδικά για την πρωτεΐνη στόχο πρωτογενή αντισώματα [polyclonal rabbit anti-heat shock protein 70 kDa και 90 kDa, anti-phospho-p38 MAP kinase (Thr180/Tyr182) και anti-p38 MAPK (Cell Signaling)] και ακολούθως με δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με το ένζυμο HRP [anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling)]. Οι ανεπτυγμένες ζώνες οπτικοποιήθηκαν μέσω ενισχυμένης χημειοφωταύγειας με έκθεση σε φιλμ και η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Image Studio Lite Software (Biosciences). Οι αλλαγές στην πρωτεϊνική έκφραση αξιολογήθηκαν σε επίπεδο σημαντικότητας 0.05 μέσω της μονόδρομης ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA).

Αποτελέσματα

Στο ήπαρ της τσιπούρας, παρότι η μερική υποκατάσταση με εντομοάλευρα δεν επέφερε σημαντική αλλαγή, η συμπερίληψη εντομοαλεύρων εμπλουτισμένων με ΑΦΦ οδήγησε σε σημαντική ($p < 0.05$) ενεργοποίηση της p38 MAPK συγκριτικά με το ιχθυάλευρο (Εικόνα 1). Σε αντίθεση, τα εντομοάλευρα αυτούσια ή εμπλουτισμένα με ΑΦΦ δεν είχαν σημαντική επίδραση στην ενεργοποίηση της συγκεκριμένης κινάσης στο λευκό μύ.

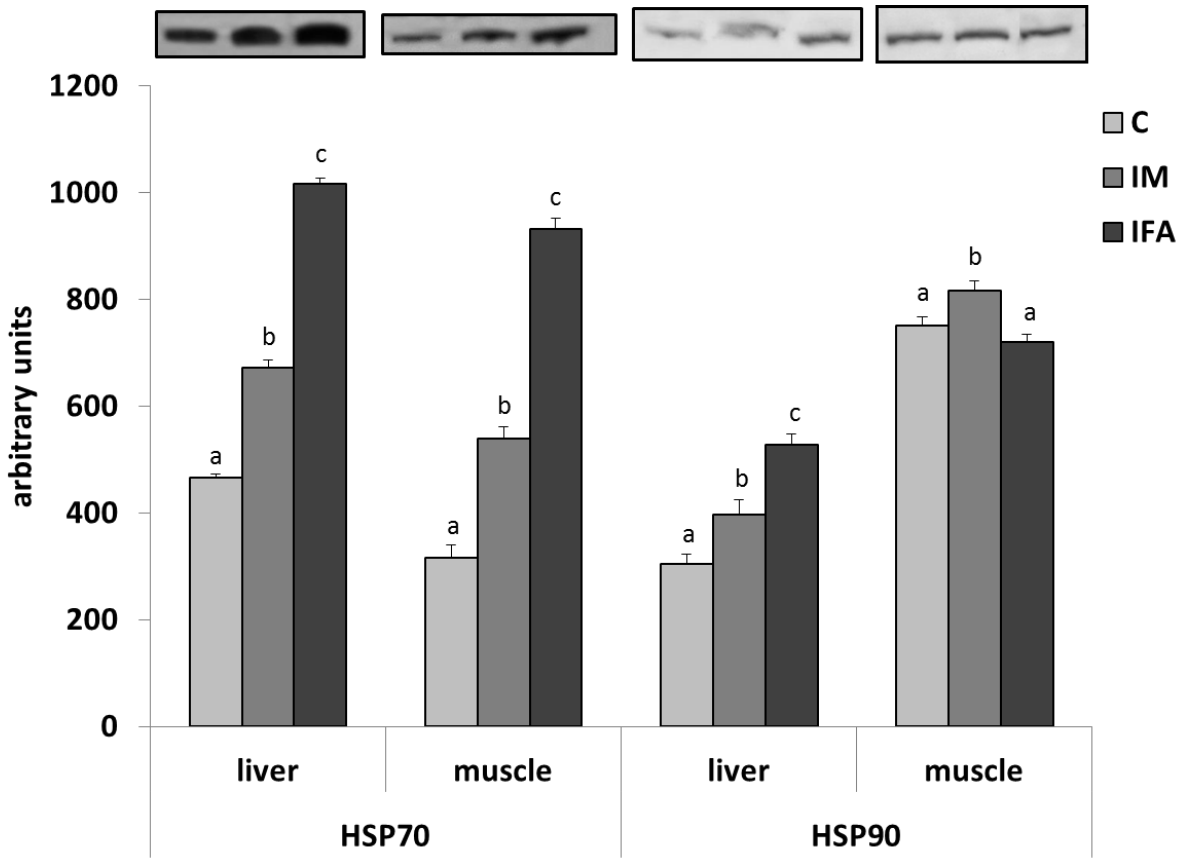


Εικόνα 1. Ενεργοποίηση της p38 MAPK στη τσιπούρα έπειτα από σίτιση με ιχθυάλευρο (C) και εντομοάλευρα αυτούσια (IM) ή εμπλουτισμένα με υπολείμματα αρωματικών-φαρμακευτικών φυτών (IFA). Τιμές (MO±STDE) με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά ($p<0,05$, One-way ANOVA, Tukey post hoc test).

Σε ότι αφορά τις Hsps, τόσο η Hsp70 όσο και η Hsp90 παρουσίασαν παρόμοιο πρότυπο έκφρασης στους δύο ιστούς (Εικόνα 2). Συγκεκριμένα, τα εντομοάλευρα αυτούσια ή εμπλουτισμένα επέφεραν σημαντική επαγωγή των δύο πρωτεϊνών, συγκριτικά με τα ιχθυάλευρα. Ωστόσο, η συμπερίληψη ΑΦΦ στα εντομοάλευρα δεν επέφερε σημαντική μεταβολή στην έκφραση της Hsp90 στο λευκό μυ, συγκριτικά με τα ιχθυάλευρα.

Συμπεράσματα

Η επαγωγή των HSPs ως απόκριση σε διατροφικές προκλήσεις έχει αναφερθεί σε αρκετές μελέτες σε ψάρια (Antonopoulou et al. 2014, Feidantsis et al. 2014). Οι διαφορές στη σύσταση αμινοξέων που παρέχονται μέσω των εντομοάλευρων καθώς και η σύνδεση των πρωτεϊνών στις ίνες χιτίνης μπορεί να απαιτούν τη δράση των Hsps σε διαδικασίες του μεταβολισμού των πρωτεϊνών (Nogales-Mérida et al. 2019). Σε αντίθεση με το ήπαρ, η συμπερίληψη ΑΦΦ δεν επέφεραν μεταβολές στην έκφραση της Hsp90 και στην ενεργοποίηση της p38 MAPK στο μυ. Η έρευνα βρίσκεται σε εξέλιξη.



Εικόνα 2. Έκφραση των πρωτεϊνών Hsp70 και Hsp90 στη τσιπούρα έπειτα από σίτιση με ιχθυάλευρο (C) και εντομοάλευρα αυτούσια (IM) ή εμπλουτισμένα με υπολείμματα αρωματικών-φαρμακευτικών φυτών (IFA). Τιμές (MO±STDE) με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά ($p<0,05$, One-way ANOVA, Tukey post hoc test).

Βιβλιογραφία

Anastasiou, T. I., Mandalakis, M., Krigas, N., Vézignol, T., Lazari, D., Katharios, P., Dailianis, T. & Antonopoulou, E. (2019). Comparative evaluation of essential oils from medicinal-aromatic plants of Greece: Chemical composition, antioxidant capacity and antimicrobial activity against bacterial fish pathogens. *Molecules*, 25(1), 148.

Andreadis, S. S., Panteli, N., Mastoraki, M., Rizou, E., Stefanou, V., Tzentilasvili, S., Sarrou, E., Chatzifotis, S., Krigas, N. & Antonopoulou, E. (2021). Towards Functional Insect Feeds: Agri-Food By-Products Enriched with Post-Distillation Residues of Medicinal Aromatic Plants in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) Breeding. *Antioxidants*, 11(1), 68.

Antonopoulou, E., Kousidou, E., Tserga, E., Feidantsis, K., & Chatzifotis, S. (2014). Dietary lipid levels in meagre (*Argyrosomus regius*): effects on biochemical and molecular indicators of liver. *Aquaculture*, 428, 265-271.

Deutsch, L., Gräslund, S., Folke, C., Troell, M., Huitric, M., Kautsky, N. & Lebel, L. (2007). Feeding aquaculture growth through globalization: Exploitation of marine ecosystems for fishmeal. *Global Environmental Change*, 17, 238-249.

Feidantsis, K., Kaitetzidou, E., Mavrogiannis, N., Michaelidis, B., Kotzamanis, Y. & Antonopoulou, E. (2014). Effect of taurine-enriched diets on the Hsp expression, MAPK activation and the antioxidant defence of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture Nutrition*, 20, 431-442.

Hardy, R.W. (2010). Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquaculture Research*, 41, 770-776.

Henry, M., Gasco, L., Piccolo, G. & Fountoulaki, E. (2015). Review on the use of insects in the diet of

farmed fish: past and future. *Animal Feed Science and Technology*, 203, 1-22.

Mandalakis, M., Anastasiou, T. I., Martou, N., Keisaris, S., Greveniotis, V., Katharios, P., Lazari, D., Krigas, N. & Antonopoulou, E. (2021). Antibacterial Effects of Essential Oils of Seven Medicinal-Aromatic Plants Against the Fish Pathogen *Aeromonas veronii* bv. *sobria*: To Blend or Not to Blend?. *Molecules*, 26(9), 2731.

Mastoraki, M., Ferrándiz, P. M., Vardali, S. C., Kontodimas, D. C., Kotzamanis, Y. P., Gasco, L., Chatzifotis, S. & Antonopoulou, E. (2020). A comparative study on the effect of fish meal substitution with three different insect meals on growth, body composition and metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*, 528, 735511.

Mastoraki, M., Katsika, L., Enes, P., Guerreiro, I., Kotzamanis, Y. P., Gasco, L., Chatzifotis, S. & Antonopoulou, E. (2022). Insect meals in feeds for juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*): Effects on growth, blood chemistry, hepatic metabolic enzymes, body composition and nutrient utilization. *Aquaculture*, 561, 738674.

Oonincx, D.G. & De Boer, I.J. (2012). Environmental impact of the production of mealworms as a protein source for humans–a life cycle assessment. *PloS one*, 7, e51145.

Panteli, N., Mastoraki, M., Lazarina, M., Chatzifotis, S., Mente, E., Kormas, K. A. & Antonopoulou, E. (2021). Configuration of gut microbiota structure and potential functionality in two teleosts under the influence of dietary insect meals. *Microorganisms*, 9(4), 699.

Sun, Y., Liu, W. Z., Liu, T., Feng, X., Yang, N. & Zhou, H. F. (2015). Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 35(6), 600-604.

van Huis, A. (2013). Potential of insects as food and feed in assuring food security. *Annual review of entomology*, 58, 563-583.

Wegele, H., Müller, L. & Buchner, J. (2004). Hsp70 and Hsp90—a relay team for protein folding. In: "Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology", Amara S.G., Bamberg E., Grunicke H., Jahn R., Lederer W.J., Miyajima A., Murer H., Offermanns S., Schultz G., Schweiger M. (eds). Springer, Berlin, Heidelberg, p. 1-44.

Ευχαριστίες:

Το έργο χρηματοδοτήθηκε από τη Δράση Εθνικής Εμβέλειας «ΕΡΕΥΝΩ- ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ-ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ ΄Β ΚΥΚΛΟΣ». ΚΩΔΙΚΟΣ ΕΡΓΟΥ Τ2ΕΔΚ-02356. ΑΚΡΩΝΥΜΙΟ: InsectFeedAroma.

Χημικός και βιολογικός χαρακτηρισμός του αιθανολικού εκχυλίσματος φύλλων του φυτού Haberlea rhodopensis

ΕΡΜΟΓΕΝΟΥΣ Αντρέας[1], ΚΥΡΙΑΚΟΥ Σωτήρης[2], ΣΠΥΡΙΔΟΠΟΥΛΟΥ Κατερίνα[1], ΝΟΜΙΚΟΥ Αγγελική[1], ΡΟΥΠΑΣ Άγγελος[1], ΒΟΥΛΓΑΡΙΔΟΥ Γεωργία-Περσεφόνη[1], MOYANKOVA Daniela[3], DJILIANOV Dimitar[3], ΠΑΝΑΓΙΩΤΙΔΗΣ Μιχάλης Ι.[2], ΠΑΠΠΑ Αγλαΐα[1]*

[1] *Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Αλεξανδρούπολη, Ελλάδα*
[2] *Τμήμα Γενετικής, Θεραπευτικής Καρκίνου και Υπερδομικής Παθολογίας, Ινστιτούτο Νευρολογίας & Γενετικής, Λευκωσία, Κύπρος*
[3] *Abiotic stress, AgroBioInstitute, Agricultural Academy, Σόφια, Βουλγαρία*

Περίληψη
Το *Haberlea rhodopensis* είναι ενδημικό φυτό των Βαλκανίων, γνωστό για την αντοχή του στην ξηρασία, ενώ η φαρμακευτική του αξία δεν είναι εκτενώς μελετημένη. Σκοπός της μελέτης ήταν η χημική ανάλυση του αιθανολικού εκχυλίσματος του *H. rhodopensis* (HEE) και ο χαρακτηρισμός των βιολογικών του δράσεων. Η χημική ανάλυση έδειξε ότι το HEE περιέχει υψηλά επίπεδα φλαβονοειδών, φαινολικών ενώσεων, διαλυτών πρωτεϊνών, χρωστικών ουσιών, και χαμηλά επίπεδα μονοτερπενοειδών, συμπυκνωμένων τανινών και διαλυτών σακχάρων. Οι δοκιμασίες DPPH και ABTS έδειξαν σημαντική αντιοξειδωτική δραστικότητα, η οποία επιβεβαιώθηκε περαιτέρω σε κυτταρικό επίπεδο μετά από επώαση ανθρώπινων κερατινοκυττάρων (HaCaT) με H_2O_2, ενώ διερευνήθηκε και η επαγωγή έμμεσων αντιοξειδωτικών κυτταρικών μηχανισμών. Σε ότι αφορά την αντιπολλαπλασιαστική δράση, οι κυτταρικές σειρές ηπατώματος (HepG3) και μη μικροκυτταρικού αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα (A459) ήταν από τις πιο ευαίσθητες στο HEE μεταξύ των καρκινικών κυτταρικών σειρών που μελετήθηκαν. Συμπερασματικά, το HEE παρουσιάζει σημαντική αντιοξειδωτική, κυτταροπροστατευτική και αντιπολλαπλασιαστική δραστικότητα που χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

Λέξεις κλειδιά
Haberlea rhodopensis, αιθανολικό εκχύλισμα, αντιοξειδωτικές ιδιότητες, κυτταροπροστασία, αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες

Εισαγωγή

Η ευρεία χρήση των φυτών βρίσκει μεγάλη αξία για ποικίλες θεραπευτικές χρήσεις, καθώς και ως συμπληρώματα διατροφής, αλλά ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και η αξία τους ως πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών (Stanković et al., 2016). Το οξειδωτικό στρες παίζει πρωταγωνιστικό ρόλο σε πολλές παθολογικές καταστάσεις συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου (Gutteridge, 1993). Τα αντιοξειδωτικά δρουν ώστε να αντισταθμίζουν το οξειδοαναγωγικό ισοζύγιο που διαταράσσεται από τις δραστικές ενώσεις οξυγόνου (ROS), είτε άμεσα, μέσω αναστολής παραγωγής ή εξουδετέρωσης των ROS, (Saeed et al., 2012), είτε έμμεσα μέσω ρύθμισης σηματοδοτικών μονοπατιών (με κυριότερο το NRF2/KEAP1) και γονιδιακής έκφρασης αποτοξινωτικών/αντιοξειδωτικών ενζύμων (Frankel & German, 2006; Kobayashi & Yamamoto, 2005)

Το ενδημικό φυτό των Βαλκανίων *H. rhodopensis* είναι γνωστό για την αντοχή του και την απουσία βλαβών ή σοβαρού οξειδωτικού στρες σε συνθήκες ξηρασίας και έντονου στρες. Πρόκειται για ένα προστατευμένο είδος στην Ελλάδα και στη Βουλγαρία (Georgiev et al., 2020). Μοναδικοί μεταβολίτες του φυτού φαίνεται να προάγουν και να μεσολαβούν την αντοχή στην ξηρασία και την προστασία από το στρες (Benina et al., 2013). Ανάλογοι μεταβολίτες φαίνεται να διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα βιοδραστικότητας που τους καθιστά ενδιαφέροντες ως πηγή νέων φυτοχημικών ουσιών με δυνητικές βιοϊατρικές εφαρμογές. Προηγούμενες μελέτες έχουν συσχετίσει διάφορα φαινολικά συστατικά του φυτού *H. rhodopensis* με αντιοξειδωτική/κυτταροπροστατευτική δράση σε διάφορους τύπους κυττάρων, ενώ η πιθανή φαρμακευτική αξία των εκχυλισμάτων του φυτού δεν είναι ευρέως μελετημένη

(Mihaylova et al., 2013; Todorova & Atanasov, 2016).

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν: α) η αξιολόγηση του χημικού προφίλ του αιθανολικού εκχυλίσματος φύλλων του φυτού *H. Rhodopensis* (HEE - *H. rhodopensis Ethanolic* Extract) και β) ο προσδιορισμός της βιοενεργότητας του HEE κυρίως σε ότι αφορά τις αντιοξειδωτικές και τις αντιπολλαπλασιαστικές του ιδιότητες.

Μέθοδοι

Για την παρασκευή του HEE χρησιμοποιήθηκαν αποξηραμένα φύλλα φυτών *H. rhodopensis* καλλιεργούμενων *in vitro* κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες (Djilianov et al., 2005), τα οποία κονιορτοποιήθηκαν σε 70% αιθανόλη και ακολούθησε ξήρανση στους 40^{o}C.

Για τον χημικό χαρακτηρισμό του HEE χρησιμοποιήθηκε UPLC-MS/MS ανάλυση.

Χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές: A549 (μη μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα), HepG2 (ηπατικό καρκίνωμα), HT29 and Caco-2 (ορθοκολικό αδενοκαρκίνωμα), PC3 and DU145 (αδενοκαρκίνωμα προστάτη) και HaCaT (ανθρώπινα κερατινοκύτταρα), στις οποίες έγινε έλεγχος κυτταροτοξικότητας του HEE.

Για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικότητας χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία sulforhodamine B (SRB) (Vichai & Kirtikara, 2006) μετά από επίδραση διαβαθμισμένων συγκεντρώσεων HEE στις κυτταρικές σειρές (Mitropoulou et al., 2020).

Για τον *in vitro* έλεγχο της άμεσης αντιοξειδωτικής δράσης πραγματοποιήθηκαν οι τεχνικές DPPH και ABTS. Για τον έλεγχο της πιθανής κυτταροπροστατευτικής δράσης πραγματοποιήθηκαν προ-επιδράσεις για 24h με HEE (20μg/mL) σε HaCaT και εν συνεχεία 24h επίδραση με H_2O_2 (0.2 & 0.4mM) και τελικός έλεγχος της βιωσιμότητας των κυττάρων με SRB. Για τον προσδιορισμό της έμμεσης αντιοξειδωτικής δράσης, HaCaT κύτταρα επωάστηκαν για 24h με HEE (20μg/mL). Πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA με χρήση NucleoZOL, σύνθεση cDNA και Real-Time PCR και διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων-στόχων: *CAT*, *SOD1*, *HMOX1*, *NQO1*, *NRF2*, *Keap1*, *GPX1*, *GSR* και *GSTP1*.

Αποτελέσματα

Η χημική ανάλυση έδειξε ότι το HEE περιέχει άφθονα φλαβονοειδή και φαινολικές ενώσεις, με τις τελευταίες να είναι πιο επικρατείς. Αντίθετα, τα επίπεδα των μονοτερπενοειδών και των συμπυκνωμένων τανινών ήταν παρόντα σε χαμηλά επίπεδα. Άλλα σημαντικά μόρια ήταν οι διαλυτές πρωτεΐνες (υψηλά επίπεδα) και τα σάκχαρα, (χαμηλά επίπεδα). Επιπλέον, το HEE περιείχε υψηλές ποσότητες χρωστικών ουσιών (χλωροφύλλη-α, -β, β-λυκοπένιο και καροτενοειδή). Τα αποτελέσματα της μελέτης μας είναι σύμφωνα με τον κύριο τύπο βιοδραστικών μορίων που έχουν εντοπιστεί σε διάφορα εκχυλίσματα *H. rhodopensis*, όπως συνοψίζονται στην εργασία των Geogiev at al.(2020) και περιλαμβάνουν φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα, λιπαρά οξέα, φυτοστερόλες, πολυσακχαρίτες, καροτενοειδή και άλλα λιποδιαλυτά συστατικά.

Όπως αναμενόταν, με βάση την υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικά και φλαβονοειδή, το HEE παρουσίασε αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική ικανότητα, όπως μετρήθηκε με δύο ανεξάρτητες *in vitro* μη κυτταρικές μεθοδολογίες της DPPH και ABTS. Η αντιοξειδωτική ικανότητα του HEE επιβεβαιώθηκε περαιτέρω μετά από επίδραση HaCaT κυττάρων με HEE σε συνθήκες οξειδωτικού στρες (επώαση με H_2O_2) οδηγώντας σε στατιστικά σημαντική μεγαλύτερη βιωσιμότητα των κυττάρων σε σχέση με τον μάρτυρα. Παράλληλα, προκαταρκτικά αποτελέσματα μελέτης έκφρασης γονιδίων-στόχων που σχετίζονται με έμμεσους αντιοξειδωτικούς κυτταρικούς μηχανισμούς (NFK2/KEAP1 μονοπάτι) έδειξαν να μην επηρεάζονται σημαντικά από το *H. rhodopensis* κάτω από τις συνθήκες που μελετήθηκαν.

Τέλος, η αντιπολλαπλασιαστική δραστικότητα του HEE προσδιορίστηκε σε ένα πάνελ 6 καρκινικών κυτταρικών σειρών και έδειξε μεγαλύτερη ευαισθησία έναντι των καρκινικών σειρών A549 (EC_{50}=46±3 mg/ml) και HepG2 (EC_{50}=81±3 mg/ml), μετά από επώαση για 72h.

Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, το αιθανολικό εκχύλισμα *Haberlea rhodopensis* κατέχει αξιοσημείωτες βιολογικές δράσεις σε ότι αφορά τις αντιοξειδωτικές, κυτταροπροστατευτικές και αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητές του. Η χημική ανάλυση έδειξε ότι το κλάσμα HEE περιέχει υψηλά επίπεδα φλαβονοειδών και φαινολικών ενώσεων, χαμηλά επίπεδα μονοτερπενοειδών και συμπυκνωμένων τανινών, υψηλά επίπεδα διαλυτών πρωτεϊνών και χρωστικών ουσιών και χαμηλά επίπεδα διαλυτών σακχάρων. Σε συμφωνία με την υψηλή περιεκτικότητά του σε πολυφαινόλες, το HEE επέδειξε σημαντική αντιοξειδωτική δράση τόσο σε μη κυτταρικά όσο και σε κυτταρικά συστήματα μελέτης. Το HEE επηρέασε επίσης με διαφορετικό τρόπο τη ανάπτυξη των διάφορων καρκινικών κυτταρικών σειρών με την πιο σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη των A549 και HepG2. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης για την κατανόηση των μηχανισμών των βιολογικών δράσεων του *H. rhodopensis* και την ταυτοποίηση των συστατικών ενώσεων που εμπλέκονται στις συγκεκριμένες δράσεις.

Βιβλιογραφία

Benina, M., Petrov, V., Toneva, V., Teneva, A., & Gechev, T. (2013). Molecular Biology and Physiology of the Resurrection Glacial Relic Haberlea Rhodopensis. In S. M. Jain & S. Dutta Gupta (Eds.), *Biotechnology of Neglected and Underutilized Crops* (pp. 61–70). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5500-0_4

Djilianov, D., Genova, G., Parvanova, D., Zapryanova, N., Konstantinova, T., & Atanassov, A. (2005). In vitro culture of the resurrection plant Haberlea rhodopensis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *80*(1), 115–118. https://doi.org/10.1007/s11240-004-8835-3

Frankel, E. N., & German, J. B. (2006). Antioxidants in foods and health: Problems and fallacies in the field. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2616

Georgiev, Y. N., Ognyanov, M. H., & Denev, P. N. (2020). The ancient Thracian endemic plant Haberlea rhodopensis Friv. and related species: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, *249*, 112359. https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112359

Gutteridge, J. M. (1993). Free radicals in disease processes: A compilation of cause and consequence. *Free Radical Research Communications*, *19*(3), 141–158. https://doi.org/10.3109/10715769309111598

Kobayashi, M., & Yamamoto, M. (2005). Molecular Mechanisms Activating the Nrf2-Keap1 Pathway of Antioxidant Gene Regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, *7*(3–4), 385–394. https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.385

Mihaylova, D., Bahchevanska, S., & Toneva, V. (2013). Examination of the antioxidant activity of Haberlea rhodopensis leaf extracts and their phenolic constituents. In *Journal of Food Biochemistry* (Vol. 37).

Mitropoulou, G., Sidira, M., Skitsa, M., Tsochantaridis, I., Pappa, A., Dimtsoudis, C., Proestos, C., & Kourkoutas, Y. (2020). Assessment of the Antimicrobial, Antioxidant, and Antiproliferative Potential of Sideritis raeseri subps. Raeseri Essential Oil. *Foods*, *9*(7), 860. https://doi.org/10.3390/foods9070860

Saeed, N., Khan, M. R., & Shabbir, M. (2012). Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts Torilis leptophylla L. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *12*(1), 221. https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-221

Stanković, N., Mihajilov-Krstev, T., Zlatković, B., Stankov-Jovanović, V., Mitić, V., Jović, J., Čomić, L., Kocić, B., & Bernstein, N. (2016). Antibacterial and Antioxidant Activity of Traditional Medicinal Plants from the Balkan Peninsula. *NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences*, *78*, 21–28. https://doi.org/10.1016/j.njas.2015.12.006

Todorova, R., & Atanasov, A. T. (2016). Haberlea rhodopensis: Pharmaceutical and medical potential as a food additive. *Natural Product Research*, *30*(5), 507–529. https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1028058

Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, *1*(3), 1112–1116. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179

Ex vivo έκπτυξη HUDEP-2 και CD34+ τροποποιημένων κυττάρων με την εισαγωγή μιας κασέτας έκφρασης της συνθετικής πρωτεΐνης F36Vmpl

ΚΙΡΤΣΟΥ Αλεξάνδρα, ΠΑΣΧΟΥΔΗ Κυριακή, ΠΑΝΑΓΙΩΤΟΥ Αιμιλία, ΒΑΣΙΛΟΥΔΗΣ Ιωάννης-Νίνος, ΠΙΠΕΡΙΔΟΥ Χαρούλα, ΓΙΑΝΝΑΚΗ Ευαγγελία, ΨΑΘΑ Νικολέτα

Τμήμα Ιατρικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ. «Γ. Παπανικολάου», alexandrakirtsou@gmail.com-1
Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ. «Γ. Παπανικολάου», paschoudik@gmail.com-2
Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ. «Γ. Παπανικολάου», aimiliapanag@gmail.com-3
Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ. «Γ. Παπανικολάου», ninos.vasiloudis@gmail.com-4
Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ. «Γ. Παπανικολάου», piperidou.ch@gmail.com-5
Αιματολογική Κλινική & Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ. «Γ. Παπανικολάου», eyannaki@uw.edu-6
Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, npsatha@bio.auth.gr-7

Περίληψη
Η γονιδιακή θεραπεία στις β-αιμοσφαιρινοπάθειες περιορίζεται από τη μειωμένη μεταφορά του θεραπευτικού γονιδίου στα προγονικά κύτταρα. Στην παρούσα μελέτη, προτείνουμε μια νέα μέθοδο για την ex vivo και in vivo έκπτυξη των τροποποιημένων κυττάρων με την χρήση ενός θεραπευτικού φορέα νέας γενιάς, που έχει ενσωματωμένη την αλληλουχία της συνθετικής πρωτεΐνης F36VMpl και ένα θεραπευτικό διαγονίδιο για τις β-αιμοσφαιρινοπάθειες. Μετά από έκθεση της πρωτεΐνης F36VMpl σε ένα χημικό μόριο (AP20187), αυτή διμερίζεται και σηματοδοτεί τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Παρατηρήσαμε πως η διαμόλυνση με τον ιικό φορέα δεν επηρεάζει αρνητικά την έκπτυξη και τη διαφοροποίηση των κυττάρων, ενώ με την επίδραση του παράγοντα διμερισμού, παρουσιάστηκε σημαντική αύξηση του ποσοστού των διαμολυσμένων κυττάρων συγκριτικά με τη συνθήκη απουσίας του. Ο συνδυασμός της F36VMpl με το θεραπευτικό διαγονίδιο (BCL11A-shRNA) απέδωσε υψηλή έκφραση της θεραπευτικής πρωτεΐνης. Θεωρούμε επομένως πως η χρήση του συστήματος F36Vmpl-AP20187 μπορεί να συμβάλλει άμεσα στην ενίσχυση του θεραπευτικού αποτελέσματος.

Λέξεις κλειδιά
γονιδιακή θεραπεία, CD34+ κύτταρα, ex vivo επιλογή, λεντιικός φορέας

Εισαγωγή

Η γονιδιακή θεραπεία αποτελεί την μόνη θεραπεία πλήρους ίασης για μια πληθώρα μονογονιδιακών γενετικών ασθενειών, όπως η ADA-SCID, η κυστική ίνωση και η β-θαλασσαιμία (Neff, Beard & Kiem 2006). Παρά τα πρώτα ενθαρρυντικά αποτελέσματα συνεχίζουν να παρατηρούνται κάποια προβλήματα που απαιτούν επίλυση. Αρχικά, η μειωμένη ικανότητα διαμόλυνσης των έως τώρα χρησιμοποιούμενων λεντι-ιικών φορέων, που σχετίζεται ισχυρά με το μεγάλο μέγεθος του γονιδιώματος τους, συχνά οδηγεί σε απουσία θεραπευτικού αποτελέσματος (Carter 2008). Παράλληλα, οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι διαμόλυνσης με στόχο την επίτευξη αυξημένου αριθμού αντιγράφων ανά κύτταρο μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη φαινομένων κυτταροτοξικότητας και εισχωρητικής μεταλλαξιγένεσης (Davis, Koç & Gerson 2000).

Στην παρούσα μελέτη, σχεδιάστηκε ένας νέος θεραπευτικός φορέας για τη θεραπεία των αιμοσφαιρινοπαθειών. Ο νέος αυτός φορέας περιλαμβάνει ένα shRNA (small hairpin RNA) που στοχεύει τον καταστολέα της γ-σφαιρίνης BCL11A (Bauer & Orkin 2012, Brendel et al. 2016, Xu J et al. 2013). και βρίσκεται προς το παρόν σε κλινικές δοκιμές. Ο φορέας έχει τροποποιηθεί μετά από αντικατάσταση του ενισχυτή που ήδη φέρει (β-globin Locus Control Region-LCR), μεγέθους ~3kb, από

έναν νέο ερυθροειδικό ενισχυτή (PVT1) με περίπου 10 φορές μικρότερο μέγεθος. Η αντικατάσταση αυτή της β-LCR ρυθμιστικής περιοχής από τον PVT1 ερυθροειδικό ενισχυτή έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του μεγέθους του γονιδιώματος του ιικού φορέα επιτρέποντας επομένως την ενσωμάτωση της κασέτας επιλογής F36Vmpl. Παράλληλα, επιτυγχάνεται η εξειδικευμένη έκφραση του διαγονιδίου (shRNA-BCL11a) στα ερυθροκύτταρα. Η πρωτεΐνη F36Vmpl είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με το ενδοκυττάριο τμήμα της να αποτελείται από τον υποδοχέα της θρομβοποιητίνης, MPL και το εξωκυττάριο τμήμα της από μια μεταλλαγμένη (F36V) μορφή της FK506-binding protein (FKBP). Μετά από έκθεση των κυττάρων σε ένα χημικό μόριο (AP20187), που προσδένεται στον F36V-FKBP υποδοχέα, η συνθετική αυτή πρωτείνη διμερίζεται και σηματοδοτεί τον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό των διαμολυσμένων κυττάρων, γεγονός που θα οδηγήσει στον εμπλουτισμό του τελικού κυτταρικού πληθυσμού σε γενετικά επιδιορθωμένα κύτταρα (Abdel-Azim et al. 2008, Okazuka et al. 2011).

Μέθοδοι

Ο ιικός φορέας με τον σχεδιασμό που περιεγράφηκε παραπάνω ελέγχθηκε σε HUDEP-2 κύτταρα (ανθρώπινη κυτταρική σειρά πρώιμων ερυθροβλαστών που εκφράζουν την ενήλικη αιμοσφαιρίνη) και σε ανθρώπινα CD34+ κύτταρα εμπλουτισμένα σε αιμοποιητικά στελεχιαία κύτταρα. Το shRNA για τον BCL11A έχει προστεθεί στο 3'UTR ενός γονιδίου αναφοράς (GFP) για την ευκολία ανίχνευσης της διαγονιδιακής έκφρασης στα κύτταρα.

Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τον ιικό φορέα. Μη διαμολυσμένα κύτταρα και κύτταρα διαμολυσμένα με ιικό φορέα που έχει τον ίδιο σχεδιασμό χωρίς όμως την συνθετική πρωτεΐνη F36Vmpl χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδες αρνητικού ελέγχου. Στη συνέχεια και 3 ημέρες μετά τη διαμόλυνση γίνεται έλεγχος των κυττάρων με κυτταρομετρία ροής για έκφραση GFP και ανακαλλιέργεια σε ομάδες με και χωρίς την χορήγηση του χημικού μορίου AP20187. Ανά δύο ημέρες πραγματοποιείται έλεγχος των ομάδων με κυτταρομετρία ροής για έκφραση GFP και εκ νέου χορήγηση του AP20187. Στο τέλος της καλλιέργειας γίνεται έλεγχος για έκφραση του διαγονιδίου στην ερυθρά σειρά με κυτταρομετρία ροής για GFP/HbF.

Αποτελέσματα

Η προσθήκη του διαγονιδίου επιλογής δεν επηρέασε αρχικά τους παραγόμενους ιικούς τίτλους που έφτασαν τα $36x10^6$ TU/ml, υψηλότερα μάλιστα του αντίστοιχου ιικού φορέα ελέγχου ($22x10^6$ TU/ml). Η διαμόλυνση τόσο της κυτταρικής σειράς HUDEP-2 όσο και των ενήλικων CD34+ ήταν επιτυχής και δεν επηρέασε αρνητικά την επιβίωση αλλά ούτε τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Στα HUDEP-2, με την επίδραση του παράγοντα διμερισμού AP20187, παρουσιάστηκε αύξηση του ποσοστού των διαμολυσμένων κυττάρων μετά την ημέρα 12 της καλλιέργειας: 31% σε σχέση με το αρχικό ποσοστό (81%±0,45 vs 50%±0,03) και 29% συγκριτικά με τη συνθήκη απουσίας του AP20187 (πχ 81%±0,45 vs 52%±1,57). Η μορφολογία των ερυθροκυττάρων μετά την F36mpl-επαγόμενη έκπτυξη δε φάνηκε να αλλάζει βάσει έκφρασης επιφανειακών δεικτών. Έντεκα ημέρες μετά τη διαμόλυνση, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και έγινε ενδοκυττάρια χρώση για την παραγωγή της γ-σφαιρίνης, ως αποτέλεσμα της έκφρασης του BCL11A-shRNA. Παρατηρήθηκε 35% έκφραση της HbF στα F36Vmpl-κύτταρα ενώ η αντίστοιχη έκφραση στα μη διαμολυσμένα κύτταρα ήταν 8%.

Το ποσοστό διαμόλυνσης στα CD34+ κύτταρα κυμάνθηκε από 1-65% ανάλογα με το MOI που χρησιμοποιήθηκε. Με την προσθήκη AP20187 στην ερυθροειδική καλλιέργεια των CD34+ κυττάρων παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού των διαμολυσμένων GFP+ κυττάρων που στα χαμηλότερα MOI έφτασε το 800%. Σε τρέχοντα πειράματα ελέγχεται η επίδραση του ιικού φορέα GFP-F36Vmpl-shRNA και του παράγοντα AP20187 σε CD34+ κύτταρα από ασθενείς με μείζονα β-θαλασσαιμία.

Συμπεράσματα

Τα πλεονεκτήματα του ιικού αυτού φορέα είναι διττά. Αρχικά, η ερυθροειδική, λόγω του νέου ενισχυτή, αποσιώπηση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα BCL11A θα οδηγήσει σε ενεργοποίηση της έκφρασης της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης χωρίς παρενέργειες σε άλλες αιμοποιητικές σειρές. Αφετέρου,

η χρήση του συστήματος F36Vmpl-AP20187 που στοχεύει στην έκπτυξη των γενετικά τροποποιημένων κυττάρων, θα συμβάλλει άμεσα στην ενίσχυση του θεραπευτικού αποτελέσματος (Belay et al. 2015, Li et al. 2002).

Επιπλέον, η συγκεκριμένη μέθοδος έκπτυξης γενετικά διορθωμένων κυττάρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε πρωτόκολλα γονιδιακής θεραπείας για άλλες γενετικές ασθένειες. Η αντικατάσταση των συστημάτων επιλογής που βασίζονται στην χρήση ισχυρών χημειοθεραπευτικών από συστήματα που στηρίζονται στην χορήγηση μη τοξικών χημικών ουσιών για τον εμπλουτισμό του αρχικού πληθυσμού σε γενετικά τροποποιημένα κύτταρα, μειώνει σημαντικά τα φαινόμενα τοξικότητας. Συνολικά, στην παρούσα εργασία προτείνεται μία καινοτόμα προσέγγιση για την θεραπεία της β-θαλασσαιμίας, η οποία θα δύναται και να χρησιμοποιηθεί και σε άλλες αιμοποιητικές νόσους.

Βιβλιογραφία

Abdel-Azim, H. et al. (2008). Expansion of multipotent and lymphoid-committed human progenitors through intracellular dimerization of Mpl. *Blood* **111**, 4064–4074

Belay, E. et al. (2015). A hyperactive Mpl-based cell growth switch drives macrophage-associated erythropoiesis through an erythroid-megakaryocytic precursor. *Blood* **125**, 1025–1033

Brendel, C. et al. (2016). Lineage-specific BCL11A knockdown circumvents toxicities and reverses sickle phenotype. *J. Clin. Invest.* **126**, 3868–3878

Brendel, C. et al. (2016). Lineage-specific BCL11A knockdown circumvents toxicities and reverses sickle phenotype. J Clin Invest. 126(10):3868-3878

Carter, B. J. (2008). Viral Vectors for Gene Therapy. *Biotechnol. Second. Complet. Revis. Ed.* **5**–**12**, 395–425

Daniel, E. B. & Stuart, H. O. (2012). Update on fetal hemoglobin gene regulation in hemoglobinopathies. **23**, 617–632

Davis, B. M., Koc, O. N., G. S. (2000). Limiting numbers of G156A O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase- transduced marrow progenitors repopulate nonmyeloablated mice after drug selection. *Blood* **95**, 3078–3084

Li, Z. Y. et al. (2002). Dimerizer-induced proliferation of genetically modified hepatocytes. *Mol. Ther.* **5**, 420–426

Neff, T., Beard, B. C. & Kiem, H. P. (2006). Survival of the fittest: In vivo selection and stem cell gene therapy. *Blood* **107**, 1751–1760

Okazuka, K. et al. (2011). Long-term regulation of genetically modified primary hematopoietic cells in dogs. *Mol. Ther.* **19**, 1287–1294

Xu J, et al. (2013). Corepressor-dependent silencing of fetal hemoglobin expression by BCL11A. *Proc Natl Acad Sci USA.* **110**, 6518–6523

ΣΥΝΕΔΡΙΑ 4

ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΕΣ

Αριστοτέλης Παπαγεωργίου,
Καθηγητής, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης
Βασιλειάδης Σωτήρης,
Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αλυσίδα αξίας για τις ελληνικές τουλίπες: Από τη διασπορά και το διεθνές ηλεκτρονικό εμπόριο στην ολοκληρωμένη διατήρηση απειλούμενων-προστατευόμενων ειδών και την πολύπλευρη έρευνα για αειφορική αξιοποίηση

ΚΡΙΓΚΑΣ Νίκος[1], ΣΑΜΑΡΤΖΑ Ιουλιέττα[1,2], ΘΕΟΧΑΡΙΔΗΣ Παναγιώτης[1,2], ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΙΔΗΣ Μιχάλης[1,2], ΚΑΡΥΔΟΠΟΥΛΟΣ Θεόδωρος[1,2], ΔΑΡΙΩΤΗΣ Ελευθέριος[1], ΠΛΑΣΤΗΡΑΣ Ιωάννης[3], ΠΑΠΠΑΣ Αναστάσιος[4], ΣΠΕΡΔΟΥΛΗ Ηλέκτρα[1], ΤΣΑΜΠΑΛΛΑ Αφροδίτη[1], ΡΑΛΛΗ Παρθενόπη[1], ΤΣΑΝΙΚΛΙΔΗΣ Γεώργιος[5], ΑΒΡΑΜΑΚΗΣ Μανόλης[6], ΠΙΠΙΝΗΣ Ηλίας[7], ΣΤΕΦΑΝΟΣ Κώστας[8], ΧΑΤΖΗΛΑΖΑΡΟΥ Στέφανος[8], ΛΕΒΙΖΟΥ Έφη[9], ΛΥΚΑΣ Χρήστος[9], ΜΕΝΕΞΕΣ Γιώργος[8], ΜΠΙΛΙΑΣ Φώτιος[8], ΚΑΡΑΓΙΑΝΝΗ Αναστασία-Γαρυφαλία[8], ΥΨΗΛΑΝΤΗΣ Ιωάννης[8], ΜΑΤΣΗ Θεοδώρα[8], ΤΣΟΚΤΟΥΡΙΔΗΣ Γεώργιος[1,4]

[1]*Ινστιτούτο Γενετικής Βελτίωσης και Φυτογενετικών Πόρων – ΕΛΓΟ Δήμητρα,* isamartza@gmail.com *(Ι.Σ.),* nkrigas@elgo.gr *(Ν.Κ.),* eleftheriosdariotis@yahoo.com *(Ε.Δ.),* pralli@elgo.gr *(Π.Ρ.),* esperdouli@elgo.gr *(Η.Σ.),* atsampalla@elgo.gr *(Α.Τ.),* gtsok@elgo.gr *(Γ.Τσοκ.),*
[2]*Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης,* theochap00@gmail.com *(Π.Θ.),* karydopou@bio.auth.gr *(Θ.Κ.),* mkonstad@bio.auth.gr *(Μ.Κ.)*
[3]*Θερμοκήπια «ΑΘΗΝΑ»,* info@thermokipiaathina.gr *(Ι.Π.)*
[4]*ΘΕΟΦΡΑΣΤΟΣ Λιπάσματα,* info@theofrastos.com *(Α.Π.)*
[5]*Ινστιτούτο Ελιάς, Υποτροπικών Φυτών και Αμπέλου – ΕΛΓΟ Δήμητρα,* tsaniklidis@elgo.gr *(Γ.Τσα.)*
[6]*Μουσείο Φυσικής Ιστορίας Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης,* avram@nhmc.uoc.gr *(Μ.Α.)*
[7]*Τμήμα Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης,* epipinis@for.auth.gr *(Η.Π.)*
[8]*Τμήμα Γεωπονίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης,* skostas@agro.auth.gr *(Σ.Κ.),* hatzilaz@agro.auth.gr *(Σ.Χ.),* thmatsi@agro.auth.gr *(Θ.Μ.),* iipsi@agro.auth.gr *(Ι.Υ.),* fbilias@agro.auth.gr *(Φ.Μ.),* gmenexes@agro.auth.gr *(Γ.Μ.),* anastasia-asia@hotmail.com *(Α.Γ.Κ.)*
[9]*Τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας,* elevizou@uth.gr *(Ε.Λ.),* chlikas@uth.gr *(Χ.Λ.)*

Περίληψη
Τα 15 αυτοφυή ελληνικά είδη τουλίπας προστατεύονται θεσμικά (Π.Δ. 67/1981), 40% είναι τοπικά ενδημικά, 50% υπενδημικά γειτνιαζόντων χωρών και σχεδόν 50% απειλούνται με εξαφάνιση. Το ερευνητικό έργο TULIPS.GR (Τ2ΕΔΚ-05115) στοχεύει στη δημιουργία αλυσίδας αξίας για τις αυτοφυείς ελληνικές τουλίπες, με άξονα την εκτός τόπου διατήρηση και αειφορική αξιοποίηση των εγχώριων φυτογενετικών πόρων μέσω πολυδιάστατης έρευνας. Διαπιστώθηκε ότι 73% των ελληνικών ειδών πωλούνται διεθνώς σε υψηλές τιμές και 60% διατηρούνται εκτός τόπου σε 41 βοτανικούς κήπους του εξωτερικού. Στο πλαίσιο TULIPS.GR ήδη διατηρούνται πλέον εκτός τόπου 14 ελληνικά είδη τουλίπας με 106 διαφορετικούς κωδικούς αναφοράς. Ταυτόχρονα, για την πλειονότητα των ελληνικών ειδών γίνονται για πρώτη φορά ειδικά πειράματα ανάπτυξης, φυσιολογίας, αγενούς και εγγενούς αναπαραγωγής, μικροπολλαπλασιασμού, φαινολογίας-φαινοτύπισης, βιοχημείας, γενετικής-μοριακής ταυτοποίησης, μετασυλλεκτικής, αναλύσεις θρεπτικής κατάσταση, αποικισμού μυκορριζών, και εφαρμογή λιπάνσεων ακριβείας με σκοπό την κατανόηση για κάθε είδος του βιολογικού κύκλου και την επίτευξη εκτός τόπου αναπαραγωγής του με ανάπτυξη ειδικών πρωτοκόλλων αναπαραγωγής-καλλιέργειας.

Λέξεις-κλειδιά
Βιοποικιλότητα, διατήρηση, βολβόρριζα, αναπαραγωγή, μοριακή τεκμηρίωση

Εισαγωγή
Οι τουλίπες κατέχουν ξεχωριστή θέση στην παγκόσμια βιομηχανία καλλωπιστικών ειδών (Krigas et al. 2021). Στην Ελλάδα αυτοφύονται 15 είδη τουλίπας, εκ των οποίων τα 12 είναι αυτόχθονα και τρία εγκλιματισμένα, έξι είναι ελληνικά ενδημικά, επτά απειλούνται με εξαφάνιση, και όλα θεωρούνται γενικώς ως απειλούμενα είδη και προστατεύονται από το Π.Δ 67/81 (Dimopoulos et al. 2016,

Kougioumtzis et al. 2021, Krigas et al. 2021, Phitos et al. 1995, Φοίτος και συν. 2009).

Το έργο TULIPS.GR (Τ2ΕΔΚ-05115) εστιάζει στα ελληνικά είδη τουλίπας και στοχεύει, μέσω μίας πολύπλευρης, ολοκληρωμένης και καθετοποιημένης επιστημονικής προσέγγισης, στη διατήρηση και αειφορική αξιοποίησή τους.

Μεθοδολογία

Διερευνήθηκε η εμπορία ελληνικών ειδών τουλίπας παγκοσμίωσακολουθώντας καθιερωμένες μεθόδους (Krigas et al. 2014, Menteli et al. 2019). Καταγράφηκε επίσης, η κατάσταση της εκτός τόπου διατήρησης για τις ελληνικές τουλίπες σε βοτανικούς κήπους παγκοσμίως μέσω της πλατφόρμας PlantSearch της Botanic Gardens Conservation International (BGCI).

Διερευνήθηκαν μέσω βάσεων δεδομένων (π.χ. https://www.jacq.org /#database) οι θέσεις εντοπισμού των ειδών τουλίπας που αυτοφύονται στο φυσικό περιβάλλον της Ελλάδας με σκοπό την οργάνωση ειδικών βοτανικών αποστολών. Πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον 20 βοτανικές αποστολές σε όλη τη χώρα (2020-2022) για συλλογή δεδομένων πεδίου, απόκτηση πολλαπλασιαστικού υλικού, συλλογή δειγμάτων εδάφους, μυκόρριζας και φυτικών ιστών για φυλλοδιαγνωστική ανάλυση και τεκμηρίωση προέλευσης του φυτικού υλικού και βιολογικού κύκλου των ειδών. Όλες οι συλλογές έγιναν κατόπιν ειδικής άδειας που παρέχεται στο ΙΓΒΦΠ-ΕΛΓΟ Δήμητρα από το Υπουργείο Περιβάλλοντος και Ενέργειας.

Για τους πειραματισμούς αναπαραγωγής-καλλιέργειας, έγινε ειδική παραγγελία για βοβλούς από 11 είδη σε εξειδικευμένα φυτώρια του εξωτερικού. Συνολικά εγκαταστάθηκαν 13.000 βολβοί σε 8 πειραματικές διατάξεις σε θερμοκήπια και αγρούς στη Θέρμη και Επανομή Θεσσαλονίκης, στο Ηράκλειο Κρήτης και στον Βόλο. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις ανάπτυξης, φαινολογίας, και αναλύσεις φυσιολογίας, βιοχημίας, φυλλοδιαγνωστικής, αποικισμού μυκορριζών και μετασυλλεκτικής (Σχήμα 2). Στο πλαίσιο της αναπαραγωγής έγινε *in vitro* εγκατάσταση πολλαπλασιαστικού υλικού, ειδικές μελέτες φυτρωτικότητας σπερμάτων και αγενούς αναπαραγωγής με βολβίδια υπό επίδραση λιπάνσεων ακριβείας. Παράλληλα, έγινε γενετική-μοριακή τεκμηρίωση (DNA Barcoding) για κάθε είδος ελληνικής τουλίπας (Σχήμα 2).

Αποτελέσματα

Συνολικά, εντοπίστηκαν στο διαδικτυακό εμπόριο 11 ελληνικά είδη τουλίπας, μεταξύ των οποίων 5 από τα 6 ενδημικά είδη της Ελλάδας, που πωλούνται κυρίως από φυτώρια του Ηνωμένου Βασιλείου και της Ολλανδίας, ενώ το υλικό εξαντλείται νωρίς εποχικά, και κάθε βολβός κοστολογείται έως και £2,60 (Krigas et al. 2021).

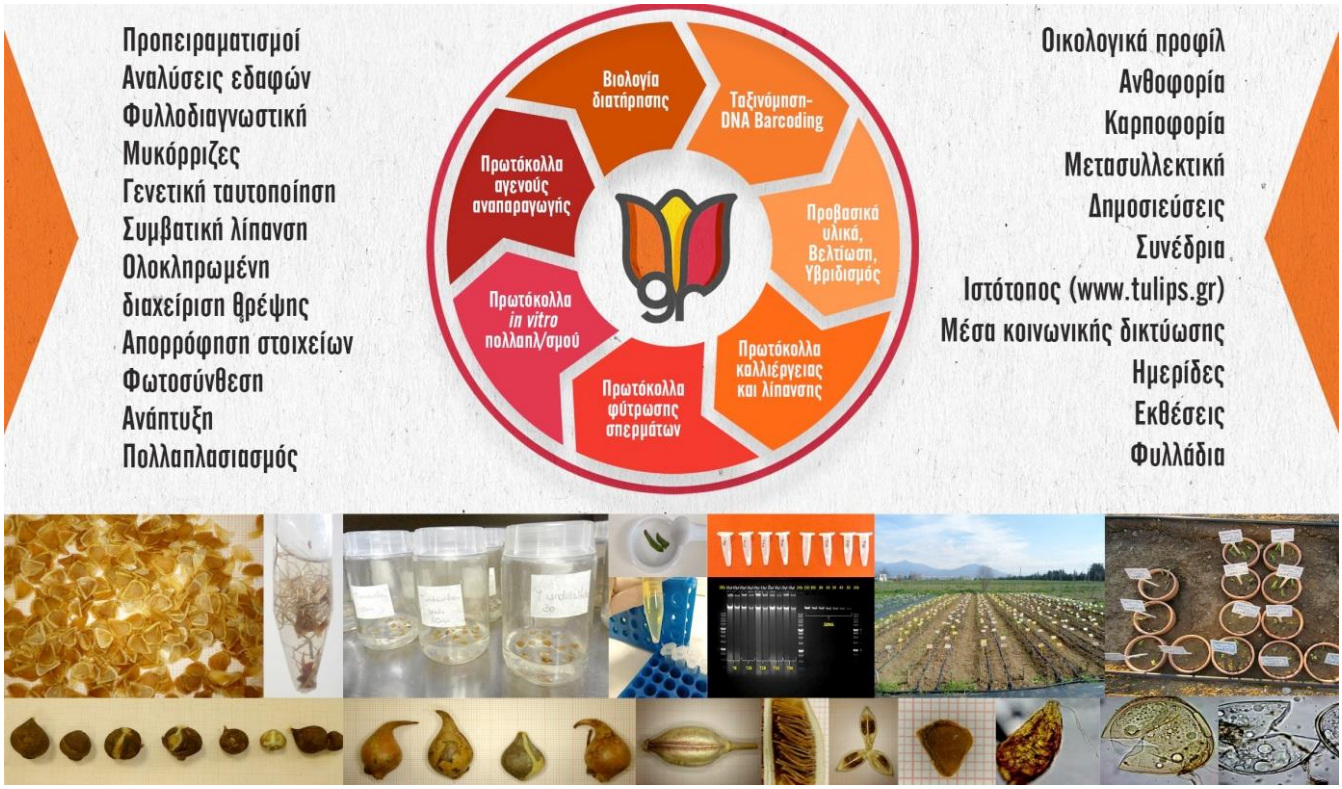
Συλλέχθηκαν, 14 αυτοφυή είδη τουλίπας από 83 πληθυσμούς στην Ελλάδα (Σχήμα 1), έγινε συντονισμένος επαναπατρισμός τουλιπών τεκμηριωμένης ελληνικής προέλευσης από βοτανικούς κήπους του εξωτερικού (9 είδη, 23 κωδικοί αναφοράς), και αγοράστηκαν δείγματα από εμπορικά διαθέσιμους βολβούς για 11 ελληνικές τουλίπες και 45 εμπορικά υβρίδια (56 κωδικοί). Τα υλικά αυτά (βολβοί, σπέρματα) βρίσκονται σε συνθήκες εκτός τόπου διατήρησης στις εγκαταστάσεις του ΙΓΒΦΠ-ΕΛΓΟ Δήμητρα, παρακολουθούνται σε όλα τα στάδια του βιολογικού τους κύκλου και αποτελούν την πρώτη συλλογή ελληνικών τουλιπών εθνικής σημασίας (Krigas et al. 2021).

Συμπεράσματα

Η τουλίπα έχει μεγάλη ανθοκομική αξία και επιφέρει ανάπτυξη σε τοπικές οικονομίες (Hernández & García 2009). Η διερεύνηση της διαδικτυακής πώλησης ελληνικών ειδών τουλίπας έδειξε ότι 73% των ελληνικών ειδών τουλίπας εμπορεύονται από φυτώρια του εξωτερικού, ενώ ο τρόπος απόκτησης του αρχικού υλικού παραμένει άγνωστος. Το γεγονός αυτό, ειδικά για τα ενδημικά είδη τουλίπας της Ελλάδας, εγείρει νομικά θέματα περί δικαιοδοσίας πρόσβασης στους εθνικούς φυτογενετικούς πόρους και δίκαιου-ισότιμου διαμοιρασμού οφελών χρησιμοποίησής τους (Krigas et al. 2021). Ακόμη πιο

εντυπωσιακή είναι η μεγάλη ζήτηση που έχουν τα ελληνικά είδη στην αγορά (το απόθεμα εξαντλείται νωρίς σε κάθε εποχή πώλησης) καθώς και η υψηλή εμπορική κοστολόγηση (Krigas et al. 2021).

Σχήμα 1. Σύνοψη εκτός τόπου διατήρησης ελληνικών ειδών τουλίπας (TULIPS.GR).



Σχήμα 2. Σύνοψη πολύπλευρης επιστημονικής προσέγγισης του TULIPS.GR.

Τα αποτελέσματα δείχνουν πως η εκτός τόπου διατήρηση των ελληνικών ειδών τουλίπας σε βοτανικούς κήπους είναι ανεπαρκής και αφορά μικρό αριθμό δειγμάτων αυτοφυών πληθυσμών (Krigas et al. 2021). Μέσω του TULIPS.GR, πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά μία εθνική συλλογή για σχεδόν όλα τα ελληνικά είδη τουλίπας όπου διατηρούνται κατά μέσο όρο 5,9 δείγματα αυτοφυών πληθυσμών ανά είδος (83 κωδικοί αναφοράς βολβών ή/και σπερμάτων), εκπροσωπώντας αξιόλογο τμήμα της υπάρχουσας γενετικής ποικιλότητας κάθε είδους.

Το έργο TULIPS.GR βρίσκεται σε πλήρη εξέλιξη με εκτεταμένους πειραματισμούς που γίνονται για

πρώτη φορά με σκοπό αφενός την ολοκληρωμένη διατήρηση και αφετέρου την αειφορική αξιοποίηση των ελληνικών τουλιπών μέσω μίας πολύπλευρης διαθεματικής προσέγγισης.

Βιβλιογραφία

Φοίτος, Δ., Κωνσταντινίδης, Θ. και Καμάρη, Γ. (2009). *Βιβλίο Ερυθρών Δεδομένων για τα Σπάνια και Απειλούμενα Φυτά της Ελλάδας* Τόμος ΙΙ. Πάτρα: Ελληνική Βοτανική Εταιρεία.

Dimopoulos, P., Raus, T., Bergmeier, E., Constantinidis, T., Gregoris, I., Kokkini, Strid, A. & Tzanoudakis, D. (2016). Vascular plants of Greece: An annotated checklist. Supplement. *Willdenowia*, 46(3), 301–347.

Hernández, B.J.E. & García, E.S. (2009). Tulips: An ornamental crop in the Andalusian middle ages. *Economic Botany*, 63(1), 60-66.

Kougioumoutzis, K., Kokkoris, I.P., Panitsa, M., Strid, A. & Dimopoulos, P. (2021). Extinction risk assessment of the Greek endemic flora. *Biology*, 10, 195.

Krigas, N., Menteli, V. & Vokou, D. (2014). The electronic trade in Greek endemic plants: Biodiversity, commercial and legal aspects. *Economic Botany* 68, 85–95.

Krigas, N., Lykas, C., Ipsilantis, I., Matsi, T., Weststrand, S., Harvström, M. & Tsoktouridis, G. (2021). Greek tulips: Worldwide electronic trade over the internet, global ex situ conservation and current sustainable exploitation challenges. *Plants*, 10, 580.

Menteli, V., Krigas, N., Avramakis, M., Turalnd, N. & Vokou, D. (2019) Endemic plants of Crete in electronic trade and wildlife tourism: Current patterns and implications for conservation. *Journal of Biological Research – Thessaloniki*, 26, 10.

Phitos, D., Strid, A., Snogerup, S. & Greuter, W. (1995) *The Red Data Book of Rare and Threatened Plants of Greece*. Gland, Switzerland: World Wide Fund for Nature.

Επίδραση της εγκατάλειψης γης και της κλιματικής αλλαγής στην ιστορική και μελλοντική χρήση ημι-ορεινών περιοχών του νομού Ιωαννίνων

Διογένης ΚΙΖΙΡΙΔΗΣ[1], Άννα ΜΑΣΤΡΟΓΙΑΝΝΗ[1], Μαγδαληνή ΠΛΕΝΙΟΥ[2], Φώτιος ΞΥΣΤΡΑΚΗΣ[2], Ελπίδα ΚΑΡΑΔΗΜΟΥ[1], Σπύρος ΤΣΙΦΤΣΗΣ[3], Ιωάννης ΤΣΙΡΙΠΙΔΗΣ[1]

[1] *Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, danis.k@zoho.com (Δ. Κ.), amastroi@bio.auth.gr (Α. Μ.), elkaradi@bio.auth.gr (Ε. Κ.), tsiripid@bio.auth.gr (Ι. Τ.)*
[2] *Ινστιτούτο Δασικών Ερευνών, Ελληνικός Γεωργικός Οργανισμός ΔΗΜΗΤΡΑ, mpleniou@fri.gr (Μ. Π.), fotios.xystrakis@fri.gr (Φ. Ξ.)*
[3] *Τμήμα Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος, Διεθνές Πανεπιστήμιο της Ελλάδας Ίδρυμα, stsiftsis@for.ihu.gr*

Περίληψη
Η κάλυψη και χρήση γης (ΚΧΓ) στα βουνά της Νότιας Ευρώπης αλλάζει σημαντικά, κυρίως λόγω της εγκατάλειψης παραδοσιακών καλλιεργητικών πρακτικών. Επομένως, η μελέτη ιστορικών προτύπων εγκατάλειψης είναι σημαντική για την πρόβλεψη μελλοντικών απειλών, ιδίως ενόψει της κλιματικής αλλαγής. Επιδιώξαμε αυτούς τους στόχους για πέντε ημι-ορεινές περιοχές του νομού Ιωαννίνων. Χαρτογραφήσαμε το ιστορικό ΚΧΓ από το 1945 μέχρι το 2015 με φωτοερμηνεία αεροφωτογραφιών. Μελλοντικές τάσεις για το 2055 προβλέφθηκαν με μοντέλο προσομοίωσης αλλαγής ΚΧΓ υπό διαφορετικά κλιματικά σενάρια. Βρήκαμε ότι από το 1945 μέχρι το 2015 οι αγροί μειώθηκαν από 30% σε 3% της έκτασης, ενώ τα δάση αυξήθηκαν από 22% σε 63%. Μελλοντικά, λιβάδια και θαμνώνες προβλέφθηκαν σε μικρότερο υψόμετρο υπό ένα θερμότερο και ξηρότερο κλίμα, ενώ τα δάση σε μεγαλύτερο. Προσεγγίσεις όπως αυτή της παρούσας μελέτης μπορούν να συνεισφέρουν στο σχεδιασμό πολιτικών διαχείρισης και αποκατάστασης, και για τον μετριασμό των αρνητικών επιπτώσεων της εγκατάλειψης απειλούμενων τοπίων της Μεσογείου.

Λέξεις-κλειδιά
Γεωγραφικά Συστήματα Πληροφοριών, γεωργία, κάλυψη και χρήση γης, κλιματική αλλαγή, κτηνοτροφία

Εισαγωγή

Παραδοσιακές πρακτικές διαχείρισης είχαν διαμορφώσει τα Μεσογειακά βουνά για αιώνες (Kaplan, Krumhardt & Zimmermann 2009). Ωστόσο, η εγκατάλειψη αυτών των περιοχών ήταν έντονη μετά τον Β' Παγκόσμιο Πόλεμο (MacDonald et al. 2000). Βασική αιτία αποτέλεσε η περιθωριοποίηση εξαιτίας δυσμενών κοινωνικο-οικονομικών συνθηκών (van der Zanden et al. 2017). Επίσης, η μεγαλύτερη κλιματική μεταβλητότητα λόγω υψομέτρου ενέτεινε τις καλλιεργητικές προκλήσεις (Mørch 1999). Έτσι, οι ορεινές καλλιέργειες ωθήθηκαν προς εγκατάλειψη, ως λιγότερο ανταγωνιστικές στις αγορές (Benayas et al. 2007).

Επιπρόσθετα, η κλιματική αλλαγή προβλέπεται μελλοντικά δραματικότερη στα Μεσογειακά βουνά, εξαιτίας μεγαλύτερης θερμοκρασιακής αύξησης, και μεγαλύτερης μείωσης βροχοπτώσεων (Bravo et al. 2008). Επομένως, είναι αναγκαία η πρόβλεψη της μελλοντικής κάλυψης και χρήσης γης (ΚΧΓ), ιδίως αναφορικά με με την επικείμενη κλιματική αλλαγή (Verburg, Rounsevell & Veldkamp 2006). Η μοντελοποίηση μπορεί να αναδείξει την επίδραση της κλιματικής αλλαγής μέσω πειραματισμού διαφορετικών κλιματικών σεναρίων (Stürck et al. 2018, van Vliet et al. 2016), όπως επιχειρήσαμε στην παρούσα μελέτη.

Υλικά και Μέθοδοι

Στα πλαίσια του προγράμματος «Abandon-diversity» (ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ.), μελετήσαμε τις ιστορικές και μελλοντικές τάσεις ΚΧΓ πέντε ημι-ορεινών περιοχών του νομού Ιωαννίνων (Εικόνα 1α) (Kiziridis et al. 2022a).

Ιστορικές τάσεις
Χρησιμοποιήσαμε ορθοφωτογραφίες φυσικού χρώματος και αεροφωτογραφίες μεγάλης κλίμακας για τέσσερα έτη μελέτης (1945, 1970, 1996 και 2015). Οι φωτογραφίες παρασχέθηκαν από: το Ελληνικό Κτηματολόγιο, τη Στρατιωτική Γεωγραφική Υπηρεσία, και το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων. Χαρτογραφήσαμε τις περιοχές με φωτοερμηνεία, για να διακριθούν οι διαφορετικοί τύποι ΚΧΓ. Κάθε κελί μεγέθους 25 × 25 m του χάρτη κάποιου έτους μελέτης κατηγοριοποιήθηκε σε μία εκ των πέντε τύπων ΚΧΓ: αγρός, λιβάδι, αραιός θαμνώνας, πυκνός θαμνώνας ή δάσος. Επίσης, συσχετίσαμε στατιστικώς τη χαρτογραφημένη ΚΧΓ με διάφορες τοπογραφικές, γεωλογικές, κλιματικές και κοινωνικο-οικονομικές συνθήκες.

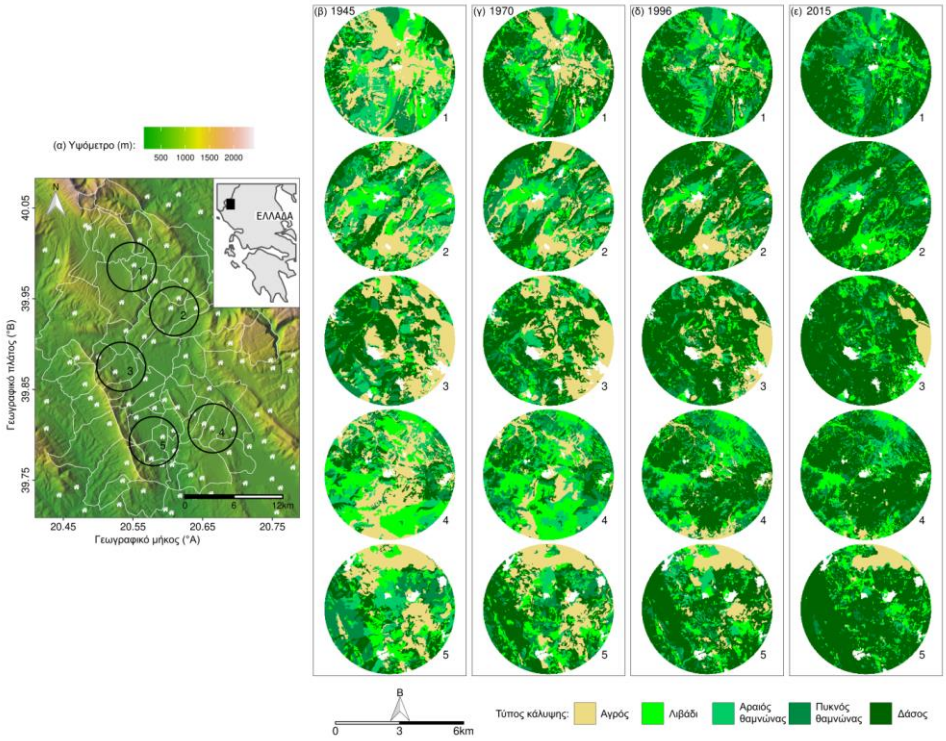
Μελλοντικές τάσεις
Για μοντέλο προσομοίωσης χρησιμοποιήσαμε μια μεταγενέστερη παραλλαγή του μοντέλου CLUE-S, το trans-CLUE-S, το οποίο επιδεικνύει μεγαλύτερη προβλεπτική ικανότητα από το CLUE-S (Kiziridis et al. 2022b). Το μοντέλο χρειάζεται δύο τύπους δεδομένων: (1) ιστορικούς χάρτες ΚΧΓ· και (2) ιστορικούς χάρτες περιβαλλοντικών συνθηκών. Επίσης, απαιτείται σενάριο μελλοντικής ζήτησης σε μεταβάσεις ΚΧΓ. Έτσι, το μοντέλο κατανέμει χωρικά τη μελλοντική ζήτηση σε ΚΧΓ σύμφωνα με τη μελλοντική περιβαλλοντική καταλληλότητα των κελιών του χάρτη ως προς τους διάφορους τύπους ΚΧΓ.

Υποθέσαμε τέσσερα σενάρια ζήτησης: (α) χωρίς ζήτηση· (β) ζήτηση ως συνήθως, από την περίοδο 1996–2015 στην περίοδο 2015–2055· (γ) ως συνήθως, αλλά με αποτροπή περαιτέρω εγκατάλειψης της εντατικής καλλιέργειας του 2015· και (δ) αντιστροφή των μεταβάσεων ΚΧΓ προς το 1970 που είχε χαρακτηριστικά εκτατικής καλλιέργειας. Για κάθε σενάριο ζήτησης, συγκρίναμε τις προβλέψεις από τρία κλιματικά σενάρια CMIP6, από το περισσότερο αισιόδοξο (SSP126) στο λιγότερο (SSP585).

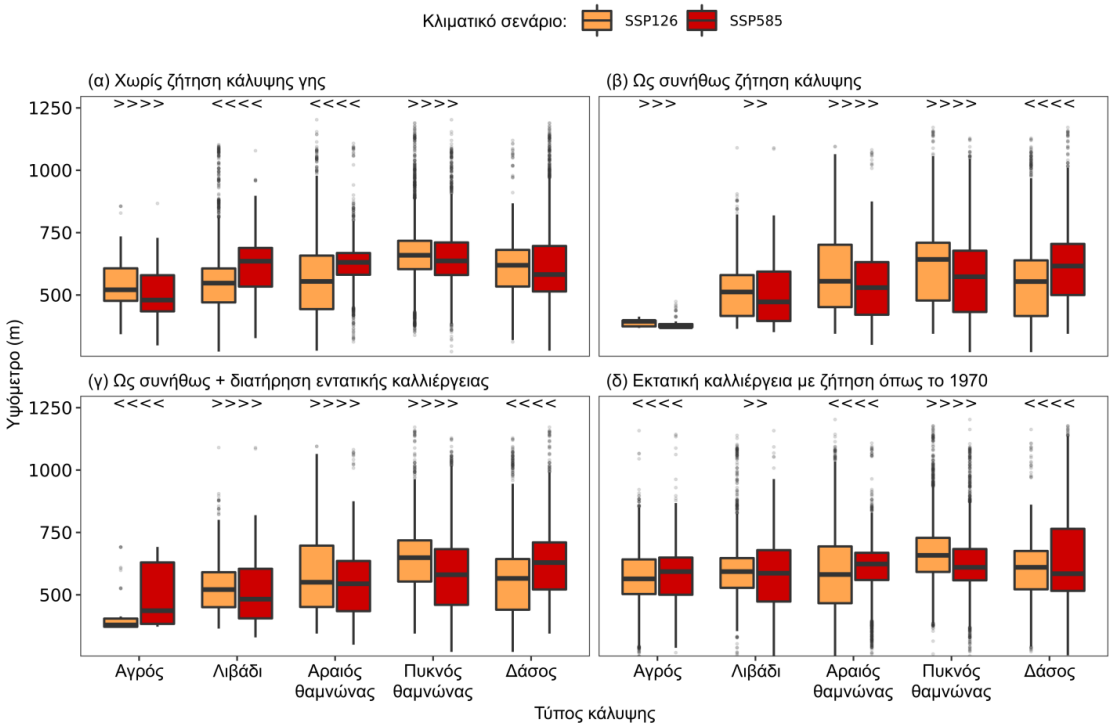
Αποτελέσματα και Συζήτηση
Ιστορικές τάσεις
Η εγκατάλειψη ήταν εμφανής σε όλες τις περιοχές (Εικόνα 1β–ε). Συνολικά, οι αγροί μειώθηκαν από 30.2%, που ήταν το μεγαλύτερο μερίδιο μεταξύ των τύπων ΚΧΓ το 1945, σε 3.2%, που ήταν το μικρότερο του 2015. Επακολούθως, τα δάση αυξήθηκαν από 21.7% σε 62.6% στα 70 έτη. Παρόμοια μεγέθη εγκατάλειψης και δάσωσης έχουν παρουσιαστεί και σε άλλες μελέτες από την περιοχή (Zomeni et al. 2008), από άλλες ορεινές περιοχές της Ελλάδας (Xystrakis, Psarras & Koutsias 2017), και από άλλα Μεσογειακά βουνά (Pueyo & Beguería 2007).

Μελλοντικές τάσεις
Οι χάρτες ΚΧΓ για το 2055 ήταν πανομοιότυποι κατά το 90–95% της έκτασής τους μεταξύ των κλιματικών σεναρίων. Για το υπόλοιπο 5–10% που διέφεραν, οι πιο συστηματικές αλλαγές ήταν η πρόβλεψη των δασών σε μεγαλύτερο υψόμετρο κατά το πιο απαισιόδοξο σενάριο θερμότερου και ξηρότερου κλίματος, και των λιβαδιών και πυκνών θαμνώνων σε μικρότερο υψόμετρο (Εικόνα 2). Παρόμοια πρότυπα μετακίνησης δασοορίων έχουν αναφερθεί σε μελέτες για την επίπτωση της κλιματικής αλλαγής με ιστορικά δεδομένα (π.χ. Piccinelli et al. 2020).

Συμπεράσματα
Η εγκατάλειψη οδήγησε ιστορικά σε αύξηση των δασών, τα οποία προβλέφθηκαν σε μεγαλύτερα υψόμετρα κατά τα πιο απαισιόδοξα κλιματικά σενάρια. Προσεγγίσεις όπως η παρούσα μπορούν να συμβάλλουν στον σχεδιασμό πολιτικών που στοχεύουν στη διαχείριση και αποκατάσταση αυτών των χαρακτηριστικών τοπίων της Μεσογείου.



Εικόνα 1. Οι πέντε περιοχές μελέτης. (α) Τοπογραφικά χαρακτηριστικά των περιοχών, οι οποίες εντοπίζονται με μαύρο πλαίσιο στον ευρύτερο χάρτη του ένθετου. Οι κοινότητες οριοθετούνται με λευκή γραμμή, και οι οικισμοί συμβολίζονται με λευκά σπίτια. (β–ε) Η χαρτογραφημένη ΚΧΓ κατά τα τέσσερα έτη μελέτης. Η παρούσα Εικόνα 1 χρησιμοποιείται κατόπιν άδειας (Kiziridis et al. 2022a).



Εικόνα 2. Υψόμετρο στα κελιά του χάρτη τα οποία προβλέφθηκαν με διαφορετική ΚΧΓ μεταξύ του πιο αισιόδοξου (SSP126) και πιο απαισιόδοξου (SSP585) κλιματικού σεναρίου. Τα σύμβολα ανισότητας υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά στο διάμεσο υψόμετρο κατά τον ελέγχο Wilcoxon μεταξύ σεναρίων. Τέσσερα σύμβολα ανισότητας χρησιμοποιήθηκαν για τιμή $p \leq 0.001$, τρία σύμβολα για $p \leq 0.001$, δύο για $p \leq 0.01$, ένα για $p \leq 0.05$, και κανένα σύμβολο για $p > 0.05$ επιπέδου στατιστικής σημαντικότητας.

Βιβλιογραφία

Benayas, J. R., Martins, A., Nicolau, J. M., & Schulz, J. J. (2007). Abandonment of agricultural land: an overview of drivers and consequences. CAB reviews: Perspectives in agriculture, veterinary science, nutrition and natural resources, 2, 1-14.

Bravo, D. N., Araújo, M. B., Lasanta, T., & Moreno, J. I. L. (2008). Climate change in Mediterranean mountains during the 21st century. Ambio, 280-285.

Kaplan, J. O., Krumhardt, K. M., & Zimmermann, N. (2009). The prehistoric and preindustrial deforestation of Europe. Quaternary Science Reviews, 28, 3016-3034.

Kiziridis, D. A., Mastrogianni, A., Pleniou, M., Karadimou, E., Tsiftsis, S., Xystrakis, F., & Tsiripidis, I. (2022a). Acceleration and relocation of abandonment in a Mediterranean mountainous landscape: drivers, consequences, and management implications. Land, 11, 406.

Kiziridis, D. A., Mastrogianni, A., Pleniou, M., Tsiftsis, S., Xystrakis, F., & Tsiripidis, I. (2022b) Improving the predictive performance of CLUE-S by extending demand to land transitions: the trans-CLUE-S model. Land, under review.

MacDonald, D., Crabtree, J. R., Wiesinger, G., Dax, T., Stamou, N., Fleury, P., ... & Gibon, A. (2000). Agricultural abandonment in mountain areas of Europe: environmental consequences and policy response. Journal of environmental management, 59, 47-69.

Mørch, H.F.C. (1999). Mediterranean agriculture - an agro-ecological strategy. Geografisk Tidsskrift, 1, 143–156.

Piccinelli, S., Brusa, G., & Cannone, N. (2020). Climate warming accelerates forest encroachment triggered by land use change: A case study in the Italian Prealps (Triangolo Lariano, Italy). Catena, 195, 104870.

Pueyo, Y., & Beguería, S. (2007). Modelling the rate of secondary succession after farmland abandonment in a Mediterranean mountain area. Landscape and Urban Planning, 83, 245-254.

Stürck, J., Levers, C., van der Zanden, E. H., Schulp, C. J. E., Verkerk, P. J., Kuemmerle, T., ... & Verburg, P. (2018). Simulating and delineating future land change trajectories across Europe. Regional Environmental Change, 18, 733-749.

van der Zanden, E. H., Verburg, P. H., Schulp, C. J., & Verkerk, P. J. (2017). Trade-offs of European agricultural abandonment. Land use policy, 62, 290-301.

van Vliet, J., Bregt, A. K., Brown, D. G., van Delden, H., Heckbert, S., & Verburg, P. H. (2016). A review of current calibration and validation practices in land-change modeling. Environmental Modelling & Software, 82, 174-182.

Verburg, P. H., Rounsevell, M., & Veldkamp, A. (2006). Scenario-based studies of future land use in Europe. Agriculture, ecosystems & environment, 114.

Xystrakis, F., Psarras, T., & Koutsias, N. (2017). A process-based land use/land cover change assessment on a mountainous area of Greece during 1945–2009: signs of socio-economic drivers. Science of the Total Environment, 587, 360-370.

Zomeni, M., Tzanopoulos, J., & Pantis, J. D. (2008). Historical analysis of landscape change using remote sensing techniques: An explanatory tool for agricultural transformation in Greek rural areas. Landscape and urban planning, 86, 38-46.

Μελέτη ανθεκτικών περιβαλλοντικών και κλινικών στελεχών Escherichia coli

ΔΙΟΛΗ Χρύσα[1], ΠΑΠΠΑ Όλγα[2], ΜΠΕΡΝΤΑΛΛΙ Σοφία[1], ΠΟΛΟΝΥΦΗ Δήμητρα[1], ΑΓΓΕΛΟΥ Κατερίνα[1], ΠΑΠΑΓΙΑΝΝΗ Βασιλική[1], ΔΑΝΑΛΙΑ Χρυσάνθη[1], ΧΡΥΣΟΧΟΟΥ Ελένη[1], ΦΛΕΒΑΡΗΣ Θοδωρής[1], ΣΙΑΤΡΑΒΑΝΗ Ειρήνη[5], ΤΑΤΣΙΟΠΟΥΛΟΣ Απόστολος[3], ΚΩΤΣΑΚΗΣ Στάθης[5], ΓΙΑΚΚΟΥΠΗ Παναγιώτα[4], ΜΥΡΙΑΓΚΟΥ Βιβή[5], ΜΠΕΛΟΥΚΑΣ Απόστολος[1]

[1] *Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Αιγάλεω, Αθήνα,* cdioli@uniwa.gr
[2] *Κεντρικό Εργαστήριο Δημόσιας Υγείας, Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας (ΕΟΔΥ),* o.pappa@eody.gr
[3] *Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Γενικό Νοσοκομείο Λιβαδειάς,* apotatsiop@yahoo.com
[4] *Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας, Σχολή Δημόσιας Υγείας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Αμπελόκηποι, Αθήνα,* pgiakkoupi@uniwa.gr
[5] *Εργαστήριο Βακτηριολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα,* miriagou@pasteur.gr

Περίληψη
Η εξάπλωση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων έχει λάβει τεράστιες διαστάσεις και απειλεί να ανατρέψει έναν αιώνα ιατρικής προόδου. Ανθεκτικά βακτήρια εντοπίζονται στα λύματα ενώ συχνά είναι αδύνατη η εξάλειψη τους κατά την επεξεργασία που υφίστανται στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων (Ε.Ε.Λ). Το γεγονός αυτό και δεδομένου ότι τα επιβαρυμένα λύματα καταλήγουν σε υδάτινα σώματα, καθώς και το ότι σε πολλές περιπτώσεις επαναχρησιμοποιούνται για βιομηχανικούς ή αρδευτικούς σκοπούς αποτελεί τεράστια απειλή για την υγεία του ανθρώπου και εν γένει του οικοσυστήματος. Συνεπώς η συστηματική επιτήρηση της αντιμικροβιακής αντοχής στο υδάτινο περιβάλλον και στα λύματα καθίσταται αναγκαία.

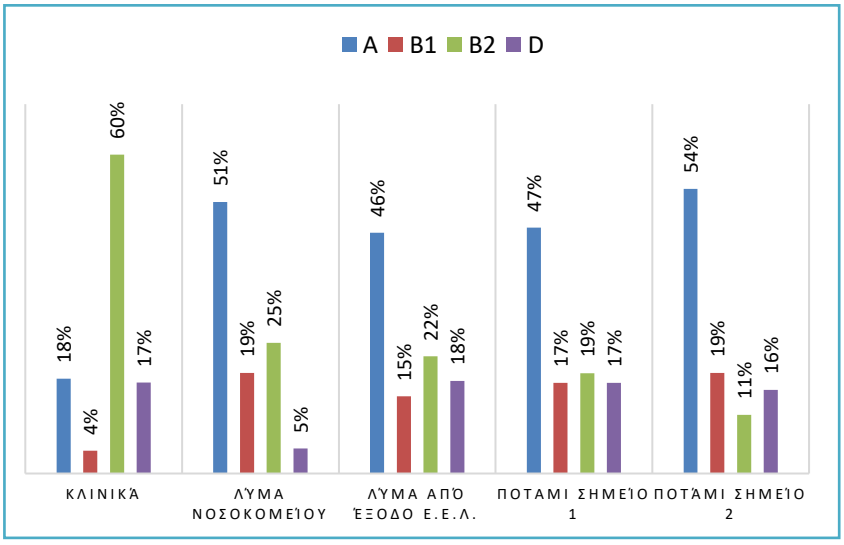
Λέξεις κλειδιά
Escherichia coli, αντιβιοτικά, αντιμικροβιακή αντοχή, περιβάλλον

Εισαγωγή
Η παρούσα εργασία σχετίζεται με τον έλεγχο των προτύπων και των μηχανισμών αντιμικροβιακής αντοχής καθώς και με την τυποποίηση στελεχών *E. coli* που απομονώθηκαν τόσο από κλινικά όσο και από περιβαλλοντικά δείγματα (νοσοκομειακό και αστικό λύμα και νερό ποταμών).

Μέθοδοι
Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 139 κλινικά και 502 περιβαλλοντικά στελέχη, που συλλέχθηκαν το διάστημα Ιούλιος 2019 – Απρίλιος 2021 και σχετίζονται χωροχρονικά. Από τα 139 κλινικά στελέχη, 104 απομονώθηκαν από ούρα, 30 από αίμα και 5 από τραύματα ασθενών που είτε νοσηλεύτηκαν είτε επισκέφθηκαν το τμήμα επειγόντων περιστατικών του Γενικού Νοσοκομείου της Λιβαδειάς. Από τα 502 περιβαλλοντικά στελέχη: α) 105 απομονώθηκαν από ημι-επεξεργασμένο λύμα του Γενικού Νοσοκομείου Λιβαδειάς, β) 171 από δευτερογενώς επεξεργασμένο λύμα που συλλέχθηκε από την έξοδο της Ε.Ε.Λ της Λιβαδειάς γ) 163 από σημείο του ποταμού Έρκυνα στα 100μ καθοδικά της εκβολής λυμάτων της Ε.Ε.Λ και δ) 63 από σημείο του ποταμού που απέχει 6χλμ από το σημείο εξόδου των λυμάτων. Όλα τα στελέχη τυποποιήθηκαν με την μοριακή τεχνική Phylogrouping (Clermont et. al. 2000). Παράλληλα υποβλήθηκαν σε έλεγχο μικροβιακής ευαισθησίας σε 18 αντιβιοτικά με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών σε άγαρ και στα φαινοτυπικά τεστ Double-Disc Synergy Test (DDST) και Carbapenem Inactivation Method (CIM-test) για την ανίχνευση β-λακταμασών εκτεταμένου φάσματος (extended-spectrum β-lactamases, ESBLs) και καρβαπενεμασών, αντίστοιχα (EUCAST 2017). Ακόμη ελέγχθηκαν μοριακά για την παρουσία γονιδίων που σχετίζονται με συγκεκριμένους φαινοτύπους αντοχής, όπως γονίδια ESBLs, καρβαπενεμασών και AmpC β-λακταμασών (Woodford et al. 2006, ECDC 2019). Τέλος σε ορισμένα πολυανθεκτικά στελέχη εφαρμόστηκε πλασμιδιακή ανάλυση κατά Portnoy (Portnoy et al.1981).

Αποτελέσματα

Σύμφωνα με τα επιδημιολογικά και τα κλινικά όρια αντοχών κατά EUCAST, αντίστοιχα, προέκυψαν τα παρακάτω: α) για τα περιβαλλοντικά στελέχη το 40,0% (203/502) χαρακτηρίστηκε ως άγριου τύπου [wild-type, WT: ευαίσθητο σε όλα τα αντιβιοτικά], το 2,0% (14/502) ως μη-άγριου τύπου [non-wild type, N-WT: ανθεκτικό σε μόνο ένα αντιβιοτικό παράγοντα], το 36,0% (183/502) ως ανθεκτικό [resistant, R: ανθεκτικό σε περισσότερο από έναν αντιβιοτικό παράγοντα μέχρι και τριών διαφορετικών κατηγοριών] και το 20.3% (102/502) ως πολυανθεκτικό [multi-drug resistant, MDR: ανθεκτικό σε τουλάχιστον έναν αντιβιοτικό παράγοντα σε περισσότερες από τρεις διαφορετικές κατηγορίες], β) για τα κλινικά στελέχη το 40,0% (56/139) χαρακτηρίστηκε ως S (sensitive, ευαίσθητο σε όλα τα αντιβιοτικά), το 44,0% (61/139) ως R και το 16% (22/139) ως MDR. Συνολικά, η μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης αντοχής παρατηρήθηκε στις πενικιλλίνες (335/641, 52%) ακολουθούμενη από την αντοχή σε κινολόνες (135/641, 21%) και κεφαλοσπορίνες (98/641, 15%). Μεταξύ των 124 συνολικά MDR στελεχών το 52% (65/124) εμφάνισε παράλληλη αντοχή σε κεφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος και κινολόνες. Από τα 80 στελέχη (κλινικά και περιβαλλοντικά) που ανέδειξαν θετικό DDS test σε 52 ανιχνεύθηκε γονίδιο $bla_{CTX\text{-}M\text{-}group\ 1}$ (52/80, 65%), σε 7 (7/80, 9%) το $bla_{CTX\text{-}M\text{-}group\ 9}$, σε 12 το bla_{TEM} (12/80, 15%) και σε 17 το bla_{SHV} (17/80, 21.3%). Θετικό CIM-test ανέδειξε μόνο ένα περιβαλλοντικό στέλεχος στο οποίο ανιχνεύθηκε το γονίδιο blaOXA-48. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του Phylogrouping τα στελέχη ομαδοποιήθηκαν στις τέσσερεις βασικές φυλογενετικές ομάδες A, B2, B1, και D. Η πλειοψηφία των περιβαλλοντικών E. coli κατατάχθηκε στην ομάδα A (48%, 242/502), ωστόσο η συχνότητα εμφάνισης της B2 ήταν οριακά αυξημένη στα στελέχη που απομονώθηκαν από το λύμα. Αντιθέτως, η επικρατέστερη ομάδα μεταξύ των κλινικών στελεχών ήταν η B2 (60%, 84/139) (**Εικόνα 1**.). Η πλασμιδιακή ανάλυση έδειξε ότι το πλασμιδιακό προφίλ των στελεχών παρουσίαζε μεγάλη ετερογένεια. Στα 50 από τα 76 στελέχη που παράγουν ESBLs ανιχνεύθηκαν πλασμίδια μεγάλου μεγέθους ≥20MDa μαζί με πολλά μικρότερα, το μέγεθος των οποίων κυμαινόταν μεταξύ των τιμών 4.2 με 1 MDa.



Εικόνα 1. Συχνότητα εμφάνισης της κάθε φυλογενετικής ομάδας στα διαφορετικά περιβάλλοντα

Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη καταδεικνύει ότι το νερό των ποταμών και το λύμα αποτελούν βασικές δεξαμενές ανθεκτικών στελεχών E. coli σε αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική πράξη. Στελέχη E. coli με παρόμοιο πρότυπο αντιμικροβιακής αντοχής που παράγουν ESBLs και συγκεκριμένα CTX-M-τύπου εντοπίστηκαν τόσο σε κλινικά όσο και σε περιβαλλοντικά στελέχη. Η φυλογενετική ομάδα B2 ήταν η κυρίαρχη στα κλινικά στελέχη και η δεύτερη πιο συχνή στα στελέχη που απομονώθηκαν από τα

δείγματα λύματος. Πιθανολογείται, πως τα περιβαλλοντικά στελέχη που κατατάχθηκαν στην ομάδα B2 έχουν νοσοκομειακή προέλευση. Τα στελέχη των ομάδων B2 και D, στις οποίες περιλαμβάνονται τόσο R όσο και MDR στελέχη, διαθέτουν το γονίδιο chuA που ευθύνεται για την μεταφορά αίμης στα εντεροαιμορραγικά στελέχη E. coli O157:H7, γεγονός που υποδηλώνει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της παθογένειας και των συγκεκριμένων φυλογενετικών ομάδων (Clermont et. al.2000, Spurbeck et al 2012). Ορισμένες μελέτες συσχετίζουν την πολυαντοχή στα αντιβιοτικά με την ανοχή στα απολυμαντικά (Amarasiri 2019, Ben et al 2017, Zhang et al. 2017). Ομοίως, στην παρούσα μελέτη ένα ποσοστό ανθεκτικών στελεχών διέφυγε της απολύμανσης που πραγματοποιήθηκε κατά την δευτερογενή επεξεργασία. Ως εκ τούτου, ο μελλοντικός μας στόχος είναι η εφαρμογή αλληλούχησης ολόκληρου του γονιδιώματος (WGS), που θα αποκαλύψει την παρουσία μηχανισμών που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στα απολυμαντικά και κατά συνέπεια, θα βοηθήσει στην εξήγηση του χαμηλού ποσοστού απομάκρυνσης ανθεκτικών στελεχών από το επεξεργασμένο λύμα.

Βιβλιογραφία

Amarasiri M., Sano D. & Suzuki S. (2020) Understanding human health risks caused by antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG) in water environments: Current knowledge and questions to be answered, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 50:19, 2016-2059

Ben W., Wang J., Cao R., Yang M., Zhang Y. & Qiang Z. (2017). Distribution of antibiotic resistance in the effluents of ten municipal wastewater treatment plants in China and the effect of treatment processes. Chemosphere, 172, 392–398.

Clermont O., Bonacorsi S. & Bingen E. (2000). Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group. Applied and environmental microbiology, 66 (10), 4555–4558.

European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC (2019). Laboratory manual for carbapenem and colistin resistance detection and characterisation for the survey of carbapenem- and/or colistin-resistant Enterobacteriaceae – Version 2.0. Stockholm

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST (2017) guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance Version 2.01

Portnoy A. & Falkow S. (1981). Virulence-associated plasmids from Yersinia enterocolitica and Yersinia pestis. *Journal of bacteriology*, 148 (3), 877–883.

Spurbeck R., Dinh Jr, Walk T., Stapleton E., Hooton M., Nolan K., Kim S., Johnson R. & Mobley H. L. (2012). Escherichia coli isolates that carry vat, fyuA, chuA, and yfcV efficiently colonize the urinary tract. *Infection and immunity*, 80 (12), 4115–4122.

Woodford N., Fagan E. J. & Ellington M. J. (2006). Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 57 (1), 154–155.

Zhang M., Xu M., Wang C., Zhuang K. & Liu Q. (2017). Effects of ultraviolet disinfection on antibiotic-resistant Escherichia coli from wastewater: inactivation, antibiotic resistance profiles and antibiotic resistance genes. *Journal of applied microbiology*, 123 (1), 295–306.

Μελέτη της απόκρισης της αχιβάδας **Ruditapes decussatus** *σε αυξανόμενες θερμοκρασίες μέσω της γονιδιακής έκφρασης δύο μοριακών συνοδών (hsp)*

ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ Κ. Δημήτριος[1], ΓΙΑΝΤΣΗΣ Α. Ιωάννης[2], ΛΑΤΤΟΣ Αθανάσιος[1], ΜΙΧΑΗΛΙΔΗΣ Βασίλειος[1]

[1]*Σχολή Θετικών Επιστημών, ΑΠΘ,* dkpapado@bio.auth.gr, lattosad@bio.auth.gr, michaeli@bio.auth.gr
[2]*Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Μακεδονίας,* igiantsis@uowm.gr

Περίληψη
Η αχιβάδα *Ruditapes decussatus* είναι αυτόχθονο δίθυρο Μαλάκιο με σημαντική εμπορική αξία. Τα δίθυρα, όντας ανίκανα να μετακινηθούν, είναι από τους πιο ευάλωτους οργανισμούς ενάντια στην αύξηση της θερμοκρασίας των ωκεανών εξαιτίας της κλιματικής αλλαγής. Η παρούσα μελέτη εστίασε στην διερεύνηση της απόκρισης στη θερμική καταπόνηση (thermal stress) του είδους *Ruditapes decussatus*, στα πλαίσια των περιστατικών μαζικής θνησιμότητας που παρατηρούνται στους πληθυσμούς οστρακοειδών λόγω των υψηλών θερμοκρασιών. Εξετάστηκε η έκφραση των γονιδίων *hsp22* και *hsp70* σε 4 θερμοκρασίες με παράλληλη καταγραφή της θνησιμότητας για διάστημα 3 εβδομάδων. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι ακόμα και μικρή αύξηση της θερμοκρασίας (22,5°C) είναι αρκετή ώστε να οδηγήσει σε μαζικές θνησιμότητες. Οι μεγαλύτερες θερμοκρασίες οδηγούν αντίστοιχα σε μεγαλύτερες θνησιμότητες με την ένταση, την ταχύτητα και τον τρόπο της απόκρισης να διαφέρουν στις διαφορετικές θερμοκρασίες.

Λέξεις-κλειδιά
Ruditapes decussatus, κλιματική αλλαγή, καταπόνηση, hsp22, hsp70

Εισαγωγή
Η συνεχής αύξηση του ατμοσφαιρικού CO_2 αναμένεται να οδηγήσει μέχρι το 2100 σε αύξηση της μέσης θερμοκρασίας της επιφάνειας των ωκεανών κατά 2-4 °C (Hoegh-Guldberg et al. 2014). Ιδιαίτερα ευάλωτες θεωρούνται οι παράκτιες περιοχές όπου και διαβιούν οι περισσότεροι πληθυσμοί οστρακοειδών και από όπου προέρχεται μεγάλο ποσοστό (90%) της παραγωγής διθύρων (Wijsman et al. 2019). Συνεπώς, κρίνεται απαραίτητη η μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στα θαλάσσια δίθυρα ώστε να προσδιοριστεί η ικανότητα τους να αντιμετωπίζουν θερμοκρασιακές διακυμάνσεις. Η αχιβάδα *Ruditapes decussatus* θεωρείται ένα σημαντικό οικονομικά δίθυρο (FAO 2016). Οι υδρόβιοι οργανισμοί είναι ικανοί ως έναν βαθμό να εγκλιματίζονται σε θερμοκρασιακές διακυμάνσεις (Schiedek et al. 2007). Η διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών απόκρισης είναι σημαντική για την κατανόηση του μεγέθους της καταπόνησης και τον προσδιορισμό των θερμοκρασιακών ορίων των διθύρων. Η πρωτεΐνη θερμικού πλήγματος 70 (Hsp70) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην φυσιολογική απόκριση των διθύρων ενάντια στη θερμοκρασιακή καταπόνηση (Anestis et al. 2008), ενώ η Hhsp22 παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB, ο οποίος επάγει την έκφραση πολλών γονιδίων ενάντια σε κάθε είδους καταπόνηση και ως εκ τούτου επιλέχθηκαν προς μελέτη στην παρούσα εργασία.

Μεθόδοι
Αχιβάδες *Ruditapes decussatus* συλλέχθηκαν και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο σε θαλασσινό νερό μέσα σε καλαθάκια με άμμο ώστε να προσομοιωθεί το φυσικό τους ενδιαίτημα. Διανεμήθηκαν σε 8 δεξαμενές (4 θερμοκρασίες), στις οποίες ήταν εγκατεστημένο κλειστό σύστημα ανακυκλοφορίας νερού (RAS) και σιτίζοταν με μικροφύκη. Οι παράμετροι του νερού παρακολουθούνταν καθημερινώς (pH, διαλυμμένο οξυγόνο, θερμοκρασία, αμμωνία, νιτρικά και νιτρώδη ιόντα), ενώ οι διαφορετικές θερμοκρασίες ρυθμίστηκαν με ηλεκτρικούς θερμοστάτες. Σε διάρκεια τριών εβδομάδων και σε 6 χρονικές στιγμές (Πίνακας 2), λήφθηκαν τυχαία 4 άτομα από κάθε δεξαμενή και ακολούθησε απομόνωση του ολικού RNA (NucleoZOL, Macherey-Nagel) από τον ιστό του μανδύα.

Πίνακας 1: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων στόχων

Γονίδιο στόχος	Εμπρόσθιος εκκινητής (5΄-3΄) Αντίστροφος εκκινητής (5΄-3΄)	Βιβλιογραφία
hsp22	GATGAATGGAAATCAATGGAC	Παρούσα εργασία
	GGTTTTCACGCTAATTTCTTC	
hsp70	TCTCGGAGGTGAGGATTTTG	Velez et al. 2017
	TTCTCTTTGCTCGCTCACAC	
18S rRNA	GTACAAAGGGCAGGGACGTA	Moreira et al. 2012
	CTCCTTCGTGCTAGGGATTG	

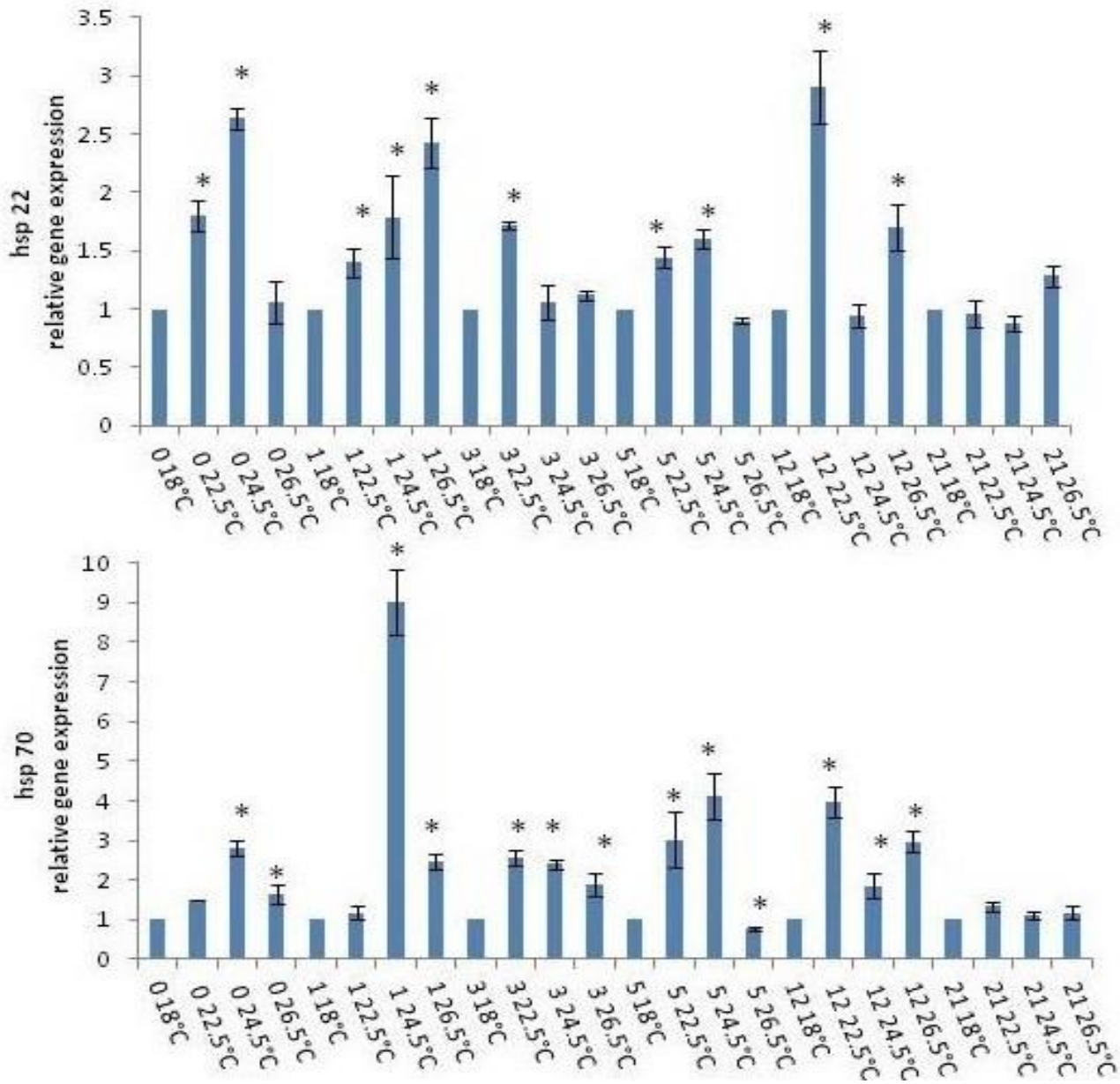
Ακολούθησε αντίστροφη μεταγραφή του RNA (PrimeScript kit, Takara) και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου με υπόστρωμα το cDNA και με τη χρήση του κιτ KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2x) και κατάλληλων εκκινητών (Πίνακας 1). Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων σύμφωνα με τους Livak & Schmittgen (2001) με μάρτυρα τις αχιβάδες στους 18°C και γονίδιο αναφοράς το 18S.

Αποτελέσματα

Στους 22,5°C παρατηρήθηκε θνησιμότητα 14,8% μέχρι και την 5η μέρα και αυξημένες εκφράσεις και των δύο γονιδίων συγκριτικά με τους 18°C (Πίνακας 2, Εικόνα 1). Έπειτα παρατηρήθηκαν μηδενικές θνησιμότητες, ωστόσο η έκφραση των γονιδίων εμφανίστηκε σημαντικά αυξημένη και τη 12η μέρα. Τη 3η μέρα η έκφραση της Hsp22 ήταν σημαντικά αυξημένη ακόμα και συγκριτικά με τις μεγαλύτερες θερμοκρασίες, ενώ τη μέρα 5 τα επίπεδα του γονιδίου αυτού είναι παρόμοια με τους 24,5°C και αυξημένα συγκριτικά με τους 26,5°C. Τα επίπεδα έκφρασης της Hsp70 τις ημέρες 3 και 5 βρέθηκαν παρόμοια με τους 24,5°C και μεγαλύτερα από τους 26,5°C. Στους 24,5°C παρατηρήθηκε συνολική θνησιμότητα 33%, ενώ το mRNA της Hsp22 βρέθηκε αυξημένο τις ημέρες 0, 1 και 5 συγκριτικά με τον μάρτυρα και της Hsp70 βρέθηκε αυξημένο τις μέρες 0-12. Στους 26,5°C καταγράφηκε ακόμα μεγαλύτερη θνησιμότητα (62,3%) με κορύφωση μετά τη 10η μέρα. Η Hsp22 εμφάνισε αυξημένη έκφραση τις μέρες 1 και 12 και η Hsp70 τις μέρες 0, 1, 3 και 12 ενώ τη μέρα 5 τα επίπεδά της δεύτερης ήταν χαμηλότερα και από του μάρτυρα (Εικόνα 1). Στους 26,5°C την ημέρα 12 και τα δύο γονίδια εμφάνισαν αυξημένη έκφραση, ενώ τις πρώτες 5 μέρες που παρατηρήθηκε παρόμοια θνησιμότητα με τους 24,5 °C η έκφραση των γονιδίων είναι είτε στα επίπεδα του μάρτυρα είτε αυξημένα συγκριτικά με του μάρτυρα, όμως μειωμένα συγκριτικά με τους 24,5 °C.

Πίνακας 2: Ποσοστά θνησιμότητας

	Ημέρα			
Θερμοκρασία	0	5	10	21
18°C	0%	0%	0%	2,60%
22,5°C	0%	14,80%	14,80%	16,10%
24,5°C	0%	14,40%	24,30%	33,00%
26,5°C	0%	18,80%	26,40%	62,30%



Εικόνα 1. Έκφραση γονιδίων hsp22 και hsp70 στο μανδύα του διθύρου *Ruditapes decussatus* στις διαφορετικές θερμοκρασίες. Οι αστερίσκοι (*) υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με τον μάρτυρα (18°C).

Συμπεράσματα

Η τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης είναι από τις πιο ταχείες και ευαίσθητες αποκρίσεις ενάντια σε καταστάσεις καταπόνησης (Zippay & Hofmann 2010). Με βάση τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η αρχική απόκριση του *Ruditapes decussatus* είναι έντονη στους 22,5°C, σε συμφωνία με την υψηλή θνησιμότητα (14,8%) και την αυξημένη έκφραση των δύο γονιδίων τις πρώτες πέντε μέρες, ωστόσο φαίνεται οτι έπειτα προσαρμόζεται σε αυτές τις συνθήκες παρουσιάζοντας μηδενικές θνησιμότητες τις επόμενες 16 ημέρες. Η έκθεση στους 24,5°C οδηγεί σε σταθερά ποσοστά θνησιμότητας που έφτασαν το 33%. Η καταπόνηση παρουσιάζεται σταθερά έντονη τις πρώτες 12 μέρες, όπως φαίνεται από την hsp70 και από τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της hsp22 τις μέρες 0, 1 και 5. Η έκθεση στους 26,5°C οδήγησε σε μεγάλη θνησιμότητα (62,3%), κυρίως από τη μέρα 10 και έπειτα. Οι Velez et al. (2017) παρατήρησαν στους 21°C στο *Ruditapes decussatus* μηδενική θνησιμότητα αλλά παράλληλα, καταστροφή των μεμβρανών λόγω αναποτελεσματικότητας των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Παραδόξως, στην ίδια εργασία, στους 25°C το είδος εμφανίστηκε ανθεκτικό (σε 28 ημέρες, 7%

θνησιμότητα), επιστρατεύοντας μηχανισμούς απόκρισης όπως το παρατεταμένο κλείσιμο των θυρίδων. Φαίνεται ότι η έκθεση στην θερμοκρασία των 26,5°C οδηγεί αρχικά σε ήπια απόκριση και συμπεριφορικές αλλαγές για τη διατήρηση της ομοιόστασης, όμως η παρατεταμένη καταπόνηση οδηγεί σε διαταραχή των ομοιστατικών μηχανισμών και μεγάλες θνησιμότητες.

Ενδεικτική βιβλιογραφία

Anestis, A., Pörtner, H. O., Lazou, A. & Michaelidis, B. (2008). Metabolic and molecular stress responses of sublittoral bearded horse mussel *Modiolus barbatus* to warming sea water: implications for vertical zonation. Journal of Experimental Biology, 211, 2889-2898.

FAO (2016). Species Fact Sheets: *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758). In http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/ Ruditapes_decussatus/en, vol. 2.

Hoegh-Guldberg, O., Cai, R., Poloczanska, E., Brewer, P. G., Sundby, S., Hilmi, K., Fabry, V. J. & Jung, S. (2014) The Ocean in Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. In Part B: Regional Aspects, 1655-1731. Cambridge: Cambridge University Press.

Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. Methods, 25, 402–408.

Moreira, R., Balseiro, P., Romero, A., Dios, S., Posada, D., Novoa, B., & Figueras, A. (2012). Gene expression analysis of clams *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus* following bacterial infection yields molecular insights into pathogen resistance and immunity. Developmental & Comparative Immunology, 36, 140-149.

Schiedek, D., Sundelin, B., Readman, J. W. & Macdonald, R. W. (2007). Interactions between climate change and contaminants. Marine pollution bulletin, 54, 1845-1856.

Velez, C., Figueira, E., Soares, A. M. & Freitas, R. (2017). Effects of seawater temperature increase on economically relevant native and introduced clam species. Marine environmental research, 123, 62-70.

Wijsman, J. W. M., Troost, K., Fang, J. & Roncarati, A. (2019). Global production of marine bivalves. Trends and challenges. In Goods and Services of Marine Bivalves, 7-26. Cham: Springer.

Zippay, M. L. & Hofmann, G. E. (2010). Effect of pH on gene expression and thermal tolerance of early life history stages of red abalone (*Haliotis rufescens*). Journal of Shellfish Research, 29, 429-439.

Η ερευνητική εργασία υποστηρίχτηκε από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ.) στο πλαίσιο της «3ης Προκήρυξης ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ. για Υποψήφιους/ες Διδάκτορες» (Αριθμός Αίτησης Υποτροφίας: 6050)

Γενετική ταυτοποίηση του περιεχομένου εμπορικών εντομοάλευρων

ΜΟΥΛΙΣΤΑΝΟΣ Αριστοτέλης[1,2], ΚΑΡΑΪΣΚΟΥ Νικολέττα[1,2], ΓΚΑΓΚΑΒΟΥΖΗΣ Κωνσταντίνος[1,2], ΜΗΝΟΥΔΗ Στυλιανή[1,2], ΙΩΑΝΝΙΔΟΥ Χρύσα[1], ΠΑΝΤΕΛΗ Νικόλας[1], ΖΩΓΡΑΦΟΥ Στυλιανή[3], ΚΩΤΟΥΖΑΣ Δημήτρης[4], ΚΟΝΤΟΔΗΜΑΣ Δημήτρης[4], ΔΡΟΣΟΠΟΥΛΟΥ Ελένη[1], ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ Ευθυμία[1], ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΙΔΗΣ Αλέξανδρος[1,2]

[1]Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, email: amoulist@bio.auth.gr, nikolbio@bio.auth.gr, gagavou@bio.auth.gr, sminoudi@bio.auth.gr, xrusaioann@gmail.com, nkpanteli@bio.auth.gr, edrosopo@bio.auth.gr, eantono@bio.auth.gr, atriant@bio.auth.gr.
[2]Genomics and Epigenomics Translational Research (GENeTres), Κέντρο Διεπιστημονικής Έρευνας και Καινοτομίας (ΚΕΔΕΚ-ΑΠΘ), Balkan Center, Θεσσαλονίκη.
[3]Τμήμα Ανθρωπιστικών, Κοινωνικών και Οικονομικών Επιστημών, Διεθνές Πανεπιστήμιο της Ελλάδος, email: s.zografou@ihu.gr.
[4]Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, email:d.kotouzas@bpi.gr, d.kontodimas@bpi.gr.

Περίληψη
Τα έντομα προτείνονται ως εναλλακτική πηγή πρωτεϊνών ή/και λιπιδίων σε ζωοτροφές και τρόφιμα. Για τη μέγιστη ασφάλεια και αποτελεσματικότητα των τροφών που περιέχουν έντομα, απαιτείται ο έλεγχος της ποιοτικής τους σύνθεσης. Σκοπός της μελέτης είναι η γενετική ανάλυση της σύνθεσης εμπορικώς διαθέσιμων εντομοάλευρων, σε επίπεδο είδους. Μετά την ανάλυση δειγμάτων προνυμφών και ενηλίκων ατόμων, επιλέχθηκε τμήμα του μιτοχονδριακού γονιδίου COI για τη γενετική ταυτοποίηση των ειδών που περιέχονται σε εντομοάλευρα. Από τις αναλύσεις των προνυμφών εντοπίστηκαν ασυμφωνίες μεταξύ της μορφολογικής και γενετικής ταυτοποίησης. Πέρα από το αναμενόμενο είδος εντόμου δεν εντοπίστηκε άλλο είδος ζωικού οργανισμού στα εμπορικώς διαθέσιμα εντομοάλευρα που μελετήθηκαν. Ωστόσο, σε ένα άλευρο από ερευνητική εκτροφή ανιχνεύθηκαν είδη μυκήτων. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν δύο προβλήματα που χρήζουν ιδιαίτερης προσοχής: i) την πιθανή λανθασμένη μορφολογική ταυτοποίηση των εντόμων πριν από την εκτροφή τους και ii) την ανάγκη σωστής συντήρησης και επεξεργασίας τους.

Λέξεις-κλειδιά
εντομοάλευρα, γονίδιο COI, κλωνοποίηση, colony PCR

Εισαγωγή

Τα εντομοάλευρα μελετώνται όλο και περισσότερο ως εναλλακτική πηγή πρωτεΐνης ή/και λιπιδίων σε τρόφιμα και ζωοτροφές (Rumbos et al. 2021). Έχει δειχθεί για παράδειγμα, ότι διαφορετικά είδη εντόμων επηρεάζουν διαφορετικά το κάθε είδος ψαριού σε ιχθυοκαλλιέργειες (Fabrikov et al. 2020, Mastoraki et al. 2020, 2022). Η χρήση ειδών εντόμων που δεν έχουν εγκριθεί ως κατάλληλα για να συμπεριληφθούν σε ζωοτροφές εγείρει ανησυχίες, λόγω κυρίως της έλλειψης δεδομένων σχετικά με την ασφάλεια και τη θρεπτική τους αξία (Debode et al. 2017).

Η εφαρμογή μεθόδων γενετικής ανάλυσης στις ζωοτροφές είναι ένας καινοτόμος και αξιόπιστος τρόπος ανίχνευσης των ειδών που περιέχονται σε αυτές. Παράδειγμα εφαρμογής γενετικής ανάλυσης στην ανίχνευση εντόμων σε τρόφιμα και ζωοτροφές είναι η μέθοδος PCR σε πραγματικό χρόνο, η οποία έχει δοκιμαστεί με επιτυχία για τον εντοπισμό των ειδών *Tenebrio molitor* (Debode et al. 2017) και *Hermetia illucens* (Marien et al. 2018). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε μια μη στοχευμένη προσέγγιση, η κλωνοποίηση, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην ανάλυση τόσο εντομοάλευρων όσο και ιχθυάλευρων (Garino, Zagon & Braeuning 2019; Vlachavas et al. 2019) και επιτρέπει την ποιοτική ανάλυση της σύνθεσης των προιόντων σε επίπεδο είδους, με στόχο τη διασφάλιση της ποιότητας τους.

Μέθοδοι

Σε δείγματα προνυμφών και ενήλικων ατόμων από τα είδη *Hermetia illucens*, *Musca domestica* και

Tenebrio molitor (Πίνακας 1) αναλύθηκαν τμήματα των γονιδίων COI και 16S rRNA, με σκοπό να επιλεγεί ο κατάλληλος δείκτης για την ταυτοποίηση των εντόμων. Η πειραματική διαδικασία περιλάμβανε:

1. Απομόνωση DNA
2. Ενίσχυση τμημάτων DNA με PCR
3. Αλληλούχιση
4. Ταυτοποίηση αλληλουχιών με τη βοήθεια βάσης δεδομένων (NCBI)

Η περιοχή που επιλέχθηκε από την παραπάνω διαδικασία χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση οκτώ εμπορικώς διαθέσιμων εντομοάλευρων, καθώς και ενός αλεύρου προερχόμενου από ερευνητική εκτροφή. Η κύρια πειραματική διαδικασία ανάλυσης εντομοάλευρων, περιλάμβανε:

1. Απολίπανση δειγμάτων
2. Απομόνωση DNA
3. Ενίσχυση επιλεγμένης περιοχής του mtDNA με PCR
4. Καθαρισμός PCR προϊόντων
5. Κλωνοποίηση PCR προϊόντων
6. Επιλογή μετασχηματισμένων κλώνων (50 κλώνοι/δείγμα)
7. Ενίσχυση των ενθεμάτων DNA επιλεγμένων κλώνων με πλασμιδιακούς εκκινητές με colony PCR
8. Αλληλούχιση
9. Ταυτοποίηση αλληλουχιών με τη βοήθεια βάσης δεδομένων (NCBI)

Αποτελέσματα

Από την ανάλυση των προνυμφών και των ενήλικων ατόμων, ένα τμήμα 650 βάσεων του γονιδίου COI κρίθηκε ως το πλέον κατάλληλο για την ταυτοποίηση ειδών εντόμων. Το τμήμα αυτό αποτελεί έναν βασικό μοριακό δείκτη στην ταυτοποίηση ζωικών ειδών και χρησιμοποιείται ευρέως σε εργασίες ταυτοποίησης ειδών εντόμων.

Από αυτή την διαδικασία προέκυψε πως οι προνύμφες που αναφερόταν ως *Musca domestica* ταυτοποιήθηκαν γενετικά ως *Muscina stabulans*. Για την περαιτέρω διερεύνηση αυτής της ασυμφωνίας κρίθηκε απαραίτητη η εκ νέου συλλογή και εκτροφή δειγμάτων *Musca domestica* και *Muscina stabulans*. Από τις νέες εκτροφές, αναλύθηκαν ενήλικα άτομα και διαπιστώθηκε συμφωνία μορφολογικής και γενετικής ταυτοποίησης για το *Musca domestica* αλλά όχι για το *Muscina stabulans*, όπου γενετικά ταυτοποιήθηκε ως *Sarcophaga africa*. Στις προνύμφες των *Hermetia illucens* και *Tenebrio molitor* η μορφολογική και γενετική ταυτοποίηση ήταν σε συμφωνία σε όλα δείγματα.

Από την ανάλυση της σύστασης των εντομοάλευρων, διαπιστώθηκε πως στα 8 εμπορικά διαθέσιμα εντομοάλευρα (ΕΑ 1-8), δεν εντοπίστηκε κανένα άλλο είδος εκτός από το αναμενόμενο. Στο εντομοάλευρο ΕΑ 9 που προερχόταν από ερευνητική εκτροφή, 55,9% των αλληλουχιών ταυτοποιήθηκαν ως *Tenebrio molitor* και οι υπόλοιπες βρέθηκαν να ανήκουν σε είδη μυκήτων (*Candida* sp. και *Millerozyma farinosa*) (Πίνακας 1). Η απουσία επεξεργασίας κατά την παραγωγή του συγκεκριμένου άλευρου φαίνεται να ευνόησε την ανάπτυξη μυκήτων, καθώς τόσο η *Millerozyma farinosa* όσο και είδη του γένους *Candida* είναι συμβιωτικά των εντόμων (Dossey, Tatum & McGill 2016, Stefanini 2018).

Συμπεράσματα

Με την παραπάνω μεθοδολογία διαπιστώθηκε η μη ύπαρξη νοθείας από άλλα είδη εντόμων ή ζωικών οργανισμών στα εμπορικώς διαθέσιμα άλευρα που μελετήθηκαν. Παράλληλα, αναδείχθηκαν η αδυναμία σε ορισμένες περιπτώσεις επιτυχούς μορφολογικής ταυτοποίησης των εντόμων, καθώς και η ανάγκη σωστής συντήρησης και επεξεργασίας των προϊόντων τους, παράγοντες που καθορίζουν την ποιότητα και την ασφάλεια των ζωοτροφών και τροφίμων γενικότερα.

Πίνακας 1: Αποτελέσματα γενετικής ταυτοποίησης των μελετούμενων εντομοάλευρων. (ΕΑ: εντομοάλευρο)

ΕΑ	Τύπος επεξεργασίας	Αναφερόμενη σύσταση	Αριθμός αλληλουχιών	Είδη που εντοπίστηκαν με τη γενετική ανάλυση
ΕΑ 1	Απολίπανση	*Hermetia illucens*	45	*Hermetia illucens*
ΕΑ 2		*Hermetia illucens*	49	*Hermetia illucens*
ΕΑ 3		*Hermetia illucens*	41	*Hermetia illucens*
ΕΑ 4		*Hermetia illucens*	42	*Hermetia illucens*
ΕΑ 5		*Hermetia illucens*	46	*Hermetia illucens*
ΕΑ 6	Αποξήρανση	*Musca domestica*	47	*Musca domestica*
ΕΑ 7		*Musca domestica*	43	*Musca domestica*
ΕΑ 8	Λυοφιλοποίηση	*Tenebrio molitor*	20	*Tenebrio molitor*
ΕΑ 9	-	*Tenebrio molitor*	19	*Tenebrio molitor*
			13	*Millerozyma farinosa*
			2	*Candida sp.*

Βιβλιογραφία

Debode F., et al. (2017). Development of Real-Time PCR tests for the detection of *Tenebrio molitor* in food and feed. *Food Additives and Contaminants*, 34, 1421–26.

Dossey A. T., Tatum J. T. & McGill W. L. (2016). *Insects as Sustainable Food Ingredients.* USA: Academic Press.

Fabrikov D., et al. (2020). Comparative study of growth performance and amino acid catabolism in *Oncorhynchus mykiss*, *Tinca tinca* and *Sparus aurata* and the catabolic changes in response to insect meal inclusion in the diet. *Aquaculture*, 529, 735731.

Garino C., Zagon J. & Braeuning A. (2019). Insects in food and feed – Allergenicity risk assessment and analytical detection. *EFSA Journal*, 17, e170907.

Marien A., et al. (2018) Detection of *Hermetia illucens* by Real-Time PCR. *Journal of Insects as Food and Feed*, 4, 115–22.

Mastoraki M., et al. (2020) A comparative study on the effect of fish meal substitution with three different insect meals on growth, body composition and metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*, 528, 735511.

Mastoraki M., et al. (2022) Insect meals in feeds for juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*): Effects on growth, blood chemistry, hepatic metabolic enzymes, body composition and nutrient utilization. *Aquaculture*, 561, 738674.

Rumbos C. I., et al. (2021). Insect-Based Feed Ingredients for Aquaculture: A case study for their acceptance in Greece. *Insects*, 12, 586.

Stefanini I., (2018). Yeast - Insect Associations : It takes guts. 35, 315–30.

Vlachavas A., et al. (2019). Using genetic methods for analysis of fish meals and feeds employed in Greek mariculture. *Aquaculture Research*, 50, 312–22.

Ευχαριστίες

Το έργο χρηματοδοτήθηκε εν μέρει από το ΕΠΑνΕΚ (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης της Ευρωπαϊκής Ένωσης και από εθνικούς πόρους) και υλοποιείται μέσω της Γενικής Γραμματείας Έρευνας και Καινοτομίας (ΓΓΕΚ) στα πλαίσια του ερευνητικό έργου Τ6ΥΒΠ-00174 «Τα εντομοάλευρα ως εναλλακτική πηγή πρωτεϊνών στα σιτηρέσια των εκτρεφόμενων ιχθύων (Entomo4Fish)».

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα και η φυλογενετική ταξινόμηση της καραβίδας εσωτερικών υδάτων Pontastacus leptodactylus από την Ελλάδα

ΑΛΒΑΝΟΥ Β. Μαρία[1], ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ Κ. Δημήτρης[2], ΛΑΤΤΟΣ Αθανάσιος[2], ΦΕΙΔΑΝΤΣΗΣ Κωνσταντίνος[2], ΜΑΚΡΗ Βασιλική[2], ΜΙΧΑΗΛΙΔΗΣ Βασίλειος[2], ΑΠΟΣΤΟΛΙΔΗΣ Απόστολος[3], ΓΙΑΝΤΣΗΣ Α. Ιωάννης[1]

[1]*Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Μακεδονίας,* mariaalvanou7@gmail.com, igiantsis@uowm.gr
[2]*Σχολή Θετικών Επιστημών, ΑΠΘ,* dkpapado@bio.auth.gr, lattosad@bio.auth.gr, kfeidant@bio.auth.gr, makrivasil@bio.auth.gr, michaeli@bio.auth.gr
[3]*Σχολή Γεωπονίας, Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος, ΑΠΘ,* apaposto@agro.auth.gr

Περίληψη
Στην παρούσα εργασία περιγράφεται το μιτοχονδριακό γονιδίωμα της καραβίδας εσωτερικών υδάτων *Pontastacus leptodactylus* από την Ελλάδα για πρώτη φορά, χρησιμοποιώντας 14 ζεύγη εκκινητών που σχεδιάστηκαν βάσει αλληλουχιών συγγενικών ειδών. Το κωδικό τμήμα του μιτοχονδριακού γονιδιώματος του *P. leptodactylus* που αναλύθηκε αποτελείται από 14.282 ζεύγη βάσεων στις οποίες συμπεριλαμβάνονται 13 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, 1 ριβοσωμικό γονίδιο και 13 μεταφορικά RNA (tRNA). Με βάση ολόκληρη την αλληλουχία του μιτοχονδριακού γονιδιώματος σε σύγκριση με άλλες αλληλουχίες από συγγενικά είδη από τη βάση δεδομένων GenBank, κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο που απεικονίζει τις φυλογενετικές σχέσεις του *P. leptodactylus* σε σχέση με άλλα είδη της οικογένειας Astacidae. Από τις μεταξύ τους σχέσεις προκύπτει πως η γενετική απόσταση μεταξύ *Astacus astacus* και *P. leptodactylus* φαίνεται μικρότερη συγκριτικά με την απόσταση των *Austropotamobius pallipes* και *Austropotamobius torrentium* παρόλο που τα τελευταία έχουν ταξινομηθεί εντός του ίδιου γένους.

Λέξεις Κλειδιά
καραβίδα, *Pontastacus leptodactylus*, μιτοχονδριακό γονιδίωμα

Εισαγωγή
Στην Ελλάδα εντοπίζονται τέσσερα είδη καραβίδας των εσωτερικών υδάτων. Πιο συγκεκριμένα, τρία αυτόχθονα (*Astacus astacus*, *Pontastacus leptodactylus*, *Austropotamobius torrentium)* και ένα ξενικό (*Pacifastacus leniusculus).* Προηγούμενες μελέτες που αφορούν την εξάπλωση των συγκεκριμένων ειδών αναφέρουν πως το *Pontastacus leptodactylus* προέρχεται από την περιοχή του Έβρου (Perdikaris et al. 2017, Laggis et al. 2017). Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια λόγω της υψηλής αξίας του συγκεκριμένου είδους έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μεταφορές και εισαγωγές πληθυσμών σε ενδιαιτήματα όπου δεν προϋπήρχε. Σε αυτές τις περιπτώσεις συγκαταλέγονται και οι λίμνες Βεγορίτιδα και Βόλβη όπου το *P. leptodactylus* καταγράφηκε πρόσφατα (Alvanou et al. 2022). Οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των πληθυσμών του συγκεκριμένου είδους δεν είναι απολύτως ξεκάθαρες, με αποτέλεσμα να υπάρχουν διαφωνίες σχετικά με τη συστηματική του ταξινόμηση. Η παραπάνω κατάσταση αντικατοπτρίζεται στην πληθώρα διαφορετικών ονομασιών που έχει λάβει κατά καιρούς όπως *Pontastacus leptodactylus*, *Astacus leptodactylus* ή ως σύμπλεγμα ειδών *Astacus leptodactylus*-complex (Karaman 1963, Strarobogatov 1995, Souty-Grosset et al. 2006, Śmietana et al. 2006, Kostyuk, Garbar & Mezhzherin 2013, Crandall & De Grave 2017). Η πλέον επικρατέστερη κατάταξη του σε επίπεδο γένους είναι το *Pontastacus leptodactylus* (Crandall & De Grave 2017). Αξίζει ωστόσο να αναφερθεί πως οι παραπάνω μελέτες βασίζονται σε συγκεκριμένα μιτοχονδριακά γονίδια. Επομένως στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ανάλυση ολόκληρου του μιτοχονδιακού γονιδιώματος του συγκεκριμένου είδους σε μια περαιτέρω προσπάθεια αποσαφήνισης της συστηματικής του ταξινόμησης.

Μέθοδοι
Δείγματα *P. leptodactylus* συλλέχθηκαν από τη λίμνη Βεγορίτιδα από πληθυσμό που έχει μεταφερθεί και εγκαθιδρυθεί στην περιοχή. Σαράντα mg μυϊκού ιστό της ουράς χρησιμοποιήθηκαν για απομόνωση

DNA με τη χρήση του εμπορικού kit Nucleospin tissue (Machenery Nagel). Σχεδιάστηκαν 14 ζεύγη εκκινητών (Πίνακας 1) βάσει κατατεθειμένων αλληλουχιών της οικογένειας Astacidae στη βάση γενετικών δεδομένων GenBank.

Πίνακας 2: Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την αλληλούχηση του γονιδιώματος

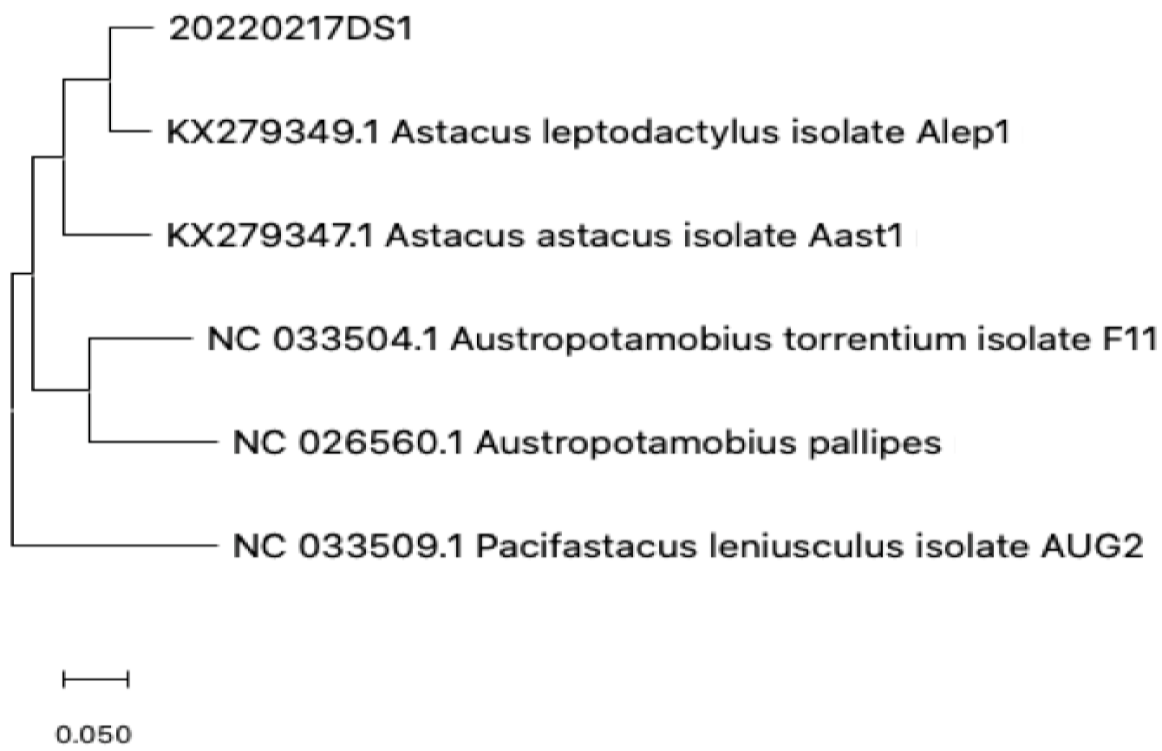
Όνομα	Αλληλουχία	Θερμοκρασία υβριδισμού (°C)
MtAst1F	5' CAAATCATAAAGATATTGGAAC 3'	49
MtAst1R	5' AATGTTGRGGRAAGAATGT 3'	
MtAst2F	5' CAGTKGGRGGTTTAACAGGAG 3'	54
MtAst2R	5' GTTATCRRGTGATTATTCTGAAC 3'	
MtAst3F	5' CATTCTTGAACTGTACCTTC 3'	52
MtAst3R	5' CTACTAAATGATATGCATGGTG 3'	
MtAst4.2F	5' GCTGTTGCAATTATTCAGTC 3'	50
MtAst4.2R	5' CCAAAGGTATAAGAAGMGTA 3'	
MtAst6F	5' GAATTTAACCGCTCAAGAAC 3'	52
MtAst6R	5' CCTAACTATTTCTCTTCCGAG 3'	
MtAst7F	5' AGCATCTCATTTACACCGA 3'	51
MtAst7R	5' ABTCBAACATGTCTAAGCATC 3'	
MtAst8F	5' TACTTTAGGGATAACAGCGTA 3'	52
MtAst8R	5' GGTCAAATTCTTTCACTCCT 3'	
MtAst9F	5' TACCTCGGTTTCGTTATGA 3'	51
MtAst9R	5' ATACYCCYAATATTGAATCAG 3'	
MtAst10F	5' GACCTCARGGTAAGACATATC 3'	54
MtAst10R	5' TCTCTCCCTAAYTGATTTCC 3'	
MtAst11F	5' GTCCGCTCRCARGGTAATG 3'	51
MtAst11R	5' AAAGGAAGYCAATGAAGAC 3'	
MtAst12F	5' GTCATGGTTTATGTTCATCTG 3'	52
MtAst12R	5' ACTCAAAATTAGCTCCRAGC 3'	
MtAst13F	5' CGTGTCRGCATTAGTACATTC 3'	54
MtAst13R	5' CCCCAAAYCAAGAATTTGAAG 3'	
MtAst14F	5' CTACATTGAAGCTGTAGAAGAG 3'	51
MtAst14R	5' TTTGACAACTTTGAAGGATG 3'	
MtAst15F	5' TCAGCAGGCCTATCATTT 3'	51
MtAst15R	5' CAAAAGCATGAGCAGTTACTAC 3'	

Ακολούθησε η ενίσχυση των τμημάτων με PCR σε αντιδράσεις συνολικού όγκου 20 μl που περιείχαν 10 μl FastGene Taq 2x Ready Mix (NIPPON Genetics, Europe), 0,3 pmol από τον κάθε εκκινητή και νερό μέχρι τον τελικό όγκο. Οι συνθήκες της κάθε αντίδρασης ήταν 95°C για 3 min, 94°C για 30 sec, θερμοκρασία υβριδισμού (Πίνακας 1) για 40 sec, 72°C για 50 sec και τελικό στάδιο ενίσχυσης στους 72°C για 5 min. Μετά τον καθαρισμό των προϊόντων PCR με τη χρήση του εμπορικού kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (MAcherey-Nagel), τα καθαρισμένα προϊόντα αλληλουχήθηκαν με τη μέθοδο Sanger με χρήση τόσο του forward όσο και του reverse εκκινητή. Τέλος με τη χρήση του προγράμματος MEGAX (Kumar et al. 2018) τα αποτελέσματα της αλληλούχησης στοιχήθηκαν χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο ClustalW και δημιουργήθηκε φυλογενετικό δέντρο Maximum Likelihood (ML) σε σύγκριση με άλλες 5 αλληλουχίες που ανακτήθηκαν από GenBank (NC_033509.1, NC_033504.1, NC_026560.1, KX279349.1, KX279347.1).

Αποτελέσματα

Με βάση τα αποτελέσματα της αλληλούχησης προέκυψε πως το κωδικό μέρος του μιτοχονδριακού γονιδιώματος του *P. leptodactylus* (20220217DS1) αποτελείται από 14.282 ζεύγη βάσεων ενώ η μη

κωδική περιοχή ελέγχου υπολογίζεται πως ανέρχεται περίπου στα 1500 ζεύγη βάσεων. Οι φυλογενετικές σχέσεις του *P. leptodactylus* σε σύγκριση με άλλα είδη της οικογένειας απεικονίζονται στο δενδρόγραμμα Maximul Likelihood (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Φυλογενετικό δέντρο ML που απεικονίζει τις φυλογενετικές σχέσεις του απλοτύπου από την Ελλάδα με τα είδη *Pontastacus leptodactylus*, *Astacus astacus*, *Austropotamobius torrentium*, *Austropotamobius pallipes* και *Pacifastacus leniusculus*.

Συζήτηση

Το *P. leptodactylus* αποτελεί ένα είδος μη επιβεβαιωμένης συστηματικής ταξινόμησης λόγω της ευρείας εξάπλωσής του αλλά και λόγω των διαφορετικών μορφολογικών χαρακτηριστικών του. Στην Ελλάδα τις τελευταίες δεκαετίες έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μεταφορές του είδους από τον άνθρωπο σε νέα ενδιαιτήματα, όπου και έχουν εγκαθιδρύσει πληθυσμούς. Η παρούσα μελέτη αφορά την πρώτη προσπάθεια αλληλούχησης του μιτοχονδριακού γονιδιώματός του στην Ελλάδα όπως επίσης και την πρώτη προσπάθεια φυλογενετικού χαρακτηρισμού του βάσει ολόκληρου του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Παρατηρήθηκε πως το *P. leptodactylus* βρίσκεται πιο κοντά γενετικά στο *Astacus astacus*, και μάλιστα με μικρότερη γενετική απόσταση συγκριτικά με αυτή των *Austropotamobius torrentium* και *Austropotamobius pallipes* τα οποία και ανήκουν στο ίδιο γένος. Επιπροσθέτως, παρατηρήθηκε πως η γενετική απόσταση μεταξύ του δείγματος που αναλύθηκε και της κατατεθειμένης ακολουθίας στη GenBank (KX279349.1) ήταν αρκετά σημαντική παρόλο που τα άτομα ανήκουν στο ίδιο είδος.

Βιβλιογραφία

Alvanou, M. V., Papadopoulos, D. K., Lattos, A., Georgoulis, I., Feidantsis, K., Apostolidis, A. P., Michaelidis, B. & Giantsis, I. A. (2022). Biology, distribution, conservation status and stocking perspective of freshwater crayfish in Greece: An updated review. *Aquaculture Research*, 53, 5115–5128.

Crandall, K. A. & De Grave, S. (2017). An updated classification of the freshwater crayfishes

(Decapoda: Astacidea) of the world, with a complete species list. *Journal of Crustacean Biology*, 37, 615-653.

Karaman M.S., (1963). Studie der Astacidae (Crustacea, Decapoda) II. Teil. *Hydrobiologia* 22, 111–132.

Kostyuk, V. S., Garbar A. V. & Mezhzherin S. V. (2013). Karyotypes and morphological variability of crayfish Pontastacus leptodactylus and P. angulosus (Malacostraca, Decapoda). *Vestnik Zoologii*, 47, 11–16.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547-1549.

Laggis, A., Baxevanis, A. D., Charalampidou, A., Maniatsi, S., Triantafyllidis, A. & Abatzopoulos, T. J. (2017). Microevolution of the noble crayfish (Astacus astacus) in the Southern Balkan Peninsula. *BMC evolutionary biology*, 1717, 1-19.

Perdikaris, C., Konstantinidis, E., Georgiadis, C. & Kouba, A. (2017). Freshwater crayfish distribution update and maps for Greece: combining literature and citizen-science data. *Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems*, 418, 51.

Śmietana, P., Schuz, H. K., Keszka, S., Schulz, R., Schulz, H. K., Keszka, S. & Schulz, R. (2006). A proposal for accepting Pontastacus as a genus of European crayfish within the family Astacidae based on a revision of the West and East European taxonomic literature. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 380–381, 1041–1052.

Souty-Grosset, C., Holdich, D. M., Noël P. V. & Haffner, P. (2006). *Atlas of crayfish in Europe*. Paris: Muséum Nationale d'Histoire Naturelle.

Strarobogatov Y. I., (1995). Taxonomy and geographical distribution of crayfishes of Asia and East Europe (Crustacea Decapoda Astacoidei). *Arthropoda Selecta*, 4, 3–25.

Αποτίμηση του βακτηριακού προφίλ σε ιχθυοκαλλιέργειες με τη χρήση γονιδιωματικών τεχνολογιών

ΚΥΡΙΤΣΗ Μαρία[1], ΤΣΟΥΡΕΚΗ Αντιόπη[1], ΚΟΥΚΑΡΑΣ Κωνσταντίνος[1], ΜΙΧΑΗΛΙΔΟΥ Σοφία[1], ΚΡΕΗ Γρηγόρης[2], ΑΡΓΥΡΙΟΥ Αναγνώστης[1,3]

1. Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών, ΕΚΕΤΑ, kyritsimaria@certh.gr, atsoureki@certh.gr, kkoukaras@certh.gr, sofia_micha28@certh.gr, argiriou@certh.gr
2.Ινστιτούτο Αλιευτικής Έρευνας, ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ, krey@inale.gr
3. Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, argiriou@certh.gr

Περίληψη
Οι πρόσφατες τεχνολογικές εξελίξεις στην Αλληλούχηση Επόμενης Γενιάς (NGS) και στον προσδιορισμό της αλληλουχίας συγκεκριμένων περιοχών γονιδίων-στόχων, όπως το γονίδιο 16S rRNA, έχουν συμβάλει σημαντικά στην αξιολόγηση των βακτηριακών κοινοτήτων. Στόχος της συγκεκριμένης έρευνας είναι η αξιολόγηση των βακτηρίων θαλάσσιου οικοσυστήματος ιχθυοκαλλιεργειών, χρησιμοποιώντας γονιδιωματικές τεχνολογίες. Η αλληλούχηση των υπερμεταβλητών περιοχών V3 – V4 του γονιδίου 16S rRNA χρησιμοποιήθηκε σε 100 δείγματα νερού, που συλλέγονταν μηνιαίως για ένα έτος από ιχθυοκαλλιέργειες. Η ανάλυση αποκάλυψε τις εποχικές μεταβολές των βακτηρίων, με τους μεγαλύτερους αριθμούς ειδών να εμφανίζονται τη χειμερινή περίοδο.

Λέξεις-κλειδιά
Ασθένειες ψαριών, Βακτηριακό προφίλ, υδατοκαλλιέργειες, μεταγονιδιωματική, 16S rRNA

Εισαγωγή

Η χρήση μοριακών μεθόδων έχει συμβάλει σημαντικά στη μελέτη των βακτηρίων (Nisiotou et al 2014). Με τη χρήση τεχνολογίας αλληλούχησης 2^{ης} γενιάς μπορούν να ληφθούν χιλιάδες αλληλουχίες σε σύντομο χρονικό διάστημα και με χαμηλό κόστος. Οι εν λόγω αναλύσεις βασίζονται στην αλληλούχηση περιοχών, όπως το γονίδιο 16S rRNA και συμβάλουν στην αξιολόγηση των οικολογικών χαρακτηριστικών είτε ολόκληρων βακτηριακών κοινοτήτων είτε μεμονωμένων οργανισμών (Caporaso et al 2011).

Οι υδατοκαλλιέργειες αναμένεται να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην εξασφάλιση αλιευμάτων τα επόμενα χρόνια. Ήδη στη Χώρα μας, το 61% της εγχώριας παραγωγής αλιευμάτων προήλθε το 2019 από την υδατοκαλλιέργεια και το υπόλοιπο 39% από την αλιεία (FAO 2020). Παράλληλα είναι ένας από τους κλάδους που θα επηρεαστεί από την κλιματική αλλαγή, με έξαρση ασθενειών (Cascarano et al 2021, Lafferty et al 2015). Η εφαρμογή της 16S rRNA μεταγονιδιωματικής ανάλυσης επιτρέπει τη γρήγορη και αξιόπιστη ταυτοποίηση των βακτηρίων και μπορεί να συμβάλλει στην πρόληψη των ασθενειών (Avarre 2020).

Σκοπός της έρευνας είναι η αποτίμηση του βακτηριακού προφίλ σε θαλάσσιο οικοσύστημα ιχθυοκαλλιεργειών, ώστε να διερευνηθεί η συχνότητα εμφάνισης ασθενειών σε σχέση με τον βακτηριακό πληθυσμό και να ταυτοποιηθούν οι παθογόνοι παράγοντες με τη χρήση γονιδιωματικών τεχνολογιών.

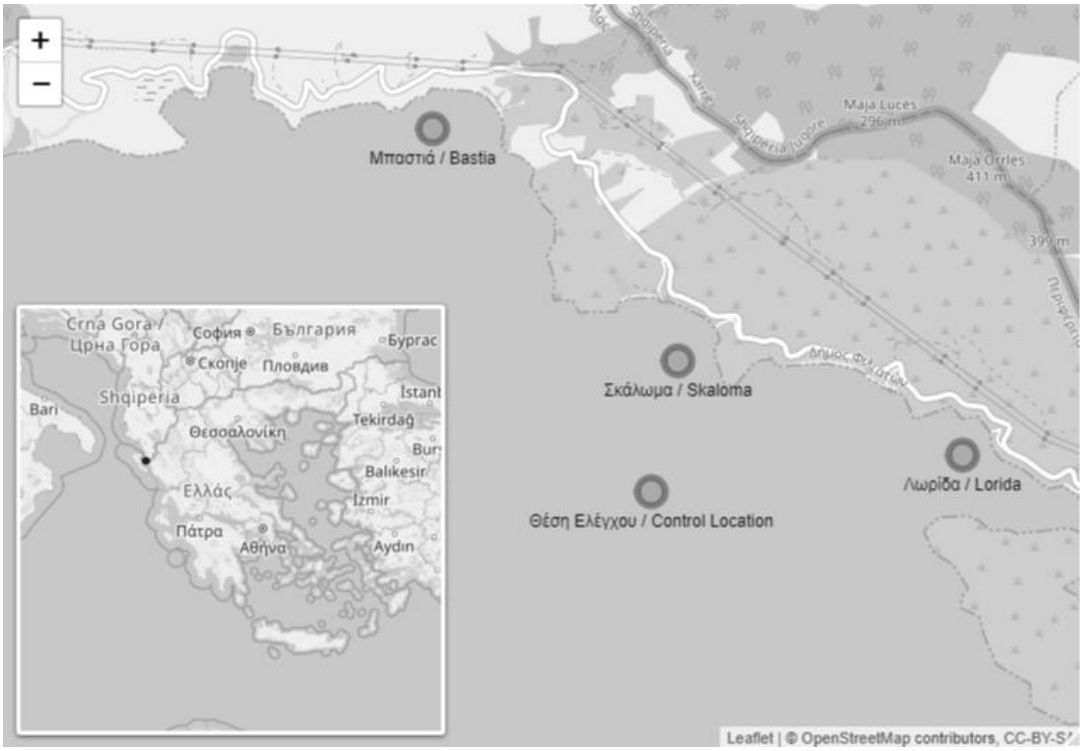
Μεθοδολογία

Την περίοδο Απρίλιος 2020 έως Μάιος 2021, συλλέχθηκαν 100 δείγματα νερού από τέσσερις θέσεις (Ιχθυοκαλλιέργεια Λωρίδας, Σκαλώματος και Μπαστιάς και θέση ελέγχου) στη θαλάσσια περιοχή της Θεσπρωτίας (Εικόνα 1). Τα δείγματα νερού λαμβάνονταν μηνιαίως ή και συχνότερα, με δειγματολήπτη Niskin από δύο σημεία κάθε ιχθυοκαλλιέργειας (αρχή και τέλος). Το κάθε δείγμα νερού (2L) προερχόταν από ομογενοποίηση δύο επιμέρους δειγμάτων (μέση και πυθμένας) της στήλης του νερού.

Στη συνέχεια, 1L από το δείγμα διηθούνταν σε φίλτρο Sterivex GV 0,22 μm, το οποίο διατηρούνταν σε ξηρό πάγο, κατά τη μεταφορά και αποθηκεύονταν στους -80 °C, μέχρι την ανάλυση.

Για την απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιήθηκε το ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit. Για τον προσδιορισμό της βακτηριακής ποικιλότητας κατασκευάστηκαν βιβλιοθήκες με τις υπερμεταβλητές περιοχές V3 – V4 του 16S rRNA, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Illumina "16S Metagenomic Sequencing Library Preparation" (15044223 B). Η αλληλούχηση των βιβλιοθηκών πραγματοποιήθηκε στο σύστημα MiSeq της Illumina, χρησιμοποιώντας το MiSeq reagent kit v3 (2 × 300 κύκλοι).

Η επεξεργασία των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα QIIME2 (Bolyen et al 2019). Για την αποτίμηση του βακτηριακού προφίλ χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος denoising με τον αλγόριθμο DADA2 (Callahan et al 2020) και παρήχθησαν τα ASVs (Amplicon Sequence Variants). Τα ASVs στοιχήθηκαν έναντι της βάσης δεδομένων SILVA (έκδοση 132) και αντιστοιχήθηκαν μέχρι το επίπεδο είδους για κάθε δείγμα νερού.



Εικόνα 1. Χάρτης της θαλάσσιας περιοχής της Θεσπρωτίας με τις θέσεις δειγματοληψίας (Μπαστιά, Σκάλωμα, Λωρίδα, Θέση Ελέγχου).

Αποτελέσματα

Από την αλληλούχηση των 100 βιβλιοθηκών παρήχθησαν συνολικά 5.923.000 αλληλουχίες συζευγμένων άκρων. Από αυτές, με βάση τα κριτήρια της ποιότητας των αλληλουχιών, παρέμειναν 4.247.613 αλληλουχίες για ταξινομική αντιστοίχιση, οι οποίες αντιστοιχήθηκαν σε 2.739 ASVs.

Από το σύνολο των δειγμάτων ανιχνεύτηκαν 419 διαφορετικά βακτήρια προερχόμενα από 482 διαφορετικά γένη και 261 διαφορετικές οικογένειες. Η ανάλυση σε επίπεδο α-ποικιλότητας φανέρωσε την αυξημένη ποικιλότητα ειδών της θέσης ελέγχου συγκριτικά με τις ιχθυοκαλλιέργειες. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η χειμερινή περίοδος παρουσίασε μεγαλύτερο αριθμό βακτηρίων συγκριτικά με τις άλλες περιόδους του έτους. Σύμφωνα με την Μη-μετρική Πολυδιάστατη Κλιμακοποίηση (Non-Metric Multidimensional Scaling - NMDS) (Εικόνα 2), λαμβάνοντας υπόψη τη γενετική συγγένεια του ειδών, προκύπτει μια σαφής εποχική διαφοροποίηση, μεταξύ της θέσης ελέγχου και των ιχθυοκαλλιεργειών

και ότι η κατανομή των βακτηρίων στη διάρκεια του χρόνου ακολουθεί ένα κυκλικό πρότυπο διαδοχής.

Σε επίπεδο Φύλου, η πλειοψηφία των βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν ανήκουν στα Proteobacteria ακολουθούμενη από τα Bacteroidota και Cyanobacteria. Ειδικότερα, σε επίπεδο Οικογένειας παρατηρείται ότι η αφθονία των ειδών της Οικογένειας *Flavobacteriaceae* μειώνεται από τον Ιανουάριο 2021 έως τον Μάρτιο 2021, ενώ στη συνέχεια αυξάνεται απότομα τον Απρίλιο 2021. Επιπλέον, παρατηρείται πως τα μέλη της οικογένειας *Rhodobacteraceae* χαρακτηρίζονται από υψηλότερα ποσοστά αφθονίας τους καλοκαιρινούς και φθινοπωρινούς μήνες. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε ιχθυοκαλλιέργεια λαβρακιού στις ακτές της Αδριατικής θάλασσας (Kolda et al 2020).

Εικόνα 2. Μη-μετρική Πολυδιάστατη Κλιμακοποίηση του βακτηριακού φορτίου στα δείγματα νερού στη διάρκεια του χρόνου (όπου Β: Μπαστιά, S: Σκάλωμα, L: Λωρίδα, C: Θέση Ελέγχου, η αρίθμηση δηλώνει τη δειγματοληψία, Β: θέση δείγματος εντός της μονάδας – Αρχή, Ε: θέση δείγματος εντός της μονάδας – Τέλος).

Συμπεράσματα

Η συσχέτιση των αποτελεσμάτων με βάσεις δεδομένων παθογόνων βακτηρίων (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/organisms/, https://www6.inrae.fr/cirm_eng/Pathogenic-Bacteria, https://globalrph.com/bacteria/) έδειξε την παρουσία δυνητικά παθογόνων ειδών από τα γένη *Pseudomonas* και *Vibrio*, σε πολύ χαμηλά ποσοστά, με υψηλότερη εμφάνιση τους καλοκαιρινούς και φθινοπωρινούς μήνες, όπου παρατηρούνται και οι περισσότερες ασθένειες στα ψάρια. Η εμφάνιση των ασθενειών που οφείλονται στους παραπάνω παθογόνους μικροοργανισμούς φαίνεται να σχετίζεται με την αύξηση της θερμοκρασίας του νερού (Cascarano et al 2021). Η παρουσία τους, έστω και σε χαμηλά ποσοστά, χρήζει περεταίρω διερεύνησης, με ανάλυση στοχευμένων περιοχών του γονιδιώματός τους. Τα αποτελέσματα της έρευνας δείχνουν ισχυρή συσχέτιση της βακτηριακής κοινότητας με την εποχή

και υπάρχουν ενδείξεις ότι εντός των ιχθυοκαλλιεργειών δεν παρατηρούνται διαφοροποιήσεις στη βακτηριακή σύσταση των εκάστοτε πληθυσμών. Η εφαρμογή της 16S rRNA μεταγονιδιωματικής ανάλυσης για την ταυτοποίηση των διαφόρων βακτηρίων στις ιχθυοκαλλιέργειες, αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για τον έγκαιρο εντοπισμό παθογόνων ειδών και την ανάπτυξη στρατηγικών ελέγχου των ασθενειών στις υδατοκαλλιέργειες.

Βιβλιογραφία

Avarre, J.C., (2020). Next-generation sequencing: a revolution in the field of fish diseases. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, 40, 62-69.

Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., Alexander, H,, Alm, E.J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J.E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C.J., Brown, C.T., Callahan, B.J., Caraballo-Rodríguez, A.M., Chase, J., … Caporaso, J.G., (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852–857.

Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rose, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., (2020), DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583.

Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., Fierer, N., Knight, R., (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. PNAS, 108(2011), 4516-4522.

Cascarano, M., Stavrakidis-Zachou, O., Mladineo, I., Thompson, K., Papandroulakis, N., Katharios, P. (2021). Mediterranean Aquaculture in a Changing Climate: Temperature Effects on Pathogens and Diseases of Three Farmed Fish Species. Pathogens, 10(9), 1205.

Cruaud, P., Vigneron, A., Fradette, M.S., Charette, S.J., Rodriguez, M.J., Dorea, C.C., Culley, A.I., (2017). Open the Sterivex^{TM} casing: An easy and effective way to improve DNA extraction yields. *Limnology and Oceanography Methods*, 15(12), 1015-1020.

FAO, (2020). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action.* Rome.

Kolda, A., Gavrilović, A., Jug-Dujaković, J., Ljubešić, Z., El-Matbouli, M., Lillehaug, A., Lončarević, S., Perić, L., Knežević, Lušić, D.V., Kapetanović, D., (2020). Profiling of bacterial assemblages in the marine cage farm environment, with implications on fish, human and ecosystem health. *Ecological Indicators*, 118, 106785.

Lafferty, K., Harvell, C., Conrad, J., Friedman, C., Kent, M., Kuris, A., Powell, E., Rondeau, D., Saksida, S., (2014). Infectious Diseases Affect Marine Fisheries and Aquaculture Economics. *Annual review of marine science*, 7, 471-496.

Nisiotou, A., Parlapani, F.F., Kormas, K., Boziaris, I.S., (2014). Old targets, new weapons: food microbial communities revealed with molecular tools. In: Boziaris, I.S. (eds), *Novel Food Preservation and Microbial Assessment Techniques*, p. 277-312. Taylor & Francis, CRC Press.

Ευχαριστίες

Η παρούσα έρευνα (ΟΠΣ/MIS 5032517) χρηματοδοτήθηκε από το Ε.Π.ΑΛ.Θ. (ΕΣΠΑ 2014-2020).

Χρήση βιολογικών δεικτών που προέρχονται από εργαλεία βασισμένα σε DNA αναλύσεις για τον προσδιορισμό της γεωγραφικής προέλευσης και γνησιότητας σε δύο ΠΟΠ προϊόντα Αυγοτάραχο Μεσολογγίου και Σταφίδα

Μαρία Ελένη ΔΗΜΗΤΡΑΚΟΠΟΥΛΟΥ, Ζωή ΚΟΤΣΙΡΗ, Μαρία ΑΘΑΝΑΣΙΟΥ, Ελευθερία ΧΟΡΤΗ ΤΡΙΨΑ, Απόστολος ΒΑΝΤΑΡΑΚΗΣ

Εργαστήριο Υγιεινής, Τμ. Ιατρικής, Παν/μιο Πατρών

Περίληψη

Η ιχνηλασιμότητα και η πιστοποίηση των τροφίμων είχαν καταστεί υποχρεωτική για τα τρόφιμα βιομηχανία και παγκόσμιο εμπόριο τροφίμων. Πολυάριθμες μέθοδοι που βασίζονται στο DNA θα μπορούσαν να συμβάλουν ενάντια στις νοθείες τροφίμων, λόγω των πλεονεκτημάτων τους όπως η απλότητα, η ακρίβεια και η σταθερότητα. Ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν να διερευνήσει εάν μοναδικοί βιολογικοί δείκτες για δύο δημοφιλή προϊόντα ελληνικής προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης (ΠΟΠ) θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν. Για το σκοπό αυτό, το «Αυγοτάραχο Μεσολογγίου» γνωστό ως ελληνικό χαβιάρι και η σταφίδα "Vostizza" υποβλήθηκε σε ανάλυση με βάση το DNA σε μεθόδους όπως PCR-RAPD, PCR-RFLP, και PCR-DGGE για ελληνικά προϊόντα ΠΟΠ και πιθανούς βιολογικούς δείκτες που διερευνήθηκαν, με βάση είτε το γονιδιωματικό DNA είτε τις κοινότητες βακτηρίων. Τα προφίλ των ζωνών που προέκυψαν με τις μοριακές τεχνικές, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως «κώδικας» που θα πιστοποιεί την προέλευση και τη γνησιότητα των προϊόντων ΠΟΠ. Οι μέθοδοι αυτές προτείνονται, ως εναλλακτικά εργαλεία ιχνηλασιμότητας, προκειμένου να παρέχει μοναδικούς δείκτες και θα μπορούσε να είναι το κλειδί για την πρόκληση «από το αγρόκτημα στο τραπέζι». Επομένως, οι βιολογικοί δείκτες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε ολόκληρη την εμπορική αλυσίδα εφοδιασμού και να προστατεύσουν τα τρόφιμα, τα οποία διαθέτουν σύστημα ποιότητας, από νοθείες.

Λέξεις κλειδιά

βιολογικοί δείκτες, γεωγραφική προέλευση, γνησιότητα, ιχνηλασιμότητα, σταφίδα, αυγοτάραχο

Εισαγωγή

Η προστατευόμενη ονομασία προέλευσης (ΠΟΠ) και η προστατευόμενη γεωγραφική ένδειξη (ΠΓΕ) είναι συστήματα ποιότητας της ΕΕ για προϊόντα που τα φέρουν, τα οποία εισήχθησαν από τον Κανονισμό ΕΟΚ 2081/92 (προσφάτως αντικαταστάθηκε από τον Κανονισμό ΕΚ 510/2006). Το σήμα ΠΟΠ προστατεύει την προέλευσή τους, και πιστοποιούνται με πλήρη συμμόρφωση με τα πρότυπα της ΕΕ και, επομένως, υψηλότερη τιμή στην παγκόσμια αγορά τροφίμων. Ως αποτέλεσμα, οι καταναλωτές αναμένουν αυτά τα προϊόντα να έχουν κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά αφορούν την ιχνηλασιμότητα και την αυθεντικότητα του προϊόντος. Ως εκ τούτου, από τον κανονισμό 2065/2001 της Ευρωπαϊκής Ένωσης, η ιχνηλασιμότητα των τροφίμων και η ακριβής επισήμανση των προϊόντων έχουν θεσμοθετηθεί.

Η ιχνηλασιμότητα και ο έλεγχος ταυτότητας τροφίμων είχαν καταστεί υποχρεωτικοί για τη βιομηχανία τροφίμων και το παγκόσμιο εμπόριο τροφίμων. Πολυάριθμες μέθοδοι που βασίζονται στο DNA θα μπορούσαν να συμβάλουν στην καταπολέμηση της απάτης στα τρόφιμα, λόγω των πλεονεκτημάτων τους όπως η απλότητα, η ακρίβεια και η στιβαρότητα

Επιπλέον, τρόφιμα που έχουν ποιότητα ΠΟΠ λόγω της μοναδικότητάς τους και του οικονομικού τους αντίκτυπου είναι επιρρεπή στη νόθευση. Οι αρχές αναζητούν αξιόπιστα εργαλεία για την επικύρωση της γεωγραφικής προέλευσης και της αυθεντικότητας των προϊόντων διατροφής. Λόγω αυτής της ζήτησης και του αντίκτυπου που υπάρχει στην κοινή γνώμη όταν ένα περιστατικό απάτης σε τρόφιμα εμφανίζεται, οι ερευνητές προσπαθούν να αντιμετωπίσουν αυτό το ζήτημα με καινοτόμες και αναλυτικές προσεγγίσεις. Υπέρυθρη φασματοσκοπία, ισοτοπικές μέθοδοι, τεχνικές βασισμένες στο DNA, φασματομετρία μάζας, χρωματογραφικές τεχνικές και συνδυασμοί αυτών έχουν χρησιμοποιηθεί.

Αυτές οι μέθοδοι επίσης, αποδείχθηκαν πολλά υποσχόμενες για την εκπλήρωση αυτού του ρόλου.

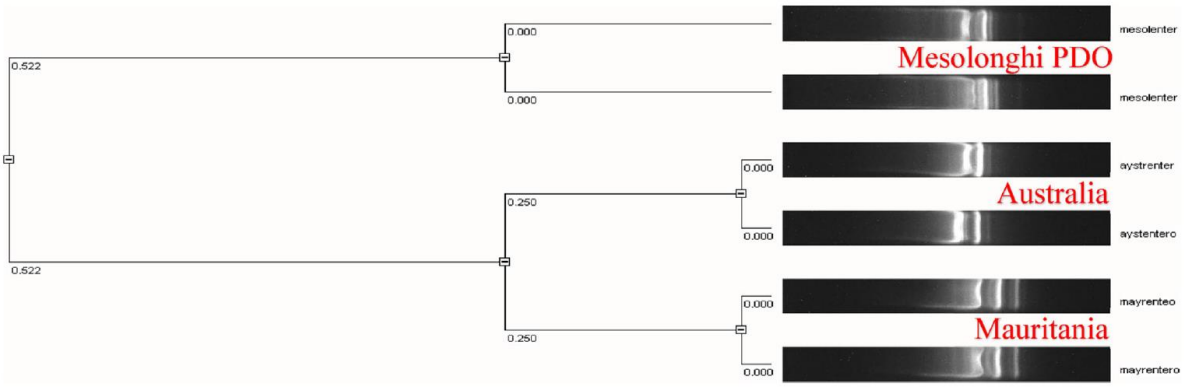
Μέθοδοι

Ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν να διερευνηθεί εάν μπορούσαν να υποδειχθούν μοναδικοί βιολογικοί δείκτες για δύο υψηλής αξίας και δημοφιλή προϊόντα ελληνικής προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης (ΠΟΠ). Για το σκοπό αυτό, το «Αυγοτάραχο Μεσολογγίου» γνωστό ως ελληνικό χαβιάρι και η σταφίδα «Vostizza» υποβλήθηκαν σε ανάλυση με βάση το DNA. Πραγματοποιήθηκαν PCR-RAPD, PCR-RFLP και PCR-DGGE για ελληνικά προϊόντα ΠΟΠ και διερευνήθηκαν πιθανοί βιολογικοί δείκτες, βάσει είτε του γονιδιωματικού DNA είτε των βακτηριακών κοινοτήτων που είχαν.

Αποτελέσματα

Τα προφίλ ζωνών που προέκυψαν στις μοριακές τεχνικές, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως «κώδικας» για την πιστοποίηση της προέλευσης και της γνησιότητας των προϊόντων ΠΟΠ. Η τεχνική PCR-RAPD πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας DNA που απομονώθηκε από αποικίες Εντεροβακτηριδίων. Τα επιλεγμένα τμήματα DNA στα τρία διαφορετικά δείγματα από γεωγραφικές τοποθεσίες, με τον αριθμό των ενισχυμένων τμημάτων να κυμαίνεται από 4 έως 9. Επιπλέον, το μέγεθος των τμημάτων διέφερε από 200 έως 900 bs. Όλα τα δείγματα αυγών ψαριών διακρίθηκαν από την παρουσία ή απουσία μοναδικών τμημάτων DNA, που προέκυψαν από την RAPD ανάλυση. Στο 48% παρατηρήθηκε μια ομάδα τμημάτων που υπάρχει στα δείγματα του Μεσολογγίου και δείγματα από τις άλλες δύο περιοχές. Στο 75%, τα δείγματα από την Αυστραλία και τη Μαυριτανία υπέστησαν διακρίσεις στη δεύτερη ομάδα.

Υψηλή ομοιότητα σε ανάλυση αλληλουχίας του γονιδίου coi, δείχνει ότι τέτοια περιοχή είχε εξαιρετικά διατηρημένο γονίδιο κατά την εξέλιξη. Ωστόσο, εντός της περιοχής, υπήρχαν νουκλεοτίδια που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για να γίνει διάκριση του αυγοτάραχου ανάλογα με την προέλευσή τους. Τα προϊόντα PCR στην περιοχή του coi που λαμβάνονται από δείγματα αυγοτάραχου έδειξαν θέσεις περιορισμού HinfI, AluI, PaeI και AquIII που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία διακριτού σχεδίου PCR-RFLP. Με την ενζυμική πέψη AquIII, το «αυγοτάραχο Μεσολογγίου» διακρίνεται από τα άλλα δύο δείγματα από τη Μαυριτανία και την Αυστραλία.



Εικόνα 1. Η γενετική ποικιλότητα των βακτηρίων στη σταφίδα από πέντε γεωγραφικές περιοχές (Νεμέα, Καλαμάτα, ΠΟΠ, Ζάκυνθος, Αμαλιάδα) προσδιορίστηκε με τη βοήθεια PCR-DGGE. Λήφθηκαν πρότυπα PCR-DGGE, αποκάλυψαν μεμονωμένες ζώνες που αντανακλούν μικροοργανισμούς που υπάρχουν στα δείγματα από πέντε τοποθεσίες.

Συμπεράσματα

Συνοπτικά, αυτή ήταν η πρώτη μελέτη που εφαρμόστηκε με επιτυχία με μεθόδους βασισμένες στο DNA για την ελληνική ΠΟΠ (Αυγοτάραχο Μεσολογγίου και σταφίδα Vostizza) για ιχνηλασιμότητα και έλεγχος ταυτότητας. Αυτές οι μέθοδοι προτείνονται, ως εναλλακτικά εργαλεία ιχνηλασιμότητας,

προκειμένου να παρέχουν μοναδικούς δείκτες και θα μπορούσαν να αποτελέσουν το κλειδί για την πρόκληση «από αγρόκτημα σε τραπέζι». Ως εκ τούτου, βιολογικοί δείκτες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε ολόκληρη την εμπορική αλυσίδα εφοδιασμού και να προστατεύσουν τα τρόφιμα, τα οποία διαθέτουν σύστημα ποιότητας, από νοθείες. Περαιτέρω DNA ανάλυση και εφαρμογή σε ποικιλία τροφίμων σε μεγάλη κλίμακα, μπορεί να είναι η κατάλληλη λύση για τη διαχείριση των νοθειών και για να ενισχύσει επίσης την εμπιστοσύνη των καταναλωτών

Χρηματοδότηση

Η παρούσα έρευνα έλαβε χρηματοδότηση από την Ενιαία Κρατική Ενίσχυση Δράσης για Έρευνα, Τεχνολογική Ανάπτυξη & Καινοτομία «Ερευνώ Καινοτομώ» έργο «Trust Trace» T1EDK-04028. Επίσης υπήρχε υποστήριξη αυτής της εργασίας από το έργο «Synthetic Biology: From omics technology to genomic engineering (OMIC ENGINE)» (MIS 5002636) που υλοποιείται στο πλαίσιο της Δράσης «Ενίσχυση της Υποδομής Έρευνας και Καινοτομίας», χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» (ΕΣΠΑ 2014-2020) και συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης).

,

ΣΥΝΕΔΡΙΑ 5

ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΕΣ

Γεωργία Μανδηλαρά,
Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας, Σχολή Δημόσιας Υγείας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Επιστημονική Υπεύθυνη Εθνικού Κέντρου Αναφοράς Σαλμονελών, Σιγκελών και λοιπών τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών
Τσίκου Δανιελα,
Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Χρήση μεθόδων μηχανικής εκμάθησης για την πρόβλεψη προτύπων βιοποικιλότητας

ΣΤΕΡΓΙΟΥ Κωνσταντίνα[1], ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ Παναγιώτης[2], ΚΑΛΛΙΜΑΝΗΣ Αθανάσιος[1]

[1]*Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, stergiouk@bio.auth.gr, kalliman@bio.auth.gr*
[2]*Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, pdimopoulos@upatras.gr*

Περίληψη
Τα ξενικά είδη είναι απειλή για τη βιοποικιλότητα. Τα πρότυπα εξάπλωσης των φυτικών ξενικών ειδών μπορεί να επηρεάζονται από βιοτικούς (π.χ. ποικιλότητα γηγενών φυτικών ειδών) ή αβιοτικούς παράγοντες (π.χ. κλίμα). Για τη μελέτη τους έχουν χρησιμοποιηθεί κυρίως μέθοδοι όπως τα γενικευμένα γραμμικά μοντέλα, αλλά δεν έχει εξεταστεί εάν και κατά πόσο η επιλογή στατιστικού εργαλείου (όπως τα μοντέλα μηχανικής εκμάθησης) επηρεάζει την προβλεπτική ικανότητα των αναλύσεων, την τελική συμπερασματολογία ή/και την ιεράρχηση της σημαντικότητας των παραγόντων. Στη συγκεκριμένη εργασία, βρήκαμε ότι για τα ξενικά φυτικά είδη της Ελλάδας τα γενικευμένα γραμμικά μοντέλα είχαν χαμηλότερη προβλεπτική ικανότητα (μικρότερο R^2) από τα αντίστοιχα μοντέλα μηχανικής εκμάθησης (δέντρα απόφασης, Κ κοντινότεροι γείτονες, μηχανές διανυσμάτων υποστήριξης - SVM). Όταν εξετάσαμε κάθε παράγοντα μόνο του, όλες οι μέθοδοι εκτός από τα SVM ανέδειξαν την ποικιλότητα γηγενών ειδών ως την σημαντικότερη παράμετρο, ενώ η ιεράρχηση των παραγόντων παρουσίαζε διαφορές μεταξύ των μεθόδων.

Λέξεις-κλειδιά
Βιοποικιλότητα, ξενικά είδη, γραμμικά μοντέλα, μηχανική εκμάθηση

Εισαγωγή

Η σταθερότητα των οικοσυστημάτων συνδέεται ισχυρά με τη βιοποικιλότητα. Στην περίοδο του Ανθρωπόκαινου, η βιοποικιλότητα απειλείται από ποικίλους παράγοντες, όπως η κλιματική αλλαγή, η απώλεια ενδιαιτήματος, η ρύπανση του περιβάλλοντος. Τα τελευταία χρόνια, μια απειλή που συζητιέται έντονα είναι τα ξενικά και ιδιαιτέρως τα εισβολικά είδη (Bellard et al. 2013). Για αυτό το λόγο, έχουν διατυπωθεί πολλές υποθέσεις για τους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες που επηρεάζουν την εξάπλωση των ξενικών ειδών (Catford et al. 2011).

Τα κλασσικά στατιστικά μοντέλα που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά κόρον για την ανάλυση των προτύπων της βιοποικιλότητας υστερούν σε σχέση με αυτά της Μηχανικής Εκμάθησης, έναν κλάδο της επιστήμης των υπολογιστών που αναπτύσσει αλγόριθμους ικανούς για αποφάσεις που βασίζονται σε μεγάλες βάσεις δεδομένων. Στην οικολογία, όπου τα δεδομένα που περιγράφουν τα οικοσυστήματα δεν προσαρμόζονται πάντα στα γραμμικά μοντέλα λόγω της πολυπλοκότητάς τους, η χρήση μοντέλων μηχανικής εκμάθησης μπορεί να δώσει πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα (Thessen 2016).

Στην προκειμένη εργασία ασχοληθήκαμε με τα πρότυπα βιοποικιλότητας των φυτικών ειδών της Ελλάδας και συγκεκριμένα φυτικών ξενικών ειδών, διερευνώντας πώς η φυτική ποικιλότητα των τελευταίων επηρεάζεται τόσο από βιοτικούς όσο και αβιοτικούς παράγοντες. Εδώ, ερευνήσαμε εάν η επιλογή του στατιστικού εργαλείου επηρεάζει την προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου, αλλάζει τα συμπεράσματα στα οποία καταλήγουμε και ιδιαίτερα την ιεράρχηση της σημαντικότητας των παραγόντων που επηρεάζουν την ποικιλότητα.

Μεθοδολογία

Τα δεδομένα για τη φυτική ποικιλότητα της Ελλάδας και προέρχονται από καταγραφές δημοσιευμένων εργασιών για την περιοχή της Ελλάδας, ενώ τα δεδομένα για τις αβιοτικές παραμέτρους προέρχονται από το Corine 2000 για την κάλυψη γης και από το WorldClim για το κλίμα.

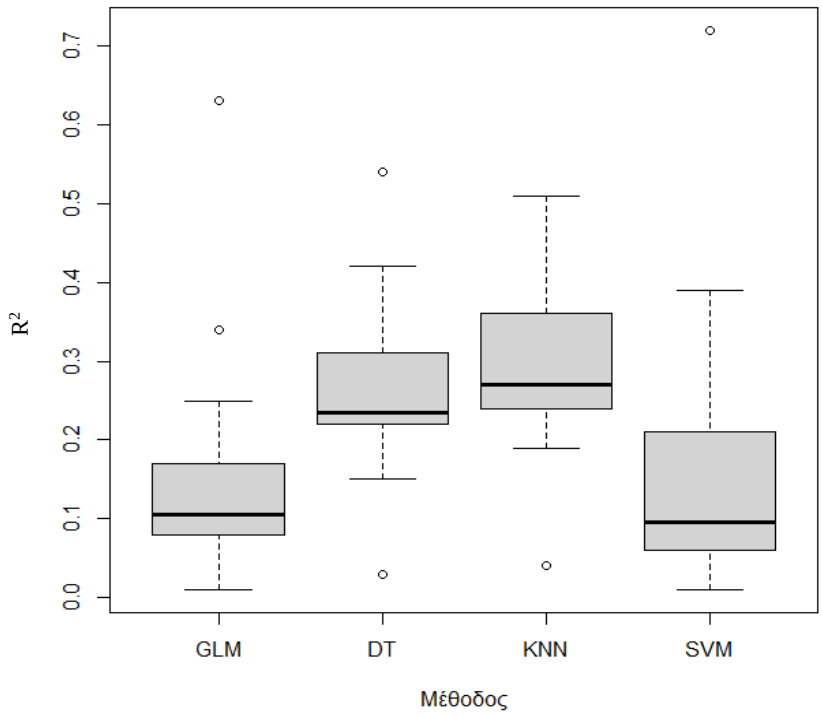
Για τη δημιουργία μοντέλων χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές προσεγγίσεις: η κλασσική με τα

γενικευμένα γραμμικά μοντέλα (General Linear Models, GLM) και η πιο σύγχρονη με τις μεθόδους της μηχανικής εκμάθησης. Στη δεύτερη προσέγγιση εντάσσονται τα δέντρα απόφασης (Decision Trees, DT), οι Κ κοντινότεροι γείτονες (K nearest neighbors, KNN) και οι μηχανές υποστήριξης διανυσμάτων (Support Vector Machines, SVM). Και στις τέσσερις περιπτώσεις, δημιουργήθηκαν 13 μοντέλα με μία μόνο ανεξάρτητη μεταβλητή για να προβλέψουμε την ποικιλότητα ξενικών φυτικών ειδών στην Ελλάδα. Για τα γραμμικά μοντέλα αναλύθηκε όλο το σύνολο των δεδομένων ενώ για τα μοντέλα μηχανικής εκμάθησης έγινε διαχωρισμός των δεδομένων σε δύο υποσύνολα· στο υποσύνολο εκπαίδευσης (77% των δεδομένων) και στο υποσύνολο ελέγχου(το υπόλοιπο 23%).

Για την αξιολόγηση των μοντέλων αναφορικά με την ικανότητα πρόβλεψης της εξαρτημένης μεταβλητής (ποικιλότητα ξενικών) και για την σχετική σημαντικότητα των παραγόντων που επηρεάζουν την ποικιλότητα χρησιμοποιήσαμε τον συντελεστή προσδιορισμού R^2.

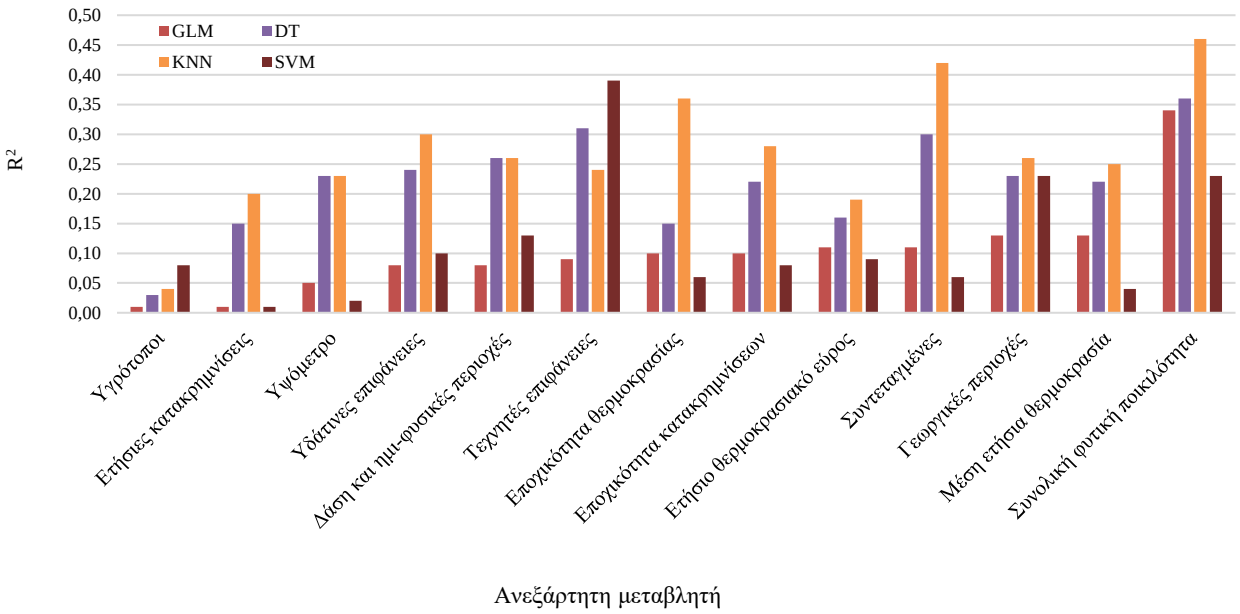
Αποτελέσματα

Βρήκαμε ότι η επιλογή του στατιστικού εργαλείου επηρεάζει την προβλεπτική ικανότητα των μοντέλων αναφορικά με την επίδραση των διαφορετικών παραγόντων στην ποικιλότητα των ξενικών ειδών. Τα γενικευμένα γραμμικά μοντέλα επέδειξαν παραπλήσια προβλεπτική ικανότητα με τα SVM. Και οι δύο αυτές ομάδες υστερούν στην απόδοσή τους σε σχέση με τα μοντέλα των DT και KNN (Εικόνα 1). Σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις, οι μεταβλητές που χρησιμοποιήσαμε φαίνεται να μην μπορούν να εξηγήσουν περισσότερο από το 50% της διακύμανσης της εξαρτημένης μεταβλητής.



Εικόνα 1. Θηκόγραμμα για τη σύγκριση του συντελεστή προσδιορισμού (R^2) των μοντέλων για τα γραμμικά μοντέλα (GLM) και για τα μοντέλα μηχανικής εκμάθησης: Δέντρα Απόφασης (DT), Κ Κοντινότεροι Γείτονες (KNN) και Μηχανές Υποστήριξης διανυσμάτων (SVM).

Αναφορικά με τον σημαντικότερο παράγοντα που επηρεάζει την ποικιλότητα των ξενικών ειδών, φαίνεται ότι οι περισσότερες προσεγγίσεις συνάδουν, αναδεικνύοντας τη συνολική φυτική ποικιλότητα ως κύριο καθορισμού του προτύπου (Εικόνα 2). Η διαφορά είναι στα αποτελέσματα των μοντέλων SVM, όπου αναδεικνύεται ως σημαντικότερος παράγοντας το ποσοστό κάλυψης γης από τεχνητές επιφάνειες κατά Corine 2000 (Εικόνα 2). Πέρα από τον πλέον σημαντικό παράγοντα, η ιεράρχηση των υπολοίπων παραγόντων δεν είναι κοινή μεταξύ των διαφορετικών προσεγγίσεων (Εικόνα 2)



Εικόνα 2. Παρουσίαση του συντελεστή προσδιορισμού (R^2) των δεκατριών μοντέλων που δημιουργήθηκαν, όλα έχοντας ως εξαρτημένη μεταβλητή την φυτική ποικιλότητα των ξενικών ειδών, με τις τέσσερις διαφορετικές μεθόδους. Με πορτοκαλί αναπαρίστανται τα γενικευμένα γραμμικά μοντέλα (GLM), με κίτρινο τα μοντέλα των δέντρων αποφάσεων (DT), με πράσινο τα μοντέλα των Κ Κοντινότερων Γειτόνων (KNN) και με καφέ τα μοντέλα των Μηχανών Διανυσμάτων Υποστήριξης (SVM).

Συμπεράσματα

Η επιλογή στατιστικού εργαλείου παίζει ρόλο στη συμπερασματολογία για τους παράγοντες που επηρεάζουν την ποικιλότητα ξενικών ειδών. Καταρχάς, επηρεάζει την προβλεπτική ικανότητα των μοντέλων, με τα μοντέλα μηχανικής εκμάθηση να προσαρμόζονται καλύτερα στα δεδομένα σε σχέση με τα γενικευμένα γραμμικά μοντέλα. Αλλά πιο ενδιαφέρον παρουσιάζει το εύρημα ότι διαφορετικά στατιστικά εργαλεία οδηγούν σε διαφορές (μικρότερες ή μεγαλύτερες) στην ιεράρχηση των παραγόντων που επηρεάζουν την ποικιλότητα.

Βιβλιογραφία

Bellard, C., Thuiller, W., Leroy, B. et al. (2013). Will climate change promote future invasions? *Global Change Biology*, 19(12), 3740–3748.

Catford, J., Vesk, P., White, M., Wintle, B. (2011). Hotspots of plant invasion predicted by propagule pressure and ecosystem characteristics. *Diversity and Distributions*, 17, 1099–1110

Thessen, A. (2016). Adoption of Machine Learning Techniques in Ecology and Earth Science. *One Ecosystem*, 1, e8621

Αντιμετώπιση της βιοδιάβρωσης στα μνημειακά μάρμαρα με τη χρήση βιολογικού βιοκτόνου

ΚΑΠΙΡΗΣ Δημήτριος Νικόλαος[1], ΒΕΛΛΙΑΝΙΤΗΣ Δημήτριος[2] , ΚΟΛΛΑΡΟΥ Δήμητρα, ΚΟΡΜΠΑΚΗ Βασιλική

[1]*Πανεπιστήμιο Πατρών* dimitrisnikolask@gmail.com
[2]*Πανεπιστήμιο Πατρών* vellianitisd@gmail.com

Περίληψη
Ως βιοδιάβρωση ορίζεται η αποσύνθεση των υλικών ενός αντικειμένου από (μικρο)οργανισμούς, οι οποίοι είτε φωλιάζουν και αναπτύσσονται είτε τρέφονται με αυτό. Το φαινόμενο αυτό απειλεί τα μαρμάρινα μνημεία σε όλο τον κόσμο, οπότε ο περιορισμός του είναι ζήτημα μεγάλης σημασίας. Η ταχυπλεσίνη είναι ένα αντιμικροβιακό πεπτίδιο, με δράση κατά των Gram+ και - βακτηρίων, *Firmicutes*, μυκήτων και ιών. Θα αποτελέσει το κύριο συστατικό ενός βιολογικού βιοκτόνου κατά της μικροχλωρίδας των μαρμάρων. Οι πειραματικές διαδικασίες περιλαμβάνουν τον μετασχηματισμό στελεχών *E.Coli* με ανασυνδυασμένα πλασμίδια που περιέχουν την επιθυμητή νουκλεοτιδική αλληλουχία. Μετά τον χαρακτηρισμό της έκφρασης και της καθαρότητας του υπό μελέτη πεπτιδίου, θα αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα της ταχυπλεσίνης ως βιοκτόνο προϊόν σε μικροοργανισμούς που βρίσκονται στο μάρμαρο. Η χρήση του αντιμικροβιακού πεπτιδίου αποτρέπει την ανάπτυξη ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών, εξαλείφοντας έτσι την ανάγκη δημιουργίας ολοένα και πιο σύγχρονων βιοκτόνων, αποτελώντας ένα χρήσιμο, φιλικό προς τον άνθρωπο και το περιβάλλον βιοκτόνο.

Λέξεις κλειδιά
Βακτήρια, μύκητες, βιοδιάβρωση, αντιμικροβιακό πεπτίδιο, πολιτιστική κληρονομιά

Εισαγωγή

Η μελέτη στοχεύει στην εξάλειψη της βιοδιάβρωσης που παρατηρείται στα μάρμαρα, χρησιμοποιώντας έναν φυσικό τρόπο για την εξόντωση των μικροοργανισμών που διαβρώνουν το μάρμαρο. Σε σύγκριση με άλλα ανόργανα υλικά , οι επιφάνειες των πετρωμάτων είναι εύκολο να αποικιστούν από μικροοργανισμούς. Η απλή παρουσία μικροοργανισμών μέσα/πάνω στο πέτρωμα δεν υποδηλώνει απαραίτητα αποσύνθεση. Στην πραγματικότητα η διαδικασία της βιολογικής φθοράς ξεκινά όταν συνδυάζεται η παρουσία μικροοργανισμών με άλλους παράγοντες όπως χημικούς, φυσικούς και ή περιβαλλοντικούς παράγοντες που έχουν αντίκτυπο στην ανάπτυξη της μικροβιακής χλωρίδας.

Οι μικροοργανισμοί στο μάρμαρο

Η ταξινόμηση των μικροοργανισμών βασίζεται στον εντοπισμό και την κατανομή τους πάνω ή/και μέσα στο υπόστρωμα, έτσι έχουμε Epilithobionts, Endolithobionts. Τα Endolithobionts διακρίνονται σε: 1.Chasmolithic microorganisms (που ζουν σε προϋπάρχουσες ρωγμές ή σχισμές) 2. Euendolithic (που εισέρχονται ενεργά στο υπόστρωμα) 3. Cryptoendolithic (ανάπτυξη κάτω από την επιφάνεια) (Urzi 2004). Η έρευνα στοχεύει στη χρήση ενός αντιμικροβιακού πεπτιδίου που απομονώθηκε από αιμοκύτταρα καβουριών, την Ταχυπλεσίνη Ι, με στόχο τη μικροβιακή χλωρίδα που ζει στα μάρμαρα. Στο Ερέχθειο βρέθηκε το στέλεχος *Bacillus subtilis* και ένα ευρύ φάσμα άλλων βακτηρίων Gram + και Gram – (Kanini et.al 2014)

Τι είναι τα αντιμικροβιακά πεπτίδια;

Μια άφθονη και ποικίλη ομάδα μορίων που παράγονται από πολλούς ιστούς και κυτταρικούς τύπους σε μια ποικιλία ασπόνδυλων, φυτικών και ζωικών ειδών. Η σύνθεση των αμινοξέων τους και το μέγεθός τους τους επιτρέπουν να προσκολλώνται και να εισέρχονται στους πόρους της μεμβράνης με αποτέλεσμα να βλάπτουν και να σκοτώνουν τους μικροοργανισμούς (A.Brodgen, Kim2005) .

Γιατί Ταχυπλεσίνη;
Ένα αντιμικροβιακό πεπτίδιο που βρέθηκε στο όξινο εκχύλισμα των αιμοκυττάρων από το ιαπωνικό καβούρι (*Tachypleus tridentatus*) και είναι ευρέως αποτελεσματικό μεταξύ πολλών Gram + και - βακτηρίων, μυκήτων και ιών. Ειδικά η εγγενής ταχυπλεσίνη είναι αποτελεσματική έναντι του Bacillus subtilis με ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (Toshiyuki, Fuminori,Takashi 1989)

Μέθοδοι:
Επιλογή πλασμιδίου
Το πλασμίδιο *pcDNA3.1,* αποτελεί το καταλληλότερο πλασμίδιο για το πείραμα, προσδίδοντας στα βακτήρια ανθεκτικότητα στο ευρέως χρησιμοποιούμενο αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Διαθέτει polycloning sight όπου πρόκειται να προστεθεί το γονίδιο ώστε να εκφράζεται με μεγάλο ρυθμό και τέλος η αλληλουχία του περιέχει μεγάλη ποικιλία θέσεων αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων.

Επιλογή γονιδίων και περιοριστικών ενζύμων
Τα ανάλογα Y8S και I11S του γονιδίου της ταχυπλεσίνης έχουν πολύ μειωμένη αιμολυτική δράση και αποτελούν πολλά υποσχόμενα υποψήφια φάρμακα για θεραπεία μολυσματικών ασθενειών που προκαλούνται τόσο από Gram-θετικά όσο και από Gram-αρνητικά βακτηριακά παθογόνα (Panteleev, Ovchinnikova 2015). Στην αλληλουχία των 2 αυτών γονιδίων αλλά και του φυσιολογικού, για έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης των αναλόγων, προστέθηκε το κωδικόνιο έναρξης, καθώς η μεθειονίνη απουσιάζει από την ταχυπλεσίνη φυσιολογικά, καθώς και το κωδικόνιο λήξης 5'TAG3'. Επιλέχθηκαν 2 περιοριστικά ένζυμα που αφήνουν διαφορετικά μονόκλωνα άκρα, ώστε το γονίδιο να μπει σίγουρα με τη σωστή κατεύθυνση στο πλασμίδιο. Τα καταλληλότερα ένζυμα είναι η *ECORI* και η *XBAI,* αφού το πλασμίδιο έχει μία θέση αναγνώρισης για καθεμία και μέσα στο γονίδιο δεν υπάρχει καμία θέση αναγνώρισης, άρα το ανασυνδυασμένο DNA θα είναι κυκλικό. Στο 5' άκρο του γονιδίου προστέθηκε η αλληλουχία αναγνώρισης της *ECOR1* 5'GAATTC3' και στο 3' άκρο, η αλληλουχία αναγνώρισης της *XBA1* 5'TCTAGA3'.

Πολλαπλασιασμός πλασμιδίου pcDNA3.1 μέσα σε επιδεκτικά E.Coli DH5A
Το κατεψυγμένο στους -80^{o}C αρχικό, μη ανακαλλιεργημένο σωληνάριο με τα επιδεκτικά *E.Coli* τοποθετήθηκε στον πάγο και σε αυτό προστέθηκε 1 μL πλασμιδίου, 1ng/μL. Μετά από ελάχιστη ανακίνηση, το σωληνάριο αφέθηκε στον πάγο για 30 λεπτά. Πραγματοποιήθηκε θερμικό σοκ στους 42 ^{o}C για 45 δευτερόλεπτα στο προπαρασκευασμένο μηχάνημα heatblock με την αντίστοιχη θερμοκρασία. Το σωληνάριο τοποθετήθηκε για 5 λεπτά στον πάγο και έπειτα προστέθηκαν σε αυτό 800 μL LB σε θερμοκρασία δωματίου. Επωάστηκε στους 37 ^{o}C στην ανακίνηση για 1 ώρα. Στη συνέχεια, 600 μl από το 1 ml μετασχηματισμένων βακτηρίων αναμίχθηκαν με 2,05 mL LB και 0,2 ml Αμπικιλίνη. Από τα υπόλοιπα 400 μL E. coli, τα μισά από αυτά (200 μL) χρησιμοποιήθηκαν ως καλλιέργεια ελέγχου με 0,75 ml LB, ενώ τα υπόλοιπα (200μL) προστέθηκαν σε στερεή καλλιέργεια LB-Agar - τα τελευταία χωρίστηκαν επίσης σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις (150 μL και 50 μL).

Πέψη πλασμιδίου
Χρησιμοποιήθηκαν 20 μL πλασμιδίου, 1,5 μL από κάθε ένζυμο, 3 μL από το IV buffer και 4 μL απιονισμένο H20 (30 μL συνολικά). Τοποθέτηση στους 37 ^{o}C για 1 ώρα. Με ηλεκτροφόρηση, επιβεβαιώθηκε η επιτυχία της πέψης.

Αντίδραση λιγάσης
Αράιωση 1,6 μL της αλληλουχίας ένθεσης DNA, 3,3 μL του πλασμιδιακού φορέα, 2 μL του ρυθμιστικού διαλύματος υψηλής T4 λιγάσης, 1 μL της T4 λιγάσης σε 11,7 u μL καθαρισμένου H2O. Απαλή ανάμιξη με πιπέτα πάνω-κάτω και φυγοκέντρηση για λίγο. Λόγω συνεκτικών άκρων, επώαση στους 45 ^{o}C για 10 λεπτά σύμφωνα με το πρωτόκολλο υψηλής T4-λιγάσης. Θέρμανση στους 65 ^{o}C για 10 λεπτά για αδρανοποίηση λιγάσης σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή και στη συνέχεια τοποθέτηση στον πάγο μέχρι το επόμενο βήμα.

Επιλογή εκκινητών και PCR

Προκειμένου να πιστοποιηθεί ότι η διαδικασία σύνδεσης είχε πραγματοποιηθεί επιτυχώς, θα πραγματοποιηθεί PCR. Συγκεκριμένα, σχεδιάστηκαν δύο κατάλληλοι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές που προσδένονταν σε κάθε περιοχή των θέσεων αναγνώρισης. Ως εκ τούτου, ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο θα απέδιδε μεγαλύτερο προϊόν PCR λόγω της παρουσίας του εισαγόμενου τμήματος DNA. Τα προϊόντα PCR, ηλεκτροφορήθηκαν σύμφωνα με το κατάλληλο πρωτόκολλο και απεικονίστηκε το ανασυνδυασμένο DNA που αποδεικνύεται από τη διαφορετική του θέση σε σχέση με το μη ανασυνδυασμένο στο πήκτωμα.

Επιλογή εκκινητών για PCR

Προκειμένου να πιστοποιηθεί ότι ο ανασυνδυασμός έχει πραγματοποιηθεί επιτυχώς θα πραγματοποιηθεί μια αντίδραση πολυμεράσης-αλυσίδας (PCR). Συγκεκριμένα, σχεδιάστηκαν δύο κατάλληλοι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές που προσδένονταν σε κάθε περιοχή των θέσεων αναγνώρισης. Ως εκ τούτου, ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο θα απέδιδε μεγαλύτερο προϊόν PCR λόγω της παρουσίας του εισαγόμενου τμήματος DNA.

Αποτελέσματα:

Σε αυτή την φάση, το πείραμα βρίσκεται στην αντίδραση λιγάσης, ώστε να ενωθεί το γονίδιο I11S με το επιθυμητό θραύσμα του πλασμιδίου. Τα μελλοντικά σχέδια περιλαμβάνουν, τον έλεγχο επιτυχίας της αντίδρασης λιγάσης και τη δημιουργία μετασχηματισμένων βακτηρίων που παράγουν το ανάλογο I11S πεπτίδιο της ταχυπλεσίνης, την απομόνωση του αναλόγου της ταχυπλεσίνης, την αφαίρεση του αμινοξέος μεθειονίνη, επειδή απουσιάζει από το ώριμο πεπτίδιό της και την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής του δράσης έναντι μικροοργανισμών που ζουν στο μάρμαρο. Τα πειράματα θα επαναληφθούν για σύγκριση αντιμικροβιακής δράσης και με τα άλλα 2 γονίδια.

Συμπεράσματα:

Η εφεύρεση ενός βιολογικού βιοκτόνου, φιλικού προς τον άνθρωπο, το περιβάλλον και το μάρμαρο πρόκειται να λύσει πολλά προβλήματα που αντιμετωπίζουν οι συντηρητές, αποτελώντας πανάκεια για τη διαφύλαξη της πολιτιστικής μας κληρονομιάς.

Βιβλιογραφία:

A. Brogden, Kim, Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *www.nature.com/reviews/micro*, 2005, 238-250of the Conservations Project of Acropolis, Geomicrobiology, 2014, 726-736

Kanini, Dora Nikolakopoulou Efstathios Katsifas Nikolaos I. Kyratsous Grammatiki, Bacterial Deterioration of Marble Monuments: A Case Study

M. Garcia-Valles, C. Urzi and M. Vendrell-Saz, *Environmental Geology* 41, 2002, 889-897

Toshiyuki Miyata, Fuminori Tokunaga , Takashi Yoneya Katsuhiro Yo, Antimicrobial Peptides Isolated from Horseshoe Crab Hemocytes, Tachyplesin II and PolyphemusinsI and II: Chemical Structures and Biological Activity, *J.Biochem*, 1989, 663-668

Urzi, Clara, Microbial deterioration of rocks and marble monuments of the Mediterranean basin: a review, *Microbial Deterioration of Rocks and Marble Monuments*, 2004, 441-457

Αντικατάσταση του θειώδη ανυδρίτη από το π-κουμαρικό οξύ: Μια "πράσινη" εναλλακτική τεχνολογία στη βιομηχανική οινοποίηση.

ΣΑΚΑΡΙΚΟΥ Χριστίνα[1*], ΓΙΑΓΚΙΝΗΣ Κωνσταντίνος[1], ΒΑΣΙΟΣ Κ. Γεώργιος[1]

[1]*Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής, Σχολή Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Αιγαίου*
chsakarikou@aegean.gr
cgiaginis@aegean.gr
vasios@aegean.gr

Περίληψη
Η παγκόσμια τάση για "πράσινο" καταναλωτισμό και παραγωγή ασφαλών και βιώσιμων προϊόντων παρουσιάζει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον και οδηγεί στην ανάγκη για την αναζήτηση εναλλακτικών φυσικών συντηρητικών τροφίμων και ποτών, βιο-συντηρητικών, και στην οινοποίηση, περιορίζοντας ή και αντικαθιστώντας πλήρως τα θειώδη, τα οποία χρησιμοποιούνται συμβατικά αλλά έχουν αποδειχτεί επιβλαβή για την υγεία του καταναλωτή. Διάφορα φυτοχημικά, φυτικά αιθέρια έλαια και εκχυλίσματα παρουσιάζουν αντιμικροβιακή, αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη αντικαρκινική δράση καθώς και ρυθμιστική δράση στη γονιδιακή έκφραση των miRNAs και προτείνονται ως φυσικά συντηρητικά στα τρόφιμα, ενώ παράλληλα προσδίδουν σε αυτά και ιδιαίτερη διατροφική αξία. Η οινοποίηση σε βιομηχανική κλίμακα, με αντικατάσταση του θειώδη ανυδρίτη από το φυτοχημικό π-κουμαρικό οξύ, αποτέλεσαι το σκοπό της παρούσας έρευνας, με ικανοποιητικά αποτελέσματα από τις συγκριτικές εργαστηριακές αναλύσεις που διεξήχθησαν, καθώς διασφαλίστηκε η παραγωγή ενός ασφαλούς φυσικού, βιώσιμου, αυθεντικού και υγιεινού οίνου με διατροφική αξία.

Λέξεις-κλειδιά
Βιο-συντηρητικά, φυτοχημικά, πράσινα προϊόντα, βιομηχανία οίνου, θειώδης ανυδρίτης, π-κουμαρικό οξύ.

Εισαγωγή
Ο θειώδης ανυδρίτης, χάρη στην αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή του δράση, χρησιμοποιείται παραδοσιακά στην οινοποίηση ως ένα αποτελεσματικό συντηρητικό μολονότι συχνά μπορεί να αλλοιώσει τη γεύση του οίνου ή ακόμη και να έχει αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία του καταναλωτή, ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιείται σε μεγαλύτερη από τη συνιστάμενη ποσότητα (Garcia-Ruiz et al. 2009, Vally, Misso & Madan 2009). Επιπλέον, ο θειώδης ανυδρίτης μπορεί να επάγει τόσο μηχανισμούς αντοχής σε διάφορα είδη αλλοιωγόνων βακτηρίων και μυκητών όσο και την κατάσταση στην οποία οι μικροοργανισμοί παραμένουν μεταβολικά ενεργοί αλλά εργαστηριακά μη καλλιεργήσιμοι (VBNC:viable but not culturable) και κατά συνέπεια μη ανιχνεύσιμοι (Divol, du Toit & Duckitt 2012). Για το λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια, υπάρχει η τάση αντικατάστασης του θειώδη ανυδρίτη από φυτικής προέλευσης ενώσεις, όπως τα φυτοχημικά, τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί ως βιο--συντηρητικά σε μοντέλα οινοποίησης, σε εργαστηριακή κλίμακα, ως μία πράσινη και κατά συνέπεια πιο υγιεινή εναλλακτική τεχνολογία (Santos et al. 2012). Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αντικατάσταση του θειώδη ανυδρίτη από μία φυτικής προέλευσης φαινολική ένωση, το π-κουμαρικό οξύ, στην οινοποίηση και σε βιομηχανική κλίμακα, για την παραγωγή ενός ασφαλούς φυσικού, βιώσιμου, αυθεντικού και υγιεινού οίνου με διατροφική αξία.

Μέθοδοι
Κατά την περίοδο του τρύγου 2019, στο οινοποιείο του αγροτικού συνεταιρισμού της Λήμνου "η Ένωση" πραγματοποιήθηκε παράλληλη οινοποίηση, σε βιομηχανική κλίμακα, 10,000 kg λευκών σταφυλιών της τοπικής ποικιλίας Μοσχάτο Αλεξανδρείας, βιολογικής καλλιέργειας, σε δύο διαφορετικές ανοξείδωτες δεξαμενές της ίδιας χωρητικότητας, ακολουθώντας τις ίδιες ακριβώς διαδικασίες εκτός της χρήσης του θειώδη ανυδρίτη, ο οποίος στη μία δεξαμενή αντικαταστάθηκε από

το π-κουμαρικό οξύ και σε διαφορετική συγκέντρωση από το πρώτο. Τρεις μήνες μετά την εμφιάλωση των δύο προϊόντων πραγματοποιήθηκαν σε διαπιστευμένα εργαστήρια και ακολουθώντας τα διεθνή αναλυτικά πρωτόκολλα, International Standards Organization (ISO) και International Organization of Vine and Wine (OIV), οινολογικές-φυσικοχημικές, μικροβιολογικές, οργανοληπτικές αναλύσεις των δύο δειγμάτων προκειμένου αυτά να συγκριθούν ως προς τη σταθερότητα, την ποιότητα και την ασφάλειά τους και να αξιολογηθεί η αντικατάσταση του θειώδη ανυδρίτη από το βιο-συντηρητικό π-κουμαρικό οξύ.

Αποτελέσματα

Γενικά, η αντικατάσταση του θειώδη ανυδρίτη από το π-κουμαρικό οξύ δεν επέφερε αξιοσημείωτες διαφορές ανάμεσα στα δύο προϊόντα αναφορικά στη σταθερότητα, στην ασφάλεια, στο μικροβιολογικό, στο αντιοξειδωτικό και φυσικοχημικό τους προφίλ, ενώ το οργανοληπτικό προφίλ του νέου προϊόντος δίχως θειώδη, παρουσιάστηκε ελαφρώς βελτιωμένο.

Συμπεράσματα

Η αντικατάσταση του θειώδη ανυδρίτη από το π-κουμαρικό οξύ μπορεί να θεωρηθεί ως μία αποτελεσματική, εύχρηστη και οικονομική "πράσινη" εναλλακτική τεχνολογία στην βιομηχανική οινοποίηση, η οποία διασφαλίζει σταθερά, ποιοτικά, ασφαλή και βιώσιμα πράσινα προϊόντα οίνου με διατροφική αξία.

Ενδεικτική Βιβλιογραφία

Divol, B., du Toit, M., Duckitt, E. (2012). Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts.Appl Microbiol Biotechnol. 95:601–613 DOI 10.1007/s00253-012-4186-x

Garcia-Ruiz, A., Bartolome, B., Cueva, C., Martin-Alvarez, PJ., Moreno-Arribas, MV. (2009). Inactivation of oenological lactic acid bacteria (Lactobacillus hilgardii and Pediococcus pentosaceus) by wine phenolic compounds. J Appl Microbiol. 107(3):1042–1053 doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04287.x

Vally, H., Misso NLA., Madan V. (2009). Clinical effects of sulphite additives. Clin Exp Allergy 39(11):1643–1651 doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03362.x

Santos, MC., Nunes, C., Saraiva, JA., Coimbra, MA. (2012). Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations. Eur. Food Res. Technol. 234, 1-12 DOI 10.1007/s00217-011-1614-6

PnTXG : Μια αναδυόμενη θαλάσσια βιοτοξίνη στα οστρακοειδή

ΓΟΥΓΟΥΣΗ Αντωνία – *Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης,* agougousi@bio.auth.gr
ΚΑΛΑΪΤΖΙΔΟΥ Μαρία - *Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Θαλάσσιων Βιοτοξινών και τοξινών λοιπών υδάτων, Τμήμα Μικροβιολογίας Τροφίμων, Καταλοίπων και Θαλάσσιων Βιοτοξινών, Διεύθυνση Κτηνιατρικού Κέντρου Θεσσαλονίκης, Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων,* mkalaitzidou@minagric.gr
ΤΣΙΤΑΜΠΑΝΗ Μαρία - *Εθνικό* Εργαστήριο Αναφοράς Θαλάσσιων Βιοτοξινών και τοξινών λοιπών υδάτων, Τμήμα Μικροβιολογίας Τροφίμων, Καταλοίπων και Θαλάσσιων Βιοτοξινών, Διεύθυνση Κτηνιατρικού Κέντρου Θεσσαλονίκης, Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, tsitabani.cat@gmail.com
ΣΙΔΗΡΟΠΟΥΛΟΥ Αναστασία - *Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Θαλάσσιων Βιοτοξινών και τοξινών λοιπών υδάτων, Τμήμα Μικροβιολογίας Τροφίμων, Καταλοίπων και Θαλάσσιων Βιοτοξινών, Διεύθυνση Κτηνιατρικού Κέντρου Θεσσαλονίκης, Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων,* asidiropoulou@minagric.gr
ΚΙΟΥΤΣΙΟΥΚΗΣ Χαράλαμπος - *Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Θαλάσσιων Βιοτοξινών και τοξινών λοιπών υδάτων, Τμήμα Μικροβιολογίας Τροφίμων, Καταλοίπων και Θαλάσσιων Βιοτοξινών, Διεύθυνση Κτηνιατρικού Κέντρου Θεσσαλονίκης, Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων,* xarkiou@yahoo.gr
ΜΙΝΤΖΑ Διονυσία - *Τμήμα Αλιευμάτων, Γάλακτος και Λοιπών Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Διεύθυνση Κτηνιατρικής Δημόσιας Υγείας, Γενική Διεύθυνση Κτηνιατρικής, Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, dmintza@minagric.gr*
ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΠΟΥΛΟΣ Θωμάς - *Γενική Διεύθυνση Κτηνιατρικής, Γενική Γραμματεία Αγροτικής Ανάπτυξης καιΤτροφίμων,* thalexandropoulos@minagric.gr
ΜΑΚΡΗ Βασιλική - *Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης,* makrivasil@bio.auth.gr
ΓΟΥΓΟΥΣΗ Ηλιάνα – *Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης,* igougousi@chem.auth.gr
ΜΙΧΑΗΛΙΔΗΣ Βασίλειος – *Καθηγητής - Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης,* michaeli@bio.auth.gr

Περίληψη
Η αύξηση της θερμοκρασίας στην επιφάνεια της θάλασσας λόγω της κλιματικής αλλαγής σε συνδυασμό με την αύξηση του ευτροφισμού, οδηγούν στην έξαρση τοξικών ανθήσεων του νερού (Harmful Algal Blooms – HABs). Πρόκειται για τοξικά είδη μικροφυκών τα οποία δύναται να παράγουν θαλάσσιες βιοτοξίνες. Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αύξηση στη συσσώρευση θαλάσσιων βιοτοξινών στο είδος *Mytilus galloprovincialis* (Μεσογειακό μύδι), ιδιαίτερα στον Θερμαϊκό Κόλπο. Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η βιοτοξίνη PnTXG. Ανήκει στις κυκλικές ιμίνες, που είναι λιπόφιλες νευροτοξίνες. Για την μελέτη λήφθηκαν 10 δείγματα μυδιών, από δύο περιοχές του Θερμαϊκού Κόλπου (Πιερία, Θεσσαλονίκη). Έπειτα από κατάλληλη επεξεργασία, τα δείγματα αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης συνδεδεμένη με φασματομετρία μάζας σε σειρά (UHPLC – MS/MS). Η PnTXG ανιχνεύτηκε σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του ορίου ανίχνευσης της μεθόδου (LOQ) σε 7 δείγματα. Από την έρευνα συμπεραίνεται, ότι η PnTXG βιοσυσσωρεύεται στα μύδια του Θερμαϊκού κόλπου και η παρακολούθησή της δύναται να συμβάλει στην προστασία της δημόσιας υγείας.

Λέξεις – κλειδιά
PnTXG, *Mytilus galloprovincialis*, HABs, *Vulcanodinium rugosum*, UHPLC – MS/MS

Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αύξηση των θαλάσσιων βιοτοξινών, που βιοσυσσωρεύονται σε διάφορα είδη ζώντων δίθυρων μαλακίων. Συγκεκριμένα στη Βόρεια Ελλάδα και ειδικά στον Θερμαϊκό Κόλπο, όπου βρίσκεται η πλειονότητα των ελληνικών μυδοκαλλιεργειών του *Mytilus galloprovincialis*, τα συχνά τοξικά φαινόμενα δύναται να εντείνουν την παραγωγή θαλάσσιων βιοτοξινών.

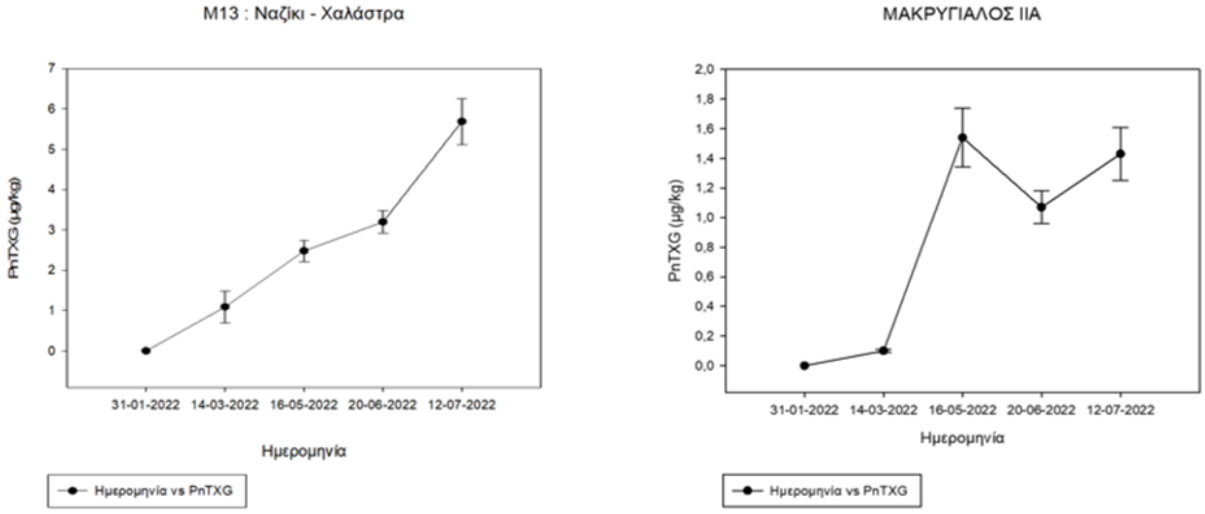
Η PnTXG, αποτελεί αναδυόμενη θαλάσσια βιοτοξίνη και ανήκει στην ομάδα των πιννατοξινών (PnTXs), που συγκαταλέγονται στις κυκλικές ιμίνες (Otero & Silva 2022), τοξίνες για τις οποίες έχει

αναφερθεί τοξικότητα σε πειραματόζωα (Munday R., Selwood A.I. & Rhodes L. 2012, Sosa S. et al. 2020). Για τις τοξίνες αυτές δεν έχουν καθοριστεί ακόμα κανονιστικά όρια από την Ευρωπαϊκή Ένωση. Παράγονται από το θαλάσσιο δινομαστιγωτό *Vulcanodinium rugosum* (Nézan & Chomérat 2011). Στην Ελλάδα, μέχρι σήμερα δεν έχουν αναφερθεί περιστατικά τοξίκωσης στον άνθρωπο, ωστόσο, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων, παρατηρήθηκε κατόπιν ενδοπεριτοναϊκής έγχυσης, τοξικότητα σε ζώα εργαστηρίου (EFSA 2010). Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανίχνευση της PnTXG και η συμβολή των αποτελεσμάτων στον πιθανό καθορισμό κανονιστικών ορίων από την Ευρωπαϊκή Ένωση.

Μέθοδοι

Οι αναλύσεις για τον προσδιορισμό της μελετούμενης τοξίνης, πραγματοποιήθηκαν στο Διαπιστευμένο Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Θαλάσσιων Βιοτοξινών και τοξινών λοιπών υδάτων, του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων. Συνολικά λήφθηκαν 10 δείγματα από τις περιοχές Χαλάστρας και Μακρύγιαλου.

	PnTXG	
Ημερομηνία	Μακρύγιαλος ΠΑ	Μ13: Ναζίκι – Χαλάστρα
31.01.2022	<LOD	<LOD
14.03.2022	0,1 (<LOQ)	1,09 (>LOQ)
16.05.2022	1,54 (>LOQ)	2,48 (>LOQ)
20.06.2022	1,07 (>LOQ)	3,20 (>LOQ)
12.07.2022	1,43 (>LOQ)	5,69 (>LOQ)



Εικόνα 1 . Ημερομηνίες δειγματοληψιών και τα αντίστοιχα αποτελέσματα για κάθε περιοχή.

Για την προετοιμασία των δειγμάτων, εκχυλίστηκαν 2 g ομογενοποιημένου ολικού ιστού μυδιών με μεθανόλη 100%. Τα εκχυλίσματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης-συζευγμένης με φασματομετρία μάζας σε σειρά (UHPLC-MS/MS), στο σύστημα WATERS ACQUITY- QUATRO MICRO. Η ποσοτικοποίηση διενεργήθηκε με πρότυπη καμπύλη αναφοράς, με το λογισμικό TargetLynx.

Αποτελέσματα

Έπειτα από την ανάλυση, τα αποτελέσματα χαρακτηρίζονται ως: μη ανιχνεύσιμα (<LOD), μη ποσοτικοποιήσιμα (<LOQ), ανιχνεύσιμα (>LOD), ποσοτικοποιήσιμα (>LOQ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.

Και στις δύο περιοχές δειγματοληψιών, η πλειονότητα των αποτελεσμάτων θεωρούνται ως ποσοτικοποιήσιμα (>LOQ). Κατά την πρώτη δειγματοληψία (31.01.2022), και στις δύο περιοχές παρατηρήθηκε η χαμηλότερη θερμοκρασία. Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν μη ανιχνεύσιμα (<LOD). Στις επόμενες δειγματοληψίες, κατά τη σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας, παρατηρείται και σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης της μελετούμενης τοξίνης.

Συμπεράσματα

Από την παρούσα έρευνα προκύπτει ότι η ανίχνευση της PnTXG πιθανόν να επηρεάζεται από την αύξηση της θερμοκρασίας. Σύμφωνα με τους Kim et al. (2022), η υπερθέρμανση του πλανήτη έχει οδηγήσει στην αύξηση των μέσων θερμοκρασιών παγκοσμίως, όπως και των θαλασσών. Οι αλλαγές αυτές αυξάνουν την συχνότητα εμφάνισης των HABs, τα οποία με τη σειρά τους δύναται να παράγουν θαλάσσιες βιοτοξίνες. Σύμφωνα με τους Abadie et al. (2016), Moore et al. (2010), το 2013 η πυκνότητα του *Vulcanodinium rugosum*, βρέθηκε στο υψηλότερο επίπεδο μεταξύ Ιουνίου και Σεπτεμβρίου. Καθώς τα επίπεδα των θερμοκρασιών των θαλασσών αυξάνονται λόγω της κλιματικής αλλαγής, ευνοείται η αύξηση του πληθυσμού του δυνητικά τοξικού *Vulcanodinium rugosum* και συνεπώς της πιθανής βιοσυσσώρευσης PnTXG στα μύδια. Παρόλο που η μελέτη της συγκεκριμένης τοξίνης βρίσκεται σε αρχικά στάδια, εντούτοις τα πρώτα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η κλιματική αλλαγή μέσω της αύξησης της θερμοκρασίας αλλά και άλλων περιβαλλοντικών στρεσσογόνων παραγόντων πιθανόν να ευνοήσει περαιτέρω την αύξηση του πληθυσμού του δυνητικά τοξικού *Vulcanodinium rugosum* και συνεπώς την πιθανή βιοσυσσώρευση PnTXG. Ο καθορισμός κανονιστικών ορίων από την ΕΕ, αποτελεί θέμα συζήτησης τα τελευταία χρόνια. Επιπροσθέτως, η δημιουργία ενός συστήματος παρακολούθησης των αβιοτικών παραμέτρων του νερού και έγκυρης προειδοποίησης (early warning system) με σκοπό την ενημέρωση των μυδοκαλλιεργητών, θα συμβάλλει στην έγκαιρη λήψη μέτρων. Απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση της τοξικής δράσης της PnTXG στον άνθρωπο για την προστασία της δημόσιας υγείας.

Βιβλιογραφία

Abadie E., Muguet A., Berteaux T., et al. (2016). Toxin and Growth Responses of the Neurotoxic Dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* to Varying Temperature and Salinity. Toxins, 8 (5), 136.

European Food Safety Authority (2010). Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Cyclic imines (spirolides, gymnodimines, pinnatoxins and pteriatoxins). EFSA Journal, 8 (6), 1628.

Kim Y-S., An H-J., Kim J., et al. (2022). Current Situation of Palytoxins and Cyclic Imines in Asia-Pacific Countries: Causative Phytoplankton Species and Seafood Poisoning. Int. J. Environ. Res. Public Health, 19 , 4921.

Moore S.K., Mantua N.J., Hickey B.M., et al. (2010). The relative influences of El Niño-Southern Oscillation and Pacific Decadal Oscillation on paralytic shellfish toxin accumulation in Pacific Northwest shellfish. Limnology and Oceanography, 55(6), 2262–2274.

Munday R., Selwood A.I., Rhodes L. (2012). Acute toxicity of pinnatoxins E, F and G to mice. Toxicon, 60,6, 995-999.

Nézan, E. & Chomérat, N. (2011). *Vulcanodinium rugosum* gen. et sp. nov. (Dinophyceae), un nouveau dinoflagellé´ marin de la côte méditerranéenne française. Cryptogam. Algol. 32, 3–18.

Otero, P. & Silva, M. (2022). Emerging Marine Biotoxins in EuropeanWaters: Potential Risks and Analytical Challenges. Mar. Drugs 2022, 20, 199.

Pörtner, H. (2010). Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. J. Exp. Biol. 213, 881–893.

Pörtner, H. & Peck, A. (2010). Climate change effects on fishes and fisheries: towards a cause-and-effect understanding. J. Fish Biol. 77, 1745–1779.

Sosa S., Pelin M., Cavion F., et al. (2020). Acute Oral Toxicity of Pinnatoxin G in Mice. Toxins, 12 (2), 87.

Η έκφραση του KLF2 (Krüppel-like factor 2) στους πνευμονικούς ινοβλάστες συνδέεται με την ανοσο-ινωτική τους συμπεριφορά σε περιβάλλον COVID-19

ΝΑΤΣΗ Αναστασία-Μαρία, [a,1], ΓΑΒΡΙΗΛΙΔΗΣ Ευστράτιος [a,b,2], ΧΡΥΣΑΝΘΟΠΟΥΛΟΥ Ακριβή [a], ΑΝΤΩΝΙΑΔΟΥ Χριστίνα [a,b], ΤΣΙΡΟΝΙΔΟΥ Βικτώρια[a], ΣΚΕΝΔΡΟΣ Παναγιώτης[a,b,3], ΡΙΤΗΣ Κωνσταντίνος[a,b,3]

[a, b] *Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Εργαστήριο Μοριακής Αιματολογίας & Α' Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Αλεξανδρούπολης*
[3] *κοινή επίβλεψη της μελέτης*
E-mail addresses: anastasiamaria1997@hotmail.com [1], stratosgbrl@gmail.com [2]

Περίληψη
Οι πνευμονικοί ινοβλάστες, διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της COVID-19, τόσο στην οξεία, όσο και στην χρόνια πνευμονική προσβολή. Στην παρούσα μελέτη, διερευνήθηκε η επίδραση του φλεγμονώδους μικροπεριβάλλοντος της νόσου, στο ινωτικό δυναμικό των ινοβλαστών, και η συσχέτιση της με την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα KLF2. Η έκφραση του KLF2 καταστέλλεται σημαντικά στους ανθρώπινους πνευμονικούς ινοβλάστες, όταν διεγείρονται με πλάσμα από ασθενείς με σοβαρή COVID-19. Συγχρόνως, αποκτούν προ-ινωτικό φαινότυπο, που χαρακτηρίζεται από την υπερέκφραση CCN2. Η υπο-έκφραση του KLF2 και η ινωτική διεργασία, αναστρέφονται ταυτόχρονα, όταν χρησιμοποιούνται συνδυαστικά in vitro φαρμακευτικοί παράγοντες, έναντι της NETωσης και της JAK/IL-6 σηματοδότησης (θεραπεία COMBI). Σε κλινικό επίπεδο, η COMBI θεραπεία σχετίστηκε με σημαντικά καλύτερη έκβαση στους ασθενείς με σοβαρή νόσο COVID-19. Τα παραπάνω αποτελέσματα, παρέχουν μία μηχανιστική σύνδεση, μεταξύ της COVID-19-επαγόμενης φλεγμονής και της ινωτικής προσβολής και παράλληλα υποστηρίζουν την έρευνα για τον ρυθμιστικό ρόλο του KLF2 και σε άλλα ανοσο-ινωτικά νοσήματα.

Λέξεις-Κλειδιά
COVID-19, JAK/IL-6, KLF2, πνευμονικοί ινοβλάστες, DNaseI

Εισαγωγή

Κύριοι μηχανισμοί στην παθοφυσιολογία της COVID-19, αποτελούν η ανοσο-θρόμβωση και ανοσο-ίνωση (1–3). Η πνευμονική ίνωση, θεωρείται μία από τις σημαντικότερες επιπλοκές της νόσου, καθώς επηρεάζει την έκβαση και την ποιότητα ζωής των ασθενών που επιβιώνουν (4). Κυρίαρχο ρόλο κατά τις διαδικασίες αυτές, στο περιβάλλον του πνεύμονα, κατέχουν οι ινοβλάστες (5). Η συγκεκριμένη μελέτη, βασίστηκε σε προηγούμενα αποτελέσματα της ομάδας μας, σύμφωνα με τα οποία, η ανοσοτροποποιητική συνδυαστική θεραπεία COMBI, αποτελούμενη από DNase, για την διάλυση θρομβογόνων εξωκυτταρικών ουδετεροφιλικών παγίδων (NETs), Baricitinib (εκλεκτικός αναστολέας κινασών JAK1/2) και Tocilizumab (αναστολέας υποδοχέα της IL-6), σχετίστηκε με χαμηλότερα ποσοστά θνητότητας, πιθανότητας για διασωλήνωση και βραχύτερη ενδονοσοκομειακή νοσηλεία. Παράλληλα, η *in vitro* αναστολή του άξονα TF/θρομβίνης, προλάμβανε τις σχετιζόμενες με τη νόσο, θρομβο-φλεγμονώδεις αποκρίσεις (6).

Ο KLF2, εμπλέκεται σε ποικίλες κυτταρικές ρυθμιστικές διεργασίες σε διάφορους ιστούς, ενώ ο προστατευτικός του ρόλος είναι τεκμηριωμένος στα ενδοθηλιακά κύτταρα, προάγοντας την ομοιόσταση και ακεραιότητα των αγγείων (7,8). Παράλληλα, πειραματικά μοντέλα ίνωσης, συνδέουν την μειωμένη έκφραση του, με την επιδείνωση της νόσου, ενώ αντιθέτως, η υπερ-έκφραση του ασκεί αντι-ινωτικές επιδράσεις (9,10). Σκοπός της εργασίας, είναι η μελέτη της επίδρασης του μικροπεριβάλλοντος της COVID-19, σε ανθρώπινους πνευμονικούς ινοβλάστες και η συσχέτιση της ινωτικής διαδικασίας με την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα KLF2.

Μέθοδοι

Για την μελέτη, απομονώθηκε πλάσμα από ασθενείς με σοβαρή COVID-19 (PO2/FiO2<100mmHg), πριν

λάβουν ανοσοτροποποιητική ή αντιθρομβωτική θεραπεία. Παράλληλα, απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν ανθρώπινοι πνευμονικοί μυοϊνοβλάστες, προερχόμενοι από φυσιολογικό ιστό, μετά από βιοψία πνεύμονα, που διενεργήθηκε για διαγνωστικούς λόγους. Για την διερεύνηση της επίδρασης του μικροπεριβάλλοντος της νόσου, στο ινωτικό δυναμικό των ινοβλαστών και τη συσχέτιση αυτής με την έκφραση του KLF2, πραγματοποιήθηκαν real-time qPCR, ποσοτικοποίηση κολλαγόνου (collagen assay), ανοσοφθορισμός και μέτρηση της μεταναστευτικής ικανότητας των ινοβλαστών (wound healing assay). Επίσης, για την μελέτη της επίδρασης της νόσου στην διαδικασία της ίνωσης και την αναστροφή του ινωτικού φαινομένου, πραγματοποιήθηκαν στους ινοβλάστες συγκαλλιέργειες με το πλάσμα ασθενών, παρουσία ή μη των φαρμακευτικών παραγόντων, που χρησιμοποιούνται στην συνδυασμένη θεραπεία COMBI, σε ασθενείς με σοβαρή COVID-19 (DNAse, Baricitinib,Tocilizumab).

Αποτελέσματα

Το φλεγμονώδες περιβάλλον της COVID-19, ενισχύει το ινωτικό δυναμικό των πνευμονικών ινοβλαστών in vitro, ενώ η COMBI θεραπεία αναστέλλει το φαινόμενο

Πνευμονικοί ινοβλάστες επωάστηκαν με πλάσμα ασθενών με σοβαρή COVID-19, με αποτέλεσμα την αύξηση των επίπεδων του δείκτη ίνωσης CCN2 (**connective tissue growth factor**, CTGF) (11), σε mRNA και πρωτεϊνικό επίπεδο, καθώς και την αύξηση της παραγωγής κολλαγόνου.

Για τον καθορισμό του ρόλου διαφόρων φλεγμονωδών παραγόντων και μονοπατιών, έγιναν αναστολές τόσο στο πλάσμα, όσο και απευθείας στους ινοβλάστες. Αρχικά, βάσει των προηγούμενων ενθαρρυντικών αποτελεσμάτων της ομάδας μας (6), πραγματοποιήθηκε συνδυαστική αναστολή με DNAseI, Baricitinib και Tocilizumab, με αποτέλεσμα την μεγαλύτερη μείωση στα επίπεδα CCN2 (σε mRNA & πρωτεϊνικό επίπεδο), καθώς και ελάττωση της παραγωγής κολλαγόνου. Βασιζόμενοι σε προηγούμενες δημοσιεύσεις, που εμπλέκουν τα υψηλά επίπεδα IL-6 (12,13) και την εμπλοκή του άξονα TF/θρομβίνης (2,14), στην παθοφυσιολογία της COVID-19, πραγματοποιήθηκαν μεμονωμένες αναστολές με Tocilizumab και Dabigatran (αναστολέας θρομβίνης). Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση στα επίπεδα CCN2 και κολλαγόνου. Οι μεμονωμένες αναστολές με Baricitinib και DNaseI, πέτυχαν την αναστροφή της ινωτικής διεργασίας, μέσω μείωσης του CCN2, ωστόσο όχι στον βαθμό που επιτεύχθηκε με την συνδυαστική αναστολή (COMBI) (Εικόνα 1A).

Η υπο-έκφραση του KLF2 σε περιβάλλον COVID-19, σχετίζεται με το ινωτικό δυναμικό των ινοβλαστών , ενώ η COMBI θεραπεία αναστρέφει το φαινόμενο

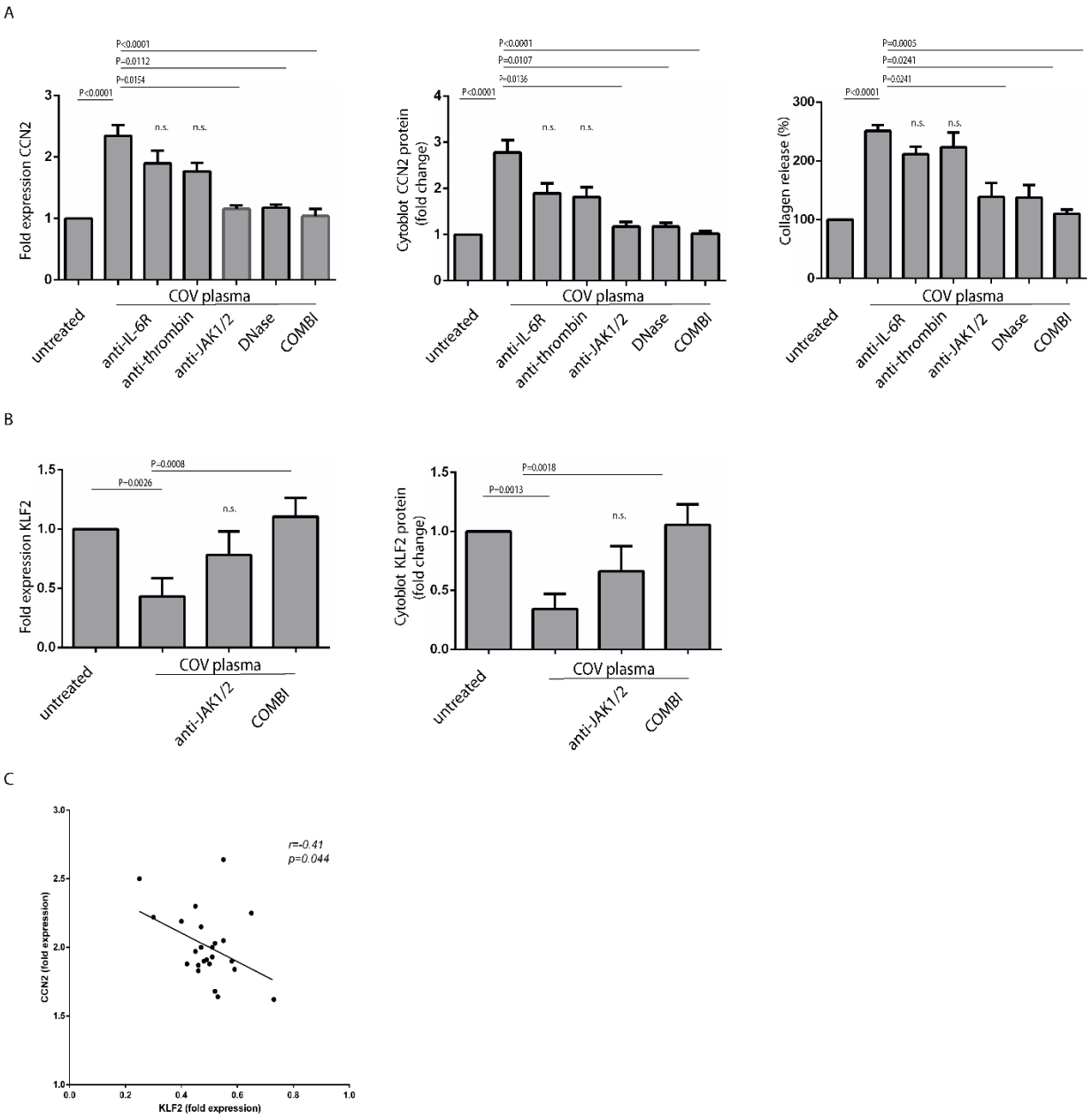
Η διέγερση ινοβλαστών με COVID-19 πλάσμα, οδήγησε σε ελάττωση των επιπέδων του KLF2 (mRNA και πρωτεϊνικό επίπεδο), ενώ η προ-επώαση με τους αναστολείς της COMBI, τον επανέφερε σε φυσιολογικά επίπεδα (Εικόνα 1B). Η προ-επώαση αποκλειστικά με Baricitinib (15), δεν κατόρθωσε να μεταβάλλει σημαντικά τα επίπεδα του KLF2. Παράλληλα, διαπιστώθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του KLF2 και του ινωτικού παράγοντα CCN2, (Εικόνα 1C). Τα παραπάνω αποτελέσματα, προτείνουν, ότι η διαμεσολαβούμενη από το φλεγμονώδες περιβάλλον της COVID-19, υπο-έκφραση του KLF2, σχετίζεται με το ινωτικό δυναμικό των ινοβλαστών, φαινόμενο, το οποίο αναστρέφεται από την COMBI θεραπεία.

Συμπεράσματα

Η επώαση πνευμονικών ινοβλαστών με COVID-19 πλάσμα, οδηγεί στην απόκτηση προ-ινωτικού φαινοτύπου, φαινόμενο που συνδέεται, με την υπο-έκφραση του KLF2. Η διαδικασία αυτή, δύναται να αναστραφεί με την αναστολή της JAK/STAT/IL-6 σηματοδότησης και της αποικοδόμησης των NETs. Τα παραπάνω δεδομένα προτείνουν μία μηχανιστική εξήγηση, για τα ευνοϊκότερα αποτελέσματα της COMBI θεραπείας, σε COVID-19 ασθενείς.

Η παρούσα μελέτη, διερευνά για πρώτη φορά την έκφραση του KLF2 σε ανθρώπινους πνευμονικούς ινοβλάστες σε φυσιολογικές συνθήκες, στις φλεγμονώδεις συνθήκες της σοβαρής νόσου COVID-19, και παρουσία καθιερωμένων ανοσοτροποποιητικών παραγόντων, που στοχεύουν την NETωση και την JAK/IL-6 σηματοδότηση. Συνολικά τα ευρήματα, ενθαρρύνουν την έρευνα για τον ρόλο του KLF2 στην

φλεγμονή και στην ίνωση, με σκοπό την ανακάλυψη νέων διαγνωστικών και θεραπευτικών στόχων.



Εικόνα 1. (A) Μελέτες της αναστολής του ινωτικού δυναμικού των πνευμονικών ινοβλαστών, σε περιβάλλον COVID-19. (1) qPCR, (2) In-cell ELISA, (3) Collagen assay
(B) Η υπο-έκφραση του KLF2 στους πνευμονικούς ινοβλάστες, σχετίζεται με το ινωτικό δυναμικό τους, σε περιβάλλον COVID-19. (1) qPCR, (2) In-cell ELISA
(C) Αρνητική συσχέτιση mRNA επιπέδων KLF2 και CCN2 (Pearson's r, n=24).

Βιβλιογραφία

Bonaventura A, et al. (2021). Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19. Nat Rev Immunol.,1–11.

Skendros P, et al. (2020). Complement and tissue factor-enriched neutrophil extracellular traps are key drivers in COVID-19 immunothrombosis. J Clin Invest.,11,6151–7.

Chun HJ, et al. (2021). Immunofibrotic drivers of impaired lung function in postacute sequelae of SARS-CoV-2 infection. JCI Insight,14,148476.

Mantovani A, et al. (2022). Long Covid: where we stand and challenges ahead. Cell Death Differ.,10,1891–900.

Rendeiro AF, et al. (2021). The spatial landscape of lung pathology during COVID-19 progression. Nature,7860,564–9.

Gavriilidis E, et al. (2022). Combined administration of inhaled DNase, baricitinib and tocilizumab as rescue treatment in COVID-19 patients with severe respiratory failure. Clinical Immunology,238,109016.

Wu D, et al. (2021) SARS-CoV-2 Infection Is Associated with Reduced Krüppel-like Factor 2 in Human Lung Autopsy. Am J Respir Cell Mol Biol.,65,222–6.

Xu S, et al. (2021). The zinc finger transcription factor, KLF2, protects against COVID-19 associated endothelial dysfunction. Signal Transduct Target Ther.,6,266.

Shi J, et al. (2018). KLF2 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis and inflammation with regulation of AP-1. Biochem Biophys Res Commun., 495,20–26.

Marrone G, et al. (2015). KLF2 exerts antifibrotic and vasoprotective effects in cirrhotic rat livers: behind the molecular mechanisms of statins. Gut. 2015, 64(9),1434–43.

Lipson KE, et al. (2012). CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. Fibrogenesis & Tissue Repair. 5,24.

RECOVERY Collaborative Group. (2021). Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial. Lancet. 397(10285), 1637–45.

Santa Cruz A, et al. (2021). Interleukin-6 Is a Biomarker for the Development of Fatal Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Pneumonia. Frontiers in Immunology,12,263.

Howell DC, et al. (2001). Direct thrombin inhibition reduces lung collagen, accumulation, and connective tissue growth factor mRNA levels in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Am J Pathol.,159(4),1383–95.

Marconi VC, et al. (2021). Efficacy and safety of baricitinib for the treatment of hospitalised adults with COVID-19 (COV-BARRIER): a randomised, double-blind, parallel-group, placebo-controlled phase 3 trial. Lancet Respir Med, 9(12), 1407-1418.

Μελέτη μη-κωδικών RNA μεταγράφων που εμπλέκονται στην αναπαραγωγική ικανότητα των θηλυκών κουνουπιών Aedes albopictus

ΚΑΤΣΙΑΜΑΝΗ Λευκοθέα – Άννα[1], ΧΑΤΖΗ Βασιλική[1] και ΜΑΤΘΙΟΠΟΥΛΟΣ Κωνσταντίνος[1]

1 Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Λάρισα, 41500, Ελλάδα
lkatsiamani@uth.gr, kmathiop@bio.uth.gr, chavasiliki@uth.gr

Περίληψη
Τα lncRNA (long non-coding RNA, μακρά μη κωδικοποιητικά RNA) μόρια έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον της παγκόσμιας επιστημονικής κοινότητας τα τελευταία χρόνια. Η αιτία του έντονου ενδιαφέροντος των ερευνητών για το μόρια αυτά (και τα γονίδια από τα οποία προκύ- πτουν) πηγάζει κατά κύριο λόγο από την ειδο-ειδικότητά τους και τους ποικίλους τρόπους με τους οποίους μπορούν να επιδράσουν στον τελικό φαινότυπο. Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας μελετούμε τον ρόλο κάποιων τέτοιων μορίων στον φαινότυπο ωοαπώθεσης, εκκόλα- ψης των αυγών και συζευκτικής συμπεριφοράς των θηλυκών κουνουπιών *Ae. albopictus*. Δε- δομένου ότι τα περισσότερα lncRNA γονίδια των *Ae. albopictus* παραμένουν άγνωστα είμαστε βέβαιοι ότι υπάρχουν περισσότερα από ένα γονίδια που ελέγχουν την διαθεσιμότητα των θη- λυκών εντόμων στην σύζευξη και τα οποία εάν στοχευθούν σε συνδυασμό με γονίδια που ε- μπλέκονται στην ωοαπώθεση και την εκκόλαψη των αυγών θα μειώσουν δραστικά τον πληθυ- σμό αυτού του είδους εντόμων που αποτελεί τεράστια απειλή για την δημόσια υγεία.

Λέξεις-κλειδιά
Ae. albopictus, lncRNAs, oviposition, monandry, post-mating behavior

Εισαγωγή

Τα κουνούπια είναι τα πιο θανατηφόρα ζώα στη γη, καθώς είναι υπεύθυνα για περισσότερους από 700.000 θανάτους ετησίως (WHO, 2020). Το ασιατικό κουνούπι τίγρης *(Aedes albopictus)* βρίσκεται μεταξύ των 100 πιο χωροκατακτητικών ειδών παγκοσμίως, ενώ η ικανότητά του να μεταφέρει ιούς (Dengue, Zika, Chikungunya, κ.α.) το καθιστά πιθανή δεξαμενή παθογόνων και ενδεχόμενο υπαίτιο για μια επόμενη πανδημία (Benedict et al 2007). Χαρακτηριστικό του μεγέθους της απειλής που αποτελεί το συγκεκριμένο είδος είναι ότι ένας στους δύο ανθρώπους παγκοσμίως διατρέχει κίνδυνο να νοσήσει από δάγκειο πυρετό, καθώς μέσα σε λιγότερο από 40 χρόνια το είδος *Ae. albopictus* έχει εξαπλωθεί σχεδόν σε όλο τον κόσμο λόγω της μεγάλης προσαρμοστικότητάς του σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες (Bonizzoni et al. 2013, Rochlin et al. 2013).

Η ευκολία των *Ae. albopictus* να εξαπλώνονται και να πολλαπλασιάζονται οφείλεται στο πλή- θος και την ανθεκτικότητα των αυγών τους, στην ταχύτητα εκκόλαψής τους και στην γρήγορη ωρίμανση των νεαρών εντόμων. Μέχρι σήμερα ο πληθυσμός των κουνουπιών ελέγχεται κυ- ρίως με εντομοκτόνα, τα οποία δεν είναι πάντοτε αποτελεσματικά, ενέχουν τον κίνδυνο ανά- πτυξης ανθεκτικότητας (Richards et al. 2020), ενώ συχνά βλάπτουν και οργανισμούς μη-στό- χους (Muzinic et al. 2018). Έτσι, η ανάγκη για ανεύρεση νέων, φιλικών προς το οικοσύστημα μεθόδων καταπολέμησης γίνεται επιτακτική.

Η μετάδοση ασθενειών οφείλεται αποκλειστικά στα θηλυκά άτομα καθώς χρειάζονται γεύμα αίματος για την ωρίμανση των ωοθηκών τους (Roy et al. 2016). Είναι εύλογο λοιπόν, ότι η πλειονότητα των μεθόδων καταπολέμησης των κουνουπιών στοχεύουν στην αναπαραγωγική ικανότητα των θηλυκών εντόμων, διότι έτσι αφενός μειώνεται ο πληθυσμός και αφετέρου ε- λαττώνεται η επαφή τους με τον

άνθρωπο.

Τα τελευταία χρόνια έχουν ανακαλυφθεί νέες ομάδες μη-κωδικών RNA τα οποία έχει δειχθεί ότι μπορούν να αλλάξουν την έκφραση πλήθους γονιδίων μεταβάλλοντας τον τελικό φαινό- τυπο (Azlan, 2019, Yan et al 2019, Feng et al 2018, Li et al 2019). Για τα μικρά μη-κωδικά μόρια (microRNAs ή miRNAs) το πεδίο έχει αρχίσει να ξεδιαλύνει καθώς υπάρχουν αποτε- λεσματικές βιοπληροφορικές προσεγγίσεις εντοπισμού τους. Αντιθέτως, τα μεγάλα μη-κωδικά μόρια (long non-coding RNAs ή lncRNAs) δεν έχουν μελετηθεί τόσο ενδελεχώς λόγω των ποικίλων τρόπων με τους οποίους επηρεάζουν τη ρύθμιση των γονιδίων-στόχων τους. Η μο- ναδική προσέγγιση προς αυτή την κατεύθυνση είναι μια μελέτη του εργαστηρίου μας (Belavilas et al, 2022). Ωστόσο, αφορά μόνο ένα μέρος των lncRNA γονιδίων που εμπλέκονται στην αναπαραγωγική ικανότητα των θηλυκών ατόμων ενώ υπάρχουν μεγάλα περιθώρια μελέ- της αν αναλογιστούμε το πλήθος lncRNA γονιδίων που υπάρχει και τον πιθανό ρόλο τους στη ρύθμιση άλλων γονιδίων. Έτσι, τα lncRNA γονίδια παρουσιάζουν μεγάλο ερευνητικό ενδια- φέρον λόγω της εξειδίκευσής τους ως προς τους γονιδιακούς στόχους που ρυθμίζουν (Xu et al 2019, Patil et al 2014, Farley et al 2021) και τον χαμηλό βαθμό συντήρησής τους ανάμεσα σε συγγενικά είδη (Jenkins et al. 2015, Lucas et al 2013, Azlan et al. 2021). Τα δύο αυτά χαρα- κτηριστικά τα καθιστούν ελκυστικούς στόχους μεθόδων εντομολογικού ελέγχου, διότι πιθανή στόχευσή τους θα παρουσίαζε υψηλή εξειδίκευση, αποκλείοντας έτσι οποιαδήποτε επίδραση σε οργανισμούς μη-στόχους.

Μεθοδολογία

1. Διερεύνηση της επίδρασης ενός συγκεκριμένου γονιδίου (Norma3) στον τελικό φαινό- τυπο αναπαραγωγικής ικανότητας των θηλυκών *Ae. albopictus*. Δεδομένου του ενδια- φέροντος φαινοτύπου που παρατηρήθηκε μετά από μερική σίγηση του γονιδίου Norma3 μέσω χορήγησης dsRNA (βλ. Αποτελέσματα) διερευνούμε την επίδραση στο φαινότυπο του εντόμου μετά από την πλήρη αδρανοποίηση του γονιδίου με CRISPR/Cas9 μεταλλαξιγένεση. Προκειμένου να είναι ο πληθυσμός των εντόμων μας βιώσιμος, σχεδιάζουμε την δημιουργία ειδικών στελεχών εντόμων όπου τα θηλυκά θα φέρουν στο γονιδίωμά τους την πρωτεΐνη Cas9 ενώ τα αρσενικά θα φέρουν τα guide RNA έναντι των γονιδίων-στόχων μας.
2. Έλεγχος της επίδρασης που έχουν άλλα γονίδια στον φαινότυπο που μελετάμε: Θα α- κολουθήσει RNAi σίγηση περισσότερων γονιδίων, η έκφραση των οποίων να:
   α) είναι ιστο-ειδική για τις ωοθήκες και
   β) αυξάνεται μετά από την λήψη γεύματος αίματος
   Τα γονίδια που θα οδηγήσουν στον πιο εντυπωσιακό φαινότυπο θα σιγηθούν συνδυα- στικά μέσω της ταυτόχρονης χορήγησης dsRNA έναντι αυτών. Θα ακολουθήσει προσ- διορισμός του βαθμού σίγησης των γονιδίων-στόχων και παρατήρηση του φαινοτύπου που θα προκύψει.

Αποτελέσματα

Πρόσφατη μελέτη του εργαστηρίου μας (Belavilas et al, 2022) ανέδειξε τη σημασία ορισμένων lncRNA μορίων στον φαινότυπο ωοαπώθεσης και εκκόλαψης των αυγών των Ae. albopictus. Τα εν λόγω lncRNAs ταυτοποιήθηκαν ως διαφορικά εκφραζόμενα στις ωοθήκες θηλυκών ε- ντόμων μετά τη λήψη αίματος. Η καταστολή της έκφρασης ενός εξ αυτών, οδήγησε σε μείωση
της αναπαραγωγικής ικανότητας κατά 73%. Περισσότερα από έξι ακόμα γονίδια της αρχικής ανάλυσης χρήζουν αντίστοιχης μελέτης. Η παρούσα εργασία θα ανοίξει τον δρόμο για τη στο- χευμένη και ειδο-ειδική μείωση των πληθυσμών των κουνουπιών Ae. albopictus.

Συμπεράσματα

Από την βιβλιογραφία και από τα προκαταρκτικά αποτελέσματα του εργαστηρίου μας προκύ- πτει ότι τα lncRNA μπορούν πράγματι να επηρεάσουν τον φαινότυπο. Αναμένουμε ότι με την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας θα μπορέσουμε να μελετήσουμε τον τρόπο με τον οποίο ορισμένα μη-κωδικά γονίδια επηρεάζουν την αναπαραγωγική ικανότητα των θηλυκών κου- νουπιών Ae. albopictus και κατά πόσο η στόχευσή τους μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έ- λεγχο του πληθυσμού τους. Ακόμη, θα

μπορέσουμε να αξιολογήσουμε την φαινοτυπική δια- φορά ανάμεσα στην μείωση της έκφρασης ενός γονιδίου και στην ολοκληρωτική διαγραφή του

Βιβλιογραφία

Azlan, A., Obeidat, S. M., Theva Das, K., Yunus, M. A. & Azzam, G. Genome-wide identification of Aedes albopictus long noncoding RNAs and their association with dengue and Zika virus infection. PLoS Negl Trop Dis 15, e0008351, doi:10.1371/journal.pntd.0008351 (2021).

Azlan, A., Obeidat, S. M., Yunus, M. A. & Azzam, G. Systematic identification and characterization of Aedes aegypti long noncoding RNAs (lncRNAs). Scientific Reports 9, 12147, doi:10.1038/s41598-019-47506-9 (2019).

Belavilas-Trovas A, Gregoriou ME, Tastsoglou S, Soukia O, Giakountis A, Mathiopoulos K. A species-specific lncRNA modulates the reproductive ability of the asian tiger mosquito. Front Bioeng Biotechnol. 2022 Aug 24;10:885767. doi: 10.3389/fbioe.2022.885767. PMID:36091452; PMCID: PMC9448860.

Benedict, M. Q., Levine, R. S., Hawley, W. A. & Lounibos, L. P. Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito Aedes albopictus. Vector Borne Zoonotic Dis 7, 76-85,doi:10.1089/vbz.2006.0562 (2007).

Bonizzoni, M., Gasperi, G., Chen, X. & James, A. A. The invasive mosquito species Aedes albopictus: current knowledge and future perspectives. Trends Parasitol 29, 460-468, doi:10.1016/j.pt.2013.07.003 (2013).

Farley, E. J., Eggleston, H. & Riehle, M. M. Filtering the Junk: Assigning Function to the Mosquito Non-Coding Genome. Insects 12, doi:10.3390/insects12020186 (2021).

Feng, X., Zhou, S., Wang, J. & Hu, W. microRNA profiles and functions in mosquitoes. PLoS Negl Trop Dis 12, e0006463, doi:10.1371/journal.pntd.0006463 (2018).

Jenkins, A. M., Waterhouse, R. M. & Muskavitch, M. A. Long non-coding RNA discovery across the genus anopheles reveals conserved secondary structures within and beyond the Gambiae complex. BMC Genomics 16, 337, doi:10.1186/s12864-015-1507-3 (2015).

Li, M.-z., Xiao, H.-m., He, K. & Li, F. Progress and prospects of noncoding RNAs in insects.Journal of Integrative Agriculture 18, 729-747, doi:https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)61976-8 (2019).

Lucas, K. J., Myles, K. M. & Raikhel, A. S. Small RNAs: a new frontier in mosquito biology.Trends in Parasitology 29, 295-303, doi:https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.04.003 (2013).

Muzinic, V. & Zeljezic, D. Non-target toxicity of novel insecticides. Arh Hig Rada Toksikol 69, 86-102, doi:10.2478/aiht-2018-69-3111 (2018).

Patil, V. S., Zhou, R. & Rana, T. M. Gene regulation by non-coding RNAs. Crit Rev Biochem Mol Biol 49, 16-32, doi:10.3109/10409238.2013.844092 (2014).

Richards, S. L., Byrd, B. D., Reiskind, M. H. & White, A. V. Assessing Insecticide Resistance in Adult Mosquitoes: Perspectives on Current Methods. Environ Health Insights 14, 1178630220952790, doi:10.1177/1178630220952790 (2020).

Rochlin, I., Ninivaggi, D. V., Hutchinson, M. L. & Farajollahi, A. Climate change and range expansion of the Asian tiger mosquito (Aedes albopictus) in Northeastern USA: implications for public health practitioners. PLoS One 8, e60874, doi:10.1371/journal.pone.0060874 (2013).

Roy, S. et al. in Advances in Insect Physiology Vol. 51 (ed Alexander S. Raikhel) 115-144 (Academic Press, 2016).

WHO. Vector-borne Diseases (2020)

Xu, Y. et al. Differentiation of Long Non-Coding RNA and mRNA Expression Profiles in Male and Female Aedes albopictus. Front Genet 10, 975, doi:10.3389/fgene.2019.00975 (2019).

Yan, Q., Zhu, C., Guang, S. & Feng, X. The Functions of Non-coding RNAs in rRNA Regulation. Front Genet 10, 290, doi:10.3389/fgene.2019.00290 (2019).

Εργαστηριακή διερεύνηση υδατογενούς επιδημίας από Salmonella enterica enterica ser. Bovismorbificans

ΝΤΟΥΡΟ Νταγιάνα, ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ Γεώργιος, KARAJ Γρηγόρης, ΤΡΑΓΑΡΗ Δήμητρα, ΣΠΗΛΙΟΠΟΥΛΟΥ Ιωάννα, ΣΙΔΕΡΟΓΛΟΥ Θεολογία, ΧΡΥΣΟΣΤΟΜΟΥ Ανθή, ΠΟΛΕΜΗΣ Μιχάλης, ΜΕΛΛΟΥ Κασσιανή, ΜΑΝΔΗΛΑΡΑ Γεωργία

Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, Μεταπτυχιακή φοιτήτρια, ntanintou98@gmail.com
Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, Μεταπτυχιακός φοιτητής, gepapageo@biol.uoa.gr
Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, Προπτυχιακός φοιτητής, grigorioskaraj@gmail.com
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, ΠΑΔΑ, Προπτυχιακή φοιτήτρια, bisc19678310@uniwa.gr
EUPHEM Fellow, i.spiliopoulou@eody.gov.gr
Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας, t.siderouglou@eody.gov.gr, a.chrysostomou@eody.gov.gr, *m.polemis@eody.gov.gr* , k.mellou@eody.gov.gr
Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Σαλμονελών, Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας, Σχολή Δημόσιας Υγείας Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, gmandilara@uniwa.gr

Περίληψη
Η *Salmonella* spp. σύμφωνα με το ECDC είναι το πιο κοινό αίτιο τροφιμογενών επιδημιών, καταγράφοντας το 2020 στην Ε.Ε. 694 επιδημίες. Στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Σαλμονελλών (ΕΚΑΣ) αποστέλλονται κλινικά καλλιεργήματα σαλμονελών με σκοπό την επιδημιολογική επιτήρηση. Τον Σεπτέμβριο του 2022 έγινε ενημέρωση από τον ΕΟΔΥ σχετικά με συρροή κρουσμάτων υδατογενούς σαλμονέλωσης σε περιοχή της Πελοποννήσου. Στο ΕΚΑΣ εστάλησαν συνολικά 10 καλλιεργήματα *Salmonella* spp, 8 κλινικά και 2 από πόσιμο νερό της περιοχής. Τα καλλιεργήματα οροτυποποιήθηκαν ως *S.* Bovismorbificans. Η μοριακή τυποποίηση έδειξε ότι τα καλλιεργήματα της συρροής (κλινικά και νερού) είχαν πανομοιότυπο μοριακό προφίλ και διαφορετικό μοριακό προφίλ από τα επιδημιολογικά μη σχετιζόμενα ίδιου οροτύπου, καταδεικνύοντας ότι υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ τους. Συν-αξιολόγηση με τα δεδομένα που προέκυψαν από την επιδημιολογική διερεύνηση επιβεβαίωσε τη συσχέτιση αυτή. Η επιδημιολογική και η εργαστηριακή επιτήρηση της σαλμονέλωσης, πρέπει να πραγματοποιούνται παράλληλα προκειμένου να συνάγονται ασφαλή συμπεράσματα και να γίνονται έγκαιρα παρεμβάσεις για την προστασία της δημόσιας υγείας.

Λέξεις-Κλειδιά
Salmonella, ορότυπος, επιτήρηση, επιδημία

Εισαγωγή

Η *Salmonella* spp. σύμφωνα με το Ευρωπαϊκό Κέντρο Ελέγχου Νοσημάτων αποτελεί τη «βασίλισσα» των τροφιμογενών παθογόνων μικροβίων. Για το έτος 2020 η μέση ετήσια δηλούμενη επίπτωση σαλμονέλωσης στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης ήταν 13,7 /100.000 πληθυσμού και στην Ελλάδα αντίστοιχα 3,57/100.000 πληθυσμού, ενώ για την τετραετία 2016-2019 ήταν κατά μέσο όρο στην Ε.Ε. 19,5/100.000, και στην Ελλάδα 6,38/100.000 πληθυσμού. Η μείωση της δηλωθείσας επίπτωσης πιθανά οφείλεται στην πανδημία COVID-19, όπου η εφαρμογή περιοριστικών μέτρων περιόρισε την έκθεση του πληθυσμού σε πιθανούς κινδύνους αλλά και οι μηχανισμοί της δημόσιας υγείας είχαν στραφεί στη διαχείριση της πανδημίας. Η Σαλμονέλα είναι το πιο κοινό αίτιο τροφιμογενών επιδημιών. Το 2020 καταγράφηκαν στην Ε.Ε. 694 επιδημίες.

Στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Σαλμονελών (ΕΚΑΣ) αποστέλλονται καλλιεργήματα σαλμονελών που απομονώνονται από όλα τα Νοσοκομεία της Ελλάδος για περαιτέρω τυποποίηση και χαρακτηρισμό, με σκοπό την επιδημιολογική επιτήρηση των στελεχών που κυκλοφορούν στην Ελλάδα, ως προς τον ορότυπο, την αντοχή σε αντιβιοτικά κ.λ.π. Στόχος της εργαστηριακής επιτήρησης είναι να αναγνωρίζονται εγκαίρως ανοιχτές συρροές κρουσμάτων σαλμονέλωσης αλλά και πιθανές αυξητικές τάσεις-διασπορά κάποιων συγκεκριμένων στελεχών, με σκοπό τις άμεσες ενέργειες παρέμβασης για την προστασία της δημόσιας υγείας.

Ο ορότυπος S. Bovismorbificans τα τελευταία χρόνια στην Ελλάδα είναι ένας από τους 5 συχνότερους ορότυπους από κλινικά δείγματα με συχνότητα απομόνωσης την περίοδο 2015-2019 4,55%, ενώ το 2020 αυξήθηκε δραματικά σε ποσοστό 13,1%.

Τον Σεπτέμβριο του 2022 έγινε ενημέρωση από τον Εθνικό Οργανισμό Δημόσιας Υγείας σχετικά με συρροή κρουσμάτων υδατογενούς γαστρεντερίτιδας σε περιοχή της Πελοποννήσου, οφειλόμενη στο βακτήριο της σαλμονέλας, με αίτημα να πραγματοποιηθεί τυποποίηση των καλλιεργημάτων σαλμονέλας από ασθενείς της επιδημίας αλλά και από πόσιμο νερό και να γίνει εργαστηριακή διερεύνηση.

Σκοπός

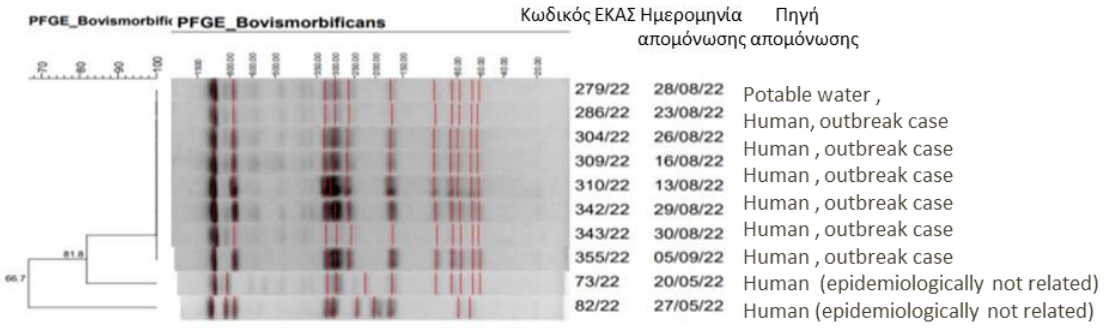
Στην παρούσα εργασία θα περιγραφεί η εργαστηριακή διερεύνηση υδατογενούς επιδημίας σαλμονέλωσης στην Ελλάδα, την περίοδο Σεπτέμβριος-Οκτώβριος 2022 και η ανεύρεση της πιθανής κοινής πηγής μόλυνσης.

Υλικά και Μέθοδοι

Στο ΕΚΑΣΣ εστάλησαν συνολικά 10 καλλιεργήματα *Salmonella* spp που αφορούσαν στη συρροή κρουσμάτων σαλμονέλωσης, 8 κλινικά και 2 από νερό της περιοχής. Πραγματοποιήθηκε οροτυποποίηση με τη μέθοδο οροσυγκόλληση επί πλακός, (Kaufmann-White Le Minor Scheme). Μελετήθηκαν όλα τα καλλιεργήματα ως προς την αντοχή τους σε μια ομάδα 16 αντιμικροβιακών ουσιών που εκπροσωπούν όλες τις κλασικές ομάδες (κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες, αμινογλυκοσίδες κ.ά.) με τη μέθοδο Kirby-Bauer (κατά EUCAST) και στη συνέχεια έγινε μοριακή τυποποίηση με τη μέθοδο της πέψης του DNA με περιοριστική ενδονουκλεάση και ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο πεδίο (Pulsed Field Gel Electrophoresis-PFGE). Το Δενδρόγραμμα κατασκευάστηκε με το Πρόγραμμα Bionumerics 6.6 (Applied Maths). Στη μοριακή τυποποίηση συμπεριλήφθηκαν και δύο μη σχετιζόμενα επιδημιολογικά καλλιεργήματα *S.* Bovismorbificans (διαφορετική χρονική περίοδο και, διαφορετική γεωγραφική περιοχή απομόνωσης).

Αποτελέσματα

Όλα τα καλλιεργήματα ανήκαν στον ορότυπο *Salmonella enterica enterica* ser. Bovismorbificans (εκτός ενός από από τα δείγματα νερού που ανήκε στον ορότυπο S.Bardo) και ήταν ευαίσθητα στα εξετασθέντα αντιβιοτικά. Η μοριακή τυποποίηση 8 καλλιεργημάτων της συρροής και 2 καλλιεργημάτων επιδημιολογικά μη σχετιζόμενων ίδιου οροτύπου (διαφορετική χρονική περίοδο απομόνωσης και διαφορετική γεωγραφική περιοχή) έδειξε ότι τα καλλιεργήματα της συρροής είχαν πανομοιότυπο μοριακό προφίλ (100% ομοιότητα) και διαφορετικό μοριακό προφίλ από τα επιδημιολογικά μη σχετιζόμενα (Γράφημα 1).



Γράφημα 1: Δενδρόγραμμα με τα μοριακά προφίλ που προέκυψαν από την εφαρμογή της μεθόδου μοριακής τυποποίησης PFGE. Τα καλλιεργήματα 73/22 και 82/22 είναι επιδημιολογικά μη σχετιζόμενα με τη συρροή.

Συμπεράσματα

Από την εργαστηριακή διερεύνηση προκύπτει ότι υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του καλλιεργήματος *S.* Bovismorbificans από το πόσιμο νερό της περιοχής και των κλινικών καλλιεργημάτων Συν-αξιολόγηση με τα δεδομένα που προέκυψαν από την επιδημιολογική διερεύνηση επιβεβαίωσε τη συσχέτιση αυτή.

Η επιδημιολογική και η εργαστηριακή επιτήρηση των κρουσμάτων σαλμονέλωσης, στα πλαίσια και της επιτήρησης αλλά και της διερεύνησης τροφιμογενών επιδημιών, πρέπει να πραγματοποιούνται παράλληλα προκειμένου να συνάγονται ασφαλή συμπεράσματα και να γίνονται έγκαιρα παρεμβάσεις για την προστασία της δημόσιας υγείας.

Βιβλιογραφία

Επιδημιολογικά δεδομένα για τη σαλμονέλωση στην Ελλάδα, 2014-2020, ΕΟΔΥ (2021)

EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2021. The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. EFSA Journal 2021;19(12):6971, 324 pp. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971

Διερεύνηση τροφιμογενούς επιδημίας από Salmonella enterica enterica ser. Give

ΝΤΟΥΡΟ Νταγιάνα, ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ Γεώργιος, KARAJ Γρηγόρης, ΤΡΑΓΑΡΗ Δήμητρα, ΣΙΔΕΡΟΓΛΟΥ Θεολογία, ΧΡΥΣΟΣΤΟΜΟΥ Ανθή, ΠΟΛΕΜΗΣ Μιχάλης, ΜΕΛΛΟΥ Κασσιανή, ΜΑΝΔΗΛΑΡΑ Γεωργία

Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, Μεταπτυχιακή φοιτήτρια, ntanintou98@gmail.com
Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, Μεταπτυχιακός φοιτητής, gepapageo@biol.uoa.gr
Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, Προπτυχιακός φοιτητής, grigorioskaraj@gmail.com
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, ΠΑΔΑ, Προπτυχιακή φοιτήτρια, bisc19678310@uniwa.gr
Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας, t.siderouglou@eody.gov.gr, a.chrysostomou@eody.gov.gr, m.polemis@eody.gov.gr , k.mellou@eody..gov.gr
Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Σαλμονελών, Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας, Σχολή Δημόσιας Υγείας Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, gmandilara@uniwa.gr

Περίληψη
Η *Salmonella* spp. αποτελεί το πιο κοινό αίτιο τροφιμογενών επιδημιών σύμφωνα με το ECDC, καταγράφοντας το 2020 στην Ε.Ε. 694 επιδημίες. Στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Σαλμονελλών (ΕΚΑΣ) αποστέλλονται κλινικά καλλιεργήματα σαλμονελών με σκοπό την επιδημιολογική επιτήρηση. Τον Σεπτέμβριο του 2022 έγινε ενημέρωση από τον ΕΟΔΥ σχετικά με συρροή κρουσμάτων τροφιμοφενούς σαλμονέλωσης σε περιοχή της Πελοποννήσου κατά τη διάρκεια ενός πανηγυριού. Στο ΕΚΑΣ εστάλησαν συνολικά 16 κλινικά καλλιεργήματα *Salmonella* spp, και 1 καλλιέργημα από ψημένο χοιρινό κρέας (γουρουνοπούλα). Τα καλλιεργήματα οροτυποποιήθηκαν ως *S.* Give. Η αρχική μοριακή τυποποίηση έδειξε ότι καλλιεργήματα της συρροής (κλινικά και τροφίμου) είχαν πανομοιότυπο μοριακό προφίλ και διαφορετικό μοριακό προφίλ από τα επιδημιολογικά μη σχετιζόμενα ίδιου οροτύπου, καταδεικνύοντας ότι πιθανά υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ τους. Συναξιολόγηση με τα δεδομένα που προέκυψαν από την επιδημιολογική διερεύνηση θα επιβεβαιώσει τη συσχέτιση αυτή. Η επιδημιολογική και η εργαστηριακή επιτήρηση της σαλμονέλωσης, πρέπει να πραγματοποιούνται παράλληλα προκειμένου να συνάγονται ασφαλή συμπεράσματα και να γίνονται έγκαιρα παρεμβάσεις για την προστασία της δημόσιας υγείας.

Λέξεις-Κλειδιά
Salmonella, ορότυπος, επιτήρηση, επιδημία

Εισαγωγή

Η μη τυφοειδής-παρατυφικειδής σαλμονέλλωση εξακολουθεί να αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας. Για το έτος 2020 η μέση ετήσια δηλούμενη επίπτωση σαλμονέλωσης στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης ήταν 13,7/100.000 πληθυσμού και στην Ελλάδα αντίστοιχα 3,57/100.000 πληθυσμού, ενώ για την τετραετία 2016-2019 ήταν κατά μέσο όρο στην Ε.Ε. 19,5/100.000, και στην Ελλάδα 6,38/100.000 πληθυσμού. Η σημαντική μείωση της δηλωθείσας επίπτωσης πιθανά οφείλεται στην πανδημία COVID-19, όπου η εφαρμογή περιοριστικών μέτρων περιόρισε την έκθεση του πληθυσμού σε πιθανούς κινδύνους αλλά και οι μηχανισμοί της δημόσιας υγείας είχαν στραφεί στη διαχείριση της πανδημίας. Η Σαλμονέλα είναι το πιο κοινό αίτιο τροφιμογενών επιδημιών. Τα τελευταία χρόνια καταγράφονται ανοιχτές επιδημίες σαλμονέλωσης μεγάλης έκτασης, λόγω της παγκοσμιοποίησης της παραγωγής και του εμπορίου τροφίμων, των μετακινήσεων του πληθυσμού (ταξίδια, μετανάστευση) και των αλλαγών του τρόπου ζωής των σύγχρονων ανθρώπων (κατανάλωση έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων, συχνή επίσκεψη σε χώρους εστίασης, κτλ.). Το 2020 καταγράφηκαν στην Ε.Ε. 694 επιδημίες με εμπλεκόμενα τρόφιμα τα αυγά και το χοιρινό κρέας.

Στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Σαλμονελών (ΕΚΑΣ) αποστέλλονται καλλιεργήματα σαλμονελών που απομονώνονται από όλα τα Νοσοκομεία της Ελλάδος για περαιτέρω τυποποίηση και χαρακτηρισμό, με σκοπό την επιδημιολογική επιτήρηση των στελεχών που κυκλοφορούν στην Ελλάδα, ως προς τον ορότυπο, την αντοχή σε αντιβιοτικά κ.λ.π. Στόχος της εργαστηριακής επιτήρησης είναι να

αναγνωρίζονται εγκαίρως ανοιχτές συρροές κρουσμάτων σαλμονέλωσης αλλά και πιθανές αυξητικές τάσεις-διασπορά κάποιων συγκεκριμένων στελεχών, με σκοπό τις άμεσες ενέργειες παρέμβασης για την προστασία της δημόσιας υγείας.

Ο ορότυπος S. Give είναι ένας πολύ σπάνιος ορότυπος από κλινικά καλλιεργήματα (0-1 καλλιεργήματα/έτος), με εξαίρεση το 2018, όπου είχε καταγραφεί συρροή κρουσμάτων σαλμονέλωσης από αυτόν τον ορότυπο σε χωριά της Πελοποννήσου με εμπλεκόμενο τρόφιμο ψημένο χοιρινό κρέας (γουρουνοπούλα).

Τον Σεπτέμβριο του 2022 έγινε ενημέρωση από τον Εθνικό Οργανισμό Δημόσιας Υγείας σχετικά με συρροή κρουσμάτων τροφιμογενούς γαστρεντερίτιδας σε περιοχή της Πελοποννήσου, έπειτα από παρουσία των ασθενών σε πανηγύρι, οφειλόμενη στο βακτήριο της σαλμονέλας, με αίτημα να πραγματοποιηθεί τυποποίηση των καλλιεργημάτων σαλμονέλας από ασθενείς της επιδημίας αλλά και από χοιρινό κρέας και να γίνει εργαστηριακή διερεύνηση.

Σκοπός

Στην παρούσα εργασία θα περιγραφεί η εργαστηριακή διερεύνηση τροφιμογενούς επιδημίας σαλμονέλωσης στην Ελλάδα, την περίοδο Σεπτέμβριος-Οκτώβριος 2022 και η ανεύρεση της πιθανής κοινής πηγής μόλυνσης, αλλά και η πιθανή συσχέτιση με τα καλλιεργήματα της συρροής κρουσμάτων σαλμονέλωσης από τον ίδιο ορότυπο το 2018, με εμπλεκόμενο τρόφιμο πάλι το χοιρινό κρέας.

Υλικά και Μέθοδοι

Στο ΕΚΑΣΣ εστάλησαν συνολικά 16 καλλιεργήματα *Salmonella* spp που αφορούσαν στη συρροή κρουσμάτων σαλμονέλωσης, και 1 καλλιέργημα που απομονώθηκε από ψημένο χοιρινό κρέας που πωλούνταν από πλανόδιο σε πανηγύρι σε περιοχή της Πελοποννήσου. Πραγματοποιήθηκε οροτυποποίηση με τη μέθοδο οροσυγκόλληση επί πλακός, (Kaufmann-White Le Minor Scheme). Μελετήθηκαν όλα τα καλλιεργήματα ως προς την αντοχή τους σε μια ομάδα 16 αντιμικροβιακών ουσιών που εκπροσωπούν όλες τις κλασικές ομάδες (κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες, αμινογλυκοσίδες κ.ά.) με τη μέθοδο Kirby-Bauer (κατά EUCAST) και στη συνέχεια έγινε μοριακή τυποποίηση με τη μέθοδο της πέψης του DNA με περιοριστική ενδονουκλεάση και ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο πεδίο (Pulsed Field Gel Electrophoresis-PFGE). Στη μοριακή τυποποίηση συμπεριλήφθηκαν και δύο μη σχετιζόμενα επιδημιολογικά καλλιεργήματα *S*. Give (διαφορετική χρονική περίοδο και, διαφορετική γεωγραφική περιοχή απομόνωσης).

Αποτελέσματα

Όλα τα καλλιεργήματα ανήκαν στον ορότυπο *Salmonella enterica enterica* ser. Give και ήταν ευαίσθητα στα εξετασθέντα αντιβιοτικά. Η μοριακή τυποποίηση των πρώτων 5 κλινικών καλλιεργημάτων της συρροής, 1 καλλιεργήματος από το χοιρινό κρέας (γουρουνοπούλα) και 2 επιδημιολογικά μη σχετιζόμενων καλλιεργημάτων ίδιου οροτύπου (διαφορετική χρονική περίοδο απομόνωσης και διαφορετική γεωγραφική περιοχή) έδειξε ότι τα κλινικά καλλιεργήματα της συρροής και του τροφίμου είχαν πανομοιότυπο μοριακό προφίλ (100% ομοιότητα) και διαφορετικό μοριακό προφίλ από τα επιδημιολογικά μη σχετιζόμενα.

Συμπεράσματα

Από τα προκαταρκτικά δεδομένα της εργαστηριακής διερεύνησης προκύπτει ότι υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του καλλιεργήματος *S*. Give από το χοιρινό κρέας και των κλινικών καλλιεργημάτων. Η μοριακή τυποποίηση και των υπολοίπων κλινικών καλλιεργημάτων και αξιολόγησή τους και με τα δεδομένα που προέκυψαν από την επιδημιολογική διερεύνηση θα επιβεβαιώσει τη συσχέτιση αυτή.

Η εργαστηριακή επιδημιολογική επιτήρηση των λοιμώξεων από σαλμονέλα, αλλά και η εργαστηριακή διερεύνηση συρροών σαλμονέλωσης, είναι πολύ σημαντικά «όπλα» για την προστασία της δημόσιας υγείας. Η συνεχής και συστηματική συλλογή, ανάλυση και ερμηνεία όλων των δεδομένων που αφορούν

στην εμφάνιση και εξάπλωση των διαφόρων τύπων σαλμονελών είναι απαραίτητες διαδικασίες για το σχεδιασμό, την εφαρμογή και την αξιολόγηση των παρεμβάσεων δημόσιας υγείας με τελικό στόχο τον αποτελεσματικό έλεγχο των σαλμονελώσεων και την αποτροπή επιδημιών.

Βιβλιογραφία

Επιδημιολογικά δεδομένα για τη σαλμονέλωση στην Ελλάδα, 2014-2020, ΕΟΔΥ (2021)

EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2021. The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. EFSA Journal 2021;19(12):6971, 324 pp. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971

ΣΥΝΕΔΡΙΑ 6

ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΕΣ

Ελένη Ρίζου,
Εργαστηριακή Γενετίστρια, Τμήμα Γενετικής ΓΟΝΚ Ο Άγιος Σάββας, μέλος Δ.Σ. Π.Ε.Β.
Γιακουντής Αντώνης,
Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δωρεά και μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων στην προ- και μετά- COVID-19 εποχή

ΣΑΜΑΡΑ Πηνελόπη, ΓΡΑΦΑΚΟΣ Στυλιανός

Τράπεζα Εθελοντών Δοτών Μυελού των Οστών «ΟΡΑΜΑ ΕΛΠΙΔΑΣ», Ογκολογική Μονάδα Παίδων «Μαριάννα Β. Βαρδινογιάννη-ΕΛΠΙΔΑ», Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία», Αθήνα, donor@oramaelpidas.gr

Περίληψη

Η Μεταμόσχευση Αιμοποιητικών Κυττάρων (ΜΑΚ) ή Μεταμόσχευση Μυελού των Οστών (ΜΜΟ) αποτελεί καθιερωμένη θεραπευτική επιλογή για την αντιμετώπιση σοβαρών αιματολογικών, νεοπλασματικών και γενετικών νοσημάτων. Απαραίτητη προϋπόθεση για την πραγματοποίησή της αποτελεί η ύπαρξη ενός HLA ιστοσυμβατού δότη. Αρχικά ο δότης αναζητείται στην οικογένεια του ασθενούς, ωστόσο καθώς η πιθανότητα ανεύρεσης συμβατού αδελφού/ής είναι 25%, η πλειονότητα των ασθενών εξαρτάται από εθελοντές μη συγγενείς δότες, οι οποίοι είναι καταχωρημένοι στον Παγκόσμιο Οργανισμό Εθελοντών Δοτών (WMDA) που απαριθμεί 40.000.000 εθελοντές δότες. Στην Ελλάδα, το Εθνικό Αρχείο εθελοντών δοτών διαχειρίζεται ο Εθνικός Οργανισμός Μεταμοσχεύσεων (ΕΟΜ), όπου συγκεντρώνει όλους τους δότες από τα Κέντρα Δοτών. Η διαδικασία συντονισμού της μεταμόσχευσης από εθελοντή δότη περιλαμβάνει ένα δίκτυο φορέων και είναι ούτως ή άλλως πολύπλοκη, με αποτέλεσμα οι δύσκολες συνθήκες λόγω COVID-19 να επιβαρύνουν τις διαδικασίες αυτές. Όμως, η άψογη συνεργασία και ο επαγγελματισμός των εμπλεκόμενων οργανισμών διασφάλισε την ασφαλή παροχή αιμοποιητικών μοσχευμάτων σε κάθε ασθενή.

Λέξεις-κλειδιά

Μεταμόσχευση, Αιμοποιητικά κύτταρα, Μυελός των οστών, Εθελοντής δότης, Κέντρο Δότη

Εισαγωγή

Η σημαντική ανάπτυξη των ΜΑΚ τις τελευταίες δεκαετίες οφείλεται στην ύπαρξη μεγάλου αριθμού εθελοντών δοτών μυελού των οστών καταγεγραμμένων στον WMDA, αριθμός που καθημερινά αυξάνεται. Το πρώτο Κέντρο Εθελοντών Δοτών, το Anthony Nolan, δημιουργήθηκε το 1974 στο Λονδίνο από τη μητέρα ενός παιδιού που έπασχε από γενετικό νόσημα και έπρεπε να υποβληθεί σε ΜΑΚ αλλά δεν είχε συμβατό αδελφό. Αργότερα ακολούθησαν και άλλοι σε διάφορες χώρες, με αποτέλεσμα να δημιουργηθούν διάφορα Κέντρα Δοτών συντονιζόμενα από τον WMDA, προσφέροντας μοσχεύματα σε ολοένα μεγαλύτερο αριθμό ασθενών. Η διαδικασία συντονισμού της μεταμόσχευσης από ένα μη συγγενή εθελοντή δότη είναι πολύπλοκη και χρονοβόρα. Περιλαμβάνει ένα πυκνό δίκτυο λειτουργιών, στο οποίο συμμετέχουν το Κέντρο Δοτών όπου είναι εγγεγραμμένος ο υποψήφιος δότης, η Μονάδα Μεταμόσχευσης όπου νοσηλεύεται ο ασθενής που θα υποβληθεί σε ΜΑΚ, το Νοσοκομείο-Κέντρο Συλλογής όπου θα ληφθεί το μόσχευμα από το δότη, ο αρμόδιος ΕΟΜ κάθε χώρας και ο WMDA. Το τελικό αποτέλεσμα αυτής της προσπάθειας είναι η μεταφορά του μοσχεύματος από το σημείο συλλογής του προς το νοσηλευτικό ίδρυμα που ευρίσκεται ο προς μεταμόσχευση ασθενής (παιδί ή ενήλικας), με σκοπό τη θεραπεία αυτού από το σοβαρό νόσημα που πάσχει. Στη χώρα μας, ήδη από το 2010 ξεκίνησαν οι πρώτες προσπάθειες για την ενημέρωση του κοινού γύρω από τη δωρεά μυελού των οστών. Το 2014, η προσπάθεια γιγαντώθηκε καθώς ξεκίνησε τη λειτουργία του ο Σύλλογος «ΟΡΑΜΑ ΕΛΠΙΔΑΣ», το μεγαλύτερο έως τώρα Κέντρο Δοτών με περισσότερους από 130.000 καταχωρημένους εθελοντές δότες μυελού των οστών. Σκοπός του η προσέλκυση, η ενημέρωση και η εγγραφή νέων εθελοντών δοτών μυελού των οστών στο Εθνικό και Παγκόσμιο Αρχείο μέσα από τη λήψη εντός στοματικού επιχρίσματος και την HLA τυποποίησή του.

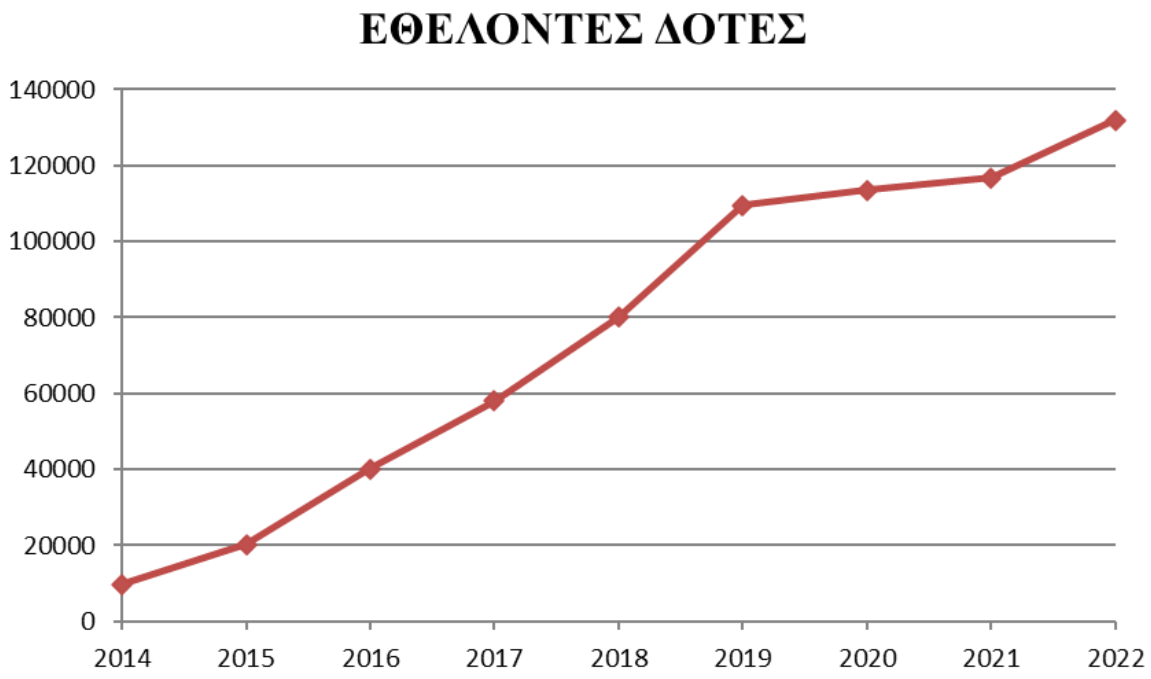
Μέθοδοι

Η αξιολόγηση της αλλαγής που έχει επέλθει στο πεδίο των ΜΑΚ στη χώρα μας μετά τη δημιουργία ενός νέου οργανωμένου Κέντρου Δοτών, η επίδραση της πανδημίας COVID-19 στη λειτουργία του και η μετά COVID-19 πορεία των δωρεών. Μελετήθηκαν οι εγγεγραμμένοι εθελοντές δότες, οι δότες που

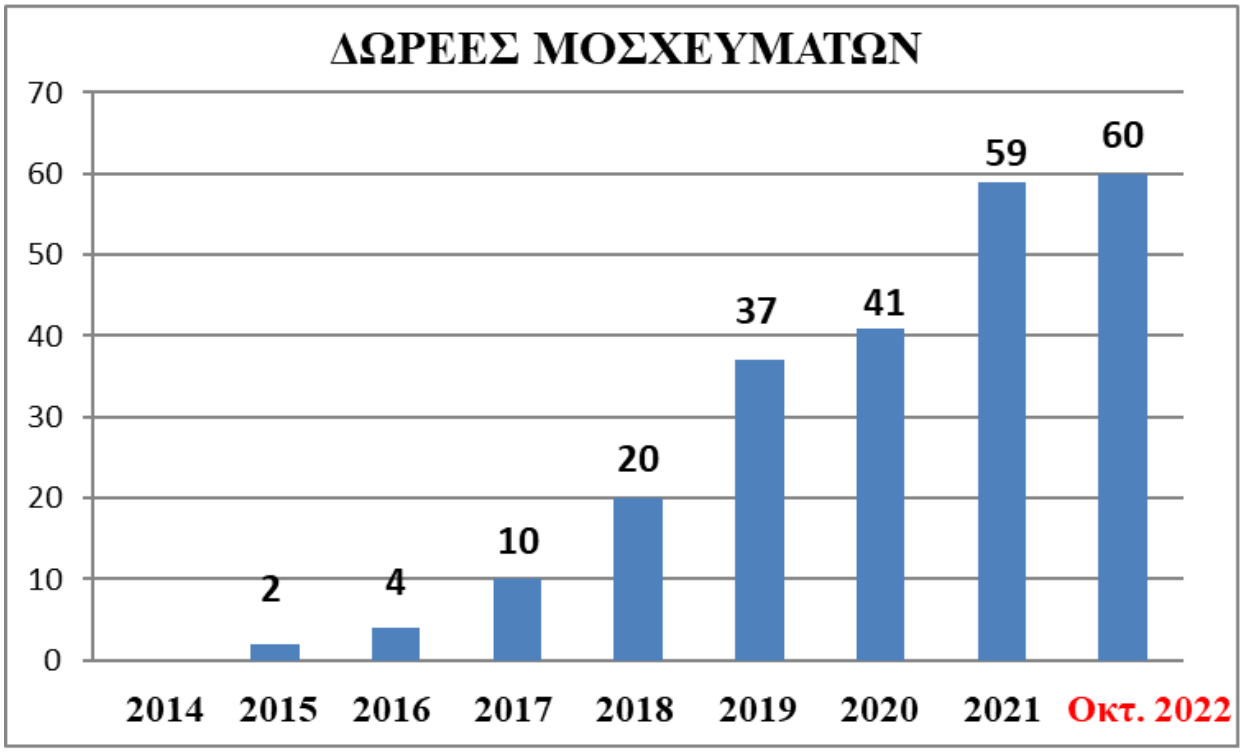
βρέθηκαν συμβατοί και οι δότες που προσέφεραν μόσχευμα τόσο για Έλληνες ασθενείς όσο και για ασθενείς εξωτερικού καθ' όλη τη διάρκεια λειτουργίας.

Αποτελέσματα

Τον πρώτο χρόνο λειτουργίας του Κέντρου μας εγγράφηκαν 10.000 νέοι εθελοντές δότες, εκ των οποίων ένας βρέθηκε συμβατός με ασθενή. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι απαιτείται μία δεξαμενή τουλάχιστον 10.000 δοτών για να ξεκινήσει η ανεύρεση συμβατών δοτών. Από την αρχή λειτουργίας μέχρι σήμερα (Οκτ.2022), το ΟΡΑΜΑ ΕΛΠΙΔΑΣ διαθέτει 132.000 εγγεγραμμένους εθελοντές δότες μυελού των οστών από τους 224.376 του Εθνικού Αρχείου του ΕΟΜ (Σχήμα 1). Έλαβε 2.778 αιτήματα αναζήτησης συμβατού δότη για ασθενείς κάθε ηλικίας σε Ελλάδα και εξωτερικό και βρέθηκαν συμβατοί με ασθενείς 1.300 δότες, εκ των οποίων προσέφεραν τελικά μόσχευμα οι 233 (Σχήμα 2). Από τα 233 μοσχεύματα, τα 114 αφορούσαν ασθενείς στην Ελλάδα και τα 119 ασθενείς στο εξωτερικό. 201 δότες προσέφεραν μόσχευμα μέσω του περιφερικού αίματος με το μηχάνημα κυτταραφαίρεσης και 32 μέσω παρακέντησης των οστών της λεκάνης. Οι λήπτες ήταν 178 ενήλικες και 55 παιδιά-έφηβοι. Από τα 55 παιδιά-εφήβους που έλαβαν μόσχευμα, τα 30 νοσηλεύονταν στην Ογκολογική Μονάδα Παίδων «Μ. Βαρδινογιάννη-ΕΛΠΙΔΑ». Η πανδημία COVID-19 που ξέσπασε τον Φεβρουάριο του 2020 είχε αρνητικές επιπτώσεις, καθώς δημιούργησε προσωρινή αναχαίτιση της σημαντικής ανόδου των εγγραφών και των δωρεών που είχε ξεκινήσει. Συγκεκριμένα, οι ενημερώσεις προσέλκυσης νέων δοτών αναστάλθηκαν με επακόλουθο τη μείωση των νέων εγγραφών, με την πλειοψηφία των νέων εγγραφών μέσα στην πανδημία να πραγματοποιείται με κατ'οίκον αποστολή πακέτου εγγραφής. Ωστόσο, η δεξαμενή των εθελοντών δοτών που ήδη έχει δημιουργηθεί ήταν αρκετή ώστε να τροφοδοτεί με συμβατούς δότες αρκετούς ασθενείς. Η πανδημία επίσης προκάλεσε επιφυλακτικότητα στους δότες ως προς την ασφάλεια των διαδικασιών, ωστόσο αυτό γρήγορα αποκαταστάθηκε με κατάλληλη ενημέρωση και σωστή τήρηση των εκάστοτε υγειονομικών μέτρων. Η υψηλή HLA τυποποίηση των δοτών μας σε έξι γενετικούς τόπους από την εγγραφή τους διαδραμάτισε ουσιαστικό ρόλο στην επιλογή του πλέον κατάλληλου δότη προς μεταμόσχευση. Επιπλέον, η κρυοσυντήρηση των κυτταρικών προϊόντων ήταν η νέα προσωρινή τακτική για την ελαχιστοποίηση των κινδύνων που σχετίζονται με τη μεταφορά του μοσχεύματος και τη διαθεσιμότητα των δοτών. Πλέον, 2.5 χρόνια μετά, φαίνεται ότι έχει επέρθει και πάλι ομαλότητα στις διαδικασίες των δωρεών και αυξάνεται η προσφορά νέων μοσχευμάτων.



Σχήμα 1. Αριθμός εγγεγραμμένων εθελοντών δοτών μυελού των οστών από την αρχή λειτουργίας του Κέντρου Δοτών έως σήμερα



Σχήμα 2. Αριθμός των προσφερόμενων μοσχευμάτων από την αρχή λειτουργίας του Κέντρου Δοτών έως τον Οκτώβριο του 2022

Συμπεράσματα

Έχει δημιουργηθεί μία αξιόλογη ελληνική δεξαμενή εθελοντών δοτών που καλύπτει όλο και περισσότερο τις ανάγκες για μεταμόσχευση των ασθενών στην Ελλάδα, ενώ επιπρόσθετα προσφέρει ευκαιρία για μεταμόσχευση και σε ασθενείς του εξωτερικού. Η χώρα μας από ουραγός στον τομέα αυτό, κατέχει πια σημαντική θέση μεταξύ των 55 χωρών του WMDA ως προς τον αριθμό των εγγεγραμμένων εθελοντών δοτών. Ο συνεχώς αυξανόμενος αριθμός εθελοντών δοτών θα συμβάλλει στην εξασφάλιση μοσχευμάτων για τη συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών στη χώρα μας που δεν διαθέτει συμβατό συγγενή. Η εμπειρία που αποκτήσαμε από την πανδημία COVID-19 και οι δυσκολίες που ανέκυψαν στη διαδικασία της δωρεάς μας καθοδήγησαν ως προς τη μελλοντική αντιμετώπιση τέτοιων συμβάντων και την απρόσκοπτη συνέχιση των δωρεών.

Βιβλιογραφία

www.oramaelpidas.gr, https://wmda.info/

Η μετάλλαξη T350G του E6 γονιδίου του Ιού των Ανθρώπινων Θηλωμάτων (HPV 16) κυριαρχεί στον καρκίνο του στοματοφάρυγγα. Δεδομένα από μελέτη μικρής ομάδας Ελλήνων ασθενών.

ΡΕΣΤΑ Παναγιώτα[1,2], ΖΥΓΟΥΡΑΣ Ιωάννης[3], ΝΤΟΛΚΕΡΑΣ Αντώνιος[3], ΜΠΕΛΟΥΚΑΣ Απόστολος[1,2], ΚΟΤΤΑΡΙΔΗ Χριστίνα[3]

[1]*Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, presta@uniwa.gr, abeloukas@uniwa.gr*
[2]*Εθνικό Κέντρο Αναφοράς AIDS Νοτίου Ελλάδος, Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, presta@uniwa.gr, abeloukas@uniwa.gr*
[3]*Εργαστήριο Γενικής Μικροβιολογίας, Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, ckottaridi@bio.auth.gr, izygouras@bio.auth.gr, ntolkeras@bio.auth.gr*

Περίληψη
Μελέτες έχουν δείξει μια σημαντική αύξηση στη συχνότητα συσχέτισης του πλακώδους στοματοφαρυγγικού καρκινώματος με τον Ιό των Ανθρώπινων Θηλωμάτων (HPV) τύπου 16 (υψηλού κινδύνου). Η γενετική ετερογένεια του HPV16 έχει μελετηθεί εκτενώς στον καρκίνο του Τραχήλου στους Μήτρας αλλά πολύ λιγότερο στον στοματοφαρυγγικό καρκίνο. Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκαν οι γενετικές παραλλαγές των αλληλουχιών του γονιδίου *E6* του HPV16 σε μια μικρή ομάδα Ελλήνων ασθενών που είχαν διαγνωστεί με καρκίνο του στοματοφάρυγγα. Η συντριπτική πλειονότητα των ακολουθιών ανήκαν στον κλάδο των ευρωπαϊκών παραλλαγών (A1-3) με την μετάλλαξη T350G να είναι η κυρίαρχη έναντι των υπολοίπων. Αυτό το εύρημα μπορεί να υποδεικνύει την ανάγκη διεξαγωγής περαιτέρω μελετών που θα μπορούσαν να εξηγήσουν την πιθανή επίδραση στους στους μετάλλαξης στους παθομηχανισμούς του στοματοφαρυγγικού καρκίνου.

Λέξεις –Κλειδιά
Ιός των Ανθρώπινων Θηλωμάτων (Human Papilloma Virus-HPV), HPV16, γενετική ποικιλότητα , καρκίνος στοματοφάρυγγα, καρκίνος Κεφαλής Τραχήλου

Εισαγωγή
Ο ιός των Ανθρώπινων Θηλωμάτων (HPV) είναι μέλος της οικογένειας των *Papillomaviridae* (PV) και μολύνει το βλεννογόνο επιθήλιο (Tommasino, 2014). Οι γονότυποι υψηλού κινδύνου συνδέονται με την ανάπτυξη προ-κακοήθων βλαβών και ορισμένους τύπους καρκίνου λόγω της έντονης ογκογόνου δράσης τους. Οι σημαντικότεροι εξ αυτών είναι οι HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 και 59, οι οποίοι μπορούν να προκαλέσουν ποικίλες καρκινικές εκδηλώσεις (Spence et al. 2016). Ο Καρκίνος Κεφαλής και Τραχήλου (HNC) περιλαμβάνει μια ευρεία ομάδα καρκινωμάτων που προέρχονται από την περιοχή της κεφαλής, όπως καρκίνους της στοματικής κοιλότητας, του ρινοφάρυγγα, του στοματοφάρυγγα κ.α (Johnson, 2020). Διάφοροι νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί είναι υπεύθυνοι για πολλές παραλλαγές του ιού HPV16 και μπορούν να διαιρεθούν με γεωγραφικά κριτήρια δημιουργώντας διακριτούς φυλογενετικούς κλάδους. Στην βιβλιογραφία ορισμένοι πολυμορφισμοί στο γονίδιο *E6* του HPV16 έχουν συσχετιστεί με την παθογένεια και την ανοσογονικότητα του ιού (Bletsa et al., 2021). Στη παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν για πρώτη φορά οι πολυμορφισμοί της αλληλουχίας του ογκογονιδίου *E6* των γονιδιωμάτων του HPV16 που ανιχνεύθηκαν στον ελληνικό πληθυσμό, παρέχοντας περαιτέρω γνώσεις για την κατανόηση της παθογένειας, της ποικιλομορφίας και της εξέλιξης του ιικού γονιδιώματος.

Μέθοδοι
Συνολικά, 40 τομές από ιστικά δείγματα από Έλληνες άνδρες μέσης ηλικίας 57 ετών συλλέχθηκαν αναδρομικά από ασθενείς που επισκέφθηκαν δύο τριτοβάθμια νοσοκομεία της Δυτικής Αττικής στην Αθήνα. Οι ασθενείς ήταν μη-καπνιστές με ελάχιστο ή καθόλου ιστορικό χρήσης αλκοόλ. Ο γονότυπος

σε όλες τις περιπτώσεις βρέθηκε HPV16 με την χρήση πρωτοκόλλου PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR) εμπορικά διαθέσιμου (Sacace Bio-technologies, Como Italy) αφού πρώτα απομονώθηκε το ιικό DNA με την χρήση του QIAamp DNA FFPE (Qiagen, Heidelberg Γερμανία) κιτ ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για τον προσδιορισμό των παραλλαγών του γονιδίου HPV16 E6, χρησιμοποιήθηκαν ήδη δημοσιευμένα ζεύγη εκκινητών που εκτείνονται στην κωδικοποιούσα περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 52 έως 575 (Cornet et al., 2012). Το γονίδιο E6 του HPV16 εδράζεται μεταξύ των νουκλεοτιδίων 104 και 559 και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 151 αμινοξέων, επομένως ολόκληρο το γονίδιο ήταν διαθέσιμο για αλληλούχηση. Τα προϊόντα της PCR υποβλήθηκαν σε αμφίδρομη αλληλούχηση κατά Sanger χρησιμοποιώντας τυπικές διαδικασίες. Ο αλγόριθμος MUSCLE στο λογισμικό MEGA X χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό πολυμορφισμών (Kumar et al., 2018) Οι φυλογενετικές αναλύσεις διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Neighbor-Joining (NJ) με βάση την αλληλουχία αναφοράς του HPV16 που είναι διαθέσιμη στη βάση δεδομένων ακολουθιών HPV16 (Εθνικό Εργαστήριο Los Alamos) (http://hpv-web.lanl.gov/). Τα φυλογενετικά δέντρα κατασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας μεθόδους δύο παραμέτρων Kimura του MEGA X.

Αποτελέσματα

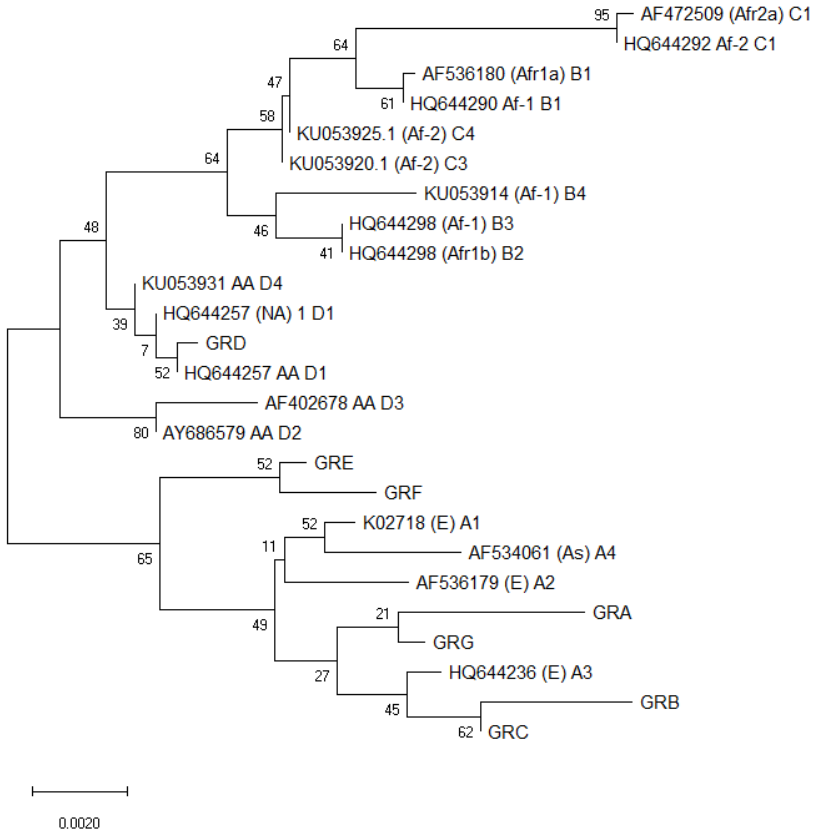
Οι 40 αλληλουχίες του HPV16 *E6* γονιδίου που ελήφθησαν, ομαδοποιήθηκαν σε σε επτά διαφορετικές ομάδες GRA (4/40; 10%), GRB (3/40; 7,5%), GRC (6/40; 15%), GRD (6/40; 15%), GRE (1/40; 2,5%), GRF (1/40; 2,5%) και GRG (19/40; 47,5%), καθεμία από τις οποίες περιείχε αλληλουχίες με τουλάχιστον ένα μοναδικό νουκλεοτιδικό πολυμορφισμό σε σύγκριση με τις υπόλοιπες αλληλουχίες των διαφορετικών ομάδων όπως παρουσιάζεται στον πίνακα που ακολουθεί. Η ανάλυση σχεδόν ολόκληρου του γονιδίου *E6*, αποκάλυψε 8 νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις, 4 από τις οποίες (4/8, 50%) οδήγησαν σε αμινοξικές αλλαγές και οι υπόλοιπες ήταν μη συνώνυμες. Η παραλλαγή T350G εντοπίστηκε στο 82,5% (33/40 απομονώσεις) των *E6* αλληλουχιών. Ακόμα, η σιωπηλή μετάλλαξη του νουκλεοτιδίου T185C που έχει βρεθεί σε 6 από τις 40 (15%) αλληλουχίες περιγράφεται για πρώτη φορά ως νουκλεοτιδική αντικατάσταση του γονιδίου HPV16 *E6* στην παρούσα μελέτη. Τέλος η φυλογενετική ανάλυση αποκάλυψε ότι το 85% (34/40) των αλληλουχιών ανήκαν στον κλάδο ευρωπαϊκών παραλλαγών ενώ τα υπόλοιπα 6/40 απομονωμένα στελέχη (15%) κατατάσσονται στην ομάδα GRD, στην υποκατηγορία D1 της ασιατικής-αμερικανικής προέλευσης D (Εικόνα 1).

Πίνακας 1: Νουκλεοτιδικοί Πολυμορφισμοί στο Ανοιχτό Πλαίσιο Ανάγνωσης του γονιδίου *E6* του HPV16.

Isolates with identical sequences	HPV16 ref (K02718)	nt position							
		131A	145G	176G	185T	286T	289A	335C	350T
	Non-synonymous mutations	R17G	.	D32N	.	.	.	H85Y	L90V
4	GRA	G	.	A	.	.	.	.	G
3	GRB	.	.	.	.	.	.	.	.
6	GRC	.	.	.	C	.	.	.	.
6	GRD	.	T	.	.	A	G	T	G
1	GRE	.	.	.	.	A	G	.	G
1	GRF	.	.	.	.	.	G	.	G
19	GRG	.	.	.	.	.	.	.	G

Συμπεράσματα

Η αλληλούχηση του γονιδίου *E6* HPV16πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά σε δείγματα από στοματοφάρυγγα που προέρχονται από Έλληνες ασθενείς. Αν και η ανάλυση περιελάμβανε έναν μάλλον μικρό αριθμό δειγμάτων, νέα φυλογενετικά δεδομένα σχετικά με την ποικιλομορφία του ικού γονιδιώματος του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων αντλήθηκαν από τα αποτελέσματα της μελέτης.



Εικόνα 1: Φυλογενετικό Δέντρο Ένωσης Γειτόνων, κλάδοι των 1000 επαναλήψεων που κατασκευάστηκε με την μέθοδο διόρθωσης δύο παραμέτρων Kimura του MEGA X, από την στοίχιση των αλληλουχιών HPV16 *E6* των υποκατηγοριών A1, A2, A3, A4, B1, B2, B3, B4, C1, C3, C4, D1, D2, D3, D4 από την παρούσα μελέτη.

Βιβλιογραφία

Tommasino, M., *The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis.* Semin Cancer Biol, 2014. 26: p. 13-21.

Spence, T., et al., HPV Associated Head and Neck Cancer. Cancers (Basel), 2016. 8(8).

Johnson, D.E., et al., Head and neck squamous cell carcinoma. Nat Rev Dis Primers, 2020. 6(1): p. 92.

Bletsa, G., et al., Genetic variability of the HPV16 early genes and LCR. Present and future perspectives. Expert Rev Mol Med, 2021. 23: p. e19.

Cornet, I., et al., *Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR.* J Virol, 2012. 86(12): p. 6855-61.

Kumar, S., et al., *MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms.* Mol Biol Evol, 2018. 35(6): p. 1547-1549.

HPV Sequence Database Available from: http://hpv-web.lanl.gov/

Προγνωστική και θεραπευτική χρησιμότητα της 25 – υδροξυκαλσιφερόλης D3 ορού σε ασθενείς με Covid-19: θεωρητική ή εφικτή;

ΒΑΛΣΑΜΑΚΗ Πιπίτσα[1], ΑΡΓΥΡΙΑΔΟΥ Νικολέτα[2], ΠΑΠΑΖΟΓΛΟΥ Δημήτριος[3], ΠΙΣΤΟΛΑ Αναστασία[4], ΖΗΣΙΜΟΠΟΥΛΟΣ Αθανάσιος[5]

[1]Τμήμα Πυρηνικής Ιατρικής ΠΓΝΑ, pivalsam@med.duth.gr
[2]Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής ΔΠΘ, nikoargy3@mbg.duth.gr
[3] Τμήμα Πυρηνικής Ιατρικής ΠΓΝΑ, dpapazog@med.duth.gr
[4] Τμήμα Πυρηνικής Ιατρικής ΠΓΝΑ, apistola@med.duth.gr
[5] Τμήμα Πυρηνικής Ιατρικής ΠΓΝΑ, azisimop@med.duth.gr

Περίληψη
Η παρακάτω εργασία πραγματεύεται την πιθανότητα συσχέτισης της βιταμίνης D (25-υδροξυκαλσιφερόλης) με την αντιμετώπιση και τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων σε ασθενείς που νοσούν από τον ιό SARS-CoV-2. Ειδικότερα, αναλύονται δείγματα αίματος από ασθενείς με COVID – 19, που νοσηλεύτηκαν στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Αλεξανδρούπολης, ως προς τη συγκέντρωση της βιταμίνης D. Για τις μετρήσεις έγινε χρήση ραδιοανοσοδοκιμασίας, υποδεικνύοντας χαμηλότερες συγκεντρώσεις βιταμίνης D στο αίμα νοσούντων σε προχωρημένο στάδιο της COVID-19.

Λέξεις – κλειδιά:
Βιταμίνη D, 25(OH)D_3, SARS – CoV-2, RIA, υποβιταμίνωση D

Εισαγωγή

Η βιταμίνη D συμμετέχει κυρίως σε ποικίλες κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της μιτοχονδριακής λειτουργίας, της μείωσης της φλεγμονής, του ανταγωνισμού οξειδωτικού στρες, καθώς και της ρύθμισης του ενδονευρικού ασβεστίου. Μεταβλητές διαταραχές ενδοκρινικής, αναπνευστικής, καρδιαγγειακής και νευροεκφυλιστικής προέλευσης έχουν συνδεθεί με ανεπάρκεια βιταμίνης D. Οι ασθενείς με COVID-19 που παρουσιάζουν σοβαρή συμπτωματολογία, μπορεί να πάσχουν από οποιαδήποτε από τις παραπάνω διαταραχές. Στο τρέχον ερευνητικό μας πρωτόκολλο, προσδιορίσαμε προοπτικά το επίπεδο της 25-υδροξυκαλσιφερόλης [25(OH)D_3 ή βιταμίνης D] ορού, σε ασθενείς σε διαφορετικά στάδια λοίμωξης με SARS-CoV-2. Στόχος είναι να καθορίσουμε πιθανές συσχετίσεις διάφορων παραλλαγών της 25(OH)D_3 και της σοβαρότητας ή της έκβασης της ασθένειας.

Μέθοδοι

Αρχικά συλλέξαμε δείγματα αίματος από κάθε ασθενή που παραπέμφθηκε στο τμήμα μας και στη συνέχεια μετρήσαμε την αρχική τιμή 25(OH)D_3. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριό μας (εικόνα 1), με διεξαγωγή ραδιοανοσοδοκιμασίας (RIA) χρησιμοποιώντας το kit «25-OH Vitamin D total RIA (Immunotech, Πράγα, Τσεχία)». Οι ασθενείς που έφεραν SARS-CoV-2 νοσηλεύτηκαν σε ειδικούς θαλάμους, μονάδες εντατικής θεραπείας ή βρίσκονταν υπό παρακολούθηση στο σπίτι. Στη συνέχεια, η αιμοληψία επαναλαμβανόταν μία φορά την εβδομάδα για τους νοσηλευόμενους ασθενείς του νοσοκομείου, ενώ για τους ασθενείς που παρέμειναν σπίτι η αιμοληψία πραγματοποιήθηκε στο τέλος της περιόδου επιτήρησης. Επιπρόσθετα, έγιναν εκτιμήσεις της 25(OH)D_3 ως μέρος της παρακολούθησης βάσει τοπικού πρωτοκόλλου. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν στατιστικά χρησιμοποιώντας το Student's t-test, το x^2 test ή/και τη μέθοδο Pearson Correlation,, με στατιστική σημαντικότητα $p < 0.05$.

Αποτελέσματα

Εβδομήντα δύο ασθενείς με SARS-CoV-2, 51 άνδρες και 21 γυναίκες, με μέση ηλικία±SD 75±9 έτη, ενσωματώθηκαν στη μελέτη μας. Ήπια έως βαριά υποβιταμίνωση D προσδιορίστηκε σε συνολικά 243 δείγματα αίματος. Σε ασθενείς σε προχωρημένο στάδιο της νόσου, τα επίπεδα 25(OH)D_3 στον ορό ήταν

χαμηλότερα, ενώ καλύτερη απόδοση, σε συνδυασμό με κλινική ή απεικονιστική βελτίωση, συσχετίστηκε με υψηλότερες τιμές (πίνακας 1).

Συμπεράσματα

Τα προκαταρκτικά ευρήματά μας υποδεικνύουν σταδιακά χαμηλότερη έκφραση 25(OH)D_3 στον ορό ασθενών μολυσμένων με SARS-CoV-2, συμβατά με ανάλογη κλινική και απεικονιστική κατάσταση. Η εκτίμηση των επιπέδων 25(OH)D_3, μέσω της RIA θα μπορούσε να ενισχύσει την πρόγνωση της έκβασης της νόσου COVID-19.

Εικόνα 1. Εργαστήριο in vitro του Τμήματος Πυρηνικής Ιατρικής του ΠΓΝΑ

Πίνακας 1: Συσχέτιση σταδίου ασθένειας με τα επίπεδα βιταμίνης D στον ορό ασθενών

Στάδιο ασθένειας COVID-19	Συγκέντρωση 25(OH)D_3 ορού
προχωρημένο	οι χαμηλότερες τιμές (0-10 ng/mL)
καλύτερη απόδοση, σε συνδυασμό με κλινική ή απεικονιστική βελτίωση	υψηλότερες τιμές (10-30 ng/mL)

Βιβλιογραφία

Bergman Peter. (2022). Can vitamin D protect against covid-19?. *BMJ*, 2022;378:o1822

Jolliffe DA, Camargo CA Jr., Sluyter JD, et al. (2021). Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory infections: a systematic review and meta-analysis of aggregate data from randomised controlled trials. *Lancet Diabetes* Endocrinol, 2021;9:276-92

Martineau AR, Jolliffe DA, Hooper RL, et al. (2017) . Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory tract infections: systematic review and meta-analysis of individual participant data. *BMJ*, 2017;356:i6583.

Valsamaki Pipitsa, Panagopoulos Periklis, Petrakis Vasilios, Balomenos Vasilios, Pistola Anastasia, Papazoglou Dimitrios, Zissimopoulos Athanassios. (2022). Correlation of RIA serum 25-hydroxycalciferol-D3 with SARS-CoV-2. *In Proceedins of the 13th Congress of the World Federation of Nuclear Medicine & Biology WFNMB 2022*, Japan

Προσθέτοντας τη μεταβλητή των ανεμομεταφερόμενων γυρεοκόκκων στην εξίσωση της πανδημίας COVID-19

ΔΑΜΙΑΛΗΣ Αθανάσιος, ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΠΟΥΛΟΣ Αθανάσιος, ΒΩΚΟΥ Δέσποινα

Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Οικολογίας,
dthanos@bio.auth.gr

Περίληψη
Έχει πρόσφατα αποδειχθεί ότι η έκθεση σε ανεμομεταφερόμενους γυρεοκόκκους εξασθενεί το ανοσοποιητικό σύστημα ως προς την αντιμετώπιση αναπνευστικών ιογενών λοιμώξεων που προκαλούνται από κοινούς ιούς του κρυολογήματος, όπως ο ρινοϊός. Αυτό οφείλεται στην προκαλούμενη μείωση της απόκριση των αντιικών πρωτεϊνών ιντερφερόνης και ισχύει ανεξαρτήτως ευαισθησίας σε αλλεργίες. Εδώ διερευνάται κατά πόσο ισχύει το ίδιο και για τον πανδημικό ιό SARS-CoV-2, εφόσον εξάρσεις της πανδημίας συμπίπτουν με υψηλές συγκεντρώσεις γυρεοκόκκων στην ατμόσφαιρα. Προς τούτο, πραγματοποιήθηκε εκτεταμένη συλλογή και ανάλυση δεδομένων θετικών κρουσμάτων μόλυνσης από SARS-CoV-2, συγκεντρώσεων ανεμομεταφερόμενης γύρης και μετεωρολογικών παραμέτρων. Η τελική βάση δεδομένων περιελάμβανε 130 σταθμούς από 31 χώρες και 5 ηπείρους. Για να μελετηθεί ο κύριος παράγοντας μετάδοσης του κορονοϊού, η ανθρώπινη επαφή, εισήχθησαν και οι μεταβλητές της πυκνότητας πληθυσμού για την κάθε περιοχή μελέτης, καθώς και η ύπαρξη υποχρεωτικού εγκλεισμού. Τα κύρια ευρήματα ήταν ότι η ανεμομεταφερόμενη γύρη, σε συνέργεια με τη θερμοκρασία αέρα και την υγρασία, εξηγούσαν κατά μέσο όρο 44% της μεταβλητότητας των θετικών κρουσμάτων κορονοϊού. Ο εγκλεισμός μείωσε στο μισό τα ποσοστά θετικών κρουσμάτων SARS-CoV-2, κάτω από παρόμοιες συνθήκες γυρεοφορίας. Δεδομένου ότι η κλιματική αλλαγή συντελεί στη δραματική αύξηση της ατμοσφαιρικής αφθονίας γύρης και στη μετατόπιση της κύριας εποχής της νωρίτερα, οι περίοδοι κυκλοφορίας γύρης και ιών που προξενούν αναπνευστικές λοιμώξεις συμπίπτουν την άνοιξη, με αποτέλεσμα η γύρη να δρα συνεργιστικά στην έξαρση των λοιμώξεων.

Λέξεις κλειδιά
Αεροβιολογία, αναπνευστικές λοιμώξεις, γύρη, κλιματική αλλαγή, COVID-19, SARS-CoV-2

Εισαγωγή

Έχει βρεθεί πρόσφατα ότι η γύρη μειώνει τις αντιικές ιντερφερόνες τύπου-I και τύπου-III, με αποτέλεσμα την ενδεχόμενη αναστολή της έμφυτης άμυνας των επιθηλίων των αεραγωγών κατά των ιών (Gilles κ.ά. 2020). Αυτό τεκμηριώθηκε με *in vitro, in vivo* και κλινικά δεδομένα. Σε μεγάλο δείγμα πληθυσμού στη Σουηδία (>20.000 ασθενείς με αναπνευστικές λοιμώξεις κατά τις χρονιές 2011-2013), η ίδια έρευνα έδειξε την ύπαρξη σημαντικής θετικής συσχέτισης μεταξύ προσβολών από ρινοϊό και ατμοσφαιρικές συγκεντρώσεις γύρης σημύδας την περίοδο της άνοιξης.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί εάν και σε τι βαθμό η παραπάνω συνέργεια μπορεί να ισχύει και για τον ιό SARS-CoV-2 και περαιτέρω να αξιολογηθεί η συμβολή της ανεμομεταφερόμενης γύρης στις εξάρσεις της πανδημίας covid-19.

Μέθοδοι

Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο STROBE για επιδημιολογικές μελέτες (Damialis κ.ά. 2021):
Πειραματικός σχεδιασμός
Για τον έλεγχο του ερευνητικού μας ερωτήματος, πραγματοποιήθηκε μαζική συλλογή και ανάλυση ημερήσιων δεδομένων (cross-sectional, longitudinal), για την περίοδο 01/01/2020 – 08/04/2020, που αφορούσαν α) επιβεβαιωμένα θετικά κρούσματα από τον ιό SARS-CoV-2, β) συγκεντρώσεις γυρεοκόκκων για το σύνολο της βιοποικιλότητας ανά σταθμό συλλογής, γ) τιμές θερμοκρασίας αέρα, δ) τιμές υγρασίας. Επιπρόσθετα, συμπεριλήφθηκαν κοινωνικο-δημογραφικές παράμετροι, οι οποίες εκφράζουν την ανθρώπινη επαφή, ως κύριο παράγοντα μετάδοσης του κορονοϊού: πυκνότητα

πληθυσμού και ημερομηνίες εγκλεισμού (παρουσία-απουσία, και αυστηρότητα).

Πηγές δεδομένων

Αεροβιολογικά δεδομένα γύρης συνελέγησαν από όσους σταθμούς λειτουργούσαν εκείνη την περίοδο σε όλο τον πλανήτη. Συνολικά, συνελέγησαν ημερήσιες συγκεντρώσεις γύρης από 248 αεροβιολογικούς σταθμούς (**Σχήμα 1**). Για λόγους ομογενοποίησης και συγκρισιμότητας, οι σταθμοί κατατάχθηκαν και περαιτέρω επιλέχτηκαν ή απορρίφθηκαν βάσει της πληρότητας των δεδομένων όλων των επιθυμητών παραγόντων. Τα κρούσματα κορονοϊού και οι υπόλοιπες παράμετροι επιλέχτηκαν τελικά από ένα σύνολο 130 σταθμών από 31 χώρες και 5 Ηπείρους.

Ανάλυση δεδομένων

Γενικά Γραμμικά Μοντέλα (one-way, factorial ANOVAs, simple linear regressions), Μοντέλα Αυτοπαλινδρόμισης (cross-correlations), Γενικευμένα Μη Γραμμικά Μοντέλα (Poisson and log-normal distributions), Ridge Regressions.

Τεχνικές αντιμετώπισης συστηματικών σφαλμάτων

Α) Τρείς διαφορετικές ομάδες αναλυτών, από διαφορετικές χώρες, πραγματοποίησαν ανεξάρτητα τη στατιστική ανάλυση, με διαφορετικές προσεγγίσεις και συνέκριναν τακτικά τα αποτελέσματά τους.

Β) Ακραίες τιμές (Outliers): Χρήση bag plots (έλεγχος μέσων και διμέσων, κατανομών σε τεταρτημόρια, συμμετρίας).

Γ) Υπερπροσαρμογή (Overfitting): Sensitivity analysis (bootstrap reshuffling), ridge regressions (backward stepwise elimination και υψηλότερη τιμή λ).

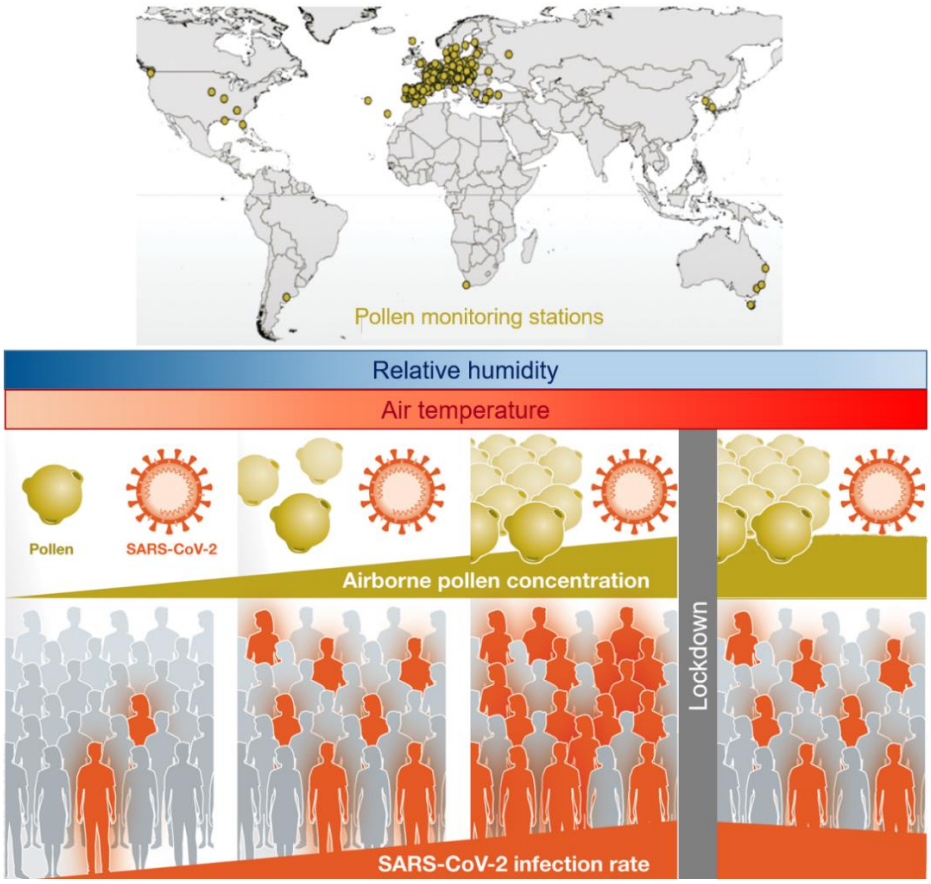
Δ) Συνεργιστικοί και αντιθετικοί παράγοντες: ridge regressions (backward stepwise elimination και υψηλότερη τιμή λ).

Αποτελέσματα

Το κύριο εύρημα της μελέτης ήταν η σημαντική θετική σχέση μεταξύ κρουσμάτων κορονοϊού και ατμοσφαιρικών συγκεντρώσεων γυρεοκόκκων κατά την άνοιξη του 2020, για την πλειονότητα των εξεταζόμενων περιοχών, σε συνέργεια με τη θερμοκρασία αέρα και τη σχετική υγρασία (Σχήμα 1) και με κατώφλι εμφάνισης αυτής της σχέσης τους 248 γυρεόκοκκους ανά κυβικό μέτρο. Αυτή η συνέργεια μπόρεσε να εξηγήσει κατά μέσο όρο 44% της διακύμανσης των θετικών κρουσμάτων κορονοϊού, συνήθως με μία χρονική υστέρηση τεσσάρων ημερών, και αποκλείοντας τον κύριο παράγοντα της κοινωνικής επαφής (όπως εκφραζόταν με τα μέτρα εγκλεισμού). Κοινωνικο-δημογραφικές επιδράσεις (πυκνότητα πληθυσμού και εγκλεισμός), όντας μεταβλητές που εκφράζουν κοινωνική επαφή, αποτέλεσαν τους σημαντικότερους παράγοντες στην εξίσωση της διασποράς του κορονοϊού: καθεστώτα εγκλεισμού, ειδικά όταν υιοθετούνταν αρκετά νωρίς οδηγούσαν σε μείωση των κρουσμάτων στο μισό, κατά μέσο όρο. Σημειωτέον ότι, κατά την περίοδο μελέτης, τα χαμηλότερα επίπεδα κρουσμάτων του ιού παρατηρήθηκαν σε περιοχές όπου οι ατμοσφαιρικές συγκεντρώσεις γυρεοκόκκων ήταν επίσης χαμηλότερες.

Συμπεράσματα

Η έρευνα αυτή όχι μόνο δείχνει τη θετική σχέση μεταξύ αφθονίας γύρης και κρουσμάτων SARS-CoV-2, αλλά επιτρέπει υποθέσεις για άλλες ανάλογες σχέσεις υπό την τρέχουσα κλιματική αλλαγή. Έχει κατ' επανάληψη διαπιστωθεί ότι οι ανεμομεταφερόμενοι γυρεόκοκκοι παράγονται σε μεγαλύτερες ποσότητες σε σχέση με το παρελθόν, ενώ η εποχή γυρεοφορίας μεταφέρεται νωρίτερα και εγγύτερα στην εποχή όπου ενδημούν συγκεκριμένες ιογενείς λοιμώξεις (Ziska et al. 2019). Λόγω της συνέργειας γύρης και ιών του αναπνευστικού συστήματος, αυτές οι μεταβολές εγκυμονούν σημαντικούς κινδύνους. Η στήριξη της λειτουργίας σταθμών βιοπαρακολούθησης γυρεοκόκκων και σπορίων μυκήτων αλλά και η δημιουργία συστημάτων πρόβλεψης και ενημέρωσης του κοινού για την ποιότητα της ατμόσφαιρας αναφορικά με βιολογικούς παράγοντες αποτελεί επιτακτική ανάγκη.



Σχήμα 1. Σχηματική απεικόνιση του σχεδιασμού της μελέτης και των κύριων αποτελεσμάτων της. Συλλέχθηκαν δεδομένα ατμοσφαιρικών συγκεντρώσεων γυρεοκόκκων, μετεωρολογικών παραμέτρων, κρουσμάτων SARS-CoV-2, πυκνότητας πληθυσμού και καθεστώτων εγκλεισμού που αφορούσαν την περίοδο μεταξύ 1ης Ιανουαρίου και 8ης Απριλίου 2020. Η βάση δεδομένων προέκυψε από 248 σταθμούς βιοπαρακολούθησης από 31 χώρες σε όλες τις κατοικημένες ηπείρους. Πέρα από την αναμενόμενη προστατευτική δράση των καθεστώτων lockdowns (γκρίζα κάθετη στήλη), βρέθηκαν σημαντικές θετικές συσχετίσεις των κρουσμάτων SARS-CoV-2 με τις ατμοσφαιρικές συγκεντρώσεις γυρεοκόκκων κατά τη διάρκεια ζεστών (οριζόντια γραμμή κόκκινης διαβάθμισης) και ξηρών (οριζόντια γραμμή μπλε διαβάθμισης) καιρικών συνθηκών.

Βιβλιογραφία

Damialis, A., Gilles, S., Sofiev, M., Sofieva, V., Kolek, F., Bayr, D., Plaza, M.P., Leier-Wirtz, V., Kaschuba, S., Ziska, L.H., Bielory, L., Makra, L., Trigo, M.M., COVID-19/POLLEN study group & Traidl-Hoffmann, C. (2021). Higher airborne pollen concentrations correlated with increased SARS-CoV-2 infection rates, as evidenced from 31 countries across the globe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 118, e2019034118.

Gilles, S., Blume, C., Wimmer, M., Damialis, A., Meulenbroek, L., Gökkaya, M., Bergougnan, C., Eisenbart, S., Sundell, N., Lindh, M., Andersson, L.M., Dahl, Å., Chaker, A., Kolek, F., Wagner, S., Neumann, A.U., Akdis, C.A., Garssen, J., Westin, J., Van't Land, B., Davies, D.E. & Traidl-Hoffmann, C. (2020). Pollen exposure weakens innate defense against respiratory viruses. *Allergy*, 75, 576-587.

Ziska, L.H., Makra, L., Harry, S.K., Bruffaerts, N., Hendrickx, M., Coates, F., Saarto, A., Thibaudon, M., Oliver, G., Damialis, A., Charalampopoulos, A., Vokou, D., Heiđmarsson, S., Guđjohnsen, E., Bonini, M., Oh, J.W., Sullivan, K., Ford, L., Brooks, G.D., Myszkowska, D., Severova, E., Gehrig, R., Ramón, G.D., Beggs, P.J., Knowlton, K. & Crimmins, A.R. (2019). Temperature-related changes in airborne allergenic pollen abundance and seasonality across the northern hemisphere: a retrospective data analysis. *The Lancet Planetary Health*, 3, e124-e131.

Μελέτες Πρόκλησης σε ανθρώπους– Human Challenge Studies & Βιοηθικά Ζητήματα. Η περίπτωση του SARS-CoV-2

ΚΟΡΜΠΑΚΗ Βασιλική, ΤΣΙΝΟΡΕΜΑ Σταυρούλα

Πανεπιστήμιο Πατρών, korvan@upatras.gr , *Πανεπιστήμιο Κρήτης,* tsinorema@fks.uoc.gr
ΔΠΜΣ «Βιοηθική»

Περίληψη
Στην παρούσα εργασία το θέμα είναι αν οι Μελέτες Πρόκλησης σε Ανθρώπους (Human Challenge Studies-HCS) είναι ένας ηθικά αποδεκτός τρόπος κλινικής έρευνας στην εκάστοτε επιτάχυνση της διαδικασίας εύρεσης νέων εμβολίων, μέσα από το παράδειγμα της περίπτωσης του SARS-CoV-2.

Λέξεις-κλειδιά
Μελέτες πρόκλησης, challenge studies, βιοηθική, εμβόλια, SARS-CoV-2

Εισαγωγή

Οι ελεγχόμενες μελέτες μόλυνσης ανθρώπων ή αλλιώς «μελέτες πρόκλησης σε ανθρώπους» (Human Challenge Studies-HCS) αφορούν την έκθεση υγιών εθελοντών σε ένα παθογόνο μικρόβιο, προκειμένου: α) να επιταχυνθεί η παραγωγή εμβολίου κατά του παθογόνου, β) να γίνουν συγκριτικές μελέτες μεταξύ των υποψήφιων εμβολίων και γ) να επιλεγούν τα καταλληλότερα εμβόλια για μεγαλύτερες μελέτες (WHO 2020).

Οι μελέτες πρόκλησης σε ανθρώπους πραγματοποιούνται: είτε με μόλυνση με το «αγρίου τύπου» παθογόνο παράγοντα (ιός, βακτήριο κλπ.), είτε με εξασθενημένο στέλεχος, το οποίο έχει παρασκευαστεί ειδικά για την συγκεκριμένη μελέτη πρόκλησης - HCS. Το στέλεχος, η δόση και ο τρόπος χορήγησης εξαρτώνται από το παθογόνο μικρόβιο. Σκοπός είναι να επιτευχθεί επαρκής ανοσο-αντίδραση στην πλειοψηφία των εθελοντών διασφαλίζοντας την ασφάλεια όλων. Οι μελέτες πρόκλησης έχουν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν σε επιδημίες για ασθένειες όπως: χολέρα, μαλάρια, κίτρινος πυρετός, ευλογιά, γρίπη και τα τελευταία 50 χρόνια, έχουν διεξαχθεί μελέτες πρόκλησης με ασφάλεια σε δεκάδες χιλιάδες ενήλικους εθελοντές, κατόπιν συναίνεσής τους, υπό την εποπτεία των επιτροπών δεοντολογίας της έρευνας (Akst 2020).

Ανάλυση θέματος

Συναίνεση κατόπιν ενημέρωσης – Informed Consent.

Σύμφωνα με την «Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2014» τα κύρια χαρακτηριστικά της συναίνεσης κατόπιν ενημέρωσης είναι:

1. Ενημέρωση: κάθε πιθανός εθελοντής πρέπει να ενημερώνεται επαρκώς για τους στόχους, τις μεθόδους, τις πηγές χρηματοδότησης, τυχόν πιθανές συγκρούσεις συμφερόντων, τις θεσμικές σχέσεις του ερευνητή, τα αναμενόμενα οφέλη και τους πιθανούς κινδύνους, τη μελέτη και την ενόχληση που μπορεί να συνεπάγεται μετά τη μελέτη, διατάξεις και οποιεσδήποτε άλλες σχετικές πτυχές της μελέτης. Επίσης, θα πρέπει κάθε πιθανός εθελοντής να ενημερώνεται για το δικαίωμα άρνησης συμμετοχής στη μελέτη ή ανάκλησης της συναίνεσης για συμμετοχή ανά πάσα στιγμή χωρίς αντίποινα. Ο ιατρός ή άλλο άτομο με τα κατάλληλα προσόντα πρέπει στη συνέχεια να ζητήσει την ελεύθερα ενημερωμένη συναίνεση, του δυνητικού ατόμου, κατά προτίμηση γραπτώς, αφού ασφαλώς βεβαιωθεί ότι αυτό το άτομο έχει κατανοήσει τις πληροφορίες. Εάν η συγκατάθεση δεν μπορεί να εκφραστεί γραπτώς, η μη γραπτή συγκατάθεση πρέπει να τεκμηριωθεί και να τεκμηριωθεί επίσημα.
2. Κατανόηση: οι ερευνητές είναι υπεύθυνοι για να εξακριβώσουν ότι το άτομο έχει κατανοήσει τις πληροφορίες και υποχρεωμένοι να βεβαιωθούν ότι οι πληροφορίες σχετικά με τον κίνδυνο για τα άτομα είναι πλήρεις και επαρκώς κατανοητές και όταν οι κίνδυνοι είναι πιο σοβαροί, αυτή η

υποχρέωση αυξάνεται. Η παρουσίαση όλων αυτών των πληροφοριών θα πρέπει να γίνεται με οργανωμένο και όχι γρήγορο τρόπο και είναι απαραίτητο να προσαρμοστεί στις ικανότητες του ατόμου. Περιστασιακά, ίσως να πρέπει να δώσουν κάποιες προφορικές ή γραπτές εξετάσεις κατανόησης.

3. Εθελοντική - Εκούσια: η συμμετοχή ατόμων που μπορούν να δώσουν συναίνεση μετά από ενημέρωση στην ιατρική έρευνα πρέπει να είναι εθελοντική. Παρόλο που ίσως είναι σκόπιμο να συμβουλευτούν τα μέλη της οικογένειας τους ή τους ηγέτες της κοινότητας στην οποία ζουν, κανένα άτομο ικανό να δώσει συναίνεση μετά από ενημέρωση δεν μπορεί να εγγραφεί σε μια ερευνητική μελέτη, εκτός εάν συμφωνεί ελεύθερα. Το στοιχείο της συναίνεσης κατόπιν ενημέρωσης απαιτεί όρους χωρίς εξαναγκασμό και αδικαιολόγητη επιρροή. Ο εξαναγκασμός συμβαίνει όταν μια πρόδηλη απειλή βλάβης παρουσιάζεται σκόπιμα από ένα άτομο σε άλλο προκειμένου να επιτευχθεί συμμόρφωση. Αντίθετα, η αδικαιολόγητη επιρροή προκύπτει μέσω μιας προσφοράς υπερβολικής, αδικαιολόγητης, ακατάλληλης ανταμοιβής ή άλλου πλεονάσματος προκειμένου να επιτευχθεί συμμόρφωση.

Σύμφωνα με την Onora O'Neil (O'Neil 2004) η συναίνεση κατόπιν ενημέρωσης του ασθενούς στην ιατρική πράξη ή του υποκειμένου στην έρευνα, θα πρέπει να είναι **σαφής/ξεκάθαρη και ειδική, χωρίς όμως να είναι δυνατόν να είναι «τέλεια»,** με μόνη ίσως εξαίρεση την περίπτωση των κλινικών μελετών, όπου η σαφής και ειδική συναίνεση κατόπιν ενημέρωσης μπορεί να είναι εφικτή διότι οι εθελοντές επιλέγονται όπως αναφέρει "de novo". Ακόμη όμως και σε αυτήν την περίπτωση, δεν αμφισβητείται η αρχή της ατομικής συναίνεσης όταν υπάρχει και ο παράγοντας «αμοιβή» στις μελέτες πρόκλησης για τον SARS-CoV-2; Επίσης, με δεδομένη την αδιαφάνεια της συναίνεσης σε μελλοντική πράξη (O'Neil 2004), στην περίπτωση των μελετών πρόκλησης για τον SARS-CoV-2, η συναίνεση κατόπιν ενημέρωσης δεν εμπεριέχει απρόβλεπτους κινδύνους για αυτόν που συναινεί;

World Health Organization (WHO) - Μελέτες πρόκλησης SARS-CoV-2.

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας δημοσίευσε τα Βασικά Κριτήρια για την ηθική αποδοχή των μελετών πρόκλησης COVID-19 στον άνθρωπο, στις 6 Μαΐου 2020, και πριν ανακαλυφθούν και δρομολογηθεί η παραγωγή των εμβολίων (WHO 2020).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Βασικά κριτήρια για την ηθική αποδοχή των μελετών πρόκλησης COVID-19 στον άνθρωπο, 6 Μαΐου 2020

Βασικά κριτήρια για την ηθική αποδοχή των μελετών πρόκλησης COVID-19 στον άνθρωπο 6 Μαΐου 2020	
Επιστημονικές και ηθικές εκτιμήσεις	
Κριτήριο 1: Επιστημονική αιτιολόγηση	Οι μελέτες πρόκλησης SARS-CoV-2 πρέπει να έχουν ισχυρή επιστημονική αιτιολόγηση.
Κριτήριο 2: Εκτίμηση κινδύνων και πιθανών οφελών	Πρέπει να είναι λογικό να αναμένεται ότι τα πιθανά οφέλη των μελετών πρόκλησης SARS-CoV-2 υπερτερούν των κινδύνων.
Διαβούλευση και συντονισμός	
Κριτήριο 3: Διαβούλευση και συμφωνία	Οι μελέτες πρόκλησης SARS-CoV-2 θα πρέπει να πραγματοποιούνται με διαβούλευση και συμφωνία με το κοινό, καθώς και σχετικούς εμπειρογνώμονες και υπεύθυνους χάραξης πολιτικής.
Κριτήριο 4: Συντονισμός	Τα ερευνητικά προγράμματα μελέτης πρόκλησης SARS-CoV-2 πρέπει να περιλαμβάνουν στενό συντονισμό μεταξύ ερευνητών, χρηματοδοτών, υπευθύνων χάραξης πολιτικής και ρυθμιστικών αρχών.
Κριτήρια επιλογής	

Κριτήριο 5: Επιλογή τοποθεσίας	Οι μελέτες πρόκλησης SARS-CoV-2 πρέπει να πραγματοποιούνται σε τόπους όπου η έρευνα μπορεί να διεξαχθεί με τα υψηλότερα επιστημονικά, κλινικά και ηθικά πρότυπα.
Κριτήριο 6: Επιλογή συμμετεχόντων	Οι ερευνητές μελέτης πρόκλησης SARS-CoV-2 θα πρέπει να διασφαλίσουν ότι τα κριτήρια επιλογής συμμετεχόντων περιορίζουν και ελαχιστοποιούν τον κίνδυνο.
Επισκόπηση και συναίνεση	
Κριτήριο 7: Επισκόπηση εμπειρογνωμόνων	Οι μελέτες πρόκλησης SARS-CoV-2 πρέπει να επανεξεταστούν από μια εξειδικευμένη ανεξάρτητη επιτροπή.
Κριτήριο 8: Συναίνεση κατόπιν ενημέρωσης	Οι μελέτες πρόκλησης SARS-CoV-2 πρέπει να περιλαμβάνουν **απαιτητική** συναίνεση κατόπιν ενημέρωσης.

Στα Κριτήρια 2, 5 και 6 αναδεικνύεται η αρχή της ωφέλειας και η αρχή της μη βλάβης. Στο Κριτήριο 2 αναφέρεται γενικότερα η ελαχιστοποίηση του κινδύνου είτε για τους συμμετέχοντες στις μελέτες πρόκλησης, είτε για το σύνολο της κοινωνίας. Όταν πρόκειται για τους συμμετέχοντες ωφέλεια και μη βλάβη είναι η **ανοσία** που θα πραγματοποιηθεί αν είναι αποτελεσματικό το υποψήφιο εμβόλιο, ενώ θα πρέπει να ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος για τη ζωή του καθενός χωριστά: επιλέγοντας χαμηλού κινδύνου συμμετέχοντες, με την επιλογή όσο το δυνατόν λιγότερων σε αριθμό, με τη στενή παρακολούθηση, την πρόωρη διάγνωση και την υποστηρικτική φροντίδα, συμπεριλαμβανομένης και της εντατικής φροντίδας αν απαιτηθεί, μακράς διάρκειας follow-up κ.α. Αναφορικά με την ωφέλεια και τη μη βλάβη της κοινωνίας, σίγουρα θα είναι ο αριθμός ζωών που θα σωθούν, η επιστροφή όλου του πλανήτη στην φυσιολογική του λειτουργία από κοινωνικής και οικονομικής άποψης, καθώς και τα δεδομένα οφέλη στη δημόσια υγεία. Στο Κριτήριο 5 η επιλογή τοποθεσίας διεξαγωγής των μελετών πρόκλησης θα πρέπει να είναι τέτοια ώστε να παρέχει τη μέγιστης ποιότητας φροντίδα (εντατική αν χρειαστεί) στους συμμετέχοντες. Στο Κριτήριο 6 αναφέρεται πως θα πρέπει να επιλέγονται νέοι, υγιείς (ψυχικά και σωματικά) εθελοντές, προκειμένου να είναι ελάχιστος ο κίνδυνος και μέγιστο το όφελος.

Στο Κριτήριο 8 και μέσω της απαιτητικής (rigorous), όπως αναφέρεται, συναίνεσης κατόπιν ενημέρωσης, προβάλουν: α) η αρχή της δικαιοσύνης και του σεβασμού της αυτονομίας του υποψήφιου-εθελοντή, β) η αρχή της δικαιοσύνης, εφόσον όλοι θα λάβουν την ίδια ενημέρωση, πριν την έναρξη της μελέτης πρόκλησης και συναινέσουν, γ) ο σεβασμός της αυτονομίας του δρώντος, σε συνδυασμό με μη εξαπάτηση και μη εξαναγκασμό, αναφορικά με το τι πρόκειται να υποστεί κατά τη διάρκεια της μελέτης, ποιος είναι ο σκοπός της μελέτης, ποια τα μέσα, ποιοι οι πιθανοί κίνδυνοι και ποια τα αναμενόμενα αποτελέσματα.

Κώδικας Νυρεμβέργης.
Ο Κώδικας της Νυρεμβέργης (γερμανικά: Nürnberger Kodex) είναι ένα σύνολο αρχών έρευνας όσον αφορά τα ζητήματα ηθικής που θίγουν το θέμα των επιστημονικών πειραμάτων με υποκείμενο το ανθρώπινο είδος. Ο "Κώδικας της Νυρεμβέργης" έχει δέκα σημεία και παραμένει ένα **ορόσημο** για την ιατρική ηθική και ένα από τα πιο μακροχρόνια προϊόντα της "Δίκης των Ιατρών" (Nuremberg Code 1949).

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Κώδικας Νυρεμβέργης

	ΚΩΔΙΚΑΣ ΝΕΡΕΜΒΕΡΓΗΣ
1	Η εθελοντική συναίνεση του εξεταζόμενου είναι απολύτως απαραίτητη.
2	Το πείραμα πρέπει να είναι τέτοιο ώστε να παράγει καρποφόρα αποτελέσματα για το καλό της κοινωνίας, απροσέγγιστο μέσω άλλων μεθόδων ή μέσων μελέτης και όχι τυχαίο και περιττό.

3	Το πείραμα θα πρέπει να σχεδιαστεί και να βασίζεται σε αποτελέσματα πειραμάτων σε ζώα, στην γνώση του φυσικού ιστορικού της νόσου ή άλλων προβλημάτων υπό μελέτη για να διασφαλιστεί ότι τα αναμενόμενα αποτελέσματα θα δικαιολογήσουν την εκτέλεση του πειράματος.
4	Το πείραμα πρέπει να διεξάγεται έτσι ώστε να αποφεύγεται κάθε περιττή σωματική και ψυχική οδύνη και τραυματισμός.
5	Δεν πρέπει να διεξάγεται πείραμα όταν υπάρχει εκ των προτέρων υποψία θανάτου ή τραυματισμού ως αποτέλεσμα. Εκτός, ίσως, σε εκείνα τα πειράματα όπου οι πειραματικοί γιατροί χρησιμεύουν επίσης ως υποκείμενα.
6	Ο βαθμός κινδύνου, δεν πρέπει να υπερβαίνει εκείνον που καθορίζεται από την ανθρωπιστική σημασία του προβλήματος που καλείται να επιλυθεί από το πείραμα.
7	Θα πρέπει να γίνουν οι κατάλληλες προετοιμασίες και να παραχθούν οι κατάλληλες εγκαταστάσεις για την προστασία του εξεταζόμενου, ακόμη και από τις ελάχιστες πιθανότητες τραυματισμού, αναπηρίας ή θανάτου.
8	Το πείραμα πρέπει να διεξάγεται μόνο από επιστημονικά εγκεκριμένα πρόσωπα. Ο υψηλότερος βαθμός εμπειρίας και φροντίδας θα πρέπει να απαιτείται σε όλα τα στάδια του πειράματος από εκείνους που διεξάγουν ή συμμετέχουν σε αυτό.
9	Κατά τη διάρκεια του πειράματος ο εξεταζόμενος είναι ελεύθερος να τερματίσει το πείραμα εάν έχει φτάσει στη φυσική ή ψυχική κατάσταση όπου η συνέχιση του πειράματος του φαίνεται αδύνατη.
10	Κατά τη διάρκεια του πειράματος, ο υπεύθυνος επιστήμονας πρέπει να είναι προετοιμασμένος να τερματίσει το πείραμα σε οποιοδήποτε στάδιο, εάν έχει πιθανό λόγο να πιστεύει κατά την άσκηση της καλής πίστης, την ανώτερη ικανότητα και την προσεκτική κρίση που απαιτείται από αυτόν, ότι η συνέχιση του πειράματος είναι πιθανό να οδηγήσει σε τραυματισμό, αναπηρία ή θάνατο του εξεταζόμενου.

Οι μελέτες πρόκλησης έρχονται σε σύγκρουση με τους κανόνες 4 και 5 του Κώδικα της Νυρεμβέργης, διότι μπορεί να προκύψει περιττός σωματικός ή και ψυχικός τραυματισμός του εθελοντή, ο οποίος θα εκτεθεί σκόπιμα σε έναν επικίνδυνο ιό, αφού εμβολιαστεί με το υποψήφιο εμβόλιο, καθώς και σοβαρή ασθένεια ή και απρόβλεπτος θάνατος του. Επίσης, δεν είναι δυνατόν να ισχύσουν οι κανόνες 9 και 10 του Κώδικα της Νυρεμβέργης, ειδικά αφού εκτεθεί στον ιό ο εθελοντής, το πείραμα δεν είναι δυνατόν να σταματήσει, είτε από εκείνον, είτε από τον υπεύθυνο επιστήμονα.

Μελέτες πρόκλησης και SARS-COV-2.

Στις 20 Οκτωβρίου 2020 ανακοινώθηκε ότι θα πραγματοποιηθούν μελέτες πρόκλησης στο Ηνωμένο Βασίλειο από έναν ιδιωτικό οργανισμό κλινικής έρευνας με έδρα το Δουβλίνο που ονομάζεται Open Orphan και τη θυγατρική του hVIVO, στη μονάδα απομόνωσης υψηλού επιπέδου του Royal Free Hospital στο Βόρειο Λονδίνο και η Taskforce της Βρετανικής Κυβέρνησης για το εμβόλιο COVID-19, συμφώνησε να πληρώσει την εταιρεία έως και 10 εκατομμύρια λίρες (11,4 εκατομμύρια ευρώ). Η αρχική δοκιμή θα περιλάμβανε 30-50 υγιείς συμμετέχοντες μεταξύ 18-30 ετών. Θα γινόταν με χαμηλή δόση πρόκλησης του στελέχους SARS-COV-2. Τον Φεβρουάριο του 2022, τα αποτελέσματα από τη Μελέτη Χαρακτηρισμού έδειξαν ότι η παραπάνω μελέτη πρόκλησης σε ανθρώπους για το εμβόλιο κατά του SARS-CoV-2 ήταν ασφαλής σε υγιείς νεαρούς ενήλικες και παρείχε λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη λοίμωξη COVID-19. Τα αποτελέσματα της μελέτης, έχουν σταλεί για δημοσίευση και αναμένουν έγκριση (Ben Killingley et al. 2022). Σε αυτή την πρώτη Μελέτη Πρόκλησης του SARS-CoV-2 για τον άνθρωπο, δεν ανιχνεύθηκαν σοβαρά ζητήματα ασφάλειας και παρουσιάστηκαν τα λεπτομερή χαρακτηριστικά της πρώιμης μόλυνσης και οι επιπτώσεις τους στη δημόσια υγεία. Τώρα που ολοκληρώθηκε η Μελέτη Χαρακτηρισμού, αυτό το μοντέλο μελέτης ανθρώπινης πρόκλησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διεξαγωγή μελλοντικών μελετών ανθρώπινης πρόκλησης COVID-19, που υπόκεινται σε κανονιστικές εγκρίσεις.

Επιχειρήματα ΥΠΕΡ- ΚΑΤΑ των μελετών πρόκλησης

Ένα θέμα το οποίο φαίνεται αρχικά ως πιθανό επιχείρημα υπέρ των μελετών πρόκλησης είναι η αμοιβή που συνήθως δίδεται στους εθελοντές. Πως αξιολογείται όμως ηθικά η αμοιβή αυτή; Μήπως κάποιοι

γίνουν εθελοντές μόνο για την αμοιβή; Μήπως ευάλωτες κοινωνικά ομάδες, όπως π.χ. άνεργοι, οδηγηθούν σε μια τέτοια απόφαση μόνο και μόνο για την αμοιβή; Όλα τα επιχειρήματα υπέρ των μελετών πρόκλησης ακολουθούν τη θεωρία του ωφελιμισμού, όπου για χάρη της επιτάχυνσης και της μεγιστοποίησης της αναμενόμενης ωφέλειας, μπορούν να θυσιαστούν και κάποιοι εθελοντές, δεδομένου ότι κάποιοι, με βάση τις πιθανότητες, θα αρρωστήσουν σοβαρά και ίσως πεθάνουν. Σύμφωνα με τη Σύσταση της Εθνικής Επιτροπής Βιοηθικής (Εθνική Επιτροπή Βιοηθικής 2020), «*το κριτήριο της «δυνητικής ωφελιμότητας», το οποίο αξιοποιείται από τους υποστηρικτές των μελετών πρόκλησης, υποστέλλεται δεοντολογικά εν όψει σοβαρών αβεβαιοτήτων που υπάρχουν σε σχέση, τόσο με την ασφάλεια των συμμετεχόντων/εθελοντών, όσο και τη δυνατότητα ορθής εκτίμησης κινδύνων γενικότερα, λόγω πολλαπλών επιστημονικών αβεβαιοτήτων σε σχέση με τον νέο κορωνοϊό. Επιπλέον, εξαιτίας των αυξημένων αβεβαιοτήτων, οι δυνητικοί συμμετέχοντες δεν μπορεί να είναι «πλήρως και επαρκώς ενημερωμένοι*» για τους κινδύνους, ώστε να παράσχουν **γνήσια συναίνεση**, όπως απαιτείται για τη συμμετοχή σε κάθε κλινική δοκιμή. Η Επιτροπή επισημαίνει επίσης τον κίνδυνο, εξαιτίας των παραπάνω προβλημάτων, να απειληθεί η δημόσια εμπιστοσύνη στις κλινικές δοκιμές για τη νέα νόσο, οι οποίες είναι απαραίτητες για την εξεύρεση αποτελεσματικού εμβολίου, αλλά και να ενταθεί η καχυποψία των πολιτών για τους εμβολιασμούς.

Συμπεράσματα – Συζήτηση

Συνοψίζοντας:

- ✓ μπορεί να προκληθεί σοβαρή ασθένεια ή θάνατος στην ομάδα εθελοντών, η οποίοι ναι μεν είναι συνήθως μεταξύ 18-30 ετών αλλά και σε αυτή την ηλικιακή ομάδα η θνησιμότητα είναι περίπου 0,03%,
- ✓ τι θα συμβεί στους εθελοντές που θα δεχθούν το placebo και στη συνέχεια θα μολυνθούν με τον SARS-CoV-2 στην περίπτωση που νοσήσουν με COVID-19;
- ✓ πρόκειται ουσιαστικά για έκθεση υγιών εθελοντών σε σχετικά υψηλό ρίσκο με κίνδυνο να υποφέρουν στο μέλλον από μακροχρόνιες άγνωστες συνέπειες της νόσου,
- ✓ ελλοχεύει ένας τεράστιος κίνδυνος να κλονιστεί η δημόσια εμπιστοσύνη στην έρευνα

Είναι σαφές ότι κατά τη διάρκεια των μελετών πρόκλησης καταρρίπτεται η αρχή του «ωφελείν» και του «μη βλάπτειν» (όρκος του Ιπποκράτη) και συγκεκριμένα για τους εθελοντές που θα αρρωστήσουν ή θα πεθάνουν από την έκθεσή τους στον ιό. Η «γνήσια» συναίνεση κατόπιν ενημέρωσης του συμμετέχοντα αμφισβητείται, στο πλαίσιο μιας μελέτης πρόκλησης με τόσους πιθανούς κινδύνους για την υγεία και τη ζωή των συμμετεχόντων. Ο εμβολιασμός με τον «άγριο τύπο» του ιού (O'Neil 2020), στις μελέτες πρόκλησης είναι ηθικά απαράδεκτος είτε αφορά τους εθελοντές που εμβολιάζονται με το υποψήφιο εμβόλιο, είτε ακόμη περισσότερο εκείνους που θα εμβολιαστούν με το placebo. Συνοψίζοντας, οι μελέτες πρόκλησης για την επιτάχυνση της παραγωγής εμβολίων, φέρουν πολλούς κινδύνους και αβεβαιότητες, αποτελώντας έναν μη ηθικά αποδεκτό τρόπο.

Βιβλιογραφια

Σύσταση για τις Κλινικές Δοκιμές εν Μέσω της Πανδημίας COVID-19, 29 Σεπτεμβρίου 2020. Αθήνα: Εθνική Επιτροπή Βιοηθικής

Akst, J. 2020. A Challenge Trial for COVID-19 Would Not Be the First of Its Kind, *<https://www.the-scientist.com/news-opinion/a-challenge-trial-for-covid-19-would-not-be-the-first-of-its-kind-68030>*

Ben Killingley, Alex Mann, Mariya Kalinova et al. Safety, tolerability and viral kinetics during SARS-CoV-2 human challenge, 01 February 2022, *PREPRINT (Version 1) available at Research Square* [https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1121993/v1].

Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2014. World Medical Association.

Key criteria for the ethical acceptability of COVID-19 human challenge studies, 6 May 2020. World Health Organisation.

Nuremberg Code, The Doctor's Trial: The Medical Case of the Subsequent Nuremberg Proceedings. United States Holocaust Memorial Museum Online Exhibitions.

O'Neill McPartlin S. et. al. 2020. Should we allow human challenge studies to infect healthy volunteers with SARS-CoV-2?. *BMJ*; 371:m4258.

O'Neill O. 2004. Informed consent and public health, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 359:1133–1136. [http://doi.org/10.1098/rstb.2004.1486].

O'Neill O. 2004. Accountability, trust and informed consent in medical practice and research. *Clin Med (Lond)*. May-Jun;4(3):269-76. [doi: 10.7861/clinmedicine.4-3-269].

Sars-Cov-2-ειδικά Τ-λεμφοκύτταρα ως θεραπεία της Covid-19

ΓΙΑΝΝΑΚΗ Μαρία[1], ΖΩΤΟΥ Ελένη[2], ΠΑΝΤΑΖΗ Χρυσούλα[3], ΧΡΙΣΤΟΦΗ Παναγιώτα[4], ΧΑΤΖΗΔΑΝΙΗΛ Αλεξάνδρα[5], ΣΕΛΙΔΗΣ Περικλής[6], ΠΑΣΧΟΥΔΗ Κυριακή[7], ΚΑΡΑΒΑΛΑΚΗΣ Γιώργος[8], ΞΩΧΕΛΛΗ Αλίκη[9], ΓΕΩΡΓΑΚΟΠΟΥΛΟΥ Αφροδίτη[10], ΠΑΠΑΓΙΑΝΝΗ Πηνελόπη Γεωργία[11], ΒΑΛΛΙΑΝΟΥ Ιωάννα[12], ΣΤΑΥΡΙΔΟΥ Φανή[13], ΣΙΩΤΟΥ Ελένη[14], ΚΑΜΜΕΝΟΥ Μαρία[15], ΒΑΡΣΑΜΟΥΔΗ Ευαγγελία[16], ΠΑΠΑΔΗΜΗΤΡΙΟΥ Βασιλική[17], ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΙΔΟΥ Μαρία[18], ΜΠΟΥΚΛΑ Άννα[19], ΣΑΚΕΛΛΑΡΗ Ιωάννα[20], ΦΥΛΑΚΤΟΥ Ασημίνα[21], ΑΝΑΓΝΩΣΤΟΠΟΥΛΟΣ Αχιλλέας[22], ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ Αναστασία[23], ΓΙΑΝΝΑΚΗ Ευαγγελία[24]

Αιματολογική Κλινική – Μονάδα Μεταμόσχευσης – Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη, giannakimar@hotmail.com-1
Αιματολογική Κλινική – Μονάδα Μεταμόσχευσης – Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη, elenazotoy@gmail.com-2
Αιματολογική Κλινική – Μονάδα Μεταμόσχευσης – Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη, chrysa_1@hotmail.gr-3
Αιματολογική Κλινική – Μονάδα Μεταμόσχευσης – Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη, panayiota2ch@hotmail.com-4
Αιματολογική Κλινική – Μονάδα Μεταμόσχευσης – Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη, antalydia@yahoo.gr-5
Αιματολογική Κλινική – Μονάδα Μεταμόσχευσης – Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη, peri.seli@yahoo.com-6
Αιματολογική Κλινική – Μονάδα Μεταμόσχευσης – Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη, paschoudi@bio.auth.gr-7
Αιματολογική Κλινική – Μονάδα Μεταμόσχευσης – Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη, giorgos.karavalakis@gmail.com-8
Εθνικό Περιφερειακό Κέντρο Ιστοσυμβατότητας - Τμήμα Ανοσολογίας, ΓΝΘ Ιπποκράτειο, Θεσσαλονίκη, aliki.xochelli@gmail.com-9
Αιματολογική Κλινική – Μονάδα Μεταμόσχευσης – Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη, aphroditegeo@hotmail.com-10
Αιματολογική Κλινική – Μονάδα Μεταμόσχευσης – Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη, papagianni.pinelopi@gmail.com-11
Αιματολογική Κλινική – Μονάδα Μεταμόσχευσης – Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη, vallianou@hotmail.com-12
Αιματολογική Κλινική – Μονάδα Μεταμόσχευσης – Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη, fanistavridou73@gmail.com-13
Αιματολογική Κλινική – Μονάδα Μεταμόσχευσης – Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη, elsiotou@yahoo.gr-14
Εθνικό Περιφερειακό Κέντρο Ιστοσυμβατότητας - Τμήμα Ανοσολογίας, ΓΝΘ Ιπποκράτειο, Θεσσαλονίκη, maria.kammenou@yahoo.gr-15
Εθνικό Περιφερειακό Κέντρο Ιστοσυμβατότητας - Τμήμα Ανοσολογίας, ΓΝΘ Ιπποκράτειο, Θεσσαλονίκη,evageliavar10@gmail.com-16
Αιματολογική Κλινική – Μονάδα Μεταμόσχευσης – Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη, hraklis31@gmail.com-17
Αιματολογική Κλινική – Μονάδα Μεταμόσχευσης – Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη, mtriantafyl@hotmail.gr-18
Εθνικό Περιφερειακό Κέντρο Ιστοσυμβατότητας - Τμήμα Ανοσολογίας, ΓΝΘ Ιπποκράτειο, Θεσσαλονίκη, annaboukla@gmail.com-19
Αιματολογική Κλινική – Μονάδα Μεταμόσχευσης – Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη, bmt@gpapanikolaou.gr-20
Εθνικό Περιφερειακό Κέντρο Ιστοσυμβατότητας - Τμήμα Ανοσολογίας, ΓΝΘ Ιπποκράτειο, Θεσσαλονίκη, fylaktoumina@gmail.com-21
Αιματολογική Κλινική – Μονάδα Μεταμόσχευσης – Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη, achanagh@gmail.com-22

Αιματολογική Κλινική – Μονάδα Μεταμόσχευσης – Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη, papada_1@hotmail.com-23
Αιματολογική Κλινική – Μονάδα Μεταμόσχευσης – Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη, eyannaki@uw.edu-24

Περίληψη
Ο ρόλος των SARS-CoV-2 ειδικών-Τ-λεμφοκυττάρων (CoV-2-STs) είναι καταλυτικός στην αντιμετώπιση της COVID-19. Ωστόσο στη σοβαρή COVID-19,η λεμφοπενία εμποδίζει τον έλεγχο της λοίμωξης. Στόχος της μελέτης, ήταν η αξιολόγηση της δυνατότητας δημιουργίας τράπεζας CoV-2-STs από αναρρώσαντες δότες με απώτερο στόχο την ανοσοθεραπεία COVID-19 ασθενών υψηλού κινδύνου. Για τη δημιουργία της τράπεζας επιλέχθηκαν COVID-19 αναρρώσαντες δότες με ισχυρή Τ-κυτταρική ανοσία και ευρεία HLA αντιπροσώπευση. Υπο GMP συνθήκες,μονοπύρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος διεγέρθηκαν με μείγμα πεπτιδίων αντιγόνων του SARS-CoV-2,καλλιεργήθηκαν και κρυοσυντηρήθηκαν. Τα CoV-2-STs τυποποιήθηκαν κατά HLA και ελέγχθηκαν φαινοτυπικά,λειτουργικά και ως προς τη στειρότητά τους. Πολλαπλές δόσεις κυτταρικών προϊόντων παρήχθησαν από 30 COVID-19 αναρρώσαντες δότες. Τα προϊόντα είναι πολυκλωνικά,περιλαμβάνοντας κυρίως βοηθητικά αλλά και κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα,εμφανίζοντας παράλληλα δείκτες μνήμης και ισχυρή SARS-CoV-2 ειδικότητα. Στα 29/30 κυτταρικά προϊόντα χαρακτηρίστηκε τουλάχιστον 1 HLA στόχευσης του SARS-CoV-2. Συμπερασματικά, προτείνουμε μια θεραπευτική προσέγγιση Τ-κυτταρικής ανοσοθεραπείας της COVID-19 με υψηλή ειδικότητα και ισχυρή κυτταροτοξικότητα.

Λέξεις κλειδιά
κορονοϊός SARS-2,υιοθετούμενη ανοσοθεραπεία,SARS-COV-2 ειδικά Τ-κύτταρα

Εισαγωγή
Δύο χρόνια μετά το ξέσπασμα της πανδημίας COVID-19, που προκαλείται από τον κορονοιό-2 του σοβαρού οξέος αναπνευστικού συνδρόμου (SARS-CoV-2), τα εμβόλια αποτελούν αδιαμφισβήτητα την πιο αποτελεσματική προστασία κατά του ιού. Υπάρχουν φάρμακα που ελαττώνουν τα ποσοστά νοσηλείας και θνητότητας σε ασθενείς με ήπια-μέτρια νόσο (molnupiravir και nirmatrelvir/ritonavir)(Hammond et al. 2022; Jayk Bernal et al. 2022; Owen et al. 2021) ή ελαττώνουν το χρόνο ανάρρωσης σε ασθενείς με προχωρημένη νόσο (remdesivir)(Beigel et al. 2020). Ωστόσο, καμία θεραπευτική επιλογή δεν έχει αποδειχθεί αποτελεσματική σε ασθενείς με σοβαρή νόσο.

Η θεραπεία με αντιικά Τ-κύτταρα είναι πολλά υποσχόμενη έναντι της COVID-19. Αντιικά Τ-κύτταρα που στοχεύουν τον ιό Epstein-Barr,τον αδενοιό,τον κυτταρομεγαλοιό,τον ιό BK, κυρίως σε ασθενείς μετά από μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων ή αιμοποιητικών κυττάρων έχουν εφαρμοστεί με ασφάλεια και αποτελεσματικότητα. Επιπλέον, εμείς και άλλοι, έχουμε δείξει τη σημασία των Τ-κυττάρων στον έλεγχο της SARS-CoV-2 λοίμωξης και τη δυνατότητα έκπτυξης SARS-CoV-2 Τ-κυττάρων μνήμης από αναρρώσαντες.

Στην παρούσα μελέτη αξιολογούμε την δυνατότητα δημιουργίας μιας τράπεζας ειδικών SARS-CoV-2 Τ-κυτταρικών προϊόντων από αναρρώσαντες δότες, τα οποία θα μπορούσαν να χορηγηθούν ως ένα ‘ζωντανό φάρμακο’ σε νοσηλευόμενους ασθενείς υψηλού κινδύνου με COVID-19.

Μέθοδοι
Επιλογή δοτών
Για τη δημιουργία της τράπεζας επιλέχθηκαν 30 αναρρώσαντες υγειονομικοί ως δότες, με ισχυρή SARS-CoV-2 Τ-κυτταρική ανοσία. Οι δότες επιλέχθηκαν ώστε να αντιπροσωπεύουν τον γενικό Ελληνικό πληθυσμό, ως προς τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας -HLA.
Παραγωγή SARS-CoV-2-STs
Τα CoV-2-STs παρήχθησαν μετά από λήψη 35-40ml αίματος από τους αναρρώσαντες δότες. Τα μονοπύρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος (PBMCs) διεγέρθηκαν με μείγμα πεπτιδίων

(ακίδας/μεμβράνης/NCAP) και καλλιεργήθηκαν για 9-11 ημέρες (Papadopoulou et al. 2014, 2019; Papayanni et al. 2021; Tzannou et al. 2017).

Δοκιμασία ELIspot

Τα CoV-2-STs διεγέρθηκαν με ένα μίγμα πεπτιδικών αντιγόνων (ακίδας/μεμβράνης/NCAP) ή μόνο με πεπτίδια ακίδας (μη μεταλλαγμένη, άλφα, βήτα, δέλτα ή όμικρον μετάλλαξη της ακίδας) ή μεμονωμένους ή συνολικούς (pooled) SARS-CoV-2 επίτοπους, γνωστούς για την HLA στόχευση του CoV-2. Η ειδικότητα μετρήθηκε με ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) Elispot [Eli.Scan scanner (A.EL.VIS),Eli.Analyse software V6.2.SFC] και εκφράστηκε ως κύτταρα που σχηματίζουν κηλίδες (SFCs) ανά αριθμό κυττάρων. Η απόκριση θεωρήθηκε θετική, εφόσον τα συνολικά SFC ήταν $\geq 30/2\times10^5$ CoV-2-STs.

Ανοσοφαινότυπος με Κυτταρομετρία Ροής

Τα CoV-2-STs επωάστηκαν με CD45,CD3,CD4,CD8,CD45RA και CD62L.

Τυποποίηση κατά HLA

DNA δείγματα από τους CoV-2-ST δότες τυποποιήθηκαν με υψηλή ανάλυση-2F ως προς HLA-A*,-B*,-C*,-DRB1*,-DRB3*,DRB4*,DRB5*,-DQA1*,-DQB1*,-DPA1* και -DPB1* είτε με PCR-SSP χρησιμοποιώντας ενίσχυση μέσω PCR με ειδικούς εκκινητές (Micro SSP),είτε με αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS).

Αποτελέσματα

Σύσταση τράπεζας Cov-2-STs κυτταρικών προϊόντων

Τριάντα κλινικής βαθμίδας CoV-2-ST,παρήχθησαν υπό GMP συνθήκες,από αναρρώσαντες COVID-19 δότες υγειονομικούς,επιλεγμένους να εκφράζουν τα συχνότερα HLA αντιγόνα του ελληνικού πληθυσμού. Από 3-10x10^7 PBMCs παρήχθησαν 60.5x10^7(24.5-111.5x10^7) κύτταρα ανά προϊόν [έκπτυξη 12(6.6-32)φορές],που αντιστοιχούν σε πολλαπλές δόσεις). Τα κυτταρικά προϊόντα ήταν πολυκλωνικά,σχεδόν αποκλειστικά Τ-κύτταρα [97%(81-99%)], κυρίως CD4+ [78%(61-95%)] αλλά και CD8+ [14%(3-33%)],ενώ εξέφραζαν δείκτες κεντρικής και δραστικής μνήμης (central memory:CD45RA-CD62L+ /effector memory CD45RA-/CD62L$^-$). Όλα τα CoV-2-STs παρουσίασαν ισχυρή ειδικότητα ενάντια στα 3 αντιγόνα στόχους του SARS-CoV-2 (NCAP-Spike-Membrane),και ειδικότερα,όχι μόνο κατά της αμετάλλακτης παραλλαγής άλφα αλλά και κατά τις μεταλλάξεις της ακίδας βήτα,δέλτα και όμικρον. Η λειτουργικότητα κατά του SARS-CoV-2 χαρτογραφήθηκε για κάθε προϊόν, και ανιχνεύθηκε τουλάχιστον ένα HLA που διαμεσολαβεί την CoV-2-ST ειδικότητα σε 29/30 προϊόντα**.**

Συμπεράσματα

Πρόσφατα, 2 από του στόματος αντιικά φάρμακα εγκρίθηκαν για την ήπια ή ενδιάμεσης βαρύτητας COVID-19, μειώνοντας κατά 89% (Paxlovid, nirmatrelvir/ritonavir) και 26% (Molnupiravir) τον κίνδυνο νοσηλείας και θανάτου σε μη νοσηλευόμενους ασθενείς χωρίς ανάγκες οξυγόνου, αλλά εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο εξέλιξης σε σοβαρή COVID-19 λοίμωξη(Hammond et al. 2022; Jayk Bernal et al. 2022; Owen et al. 2021). Ωστόσο οι θεραπευτικές επιλογές για τους νοσηλευόμενους ασθενείς με σοβαρή COVID-19 είναι δραματικά περιορισμένες. Το Remdesivir, μειώνει τον χρόνο ανάρρωσης στους ασθενείς με μέτρια-σοβαρή COVID-19(Beigel et al. 2020), ενώ το Lobinavir-Ritonavir στην σοβαρή Covid-19,δεν κατάφερε να δείξει όφελος στην επιβίωση συγκριτικά με την πρότυπη φροντίδα.

Ο ρόλος της Τ-κυτταρικής ανοσίας στην COVID-19 αναγνωρίστηκε πρόσφατα. Κυκλοφορούντα CoV-2-STs ανιχνεύθηκαν σε αναρρώσαντες δότες και συσχετίστηκαν με ανάρρωση(Le Bert et al. 2021; Papayanni et al. 2021; Rydyznski Moderbacher et al. 2020),ενώ η λεμφοπενία, χαρακτηριστικό της σοβαρής COVID-19, έχει συσχετισθεί με χειρότερη έκβαση(Chen et al. 2020; Yang et al. 2020; Zhou et al. 2020). Με δεδομένο τις ελάχιστες θεραπευτικές επιλογές στη σοβαρή COVID-19,τον ρόλο της ειδικής Τ-κυτταρικής ανοσίας και τον επιτυχή έλεγχο άλλων ιογενών λοιμώξεων σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση, με τη χρήση αντιικών Τ-λεμφοκυττάρων, στοχεύσαμε να αξιολογήσουμε την δυνατότητα δημιουργίας μίας τράπεζας CoV-2-STs από αναρρώσαντες COVID-19 δότες.

Δημιουργήσαμε λοιπόν μια τράπεζα άμεσα διαθέσιμων «off-the-shelf» CoV-2-STs από αναρρώσαντες δότες,οι οποίοι επιλέχθηκαν να εκφράζουν τα πλέον κοινά HLA στον ελληνικό πληθυσμό. Τα κυτταρικά προϊόντα εμφάνιζαν υψηλή ειδικότητα έναντι του SARS-CoV-2 και των γνωστών παραλλαγών του και ήταν πολυκλωνικά, εμπλουτισμένα κυρίως σε CD4+ κύτταρα.

Η εμφάνιση παραλλαγών του SARS-COV-2 εγείρει ανησυχίες ανοσιακής διαφυγής εάν τα SARS-COV-2-STs προέρχονται από δότες που εκτέθηκαν σε διαφορετικό στέλεχος. Ωστόσο τα κυτταρικά προϊόντα μας, που δημιουργήθηκαν από αναρρώσαντες που εκτέθηκαν στο πρωταρχικό στέλεχος του ιού, φάνηκαν δραστικά ενάντια σε όλες τις παραλλαγές. Καθώς τα παραγόμενα SARS-COV-2-STs καλύπτουν ολόκληρο το ιικό γονιδίωμα, έχουν μεγαλύτερη δυνατότητα να μην επιτρέψουν ανοσιακή διαφυγή επί νέων μεταλλάξεων, συγκριτικά με τα μονοκλωνικά αντισώματα ή τα εμβόλια.

Η χορήγηση SARS-COV-2-STs ελέγχθηκε σε τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη φάσης I-II ως θεραπεία της σοβαρής COVID-19 και θα μπορούσε να αποτελέσει ένα ισχυρό όπλο κατά της πανδημίας.

Βιβλιογραφία

Beigel, John H. et al. 2020. “Remdesivir for the Treatment of Covid-19 — Final Report.” *The New England Journal of Medicine* 383(19): 1813–26.

Le Bert, Nina et al. 2021. “Highly Functional Virus-Specific Cellular Immune Response in Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection.” *The Journal of experimental medicine* 218(5).

Chen, Guang et al. 2020. “Clinical and Immunological Features of Severe and Moderate Coronavirus Disease 2019.” *The Journal of Clinical Investigation* 130(5): 2620.

Hammond, Jennifer et al. 2022. “Oral Nirmatrelvir for High-Risk, Nonhospitalized Adults with Covid-19.” *The New England journal of medicine* 386(15): 1397–1408.

Jayk Bernal, Angélica et al. 2022. “Molnupiravir for Oral Treatment of Covid-19 in Nonhospitalized Patients.” *The New England journal of medicine* 386(6): 509–20.

Owen, Dafydd R. et al. 2021. “An Oral SARS-CoV-2 Mpro Inhibitor Clinical Candidate for the Treatment of COVID-19.” *Science* 374(6575): 1586–93.

Papadopoulou, A. et al. 2014. “Activity of Broad-Spectrum T Cells as Treatment for AdV, EBV, CMV, BKV, and HHV6 Infections after HSCT.” *Science Translational Medicine* 6(242): 242ra83-242ra83.

Papadopoulou A., Alvanou M., Koukoulias K. et al. 2019 “Clinical-Scale Production of Aspergillus-Specific T Cells for the Treatment of Invasive Aspergillosis in the Immunocompromised Host.” *Bone Marrow Transplantation* 54(12): 1963–72.

Papayanni, Penelope-Georgia et al. 2021. “Vaccinated and Convalescent Donor–Derived Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2–Specific T Cells as Adoptive Immunotherapy for High-Risk Coronavirus Disease 2019 Patients.” *Clinical Infectious Diseases* 73(11): 2073–82.

Rydyznski Moderbacher, Carolyn et al. 2020. “Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity.” *Cell* 183(4): 996.

Tzannou, I. et al. 2017. “Off-the-Shelf Virus-Specific T Cells to Treat BK Virus, Human Herpesvirus 6, Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, and Adenovirus Infections after Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation.” *Journal of Clinical Oncology* 35(31).

Yang, Xiaobo et al. 2020. “Clinical Course and Outcomes of Critically Ill Patients with SARS-CoV-2 Pneumonia in Wuhan, China: A Single-Centered, Retrospective, Observational Study.” *The Lancet. Respiratory medicine* 8(5): 475–81.

Zhou, Runhong et al. 2020. “Acute SARS-CoV-2 Infection Impairs Dendritic Cell and T Cell Responses.” *Immunity* 53(4): 864-877.e5.

Συσχέτιση της HPV μόλυνσης με κυτταρολογικές αλλοιώσεις σε τεστ Παπανικολάου

ΜΠΙΣΜΠΑ Μαρία[1], ΣΙΩΠΗ Ζωή[2], ΒΗΤΤΑΣ Σπύρος[3]

Microgenome, Ιδιωτικό διαγνωστικό εργαστήριο, m123ari8@gmail.com-1
Microgenome, Ιδιωτικό διαγνωστικό εργαστήριο, zoi_siop@hotmail.com-2
Microgenome, Ιδιωτικό διαγνωστικό εργαστήριο, vittas.microgenome@gmail.com-3

Περίληψη
Ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων ή Human Papilloma Virus ή HPV έχει συσχετιστεί με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και ανήκει στους πιο συχνά σεξουαλικώς μεταδιδόμενους ιούς. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας σε δείγματα thin prep, από τα οποία απομονώθηκε ολικό DNA με αυτόματη μέθοδο, εφαρμόστηκε η τεχνική Real Time PCR για τον εντοπισμό DNA του ιού HPV. Σε σύνολο 2964 δειγμάτων τα 544 (18.35%) βρέθηκαν θετικά σε κάποιον υψηλού κινδύνου υπότυπο, από τα οποία μόλις τα 36 (6.61%) εμφάνιζαν κυτταρολογικές αλλοιώσεις ποικίλης σημαντικότητας. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να συσχετιστεί η μόλυνση από τον HPV ιό με την πιθανώς παθολογική κυτταρολογική εικόνα κολποτραχηλικών επιθηλιακών κυττάρων.

Λέξεις κλειδιά
HPV, Τεστ Παπανικολάου, τραχηλικές αλλοιώσεις

Εισαγωγή
Ο ιός HPV αποτελεί μέλος της οικογένειας των Papillomaviridae, είναι διπλόκλωνος DNA ιός και έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, που αναφέρεται ως ο 3^{ος} σε συχνότητα στις αναπτυσσόμενες χώρες, ενώ είναι ικανός να μολύνει τόσο τα θήλεα όσο και τα άρρενα άτομα (Doorbar et al. 2012, Tsikouras et al. 2016, Zacharis et al. 2018). Συγκεκριμένα για τα θήλεα άτομα, ο HPV ιός εντοπίζεται στο 99% των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Μέχρι σήμερα, έχουν αναγνωριστεί περισσότεροι από 200 υπότυποι του ιού, με τους 15 από αυτούς να έχουν συνδεθεί με την ανάπτυξη καρκίνου (υψηλού κινδύνου ή ογκογόνοι υπότυποι) (Okunade 2020). Τα τελευταία χρόνια έχουν εφαρμοστεί προγράμματα προληπτικού ελέγχου, που περιλαμβάνουν τον εμβολιασμό, την μοριακή ανίχνευση ιικού DNA ή RNA και την κυτταρολογική εξέταση τραχηλικών κυττάρων, με σκοπό τον περιορισμό του φαινομένου. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί ο βαθμός συνάφειας μιας HPV λοίμωξης από υψηλού κινδύνου υπότυπο με παθολογικά ευρήματα στα αντίστοιχα κολποτραχηλικά επιχρίσματα που υποβλήθηκαν σε τεστ Παπανικολάου.

Μέθοδοι
Κατά το 2021, συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν συνολικά 2964 δείγματα thin prep από θήλεα άτομα, με σκοπό να υποβληθούν σε μοριακή ανίχνευση ιικού DNA του ιού HPV και σε τεστ Παπανικολάου. Η ανίχνευση του HPV DNA έγινε με την χρήση εμπορικού κιτ για την διενέργεια Real Time PCR της εταιρείας Sacace, με ικανότητα διάκρισης των υποτύπων 16, 18 και 45 και ικανότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης των υποτύπων 31, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, που θεωρούνται οι πιο διαδεδομένοι ογκογόνοι υπότυποι. Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκε τόσο αρνητικός όσο και θετικός μάρτυρας. Παράλληλα, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε κυτταρολογική εξέταση υγρής φάσης, αναλύθηκαν και κατατάχθηκαν κατά την κλίμακα Παπανικολάου και κατά την κλίμακα Bethseda.

Αποτελέσματα
Στο σύνολο των 2964 δειγμάτων διαφόρων ηλικιακών ομάδων, τα 544 δείγματα βρέθηκαν θετικά (18.35%) σε τουλάχιστον έναν υπότυπο από αυτούς που αναφέρεται ότι δύνανται να ανιχνευθούν με βάση την παραπάνω μέθοδο. Ακόμη, επί του συνόλου των δειγμάτων, τα 71 (2.39%) εμφάνιζαν παθολογικό τεστ Παπανικολάου.

Από τα 544 θετικά για HPV DNA δείγματα, τα 36 (6.61%) εμφάνιζαν κυτταρολογικές αλλοιώσεις στο τεστ Παπανικολάου, ενώ από το σύνολο των δειγμάτων με μη φυσιολογικό τεστ Παπανικολάου, τα 36/71 (50.7%) είχαν θετικό HPV DNA τεστ.

Τέλος, τα δείγματα με μη φυσιολογικά τεστ Παπανικολάου, στα οποία δεν ανιχνεύθηκε κάποιος από τους παραπάνω υπότυπους του ιού, ήταν μόλις 35/2420 (1.44%).

Συμπεράσματα

Με βάση τα παραπάνω στοιχεία φαίνεται ότι το ποσοστό των HPV μολύνσεων που φτάνουν σε κυτταρολογική αλλοίωση είναι 6.61% (36/544). Αντίθετα, τα δείγματα τα οποία εμφάνισαν HPV μόλυνση χωρίς ταυτόχρονη κυτταρολογική αλλοίωση αποτελούσαν την συντριπτική πλειοψηφία των θετικών HPV δειγμάτων (508/544 - 93.3%), γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι το 90% των μολύνσεων υποστρέφει μετά από αντιμετώπιση από το ανοσοποιητικό του ατόμου και πριν προλάβει να προκαλέσει κυτταρολογικές αλλοιώσεις (Elfgren et al. 2000). Παράλληλα, σε δείγματα στα οποία δεν έχει ανιχνευθεί DNA του ιού, το ποσοστό των μη φυσιολογικών τεστ Παπανικολάου ήταν μόλις 1.44%, ενώ αντίθετα το ποσοστό αυτών σε δείγματα θετικά για τον ιό ήταν 50.7% (36/71), δείχνοντας ότι η παρουσία του ιού εντείνει την παθολογικότητα των κυτταρολογικών αλλοιώσεων που ανιχνεύονται σε τεστ Παπανικολάου. Συνολικά, η παρούσα εργασία συμβάλλει στο να ξεκινήσει η διερεύνηση της πιθανότητας να διεξάγεται η μοριακή ανίχνευση DNA του ιού HPV παράλληλα με την κυτταρολογική εξέταση – τεστ Παπανικολάου για κάθε περιστατικό ανεξαρτήτως ιστορικού προηγούμενης HPV μόλυνσης ή παθολογικού αποτελέσματος από την κυτταρολογική εξέταση.

Βιβλιογραφία

Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R., & Stanley, M. A. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30 Suppl 5, F55–70.

Elfgren, K., Kalantari, M., Moberger, B., Hagmar, B., & Dillner, J. (2000). A population-based five-year follow-up study of cervical human papillomavirus infection. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 183(3), 561–567.

Okunade, K. S. (2020) Human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 40(5).

Tsikouras, P., Zervoudis, S., Manav, B., Tomara, E., Iatrakis, G., Romanidis, C., Bothou, A., & Galazios, G. (2016). Cervical cancer: screening, diagnosis and staging. *Journal of the Balkan Union of Oncology*, 21(2), 320–325.

Zacharis, K., Messini, C. I., Anifandis, G., Koukoulis, G., Satra, M., & Daponte, A. (2018). Human Papilloma Virus (HPV) and Fertilization: A Mini Review. *Medicina (Kaunas)*, 54(4), 50.

Αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης μορίων σηματοδότησης σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος στη νόσο του Πάρκινσον

[1]ΝΤΑΒΑΡΟΥΚΑΣ Παναγιώτης, [1]ΑΝΔΡΟΥΤΣΟΠΟΥΛΟΥ Αναστασία, [2]ΦΟΥΣΙΚΑ Νάνσυ, [2]ΜΑΡΟΓΙΑΝΝΗ Χρυσούλα, [2]ΚΑΛΑΛΑ Φανή, [2]ΣΠΕΛΕΤΑΣ Ματθαίος, [2]ΞΗΡΟΜΕΡΗΣΙΟΥ Γεωργία, [1]ΠΑΠΟΥΤΣΟΠΟΥΛΟΥ Σταματία

[1]Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Βιόπολις, Μεζούρλο, 41500, Ελλάδα
[2]Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Βιόπολις, Μεζούρλο, 41500, Ελλάδα

Περίληψη
Αν και η νόσος του Πάρκινσον αρχικά θεωρούνταν αποκλειστικά κινητική διαταραχή, είναι πλέον γνωστό ότι είναι μια πολυπαραγοντική νόσος, η οποία χαρακτηρίζεται από περίπλοκη αιτιολογία και παθογένεση. Αξιοσημείωτη είναι η παρουσία φλεγμονής τόσο στο νευρικό σύστημα όσο και στην περιφέρεια. Σε αυτή τη μελέτη, διερευνήθηκαν οι αλλαγές στο περιφερικό ανοσοποιητικό σύστημα ασθενών με Πάρκινσον. Συγκεκριμένα, εφαρμόσθηκε κυτταρομετρία ροής σε περιφερικό αίμα ασθενών (n=10) και υγιών (n=11) δοτών για τη μέτρηση των ποσοστών των μονοκυττάρων, των Τ λεμφοκυττάρων και των Β λεμφοκυττάρων. Παράλληλα, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα Σορτιλίνη, του υποδοχέα CD40 και τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB/p65. Στατιστικά σημαντικές διαφορές βρέθηκαν στα ποσοστά των Β λεμφοκυττάρων και των μονοκυττάρων μεταξύ ασθενών και υγειών, καθώς και στα επίπεδα της Σορτιλίνης και του NF-κB σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους.

Λέξεις-κλειδιά
Νόσος του Πάρκινσον, Νευροφλεγμονή, Μονοκύτταρα, Λεμφοκύτταρα

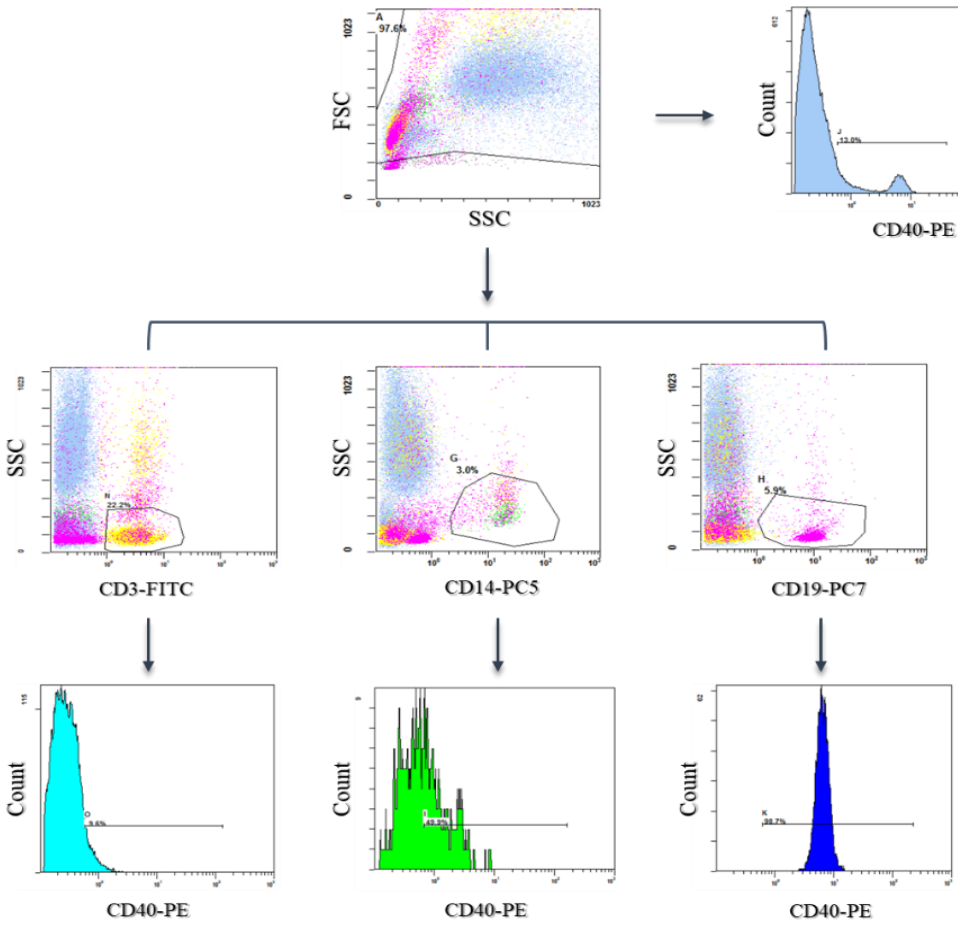
Εισαγωγή
Η νόσος του Πάρκινσον (ΝΠ) είναι μια χρόνια προοδευτική νευροεκφυλιστική διαταραχή, η οποία χαρακτηρίζεται από τον εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μέλαινας ουσίας του μεσεγκεφάλου (Jankovic 2008). Η ΝΠ παρουσιάζει περίπλοκη αιτιοπαθογένεση, της οποίας βασικά ορόσημα είναι ο σχηματισμός σωματίων Lewy, η αδυναμία αποικοδόμησης και απομάκρυνσης πρωτεϊνών και η νευροφλεγμονή (Jankovic and Tan 2020). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η μόλυνση από τον ιό SARS-CoV-2 ενεργοποιεί παρόμοια μοριακά μονοπάτια και φέρει κλινικά συμπτώματα παρόμοια με τη ΝΠ (Mysiris, Vavougios et al. 2022). Μεσολαβητές που συμβάλλουν στην πρόκληση χρόνιας φλεγμονής στη ΝΠ δείχνουν κοινό χαρακτηριστικό τη ρύθμιση τους από τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB (Bellucci, Bubacco et al. 2020). Το κανονικό μονοπάτι του NF-κB φαίνεται να ελέγχει την έκφραση μιας πληθώρας γονιδίων που ελέγχουν τόσο τη νευρωνική λειτουργία όσο και τη νευροφλεγμονή. Ανισορροπίες στην ενεργοποίησή του πιθανώς να συμβάλλουν σημαντικά στην παθογένεση της ΝΠ. Επιπρόσθετα, ο υποδοχέας νευροτενσίνης-3, γνωστός ως Σορτιλίνη, είναι μέλος της οικογένειας υποδοχέων με VPS10P (Vacuolar Protein Sorting 10 Protein) επικράτεια και εκφράζεται τόσο σε κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος, όσο και σε κύτταρα του ανοσοποιητικού (Hermey 2009). Δρα ως ενδοκυτταρικός διακινητής σημαντικών μορίων και υποκινητής με καίριο ρόλο στην επαγωγή και καταστολή διάφορων ανοσολογικών αποκρίσεων, αλλά και στην νευροπροστασία (Talbot, Saada et al. 2018). Η εμπλοκή του ανοσοποιητικού συστήματος στη νόσο του Πάρκινσον είναι ένα αξιοσημείωτο κομμάτι της ασθένειας, το οποίο ήρθε πρόσφατα στο προσκήνιο χωρίς να έχει διερευνηθεί επαρκώς. Η μελέτη του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, και του υποδοχέα Σορτιλίνη στα κύτταρα του ανοσοποιητικού σε σχέση με τη ΝΠ αποτελεί το αντικείμενο αυτής της μελέτης,

Μέθοδοι
Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος υγειών ατόμων και ασθενών με Πάρκινσον, τα οποία

συλλέχθηκαν κατά την παρακολούθησή τους στα εξωτερικά ιατρεία της Νευρολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Οι ασθενείς με ΝΠ χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, σε αυτούς που είχαν σποραδική νόσο (PD/Sporadic, n=5) και σε αυτούς που έφεραν γενετική μετάλλαξη σχετιζόμενη με τη νόσο (PD/SNPs, n=5). Τα δείγματα επεξεργάστηκαν εντός 24 ωρών από τη στιγμή της συλλογής τους και αναλύθηκαν με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Για τον προσδιορισμό διαφορετικών κυτταρικών τύπων χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα (Beckman Coulter) anti-CD3, anti-CD19, anti-CD14 για τον εντοπισμό των Τ και Β λεμφοκυττάρων και των μονοκυττάρων, αντίστοιχα. Για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης της Σορτιλίνης, του CD40 και του NF-κB/p65 χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα anti-human Sortilin unconjugated (Invitrogen) και mouse F(ab2) IgG (H+L)-FITC (Invitrogen), anti-human CD40-PE (Beckman Coulter), και anti-human p65/NFkB-PE (R&D Systems), αντίστοιχα. Τα δεδομένα της έρευνας παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα μέσης τιμής. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της σημαντικότητας των μέσων όρων μέσω των δοκιμασιών Mann-Whitney και Kruskal-Wallis, ενώ για τον προσδιορισμό της σημαντικότητας των συγκρίσεων που έγιναν υπολογίστηκε η τιμή σημαντικότητας (p-value). Η στατιστική σημαντικότητα προσδιορίστηκε ως p-value<0.05. Για την κατασκευή των γραφημάτων σύγκρισης των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό GraphPad Prism 9.4.0.

Αποτελέσματα

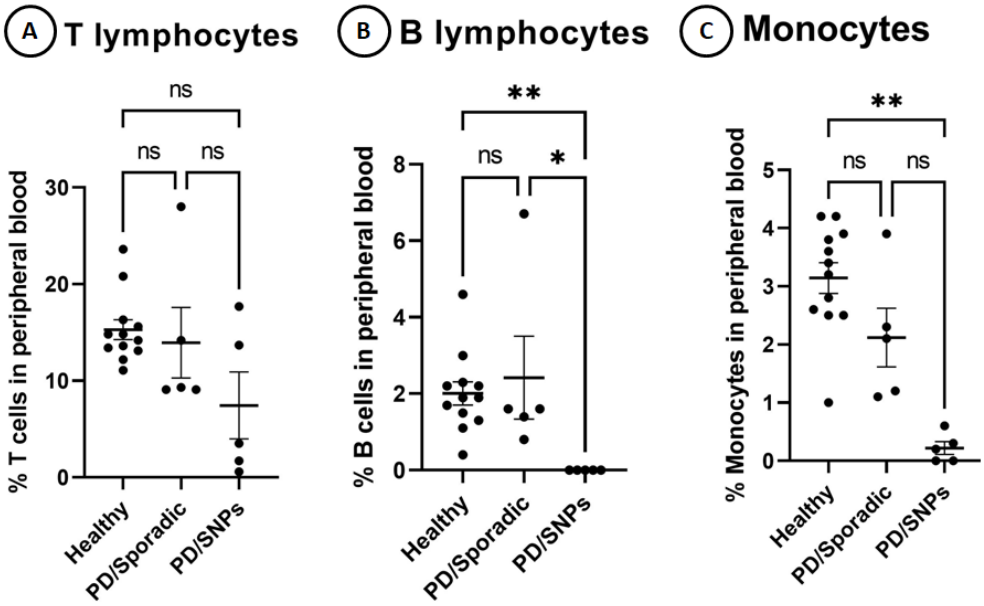
Η στρατηγική που ακολουθήθηκε για την ανάλυση των δειγμάτων κυτταρομετρίας μέσω σκικτογραμμάτων και ιστογραμμάτων κατανομής συχνοτήτων παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 2. Ενδεικτική στρατηγική ανάλυσης των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 2, τα επίπεδα των Β λεμφοκυττάρων και των μονοκυττάρων παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική μείωση στους ασθενείς με Πάρκινσον και ιδιαίτερα σε αυτούς που μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (Single-nucleotide polymorphism, SNPs) που σχετίζονται με την ασθένεια σε σχέση με τους υγιείς δότες, ενώ ο πληθυσμός των Τ λεμφοκυττάρων παραμένει

σταθερός. Το σύνολο των κυττάρων του ανοσοποιητικού των ασθενών με SNPs παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα του p65/NFkB, εκ των οποίων τα Τ λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα παρουσιάζουν αύξηση των επιπέδων του υποδοχέα CD40. Αν και δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά στα επίπεδα της Σορτιλίνης στα λεμφοκύτταρα, στα μονοκύτταρα παρατηρήθηκε αισθητή αύξηση σε ασθενείς με ΝΠ.



Εικόνα 3. Ποσοστά πληθυσμών ανοσοκυττάρων σε υγιείς δότες (n=6), δότες με σποραδική ΝΠ (n=5) και δότες με SNPs σχετιζόμενα με τη νόσο (n=5). (Α) Τ λεμφοκύτταρα. (Β) Β λεμφοκύτταρα. (C) Μονοκύτταρα.
ns = not statistical significant, *: p-value < 0.05, **: p-value < 0.01

Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας γίνεται αντιληπτό ότι υπάρχει μια εμφανής αλλαγή στο προφίλ του περιφερικού ανοσοποιητικού συστήματος στη νόσο του Πάρκινσον. Παρατηρήθηκε μείωση των ποσοστών των Β λεμφοκυττάρων και των μονοκυττάρων σε ασθενείς με Πάρκινσον και, ιδιαίτερα, σε άτομα που φέρουν συγκεκριμένους μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς, οι οποίοι ευθύνονται για τη νόσο. Αυτή η μείωση συνάδει με προηγούμενες έρευνες και μπορεί να αποδοθεί στη γήρανση του ανοσοποιητικού, καθώς και στη μείωση της ντοπαμίνης, η οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό των Β λεμφοκυττάρων (Meredith, Holder et al. 2006, Qin, Jing et al. 2016, Jiang, Gao et al. 2017). Παράλληλα, παρατηρήθηκε αύξηση του p65/NF-κB στο σύνολο των ανοσοκυττάρων των ασθενών με ΝΠ που φέρουν SNPs. Αυξημένα επίπεδα του p65/NF-κB υποδηλώνουν ενεργοποίηση του κανονικού μονοπατιού του NF-κB, η οποία στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος παρατηρείται συνήθως σε καταστάσεις φλεγμονής (Trares, Ackermann et al. 2022). Ιδιαίτερα σημαντικό εύρημα αυτής της μελέτης αποτελεί η αύξηση των επιπέδων της Σορτιλίνης στα μονοκύτταρα των ασθενών ΝΠ με SNPs, κάτι το οποίο δεν έχει αναφερθεί ξανά στη διεθνή βιβλιογραφία. Ωστόσο, μελέτες σε γενετικό επίπεδο έχουν δείξει συσχέτιση ενός άλλου μέλους της οικογένειας υποδοχέων με VPS10P επικράτεια, της SorLA, με τη ΝΠ (Xiromerisiou, Bourinaris et al. 2021). Περαιτέρω μελέτες θα μας βοηθήσουν στην κατανόηση της συμβολής αυτών των πρωτεϊνών και του ανοσοποιητικού συστήματος στη παθογένεση της νόσου.

Βιβλιογραφία

Bellucci, A., et al. (2020). "Nuclear Factor-kappaB Dysregulation and alpha-Synuclein Pathology: Critical Interplay in the Pathogenesis of Parkinson's Disease." Front Aging Neurosci **12**: 68.

Hermey, G. (2009). "The Vps10p-domain receptor family." Cell Mol Life Sci **66**(16): 2677-2689.

Jankovic, J. (2008). "Parkinson's disease: clinical features and diagnosis." J Neurol Neurosurg Psychiatry **79**(4): 368-376.

Jankovic, J. and E. K. Tan (2020). "Parkinson's disease: etiopathogenesis and treatment." J Neurol Neurosurg Psychiatry **91**(8): 795-808.

Jiang, S., et al. (2017). "The correlation of lymphocyte subsets, natural killer cell, and Parkinson's disease: a meta-analysis." Neurol Sci **38**(8): 1373-1380.

Meredith, E. J., et al. (2006). "Dopamine targets cycling B cells independent of receptors/transporter for oxidative attack: Implications for non-Hodgkin's lymphoma." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(36): 13485-13490.

Mysiris, D. S., et al. (2022). "Post-COVID-19 Parkinsonism and Parkinson's Disease Pathogenesis: The Exosomal Cargo Hypothesis." Int J Mol Sci **23**(17).

Qin, L., et al. (2016). "Aging of immune system: Immune signature from peripheral blood lymphocyte subsets in 1068 healthy adults." Aging (Albany NY) **8**(5): 848-859.

Talbot, H., et al. (2018). "Regulatory Roles of Sortilin and SorLA in Immune-Related Processes." Front Pharmacol **9**: 1507.

Trares, K., et al. (2022). "The canonical and non-canonical NF-kappaB pathways and their crosstalk: A comparative study based on Petri nets." Biosystems **211**: 104564.

Xiromerisiou, G., et al. (2021). "SORL1 mutation in a Greek family with Parkinson's disease and dementia." Ann Clin Transl Neurol **8**(10): 1961-1969.

IV.ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

Ετήσιος αντίκτυπος της πανδημίας Covid-19 και οι συνακόλουθοι περιορισμοί μετακίνησης στα επίπεδα της βιταμίνης D στη δυτική Ελλάδα

[1]ΜΠΑΤΣΗ Χριστίνα,[1]ΞΟΥΡΓΙΑ Ξανθή, ΤΣΙΟΥΡΗΣ Σπυρίδων, [1]ΣΙΟΚΑ Χρύσα

[1]Εργαστήριο Πυρηνικής Ιατρικής, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ιωαννίνων, batsi.christina@gmail.com

Περίληψη
Η λιποδιαλυτή βιταμίνη D, γνωστή και ως «βιταμίνη του ήλιου», ασκεί τη δράση της σε πολλά όργανα του σώματος. Η βιταμίνη D3 παράγεται, όταν η ηλιακή ακτινοβολία έρχεται σε επαφή με το δέρμα μέσω της έκθεσής του στην υπεριώδη ηλιακή ακτινοβολία Β (UVB), ενώ μικρές ποσότητες προσλαμβάνονται διατροφικώς. Ανεπάρκεια βιταμίνης D μπορεί να προκύψει κυρίως από ανεπαρκή έκθεση στον ήλιο, καθώς και από μειωμένη διαιτητική πρόσληψη. Σύμφωνα με την Παγκόσμια Ενδοκρινολογική Εταιρεία, το κατώτερο φυσιολογικό όριο συγκέντρωσης βιταμίνης D στον ορό είναι 30 ng/ml, επίπεδα 10-29 ng/ml συνιστούν ανεπάρκεια, ενώ τιμές <10 ng/ml αληθή έλλειψη. Η έλευση της πανδημίας Covid-19, θα μπορούσε να επιδράσει αρνητικά στα επίπεδα της βιταμίνης D του πληθυσμού, μέσω των μέτρων περιορισμού της κυκλοφορίας, περιορίζοντας ταυτόχρονα την έκθεση των πολιτών στην ηλιακή ακτινοβολία. Φαίνεται, ωστόσο, πως ποικίλοι ανεξάρτητοι παράγοντες αλληλεπίδρασαν, ώστε να παρατηρηθεί μια σημαντική αύξηση των επιπέδων βιταμίνης Dκατά τους μήνες της πανδημίας.

Λέξεις-κλειδιά
βιταμίνη D,έλλειψη, μέτρα περιορισμού, Covid-19

Εισαγωγή
Η βιταμίνη D3 παράγεται στο μεγαλύτερο ποσοστό στο δέρμα, ως αποτέλεσμα της ακτινοβόλησης της 7-δευδρο-χοληστερόλης από τις υπεριώδεις ακτίνες του ηλιακού φωτός, ενώ ένα μικρότερο τμήμα προέρχεται από τις τροφές, όπως π.χ. αβγά, γάλα, ψάρια. Η D3 είναι ανενεργή και υπόκειται σε δύο υδροξυλιώσεις, αρχικά στο ήπαρ, όπου μετατρέπεται σε 25-υδρόξυχοληκαλσιφερόλη που αποτελεί και την πιοενεργή μορφή της βιταμίνης D. Η δεύτερη υδροξυλίωση που πραγματοποιείται στους νεφρούς, ενεργοποιείται από την παραθορμόνη, μια ορμόνη που εκκρίνεται από τους παραθυρεοειδής αδένες και παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό του ασβεστίου και του φωσφόρου. Η 1.25-διυδροξυχοληκαλσιφερόλη δρα με την σειρά της στο έντερο αυξάνοντας την απορρόφηση του ασβεστίου από τις τροφές (Omdahl et al., 2002; Christakos et al., 2016).

Τα τελευταία χρόνια, το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί στη μελέτη των επιπέδων της βιταμίνης D και πρόσφατες μελέτες μεγάλης κλίμακας αποτυπώνουν ότι περίπου το 40% των Ευρωπαίων έχει ανεπάρκεια βιταμίνης D και το 13% έχει αληθή έλλειψη (Cashman et al., 2016). Το ερευνητικό ενδιαφέρον για την μέτρηση των επιπέδων Βιταμίνης D, σχετίζεται με το γεγονός πως τα χαμηλά επίπεδα δε συσχετίζονται μόνο με το μεταβολισμό του ασβεστίου αλλά συνδέονται και με μια πληθώρα παθολογικών καταστάσεων όπως ο χρόνιος πόνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, η κατάθλιψη κ.α. (Benhamou et al., 2021).

Τα μέτρα περιορισμού της κυκλοφορίας των πολιτών για την αντιμετώπιση του κινδύνου διασποράς του κορονοϊού Covid-19 (ΚΥΑ*Δ1α/ΓΠ.οικ.20036*/22.3.2020, ΦΕΚ 986/Β΄22/03/2020) περιόρισαν ταυτόχρονα και την έκθεση των πολιτών στην ηλιακή ακτινοβολία. Τα μέτρα αυτά, θα μπορούσαν εκ πρώτης όψεως να επιδράσουν αρνητικά στα επίπεδα της Βιταμίνης D, μιας και η σύνθεσή της επηρεάζεται από την έκθεση στον ήλιο.

Σκοπός
Ήταν ο προσδιορισμός των επιπέδων βιταμίνης D σε δείγματα ορού εξεταζόμενων του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (ΠΓΝΙ) που αναλύθηκαν στο εργαστήριο κατά τη

διάρκεια ενός έτους πριν από την πανδημία Covid-19 (Μάρτιος 2019 – Φεβρουάριος 2020) και κατά το πρώτο έτος της πανδημίας (Μάρτιος 2020 – Φεβρουάριος 2021).

Μεθοδολογία

Κατά τη διάρκεια 24 μηνών (3/2019–02/2021) της μελέτης, μετρήθηκε η βιταμίνη D στον ορό 13024 δειγμάτων εξεταζομένων, που παραπέμφθηκαν στη Μονάδα Ραδιοανοσολογικών Αναλύσεων του Εργαστηρίου Πυρηνικής Ιατρικής του ΠΓΝΙ. Ο προσδιορισμός των επιπέδων της βιταμίνης D έγινε με τη μέθοδο της ραδιοανασολογικής ανάλυσης (RIA) και οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε δικάναλο μετρητή ακτινοβολίας–γ πολλαπλών δειγμάτων. Η επίδραση της ηλικίας, του φύλου και του έτους στα μετρηθέντα επίπεδα βιταμίνης D πριν και κατά την πανδημία, αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας παραμετρικές δοκιμασίες.Οι τιμές των μεταβλητών εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση.

Αποτελέσματα

Πραγματοποιήθηκαν 13024 αναλύσεις, οι οποίες αφορούσαν 4293 (32,9%) άνδρες και 8731 γυναίκες (67,1%). Μία επισκόπηση των χαρακτηριστικών τους με βάση το έτος προσέλευσης φαίνεται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1: Δημογραφικά χαρακτηριστικά και συγκέντρωση Βιταμίνης D με βάση το φύλο

Συγκέντρωση Βιταμίνης D (ng/ml)						
	Πριν την Πανδημία			Κατά την Πανδημία		
	Σύνολο	Άνδρες	Γυναίκες	Σύνολο	Άνδρες	Γυναίκες
Αριθμός Ασθενών	7060	2340	4720	5964	1953	4011
Μέση ηλικία ± τυπική απόκλιση (SD)	55,1±19,3	54,1±20,7	55,6±18,5	53,1±18,4	53,2±19,5	53,1 ±17,9
Μέση συγκέντρωση βιταμίνης D±τυπική απόκλιση (SD)	17,0 ±8,2	16,4 ±7,8	17,5 ±8,1	18,3 ±8,2	17,8 ±8,4	18,5 ±8,1

Η μέση ηλικία των εξεταζομένων πριν την πανδημία ήταν 55,1±19,3 έτη και 53,1±18,4 έτη κατά το πρώτο έτος της πανδημίας. Η μέση συγκέντρωση της βιταμίνης D στον ορό του πληθυσμού ήταν 17,0 ± 8,2 ng/ml πριν την πανδημία με τις γυναίκες να παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα από τους άνδρες (17,5 ± 8,1ng/ml έναντι 16,4 ±7,8 ng/ml, $p<0.05$). Κατά τη διάρκεια της πανδημίας η μέση συγκέντρωση της βιταμίνης D στον ορό σε ολόκληρο το πληθυσμό ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με πριν (18,3 ± 8,2 ng/ml, $p<0.05$) με τις γυναίκες να παρουσιάζουν και πάλι σημαντικά υψηλότερα επίπεδα από τους άνδρες (18,5 ± 8,1 ng/ml έναντι 17,8 ±8,4 ng/ml, $p<0.05$). Η αύξηση της Βιταμίνης D κατά την πανδημία βρέθηκε σημαντική όχι μόνο για το σύνολο του πληθυσμού, αλλά και επιμέρους σε κάθε φύλο ($p<0.05$). Πριν την πανδημία αληθή έλλειψη είχε το 17,2% του πληθυσμού και επάρκεια το 7,5% ενώ κατά τη διάρκεια της πανδημίας αληθή έλλειψη είχε το 13,8% και επάρκεια το 8,9%.

Συμπεράσματα

Μολονότι η μελέτη ανέδειξε την ύπαρξη μειωμένων επιπέδων βιταμίνης D ορού σε επίπεδο πληθυσμού, τόσο πριν, όσο και κατά τη διάρκεια της πανδημίας Covid-19, τα προ πανδημίας επίπεδα βρέθηκαν σημαντικά χαμηλότερα ($p<0,05$). Το εύρημα θα μπορούσε να σχετίζεται αφενός με τη λήψη βιταμινούχων συμπληρωμάτων από σημαντική μερίδα του πληθυσμού, με σκοπό την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι του κορωνοϊού, αφετέρου με αύξηση της αθλητικής δραστηριότητας κατά το χρονικό διάστημα που εφαρμόζονταν τα μέτρα περιορισμού της κυκλοφορίας. Στον πληθυσμό της μελέτης μας, οι γυναίκες είχαν υψηλότερες μέσες συγκεντρώσεις βιταμίνης D στον ορό σε σχέση με τους άνδρες ($p<0,05$) παρόλο που το γυναικείο φύλο σχετίζεται με χαμηλότερα επίπεδα (Mithal et al., 2009). Μια εξήγηση είναι ότι οι γυναίκες στο δείγμα μας ήταν πιο πιθανό να λάβουν συμπληρώματα νωρίτερα στη ζωή τους για την πρόληψη της οστεοπόρωσης (Rizzoli et al., 2013). Τα αποτελέσματα της εργασίας μας, βρίσκονται σε συμφωνία με μελέτες που αφορούν τα επίπεδα Βιταμίνης D σε μεγάλους πληθυσμούς στην Ευρώπη με τη διαφορά πως στην Ελλάδα μικρότερο

ποσοστό του πληθυσμού (<10%) παρουσιάζει αληθή έλλειψη σε σχέση με την υπόλοιπη Ευρώπη (~13%)(Amrein et al., 2020).

Βιβλιογραφία

Amrein, K., Scherkl, M., Hoffmann, M., Neuwersch-Sommeregger, S., Köstenberger, M., TmavaBerisha, A., Martucci, G., Pilz, S., &Malle, O. (2020). Vitamin D deficiency 2.0: an update on the current status worldwide. *European journal of clinical nutrition*, *74*(11), 1498–1513. https://doi.org/10.1038/s41430-020-0558-y

Benhamou, J., Schindler, C.,Rutishauser, J. (2021). Prevalence of vitamin D deficiency in an inpatient population in the Swiss Canton of Basel-Country. *Swiss medical weekly*, *151*, w20470. https://doi.org/10.4414/smw.2021.20470

Cashman, K. D., Dowling, K. G., Škrabáková, Z., Gonzalez-Gross, M., Valtueña, J., De Henauw, S., Moreno, L., Damsgaard, C. T., Michaelsen, K. F., Mølgaard, C., Jorde, R., Grimnes, G., Moschonis, G., Mavrogianni, C., Manios, Y., Thamm, M., Mensink, G. B., Rabenberg, M., Busch, M. A., Cox, L., Kiely, M. (2016). Vitamin D deficiency in Europe: pandemic?*The American journal of clinical nutrition*, *103*(4), 1033–1044. https://doi.org/10.3945/ajcn.115.120873

Christakos, S., Dhawan, P.,Verstuyf, A., Verlinden, L., Carmeliet, G. (2016). Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiological reviews*, *96*(1), 365–408. https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2015

Mithal, A., Wahl, D. A., Bonjour, J. P., Burckhardt, P., Dawson-Hughes, B., Eisman, J. A., El-Hajj Fuleihan, G., Josse, R. G., Lips, P., Morales-Torres, J., & IOF Committee of Scientific Advisors (CSA) Nutrition Working Group (2009). Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, *20*(11), 1807–1820. https://doi.org/10.1007/s00198-009-0954-6

Omdahl, J. L., Morris, H. A., & May, B. K. (2002). Hydroxylase enzymes of the vitamin D pathway: expression, function, and regulation. *Annual review of nutrition*, *22*, 139–166. https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.120501.150216

Rizzoli, R., Boonen, S., Brandi, M. L., Bruyère, O., Cooper, C., Kanis, J. A., Kaufman, J. M., Ringe, J. D., Weryha, G., &Reginster, J. Y. (2013). Vitamin D supplementation in elderly or postmenopausal women: a 2013 update of the 2008 recommendations from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). *Current medical research and opinion*, *29*(4), 305–313. https://doi.org/10.1185/03007995.2013.766162

Εξόρυξη δεδομένων κειμένου για την ανάπτυξη βάσης δεδομένων για δυνητικά προβιοτικούς μικροοργανισμούς

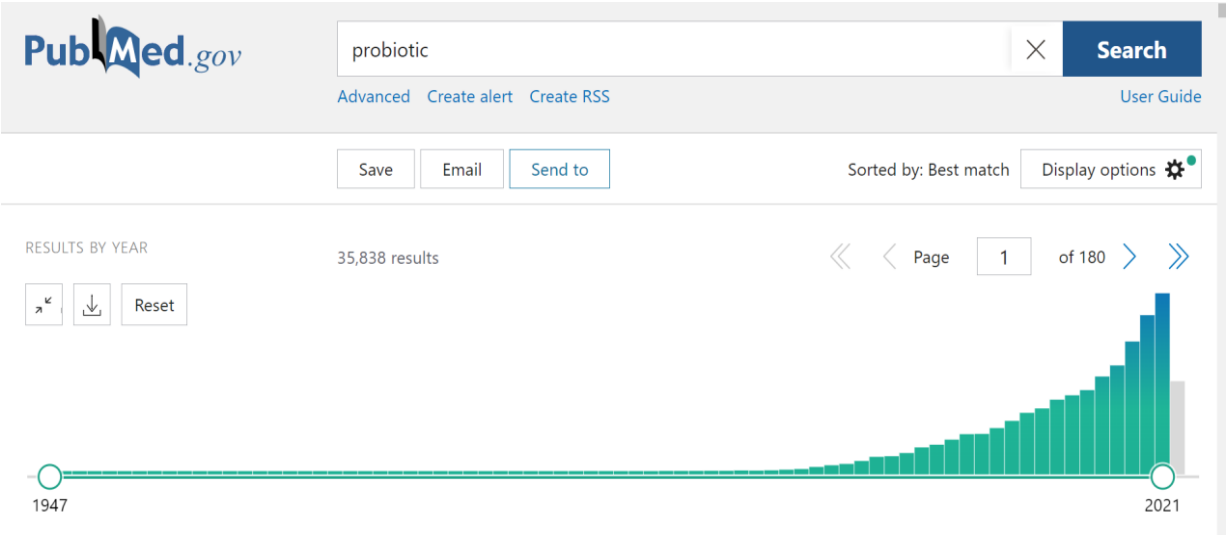
ΡΕΠΑΝΑΣ Παναγιώτης[1], ΚΑΒΑΚΙΩΤΗΣ Ιωάννης[1], ΤΣΙΦΙΝΤΑΡΗΣ Μαργαρίτης[1], ΚΙΟΥΣΗ Δέσποινα Ευγενία[1], ΓΑΛΑΝΗΣ Αλέξης[1*]

[1]*Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Δραγάνα, Αλεξανδρούπολη, Ελλάδα agalanis@mbg.duth.gr*

Περίληψη
Τα προβιοτικά είναι μικροοργανισμοί οι οποίοι μπορούν να προσδώσουν ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία του ξενιστή, όταν καταναλώνονται σε κατάλληλες ποσότητες (Hill et al., 2014). Σήμερα, υπάρχει διαθέσιμος μεγάλος όγκος βιβλιογραφίας σχετικά με την απομόνωση και μελέτη των βιολογικών ιδιοτήτων νέων πιθανά προβιοτικών στελεχών. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο σχεδιασμός και η εφαρμογή ροής εργασιών που βασίζεται στην συλλογή μεγάλου όγκου δεδομένων με την μέθοδο «text mining» για την εξαγωγή της διαθέσιμης βιβλιογραφίας σχετικά με τα βακτήρια που εμφανίζουν προβιοτικά χαρακτηριστικά. Η διαδικασία αυτή αποτελεί το πρώτο βήμα για την ανάπτυξη μιας βάσης δεδομένων η οποία θα περιλαμβάνει καταχωρήσεις για το σύνολο των διαθέσιμων δυνητικά προβιοτικών βακτηρίων.

Λέξεις κλειδιά
Προβιοτικά βακτήρια, βάση δεδομένων

Εισαγωγή
Σημαντική πρόοδος έχει επιτελεστεί στην απομόνωση και τον χαρακτηρισμό μικροοργανισμών που εμφανίζουν προβιοτικά χαρακτηριστικά από προϊόντα ζύμωσης ή τον γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου (Suez et al., 2019). Το αυξημένο ενδιαφέρον της βιομηχανίας και των καταναλωτών έχει συμβάλει στην εκθετική αύξηση του αριθμού των δημοσιεύσεων που χρησιμοποιούν τον όρο «προβιοτικά» (Zion Market Research, 2020) (Εικόνα1).



Εικόνα 1. Βιβλιογραφικές αναφορές που περιέχουν την λέξη-κλειδί “probiotics” («προβιοτικά») στην βάση δεδομένων PubMed (1947-2021).

Ένας μικροοργανισμός για να χαρακτηριστεί ως προβιοτικός πρέπει να πληροί ορισμένα κριτήρια ασφάλειας και λειτουργικότητας. Πιο συγκεκριμένα, θα πρέπει να είναι ασφαλής προς κατανάλωση, να

είναι ανθεκτικός στις συνθήκες του γαστρεντερικού σωλήνα και να προσδίδει ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία του ξενιστή, όπως για παράδειγμα την βελτίωση της λειτουργίας του γαστρεντερικού συστήματος. Παράλληλα, στελέχη τα οποία προορίζονται για χρήση στην βιομηχανία τροφίμων, θα πρέπει να διατηρούν την βιωσιμότητα τους κατά την παραγωγή, μεταφορά και αποθήκευση των προϊόντων (Authority (EFSA), 2005; Joint, F.A.O., 2006). Στόχος αυτής της παρούσας μελέτης είναι να διεξαχθεί το πρώτο βήμα για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη μιας βάσης δεδομένων η οποία θα περιέχει πληροφορίες σχετικά με τις βιολογικές ιδιότητες πιθανά προβιοτικών βακτηρίων, που προκύπτουν από in vitro μελέτες. Για τον σκοπό αυτό, αναπτύχθηκε μια ροή εργασιών βασιζόμενη στο text mining για την διαλογή δεδομένων, χρησιμοποιώντας εργαλεία βιοπληροφορικής.

Μέθοδοι

Σύνθετη αναζήτηση με χρήση κανονικών εκφράσεων (regular expressions):

Τα regular expressions δημιουργήθηκαν με την βοήθεια του εργαλείου PubMed Advanced Search Builder. Αυτό το εργαλείο αναζητά λέξεις-κλειδιά σε ένα συγκεκριμένο πεδίο, συνδυάζει αναζητήσεις και δημιουργεί μεγάλες, περίπλοκες συμβολοσειρές αναζήτησης, δείχνει πώς ερμηνεύτηκε κάθε ερώτημα από το PubMed καθώς και τον αριθμό των αποτελεσμάτων που επιστρέφονται από κάθε ερώτημα. Το συγκεκριμένο εργαλείο χρησιμοποιήθηκε για το φιλτράρισμα των δεδομένων. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν κανονικές εκφράσεις για την εύρεση βακτηριακών ειδών στην NCBI Taxonomy database και την δημιουργία λίστας με την χρήση in-house scripts. Οι εργασίες πραγματοποιήθηκαν στην υποδομή βιοπληροφορικής του τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, ΔΠΘ.

Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων:

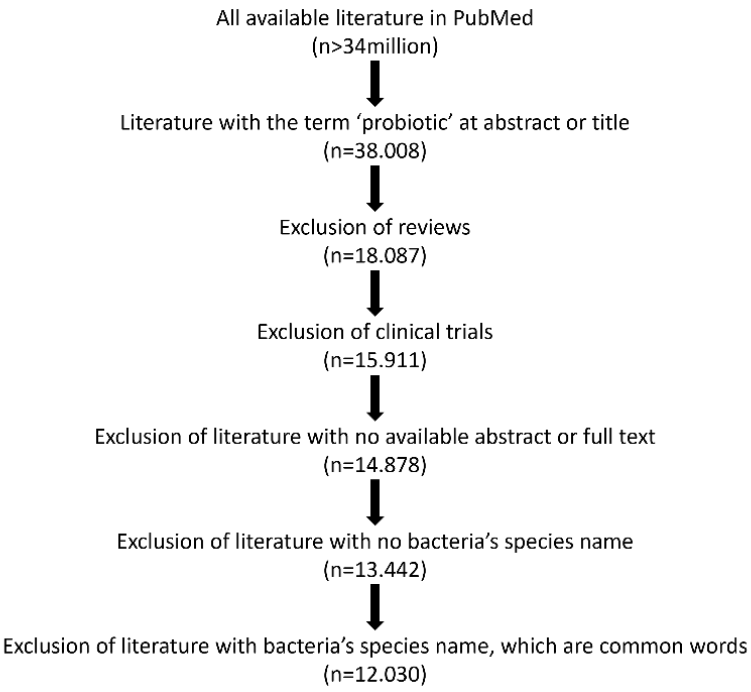
Για το φιλτράρισμα των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω διαδικασία, η οποία συνοψίζεται στην Εικόνα 2: Αρχικά, η βάση δεδομένων PubMed αναζητήθηκε για εργασίες που περιέχουν τη λέξη-κλειδί «προβιοτικά» (“probiotics”) τουλάχιστον μία φορά σε οποιοδήποτε τμήμα της δημοσίευσης, προκειμένου να συλλεχθούν πληροφορίες σχετικά με μικροοργανισμούς που παρουσιάζουν προβιοτικά χαρακτηριστικά (Sayers et al., 2020). Στην συνέχεια εντοπίστηκαν πόσα από αυτά τα άρθρα περιέχουν την ίδια λέξη κλειδί στον τίτλο ή την περίληψη. Από τα αποτελέσματα εξαιρέθηκαν τα άρθρα ανασκόπησης και οι κλινικές δοκιμές, όπως και δημοσιεύσεις χωρίς διαθέσιμη περίληψη ή κείμενο. Τέλος απορρίφθηκαν δημοσιεύσεις οι οποίες δεν περιείχαν στην περίληψη κάποιο όνομα βακτηριακού είδους.

In-house scripts:

Μια λίστα με ονόματα βακτηρίων λήφθηκε από το NCBI Taxonomy. Αυτή η λίστα περιείχε το γένος, το είδος και άλλα χαρακτηριστικά για κάθε βακτήριο. Καθώς το όνομα του γένους συνήθως γράφεται με συντομογραφία σε ερευνητικά άρθρα, η λίστα επεξεργάστηκε ώστε να περιέχει μόνο το όνομα του είδους. Για το σκοπό αυτό γράφτηκε ένα script στην γλώσσα προγραμματισμού Python. Η επεξεργασμένη λίστα χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση των δεδομένων που συλλέχθηκαν από την βάση PubMed, με bash scripting. Οποιαδήποτε περίληψη δεν περιείχε τουλάχιστον ένα όνομα είδους βακτηρίων αποκλείστηκε από την λίστα. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε ένα script bash για να προσδιοριστεί πόσες φορές εντοπίστηκε κάθε είδος στα τελικά επιλεγμένα δεδομένα.

Αποτελέσματα

Ο τελικός αριθμός δεδομένων που συλλέχθηκαν από την PubMed ύστερα από την εφαρμογή της ροής εργασιών ήταν 12.030 δημοσιεύσεις από το σύνολο των διαθέσιμων καταχωρήσεων (~34 εκατομμύρια). Στα δεδομένα που συλλέχθηκαν χρησιμοποιήθηκαν in-house scripts για τον εντοπισμό βακτηριακών ειδών που εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα είδη *Lactiplantibacillus plantarum, Lacticaseibacillus rhamnosus, Escherichia coli, Lactobacillus acidophilus, Lactococcus lactis, Lc. casei, reuteri, Lc. paracasei, Bifidobacterium longum, Bacilus subtilis* ήταν αυτά που εντοπίστηκαν πιο συχνά στις περιλήψεις των δημοσιεύσεων.



Εικόνα 2. Ροή εργασίας για το φιλτράρισμα δημοσιεύσεων που περιέχουν πληροφορίες σχετικά με πιθανά προβιοτικά στελέχη.

Συμπεράσματα

Η παρούσα ροή εργασίας ακολουθήθηκε για τη συλλογή δεδομένων τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή ενημερωτικής βάσης δεδομένων. Αυτή η βάση δεδομένων θα περιέχει πληροφορίες για βακτήρια, τα οποία έχουν μελετηθεί για τις προβιοτικές τους ιδιότητες. Τα επόμενα βήματα για τη δημιουργία αυτής της βάσης δεδομένων είναι η μη αυτόματη εξέταση των περιλήψεων των δημοσιεύσεων που συλλέχθηκαν και η οργάνωση σε πίνακες πειραματικών δεδομένων που σχετίζονται με τον προβιοτικό χαρακτήρα. Πιο συγκεκριμένα, κάθε πίνακας θα περιέχει ένα συγκεκριμένο χαρακτηριστικό σχετιζόμενο με τον προβιοτικό χαρακτήρα και την αναφορά της μελέτης. Στη συνέχεια, αυτοί οι πίνακες θα τοποθετηθούν σε ένα λογικό μοντέλο μιας βάσης δεδομένων, όπου κάθε πίνακας θα συνδέεται με άλλους. Μετά την ανάπτυξή της, η βάση δεδομένων θα είναι ελεύθερα προσβάσιμη στο διαδίκτυο και θα επιμεληθεί ώστε να ενημερώνεται τακτικά.

Βιβλιογραφικές αναφορές

Authority (EFSA), E. F. S. (2005). Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *EFSA Journal*, *3*(6), 226. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2005.226

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology 2014 11:8, 11(8), 506–514. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66

Joint FAO WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food (Ed.). (2006). *Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation ; report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, Córdoba, Argentina, 1 - 4 October 2001 ; report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the*

Evaluation of Probiotics in Food, London, Ontario, Canada, 30 April - 1 May 2002. Food and Agriculture Organization of the United Nations [u.a].

Suez, J., Zmora, N., Segal, E., & Elinav, E. (2019). The pros, cons, and many unknowns of probiotics. *Nature Medicine*, *25*(5), 716–729. https://doi.org/10.1038/s41591-019-0439-x

Zion-Market-Research (2020). Probiotics Market: Size, Share & Trends Analysis Report by Ingredient Type (Bacteria and Yeast), by Form (Liquid Probiotic and Dry Probiotic), by Application (Food & Beverages, Dietary Supplements, and Animal Feed), By End User (Human Probiotics and Animal Probiotics): Global Industry Perspective, Comprehensive Analysis, and Forecast, 2019 – 2026. Mrunal Paradise: Zion Market Research.

Ταυτοποίηση του βακτηριακού στελέχους S3/K και χαρτογράφηση ολόκληρου του γονιδιώματος του – εύρεση μηχανισμών ανθεκτικότητας σε υψηλή συγκέντρωση εξασθενούς χρωμίου Cr(VI) και σε ακραία περιβάλλοντα – ακινητοποίηση του σε υποστρώματα με στόχο την αναγωγή υψηλών συγκεντρώσεων Cr(VI)

ΔΗΜΟΥΛΙΟΣ Αθανάσιος[1], ΝΤΑΒΕ Γεωργία[1], ΤΣΙΡΟΠΙΝΑ Δέσποινα[1], ΚΥΡΙΤΣΗ Μαρία[2], ΣΚΟΥΡΑΣ Ζαχαρίας[1], ΑΡΓΥΡΙΟΥ Αναγνώστης[3], ΓΙΑΓΚΟΥ Μηνάς[1]

1) *Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Α.Π.Θ.,* dimoulios@bio.auth.gr, georgiant@bio.auth.gr, dtsirop@bio.auth.gr, yiangou@bio.auth.gr, scouras@bio.auth.gr
2) *Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών, Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης,* kyritsimaria@certh.gr
3) *Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής, Πανεπιστήμιο Αιγαίου,* argiriou@certh.gr

Περίληψη

Το εξασθενές χρώμιο επιβαρύνει ως βιομηχανικός ρύπος το περιβάλλον. Σε προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου απομονώθηκε το βακτηριακό στέλεχος S3/K, που στην παρούσα εργασία έγινε ταυτοποίηση του ως *Thauera mechernichensis*. Έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται και να ανάγει υψηλές συγκεντρώσεις Cr(VI), ιδίως όταν ακινητοποιείται σε διατάξεις αποτελούμενες από διάφορα πληρωτικά υλικά με σκοπό τη βιοαπορρύπανση βιομηχανικών λυμάτων. Αποδοτικότερες χαρακτηρίστηκαν οι διατάξεις που αποτελούνταν από πούδρα ξύλου *Populus alba* και ρινίσματα σιδήρου καθώς ενίσχυσαν την ικανότητα αναγωγής συγκεντρώσεων χρωμίου έως 1750 mg/L. Η βιοπληροφορική ανάλυση του γονιδιώματος του στελέχους S3/K συσχέτισε την παραπάνω ικανότητα με ποικίλους μηχανισμούς, όπως το ισχυρό κυτταρικό τοίχωμα, τα συστήματα απομάκρυνσης του χρωμίου από το κύτταρο, τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, τη δράση ρεδουκτασών του χρωμίου, καθώς και με την ομοιόσταση σιδήρου και θείου. Επιπρόσθετα, βρέθηκε ότι το βακτηριακό στέλεχος S3/K, ανέχεται καταπόνηση αλκαλικού περιβάλλοντος μέσω βιοσύνθεσης όξινων αμινοξέων και της ενδοκυτταρικής μεταφοράς πρωτονίων.

Λέξεις-κλειδιά: *Thauera mechernichensis*, χρώμιο, μηχανισμοί άμυνας, γονιδίωμα, βιοαπορρύπανση

Εισαγωγή

Το εξασθενές χρώμιο είναι ένας από τους πιο επιβλαβείς και σημαντικούς ρύπους του φυσικού περιβάλλοντος (Jiang et al. 2019). Για το λόγο αυτό, το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας έχει στραφεί στην αποτοξικοποίησή του με βιολογικές μεθόδους, χρησιμοποιώντας μικροοργανισμούς ικανούς να ανάγουν το εξασθενές Cr(VI) στο λιγότερο τοξικό τρισθενές χρώμιο Cr(III) (Jobby et al. 2018). Σε προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου, απομονώθηκε το βακτηριακό στέλεχος S3/K από την ενεργό ιλύ μονάδας επεξεργασίας αστικών λυμάτων της Καστοριάς. Το στέλεχος S3/K έχει την ικανότητα να ανάγει υψηλές συγκεντρώσεις Cr(VI). Η ικανότητα αυτή οφείλεται σε μηχανισμούς ανθεκτικότητας στο Cr(VI) και στην παρουσία ρεδουκτασών του Cr(VI). Επίσης, είναι ιδιαίτερα ανθεκτικό στη χαμηλή θερμοκρασία (4 °C), στην UV ακτινοβολία και στο αλκαλικό στρες. Η αναγωγή του Cr(VI) μέσω βακτηρίων ακινητοποιημένων σε φυσικά ή συνθετικά υποστρώματα αποτελεί την πιο αποτελεσματική και οικονομική λύση για την αποτοξικοποίηση βιομηχανικών λυμάτων επιβαρυμένα με χρώμιο (Arshad et al. 2017).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ταυτοποίηση του στελέχους S3/K σε επίπεδο είδους, και ο πλήρης προσδιορισμός του γονιδιώματος του με αλληλούχηση επόμενης γενιάς. Επίσης, προσδιορίστηκαν οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας και αναγωγής του Cr(VI) και ανθεκτικότητας σε αλκαλική καταπόνηση με κατάλληλα εργαλεία βιοπληροφορικής. Τέλος διερευνήθηκε η καταλληλότερη λειτουργική διάταξη μικρού και μεγάλου όγκου χρησιμοποιώντας φυσικά και συνθετικά υλικά με σκοπό την αναγωγή ιδιαίτερα υψηλών συγκεντρώσεων Cr(VI).

Μεθοδολογία

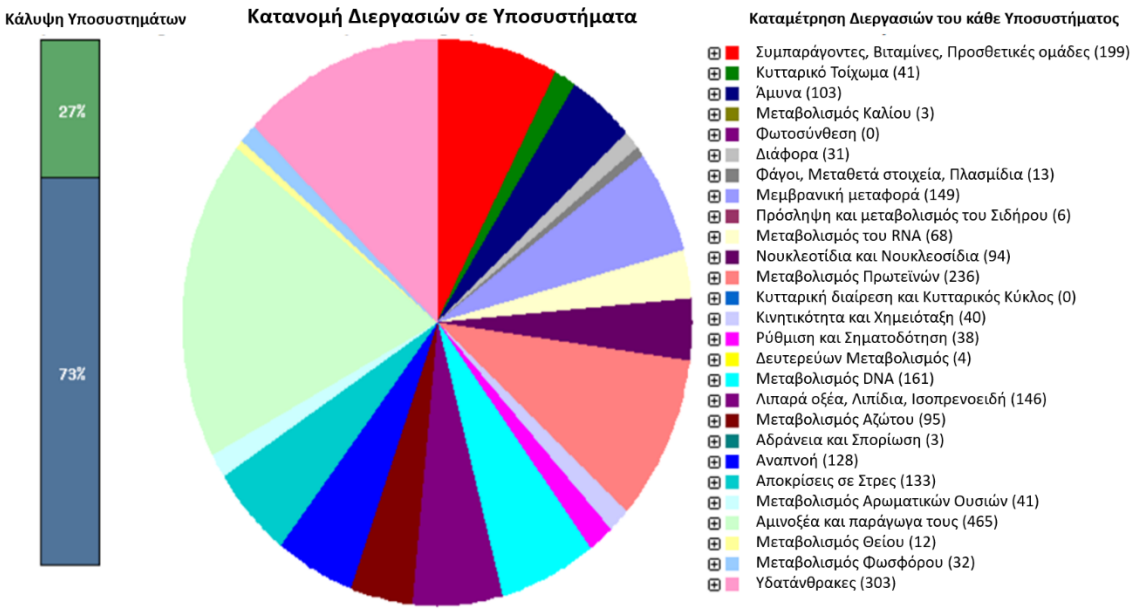
Η ταυτοποίηση του βακτηριακού στελέχους S3/K, σε επίπεδο είδους, πραγματοποιήθηκε με PCR και αλληλούχηση κατά Sanger του γονιδίου του 16S rRNA και σύγκριση με αλληλουχίες αναφοράς της GenBank. Η αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος του στελέχους S3/K, πραγματοποιήθηκε με τη συσκευή MinION (Oxford Nanopore Technologies). Η επεξεργασία των δεδομένων, η συναρμολόγηση του γονιδιώματος του στελέχους S3/K, και η εύρεση των λειτουργικών στοιχείων του επιτεύχθηκαν μέσω της πλατφόρμας UseGalaxyEurope και Rast. Η εύρεση πρωτεϊνών αναγωγής και αντοχής του χρωμίου και του αλκαλικού περιβάλλοντος, πραγματοποιήθηκε μέσω του BlastP (NCBI), ενώ ο έλεγχος της λειτουργίας τους έγινε στη βάση δεδομένων UniProt. Για την κατασκευή στήλης εργαστηριακής κλίμακας χρησιμοποιήθηκαν σύριγγες των 60ml και κυλινδρικές διατάξεις από Plexiglass 5L, οι οποίες πληρώθηκαν με πούδρα ξύλου *Populus alba*/ κυτταρίνη/ λιγνίνη/ ρινίσματα σιδήρου/ υαλοβάμβακα, θρεπτικό υλικό Συνθετικού Λύματος (συγκέντρωση Cr(VI) 0mg/L-1750mg/L) και καλλιέργεια S3/K (5×10^9 CFU). Καθημερινά λαμβάνονταν δείγματα για να ελεγχθεί η αναγωγή του Cr(VI) με τη μέθοδο του 1,5-διφαινυλκαρβαζιδίου (Liu, Leng & Lin 2016).

Αποτελέσματα

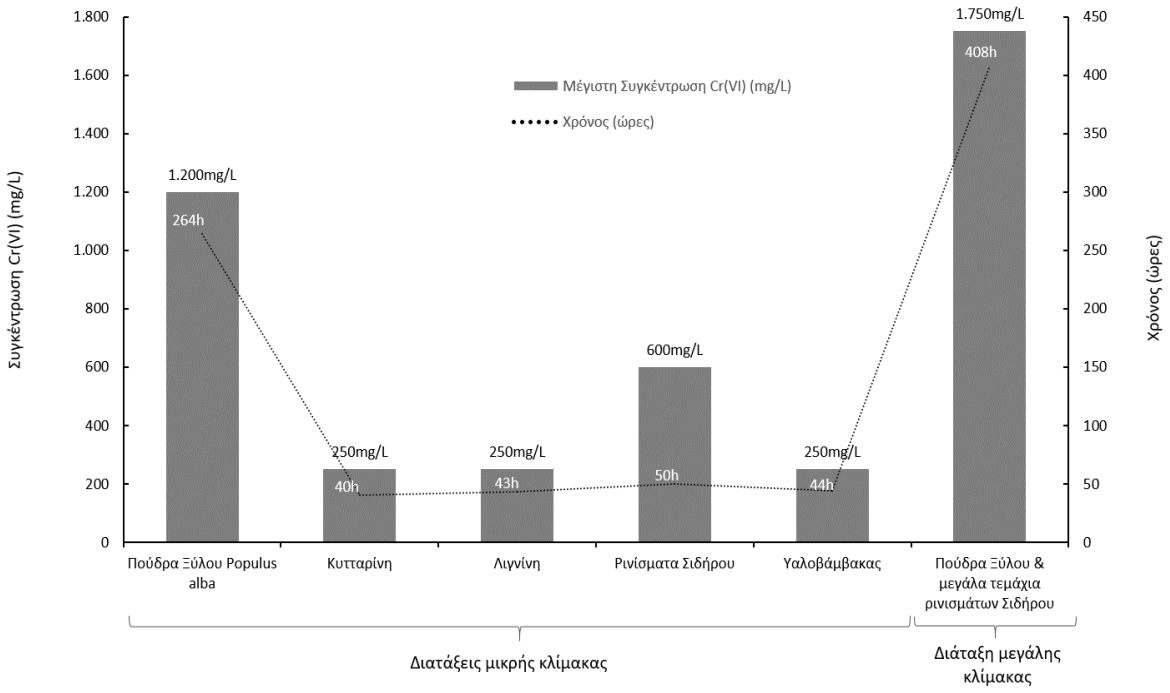
Το βακτηριακό στέλεχος S3/K ανήκει στο είδος *Thauera mechernichensis* με ομολογία 99.29%. Το χρωμόσωμα του αποτελείται από 4.585.699 bp και διαθέτει ένα πλασμίδιο μεγέθους 633.209 bp, ενώ το περιεχόμενο σε GC(%) είναι 64,98%. Στο γονιδίωμα του εδράζονται συνολικά 6.116 πιθανά γονίδια, εκ των οποίων τα 3.840 έχουν ταυτοποιηθεί και επιτελούν 2.544 μοναδικές διεργασίες, 12 γονίδια που κωδικοποιούν rRNAs και 94 tRNAs (Εικόνα 1). Η αναγωγή του Cr(VI) επιτυγχάνεται από κυτοπλασματικές ρεδουκτάσες κλάσης I και κλάσης II και τη μεμβρανική ρεδουκτάση ApcA. Η αντοχή του στο Cr(VI) οφείλεται σε εξωκυτταρική μεταφορά Cr(VI), σε αποκρίσεις στο οξειδωτικό στρες (μέσω δισμουτασών του υπεροξειδίου, γλουταθειόνης, θειορεδοξίνης), επιδιόρθωση και προστασία του DNA (μέσω σχηματισμού κόμβων Holliday, συστήματος SOS, μεθυλτρανσφερασών), παρουσία ισχυρού κυτταρικού τοιχώματος (πρωτεΐνες OmpA. LptA, Pal), ομοιόσταση του θείου και του σιδήρου και αλλαγές στον μεταβολισμό (λιπιδίων και πρωτεϊνών). Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αντοχή του αλκαλικού περιβάλλοντος είναι η βιοσύνθεση όξινων αμινοξέων (γλουταμινικό και ασπραραγινικό οξύ), η ενδοκυτταρική μεταφορά πρωτονίων (μέσω ATPασών και αντιμεταφορέων) και η προστασία του κυτταρικού τοιχώματος. Μετά από ακινητοποίηση των βακτηριακών κυττάρων σε υποστρώματα, αποδείχθηκε ότι η πιο αποτελεσματική διάταξη ήταν το μείγμα πούδρας ξύλου *Populus alba* και ρινισμάτων σιδήρου σε στήλη μεγάλης κλίμακας, καθώς παρατηρήθηκε αναγωγή του Cr(VI) σε συγκεντρώσεις έως 1750mg/L (Εικόνα 2).

Συμπεράσματα

Το S3/K ανήκει στο είδος *Thauera mechernichensis* και διαθέτει ένα σχετικά μεγάλο σε μέγεθος γονιδίωμα όπου εδράζονται γονίδια που το καθιστούν εξαιρετικά αυτόνομο, καθώς είναι εξοπλισμένο με μια πληθώρα βιοσυνθετικών μονοπατιών και αναπτύσσεται σε φτωχό θρεπτικό μέσο. Επίσης, διαθέτει όλους τους γνωστούς μηχανισμούς ανθεκτικότητας και αναγωγής του Cr(VI) και επιβιώνει σε αλκαλικά περιβάλλοντα. Η αυξημένη αναγωγική ικανότητα του μικροοργανισμού παρουσία πούδρας ξύλου και ρινισμάτων σιδήρου συσχετίστηκε με i) την ικανότητα των συστατικών του ξύλου να απορροφούν χρώμιο και να επιταχύνουν την αναγωγική διαδικασία καθώς και ii) την ευεργετική επίδραση των ιόντων σιδήρου $FeCl_3$ στην ανάπτυξη του. Συνεπώς, το στέλεχος S3/K αποδεικνύεται ότι είναι ένας μικροοργανισμός ιδιαίτερα ανθεκτικός στο Cr(VI) και στο αλκαλικό περιβάλλον και δεδομένης της πιθανής χρήσης του ως μέσο βιοαπορρύπανσης λυμάτων επιβαρυμένων με χρώμιο, αποτελεί μια προσοδοφόρα, πλεονεκτική και οικονομική λύση.



Εικόνα 1. Κατανομή των ταυτοποιημένων κυτταρικών διεργασιών σε ομαδοποιημένα υποσυστήματα με ειδικό λειτουργικό ρόλο.



Εικόνα 2. Μέγιστη συγκέντρωση Cr(VI) που ανάγει το στέλεχος S3/K ακινητοποιημένο σε στήλη με διαφορετικά πληρωτικά υλικά.

Βιβλιογραφία

Arshad, M., Khan, A., Hussain, I., Badar-uz-Zaman, Anees, M., Iqbal, M., Soja, G., Linde, C. & Yousaf, S. (2017). The reduction of chromium (VI) phytotoxicity and phytoavailability to wheat (*Triticum aestivum*) using biochar and bacteria. *Applied Soil Ecology*, 114, 90-98.

Jiang, B., Gong, Y., Gao, J., Sun, T., Liu, Y., Oturan, N. & Oturan, M. (2019). The reduction of Cr(VI) to Cr(III) mediated by environmentally relevant carboxylic acids: State-of-the-art and perspectives. *Journal of Hazardous Materials*, 365, 205-226.

Jobby, R., Jha, P., Yadav, A. & Desai, N. (2018). Biosorption and biotransformation of hexavalent chromium [Cr (VI)]: A comprehensive review. *Chemosphere*, 207, 255-266.

Liu, L., Leng, Y. & Lin, H. (2016). Photometric and visual detection of Cr(VI) using gold nanoparticles modified with 1,5-diphenylcarbazide. *Microchimica Acta*, 183, 1367-1373.

Προβιοτικές ιδιότητες και ανοσοτροποποιητική δράση γαστρεντερικών βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν από το εδώδιμο χερσαίο σαλιγκάρι Cornu aspersum maxima

ΑΥΓΟΥΣΤΗ Καλοδότη [1], ΝΤΟΥΣΚΟΥ Εσμεράλντα [1,3], ΧΑΛΙΑΜΑΛΙΑ Ελευθερία [1], ΚΟΤΖΑΜΑΝΙΔΗΣ Χαράλαμπος [3], ΣΤΑΙΚΟΥ Αλεξάνδρα [2], ΓΙΑΓΚΟΥ Μηνάς [1]

1. Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Α.Π.Θ, kavgousti@bio.auth.gr, nesmeral@bio.auth.gr, chalelef@bio.auth.gr, yiangou@bio.auth.gr
2. Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Α.Π.Θ, astaikou@bio.auth.gr
3. Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών, ΕΛΓΟ Δήμητρα, kotzam@vri.gr

Περίληψη

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος συμμετέχει στην ενίσχυση και διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού. Τα προβιοτικά, είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί που, όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες, επηρεάζουν τη λειτουργία-σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας, ρυθμίζουν τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις, ενισχύουν τον εντερικό φραγμό και ενισχύουν/ρυθμίζουν, τόσο τις ανοσοαποκρίσεις στον εντερικό βλεννογόνο, όσο και τις συστημικές ανοσοαποκρίσεις. Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά για τις αλληλεπιδράσεις της εντερικής μικροχλωρίδας και του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος των γαστερόποδων. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ταυτοποίηση μικροοργανισμών της συμβιωτικής εντερικής μικροχλωρίδας του σαλιγκαριού *Cornu aspersum* maxima. Απομονώθηκαν 89 βακτηριακά στελέχη από το γαστρεντερικό σωλήνα, 12 εκ των οποίων διερευνήθηκαν, ως προς την ικανότητα τους να διέρχονται από το γαστρεντερικό σωλήνα και, ως προς τα χαρακτηριστικά της κυτταρικής επιφάνειας. Με βάση τα παραπάνω, 5 στελέχη ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους και διερευνήθηκε η *in vivo* ανοσοενισχυτική δράση τους στους έμφυτους μηχανισμούς άμυνας καθώς και η αντιβακτηριακή τους δράση έναντι δυνητικά παθογόνων στελεχών.

Λέξεις-Κλειδιά:
Enterococcus faecalis, *Lactobacillus plantarum*, προβιοτικά, μικροχλωρίδα, σαλιγκάρια.

Εισαγωγή

Οι ευεργετικές αλληλεπιδράσεις ξενιστή-μικροοργανισμών («συμβίωση»), υποδεικνύουν το σημαντικό ρόλο της γαστρεντερικής μικροχλωρίδας στην υγεία του ανθρώπου και των ζώων. Η διαταραχή της φυσιολογικής μικροχλωρίδας του εντέρου, γνωστή ως «δυσβίωση», οδηγεί σε μολυσματικές, μεταβολικές και ασθένειες του ανοσοποιητικού συστήματος (Baohong et al. 2017). Η αναβίωση της μικροχλωρίδας, δηλαδή η πρόληψη και η θεραπεία ασθενειών που οφείλονται σε καταστάσεις δυσβίωσης, επιτυγχάνεται με χορήγηση προβιοτικών (Butel 2014). Για να χαρακτηριστεί ένας μικροοργανισμός ως προβιοτικό απαραίτητη προϋπόθεση είναι να πληροί συγκεκριμένα κριτήρια, όπως είναι η αντοχή στους ανατομικούς και φυσιολογικούς φραγμούς του πεπτικού σωλήνα, και, η αντιβακτηριακή και ανοσοενισχυτική δράση (FAO/WHO 2002). Οι μικροοργανισμοί που συνήθως πληρούν τα παραπάνω κριτήρια είναι τα γαλακτικά βακτήρια, με πιο κοινά γένη τα *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Η αντιμικροβιακή δράση, ο αποκλεισμός ή αναστολή των παθογόνων, η ενίσχυση της λειτουργίας του εντερικού επιθηλιακού φραγμού (Resta-Lenert & Barrett 2003), η ανοσοτροποποιητική δράση (Baken et al. 2006) είναι μερικές από τις ευεργετικές επιδράσεις των γαλακτικών βακτηρίων. Η χρήση των εντερόκοκκών ως προβιοτικά είναι αμφιλεγόμενη, εφόσον ορισμένα είδη έχουν συσχετιστεί με ευκαιριακές λοιμώξεις στον άνθρωπο (Foulquié Moreno et al. 2006).

Παρά την εκτεταμένη διερεύνηση της εντερικής μικροχλωρίδας στον άνθρωπο και στα σπονδυλωτά, υπάρχει περιορισμένη γνώση για το ρόλο της εντερικής μικροχλωρίδας και των προβιοτικών στην ανάπτυξη και υγεία των ασπόνδυλών, όπως τα γαστερόποδα, καθώς και στην αλληλεπίδραση της

μικροχλωρίδας με την έμφυτη άμυνα. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η απομόνωση γαλακτικών βακτηρίων από τον γαστρεντερικό σωλήνα του σαλιγκαριού *Cornu aspersum* maxima και η διερεύνηση των προβιοτικών ιδιοτήτων και της ανοσοτροποποιητικής δράσης τους.

Μεθοδολογία και αποτελέσματα

Απομονώθηκαν 89 στελέχη γαλακτικών βακτηρίων από το γαστρεντερικό σωλήνα του *Cornu aspersum* maxima. Συνολικά, 12 Gram $^{+}$, καταλάση $^{-}$ και β- ή γ-αιμολυτικά στελέχη με βάση την ανάπτυξη σε αιματούχο άγαρ, επιλέχθηκαν για περαιτέρω διερεύνηση των προβιοτικών τους ιδιοτήτων. Το στέλεχος Sgs14 χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας (Dushku et al. 2019). Αρχικά διερευνήθηκε η ικανότητα να επιβιώνουν στο πεπτικό σύστημα των σαλιγκαριών, με ποιοτικό έλεγχο της ανάπτυξης τους παρουσία εξωτερικής και γαστρικής βλέννας, γαστρικών εκκρίσεων και όξινου pH (Πίνακας 1). Ακολούθως, διερευνήθηκαν τα χαρακτηριστικά της κυτταρικής επιφάνειας που σχετίζονται με την ικανότητα προσκόλλησης και αποικισμού του εντερικού σωλήνα (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: *In vitro* προβιοτικές ιδιότητες.

Στέλεχος	Προέλευση	Χαρακτηριστικά κυτταρικής επιφάνειας [α]			Ανοχή στους γαστρεντερικούς φραγμούς [β]				
		Σχηματισμός Βιοϋμενίου	Αυτοσυσσωμάτωση	Υδροφοβικότητα	pH 3	pH 5	Εξωτερική Βλέννα	Γαστρική Βλέννα	Γαστρικές εκκρίσεις
Spp1	Εντερικός σωλήνας	++	++	+++	+	++	+++	+++	+++
Spp3		+++	-	++	+	++	++	+++	+++
Spp8		++	++	++	+	++	++	+++	+++
Spp9		+	++	+++	-	++	+	+	+
Spp11		+	+++	+++	+	++	+++	+++	+++
Spp13		+	++	+++	+	++	+	+	++
Spp14		+	++	++	+	++	+	+	+
Spp15		+	++	++	+	++	+	+	+
Spp16		++	+	+++	+	++	++	++	++
Spp17		++	-	++	+	++	++	++	++
Spp18		+++	++	+++	+	++	++	+++	++
Spp19		+++	+	++	+	++	+++	+++	+++
Sgs14		++	+	+	+	++	+++	+++	+++

[α] *Οι τιμές σχηματισμού βιοϋμενίου, αυτοσυσσωμάτωσης και υδροφοβικότητας εκφράζονται ως απουσία(-), ασθενή(+), μέτρια(++), υψηλή(+++) ικανότητα. Οπτική απορρόφηση βιοϋμένιου: 0.07-0.25(+), 0.25-0.40(++), 0.40-0.55(+++). Αυτοσυσσωμάτωση %: 7-12(-), 12-20%(+), 20-45%(++), 45-73%(+++). Υδροφοβικότητα %: 25-40% (+), 40-75% (++), 75-94%(+++).*

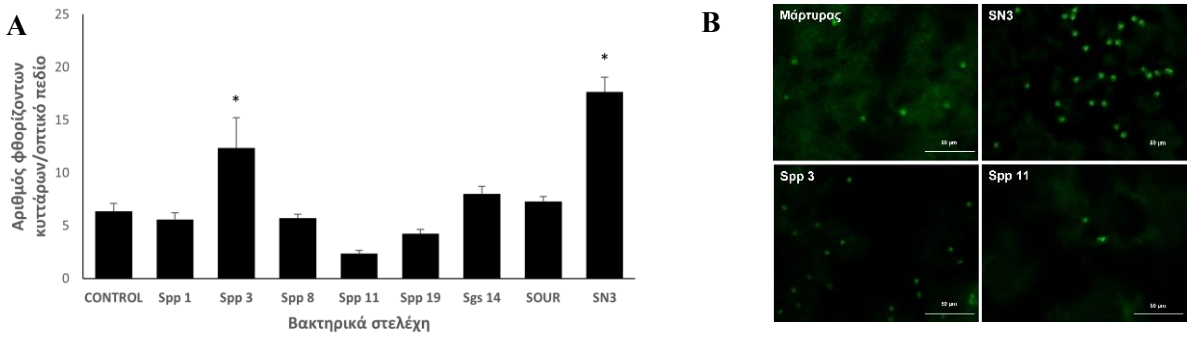
[β] *Ανοχή στους γαστρεντερικούς φραγμούς: απουσία(-), ασθενή(+), μέτρια(++), υψηλή(+++) ανοχή.*

Πέντε στελέχη, με τις καλύτερες *in vitro* προβιοτικές ιδιότητες και με χαρακτηριστική γ-αιμόλυση ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους με αλληλούχιση του 16S rRNA. Δύο στελέχη (Spp1 & Spp11) ταυτοποιήθηκαν ως *Lactobacillus plantarum* και τρία στελέχη (Spp3, Spp8 & Spp19) ως *Enterococcus faecalis*. Ακολούθως, διερευνήθηκε η *in vivo* αλληλεπίδραση τους με τους έμφυτους χυμικούς και κυτταρικούς μηχανισμούς άμυνας, έπειτα από υποδερμική χορήγηση στο ραχιαίο αιμόκοιλο. Όλα τα στελέχη εμφάνισαν ανοσοενισχυτική δράση, με συσσώρευση μεγάλου αριθμού αμοιβαδοκυττάρων στην αιμόλεμφο και, εκτός του Spp11, αυξημένη φαγοκυττάρωση, σε σύγκριση με ζώα-μάρτυρες (p-value < 0,05). Τα στελέχη Spp1, Spp11 και Spp8 οδήγησαν στην ενεργοποίηση του μονοπατιού της φαινολοξειδάσης, που σχετίζεται με την παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων. Κανένα στέλεχος δεν οδήγησε στην αύξηση της παραγωγής νιτρικών ιόντων (NO^{-}) και στη νέκρωση των κυττάρων, ενώ το *E. faecalis* Spp3 οδήγησε σε αυξημένη παραγωγή κυτταροτοξικών δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) σε σύγκριση με ζώα-μάρτυρες (p-value < 0,05) (Εικόνα 1). Τέλος, διερευνήθηκε η αντιβακτηριακή δράση των πιθανών προβιοτικών (Spp1, Spp3, Spp8, Spp11, Spp19, Sgs14) έναντι δυνητικά παθογόνων

βακτηρίων με τη μέθοδο της παράλληλης ανάπτυξης. Όλα τα στελέχη εμφάνισαν αντιβακτηριακή δράση έναντι του *S. lugdunensis*, ενώ τα στελέχη *L. plantarum* εμφάνισαν αντιβακτηριακή δράση και έναντι στο υπερλοιμογόνο και λοιμογόνο στέλεχος *L. monocytogenes* SN3 και SN1, αντίστοιχα (Dushku et al. 2020), στα *S. aureus* και *P. putida* 8.

Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας μαζί με προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου (Dushku et al. 2019) αποτελούν τη βάση για την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της εντερικής μικροχλωρίδας και των έμφυτων μηχανισμών άμυνας των σαλιγκαριών. Σημαντική είναι η απουσία αιμόλυσης για τα στελέχη *E. faecalis* που συνεπάγεται την απουσία έκφρασης κυτολισίνης, ενός από τους πιο καθοριστικούς μολυσματικούς παράγοντες του συγκεκριμένου είδους. Τα στελέχη *L. plantarum* Spp1 και Spp11 και τα στελέχη *E. faecalis* Spp8 και Spp19 που δεν οδήγησαν σε παραγωγή κυτταροτοξικών μορίων θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως πιθανά προβιοτικά έπειτα από περαιτέρω διερεύνηση της *in vivo* ικανότητας προσκόλλησης στον εντερικό σωλήνα των σαλιγκαριών και αντοχής σε αντιβιοτικά. Η *in vivo* χορήγηση τους μέσω της τροφής πιθανά θα οδηγεί στην πρόληψη και/ή αναστολή της εντερικής «δυσβίωσης» ή/και την «αναβίωση» της εντερικής μικροχλωρίδας και ολόκληρου του οργανισμού.



Εικόνα 1. Α) Παραγωγή ROS από αμοιβαδοκύτταρα. Β) Φωτογραφίες οπτικής μικροσκοπίας φθορισμού των αμοιβαδοκυττάρων έπειτα από τον έλεγχο παραγωγής ROS.

Βιβλιογραφία

Baken, K. A., Ezendam, J., Gremmer, E. R., et al. (2006). Evaluation of immunomodulation by *Lactobacillus* casei Shirota: immune function, autoimmunity and gene expression. *Int J Food Microbiol*, 112, 8–18.

Baohong, W., Mingfei, Y., Longxian, L., et al. (2017). The human microbiota and disease. *Engineering*, 3, 71-78.

Butel, M. J., (2014). Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 44, 1-8.

Dushku, E., Ioannou, A., Staikou, A. & Yiangou M., (2019). Probiotic properties and immunomodulatory activity of gastrointestinal tract commensal bacterial strains isolated from the edible farmed snail *Cornu aspersum* maxima. *Fish Shellfish Immunol*, 92, 792–801.

Dushku, E., Kotzamanidis, C., Avgousti., et al. (2020). *Listeria monocytogenes* induced dysbiosis in snails and rebiosis achieved by administration of the gut commensal Lactobacillus plantarum Sgs14 strain. *Fish & Shellfish Immunology*, 104, 337-346.

FAO/WHO., (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. *Food and Health Agricultural Organisation of the United Nations — World Health Organisation*, Working group report.

Foulquié Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. & De Vuyst, L., (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 1-24.

Resta-Lenert, S. & Barrett, K.E. (2003). Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut*, 52, 988–997.

Η οργάνωση της έμφυτης άμυνας στο σαλιγκάρι Cornu aspersum maxima και ο ρόλος των ανοσοκυττάρων κατά τη λοίμωξη με το στέλεχος Listeria monocytogenes SN3.

ΚΑΡΑΘΟΔΩΡΟΥ Αργυρώ[1], ΜΠΑΛΑΣΚΑ Μαρία[1], ΣΠΥΡΟΠΟΥΛΟΥ Άννα[1], ΜΠΗΛΙΟΥΡΗ Κυριακή[1], ΝΤΟΥΣΚΟΥ Εσμεράλντα[1,2], ΧΑΣΙΩΤΗ Ελισάβετ[1], ΚΟΤΖΑΜΑΝΙΔΗΣ Χαράλαμπος[2], ΣΤΑΙΚΟΥ Αλεξάνδρα[3], ΓΙΑΓΚΟΥ Μηνάς[1]

1) *Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης,*
argykara@bio.auth.gr, mmpalaska@bio.auth.gr, annspydim@bio.auth.gr, kmpiliou@bio.auth.gr, nesmeral@bio.auth.gr, elischas@bio.auth.gr, yiangou@bio.auth.gr
2) *Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών, Ελληνικός Γεωργικός Οργανισμός ΔΗΜΗΤΡΑ*
kotzam@vri.gr
3) *Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης,* astaikou@bio.auth.gr

Περίληψη
Οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί διαθέτουν φυσικούς μηχανισμούς άμυνας, που ενεργοποιούνται ως απόκριση σε εσωτερικούς-γενετικούς και εξωτερικούς-περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η κατανόηση των έμφυτων μηχανισμών άμυνας απαιτεί την κατανόηση των πληθυσμών κυττάρων και του ρόλου τους στις ανοσοαποκρίσεις. Σκοπός της εργασίας ήταν η διερεύνηση της προέλευσης και της λειτουργίας των αμοιβαδοκυττάρων και των υαλινοκυττάρων της αιμολέμφου που αποτελεί ιστό ανοσοαπόκρισης στο σαλιγκάρι. Το υπερλοιμογόνο στέλεχος *Listeria monocytogenes* SN3 επάγει σημαντικά την αύξηση των ζωντανών και νεκρών κυττάρων στην αιμόλεμφο. Η αύξηση αυτή συνδυάζεται με σημαντική αύξηση των κυττάρων που εκφράζουν το δείκτη στελεχιαίων κυττάρων LGR5 στο ηπατοπάγκρεας. Το αποτέλεσμα αυτό αναδεικνύει για πρώτη φορά το ηπατοπάγκρεας ως το όργανο αιμοποίησης. Τα υαλινοκύτταρα, καθώς και τα αμοιβαδοκύτταρα δεν έδειξαν να είναι στελεχιαία κύτταρα. Αναδεικνύεται για πρώτη φορά η παρόμοια με NK-κυτταροτοξική δράση των υαλινοκυττάρων έναντι μολυσμένων με SN3 αμοιβαδοκυττάρων. Η αντι-SN3 ανοσοαπόκριση των αμοιβαδοκυττάρων περιλαμβάνει την αναγνώριση και την παραγωγή ROS και μορίων τύπου κυτοκινών.

Λέξεις-Κλειδιά
Έμφυτη άμυνα, αμοιβαδοκύτταρα, υαλινοκύτταρα, στελεχιαία κύτταρα, δυσβίωση

Εισαγωγή
Τα σαλιγκάρια δεν εκδηλώνουν ανοσοαποκρίσεις της επίκτητης άμυνας, αλλά διαθέτουν αποτελεσματικούς έμφυτους μηχανισμούς κυτταρικής και χυμικής άμυνας (Abou-El-Naga *et al*. 2014). Οι ανοσοαποκρίσεις εκκινούν από τα κύτταρα της αιμολέμφου που έχουν την ικανότητα να διεισδύουν στους ιστούς. Με βάση τη μορφολογία τους, τα κύτταρα της αιμολέμφου διακρίνονται στα αμοιβαδοκύτταρα, που φέρουν υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων, φαγοκυτταρώνουν και παράγουν οξειδωτικές ρίζες και στα υαλινοκύτταρα, ο λειτουργικός ρόλος των οποίων βρίσκεται υπό διερεύνηση. Βιβλιογραφικά, αναφέρεται ότι οι δύο τύποι κυττάρων της αιμολέμφου αντιπροσωπεύουν διαφορετικά στάδια ανάπτυξης ενός κυτταρικού τύπου, δηλαδή, ότι τα υαλινοκύτταρα είναι τα νεαρά, βλαστικά κύτταρα, ενώ τα αμοιβαδοκύτταρα είναι τα ώριμα κύτταρα. Ωστόσο, δεν υπάρχουν διαθέσιμα αποτελέσματα που αποδεικνύουν την άποψη αυτή, ενώ έχει διατυπωθεί και η άποψη ότι τα υαλινοκύτταρα συμβάλλουν στην παραγωγή ορολογικών παραγόντων (Adamowicz & Bolaczek 2003). Οι πληθυσμοί των κυττάρων της αιμολέμφου μεταβάλλονται ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες, τις μολύνσεις, τους τραυματισμούς και τη γενικότερη ανοσοβιολογική και μεταβολική κατάσταση του οργανισμού. Κατά τις μολύνσεις, τα σαλιγκάρια υφίστανται μεγάλη απώλεια κυττάρων, λόγω απόπτωσης και νέκρωσης. Συνεπώς, η σύνθεση και απελευθέρωση κυττάρων από αιμοποιητικούς ιστούς (αιμοποίηση), είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ομοιόστασης (Li *et a*l. 2017), αλλά δεν έχει προσδιοριστεί ή εντοπιστεί το όργανο αιμοποίησης. Σε ορισμένα γαστερόποδα έχουν εντοπιστεί

μικρά μη διαφοροποιημένα κύτταρα στο περικαρδιακό τοίχωμα, κοντά στο νεφρό, που υφίστανται ταχεία μιτωτική διαίρεση μετά από μολύνσεις (Accorsi, Ottaviani & Malagoli, 2014). Ωστόσο, η συσχέτιση της αιμοποίησης με το ανοσοβιολογικό σύστημα παραμένει ασαφής. Επίσης, δεν έχουν αποσαφηνιστεί οι μηχανισμοί πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης και ωρίμανσης των κυττάρων της αιμολέμφου, καθορισμού της μοίρας τους και αλληλεπίδρασης των παθογόνων με την έμφυτη άμυνα, καθώς ο πλήρης ρόλος των ανοσοκυττάρων παραμένει ασαφής.

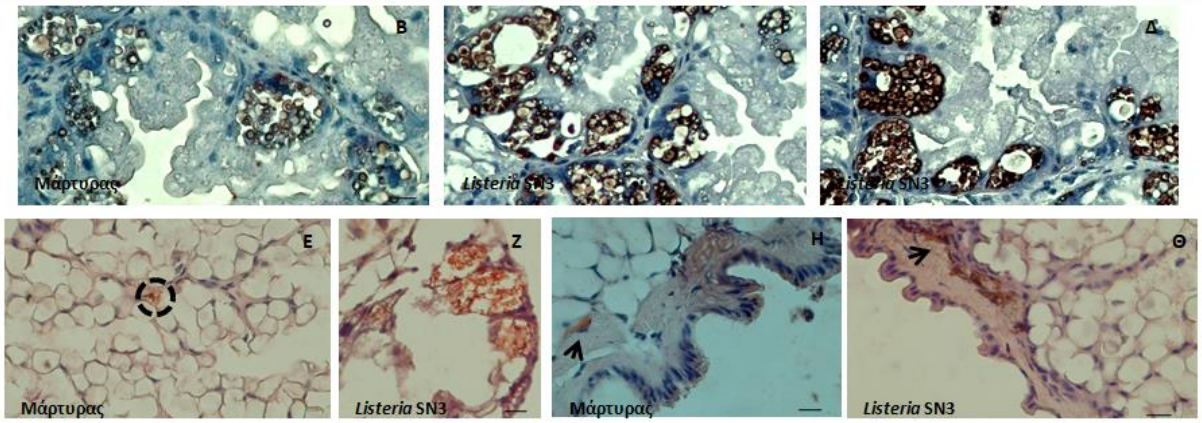
Στην αιμόλεμφο, τον ιστό όπου εντοπίζονται τα ανοσοκύτταρα του σαλιγκαριού *Cornu aspersum* maxima έχουν προσδιοριστεί μορφολογικά δύο τύποι κυττάρων, τα αμοιβαδοκύτταρα και τα υαλινοκύτταρα. Σε προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου βρέθηκε ότι το υπερλοιμογόνο στέλεχος των σαλιγκαριών *Listeria monocytogenes* SN3 οδηγεί σε εντερική δυσβίωση, ιστικές αλλοιώσεις και εισέρχεται στα αμοιβαδοκύτταρα, παρεμποδίζοντας την ανοσοαντίδραση τους. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο φαινοτυπικός, μοριακός και λειτουργικός χαρακτηρισμός και η διερεύνηση της προέλευσης των κυττάρων της αιμολέμφου, που είναι τα βασικά κύτταρα-δράστες των ανοσοαποκρίσεων στο σαλιγκάρι.

Μεθοδολογία και Αποτελέσματα

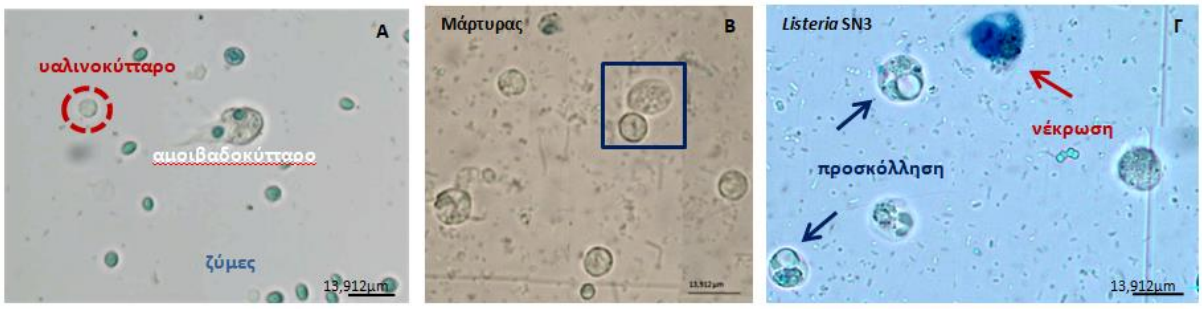
Κατά την SN3 λοίμωξη παρατηρείται στην αιμόλεμφο των σαλιγκαριών πολύ σημαντική αύξηση στον αριθμό των ζωντανών αμοιβαδοκυττάρων και υαλινοκυττάρων, καθώς και των νεκρών κυττάρων (Εικόνα-Πίνακας 1Α). Κατά την SN3 λοίμωξη, προσδιορίστηκε με ανοσοϊστοχημεία μεγάλος αριθμός $LGR5^+$ κυττάρων που συσσωρεύονται στις περιοχές που περιβάλλουν τις κοιλότητες του ηπατοπαγκρέατος (Εικόνα 1Β-Δ), στα άκρα του περικαρδιακού σάκου (Εικόνα 1Η-Θ) και του μανδύα στο σημείο επαφής με το νεφρό (Εικόνα 1Ε-Ζ), όπου πιθανά μεταναστεύουν τα κύτταρα για να διαφοροποιηθούν, μετά τις ιστικές βλάβες που προκαλεί το SN3. Αντίθετα, στην αιμόλεμφο τα κύτταρα είναι $LGR5^-$, συνεπώς ο ρόλος που αποδίδεται στα υαλινοκύτταρα ως στελεχιαία κύτταρα δεν φαίνεται να επιβεβαιώνεται. Το αποτέλεσμα αυτό αναδεικνύει για πρώτη φορά το ηπατοπάγκρεας ως το όργανο αιμοποίησης στο σαλιγκάρι.

Ακολούθως, διερευνήθηκε ο ρόλος των κυττάρων της αιμολέμφου κατά την SN3 λοίμωξη. Τα υαλινοκύτταρα ομοιάζουν μορφολογικά με τα λεμφοειδή κύτταρα των θηλαστικών, ενώ, παράλληλα, φαίνεται να εκφράζουν τους δείκτες CD49b και CD16 των NK κυττάρων των θηλαστικών. Τα ενεργοποιημένα από το στελεχος SN3 υαλινοκύτταρα έδειξαν, μικροσκοπικά, να προσκολλούνται πάνω σε μολυσμένα αμοιβαδοκύτταρα και να τα νεκρώνουν (Εικόνα 2Β-Γ), μειώνοντας τον πληθυσμό τους, μείωση που ποσοτικοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής. Συνεπώς, αναδεικνύεται για πρώτη φορά η παρόμοια με NK-κυτταροτοξική δράση των υαλινοκυττάρων. Τα αμοιβαδοκύτταρα ομοιάζουν με τα μακροφάγα των θηλαστικών, καθώς αναγνωρίζουν αντιγόνα, με υποδοχείς τύπου Toll, που ανιχνεύθηκαν με αντισώματα των θηλαστικών. Ακόμα, φαγοκυτταρώνουν οψωνισμένα, αδρανοποιημένα κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* (Εικόνα 2Α) και καταστρέφουν τα αντιγόνα, παράγοντας ROS και μόρια τύπου κυτοκινών.

Α) Αριθμός αμοιβαδοκυττάρων και υαλινοκυττάρων στην αιμόλεμφο κατά τη χορήγηση του SN3					
Αμοιβαδοκύτταρα/ml (x10^4)		Υαλινοκύτταρα/ml (x10^4)		Νεκρά κύτταρα/ml (x10^4)	
Μάρτυρας	*Listeria* Sn3	Μάρτυρας	*Listeria* Sn3	Μάρτυρας	*Listeria* Sn3
16	250	2	117	0-1	107



Εικόνα 4. Κατά την SN3 λοίμωξη παρατηρείται στην αιμόλεμφο τεράστια αύξηση των ζωντανών και των νεκρών κυττάρων (Α) που συνοδεύεται από αύξηση των LGR5$^+$ κυττάρων στο ηπατοπάγκρεας (Β-Δ), στο νεφρό (Ε-Ζ) και στο περικάρδιο (Η-Θ). Κλίμακα: 13,912 μm.



Εικόνα 5. Τα αμοιβαδοκύτταρα φαγοκυτταρώνουν κύτταρα του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* (Α), ενώ τα ενεργοποιημένα από SN3 υαλινοκύτταρα προσκολλώνται πάνω σε μολυσμένα αμοιβαδοκύτταρα και προκαλούν κυτταρική νέκρωση (Β-Γ).

Συμπεράσματα

- Το ηπατοπάγκρεας των σαλιγκαριών είναι, πιθανά, το όργανο παραγωγής και φιλοξενίας των στελεχιαίων κυττάρων της αιμοποίησης και της έμφυτης ανοσοαπόκρισης.
- Κατά την SN3 λοίμωξη, τα LGR5$^+$ στελεχιαία κύτταρα μεταναστεύουν από το ηπατοπάγκρεας, τόσο προς την αιμόλεμφο, όπου διαφοροποιούνται σε κύτταρα-δράστες, δηλαδή υαλινοκύτταρα και αμοιβαδοκύτταρα, όσο και προς την προκαλούμενη από SN3 ιστική βλάβη για την αναγέννηση της.
- Τα υαλινοκύτταρα είναι μορφολογικά και λειτουργικά παρόμοια με τα λεμφοειδή κύτταρα τύπου 1 (ILCs1) της έμφυτης άμυνας των θηλαστικών και, πιο συγκεκριμένα, με τα κύτταρα φυσικούς φονιάδες (NK).
- Τα αμοιβαδοκύτταρα ομοιάζουν μορφολογικά και λειτουργικά με τα μακροφάγα των θηλαστικών.

Βιβλιογραφία

Abou-El-Naga, I. F. *et al*. (2014). *In vitro* interactions between the defense systems of resistant and susceptible *Biomphalaria alexandrina* and sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *Veterinary Parasitology*, 205.3-4, 712-716.

Accorsi, A., Ottaviani, E. & Malagoli, D. (2014). Effects of repeated hemolymph withdrawals on the hemocyte populations and hematopoiesis in *Pomacea canaliculata*. *Fish & Shellfish Immunology*, 38.1. 56-64.

Adamowicz, A. & Bolaczek, M. (2003). Blood cells morphology of the snail *Helix aspersa* maxima (Helicidae). *Zoologica Poloniae*, 48.1-4, 93-101.

Li, Y. *et al*. (2017). The hematopoiesis in gill and its role in the immune response of Pacific oyster *Crassostrea gigas* against secondary challenge with *Vibrio splendidus*. *Developmental & Comparative Immunology*, 71, 59-69.

Μηχανισμοί που εμποδίζουν τη θραύση γεφυρών χρωματίνης στην κυτταροκίνηση

ΜΠΑΛΑΦΟΥΤΗ Σοφία, ΖΑΧΟΣ Γεώργιος, ΠΕΤΣΑΛΑΚΗ Ελένη

Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, grad1030@edu.biology.uoc.gr
Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, gzachos@uoc.gr
Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, grad600@edu.biology.uoc.gr

Περίληψη
Οι γέφυρες χρωματίνης είναι «νήματα» ατελώς διαχωρισμένου DNA που συνδέουν τους θυγατρικούς πυρήνες στην κυτταροκίνηση. Στην κυτταροκίνηση με γέφυρες χρωματίνης, τα αγρίου τύπου κύτταρα επάγουν το σχηματισμό συσσωματωμάτων ακτίνης στη βάση του κυτταροπλασματικού καναλιού για να εμποδίσουν το σπάσιμο των γεφυρών χρωματίνης, το οποίο συνδέεται με συσσώρευση βλαβών στο DNA και καρκινογένεση. Ωστόσο, ο μοριακός μηχανισμός σχηματισμού των συσσωματωμάτων ακτίνης δεν είναι γνωστός. Στην παρούσα μελέτη, δείχνουμε ότι η RhoA, μια μικρή GTPάση που συμμετέχει στην αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού ακτίνης, εντοπίζεται στη βάση των γεφυρών DNA, προάγει το σχηματισμό των συσσωματωμάτων ακτίνης και είναι απαραίτητη για τη σταθεροποίηση των γεφυρών χρωματίνης σε κύτταρα ανθρώπου. Αναστολή ή μείωση της RhoA μειώνει το σχηματισμό των συσσωματωμάτων ακτίνης και προάγει το σπάσιμο των γεφυρών χρωματίνης σε σύγκριση με κύτταρα ελέγχου. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ένα νέο μηχανισμό προστασίας των γεφυρών χρωματίνης από σπάσιμο στην κυτταροκίνηση, μέσω σχηματισμού συσσωματωμάτων ακτίνης από τη RhoA.

Λέξεις – κλειδιά: Γέφυρες χρωματίνης, συσσωματώματα ακτίνης, RhoA, κυτταροκίνηση

Εισαγωγή
Ορισμένες φορές το κυτταροπλασματικό κανάλι που συνδέει τα θυγατρικά κύτταρα στην κυτταροκίνηση περιέχει γέφυρες χρωματίνης. Οι γέφυρες χρωματίνης είναι νήματα DNA που συνδέουν τους πόλους στην ανάφαση ή τους θυγατρικούς πυρήνες στην κυτταροκίνηση και σχετίζονται με ογκογένεση (Ganem & Pellman 2012, Hoffelder et al. 2004). Σχηματίζονται από διάφορους παράγοντες, όπως το μπλέξιμο του DNA κατά την αντιγραφή, τα δικεντρικά χρωμοσώματα και η αδυναμία επίλυσης του DNA κατά τον ανασυνδυασμό των χρωμοσωμάτων (Amaral et al. 2016, Petsalaki & Zachos 2019, Wang et al. 2010). Το σπάσιμο των γεφυρών χρωματίνης οδηγεί σε συσσώρευση βλαβών στο DNA, χρωμοθρίψη και σχηματισμό μικροπυρήνων (Umbreit et al. 2020). Τα παραπάνω οδηγούν σε αύξηση της χρωμοσωμικής αστάθειας που είναι συνδεδεμένη με την καρκινογένεση (Hanahan & Weinberg 2011). Τα ευκαρυωτικά κύτταρα, παρουσία γεφυρών DNA στην κυτταροκίνηση, ενεργοποιούν το σημείο ελέγχου της αποκοπής, ώστε να καθυστερήσουν το τελικό κόψιμο του κυτταροπλασματικού καναλιού που συνδέει τα θυγατρικά κύτταρα (Nahse et al. 2016, Petsalaki & Zachos 2019, Steigemann et al. 2009). Επιπλέον, τα αγρίου τύπου κύτταρα, στη βάση των γεφυρών χρωματίνης, σχηματίζουν συσσωματώματα ακτίνης που ονομάζονται “actin patches” για να σταθεροποιήσουν τις γέφυρες χρωματίνης (Dandoulaki et al. 2018, Petsalaki & Zachos 2019, Steigemann et al. 2009). Κινάσες, όπως οι Chk1 και Src, συμβάλλουν στο σχηματισμό των συσσωματωμάτων ακτίνης και στην προστασία των γεφυρών DNA από σπάσιμο στην κυτταροκίνηση (Dandoulaki et al. 2018). Ωστόσο, ο μηχανισμός δημιουργίας των συσσωματωμάτων ακτίνης δεν είναι πλήρως κατανοητός.

Η πρωτεΐνη RhoA ανήκει στην οικογένεια των μικρών GTPασών. Ενεργοποιείται μετά από πρόσδεση με GTP και απενεργοποιείται μετά από πρόσδεση με GDP (Jordan & Canman 2012). Η ενεργοποιημένη RhoA προσδένεται σε πρωτεΐνες που βρίσκονται καθοδικά της και σχετίζονται με την αναδιοργάνωση της ακτίνης έχοντας έτσι ενεργό ρόλο στην κυτταροκίνηση, την μετανάστευση και την προσκόλληση των κυττάρων στο υπόστρωμα (Jaffe & Hall 2005, Zhou & Zheng 2013). Ωστόσο, κάποιος ρόλος για τη RhoA στην προστασία των γεφυρών χρωματίνης από σπάσιμο δεν είχε έως τώρα ανιχνευθεί.

Μέθοδοι

Για τους σκοπούς της συγκεκριμένης μελέτης, παρατηρήσαμε σε συνεστιακό μικροσκόπιο μονιμοποιημένα κύτταρα BE, καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου του ανθρώπου. Επιπλέον, σε μικροσκόπιο φθορισμού παρατηρήσαμε ζωντανά κύτταρα Hela, καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας του ανθρώπου, που εξέφραζαν σταθερά την πρωτεΐνη μάρτυρα του πυρηνικού φακέλου, Lap2b, υβριδική με τη φθορίζουσα χρωστική RFP (Lap2b:RFP) και το πεπτίδιο Lifeact, που προσδένεται στην ακτίνη, υβριδικό με GFP (Lifeact:GFP). Επίσης, πραγματοποιήθηκε παροδική επιμόλυνση των κυττάρων με siRhoA, που μειώνει την ενδογενή ανθρώπινη RhoA και επώαση των κυττάρων με τον χημικό αναστολέα της RhoA, Y16. Ακόμα, πραγματοποιήθηκε παροδική επιμόλυνση κυττάρων με πλασμίδιο που κωδικοποιεί τη μεταλλαγμένη Vps4 υβριδική με GFP, στην οποία η λυσίνη 173 είχε αλλάξει σε γλουταμίνη για να καταργήσει την πρόσδεση της Vps4 με ATP και να αναστείλει την αποκοπή του κυτταροπλασματικού καναλιού (GFP:Vps4-K173Q). Τέλος, για την ανίχνευση του κυτταροπλασματικού καναλιού στο συνεστιακό μικροσκόπιο, βάψαμε τα κύτταρα με FM 1-43FX, μια λιπόφιλη φθορίζουσα χρωστική που επισημαίνει τις μεμβράνες.

Αποτελέσματα

Για να εξετάσουμε τον πιθανό ρόλο της RhoA στην κυτταροκίνηση παρουσία γεφυρών χρωματίνης, παρατηρήσαμε μονιμοποιημένα κύτταρα BE σε συνεστιακό μικροσκόπιο και ζωντανά κύτταρα σε μικροσκόπιο φθορισμού. Δείξαμε ότι η μείωση της ενδογενούς RhoA μέσω siRhoA ή η αναστολή της RhoA μέσω του χημικού αναστολέα Y16, αυξάνει το σπάσιμο των γεφυρών χρωματίνης σε σύγκριση με κύτταρα ελέγχου. Το σπάσιμο αυτό δεν οφείλεται σε δυσλειτουργία του σημείου ελέγχου της αποκοπής διότι αναστολή της αποκοπής μέσω επιμόλυνσης κυττάρων με τη μεταλλαγμένη Vps4 δεν μειώνει τις σπασμένες γέφυρες χρωματίνης σε κύτταρα χωρίς λειτουργική RhoA. Αντίθετα, η αναστολή της RhoA οδηγεί σε μείωση των συσσωματωμάτων ακτίνης στη βάση των γεφυρών. Επιπλέον, δείξαμε ότι η RhoA εντοπίζεται στη βάση των γεφυρών DNA, γεγονός που υποδεικνύει τον άμεσο ρόλο της στο σχηματισμό των συσσωματωμάτων ακτίνης. Τέλος, για να διερευνήσουμε αν το σπάσιμο των γεφυρών χρωματίνης σε κύτταρα με μειωμένη RhoA σχετίζεται με το σπάσιμο του κυτταροπλασματικού καναλιού, αναλύσαμε μονιμοποιημένα κύτταρα βαμμένα με τη λιπόφιλη φθορίζουσα χρωστική FM1-43FX. Δείξαμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων με σπασμένες γέφυρες χρωματίνης, εμφάνιζαν άθικτο κυτταροπλασματικό κανάλι, σε σύγκριση με κύτταρα που είχαν επωαστεί με τον TG003, που αναστέλλει το σημείο ελέγχου της αποκοπής. Σ’ αυτή την περίπτωση όλα τα κύτταρα με σπασμένες γέφυρες χρωματίνης είχαν και σπασμένο κυτταροπλασματικό κανάλι.

Συμπεράσματα

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα προτείνουμε ότι στην κυτταροκίνηση με γέφυρες χρωματίνης η RhoA εντοπίζεται στη βάση της γέφυρας DNA και είναι απαραίτητη για το σχηματισμό των συσσωματωμάτων ακτίνης και τη προστασία των γεφυρών χρωματίνης από σπάσιμο. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ένα νέο μηχανισμό που μπορεί να προστατεύει από καρκινογένεση σε κύτταρα ανθρώπου, μέσω του σχηματισμού συσσωματωμάτων ακτίνης στην κυτταροκίνηση με γέφυρες χρωματίνης.

Βιβλιογραφία

Amaral, N., Vendrell, A., Funaya, C., Idrissi, F.Z., Maier, M., Kumar, A., Neurohr, G., Colomina, N., Torres-Rosell, J., Geli, M.I., et al. (2016). The Aurora-B-dependent NoCut checkpoint prevents damage of anaphase bridges after DNA replication stress. Nature Cell Biology 18, 516–526.

Dandoulaki, M., Petsalaki, E., Sumpton, D., Zanivan, S., and Zachos, G. (2018). Src activation by Chk1 promotes actin patch formation and prevents chromatin bridge breakage in cytokinesis. Journal of Cell Biology 217, 3071–3089.

Ganem, N.J., and Pellman, D. (2012). Linking abnormal mitosis to the acquisition of DNA damage. Journal of Cell Biology 199, 871–881.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. Cell 144, 646–674.

Hoffelder, D.R., Luo, L., Burke, N.A., Watkins, S.C., Gollin, S.M., and Saunders, W.S. (2004). Resolution of anaphase bridges in cancer cells. Chromosoma 112, 389–397.

Jaffe, A.B., and Hall, A. (2005). Rho GTPases: Biochemistry and biology. Annual Review of Cell and Developmental Biology 21, 247–269.

Jordan, S.N., and Canman, J.C. (2012). Rho GTPases in animal cell cytokinesis: An occupation by the one percent. Cytoskeleton 69, 919–930.

Nähse, V., Christ, L., Stenmark, H., and Campsteijn, C. (2017). The Abscission Checkpoint: Making It to the Final Cut. Trends in Cell Biology 27, 1–11.

Petsalaki, E., and Zachos, G. (2019). Building bridges between chromosomes: novel insights into the abscission checkpoint. Cellular and Molecular Life Sciences 76, 4291–4307.

Steigemann, P., Wurzenberger, C., Schmitz, M.H.A., Held, M., Guizetti, J., Maar, S., and Gerlich, D.W. (2009). Aurora B-Mediated Abscission Checkpoint Protects against Tetraploidization. Cell 136, 473–484.

Umbreit, N.T., Zhang, C.Z., Lynch, L.D., Blaine, L.J., Cheng, A.M., Tourdot, R., Sun, L., Almubarak, H.F., Judge, K., Mitchell, T.J., et al. (2020). Mechanisms generating cancer genome complexity from a single cell division error. Science 368.

Wang, L.H.C., Mayer, B., Stemmann, O., and Nigg, E.A. (2010). Centromere DNA decatenation depends on cohesin removal and is required for mammalian cell division. Journal of Cell Science 123, 806–813.

Zhou, X., and Zheng, Y. (2013). Cell type-Specific signaling function of rhoa gtpase: Lessons from mouse genetargeting. Journal of Biological Chemistry 288, 36179–36188.

Απομόνωση πιθανών προβιοτικών μικροοργανισμών από την εντερική μικροχλωρίδα του χερσαίου σαλιγκαριού Cornu aspersum maxima από εκτροφείο της Νότιας Ελλάδας και διερεύνηση της ανοσοτροποποιητικής τους δράσης.

ΒΑΣΙΛΑΚΟΠΟΥΛΟΥ Δήμητρα[1], ΚΑΡΑΘΟΔΩΡΟΥ Αργυρώ[1], ΠΑΠΑΛΑΜΠΡΟΥ Φαίδρα[1], ΠΑΝΑΓΙΩΤΟΠΟΥΛΟΥ Γεσθημανή[1], ΚΟΤΖΑΜΑΝΙΔΗΣ Χαράλαμπος[2], ΣΤΑΙΚΟΥ Αλεξάνδρα[3], ΓΙΑΓΚΟΥ Μηνάς[1]

1. Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης,
dimitravs@bio.auth.gr, argykara@bio.auth.gr, fpapalamp@bio.auth.gr, gesthima@bio.auth.gr, yiangou@bio.auth.gr
2. Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών, Ελληνικός Γεωργικός Οργανισμός ΔΗΜΗΤΡΑ
kotzam@vri.gr
3. Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης,
astaikou@bio.auth.gr

Περίληψη

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος διαδραματίζει δομικές, μεταβολικές και προστατευτικές λειτουργίες για τη διατήρηση και ενίσχυση της ομοιόστασης του οργανισμού. Στο πλαίσιο αυτό, έχει τεθεί ως θεραπευτικός στόχος, μέσα από τη χορήγηση προβιοτικών, δηλαδή ζωντανών μικροοργανισμών που, όταν χορηγηθούν σε επαρκείς ποσότητες, ασκούν ευεργετική δράση στον ξενιστή. Ωστόσο, υπάρχει περιορισμένη γνώση όσον αφορά, τόσο στις αλληλεπιδράσεις της εντερικής μικροχλωρίδας και του ανοσοβιολογικού συστήματος, όσο και στη χρήση προβιοτικών σε κατώτερα ασπόνδυλα, όπως το χερσαίο σαλιγκάρι *Cornu aspersum*. Σε προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου απομονώθηκαν για πρώτη φορά γαλακτικά βακτήρια από το γαστρεντερικό σωλήνα του *Cornu aspersum* maxima και θεσπίστηκαν *in vivo* και *in vitro* κριτήρια για το χαρακτηρισμό τους ως προβιοτικά. Στην παρούσα εργασία απομονώθηκαν πιθανά προβιοτικά βακτήρια *Enterococcus* και *Leuconostoc* από σαλιγκάρια *Cornu aspersum* maxima, τα οποία διερευνήθηκαν ως προς την *in vitro* ικανότητα διέλευσης και αποικισμού του γαστρεντερικού σωλήνα και την *in vivo* ανοσοενισχυτική τους δράση στους μηχανισμούς έμφυτης άμυνας.

Λέξεις-Κλειδιά

Προβιοτικά, μικροχλωρίδα, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, ανοσοενίσχυση

Εισαγωγή

Ο μικροβιακός αποικισμός του γαστρεντερικού σωλήνα σηματοδοτεί, από τα αρχικά στάδια, καθοριστικές αλλαγές στη δομική και λειτουργική οργάνωση του ανοσοβιολογικού συστήματος. Οι συνέπειες αυτού του μεταγεννητικού προγραμματισμού υφίστανται σε όλη τη ζωή και επηρεάζουν την υγεία του οργανισμού (Tlaskalova-Hogenova *et al*. 2004). Στο πλαίσιο αυτό, εξελίχθηκαν νέες στρατηγικές για την πρόληψη και θεραπεία ασθενειών, οφειλόμενων στη δυσβίωση, που αφορούν στη σύνθεση και δυναμική των εντερικών μικροβιοκοινοτήτων. Το ενδιαφέρον εστιάζεται στην αναβίωση της εντερικής μικροχλωρίδας και του ξενιστή, μέσω στοχευμένης τροποποίησης της σύστασης της με τη χορήγηση προβιοτικών, δηλαδή ζωντανών μικροοργανισμών, που, όταν χορηγηθούν σε κατάλληλες ποσότητες, προάγουν την υγεία του ξενιστή (FAO/WHO 2002). Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει ευρεία γνώση αναφορικά με την αλληλεπίδραση των έμφυτων μηχανισμών άμυνας με τη μικροχλωρίδα σε ασπόνδυλα, όπως τα σαλιγκάρια. Σε προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου, απομονώθηκαν για πρώτη φορά προβιοτικοί μικροοργανισμοί από το γαστρεντερικό σωλήνα του εκτρεφόμενου σαλιγκαριού *Cornu aspersum* και θεσπίστηκαν *in vitro* και *in vivo* κριτήρια για το χαρακτηρισμό προβιοτικών ειδικών για σαλιγκάρια, που σχετίζονται με την αντοχή στους φυσιολογικούς φραγμούς άμυνας (εξωτερική βλέννα, γαστρική βλέννα, όξινο περιβάλλον), την ικανότητα προσκόλλησης στο επιθήλιο (σχηματισμός βιοϋμενίου, αυτοσυσσωμάτωση, υδροφοβία) και την ανοσοενισχυτική δράση στους μηχανισμούς άμυνας (φαγοκυττάρωση, χημειόταξη, παραγωγή αντιμικροβιακών ενζύμων)

(Dushku *et al*. 2019).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η απομόνωση πιθανών προβιοτικών βακτηρίων από το έντερο, τη γαστρική βλέννα και το στόμαχο *Cornu aspersum* σαλιγκαριών από εκτροφείο στη Νότια Ελλάδα και η διερεύνηση των *in vitro* προβιοτικών ιδιοτήτων και της *in vivo* ανοσοενισχυτικής δράσης τους.

Μεθοδολογία & Αποτελέσματα

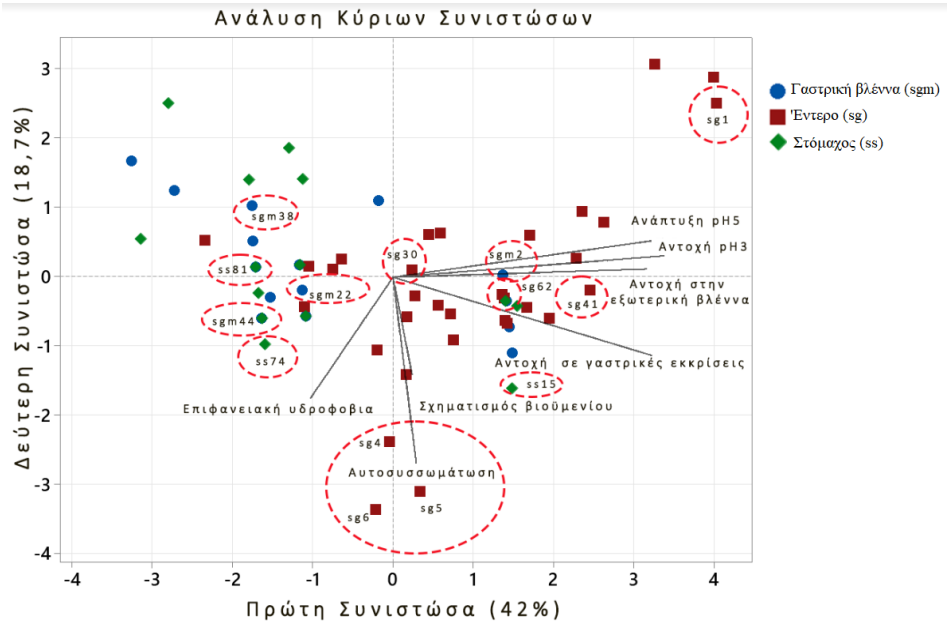
Τα βακτηριακά στελέχη απομονώθηκαν από τα ομογενοποιήματα εντέρου, στομάχου και γαστρικής βλέννας ενήλικων σαλιγκαριών *Cornu aspersum* maxima με καλλιέργεια σε εκλεκτικό θρεπτικό μέσο MRS και συλλογή μοναδικών αποικιών. Συλλέχθηκαν 140 αποικίες και οι μικροοργανισμοί παρατηρήθηκαν μικροσκοπικά με χρώση Gram και εξετάστηκαν ως προς την ύπαρξη καταλάσης. Με βάση αυτές τις δοκιμασίες επιλέχθηκαν 35 θετικά κατά Gram και αρνητικά κατά καταλάση βακτηριακά στελέχη από τον εντερικό βλεννογόνο, 21 από τη γαστρική βλέννα και 14 από το βλεννογόνο του στομάχου. Τα βακτήρια αυτά εξετάστηκαν, αρχικά, ως προς την ικανότητα να διαπερνούν τους μηχανικούς και χημικούς φραγμούς άμυνας των σαλιγκαριών, όπως η εξωτερική βλέννα, η γαστρική βλέννα, οι γαστρικές εκκρίσεις και το όξινο pH του γαστρεντερικού σωλήνα. Ακολούθως, εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα να αποικίζουν το έντερο, με βάση ιδιότητες της εξωτερικής επιφάνειας, όπως ο σχηματισμός βιοϋμενίου, η αυτοσυσσωμάτωση και η υδροφοβία.

Στη συνέχεια, ομαδοποιήθηκαν με βάση τις παραπάνω ιδιότητες με την Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Εικόνα 1). Με βάση την ομαδοποίηση και τα *in vitro* χαρακτηριστικά επιλέχθηκαν 8 στελέχη του εντέρου (Sg1, Sg4, Sg5, Sg6, Sg30, Sg41, Sg62, Sg67), 4 της γαστρικής βλέννας (Sgm2, Sgm22, Sgm8, Sgm44) και 3 του στομάχου (Ss15, Ss74, Ss81) για μοριακή ταυτοποίηση με βάση το γονίδιο 16S rRNA. Τα 14 από τα 15 βακτήρια βρέθηκε ότι ανήκουν στο είδος *Enterococcus malodoratus*, ενώ ένα βακτήριο (Sg1) στο είδος *Leuconostoc mesenteroides*.

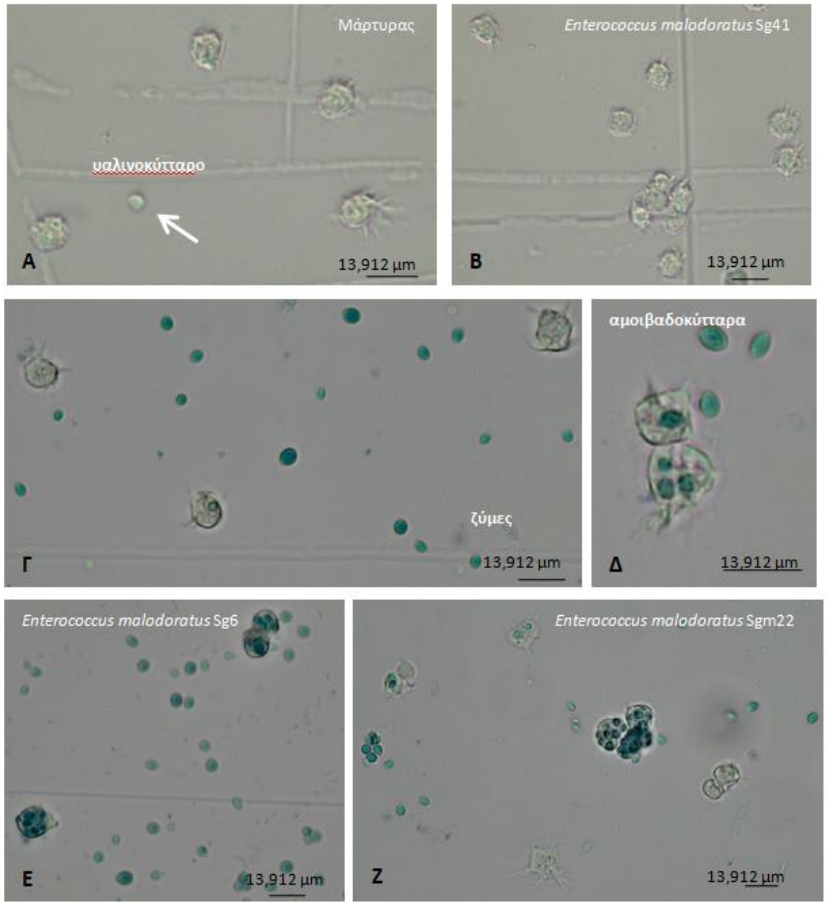
Από τα παραπάνω βακτήρια, 4 βακτήρια του εντερικού βλεννογόνου (Sg1, Sg6, Sg41, Sg62), 2 της γαστρικής βλέννας (Sgm2, Sgm22) και 1 του βλεννογόνου του στομάχου (Ss15), τα οποία έδειξαν να είναι διαφορετικά στελέχη (GenBank) εξετάστηκαν ως προς την *in vivo* ανοσοενισχυτική δράση. Βρέθηκε ότι, μετά από ενέσιμη χορήγηση στο ραχιαίο αιμόκοιλο, αυξάνουν στατιστικά σημαντικά (p-value<0,05) τη χημειοτακτική και φαγοκυτταρική ικανότητα των αμοιβαδοκυττάρων στην αιμόλεμφο (Εικόνα 2). Ωστόσο, μόνο το στέλεχος Ss15 οδήγησε σε αύξηση του αντιμικροβιακού ενζύμου φαινολοξειδάση στο κυτταρικό εκχύλισμα της αιμολέμφου. Αντίθετα, κανένα στέλεχος δεν επέφερε χημειόταξη υαλινοκυττάρων, κυτταρική νέκρωση και παραγωγή κυτταροτοξικών μορίων (νιτρικά ιόντα και ενεργές μορφές οξυγόνου-ROS). Μάλιστα, το στέλεχος Sg41 οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση των νιτρικών ιόντων και των ROS που απελευθερώνονται από τα κύτταρα της αιμολέμφου.

Συμπεράσματα

Η παραπάνω εργασία διερευνά για πρώτη φορά τις *in vitro* και *in vivo* προβιοτικές ιδιότητες βακτηρίων των γενών *Enterococcus* και *Leuconostoc* που απομονώθηκαν από το σαλιγκάρι *Cornu aspersum* maxima. Η προβιοτική δράση συσχετίσθηκε με την ικανότητα των βακτηρίων να φτάνουν στο γαστρεντερικό σωλήνα και να τον αποικίζουν και με την ενίσχυση της φαγοκυττάρωσης και χημειόταξης αμοιβαδοκυττάρων στην αιμόλεμφο. Οι μηχανισμοί ανοσοενισχυτικής και αντιμικροβιακής δράσης και η ασφαλής χρήση τους χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης, ωστόσο τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν τη βάση για την κατανόηση της αλληλεπίδρασης της εντερικής μικροχλωρίδας με τους μηχανισμούς έμφυτης άμυνας των σαλιγκαριών.



Εικόνα 1. Ανάλυση κυρίων συνιστωσών για τη διάκριση των πιθανών προβιοτικών στελεχών με βάση τις *in vitro* ιδιότητες ανθεκτικότητας στους φραγμούς άμυνας (pH 3, pH 5, εξωτερική βλέννα, γαστρικό περιεχόμενο) και ικανότητας αποικισμού του βλεννογόνου (σχηματισμός βιοϋμενίου, αυτοσυσσωμάτωση, υδροφοβία).



Εικόνα 2. Χημειοτακτική και φαγοκυτταρική ικανότητα μετά τη χορήγηση των πιθανών προβιοτικών βακτηριακών στελεχών. Η χορήγηση των πιθανών προβιοτικών οδηγεί σε αύξηση των αμοιβαδοκυττάρων στην αιμόλεμφο, αλλά όχι των υαλινοκυττάρων και οδηγεί σε αύξηση της φαγοκυττάρωσης από τα αμοιβαδοκύτταρα. Φωτογραφίες οπτικού μικροσκοπίου. Μεγέθυνση 40Χ.

Βιβλιογραφία

Dushku, E. *et al*. (2019). Probiotic properties and immunomodulatory activity of gastrointestinal tract commensal bacterial strains isolated from the edible farmed snail *Cornu aspersum* maxima. *Fish & shellfish immunology*, 92, 792-801.

FAO/WHO (2002). Guidelines For The Evaluation Of Probiotics In Food. 1-11.

Tlaskalová-Hogenová, H. *et al*. (2004). Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunology letters*, 93.2-3, 97-108.

Μελέτη νέων μηχανισμών σχηματισμού της μιτωτικής ατράκτου.

ΜΠΟΥΤΑΚΟΓΛΟΥ Νίκος[1], ΠΕΤΣΑΛΑΚΗ Ελένη[2], ΖΑΧΟΣ Γεώργιος[3]

1. Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας, Ηράκλειο 70013, Ελλάδα, grad1033@edu.biology.uoc.gr.
2. Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας, Ηράκλειο 70013, Ελλάδα, grad600@edu.biology.uoc.gr.
3. Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας, Ηράκλειο 70013, Ελλάδα, gzachos@uoc.gr.

Περίληψη
Η μιτωτική άτρακτος είναι ένα δυναμικό πολυμερές μικροσωληνίσκων, απαραίτητο στην κυτταρική διαίρεση για τον καταμερισμό των χρωμοσωμάτων στα δύο θυγατρικά κύτταρα. Λάθη στο σχηματισμό της ατράκτου μπορεί να οδηγήσουν σε καρκίνο και αναπτυξιακές διαταραχές. Ωστόσο, οι ακριβείς μηχανισμοί πολυμερισμού της ατράκτου δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Στην παρούσα εργασία, δείχνουμε ότι η κινάση Chk1, που συμμετέχει στην απόκριση του κυττάρου σε βλάβες DNA, είναι απαραίτητη για τη βέλτιστη πυκνότητα και τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων της ατράκτου σε κύτταρα ανθρώπου. Επιπλέον, βρήκαμε ότι η Chk1 εντοπίζεται στα μιτωτικά κεντροσώματα (κέντρα οργάνωσης των μικροσωληνίσκων) και φωσφορυλιώνει τη δομική πρωτεΐνη των μικροσωληνίσκων, β-τουμπουλίνη in vitro. Επίσης, κύτταρα χωρίς λειτουργική Chk1 εμφανίζουν αυξημένα ποσοστά αποδιοργανωμένων ατράκτων. Προτείνουμε ότι η Chk1 προάγει το σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου φωσφορυλιώνοντας τη β τουμπουλίνη στα κεντροσώματα. Τα αποτελέσματα μας αυτά προτείνουν ένα νέο μηχανισμό σχηματισμού της μιτωτικής ατράκτου σε κύτταρα ανθρώπου.

Λέξεις Κλειδιά
Μιτωτική άτρακτος, Μικροσωληνίσκοι, Chk1, β-τουμπουλίνη, Φωσφορυλίωση.

Εισαγωγή
Η μιτωτική άτρακτος είναι ένα δυναμικό πολυμερές απαραίτητο κατά την κυτταρική διαίρεση για το ισόποσο μοίρασμα των χρωμοσωμάτων στα δύο νεοσχηματιζόμενα κύτταρα (Prosser & Pelletier 2017). Πιο συγκεκριμένα, για τη δημιουργία του οι πρωτεΐνες α και β τουμπουλίνη ετεροδιμερίζονται και σχηματίζουν πρωτοϊνίδια (Desai & Mitchison 1997). Στη συνέχεια, δεκατρία πρωτοϊνίδια συναρμολογούνται και δημιουργούνται οι μικροσωληνίσκοι, οι οποίοι μοιάζουν με κυλινδρικές και κοίλες δομές (Desai & Mitchison 1997). Τα κύρια κέντρα οργάνωσης των μικροσωληνίσκων στα κύτταρα θηλαστικών είναι τα κεντροσώματα, τα οποία περιλαμβάνουν ένα σύμπλοκο με διαμόρφωση δακτυλιδιού που αποτελείται από την πρωτεΐνη γ-τουμπουλίνη (Roostalu & Surrey 2017). Τα σύμπλοκα δακτυλίων γ-τουμπουλίνης δρουν σαν ικριώματα για τα ετεροδιμερή αβ τουμπουλίνης και επιτρέπουν το σχηματισμό των μικροσωληνίσκων (Roostalu & Surrey 2017). Επιπλέον, τα διμερή τουμπουλινών τροποποιούνται μετα-μεταφραστικά, όμως ο ρόλος των τροποποιήσεων στο πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων δεν είναι πλήρως κατανοητός (Janke & Magiera 2020).
Η πρωτεΐνη Chk1 (Checkpoint kinase 1) είναι μια κινάση σερίνης θρεονίνης απαραίτητη για την απόκριση των κυττάρων μετά από βλάβες στο DNA και ενεργοποιείται από την κινάση σερίνης θρεονίνης ATR (Smith et al. 2010). Απουσία βλαβών στο DNA, η Chk1 ρυθμίζει την έναρξη της μιτωτικής διαίρεσης εμποδίζοντας την πρώιμη ενεργοποίηση της Cdk1 μέσω της φωσφορυλίωσης της φωσφατάσης Cdc25B (Krämer et al. 2004, Matsuyama et al. 2011). Επίσης η Chk1 προάγει τη σωστή διάταξη και ακριβή διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά την κυτταρική διαίρεση φωσφορυλιώνοντας την κινάση Aurora B (Petsalaki & Zachos 2013, Petsalaki et al. 2011, Zachos et al. 2007). Ωστόσο, μέχρι σήμερα δεν έχει εντοπιστεί κάποιος ρόλος της Chk1 στο σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου.

Μέθοδοι
Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά BE που προέρχεται από ανθρώπινο καρκίνωμα του παχέος εντέρου. Για τη μείωση των ενδογενών επιπέδων της πρωτεΐνης Chk1 χρησιμοποιήθηκε ειδικό siRNA (siChk1). Επιπλέον, στην in vitro δοκιμασία κινάσης χρησιμοποιήθηκε η ανασυνδυασμένη κινάση Chk1, η καθαρισμένη GST-β-τουμπουλίνη και μετά την ηλεκτροφόρηση

SDS-PAGE και την ανοσοστύπωση (western blot) των πρωτεϊνών, πραγματοποιήθηκε αυτοραδιογραφία. Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε σε ανεστραμένο συνεστιακό μικροσκόπιο (laser-scanning spectral confocal microscope TCS SP8- Leica) και η επεξεργασία του συνόλου των εικόνων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Leica Application Suite X software (LAS X).

Αποτελέσματα

Κύτταρα BE εμφάνισαν μειωμένη πυκνότητα μικροσωληνίσκων της ατράκτου μετά από μείωση των ενδογενών επιπέδων της Chk1, με siRNA, σε σύγκριση με τα κύτταρα αγρίου τύπου, τόσο κατά την προμετάφαση όσο και στο στάδιο της ανάφασης. Επιπλέον, για να εξετάσουμε το ρόλο της Chk1 στον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων της ατράκτου, κύτταρα επωάσθηκαν με κρύο θρεπτικό μέσο για 1,5h, ώστε να αποικοδομηθούν πλήρως οι μικροσωληνίσκοι. Στη συνέχεια, εξετάστηκε η πυκνότητα των μικροσωληνίσκων της ατράκτου στο στάδιο της προμετάφασης, κατά την ανάκτηση με ζεστό θρεπτικό μέσο παρουσία ή απουσία του αναστολέα της Chk1, UCN-01. Έτσι, παρατηρήσαμε ότι η αναστολή της Chk1 ελάττωσε τον επανασχηματισμό των μικροσωληνίσκων της ατράκτου σε σύγκριση με τα κύτταρα αγρίου τύπου. Άρα, από αυτά τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η Chk1 είναι απαραίτητη για τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων της ατράκτου. Παράλληλα, λαμβάνοντας υπόψιν τον πιθανό ρόλο της Chk1 στον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων της ατράκτου, εντοπίσαμε στα μιτωτικά κεντροσώματα, την ενεργή μορφή της Chk1 (pS345 Chk1), με τη χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας. Στη συνέχεια, για να διερευνήσουμε αν η Chk1 φωσφορυλιώνει in vitro την τουμπουλίνη, πραγματοποιήσαμε δοκιμασία κινάσης, χρησιμοποιώντας την πρωτεΐνη Chk1 και την GST tagged β τουμπουλίνη του ανθρώπου απομονωμένη από βακτήρια. Με αυτό τον τρόπο είδαμε ότι η κινάση Chk1 φωσφορυλιώνει in vitro την ανθρώπινη β-τουμπουλίνη, σε νέα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα τα οποία και ταυτοποιήσαμε. Επίσης, σαν επακόλουθο των αποτελεσμάτων που αναλύθηκαν, μπορούμε να αναφέρουμε ότι, η μείωση στον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων της ατράκτου μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό αποδιοργανωμένων (κακοφτιαγμένων) ατράκτων. Έτσι, παρατηρήσαμε ότι σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου που δεν εμφανίζουν καμία κακοφτιαγμένη άτρακτο, τα κύτταρα με μειωμένη Chk1 εμφανίζουν αυξημένο ποσοστό (16%) αποδιοργανωμένων ατράκτων. Έτσι, φαίνεται ότι η Chk1 είναι απαραίτητη για τη βέλτιστη οργάνωση της ατράκτου.

Συμπεράσματα

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η Chk1 προάγει τον αποτελεσματικό πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου, μέσω φωσφορυλίωσης της β-τουμπουλίνης στα κεντροσώματα. Χρησιμοποιώντας φωσφο-ειδικά αντισώματα έναντι των θέσεων φωσφορυλίωσης από την Chk1 καθώς και μεταλλαγμένες πρωτείνες β-τουμπουλίνης, θα διερευνήσουμε περαιτέρω το συγκεκριμένο μοριακό μηχανισμό. Η εργασία μας περιγράφει νέους μηχανισμούς οι οποίοι μπορούν να προστατεύουν από την καρκινογένεση μέσω ρύθμισης του σωστού σχηματισμού και της λειτουργίας της μιτωτικής ατράκτου.

Βιβλιογραφία

Prosser, S.L., and Pelletier, L. (2017). Mitotic spindle assembly in animal cells: A fine balancing act. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 18, 187–201.

Desai, A., and Mitchison, T.J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 13, 83–117.

Roostalu, J., and Surrey, T. (2017). Microtubule nucleation: Beyond the template. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 18, 702–710.

Janke, C., and Magiera, M.M. (2020). The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 21, 307–326.

Smith, J., Mun Tho, L., Xu, N., and A. Gillespie, D. (2010). The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. Advances in Cancer Research, 108, 73–112.

Krämer, A., Mailand, N., Lukas, C., Syljuåsen, R.G., Wilkinson, C.J., Nigg, E.A., Bartek, J., and Lukas, J. (2004). Centrosome-associated Chk1 prevents premature activation of cyclin-B-Cdk1 kinase. Nature Cell Biology, 6, 884–891.

Matsuyama, M., Goto, H., Kasahara, K., Kawakami, Y., Nakanishi, M., Kiyono, T., Goshima, N., and Inagaki, M. (2011). Nuclear Chk1 prevents premature mitotic entry. Journal of Cell Science, 124, 2113–2119.

Zachos, G., Black, E.J., Walker, M., Scott, M.T., Vagnarelli, P., Earnshaw, W.C., and Gillespie, D.A.F. (2007). Chk1 Is Required for Spindle Checkpoint Function. Developmental Cell, 12, 247–260.

Petsalaki, E., Akoumianaki, T., Black, E.J., Gillespie, D.A.F., and Zachos, G. (2011). Phosphorylation at serine 331 is required for Aurora B activation. Journal of Cell Biology, 195, 449–466.

Petsalaki, E., and Zachos, G. (2013). Chk1 and mps1 jointly regulate correction of merotelic kinetochore attachments. Journal of Cell Science, 126, 1235–1246.

Ο ρόλος των προβιοτικών μικροοργανισμών σε ασπόνδυλα σε καταστάσεις εντερικής λοίμωξης

ΣΠΥΡΟΠΟΥΛΟΥ Άννα[1], ΚΑΡΑΘΟΔΩΡΟΥ Αργυρώ[1], ΑΜΑΝΑΤΙΔΗΣ Περικλής[1], ΑΥΓΕΡΗΣ Αναστάσιος[1], ΝΤΟΥΣΚΟΥ Εσμεράλντα[1,2], ΚΟΤΖΑΜΑΝΙΔΗΣ Χαράλαμπος[2], ΣΤΑΪΚΟΥ Αλεξάνδρα[3], ΓΙΑΓΚΟΥ Μηνάς[1]

1) Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Α.Π.Θ, annspydim@bio.auth.gr, *argykara@bio.auth.gr,* periaman@bio.auth.gr, *aavgeris@bio.auth.gr,* nesmeral@bio.auth.gr, yiangou@bio.auth.gr

2) Ελληνικός Γεωργικός Οργανισμός ΔΗΜΗΤΡΑ, Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών, kotzam@vri.gr

3) Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Α.Π.Θ, astaikou@bio.auth.gr

Περίληψη

Οι μικροοργανισμοί που αποικίζουν το έντερο παράγουν μεταβολικά παραπροϊόντα, όπως τα λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (SCFA), ουσίες που στα σπονδυλωτά συμμετέχουν στην αναβίωση του οργανισμού. Προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο ρόλος των SCFA στην αναβίωση σε ασπόνδυλα και να διερευνηθεί η επίδραση των SCFA στους μηχανισμούς έμφυτης άμυνας, διερευνήθηκε η επίδραση των βασικότερων SCFA (ACE, PROP, BUT) όταν χορηγούνται μέσω της τροφής σε σαλιγκάρια παράλληλα με το υπερλοιμογόνο στέλεχος *Listeria monocytogenes* SN3. Προέκυψε ότι η χορήγηση SCFA σε καταστάσεις δυσβίωσης από το SN3 αναστέλλει τον παθολογικό φαινότυπο εξαιτίας του SN3 και έχει ανοσοενισχυτική δράση, αυξάνοντας την έκφραση υποδοχών τύπου Toll στους ιστούς. Η δυσβίωση λόγω του SN3, συσχετίσθηκε, επιπλέον, με αυξημένα συσσωματώματα ασβεστίου και βλεννοκυττάρων στα κόπρανα και αλλοίωση στη μορφολογία των ιστών του πεπτικού σωλήνα.

Λέξεις-κλειδιά

Cornu aspersum, Λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας, Ανοσοβιολογικό σύστημα, Δυσβίωση, Ανοσοενίσχυση

Εισαγωγή

Ο όρος ‘μικροχλωρίδα’ αναφέρεται στο σύνολο των μικροοργανισμών που αποικίζουν μια συγκεκριμένη θέση σε έναν ξενιστή ή περιβάλλον. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μικροχλωρίδα του εντέρου, καθώς εκτελεί ποικίλες βιολογικές διαδικασίες, ευεργετικές για τον ξενιστή. Το ανοσοβιολογικό σύστημα έχει εξελιχθεί και δομηθεί με τέτοιο τρόπο, ώστε να φιλοξενεί μεγάλο αριθμό βακτηρίων, να αλληλεπιδρά αμοιβαία με αυτά, αλλά και να απομακρύνει τους παθογόνους μικροοργανισμούς, που διαταράσσουν την ομοιόσταση του (δυσβίωση) (Chen *et al.* 2021, Jandhyala *et al*. 2015, Van Horn *et al*. 2012).

Τα SCFA είναι τα κύρια τελικά προϊόντα της αναερόβιας ζύμωσης των φυτικών ινών και των άπεπτων υδατανθράκων από τη μικροχλωρίδα του εντέρου. Το οξικό οξύ (ACE-CH_3COOH), το προπιονικό οξύ (PROP-CH_3CH_2COOH) και το βουτυρικό οξύ (BUT-$CH_3(CH_2)_2COOH$) είναι τα κύρια SCFA που παράγονται κατά την εντερική ζύμωση από βακτήρια. Τα οξέα αυτά αποτελούν >95% της περιεκτικότητας του εντέρου σε SCFA σε συνήθη μοριακή αναλογία 3:1:1 (ACE:PROP:BUT). Τα βακτήρια που παράγουν SCFA στο έντερο ανήκουν κυρίως στα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* (Hu *et al*. 2018, Markowiak-Kopeć & Śliżewska 2020, Morrison & Preston 2016). Τα SCFA συμμετέχουν στη ρύθμιση του pH, στο μεταβολισμό της γλυκόζης και των πρωτεϊνών και στη διατήρηση της φυσιολογικής δομής και λειτουργίας του εντέρου. Επιπλέον, παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη δράση, καθώς ρυθμίζουν τη λειτουργία των λευκοκυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων και αναστέλλουν την παραγωγή και απελευθέρωση προφλεγμονωδών μορίων στο εντερικό επιθήλιο. Ακόμη, αποτελούν την κύρια πηγή ενέργειας για τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και προστατεύουν το έντερο από την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών (Markowiak-Kopeć & Śliżewska 2020, Vinolo *et al.* 2011).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της επίδρασης των SCFA στην έμφυτη άμυνα των σαλιγκαριών και στην αναστολή του παθολογικού φαινοτύπου δυσβίωσης και η περαιτέρω διερεύνηση του μηχανισμού παθογένειας του υπερλοιμογόνου στελέχους *Listeria monocytogenes* SN3 στα σαλιγκάρια.

Μεθοδολογία και Αποτελέσματα

Η ανοσοτροποποιητική δράση των SCFA σε σαλιγκάρια μετά από δυσβίωση προκαλούμενη από το στέλεχος SN3, έγινε με χορήγηση μέσω της τροφής. Δημιουργήθηκαν τέσσερις πειραματικές σειρές (Μάρτυρας-αποστειρωμένη τροφή, SCFA-αποστειρωμένη τροφή με διάλυμα SCFA, SN3-τροφή αναμειγμένη με SN3 και SCFA/SN3-εναλλαγή τροφής με SCFA και SN3). Παρατηρήθηκε ότι τα SCFA καθυστερούν και μειώνουν την θνησιμότητα που προκαλεί το στέλεχος SN3 (**Εικόνα 1. α**) και την έκκριση βλέννας στα κόπρανα των ζώων που προκαλείται από το SN3 (**Εικόνα 1. β**). Επιπλέον, τα κόπρανα στα σαλιγκάρια της SN3 σειράς περιείχαν, μικροσκοπικά, μεγάλες ποσότητες συσσωματωμάτων ασβεστίου, πιθανότατα λόγω της μεγάλης αλλοίωσης που παρατηρείται και από τον ιστολογικό έλεγχο στη θέση όπου γίνεται η ασβεστοποίηση του κελύφους (ηπατοπάγκρεας). Ακόμη, από τη διερεύνηση της μικροβιολογικής σύστασης των κοπράνων με χρήση εκλεκτικών θρεπτικών υλικών παρατηρήθηκαν μεγάλες διακυμάνσεις του μικροβιακού φορτίου διαφορετικών ομάδων βακτηρίων μετά τη χορήγηση του SN3 και/ή των SCFA.

Από την ιστολογική παρατήρηση του πεπτικού σωλήνα (οισοφάγος, προστόμαχος, στόμαχος, έντερο και ηπατοπάγκρεας) των σαλιγκαριών των 4 πειραματικών σειρών φάνηκε ότι η αλλοίωση που προκαλείται στους βλεννογόνους από το SN3, μειώνεται σημαντικά στην SCFA/SN3 σειρά, γεγονός που αποδεικνύει ότι τα SCFA έχουν την ικανότητα να μειώνουν, σε κάποιο βαθμό, την παθογένεια του υπερλοιμογόνου βακτηρίου στους ιστούς, αλλά δεν έχουν την ικανότητα να παρεμποδίζουν πλήρως την αλλοίωση, ενώ μικρή τροποποίηση του εντέρου παρατηρήθηκε και στην SCFA σειρά (**Εικόνα 2**).

Για τη διερεύνηση της έκφρασης ομόλογων των θηλαστικών υποδοχέων τύπου Toll από τα κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου και του ηπατοπαγκρέατος, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του ανοσοφθορισμού, χρησιμοποιώντας τα αντισώματα έναντι των TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 και TLR9. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχουν σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ των πειραματικών σειρών στους δύο ιστούς, υποδεικνύοντας πιθανό ανοσοτροποποιητικό ρόλο των SCFA. Οι διαφορές που παρατηρούνται είναι πιθανόν να οφείλονται στα διαφορετικά μοριακά πρότυπα που αναγνωρίζει κάθε υποδοχέας και τις ανοσοαποκρίσεις, τις οποίες ενεργοποιεί.

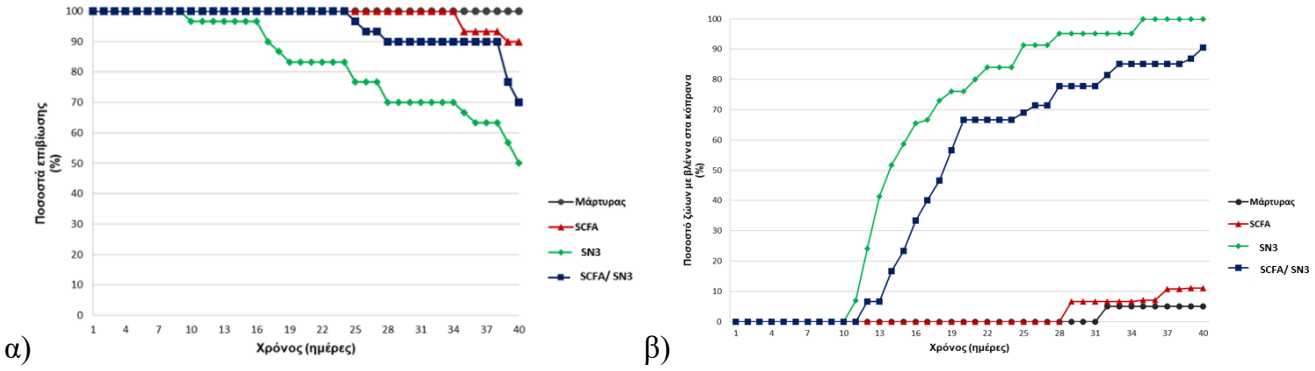
Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας παρατηρήθηκε ότι:

- η παθοφυσιολογία που προκαλεί το στέλεχος SN3, που έχει ήδη συσχετισθεί με αυξημένη θνησιμότητα των ζώων και αυξημένη βλέννα στο έντερο και στα κόπρανα και αλλοίωση της μορφολογίας του εντέρου, για πρώτη φορά, στη συγκεκριμένη εργασία συσχετίσθηκε, επιπλέον, με την αύξηση των αποθέσεων ασβεστίου στα κόπρανα και την αλλοίωση στη μορφολογία όλων των ιστών του πεπτικού σωλήνα και του ηπατοπαγκρέατος.

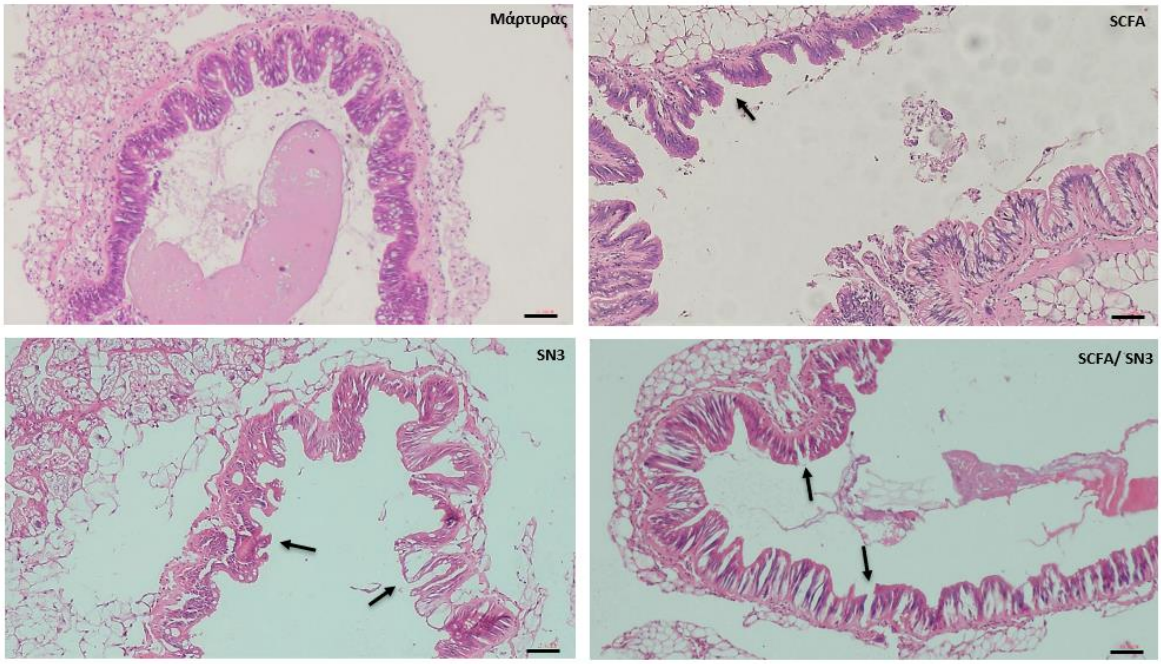
- η χορήγηση των SCFA μέσω της τροφής δεν επάγει τις έμφυτες κυτταρικές και χυμικές ανοσοαποκρίσεις στην αιμόλεμφο, αλλά είναι ικανή να αναστείλει τη δυσβίωση που προκαλείται από το υπερλοιμογόνο στέλεχος SN3, αφού καθυστερεί τη θνησιμότητα, μειώνει την εκκρινόμενη βλέννα στα κόπρανα, αλλά και την αποβολή ασβεστοκυττάρων μέσω των κοπράνων, ευνοεί την ανάπτυξη συγκεκριμένων βακτηριακών πληθυσμών στο έντερο και αναστέλλει την ανάπτυξη του SN3, εμποδίζοντας την επίδραση του στις κυτταρικές και χυμικές ανοσοαποκρίσεις.

- η ανοσοτροποποιητική δράση των SCFA στο έντερο και στο ηπατοπάγκρεας συσχετίζεται με αλλαγές στην έκφραση ομολόγων των θηλαστικών υποδοχέων τύπου Toll.



α) β)

Εικόνα 1. α) Ποσοστό επιβίωσης (%) και **β)** ποσοστό σαλιγκαριών *Cornu aspersum* maxima με βλέννα στα κόπρανα των στις 4 πειραματικές σειρές.



Εικόνα 2. Ιστοπαθολογία του εντερικού βλεννογόνου με χρώση εωσίνης-αιματοξυλίνης στις 4 πειραματικές σειρές (Μεγέθυνση 10Χ, Κλίμακα 13,912μm). Τα βέλη υποδεικνύουν τις αλλοιώσεις στη μορφολογία του ιστού.

Βιβλιογραφία

Chen, L., Li, S., Xiao, Q. *et al*. (2021). Composition and diversity of gut microbiota in *Pomacea canaliculata* in sexes and between developmental stages. *BMC Microbiology*, 21, 1-12.

Hu, J., Lin, S., Zheng, B. & Cheung, P.C.K. (2018). Short-chain fatty acids in control of energy metabolism. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58, 1243-1249.

Jandhyala, S.M. *et al*. (2015). Role of the Normal Gut Microbiota. *World Journal of Gastroenterology*, 21, 8836-8847.

Markowiak-Kopeć, P. & Śliżewska, K. (2020). The effect of probiotics on the production of short-chain fatty acids by human intestinal microbiome. *Nutrients*, 12, 1-23.

Morrison, D. J. & Preston, T. (2016). Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*, 7, 189-200.

Van Horn, D. J. *et al*. (2012). Complex Intestinal Bacterial Communities in Three Species of Planorbid Snails. *Journal of Molluscan Studies*, 78, 74-80.

Vinolo, M.A.R. *et al*. (2011). Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 22, 849-855.

Τρίτο καλοκαίρι πανδημίας COVID-19: Μια επιδημιολογική μελέτη για την COVID-19 στις Π.Ε. Δυτικής Μακεδονίας, Πέλλας και Ημαθίας

ΠΑΠΑΔΗΜΗΤΡΙΟΥ Μαρία, ΝΑΚΟΥ Ιφιγένεια, ΒΟΪΤΣΕ Αναστασία[1]

[1]*Γ.Ν. Κοζάνης «Μαμάτσειο» Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, covid19@mamatsio.gr*

Περίληψη
Στην παρούσα μελέτη, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά την ανάλυση δειγμάτων από τα Νοσοκομεία και κέντρα υγείας της Περιφέρειας Δυτικής Μακεδονίας και τις Περιφερειακές Ενότητες Πέλλας και Ημαθίας κατά τους καλοκαιρινούς μήνες του 2021 και 2022, καθώς και τη σύγκριση αυτών, με σκοπό την εξαγωγή συμπερασμάτων για το μέλλον και την εξέλιξη της πανδημίας.

Λέξεις-κλειδιά
SARS-CoV-2, COVID-19, πανδημία, επιδημιολογική μελέτη

Εισαγωγή

Ο ιός SARS-CoV-2 είναι ένας μονόκλωνος ιός RNA θετικής πολικότητας, ο οποίος μεταδίδεται κυρίως μέσω αναπνευστικών σταγονιδίων και προκαλεί τη νόσο COVID-19. Η απομόνωση του ιού πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά στην Κίνα τον Δεκέμβριο του 2019 από ασθενείς με συμπτώματα πνευμονίας (Zhu et al. 2020). Πλέον είναι γνωστό ότι ένα ευρύ φάσμα συμπτωμάτων, που κυμαίνονται από την ασυμπτωματική νόσηση έως το σοβαρό σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS) και το θάνατο μπορεί να οφείλονται στον ιό SARS-CoV-2 (Tian et al. 2020).

Το πρώτο κρούσμα COVID-19 στην Ελλάδα εντοπίστηκε στις 26 Φεβρουαρίου 2022. Άμεσα ξεκίνησε η ενημέρωση σχετικά με τους κανόνες υγιεινής και εφαρμόστηκαν μέτρα κοινωνικής αποστασιοποίησης. Παράλληλα, για την παρακολούθηση και την αντιμετώπιση της πανδημίας στην Δυτική Μακεδονία, ιδρύθηκε τον Απρίλιο του 2020 το Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας στο Γενικό Νοσοκομείο Κοζάνης, το οποίο εξυπηρετεί μέχρι και σήμερα τη Δυτική Μακεδονία, καθώς και τις περιφερειακές ενότητες Πέλλας και Ημαθίας.

Ο στόχος αυτής της μελέτης είναι να παρέχει μια συγκριτική ανάλυση της επιδημιολογίας της νόσου COVID-19 στις περιοχές εξυπηρέτησης του εργαστηρίου κατά τις καλοκαιρινές περιόδους του έτους 2021 και του 2022.

Μέθοδοι

Για τη συγκεκριμένη μελέτη αναλύθηκαν με τη μέθοδο της ποιοτικής RT-PCR 16.185 δείγματα κατά την περίοδο 31/5/2021 έως και 5/9/2021και 21.371 δείγματα κατά την περίοδο 30/5/2022 έως και 4/9/2022. Τα δείγματα συλλέχθηκαν τόσο από τα 9 Νοσοκομεία που εξυπηρετεί το εργαστήριό μας (Κοζάνης, Πτολεμαΐδας, Γρεβενών, Καστοριάς, Φλώρινας, Έδεσσας, Γιαννιτσών, Βέροιας και Νάουσας) όσο και από τα συνολικά 18 κέντρα υγείας από τις Π.Ε. Κοζάνης, Γρεβενών, Καστοριάς, Φλώρινας, Πέλλας και Ημαθίας.

Για την εξαγωγή του RNA του ιού SARS-CoV-2 έγινε χρήση είτε του ANDiS Viral RNA Auto Extraction & Purification Kit στο Αυτόματο Σύστημα Απομόνωσης Νουκλεϊκών οξέων ANDiS 350 του οίκου 3DMed, είτε του MOLgen Universal Extraction Kit στο στο Αυτόματο Σύστημα EXTRAlab του οίκου ADALTIS. Για την RT-qPCR χρησιμοποιήθηκε το ANDiS FAST SARS-CoV-2 RT-qPCR Detection Kit, το οποίο περιέχει primers για αλληλουχίες του ORF1ab, του γονιδίου E και του γονιδίου N του ιού καθώς και για το γονίδιο της RNase P που χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Η

ενίσχυση πραγματοποιήθηκε στο θερμοκυκλοποιητή Quant Gene 9000 της BIOER και η ανάλυση έγινε με το λογισμικό LineGene9600 του ίδιου οίκου.

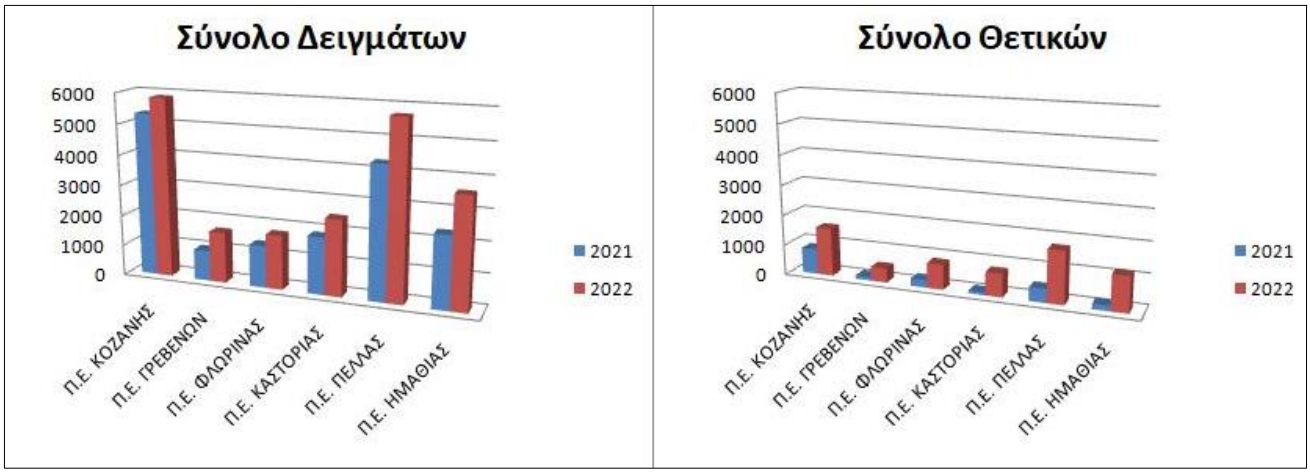
Η καταχώρηση των αποτελεσμάτων γίνεται στο σύστημα καταγραφής του νοσοκομείου LIS και η επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Excel της Microsoft.

Αποτελέσματα

Ο συνολικός αριθμός δειγμάτων που εξετάστηκαν από το εργαστήριό μας την καλοκαιρινή περίοδο του 2021 ανέρχεται σε 16.185, ενώ κατά το 2022 σε 21.371. Συνεπώς τα δείγματα εμφανίζονται αυξημένα κατά 32% το καλοκαίρι του 2022 σε σχέση με το 2021. Στην Εικόνα 1 εμφανίζεται η σύγκριση του πλήθους των συνολικών (αριστερά) και των θετικών (δεξιά) δειγμάτων που αναλύσαμε.

Παρατηρούμε ότι το καλοκαίρι του 2022 υπάρχει μία ανοδική τάση σε όλες τις Π.Ε. τόσο στον αριθμό των δειγμάτων όσο και στον αριθμό των θετικών. Συγκεκριμένα, παρατηρήσαμε αύξηση κατά 10% στη Π.Ε. Κοζάνης, 66% στη Π.Ε. Γρεβενών, 25,5% στην Π.Ε. Φλώρινας, 33,4% στην Π.Ε. Καστοριάς, 33% στην Π.Ε. Πέλλας και 52% στα δείγματα της Π.Ε. Ημαθίας.

Αναφορικά με το συνολικό αριθμό θετικών, παρατηρήσαμε πολύ μεγαλύτερη αύξηση το καλοκαίρι του 2022, σε σύγκριση με αυτό του 2021. Συγκεκριμένα, στην Π.Ε. Κοζάνης τα θετικά δείγματα βρέθηκαν σχεδόν διπλάσια, στην Π.Ε. Γρεβενών και Πέλλας τετραπλάσια, στην Π.Ε. Φλώρινας τριπλάσια, στην Π.Ε. Καστοριάς οκταπλάσια και στην Π.Ε. Ημαθίας εξαπλάσια.

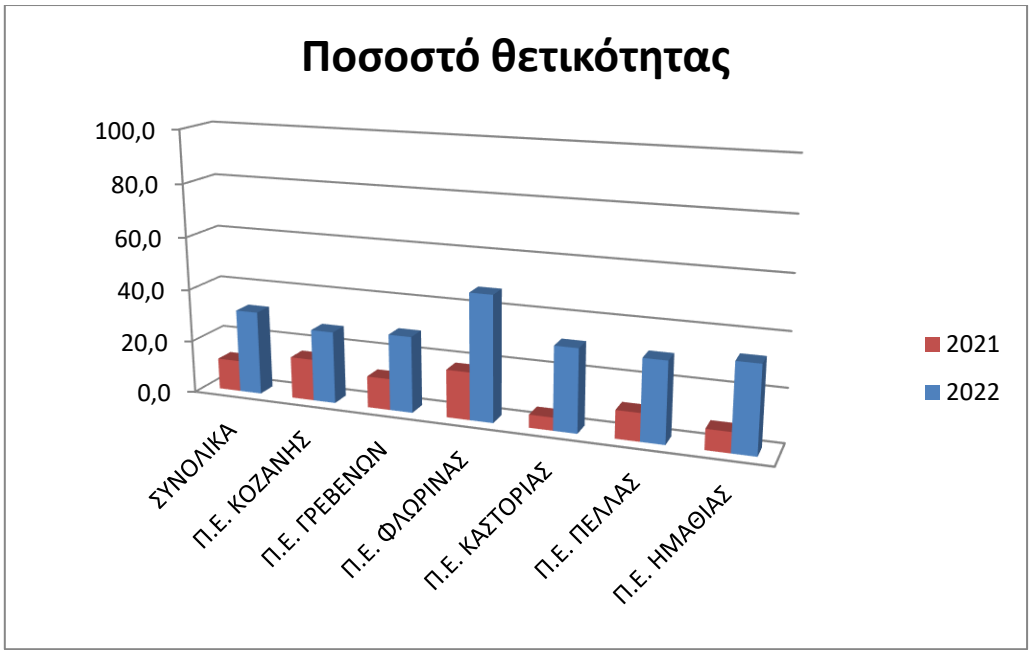


Εικόνα 1. Συνολικός αριθμός δειγμάτων και θετικών που εξετάστηκαν ανά νομό

Το 2022, το ποσοστό θετικότητας (αριθμός θετικών / αριθμό δειγμάτων), στο σύνολο των δειγμάτων, παρουσιάζει αύξηση κατά 20 ποσοστιαίες μονάδες. Η αύξηση, κατ' επέκταση, διαφαίνεται και στις κατά τόπους Π.Ε. που μελετούνται (Εικόνα 2). Πιο συγκεκριμένα, μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήσαμε στη Π.Ε. Φλώρινας με 29,3 ποσοστιαίες μονάδες, ενώ ακολουθούν οι Π.Ε. Καστοριάς και Ημαθίας με 26,3 και 24,9 ποσοστιαίες μονάδες αντιστοίχως. Η αύξηση στη Π.Ε. Πέλλας κινήθηκε κοντά στο ποσοστό του συνόλου, ενώ μικρότερης κλίμακας αύξηση είδαμε στις Π.Ε. Γρεβενών και Κοζάνης με 16,9 και 11,4 ποσοστιαίες μονάδες αντίστοιχα.

Συμπεράσματα

Φέτος διανύσαμε το τρίτο καλοκαίρι πανδημίας COVID-19. Σε αντίθεση με τα προηγούμενα δύο καλοκαίρια, δεν εφαρμόστηκαν πρόσθετα μέτρα δημόσιας υγείας (κοινωνική απόσταση, τοπικά lockdown, υποχρεωτική χρήση μάσκας σε δημόσιους χώρους, κ.λπ.) σε τοπικό ή εθνικό επίπεδο.



Εικόνα 2. Ποσοστό θετικότητας δειγμάτων ανά νομό

Επιπλέον, ένα ακόμα στοιχείο που διέφερε στα τελευταία δύο καλοκαίρια είναι το στέλεχος του ιού SARS-CoV-2 που επικρατούσε. Σύμφωνα με μελέτη για τα στελέχη που ήταν σε κυκλοφορία στην Αττική (Galani et al. 2022) καθώς και με αδημοσίευτα δεδομένα αλληλούχισης από το Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης (Ε.Κ.Ε.Τ.Α.), που αφορούν τις Π.Ε. εξυπηρέτησης του εργαστηρίου μας, το καλοκαίρι του 2021 επικρατούσε το στέλεχος Δέλτα, ενώ το 2022 επικράτησε το πολύ πιο μεταδοτικό στέλεχος Όμικρον.

Αυτά τα δύο στοιχεία, πιθανώς να συνετέλεσαν στην αυξημένη θετικότητα του φετινού καλοκαιριού σε σύγκριση με την αντίστοιχη περίοδο του 2021. Διάφορες μελέτες συμφωνούν πως είναι πιθανό ο ιός SARS-CoV-2 να γίνει ενδημικός στα επόμενα χρόνια (Lavine et al. 2021, Maltezou et al. 2020). Στην κατεύθυνση αυτή συμβάλει η επικαιροποίηση των εμβολίων κατά του SARS-CoV-2 και η συνεχής έρευνα για νέα φάρμακα που βοηθούν στην αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση της νόσου (Antia R., & Halloran M.E. 2021). Υπάρχει, ωστόσο, μια αβεβαιότητα για το πότε μπορεί αυτή η μετάβαση να επιτευχτεί λόγω της εμφάνιση νέων στελεχών τα οποία μπορεί να είναι περισσότερο μεταδοτικά (Yang et al. 2022)

Βιβλιογραφία

Antia R., & Halloran M.E. (2021). Transition to endemicity: Understanding COVID-19. *Immunity*, 54(10), 2172-2176.

Galani A., Markou A., Dimitrakopoulos L., Kontou A., Kostakis M., Kapes V., Diamantopoulos M.A., Adamopoulos P.G., Avgeris M., Lianidou E., Scorilas A., Paraskevis D., Tsiodras S., Dimopoulos M.A., Thomaidis N. (2022). Delta SARS-CoV-2 variant is entirely substituted by the omicron variant during the fifth COVID-19 wave in Attica region. *Science of The Total Environment*, 28, 856

Koelle K., Martin M. A., Antia R., Lopman B., Dean N. E., (2022). The changing epidemiology of SARS-CoV-2. *Science*, 375(6585), 1116-1121

Lavine J. S., Bjornstad O. N., Antia R., (2021). Immunological characteristics govern the transition of COVID‐19 to endemicity. *Science*, 371, 741-745

Maltezou H.C., Theodoridou K, Poland G., (2020). Influenza immunization and COVID‐19. *Vaccine*, 38, 6078‐6079.

Tian S., Hu N., Lou J., Chen K., Kang X., Xiang Z., Chen H., Wang D., Liu N., Liu D., Chen G., Zhang Y., Li D., Li J., Lian H., Niu S., Zhang L., Zhang J., (2020). Characteristics of COVID-19 infection in Beijing. *J Infect*., 80(4), 401-406

Yang Z., Zhang S., Tang Y. P., Zhang S., Xu D. Q., Yue S. J., Liu Q. L., (2022) Clinical Characteristics, Transmissibility, Pathogenicity, Susceptible Populations, and Re-infectivity of Prominent COVID-19 Variants. *Aging Dis.,* 13(2), 402-422

Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., Zhao X., Huang B., Shi W., Lu R., Niu P., Zhan F., Ma X., Wang D., Xu W., Wu G., Gao G. F., Tan W. China Novel Coronavirus Investigating and Research Team (2020). A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med,* 382, 727-733

Εισβολείς στον Θερμαϊκό κόλπο

ΚΟΥΡΚΟΥΤΜΑΝΗ Πολυξένη[1], ΜΙΧΑΛΟΥΔΗ Ευαγγελία[2]

Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Βιολογίας,
[1]kourkoutm@bio.auth.gr,[2] tholi@bio.auth.gr

Περίληψη
Η εξάπλωση των εισβολικών ειδών αποτελεί απειλή για τη βιοποικιλότητα και τη λειτουργία των θαλάσσιων οικοσυστημάτων σε παγκόσμιο επίπεδο. Η παρούσα εργασία καταγράφει την παρουσία τριών εισβολικών ειδών ζωοπλαγκτού στο εσωτερικό τμήμα του Θερμαϊκού κόλπου. Το μονοπάτι άφιξης των ειδών πιθανότατα γίνεται μέσω έρματος των πλοίων καθώς ο σταθμός δειγματοληψίας είναι δίπλα στο λιμάνι της Θεσσαλονίκης, το οποίο γνωρίζει μεγάλη εμπορική κίνηση. Η εγκαθίδρυση του εισβολικών ειδών στο Θερμαϊκό είναι πιθανό να προκαλέσει πολύπλοκες, και μέχρι τώρα απροσδιόριστες επιπτώσεις, στο τροφικό πλέγμα του κόλπου και συνεπώς χρήζει παρακολούθησης.

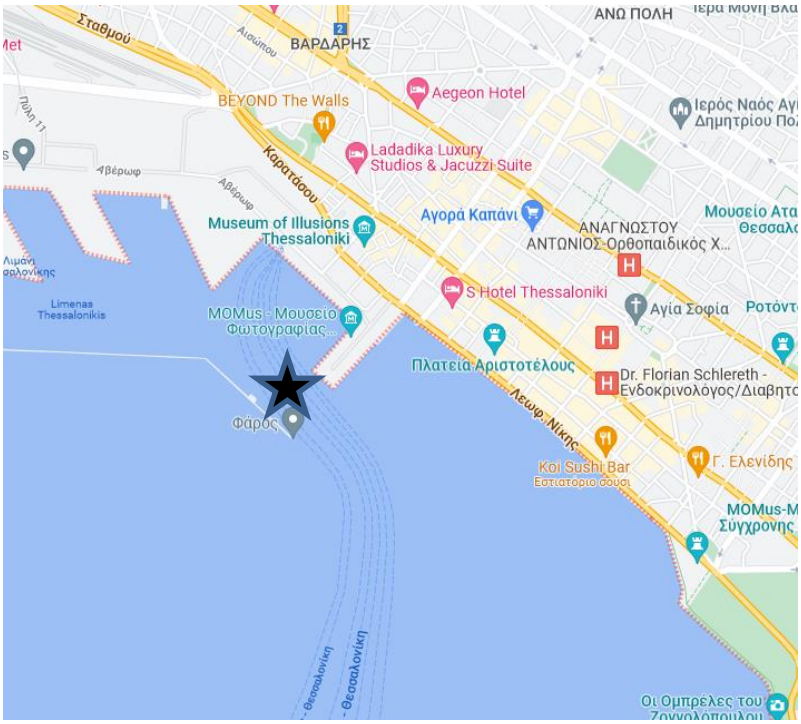
Λέξεις-Κλειδιά
Ζωοπλαγκτό, εισβολικά είδη, Θερμαϊκός κόλπος

Εισαγωγή

Η εισαγωγή εισβολικών ειδών αποτελεί ζήτημα παγκόσμιας ανησυχίας και απειλή για το θαλάσσιο περιβάλλον, επηρεάζοντας κυρίως παράκτιες περιοχές και λιμάνια καθώς η παγκοσμιοποίηση των θαλάσσιων δραστηριοτήτων που αυξήθηκε τις τελευταίες δεκαετίες εντείνει περαιτέρω αυτό το φαινόμενο (Geburzi & McCarthy 2018). Ως εισβολικά ορίζονται τα είδη που έχουν εισέλθει ακούσια (φυσική κινητικότητα των ειδών μέσω θαλάσσιων ρευμάτων) ή εκούσια (θαλάσσιες μεταφορές και υδατοκαλλιέργειες) σε περιοχές πέρα από τη φυσική τους εξάπλωση, ξεπερνώντας βιογεωγραφικούς φραγμούς (EU Regulation 1143/2014). Οι επιπτώσεις των εισβολικών ειδών περιλαμβάνουν μείωση αυτόχθονων πληθυσμών, μεταβολές στη σύνθεση των κοινοτήτων, επιπτώσεις στη δομή και λειτουργία των οικοσυστημάτων, οικονομικές απώλειες, ενώ συγκαταλέγονται και μεταξύ των σημαντικότερων αιτίων απώλειας βιοποικιλότητας (Tsamis et al. 2019).
Τα έρματα των πλοίων αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους φορείς εξάπλωσης θαλάσσιων ειδών, ιδιαίτερα για ασπόνδυλους οργανισμούς όπως το ζωοπλαγκτό, διευκολύνοντας τη διασπορά τους σε νέες περιοχές εκτός του φυσικού εύρους κατανομής τους (Bailey 2015). Ο Θερμαϊκός κόλπος, στον οποίο βρίσκεται το Λιμάνι της Θεσσαλονίκης, είναι ένα από τα κύρια λιμάνια της Μεσογείου, γεγονός που καθιστά πολύ πιθανή την άφιξη εισβολικών ειδών. Συνεπώς, η διερεύνηση της ποικιλότητας των πλαγκτικών κοινωνιών του, με σκοπό την παρακολούθηση της εξάπλωσης των εισβολικών ειδών που έχουν ήδη καταγραφεί σε παρακείμενες περιοχές στη Μεσόγειο και συμπεριλαμβάνονται ως <<αναμενόμενα>> για τα ελληνικά θαλάσσια ύδατα σύμφωνα με την λίστα των δυνητικά εισβολικών ειδών για τις χώρες της Ανατολικής και Νότιας Ευρώπης (ESENIAS), αποτελεί ερευνητική προτεραιότητα.

Υλικά και μέθοδοι

Στο πλαίσιο συστηματικής παρακολούθησης των πλαγκτικών κοινωνιών στο παραλιακό μέτωπο του Όρμου της Θεσσαλονίκης, πραγματοποιήθηκαν κατά το χρονικό διάστημα 2019-2022, δειγματοληψίες ζωοπλαγκτού με τη χρήση διχτών 50 και 250 μm. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε μικροσκόπιο (Leica, Leitz Laborlux S) και με τη χρήση κατάλληλων ταξινομικών κλειδών πραγματοποιήθηκε η αναγνώριση των οργανισμών σε επίπεδο είδους.



Εικόνα 1. Θέση του σταθμού δειγματοληψίας στο παραλιακό μέτωπο του Όρμου της Θεσσαλονίκης στον Θερμαϊκό κόλπο

Αποτελέσματα και Συζήτηση

Από την μικροσκοπική ανάλυση των δειγμάτων καταγράφηκε για πρώτη φορά τόσο στον Θερμαϊκό κόλπο όσο και στο Β. Αιγαίο η παρουσία δύο εισβολικών ειδών, του Oithona davisae και του Pseudodiaptomus marinus.

Το κυκλωποειδές κωπήποδο O. davisae, αν και ενδημικό στα παράκτια ύδατα της Ασίας, κατάφερε να φθάσει στη Μαύρη θάλασσα, πιθανόν μέσω έρματος των πλοίων, να αναπαραχθεί και να εγκαταστήσει πληθυσμό, καταλαμβάνοντας την οικολογική θέση ειδών με παρόμοιες οικολογικές απαιτήσεις (Zagami et al. 2018). Σήμερα παρουσιάζει ευρεία εξάπλωση στον Ειρηνικό και τον Ατλαντικό Ωκεανό (Zagami et al. 2018), ενώ από το 2003 καταγράφεται και στη Μεσόγειο θάλασσα (Saiz et al. 2003). Στο θαλάσσιο οικοσύστημα του Θερμαϊκού κόλπου καταγράφηκε πρώτη φορά το 2019, χωρίς να έχει πλήρως εξακριβωθεί αν η μεταφορά του εκεί οφείλεται στα έρματα των πλοίων ή έγινε ακούσια λόγω κινητικότητας των ρευμάτων από την Μαύρη Θάλασσα (Dragicevic et al. 2019).

Το καλανοειδές κωπήποδο P. marinus, μετά την πρώτη καταγραφή του στην Αδριατική θάλασσα το 2007 (De Olazabal & Tirelli 2011) αποτελεί πλέον ένα από τα πιο ευρέως διαδεδομένα εισβολικά κωπήποδα στην Ευρώπη (Tsamis et al. 2019). Η πρώτη καταγραφή του στον κόλπο της Θεσσαλονίκης πραγματοποιήθηκε το 2021 και ο πιθανός φορέας εισαγωγής του θεωρήθηκε το νερό έρματος των πλοίων καθώς ο σταθμός δειγματοληψίας βρίσκεται δίπλα στο λιμάνι της Θεσσαλονίκης. Αν και η εισαγωγή στην περιοχή έρευνας αποτελεί μάλλον πρόσφατο φαινόμενο, καθώς δεν έχει καταγραφεί σε προηγούμενες έρευνες, η παρουσία κωπηποδιτών, ενήλικων και ωοφόρων θηλυκών ενισχύει την υπόθεση του ήδη εγκαθιδρυμένου πληθυσμού (Kourkoutmani & Michaloudi 2022).

Τέλος, κατά την διάρκεια των δειγματοληψιών καταγράφηκε μακροσκοπικά στο πεδίο η παρουσία του κτενοφόρου Mnemiopsis leydi, η ταξινομική αναγνώριση του οποίου έγινε στο εργαστήριο. Το είδος έχει συμπεριληφθεί στη λίστα της IUCN ως ένας από τους 100 χειρότερους εισβολείς παγκοσμίως, και είναι γνωστό για τις πληθυσμιακές του εκρήξεις, ικανές να προκαλέσουν σημαντικές οικονομικές και περιβαλλοντικές επιπτώσεις, όπως συνέβη μετά την εισαγωγή του στη Μαύρη θάλασσα (Kideys 2002). Αν και η παρουσία στην ευρύτερη περιοχή του Θερμαϊκού κόλπου έχει καταγραφεί και σε προηγούμενες έρευνες (Siapatis et al. 2008), κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών της παρούσας έρευνας

καταγράφηκε η επίδραση της παρουσίας του στην διακύμανση της ζωοπλαγκτικής κοινωνίας του κόλπου (Κουρκουτμάνη κ.α. 2021).

Εικόνα 2. Εισβολικά είδη ζωοπλαγκτού στο Θερμαϊκό κόλπο: A) Mnemiopsis leidyi, B) Oithona davisae, C) Pseudodiaptomus marinus (Κλίμακα 50μm)

Συμπεράσματα

Η μελέτη των εισβολικών ειδών στο θαλάσσιο οικοσύστημα του Θερμαϊκού δεν θα πρέπει να σταματά στην καταγραφή της παρουσίας τους αλλά να συνοδεύεται και από τον προσδιορισμό της μακροπρόθεσμης επίδρασής τους στις πλαγκτικές κοινότητες του Θερμαϊκό κόλπου. Τα ερευνητικά ερωτήματα που προκύπτουν είναι:

- Ποιες είναι οι περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία, αλατότητα, διαθεσιμότητα τροφής) που οδηγούν στις πληθυσμιακές εκρήξεις του *M. leydi* στον Θερμαϊκό κόλπο?
- Θα καταφέρει το εισβολικό κυκλωποειδές *O. davisae* να οδηγήσει στην εξαφάνιση αυτόχθονων ειδών μέσω μηχανισμών ανταγωνισμού?
- Πόσο διερευνημένη είναι η εξάπλωση του *P. marinus* προς το εξωτερικό τμήμα του Θερμαϊκού κόλπου?

Βιβλιογραφία

Κουρκουτμάνη, Π., Ντίνου, Η-Β., Μιχαλούδη, Ε. (2021). Η μικρο- και μεσο-ζωοπλαγκτική κοινωνία του Θερμαϊκού κόλπου, κατά την παρουσία του Mnemiopsis leidyi. Πρακτικά 10ου Πανελλήνιου Συνεδρίου Οικολογίας, Διαδικτυακό συνέδριο.

Bailey, S. A. (2015). An overview of thirty years of research on ballast water as a vector for aquatic invasive species to freshwater and marine environments. Aquatic Ecosystem Health & Management, 18(3), 261-268.

De Olazabal, A., & Tirelli, V. (2011). First record of the egg-carrying calanoid copepod *Pseudodiaptomus marinus* in the Adriatic Sea. *Marine Biodiversity Records, 4*.

Dragicevic, Branko, et al. "New Mediterranean Biodiversity Records (December 2019)." (2019).

Geburzi, J. C., & McCarthy, M. L. (2018). How do they do it?–Understanding the success of marine invasive species. In *YOUMARES 8–oceans across boundaries: learning from each other* (pp. 109-124). Springer, Cham.

Kideys, A. E. (2002). The comb jelly *Mnemiopsis leidyi* in the Black Sea. In Invasive Aquatic Species of Europe. Distribution, Impacts and Management (pp. 56-61). Springer, Dordrecht.

Kourkoutmani, P., & Michaloudi, E. (2022). First record of the calanoid copepod Pseudodiaptomus marinus Sato, 1913 in the North Aegean Sea. *Thessaloniki Bay, Greece. BioInvasions Records, 11*(3), 738-746.

Saiz, E., Calbet, A., & Broglio, E. (2003). Effects of small-scale turbulence on copepods: The case of

Oithona davisae. Limnology and Oceanography, 48(3), 1304-1311.

Siapatis, A., Giannoulaki, M., Valavanis, V. D., Palialexis, A., Schismenou, E., Machias, A., & Somarakis, S. (2008). Modelling potential habitat of the invasive ctenophore *Mnemiopsis leidyi* in Aegean Sea. In Essential Fish Habitat Mapping in the Mediterranean (pp. 281-295). Springer, Dordrecht.

Tsiamis, K., Azzurro, E., Bariche, M., Çinar, M. E., Crocetta, F., De Clerck, O., ... & Cardoso, A. C. (2020). Prioritizing marine invasive alien species in the European Union through horizon scanning. Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems, 30(4), 794-845.

Zagami, G., Brugnano, C., Granata, A., Guglielmo, L., Minutoli, R., & Aloise, A. (2018). Biogeographical distribution and ecology of the planktonic copepod *Oithona davisae*: Rapid invasion in Lakes Faro and Ganzirri (Central Mediterranean Sea). Trends in Copepod Studies-Distribution, Biology and Ecology, 59-82.

Μελέτη της ρύθμισης ογκοεπαγωγικών lncRNA από μεταγραφικούς παράγοντες ελέγχου κυτταρικών γενεαλογιών στον γαστρικό καρκίνο

ΜΠΕΓΚΟΛΛΙ Ροντιόλα[1], ΧΑΤΖΗΑΓΓΕΛΟΥ Μυρτώ[1],ΛΟΥΜΑ Βαρβάρα-Ρηγίνα[1], ΓΙΑΚΟΥΝΤΗΣ Αντώνιος[1,2,‡]

1. Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βιόπολις, 41500 Λάρισα, rbegkolli@uth.gr
[1] *Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βιόπολις, 41500 Λάρισα*
[2] *Ινστιτούτο Διάγνωσης και Θεραπείας του Καρκίνου, Πανεπιστημιακό Κέντρο Καινοτομίας και Ανάπτυξης, Λάρισα*
‡ *Corresponding author:* agiakountis@uth.gr

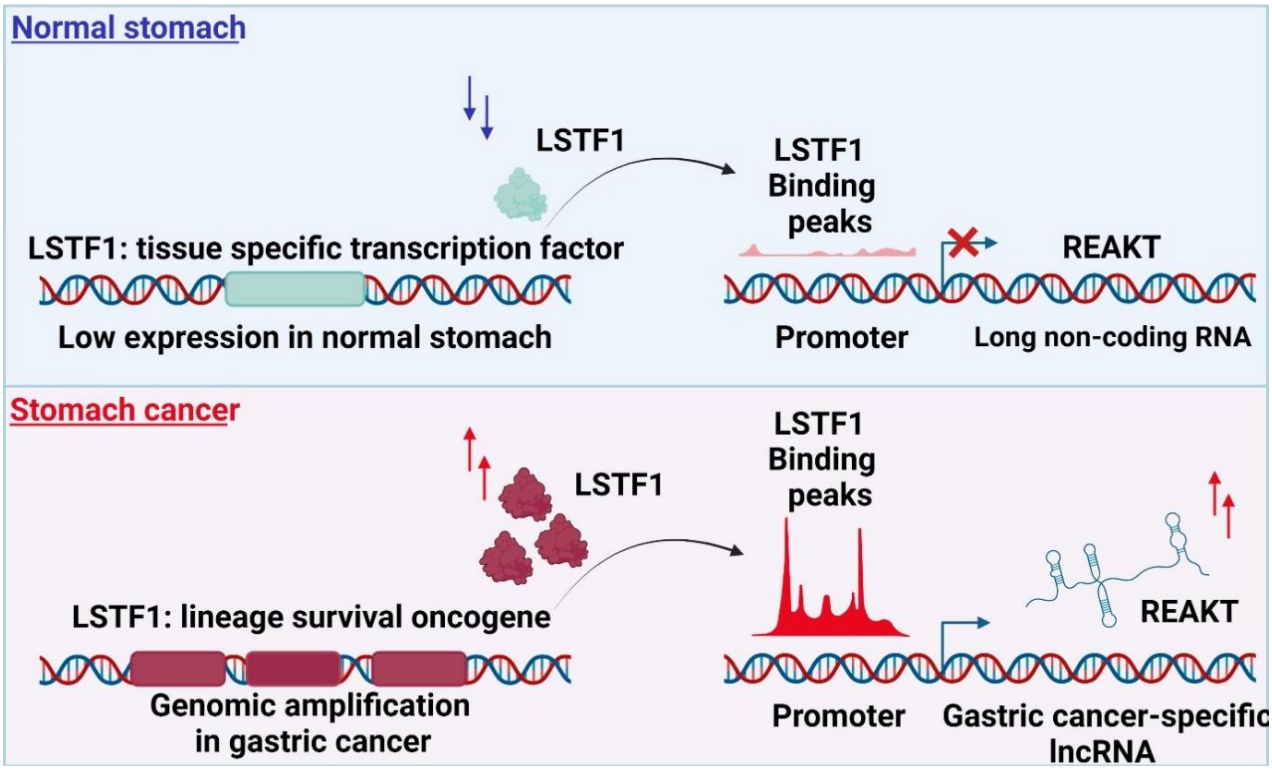
Περίληψη
Ο γαστρικός καρκίνος χαρακτηρίζεται από υψηλή θνησιμότητα και συχνότητα εμφάνισης παγκοσμίως. Η καθυστερημένη διάγνωση της νόσου, η οποία στα αρχικά στάδια είναι ασυμπτωματική, οδηγεί σε υψηλά επίπεδα θνησιμότητας. Για αυτόν τον λόγο υπάρχει ανάγκη εύρεσης βιοδεικτών υψηλής εξειδίκευσης έναντι των αρχικών σταδίων της νόσου. Στο στάδιο των προκαρκινικών αλλοιώσεων, σημαντικός είναι ο ογκοεπαγωγικός ρόλος των μεταγραφικών παραγόντων ελέγχου κυτταρικών γενεαλογιών (LS-TFs) οι οποίοι λόγω έκτοπης έκφρασης προάγουν την νεοπλασία. Λόγω του ρόλου τους σε φυσιολογικούς ιστούς οι ίδιοι παράγοντες δεν μπορούν να αποτελέσουν άμεσους θεραπευτικούς στόχους, συνεπώς ενδιαφέρον έχουν καθοδικοί, ιστοειδικοί τους στόχοι, όπως τα lncRNA. Τα lncRNA εμφανίζουν καρκινοειδική έκφραση και συχνά εξειδικεύουν τη δράση μεταγραφικών παραγόντων σε όγκους. Στόχος αυτής της εργασίας είναι η εύρεση lncRNA που να ρυθμίζονται από LS-TFs στον γαστρικό καρκίνο. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης συνδυαστικά με πειράματα μεταγραφομικής, για να βρεθούν καρκινοειδικά lncRNAs που να ρυθμίζονται άμεσα από LS-TFs.

Λέξεις-κλειδιά
Γαστρικός καρκίνος, lncRNAs, βιοδείκτες, μεταγραφικοί παράγοντες, ιστοειδικότητα

Εισαγωγή
Ο γαστρικός καρκίνος (ΓΚ) κατατάσσεται στην 3η θέση παγκοσμίως ως προς την θνησιμότητα ενώ τα υπάρχοντα διαγνωστικά εργαλεία είναι χαμηλής ευαισθησίας και εξειδίκευσης (Lordick and Janjigian 2016, Abbas, Faggian et al. 2018, Sexton, Al Hallak et al. 2020, Ye, Xu et al. 2020, Sung, Ferlay et al. 2021, Pal, Muinao et al. 2022). Συνεπώς υπάρχει ανάγκη εύρεσης εξειδικευμένων, μη επεμβατικών διαγνωστικών βιοδεικτών για έγκαιρη διάγνωση.

Η ασθένεια είναι ετερογενής σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο, με ύπαρξη κυττάρων από πολλαπλές γενεαλογίες ήδη από τα προκαρκινικά στάδια (Kim, Park et al. 2022). Ο καθορισμός και η διατήρηση της κυτταρικής ταυτότητας ρυθμίζεται από εξειδικευμένους μεταγραφικούς παράγοντες (lineage survival transcription factors, LS-TFs) που ρυθμίζουν την διαφοροποίηση των πρόδρομων κυττάρων προς συγκεκριμένες γενεαλογίες, ενώ οποιαδήποτε διαταραχή στην έκφρασή τους μπορεί να επάγει τη νεοπλασία (Francis, Guo et al. 2019, Mayran, Sochodolsky et al. 2019). Στον ΓΚ, συγκεκριμένοι LS-TFs ενισχύονται με πολλαπλά αντίγραφα DNA στο καρκινικό γονιδίωμα και είναι κρίσιμοι για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων(Chia, Deng et al. 2015). Ωστόσο, οι ίδιοι μεταγραφικοί παράγοντες δεν μπορούν να αποτελέσουν άμεσους θεραπευτικούς στόχους καθώς εμπλέκονται στη φυσιολογία πολλών διαφορετικών ιστών(Jiang, Chan et al. 2008, Huang, Guo et al. 2017, Tremblay, Sanchez-Ferras et al. 2018). Αποδέκτες της ρύθμισης των LS-TFs αποτελούν τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (long non-coding RNA, lncRNA) (Εικόνα1) που χαρακτηρίζονται από υψηλή εξειδίκευση σε ιστολογικό και κυτταρικό επίπεδο και μπορούν να αποτελέσουν καινοτόμους βιοδείκτες για την έγκαιρη διάγνωση του ΓΚ.
Τα lncRNA συμμετέχουν ενεργά στην παθοφυσιολογία του καρκίνου με πολλαπλές λειτουργίες υψηλής

εξειδίκευσης ως προς τον καρκινικό τύπο (Huarte 2015, Yan, Hu et al. 2015). Παράλληλα, έχουν ενδιαφέρον και λόγο της παρουσίας τους σε βιολογικά υγρά καθιστώντας τα ιδανικούς μη επεμβατικούς βιοδείκτες (Anfossi, Babayan et al. 2018). Η δράση των μεταγραφικών παραγόντων συχνά εξειδικεύεται ανά ιστό μέσω ρυθμιστικών αλληλεπιδράσεων με lncRNA(Wu, Liu et al. 2014, Statello, Guo et al. 2021). Στον ΓΚ τα lncRNA που έχουν χαρακτηριστεί αφορούν μετάγραφα που εκφράζονται καθολικά σε διάφορους τύπου καρκίνου, ή που εμπλέκονται και σε φυσιολογικές διεργασίες (Gao, Wang et al. 2020). Η εύρεση λοιπόν εξειδικευμένων για τον ΓΚ lncRNA βιοδεικτών θα ενισχύσει την διαγνωστική/προγνωστική εργαλειοθήκη της νόσου.



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση της ρύθμισης ενός lncRNA (REAKT) από τον LSTF1 σε δύο περιπτώσεις: στον φυσιολογικό στόμαχο και στον γαστρικό καρκίνο.

Μεθοδολογία

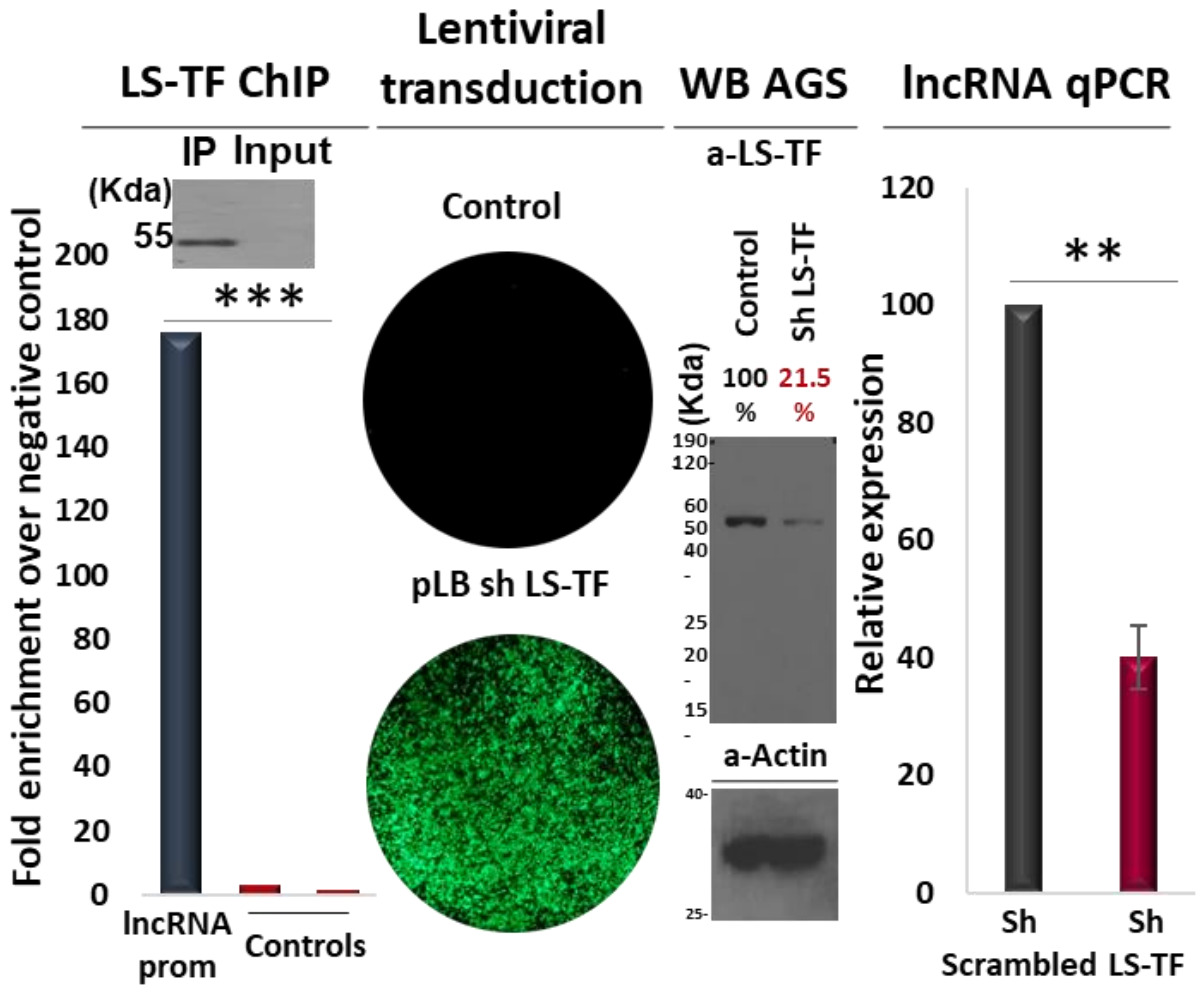
Για την εύρεση lncRNA που ρυθμίζονται από τον μεταγραφικό παράγοντα ελέγχου κυτταρικών γενεαλογιών LSTF1 ακολουθήθηκαν οι εξής μεθοδολογικές προσεγγίσεις (Εικόνα 2):

α) Εύρεση καρκινοειδικών lncRNA-στόχων που να ρυθμίζονται άμεσα από τον μεταγραφικό παράγοντα LSTF1 μέσω συνδυαστικής βιοπληροφορικής ανάλυσης δεδομένων ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP-Seq) γαστρικών κυτταρικών σειρών και RNA αλληλούχησης από βιοψίες ασθενών με ΓΚ (RNA-Seq).

β) Ανάπτυξη και εφαρμογή ενός πειραματικού συστήματος παροδικής σίγησης (RNA αποσιώπηση) του LSTF1 με χρήση λεντι-ιών σε γαστρική καρκινική σειρά. Η αποτελεσματικότητα της σίγησης του LSTF1 έγινε σε μεταγραφικό (qPCR) και πρωτεϊνικό (Western blot) επίπεδο. Ακολούθησε φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των κυττάρων απουσία του LSTF1 μέσω CFA (colony formation assay).

γ) RNA αλληλούχηση ύστερα από τη σίγηση του LSTF1 και ανάλυση οντολογίας για τα απορρυθμισμένα γονίδια. Τα διαφορικά εκφρασμένα lncRNA που προέκυψαν, συγκρίθηκαν με την λίστα του σταδίου (α) καταλήγοντας στην τελική επιλογή των lncRNA-στόχων προς μελέτη.

δ) Ανάλυση του προφίλ έκφρασης των υποψήφιων lncRNA σε βιοψίες ασθενών έναντι φυσιολογικών και παρακαρκινικών ιστών (TCGA).



Εικόνα 2. Απεικόνιση των τεχνικών μεθοδολογιών και της αποτελεσματικότητας τους.

Αποτελέσματα

α) Η ανάλυση των δεδομένων RNA αλληλούχησης από βιοψίες ασθενών με ΓΚ φανέρωσε πλήθος απορρυθμισμένων lncRNA. Η σύγκριση με δεδομένα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης φανέρωσε lncRNA με πρότυπα πρόσδεσης του LSTF1 στην περιοχή του υποκινητή τους. Έτσι από το στάδιο αυτό δημιουργήθηκε μια αρχική λίστα καρκινοειδικών lncRNA με πιθανή άμεση ρύθμιση από τον LSTF1.

β) Σημειώθηκε επιτυχής καταστολή του LSTF1 μεταγράφου και πρωτεΐνης σε ποσοστό 76,8% και 64,4% αντίστοιχα. Παράλληλα, παρατηρήθηκε μείωση του αριθμού των αποικιών των καρκινικών κυττάρων σε ποσοστό 60% έναντι του μάρτυρα.

γ) Η ανάλυση οντολογίας έδειξε πως τα στατιστικώς σημαντικά απορρυθμισμένα γονίδια εμπλέκονται κυρίως στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου αλλά και σε γαστρεντερολογικού τύπου καρκίνους. Επίσης προέκυψαν τα διαφορικά εκφρασμένα lncRNA απουσία του LSTF1, και συγκριτικά με τα αποτελέσματα της ενότητας (α) επιλέχθηκαν οι lncRNA-στόχοι προς μελέτη.

δ) Η εξέταση του προφίλ έκφρασης των lncRNA-στόχων ανέδειξε μεταξύ άλλων το lncRNA REAKT6, που παρουσιάζει εξειδικευμένη και υψηλή έκφραση σε όγκους γαστρικής προέλευσης. Επίσης ο πειραματικός έλεγχος της έκφρασης του REAKT6 απουσία του LSTF1 έδειξε 64% μείωση του lncRNA μεταγράφου.

Συζήτηση

Η παρούσα εργασία στηρίζεται σε μια συνδυαστική μεθολογική προσέγγιση που περιλαμβάνει

βιοπληροφορικές αναλύσεις και πειραματική απόδειξη. Το βιοπληροφορικό σκέλος είναι απαραίτητο για την ιεράρχηση των lncRNA-στόχων προς μελέτη, ενώ το πειραματικό έρχεται να αποδείξει τη βιολογική υπόσταση της υπόθεσης. Η επιτυχής σίγηση του LSTF1 επιβεβαιώνει την αποτελεσματικότητα του συστήματος καταστολής ενώ η μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού απουσία του LSTF1, υποδεικνύει την εμπλοκή του LSTF1 στη διαδικασία του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, γεγονός που συμφωνεί και με τις αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία για τη λειτουργία του LSTF1(Dong and Chen 2009, Suzuki, Sawaki et al. 2009, Rogerson, Ogden et al. 2020). Συνεπώς lncRNA που ρυθμίζονται από τον συγκεκριμένο μεταγραφικό παράγοντα και μεσολαβούν για την ογκογόνο δράση του στον ΓΚ, πιθανώς να συμμετέχουν στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Σε επόμενο βήμα εξετάστηκε ο φαινότυπος καταστολής του LSTF1 και σε μοριακό επίπεδο, με τα αποτελέσματα να επιβεβαιώνουν τον παρατηρούμενο φαινότυπο. Το REAKT6 εμφανίζει σημαντική υπερέκφραση ειδικά στον ΓΚ ενώ αυξημένη είναι η έκφρασή του και σε καρκίνους κοινής αιτιολογικής βάσης.

Βιβλιογραφία

Abbas, M., A. Faggian, D. N. Sintali, G. J. Khan, S. Naeem, M. Shi and C. Dingding (2018). "Current and future biomarkers in gastric cancer." Biomed Pharmacother **103**: 1688-1700.

Anfossi, S., A. Babayan, K. Pantel and G. A. Calin (2018). "Clinical utility of circulating non-coding RNAs - an update." Nat Rev Clin Oncol **15**(9): 541-563.

Chia, N. Y., N. Deng, K. Das, D. Huang, L. Hu, Y. Zhu, K. H. Lim, M. H. Lee, J. Wu, X. X. Sam, G. S. Tan, W. K. Wan, W. Yu, A. Gan, A. L. Tan, S. T. Tay, K. C. Soo, W. K. Wong, L. T. Dominguez, H. H. Ng, S. Rozen, L. K. Goh, B. T. Teh and P. Tan (2015). "Regulatory crosstalk between lineage-survival oncogenes KLF5, GATA4 and GATA6 cooperatively promotes gastric cancer development." Gut **64**(5): 707-719.

Dong, J. T. and C. Chen (2009). "Essential role of KLF5 transcription factor in cell proliferation and differentiation and its implications for human diseases." Cell Mol Life Sci **66**(16): 2691-2706.

Francis, R., H. Guo, C. Streutker, M. Ahmed, T. Yung, P. B. Dirks, H. H. He and T. H. Kim (2019). "Gastrointestinal transcription factors drive lineage-specific developmental programs in organ specification and cancer." Sci Adv **5**(12): eaax8898.

Gao, Y., J. W. Wang, J. Y. Ren, M. Guo, C. W. Guo, S. W. Ning and S. Yu (2020). "Long noncoding RNAs in gastric cancer: From molecular dissection to clinical application." World J Gastroenterol **26**(24): 3401-3412.

Huang, D., G. Guo, P. Yuan, A. Ralston, L. Sun, M. Huss, T. Mistri, L. Pinello, H. H. Ng, G. Yuan, J. Ji, J. Rossant, P. Robson and X. Han (2017). "The role of Cdx2 as a lineage specific transcriptional repressor for pluripotent network during the first developmental cell lineage segregation." Sci Rep **7**(1): 17156.

Huarte, M. (2015). "The emerging role of lncRNAs in cancer." Nat Med **21**(11): 1253-1261.

Jiang, J., Y. S. Chan, Y. H. Loh, J. Cai, G. Q. Tong, C. A. Lim, P. Robson, S. Zhong and H. H. Ng (2008). "A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells." Nat Cell Biol **10**(3): 353-360.

Kim, J., C. Park, K. H. Kim, E. H. Kim, H. Kim, J. K. Woo, J. K. Seong, K. T. Nam, Y. C. Lee and S. Y. Cho (2022). "Single-cell analysis of gastric pre-cancerous and cancer lesions reveals cell lineage diversity and intratumoral heterogeneity." NPJ Precis Oncol **6**(1): 9.

Lordick, F. and Y. Y. Janjigian (2016). "Clinical impact of tumour biology in the management of gastroesophageal cancer." Nat Rev Clin Oncol **13**(6): 348-360.

Mayran, A., K. Sochodolsky, K. Khetchoumian, J. Harris, Y. Gauthier, A. Bemmo, A. Balsalobre and J. Drouin (2019). "Pioneer and nonpioneer factor cooperation drives lineage specific chromatin opening." Nat Commun **10**(1): 3807.

Pal, M., T. Muinao, H. P. D. Boruah and N. Mahindroo (2022). "Current advances in prognostic and diagnostic biomarkers for solid cancers: Detection techniques and future challenges." Biomed Pharmacother **146**: 112488.

Rogerson, C., S. Ogden, E. Britton, O. Consortium, Y. Ang and A. D. Sharrocks (2020). "Repurposing of KLF5 activates a cell cycle signature during the progression from a precursor state to oesophageal adenocarcinoma." Elife **9**.

Sexton, R. E., M. N. Al Hallak, M. Diab and A. S. Azmi (2020). "Gastric cancer: a comprehensive review of current and future treatment strategies." Cancer Metastasis Rev **39**(4): 1179-1203.

Statello, L., C. J. Guo, L. L. Chen and M. Huarte (2021). "Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions." Nat Rev Mol Cell Biol **22**(2): 96-118.

Sung, H., J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal and F. Bray (2021). "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." CA Cancer J Clin **71**(3): 209-249.

Suzuki, T., D. Sawaki, K. Aizawa, Y. Munemasa, T. Matsumura, J. Ishida and R. Nagai (2009). "Kruppel-like factor 5 shows proliferation-specific roles in vascular remodeling, direct stimulation of cell growth, and inhibition of apoptosis." J Biol Chem **284**(14): 9549-9557.

Tremblay, M., O. Sanchez-Ferras and M. Bouchard (2018). "GATA transcription factors in development and disease." Development **145**(20).

Wu, Z., X. Liu, L. Liu, H. Deng, J. Zhang, Q. Xu, B. Cen and A. Ji (2014). "Regulation of lncRNA expression." Cell Mol Biol Lett **19**(4): 561-575.

Yan, X., Z. Hu, Y. Feng, X. Hu, J. Yuan, S. D. Zhao, Y. Zhang, L. Yang, W. Shan, Q. He, L. Fan, L. E. Kandalaft, J. L. Tanyi, C. Li, C. X. Yuan, D. Zhang, H. Yuan, K. Hua, Y. Lu, D. Katsaros, Q. Huang, K. Montone, Y. Fan, G. Coukos, J. Boyd, A. K. Sood, T. Rebbeck, G. B. Mills, C. V. Dang and L. Zhang (2015). "Comprehensive Genomic Characterization of Long Non-coding RNAs across Human Cancers." Cancer Cell **28**(4): 529-540.

Ye, D. M., G. Xu, W. Ma, Y. Li, W. Luo, Y. Xiao, Y. Liu and Z. Zhang (2020). "Significant function and research progress of biomarkers in gastric cancer." Oncol Lett **19**(1): 17-29.

Λειτουργική ανάλυση της ρύθμισης και του ρόλου μη κωδικοποιητών RNA στην καρκινογένεση του στομάχου

ΧΑΤΖΗΑΓΓΕΛΟΥ Μυρτώ[1], ΜΠΕΓΚΟΛΛΙ Ροντιόλα-Ελένη [1], ΣΤΑΜΠΟΥΛΟΓΛΟΥ Ελένη [1], ΓΙΑΚΟΥΝΤΗΣ Αντώνιος[1,2,‡]

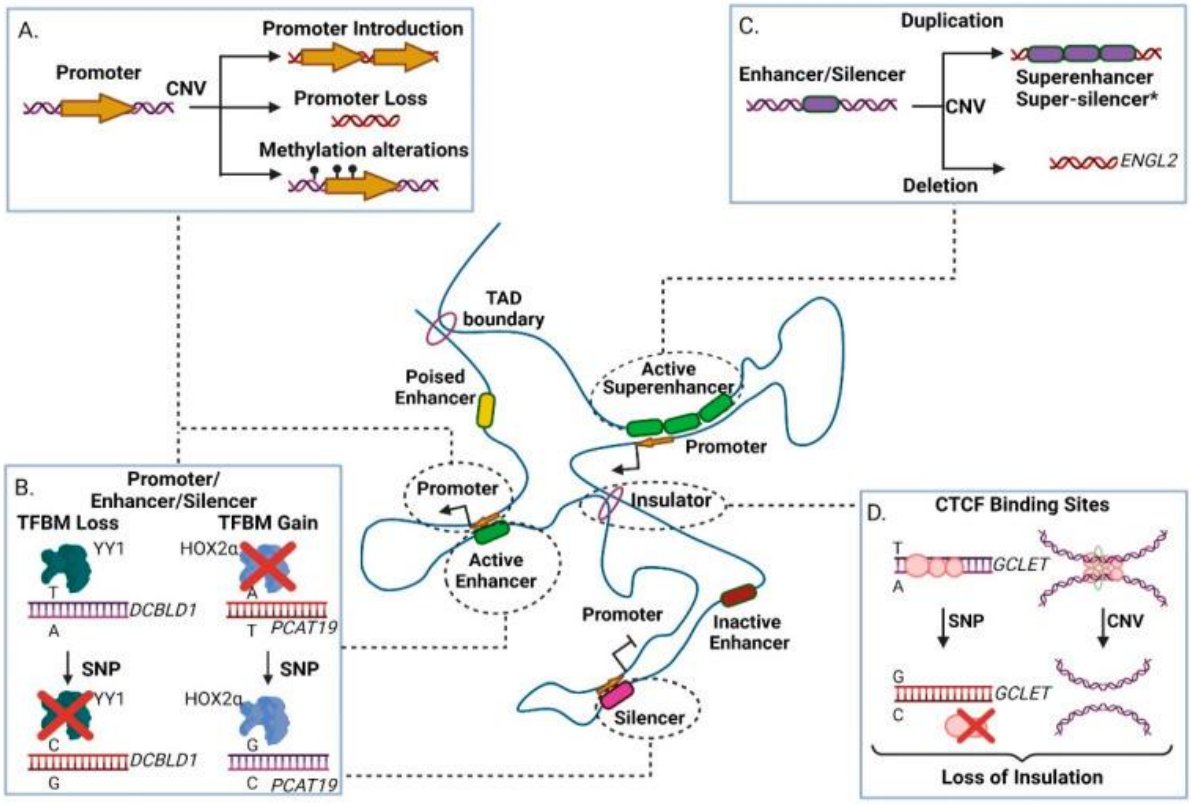
[1] *Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βιόπολις, 41500 Λάρισα*
[2] *Ινστιτούτο Διάγνωσης και Θεραπείας του Καρκίνου, Πανεπιστημιακό Κέντρο Καινοτομίας και Ανάπτυξης, Λάρισα*
‡ *Corresponding author:* agiakountis@uth.gr

Περίληψη
Ο γαστρικός καρκίνος αποτελεί την 5η σε συχνότητα νεοπλασία, ωστόσο αναδεικνύεται παράλληλα ως η 3η πιο θανατηφόρα μορφή της νόσου παγκοσμίως. Αυτό οφείλεται στην καθυστερημένη διάγνωση των ασθενών με γαστρικό καρκίνο λόγω απουσίας μοριακών, μη επεμβατικών μεθόδων που θα μπορούσαν να εφαρμοστούν ως προσυμπωματικός έλεγχος στον ευρύ πληθυσμό. Τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (ή lncRNA) εμφανίζουν εξειδικευμένες λειτουργίες και πρότυπα έκφρασης τόσο σε φυσιολογικούς ιστούς όσο και σε διάφορους τύπους καρκίνου, γεγονός που τα αναδεικνύει ως μοριακούς βιοδείκτες υψηλής διαγνωστικής και προγνωστικής αξίας. Επιπλέον η δυνατότητα ανίχνευσής τους σε βιολογικά υγρά τα καθιστά ιδανικά υποψήφια μόρια για μη επεμβατική διάγνωση. Η προτεινόμενη μελέτη στοχεύει να χαρακτηρίσει ένα υποψήφιο lncRNA, το GrACILe5 (Gastric Cancer Induced LincRNA 5) και να εντοπίσει της ρυθμιστικές αλληλουχίες που εξειδικεύουν την έκφραση του σε καρκινικά κύτταρα στομάχου προκειμένου να αξιολογηθεί στη συνέχεια η ικανότητά του ως μη επεμβατικός βιοδείκτης στη διάγνωση/πρόγνωση του καρκίνου του στομάχου.

Λέξεις-κλειδιά
Καρκίνος στομάχου, lncRNAs, μη επεμβατική διάγνωση, βιοδείκτες

Εισαγωγή
Ο καρκίνος του στομάχου κατατάσσεται ως ο 5ος πιο συχνός τύπος καρκίνου, με περισσότερο από 1 εκατομμύριο περιστατικά ετησίως. Ωστόσο ανέρχεται 3ος σε ποσοστά θνησιμότητας (Sung et al. 2021), η οποία οφείλεται στα ασυμπτωματικά αρχικά στάδια της νόσου, που οδηγούν σε καθυστερημένη διάγνωση (Rawla et al. 2019). Μέχρι σήμερα ο καρκίνος του στομάχου διαγιγνώσκεται με επεμβατικές μεθόδους συνήθως σε μεταστατικά στάδια οι οποίες δεν είναι οικονομικά βιώσιμες για τον έλεγχο της νόσου στο γενικό πληθυσμό (Lansdorp-Vogelaar, et al. 2021). Ως αποτέλεσμα, το προσδόκιμο ζωής των ασθενών με προχωρημένο γαστρικό καρκίνο είναι χαμηλό, με το ποσοστό 5ετούς επιβίωσης να κυμαίνεται μεταξύ 5 και 30% (Thrift.et al. 2020). Για τον σκοπό αυτό είναι απαραίτητη η εύρεση νέων, μη επεμβατικών, μοριακών βιοδεικτών με υψηλό προγνωστικό και διαγνωστικό δυναμικό έναντι των πρώιμων σταδίων της συγκεκριμένης νεοπλασίας. Η παρούσα μελέτη εστιάζει στον ρόλο των μακρών μη κωδικοποιητικών RNA (lncRNA) ως κατάλληλους στόχους-βιοδείκτες για τον γαστρικό καρκίνο (Li et al. 2020). Τα lncRNA αφορούν μετάγραφα μήκους ≥ 200-nt με χαμηλό ή μηδενικό κωδικοποιητικό δυναμικό (Dahariya et al. 2019), η πλειοψηφία των οποίων εμφανίζει εξειδικευμένα πρότυπα έκφρασης τόσο σε φυσιολογικούς ιστούς, όσο και σε διάφορους τύπους καρκίνου (Li et al. 2017, Zhang et al. 2019). Η ιστοειδικότητα και καρκινοειδικότητα (Trimarchi et al. 2014) των lncRNAs οφείλεται στους μηχανισμούς ρύθμισής τους και ενορχηστρώνεται μέσω ρυθμιστικών αλληλουχιών στις οποίες προσδένονται μεταγραφικοί παράγοντες (Liu et al. 2021). Ως μοριακοί βιοδείκτες που εντοπίζονται σε κυκλοφορούντα υγρά (Yu et al. 2021), τα lncRNA μπορούν είτε να ανιχνεύουν τη νόσο κατά την επαγωγή της σε αρχικά στάδια είτε να αξιοποιηθούν ως μοριακά προγνωστικά κριτήρια (Chao et al. 2021), εξοπλίζοντας μια ολοένα αυξανόμενη εργαλειοθήκη για την αντιμετώπιση του καρκίνου του στομάχου. Η απορρύθμιση των lncRNAs στον καρκίνο οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στις ρυθμιστικές τους περιοχές οι οποίες συσσωρεύουν μεταλλάξεις που προκαλούν γονιδιωματική αστάθεια, ενεργώντας ως κινητήριος δύναμη στην καρκινογένεση (Lange et al. 2021). Στην **Εικόνα 1**

απεικονίζονται διαφορετικά είδη μεταλλάξεων σε μη κωδικοποιητικές περιοχές του γονιδιώματος που ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων συμπεριλαμβανομένων και lncRNAs.



Εικόνα 1. Η επίδραση των γονιδιωματικών παραλλαγών σε μη μεταγραφόμενα γονιδιακά ρυθμιστικά στοιχεία.

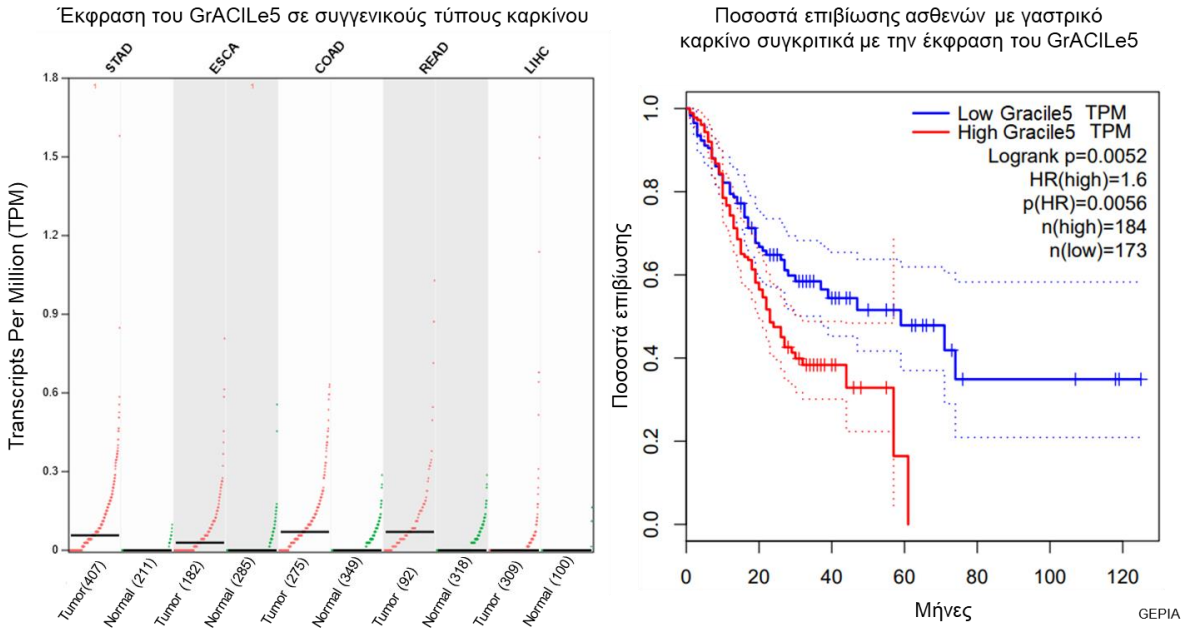
Συνεπώς η αποσαφήνιση του ρόλου των lncRNAs στον καρκίνο προϋποθέτει τον εντοπισμό των ρυθμιστικών στοιχείων που ελέγχουν την έκφρασή τους και τον χαρακτηρισμό πιθανών μεταλλάξεων που είναι υπεύθυνες για την καρκινοειδική τους έκφραση.

Μέθοδοι

Μεταγραφομική ανάλυση δεδομένων TCGA και gTEX και συσχέτιση τους με κλινικά δεδομένα ασθενών και δεδομένα ανοσοκατακρίμνησης χρωματίνης με σκοπό **i)** την εύρεση lncRNA με καρκινοειδική έκφραση στον γαστρικό καρκίνο **ii)** την συσχέτιση της έκφρασης τους με την κλινική εικόνα του ασθενούς για εκτίμηση του προγνωστικού τους δυναμικού **iii)** την εύρεση πιθανών *cis* και *trans* ρυθμιστικών στοιχείων.

Αποτελέσματα

Έπειτα από ανάλυση δεδομένων μεταγραφομικής από βιοψίες ασθενών με καρκίνο του στομάχου έναντι παρακαρκινικού και φυσιολογικού ιστού, παρατηρούμε υπερέκφραση του lncRNA GrACILe5 σε καρκινική βιοψία έναντι του φυσιολογικού ιστού σε πέντε διαφορετικούς τύπους καρκίνου (**Εικόνα 2**). Από τα αποτελέσματα αυτά συμπεραίνουμε πως το GrACILe5 εμφανίζει εξειδικευμένα πρότυπα έκφρασης σε γαστρεντερικού τύπου καρκίνους (π.χ. καρκίνος στομάχου, οισοφάγου και παχύ εντέρου) ενώ εμφανίζει σχεδόν μηδενική έκφραση σε μη συγγενικούς καρκίνους (π.χ. καρκίνος του ήπατος). Αυτό καθιστά το lncRNA GrACILe5 ως υποψήφιο μόριο-βιοδείκτη για εξειδικευμένη διάγνωση του καρκίνου του στομάχου όσο και για συγγενικού τύπου καρκίνους. Ακόμα γίνεται εμφανής η συσχέτιση της έκφρασης του GrACILe5 σε γαστρικούς όγκους με τα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών, αναδεικνύοντας το προγνωστικό δυναμικό του συγκεκριμένου lncRNA στον γαστρικό καρκίνο.



Εικόνα 2. Αριστερά: Έκφραση του γονιδίου GrACILe5 σε δείγματα βιοψιών γαστρεντερικού καρκίνου έναντι παρακαρκινικού και φυσιολογικού ιστού. STAD: Stomach adenocarcinoma, ESCA: Esophageal carcinoma, COAD: Colon adenocarcinoma, READ: Rectum adenocarcinoma, LIHC: Liver hepatocellular carcinoma. Δεξιά: Ποσοστά επιβίωσης ασθενών με γαστρικό αδενοκαρκίνωμα (STAD) συγκριτικά με την έκφραση του GrACILe5.

Συμπεράσματα

Η μεταγραφομική ανάλυση βιοψιών από γαστρικούς καρκίνους επιδεικνύει καρκινοειδικά πρότυπα έκφρασης για το lncRNA GrACILe5 καθιστώντας το υποψήφιο μόριο για τη διάγνωση και την πρόγνωση του καρκίνου του στομάχου. Η αποσαφήνιση της εξειδικευμένης έκφρασής του στον καρκίνο προϋποθέτει την ανάλυση των ρυθμιστικών στοιχείων που εντοπίζονται στον γενετικό του τόπο για τα οποία υπάρχουν ενδείξεις μεταγραφικής ενεργότητας σε γαστρικούς όγκους (επιγενετικές τροποποιήσεις, πρόσδεση καρκινοειδικών μεταγραφικών παραγόντων). Για τη μελέτη τέτοιων ρυθμιστικών αλληλουχιών και επιβεβαίωση του ρυθμιστικού τους δυναμικού, μπορούν να αξιοποιηθούν μεθοδολογίες αξιολόγησης μεταγραφικής ενεργότητας όπως δοκιμασίες χημειοφωταύγειας που περιλαμβάνουν χρήση γονιδίων αναφοράς (luciferase assays), καθώς και μέθοδοι ανίχνευσης των επιπέδων μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου ενδιαφέροντος, έπειτα από ενδογενή ενεργοποίηση των επιλεγμένων ρυθμιστικών στοιχείων σε ζωντανά κύτταρα (CRISPR activation). Συνολικά οι πειραματικές αυτές προσεγγίσεις θα συμβάλλουν στην επιβεβαίωση της ενεργότητας των επιλεγμένων ρυθμιστικών στοιχείων σε καρκινικά κύτταρα στομάχου και θα αποκαλύψουν πιθανή συμμετοχή αυτών στη ρύθμιση τόσο του lncRNA GrACILe5 όσο και καθοδικών γονιδίων στόχων αυτού στον καρκίνο του στομάχου.

Βιβλιογραφία

Chao X., et al., (2021). Comprehensive analysis of lncRNAs as biomarkers for diagnosis, prognosis, and treatment response in clear cell renal cell carcinoma. *Mol Ther Oncolytics*, 22:209-218.

Dahariya S., et al., (2019). Long non-coding RNA: Classification, biogenesis and functions in blood cells. *Mol Immunol*, 112: p. 82-92.

Lange M., et al., (2021). Non-Coding Variants in Cancer: Mechanistic Insights and Clinical Potential for Personalized Medicine. *Noncoding RNA*, 7(3):47.

Lansdorp-Vogelaar I., et al., (2021). Cost-effectiveness of prevention and early detection of gastric cancer in Western countries. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 50-51: p. 101735.

Li S., et al., (2017). Exploring functions of long noncoding RNAs across multiple cancers through coexpression network. *Sci Rep*, 7(1): p. 754.

Li Y., Jiang, T., Zhou, W. et al., (2020). Pan-cancer characterization of immune-related lncRNAs identifies potential oncogenic biomarkers. *Nat Commun*, 11, 1000.

Liu Y., et al., (2021). Long non-coding RNAs: Biogenesis, functions, and clinical significance in gastric cancer. *Mol Ther Oncolytics*, 23: p. 458-476

Rawla P. and A. Barsouk, (2019). Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention. *Prz Gastroenterol*, 14(1): p. 26-38.

Sung H., et al., (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71(3): p. 209-249.

Thrift A.P. and H.B. El-Serag, (2020). Burden of Gastric Cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 18(3): p.534-542.

Trimarchi T. et al., (2014). Genome-wide mapping and characterization of Notch-regulated long noncoding RNAs in acute leukemia. *Cell*, 158(3):593-606.

Yu Z., et al., (2021). Aberrant Non-Coding RNA Expressed in Gastric Cancer and Its Diagnostic Value. *Front Oncol*, 11: p. 606764.

Zhang X., et al., (2019). Mechanisms and Functions of Long Non-Coding RNAs at Multiple Regulatory Levels. *Int J Mol Sci*, 20(22).

In vitro αξιολόγηση του προβιοτικού δυναμικού μικροβιακών απομονώσεων από ζυμούμενα τρόφιμα

Νικολέτα ΝΤΙΑΝΤΙΑΣΗ, Αλεξάνδρα ΛΙΑΝΟΥ

Τομέας Γενετικής, Βιολογίας Κυττάρου και Ανάπτυξης, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα, 26504, ntiantiasi.nikol@gmail.com,alianou@upatras.gr

Περίληψη

Τα ζυμούμενα τρόφιμα αποτελούν πηγή προβιοτικών μικροοργανισμών, που ενισχύουν την υγεία ανθρώπων και ζώων. Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η απομόνωση μικροοργανισμών από ζυμούμενα τρόφιμα και η αξιολόγηση του προβιοτικού δυναμικού τους. Μικροβιακές απομονώσεις πραγματοποιήθηκαν από κεφίρ γάλακτος και επιτραπέζιες ελιές, καθώς επίσης και από απόβλητο ελαιοτριβείου, δεδομένης της αναμενόμενης συσχέτισής του με την αυτόχθονη μικροχλωρίδα του ελαιόκαρπου. Με βάση διακριτά μακροσκοπικά χαρακτηριστικά των αποικιών σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα πραγματοποιήθηκαν οκτώ, πέντε και δύο μικροβιακές απομονώσεις από κεφίρ, επιτραπέζιες ελιές και απόβλητο ελαιοτριβείου, αντίστοιχα. Εκ των απομονώσεων, 14 ταυτοποιήθηκαν φαινοτυπικά ως δυνητικά οξυγαλακτικά βακτήρια και δύο ως ζυμομύκητες. Απομονώσεις με εύρωστη ανάπτυξη σε θρεπτικούς ζωμούς καλλιέργειας, αξιολογήθηκαν για το προβιοτικό τους δυναμικό μέσω των ακόλουθων *in vitro* δοκιμών: αντοχή σε χαμηλό pH, ικανότητα αυτοσυσσωματωμάτωσης, σχηματισμός βιοϋμενίου, αντιοξειδωτική δράση και αξιολόγηση ασφάλειας. Συναξιολογώντας τα αποτελέσματα, πέντε απομονώσεις οξυγαλακτικών βακτηρίων και δύο απομονώσεις ζυμομύκητων παρουσιάζουν επιθυμητά *in vitro* προβιοτικά χαρακτηριστικά.

Λέξεις- κλειδιά: προβιοτικά, οξυγαλακτικά βακτήρια, ζυμομύκητες, ζυμούμενα τρόφιμα

Εισαγωγή

Η ζύμωση αποτελεί παραδοσιακή μέθοδο για τη συντήρηση και την αύξηση της διάρκειας ζωής ευαλλοίωτων τροφίμων όπως φρούτα, λαχανικά, κρέας, ψάρι και γαλακτοκομικά προϊόντα. Ως ζυμούμενα τρόφιμα ορίζονται εκείνα που παράγονται μέσω επιθυμητής μικροβιακής ανάπτυξης και ενζυματικών μετατροπών των συστατικών τους (Marco et al. 2021). Λόγω της θετικής τους επίδρασης στην υγεία των ανθρώπων (Xiang et al. 2019), τα ζυμούμενα τρόφιμα έχουν τραβήξει το ενδιαφέρον τόσο των επιστημόνων όσο και των καταναλωτών. Η διάσταση των ζυμούμενων τροφίμων ως «λειτουργικά τρόφιμα» έχει εν πολλοίς αποδοθεί στη σημαντική παρουσία σε αυτά των προβιοτικών (Bonatsou et al. 2018). Ως προβιοτικά ορίζονται οι μικροοργανισμοί οι οποίοι όταν βρεθούν σε επαρκή συγκέντρωση, συμβάλλουν ωφέλιμα στην υγεία του ξενιστή (FAO/WHO 2002). Πράγματι, τα προβιοτικά επιδεικνύουν σημαντική αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή και αντιφλεγμονώδη δράση, με σημαντικά οφέλη για το γαστρεντερικό, ουροποιητικό και αναπνευστικό σύστημα (Ayivi et al. 2020, Cuvas-Limon et al. 2020, El Sheikha 2018) . Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η απομόνωση μικροοργανισμών από ζυμούμενα τρόφιμα, τόσο ζωικής όσο και φυτικής προέλευσης, και η αξιολόγηση του προβιοτικού δυναμικού τους.

Υλικά και Μέθοδοι

Δείγματα

Απομονώσεις μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκαν από: (i) τέσσερα προϊόντα κεφίρ αγελαδινού γάλακτος, και (ii) δύο παρτίδες επιτραπέζιων φυσικών μαύρων ελιών ποικιλίας Καλαμών, ενώ επίσης έγιναν απομονώσεις από απόβλητο ελαιοτριβείου, δεδομένης της αναμενόμενης συσχέτισής του με την αυτόχθονη μικροχλωρίδα του ελαιόκαρπου.

Απομόνωση μικροοργανισμών, χαρακτηρισμός και συνθήκες καλλιέργειας

Η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων (κεφίρ, σάρκα ελαιόκαρπου και άλμη, καθώς και απόβλητο ελαιοτριβείου) πραγματοποιήθηκε μετά από κατάλληλη δειγματοληψία, ομογενοποίηση, διενέργεια

διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων και επίστρωση/ενσωμάτωση κατάλληλων αραιώσεων στα ακόλουθα θρεπτικά υλικά: PCA, PDA με 0.05 g/L χλωραμφαινικόλη, και MRS agar. Επιπλέον, η υγιεινή των δειγμάτων ελέγχθηκε σε VRBG agar.

Οι διακριτές μορφολογικά αποικίες που αναπτύχθηκαν στα παραπάνω υποστρώματα, απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν σε διάφορους θρεπτικούς ζωμούς και σε διαφορετικές θερμοκρασίες, ώστε να προσδιοριστούν οι ευνοϊκότερες συνθήκες ανάπτυξης. Επίσης, χαρακτηρίστηκαν με βάση τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τους (μικροσκοπική παρατήρηση, χρώση Gram, δοκιμές καταλάσης και οξειδάσης). Απομονώσεις με εύρωστη ανάπτυξη αξιολογήθηκαν για το προβιοτικό τους δυναμικό μέσω των παρακάτω *in vitro* δοκιμών. Στις δοκιμές αυτές συμπεριλήφθηκε και *στέλεχος Saccharomyces cerevisiae* (AXAZ-1) από τη συλλογή του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας (Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών).

Αντοχή σε χαμηλό pH

Για την αξιολόγηση της αντοχής των μικροβιακών απομονώσεων σε συνθήκες χαμηλού pH, ακολουθήθηκαν διαδικασίες οι οποίες έχουν περιγραφεί προηγουμένως (Argyri et al. 2013) με ορισμένες τροποποιήσεις. Καλλιέργειες των απομονώσεων φυγοκεντρίθηκαν, εκπλύθηκαν μέσω εκ νέου φυγοκέντρισης σε PBS, και τα συλλεχθέντα κύτταρα επανασυστάθηκαν σε PBS (pH=2.5) και επωάστηκαν στους 37°C για 3 h με ανακίνηση. Στις 0 και 3 h πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες και προσδιορισμός των επιβιωσάντων μικροβιακών πληθυσμών σε κατάλληλα θρεπτικά υλικά.

Αυτοσυσσωμάτωση

Ο προσδιορισμός της ικανότητας αυτοσυσσωμάτωσης βασίστηκε σε προηγουμένως περιεγραμμένα πρωτόκολλα (Bonatsou et al. 2018, Solieri et al. 2014). Συνοπτικά, καλλιέργειες των απομονώσεων φυγοκεντρίθηκαν, εκπλύθηκαν και επανασυστάθηκαν σε PBS. Μετά από ανάδευση με vortex για 10 s, τα κυτταρικά εναιωρήματα επωάστηκαν στους 37°C για 24 h. Στις 0, 2, 4 και 24 h λήφθηκε 1 ml από το υπερκείμενο κάθε εναιωρήματος και μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα (OD) στα 600 nm. Το ποσοστό αυτοσυσσωμάτωσης προσδιορίστηκε μέσω της παρακάτω εξίσωσης:

$$Autoaggregation\ (\%) = [1 - \frac{A_t}{A_0}] \times 100$$

όπου A_t και A_0 η μέτρηση OD σε χρόνο t και 0, αντίστοιχα.

Σχηματισμός βιοϋμενίου

Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε στηρίχθηκε σε προηγουμένως περιεγραμμένα πρωτόκολλα (Lianou and Koutsoumanis, 2012, Pachla et al. 2021), και περιλάμβανε τη χρήση μικροσυστοιχιών πολυστυρενίου και χρώσης κρυσταλλικού ιώδους. Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου στηρίχθηκε στη μέτρηση της OD (595 nm) αιθανόλης στην οποία είχε επαναδιαλυτοποιηθεί το δεσμευμένο σε βιοϋμένιο κρυσταλλικό ιώδες, και υπολογίστηκε ως η διαφορά της μέσης τιμής της OD του μάρτυρα (φρεάτια χωρίς προσθήκη μικροβιακής καλλιέργειας) από την τιμή στο κάθε φρεάτιο το οποίο περιλάμβανε μικροβιακή απομόνωση (ΔOD_{595nm}).

Αντιοξειδωτική δράση

Η δοκιμή που εφαρμόστηκε αποτελεί παραλλαγή πρωτοκόλλων των Cho et al. (2018) και Gil-Rodriguez et al. (2015). Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου, και στηρίχτηκε στη χρήση του αντιδραστηρίου DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, 0,2 mM σε μεθανόλη) και σε φωτομέτρηση στα 495 nm. Το ποσοστό υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση:

$$Scavenging\ activity\ (\%) = [1 - \frac{A_{sample}}{A_{blank}}] \times 100$$

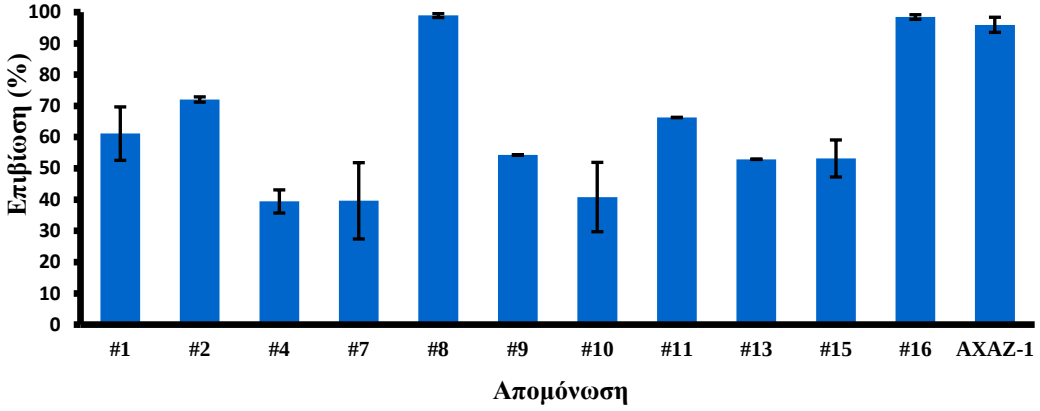
όπου A_{sample} η OD του DPPH με το δείγμα, και A_{blank} η OD του DPPH με διάλυμα Ringer. Μετρήσεις έγιναν και σε φρεάτια μόνο με DPPH ή ασκορβικό οξύ (θετικός μάρτυρας).

Αιμολυτική δράση

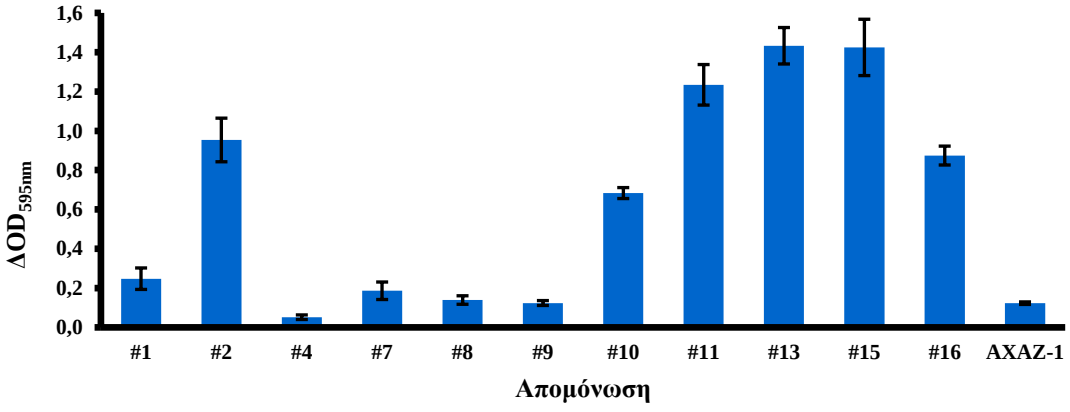
Η αξιολόγηση της αιμολυτικής δράσης των μικροβιακών απομονώσεων πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία Columbia agar με προσθήκη αίματος προβάτου (5% v/v). Τα τρυβλία εμβολιάστηκαν, επωάστηκαν (28°C, 48-72 h), και παρατηρήθηκαν για σχηματισμό πρασινωπών ζωνών (α-αιμόλυση), διαυγών ζωνών (β-αιμόλυση) ή απουσία ζωνών (γ-αιμόλυση: απουσία αιμόλυσης).

Αποτελέσματα

Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν 16 μικροβιακές απομονώσεις: οκτώ από κεφίρ, έξι από ελιές και δύο από απόβλητο ελαιοτριβείου. Από το σύνολο των απομονώσεων, 14 απομονώσεις χαρακτηρίστηκαν ως δυνητικά οξυγαλακτικά βακτήρια και δύο ως ζύμες, ενώ εύρωστη ανάπτυξη επιδείχθηκε από 11 απομονώσεις οι οποίες και στη συνέχεια αξιολογήθηκαν ως το προβιοτικό τους δυναμικό. Το ποσοστό επιβίωσης ύστερα από έκθεση σε όξινο περιβάλλον (pH 2,5) ήταν άνω του 60% για πέντε απομονώσεις, οι δύο εκ των οποίων (#8, #16) ήταν ζύμες (Εικόνα 1). Σημαντική ικανότητα αυτοσυσσωμάτωσης σημειώθηκε για οκτώ απομονώσεις (#1, #2, #4, #8, #11, #13, #15 και #16). Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου παρατηρήθηκε να είναι υψηλή για έξι μικροβιακές απομονώσεις (Εικόνα 2). Αναφορικά με την αντιοξειδωτική δράση, το υψηλότερο ποσοστό αναγωγής του DPPH (38,6%) καταγράφηκε για τη απομόνωση #16, ενώ σε μικρότερο βαθμό αντιοξειδωτική δράση επίσης καταγράφηκε για τις απομονώσεις #1, #2, #8, #10, #13 και #15. Τέλος, όλες οι απομονώσεις κρίθηκαν ασφαλείς ως προς την αιμολυτική τους δράση, εκτός ενδεχομένως της απομόνωσης #1 για την οποία καταγράφηκε α-αιμόλυση.



Εικόνα 1. Ποσοστό επιβίωσης μικροβιακού πληθυσμού (pH= 2,5/3 h)



Εικόνα 2. Σχηματισμός βιοϋμενίου

Συμπεράσματα

Συναξιολογώντας το σύνολο των πειραματικών δεδομένων, οι μικροβιακές απομονώσεις οι οποίες διαφαίνονται να επιδεικνύουν το σημαντικότερο προβιοτικό δυναμικό είναι οι #10, #11, #13, #15 και #16, ενώ υποσχόμενες είναι και οι απομονώσεις #2 και #8. Οι απομονώσεις αυτές θα είχε αξία να συμπεριληφθούν σε περαιτέρω έρευνα, με τελικό στόχο τη χρήση τους σε νέα λειτουργικά τρόφιμα ή/και συμπληρώματα διατροφής.

Βιβλιογραφία

Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K. A. G., Tsakalidou, E., Nychas, G. -J. E., Panagou, E. Z., & Tassou, C. C. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. *Food Microbiology*, *33*, 282–291.

Ayivi, R. D., Gyawali, R., Krastanov, A., Aljaloud, S. O., Worku, M., Tahergorabi, R., Silva, R. C. da, & Ibrahim, S. A. (2020). Lactic acid bacteria: Food safety and human health applications. *Dairy*, *1*, 202–232.

Bonatsou, S., Karamouza, M., Zoumpopoulou, G., Mavrogonatou, E., Kletsas, D., Papadimitriou, K., Tsakalidou, E., Nychas, G. -J. E., & Panagou, E. (2018). Evaluating the probiotic potential and technological characteristics of yeasts implicated in cv. Kalamata natural black olive fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, *271*, 48–59.

Cho, Y. J., Kim, D. H., Jeong, D., Seo, K. H., Jeong, H. S., Lee, H. G., & Kim, H. (2018). Characterization of yeasts isolated from kefir as a probiotic and its synergic interaction with the wine byproduct grape seed flour/extract. *LWT*, *90*, 535–539.

Cuvas-Limon, R. B., Nobre, C., Cruz, M., Rodriguez-Jasso, R. M., Ruíz, H. A., Loredo Treviño, A., Texeira, J. A., & Belmares, R. (2020). Spontaneously fermented traditional beverages as a source of bioactive compounds: an overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *61*, 2984–3006.

El Sheikha, A. F., Levin, R. E., & Xu, J. (2018). *Molecular techniques in food biology: safety, biotechnology, authenticity and traceability*. USA: John Wiley & Sons Ltd.

FAO/WHO, 2002. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002.

Gil-Rodríguez, A. M., Carrascosa, A. V., & Requena, T. (2015). Yeasts in foods and beverages: *In vitro* characterisation of probiotic traits. *LWT*, *64*, 1156–1162.

Lianou, A., & Koutsoumanis, K. P. (2012). Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, *160*, 171–178.

Marco, M. L., Sanders, M. E., Gänzle, M., Arrieta, M. C., Cotter, P. D., de Vuyst, L., Hill, C., Holzapfel, W., Lebeer, S., Merenstein, D., Reid, G., Wolfe, B. E., & Hutkins, R. (2021). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 18, Issue 3, pp. 196–208). Nature Research.

Pachla, A., Ptaszyńska, A. A., Wicha, M., Kunat, M., Wydrych, J., Oleńska, E., & Małek, W. (2021). Insight into probiotic properties of lactic acid bacterial endosymbionts of *Apis mellifera* L. derived from the Polish apiary. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *28*, 1890–1899.

Solieri, L., Bianchi, A., Mottolese, G., Lemmetti, F., & Giudici, P. (2014). Tailoring the probiotic potential of non-starter *Lactobacillus* strains from ripened Parmigiano Reggiano cheese by *in vitro* screening and principal component analysis. *Food Microbiology*, *38*, 240–249.

Xiang, H., Sun-Waterhouse, D., Waterhouse, G. I. N., Cui, C., & Ruan, Z. (2019). Fermentation-enabled wellness foods: A fresh perspective. *Food Science and Human Wellness*, *8*, 203–243.

Εποχική κατανομή κουνουπιών Anopheles sp., Culex sp. και Ochlerotatus sp. στη Δυτική Ελλάδα και συσχέτισή της με κλιματολογικά δεδομένα

ΓΑΤΣΟΜΑΛΟΥ Ουρανία[1], ΛΙΑΚΟΣ Δημήτρης[1], ΑΛΒΑΝΟΥ Β. Μαρία[1], ΓΙΑΝΤΣΗΣ Α. Ιωάννης[1]

[1]*Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Μακεδονίας,* ouraniagats@gmail.com, apolyman@yahoo.gr, mariaalvanou7@gmail.com, igiantsis@uowm.gr

Περίληψη

Η εκτίμηση της κατανομής των ειδών των κουνουπιών και της εποχικής διακύμανσης του μεγέθους των πληθυσμών τους αποτελούν απαραίτητα στοιχεία για το σχεδιασμό στρατηγικών καταπολέμησής τους. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η συγκέντρωση και ομαδοποίηση στοιχείων κατανομής ειδών κουνουπιών που απαντώνται στις Περιφερειακές Ενότητες (ΠΕ) Άρτας και Αιτωλοκαρνανίας, με απωτερο στόχο την ανάδειξη του προβλήματος της παρουσίας του εντόμου υπό το πρίσμα τόσο της δημόσιας υγείας, όσο και της όχλησης. Πραγματοποιήθηκαν συλλογές κουνουπιών από οκτώ επιλεγμένα σημεία με χρήση της παγίδας MOSQUITO - TRIPLE TRAP (ΠΡΟΤΕΚΤΑ ΑΕ), τα οποία ταυτοποιήθηκαν μορφολογικά ως *Anopheles hyrcanus, Culex pipiens, Culex tritaeniorhynhus* και *Ochlerotatus caspius*. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αύξηση των πληθυσμών τους, κατά τους καλοκαιρινούς μήνες και τις αρχές του Σεπτεμβρίου. Συμπερασματικά, ενώ τα είδη που θεωρούνται κύριοι διαβιβαστές επικίνδυνων ασθενειών δεν ανιχνεύτηκαν, το πρόβλημα της όχλησης είναι ιδιαίτερα έντονο με δυσμενείς επίσης επιδρασεις στον τουρισμό.

Λέξεις Κλειδιά

Anopheles, *Culex*, *Ochlerotatus*, Αιτωλοακαρνανία, Άρτα

Εισαγωγή

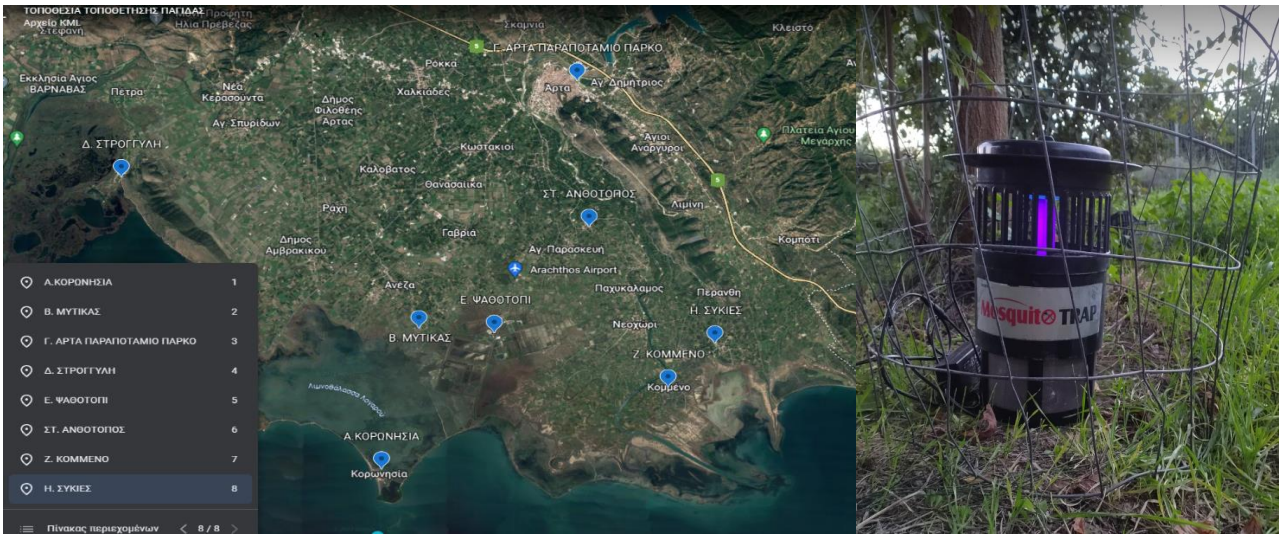
Τα κουνούπια, ως διαβιβαστές επικίνδυνων ασθενειών παρουσιάζουν μεγάλη σημασία για τη δημόσια υγεία (Berenger & Parola 2017). Επίσης, οι αυξημένοι πληθυσμοί τους αποτελούν εμπόδια στην ανάπτυξη και διεξαγωγή υπαίθριων δραστηριοτήτων εργασίας και αναψυχής προκαλώντας δυσφορία και όχληση σε μόνιμους κατοίκους και επισκέπτες, με τελική έκβαση την υποβάθμιση των περιοχών που πλήττονται (Halasa et al. 2014).

Πολλές περιοχές της δυτικής Ελλάδας χαρακτηρίζονται από έντονη παρουσία κουνουπιών, κυρίως λόγω εδαφοκλιματικών συνθηκών. Επί αρκετά χρόνια εφαρμόζονται προγράμματα καταπολέμησης κουνουπιών υπό την αιγίδα των αρμόδιων υπηρεσιών των ΠΕ και των δήμων σε περιοχές με μεγάλο πρόβλημα. Ωστόσο, τα καταγεγραμμένα στοιχεία για το πλήθος και την εποχικότητα των εντόμων αυτών σε ορισμένες περιοχές δεν είναι επαρκή, ενώ απαιτούν συχνή ανανέωση.

Επομένως, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να συγκεντρώσει και να ομαδοποιήσει τα στοιχεία για τα είδη των κουνουπιών που απαντώνται στις ΠΕ Άρτας και Αιτωλοακαρνανίας, καθώς και τη μηνιαία ποσοτική γεωγραφική κατανομή τους, έτσι ώστε να αναδειχτεί ο βαθμός στον οποίο μπορεί να αποτελεί παράγοντα τόσο κινδύνου για τη δημόσια υγεία, όσο και σημαντικής όχλησης.

Μέθοδοι

Τοποθετήθηκαν ειδικές παγίδες MOSQUITO - TRIPLE TRAP, της εταιρίας ΠΡΟΤΕΚΤΑ Α.Ε. (Εικόνα 1) σε οκτώ γεωγραφικά σημεία (Εικόνα 1) κατά την περίοδο Μαΐου-Οκτωβρίου 2021, κάθε 1^{η} και 15^{η} του μήνα.



Εικόνα 1. Χάρτης των σημείων δειγματοληψίας (αριστερά) και τοποθέτηση παγίδας συλλογής κουνουπιών MOSQUITO - TRIPLE TRAP (δεξιά)

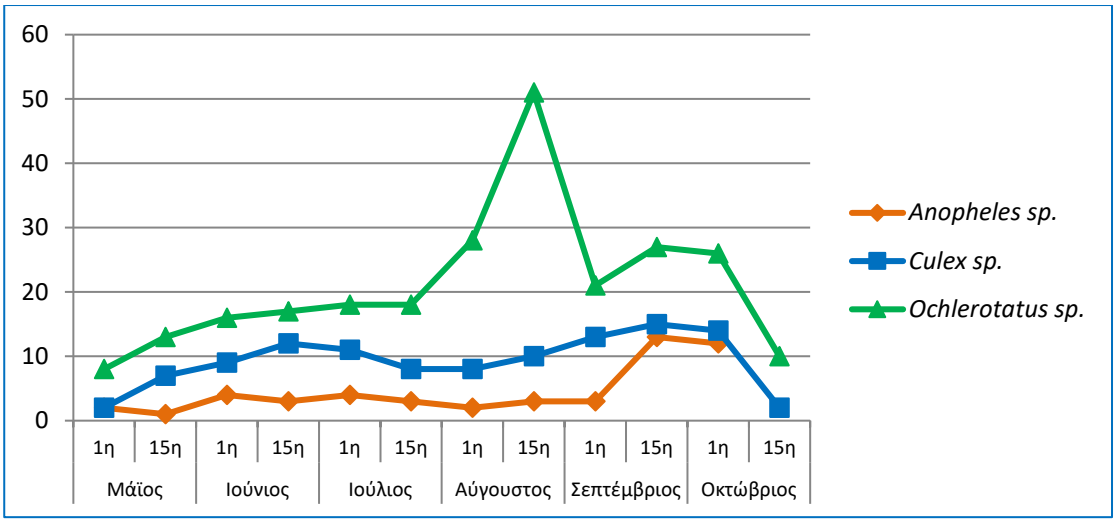
Η κάθε παγίδα τοποθετήθηκε σε ύψος 1.5m από το έδαφος, σε μέρος με σχετικά υψηλή υγρασία, καλή κάλυψη (κοντά σε δέντρα/ θάμνους) και σκίαση κατά την ανατολή, για να μην αλλοιώνεται-αφυδατώνεται το δείγμα (Εικόνα 1). Η απόσταση των παγίδων από τα κτίρια ανέρχονταν σε τουλάχιστον 10 μέτρα ενώ επιλέχθηκαν σημεία όπου δεν υπήρχαν ισχυροί άνεμοι/ρεύματα. Επιπλέον, στις θέσεις όπου τοποθετήθηκαν οι παγίδες δεν υπήρχαν ζώα και βρίσκονταν μακριά από άλλες πηγές φωτός, καυσαερίων, θερμότητας, πτητικών και εύφλεκτων υλικών. Τέλος, οι παγίδες τοποθετήθηκαν κοντά στα σύνορα διαφορετικών οικοσυστημάτων (στο βαθμό που ήταν εφικτό) έτσι ώστε να καλύπτονται και τα δύο και σε απόσταση τουλάχιστον 50 μέτρων (Brown et al. 2008) από άλλες παγίδες για να μην υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των παγίδων. Οι παγίδες ενεργοποιούνταν 1 ώρα πριν την δύση του ηλίου και η συλλογή ολοκληρωνόταν 1 ώρα μετά την ανατολή. Μετά την συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε μορφολογική ταυτοποίηση με τη χρήση κλειδών προσδιορισμού, οι οποίες βασίζονταν στη μελέτη των εξωτερικών ανατομικών χαρακτηριστικών των θηλυκών κουνουπιών (Βογιατζόγλου-Σαμανίδου 2011).

Αποτελέσματα

Μετά την ολοκλήρωση των εργασιών συλλογής των κουνουπιών από τις οκτώ περιοχές όπου τοποθετήθηκαν οι παγίδες, για το χρονικό διάστημα Μάϊου-Οκτωβρίου 2021, και βάσει της συστηματικής τους ταυτοποίησης (Βογιατζόγλου-Σαμανίδου 2011), ταυτοποιήθηκαν συνολικά 3 γένη και 4 είδη. Πιο συγκεκριμένα, τα είδη που ταυτοποιήθηκαν ήταν τα εξής: *Anopheles hyrcanus*, *Culex pipiens, Culex tritaeniorhynchus* και *Ochlerotatus caspius.* Ένας σημαντικός αριθμός των δειγμάτων ταυτοποιήθηκε μόνο μέχρι το επίπεδο γένους κυρίως λόγω αλλοίωσης εξωτερικών χαρακτηριστικών. Το είδος που εμφανίζεται σε όλες τις περιοχές και υπερτερεί αριθμητικά είναι το *Ochlerotatus caspius* (Εικόνα 2), αποτέλεσμα που ήταν αναμενόμενο λόγω της παρουσίας μεγάλων υδάτινων όγκων με αλμυρά και υφάλμυρα νερά (λιμνοθάλασσες) στην περιοχή, στα οποία προτιμά να πολλαπλασιάζεται το συγκεκριμένου είδος.

Συζήτηση

Η επικράτηση του *Ochlerotatus sp*., τόσο αριθμητικά (61,12%), όσο και εκτατικά ήταν εμφανής. Όσον αφορά την εποχική κατανομή, παρατηρήθηκε έντονη πληθυσμιακή αύξηση τους καλοκαιρινούς μήνες και κατά τις αρχές Σεπτεμβρίου. Πιο συγκεκριμένα ο Αύγουστος ήταν ο μήνας που παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη αύξηση και ιδιαιτέρως η 15^{η} Αυγούστου. Συγκριτικά, παρατηρήθηκε πως η μηνιαία αύξηση του αριθμού των κουνουπιών ήταν ανάλογη με την αύξηση της μέσης μηνιαίας θερμοκρασίας.



Εικόνα 2. Συνολική (από όλες τις περιοχές) κατανομή των κουνουπιών ανά μήνα

Η διακύμανση αυτή συνάδει με τη βιολογία του εντόμου, καθώς η αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει αντίστοιχα το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κουνουπιών. Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει την αύξηση του αριθμού των κουνουπιών είναι και οι βροχοπτώσεις και μάλιστα οι έντονες καλοκαιρινές που προκαλούν παροδικά συσσώρευση υδάτων (νερολακούβες) ή και σύντομες πλημύρες, με αποτέλεσμα την εκκόλαψη μεγάλου αριθμού προνυμφών (Βογιατζόγλου-Σαμανίδου 2011). Συνεπώς υπάρχει μεγάλη πιθανότητα ο αυξημένος αριθμός εντόμων και ιδιαιτέρως του γένους *Ochlerotatus*, που παρατηρείται κατά τη 15η Αυγούστου και τη 15η Σεπτεμβρίου, να συσχετίζεται και με αυτή την παράμετρο.

Συνεκτιμώντας αφενός το ιδιαιτέρως χαμηλό ποσοστό παρουσίας του *Culex pipiens*, που θεωρείται ο κύριος φορέας του ιού του Δυτικού Νείλου, αλλά την απουσία κυρίων ειδών - διαβιβαστών σοβαρών νοσημάτων (Bartlow et al. 2019) και αφετέρου την μη παρουσία κρουσμάτων αυτών των ασθενειών τουλάχιστον κατά την τελευταία δεκαετία, μπορεί να θεωρηθεί πως η παρουσία των συγκεκριμένων ειδών κουνουπιών στο δυτική Ελλάδα δε συνιστά προς το παρόν παράγοντα υψηλού κινδύνου για τη δημόσια υγεία. Εντούτοις αποτελεί σημαντικό παράγοντα όχλησης των κατοίκων, με αρνητικές επιπτώσεις στις υπαίθριες δραστηριότητες εργασίας και αναψυχής. Η λήψη μέτρων απώθησης ή θανάτωσης των εντόμων επιβαρύνει οικονομικά τα νοικοκυριά στις περιοχές που πλήττονται και τα προγράμματα καταπολέμησης επιβαρύνουν τους προϋπολογισμούς της Περιφερειακής Ενότητας και των δήμων.

Βιβλιογραφία

Βογιατζόγλου-Σαμανίδου Α., (2011). *Τα κουνούπια της Ελλάδας: Μορφολογία, Βιολογία, Δημόσια υγεία, Κλείδες προσδιορισμού, Αντιμετώπιση*. Αθήνα: Εκδόσεις Αγροτύπος.

Bartlow, A. W., Manore, C., Xu, C., Kaufeld, K. A., Del Valle, S., Ziemann, A., Fairchild, G. & Fair, J. M. (2019). Forecasting Zoonotic Infectious Disease Response to Climate Change: Mosquito Vectors and a Changing Environment. *Veterinary Sciences*, 6, 40.

Berenger, J. M. & Parola, P. (2017). *Arthropod vectors of medical importance.* Amsterdam: Elsevier

Brown, H. E., Paladini, M., Cook, R. A., Kline, D., Barnard, D. & Fish, D. (2008). Effectiveness of mosquito traps in measuring species abundance and composition. *Journal of Medical Emtomology*, 45, 517-521.

Halasa, Y. A., Shepard, D. S., Fonseca, D. M., Farajollahi, A., Healy, S., Gaugler, R., Bartlett-Healy, K., Stricman, D. A. & Clark, G. G. (2014). Quantifying the impact of mosquitoes on quality of life and enjoyment of yard and porch activities in New Jersey. *PLoS One*, 9, e 89221.

Διερεύνηση καινοτόμων βιοδεικτών σε κρεοπαραγωγά ορνίθια μολυσμένα με Campylobacter jejuni

ΤΣΙΟΥΡΗΣ Βασίλειος[1], ΜΑΝΤΖΙΟΣ Τηλέμαχος[1], ΚΑΝΑΡΗ Ελισάβετ[1,2], ΚΙΣΚΙΝΗΣ Κωνσταντίνος[1], ΚΙΟΥΣΗ Δέσποινα Ευγενία[2], ΠΑΠΠΑ Αγλαΐα[2], ΓΑΛΑΝΗΣ Αλέξιος[2]

[1]*Μονάδα Παθολογίας Πτηνών, Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης: billtsiou@vet.auth.gr (Β.Τ), mantzios@vet.auth.gr (Τ.Μ.), kiskinik@ vet.auth.gr (Κ.Κ.), eliskanari@gmail.com (Ε.Κ.)*

[2]*Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, dkiousi@mbg.duth.gr (Δ.Ε.Κ), apappa@mbg.duth.gr (Α.Π.), agalanis@mbg.duth.gr (Α.Γ.)*

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση καινοτόμων βιοδεικτών της υγείας κρεοπαραγωγών ορνιθίων τα οποία έχουν μολυνθεί πειραματικά με *C.jejuni*. Εξήντα-τέσσερις νεοσσοί ημέρας (Ross®308) κατανεμήθηκαν τυχαία σε δύο πειραματικές ομάδες, με τέσσερις επαναλήψεις, σύμφωνα με τον ακόλουθο πειραματικό σχεδιασμό: **Ομάδα Α**: αρνητικοί μάρτυρες και **Ομάδα Β**: τα πτηνά της οποίας ενοφθαλμίστηκαν με 1ml-10^7 CFU/ml *C.jejuni*. Πέντε ημέρες μετά τη μόλυνση, η συγκέντρωση της ιντερλευκίνης-10 (IL-10) στον ορό του αίματος και της κοναλβουμίνης (ovotransferrin) στα κόπρανα των πτηνών, εκτιμήθηκαν με sandwich και competitive ELISA, αντίστοιχα, ενώ η έκφραση του γονιδίου οκλουδίνης (occludin) στα επιθηλιακά κύτταρα της νήστιδας υπολογίστηκε με Real-time PCR. Η μόλυνση των πτηνών με *C.jejuni* οδήγησε σε σημαντική ($P \leq 0,05$) αύξηση της έκφρασης της occludin στα επιθηλιακά κύτταρα της νήστιδας, ενώ η συγκέντρωση της IL-10 και της ovotransferrin δεν επηρεάστηκαν σημαντικά.

Λέξεις κλειδιά

Campylobacter jejuni, βιοδείκτες, υγεία γαστρεντερικού συστήματος, κρεοπαραγωγά ορνίθια

Εισαγωγή

Το *Campylobacter jejuni* αποτελεί το κύριο αίτιο βακτηριακής γαστρεντερίτιδας παγκοσμίως, ενώ η επεξεργασία ή/και κατανάλωση η ορνίθειου κρέατος αποτελεί την συχνότερη πηγή μόλυνσης του ανθρώπου (EFSA 2021). Ο μικροοργανισμός συχνά αποικίζει στο γαστρεντερικό σύστημα των πτηνών αθροίζοντας μεγάλους πληθυσμούς (10^7-10^9 CFU/g κοπράνων), οι οποίοι επιμολύνουν το τελικό σφάγιο κατά τον εκσπλαχνισμό. Οι μέχρι τώρα παραβάσεις για την μείωση του επιπολασμού του βακτηρίου στις εκτροφές κρεοπαραγωγών ορνιθίων έχουν μερική επιτυχία, γεγονός που οφείλεται κατά ένα μεγάλο ποσοστό στην μη κατανόηση των μηχανισμών αλληλεπίδρασης μεταξύ του μικροοργανισμού και του ξενιστή, καθώς και στην απουσία κλινικών συμπτωμάτων που συχνά δυσχεραίνουν την έγκαιρη διάγνωση (Hansson et al. 2018).

Ως βιοδείκτες ορίζονται οι μετρήσιμες ουσίες ενός βιολογικού συστήματος, που οι διαφορές στην συγκέντρωσή τους αντανακλά σε διαταραχές στην φυσιολογική του λειτουργία. Γενικότερα, υπάρχει ανάγκη για την ανάπτυξη αξιόπιστων, ευαίσθητων και εξειδικευμένων βιοδεικτών για την παρακολούθηση της κατάστασης της υγείας των πτηνών (Duchatelle et al. 2018). Στην περίπτωση του *C.jejuni* η ανάπτυξη τέτοιων βιοδεικτών όχι μόνο θα διευκολύνει τις μελέτες σχετικά με την παθογένεια του μικροοργανισμού, αλλά και θα βοηθήσει στην παρακολούθηση της κατάστασης στο πεδίο, και ως εκ τούτου, στη δημιουργία πιο στοχευμένων και αποτελεσματικών στρατηγικών πρόληψης.

Έτσι, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση καινοτόμων βιοδεικτών της υγείας του γαστρεντερικού συστήματος, στον ορό του αίματος, στα κόπρανα και στους ιστούς κρεοπαραγωγών ορνιθίων τα οποία έχουν μολυνθεί πειραματικά με *C.jejuni*.

Υλικά και Μέθοδοι

Ο πειραματισμός διενεργήθηκε στην εγκατάσταση χρήσης πειραματόζωων της Μονάδας Παθολογίας Πτηνών, της Κλινικής Παραγωγικών Ζώων, του Τμήματος Κτηνιατρικής Α.Π.Θ. (αριθμός καταχώρησης EL-54-BIOexp-03).

Συνολικά 64 νεοσσοί ημέρας κρεοπαραγωγικού τύπου (Ross®308), προμηθεύτηκαν από εμπορικό εκκολαπτήριο και κατανεμήθηκαν τυχαία, σε 2 πειραματικές ομάδες, με 4 επαναλήψεις των 8 νεοσσών, σύμφωνα με τον ακόλουθο πειραματικό σχεδιασμό:

Ομάδα Α: αρνητικοί μάρτυρες
Ομάδα Β: πτηνά που μολύνθηκαν με *C.jejuni*.

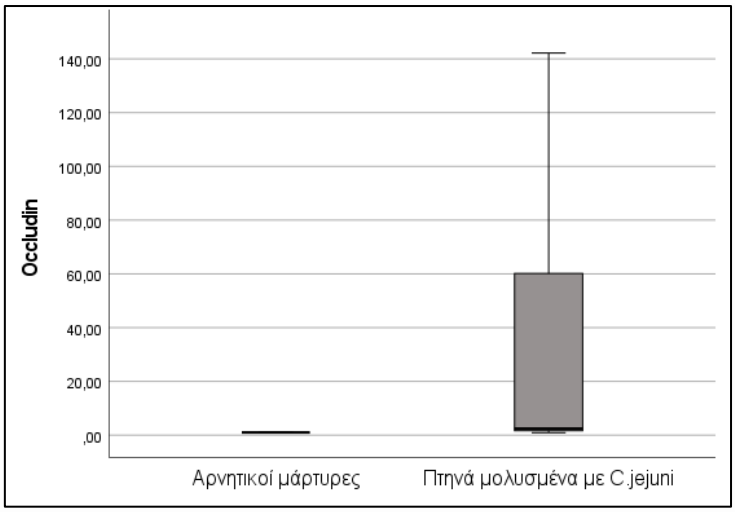
Η μόλυνση των πτηνών της ομάδας Β έγινε τη 18^{η} ημέρα του πειραματισμού, με τη χορήγηση 1ml ενοφθαλμίσματος σε κάθε πτηνό, το οποίο περιείχε 10^7 CFU/ml *C.jejuni*, ενώ στα πτηνά της ομάδας Α χορηγήθηκε 1 ml BPW ως "*placebo*". Την 23^{η} ημέρα του πειράματος (5 ημέρες μετά τη μόλυνση) δείγματα αίματος και κοπράνων συλλέχθηκαν από τα πτηνά και των δυο πειραματικών ομάδων, ενώ μετά την ευθανασία τους, δείγματα ιστού από την περιοχή της νήστιδας του εντέρου, ελήφθησαν, ψύχθηκαν άμεσα σε υγρό άζωτο, και αποθηκεύτηκαν στους -80 ^{o}C, μέχρι την περαιτέρω διερεύνησή τους στο εργαστήριο.

Η ποσοτικοποίηση της IL-10 στον ορό του αίματος έγινε με τη χρήση εμπορικού kit sandwich ELISA (Chicken Interleukin 10 (IL10) ELISA, DLR-IL10-Ch, Dldevelop, Kelowna, Canada), ενώ η ποσοτικοποίηση της ovotransferrin στα κόπρανα των πτηνών έγινε με τη χρήση εμπορικού kit competitive ELISA (Chicken Ovotransferrin ELISA, KT-530, Kamiya Biomedical Company, Tukwila, USA). Τέλος το ποσοστό έκφρασης της occludin στα δείγματα εντερικού ιστού εκτιμήθηκε με RT-PCR, με τη χρήση των εκκινητών F-5'-GAGCCCAGACTACCAAAGCAA-3' και R-5'-GCTTGATGTGGAAGAGCTTGTTG-3'. Η GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς και η ποσότητα των μεταγραφών της εκτιμήθηκε με την χρήση των εκκινητών: F-5'-CTGGCAAAGTCCAAGTGGTG-3' και R-5'-CCCTTGAAGTGTCCGTGTGT-3'.

Αποτελέσματα και συζήτηση

Τα αποτελέσματα από τη μέτρηση του ποσοστού έκφρασης της occludin στα επιθηλιακά κύτταρα της νήστιδας του εντέρου αναπαρίστανται στο **Γράφημα 1**. Η occludin είναι ένα από τα κύρια συστατικά των πρωτεϊνών σύνδεσης (TJ) των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου και φαίνεται να εμπλέκεται στη ρύθμιση της διάχυσης μεταξύ των μεμβρανών και της παρακυτταρικής διάχυσης μικρών μορίων και ως εκ τούτου στον εντερικό φραγμό. Από προηγούμενες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η γονιδιακή έκφραση της occludin στον βλεννογόνο του εντέρου λειτουργεί ως πιθανός βιοδείκτης σε παθολογικές καταστάσεις όπως η κοκκιδίωση και η νεκρωτική εντερίτιδα (Gharib-Naseri et al. 2020). Στη δική μας μελέτη, η μόλυνση των πτηνών με *C.jejuni* οδήγησε σε σημαντική ($P \leq 0,05$) αύξηση του ποσοστού έκφρασης της occludin. Η αυξημένη έκφραση των TJ μπορεί να θεωρηθεί ως προσαρμοστική απόκριση για τη διατήρηση του εντερικού φραγμού έναντι περαιτέρω βλάβης από το *C.jejuni* (Buchholz et al. 2022).

Η ovotransferrin είναι μία γλυκοπρωτεΐνη με αντιμικροβιακή δράση, η οποία συντίθεται στο ήπαρ και στον ωαγωγό των πτηνών και δρα ως πρωτεΐνη οξείας φάσης. Η συγκέντρωση της ovotransferrin στον ορό του αίματος έχει χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης σε καταστάσεις μόλυνσης και φλεγμονής στα πτηνά (Rathnapala et al. 2021). Ωστόσο σύμφωνα με τους Goossens et al. (2018) η ανίχνευσή πρωτεϊνών του ορού, όπως η ovotransferrin στα κόπρανα των πτηνών, σχετίζεται με διαταραχή της ακεραιότητας του εντερικού επιθηλίου, που μπορεί να προκληθεί σε παθολογικές καταστάσεις όπως η κοκκιδίωση και η νεκρωτική εντερίτιδα.

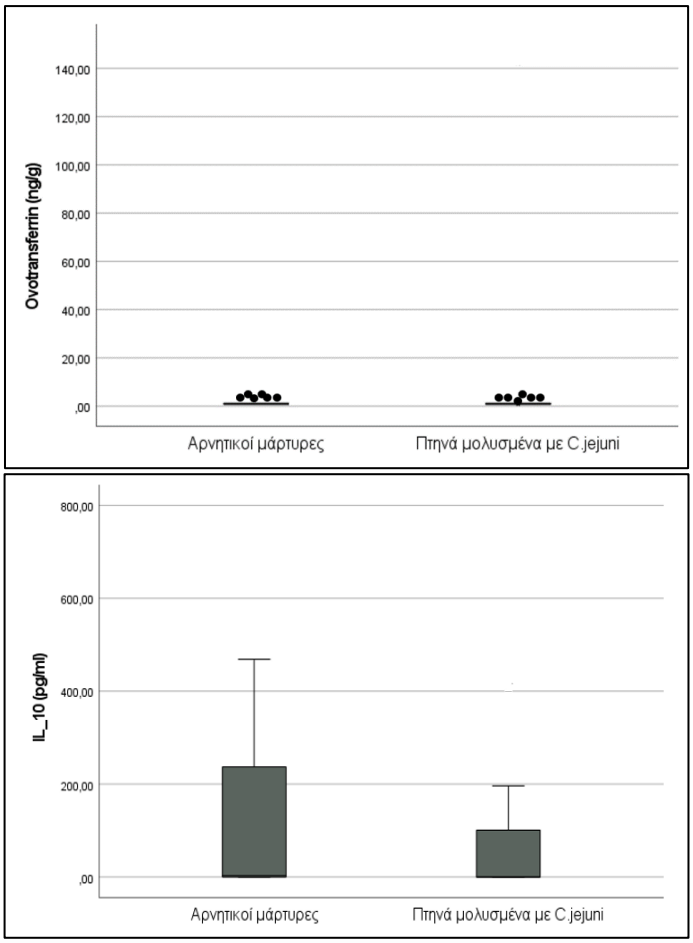


Γράφημα 1. Συγκριτική αύξηση των επιπέδων έκφρασης της "occludin" στα επιθηλιακά κύτταρα της νήστιδας του εντέρου των πτηνών που μολύνθηκαν με C.jejuni, σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες.

Στη δική μας έρευνα, η μόλυνση των πτηνών με C.jejuni δεν επηρέασε σημαντικά (P>0,05) τη συγκέντρωση της ovotransferrin στα κόπρανα (Γράφημα 2Α). Τόσο στην ομάδα των αρνητικών μαρτύρων, όσο και στα πτηνά που μολύνθηκαν με C.jejuni η συγκέντρωση της ovotransferrin στα κόπρανα ήταν μηδενική, γεγονός που υποδηλώνει την απουσία της ή την παρουσία της σε συγκεντρώσεις μικρότερες του ορίου ανίχνευσης του εμπορικού ELISA kit που χρησιμοποιήθηκε.

A

B



Γράφημα 2. Α) Η επίδραση της μόλυνσης των πτηνών με *C.jejuni*, στη συγκέντρωση ovotransferrin στα κόπρανα των πτηνών, **Β)** Η επίδραση της μόλυνσης των πτηνών με *C.jejuni*, στη συγκέντρωση της IL-10, στον ορό του αίματος των πτηνών.

Η επίδραση της μόλυνσης των πτηνών με *C.jejuni* στη συγκέντρωση της IL-10 στον ορό του αίματος αναπαρίσταται στο **Γράφημα 2Β**. Η IL-10 είναι μια κυτοκίνη η οποία εμπλέκεται ως ρυθμιστικός παράγοντας σε καταστάσεις φλεγμονής, κατά τη μόλυνση με βακτήρια, ιούς ή πρωτόζωα (Manzanillo et al. 2015). Η μόλυνση των πτηνών με αρκετά παθογόνα έχει δείξει ότι προκαλεί μαζική αύξηση IL-10 και γι' αυτό αποτελεί εάν βιοδείκτη της υγείας των πτηνών (Arendt et al. 2019). Στη δική μας έρευνα, η μόλυνση με *C.jejuni* δεν επηρέασε σημαντικά (*P>0,05*) τη συγκέντρωση της IL_10 στον ορό του αίματος.

Συμπεράσματα

Αυτή η μελέτη αποτελεί ένδειξη ότι η μόλυνση των πτηνών με *C.jejuni* δεν προκαλεί σημαντικές μεταβολές στη συγκέντρωση της IL-10 στον ορό και της ovotransferrin στα κόπρανα των πτηνών. Παρόλα αυτά η μόλυνση των πτηνών με *C.jejuni* φαίνεται να επηρεάζει την λειτουργία του εντερικού φραγμού και να οδηγεί σε αύξηση του ποσοστού έκφρασης της πρωτεΐνης "occludin" σε τεμάχια εντερικού ιστού. Ωστόσο η χρήση της ως βιοδείκτη περιορίζεται για ερευνητικούς σκοπούς, καθώς απαιτεί τη θανάτωση του ζώου για τη λήψη ιστοτεμαχίων και ως εκ τούτου αντικρούεται της πρακτικής ορθής ανάπτυξης βιοδεικτών οι οποίοι θα είναι λιγότερο παρεμβατικοί και δεν θα απαιτούν τη θανάτωση των ζώων στην πράξη.

Βιβλιογραφία

Ducatelle R., Goossens E., Meyer F.D., Eeckhaut V., Antonissen G., Haesebrouck F., and Immerseel F. V. (2018). "Biomarkers for Monitoring Intestinal Health in Poultry: Present Status and Future Perspectives." *Veterinary Research*, 49, 43, https://doi.org/10.1186/s13567-018-0538-6.

Goossens E., Debyser G., Callens C., Gussem M. D., Dedeurwaerder A., Devreese B., Haesebrouck F. (2018). "Elevated Faecal Ovotransferrin Concentrations Are Indicative for Intestinal Barrier Failure in Broiler Chickens." *Veterinary Research* 49, 1, https://doi.org/10.1186/s13567-018-0548-4.

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. (2021). The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. EFSA Journal 19, (12):6971. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971

Hansson I., Sandberg M., Habib I., Lowman R., & Engvall, E. O. (2018). Knowledge gaps in control of Campylobacter for prevention of campylobacteriosis. *Transboundary and emerging diseases*, 65 , 1, 30–48. https://doi.org/10.1111/tbed.12870

Gharib-Naseri, K., de Paula Dorigam, J. C., Doranalli, K., Kheravii, S., Swick, R. A., Choct, M., & Wu, S. B. (2020). Modulations of genes related to gut integrity, apoptosis, and immunity underlie the beneficial effects of Bacillus amyloliquefaciens CECT 5940 in broilers fed diets with different protein levels in a necrotic enteritis challenge model. *Journal of animal science and biotechnology*, 11, 104. https://doi.org/10.1186/s40104-020-00508-4

Buchholz, S., Ruhnau D., Hess C., Aschenbach J.R., Hess M., Awad W. A. (2022). Paracellular intestinal permeability of chickens induced by DON and/or C.jejuni is associated with alterations in tight junction mRNA expression. *Microbial Pathogenesis*, 168,105509, https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105509

Rathnapala E.C.N., Ahn D.U., and Abeyrathne S. (2021). "Functional Properties of Ovotransferrin from Chicken Egg White and Its Derived Peptides: A Review." *Food Science and Biotechnology*, 30, 619-630. https://doi.org/10.1007/s10068-021-00901-3

Manzanillo P., Eidenschenk C., and Ouyang W. (2015). "Deciphering the Crosstalk among IL-1 and IL-10 Family Cytokines in Intestinal Immunity." *Trends in Immunology*, 36, 471-478, https://doi.org/10.1016/j.it.2015.06.003.

Arendt, M., Elissa, J., Schmidt, N., Michael, E., Potter, N., Cook, M., & Knoll, L. J. (2019). *Investigating the role of interleukin 10 on Eimeria intestinal pathogenesis in broiler chickens. Veterinary Immunology and Immunopathology, 109934.* https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2019.109934

Προσδιορισμός και κατανομή του μικροβιώματος στο πεπτικό σύστημα εκτρεφόμενων χερσαίων σαλιγκαριών Cornu aspersum με αλληλούχηση του 16S rRNA γονιδίου

ΚΥΡΙΤΣΗ Μαρία[1,2], ΧΑΡΙΖΑΝΗ Ελισάβετ[1], ΣΤΑΙΚΟΥ Αλεξάνδρα[3], ΑΡΓΥΡΙΟΥ Αναγνώστης[2,4], ΓΙΑΓΚΟΥ Μηνάς[1]

1.Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Α.Π.Θ, kyritsime@bio.auth.gr, charizae@bio.auth.gr, yiangou@bio.auth.gr
2.Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών, Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης, kyritsimaria@certh.gr, argiriou@certh.gr
3.Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Α.Π.Θ, astaikou@bio.auth.gr
4.Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής, argyriou@aegean.gr

Περίληψη
Οι συμβιωτικοί μικροοργανισμοί του εντέρου συμβάλλουν στη διατήρηση της ομοιόστασης, στην πέψη και στους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή. Η έρευνα για το εντερικό μικροβίωμα των χερσαίων σαλιγκαριών με Αλληλούχηση Επόμενης Γενιάς (NGS) είναι πολύ περιορισμένη. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση του 16S rRNA γονιδίου για τον προσδιορισμό της σύστασης και χωρικής κατανομής των βακτηριακών κοινοτήτων στον πεπτικό σωλήνα εκτρεφόμενων σαλιγκαριών *Cornu aspersum* (Muller, 1774) και *C. aspersum* maxima. Η Ανάλυση Κύριων Συντεταγμένων (PCoA) έδειξε ότι με βάση τη βακτηριακή σύσταση η στοματική μάζα διαφέρει από τα υπόλοιπα τμήματα, ενώ το έντερο ομαδοποιείται κυρίως με το ηπατοπάγκρεας. Η φυλογενετική ταξινόμηση των αλληλουχιών έδειξε την κυριαρχία μη καλλιεργήσιμων βακτηρίων κατά μήκος του πεπτικού συστήματος και την ύπαρξη βακτηριακών ομάδων που σχετίζονται με τη διάσπαση των φυτικών ινών που καταναλώνουν τα σαλιγκάρια. Τα παραπάνω αποτελούν την πρώτη καταγραφή δεδομένων μικροβιώματος μέσω NGS στα διαφορετικά τμήματα του πεπτικού συστήματος εκτρεφόμενων σαλιγκαριών *C. aspersum*.

Λέξεις-κλειδιά: *Cornu aspersum*, πεπτικό σύστημα, μικροβίωμα, μεταγονιδιωματική, 16S rRNA

Εισαγωγή
Το χερσαίο σαλιγκάρι *Cornu aspersum* αποτελεί βασικό είδος της μεσογειακής χερσαίας πανίδας και από τα σημαντικότερα εδώδιμα εμπορεύσιμα είδη σαλιγκαριών στην Ελλάδα. Στην εκτροφή χρησιμοποιείται πολύ συχνά το υποείδος *C. aspersum* maxima καθώς είναι μεγαλύτερο σε μέγεθος και χαρακτηρίζεται από γρήγορη αύξηση (Χατζηιωάννου και Στάικου 2015). Τα χερσαία σαλιγκάρια τρέφονται κυρίως με φυτά πλούσια σε πρωτεΐνες και ασβέστιο που απαιτούνται για την ανάπτυξή τους. Τα ζώα με διατροφή πλούσια σε λιγνοκυτταρινικά συστατικά διαθέτουν εξειδικευμένη εντερική μικροχλωρίδα που τα εφοδιάζει με απαραίτητα πεπτικά ένζυμα. Έχει αναφερθεί ότι τα διαφορετικά τμήματα του γαστρεντερικού σωλήνα των σαλιγκαριών αποτελούν μοναδικά μικρο-περιβάλλοντα που φιλοξενούν ξεχωριστές βακτηριακές κοινότητες (Li et al 2019). Η εντερική μικροχλωρίδα του *Cornu aspersum* έχει διερευνηθεί με μεθόδους καλλιέργειας των βακτηρίων. Εντούτοις, ο αριθμός των πληροφοριών που αφορούν στη σύσταση και χωρική κατανομή των μικροοργανισμών στο πεπτικό σύστημα του *C. aspersum* με μεταγονιδιωματικές μεθόδους είναι πολύ μικρός.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο χαρακτηρισμός των βακτηριακών κοινοτήτων κατά μήκος του πεπτικού συστήματος εκτρεφόμενων χερσαίων σαλιγκαριών του είδους *C. aspersum* (Muller, 1774) και του υποείδους *C. aspersum* maxima μέσω της μεταγονιδιωματικής με βάση το 16S rRNA, για την καλύτερη κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μικροβιακών κοινοτήτων-ξενιστή που συμβάλλουν στη συμβίωσή των βακτηρίων στο πεπτικό σύστημα των σαλιγκαριών.

Μεθοδολογία

Χρησιμοποιήθηκαν πέντε ενήλικα σαλιγκάρια *C. aspersum* (Muller, 1774) και τέσσερα *C. aspersum* maxima που συλλέχθηκαν κατά την εαρινή περίοδο από εκτροφείο της Κρήτης και της Θεσσαλονίκης αντίστοιχα. Διατηρήθηκαν σε εργαστηριακές συνθήκες (φωτοπεριοδικότητα 12 ωρών, υγρασία 60-90%, 22°C ± 2°C) για μία εβδομάδα, όπου τρέφονταν αποκλειστικά με αποστειρωμένο σιτηρέσιο εμπορίου. Πριν από τη δειγματοληψία αφέθηκαν σε νηστεία για 2 μέρες, ώστε να αποβάλουν πλήρως τα μερίδια τροφής. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολόκληρου του πεπτικού συστήματος υπό άσηπτες συνθήκες και χωρίστηκε σε 5 μέρη: στοματική μάζα, προστόμαχος, στόμαχος, έντερο και ηπατοπάγκρεας. Η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε με το ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (ZYMO RESEARCH, Irvine, CA, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για τον προσδιορισμό της βακτηριακής σύστασης χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της εταιρίας Illumina “16S Metagenomic Sequencing Library Preparation” για την κατασκευή βιβλιοθηκών με τις υπερμεταβλητές περιοχές V3–V4 του 16S rRNA γονιδίου. Η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε στο σύστημα MiSeq, χρησιμοποιώντας το MiSeq reagent kit v3 (2×300 κύκλοι) (Illumina Inc. San Diego, CA, USA).

Η επεξεργασία των βακτηριακών αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε στην πλατφόρμα QIIME2 έκδοση-2021.11 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2) (Bolyen et al. 2019). Ο ποιοτικός έλεγχος των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με το πακέτο DADA2 (Divisive Amplicon Denoising Algorithm) (Callahan et al. 2020). Οι αλληλουχίες (Amplicon Sequence Variants – ASVs) που προέκυψαν στοιχήθηκαν έναντι της βάσης δεδομένων SILVA (έκδοση-138). Η περαιτέρω επεξεργασία και οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε στη γλώσσα R έκδοση-4.1.1.

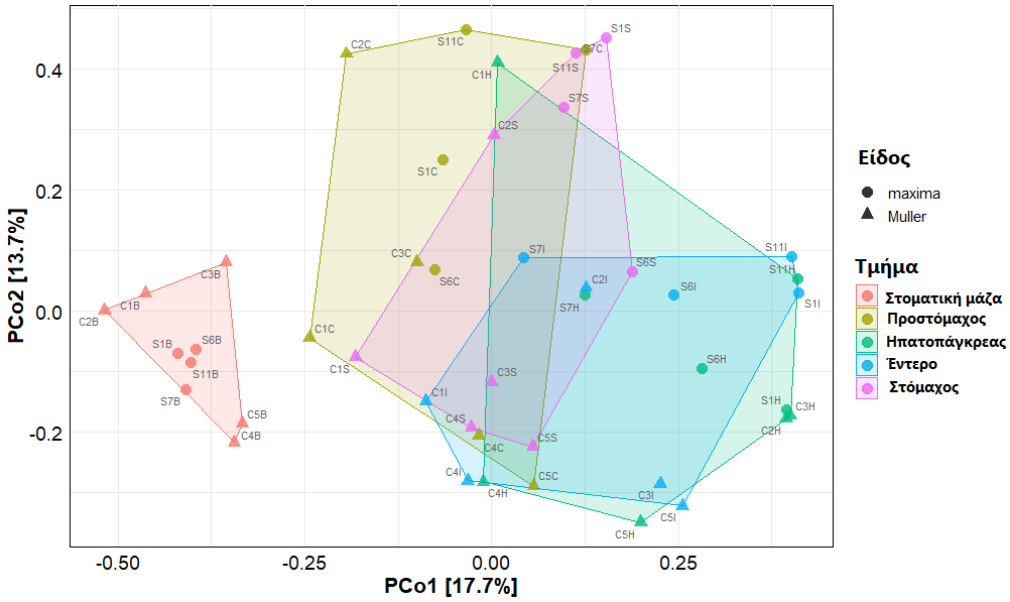
Αποτελέσματα

Από το σύνολο των 45 δειγμάτων του πεπτικού συστήματος των σαλιγκαριών ανιχνεύτηκαν 138 διαφορετικές οικογένειες που ανήκουν σε 18 Φύλα. Η ανάλυση α-ποικιλότητας φανέρωσε την κατά μέσο όρο αυξημένη ποικιλότητα βακτηριακών ειδών στα δείγματα εντέρου συγκριτικά με τα υπόλοιπα τμήματα. Η Ανάλυση Κύριων Συντεταγμένων (PCoA) έδειξε τον διαχωρισμό των δειγμάτων της στοματικής μάζας, ενώ τα υπόλοιπα τμήματα ομαδοποιούνται πιο κοντά μεταξύ τους. Τα δείγματα του προστόμαχου ομαδοποιήθηκαν κυρίως με τον στόμαχο, ενώ στα δείγματα εντέρου και ηπατοπαγκρέατος παρατηρήθηκε μεγαλύτερη επικάλυψη (Εικόνα 1).

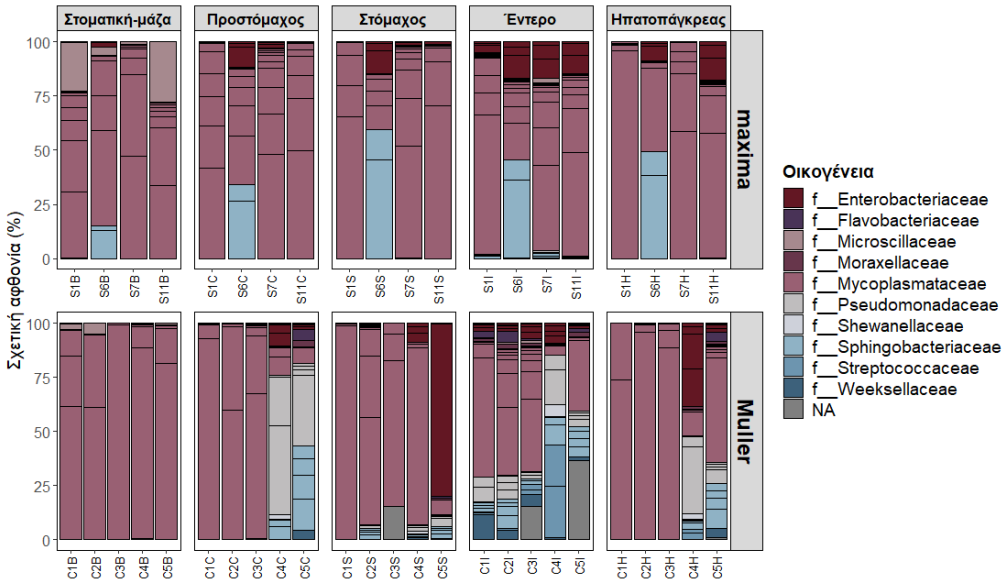
Σε επίπεδο ταξινόμησης Φύλου, τα περισσότερα βακτήρια ανήκουν στα Firmicutes, ακολουθούμενα από τα Proteobacteria και Bacteroidota. Σε επίπεδο Οικογένειας παρατηρείται κυριαρχία των *Mycoplasmataceae* κατά μήκος του πεπτικού σωλήνα με κύριους εκπροσώπους μη καλλιεργήσιμα βακτήρια (Εικόνα 2). Τα *Enterobacteriaceae* και *Sphingobacteriaceae* βρέθηκαν σε υψηλά ποσοστά κυρίως στο έντερο, ενώ τα *Microscillaceae* σχεδόν αποκλειστικά στη στοματική μάζα. Τη μεγαλύτερη ποικιλομορφία ειδών παρουσίασαν τα δείγματα εντέρου του *C. aspersum* (Muller, 1774) συγκριτικά με το *C. aspersum* maxima.

Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά η αποτίμηση των βακτηριακών κοινοτήτων κατά μήκος του πεπτικού συστήματος εκτρεφόμενων χερσαίων σαλιγκαριών *C. aspersum* (Muller, 1774) και *C. aspersum* maxima μέσω αλληλούχησης του 16S rRNA γονιδίου με NGS. Τα διαφορετικά τμήματα του πεπτικού συστήματος των σαλιγκαριών διαχωρίζονται μεταξύ τους βάσει της βακτηριακής σύστασης. Και στα δύο είδη σαλιγκαριών εντοπίζονται ομάδες βακτηρίων που σχετίζονται με τη διάσπαση των φυτικών ινών που καταναλώνουν. Κατά μήκος του πεπτικού σωλήνα τους κυριαρχούν μη καλλιεργήσιμα βακτήρια της οικογένειας *Mycoplasmataceae*. Τα βακτήρια αυτά έχουν χαρακτηριστεί ως συμβιωτικά του εντέρου διάφορων ασπόνδυλων οργανισμών, μεταξύ των οποίων χερσαία και υδρόβια σαλιγκάρια (Hu et al. 2018, Pawar et al. 2021). Η παρουσία αυτών των μικροοργανισμών στο πεπτικό σύστημα των γαστερόποδων μπορεί να αντανακλά τον ευεργετικό ρόλο τους ως συμβιώτες. Ο ρόλος τους σε αυτούς του οργανισμούς δεν έχει σαφηνιστεί και χρειάζεται περεταίρω έρευνα για να εξακριβωθεί εάν επιτελούν κάποια εξειδικευμένη λειτουργία στο γαστρεντερικό σωλήνα των σαλιγκαριών.



Εικόνα 1. Ανάλυση Κύριων Συντεταγμένων (PCoA) με βάση τον πίνακα ανομοιοτήτων Bray-Curtis.



Εικόνα 2. Ραβδογράμματα των 10 κυρίαρχων βακτηρίων σε επίπεδο Οικογένειας, εκφραζόμενα ως ποσοστό επί τοις εκατό(%) των αλληλουχιών.

Βιβλιογραφία

Χατζηιωάννου, Μ. & Στάικου, Α. (2015) *Βιολογία και Εκτροφή Γαστεροπόδων* Αθήνα: Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις.

Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., … Caporaso, J. G., (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. Nature Biotechnology, 37(8), 852–857.

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A. & Holmes, S. P. (2020). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nat. Methods, 13, 581–583.

Hu, Z., Chen, X., Chang, J., Yu, J., Tong, Q., Li, S. & Niu, H., (2018). Compositional and predicted functional analysis of the gut microbiota of Radix auricularia (Linnaeus) via high-throughput Illumina sequencing. PeerJ, 1–19.

Li, L. H., Lv, S., Lu, Y., Bi, D. Q., Guo, Y. H., Wu, J. T., Yue, Z. Y., Mao, G. Y., Guo, Z. X., Zhang, Y. & Tang, Y. F., (2019). Spatial structure of the microbiome in the gut of Pomacea canaliculata. BMC Microbiol., 19, 1–9.

Pawar, K. D., Banskar, S., Rane, S. D., Charan, S. S., Kulkarni, G. J., Sawant, S. S., Ghate, H. V., Patole, M. S. & Shouche, Y. S., (2012). Bacterial diversity in different regions of gastrointestinal tract of Giant African Snail (Achatina fulica). Microbiologyopen, 1, 415–426.

Διερεύνηση της μεθυλίωση του γονιδιώματος του Ιού των Ανθρώπινων Θηλωμάτων (HPV 16) σε περιπτώσεις καρκίνου Κεφαλής Τραχήλου

ΖΥΓΟΥΡΑΣ Ιωάννης[1], ΑΘΑΝΑΣΙΟΥ Αναστασία[1], ΛΕΒΕΝΤΑΚΟΥ Δανάη[2], ΚΥΡΙΑΚΟΠΟΥΛΟΥ Ζαχαρούλα[3], ΚΟΤΤΑΡΙΔΗ Χριστίνα[1]

[1]*Εργαστήριο Γενικής Μικροβιολογίας, Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης,* izygouras@bio.auth.gr, anastathan@bio.auth.gr, ckottaridi@bio.auth.gr

[2] *Β' Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αττικόν, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ,* dleventakou@med.uoa.gr

[3] *Τμήμα Περιβάλλοντος, Σχολή Τεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας,* zahkyr@uth.gr

Περίληψη

Ο ιός των Ανθρωπίνων Θηλωμάτων (HPV) και κυρίως ο τύπος HPV16 ανευρίσκεται συχνά σε περιπτώσεις καρκίνου Κεφαλής Τραχήλου (HNC). Η μεθυλίωση του γονιδιώματος του HPV16 έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας αλλά σε μικρότερο βαθμό στο HNC. Στην παρούσα μελέτη, διερευνήθηκε η μεθυλίωση του γονιδίου *L1* και της 5' μη μεταφραζόμενης περιοχής (URR), του γονιδιώματος του HPV16 με πυροαλληλούχηση, σε μικρή ομάδα κλινικών δειγμάτων με HNC. Το γονίδιο *L1* βρέθηκε να είναι μεθυλιωμένο σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων σε σχέση με την URR ωστόσο, συγκριτικά με αντίστοιχες μελέτες που διερευνήθηκαν δείγματα από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας η μεθυλίωση της URR φαίνεται να είναι πιο συχνή στις περιπτώσεις HNC. Το εύρημα αυτό είναι πιθανό να σχετίζεται με την παρουσία του ιού στην συγκεκριμένη νόσο σε επισωματική μορφή, υπόθεση που βρίσκεται υπό διερεύνηση.

Λέξεις-κλειδιά

HPV16, καρκίνος Κεφαλής Τραχήλου, Μεθυλίωση, *L1*, URR

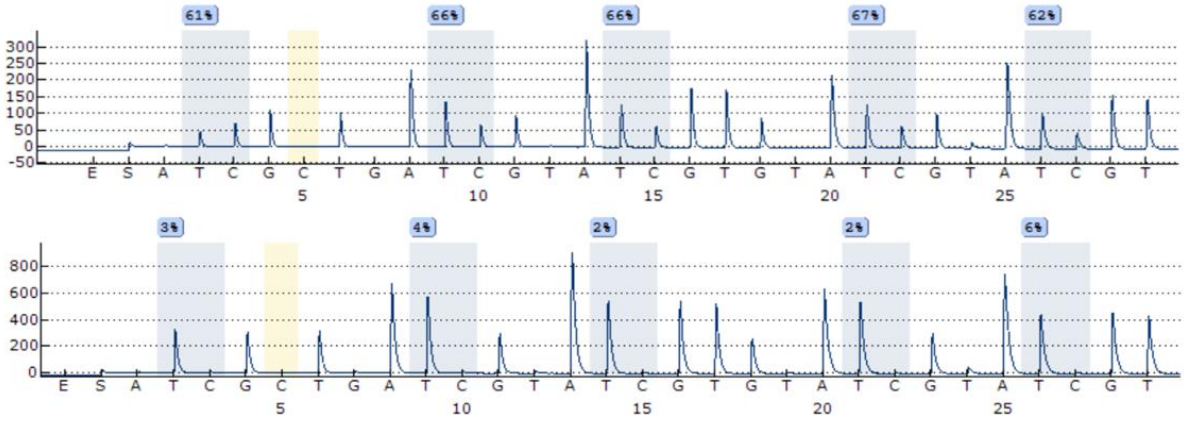
Εισαγωγή

Ο Ιός των Ανθρώπινων Θηλωμάτων (HPV) ανήκει στην οικογένεια των *Papillomaviridae* και μπορεί να προσβάλλει το δέρμα και το βλεννογόνιο επιθήλιο (Van Doorslaer 2013). Είναι γνωστοί περίπου 200 τύποι του ιού, με 14 περίπου από αυτούς να χαρακτηρίζονται ως υψηλού κινδύνου λόγω της ικανότητας τους να προκαλούν κακοήθεια. Οι τύποι HPV 16 και 18 σχετίζονται επιδημιολογικά με τα περισσότερα περιστατικά καρκίνου (Spence et al. 2016). Ο Καρκίνος Κεφαλής και Τραχήλου περιλαμβάνει μια ευρεία ομάδα καρκινωμάτων που προέρχονται από την περιοχή της κεφαλής, με ιδιαίτερο ενδιαφέρον να παρουσιάζει το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα Κεφαλής Τραχήλου καθώς το 2018 διαγνώστηκε σε 900.000 ασθενείς και οδήγησε σε 450.000 θανάτους (Johnson et al. 2020). Ο ιός HPV και κυρίως ο τύπος HPV16 ανευρίσκεται πολύ συχνά στη συγκεκριμένη νόσο (LeConte et al. 2018). Όπως είναι γνωστό, οι ογκοπρωτεΐνες των ιών HPV υψηλού κινδύνου επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων του ξενιστή που σχετίζονται με επιγενετικές αλλαγές και κυρίως τη μεθυλίωση είτε του ιικού DNA, είτε του ξενιστή (Kuss-Duerkop, Westrich & Pyeon 2018). Η μεθυλίωση αφορά την προσθήκη μεθυλομάδας στον 5' άνθρακα του πυριμιδινικού δακτυλίου της κυτοσίνης στα δινουκλεοτίδια CG. Στην παρούσα μελέτη παρουσιάζουμε πρόδρομα αποτελέσματα της διερεύνησης της μεθυλίωσης του γονιδίου *L1* και της URR του HPV16 σε μικρή ομάδα κλινικών δειγμάτων, που στόχο έχει τη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της παρουσίας του ιού με τον ξενιστή στο συγκεκριμένο νόσημα.

Μέθοδοι

Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 50 τομές από δείγματα ιστού εγκλεισμένα σε παραφίνη, από Έλληνες ασθενείς, με HNC και θετικό το μοριακό έλεγχο για την παρουσία του ιού HPV16. Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA με την χρήση του cobas® DNA Sample Preparation κιτ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Γερμανία) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ακολούθησε η μετατροπή του DNA παρουσία όξινου θειώδους νατρίου (Bisulfite Conversion) με την χρήση του

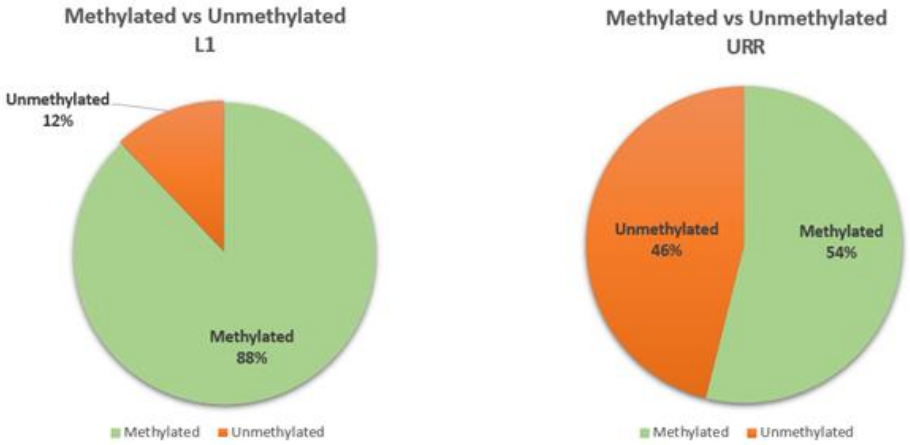
EpiTect Bisulfite κιτ (QIAGEN, Heidelberg Γερμανία), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Μέσω της διαδικασίας αυτής πραγματοποιείται η μετουσίωση του DNA και η απαμίνωση των μη μεθυλιωμένων κυτοσινών, μετατρέποντας τις σε ουρακίλες, ενώ οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες παραμένουν ως έχουν. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση του DNA με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), με την χρήση ήδη δημοσιευμένων ζευγών εκκινητών βιοτυνιλιωμένων στο 5' άκρο, με 5 ζεύγη να στοχεύουν το *L1* και 2 τη UTR (Mirabello et al. 2013). Μελετήθηκαν συνολικά 6 θέσεις CG (CG sites) για το *L1* και 7 για τη URR. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε ήταν η πυροαλληλούχηση με την χρήση του PyroMark Q24 (QIAGEN, Heidelberg Γερμανία), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η πυροαλληλούχηση είναι μέθοδος αλληλούχησης μέσω σύνθεσης και βασίζεται στην ανίχνευση πυροφωσφορικού κατά την ενσωμάτωση νουκλεοτιδίου μέσω εκπομπής φωτός. Η εμφάνιση του ποσοστού της μεθυλίωσης του DNA, γίνεται μέσω κατάλληλου λογισμικού (Εικόνα 1), στις θέσεις CG που μας ενδιαφέρουν.



Εικόνα 1. Πυρογράμματα που απεικονίζουν μεθυλιωμένες και μη μεθυλιωμένες θέσεις

Αποτελέσματα

Με την ολοκλήρωση των αναλύσεων, τέθηκε ως κατώφλι μεθυλίωσης το 15% σε κάθε θέση CG. Βρέθηκε ότι για το γονίδιο *L1*, σε όλα τα ζεύγη εκκινητών υπήρχε μια κυριαρχία των μεθυλιωμένων δειγμάτων, καθώς παρατηρήθηκε μεθυλίωση στο 88% των δειγμάτων, ενώ μόνο 12% των δειγμάτων ήταν μη μεθυλιωμένα (Διάγραμμα 1). Τα ποσοστά της μεθυλίωσης κυμάνθηκαν από 48,2%-56,2%. Όσον αφορά τη URR, υψηλά ποσοστά μεθυλίωσης βρέθηκαν σε ποσοστό 54% του συνόλου των δειγμάτων (Διάγραμμα 1) και αντίστοιχα τα ποσοστά της μεθυλίωσης κυμάνθηκαν από 20,2% - 43,2%.



Διάγραμμα 1. Ποσοστό μεθυλιωμένων και μη μεθυλιωμένων δειγμάτων για το *L1* (αριστερά) και το URR (δεξιά)

Συμπεράσματα

Για το *L1* παρατηρήθηκε υψηλή μεθυλίωση, με την τιμή της μέσης μεθυλίωσης του να είναι παρόμοια με αυτή που παρατηρήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (Kottaridi et al. 2017). Φαίνεται, πως ογκοπρωτεΐνες του HPV16 επηρεάζουν τον μηχανισμό μεθυλίωσης του DNA, σε μια διαφορετική ανατομική θέση, με παρόμοιο τρόπο για το *L1*. Όσον αφορά τη UTR, υπάρχει μεθυλίωση στο 54% των δειγμάτων, κάτι που διαφέρει από αποτελέσματα της ομάδας μας σε αντίστοιχη εργασία στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (Kottaridi et al. 2019). Τα υψηλά ποσοστά μεθυλίωσης στο URR, αποτελούν πιθανή ένδειξη πως ο ιός βρίσκεται σε επισωματική μορφή. Δεδομένου του μικρού αριθμού των δειγμάτων, περαιτέρω μελέτη είναι απαραίτητη για την επιβεβαίωση αυτής της υπόθεσης.

Βιβλιογραφία

Johnson, D. E., Burtness, B., Leemans, C. R., Lui, V., Bauman, J. E., & Grandis, J. R. (2020). Head and neck squamous cell carcinoma. Nature reviews. Disease primers, 6(1), 92.

Kottaridi, C., Kyrgiou, M., Pouliakis, A., Magkana, M., Aga, E., Spathis, A., Mitra, A., Makris, G., Chrelias, C., Mpakou, V., Paraskevaidis, E., Panayiotides, J. G., & Karakitsos, P. (2017). Quantitative Measurement of L1 Human Papillomavirus Type 16 Methylation for the Prediction of Preinvasive and Invasive Cervical Disease. The Journal of infectious diseases, 215(5), 764–771

Kottaridi, C., Leventakou, D., Pouliakis, A., Pergialiotis, V., Chrelias, G., Patsouri, E., Zacharatou, A., Panopoulou, E., Damaskou, V., Sioulas, V., Chrelias, C., Kalantaridou, S., Panayiotides, I.G. (2019). Searching HPV genome for methylation sites involved in molecular progression to cervical precancer. Journal of Cancer, 10(19), 4588-4595

Kuss-Duerkop, S. K., Westrich, J. A., & Pyeon, D. (2018). DNA Tumor Virus Regulation of Host DNA Methylation and Its Implications for Immune Evasion and Oncogenesis. Viruses, 10(2), 82

LeConte, B. A., Szaniszlo, P., Fennewald, S. M., Lou, D. I., Qiu, S., Chen, N. W., Lee, J. H., & Resto, V. A. (2018). Differences in the viral genome between HPV-positive cervical and oropharyngeal cancer. PloS one, 13(8)

Mirabello, L., Schiffman, M., Ghosh, A., Rodriguez, A. C., Vasiljevic, N., Wentzensen, N., Herrero, R., Hildesheim, A., Wacholder, S., Scibior-Bentkowska, D., Burk, R. D., & Lorincz, A. T. (2013). Elevated methylation of HPV16 DNA is associated with the development of high grade cervical intraepithelial neoplasia. International journal of cancer, 132(6), 1412–1422

Spence, T., Bruce, J., Yip, K. W., & Liu, F. F. (2016). HPV Associated Head and Neck Cancer. Cancers, 8(8), 75

Van Doorslaer K., (2013). Evolution of the Papillomaviridae. Virology, 445(1-2):11-20

Προκαταρκτικά αποτελέσματα από τη διερεύνηση της παρουσίας Wolbachia σε πληθυσμούς του Ασιατικού κουνουπιού τίγρη, Aedes albopictus (Diptera:Culicidae) στον ελλαδικό χώρο

ΜΙΣΑΗΛΙΔΗΣ Μιχαήλ [1], GEWEHR Sandra [2], ΚΩΤΣΙΟΥ Νίκος [1], ΑΥΓΟΥΣΤΙΝΟΣ Α. Αντώνιος[3], ΜΟΥΡΕΛΑΤΟΣ Σπύρος[2], ΠΑΠΑΚΩΣΤΑΣ Σπύρος[4], ΔΡΟΣΟΠΟΥΛΟΥ Ελένη [1]

[1] *Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης*
[2] *Οικοανάπτυξη Α.Ε.*
[3] *Τμήμα Φυτοπροστασίας Πατρών, Ινστιτούτο Βιομηχανικών και Κτηνοτροφικών Φυτών, ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ*
[4] *Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας, Διεθνές Πανεπιστήμιο της Ελλάδος*

Περίληψη
Το Ασιατικό κουνούπι τίγρης *Aedes albopictus*, συγκεντρώνει τα τελευταία χρόνια μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον λόγω του ότι συνιστά εν δυνάμει διαβιβαστή πολλών σοβαρών ασθενειών για τον άνθρωπο. Η μόλυνση κουνουπιών με κατάλληλα στελέχη του βακτηρίου *Wolbachia* παρουσιάζεται ως μία πολλά υποσχόμενη λύση ελέγχου των φυσικών πληθυσμών κουνουπιών καθώς μπορεί να οδηγήσει σε κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (στείρες διασταυρώσεις). Η μόλυνση με *Wolbachia* δύναται, επίσης, να μειώσει τη μετάδοση ορισμένων παθογόνων μέσω π.χ. μείωσης του ρυθμού αναπαραγωγής αυτών στα μολυσμένα κουνούπια. Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε ανίχνευση της φυσικής παρουσίας *Wolbachia* σε φυσικούς πληθυσμούς *Ae. albopictus* οκτώ νομών της Ελλάδας, και επιχειρήθηκε η τυποποίηση των στελεχών *Wolbachia* που ανιχνεύτηκαν, μέσω του συστήματος MLST. Τέλος, μέσω βιοπληροφορικών μεθόδων επιχειρήθηκε ανάλυση συσχέτισης μεταξύ των μοτίβων της μόλυνσης και περιβαλλοντικών παραγόντων.

Λέξεις-κλειδιά
Aedes albopictus, κυτταροπλασματική ασυμβατότητα, *Wolbachia*, wAlbA/wAlbB, MLST

Εισαγωγή
Το κουνούπι τίγρης, *Aedes albopictus*, αποτελεί ένα από τα πλέον εισβολικά είδη κουνουπιών. Παρόλο που είναι ενδημικό είδος της νοτιοανατολικής Ασίας έχει εγκαθιδρύσει επιτυχώς πληθυσμούς σε όλες τις ηπείρους, τα τελευταία 80 χρόνια. Κύρια αιτία της εξάπλωσής του αποτελούν οι ανθρώπινες δραστηριότητες, καθώς οι πληθυσμοί του διαθέτουν περιορισμένη ικανότητα μετακίνησης (Swan et al., 2022). Στην Ευρώπη πρωτοεμφανίστηκε το 1979 στην Αλβανία, ενώ στον ελλαδικό χώρο το 2003 (Badieritakis et al., 2017). Το συγκεκριμένο είδος συγκεντρώνει αυξημένο επιδημιολογικό ενδιαφέρον, καθώς έχει αποδειχθεί ικανός διαβιβαστής σημαντικών ιογενών παθογόνων, όπως ο ιός Ζίκα, ο ιός του δάγκειου πυρετού και ο ιός του Δυτικού Νείλου. Επιπρόσθετα, αποτελεί δυνητικό διαβιβαστή πολλών ακόμα παθογόνων. Η ύπαρξη περιορισμένων αντιικών θεραπειών και εμβολίων υπογραμμίζουν την αναγκαιότητα σχεδιασμού και εφαρμογής προγραμμάτων ελέγχου πληθυσμών των *Ae. albopictus* ή περιορισμού της ικανότητας τους ως προς την μετάδοση των παθογόνων (Vanlandingham et al., 2016). Το βακτήριο *Wolbachia pipientis* είναι ένα υποχρεωτικά ενδοκυτταρικό α-πρωτεοβακτήριο, που μεταβιβάζεται μητρικά και μπορεί να επιδράσει στην αναπαραγωγική συμπεριφορά των ξενιστών του. Ο φαινότυπος της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας (CI), κατά την οποία η διασταύρωση ανάμεσα σε μολυσμένα αρσενικά με θηλυκά είτε μη μολυσμένα είτε μολυσμένα με διαφορετικό στέλεχος *Wolbachia* οδηγεί σε εμβρυικό θάνατο, είναι η πιο συχνή επίδραση που παρατηρείται μεταξύ των εντόμων ξενιστών (Werren et al., 2008). Για το λόγο αυτό πιστεύεται ότι η *Wolbachia* μπορεί να αποτελέσει τη βάση για την ανάπτυξη μεθόδων για τον πληθυσμιακό έλεγχο βλαβερών εντόμων, μεταξύ των οποίων και κουνουπιών. Επιπρόσθετα, η μόλυνση με *Wolbachia* φαίνεται πως μπορεί να επιδράσει αρνητικά στην αναπαραγωγή και αφθονία άλλων παθογόνων, δυνητικά περιορίζοντας τη μετάδοση αυτών στον άνθρωπο (Bourtzis et al., 2014; Utarini et al., 2021).

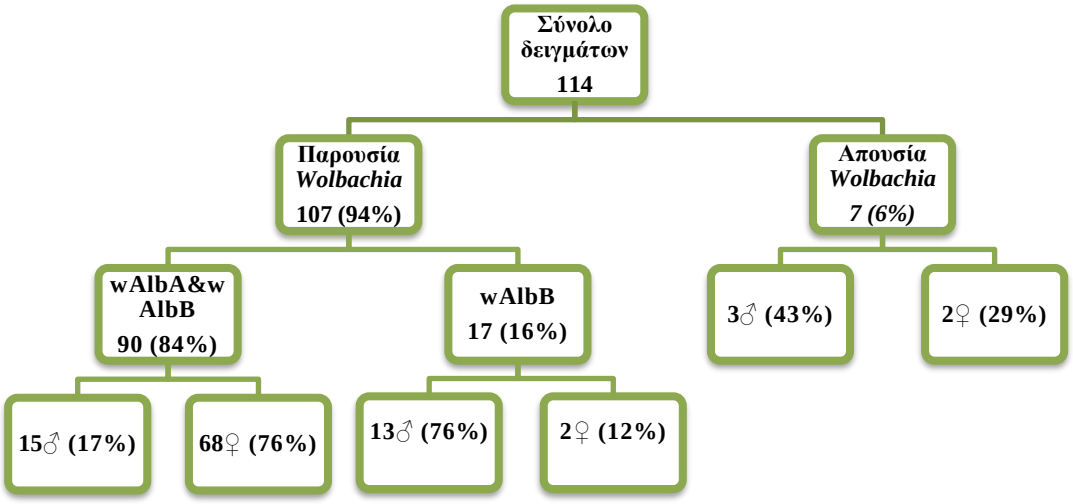
Η φυσική μόλυνση από *Wolbachia* στα έντομα υπολογίζεται σε ποσοστό 40-60% παγκοσμίως (da Silva et al., 2021). Συγκεκριμένα, στο *Ae. albopictus* η μόλυνση σε φυσικούς πληθυσμούς φτάνει συχνά στο 100%, ενώ έχουν αναγνωριστεί 2 στελέχη *Wolbachia* που ανήκουν στις υπερ-ομάδες A και B (wAlbA και wAlbB) (Dutton & Sinkins, 2004). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η πλειοψηφία των ατόμων, παρουσιάζουν μοτίβο παράλληλης μόλυνσης και με τα δύο στελέχη, με το ποσοστό των διπλά μολυσμένων ατόμων να είναι χαμηλότερο για τα αρσενικά (Tortosa et al., 2010). Έχει προταθεί ότι στα αρσενικά μπορεί να παρατηρηθεί απώλεια του στελέχους wAlbA, λόγω επίδρασης περιβαλλοντικών παραγόντων (Wiwatanaratanabutr & Kittayapong, 2006). Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της μόλυνσης από *Wolbachia* σε φυσικούς πληθυσμούς *Ae. albopictus* στον ελλαδικό χώρο.

Μέθοδοι

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από οκτώ νομούς της Ελλάδας που συλλέχθηκαν κατά τους μήνες Ιούλιο - Σεπτέμβριο του 2021 με παγίδες διοξειδίου του άνθρακα και φωτός τύπου CDC Mini light trap (Ecodev trap), στο πλαίσιο της συστηματικής εντομολογικής επιτήρησης στα έργα καταπολέμησης κουνουπιών στις εν λόγω περιοχές.. Το γενετικό υλικό απομονώθηκε από κάθε άτομο ξεχωριστά μέσω ενός τροποποιημένου πρωτοκόλλου βασισμένο στη μέθοδο CTAB (Doyle 1990). Η ανίχνευση της μόλυνσης από *Wolbachia* πραγματοποιήθηκε με PCR, με την χρήση εκκινητών για τη 16S συντηρημένη ριβοσωμική υπομονάδα του βακτηρίου, ενώ για τον διαχωρισμό των στελεχών σε wAlbA-wAlbB χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που στοχεύουν αλληλουχίες της πρωτεΐνης επιφάνειας wsp, ειδικές για κάθε στέλεχος (Zhou et al., 1998). Η συντηρημένη μιτοχονδριακή αλληλουχία του 12S ριβοσωμικού RNA του κουνουπιού χρησιμοποιήθηκε ως θετικός δείκτης. Επίσης, ενισχύθηκαν και αλληλουχήθηκαν 5 γονιδιακοί τόποι, με στόχο την πλήρη τυποποίηση των στελεχών σύμφωνα με το σύστημα MLST (Baldo et al., 2006). Με τα παραπάνω δεδομένα πρόκειται να πραγματοποιηθεί στατιστική συσχέτιση των παρατηρούμενων συχνοτήτων μολύνσεων με Wolbachia με περιβαλλοντικούς παράγοντες που συλλέχθηκαν από βάσεις δεδομένων για τις υπό μελέτη περιοχές.

Αποτελέσματα-Συζήτηση

Αναλύθηκαν επιτυχώς 114 άτομα *Ae. albopictus*. Το βακτήριο *Wolbachia* ανιχνεύθηκε σε 107 άτομα ενώ δεν ανιχνεύθηκε μόλυνση σε 7 άτομα, επιβεβαιώνοντας τα υψηλά ποσοστά μόλυνσης που αναμένονταν σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (da Silva et al., 2021). Όσον αφορά τα μολυσμένα άτομα, σε 90 ανιχνεύθηκε το μοτίβο της διπλής μόλυνσης, ενώ 17 βρέθηκαν μολυσμένα μόνο με το στέλεχος wAlbB (Σχήμα 1). Στην συντριπτική τους πλειοψηφία τα μονά μολυσμένα άτομα ήταν αρσενικά (Σχήμα 1), σε συμφωνία με την παρατηρούμενη τάση των αρσενικών ατόμων να χάνουν το στέλεχος wAlbA κατά τη διάρκεια της ζωής τους (Tortosa et al., 2010).



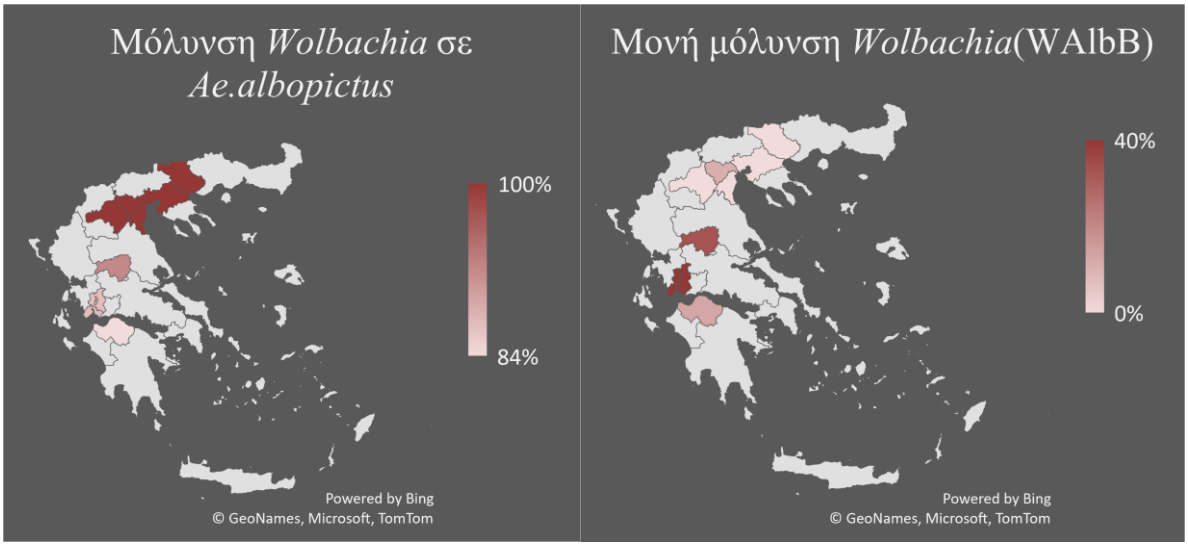
Σχήμα 1. Απεικόνιση κατανομής του μοτίβου της μόλυνσης από Wolbachia σε φυσικούς πληθυσμούς Ae. albopictus και κατανομή ανά φύλο (τα δείγματα απροσδιόριστου φύλου (συνολικά 11) δεν περιλαμβάνονται στα στοιχεία ανά φύλο)

Τα αναλυτικά αποτελέσματα ταξινομημένα ανά νομό και φύλο παρουσιάζονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 3: Κατανομή ανά νομό της φυσικής μόλυνσης από Wolbachia σε φυσικούς πληθυσμούς Ae. albopictus στον ελλαδικό χώρο

Νομός	Παρουσία *Wolbachia*	Διπλή μόλυνση (wAlbA&wAlbB)	Μονή μόλυνση (wAlbB)
ΑΙΤΩΛΟΑΚΑΡΝΑΝΙΑΣ	87% (13/15)	54% (5♂,2♀)	46% (3♂,3♀)
ΑΧΑΪΑΣ	84% (16/19)	87% (4♂,4♀/6?)	13% (1♂,1?)
ΗΜΑΘΙΑΣ	100% (9/9)	89% (8♀)	11% (1♀)
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ	100% (8/8)	100% (5♂,3♀)	-
ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ	93% (25/27)	68% (4♂,13♀)	32% (8♂)
ΚΟΖΑΝΗΣ	100% (19/19)	100% (19♀)	-
ΠΙΕΡΙΑΣ	100% (13/13)	100% (13♀)	-
ΣΕΡΡΩΝ	100% (4/4)	100% (4♀)	-

?: άτομα απροσδιόριστου φύλου



Εικόνα 6. Απεικόνιση της ποσοστιαίας διαβάθμισης της συνολικής (α) και της μονής (β) μόλυνσης από Wolbachia σε φυσικούς πληθυσμούς Ae. albopictus στους νομούς που μελετήθηκαν**.**

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε μεγαλύτερο ποσοστό συνολικής μόλυνσης στους βορειότερους νομούς σε σχέση με τους νοτιότερους (Εικόνα 1α). Αντιθέτως, τα ποσοστά μονής μόλυνσης από το στέλεχος wAlbB είναι υψηλότερα στους νοτιότερους νομούς συγκριτικά με τους πιο βόρειους (Εικόνα 1β). Ειδικότερα, οι περιοχές της Καρδίτσας και της Αιτωλοακαρνανίας παρουσιάζουν το υψηλότερο ποσοστό ατόμων όπου ανιχνεύεται μονή μόλυνση (Πίνακας 1, Εικόνα 1β). Το γεγονός ότι η πλειοψηφία των δειγμάτων που εντοπίστηκε μονή μόλυνση είναι αρσενικά (Πίνακας 1), οδηγούν στην υπόθεση ότι στα αρσενικά άτομα μειώνονται σημαντικά τα επίπεδα του στελέχους wAlbA στους νοτιότερους νομούς. Στη συνέχεια, επιλεγμένα στελέχη από την βόρεια και τη νότια Ελλάδα τυποποιήθηκαν μέσω του συστήματος MLST και αλληλουχήθηκαν, με απώτερο στόχο την εύρεση ποικιλομορφίας (ταυτοποίηση σε εξέλιξη). Με την ολοκλήρωση της ταυτοποίησης θα πραγματοποιηθεί βιοπληροφορική ανάλυση συσχέτισης μεταξύ των μοτίβων της μόλυνσης από *Wolbachia* και περιβαλλοντικών παραγόντων.

Βιβλιογραφία

Badieritakis, Papachristos, D., Latinopoulos, D., Stefopoulou, Kolimenakis, Bithas, K., Patsoula, Beleri, S., Maselou, D., Balatsos, G., & Michaelakis. (2017). *Aedes albopictus* (Skuse, 1895) (Diptera:

Culicidae) in Greece: 13 years of living with the Asian tiger mosquito. *Parasitology Research*, 117(2), 453–460.

Baldo, L., Dunning Hotopp, J. C., Jolley, K. A., Bordenstein, S. R., Biber, S. A., Choudhury, R. R., Hayashi, C., Maiden, M. C. J., Tettelin, H., & Werren, J. H. (2006). Multilocus Sequence Typing System for the Endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7098–7110.

Bourtzis, K., Dobson, S. L., Xi, Z., Rasgon, J. L., Calvitti, M., Moreira, L. A., Bossin, H. C., Moretti, R., Baton, L. A., Hughes, G. L., Mavingui, P., & Gilles, J. R. (2014). Harnessing mosquito–Wolbachia symbiosis for vector and disease control. *Acta Tropica*, 132, S150–S163.

Doyle, J. J. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus (Madison)*. 12, 13–15.

Dutton, T. J., & Sinkins, S. P. (2004). Strain-specific quantification of *Wolbachia* density in *Aedes albopictus* and effects of larval rearing conditions. *Insect Molecular Biology*, 13(3), 317–322.

Inácio da Silva, L. M., Dezordi, F. Z., Paiva, M. H. S., & Wallau, G. L. (2021). Systematic Review of Wolbachia Symbiont Detection in Mosquitoes: An Entangled Topic about Methodological Power and True Symbiosis. *Pathogens*, 10(1), 39.

Swan, T., Russell, T. L., Staunton, K. M., Field, M. A., Ritchie, S. A., & Burkot, T. R. (2022). A literature review of dispersal pathways of *Aedes albopictus* across different spatial scales: implications for vector surveillance. *Parasites and Vectors*, 15(1).

Tortosa, P., Charlat, S., Labbé, P., Dehecq, J. S., Barré, H., & Weill, M. (2010). *Wolbachia* Age-Sex-Specific Density in *Aedes albopictus*: A Host Evolutionary Response to Cytoplasmic Incompatibility? *PLoS ONE*, 5(3), e9700.

Utarini, A., Indriani, C., Ahmad, R. A., Tantowijoyo, W., Arguni, E., Ansari, M. R., Supriyati, E., Wardana, D. S., Meitika, Y., Ernesia, I., Nurhayati, I., Prabowo, E., Andari, B., Green, B. R., Hodgson, L., Cutcher, Z., Rancès, E., Ryan, P. A., O'Neill, S. L., Dufault, S. M., Tanamas K. S., Jewell P. N., Anders L. K., Simmons P. C., & AWED Study Group (2021). Efficacy of Wolbachia-Infected Mosquito Deployments for the Control of Dengue. *The New England journal of medicine*, 384(23), 2177–2186.

Vanlandingham, D. L., Higgs, S., & Huang, Y. J. S. (2016). *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and Mosquito-Borne Viruses in the United States: Table 1. *Journal of Medical Entomology*, 53(5), 1024–1028.

Werren, J. H., Baldo, L., & Clark, M. E. (2008). *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 741–751.

Wiwatanaratanabutr, S., & Kittayapong, P. (2006). Effects of temephos and temperature on *Wolbachia* load and life history traits of *Aedes albopictus*. *Medical and Veterinary Entomology*, 20(3), 300–307.

Zhou, W., Rousset, F., & O'Neill, S. (1998). Phylogeny and PCR–based classification of Wolbachia strains using wsp gene sequences. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 265(1395), 509–515.

Ανάπτυξη multiplex PCR για τη μοριακή ταυτοποίηση τεσσάρων ειδών της οικογένειας Mullidae, διαθέσιμων στην Ελληνική αγορά

ΓΙΑΝΤΣΗΣ Α. Ιωάννης[1,2], ΤΟΚΑΜΑΝΗ Μαρία[2], ΤΖΑΤΖΑΝΗ Στέλλα[3], ΧΑΤΖΗΝΙΚΟΛΑΟΥ Εμμανουέλα[3], ΤΩΡΟΣ Αθανάσιος[2], ΜΠΟΥΧΟΡΙΚΟΥ Αναστασία[2], ΤΣΟΜΑΚΙΔΗΣ Πέτρος[2], ΣΑΚΚΑ Ελένη[2], ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΙΔΗΣ Γεώργιος[4], ΣΑΝΔΑΛΤΖΟΠΟΥΛΟΣ Μ. Ραφαήλ[2], ΑΠΟΣΤΟΛΙΔΗΣ Π. Απόστολος[2,3]

[1]*Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Μακεδονίας,* igiantsis@uowm.gr
[2]*Σχολή Υγείας, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης,* tokamanimaria@hotmail.com, athanasiostoros@gmail.com, anasbouc@mbg.duth.gr, petrostsomakidis@gmail.com, elensakk@mbg.duth.gr, rmsandal@mbg.duth.gr
[3]*Σχολή Γεωπονίας, Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος, ΑΠΘ,* apaposto@agro.auth.gr, stellatzz13@gmail.com, chatzini@agro.auth.gr
[4]*Σχολή Επιστημών των Ζώων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών,* gvtrianta@aua.gr

Περίληψη
Η αντικατάσταση ενός ακριβού προϊόντος διατροφής από ένα σχετικά φθηνότερο με σκοπό την κερδοσκοπία και την παραπλάνηση του καταναλωτή αποτελεί ένα συχνό φαινόμενο νοθείας μείζονος σημασίας. Η επαλήθευση της ταυτότητας αλιευμάτων μπορεί να γίνει σύμφωνα με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους ενώ όταν το δείγμα είναι κατεστραμμένο, μεταποιημένο ή και μαγειρεμένο, είναι απαραίτητα μοριακά εργαλεία για το σκοπό αυτό. Η παρούσα μελέτη εστιάζει στην ταυτοποίηση ειδών ιχθύων της οικογένειας *Mullidae*, που αλιεύονται στις Ελληνικές θάλασσες ή διακινούνται στην Ελληνική αγορά. Πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία περισσότερων από 300 ιχθύων από μεγάλο εύρος της Ελληνική επικράτειας, της Μαύρης θάλασσας και κατεψυγμένων δειγμάτων από τον Ατλαντικό (FAO34). Χρησιμοποιώντας μοριακούς δείκτες, ταυτοποιήθηκαν περιοχές με μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς, μοναδικούς για κάθε είδος στα μιτοχονδιακά γονίδια COI και Cyt B. Στη συνέχεια, κατασκευάστηκαν ειδοειδικοί εκκινητές βάσει των οποίων αναπτύχθηκαν δύο ανεξάρτητες τεχνικές multiplex PCR που επιτρέπουν τον έλεγχο της αυθεντικότητας των ιχθύων. Η εφαρμογή των μεθοδολογιών αυτών αναμένεται να συμβάλει στον έλεγχο της αυθεντικότητας και στον εντοπισμό φαινομένων νοθείας.

Λέξεις Κλειδιά
Νοθεία, *Mullidae*, Multiplex PCR

Εισαγωγή
Η νοθεία τροφίμων μέσω εσφαλμένης σήμανσης είναι παράνομη πρακτική και η δυνατότητα εξακρίβωσης της ταυτότητας των προϊόντων είναι μείζονος σημασίας για τους καταναλωτές. Η λανθασμένη σήμανση της προέλευσης λαμβάνει χώρα συνήθως σε μεταποιημένα ή κατεψυγμένα προϊόντα. Το θέμα αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία για τα ψάρια, καρκινοειδή και μαλάκια, τα οποία νοθεύονται εύκολα κυρίως λόγω της δύσκολης μορφολογικής αναγνώρισης. Τα είδη ψαριών της οικογένειας *Mullidae* θεωρούνται από τα πιο υψηλής αξίας θαλασσινά που διακινούνται στην Ελλάδα. Συγκεκριμένα, η κουτσομούρα (*Mullus barbatus*) και το μπαρμπούνι (*Mullus surmuletus*) είναι αμφότερα αυτόχθονα στο Αιγαίο και Ιόνιο Πέλαγος. Ωστόσο, τα δύο αυτά είδη νοθεύονται ή συγχέονται με τον λοχία (*Upeneus moluccensis*), έναν λεσσεψιανό μετανάστη που απαντάται στη Νοτιοανατολική Μεσόγειο , καθώς και με το εισαγόμενο είδος *Pseudupeneus prayensis* που πωλείται και ως μπαρμπούνι Σενεγάλης. Η αξία του τελευταίου είναι αρκετά χαμηλότερη σε σύγκριση με αυτή των αυτόχθονων ειδών. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να αναπτυχθεί μία ταχεία μοριακή τεχνική για την ταυτοποίηση των παραπάνω ειδών ιχθύων.

Μέθοδοι
Η δειγματοληψία των ειδών *M. barbatus*, *M. surmuletus* και *U. moluccensis* πραγματοποιήθηκε από περιοχές της Ελλάδας, της Κύπρου καθώς και της Μαύρης Θάλασσας (Constantza Ρουμανίας, Burgas Βουλγαρίας). Επιπλέον, 20 δείγματα *P. prayensis* αγοράστηκαν από την Ελληνική αγορά. Συνολικά συλλέχθηκαν περισσότερα από 300 δείγματα, τα οποία ταυτοποιήθηκαν βάσει μορφολογικών χαρακτηριστικών. Το γενετικό υλικό απομονώθηκε με το kit NucleoSpin Tissue της εταιρίας Macherey-

Nagel από ιστό πτερυγίου. Για την αναζήτηση πολυμορφισμών εξετάστηκαν τα γονίδια της μιτοχονδριακής υπομονάδας οξειδάσης του κυτοχρώματος C (COI) και του κυτοχρώματος b (Cyt B) όπως προέκυψαν ύστερα από ενίσχυση των τμημάτων με καθολικούς εκκινητές της βιβλιογραφίας [FISHCO1LBC-FISHCO1HBC (Handy κ.α. 2011), L14841-H15149 (Kocher κ.α.1989)]. Η ενίσχυση των τμημάτων έγινε με το KAPA HiFi PCR Kit (#KK2101) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα προϊόντα της PCR καθαρίστηκαν με το kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) και ακολούθησε αλληλούχισή τους με τη μέθοδο Sanger με χρήση του ανοδικού και καθοδικού εκκινητή.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης Sanger αναλύθηκαν με το εργαλείο UGENE (Okonechnikov κ.α. 2012). Στη συνέχεια ακολούθησε ο σχεδιασμός και η βελτιστοποίηση της διαγνωστικής δοκιμασίας multiplex PCR για τους δύο γενετικούς τόπους. Οι 5 εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην κάθε δοκιμασία παρουσιάζονται στην Εικόνα 1. Η ενίσχυση των τμημάτων έγινε με το FastGene Taq 2x Ready Mix (NIPPON Genetics, Europe). Οι αντιδράσεις συνολικού όγκου 20 μl περιείχαν 10 μl FastGene Taq 2x Ready Mix, 0,3 pmol από τον κάθε εκκινητή, 10-30ng DNA και νερό μέχρι τον τελικό όγκο. Οι συνθήκες της κάθε αντίδρασης ήταν: 95^{o}C για 3 min, για 40 κύκλους- 94^{o}C για 30 sec, 58 ^{o}C για 40 sec, 72^{o}C για 50 sec- και στους 72^{o}C για 5 min. Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, αποδίδοντας μια ενιαία καθαρή ζώνη διαγνωστικού μεγέθους για κάθε είδος.

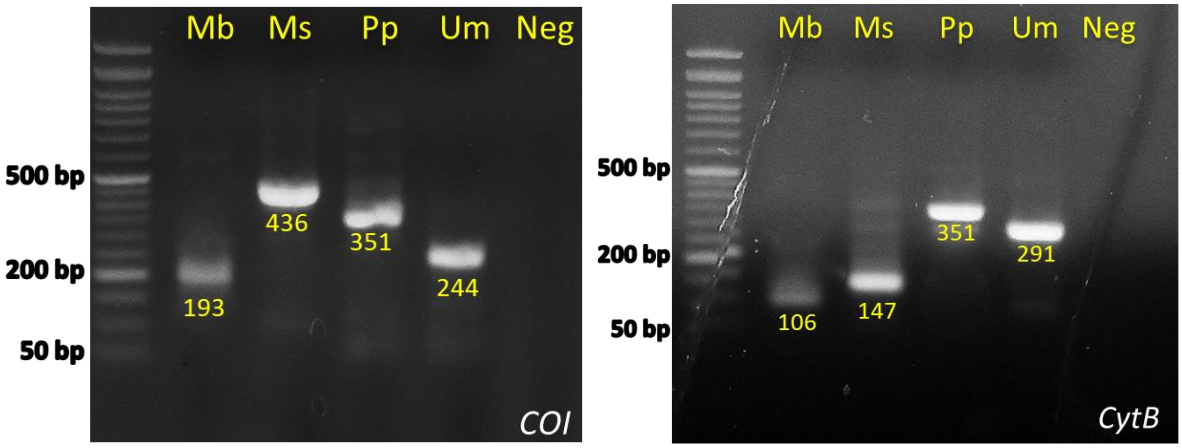
Αποτελέσματα

Η σύγκριση των αλληλουχιών μεταξύ τους καθώς και με αλληλουχίες αναφοράς στη βάση δεδομένων Genebank οδήγησε στο χαρακτηρισμό ειδοειδικών πολυμορφισμών μεμονωμένων νουκλεοτιδίων (Εικόνα 1). Για τη διάκριση των τεσσάρων ειδών σχεδιάστηκε μια multiplex PCR για κάθε γονίδιο. Οι δύο δοκιμασίες βασίζονται σε ειδικούς για το είδος εκκινητές και παρουσιάζονται στην Εικόνα 1. Οι δύο αντιδράσεις multiplex PCR βελτιστοποιήθηκαν και ελέγχθηκαν σε περισσότερα από 100 δείγματα και από τα 4 είδη, για να ελεγχθεί η επιτυχής ταυτοποίηση τους. Σε όλες τις περιπτώσεις η δοκιμασία μπορούσε να ταυτοποιήσει επιτυχώς το είδος του δείγματος σε ποσοστό 100%. Ενδεικτικά, παρουσιάζονται στην Εικόνα 2 αποτελέσματα των δύο multiplex PCR. Τα προϊόντα που προκύπτουν μπορούν να διαχωριστούν εύκολα σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%.

Συζήτηση

Η νοθεία στα αλιεύματα είναι το σύνολο των πρακτικών που γίνονται είτε εκούσια με σκοπό την παραπλάνηση των συναλλασσόμενων (επιχειρήσεις, καταναλωτές) ή ακούσια λόγω άγνοιας των επιστημονικών ονομασιών. Σε κάθε περίπτωση, αποτελεί μείζον πρόβλημα της Ελληνικής αγοράς. Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη μεθοδολογίας για τη διάκριση των 2 ειδών της οικογένειας *Mullidae* με μεγάλο αγοραστικό ενδιαφέρον, έναντι του εισαγόμενου είδους χαμηλότερης οικονομικής αξίας *Pseudupeneus prayensis* και του λεσσεψιανού μετανάστη *Upeneus moluccensis*. Έχοντας αυτό υπόψη, σχεδιάστηκαν δύο τεχνικές multiplex PCR για την ταυτοποίηση των τεσσάρων ειδών. Η δυνατότητα εφαρμογής αυτών των οικονομικών, γρήγορων και εύκολων στην εφαρμογή μεθοδολογιών αναμένεται να συμβάλει στον εντοπισμό και στην εξάλειψη της εκούσιας ή ακούσιας εμπορικής νοθείας.

Εικόνα 7. Στοίχιση των αλληλουχιών των προς μελέτη ειδών και σήμανση του κοινού και των ειδοειδικών εκκινητών που χρησιμοποιούνται στη διαγνωστική multiplex PCR.



Εικόνα 8. Αποτελέσματα της δοκιμασίας Multiplex PCR COI(αριστερά) και Cyt b (δεξιά) για τα είδη *Mullus barbatus* (Mb), *Mullus surmuletus* (Ms), *Pseudupeneus prayensis* (Pp) και *Upeneus moluccensis* (Um).

Βιβλιογραφία

Handy, S. M., Deeds, J. R., Ivanova, N. V., Hebert, P. D., Hanner, R. H., Ormos, A., ... & Yancy, H. F. (2011). A single-laboratory validated method for the generation of DNA barcodes for the identification of fish for regulatory compliance. *Journal of AOAC International*, 94(1), 201-210.

Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Pääbo, S., Villablanca, F. X., & Wilson, A. C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(16), 6196-6200.

Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., & Ugene Team. (2012). Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 28(8), 1166-1167.

Χρηματοδότηση – ευχαριστίες: Η εργασία χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα Αλιείας 2014-2020 στα πλαίσια του έργου FISHMID με κωδικό MIS 5033599.

Ο εποχικός κύκλος φωτοσυνθετικών χρωστικών στο ίζημα μιας εύτροφης λίμνης

ΚΙΤΣΟΥ Αικατερίνη, ΜΟΣΧΟΣ Στέφανος, ΠΙΠΕΡΑΓΚΑΣ Οδυσσέας, ΚΑΡΑΓΙΑΝΝΗ Ήρα

Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων 45110, Ιωάννινα, katkitsou@hotmail.com
Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων 45110, Ιωάννινα, st.moschos@uoi.gr
Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων 45110, Ιωάννινα, o.piperagkas@uoi.gr
Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων 45110, Ιωάννινα, hkaray@uoi.gr

Περίληψη
Η μελέτη του ιζήματος είναι ιδιαίτερης αξίας για την παρακολούθηση και εκτίμηση της οικολογικής κατάστασης ενός λιμναίου οικοσυστήματος, καθώς αλληλοεπιδρά με τη στήλη του νερού και επηρεάζει την δομή και τη λειτουργία του. Στην παρούσα εργασία έγινε μελέτη των διακυμάνσεων της χλωροφύλλης-α και της φαιοφυτίνης που περιέχονται στο επιφανειακό ίζημα (0-7 cm) ενός παράκτιου σταθμού της λίμνης Παμβώτιδας μεταξύ Απριλίου και Δεκεμβρίου 2018. Επιπλέον, μετρήθηκε το ποσοστό της ολικής, ευδιάσπαστης και δυσδιάσπαστης οργανικής ύλης στο ίζημα και οι φυσικοχημικές παράμετροι της στήλης του νερού. Τα αποτελέσματα έδειξαν κάθετη διαστρωμάτωση της χλωροφύλλης-α και της οργανικής ύλης, με φθίνουσες τιμές καθώς αυξανόταν το βάθος, πιθανόν ως απόκριση στην εαρινή και φθινοπωρινή φυτοπλαγκτική άνθιση, και σημαντική αποδόμηση της χλωροφύλλης-α μετά την θερινή περίοδο. Η μεταβλητότητα των βιοτικών παραμέτρων παρείχε σημαντικές πληροφορίες για αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών στο ίζημα, αλλά και με την υπερκείμενη υδάτινη στήλη.

Λέξεις-κλειδιά
Ίζημα, χλωροφύλλη, φαιοφυτίνη, Παμβώτιδα

Εισαγωγή
Η μελέτη των φωτοσυνθετικών χρωστικών στο ίζημα μιας λίμνης παρέχει πληροφορίες για την φύση και τις πηγές των οργανικών εισροών σε αυτό, και τα συμπεράσματα μπορούν να εξαχθούν ευκολότερα από οποιοδήποτε άλλο οργανικό υλικό (Nalepa & Quigley 1987). Σύμφωνα με τους Welschmeyer & Lorenzen (1985) ο λόγος χλωροφύλλη/φαιοφυτίνη μπορεί να δείξει την φυσιολογική κατάσταση των οργανισμών κατά το χρόνο της δειγματοληψίας και να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης της αύξησης του φυτοπλαγκτού, της κυτταρικής γήρανσης και της βόσκησης από το ζωοπλαγκτό. Εκτός από τις φωτοσυνθετικές χρωστικές η ολική οργανική ύλη που διατηρείται στα ιζήματα μπορεί να δώσει πληροφορίες για μεταβολές στο οικοσύστημα σε διάφορες χρονικές κλίμακες (Meyers & Teranes 2001). Η Παμβώτιδα χαρακτηρίζεται Ειδική Ζώνη Διατήρησης και Ζώνη Ειδικής Προστασίας σύμφωνα με το δίκτυο Φύση 2000. Η σημαντικότητά της οφείλεται στην υψηλή βιοποικιλότητα, τον ενδημισμό, τα ενδιαιτημάτα και τις οικοσυστημικών υπηρεσιών που προσφέρει (Latinopoulos, Koulouri & Kagalou 2020). Σκοπός της εργασίας είναι να μελετηθεί η απόκριση του ιζήματος της λίμνης τις περιόδους που καταγράφεται φυτοπλαγκτική άνθιση στη στήλη του νερού.

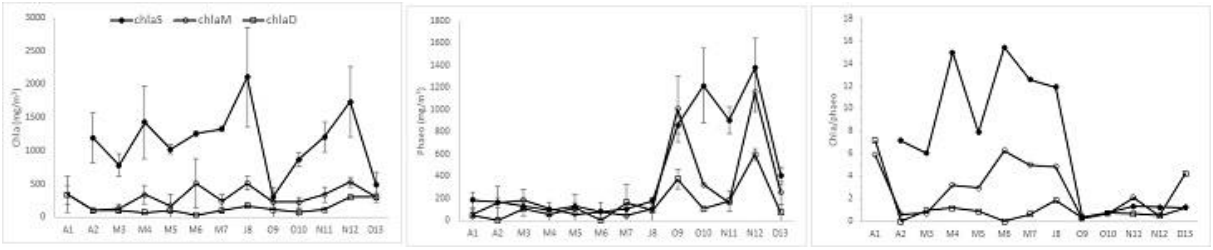
Μέθοδοι
Ως σταθμός δειγματοληψίας επιλέχθηκε η παραλία του Ναυτικού Ομίλου Ιωαννίνων, (Παμβώτιδα). Πραγματοποιήθηκαν 13 δειγματοληψίες μεταξύ Απριλίου και Δεκεμβρίου 2018. Σε κάθε δειγματοληψία ελήφθησαν εις διπλούν δείγματα για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των φωτοσυνθετικών χρωστικών και του ποσοστού της οργανικής ύλης ανά ξηρή μάζα ίζηματος, και γινόντουσαν μετρήσεις των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών (T, pH, TDS, DO κλπ) της στήλης του νερού. Για τη δειγματοληψία χρησιμοποιήθηκαν σύριγγες διαμέτρου 2cm, οι οποίες τοποθετούνταν κάθετα στο ίζημα προκείμενου να ληφθεί δείγμα από τρία βάθη μεταξύ της επιφάνειας (S) και 6-7cm (D). Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των φωτοσυνθετικών χρωστικών έγινε με μέτρηση της απορρόφησης στα 664nm και 750nm μετά από εκχύλιση σε ακετόνη 90%v/v στο σκοτάδι, στους 4^{o}C

(Parsons, Maita & Lalli 1984). Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της φαιοφυτίνης έγινε μετά από οξίνιση του δείγματος με HCl 10%v/v. Για τον προσδιορισμό της ευδιάσπαστης και δυσδιάσπαστης οργανικής ύλης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Loss On Ignition (Loh et al. 2008). Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με χρήση του Past4.

Αποτελέσματα

Η συγκέντρωση της χλωροφύλλης-α ήταν μέγιστη στην επιφάνεια του ιζήματος και μειωνόταν όσο αυξανόταν το βάθος του (Σχήμα 1). Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν ανάμεσα στους ορίζοντες δειγματοληψίας ήταν στατιστικά σημαντικές (Kruskal-Wallis, $p<0,05$). Η φαιοφυτίνη παρουσίασε μέγιστη συγκέντρωση μετά το καλοκαίρι, στην επιφάνεια του ιζήματος. Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν μόνο μεταξύ του επιφανειακού και του βαθύτερου ορίζοντα (Kruskal-Wallis, $p<0,05$). Η συγκέντρωση της φαιοφυτίνης, σε αντίθεση με αυτήν της χλωροφύλλης είχε στατιστικά σημαντική, αρνητική συσχέτιση (Spearman $r=-0,65$, $p<0,05$) με την θερμοκρασία του υπερκείμενου νερού που κυμάνθηκε μεταξύ 12 και 26^{o}C. Οι λόγοι χλωροφύλλης-α/φαιοφυτίνη ήταν γενικά υψηλότεροι στους επιφανειακούς ορίζοντες από τον Απρίλιο έως τον Ιούνιο και μειώνονταν όσο αυξανόταν το βάθος (Σχήμα 1). Από τον Οκτώβριο έως τον Δεκέμβριο οι λόγοι ήταν χαμηλότεροι και δεν εμφάνιζαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών οριζόντων. Ο μέσος όρος των λόγων την πρώτη περίοδο δειγματοληψίας ήταν ~7 και την δεύτερη ~1.

Το ποσοστό της οργανικής ύλης επί του ξηρού βάρους του ιζήματος κυμάνθηκε από 0,6 έως 4%. Όταν λήφθηκαν όλα τα δεδομένα υπόψη βρέθηκε ότι το ποσοστό της ευδιάσπαστης οργανικής ύλης ήταν κατά μέσο όρο υψηλότερο x1.4 από αυτό της δυσδιάσπαστης.



Σχήμα 1. Διακυμάνσεις χλωροφύλλης-α (chla), φαιοφυτίνης (phaeo) και chla/phaeo στις δειγματοληψίες (1, 2, 3...) μεταξύ Απριλίου (A) και Δεκεμβρίου (D) στον επιφανειακό (S), ενδιάμεσο (M) και βαθύ (D) ορίζοντα.

Ανάλυση κυρίων συνιστωσών έδειξε ομαδοποίηση των επιφανειακών δειγμάτων του ιζήματος που λήφθηκαν μεταξύ Απριλίου και Ιουνίου και αυτών που λήφθηκαν μεταξύ Οκτωβρίου και Δεκεμβρίου. Από τις περιβαλλοντικες παραμέτρους που εξετάστηκαν η χλωροφύλλη-α (~70%) και η φαιοφυτίνη (~29%) ήταν αυτές που εξηγούσαν την διασπορά των δεδομένων.

Συμπεράσματα

Στο ρηχό ίζημα της λίμνης Παμβώτιδας καταγράφεται διαστρωμάτωση στην συγκέντρωση της χλωροφύλλης-α τις δυο περιόδους δειγματοληψίας υποδεικνύοντας ευνοϊκές συνθήκες για την αύξηση βενθικών φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών ή/και καταβύθιση φυτοπλαγκτού (Fietz, Sturm & Nicklisch 2005) μετά την εαρινή και φθινοπωρινή άνθιση που καταγράφεται στην περιοχή μελέτης (Moschos, Piperagkas & Karayanni 2021, Tsola et al. 2018). Η αποδόμηση της συσσωρευμένης χλωροφύλλης μέσω βακτηριακής δραστηριότητας (Moschos, Piperagkas & Karayanni 2021) ή βόσκησης από βενθικά ασπόνδυλα (Szymczak-Żyła, Kowalewska & Louda 2011) αποτυπώνεται στην αύξηση της συγκέντρωσης της φαιοφυτίνης από τον Οκτώβριο έως το Νοέμβριο. Οι υψηλοί λόγοι chla/phaeo την άνοιξη συμφωνούν με την παρουσία φωτοσυνθετικών οργανισμών σε «καλή φυσιολογική» κατάσταση ενώ το φθινόπωρο λόγοι ~1 και αύξηση του ποσοστού της οργανικής ύλης, επιβεβαιώνουν την συγκέντρωση αποδομημένου υλικού κατά την θερμή περίοδο. Επιπλέον ο λόγος chla/phaeo >>1 επιβεβαιώνει την έντονη διαστρωμάτωση του ιζήματος την άνοιξη (Deshpande et al.

2014). Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι οι χρωστικές του ιζήματος, αντανακλώντας τις συνθήκες που επηρεάζουν την παραγωγικότητα στην στήλη του νερού και το ίζημα και την συσσώρευση οργανικής ύλης, αποτελούν έναν σημαντικό βιοδείκτη της οικολογικής κατάστασης του οικοσυστήματος. Περαιτέρω μελέτες σε δίκτυο σταθμών και σε μεγαλύτερη χρονική κλίμακα θα οδηγήσουν στην καλύτερη κατανόηση των αλληλεπιδράσεων και των ροών μεταξύ ιζήματος και στήλης νερού.

Βιβλιογραφία

Deshpande, B. N., Tremblay, R., Pienitz, R., & Vincent, W. F. (2014). Sedimentary pigments as indicators of cyanobacterial dynamics in a hypereutrophic lake. *Journal of Paleolimnology*, 52, 171–184.

Fietz, S., Sturm, M. & Nicklisch, A. (2005). Flux of lipophilic photosynthetic pigments to the surface sediments of Lake Baikal. *Global and Planetary Change*, 46, 29–44.

Latinopoulos, D., Koulouri, M. & Kagalou, I. (2020). How historical land use/land cover changes affected ecosystem services in lake Pamvotis, Greece. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 27, 1472–1491.

Loh, P. S., Miller, A. E. J., Reeves, A. D., Harvey, S. M., Overnell, J. (2008). Assessing The biodegradability of terrestrially-derived organic matter in Scottish sea loch sediments. *Hydrology and Earth System Sciences*, 12, 811 - 823.

Meyers, P. A., Teranes, J. L., (2002). Sediment organic matter. In: Tracking environmental change using lake sediments, volume 2, Physical and geochemical methods, Last W. M., Smol J. P.(eds), *Developments in Paleoenvironmental Research*, 239-269. Dordrecht: Springer.

Moschos, S., Piperagkas, O. & Karayanni, H. (2021). A vertically and temporally diverse bacterial community in a shallow lake-water sediment site of a eutrophic lake. *Inland Waters*, 11, 141–153.

Nalepa, T. F., & Quigley, M. A. (1987). Distribution of Photosynthetic Pigments in Nearshore Sediments of Lake Michigan. *Journal of Great Lakes Research*, 13, 37–42.

Parsons, T. R., Maita, Y. & Lalli, C. M. (1984). *A manual of chemical and biological methods for seawater analysis*. Oxford: Pergamon Press.

Szymczak-Żyła, M., Kowalewska, G. & Louda, J. W. (2011). Chlorophyll-a and derivatives in recent sediments as indicators of productivity and depositional conditions. *Marine Chemistry*, 125, 39–48.

Tsola, S. L., Renta, C., Macingo, S. C. & Karayanni, H. (2018). Size-fractionated chlorophyll a and phycocyanin temporal variations in a highly eutrophic lake and its isolated karstic springs. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 47, 118–127.

Welschmeyer, N. A., & Lorenzen, C. J. (1985). Chlorophyll budgets: Zooplankton grazing and phytoplankton growth in a temperate fjord and the Central Pacific Gyres1. *Limnology and Oceanography*, 30, 1–21.

Αποδόμηση της φαινόλης από ελεύθερα και ακινητοποιημένα κύτταρα Pseudarthrobacter phenanthrenivorans Sphe3: βιοχημική και μεταγραφομική προσέγγιση του μεταβολικού μονοπατιού

ΑΣΗΜΑΚΟΥΛΑ Σταματία, ΜΑΡΙΝΑΚΟΣ Ορφέας, ΚΟΥΚΚΟΥ Άννα-Ειρήνη

Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας (Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων), s.asimakoula@uoi.gr
Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας (Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων), orfmar@hotmail.com
Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας (Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων), akukku@uoi.gr

Περίληψη
Η φαινόλη είναι ένας από τους σημαντικότερους τοξικούς ρύπους στα απόβλητα βιομηχανιών που πρέπει να απομακρυνθεί πριν την απόρριψή τους. Η μικροβιακή αποδόμηση είναι η προτιμώμενη μέθοδος για την απομάκρυνσή της. Το *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 βρέθηκε ότι μπορεί να αναπτύσσεται παρουσία φαινόλης ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας. Σκοπός της εργασίας ήταν η μελέτη της αποδόμησης της φαινόλης από ελεύθερα και ακινητοποιημένα κύτταρα Sphe3 και η διερεύνηση του μονοπατιού που χρησιμοποιεί το βακτήριο για τον καταβολισμό της. Η βιοαποδόμηση εξελίσσεται ταχύτερα με τα ακινητοποιημένα κύτταρα σε σχέση με τα ελεύθερα. Τα ακινητοποιημένα κύτταρα Sphe3 διατηρούν την ικανότητα αποδόμησης φαινόλης ακόμη και μετά από 30 μέρες αποθήκευσης και επίσης μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν για τουλάχιστον 5 κύκλους διατηρώντας το 80% της αρχικής ικανότητας καταβολισμού της φαινόλης. Στο Sphe3, αν και είναι ενεργή η ορθο- και η μετα-σχάση της κατεχόλης, φαίνεται να επικρατεί το ορθο-μεταβολικό μονοπάτι για την αποδόμηση της φαινόλης.

Λέξεις-κλειδιά
Pseudarthrobacter phenanthrenivorans Sphe3, φαινόλη, 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης, 2,3-διοξυγονάση της κατεχόλης, ακινητοποίηση κυττάρων.

Εισαγωγή

Η φαινόλη είναι ένα υψηλής τοξικότητας οργανικό μόριο που συναντάται συχνά σε εγκαταστάσεις παραγωγής χαρτιού, εγκαταστάσεις παραγωγής χρωστικών ουσιών και διυλιστήρια πετροχημικών. Λόγω της υψηλής της διαλυτότητάς της στο νερό μπορεί συσσωρεύεται σε υδάτινα περιβάλλοντα και έχει θεωρηθεί ως μια από τις 20 πιο επικίνδυνες χημικές ενώσεις που ενδέχεται να προκαλέσουν μεγάλη οικολογική καταστροφή (Duan et al., 2018). Για την απομάκρυνση των φαινολών από το περιβάλλον, η πιο οικονομικά προσιτή και περιβαλλοντικά ωφέλιμη μέθοδος είναι η βιοαποδόμηση, ενώ ορισμένοι μικροοργανισμοί μπορούν να αξιοποιήσουν τη φαινόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας. Η αερόβια βιοαποδόμηση της φαινόλης ξεκινά με την εισαγωγή ενός οξυγόνου από το ένζυμο υδροξυλάση της φαινόλης προς μετατροπή της σε κατεχόλη, η οποία στη συνέχεια διασπάται από την 1,2- (ορθο-) ή την 2,3-διοξυγονάση της κατεχόλης (μετα-σχάση) (Roell et al., 2019). Το *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 είναι ένα θετικό κατά Gram βακτήριο το οποίο έχει απομονωθεί με την δυνατότητα να αποικοδομεί πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (Kallimanis et al., 2009). Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας επιχειρήθηκε επιτυχώς η ανάπτυξη του Sphe3 χρησιμοποιώντας ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας τη φαινόλη. Μετά από *in silico* μελέτη του γονιδιώματος του Sphe3 εντοπίστηκαν γονίδια που πιθανώς εμπλέκονται στον καταβολισμό της φαινόλης, κωδικεύοντας για υδροξυλάση της φαινόλης, 1,2- και 2,3-διοξυγονάση της κατεχόλης Επομένως μελετήθηκε αφενός η έκφραση των ανωτέρω γονιδίων, και αφετέρου η αποδόμηση της φαινόλης από ελεύθερα και ακινητοποιημένα κύτταρα σε σφαιρίδια αλγινικού νατρίου.

Μέθοδοι

Ανάπτυξη κυττάρων

Το Sphe3 αναπτύχθηκε σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης M9 με φαινόλη (300, 500, 750, 1000, 1200 mg/L) ή γλυκόζη (400 mg/L) ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας.

Μεταγραφομική ανάλυση

Η έκφραση των επιλεγμένων γονιδίων μελετήθηκε με Real Time-qPCR σε κύτταρα που αναπτύχθηκαν παρουσία φαινόλης ως μοναδικής πηγής άνθρακα και ενέργειας σε σύγκριση με τη γλυκόζη, όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως (Tsagogiannis et al., 2021).

Ενζυμικοί προσδιορισμοί

Οι δραστικότητες των ενζύμων υδροξυλάση της φαινόλης, 1,2-διοξυγονάση της κατεχόλης και 2,3-διοξυγονάση της κατεχόλης μετρήθηκαν σε κυτταρικά εκχυλίσματα του Sphe3, ελεύθερα κυττάρων, σύμφωνα με σχετικές έρευνες (Gurujeyalakshmi & Oriel, 1989, Nakazawa & Nakazawa, 1957, Nozaki, 1979).

Ακινητοποίηση κυττάρων

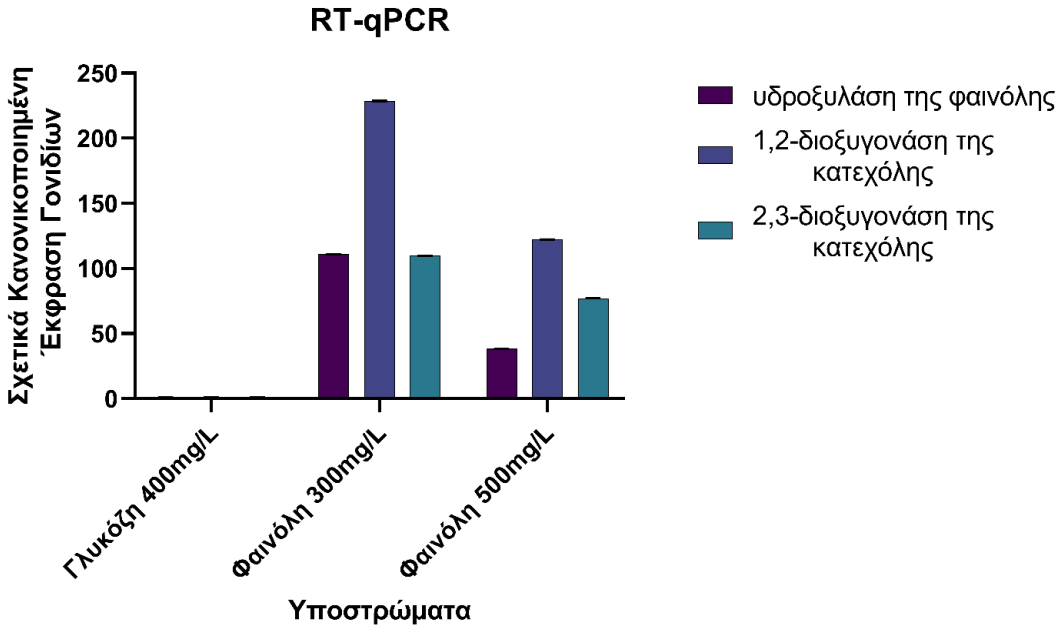
Τα κύτταρα ακινητοποιήθηκαν σε σφαιρίδια αλγινικού νατρίου (4% w/v), σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες (Ziagova et al., 2014).

Καταβολισμός της φαινόλης και βελτιστοποίηση των παραμέτρων αποδόμησης

Η αποδόμηση της φαινόλης μελετήθηκε τόσο με ελεύθερα όσο και με ακινητοποιημένα κύτταρα Sphe3. Η συγκέντρωση της φαινόλης προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της 4-αμινοαντιπυρίνης (Emerson 1943), με λήψη δειγμάτων ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Επίσης, βελτιστοποιήθηκαν οι παράμετροι (pH και θερμοκρασία) του καταβολισμού της φαινόλης και αξιολογήθηκε η επαναχρησιμοποίηση, η βιωσιμότητα [σύγκριση αρχικού εμβολίου κατά την ακινητοποίηση (10^{11} CFUs/ml) με CFUs/ml μετά από λύση των αποθηκευμένων σφαιριδίων αλγινικού νατρίου που περιείχαν τα κύτταρα] και η ικανότητα των ακινητοποιημένων κυττάρων να καταβολίζουν φαινόλη μετά από αποθήκευση 30 ημερών στους 4° C.

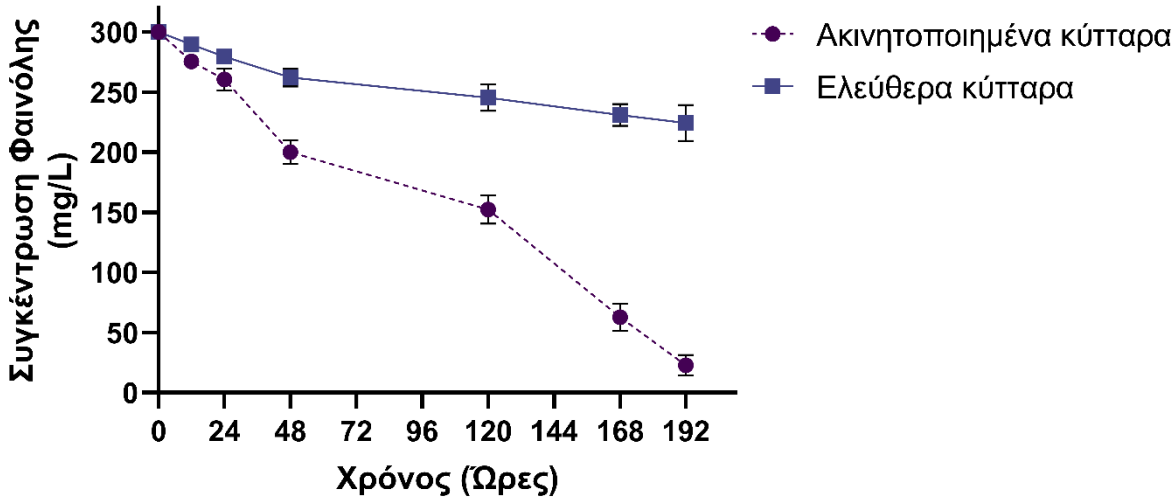
Αποτελέσματα

Το Sphe3 έχει την ικανότητα να καταβολίζει φαινόλη μέχρι και 1200 mg/L. Ανιχνεύτηκε δραστικότητα υδροξυλάσης της φαινόλης (0.09 U/mg) και 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης (0.18 U/mg) σε κυτταρικά εκχυλίσματα του Sphe3 που αναπτύχθηκαν παρουσία φαινόλης, ενώ δεν ανιχνεύτηκε δραστικότητα 2,3-διοξυγονάσης κατεχόλης. Η έκφραση των γονιδίων για την υδροξυλάση της φαινόλης και των 1,2- και 2,3-διοξυγονάση της κατεχόλης επάγεται σημαντικά όταν το βακτήριο αναπτύσσεται παρουσία φαινόλης ως μοναδικής πηγής άνθρακα σε σχέση με τη γλυκόζη (Γράφημα 1).



Γράφημα 3. Μελέτη έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων.

Τα ακινητοποιημένα βακτήρια καταβολίζουν πλήρως 300 mg/L φαινόλης σε βέλτιστο pH 7 και θερμοκρασία 20° C σε 8 ημέρες σε αντίθεση με τον αντίστοιχο αριθμό ελεύθερων κυττάρων, τα οποία στις ίδιες μέρες έχουν καταναλώσει λίγο παραπάνω από 50 mg/L φαινόλης (Γράφημα 2).



Γράφημα 4. Καταβολισμός φαινόλης από ελεύθερα και ακινητοποιημένα κύτταρα Sphe3.

Τα σφαιρίδια αλγινικού νατρίου-Sphe3 επαναχρησιμοποιήθηκαν τουλάχιστον 5 φορές διατηρώντας την ικανότητα καταβολισμού της φαινόλης πάνω από 80%. Η βιωσιμότητα των κυττάρων μετά από 30 μέρες αποθήκευσης των σφαιριδίων στους 4° C υπολογίστηκε στο 70%, ενώ διατήρησαν το 75% της ικανότητας καταβολισμού φαινόλης σε σχέση με την πρώτη μέρα (100%).

Συμπεράσματα

Το στέλεχος *Ps. phenanthrenivorans* Sphe3 αναπτύσσεται παρουσία φαινόλης μέχρι συγκέντρωσης 1200 mg/L ως μοναδικής πηγής άνθρακα και ενέργειας. Η μη ανίχνευση δραστικότητας 2,3-διοξυγονάσης της κατεχόλης και η δραματική αύξηση της έκφραση του γονιδίου της 1,2-διοξυγονάσης της κατεχόλης παρουσία φαινόλης σε σχέση με τη γλυκόζη οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το Sphe3 χρησιμοποιεί κυρίως το ορθο-μεταβολικό μονοπάτι για τον καταβολισμό της φαινόλης. Τα ακινητοποιημένα κύτταρα Sphe3 καταβολίζουν ταχύτερα τη φαινόλη σε σύγκριση με τα ελεύθερα, μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν και να αποθηκευτούν διατηρώντας σημαντικό ποσοστό της αρχικής ικανότητας αποδόμησης της φαινόλης.

Βιβλιογραφία

Duan, W., Meng, F., Cui, H., Lin, Y., Wang, G., & Wu, J. (2018). Ecotoxicity of phenol and cresols to aquatic organisms: A review. *Ecotoxicology and environmental safety*, 157, 441–456. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.089

Roell, G. W., Carr, R. R., Campbell, T., Shang, Z., Henson, W. R., Czajka, J. J., Martín, H. G., Zhang, F., Foston, M., Dantas, G., Moon, T. S., & Tang, Y. J. (2019). A concerted systems biology analysis of phenol metabolism in *Rhodococcus opacus* PD630. *Metabolic engineering*, 55, 120–130. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.06.013

Kallimanis, A., Kavakiotis, K., Perisynakis, A., Spröer, C., Pukall, R., Drainas, C., & Koukkou, A. I. (2009). *Arthrobacter phenanthrenivorans* sp. nov., to accommodate the phenanthrene-degrading bacterium Arthrobacter sp. strain Sphe3. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *59*(2), 275-279.

Tsagogiannis, E., Vandera, E., Primikyri, A., Asimakoula, S., Tzakos, A. G., Gerothanassis, I. P., & Koukkou, A. I. (2021). Characterization of Protocatechuate 4,5-Dioxygenase from *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 and In Situ Reaction Monitoring in the NMR Tube. *International journal of molecular sciences*, *22*(17), 9647. https://doi.org/10.3390/ijms22179647

Gurujeyalakshmi, G., & Oriel, P. (1989). Isolation of phenol-degrading Bacillus stearothermophilus and partial characterization of the phenol hydroxylase. *Applied and environmental microbiology*, *55*(2), 500-502.

Nakazawa, T., & Nakazawa, A. (1970). [64] Pyrocatechase (pseudomonas). In *Methods in enzymology* (Vol. 17, pp. 518-522). Academic Press

Nozaki, M. (1979). Oxygenases and dioxygenases. *Biochemistry*, 145-186.

Ziagova, M. G., Koukkou, A. I., & Liakopoulou-Kyriakides, M. (2014). Optimization of cultural conditions of Arthrobacter sp. Sphe3 for growth-associated chromate (VI) reduction in free and immobilized cell systems. *Chemosphere*, *95*, 535-540.

Emerson, E. (1943). The condensation of aminoantipyrine. II. A new color test for phenolic compounds. *The Journal of Organic Chemistry*, *8*(5), 417-428.

Ευχαριστίες

Η ερευνητική εργασία υποστηρίχτηκε από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ.) στο πλαίσιο της Δράσης «Υποτροφίες ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ. Υποψηφίων Διδακτόρων» (Δικαιούχος: Ασημακούλα Σταματία, Αριθμός Υποτροφίας: 1535).

"Άμελξη" της υποεπενδυματικής ζώνης: Βελτιστοποίηση της μεθόδου και διερεύνηση της δυνατότητας απομόνωσης ολιγοδενδρογλοιακών προγονικών κυττάρων

ΔΗΜΗΤΡΑΚΟΠΟΥΛΟΣ Δημήτρης, FRANKLIN JM Robin, ΚΑΖΑΝΗΣ Ηλίας

Εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας, τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, 26504 Ρίο, Πάτρα, jamesdimitrakop@gmail.com
Altos Labs, Cambridge Institute of Science, Granta Park, Cambridge CB21 6GP, United Kingdom, rfranklin@altoslabs.com
Εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας, τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, 26504 Ρίο, Πάτρα και Wellcome Trust – MRC Cambridge Stem Cell Institute, University of Cambridge, Cambridge CB2 0AW, United Kingdom, ikazanis@upatras.gr

Περίληψη
Μεταγεννητικά, τα νευρικά βλαστικά κύτταρα (NSCs) εντοπίζονται σε εξειδικευμένες περιοχές του εγκεφάλου. Παράδειγμα αποτελεί η Υποεπενδυματική Ζώνη (SEZ) των πλάγιων τοιχωμάτων των πλάγιων κοιλιών. Εξαιτίας των νευρογενετικών φωλεών τα τρωκτικά διατηρούν τη δυνατότητα νευρογένεσης στην ενήλικη ζωή, αλλά στους ανθρώπους η νευρογένεση στη SEZ διατηρείται μόνο μέχρι τους πρώτους 18 μήνες μεταγεννητικά. Ωστόσο, η πρώιμη παρουσία των νευρικών βλαστικών κυττάρων θα μπορούσε θεωρητικά να επιτρέψει τη χρήση τους για τη θεραπεία παιδικών νευροεκφυλιστικών ασθενειών, όπως οι λευκοδυστροφίες. Για το σκοπό αυτό, έχει αναπτυχθεί από το εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών σε συνεργασία με το εργαστήριο Νευρικών Βλαστοκυττάρων και Γήρανσης του Πανεπιστημίου του Cambridge η μέθοδος της «Άμελξης της SEZ» σε επίμυες (εικόνα 1). Η παραπάνω μέθοδος, περιλαμβάνει την ελεγχόμενη καταστροφή του επενδυματικού φραγμού ,με ένεση νευραμινιδάσης, με σκοπό την απελευθέρωση των νευρικών βλαστικών κυττάρων στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό από το οποίο μπορούν να συλλεχθούν μέσω υγρής βιοψίας.

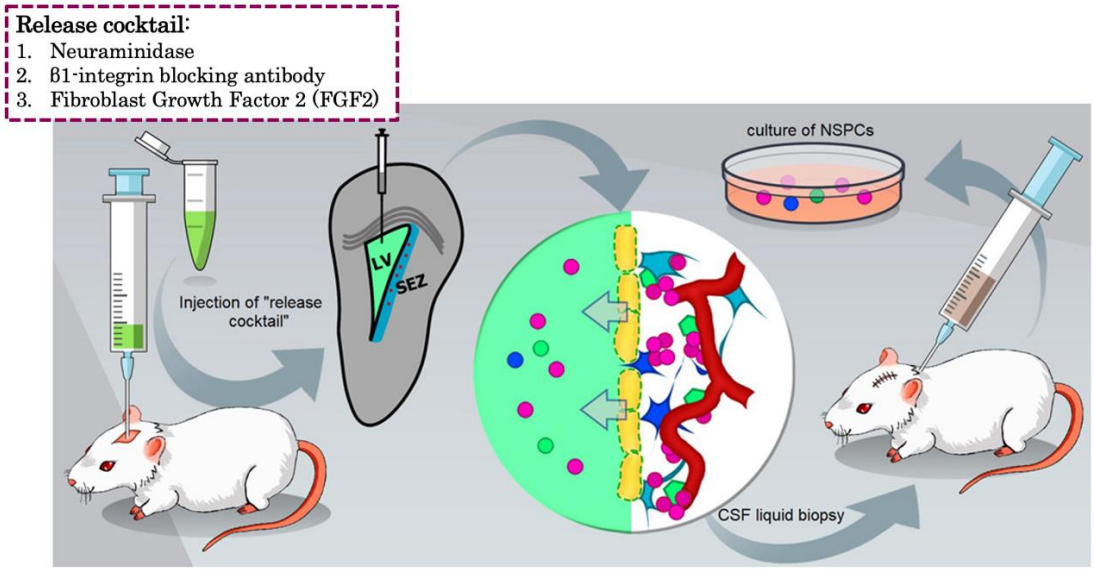
Λέξεις-κλειδιά
Νευροβλαστικά κύτταρα, Υποεπενδυματική Ζώνη, Άμελξη, Νευρογέννεση

Εισαγωγή
Τα μεταγεννητικά νευρικά βλαστικά και προγονικά κύτταρα του εγκεφάλου (NSPCs) συγκεντρώνονται σε ανατομικά καθορισμένες φωλεές βλαστοκυττάρων, μία από τις οποίες είναι η υποεπενδυματική ζώνη (SEZ) στα πλάγια τοιχώματα των πλευρικών κοιλιών και χαρακτηρίζονται από ένα ευρύ δυναμικό διαφοροποίησης, αυτοανανέωσης και ηρεμίας (quiescence) . Τα προγονικά ολιγοδενδρογλοιακά κύτταρα (OPCs) ωριμάζουν σε μυελινωτικά ολιγοδενδροκύτταρα και επίσης εμφανίζουν δυνατότητα αυτοανανέωσης.

Μέθοδοι
Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιούμε τεχνική βελτίωση της μεθόδου της Άμελξης της υποεπενδυματικής ζώνης του επίμυ (εικόνα 1) και επέκταση αυτής προκειμένου να συλλέξουμε OPCs από μια άλλη περιοχή το μεσολόβιο και για να διερευνήσουμε τις βασικές ιδιότητες των NSPC που βρίσκονται στην SEZ. Η μέθοδος της Άμελξης αποτελείται από μια ενδοεγκεφαλοκοιλιακή έγχυση του κοκτέιλ απελευθέρωσης που περιέχει την νευραμινιδάση, αντισώμα αποκλεισμού για την β1-ιντεγκρίνη και τον αυξητικό παράγοντα ινοβλαστών-2 προκειμένου να προκληθεί η ελεγχόμενη ροή των NSPCs και OPCs εντός του εγκεφαλονωτιαίου υγρού. Σε ένα δεύτερο στάδιο «συλλογής», πραγματοποιούνται υγρές βιοψίες εγκεφαλονωτιαίου υγρού από την τέταρτη κοιλία (περιοχή cisterna magna) αναισθητοποιημένων πειραματόζωων χωρίς την ανάγκη δημιουργίας τομής.

Αποτελέσματα
Οι υγρές βιοψίες μετά την άμελξη του μεσολοβίου είχαν ως αποτέλεσμα την απομόνωση κυττάρων που

εκφράζουν σε υψηλά ποσοστά τυπικούς δείκτες ολιγοδενδρογλοιακών προγονικών κυττάρων, όπως Olig2 και PDGFRα. Επιπλέον, κύτταρα που απομονώθηκαν μετά την Άμελξη της SEZ, που προηγουμένως έχουμε δείξει ότι παρουσιάζουν χαρακτηριστικά αδρανών νευρικών βλαστοκυττάρων, καλλιεργήθηκαν σε τρία διαφορετικά μέσα ανάπτυξης. Το τυπικό μέσο νευροσφαιρών, που περιέχει FGF2 και EGF και δύο μέσα που είναι γνωστό ότι ευνοούν την επέκταση των νευρικών βλαστοκυττάρων χωρίς να ενισχύουν την πρόοδό τους προς τη διαφοροποίηση. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν σημαντικές διαφορές στη μορφολογία των απομονωμένων κυττάρων και στα χαρακτηριστικά σχηματισμού αποικιών τους που διερευνούμε περαιτέρω χρησιμοποιώντας μια σειρά δεικτών NSPC προκειμένου να αξιολογήσουμε άμεσα το προφίλ της ενδογενούς SEZ.



Εικόνα 1. Η μέθοδος της Άμελξης της υποεπενδυματικής ζώνης του ενήλικου εγκεφάλου επίμυος (τροποποιημένη από McClenahan *et al.*, Stem Cells Reports, 2021).

Βιβλιογραφία

McClenahan F, Dimitriou C, *et al.*, (2021) Isolation of neural stem and oligodendrocyte progenitor cells from the brain of live rats. Stem Cell Reports, e-pub: 23 Sept 2021. Doi: 10.1016/j.stemcr.2021.08.015

Dimitrakopoulos D., Kakogiannis D., Kazanis I., Heterogeneity of quiescent and active neural stem cells in the postnatal brain (2021), Int. J. Dev. Biol., Doi: 10.1387/ijdb.220010ik

CODEGA P, V SILVA-VARGAS, *et al.*, (2014). Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche. Neuron 82: 545-559.

Σημείωση

Η συγκεκριμένη ερευνητική εργασία υποστηρίχθηκε από το ΕΛΙΔΕΚ (κωδ. προγρ.: 81209) στον Κ.Η.

Γενετικός και μορφολογικός χαρακτηρισμός στελεχών δινοφυκών από την ομάδα Gonyaulacaleans

ΑΘΑΝΑΣΙΟΥ Αναστασία[1], ΤΣΙΒΟΓΛΟΥ Ευθύμιος[2], ΚΟΤΤΑΡΙΔΗ Χριστίνα[1], ΑΡΣΕΝΑΚΗΣ Μηνάς[1,2], ΑΛΙΓΙΖΑΚΗ Κατερίνα[2]

[1]*Εργαστήριο Γενικής Μικροβιολογίας, Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης & Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη 54124,* anastathan@bio.auth.gr, ckottaridi@bio.auth.gr
[2] *Εργαστηριακή Μονάδα Θαλάσσιων Τοξικών Μικροφυκών (ΕΜΘΤΜ-ΑΠΘ), Εργαστήριο Γενικής Μικροβιολογίας, Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης & Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη 54124,* tsivoglo@bio.auth.gr, arsenaki@bio.auth.gr, aligiza@bio.auth.gr

Περίληψη
Στην παρούσα εργασία χαρακτηρίστηκαν μορφολογικά και γενετικά στελέχη δινοφυκών από τα γένη *Alexandrium* και *Protoceratium*, είδη των οποίων έχουν τη δυνατότητα να παράγουν βιοτοξίνες με επιβλαβείς επιπτώσεις στον άνθρωπο και το περιβάλλον. Με βάση την εξέταση δειγμάτων στα πλαίσια του Προγράμματος Παρακολούθησης Θαλάσσιων Τοξικών Μικροφυκών που υλοποιείται από την Εργαστηριακή Μονάδα Θαλάσσιων Τοξικών Μικροφυκών ΑΠΘ (ΕΜΘΤΜ-ΑΠΘ) απομονώθηκαν και αναπτύχθηκαν σε συνθήκες καλλιέργειας κύτταρα τα οποία στο οπτικό μικροσκόπιο έφεραν τα αδρά χαρακτηριστικά των γενών *Alexandrium* και *Protoceratium*. Τα κύτταρα που απομονώθηκαν μελετήθηκαν σε μικροσκόπιο επιφθορισμού ως προς τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά. Επιπλέον, υλικό από τις καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν εκχυλίστηκε κατάλληλα ώστε να απομονωθεί το γενετικό υλικό. Ακολούθησε η ενίσχυση κατάλληλων περιοχών του γενετικού υλικού με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και αλληλούχηση για την αναζήτηση της γενετικής ταυτότητας αυτών. Είναι η πρώτη φορά που η παρουσία των *Alexandrium fraterculus* και *Protoceratium reticulatum* επιβεβαιώνεται και γενετικά στις ελληνικές παράκτιες περιοχές.

Λέξεις-κλειδιά
Alexandrium, Protoceratium, Β. Αιγαίο, ταυτοποίηση, PCR

Εισαγωγή
Μεταξύ των δινοφυκών συγκαταλέγονται πολλά είδη, στελέχη των οποίων παράγουν βιοτοξίνες που ενδέχεται να βλάψουν τον άνθρωπο ή το περιβάλλον. Το γένος *Alexandrium* περιλαμβάνει μη τοξικά αλλά και δυνητικώς τοξικά είδη που παράγουν κυρίως παραλυτικές (gonyautoxins και saxitoxins) καθώς και άλλες (π.χ. goniodomin) τοξίνες, ενώ στελέχη του *Protoceratium reticulatum* έχουν βρεθεί να παράγουν λιπόφιλες τοξίνες (yessotoxins). Σχετικά πρόσφατα βρέθηκε ότι κάποιες καταγραφές του *P. reticulatum* ήταν λανθασμένες (misidentifications), καθώς τελικά επρόκειτο για το εξαιρετικά όμοιο μορφολογικά *Ceratocorys mariaovidiorum* (= *Pentaplacodinium saltonense*), το οποίο σύμφωνα με τα μέχρι σήμερα δεδομένα δεν είναι τοξικό (Mertens et al. 2018, Salgado et al. 2018). Η αναγνώριση των φυτοπλαγκτικών ειδών είναι κρίσιμη, ιδιαίτερα στην περίπτωση που πρέπει να διακριθεί ένα δυνητικώς τοξικό από ένα μη τοξικό taxon. Κάποιες φορές η ταυτοποίηση μπορεί να είναι εφικτή με τη χρήση μικροσκοπίας επιφθορισμού ή ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, ενώ συχνά και ειδικά σε περιπτώσεις «συμπλεγμάτων ειδών» (species complex) είναι απαραίτητη η ταυτοποίηση μέσω εύρεσης της πρωτοταγούς πρωτοδιάταξης χρησιμοποιώντας μεθόδους αλληλούχησης γενετικού υλικού και σύγκρισης με ήδη καταχωρημένες αλληλουχίες από βάσεις δεδομένων.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο γενετικός και μορφολογικός χαρακτηρισμός στελεχών δινοφυκών από την ομάδα Gonyaulacaleans και συγκεκριμένα από τα γένη *Alexandrium* και *Protoceratium*.

Μέθοδοι
Στα πλαίσια του Προγράμματος Παρακολούθησης Θαλάσσιων Τοξικών Μικροφυκών που υλοποιείται

από την ΕΜΘΤΜ-ΑΠΘ εξετάζονται εβδομαδιαία δείγματα από το σύνολο των παράκτιων περιοχών της Ελλάδας, όπου υπάρχουν δραστηριότητες παραγωγής ή/και αλιείας διθύρων μαλακίων. Με βάση τις παρατηρήσεις των ανωτέρω εβδομαδιαίων δειγμάτων, κατά τη φθινοπωρινή και χειμερινή περίοδο του 2021 χρησιμοποιήθηκε μη συντηρημένο υλικό από τον Θερμαϊκό Κόλπο και τον Κόλπο Καλλονής Λέσβου ώστε να απομονωθούν κύτταρα *Alexandrium* και *Protoceratium*, ενώ επιπλέον συλλέχθηκε υλικό από τον Θερμαϊκό Κόλπο με δίχτυ πλαγκτού (Ø 20 μm).

Η απομόνωση των κυττάρων έγινε με τη μέθοδο της μικροπιπέτας σε ανάστροφα μικροσκόπια (Olympus CK30 & CKX31) (Andersen, 2005). Από τις απομονώσεις αναπτύχθηκαν με τη χρήση κατάλληλων θρεπτικών μέσων τέσσερα (4) στελέχη (3 *Alexandrium* και 1 *Protoceratium*) τα οποία διατηρούνται σε ελεγχόμενες συνθήκες στην τράπεζα καλλιεργειών της ΕΜΘΤΜ-ΑΠΘ (HELLCC.Al.003, 4, 5 & HELLCC.Pt.001).

Η παρατήρηση των πλακών της θήκης των δινοφυκών διεξήχθη σε μικροσκόπιο φθορισμού (Olympus IX31) με τη χρήση προσπίπτουσας ακτινοβολίας και κατάλληλων φίλτρων σε κύτταρα τα οποία είχαν προηγουμένως εμποτιστεί με τη φθορίζουσα ουσία Calcofluor White M2R (Fritz & Triemer, 1985), ενώ χρησιμοποιήθηκε και το σύστημα απεικόνισης Q-Capture Pro7 (Q-Imaging Micropublisher 3.3).

Ποσότητα 1mL από κάθε καλλιέργεια (HELLCC.Al.003, 4, 5 & HELLCC.Pt.001) χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση DNA με χρήση του NucleoSpin Plant II DNA extraction kit (Macherey & Nagel, Düren, Germany) με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το DNA που εξήχθη, υπεβλήθη σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), για την ενίσχυση των περιοχών της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας (LSUrDNA), D8-D10 και D1-D3 αλλά και της περιοχής ITS. Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: FD8-RB, DIR-LSUB και ITSA-ITSB αντίστοιχα. Πιο συγκεκριμένα για τις καλλιέργειες HELLCC.Al.003, 4, 5 έγινε χρήση και των τριών ζευγών εκκινητών ενώ για την καλλιέργεια HELLCC.Pt.001 μόνο του ζεύγους ITSA-ITSB. Ακολούθησε αλληλούχηση των προϊόντων της PCR και σύγκριση των αποτελεσμάτων με δημοσιευμένες αλληλουχίες (Branco et al. 2020, Mertens et al. 2018), χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ευθυγραμμίσεων πολλαπλών ακολουθιών CLUSTALW.

Αποτελέσματα

Τα κύτταρα *Alexandrium* που απομονώθηκαν σχημάτιζαν αλυσίδες έως και 32 κυττάρων και είχαν σχήμα πενταγώνου. Στο μικροσκόπιο φθορισμού παρατηρήθηκε η διάταξη των πλακών, η οποία σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης των πλακών κατά Kofoid (1909) ήταν Po, 4', 6", 6c, (?s), 5'", 2"". Με βάση το σχηματισμό αλυσίδων κυττάρων, το σχήμα των πλακών 1' και 6", την παρουσία και τη θέση του κοιλιακού πόρου (Vp) στην 1', τη θέση του ανώτερου πόρου προσκόλλησης (apical attachment pore, aap) στα δεξιά του κορυφαίου πόρου (comma shaped Po), τη θέση του κατώτερου πόρου προσκόλλησης (pap) στην κατώτερη πλάκα της επιμήκους αύλακας (sp) και κυρίως την απουσία επιπλέον πλακιδίου πάνω στην ανώτερη πλάκα της επιμήκους αύλακας (s.a.) τα κύτταρα *Alexandrium* που απομονώθηκαν χαρακτηρίστηκαν ως *Alexandrium fraterculus.*

Τα κύτταρα *P.reticulatum* είχαν το χαρακτηριστικό έντονο ανάγλυφο στην επιφάνεια των πλακών της θήκης με την όψη δικτυώματος (reticulation). Το συγκεκριμένο taxon συχνά δεν είναι εύκολο να διακριθεί από το *Ceratocorys mariaovidiorum* (= *Pentaplacodinium saltonense*) όχι μόνο στο μικροσκόπιο φθορισμού, αλλά ακόμη και στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, ειδικά σε κοιλιακή όψη καθώς η διάταξή των πλακών (Po, 4', 6" ή 5", 6c, (7s), 6'", 2"") διαφέρει μόνο στον αριθμό των προζωνικών πλακών (5" ή 6"). Ένα στοιχείο που φαίνεται να είναι αξιόπιστο και εφικτό να παρατηρηθεί στον επιφθορισμό είναι ο βαθμός επαφής της πλάκας sa με την 1' (μεγαλύτερης έκτασης επαφή στο *P.reticulatum* σε σχέση με το *C. mariaovidiorum*). Με βάση αυτό το χαρακτηριστικό, το στέλεχος που απομονώθηκε από τον Κόλπο Καλλονής προσδιορίστηκε προσωρινά ως *P. reticulatum*, ενώ για τον τελικό χαρακτηρισμό του εφαρμόστηκαν και μοριακές τεχνικές.

Με βάση τα αποτελέσματα από την ολοκλήρωση των αναλύσεων σε γενετικό επίπεδο, όλες οι

καλλιέργειες (HELLCC.Al.003, 4, 5) που δημιουργήθηκαν από τα τρία στελέχη του γένους *Alexandrium* και από τα οποία έγινε εκχύλιση DNA χαρακτηρίστηκαν ως *Alexandrium fraterculus.* Επιπλέον κατόπιν ολοκλήρωσης της αλληλούχησης στην περιοχή ITS τα κύτταρα της καλλιέργειας του γένους *Protoceratium* (HELLCC.Pt.001) χαρακτηρίστηκαν ως *Protoceratium reticulatum.*

Συμπεράσματα

Η χρήση μοριακών τεχνικών επιβεβαίωσε τις μορφολογικές παρατηρήσεις τόσο στην περίπτωση του *Alexandrium fraterculus* όσο και σε αυτή του *Protoceratium reticulatum*, αναδεικνύοντας τη αποτελεσματικότητα του συνδυασμού κλασσικών και σύγχρονων τεχνικών στο χαρακτηρισμό διαφόρων taxa μικροφυκών και ιδιαίτερα των δυνητικώς τοξικών. Είναι η πρώτη φορά που στελέχη από τα ανωτέρω taxa που έχουν απομονωθεί από τις ελληνικές παράκτιες ακτές χαρακτηρίζονται και γενετικά.

Βιβλιογραφία

Andersen, R.A. (2005). *Algal culturing techniques.* Amsterdam: Elsevier Inc.

Balech, E. (1995). *The Genus* Alexandrium *Halim (Dinoflagellata).* Sherkin Island, Co. Cork, Ireland: Sherkin Island Marine Station.

Branco, S., Oliveira, M. M. M., Salgueiro, F., Vilar, M. C. P., Azevedo, S. M. F. O., & Menezes, M. (2020). Morphology and molecular phylogeny of a new PST-producing dinoflagellate species: *Alexandrium fragae* sp. nov. (Gonyaulacales, dinophyceae). *Harmful Algae*, 95, 101793.

Fritz, L., Triemer, R.E. (1985). A rapid simple technique utilizing calcofluor white M2R for the visualization of dinoflagellate thecal plates. *Journal of Phycology* 21, 662-664.

Mertens, K.N., Carbonell-Moore, M.C., Pospelova, V., Head, M.J., Highfield, A., Schroeder, D., Gu, H., Andree, K.B., Fernandez, M., Yamaguchi, A., Takano, Y., Matsuoka, K., Nézan, E., Bilien, G., Okolodkov, Y., Koike, K., Hoppenrath, M., Pfaff, M., Pitcher, G., Al-Muftah, A., Rochon, A., Lim, P.T., Leaw, C.P., Lim, Z.F., Ellegaard, M. (2018). *Pentaplacodinium saltonense* gen. et sp. nov. (Dinophyceae) and its relationship to the cyst-defined genus *Operculodinium* and yessotoxin-producing *Protoceratium reticulatum*. *Harmful Algae* 71, 57-77.

Salgado, P., Fraga, S., Rodríguez, F., Riobó, P., Bravo, I. (2018). *Ceratocorys mariaovidiorum* sp. nov. (Gonyaulacales), a new dinoflagellate species previously reported as *Protoceratium reticulatum*. *Journal of Phycology* 54(1), 126-137.

Wang, N., Mertens, K.N., Krock, B., Luo, Z., Derrien, A., Pospelova, V., Liang, Y., Bilien, G., Smith, K.F., De Schepper, S., Wietkamp, S., Tillmann, U., Gu, H. (2019). Cryptic speciation in *Protoceratium reticulatum* (Dinophyceae): Evidence from morphological, molecular and ecophysiological data. *Harmful Algae* 88, 101610.

Αγκίστρωση της λιπάσης LIP2 στην κυτταρική επιφάνεια της Yarrowialipolytica για κατασκευή καινοτόμων βιοκαταλυτών με εφαρμογή στην παραγωγή βιοντίζελ

ΠΑΝΑΓΙΩΤΙΔΟΥ Ελευθερία, ΣΑΜΑΡΑ Γεωργία, ΠΑΤΑΒΟΥ Βικτώρια, ΒΛΑΧΟΝΑΣΙΟΣ Κωνσταντίνος, ΑΝΔΡΕΑΔΕΛΛΗ Αγγελική, ΜΑΚΡΗΣ Αντώνιος, ΘΕΟΔΟΣΙΟΥ Ελένη

Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 54636, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα,
Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών, Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης(ΕΚΕΤΑ), 57001, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα, elefthedp@bio.auth.gr
Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 45110, Ιωάννινα, Ελλάδα,
Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών, Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης(ΕΚΕΤΑ), 57001, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα, bl01912@uoi.gr
ΠΜΣ «Εφαρμογές της Βιολογίας», Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, ΑριστοτέλειοΠανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 54636, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα,
Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών, Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης(ΕΚΕΤΑ), 57001, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα, v.patavou@certh.gr

Περίληψη
Η αυξημένη ζήτηση ενέργειας των τελευταίων δεκαετιών οδηγεί στην αναζήτηση ανανεώσιμων πηγών ενέργειας, όπως το βιοντίζελ, το οποίο μπορεί να παραχθεί μέσω ενζυμικής μετεστεροποίησης φυτικών ή/και ζωικών ελαίων/λιπών με χρήση λιπασών. Η*Yarrowia lipolytica* είναι ένας ελαιογόνος ευκαρυωτικός μικροοργανισμός που χρησιμοποιείται μεταξύ άλλων για την παραγωγή ενζύμων, όπως οι λιπάσες. Στην παραγωγή βιοντίζελ με χρήση λιπασών τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται βρίσκονται στην ακινητοποιημένη μορφή τους που τα καθιστά πιο σταθερά. Η αγκίστρωση ενζύμων στην επιφάνεια κυττάρων ζύμης (Yeast cell surface display) αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο τρόπο ακινητοποίησης καθώς ολόκληρα τα κύτταρα αποτελούν τον βιοκαταλύτη (whole-cell biocatalysts). Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε αγκίστρωση της LIP2 στο κυτταρικότοίχωμα της *Y. lipolytica* με τη χρήση της πρωτεΐνης κυτταρικού τοιχώματος PIR1 καιέλεγχος της έκθεσης αυτής, αρχικά, μέσω της πρωτεΐνης αναφοράς mCherry με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής και συνεστιακής μικροσκοπίας και, έπειτα, μέσω ενζυμικής δοκιμασίας για την αντίδραση μετεστεροποίησης.

Λέξεις-κλειδιά
Yarrowia lipolytica, πρωτεΐνη κυτταρικού τοιχώματος PIR1, πρωτεΐνη LIP2, κύτταρα-βιοκαταλύτες

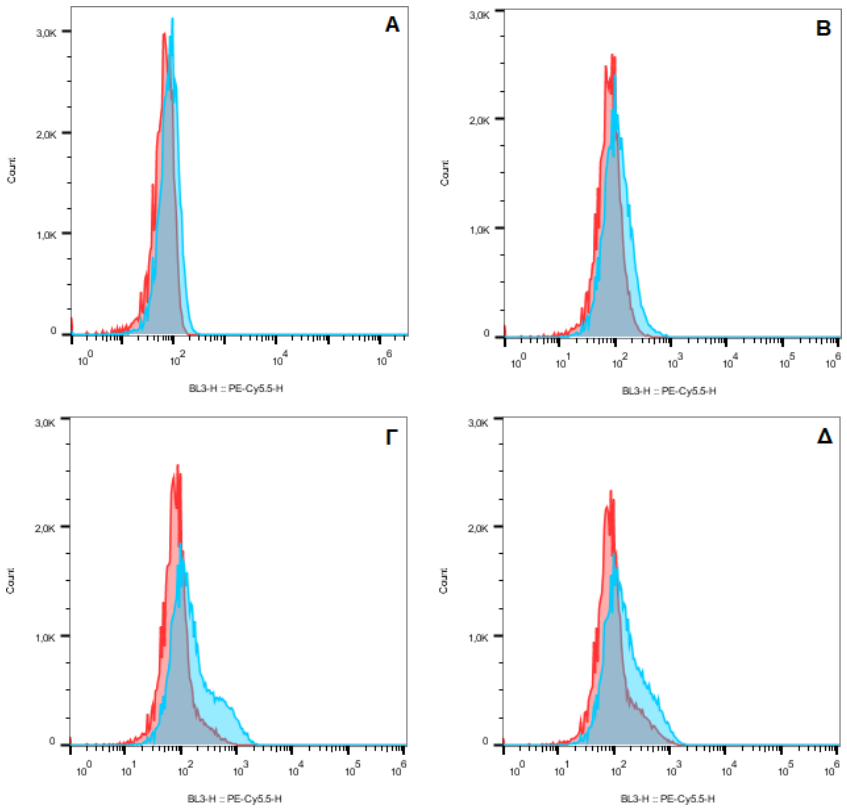
Εισαγωγή
Η *Yarrowia lipolytica* είναι ένας ευκαρυωτικός μικροοργανισμός με πολλαπλές βιοτεχνολογικές εφαρμογές (Beopoulos et al. 2009). Είναι μια αυστηρά αερόβια ζύμη με εξέχουσα ικανότητα παραγωγής και συσσώρευσης λιπιδίων που αγγίζει μέχρι και το 36% τηςβιομάζας (Nicaud 2012). Λόγω της ελαιογόνου φύσης της, χρησιμοποιείται, επίσης για την παραγωγή λιπασών, οι οποίες έχουν εφαρμογή στην ενζυμική παραγωγή βιοντίζελ (Vasaki etal. 2022). Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η δημιουργία βιοκαταλυτικών κυττάρων(whole-cell biocatalysts) για χρήση τους στην παραγωγή βιοντίζελ μέσω αγκίστρωσης της λιπάσης 2 (LIP2), που αποτελεί μια ενδογενή πρωτεΐνη της *Y. lipolytica*, στην κυτταρική επιφάνεια (Yeast cell surface display). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το σύστημα αγκίστρωσης PIR1-LIP2, το οποίο αποτελείται από την πρωτεΐνη-προσδέτη PIR1 (anchor protein) και την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος, μέσω ενσωμάτωσης της κασέτας έκφρασης στο γονιδίωμα της *Y. lipolytica*. Ο έλεγχος του ποσοστού έκφρασης του γονιδίου της *LIP2* καθώς και η επιβεβαίωση της αγκίστρωσης της παραγόμενης πρωτεΐνης στο κυτταρικό τοίχωμα πραγματοποιήθηκε με χρήση πρωτεΐνης φθορισμού mCherry, σε κυτταρόμετρο ροής καισυνεστιακό μικροσκόπιο, αντίστοιχα. Ο προσδιορισμός της καταλυτικής δράσης των νεών ανασυνδυασμένων κυττάρων πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της μετεστεροποίησης του pNPP.

Μέθοδοι

Για την κλωνοποίηση των γονιδίων *YlPIR1*, *LIP2* και *mCherry* χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *Escherichia coli* Mach1™-T1 (recA, tonA, endA1, hsdR, lacZDM15), ενώ για τον πολλαπλασιασμό των πλασμιδίων χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος NEB®5-a Competent *Escherichia coli* (New England Biolabs). Η ενίσχυση των γονιδίων με PCR ακολουθήθηκε από ηλεκτροφόρηση αγαρόζης και καθαρισμό των προϊόντων με κιτ απομόνωσης από πηκτή (Qiagen Qiaquick kit). Έπειτα, πραγματοποιήθηκε πέψη των φορέων ενσωμάτωσης με τις κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες και ακολούθησε η ένωση των γονιδίων με τους φορείς, για να δημιουργηθούν οι τελικοί φορείς ενσωμάτωσης. Για τον μετασχηματισμό του στελέχους αγρίου τύπου *Yarrowia lipolytica* MUCL 28849 ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο χημικού μετασχηματισμού LiAc (Chen et al. 1997). Η καλλιέργεια των μετασχηματισμένων κυττάρων με τον φορέα pYLEXP1/*YlPIR1-mCherry* INTE4, στέλεχος YL-PIR1-mCherry, και με τον pYLEXP1/*YlPIR1-LIP2* INTE4, στέλεχος YL-PIR1-LIP2, πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό μέσο YPG (30ºC, 150 rpm). Κύτταρα από τις καλλιέργειες του στελέχους YL-PIR1-mCherry χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση του φθορισμού σε κυτταρόμετρο ροής (Attune NxT Focusing Cytometer) για κάθε 24 ώρες και παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο (Zeiss LSM780 Confocal Microscope) στις 72 ώρες. Αντίστοιχα κύτταρα του στελέχους YL- PIR1-LIP2 απομονώθηκαν μέσω φυγοκέντρησης μετά από 24, 48 και 72 ώρες καλλιέργειας και αφού ακολούθησαν πλύσεις τους με dH2O λυοφυλιώθηκαν. Για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δράσης των κυττάρων προστέθηκαν 5mg λυοφιλιωμένης βιομάζας σε 1 mL εξάνιο 10 mmol/L pNPP και 1 mol/L *n*-butanol (40ºC, 700rpm) και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 310nm (pNP) (Fu et al. 2014).

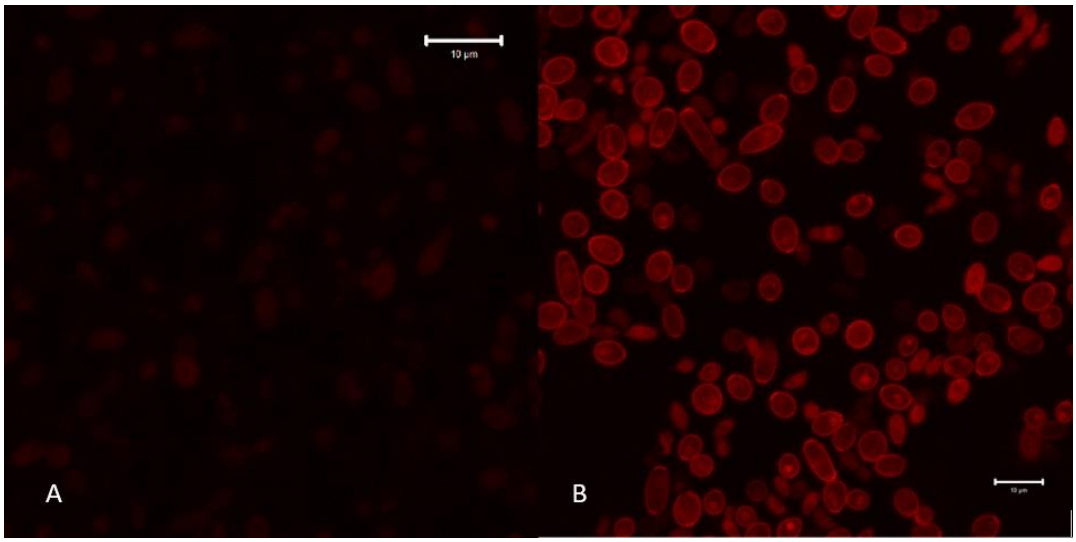
Αποτελέσματα

Από τις αποικίες του ανασυνδυασμένου στελέχους YL-PIR1-mCherry που εξετάστηκαν με χρήση κυτταρόμετρου ροής παρατηρήθηκε ετερογένεια στο ποσοστό φθορισμού, με μιααποικία να εμφανίζει τον εντονότερο φθορισμό σε σχέση με το στέλεχος αγρίου τύπου(Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Ιστογράμματα που απεικονίζουν τον αριθμό των κυττάρων αγρίου τύπου *Yarrowia lipolytica* MUCL 28849 (κόκκινο) και ανασυνδυασμένου στελέχους YL-PIR1-mCherry (μπλε) σε συνάρτηση με την ένταση φθορισμού με χρήση κυτταρομετρίας ροής μετά από Α) 24, Β) 48, Γ) 72, και Δ) 96 ώρες καλλιέργειας.

Σε όλες τις περιπτώσεις, ο μέγιστος φθορισμός παρατηρήθηκε μετά από 72 ώρεςκαλλιέργειας και διατηρήθηκε μέχρι και τις 96 ώρες. Ο φθορισμός του στελέχους αγρίου τύπου *Y. lipolytica* MUCL 28849 αποδόθηκε στον αυτοφθορισμό. Η επιτυχής αγκίστρωσητης mCherry στο κυτταρικό τοίχωμα της ζύμης επιβεβαιώθηκε με χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2, όπου διακρίνεται το φθορίζον κυτταρικό τοίχωμα μετά από καλλιέργεια 72 ωρών.



Εικόνα 2. Παρατήρηση κυττάρων Α. του στελέχους αγρίου τύπου *Y. lipolytica* 28849 MUCLκαι Β. του στελέχους YL-PIR1-mCherry μετά από καλλιέργεια 72 ωρών σε υγρό θρεπτικό μέσο YPG, μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας.

Το νέο ανασυνδυασμένο στέλεχος YL-PIR1-LIP2 παρουσίασε τη μέγιστη μετεστεροποιητική δράση μετά από καλλιέργεια 72 ωρών με παραγωγή 0.34 μmol pNP/h/mg λυοφιλιωμένης βιομάζας ενώ τα κύτταρα αγρίου τύπου δεν εμφάνισαν μετεστεροποιητική δράση.

Συμπεράσματα

Η επιβεβαίωση της επιτυχούς αγκίστρωσης της πρωτεΐνης LIP2 στο κυτταρικό τοίχωμα της ζύμης *Y. lipolytica* πραγματοποιήθηκε με χρήση πρωτεΐνης φθορισμού mCherry μέσω συνεστιακού μικροσκοπίου. Για όλες τις αποικίες που ελέγχθηκαν με κυτταρομετρία ροής προσδιορίστηκε το μέγιστο ποσοστό φθορισμού στις 72 ώρες καλλιέργειας. Παρομοίως η βιομάζα των 72 ωρών είχε τη μεγαλύτερη μετεστεροποιητική δράση. Η παρούσα εργασία αναδεικνύει την τεχνολογία έκθεσης των πρωτεϊνών στο κυτταρικό τοίχωμα ζυμών “yeastcell surface display” ως ένα πολύτιμο εργαλείο για την κατασκευή καινοτόμων βιοκαταλυτικών κυττάρων, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία παραγωγής βιοντίζελ, μειώνοντας το χρόνο και το κόστος ακινητοποίησης των ενζύμων.

Βιβλιογραφία

Beopoulos, A., Cescut, J., Haddouche, R., Uribelarrea, J., Molina-Jouve, C., & Nicaud, J. (2009). *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress In Lipid Research*, 48,375-387.

Chen, D., Beckerich, J., & Gaillardin, C. (1997). One-step transformation of the dimorphic yeast Yarrowia lipolytica. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 48, 232-235.

Nicaud, J. (2012). *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, 29, 409-418.

Vasaki, M., Sithan, M., Ravindran, G., Paramasivan, B., Ekambaram, G., & Karri, R. (2022). Biodiesel production from lignocellulosic biomass using *Yarrowia lipolytica*. *Energy Conversion And Management: X*, 13, 100167.

Fu, X., Zheng, J., Ying, X., Yan, H., & Wang, Z. (2014). Investigation of lipozyme TL IM- catalyzed transesterification using ultraviolet spectrophotometric assay. *Chinese Journal of Catalysis*, *35*, 553–559

Ο ρόλος της αλληλεπίδρασης μεταξύ αιμοπεταλίων και νευρικών βλαστικών και προγονικών κυττάρων του ενήλικου εγκεφάλου, στη φωλεά της Υποεπενδυματικής Ζώνης στην ομοιόσταση, αλλά και ύστερα από απομυελίνωση του μεσολοβίου

Μαρία ΑΝΕΣΤΗ[1], Στέφανος ΚΑΠΛΑΝΗΣ[2], Cédric GHEVAERT[3], Δόμνα ΚΑΡΑΓΩΓΕΩΣ[2], Ηλίας ΚΑΖΑΝΗΣ[1]

[1]Εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Ρίο, 26504, Ελλάδα
[2] Τομέας Βασικών Ιατρικών Επιστημών, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης και Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB), Ηράκλειο, Κρήτη, Ελλάδα
[3]Wellcome Trust – MRC Cambridge Stem Cell Institute & Department of Haematology, University of Cambridge, Cambridge, UK
email: anestimaria@gmail.com, ikazanis@upatras.gr

Περίληψη
Στον ενήλικο εγκέφαλο των θηλαστικών εντοπίζονται δύο κύριοι πληθυσμοί βλαστικών και προγονικών κυττάρων: τα νευρικά βλαστικά κύτταρα (NBK) και τα ολιγοδενδρογλοιακά προγονικά κύτταρα, τα οποία εμφανίζουν διακριτές ιδιότητες και χωρικές προτιμήσεις. Τα NBK εντοπίζονται σε εξειδικευμένα μικροπεριβάλλοντα τα οποία καλούνται βλαστικές φωλεές, μια εκ των οποίων είναι η Υποεπενδυματική Ζώνη (YEZ) των πλάγιων τοιχωμάτων των πλάγιων κοιλιών του εγκεφάλου. Στην YEZ το αγγειακό σύστημα εμφανίζει ιδιαίτερες ανατομικές ιδιότητες και αποτελεί βασικό ρυθμιστικό παράγοντα αυτής και των NBK, ενώ έχει αποκαλυφθεί ότι παράγοντες των αιμοπεταλίων ενισχύουν την επιβίωση των NBK in vitro. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η πιθανή επίδραση της άμεσης αλληλεπίδρασης των αιμοπεταλίων με τα νευρικά βλαστικά και προγονικά κύτταρα του εγκεφάλου, πραγματοποιώντας συγκαλλιέργειες μεταξύ των δυο πληθυσμών in vitro και διερευνώντας το ρόλο τους in vivo, χρησιμοποιώντας μοντέλα θρομβοκυτταροπενίας σε συνδυασμό με απομυελίνωση του μεσολοβίου, με στόχο την κατανόηση των μηχανισμών και τη διερεύνηση θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Λέξεις-κλειδιά
Νευρικά βλαστικά και προγονικά κύτταρα, Υποεπενδυματική Ζώνη, απομυελίνωση μεσολοβίου, αιμοπετάλια, θρομβοκυτταροπενία

Εισαγωγή
Δύο κύριοι πληθυσμοί βλαστικών και προγονικών κυττάρων εντοπίζονται στον ενήλικο εγκέφαλο των θηλαστικών, τα νευρικά βλαστικά κύτταρα (NBK) και τα ολιγοδενδρογλοιακά προγονικά κύτταρα (ΟΠΚ) (Agathou et al., 2013). Τα NBK συγκεντρώνονται σε περιοχές με έντονη δομική πλαστικότητα, που ονομάζονται βλαστικές φωλιές, μία εκ των οποίων βρίσκεται στην Υποεπενδυματική ζώνη (YEZ) των πλάγιων τοιχωμάτων των πλάγιων κοιλιών, ενώ τα ΟΠΚ βρίσκονται διάσπαρτα στο παρέγχυμα του εγκεφάλου (Kazanis et al., 2017; Hughes et al. 2013). Τα αιμοπετάλια αποτελούν άχρωμα κυτταρικά θραύσματα και εκτός από την κύρια λειτουργία τους που είναι η αιμόσταση, διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα σε φυσιολογικές αλλά και νευροεκφυλιστικές καταστάσεις. Έχει αποκαλυφθεί ότι το μέγεθος της YEZ αλλά και ο αριθμός των πολλαπλασιαζόμενων NBK εντός αυτής ενισχύεται ύστερα από απομυελίνωση του μεσολοβίου και έχει συσχετιστεί με εξειδικευμένη συγκέντρωση αιμοπεταλίων στο αγγειακό σύστημα της YEZ. Επιπρόσθετα, παράγοντες των αιμοπεταλίων ενισχύουν την επιβίωση των NBK in vitro (Kazanis et al., 2015). Καθώς τα αιμοπετάλια φαίνονται να αποτελούν ένα σημαντικό παράγοντα ρύθμισης της λειτουργίας των NBK, στόχος της παρούσας εργασίας είναι να διερευνηθεί, αν τα νευρικά βλαστικά και προγονικά κύτταρα επηρεάζονται από την άμεση αλληλεπίδρασή τους με τα αιμοπετάλια, πραγματοποιώντας συγκαλλιέργειες μεταξύ των πληθυσμών, ενώ επεκτείνουμε τη μελέτη μας in vivo, στη βλαστική φωλεά

της YEZ, χρησιμοποιώντας μοντέλα θρομβοκυτταροπενίας σε συνδυασμό με απομυελίνωση του μεσολοβίου.

Μέθοδοι

Νευρικά βλαστικά κύτταρα απομονώθηκαν από την YEZ των πλάγιων τοιχωμάτων των πλάγιων κοιλιών του εγκεφάλου ενήλικων μυών (πρωτογενείς καλλιέργειες), ανακαλλιεργήθηκαν και στη συνέχεια επιστρώθηκαν και καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης, απουσία ή έπειτα από την προσθήκη αιμοπεταλίων. Προκειμένου να διερευνηθεί αν οι πιθανές επιδράσεις των αιμοπεταλίων στα NBK in vitro, οφείλονται στην άμεση μεταξύ τους αλληλεπίδραση, πραγματοποιήθηκαν ακόμα πειράματα όπου τα NBK καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης το οποίο είχε παραμείνει σε καλλιέργεια και είχε εμπλουτιστεί με παράγοντες των αιμοπεταλίων (conditioned medium). Επιπρόσθετα, διερευνήθηκε η αλληλεπίδραση NBK/αιμοπεταλίων σε μοριακό επίπεδο με Real time PCR. Όσον αφορά στα in vivo πειράματα, χρησιμοποιήθηκαν δυο μοντέλα θρομοβοκυτταροπενίας: παροδική θρομοβοκυτταροπενία, με χημική απαλοιφή των αιμοπεταλίων, αλλά και Nbeal2 knockout μύες που εμφανίζουν θρομβοκυτταροπενία και έχουν αιμοπετάλια με μη λειτουργικά α-κοκκία (λειτουργική θρομβοκυτταροπενία).

Αποτελέσματα

Πρωταρχικά αποτελέσματα με ανοσοφθορισμό αποκαλύπτουν ότι παρουσία αιμοπεταλίων το ποσοστό των Νευρικών βλαστικών και προγονικών κυττάρων (%SOX2) αυξάνεται σε συνθήκες διαφοροποίησης, χωρίς κάποια σημαντική επίδραση στην κυτταρική πυκνότητα. Επιπρόσθετα, παρουσία εμπλουτισμένου μέσου διαφοροποίησης (conditioned medium) το %SOX2 θετικών κυττάρων δεν επηρεάζεται, καταδεικνύοντας το ρόλο άμεσης αλληλεπίδρασης μεταξύ αιμοπεταλίων και NBK.

Σε μοριακό επίπεδο, τα πρωταρχικά αποτελέσματα με qpcr δείχνουν σημαντική μείωση της διαφοροποίησης των NBK προς τη νευρική αλλά και την ολιγοδενδρογλοιακή μοίρα και τάση αύξησης του πολλαπλασιασμού τους σε συνθήκες διαφοροποίησης. Όσον αφορά στα in vivo πειράματα, πραγματοποιούνται οι αναλύσεις στα δυο μοντέλα θρομβοκυτταροπενίας πριν και μετά από απομυελίνωση του μεσολοβίου.

Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία διερευνάται ο ρόλος των αιμοπεταλίων στα Νευρικά βλαστικά και προγονικά κύτταρα της YEZ, με κάποιες in vitro αναλύσεις και σε μεγαλύτερο βαθμό με in vivo πειράματα. Από τα in vitro αποτελέσματα καταδεικνύεται μια σημαντική επίδραση των αιμοπεταλίων στο ποσοστό των NBK που απαιτεί την άμεση μεταξύ τους αλληλεπίδραση, ενώ πρωταρχικά αποτελέσματα δείχνουν σε μοριακό επίπεδο μια τάση επίδρασης των αιμοπεταλίων στον πολλαπλασιασμό των NBK σε συνθήκες διαφοροποίησης. Τέλος, τα in vivo πειράματα θα μας επιτρέψουν να κατανοήσουμε σε μεγαλύτερο βαθμό το ρόλο των αιμοπεταλίων στα νευρικά βλαστικά και προγονικά κύτταρα στον ενήλικο εγκέφαλο, με στόχο θεραπευτικές προσεγγίσεις.

Βιβλιογραφία

Kazanis, I., Feichtner, M., et al.., Rivera, F. J. (2015). Lesion-induced accumulation of platelets promotes survival of adult neural stem/progenitor cells. Experimental neurology, 269, 75-89.

Agathou S., Káradóttir R.T. & Kazanis I. (2013). Niche derived oligodendrocyte progenitors: a source of rejuvenation or complementation for local oligodendrogenesis? *Front Cell Neurosci*., 7-188.

Hughes, E. G., Kang, S. H., Fukaya, M. & Bergles D.E. (2013). Oligodendrocyte progenitors balance growth with self-repulsion to achieve homeostasis in the adult brain. Nat Neurosci., 16(6), 668–676.

Kazanis, I., Evans, K. A., Andreopoulou, E., Dimitriou, C., Koutsakis, C., Karadottir, R. T., & Franklin, R. J. M. (2017). Subependymal Zone-Derived Oligodendroblasts Respond to Focal Demyelination but Fail to Generate Myelin in Young and Aged Mice. *Stem Cell Reports, 8(3), 685-700.*

Ευχαριστίες

Η παρούσα ερευνητική εργασία υποστηρίχθηκε από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας & Καινοτομίας (ΕΛΙΔΕΚ) και τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Καινοτομίας (ΓΓΕΚ) στους Η.Κ. και Δ.Κ, καθώς και από Υποτροφίες διδακτορικών σπουδών από το Ίδρυμα Μποδοσάκη και από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) στην Μ.Α.

Διερεύνηση της στάσης Βιοεπιστημόνων του Δ.Π.Θ. σχετικά με τις αρχές Υπεύθυνης Έρευνας και Καινοτομίας

ΚΙΟΥΣΗ Δέσποινα Ευγενία[1], ΤΣΟΧΑΝΤΑΡΙΔΗΣ Ηλίας[1], ΤΣΑΚΩΝΑΣ Γιάννης[2], ΓΑΛΑΝΗΣ Αλέξιος[1], ΠΑΠΠΑ Αγλαΐα[1]

[1]*Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής. Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Αλεξανδρούπολη, Ελλάδα*
[2]*Βιβλιοθήκη και Κέντρο Πληροφόρησης, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα, Ελλάδα*
[*]*Αλληλογραφία: apappa@mbg.duth.gr*

Περίληψη
Το πρόγραμμα RESBIOS είναι ένα ευρωπαϊκό πρόγραμμα (Horizon 2020), που στοχεύει στην προώθηση της Υπεύθυνης Έρευνας και Καινοτομίας (Responsible Research and Innovation - RRI) στις Βιοεπιστήμες, με στοχευμένες δράσεις στην εκπαίδευση, ανοιχτή πρόσβαση, δεοντολογία, ισότητα των φύλων και την διάδραση με την κοινωνία. Στο πλαίσιο αυτό, πραγματοποιήθηκε μελέτη μέσω συμπλήρωσης ερωτηματολογίου για την καταγραφή της στάσης των βιοεπιστημόνων του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης (Δ.Π.Θ.) σχετικά με τις αρχές Υπεύθυνης Έρευνας και Καινοτομίας. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι οι συμμετέχοντες είναι ενήμεροι για τις αρχές των RRIs, τις οποίες ενσωματώνουν στην έρευνα τους. Παρόλα αυτά, η οικονομική υποστήριξη από το Πανεπιστήμιο, η ισότιμη εκπροσώπηση σε θέσεις εξουσίας και η καλύτερη δικτύωση κρίνεται ότι θα ενισχύσουν την καθολική ενσωμάτωση τους στην έρευνα και την επικοινωνία της επιστημονικής κοινότητας με την κοινωνία των πολιτών.

Λέξεις κλειδιά
Υπεύθυνη Έρευνα και Καινοτομία, Βιοεπιστήμες, Ερωτηματολόγιο

Εισαγωγή
Σήμερα, η εξασφάλιση ενός υγιούς περιβάλλοντος εργασίας στον ερευνητικό τομέα, που δίνει ίσες δυνατότητες εξέλιξης στους βιοεπιστήμονες, αποτελεί κύρια προτεραιότητα ερευνητικών ιδρυμάτων και πανεπιστημίων. Επιπρόσθετα, η συμβολή της κοινωνίας στον σχεδιασμό ερευνητικών στρατηγικών διαφαίνεται ότι μπορεί να συμβάλλει στην ερευνητική διαδικασία και την καινοτομία, συνεισφέροντας στην ενίσχυση της τοπικής κοινωνίας με την πραγματοποίηση εφαρμοσμένης έρευνας. Σε αυτό το πλαίσιο, το RESBIOS είναι ένα ευρωπαϊκό πρόγραμμα του ερευνητικού πλαισίου Horizon 2020, στο οποίο συμμετέχουν 12 φορείς από 11 ευρωπαϊκές χώρες, που στοχεύει στην προώθηση της Υπεύθυνης Έρευνας και Καινοτομίας (Responsible Research and Innovation - RRI) στις Βιοεπιστήμες. Οι αρχές των RRIs είναι μια κοινωνική πολιτική η οποία στοχεύει στη συνεργασία Πανεπιστημίου-Κοινότητας κατά την διάρκεια της ερευνητικής διαδικασίας και συνοψίζεται σε 5 βασικούς άξονες: την ενίσχυση της εκπαίδευσης, της ανοιχτής πρόσβασης και διάδρασης με την κοινωνία και την προώθηση της επιστημονικής δεοντολογίας και της ισότητας των φύλων. Για τον σχεδιασμό αποτελεσματικών στρατηγικών για την προώθηση και εφαρμογή των RRIs, κρίνεται αναγκαία η καταγραφή των πεποιθήσεων και των αναγκών του ερευνητικού δυναμικού. Έτσι, βιοεπιστήμονες όλων των βαθμίδων του Δ.Π.Θ., συμμετείχαν σε έρευνα μέσω ερωτηματολογίου για την καταγραφή απόψεων, στάσεων και πεποιθήσεων σχετικά με τις αρχές των RRIs. Η χάραξη πολιτικών με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, αναμένεται να ενισχύσει την εφαρμογή των RRIs στο Δ.Π.Θ..

Υλικά και Μέθοδοι
Βιοεπιστήμονες όλων των βαθμίδων (μεταπτυχιακοί φοιτητές, υποψήφιοι διδάκτορες, μεταδιδακτορικοί ερευνητές, μέλη ΔΕΠ, ΕΔΙΠ και ΕΤΕΠ) από το Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, αλλά και από άλλα τμήματα του Δ.Π.Θ., προσκαλέστηκαν για εθελοντική συμμετοχή σε πλήρως ανωνυμοποιημένο ερωτηματολόγιο, μέσω ηλεκτρονικής αλληλογραφίας. Η συμπλήρωση του ερωτηματολογίου έγινε ηλεκτρονικά μέσω της πλατφόρμας Google Forms, για χρονικό διάστημα 2 μηνών (Μάιος 2021 – Ιούνιος 2021). Το ερωτηματολόγιο της έρευνας εγκρίθηκε από την Επιτροπή

Ηθικής και Δεοντολογίας της Έρευνας του Δ.Π.Θ. (αριθμός πρωτοκόλλου, Α.Π. Δ.Π.Θ./ΕΗΔΕ/54149/572).

Αποτελέσματα

Για την διερεύνηση της στάσης των βιοεπιστημόνων στο Δ.Π.Θ., δημιουργήθηκε ένα ερωτηματολόγιο το οποίο διαμοιράστηκε στα μέλη της ερευνητικής κοινότητας. Πιο συγκεκριμένα συμμετείχαν 104 ερευνητές, από τους οποίους 65 γυναίκες και 39 άνδρες. Επιπρόσθετα, η πλειοψηφία των συμμετεχόντων ήταν μεταπτυχιακοί φοιτητές που ανήκουν στην ηλικιακή ομάδα 21-30 (48,1 %). Το ένα τέταρτο των συμμετεχόντων δήλωσε ότι γνωρίζει «Καθόλου» ή «Λίγο» τον όρο RRI (26,9 %). Η πλειοψηφία των εθελοντών αναγνώρισε την σημασία της επικοινωνίας της επιστημονικής κοινότητας με την κοινωνία (58,5 %) και δήλωσε ότι ενσωματώνει ενεργά τις ανάγκες της στην έρευνα (57,7 %). Οι συμμετέχοντες δήλωσαν ότι η εκπαίδευση στην επικοινωνία της επιστήμης και η καλύτερη δικτύωση με κοινωνικούς φορείς μπορούν να επιτελέσουν στην καλύτερη ενσωμάτωση των αναγκών της τοπικής και διεθνούς κοινότητας στην έρευνα. Όσον αφορά την προώθηση της ανοιχτής πρόσβασης στην επιστημονική γνώση, η πλειοψηφία συμφωνεί ότι τα αποτελέσματα δημόσιας χρηματοδοτούμενης έρευνας πρέπει να είναι ελεύθερα διαθέσιμα (87,7 %), παρόλα αυτά το υψηλό κόστος δημοσίευσης σε επιστημονικά περιοδικά ανοιχτής πρόσβασης αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα. Έτσι, οι ερευνητές δήλωσαν ότι η οικονομική υποστήριξη από το πανεπιστήμιο μπορεί να διευκολύνει την προώθηση της ανοιχτής πρόσβασης, σε ποσοστό 85,6 %. Η ισότητα των φύλων αποτελεί σημαντικό ζήτημα στον τομέα των Βιοεπιστημών (90,4 %), ενώ οι ερωτηθέντες δήλωσαν ότι η ισότιμη αντιμετώπιση των φύλων μπορεί να δημιουργήσει ένα πιο παραγωγικό και ανεκτικό περιβάλλον εργασίας, καθώς και να προωθήσει τις αρχές ισότητας φύλων στην κοινότητα. Προκειμένου να επιτευχθεί η ισότητα των φύλων στον ερευνητικό τομέα, η πλειοψηφία των συμμετεχόντων κρίνει ότι είναι σημαντική η ισότιμη εκπροσώπηση σε θέσεις διοίκησης και επιτροπές αξιολόγησης προσωπικού, καθώς και η διοργάνωση επιμορφωτικών σεμιναρίων. Αντίθετα, οι συμμετέχοντες έκριναν ότι ο εμπλουτισμός του προγράμματος σπουδών με θεματικές ενότητες για θέματα φύλου, δεν θα είναι τόσο αποτελεσματική.

Συμπεράσματα

Η παρούσα μελέτη είχε ως σκοπό να καταγράψει τις πεποιθήσεις βιοεπιστημόνων του Δ.Π.Θ., σχετικά με τις αρχές των RRIs και τις ανάγκες της επιστημονικής κοινότητας για την καλύτερη προώθηση και ενσωμάτωση τους στην έρευνα τους. Πιο συγκεκριμένα, οι πλειοψηφία των ερευνητών κατέθεσαν ότι είναι ενήμεροι σχετικά με τις αρχές των RRIs, και πιο ιδιαίτερα με την σημασία της ενσωμάτωσης κοινωνικών αναγκών στον σχεδιασμό της έρευνας, με την ισότητα των φύλων στον ερευνητικό τομέα και την ανοιχτή πρόσβαση σε επιστημονικά επιτεύγματα, ειδικά σε αποτελέσματα που έχουν προκύψει από κρατικά κονδύλια. Όσον αφορά τις ανάγκες των ερευνητών, οι συμμετέχοντες κρίνουν ότι δομικές αλλαγές στο πανεπιστήμιο με ισότιμη εκπροσώπηση των φύλων σε θέσεις εξουσίας, καθώς και η οικονομική υποστήριξη και η δικτύωση με κοινωνικούς φορείς είναι απαραίτητες για την καλύτερη προώθηση των RRIs στο Πανεπιστήμιο, την τοπική και διεθνή κοινότητα. Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας έχουν σκοπό να συνεισφέρουν στον σχεδιασμό στρατηγικών για την αποτελεσματική προώθηση των αρχών των RRIs στο Δ.Π.Θ.

Ευχαριστίες

Το έργο αυτό χρηματοδοτείται από το πρόγραμμα Horizon 2020 της Ευρωπαϊκής Ένωσης για την έρευνα και την καινοτομία, με βάση τη σύμβαση χρηματοδότησης N°872146.

ResBios

This project has received funding from the European Union´s Horizon 2020 Research and Innovation Programme under the Grant Agreement N°872146

Συγκριτική, in vivo και in vitro, ανάλυση της λειτουργίας των Νευρικών Βλαστικών και Προγονικών Κυττάρων του ενήλικου εγκεφάλου εργαστηριακών μυών και άγριων τρωκτικών του γένους Microtus

ΑΝΔΡΟΥΤΣΟΠΟΥΛΟΥ Θεοδοσία, ΛΕΒΕΝΤΑΚΟΣ Γεώργιος, ΤΣΟΥΝΙΟΣ Ιωάννης, ΜΗΤΣΑΙΝΑΣ Γεώργιος, ΚΑΖΑΝΗΣ Ηλίας

Εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, theodosia.and@gmail.com
Εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, giorgosleve7@gmail.com
Εργαστήριο Βιολογίας Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, mitsain@upatras.gr
Εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, ikazanis@upatras.gr

Περίληψη
Τα νευρικά βλαστικά και προγονικά κύτταρα (ΝΒΠΚ) είναι κύτταρα με περιορισμένη αναγεννητική δραστηριότητα, τα οποία στους εγκεφάλους των ενήλικων θηλαστικών (συμπεριλαμβανομένων των αγρίων τρωκτικών, εργαστηριακών μυών αλλά και του ανθρώπου), συγκεντρώνονται σε συγκεκριμένες περιοχές που ονομάζονται νευρογεννητικές ζώνες ή φωλιές. Η διέγερση των κυττάρων αυτών θεωρείται αποτέλεσμα εξωγενών στρεσογόνων παραγόντων και σκοπός της εργασίας αυτής είναι να διερευνηθεί, εάν τα αυστηρώς ελεγχόμενα περιβάλλοντα διαβίωσης των εργαστηριακών μυών αποτελούν ανασταλτικό παράγοντα στη διαδικασία της νευρογένεσης. Το ερώτημα θα προσεγγιστεί συγκριτικά, αναλύοντας ανοσοϊστοχημικά δεδομένα από εγκεφάλους εργαστηριακών μυών και ατόμων του είδους της ελληνικής πανίδας *Microtus thomasi*.

Λέξεις κλειδιά
Ενήλικη νευρογένεση, Νευρικά Βλαστικά κύτταρα, Υποεπενδυματική Ζώνη, Οσφρητικοί λοβοί, Άγριοι πληθυσμοί θηλαστικών

Εισαγωγή

Νευρικά Βλαστικά και Προγονικά Κύτταρα (ΝΒΠΚ) εντοπίζονται στον εγκέφαλο των ενήλικων θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, σε εξειδικευμένες περιοχές που ονομάζονται νευρογεννητικές ζώνες ή φωλιές. Οι κυριότερες περιοχές αυτού του ενδιαφέροντος είναι δύο: Η Υποεπενδυματική Ζώνη (**Sub**ependymal **Z**one, **SEZ**) των πλάγιων τοιχωμάτων των πλάγιων κοιλιών του εγκεφάλου και η Υποκοκκιώδης Ζώνη (**Sub**granular **Z**one, **SGZ**) της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου. Τα ΝΒΠΚ συνεισφέρουν σε ομοιοστατικές διεργασίες χαμηλής έντασης με περιορισμένη αναγεννητική δραστηριότητα, παρόλα αυτά παραμένουν στο κέντρο του ερευνητικού ενδιαφέροντος, ως προς τη δυνατότητα ενεργοποίησης τους με στόχο την ενδυνάμωση ενδογενών μηχανισμών κυτταρικής επιδιόρθωσης. Ο εργαστηριακός μυς αποτελεί το συνηθέστερο μοντέλο πειραματικής δοκιμής πιθανών θεραπευτικών στρατηγικών ενεργοποίησης των ΝΒΠΚ του εγκεφάλου.

Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα υποδεικνύουν πως η λειτουργία των κυττάρων αυτών επηρεάζεται από πληθώρα εξωγενών παραγόντων, όπως η άσκηση, τα επίπεδα άγχους και τα αισθητήρια ερεθίσματα. Στην παρούσα εργασία ερευνούμε την υπόθεση τα νευρικά βλαστικά και προγονικά κύτταρα των εργαστηριακών μυών να παραμένουν σε ανενεργή κατάσταση, καθώς η διαβίωση των συγκεκριμένων ζώων πραγματοποιείται σε αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες, απουσία στρεσογόνων εξωτερικών παραγόντων. Για την διερεύνηση της υπόθεσης αυτής, γίνεται συγκριτική ανάλυση της λειτουργίας των ΝΒΠΚ, σε άτομα εργαστηριακών μυών καθώς και σε άτομα του είδους *Microtus thomasi*, τα οποία μελετώνται διεξοδικά ως προς την ικανότητα κυτταρικού πολλαπλασιασμού και νευρογένεσης.
Το Μεσογειακό είδος τρωκτικού *Microtus thomasi* έχει προσαρμοστεί στην υπόγεια διαβίωση, αξιοποιώντας κατά το μέγιστο δυνατό την όσφρηση και την αφή, έναντι της όρασης. Τα τρωκτικά αυτά είναι προσαρμοσμένα σε ατμόσφαιρα φτωχή σε οξυγόνο και δέχονται διαρκώς στρεσογόνα ερεθίσματα, όπως η θήρευση, η έλλειψη τροφής και οι δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες. Η παρούσα μελέτη

βασίζεται σε ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις εγκεφαλικού ιστού, στις διαφορετικές νευρογεννητικές περιοχές του εγκεφάλου, καθώς και σε πειράματα κυτταροκαλλιεργειών πρωτογενώς απομονωμένων ΝΒΠΚ.

Μέθοδοι

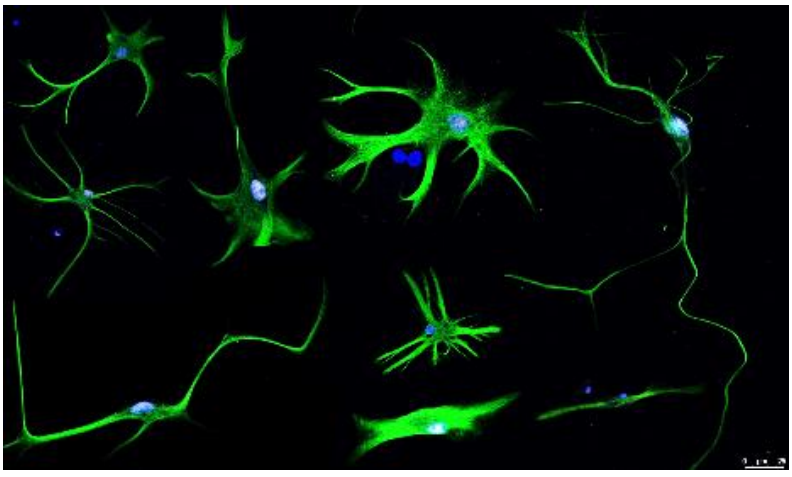
Χρησιμοποιούμε εργαστηριακούς μύες και άγρια τρωκτικά του γένους Microtus και αναλύουμε τα εγκεφαλικά δείγματα με ανοσοϊστοχημικές χρώσεις για εξειδικευμένους δείκτες για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (PCNA, Ki67) και την ταυτότητα των νευρικών και προγονικών κυττάρων (Nestin, SOX2, DCX, GFAP), δίνοντας έμφαση στην Υποεπενδυματική Ζώνη των πλάγιων τοιχωμάτων των πλάγιων κοιλιών του εγκεφάλου, στην Υποκοκκιώδη Ζώνη της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου και στους οσφρητικούς λοβούς. Επιπλέον, από τα ίδια πειραματικά ζώα καλλιεργούμε τα νευρικά βλαστικά και προγονικά κύτταρα σε συνθήκες in vitro, αμέσως μετά την απομόνωσή τους από τον εγκεφαλικό ιστό καθώς και έπειτα από δύο ανακαλλιέργειες, αξιολογώντας παρόμοιους δείκτες.

Αποτελέσματα

Η προσπάθεια καλλιέργειας των Νευρικών Βλαστικών και Προγονικών Κυττάρων των άγριων τρωκτικών του γένους Microtus, σε συνθήκες in vitro, ολοκληρώθηκε με επιτυχία, δίνοντας μας στοιχεία για την μορφολογία τους, την λειτουργία τους και την ταυτότητα τους. Τα δεδομένα που εξάγουμε από τις κυτταροκαλλιέργειες μας υποδεικνύουν προοδευτική μείωση της μιτωτικής δραστηριότητας των Νευρικών Βλαστικών και Προγονικών Κυττάρων των άγριων τρωκτικών με το πέρας του χρόνου και έντονη τάση για διαφοροποίηση προς την αστρογλοιακή μοίρα. Αντίθετα, τα ιστολογικά δεδομένα παλαιότερων ερευνών, μας υποδεικνύουν αυξημένη κυτταρική πυκνότητα και μιτωτική δραστηριότητα κατά μήκος της Υποεπενδυματικής Ζώνης στα άγρια τρωκτικά, σε σχέση με τους εργαστηριακούς μύες.

Συμπεράσματα

Η προοδευτική μείωση στην μιτωτική δραστηριότητα των Νευρικών Βλαστικών και Προγονικών Κυττάρων με το πέρας των ανακαλλιεργειών και η τάση τους για διαφοροποίηση, ενδεχομένως να οφείλεται στον μεγαλύτερο χρόνο ζωής των άγριων τρωκτικών σε σχέση με τους εργαστηριακούς μύες. Από την άλλη πλευρά, τα ιστολογικά δεδομένα των παλαιότερων ερευνών δεν συμφωνούν με τα πρόσφατα δεδομένα των κυτταροκαλλιεργειών. Πιθανόν να πρόκειται για μια ισχυρή ένδειξη ότι το μικροπεριβάλλον της νευρογεννητικής φωλιάς παρέχει σημαντικούς παράγοντες επιβίωσης, αύξησης και πολλαπλασιασμού για τα ΝΒΠΚ του συγκεκριμένου είδους. Ιδιαίτερο εύρημα είναι η χαρακτηριστική μορφολογία των αστρογλοιακών κυττάρων του είδους *Microtus thomasi*, η οποία δεν παρατηρείται στις in vivo αναλύσεις του εγκεφαλικού ιστού (Εικ.1).



Εικόνα 9. Αστρογλοιακά κύτταρα άγριων τρωκτικών του είδους Microtus thomasi, σε συνθήκες in vitro. Ανοσοϊστοχημική χρώση για τον δείκτη αστρογλοιακής μοίρας, GFAP. Απεικόνιση σε Συνεστιακό Μικροσκόπιο, φακός 40x.

Βιβλιογραφία

Obernier and Alvarez-Buylla, (2019); Neural stem cells: origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain. Development, 146 (4): dev156059. doi: 10.1242/dev.156059.

Lim and Alvarez-Buylla, (2016); The Adult Ventricular-Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. doi: 10.1101/cshperspect.a018820

Goldman, (2016); Stem and Progenitor Cell-Based Therapy of the Central Nervous System: Hopes, Hype, and Wishful Thinking. Cell Stem Cell, 18(2): 174-88. doi: 10.1016/j.stem.2016.01.012.

Kazanis, I. (2009); The subependymal zone neurogenic niche: a beating heart in the center of the brain. Brain, 132; 2909–2921. doi: 10.1093/brain/awp237

Μελέτη της αλληλεπίδρασης μιας νευροειδικής μεθυλοτρανσφεράσης της αργινίνης και της μεθυλοτρανσφεράσης της αργινίνης 1

Σοφία ΛΟΥΚΜΑΚΙΑ[1,2], Μαρούσα ΔΑΡΣΙΝΟΥ[1,2,3], Ιωάννης ΤΣΙΓΚΑΣ[1,2], Ιωάννης ΧΡΥΣΑΝΘΟΠΟΥΛΟΣ[1,2], Ευτυχία ΚΟΝΤΙΔΟΥ[4], Ελευθερία ΣΑΡΑΦΗ[1,2], Θεολόγος Μ. ΜΙΧΑΗΛΙΔΗΣ[1,2]

[1]*Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα*
[2]*Ίδρυμα Τεχνολογίας & Έρευνας – Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών, Πανεπιστημιούπολη, Ιωάννινα*
sophialook98@gmail.com, giannis.tsigas@yahoo.com, tmichael@uoi.gr
[3]Present address: *Laboratory for Molecular Cell Biology, University College London, London UK*
m.darsinou@ucl.ac.uk
[4]Present address: *Division of Cardiology, Department of Medicine Solna, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden*
eftychia.kont@gmail.com

Περίληψη
Οι μεθυλοτρανσφεράσες της οικογένειας PRMT (*Protein Arginine Methyl Transferases*) καταλύουν την μεθυλίωση καταλοίπων αργινίνης πολλών πρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένων και των ιστονών. Τα ένζυμα αυτά συμμετέχουν σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, όπως είναι η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης συμβάλλοντας έτσι στην ρύθμιση της μεταγραφή. Η πιο ενεργή μεθυλοτρανφεράση στα θηλαστικά είναι η PRMT1. Μία άλλη πρωτεΐνη αυτής της οικογένειας που ανήκει στην ίδια κατηγορία με την PRMT1 και ονομάζεται PRMT8 έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά στο κεντρικό νευρικό σύστημα, και είναι το μόνο μέλος που εντοπίζεται και στην πλασματική μεμβράνη. Απομονώθηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από νευροβλαστωματικά κύτταρα Neuro2a στα οποία έγινε διαμόλυνση με πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης χιμαιρικών μορφών των PRMT1 και PRMT8 με φθορίζουσες πρωτεΐνες. Ελέγθηκε η αλληλεπίδραση των δύο μεθυλοτρανφερασών, καθώς και πως αυτή επηρεάζει τον φαινότυπο τον κυττάρων. Τα προκαταρκτικά αποτελέσματα δείχνουν ότι τα επίπεδα και η ενεργότητα της PRMT1 στα κύτταρα Neuro2a επηρεάζονται σημαντικά από την παρουσία της νευροειδικής PRMT8.

Λέξεις-κλειδιά
Νευρικό περιβάλλον, Μεθυλοτρανσφεράση της αργινίνης 1 (PRMT1), Μεθυλοτρανσφεράση της αργινίνης 8 (PRMT8)

Εισαγωγή
Οι επιγενετικές τροποποιήσεις στο σχετικά σταθερό γονιδίωμα των κυττάρων είναι αυτές που προσδίδουν μια διαφορετικότητα στη γονιδιακή έκφραση, και την κάνουν μοναδική. Οι τροποποιήσεις αυτές δεν αφορούν τη νουκλεοτιδική αλληλουχία αλλά τις βάσεις του DNA, καθώς και αλλαγές στη δομή της χρωματίνης. Οι επιγενετικοί μηχανισμοί που συμβάλουν στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων σε κάθε κυτταρικό τύπο ή κατάσταση περιλαμβάνουν τη μεθυλίωση του DNA, τη μετα-μεταφραστική τροποποίηση των ιστονών (μεθυλίωση, ακετυλίωση κα.) καθώς και τη δράση ρυθμιστικών, μη κωδικών μορίων RNA. Τα μόρια που επιτελούν αυτές τις επιγενετικές αλλαγές είναι ένζυμα που αναγνωρίζουν και τροποποιούν κατάλληλα τα υποστρώματά τους, συμβάλλοντας στη δυναμική μεταβολή της γονιδιακής έκφρασης.

Η μεθυλίωση καταλοίπων αργινίνης είναι μία πολύ σημαντική μετα-μεταφραστική διαδικασία, η οποία συμβαίνει τόσο σε πυρηνικές όσο και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες (Bedford and Clarke, 2009). Καταλύεται από μία οικογένεια ενζύμων που ονομάζονται Ν-μεθυλοτρανσφεράσες της αργινίνης (PRMTs). Η οικογένεια αυτή στον άνθρωπο αποτελείται από 11 μέλη, τα περισσότερα από τα οποία εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα και επιτελούν διάφορες λειτουργίες. Αναγνωρίζουν και μεθυλιώνουν

κυρίως περιοχές πλούσιες σε κατάλοιπα αργινίνης και γλυκίνης, που ονομάζονται GAR μοτίβα (*Glycine-Arginine Rich domains* ή GAR domains). Υπάρχουν τρείς τρόποι με τους οποίους μπορεί να μεθυλιωθεί η γουανιδική ομάδα: να μονομεθυλιωθεί (MMA), να διμεθυλιωθεί ασύμμετρα (aDMA, και οι δύο μεθυλομάδες προσαρτώνται στο ένα από τα δύο άτομα N) ή να υποστεί συμμετρική διμεθυλίωση (sDMA, από μία μεθυλομάδα σε κάθε άτομο N). Δύο από τα μέλη της οικογένειας αυτής, η PRMT8 και η PRMT1 εμφανίζουν την μεγαλύτερη ομολογία, διαφέροντας κυρίως στο αμινοτελικό τους άκρο (Lee et al., 2005). Η PRMT1 αποτελεί την κυρίαρχη PRMT στα θηλαστικά, συμμετέχοντας σε σημαντικές διαδικασίες του κυττάρου όπως η ρύθμιση της μεταγραφής, η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, και η απόκριση στις θραύσεις του DNA, μεθυλιώνοντας ιστονικά και μη, υποστρώματα (Thiebaut et al., 2021). Η PRMT8 διαθέτει δύο ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, την νευροειδική της έκφραση και το γεγονός ότι είναι η μοναδική PRMT που εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Dong et al., 2021). Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η PRMT1 και η PRMT8 αλληλεπιδρούν άμεσα (Lee et al., 2005), ωστόσο οι γνώσεις μας γύρω από τον ρόλο αυτής της αλληλεπίδρασης στην ενδοκυττάρια κατανομή, την ενεργότητα και τα υποστρώματα αυτών των δύο ενζύμων στο νευρικό περιβάλλον είναι αρκετά περιορισμένες. Η παρούσα μελέτη επικεντρώνεται στην επικοινωνία των δύο αυτών μεθυλοτρανφερασών της αργινίνης, PRMT1 και PRMT8, καθώς και της επίδρασής της στις ιδιότητες των νευροβλαστωματικών κυττάρων.

Μέθοδοι

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο η νευροβλαστωματική σειρά ποντικού Neuro2a τα οποία διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης χιμαιρικών πρωτεϊνών για τις μεθυλοτρανσφεράσες της αργινίνης σε σύζευξη με τις φθορίζουσες πρωτεΐνες GFP ή dsRED. Οι κατασκευές αυτές εξυπηρετούν στην εύκολη ανίχνευσή των υπό μελέτη μορίων. Μετά από 48 ώρες καλλιέργειας η έκφραση των PRMT1 και PRMT8 στα κύτταρα μελετήθηκε μέσω RT-semi-qPCR και Western blot, ενώ η κατανομή τους μέσω ανοσοκυτταροχημείας και συνεστιακής μικροσκοπίας, με σκοπό να διερευνηθεί τόσο η αλληλεπίδραση των μορίων όσο και η επίδραση τους στις ιδιότητες των νευροβλαστωματικών κυττάρων. Η ανάλυση περιλαμβάνει επίσης τον έλεγχο της ενεργότητας των δύο ενζύμων με τη χρήση αντισωμάτων που αναγνωρίζουν κατάλοιπα αργινίνης διμεθυλιωμένα συμμετρικά (anti-sDMA) ή ασύμμετρα (anti-aDMA), καθώς και τα επίπεδα τροποποίησης γνωστών μορίων-στόχων.

Αποτελέσματα

Προκαταρκτικά πειράματα έκφρασης των δύο μεθυλοτρανσφερασών της αργινίνης σε νευροβλαστωματικά κύτταρα (μεμονωμένα ή σε συνδυασμό), έδειξαν ότι και τα δύο μόρια είναι ενεργά στα νευροβλαστωματικά κύτταρα, και ότι η ταυτόχρονη υπερέκφρασή τους επηρεάζει τα σχετικά πρωτεϊνικά τους επίπεδα, καθώς και τον υποκυτταρικό τους εντοπισμό. Συγκεκριμένα η παρουσία της νευροειδικής μεθυλοτρανσφεράσης μειώνει σημαντικά τα ολικά επίπεδα της PRMT1. Τρέχοντα πειράματα στοχεύουν στον έλεγχο του βαθμού μεθυλίωσης μορίων-στόχων αυτών των δύο μεθυλοτρανσφερασών μέσω ανοσοκατακρήμνισης με anti-ADMA και Western blot με αντισώματα που αναγνωρίζουν ασύμμετρα μεθυλιωμένα κατάλοιπα σε γνωστά υποστρώματα όπως το κατάλοιπο R3 της ιστόνης H4 (Wang et al., 2001)

Συμπεράσματα

Τα παραπάνω αποτελέσματα αποκαλύπτουν ότι ένας από τους ρόλους της νευροειδικής μεθυλοτρανσφεράσης, εκτός των άλλων, είναι να ρυθμίζει τα βασικά επίπεδα, αλλά και την ενεργότητα της κύριας μεθυλοτρανσφεράσης PRMT1 των κυττάρων, και ίσως και άλλων μελών αυτής της οικογένειας. Η περαιτέρω ανάλυση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των διαφορετικών μεθυλοτρασφερασών αργινίνης αναμένεται να συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση των επιμέρους ρόλων τους τόσο στο νευρικό όσο και στο μη νευρικό κυτταρικό περιβάλλον.

Ενδεικτική βιβλιογραφία

Bedford, M. T., & Clarke, S. G. (2009). Protein Arginine Methylation in Mammals: Who, What, and

Why. *Molecular Cell* doi: *10.1016/j.molcel.2008.12.013*

Dhayalan A., & Jeltsch A. (2022). Special Issue "Structure, Activity, and Function of Protein Methyltransferases". Life 12: 405, doi: 10.3390/life12030405

Lee, J., Sayegh, J., Daniel, J., Clarke, S., & Bedford, M. T. (2005). PRMT8, a New Membrane-bound Tissue-specific Member of the Protein Arginine Methyltransferase Family. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 32890–32896. doi: *10.1074/jbc.M506944200*.

Wang H., Huang Z.Q., Xia L., Feng Q., Erdjument-Bromage H., Strahl B.D., Briggs S.D., Allis C.D., Wong J., Tempst P. & Zhang Y. (2001) Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science*, **293**: 853-857

Μελέτη της δράσης της ανθρώπινης ανασυνδυασμένης θυρεοτροπίνης σε φυσιολογικές και καρκινικές κυτταρικές σειρές θυρεοειδούς που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα της

ΚΑΛΑΜΠΟΥΝΙΑΣ Γεώργιος, ΒΑΡΕΜΜΕΝΟΥ Αθηνά, ΑΡΩΝΗΣ Χρήστος, ΣΟΚΑΤ Αθανάσιος-Νασίρ, ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ Κωνσταντίνος, ΜΙΧΑΛΑΚΗ Μαρίνα, ΚΑΤΣΩΡΗΣ Παναγιώτης

Εργαστήριο Κυτταρικής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, georgekalabu@hotmail.gr
Εργαστήριο Κυτταρικής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, athina.var97@gmail.com
Εργαστήριο Κυτταρικής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών
Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστήμιο Πατρών, shaukat.ath@gmail.com
Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστήμιο Πατρών, cstath@med.upatras.gr
Τομέας Ενδοκρινολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, mixmar@upatras.gr
Εργαστήριο Κυτταρικής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, katsopan@upatras.gr

Περίληψη
Η θυρεοτροπίνη θεωρείται μιτογόνο για τα θυλακιώδη κύτταρα του θυρεοειδούς και ενοχοποιείται για την επανεμφάνιση καρκινωμάτων του αδένα. Παρόλα αυτά, πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι μοριακές αλλαγές που εμπλέκονται στην θυρεοειδική καρκινογένεση οφείλονται κυρίως στην ενεργοποίηση μονοπατιών υποδοχέων κινάσης τυροσίνης, παραβλέποντας το ρόλο της. Σε αυτή την εργασία, μελετάται η μιτογόνος δράση της TSH σε in-vitro συνθήκες σε φυσιολογικές και καρκινικές κυτταρικές σειρές θυρεοειδούς. Τα πειραματικά δεδομένα σε κυτταροκαλλιέργειες, έδειξαν ότι χαμηλές δόσεις της rhTSH (1-100 mIU/L) παρουσία ινσουλίνης δεν ήταν ικανές να επάξουν τον πολλαπλασιασμό ή τη μετανάστευση των κυττάρων. Παράλληλα, για να μελετηθεί ο ρόλος του υποδοχέα της θυρεοτροπίνης (TSHR) στους καταρράκτες μεταγωγής σήματος, μετασχηματίστηκαν κύτταρα να υπερκεκφράζουν την εν λόγω πρωτεΐνη και στη συνέχεια μελετήθηκαν οι επιπτώσεις στο ρυθμό πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης των κυττάρων αυτών, με σκοπό να αξιολογηθεί ο ρόλος του υποδοχέα στις προαναφερθείσες λειτουργίες.

Λέξεις-Κλειδιά
Θυρεοσφαιρίνη, Θηλώδες Καρκίνωμα του Θυρεοειδούς, Καρκίνος, Λέντι-ιοί, Tet-On-Advanced System

Εισαγωγή
Η θυρεοτροπίνη (TSH) είναι ορμόνη εκκρινόμενη από την υπόφυση και κινητοποιεί την εκκριτική δραστηριότητα των κυττάρων του θυρεοειδούς ενώ παράλληλα έχει μιτογόνο δράση στα κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα της. Η μεταγωγή σήματος που εκκινείται από τον υποδοχέα της TSH οδηγεί στη μεταγραφή γονιδίων που στα καρκινικά κύτταρα συσχετίζονται με την κυτταρική επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση. Σε περιπτώσεις καρκινωμάτων του αδένα η ορμόνη θεωρείται παράγοντας ρίσκου, προκαλώντας έναν πιο επιθετικό φαινότυπο, προωθώντας τη μετάσταση και επιτρέποντας την επανεμφάνιση όγκων που έχουν αφαιρεθεί. (Rowe, C. W., et al, 2017) Για αυτό το λόγο, σε ασθενείς που έχει αφαιρεθεί χειρουργικά ο αδένας, χορηγείται μόνιμα λεβοθυροξίνη σε υψηλούς τίτλους, η οποία μέσω μηχανισμών αρνητικής ανατροφοδότησης καταστέλλει την έκκρισής της. Ωστόσο, η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων λεβοθυροξίνης προκαλεί συμπτώματα κλινικού υπερθυρεοειδισμού που προξενούν πληθώρα μεταβολικών και καρδιαγγειακών προβλημάτων στους ασθενείς. (Biondi, B., & Cooper, D. S., 2019), (Schmidbauer, B. Et al., 2017) Παρόλα αυτά, πρόσφατα δεδομένα από κλινικές και βασικές μελέτες υποδεικνύουν ότι οι μοριακές αλλαγές που εμπλέκονται στην θυρεοειδική καρκινογένεση οφείλονται κυρίως στην ενεργοποίηση μονοπατιών υποδοχέων κινάσης τυροσίνης (RTKs) όπως αυτά των MAPK και της PI3K παραβλέποντας το ρόλο της TSH. Εάν αυτό είναι αληθές, ένας αξιόλογος αριθμός ασθενών υποφέρει από υποκλινικό υπερθυρεοειδισμό ασκόπως. Σκοπός αυτής της μελέτης είναι η μελέτη της μιτογόνου δράσης της TSH σε in-vitro συνθήκες (δρώντας μόνη της ή συνεργιστικά με την ινσουλίνη) σε κυτταρικές σειρές κυττάρων θυρεοειδούς, τόσο

φυσιολογικών (Nthy-Ori 3-1) όσο και καρκινικών (K1, TPC-1). Πρόσφατα, η χρήση της ανθρώπινης ανασυνδυασμένης θυρεοτροπίνης (rh-TSH) έχει καταστεί εμπορικά διαθέσιμη και θα αξιοποιηθεί αντί της βόειας θυρεοτροπίνης (b-TSH) -η οποία αξιοποιούνταν στις προηγούμενες μελέτες-και αναμένεται να μιμηθεί πιο πιστά τις συνθήκες εντός του ανθρωπίνου σώματος. (Campopiano, M. C. et al., 2020), (Wang, G., et al., 2021),

Μέθοδοι

Κύτταρα Nthy-Ori 3-1 που μοντελοποιούν τα φυσιολογικά θυρεοκύτταρα και κύτταρα K1 και TPC-1 που είναι καρκινικές κυτταρικές σειρές απομονωμένες από θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς επιστρώθηκαν σε μικροπλακίδια και επωάστηκαν με διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις ανθρώπινης ανασυνδυασμένης θυρεοσφαιρίνης (παρουσία ή μη ινσουλίνης). Στη συνέχεια, μετά από 48 ώρες επώασης τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και αξιολογήθηκε η επίδραση των ορμονών στο ρυθμό πολλαπλασιασμού τους. Έπειτα, ακολούθησαν πειράματα μετανάστευσης με τη μέθοδο Wound Healing. Για να πολλαπλασιαστεί η δράση της rh-TSH, δημιουργήθηκαν κλώνοι που υπερεξέφραζαν τον υποδοχέα της, την πρωτεΐνη TSHR. Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Lenti-X Tet-On-Advanced με το οποίο δημιουργήθηκαν λέντι-ιοί που έφεραν την αλληλουχία του γονιδίου του υποδοχέα ενσωματωμένη σε ένα σύστημα επαγόμενης έκφρασης βασισμένο στο οπερόνιο της τετρακυκλίνης. Οι ιοί παρήχθησαν σε κύτταρα HEK-293 και ακολούθησε η συλλογή τους και η διαμόλυνση κυττάρων των προαναφερθεισών θυρεοειδικών σειρών. Η επιλογή των κλώνων έγινε με αντιβιοτικά (γονίδια ανθεκτικότητας έναντι των οποίων υπήρχαν στις κλωνοποιημένες αλληλουχίες) και στη συνέχεια η επαγωγή της έκφρασης έγινε με δοξυκυκλίνη. Η επαλήθευση της υπερέκφρασης του υποδοχέα έγινε τόσο στο επίπεδο του mRNA με τη μέθοδο QPCR όσο και στο επίπεδο της πρωτεΐνης με ανάλυση Western. Στη συνέχεια, με σκοπό να επαληθευτεί η ορθότητα των αποτελεσμάτων, ελέγχθηκε η διατήρηση του θυρεοειδικού φαινοτύπου στα κύτταρα (μετασχηματισμένα και μη) μετρώντας την έκφραση της θυρεοσφαιρίνης, πρωτεΐνης που βιοσυνθέτει μόνο ο θυρεοειδής και εκκρίνεται ένεκα διέγερσης των εν λόγω κυττάρων.

Αποτελέσματα

Η rh-TSH όταν χορηγείται στα κύτταρα είτε μόνη της είτε συνεργιστικά με την ινσουλίνη δεν επαρκεί για να επάξει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ούτε την κυτταρική μετανάστευση. Οι συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν κάλυπταν ένα μεγάλο εύρος της ορμόνης, από τα αμελητέα επίπεδα που καταγράφονται στους ασθενείς -έπειτα από χορήγηση της λεβοθυροξίνης- μέχρι πολύ υψηλές συγκεντρώσεις της TSH. Στη συνέχεια επαληθεύτηκε ο μετασχηματισμός των κλώνων και η επιτυχής υπερέκφραση του υποδοχέα με Q-PCR και ανάλυση Western. Στα μετασχηματισμένα κύτταρα, έπειτα από χορήγηση της δοξυκυκλίνης με σκοπό την υπερέκφραση και σύνθεση του υποδοχέα, μελετήθηκε εκ νέου ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση, χωρίς ωστόσο να παρατηρηθούν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Συμπεράσματα

Έπειτα από ανάλυση των παραπάνω αποτελεσμάτων, φαίνεται ότι, δεδομένων των κείμενων καλλιεργητικών συνθηκών, η ανθρώπινη ανασυνδυασμένη θυρεοτροπίνη δεν δύναται να επάξει τον πολλαπλασιασμό φυσιολογικών ή καρκινικών θυρεοκυττάρων σε in-vitro συστήματα, είτε δρώντας μόνη της είτε συνεργιστικά με την ινσουλίνη. Το φαινόμενο αυτό κατέστη εντονότερο ύστερα από την υπερέκφραση του υποδοχέα, δοκιμή η οποία δεν είχε κανένα στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα. Φυσικά, καθίσταται σαφής η ανάγκη επαλήθευσης των παραπάνω αποτελεσμάτων με χορήγηση και άλλων ορμονών που δρουν συνεργιστικά με την θυρεοτροπίνη όπως ο IGF-II και στεροειδείς ορμόνες.

Βιβλιογραφία

Biondi, B., & Cooper, D. S. (2019). Thyroid Hormone Suppression Therapy. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, *48*(1), 227–237. https://doi.org/10.1016/j.ecl.2018.10.008

Campopiano, M. C., Podestà, D., Bianchi, F., Giani, C., Agate, L., Bottici, V., Cappagli, V., Lorusso, L., Matrone, A., Puleo, L., Valerio, L., Viola, D., Piaggi, P., Elisei, R., & Molinaro, E. (2020). No

difference in the outcome of metastatic thyroid cancer patients when using recombinant or endogenous TSH. *European journal of endocrinology*, *183*(4), 411–417. https://doi.org/10.1530/EJE-20-0088

Rowe, C. W., Paul, J. W., Gedye, C., Tolosa, J. M., Bendinelli, C., McGrath, S., & Smith, R. (2017). Targeting the TSH receptor in thyroid cancer. *Endocrine-related cancer*, *24*(6), R191–R202. https://doi.org/10.1530/ERC-17-0010

Schmidbauer, B., Menhart, K., Hellwig, D., & Grosse, J. (2017). Differentiated Thyroid Cancer-Treatment: State of the Art. *International journal of molecular sciences*, *18*(6), 1292. https://doi.org/10.3390/ijms18061292

Wang, G., Ren, N., Wang, S., Zhang, X., Li, Y., Sun, N., Liu, Q., Zhang, J., Song, W., & Ni, X. (2021). Serum TSH is not a risk factor for malignancy of pediatric thyroid nodules. *Endocrine-related cancer*, *28*(4), 247–255. https://doi.org/10.1530/ERC-20-0508

Μελέτη των μηχανισμών ανάπτυξης ανθεκτικότητας στη βορτεζομίμπη σε κυτταρικές σειρές προστάτη

ΖΑΦΕΙΡΟΠΟΥΛΟΥ Καλλιόπη, ΚΑΛΑΜΠΟΥΝΙΑΣ Γεώργιος, ΑΛΕΞΗΣ Σπυρίδων, ΑΝΑΣΤΑΣΟΠΟΥΛΟΣ Δανιήλ, ΜΕΝΟΥΝΟΥ Λυδία, ΣΥΜΕΩΝΙΔΗΣ Ανάργυρος, ΚΑΤΣΩΡΗΣ Παναγιώτης

Εργαστήριο Κυτταρικής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, kazafeirop@gmail.com
Εργαστήριο Κυτταρικής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, georgekalabu@hotmail.gr
Τομέας Αιματολογίας Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, spirosal1@hotmail.com
Εργαστήριο Κυτταρικής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών
Εργαστήριο Κυτταρικής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, lydiamenounou@gmail.com
Τομέας Αιματολογίας Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, symeonidis@med.upatras.gr
Εργαστήριο Κυτταρικής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, katsopan@upatras.gr

Περίληψη
Η βορτεζομίμπη (Velcade) είναι ένας αναστολέας του πρωτεασώματος με αποδεδειγμένη κλινική εφαρμογή στη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος. Η χορήγηση του σε ασθενείς για μεγάλα χρονικά διαστήματα οδηγεί στην εμφάνιση ανθεκτικότητας με μηχανισμούς οι οποίοι δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένοι ακόμα. Στην παρούσα εργασία γίνεται μία μελέτη των μηχανισμών ανάπτυξης ανθεκτικότητας στο φάρμακο χρησιμοποιώντας ως μοντέλο τις καρκινικές σειρές προστάτη DU-145 και PC3. Δημιουργήθηκαν κυτταρικοί κλώνοι ανθεκτικοί σε μεγάλες δόσεις του αναστολέα, μελετήθηκε η ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος, η δραστηριότητα του πρωτεασώματος στους δύο κλώνους και τα επίπεδα οξειδωτικού στρες των δύο τύπων κυττάρων. Η σύγκριση μεταξύ των ανθεκτικών και μη κυττάρων κατέδειξε αυξημένη συσσώρευση πρωτεασωματικών υπομονάδων στα ανθεκτικά κύτταρα, αναστολή της απόπτωσης και μειωμένο οξειδωτικό στρες σε σχέση με μη ανθεκτικά κύτταρα.

Λέξεις-κλειδιά
Πρωτεάσωμα, Βορτεζομίμπη, Καρκίνος, Οξειδωτικό στρες, Απόπτωση

Εισαγωγή
Η βορτεζομίμπη είναι ένα αντικαρκινικό φάρμακο που δρα αναστέλλοντας αντιστρεπτά την β5 υπομονάδα του 26S πρωτεασώματος. Το 26S πρωτεάσωμα είναι η κύρια μορφή πρωτεασώματος που ανιχνεύεται στα κύτταρα του αίματος και σε καρκινικούς όγκους και έχει δύο ρυθμιστικές περιοχές στα άκρα του και μία κεντρική κοίλη περιοχή με δραστικότητα τρυψίνης. Η πρωτεολυτική του δράση είναι αποτέλεσμα καταλυτικών κέντρων στις υπομονάδες τύπου β εκ των οποίων η πιο άφθονη είναι η β5 που αποτελεί και στόχο της βορτεζομίμπης. Το πρωτεάσωμα αποτελεί την κύρια οδό αποικοδόμησης ελαττωματικών και κακοφτιαγμένων πρωτεϊνών εντός του κυττάρου καθώς αναγνωρίζει και δεσμεύει πρωτεΐνες που έχουν σημανθεί για αποικοδόμηση μέσω σύζευξης με την ουμπικουιτίνη. Το σύστημα ουμπικουϊτίνης-πρωτεασώματος, αποτελεί έναν ομοιοστατικό μηχανισμό του κυττάρου και η απορρύθμισή του διαταράσσει πολλές λειτουργίες ούσα ικανή να οδηγήσει ακόμα και στον κυτταρικό θάνατο. (Chen, D. et al., 2011)

Τα καρκινικά κύτταρα λόγω αυξημένων βιοσυνθετικών ρυθμών και μειωμένου ελέγχου και ρύθμισης της πρωτεϊνοσυνθετικής τους λειτουργίας παράγουν και συσσωρεύουν ελαττωματικές πρωτεΐνες με μεγαλύτερο ρυθμό σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Η συσσώρευση τέτοιων βιομορίων παρεμποδίζει τις βασικές ενδοκυτταρικές λειτουργίες, τα επίπεδα στρες εντός του κυττάρου αυξάνονται και εάν δεν καταστεί εφικτή η επαναφορά της ισορροπίας το κύτταρο εν τέλει αποπίπτει. Επομένως, τα καρκινικά κύτταρα είναι πιο ευπαθή στην δυσλειτουργία του πρωτεασώματος, του οποίου η υπερέκφραση αποτελεί μηχανισμό επιβίωσης τους, και έτσι ερμηνεύεται και η χρήση ενός αναστολέα του πρωτεασώματος ως αντικαρκινικό φάρμακο. (Dou, Q. P., & Zonder, J. A., 2014)

Η μακροχρόνια χορήγηση βορτεζομίμπης σε ασθενείς έχει δείξει πως οδηγεί στην εμφάνιση ανθεκτικότητας στο φάρμακο αυτό χωρίς οι μηχανισμοί να είναι πλήρως κατανοητοί ακόμα. Μεταλλαγές στο γονίδιο PSMB5 που κωδικοποιεί την β5 υπομονάδα έχουν θεωρηθεί η αιτία της ανθεκτικότητας, ωστόσο, οι αλλαγές στην ενδοκυτταρική επικοινωνία και τη ρύθμιση μηχανισμών-κλειδιά για την ομοιόσταση του κυττάρου δεν έχουν αναλυθεί σε βάθος. Η ανθεκτικότητα φαίνεται να συνδέεται και με αντίσταση του κυττάρου στην απόπτωση μέσω ενίσχυσης αντι-αποπτωτικών σημάτων, με την μείωση των επιπέδων οξειδωτικού στρες αλλά και με την ενεργοποίηση μονοπατιών συνδεόμενων με την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό. Η κατανόηση των μηχανισμών αυτών θα επιτρέψει την εφαρμογή πιο στοχευμένων θεραπευτικών σχημάτων και θα παράσχει δεδομένα πάνω στη μεταγωγή σήματος που συνδέει την ομοιόσταση του κυττάρου με την επιθετικότητα του καρκίνου. Συνολικά, θα ευνοηθεί η ανάπτυξη μεθόδων καταπολέμησης της ανθεκτικότητας και συνεπώς η καταστολή του φαινομένου, βελτιώνοντας έτσι το προσδόκιμο ζωής των ασθενών. (Allmeroth, K. et al., 2021)

Μέθοδοι

Κύτταρα των δύο κυτταρικών σειρών, αφού προσδιορίστηκε η IC50 έπειτα από επώαση 72 ωρών μελετήθηκε ο ρυθμός πολλαπλασιασμού τους και μετανάστευσης παρουσία του φαρμάκου. Στην πορεία, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν με διαρκώς αυξανόμενες συγκεντρώσεις του φαρμάκου μέχρις ότου να επιβιώσουν κλώνοι με ανθεκτικότητα σε πολύ υψηλές δόσεις της ουσίας (της τάξεως των 50 nM). Στη συνέχεια οι δύο τύποι κυττάρων που είχαν προκύψει, ανθεκτικά και μη, εκτέθηκαν σε ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων της βορτεζομίμπης -και για διάφορα χρονικά διαστήματα- και συλλέχθηκαν ολικά ακατέργαστα εκχυλίσματα. Ακολούθησαν αναλύσεις της ενδοκυττάριας μεταγωγής σήματος με ανοσοστυπώματα Western και προσδιορισμός της ποσότητας της β5 υπομονάδας με την ίδια μέθοδο. Στη συνέχεια μελετήθηκε η δραστικότητα του πρωτεασώματος με χρήση του φθορίζοντος υποστρώματος. Με κυτταρομετρία ροής (FACS) έγινε αξιολόγηση της αποπτωτικής δραστηριότητας των κυττάρων και τέλος αναλύθηκαν τα επίπεδα οξειδωτικού στρες με την ίδια μέθοδο, χρησιμοποιώντας την ουσία DCFDA που υπολογίζει την ολική παρουσία ROS.

Αποτελέσματα

Μεταξύ των δύο κλώνων κυττάρων παρατηρήθηκαν αρκετές διαφορές τόσο σε επίπεδο κυτταρικής σηματοδότησης όσο και στο οξειδωτικό στρες και στην ικανότητα των κυττάρων να ανθίστανται στην απόπτωση. Τα ανθεκτικά κύτταρα εμφάνισαν καταστολή των κύριων αναστολέων του κυτταρικού κύκλου, παρατηρήθηκε αυξημένη συσσώρευση της β5 υπομονάδας του πρωτεασώματος και τα επίπεδα οξειδωτικού στρες στα ανθεκτικά κύτταρα εμφανίστηκαν μειωμένα.

Συμπεράσματα

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στη βορτεζομίμπη είναι μία πολύπλευρη διαδικασία που εμπλέκει τόσο τροποποίηση της ποσότητας του πρωτεασώματος ως άμεση απόκριση στην απενεργοποίησή του από το φάρμακο, όσο και την επαγωγή αντιαποπτωτικών μηχανισμών. Η δραστικότητα του πρωτεασώματος παραμένει σταθερή υποδεικνύοντας αλλαγές ποσοτικού παρά ποιοτικού χαρακτήρα ενώ αξιοσημείωτη είναι και η συνολική μείωση των επιπέδων οξειδωτικού στρες η οποία μπορεί να ερμηνευτεί ως ένα πλεονέκτημα που αποκτά το κύτταρο να αποσοβεί το στρες που προκαλείται από συσσώρευση ελαττωματικών βιομορίων.

Βιβλιογραφία

Allmeroth, K., Horn, M., Kroef, V., Miethe, S., Müller, R. U., & Denzel, M. S. (2021). Bortezomib resistance mutations in PSMB5 determine response to second-generation proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Leukemia, 35*(3), 887–892. https://doi.org/10.1038/s41375-020-0989-4

Chen, D., Frezza, M., Schmitt, S., Kanwar, J., & Dou, Q. P. (2011). Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Current cancer drug targets, 11*(3), 239–253. https://doi.org/10.2174/156800911794519752

Dou, Q. P., & Zonder, J. A. (2014). Overview of proteasome inhibitor-based anti-cancer therapies: perspective on bortezomib and second generation proteasome inhibitors versus future generation inhibitors of ubiquitin-proteasome system. *Current cancer drug targets*, *14*(6), 517–536. https://doi.org/10.2174/1568009614666140804154511

Χορήγηση καρφιλζομίμπης σε κυτταρικές σειρές προστάτη ανθεκτικές στη βορτεζομίμπη και μελέτη της βιωσιμότητας, του πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης και του οξειδωτικού στρες

ΚΑΛΑΜΠΟΥΝΙΑΣ Γεώργιος, ΖΑΦΕΙΡΟΠΟΥΛΟΥ Καλλιόπη, ΑΛΕΞΗΣ Σπυρίδων, ΒΛΑΧΟΣ Απόστολος, ΜΕΝΟΥΝΟΥ Λυδία, ΣΥΜΕΩΝΙΔΗΣ Ανάργυρος, ΚΑΤΣΩΡΗΣ Παναγιώτης

Εργαστήριο Κυτταρικής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, georgekalabu@hotmail.gr
Εργαστήριο Κυτταρικής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, kazafeirop@gmail.com
Τομέας Αιματολογίας Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, spirosal1@hotmail.com
Εργαστήριο Κυτταρικής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, vlachos.upatras@gmail.com
Εργαστήριο Κυτταρικής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, lydiamenounou@gmail.com
Τομέας Αιματολογίας Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, symeonidis@med.upatras.gr
Εργαστήριο Κυτταρικής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, katsopan@upatras.gr

Περίληψη
Η καρφιλζομίμπη (Kyprolis) είναι ένας αναστολέας του πρωτεασώματος δεύτερης γενιάς, που χορηγείται σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα οι οποίοι ανέπτυξαν ανθεκτικότητα στη βορτεζομίμπη. Η διατάραξη του συστήματος του πρωτεασώματος από ειδικούς αναστολείς όπως η βορτεζομίμπη και η καρφιλζομίμπη, αποτελεί μία κλινικά εφαρμοσμένη και επιτυχή αντικαρκινική θεραπεία, ωστόσο, σε βάθος χρόνου οι ασθενείς αναπτύσσουν ανθεκτικότητα. Η διαφορά των δύο φαρμάκων έγκειται στην μη αντιστρεπτή και πιο υψηλή συγγένεια της καρφιλζομίμπης για το πρωτεάσωμα, γεγονός που προκαλεί περισσότερες παρενέργειες αλλά δυσχεραίνει την ικανότητα ανθεκτικών κλώνων να επιβιώνουν. Σε αυτή τη μελέτη προσομοιώνεται η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στη βορτεζομίμπη και στη συνέχεια η χορήγηση καρφιλζομίμπης στα ανθεκτικά κύτταρα και αναλύονται οι αλλαγές που εντοπίζονται σε επίπεδο κυτταρικής σηματοδότησης, οι αλλαγές στο ρυθμό πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης καθώς και τα επίπεδα οξειδωτικού στρες.

Λέξεις-Κλειδιά
Πρωτεάσωμα, Καρφιλζομίμπη, Βορτεζομίμπη, Καρκίνος, Ανθεκτικότητα

Εισαγωγή

Η καρφιλζομίμπη είναι ένα αντικαρκινικό φάρμακο που δρα αναστέλλοντας μη αντιστρεπτά την πρωτεοσωματική δραστηριότητα σε αντίθεση με αναστολείς όπως η βορτεζομίμπη που η πρόσδεση έχει αντιστρεπτή φύση. Στόχος του φαρμάκου αυτού είναι η β5 υπομονάδα, η κυριότερη και πιο άφθονη υπομονάδα τύπου β του 26S πρωτεασώματος. Η μορφή αυτή πρωτεασώματος, είναι αυτή που κυρίως ανιχνεύεται στα κύτταρα του αίματος και σε καρκινικούς όγκους και έχει δύο ρυθμιστικές περιοχές στα άκρα του και μία κεντρική κοίλη περιοχή με δραστικότητα τρυψίνης. Το πρωτεάσωμα, σε συνδυασμό με την αυτοφαγία, αποτελούν τις κύριες οδούς αποικοδόμησης ελαττωματικών και κακοφτιαγμένων πρωτεϊνών εντός του κυττάρου. Προκειμένου να αποικοδομηθεί μία πρωτεΐνη από το πρωτεάσωμα, θα πρέπει πρώτα να σημανθεί και το σεσημασμένο πλέον πολυπεπτίδιο μπορεί να δεσμευτεί και να κατακερματιστεί σε μικρότερα πεπτίδια. Η σήμανση πρωτεϊνών για αποικοδόμηση γίνεται με ομοιοπολική πρόσδεση της πρωτεΐνης ουμπικουϊτίνης και σύστημα ουμπικουϊτίνης-πρωτεασώματος (**U**biquitin-**P**roteasome **S**ystem, **UPS**), αποτελεί έναν ομοιοστατικό μηχανισμό του κυττάρου που η απορρύθμισή του διαταράσσει πολλές λειτουργίες όντας ικανή να οδηγήσει ακόμα και στον κυτταρικό θάνατο. (Kortuem, K. M., & Stewart, A. K., 2013)

Τα καρκινικά κύτταρα λόγω αυξημένων βιοσυνθετικών ρυθμών και μειωμένου ελέγχου και ρύθμισης της πρωτεϊνοσυνθετικής τους λειτουργίας παράγουν και συσσωρεύουν ελαττωματικές πρωτεΐνες με μεγαλύτερο ρυθμό σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Η συσσώρευση τέτοιων βιομορίων παρεμποδίζει τις βασικές ενδοκυτταρικές λειτουργίες, τα επίπεδα στρες εντός του κυττάρου αυξάνονται και εάν δεν καταστεί εφικτή η επαναφορά της ισορροπίας το κύτταρο εν τέλει αποπίπτει. Επομένως,

τα καρκινικά κύτταρα είναι πιο ευπαθή στην δυσλειτουργία του πρωτεασώματος, του οποίου η υπερέκφραση αποτελεί μηχανισμό επιβίωσης τους, και έτσι ερμηνεύεται και η χρήση ενός αναστολέα του πρωτεασώματος ως αντικαρκινικό φάρμακο. (Dou, Q. P., & Zonder, J. A., 2014)

Η βορτεζομίμπη ήταν ο πρώτος αναστολέας που αξιοποιήθηκε για την θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος με σημαντική επιτυχία, ωστόσο, η χορήγηση της βορτεζομίμπης βαθμιαία οδηγεί και σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο φάρμακο αυτό απαιτώντας αλλαγή του θεραπευτικού σχήματος με χορήγηση ισχυρότερων χημειοθεραπευτικών ουσιών ενώ παράλληλα προκαλεί αρκετές ανεπιθύμητες παρενέργειες όπως η περιφερική νευροπάθεια. Ως φάρμακο δεύτερης γενιάς η καρφιλζομίμπη εμφανίζει λιγότερες παράπλευρες (off-target) παρενέργειες ωστόσο ένεκα του κοινού τρόπου δράσης η ανάπτυξη ανθεκτικότητας (ή η ύπαρξη ανθεκτικότητας στον πρωτοπαθή όγκο) δεν αποτελεί σπάνιο φαινόμενο, για αυτό κάλλιστα χορηγείται συνήθως συνδυαστικά με άλλα χημειοθεραπευτικά φάρμακα. (Allmeroth, K. et al., 2021), (Woodle, E. S. et al., 2020)

Στόχος αυτής της εργασίας είναι η τόσο η μελέτη των μηχανισμών ανάπτυξης ανθεκτικότητας το φάρμακο αυτό de novo, όσο και η μελέτη της επίδρασης του φαρμάκου σε κύτταρα ανθεκτικά σε έναν αναστολέα πρώτης γενιάς όπως είναι η βορτεζομίμπη. Η ανάπτυξη διασταυρούμενης ανθεκτικότητας (cross-resistance) στην καρφιλζομίμπη δεν έχει μελετηθεί εκτενώς ως μηχανισμός και βασιζόμενοι στο δόγμα βελτίωσης των υπαρχουσών φαρμακευτικών ουσιών παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον η αποσαφήνισή τους.

Μέθοδοι

Κύτταρα των καρκινικών κυτταρικών σειρών προστάτη DU-145 και PC-3 καλλιεργήθηκαν για αρκετές εβδομάδες παρουσία βορτεζομίμπης έως ότου αναπτυχθεί ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις του φαρμάκου. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η ευπάθεια των κυττάρων αυτών στη χορήγηση καρφιλζομίμπης και η επίδραση του φαρμάκου στην κυτταρική βιωσιμότητα, μετανάστευση και πολλαπλασιασμό. Παράλληλα, δημιουργήθηκαν κλώνοι ανθεκτικοί στην καρφιλζομίμπη και συγκρίθηκαν οι δύο ομάδες στις προαναφερθείσες παραμέτρους. Με τη μέθοδο της αννεξίνης χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής προσδιορίστηκε η αποπτωτική κατάσταση των κυττάρων ενώ με τη μέθοδο DCFDA μετρήθηκαν τα επίπεδα οξειδωτικού στρες που εμφάνιζαν τα κύτταρα. Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο δεύτερο φάρμακο μελετήθηκε και σε πρωτεϊνικό επίπεδο ποσοτικοποιώντας τόσο την έκφραση της β5 υπομονάδας του πρωτεασώματος όσο και τη συσσώρευση σημάτων αναστολής του κυτταρικού κύκλου που εκκινεί το φάρμακο. Οι αναλύσεις αυτές έγιναν με Western Blots και στη συνέχεια, με την ίδια μέθοδο, ακολούθησε διερεύνηση των κυρίων μορίων στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος που εμπλέκονται στην επιβίωση των κυττάρων και τον πολλαπλασιασμό.

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Η ανθεκτικότητα στη βορτεζομίμπη φαίνεται να αναπτύσσεται αρκετά πιο ραγδαία σε σχέση με τον αναστολέα δεύτερης γενιάς ωστόσο ανθεκτικά κύτταρα προκύπτουν με χορήγηση και των δύο αναστολέων. Κύτταρα ανθεκτικά στην βορτεζομίμπη εμφανίζουν αυξημένη-αλλά όχι επάξια ανθεκτικότητα στην καρφιλζομίμπη η οποία ωστόσο, μέσω φαινομένων επιλογής ενισχύεται ταχύτατα όταν τα κύτταρα καλλιεργηθούν αρκετό καιρό στο δεύτερο φάρμακο. Μελλοντικά θα ελεγχθεί εάν τα ανθεκτικά στους δύο αναστολείς πλέον κύτταρα διατηρούν την ανθεκτικότητα στην βορτεζομίμπη ή την έχουν απωλέσει μετά από μακροχρόνια επιβίωση μόνο σε περιβάλλον καρφιλζομίμπης ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζει και η περαιτέρω διερεύνηση των αλλαγών που έχουν επέλθει στην ενδοκυτταρική σηματοδότηση.

Βιβλιογραφία

Allmeroth, K., Horn, M., Kroef, V., Miethe, S., Müller, R. U., & Denzel, M. S. (2021). Bortezomib resistance mutations in PSMB5 determine response to second-generation proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Leukemia*, *35*(3), 887–892. https://doi.org/10.1038/s41375-020-0989-4

Dou, Q. P., & Zonder, J. A. (2014). Overview of proteasome inhibitor-based anti-cancer therapies: perspective on bortezomib and second generation proteasome inhibitors versus future generation inhibitors of ubiquitin-proteasome system. *Current cancer drug targets*, *14*(6), 517–536. https://doi.org/10.2174/1568009614666140804154511

Kortuem, K. M., & Stewart, A. K. (2013). Carfilzomib. *Blood*, *121*(6), 893–897. https://doi.org/10.1182/blood-2012-10-459883

Woodle, E. S., Tremblay, S., Brailey, P., Girnita, A., Alloway, R. R., Aronow, B., Dasgupta, N., Ebstein, F., Kloetzel, P. M., Lee, M. J., Kim, K. B., Singh, H., & Driscoll, J. J. (2020). Proteasomal adaptations underlying carfilzomib-resistance in human bone marrow plasma cells. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, *20*(2), 399–410. https://doi.org/10.1111/ajt.15634

Μία in—vitro μελέτη της αντικαρκινικής δράσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σε καρκινικές και φυσιολογικές κυτταρικές σειρές

ΚΑΛΑΜΠΟΥΝΙΑΣ Γεώργιος, ΑΝΑΓΝΩΣΤΟΠΟΥΛΟΥ Μαρία-Ελένη, ΒΛΑΧΟΣ Απόστολος, ΓΑΡΔΕΛΗ Χρυσαυγή, ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ Σεραφείμ, ΚΑΤΣΩΡΗΣ Παναγιώτης

Εργαστήριο Κυτταρικής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, georgekalabu@hotmail.gr
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, elena.anagn7@gmail.com
Εργαστήριο Κυτταρικής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, vlachos.upatras@gmail.com
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, agardeli@aua.gr
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, spapanik@aua.gr
Εργαστήριο Κυτταρικής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, katsopan@upatras.gr

Περίληψη
Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) είναι ενώσεις πολύτιμες για την εύρυθμη λειτουργία του κυττάρου, εφόσον είναι δομικά στοιχεία των μεμβρανών του, μεταβολικά πρόδρομα πολλών ενώσεων, καθώς επίσης και αποθήκες ενέργειας. Παράλληλα, η λειτουργία τους έχει συνδεθεί με σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην απόπτωση και με την πρόκληση οξειδωτικού στρες, και προηγούμενες in vitro μελέτες σε καρκινικά κύτταρα, έχουν δείξει ότι οι ενώσεις αυτές έχουν πιθανή αντικαρκινική δράση, ωστόσο η αποτελεσματικότητά τους δεν έχει μελετηθεί εκτενώς. Στην παρούσα προσέγγιση, μελετάται η δράση των PUFAs σε καρκινικές και φυσιολογικές κυτταρικές σειρές με τις κύριες παραμέτρους που ελέγχονται να αφορούν στην κυτταρική βιωσιμότητα, τον πολλαπλασιασμό και τη τάση μετανάστευσης. Τα PUFAs παρήχθησαν κατά την ανάπτυξη του Ζυγομύκητα *Cunninghamella elegans* σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό συνθήκες περιορισμένου αζώτου και στη συνέχεια το μικροβιακό λίπος που απομονώθηκε, μετατράπηκε σε άλατα του καλίου και του λιθίου (FALs) τα οποία μετέπειτα χορηγήθηκαν στα κύτταρα.

Λέξεις-Κλειδιά
Πολυακόρεστα Λιπαρά Οξέα (PUFAs), Μικροβιακό λίπος, Καρκίνος, Απόπτωση, Οξειδωτικό στρες

Εισαγωγή
Η ανάπτυξη ελαιογόνων μικροοργανισμών σε κοινά και από βιομηχανικής απόψεως συχνά ανεπιθύμητα υποστρώματα έχει επιτρέψει την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Polyunsaturated Fatty Acids, PUFAs), μορίων μεγάλης βιολογικής και πιθανής φαρμακευτικής αξίας. Τα PUFAs είναι απαραίτητο συστατικό της διατροφής του ανθρώπου καθώς απουσιάζουν τα ένζυμα για την de novo σύνθεσή τους, ενώ παράλληλα, είναι ενώσεις που χρησιμεύουν στο κύτταρο είτε ως δομικό συστατικό των μεμβρανών του, είτε ως μεταβολικό πρόδρομο, είτε ως αποθήκη ενέργειας. Το κύτταρο μπορεί αφενός να αποθηκεύει τα PUFAs ως τριγλυκερίδια και αφετέρου να τα ενσωματώνει σε μεμβρανικές δομές. Παράλληλα, πέρα από τις καθαρά μεταβολικές δράσεις τους φέρονται να συμμετέχουν και στην ενδοκυτταρική μεταγωγή σήματος, αποτελώντας σήματα που σχετίζονται με τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις, τον κυτταρικό θάνατο αλλά και τη διαχείριση του οξειδωτικού στρες από το κύτταρο. (Freitas, R., & Campos, M. M., 2019)

Τα PUFAs κατηγοριοποιούνται σε δύο μεγάλες ομάδες ανάλογα με τη θέση των διπλών δεσμών στην αλειφατική αλυσίδα, στα ω-3 λιπαρά οξέα και στα ω-6 λιπαρά οξέα. Τα πρώτα τα λαμβάνουμε από τα θαλασσινά και τα ψάρια καθώς παράγονται από το φυτοπλαγκτόν και εισέρχονται στην τροφική αλυσίδα μέσω κατανάλωσης των εν λόγω τροφών ενώ τα ω-6 παράγονται από τα χερσαία φυτά και φτάνουν στον άνθρωπο μέσω των καρπών αλλά και των ζωικών τροφών. Οι δύο ομάδες λιπαρών οξέων εμφανίζουν ανταγωνιστικές δράσεις στο ανθρώπινο σώμα με τα ω-6 να έχουν συνδεθεί με κινητοποίηση των μονοπατιών απόπτωσης και την αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων οξειδωτικού στρες. (Djuricic, I., & Calder, P. C., 2021). Η δράση τους αυτή τα θέτει στο στόχαστρο ως υποψήφια

αντικαρκινικά φάρμακα, καθώς η οποιαδήποτε διαταραχή της ομοιόστασης του κυττάρου που μπορεί να εμποδίσει την ανεξέλεγκτη διαίρεσή του είναι δυνητικά μία θεραπευτική προσέγγιση. (Bose, C. et al., 2021), (Fasano, E. et al., 2017)

Μέθοδοι

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα παρήχθησαν κατά την ανάπτυξη του Ζυγομύκητα *Cunninghamella elegans* σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό συνθήκες περιορισμένου αζώτου και T=30°C. Το μικροβιακό λίπος παραλήφθηκε από την ξηρή βιομάζα με εκχύλιση σε διαλύτη χλωροφόρμιο: μεθανόλη (2:1) και ακολούθησε συμπύκνωση υπό κενό. Η μετατροπή του μικροβιακού λίπους σε άλατα του καλίου πραγματοποιήθηκε με σαπωνοποίηση ενώ ακολούθως με την προσθήκη HCl (4N) παρήχθησαν ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFAs). Τα FFAs μετατράπηκαν σε άλατα του λιθίου (FALs) με την προσθήκη LiOH (1N).

Τα άλατα λιθίου στη συνέχεια χορηγήθηκαν στις κυτταρικές σειρές με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση τους τόσο στη βιωσιμότητα όσο και στην κυτταρική μετανάστευση. Αρχικά χορηγήθηκαν διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις των αλάτων για να προσδιοριστεί η IC_{50} της κάθε κυτταρικής σειράς και επομένως η ευπάθεια της στα λιπίδια αυτά. Στη συνέχεια ακολούθησαν πειράματα μετανάστευσης με τις μεθόδους Wound Healing Assay/Scratch Test και Chemotaxis Chambers. Η πρώτη μέθοδος εκτιμά την ικανότητα των κυττάρων να μεταναστεύουν προς περιοχές που απουσιάζουν κύτταρα και πόσο η προς μελέτη ουσία επηρεάζει αυτή τη λειτουργία ενώ η δεύτερη μέθοδος δείχνει την ικανότητα της ουσία να δρα ως χημειοτακτικός παράγοντας, είτε έλκοντας είτε απωθώντας τα κύτταρα. Στη συνέχεια με χρήση κυτταρομετρίας ροής και συγκεκριμένα με τη μέθοδο DCFDA Assay μετρήθηκαν τα επίπεδα οξειδωτικού στρες εντός των κυττάρων ενώ με την ίδια μέθοδο μετρώντας τα ενδοκυτταρικά επίπεδα αννεξίνης, αξιολογήθηκε και η τάση των κυττάρων να αποπίψουν και κατά πόσο τα PUFAs έχουν επάξει ή καταστείλει το φαινόμενο.

Αποτελέσματα

Σε πρώτη φάση υπολογίστηκαν οι IC_{50} των PUFAs στις διάφορες κυτταρικές σειρές. Σε σύγκριση μεταξύ των διάφορων κυτταρικών τύπων δεν ανιχνεύτηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ως προς τη δραστική συγκέντρωση. Γενικά φάνηκε ότι τα άλατα είχαν σε όλα τα κύτταρα κυτταροτοξική δράση στο μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων που δοκιμάστηκε και η ανασταλτική δράση αυτή φάνηκε και στην ικανότητα των κυττάρων να μεταναστεύουν. Στη συνέχεια μετρήθηκαν τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες τα οποία έδειξαν πως συνάδουν με την κυτταροτοξική δράση των αλάτων ενώ η επαλήθευση της αποπτωτικής τάσης των κυττάρων έγινε με την κυτταρομετρία ροής και έδειξε επαγωγή της απόπτωσης μετά από χορήγηση.

Συμπεράσματα

Τα PUFAs με την μορφή των αλάτων λιθίου έδειξαν κυτταροστατική και έπειτα κυτταροτοξική δράση τόσο σε καρκινικές όσο και σε φυσιολογικές κυτταρικές σειρές. Ο προσδιορισμός της IC_{50} έδειξε μια σχετική ομοιογένεια ανάμεσα στους διάφορους κυτταρικούς τύπους, υποδεικνύοντας ότι η δράση τους δεν έγκειται σε μηχανισμούς που αξιοποιεί μόνο το καρκινικό κύτταρο, αλλά σε πιο βασικά για το μεταβολισμό συστήματα των κυττάρων. Ένεκα της λιπιδικής φύσης τους, πιστεύεται ότι η κυτταροτοξική τους δράση οφείλεται σε διαταραχή της μεμβρανικής λειτουργίας και η μελέτη αυτής της δράσης θα αποτελέσει αντικείμενο μελλοντικών πειραμάτων. Αυτό που αξίζει να αναφερθεί είναι πώς πρέπει να διερευνηθούν και εναλλακτικοί τρόποι μεταφοράς των λιπιδίων εντός των κυττάρων, για παράδειγμα με τη χρήση μικκυλίων ή νανοσωματιδίων. Φυσικά σε μεταγενέστερο στάδιο θα πρέπει να ελεγχθεί η επίδραση των ουσιών στους καταρράκτες μεταγωγής σήματος εντός του κυττάρου για να ερμηνευτεί καλύτερα η επαγωγή τόσο της απόπτωσης όσο και της απόκρισης των κυττάρων στο στρες που προκαλείται από την παρουσία των PUFAs στο περιβάλλον τους.

Βιβλιογραφία

Bose, C., Hindle, A., Lee, J., Kopel, J., Tonk, S., Palade, P. T., Singhal, S. S., Awasthi, S., & Singh, S. P. (2021). Anticancer Activity of Ω-6 Fatty Acids through Increased 4-HNE in Breast Cancer Cells. *Cancers*, *13*(24), 6377. https://doi.org/10.3390/cancers13246377

Djuricic, I., & Calder, P. C. (2021). Beneficial Outcomes of Omega-6 and Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Human Health: An Update for 2021. *Nutrients*, *13*(7), 2421. https://doi.org/10.3390/nu13072421

Fasano, E., Serini, S., Cittadini, A., & Calviello, G. (2017). Long-chain n-3 PUFA against breast and prostate cancer: Which are the appropriate doses for intervention studies in animals and humans?. *Critical reviews in food science and nutrition*, *57*(11), 2245–2262. https://doi.org/10.1080/10408398.2013.850060

Freitas, R., & Campos, M. M. (2019). Protective Effects of Omega-3 Fatty Acids in Cancer-Related Complications. *Nutrients*, *11*(5), 945. https://doi.org/10.3390/nu11050945

Χρηματοδότηση

Η παρούσα ερευνητική εργασία χρηματοδοτήθηκε από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛΙΔΕΚ). Τίτλος: « Βιομετατροπή της γλυκερόλης σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα υψηλού φαρμακευτικού ενδιαφέροντος»

Διερεύνηση σηματοδοτικών μονοπατιών και γονιδίων που εμπλέκονται στη βιολογία των κοκκωδών κυττάρων και στην ωρίμανση του ωοθυλακίου

Ελευθερία ΣΑΡΑΦΗ[1,2], Κυριακή ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ[1,2] , Ιωάννης ΤΣΙΓΚΑΣ[1,2] ,Ειρήνη ΜΑΣΤΟΡΑ[3,4], Αθανάσιος ΖΗΚΟΠΟΥΛΟΣ[4], Σοφία ΛΟΥΚΜΑΚΙΑ[1,2], Ελισσάβετ ΧΑΤΖΗ[3,4], Ιωάννα ΜΠΟΥΜΠΑ[3,4], Ιωάννης ΓΕΩΡΓΙΟΥ[3,4], Θεολόγος Μ. ΜΙΧΑΗΛΙΔΗΣ[1,2]

[1] Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα
[2] Ίδρυμα Τεχνολογίας & Έρευνας – Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών, Πανεπιστημιούπολη, Ιωάννινα
sarafi.elef@gmail.com , p_kyriaki@uoi.gr, , giannis.tsigas@yahoo.com, sophialook98@gmail.com
tmichael@uoi.gr
[3] Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής στην Κλινική Πράξη, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα
[4] Μονάδα Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ιωαννίνων, Ιωάννινα
eirinimastora1@gmail.com, zikopoulos.athan@outlook.com, xatzibetty@gmail.com, ibouba@uoi.gr, igeorgio@uoi.gr

Περίληψη
Υπάρχουν πολλές τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, η βασικότερη είναι η τεχνητή εξωσωματική γονιμοποίηση (*in vitro fertilization* - IVF), όπου στις γυναίκες χορηγούνται κατάλληλες ορμόνες οι οποίες αποσκοπούν στην παραγωγή περισσότερων «ώριμων» ωοθυλακίων. Έχουν αναπτυχθεί διάφορα πρωτόκολλα, τα κυριότερα βασίζονται στη χορήγηση φαρμακευτικών αναλόγων της υποθαλαμικής ορμόνης GnRH, σε συνδυασμό με τις γοναδοτροπίνες FSH και LH, οι οποίες παράγονται στην υπόφυση. Η μελέτη μας επικεντρώνεται στην απομόνωση των κοκκωδών κυττάρων από το ωοθυλακικό υγρό γυναικών που υποβάλλονται σε IVF, και στην συγκριτική ανάλυση της ενεργότητας σημαντικών σηματοδοτικών μονοπατιών όπως το mTOR και το Hippo τα οποία συμμετέχουν στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων καθώς και των επιπέδων mRNA μορίων υπεύθυνα για την τη στερεοειδογένεση καθώς και την επικοινωνία των κοκκωδών κυττάρων μεταξύ τους αλλά και με το ωάριο. Τα προκαταρκτικά πειράματα δείχνουν σημαντικές διαφορές σε ορισμένους από τους παραπάνω παράγοντες μεταξύ των γυναικών μικρής και μεγάλης ηλικίας καθώς και γυναικών με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών.

Λέξεις-κλειδιά
κοκκώδη κύτταρα, γήρανση, σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, mTOR, Hippo

Εισαγωγή
Όσο περνάνε τα χρόνια, για μια πλειάδα παραγόντων, αυξάνονται διαρκώς τα ποσοστά της υπογονιμότητας και ένας μεγάλος αριθμός ζευγαριών οδηγούνται σε τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Δύο από τις σημαντικότερες αιτίες είναι η σχετικά όψιμη ηλικία αλλά και παθολογικοί παράγοντες όπως το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (*Polycystic Ovary Syndrome*, PCOS). Η πιο συνηθισμένη προσέγγιση είναι η τεχνητή γονιμοποίηση, η οποία βασίζεται στη χορήγηση αναλόγων (ανταγωνιστές ή αγωνιστές) της GnRH (*Gonadotropin-Releasing Hormone*), καθώς και ανασυνδυασμένων γοναδοτροπινών όπως η FSH (*recombinant human FSH* (*Follicle Stimulating Hormone*), r-hFSH) με (ή χωρίς) ανασυνδυασμένη LH (*recombinant human LH* (*Luteinizing Hormone*) r-hLH), ή φυσικών ορμονών όπως η ανθρώπινη εμμηνοπαυσιακή γοναδοτροπίνη (*Highly Purified human Menopausal Gonadotropin*, HP-hMG,).

Μέθοδοι
Στη μελέτη συμμετέχουν γυναίκες οι οποίες υποβάλλονται σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή στο

Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων με ενήμερη συγκατάθεσή τους. Χωρίζονται σε δυο κατηγορίες, μια η οποία αποτελείται από δείγματα γυναικών σχετικά μικρής ηλικίας (30 – 35 ετών) η οποία διακρίνεται σε δυο υποομάδες (υποομάδα rhFSH και υποομάδα HP-hMG), μεταξύ των οποίων υπάρχουν και δείγματα γυναικών με PCOS, και μία ομάδα μεγαλύτερης ηλικίας (38 – 45 ετών) η οποία χωρίζεται σε δυο υποομάδες όπως και στις γυναίκες μικρότερης ηλικίας, με τη μόνη διαφορά ότι rhFSH χορηγείται πάντα μαζί με rhLH (*λόγω των χαμηλών επιπέδων LH σε αυτές τις ηλικίες*). Σε όλες τις κατηγορίες η χορήγηση των γοναδοτροπινών διαρκεί 10 ημέρες σε συνδυασμό με τη χορήγηση ανταγωνιστή της GnRH για 4 ημέρες.

Κατά τη διάρκεια της τεχνητής γονιμοποίησης συλλέγεται το ωοθυλακικό υγρό από το οποίο απομονώνουμε τα τοιχωματικά κοκκώδη κύτταρα, καθώς και τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου τα οποία έρχονται σε άμεση επαφή με το ωάριο. Στη συνέχεια από τα κύτταρα αυτά, απομονώνονται πρωτεΐνες και ελέγχονται σηματοδοτικά μονοπάτια mTOR και Hippo ,τα οποία είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη των ωοθυλακίων (Papageorgiou et al. 2021), μελετώντας τα επίπεδα φωσφορυλίωσης βασικών ρυθμιστικών μορίων με τη χρήσης ειδικών αντισωμάτων (**p-PTEN**(Ser380), **pS6**(Ser240/244) και **p-YAP(**Ser127) καθώς και ο βαθμός της απόπτωσης (πρωτεΐνες της οικογένειας **Bcl-2**). Απομονώνεται επίσης και RNA από τα κοκκώδη κύτταρα με στόχο τον έλεγχο των διαφορών στην έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων (Turathum et al. 2021) καθώς και γονιδίων τα οποία είναι υπεύθυνα για την στεροειδογένεση (*Cytochrome P450 Family 19 Subfamily A Member 1, **Cyp19A1***). Τέλος, τα κύτταρα αυτά καλλιεργούνται σε ειδικά υποστρώματα και μελετώνται με ανοσοκυτταροχημεία και συνεστιακή μικροσκοπία, με σκοπό να διερευνηθούν τα παραπάνω μονοπάτια αλλά και η μορφολογία τους, καθώς και το δυναμικό πολλαπλασιασμού τους.

Αποτελέσματα

Προκαταρτικά αποτελέσματα έδειξαν ότι οι γυναίκες μικρής ηλικίας στις οποίες είχε χορηγηθεί rhFSH εμφάνισαν μειωμένα επίπεδα της p-YAP και της προαποπτωτικής πρωτεΐνης Bax έναντι των γυναικών στις οποίες είχε χορηγηθεί HP-hMG, γεγονός που υποδηλώνει ότι το μονοπάτι Hippo είναι λιγότερο ενεργό στις γυναίκες μικρότερης ηλικίας στις οποίες είχε χορηγηθεί rhFSH και η απόπτωση μειωμένη. Επιπλέον, από τα πειράματα ανοσοφθορισμού, μέσω της ανίχνευσης του δείκτη Ki67, διαπιστώθηκε ότι τα δείγματα γυναικών με PCOS είχαν πολλά περισσότερα κοκκώδη σε κατάσταση πολλαπλασιασμού σε σύγκριση με δείγματα από γυναίκες χωρίς PCOS. Τέλος, απομονώθηκε RNA από κοκκώδη κύτταρα γυναικών οι οποίες διέφεραν ως προς το πρωτόκολλο το οποίο τους είχε χορηγηθεί αλλά και ως προς την παρουσία ή όχι του συνδρόμου PCOS, και συγκρίθηκαν τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων όπως το *CYP19A1* χρησιμοποιώντας ως γονίδια αναφοράς τα *GAPDH, Srp14*, και *β*-actin.

Συμπεράσματα

Τα παραπάνω πειράματα έδειξαν αξιοσημείωτες διαφορές μεταξύ του ηλικιακού υποβάθρου, της φυσιολογίας της ωοθήκης αλλά και του πρωτοκόλλου διέγερσης όσον αφορά την ωρίμανση, τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και την επικοινωνία μεταξύ των κοκκωδών κυττάρων και του ωαρίου (Marchais *et al*. 2022). Η μελέτη μεγαλύτερου αριθμού γυναικών αναμένεται να συμβάλλει στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν την ανάπτυξη των ωοθυλακίων, και μελλοντικά, να συμβάλλει στον σχεδιασμό εξατομικευμένων θεραπειών.

Ενδεικτική βιβλιογραφία

Marchais M., Gilbert I., Bastien A., Macaulay A., Robert C. (2022). Mammalian cumulus-oocyte complex communication: a dialog through long and short distance messaging. *Review J Assist Reprod Genet*, **39:**1011-1025.

Papageorgiou K., Mastora E., Zikopoulos A., Grigoriou M.E., Georgiou, I., Michaelidis T.M. (2021). Interplay Between mTOR and Hippo Signaling in the Ovary: Clinical Choice Guidance Between Different Gonadotropin Preparations for Better IV. *Front. Endocrinol.*, **12:**702446.

Turathum B., Gao EM., Chian RC (2021). The Function of Cumulus Cells in Oocyte Growth and Maturation and in Subsequent Ovulation and Fertilization. *Cells*, **10:**2292.

Μελέτη της αγχώδους συμπεριφοράς ενηλίκων αρσενικών μυών μετά τη χορήγηση Κανναβιδιόλης

[1]ΑΤΣΟΠΑΡΔΗ Κορίνα, [2]ΚΑΪΡΗΣ Στέφανος, [3]ΠΑΝΑΓΟΠΟΥΛΟΣ Θ. Νικόλαος, [4]ΠΟΥΛΑΣ Κωνσταντίνος, [5]ΜΑΡΓΑΡΙΤΗ Γ. Μαριγούλα

[1]Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Ανοσολογίας, , Τμήμα Φαρμακευτικής, & Εργαστήριο Φυσιολογίας Ανθρώπου και Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, kor.atsop@gmail.com
[2] Εργαστήριο Φυσιολογίας Ανθρώπου και Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, stefkairis@hotmail.com
[3]Εργαστήριο Φυσιολογίας Ανθρώπου και Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, npanago@upatras.gr
[4]Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Ανοσολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών kpoulas@upatras.gr
[5]Εργαστήριο Φυσιολογίας Ανθρώπου και Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, margar@upatras.gr

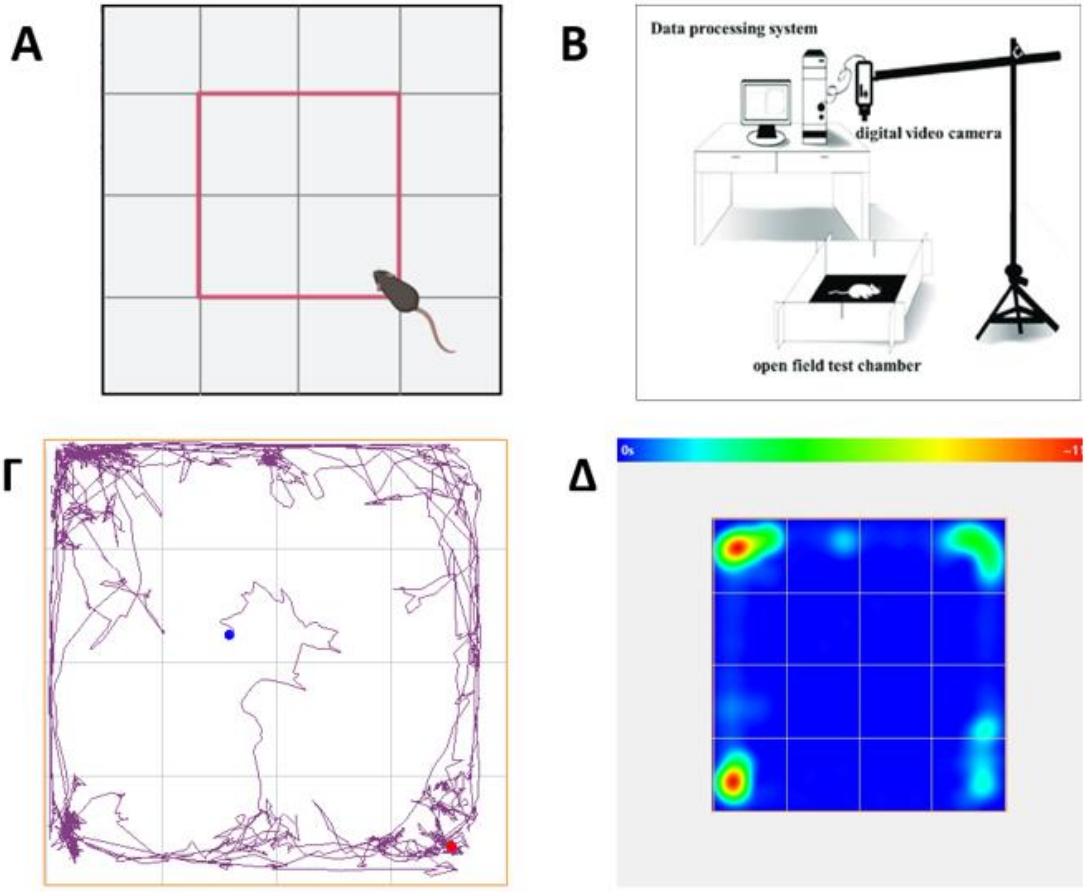
Περίληψη
Η κανναβιδιόλη (CBD) αποτελεί ένα από τα κύρια κανναβινοειδή, βρίσκεται σε φυτά του είδους *Cannabis sativa* και σε αντίθεση με την Δ9-Τετραϋδροκαναβινόλη (THC) στερείται ευφορικών ιδιοτήτων. Το CBD εμφανίζει αγχολυτική, αντικαταθλιπτική, αντιφλεγμονώδη, ανοσορυθμιστική κ.α. δράσεις. Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της πιθανής ευεργετικής επίδρασης του CBD στην αγχώδη συμπεριφορά και στην κινητικότητα ενήλικων αρσενικών μυών. Το CBD χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά (i.p) εφάπαξ σε 3 δοσολογίες (10, 20 και 60 mg/kg) καθώς και σε ολιγοήμερη χορήγηση για 5 ημέρες (20 mg/kg). Η μελέτη της αγχώδους συμπεριφοράς πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (OFT), όπου με τη χρήση του εξειδικευμένου λογισμικού προγράμματος ANY-maze πραγματοποιήθηκε η καταγραφή των συμπεριφορικών δεικτών. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν αγχολυτική δράση του CBD καθώς και αύξηση της κινητικότητας τόσο μετά τις εφάπαξ χορηγήσεις όσο και μετά την ολιγοήμερη χορήγηση.

Λέξεις-κλειδιά
Κανναβιδιόλη, Αγχολυτική Δράση, Δοκιμασία Ανοιχτού Πεδίου, Κινητικότητα

Εισαγωγή
Η χρήση κάνναβης για θεραπευτικούς σκοπούς έχει αναφερθεί από την αρχαιότητα. Η βιολογική δραστικότητα του φυτού οφείλεται σε μια κατηγορία ενώσεων που ονομάζονται φυτοκανναβινοειδή. Τα φυτοκανναβινοειδή αποτελούνται από τερπενοφαινολικές ουσίες που προέρχονται από το φυτό *Cannabis sativa*, έχουν εμφανισθεί ως ένας νέος τύπος φαρμάκων με πιθανές ευεργετικές δράσεις σε ένα ευρύ φάσμα νευροεκφυλιστικών και ψυχιατρικών διαταραχών (Crippa et al. 2018, Fernández-Ruiz et al. 2012). Λόγω του προφίλ ασφάλειας και της έλλειψης ψυχοτρόπων δράσεων, το CBD είναι ένα κανναβινοειδές που συγκεντρώνει ενδιαφέρον, με πολλές αναφορές σε φαρμακολογικές επιδράσεις σε διάφορα παθολογικά μοντέλα παθήσεων, μεταξύ των οποίων φλεγμονώδεις, νευροεκφυλιστικές, αυτοάνοσες παθήσεις και επιληψία (Pisanti, S. et al. 2017, Rong et al. 2017). Η ενεργοποίηση των CB1 υποδοχέων επιφέρει αγχολυτική δράση σε αρκετά μοντέλα συμπεριφοράς άγχους/φόβου, που προσομοιάζουν σε συμπτώματα αγχώδους διαταραχής (Ruehle et al. 2012). Το άγχος ανήκει στα ενδογενή συναισθήματα. Τα τελευταία χρόνια, εξαιτίας των γρήγορων ρυθμών ζωής, της τεχνολογικής ανάπτυξης και της οικονομικής κρίσης, η μελέτη του άγχους έχει εντατικοποιηθεί. Η συμμετοχή των νευροδιαβιβαστικών συστημάτων στην αγχώδη συμπεριφορά έχει μελετηθεί από πλήθος ερευνών.

Μέθοδοι
Τα πειραματόζωα, ενήλικοι Balb/c αρσενικοί μύες, αρχικά χωρίστηκαν σε 4 πειραματικές ομάδες (7-8 μύες/ομάδα) όπου τους χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά μία εφάπαξ δόση διαλύματος CBD σε φυσιολογικό ορό (2% Tween-80 και 10% DMSO): α) Ομάδα ελέγχου (φυσιολογικός ορός / Control) β) CBD10 ομάδα (10 mg/kg σωματικού βάρους), γ) CBD20 ομάδα (20 mg/kg σωματικού βάρους) και δ)

CBD60 ομάδα (60 mg/kg σωματικού βάρους). Ακολούθησε συμπεριφορική ανάλυση με τη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου και με βάση τα αποτελέσματα επιλέχθηκε η δόση των 20 mg/kg σωματικού βάρους ώστε να διερευνηθεί περεταίρω η συμπεριφορά μετά από ολιγοήμερη χορήγηση 5 ημερών ενδοπεριτοναϊκά. Η αγχώδης συμπεριφορά και η κινητικότητα πραγματοποιήθηκε 1 ώρα μετά την τελευταία χορήγηση και μελετήθηκε με τη χρήση της δοκιμασίας ανοιχτού πεδίου (OFT) και του εξειδικευμένου λογισμικού ANY-maze. Η συσκευή του OFT αποτελεί ένα κύβο (44x44x44cm) όπου το δάπεδο της συσκευής χωρίζεται σε δύο περιοχές την κεντρική περιοχή (open field) και την περιφέρεια (κοντά στα τοιχώματα της συσκευής). Η δοκιμασία διαρκεί 10 min και καταγράφονται: ο χρόνος στην περιφέρεια και στις γωνίες της συσκευής ως δείκτες αγχώδους συμπεριφοράς καθώς και η συνολική απόσταση που διανύει ένα πειραματόζωο στη συσκευή και στην κεντρική περιοχή, η μέση ταχύτητα και οι είσοδοι στην κεντρική περιοχή της συσκευής. Επίσης το λογισμικό ANY-maze δίνει τη δυνατότητα της καταγραφής του χάρτη πορείας (track plot) και του θερμικού χάρτη (heat plot) του πειραματόζωου στη συσκευή (εικόνα 1). Η εκτροφή των μυών πραγματοποιήθηκε σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας 24-26 ^{o}C, σχετικής υγρασίας 50-60% και τεχνητό δωδεκάωρο κύκλο εναλλαγής ημέρας-νύκτας, η τροφή και το νερό ήταν διαθέσιμα ad libitum. Τέλος η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS.



Εικόνα 10: (Α) Σχηματική απεικόνιση ανοιχτού πεδίου. (Β) Σχηματική αναπαράσταση πειραματικής διάταξης ανοιχτού πεδίου. (Γ) Χάρτης πορείας πειραματόζωου στη συσκευής. (Δ) Θερμικός χάρτης πειραματόζωου στη συσκευής.

Αποτελέσματα

Στη μελέτη των εφάπαξ ενδοπεριτοναϊκών χορηγήσεων διαφορετικών συγκεντρώσεων CBD στην αγχώδη συμπεριφορά, παρατηρήθηκε ότι ο χρόνος παραμονής στη περιφέρεια της συσκευής και στις γωνίες μειώνεται σημαντικά και στις τρείς πειραματικές ομάδες. Κατά τη μελέτη της κινητικότητας παρατηρήθηκε αύξηση της απόσταση που διανύθηκε σε όλη τη συσκευή και στην κεντρική περιοχή καθώς και αύξηση του αριθμού των εισόδων στην κεντρική περιοχή μόνο στις δόσεις των 20 και 60

mg/Kg σωματικού βάρους. Τα αποτελέσματα της αγχώδους συμπεριφοράς μετά την 5ήμερη χορήγηση του CBD υποδεικνύουν μείωση του χρόνου τόσο στην περιφέρεια όσο και στις γωνίες της συσκευής. Τέλος, μετά την 5ήμερη χορήγηση παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των εισόδων στην κεντρική περιοχή, της απόστασης που διανύθηκε σε όλη τη συσκευή και στην κεντρική περιοχή καθώς και της μέση ταχύτητας, που αποτελούν δείκτες κινητικότητας.

Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης υποστηρίζουν ότι η χορήγηση της κανναβιδιόλης εφάπαξ και με ολιγοήμερη χορήγηση δύναται να επηρεάσει τόσο την αγχώδη συμπεριφορά όσο και την κινητικότητα. Πιο συγκεκριμένα παρουσιάζει αγχολυτική δράση και προκαλεί αύξηση της κινητικότητας.

Βιβλιογραφία

Crippa, J.A., Guimarães, F.S., Campos, A.C., Zuardi, A.W., (2018). Translational Investigation of the Therapeutic Potential of Cannabidiol (CBD): Toward a New Age. Front. Immunol. 9. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02009

Fernández-Ruiz, Javier, Onintza Sagredo, M Ruth Pazos, Concepción García, Roger Pertwee, Raphael Mechoulam, and José Martínez-Orgado. (2013). "Cannabidiol for Neurodegenerative Disorders: Important New Clinical Applications for This Phytocannabinoid?", Br J Clin Pharmacol, 75 (2): 323–33. https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04341.x.

Pisanti, S., Malfitano, A.M., Ciaglia, E., Lamberti, A., Ranieri, R., Cuomo, G., Abate, M., Faggiana, G., Proto, M.C., Fiore, D., Laezza, C., Bifulco, M., (2017). Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications. Pharmacol. Ther. 175, 133–150. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.041

Rong, Carola, Yena Lee, Nicole E. Carmona, Danielle S. Cha, Renee-Marie Ragguett, Joshua D. Rosenblat, Rodrigo B. Mansur, Roger C. Ho, and Roger S. McIntyre. (2017). "Cannabidiol in Medical Marijuana: Research Vistas and Potential Opportunities." Pharmacological Research 121 (July): 213–18. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.05.005

Ruehle, S, A Aparisi Rey, F Remmers, and B Lutz. (2012). "The Endocannabinoid System in Anxiety, Fear Memory and Habituation." Journal of Psychopharmacology (Oxford, England) 26 (1): 23–39. https://doi.org/10.1177/0269881111408958.

Αναγνώριση και κατασκευή νέων ισχυρών υποκινητών στη Yarrowia lipolytica για βιοζυμώσεις με βάση τη γλυκερόλη

ΓΕΩΡΓΙΑΔΗΣ Ιωάννης, ΤΣΙΛΙΓΚΑΚΗ Χριστίνα, ΠΑΤΑΒΟΥ Βικτώρια, ΤΣΟΥΡΕΚΗ Αντιόπη, ΠΑΝΑΓΙΩΤΙΔΟΥ Ελευθερία, ΘΕΟΔΟΣΙΟΥ Ελένη, ΑΝΔΡΕΑΔΕΛΛΗ Αγγελική, ΒΛΑΧΟΝΑΣΙΟΣ Κωνσταντίνος, ΜΑΚΡΗΣ Αντώνιος

Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης,54636, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα,
Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών, Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης (ΕΚΕΤΑ), 57001, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα. georgiais@bio.auth.gr
ΠΜΣ «Εφαρμογές της Βιολογίας», Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 54636, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα,
Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών, Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης (ΕΚΕΤΑ), 57001, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα. tsiligkakichri@gmail.com
ΠΜΣ «Εφαρμογές της Βιολογίας», Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης,54636, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα,
Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών, Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης (ΕΚΕΤΑ), 57001, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα. v.patavou@certh.gr

Περίληψη
Η *Yarrowia lipolytica* αποτελεί μία μη παθογόνο αερόβια ζύμη που χρησιμοποιείται ευρέως σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Σε μία προσπάθεια αναγνώρισης υποκινητών με ισχυρή έκφραση στη ζύμη αυτή, πραγματοποιήθηκε ανάλυση διαφορικής έκφρασης γονιδίων σε κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο με βάση τη γλυκερόλη. Από τα έξι γονίδια histone 3, acyl-CoA-binding protein, dioxygenase, aquaporin-like protein, glycerol kinase, και trimethylamine-like protein, επιλέχθηκαν τα τρία με την ισχυρότερη έκφραση και κλωνοποιήθηκαν οι περιοχές των υποκινητών τους. Η ενεργότητά τους ποσοτικοποιήθηκε μέσω κυτταρομετρίας ροής και συγκρίθηκε με την αντίστοιχη των γνωστών ισχυρών υποκινητών FBA1in, EXP1 και TEF1in. Προκύπτει ότι pH3>pTMAL>pACBP, με τον pH3 να είναι ισχυρότερος των υπόλοιπων υποκινητών που ελέγχθηκαν. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας επαναλήψεις UAS1B και τους βασικούς υποκινητές H3(260) και TMAL(250), κατασκευάστηκαν υβριδικοί υποκινητές και η ενεργότητά τους συγκρίθηκε με αυτή του ισχυρού UAS1B8-TEF(136). Ο UAS1B8-TMAL(250) ξεπέρασε όλους τους υπόλοιπους σε ενεργότητα. Συνολικά, αναγνωρίστηκαν και κατασκευάστηκαν νέοι ισχυροί υποκινητές κατάλληλοι για βιοτεχνολογικές εφαρμογές στη *Y. lipolytica*.

Λέξεις κλειδιά
Yarrowia lipolytica, συνθετική βιολογία, υβριδικοί υποκινητές

Εισαγωγή
Η *Yarrowia lipolytica* είναι μία μη παθογόνος, υποχρεωτικά αερόβια ζύμη που εδώ και δεκαετίες χρησιμοποιείται ευρέως στη βιοτεχνολογία για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως οργανικά οξέα. Έχει την ικανότητα να καταβολίζει υδρογονάνθρακες, αλκοόλες και υδρόφοβες ενώσεις, όπως λιπαρά οξέα και αλκάνια (Nicaud, 2012). Η επέκταση των προοπτικών της μεταβολικής μηχανικής απαιτεί την ανάπτυξη εύχρηστων και ισχυρών μοριακών εργαλείων, συμπεριλαμβανομένων στοιχείων ελέγχου της έκφρασης, όπως είναι οι υποκινητές.

Η αναγνώριση και ο χαρακτηρισμός του ενισχυτή UAS1B του ενδογενούς *XPR2* γονιδίου στη *Y. lipolytica* (Blanchin-Roland, Cordero Otero, Gaillardin, 1994, Madzak et al., 1999), επέτρεψε την κατασκευή υβριδικών υποκινητών με διαφορετικά πρότυπα ρύθμισης και αυξημένη ενεργότητα (Madzak et al., 2000, Blazeck et al., 2011). Αποδείχθηκε η δυνατότητα χρήσης των ανοδικών αλληλουχιών ενεργοποίησης (Upstream Activation Sequences, UAS) και του βασικού υποκινητή (core promoter element) ως ανεξάρτητα στοιχεία στην κατασκευή υβριδικών υποκινητών, καθώς και ότι ο

αριθμός των UAS επαναλήψεων αποτελεί τον περιοριστικό παράγοντα των επιπέδων μεταγραφής.

Στόχος της συγκεκριμένης εργασίας είναι η αναγνώριση και ο χαρακτηρισμός νέων, ισχυρών ενδογενών υποκινητών στη *Y. lipolytica*, με αυξημένη ενεργότητα σε θρεπτικό μέσο με βάση τη γλυκερόλη. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας core elements των υποκινητών αυτών και επαναλήψεις UAS1B αλληλουχιών, κατασκευάστηκαν υβριδικοί υποκινητές με σκοπό την επίτευξη πολλαπλάσιας ενεργότητας.

Μέθοδοι

Ανάλυση διαφορικής έκφρασης γονιδίων

Τα ακατέργαστα δεδομένα (SRR9021304, SRR9021305, SRR9021306, SRR9021307, SRR9021308 και SRR9021313) ανακτήθηκαν από το SRA του NCBI και οι αλληλουχίες συζευγμένων άκρων υπέστησαν ποιοτικό φιλτράρισμα [TrimGalore (v0.6.7)] και απομακρύνθηκαν οι αλληλουχίες με χαμηλή ποιότητα (q score < 30). Για την ανάλυση διαφορικής έκφρασης ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο των Pertea et al. (2016). Ως διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια ορίστηκαν εκείνα για τα οποία η τιμή p-value ήταν χαμηλότερη από 0,005 και η τιμή |log2(FC)| ήταν μεγαλύτερη από 2.

Μελέτη έκφρασης γονιδίων σε γλυκερόλη με RT-qPCR

Με γνώμονα τα αποτελέσματα της ανάλυσης διαφορικής έκφρασης, επιλέχθηκαν 6 γονίδια, με υψηλή έκφραση μόνο σε θρεπτικά μέσα γλυκερόλης, και έγινε μελέτη της έκφρασής τους με RT-qPCR (StepOnePlus Real-Time PCR System, Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Κύτταρα *Y.lipolytica* αγρίου τύπου επωάστηκαν για 16 h στους 30ºC, σε πέντε διαφορετικά θρεπτικά μέσα· ένα μέσο γλυκόζης (YPD) και τέσσερα με διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης (2% YPG, 6% YPG, 6% Glycerol/Complete Medium, 10% Synthetic Medium). Μετά από απομόνωση RNA και κατασκευή των αντίστοιχων cDNA, πραγματοποιήθηκε qPCR για τα γονίδια *H3*, *ACBP* (acyl-CoA-binding protein), *AQP* (aquaporine-like protein), *DIOX* (dioxygenase), *GK* (glycerol kinase), και *TMA-like*, χρησιμοποιώντας το *TEF1* της *Y.lipolytica* ως ενδογενές γονίδιο αναφοράς.

Κατασκευή πλασμιδίων και μετασχηματισμός Yarrowia lipolytica

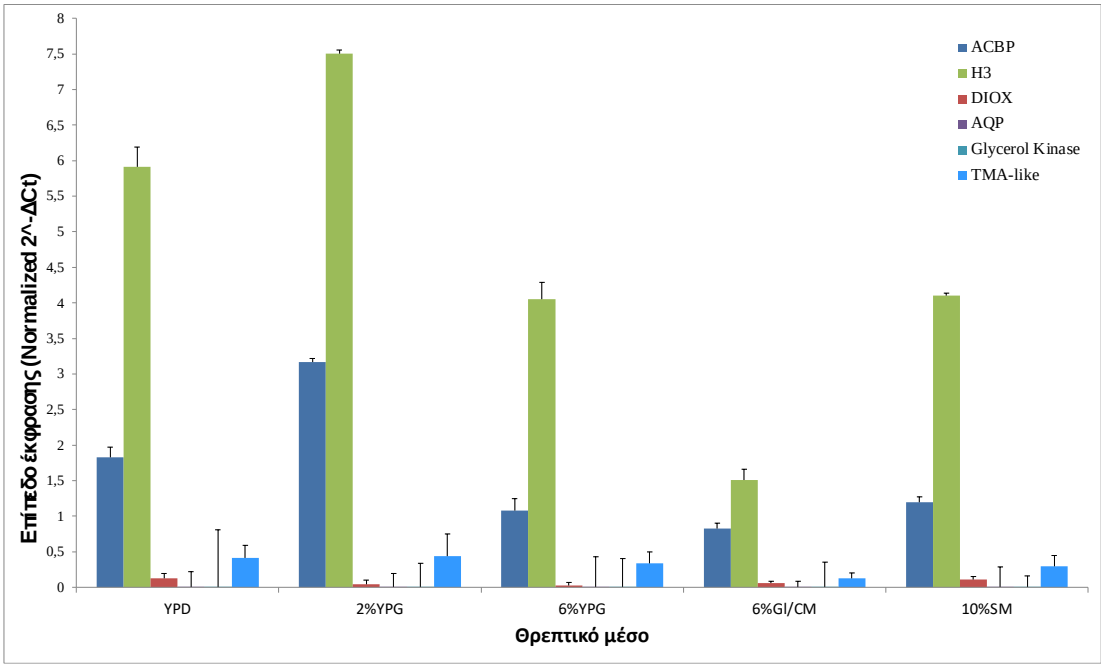
Για την κατασκευή των φορέων έκφρασης, ενισχύθηκε ο αντίστοιχος υποκινητής (περιοχή ~1Kb ανοδικά του ATG), και κλωνοποιήθηκε ανοδικά του γονιδίου αναφοράς *mCherry*. Οι υποκινητές που κλωνοποιήθηκαν είναι οι H3, TMAL, ACBP, EXP1, TEF1in και FBA1in. Οι υβριδικοί υποκινητές προέκυψαν από την κλωνοποίηση 8 επαναλήψεων του ενισχυτή UAS1B, μεγέθους 105 ζβ, ανοδικά των βασικών υποκινητών, H3(260) και TMAL(250). Το στέλεχος αγρίου τύπου *Y. lipolytica* MUCL 28849 μετασχηματίστηκε με τους φορείς έκφρασης, σύμφωνα με το πρωτόκολλο χημικού μετασχηματισμού με βάση το οξικό λίθιο (LiAc) (Chen, Beckerich, Gaillardin, 1997)

Κυτταρομετρία ροής και μικροσκοπία φθορισμού

Για την αξιολόγηση της ενεργότητας των υποκινητών, τα μετασχηματισμένα στελέχη μετρήθηκαν στο κυτταρόμετρο ροής (Attune NxT Flow Cytometer, Thermo Fischer Scientific, MA, USA) και παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού (ZOE Fluorescent Cell Imager, Bio-Rad Laboratories, CA, USA) ανά 24h. Τα στελέχη καλλιεργήθηκαν σε 25 mL πλούσιου θρεπτικού μέσου YPG 2% (Yeast extract, Peptone, Glycerol), στους 30°C για 96h. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με το πρόγραμμα FlowJo V10 (BD Biosciences, NJ, USA).

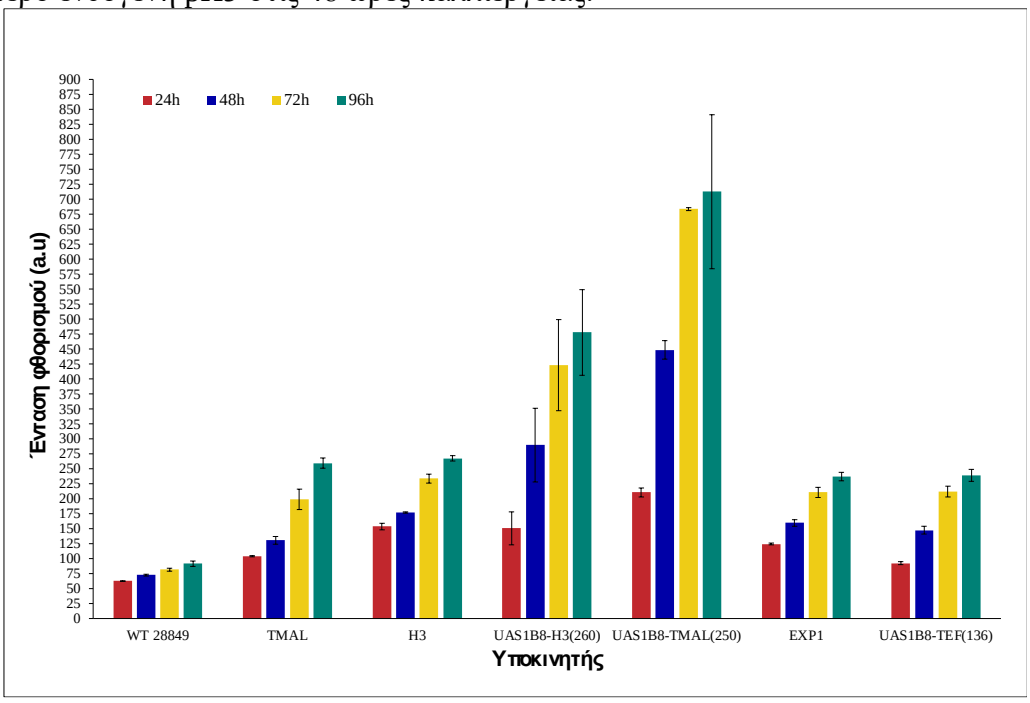
Αποτελέσματα

Από τις αντιδράσεις RT-qPCR για τον έλεγχο έκφρασης των έξι γονιδίων προέκυψε ότι η έκφραση του γονιδίου *H3* είναι σχεδόν τριπλάσια της έκφρασης του γονιδίου *ACBP*, για τα πέντε διαφορετικά θρεπτικά μέσα (Εικόνα 1). Ακόμη, παρατηρήθηκε υψηλότερη έκφραση των γονιδίων *ACBP*, *H3* και *TMA-like* στο θρεπτικό YPG 2%, και στη συνέχεια όσο αυξάνεται το ποσοστό γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο, η έκφραση μειώνεται.



Εικόνα 1. Διάγραμμα επιπέδου έκφρασης των γονιδίων στα διάφορα θρεπτικά μέσα όπως προκύπτει από την RT-qPCR.

Η ενεργότητα των υποκινητών ποσοτικοποιήθηκε και συγκρίθηκε με αυτή ήδη χαρακτηρισμένων ισχυρών (Blazeck et al., 2011, Darvishi et al., 2018), και η σειρά κατά φθίνουσα ενεργότητα είναι η εξής: pH3>pEXP1>pTMAL>pACBP>pTEF1in=pFBA1in. Στη συνέχεια, με βάση τους ισχυρότερους υποκινητές H3 και TMAL κατασκευάστηκαν οι υβριδικοί υποκινητές UAS1B8-H3(260) και UAS1B8-TMAL(250). Ο UAS1B8-TMAL(250) αποδείχθηκε ισχυρότερος των υπόλοιπων (Εικόνα 2), εμφανίζοντας 3 φορές μεγαλύτερη ενεργότητα συγκριτικά με τον pTMAL και 2,5 φορές συγκριτικά με τον ισχυρότερο ενδογενή pH3 στις 48 ώρες καλλιέργειας.



Εικόνα 2. Διάγραμμα στο οποίο απεικονίζεται ο φθορισμός (αυθαίρετες μονάδες – arbitrary units) που επάγεται από κάθε υποκινητή καθώς και ο αυτοφθορισμός του πατρικού στελέχους (WT 28849). Η τιμή του φθορισμού καθορίζεται από τον μέσο όρο του γεωμετρικού μέσου του φθορισμού μεταξύ τριών βιολογικών επαναλήψεων. Οι γραμμές σφάλματος (error bars) απεικονίζουν την τυπική απόκλιση του γεωμετρικού μέσου του φθορισμού μεταξύ τριών βιολογικών επαναλήψεων.

Συμπεράσματα

Συνολικά, χαρακτηρίστηκαν τρείς νέοι ισχυροί ενδογενείς υποκινητές (H3, TMAL, ACBP) στη *Y. lipolytica*, κατάλληλοι για βιοζυμώσεις με βάση τη γλυκερόλη. Με βάση τα core elements H3(260) και TMAL(250) κατασκευάστηκαν υβριδικοί υποκινητές που επάγουν σημαντικά υψηλότερη έκφραση συγκριτικά τόσο με τους ενδογενείς υποκινητές, όσο και με τον ισχυρό υβριδικό υποκινητή UAS1B8-TEF(136) (Blazeck et al., 2011). Οι υποκινητές αυτοί επεκτείνουν την διαθέσιμη μοριακή "εργαλειοθήκη" τροποποίησης της *Y. lipolytica*, με σκοπό την αξιοποίηση μη συμβατικών υποστρωμάτων και την ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών.

Βιβλιογραφία

Chen, D., Beckerich, J., & Gaillardin, C. (1997). One-step transformation of the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 48, 232-235.

Blanchin-Roland, S., Cordero Otero, R. R., & Gaillardin, C. (1994). Two upstream activation sequences control the expression of the *XPR2* gene in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Molecular and Cellular Biology*, 14, 327–338.

Blazeck, J., Liu, L., Redden, H., & Alper, H. (2011). Tuning gene expression in *Yarrowia lipolytica* by a hybrid promoter approach. *Applied and environmental microbiology*, 77(22), 7905–7914.

Madzak, C., Blanchin-Roland, S., Cordero Otero, R. R., & Gaillardin, C. (1999). Functional analysis of upstream regulating regions from the *Yarrowia lipolytica XPR2* promoter. *Microbiology*, 145(1), 75–87.

Madzak, C., Tréton, B., & Blanchin-Roland, S. (2000). Strong hybrid promoters and integrative expression/secretion vectors for quasi-constitutive expression of heterologous proteins in the yeast *Yarrowia lipolytica*. J*ournal of molecular microbiology and biotechnology*, 2(2), 207–216.

Nicaud, J.-M. (2012). *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, 29(10), 409–418.

Pertea, M., Kim, D., Pertea, G. M., Leek, J. T., & Salzberg, S. L. (2016). Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, stringtie and Ballgown. *Nature Protocols*, 11, 1650–1667.

https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore

Μακρά μη-κωδικοποιά RNA ως ρυθμιστές στο έμφραγμα του μυοκαρδίου

ΤΣΙΦΙΝΤΑΡΗΣ Μαργαρίτης[1], ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΥ Χαρίσιος[1], ΚΑΒΑΚΙΩΤΗΣ Ιωάννης[1], ΓΙΑΝΝΑΚΑΚΗΣ Αντώνιος[1*]

[1] Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Αλεξανδρούπολη, Ελλάδα
Αλληλογραφία: antgian@mbg.duth.gr

Περίληψη
Τα μακρά μη-κωδικοποιά RNA είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στην ανάπτυξη και τη λειτουργία της καρδιάς. Επιπλέον, για πολλά μακρά μη-κωδικοποιά RNA έχει δειχθεί πως εμπλέκονται σε συγκεκριμένες βιολογικές διεργασίες μέσω μεταγραφικών και μετα-μεταγραφικών ρυθμιστικών μηχανισμών. Σε πρόσφατες μελέτες, ολοένα και περισσότερα μη-κωδικοποιά RNA αναγνωρίζονται ως σημαντικοί ρυθμιστές στο έμφραγμα του μυοκαρδίου. Στην παρούσα εργασία, για να διερευνήσουμε τον βιολογικό ρόλο αυτής της λειτουργικής ομάδας, χρησιμοποιήσαμε δεδομένα έκφρασης από πειράματα αλληλούχισης νέας γενιάς (NGS) σε δείγματα ασθενών με έμφραγμα του μυοκαρδίου. Πιο συγκεκριμένα, αξιοποιήθηκαν 16 δείγματα αίματος ασθενών, 15 δείγματα ιστού (αριστερή κοιλία) ασθενών και 15 δείγματα ιστού (αριστερή κοιλία) υγειών ατόμων. Για την ολοκληρωμένη ανάλυση και ποσοτικοποίηση της έκφρασης του μεταγραφώματος του μυοκαρδίου αναπτύχθηκε μια ροή εργασίας που συμπεριλαμβάνει αρκετά βήματα και διάφορα εργαλεία βιοπληροφορικής. Από την ανάλυση των δεδομένων προκύπτουν ορισμένα μη-κωδικοποιά RNA τα οποία φαίνεται να εμπλέκονται στην παθογένεση της ισχαιμικής μυοκαρδιοπάθειας. Η διερεύνηση των λειτουργικών ρόλων των lncRNAs θα μπορούσε να παρέχει μηχανιστικές γνώσεις σχετικά με την παθοφυσιολογία διαφορετικών τύπων ισχαιμικών καρδιακών παθήσεων.

Λέξεις κλειδιά
Μακρά μη-κωδικοποιά RNA, Έμφραγμα του μυοκαρδίου, RNA-seq

Εισαγωγή
Ένα μεγάλο ποσοστό του ανθρώπινου γονιδιώματος μεταγράφεται ως μακρά μη-κωδικοποιά RNA (long non coding RNAs - lncRNAs), μια ετερογενή ομάδα μη κωδικοποιών μεταγραφών άνω των 200 νουκλεοτιδίων, τα οποία βρίσκονται εντός ή μεταξύ των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτείνες. Τα lncRNAs είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στην ανάπτυξη, τη λειτουργία της καρδιάς καθώς και σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου. Τα προφίλ έκφρασης των lncRNAs είναι πιο ευαίσθητο σε διαφορετικές παθολογίες της καρδιάς, συγκριτικά με τα προφίλ έκφρασης των mRNA ή των miRNA (Eicher et al. 2016). Υποστηρίζεται ότι ορισμένα lncRNAs συμμετέχουν σε ρυθμιστικά μονοπάτια της φλεγμονής και του οξειδωτικού στρες, γεγονός που τα καθιστά κατάλληλα για βιοδείκτες σε παθολογικές καταστάσεις όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου.

Μέθοδοι
Αξιοποιήθηκαν δεδομένα γονιδιακής έκφρασης έπειτα από αλληλούχιση νέας γενιάς (NGS) (illumine RNA-seq, PE-reads) α) σε δείγματα ασθενών με έμφραγμα του μυοκαρδίου, β) σε δείγματα υγειών ατόμων (δείγματα ελέγχου). Συνολικά, αναλύθηκαν 16 δείγματα αίματος ασθενών (Eicher et al. 2016), 15 δείγματα καρδιακού ιστού (αριστερή κοιλία) ασθενών και 15 δείγματα ιστού (αριστερή κοιλία) υγειών ατόμων (Yang et al. 2014). Τα δείγματα αρτηριακού αίματος συλλέχθηκαν κατά την διαδικασία καρδιακού καθετηριασμού, ενώ τα δείγματα ιστών συλλέχθηκαν κατά την διαδικασία τοποθέτησης της συσκευής υποβοήθησης αριστερής κοιλίας (LVAD). Για τον ποιοτικό έλεγχο των δεδομένων (FASTQ αρχεία) χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Trimmomatic. Η ποσοτικοποίηση των μεταγράφων πραγματοποιήθηκε με το Salmon ενώ για την ανάλυση της διαφορικής έκφρασης χρησιμοποιήθηκε το πακέτο DESeq2 στην γλώσσα προγραμματισμού R. Στην συνέχεια, τα διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια επισημειώθηκαν με όρους γονιδιακής οντολογίας (GO) για βιολογικές διεργασίες.

Αποτελέσματα

Παρατηρήθηκε διαφορά στα επίπεδα έκφρασης αρκετών lncRNAs μεταξύ φυσιολογικών και ισχαιμικών καρδιακών δειγμάτων. Επιπλέον, η μη εποπτευόμενη ιεραρχική ομαδοποίηση των προφίλ έκφρασης των καρδιακών lncRNA ανέδειξε ότι η παθολογική κατάσταση μπορεί να διακριθεί από την φυσιολογική. Η ανάλυση μονοπατιών ανέδειξε τον εμπλουτισμό αυτών των διαφορικά εκφραζόμενων μορίων σε διάφορες βιολογικές διεργασίες. Ακόμη, αρκετά lncRNA, αποτελούν στόχους διαφόρων miRNAs που συμμετέχουν σε σημαντικές βιολογικές διεργασίες για την παθολογική κατάσταση του εμφράγματος του μυοκαρδίου.

Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα έκφρασης από πειράματα αλληλούχισης επόμενης γενιάς με σκοπό να διεκπαιρεωθεί μια ποσοτική και λειτουργική ανάλυση των lncRNAs μεταξύ ασθενών με έμφραγμα του μυοκαρδίου και υγειών ατόμων. Η ανάλυση αποκάλυψε σημαντικές διαφορές στα πρότυπα έκφρασης lncRNA σε ισχαιμικές και μη ισχαιμικές καταστάσεις. Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι τα lncRNAs δρουν ρυθμίζοντας την μεταγραφική έκφραση των κοντινών γονιδίων που κωδικοποιούν κάποια πρωτεΐνη. Η διερεύνηση των πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ αυτών των καρδιακών lncRNAs και των γειτονικών γονιδίων θα μπορούσε να οδηγήσει στην καλύτερη κατανόηση του μοριακού μηχανισμού που συμμετέχουν.

Βιβλιογραφικές αναφορές:

Eicher, J. D., Wakabayashi, Y., Vitseva, O., Esa, N., Yang, Y., Zhu, J., Freedman, J. E., McManus, D. D., & Johnson, A. D. (2016). Characterization of the platelet transcriptome by RNA sequencing in patients with acute myocardial infarction. Platelets, 27(3), 230–239.

Yang, K. C., Yamada, K. A., Patel, A. Y., Topkara, V. K., George, I., Cheema, F. H., Ewald, G. A., Mann, D. L., & Nerbonne, J. M. (2014). Deep RNA sequencing reveals dynamic regulation of myocardial noncoding RNAs in failing human heart and remodeling with mechanical circulatory support. Circulation, 129(9), 1009–1021.

Επικαιροποίηση του annotation σε μη-κωδικοποιά RNA που επάγονται σε συνθήκες οξειδωτικού στρες

ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΥ Χαρίσιος, ΤΣΙΦΙΝΤΑΡΗΣ Μαργαριτης, ΚΑΒΑΚΙΩΤΗΣ Ιωάννης, ΓΙΑΝΝΑΚΑΚΗΣ Αντωνης

Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία έγινε μια προσπάθεια επικαιροποίησης του χαρακτηρισμού (annotation) μεταγράφων που βρέθηκε πως επάγονται σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, μετά από τη διεξαγωγή πειραμάτων σε κυτταρικές σειρές ινοβλαστών, στα πλαίσια προηγούμενης δημοσίευσης της ομάδας μας. Το annotation πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενημερωμένης βάσης δεδομένων και οδήγησε στην ανάθεση geneID σε μεγάλο αριθμό αυτών των μεταγράφων. Παράλληλα στην πλειοψηφία αυτών εντοπίστηκαν γειτονικά ρυθμιστικά στοιχεία, όπως υποκινητές και ενισχυτές, με τα οποία βρέθηκε χωρική αλληλοεπικάλυψη, υπογραμμίζοντας τη δυναμική σχέση περιβαλλοντικών συνθηκών, ρυθμιστικών στοιχείων και μεταγραφώματος.

Λέξεις κλειδιά

Βιοπληροφορική, Οξειδωτικό στρες, Μεγάλου μήκους μη-κωδικοποιά RNA (lncRNAs), Χαρακτηρισμός (annotation), Ρυθμιστικά στοιχεία.

Εισαγωγή

Τα μεγάλου μήκους μη-κωδικοποιά RNA (long non-coding RNAs, lncRNAs) αποτελούν μια κατηγορία λειτουργικών μορίων RNA, μήκους μεγαλύτερου των 200 νουκλεοτιδίων, τα οποία δε μεταφράζονται σε πρωτεΐνες, αλλά επιτελούν ρυθμιστικούς ρόλους, ενώ διακρίνονται από ιδιαίτερη ευαισθησία σε περιβαλλοντικά σήματα. Ταυτόχρονα συμμετέχουν σε πλήθος επιγενετικών μηχανισμών, όπως η οργάνωση της χρωματίνης,η μετα-μεταγραφική ρύθμιση αγγελιαφόρων μεταγράφων (messenger RNAs), καθώς και η αλληλεπίδραση με άλλα ρυθμιστικά RNAs(i.e. microRNAs). Σε συνθήκες στρες, με παράδειγμα το οξειδωτικό στρες, έχουν παρατηρηθεί διαταραχές στην έκφραση των RNAs που οδηγούν στη συσσώρευση κανονικών αλλά και νέων, ασυνήθιστων μεταγράφων. Σε μία πρόσφατη μελέτη της ερευνητικής ομάδας μας πραγματοποιήθηκε η προσπάθεια ανάδειξης και χαρακτηρισμού αυτού του φαινομένου, καθώς και της μελέτης της βιογένεσης νέων μεταγράφων (Giannakakis et al. 2015). Πολλά από τα μετάγραφα (transcripts) τα οποία μελετήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία ήταν νέα με αποτέλεσμα να μην τους έχει ανατεθεί κάποιο gene ID σε βάσεις όπως η ensemble (https://www.ensembl.org/index.html) και γενικότερα να υπάρχουν ελλείψεις όσον αφορά το χαρακτηρισμό τους (annotation). Έχοντας στόχο τη μετέπειτα διερεύνηση και αξιολόγηση της λειτουργικής, ρυθμιστικής και κλινικής σημασίας αυτών των μεταγράφων, με τη χρήση σύγχρονων και στοχευμένων σε lncRNAs βιοπληροφορικών εργαλείων, κρίθηκε αναγκαία η επικαιροποίηση του annotation αυτών, την οποία θα ακολουθήσει πλήθος αναλύσεων.

Μεθοδοι

Τα μετάγραφα των stress-induced lncRNAs ελήφθησαν σε μορφή γονιδιωματικών συντεταγμένων (genomic coordinates) σε σχέση με το γονιδίωμα αναφοράς «hg19». Για την αλλαγή των συντεταγμένων ώστε να αντιστοιχούν στο γονιδίωμα «hg38» χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο «liftover» (https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgLiftOver). Στη συνέχεια τα μετάγραφα αναλύθηκαν με τη βοήθεια του πακέτου «annotatr» της R και με αρχεία της ENSEMBL (v106) και του πρότζεκτ SCREEN V3 της ENCODE (ENCODE Project Consortium 2020) για την εύρεση πληροφορίας που αφορά γονίδια και ρυθμιστικά στοιχεία αντίστοιχα.

Αποτελέσματα

Εκ των χιλιάδων μεταγράφων που αναλύθηκαν περίπου 1600 βρέθηκε να αντιστοιχούν σε κάποιο ID

(RefSeq η ENSEMBLID), ενώ περίπου 1100 αντιστοιχούν μόνο σε ENSEMBL ID και περίπου 400 μόνο σε RefSeq. Η πλειοψηφία εμφανίζει αλληλοεπικάλυψη με ρυθμιστικά στοιχεία.

Συμπεράσματα

Στην πλειοψηφία των μεταγράφων που αναλύθηκαν εντοπίστηκαν γειτονικά ρυθμιστικά στοιχεία, όπως υποκινητές και ενισχυτές, με τα οποία βρέθηκε χωρική αλληλοεπικάλυψη, υπογραμμίζοντας τη δυναμική σχέση περιβαλλοντικών συνθηκών, ρυθμιστικών στοιχείων και μεταγραφώματος.

Βιβλιογραφία

Giannakakis, A. et al. Contrasting expression patterns of coding and noncoding parts of the human genome upon oxidative stress. Sci. Rep. 5, 1–16 (2015).

ENCODE Project Consortium, Jill E. Moore, Michael J. Purcaro, Henry E. Pratt, Charles B. Epstein, Noam Shoresh, Jessika Adrian, et al. 2020. “Expanded Encyclopaedias of DNA Elements in the Human and Mouse Genomes.” Nature 583 (7818): 699–710.

Ποιοτικός και ποσοτικός χαρακτηρισμός εξωσωμάτων μητρικού γάλακτος

ΤΑΣΙΟΠΟΥΛΟΥ Ανδρονίκη[1], ΠΑΛΛΗΚΑΡΟΥ Μύρια[1], ΤΣΙΦΙΝΤΑΡΗΣ Μαργαρίτης[1], ΓΙΑΝΝΑΚΑΚΗΣ Αντώνης[1]

[1]*Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης,*
antgian@mbg.duth.gr

Περίληψη
Το μητρικό γάλα είναι ένα βιολογικό υγρό, πλούσιο σε εξωσώματα, τα οποία αποτελούν μέσο επικοινωνίας μεταξύ της μητέρας και του νεογνού. Κύριος στόχος είναι η λειτουργική μελέτη των εξωσωμάτων του μητρικού γάλακτος σε διαφορετικές ομάδες-ελέγχου, οι οποίες θα περιλαμβάνουν μητέρες που έχουν γεννήσει πρόωρα και τελειόμηνα, μητέρες με δίδυμη κύηση, φυσιολογική ή κύηση με εξωσωματική. Θα αναλυθούν επίσης το πρωτόγαλα και ώριμο γάλα, καθώς η σύστασή τους φαίνεται να αλλάζει. Οι ομάδες έχουν προκύψει μέσω της δημιουργίας βιοτράπεζας μητρικού γάλατος με δείγματα πάνω από 100 μητέρες. Πρώτο βήμα αποτελεί η απομόνωση των εξωσωμάτων μέσω υπερφυγοκέντρησης (gold standard). Ακολουθεί ο ποιοτικός χαρακτηρισμός των εξωσωμάτων, με την ανίχνευση επιφανειακών δεικτών CD9, CD63 και HSP70. Στη συνέχεια θα μελετηθεί η μορφολογία τους με τη χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Τέλος, ο ποσοτικός χαρακτηρισμός θα επιτευχθεί με την καταμέτρηση της συγκέντρωσης τους, καθώς και της διαμέτρου τους με τη χρήση του μηχανήματος Exoid (Izon).

Λέξεις κλειδιά
εξωσώματα, μητρικό γάλα

Εισαγωγή
Το μητρικό γάλα αναμφίβολα είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη του νεογνού αμέσως μετά τη γέννηση, καθώς αποτελεί μία ανεκτίμητης αξίας πηγή θρεπτικών συστατικών, με πολλαπλά οφέλη τόσο για τη μητέρα όσο και για το νεογνό[1,2]. Τα μακροσυστατικά του μητρικού γάλακτος (πρωτεΐνες, ολιγοσακχαρίτες, μέταλλα κλπ) είναι καλά χαρακτηρισμένα, ωστόσο δεν έχει διερευνηθεί μέχρι σήμερα η αξία των μικροσυστατικών και πιο συγκεκριμένα των εξωσωμάτων[1,2]. Τα εξωσώματα (30-150 nm) ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των εξωκυττάριων κυστιδίων και αποτελούν διαμεσολαβητές της επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων ενός οργανισμού, αλλά και μεταξύ δύο διαφορετικών οργανισμών, με κύριο παράδειγμα την επικοινωνία μητέρας νεογνού μέσω του θηλασμού[3]. Τα εξωσώματα περιέχουν ένα ετερογενές φορτίο που αποτελείται από πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα, το οποίο μεταβάλλεται ανάλογα με την κυτταρική προέλευση, τα κύτταρα στόχους και τις λειτουργίες τους, με σημαντικότερες την ανοσολογική απάντηση, τη φλεγμονή, την απάντηση στο stress και την ανάπτυξη[3-6]. Η σύσταση του μητρικού γάλακτος επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως τις ημέρες που έχουν περάσει μετά τον τοκετό [πρωτόγαλα (1-3 ημέρες μετά τον τοκετό), ώριμο γάλα (30-40 ημέρες μετά τον τοκετό)], την εβδομάδα του τοκετού (πρόωρα-τελειόμηνα), και από στρεσογόνους παράγοντες στο περιβάλλον της μητέρας[2,7-11].

Μεθοδολογία
Απομόνωση εξωσωμάτων
Ακολουθούνται διαδοχικές φυγοκεντρήσεις 3.000 x g για 30 λεπτά, 10.000 x g για 30 λεπτά για την απομάκρυνση κυττάρων και κυτταρικών θραυσμάτων, 20.000 x g για 1 ώρα, για την απομάκρυνση των συσσωματωμάτων καζεΐνης και φιλτράρισμα (διάμετρος πόρου 0,22μm) για την απομάκρυνση κυστιδίων με διάμετρο μεγαλύτερη από 200nm. Ακολούθως, 100.000 x g για 70 λεπτά, για την απομόνωση εξωσωμάτων και επαναδιάλυση του ιζήματος σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Επανάληψη 100.000 x g για 70 λεπτά, για τον καθαρισμό των εξωσωμάτων, και τέλος επαναδιάλυση σε 200μl PBS.

Ποιοτικός έλεγχος
Πραγματοποιείται western blot για την ανίχνευση των εξωσωμικών επιφανειακών μαρτύρων CD9, CD63 και HSP70. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται το κυτόχρωμα Β ως δείκτης κυτταρικών προσμίξεων.

Ποσοτικός έλεγχος
Με τη χρήση του μηχανήματος Exoid (Izon) θα εξασφαλιστεί η ακριβής μέτρηση τους αριθμού των εξωσωμάτων, καθώς και της διαμέτρου τους. Το Exoid εξασφαλίζει ακριβείς μετρήσεις μέσω της μεθόδου Tunable resistive pulse sensing (TRPS), το οποίο επιτυγχάνεται μέσω της δημιουργίας διαφοράς δυναμικού μέσω ηλεκτροδίων αργύρου και χλωριούχου αργύρου και την εφαρμογή πίεσης.

Αποτελέσματα
Πραγματοποιήθηκε επιτυχής απομόνωση εξωσωμάτων, το οποίο επιβεβαιώνεται από ανίχνευση των εξωσωμικών επιφανειακών δεικτών CD9, CD63 και HSP70, σε μοριακά βάρη 26kDa, 26-60kDa και 70kDa, αντίστοιχα, ενώ η καθαρότητα των εξωσωμάτων επιβεβαιώνεται από την απουσία του κυτοχρώματος Β (23kDa). Ακολούθως μετρήθηκε η διάμετρος των εξωσωμάτων από 30-200nm. Τέλος, η συγκέντρωση των εξωσωμάτων εμφανίζει διακυμάνσεις μεταξύ των δειγμάτων των διαφορετικών ομάδων ελέγχου, με τις συγκεντρώσεις να κυμαίνονται μεταξύ 4e+09 έως 2e+12. Τέλος, μέσω του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου επιβεβαιώνεται η μορφολογία και το μέγεθος των εξωσωμάτων (~100nm).

Συμπεράσματα
Η επιτυχής απομόνωση των εξωσωμάτων, σε συνδυασμό με τον ποιοτικό και ποσοτικό χαρακτηρισμό τους είναι τα πρώτα βήματα για τον μετέπειτα λειτουργικό χαρακτηρισμό τους. Επόμενοι στόχοι είναι η μελέτη του φορτίου τους σε επίπεδο RNA για την ανίχνευση long non coding RNAs, τα οποία δρουν ως επιγενετικοί τροποποιητές στο νεογνό, και η μελέτη του πρωτεϊνώματος για την ανίχνευση πρωτεϊνικών μορίων που ενέχονται στις αναπτυξιακές διαδικασίες του νεογνού.

Βιβλιογραφία
Kim, S. Y. & Yi, D. Y. Components of human breast milk: from macronutrient to microbiome and microRNA. *Clinical and Experimental Pediatrics* 63, 301–309 (2020).
Mourtzi, N. *et al.* lncRNA NORAD is consistently detected in breastmilk exosomes and its expression is downregulated in mothers of preterm infants. *International Journal of Molecular Medicine* 48, 1–10 (2021).
Doyle, L. & Wang, M. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells* 8, 727 (2019).
Minciacchi, V. R., Freeman, M. R. & di Vizio, D. Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 40, 41–51 (2015).
van Niel, G., D'Angelo, G. & Raposo, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19, 213–228 (2018).
Kalluri, R. & LeBleu, V. S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science (1979)* 367, (2020).
Kahn, S. *et al.* Exosomal MicroRNAs in Milk from Mothers Delivering Preterm Infants Survive in Vitro Digestion and Are Taken Up by Human Intestinal Cells. *Mol Nutr Food Res* 62, e1701050 (2018).
Carney, M. C. *et al.* Metabolism-related microRNAs in maternal breast milk are influenced by premature delivery. *Pediatric Research* 82, 226–236 (2017).
Wang, X. *et al.* Identification and Peptidomic Profiling of Exosomes in Preterm Human Milk: Insights Into Necrotizing Enterocolitis Prevention. *Mol Nutr Food Res* e1801247 (2019) doi:10.1002/mnfr.201801247.

Bozack, A. K. *et al.* Associations between maternal lifetime stressors and negative events in pregnancy and breast milk-derived extracellular vesicle microRNAs in the programming of intergenerational stress mechanisms (PRISM) pregnancy cohort. *Epigenetics* 16, 389–404 (2021).

Ballard, O. & Morrow, A. L. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am* 60, 49–74 (2013).

Μελέτη ανάπτυξης προνυμφών Alphitobius diaperinus σε υπόστρωμα με μίγμα αρωματικών φαρμακευτικών φυτών

ΧΡΗΣΤΟΥ Μαρία Μαρίλυ [1], ΚΟΥΤΣΟΓΕΩΡΓΙΟΥ Ελένη[2], ΓΡΗΓΟΡΙΑΔΟΥ Κατερίνα[2], ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ Ευθυμία[1], ΑΝΔΡΕΑΔΗΣ Στέφανος[2]

1Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 54124, Θεσσαλονίκη, email: mariamar@bio.auth.gr, eantono@bio.auth.gr
2Ινστιτούτο Γενετικής Βελτίωσης και Φυτογενετικών Πόρων, ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ, 57001 Θεσσαλονίκη, email: ekoutsogeorgiou@gmail.com, *katgrigoriadou@elgo.gr, sandreadis@elgo.gr*

Περίληψη
Ο ανθρώπινος πληθυσμός ανέρχεται στα 7,7 δισεκατομμύρια και η αυξητική του πορεία αναμένεται να συνεχιστεί, απαιτώντας ολοένα και περισσότερους πόρους. Η κτηνοτροφία που αποτελεί βασική πηγή πρωτεΐνης συμβάλλει στην επιδείνωση διάφορων περιβαλλοντικών προβλημάτων. Αναδεικνύεται έτσι η σημασία αναζήτησης πηγών πρωτεΐνης φιλικών προς το περιβάλλον και με προοπτικές κάλυψης των αναγκών του πληθυσμού. Τα έντομα δύναται να αποτελέσουν μια υποσχόμενη λύση. Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η αξιολόγηση της επίδρασης του μίγματος αρωματικών φυτών στην ανάπτυξη του *A. diaperinus*. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν το ατομικό βάρος των προνυμφών, το ποσοστό επιβίωσής τους αλλά και η διάρκεια ανάπτυξής τους. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι προνύμφες που εκτράφηκαν στο υπόστρωμα με συγκέντρωση 10% μίγματος αρωματικών φαρμακευτικών φυτών (ΜΑΦΦ) εμφάνισαν μεγαλύτερη αύξηση μέσου ατομικού βάρους και ποσοστά επιβίωσης και είχαν πιο αργή διάρκεια ανάπτυξης. Η αύξηση του βάρους, η επιβίωση και η διάρκεια ανάπτυξης δεν επηρεάστηκε στατιστικά σημαντικά από τα διαφορετικά υποστρώματα που χρησιμοποιήσαμε.

Λέξεις κλειδιά
Alphitobius diaperinus, βρώσιμα έντομα, κυκλική οικονομία, βιωσιμότητα, αρωματικά φαρμακευτικά φυτά

Εισαγωγή

Σύμφωνα με προβλέψεις, το 2050 ο πληθυσμός θα ανέρχεται σε 9 δισεκατομμύρια. Κάτι τέτοιο τονίζει την ανάγκη για αύξηση της παγκόσμιας παραγωγής με ταυτόχρονη μείωση της σπατάλης τροφίμων, έτσι ώστε να εξασφαλιστεί μια θρεπτική και ασφαλής διατροφή για όλους. Την ίδια στιγμή, η πίεση που ασκείται στην κτηνοτροφική βιομηχανία συμβάλει στην επιδείνωση διάφορων περιβαλλοντικών προβλημάτων, όπως η αποψίλωση των δασών, η ερημοποίηση βοσκοτόπων, η εξάντληση υδάτινων πόρων αλλά και η έκκληση αερίων του θερμοκηπίου (Andreadis et al. 2021). Τα παραπάνω μπορούν σε μεγαλύτερη κλίμακα να επηρεάσουν τόσο την κλιματική αλλαγή όσο και την απώλεια της βιοποικιλότητας.

Τα έντομα ως τροφή για ανθρώπους και ζώα προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα στους τομείς του περιβάλλοντος, της οικονομίας και της ασφάλειας τροφίμων. Χρειάζονται λιγότερες ποσότητες νερού, γης και τροφής για να παράγουν εξίσου ποιοτικά διατροφικά μόρια σε σχέση με την κτηνοτροφία (Mancini et al. 2022) και έχουν μειωμένη αναλογία μετατροπής τροφής (FCR). Επιπρόσθετα, παρουσιάζουν υψηλή διατροφική αξία. Στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας έχουν χρησιμοποιηθεί οργανικά υποπροϊόντα και παραπροϊόντα γεωργίας ως υποστρώματα (Andreadis et al. 2021, Moruzzo et al. 2021). Οι δυνατότητες αξιοποίησης των βρώσιμων εντόμων έχουν οδηγήσει στην συνεχόμενη ανάπτυξη του κλάδου και της έρευνας γύρω από αυτό το θέμα (Mancini et al. 2022). Από το 2015 η EFSA ασχολείται με ζητήματα που αφορούν την ασφαλή εκτροφή τους.

Το *A. diaperinus* ή αλλιώς αλευροσκώληκας αποτέλεσε το έντομο μελέτης στην παρούσα έρευνα. Ανήκει στην τάξη Coleoptera και στην οικογένεια Tenebrionidae. Αποτελεί παράσιτο για τα πτηνοτροφία και φορέα παθογόνων, ωστόσο πλέον θεωρείται πηγή θρεπτικών συστατικών. Από το

2017, σύμφωνα με κανονισμούς της Ε.Ε, συγκαταλέγεται στα έντομα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή τροφών ιχθυοκαλλιέργειας (Rumbos et al. 2015). Σκοπός της έρευνας ήταν η αξιολόγηση της επίδρασης του ΜΑΦΦ στην ανάπτυξη και επιβίωση του *A. diaperinus*, με απώτερο στόχο την προαγωγή της βιωσιμότητας και της κυκλικής οικονομίας, καθώς το ΜΑΦΦ αποτελεί παραπροϊόν της Ελληνικής γεωργίας.

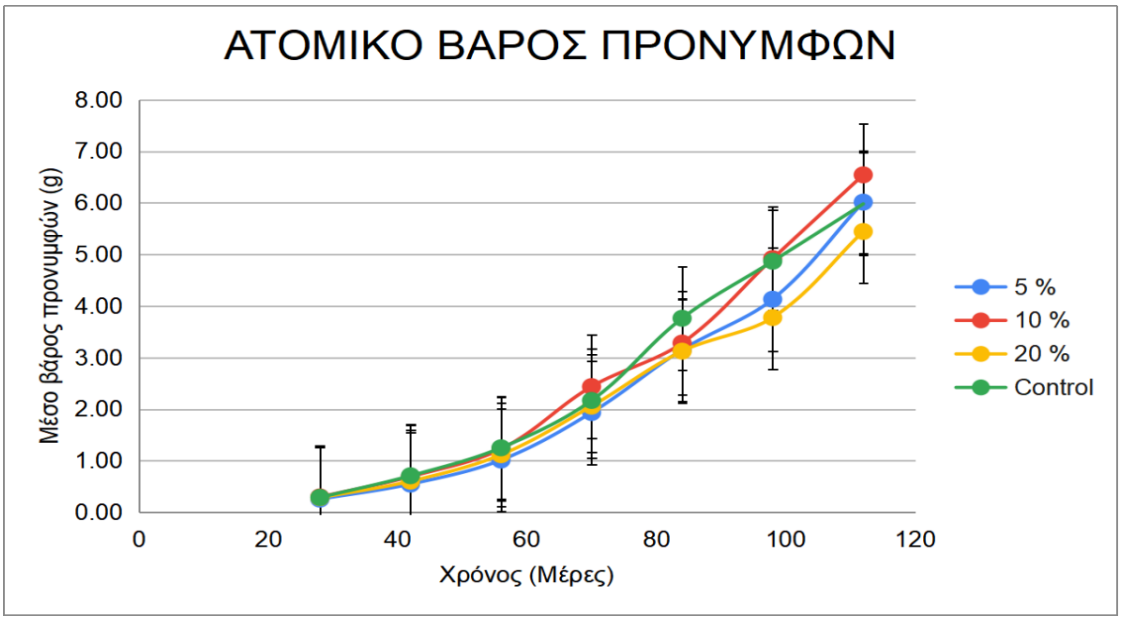
Μέθοδοι

Στο εργαστήριο συντηρούνταν εκτροφή ενηλίκων *A. diaperinus* σε υπόστρωμα καλαμποκάλευρου και φέτες καρότου ως πηγή υγρασίας. Η εκτροφή πραγματοποιούταν κάτω από σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (26^{o}C), υγρασίας (~60%) και φωτοπεριόδου (8:16h Φ: Σ). Τα ενήλικα διαχωρίζονταν από τα αβγά και τις προνύμφες δύο φορές την εβδομάδα. Μετά την εκκόλαψή τους, οι προνύμφες πρώτης και δεύτερης ηλικίας (L1, L2) συλλέγονταν για τις βιοδοκιμές. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε αποτελούταν από πίτουρο σίτου, που αποτελεί το βασικό υπόστρωμα ανάπτυξης του *A. diaperinus*, μαζί με ΜΑΦΦ από εδώδιμα φυτά της Ελλάδας. Πιο συγκεκριμένα περιείχε, ρίγανη (*Origanum vulgare*), θυμάρι (*Thymus vulgaris*), φασκόμηλο (*Salvia officinalis*), δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*) και αιθέρια έλαια αυτών, καθώς και λιναρόσπορο (*Linum usitatissimum*), κρίταμο (*Crithmum maritimum*), κανναβόπιτα και πάστα ελιάς.

Μελετήθηκαν ξεχωριστά τα ακόλουθα τέσσερα υποστρώματα: 5, 10, 20% μίγματος αρωματικών ουσιών και η ομάδα ελέγχου που περιείχε 100% πίτουρο σίτου. Κάθε δοχείο περιείχε 100 προνύμφες L1 και L2 σταδίων και 1g υποστρώματος. Συνολικά έγιναν 6 επαναλήψεις για κάθε υπόστρωμα. Για τις πρώτες 4 εβδομάδες οι προνύμφες αφήνονταν να αναπτυχθούν και έπειτα καταμετρούνταν ο αριθμός των προνυμφών που επιβίωσε και ζυγίζονταν ομαδικά. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνονταν ανά 2 εβδομάδες μέχρι να εμφανιστεί η πρώτη νύμφη. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με την Ανάλυση Διακύμανσης (ANOVA), χρησιμοποιώντας το στατιστικό πακέτο SPSS. Στατιστικά σημαντικές θεωρούνταν όλες οι υποθέσεις με $p < 0.05$.

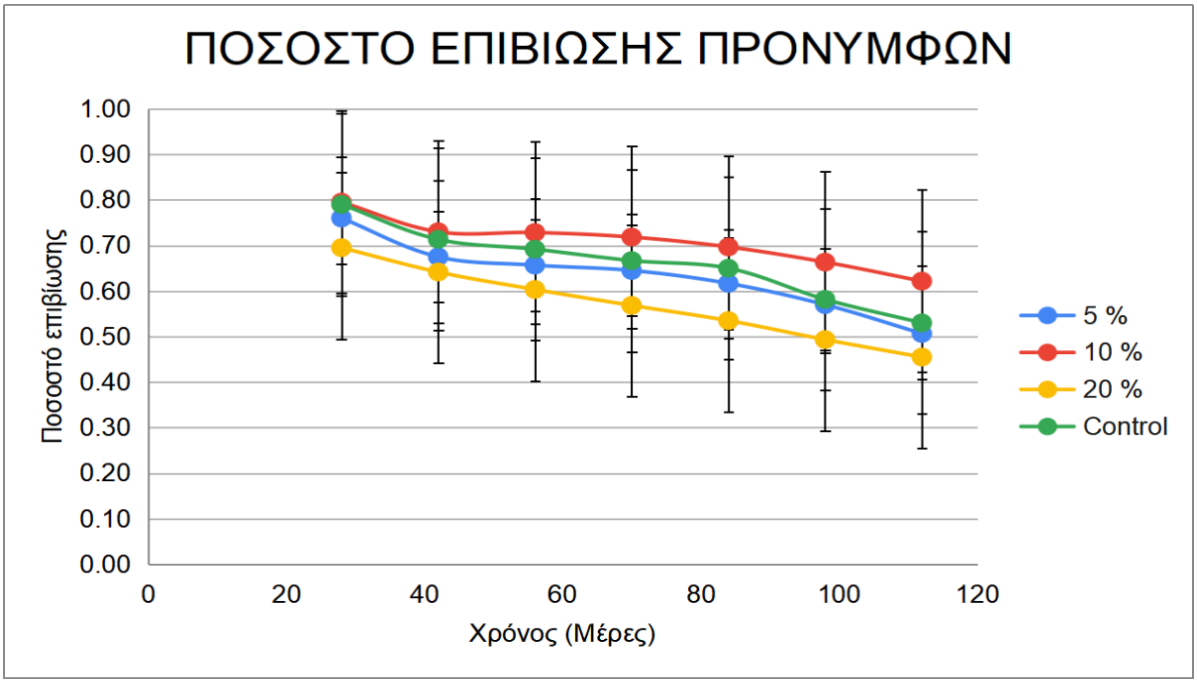
Αποτελέσματα

Το υπόστρωμα με 10% περιεκτικότητα ΜΑΦΦ εμφανίζει την μεγαλύτερη αύξηση και κυμαίνεται από 2,54g έως 8,76g με μέση τιμή 6,54g. Την μικρότερη αύξηση βάρους είχαν οι προνύμφες που εκτράφηκαν σε υπόστρωμα 20% ΜΑΦΦ, με διακύμανση από 3g έως 8,45g και μέση τιμή 5,45 g (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Μέσο ατομικό βάρος προνυμφών (g) *A.diaperinus* που εκτράφηκαν σε υποστρώματα, τα οποία περιείχαν πίτουρο σίτου και διαφορετικό ποσοστό μίγματος αρωματικών φυτών (0, 5, 10, 20%).

Το μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης εμφανίζεται στις προνύμφες που εκτράφηκαν σε υπόστρωμα 10% ΜΑΦΦ, όπου την 112 ημέρα έφτασε ως μέση τιμή το 62% και το μικρότερο ποσοστό επιβίωσης βρέθηκε στο 20% με μέση τιμή 46% (Εικόνα 2). Η διάρκεια ανάπτυξης των προνυμφών *A. diaperinus* δεν εμφανίζει μεγάλη απόκλιση μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων. Την ταχύτερη διάρκεια ανάπτυξης είχαν οι προνύμφες στα υποστρώματα 20% και Control, που σαν μέση τιμή είχαν τις 128 και 122 ημέρες αντίστοιχα. Σύμφωνα με την Ανάλυση Διακύμανσης (ANOVA), η διαφορά στις τιμές του βάρους, της επιβίωσης και της διάρκειας ανάπτυξης ανάμεσα στα διαφορετικά υποστρώματα δεν είναι στατιστικά σημαντική ($p>0.05$).



Εικόνα 2. Ποσοστό επιβίωσης των προνυμφών *A.diaperinus* που εκτράφηκαν σε υποστρώματα, τα οποία περιείχαν πίτουρο σίτου και διαφορετικό ποσοστό μίγματος αρωματικών φυτών (0, 5, 10, 20%).

Συμπεράσματα

Τονίζεται η ικανότητα αξιοποίησης μίγματος αρωματικών φυτών στην εκτροφή προνυμφών *A. diaperinus*. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με συμπεράσματα προηγούμενων ερευνών, όπου αξιολογήθηκε η ικανότητα χρήσης γεωργικών υποπροϊόντων ως υπόστρωμα εκτροφής εντόμων της οικογένειας Tenebrionidae (Broekhoven et al. 2015, Rumbos et al. 2021). Η προσθήκη ΜΑΦΦ αυξάνει τα ποσοστά ενέργειας και λίπους και εμπλουτίζει με μακροθρεπτικά στοιχεία την διατροφή (Andreadis et al. 2021). Ταυτόχρονα, περιέχει αντιοξειδωτικές ουσίες χάρη στα φυτοχημικά. Εφόσον η αύξηση του βάρους, η επιβίωση και η διάρκεια ανάπτυξης δεν επηρεάζονται στατιστικά σημαντικά από τα διαφορετικά υποστρώματα που χρησιμοποιήσαμε, η προσθήκη γεωργικών υποπροϊόντων συμφέρει τόσο οικονομικά όσο και περιβαλλοντικά, εξασφαλίζοντας την ίδια αν όχι καλύτερη επίδοση για τις προνύμφες.

Βιβλιογραφία

Andreadis, S. S., Panteli, N., Mastoraki, M., Rizou, E., Stefanou, V., Tzentilasvili, S., Sarrou, E., Chatzifotis, S., Krigas, N. & Antonopoulou, E. (2021). Towards Functional Insect Feeds: Agri-Food By-Products Enriched with Post-Distillation Residues of Medicinal Aromatic Plants in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) Breeding. *Antioxidants*, 11(1), 68.

Broekhoven, V. S., Oonincx, D. G. A. B., Huis, V. A. & Loon, V. J. J. A. (2015). Growth Performance and Feed Conversion Efficiency of Three Edible Mealworm Species (Coleoptera: Tenebrionidae) on Diets Composed of Organic by-Products. *Journal of Insect Physiology*,73, 1–10.

Mancini, S., Sogari, G., Espinosa D. S., Menozzi, D., Paci G. & Moruzzo, R. (2022) Exploring the Future of Edible Insects in Europe. *Foods*,11(3), 455.

Moruzzo, R., Riccioli, F., Espinosa D. S., Secci, C.,Poli, G. & Mancini, S. (2021). Mealworm (Tenebrio Molitor): Potential and Challenges to Promote Circular Economy.*Animals*,11, (9), 2568.

Rumbos, C. I., Bliamplias, D., Gourgouta, M., Michail V. & Athanassiou, C. G. (2021). Rearing Tenebrio Molitor and Alphitobius Diaperinus Larvae on Seed Cleaning Process Byproducts. *Insects*, 12, (4),293.

Rumbos, C. I., Karapanagiotidis, I. T., Mente, E. & Athanassiou C. G. (2015). The Lesser Mealworm Alphitobius Diaperinus: A Noxious Pest or a Promising Nutrient Source?*Reviews in Aquaculture*, 11, (4), 1418–37.

Ποσοτική Ανίχνευση Νοροϊού σε Δείγματα Αστικών Λυμάτων

ΝΤΟΛΚΕΡΑΣ Αντώνιος[1], ΧΡΙΣΤΟΥΔΙΑ Νικολέττα[2], ΠΑΝΟΥ Αικατερίνη[1], ΧΑΤΖΗΕΥΣΤΑΘΙΟΥ Αθανασία[2], ΣΚΛΑΒΙΑΔΗΣ Θεόδωρος[3], ΑΡΣΕΝΑΚΗΣ Μηνάς[1], ΝΤΑΦΟΥ Δήμητρα[2], ΚΟΤΤΑΡΙΔΗ Χριστίνα[1]

[1]*Εργαστήριο Γενικής Μικροβιολογίας, Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης* ntolkeras@bio.auth.gr, aikaterp@bio.auth.gr, ckottaridi@bio.auth.gr

[2]*Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας, Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης* cnikolett@bio.auth.gr, chatziea@bio.auth.gr, dafoud@bio.auth.gr

[3]*Τομέας Φαρμακογνωσίας-Φαρμακολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης* sklaviad@pharm.auth.gr

Περίληψη

Ο νοροϊός αποτελεί την συχνότερη αιτία πρόκλησης επιδημιών ιογενούς γαστρεντερίτιδας. Οι ταξινομικές γενοομάδες μεγαλύτερου ενδιαφέροντος είναι οι GI και GII καθώς αυτές σχετίζονται περισσότερο με την λοίμωξη στον άνθρωπο. Ο νοροϊός μπορεί να προσβάλει όλες τις ηλικίες, αλλά περισσότερο ευάλωτες ομάδες θεωρούνται τα παιδιά, οι ηλικιωμένοι και οι ανοσοκατεσταλμένοι. Στις περισσότερες περιπτώσεις η νόσηση είναι ήπια και αυτοπεριοριζόμενη. Η νόσος της γαστρεντερίτιδας από νοροϊό φαίνεται να εμφανίζει μια εποχιακή κατανομή, αν και αυτό είναι αμφισβητούμενο. Η μελέτη της επιδημιολογίας του νοροϊού στην Ελλάδα είναι ιδιαίτερα περιορισμένη. Στην παρούσα μελέτη επιχειρήθηκε η εφαρμογή ενός πρωτοκόλλου ανίχνευσης και ταυτοποίησης των γενοομάδων GI και GII των νοροϊών σε αστικά λύματα του νομού Κατερίνης για ένα χρονικό διάστημα 10 μηνών, με σκοπό την καταγραφή της παρουσίας και της ποσοτικοποίησης των συγκεκριμένων ιών.

Λέξεις Κλειδιά

Νοροϊός, Ιογενής Γαστρεντερίτιδα, Επιδημιολογική Παρακολούθηση, Αστικά Λύματα, Real Time PCR

Εισαγωγή

Οι νοροϊοί (Noroviruses – Norwalk viruses) είναι μέλη της οικογένειας των Καλυκοϊών (*Caliciviridae*) (Pringle 1999) και θεωρούνται ως η βασικότερη αιτία ιογενών γαστρεντερικών ασθενειών (Koopmans & Druizer 2004). Μπορούν να μολύνουν τόσο ανθρώπους όσο και ζώα και οι τρόποι με τους οποίους μεταδίδονται ποικίλουν, ωστόσο οι περισσότεροι σχετίζονται με επαφή με μολυσμένο νερό, τρόφιμα ή επιφάνειες. Η νόσηση χαρακτηρίζεται από έμετο, διάρροια, ναυτία, στομαχικούς πόνους και μπορεί να συνοδεύεται από πυρετό. Αν και η ασθένεια είναι συνήθως ήπια και αυτοπεριοριζόμενη, τα παιδιά, οι ηλικιωμένοι και οι ανοσοκατεσταλμένοι είναι κάποιες από τις ομάδες που κινδυνεύουν από μια πιο έντονη και μεγάλης διάρκειας νόσηση (Bok & Green 2012). Το γονιδίωμα των νοροϊών αποτελείται από ένα θετικής πολικότητας μονόκλωνο RNA το οποίο περιλαμβάνει τρία ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης. Οι νοροϊοί ταξινομούνται σε έξι διαφορετικές γενοομάδες (GI – GIV) εκ των οποίων οι γενοομάδες GI, GII και GIV προσβάλλουν τον άνθρωπο (Glass, Parashar & Estes 2009). Στην Ελλάδα έχουν διεξαχθεί λίγες μελέτες σχετικά με την ανίχνευση και τον φυλογενετικό προσδιορισμό των νοροϊών (Ruether et al. 2012), ενώ οι περισσότερες έρευνες διεξήχθησαν σε περιόδους έξαρσης κρουσμάτων και όχι ως γενική επιδημιολογική παρακολούθηση (Papadopoulos et al. 2006). Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των νοροϊών (γενοομάδες GI και GII) σε δείγματα αστικών λυμάτων από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων του Νομού Κατερίνης. Η ανάπτυξη της επιδημιολογικής παρακολούθησης σε περιβαλλοντικά δείγματα θα μπορέσει να παρέχει πολύτιμες πληροφορίες στα εθνικά συστήματα υγείας για την αντιμετώπιση πιθανών εξάρσεων κρουσμάτων, να βελτιώσει την ασφάλεια ορισμένων τροφίμων καθώς και να διευρύνει τις επιστημονικές μας γνώσεις για τον συγκεκριμένο ιό.

Μέθοδοι

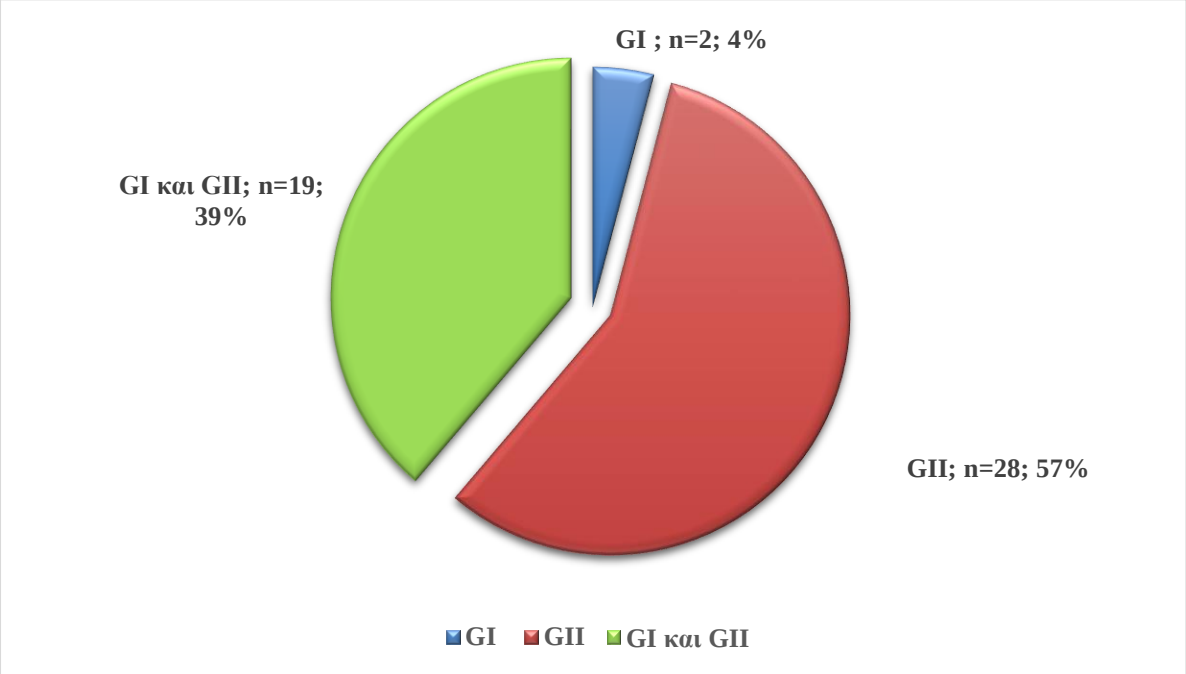
Συνολικά εξετάστηκαν 71 δείγματα αστικών λυμάτων από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων του Νομού Κατερίνης που συλλέχθηκαν από το Μάρτιο έως το Δεκέμβριο του 2021. Κατά την επεξεργασία των δειγμάτων αυτών, προστέθηκε ποσότητα βακτηριοφάγου ιού MS2 γνωστής συγκέντρωσης, αποτελώντας θετικό μάρτυρα για την ποσοτικοποίηση των ιοσωματίων νοροϊού. Τα δείγματα συμπυκνώθηκαν με φυγοκέντρηση, προκειμένου να δημιουργηθεί ίζημα που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του ολικού RNA (Petala 2021).

Για την μετατροπή του RNA σε cDNA χρησιμοποιήθηκε το PrimeScript RT Reagent Kit (Takara), όπου μέχρι και 500 ng από ολικό RNA μεταγράφηκε αντίστροφα. Χρησιμοποιώντας τη μεθοδολογία της Real-Time PCR (RT-PCR), δύο πρωτόκολλα τα οποία στοχεύουν την περιοχή ORF1/ORF2 στο γονιδίωμα των νοροϊών εφαρμόστηκαν στα δείγματα RNA. Για τις RT-PCR χρησιμοποιήθηκε το KAPA Taq PCR Kit (KAPA Biosystems), οι εκκινητές Cog1F, Cog1R, ο TaqMan ιχνηθέτης Ring 1E για την ανίχνευση της GI γενοομάδας και οι εκκινητές Cog2F, Cog2R, ο TaqMan ιχνηθέτης Ring 2B, για την ανίχνευση GII γενοομάδας (Cannon et al. 2017). Για το όριο ανίχνευσης ως κατώφλιες τιμές ελήφθησαν εκείνες που περιγράφονται από τους Cannon et al.

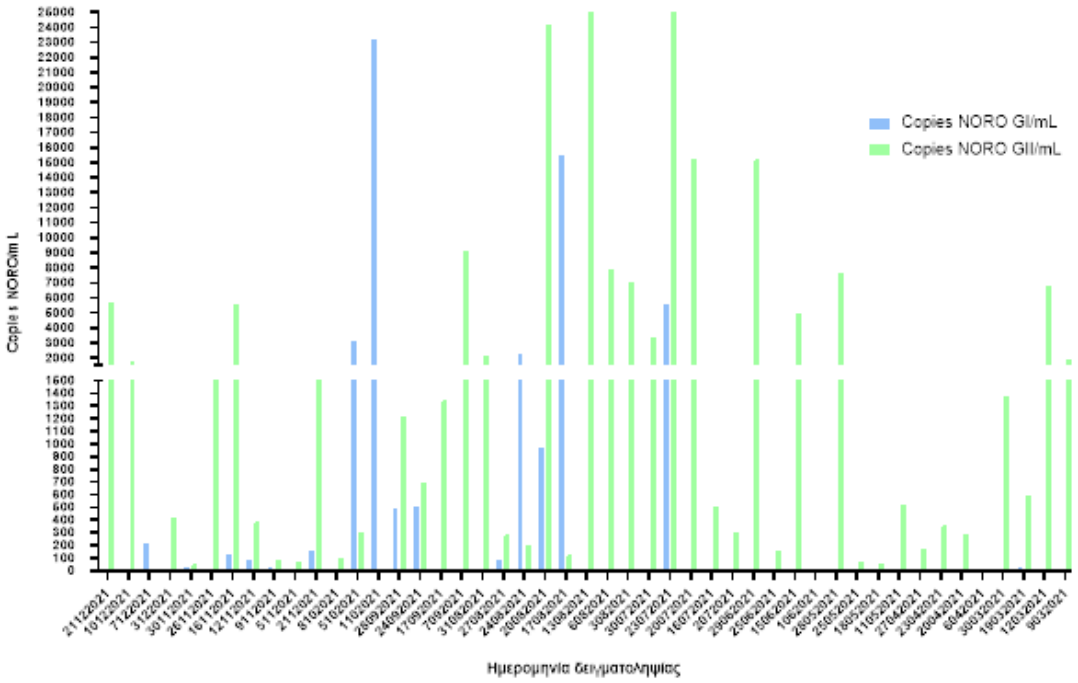
Για την ποσοτικοποίηση των ιοσωματίων νοροϊού/mL λύματος, χρησιμοποιήθηκε το παραπάνω cDNA σε Real time PCR, στοχεύοντας γονίδιο του MS2. Παρατηρώντας την κατώφλιο τιμή για τον ιό MS2 γνωστής συγκέντρωσης που χρησιμοποιήθηκε, αλλά ταυτόχρονα λαμβάνοντας υπόψη την συνολική συγκέντρωση RNA που απομονώθηκε από κάθε δείγμα, καθώς και τα αποτελέσματα από την πρώτη Real time PCR, υπολογίστηκε ο ακριβής αριθμός ιοσωματίων που παρατηρήθηκε σε κάθε δειγματοληψία.

Αποτελέσματα

Από τα 71 δείγματα που ελέγχθηκαν για την παρουσία του νοροϊού, τα 2 (2,4%) ταυτοποιήθηκαν ως GI, τα 28 (28,57%) ως GII και τα 19 (39%) βρέθηκαν θετικά και για τις δύο γενοομάδες (GI και GII) (Εικόνα 1). Ο μεγαλύτερος αριθμός θετικών δειγμάτων συγκεντρώνεται κυρίως μεταξύ των μηνών Ιούλιο-Σεπτέμβριο, όπου παρατηρείται και το υψηλότερο ιικό φορτίο (Εικόνα 2).



Εικόνα 1: Κατανομή των θετικών δειγμάτων στις γενοομάδες GI και GII



Εικόνα 2: Συγκεντρωτική απεικόνιση του ιικού φορτίου ανά ημερομηνία δειγματοληψίας

Συζήτηση

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η παρουσία νοροϊού στα δείγματα λυμάτων καταγράφεται καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης. Παρατηρήθηκε υψηλό ιικό φορτίο σε μήνες κατά τους οποίους σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Eftim et.al 2017) δεν παρατηρείται συχνά. Δεδομένης της ταχείας εξέλιξης του συγκεκριμένου ιού, η συνεχής μοριακή επιδημιολογική επιτήρηση είναι σημαντική και απαραίτητη για τη διαχείριση κινδύνου. Περαιτέρω τυποποίηση των θετικών δειγμάτων που ανευρέθηκαν στην παρούσα μελέτη, προκειμένου να χαρακτηριστούν οι διαφορετικοί γενότυποί τους, είναι σε εξέλιξη από την ομάδα μας.

Βιβλιογραφία

Bok, K. & Green, K.Y. (2012). Norovirus Gastroenteritis in Immunocompromised Patients. New England Journal of Medicine, 367, 2126-2132.

Cannon, J.L., Barclay, L., Collins, N.R., Wikswo, M.E., Castro, C.J., Magana, L.C., Gregoricus, N., Marine, R.L., Chhabra, P., Vinje, J. (2017). Genetic and Epidemiologic Trends of Norovirus Outbreaks in the United States from 2013 to 2016 Demonstrated Emergence of Novel GII.4 Recombinant Viruses, Journal of Clinical Microbiology, 55, 2208-2221.

Eftim, S., Hong, T., Soller, J., Boehm, A., Warren, I., Ichida, A., Nappier, S. (2017). Occurrence of norovirus in raw sewage A systematic literature review and meta-analysis, Water Research, 111, 366-374.

Glass, R.I., Parashar U.D., Estes M.K. (2009). Norovirus Gastroenteritis. New England Journal of Medicine, 361, 1776-1785.

Koopmans, M. & Green K.Y. (2004). Foodborne viruses: an emerging problem. International Journal of Food Microbiology, 90, 23-41

Papadopoulos, V.P., Vlachos, O., Isidorou, E. Kasmeridis, C. Pappa, Z. Goutzouvelidis, A. Filipou, F. (2006). A gastroenteritis outbreak due to Norovirus infection in Xanthi, Northern Greece: management and public health consequences. Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases, 15, 27-30.

Petala, M., Dafou, D., Kostoglou, M., Karapantsios, Th., Kanata, E., Chatziefstathiou, A., Sakaveli, F., Kotoulas, K., Arsenakis, M., Roilides, E., Sklaviadis, T., Metallidis, S., Papa, A., Stylianidis, E., Papadopoulos, A., Papaioannou, N. (2021). A physiochemical model for rationalizing SARS-CoV-2 concentration in sewage. Case study: The city of Thessaloniki in Greece. Science of The Total Environment, 755, 142855.

Pringle, C.R. (1999). Virus Taxonomy – 1999. Archives of Virology, 144, 421-429.

Ruether, I.G.A., Tsakogiannis, D., Pliaka, V., Kyriakopoulou, Z., Krikelis, A., Gartzonika, C., Leveidiotou-Stefanou, S., Markoulatos, P. Molecular Characterization of a new intergenotype Norovirus GII recombinant. (2012). Virus Genes, 44, 237-243.

Ταχεία ανίχνευση βιολογικών δεικτών σε δείγματα θαλασσινού νερού μέσω ολοκληρωμένου συστήματος βιοαισθητήρα

ΚΟΤΣΙΡΗ Ζωή, ΒΑΝΤΑΡΑΚΗΣ Απόστολος

Εργαστήριο Υγιεινής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Περίληψη
Βιολογικοί δείκτες, όπως οι *Escherichia coli* και *Enterococcus faecalis*, χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση της ποιότητας του θαλασσινού νερού. Οι κλασικές μικροβιολογικές μέθοδοι απαιτούν πολύ χρόνο. Έτσι, υπάρχει ανάγκη για την εφαρμογή ενός βιοαισθητήρα, που θα προσφέρει πληροφορίες για τη μικροβιολογική ποιότητα του θαλασσινού νερού με αποτελεσματικό και γρήγορο τρόπο. Η Gold Standard Method προϋποθέτει την ύπαρξη φίλτρου μεμβράνης ως βήμα συμπύκνωσης. Στην παρούσα εργασία, αξιολογήθηκαν έξι τύποι κοινών φίλτρων σύριγγας για συγκέντρωση βακτηρίων και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το φίλτρο με την μεγαλύτερη ανάκτηση για την ανάλυση θαλασσινού νερού για *E. coli* και Enterococci με LAMP PCR. Η υψηλότερη αποτελεσματικότητα, σε ποσοστό 98%, κατέδειξε η μεμβράνη cellulose acetate. Το όριο ανίχνευσης της πολυπλεκτικής χρωματομετρικής LAMP ήταν 10^4/1000 ml για τα *E. coli*, *E. faecalis* και τα ταυτόχρονα *E. coli* και *E. faecalis*. Η παραπάνω μέθοδος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη βιοαισθητήρα στο θαλασσινό νερό με πλεονεκτήματα, το απλό θερμαντικό στοιχείο και την ταχύτητα που παρουσιάζει η LAMP PCR.

Λέξεις-κλειδιά
θαλασσινό νερό, βιοαισθητήρας, βιοδείκτες, LAMP

Εισαγωγή
Οι παράκτιες περιοχές και οι περιοχές κολύμβησης θεωρούνται παγκοσμίως ως δυναμικές ζώνες στις αστικές πόλεις και επηρεάζουν τις οικονομικές τους συνθήκες (Tiwari et al., 2021). Για την προστασία τους και την καλή ποιότητα νερού, η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει φροντίσει να θεσπίσει ορισμένες νομοθεσίες, όπως η οδηγία πλαίσιο για τα ύδατα και η οδηγία για τη θαλάσσια στρατηγική (MSFD) (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2008, 2006). Ο αριθμός των δεικτών κοπρανώδους μόλυνσης (Fecal Indicator Bacteria FIB) δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 500 CFU για το *E. coli* και τις 200 CFU του *E. faecalis* για να χαρακτηρίζονται ως «επαρκείς» (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2006).

Το κύριο ζήτημα είναι ο χρόνος που απαιτείται για την ανάλυση του νερού. Αντί των καλλιεργητικών μεθόδων, προτείνεται η ενίσχυση νουκλεϊκού οξέος με την ισοθερμική ενίσχυση μέσω βρόχου, Multiplex LAMP, που επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών γονιδίων. Το συγκριτικό πλεονέκτημα αυτής της ανάλυσης είναι η εξοικονόμηση χρόνου και η οικονομικά αποδοτική ανάλυση (Rainbow et al., 2020). Οι βιοαισθητήρες μπορούν να γεμίσουν το κενό και να εξάγουν γρήγορα αποτελέσματα σε σύντομο χρονικό διάστημα. Είναι ευαίσθητοι στην ανίχνευση βιομορίων και μπορούν να μετατραπούν σε φορητές συσκευές (Leonardo et al., 2021). Για την πραγματοποίηση της ανάλυσης νερού, το βήμα προσυγκέντρωσης είναι απαραίτητο για τη μείωση του αρχικού όγκου (Ezenarro et al., 2022). Ένα σημαντικό μέρος της ανίχνευσης των FIB και του ορίου ανίχνευσης (LOD) βασίζεται στην αποτελεσματικότητα του φίλτρου. Η μελέτη στοχεύει να αξιολογήσει και να συγκρίνει τα εμπορικά φίλτρα που εφαρμόζονται στην ανάλυση θαλασσινού νερού. Αυτό το αποτελεσματικό φιλτράρισμα θα μπορούσε να ενσωματωθεί σε ένα βιοαισθητήρα.

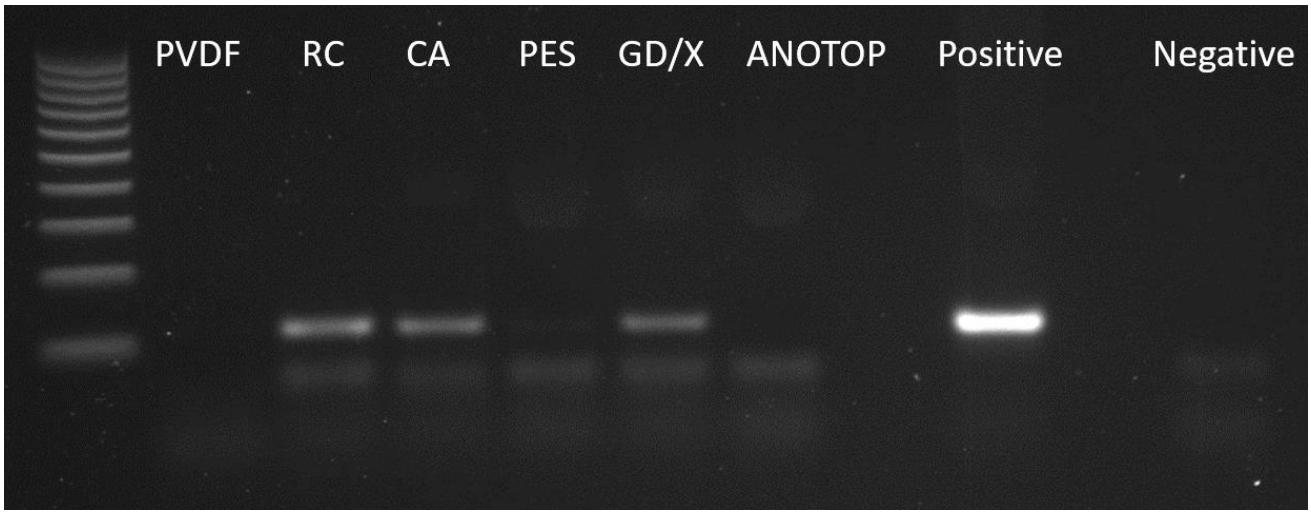
Μέθοδοι
Φίλτρα σύριγγας
Πέντε τύποι φίλτρων σύριγγας 0,45 μm αξιολογήθηκαν προκειμένου να αποφασιστεί το καταλληλότερο φίλτρο για την ανάλυση θαλασσινού νερού. Δείγματα θαλασσινού νερού συλλέχθηκαν από παράκτιες τοποθεσίες στην Πάτρα. Όλα πέρασαν μέσα από ένα φίλτρο 5 um και 0,2 um για την απομάκρυνση

ιζήματος, βακτηρίων και οποιουδήποτε άλλου οργανισμού.

Δείγματα όγκου 100 mL με *E. coli* (10^4 CFU/mL) διηθήθηκαν μέσω διαφορετικών φίλτρων με τη βοήθεια μιας περισταλτικής αντλίας. Στη συνέχεια, 10 ml dH_2O πέρασαν μέσω φίλτρου σύριγγας για την πλύση του. Στη διαδικασία της αντίστροφης ροής, 1 ml dH_2O συλλέχθηκε, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων και εφαρμόστηκε το ISO 9308-1:2014 για την ανίχνευση του *E. coli*. Για την εκχύλιση του DNA, 1 ml από την αντίστροφη πλύση, θερμάνθηκε στους 100^{o}C για 10 λεπτά για να επιτευχθεί βακτηριακή λύση και ακολούθησε PCR. Στο CA φίλτρο επαναλήφθηκε η παραπάνω διαδικασία με όγκο 1000 mL για δυο βακτήρια με διαδοχικές αραιώσεις 10^7-10^2 CFU/100ml και ακολούθησε LAMP PCR για τον εντοπισμό του ορίου ανίχνευσης.

Αποτελέσματα

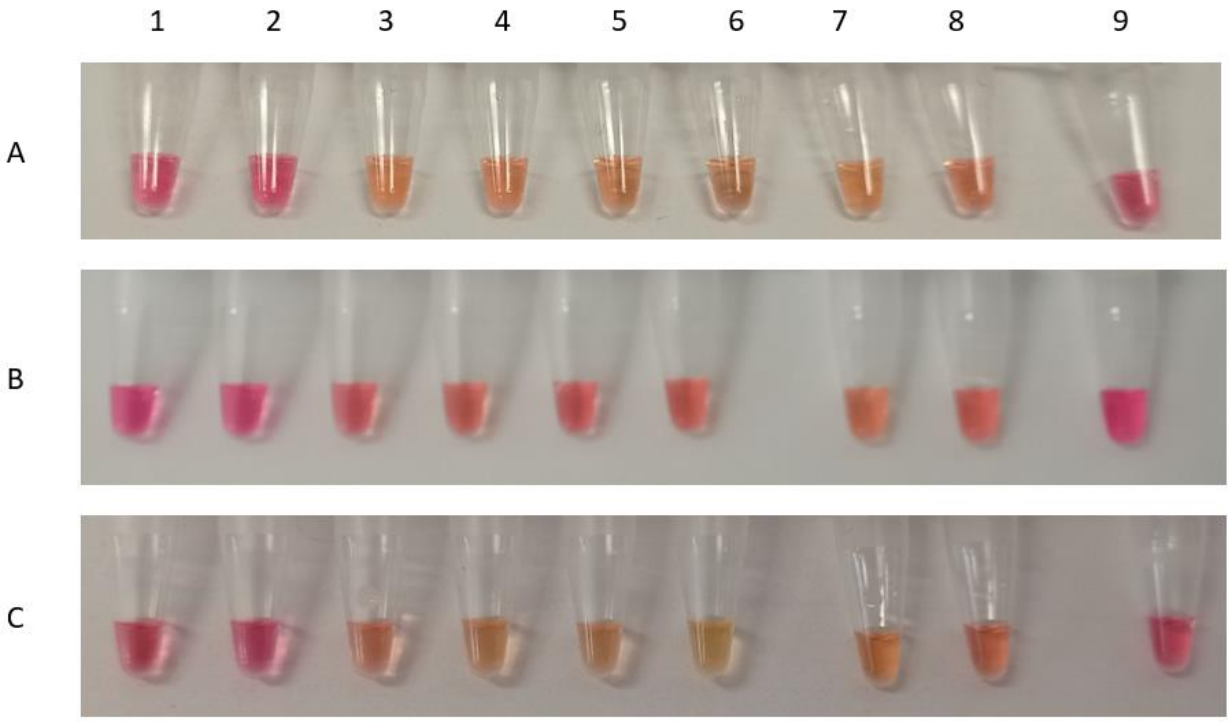
Το φίλτρο CA-S εμφανίζει την υψηλότερη βακτηριακή ανάκτηση όταν αναλύεται τόσο με (98,5%) με την ISO μέθοδο όσο και με συμβατική PCR (Εικόνα 1). Τα αποτελέσματα ήταν ακριβή καθώς δεν υπήρχαν ψευδώς θετικά δείγματα σε όλες τις αναθεωρήσεις του πειράματος. Η PCR χαρακτηρίζεται από ειδικότητα καθώς οι εκκινητές ήταν ειδικά για *E. coli* σύμφωνα με τη βάση δεδομένων BLAST. Τα αποτελέσματα ανίχνευσης τεσσάρων συγκεντρώσεων βακτηρίων, που κυμαίνονται από 10^4–10^7 cfu/ml, φαίνονται στην Εικόνα 2. Τα θετικά αποτελέσματα της ανάλυσης LAMP προσδιορίστηκαν από την ορατή αλλαγή χρώματος από ροζ σε πορτοκαλοκίτρινο χρησιμοποιώντας το Colorimetric WarmStart. Η αλλαγή χρώματος υποδηλώνει την παρουσία DNA.



Εικόνα 1. Σύγκριση των τύπων φίλτρων που απεικονίζονται σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης 2% για ενισχυμένο γονίδιο yaiO

Συμπεράσματα

Η ποιότητα των παράκτιων υδάτινων σωμάτων μελετάται για βακτήρια για την αποφυγή ασθενειών που σχετίζονται με την κολύμβηση. Συνολικά, αξιολογήθηκαν έξι είδη μεμβρανών για να επιλεγεί αυτό που είναι πιο κατάλληλο για συμπύκνωση βακτηρίων. Τα αποτελέσματα προτείνουν φίλτρο CA για αυτόν τον σκοπό. Η χρωματομετρική ανάλυση LAMP σε συνδυασμό με φίλτρο σύριγγας και μέθοδο βρασμού έδωσε γρήγορα αποτελέσματα για την ανίχνευση βιοδεικτών κοπρανώδους μόλυνσης. Αυτός ο προσδιορισμός έδωσε ακριβή αποτελέσματα όταν εκτελέστηκε χρωματομετρική πολλαπλή LAMP και ανίχνευσε και τα δύο βακτήρια σε μια ανίδραση. Η παραπάνω διαδικασία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί από τη δειγματοληψία μέχρι την ανίχνευση σε ένα φορητό σύστημα για τον έλεγχο της ποιότητας του νερού με ένα ανειδίκευτο προσωπικό σε μία μόνο ανάλυση, γεγονός που το καθιστά οικονομικά αποδοτικό και με γρήγορα αποτελέσματα. Ένα άλλο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου, είναι ο απλός εξοπλισμός που απαιτεί η LAMP. Ενδεχομένως, οποιοσδήποτε από τις δημοτικές αρχές θα μπορούσε να τοποθετήσει μια συσκευή, έναν βιοαισθητήρα, με τις συγκεκριμένες απαιτήσεις και έπειτα να μοιραστεί τα αποτελέσματα δημόσια.



Εικόνα 2. Ευαισθησίες προσδιορισμών LAMP για την ανίχνευση σειριακά αραιωμένου βακτηριακού DNA. 7, (θετικό *E. coli*) 8.9 $\times 10^4$ cfu/ml; 8, (θετικό *E. faecalis*) 2 $\times 10^4$ cfu/ml; 9, αρνητικό. **A** (*E. coli*): 1, 8.9 $\times 10^2$ cfu/ml; 2, 8.9 $\times 10^3$ cfu/ml; 3, 8.9 $\times 10^4$ cfu/ml; 4, 8.9 $\times 10^5$ cfu/ml; 5, 8.9 $\times 10^6$ cfu/ml; 6, 8.9 $\times 10^7$ cfu/ml. **B** (*E. faecalis*): 1, 2×10^2 cfu/ml; 2, 2×10^3 cfu/ml; 3, 2×10^4 cfu/ml; 4, 2×10^5 cfu/ml; 5, 2×10^6 cfu/ml; 6, 2×10^7 cfu/ml. **C** (*E. coli* + *E. faecalis*): 1, $(8.9 +2)\times 10^2$ cfu/ml; 2, $(8.9 +2)\times 10^3$ cfu/ml; 3, $(8.9 +2)\times 10^4$ cfu/ml; 4, $(8.9 +2)\times 10^5$ cfu/ml; 5, $(8.9 +2)\times 10^6$ cfu/ml; 6, $(8.9 +2)\times 10^7$ cfu/ml

Βιβλιογραφία

European Commission, (2006) Directive 2006/7/EC of the European Parliament and of the Council of 15 February 2006 concerning the management of bathing water quality and repealing Directive 76/160/EEC. Off. J. Eur. Union L 064, 37–51.

European Commission, (2008). Directive 2008/56/EC of the European Parliament and of the Council of 17 June 2008, establishing a framework for community action in the field of marine environmental policy (Marine Strategy Framework Directive). J. Water Law 19, 95–97.

Ezenarro, J.J., Mas, J., Muñoz-Berbel, X., Uria, N., (2022). Advances in bacterial concentration methods and their integration in portable detection platforms: A review. Anal. Chim. Acta 1209.

Leonardo, S., Toldrà, A., Campàs, M., (2021). Biosensors based on isothermal DNA amplification for bacterial detection in food safety and environmentalmonitoring. Sensors (Switzerland) 21, 1–24.

Tiwari, A., Oliver, D.M., Bivins, A., Sherchan, S.P., Pitkänen, T., (2021). Bathing water quality monitoring practices in europe and the United States. Int. J. Environ. Res. Public Health 18.

Η επίδραση της επιγενετικής κατάστασης ενός γονιδίου στη συχνότητα μεταλλάξεων του συστήματος CRISPR/Cas9

ΚΟΥΚΑΡΑ Ευγενία, ΒΛΕΤΣΟΣ Παναγιώτης, ΚΕΛΛΑΡΗ Λουκία-Μαρία, ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ Κ. Καλλιόπη

Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ekoukara@uth.gr, pvletsos@uth.gr

Περίληψη

Τα τριτερπένια αποτελούν μια πολυπληθή και ετερογενή οικογένεια δευτερογενών μεταβολιτών που εμπλέκονται σε καίριες διεργασίες κατά την ανάπτυξη ενός φυτού. Μια τέτοια διαδικασία είναι η φυματιογένεση, χαρακτηριστικό των ψυχανθών. Το μονοπάτι της AMY2 φαίνεται να εμπλέκεται στη ρύθμιση της φυματιογένεσης στο μοντέλο ψυχανθές *Lotus japonicus*. Το γονίδιο *AMY2*, το οποίο κωδικοποιεί για μια συνθάση της β-αμυρίνης μικτής δράσης, ανήκει σε ένα σύμπλεγμα γονιδίων με άλλα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση τριτερπενίων. Η αποσαφήνιση του ρόλου του μπορεί να γίνει μέσω της στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης του υιοθετώντας την τεχνολογία CRISPR/Cas9. Ο στόχος της εργασίας ήταν ο σχεδιασμός εξειδικευμένων gRNAs και η εισαγωγή τους σε δυαδικούς φορείς CRISPR/Cas9, χρησιμοποιώντας την τεχνική κλωνοποίησης Golden Gate. Η λειτουργικότητα των gRNAs, καθώς και η δυνατότητα πρόσβασης του συμπλόκου Cas9:sgRNA στο γονιδιακό τόπο του *AMY2*, αξιολογήθηκε μέσω παροδικής έκφρασης σε ρίζες. Απώτερος σκοπός είναι η δημιουργία σταθερών σειρών *L. japonicus* μεταλλαγμένων για το *AMY2*.

Λέξεις-κλειδιά

CRISPR/Cas9, χρωματίνη, ριζόβιο, *Agrobacterium rhizogenes.*

Εισαγωγή

Ο ρόλος του AMY2 στο φυτό Lotus japonicus

Ο μεταβολισμός των τριτερπενίων παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στα ψυχανθή και ειδικά σε μοντέλα ψυχανθή, όπως το φυτό *L. japonicus*. Η αλληλεπίδραση του φυτού με βακτήρια του γένους *Rhizobium* οδηγεί στη δημιουργία ριζικών φυματίων. Καθώς η φυματιογένεση είναι μια ενεργειακά κοστοβόρα διαδικασία, ρυθμίζεται από διάφορους φυτικούς μηχανισμούς, εκ των οποίων το μονοπάτι βιοσύνθεσης τριτερπενίων της AMY2. Το μονοπάτι ξεκινάει με τη σύνθεση δύο τριτερπενίων, εκ των οποίων το ένα είναι η β-αμυρίνη, από τη συνθάση της β-αμυρίνης μικτής δράσης, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *AMY2*. Το γονίδιο αυτό αποτελεί μέλος συστοιχίας γονιδίων που επάγεται κατά την φυματιογένεση (Krokida et al. 2013). Αν και το μονοπάτι έχει ήδη μελετηθεί, υπάρχουν ακόμη άγνωστες πτυχές σχετικά με τον ρόλο του στη φυματιογένεση. Η αποσαφήνιση του ρόλου του μπορεί να γίνει μέσω της στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης του *AMY2*, υιοθετώντας ένα σύστημα CRISPR/Cas9.

Η τεχνολογία CRISPR/Cas9

Η εισαγωγή του συστήματος CRISPR/Cas9 στα φυτικά κύτταρα μπορεί να γίνει μέσω της μεταφοράς και ενσωμάτωσης μιας σειράς γονιδίων από αγροβακτήρια. Η μέθοδος αυτή προϋποθέτει τη δημιουργία ενός δυαδικού φορέα που να εκφράζει την Cas9 και τουλάχιστον ένα sgRNA.

Μετάλλαξη του γονιδίου AMY2

Ο σκοπός της εργασίας ήταν ο σχεδιασμός εξειδικευμένων gRNAs και η εισαγωγή τους σε δυαδικούς φορείς CRISPR/Cas9, χρησιμοποιώντας την τεχνική κλωνοποίησης Golden Gate (Weber et al. 2011). Η λειτουργικότητα των gRNAs αξιολογήθηκε μέσω της παροδικής έκφρασης σε ρίζες του *L. japonicus* χρησιμοποιώντας το *Agrobacterium* rhizogenes. Επιπλέον, καθώς το *AMY2* αποτελεί μέλος συστοιχίας γονιδίων που επάγεται σε συγκεκριμένες συνθήκες, αποφασίσαμε να ελέγξουμε την επίδραση της επιγενετικής κατάστασης του *AMY2* στη συχνότητα μεταλλάξεων (Krokida et al. 2013).

Μέθοδοι

Σχεδιασμός των gRNAs

Ο σχεδιασμός των κατάλληλων gRNAs έγινε με τη χρήση των εργαλείων CRISPR-P 2.0 (Liu et al. 2017) και CRISPRdirect (Naito et al. 205). Η αναζήτηση περιλάμβανε την εύρεση όλων των μοτίβων PAM με αλληλουχία 5'NGG3', όπου N οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο, που αναγνωρίζονται από την Cas9 του οργανισμού *Streptococcus pyogenes*. Παράλληλα με την επιλογή του *L. japonicus* ως γονιδίωμα αναφοράς, ήταν δυνατή η πρόβλεψη των στόχων μη ειδικής στόχευσης (off-target sites). Τα gRNAs με τη μεγαλύτερη προβλεπόμενη εξειδίκευση επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση.

Συναρμολόγηση των δυαδικών φορέων CRISPR/Cas9

Η κατασκευή κάθε πλασμιδιακού φορέα πραγματοποιήθηκε σε μια αντίδραση κλωνοποίησης που συνδυάζει την διαδοχική δράση ενζύμου περιορισμού τύπου IIS και λιγάσης στο ίδιο PCR tube. Ακολούθησε μετασχηματισμός χημειοδεκτικών κυττάρων με την αντίδραση κλωνοποίησης και επιλογή κλώνων για απομόνωση πλασμιδίου. Οι σωστοί κλώνοι επιβεβαιώθηκαν με διαγνωστική πέψη και αλληλούχιση κατά Sanger.

Μετασχηματισμός ριζών L. japonicus και μόλυνση με ριζόβιο

Ο πειραματικός έλεγχος των gRNAs έγινε μέσω μετασχηματισμού ριζών *L. japonicus* με το *Agrobacterium rhizogenes*. Η διαδικασία περιλάμβανε την αφαίρεση της ρίζας και τον εμβολιασμό με αγροβακτήριο που φέρει δυαδικό φορέα CRISPR/Cas9. Ακολούθησε αναγέννηση και επιμήκυνση του νέου ριζικού συστήματος. 3 εβδομάδες μετά τον μετασχηματισμό, οι ρίζες ελέγχθηκαν για ύπαρξη φθορισμού. Ορισμένες μετασχηματισμένες ρίζες αποθηκεύτηκαν για έλεγχο μεταλλάξεων, ενώ τα φυτά με μια ή περισσότερες ρίζες μεταφέρθηκαν σε γλάστρες. 1 εβδομάδα μετά την φύτευση, ο μισός αριθμός φυτών εμβολιάστηκε με *Mesorhizobium loti*. 4 εβδομάδες μετά τη μόλυνση με ριζόβιο, οι ρίζες ελέγχθηκαν και πάλι για ύπαρξη φθορισμού και οι μετασχηματισμένες αποθηκεύτηκαν για έλεγχο μεταλλάξεων.

Έλεγχος μεταλλάξεων

Οι αποθηκευμένοι ιστοί χρησιμοποιήθηκαν για απομόνωση γενωμικού DNA και ενίσχυση περιοχής γονιδίων που περιλαμβάνει τις αλληλουχίες-στόχους του συμπλόκου Cas9:sgRNA. Για τον έλεγχο μεταλλάξεων ακολούθησε ανάλυση των ενισχυμένων προϊόντων με το πρωτόκολλο της ενδονουκλεάσης T7 και ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης.

Αποτελέσματα

Σχεδιασμός των guide RNAs

Το γονίδιο AMY2 εμφανίζει μεγάλη ομολογία με άλλα γονίδια του *L. japonicus*. Για την αποφυγή μεταλλάξεων σε άλλα σημεία, επιλέξαμε gRNAs που στοχεύουν εξόνια και ιντρόνια. Ο στόχος είναι η πρόκληση δύο θραύσεων διπλής έλικας εκατέρωθεν εξονίων και η αφαίρεση της ενδιάμεσης περιοχής.

Δημιουργία δυαδικών φορέων CRISPR/Cas9 σε 2 βήματα

Η σύνθεση του κάθε gRNA συνέβει με την υβριδοποίηση μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων DNA και κλωνοποίηση σε φορέα που φέρει υποκινητή και gRNA scaffold. Σε δεύτερο στάδιο, συνδυάσαμε ένα γονίδιο αναφοράς, την κασέτα έκφρασης της Cas9, κασέτες έκφρασης για δύο sgRNAs και ένα γονίδιο επιλογής σε έναν τελικό φορέα.

Έλεγχος μεταλλάξεων

Η ανίχνευση παρουσίας μεταλλάξεων έγινε σε δύο χρονικές στιγμές. Η πρώτη, 3 εβδομάδες μετά τον μετασχηματισμό, είναι η συνηθισμένη πρακτική. Ωστόσο, επειδή το *AMY2* ανήκει σε συστοιχία γονιδίων και εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα κατά την ανάπτυξη της ρίζας, πιθανώς δεν είναι προσβάσιμο στο σύμπλοκο Cas9:sgRNA. Η μόλυνση με ριζόβιο είναι γνωστό ότι επάγει την έκφραση του, άρα την χαλάρωση της δομή της χρωματίνης στο σημείο αυτό. Η υπόθεση εξετάστηκε τη δεύτερη χρονική στιγμή, 4 εβδομάδες μετά την μόλυνση με ριζόβιο. Τέλος, επειδή με την πάροδο του χρόνου

συσσωρεύονται μεταλλάξεις, αναλύθηκαν και ρίζες ίδιας ηλικίας χωρίς επιμόλυνση.

Μελλοντικά πειράματα

Το αποτέλεσμα της παροδικής έκφρασης του συστήματος CRISPR/Cas9 στις ρίζες του φυτού θα καθορίσει το πρωτόκολλο σταθερού μετασχηματισμού για τη δημιουργία σταθερών μεταλλαγμάτων του *AMY*2.

Βιβλιογραφία

Krokida et al., (2013). A metabolic gene cluster in Lotus japonicus discloses novel enzyme functions and products in triterpene biosynthesis. *New Phytol*, 200(3):675-690.

Liu et al., (2017). CRISPR-P 2.0: An Improved CRISPR-Cas9 Tool for Genome Editing in Plants. *Mol Plant*, 10(3):530-532.

Naito et al., (2015). CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics*, 31(7):1120-3.

Wang L et al., (2016). Efficient Inactivation of Symbiotic Nitrogen Fixation Related Genes in Lotus japonicus Using CRISPR-Cas9. *Front Plant Sci*., Aug 31;7:1333.

Weber et al., (2011). A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PLoS One*, 6(2):e16765.

V.WORKSHOP

WORKSHOP-1 : Καινοτόμες Μεθοδολογίες Next Generation Sequencing – Εφαρμογές στην Έρευνα και τη Διάγνωση

Συντονίστρια
Αναστασία Χατζηδημητρίου
Διευθύντρια Ερευνών, Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών, Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης (ΙΝΕΒ, ΕΚΕΤΑ)

Το Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών στο Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης (ΙΝΕΒ | ΕΚΕΤΑ) εκπονεί έρευνα στις Επιστήμες Ζωής που εκτείνεται από τα μικρόβια ως τον άνθρωπο. Στο πλαίσιο αυτό, τα τελευταία χρόνια αναπτύσσει και εφαρμόζει καινοτόμες μεθοδολογίες αλληλούχησης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS) με τελικό σκοπό την προαγωγή της βασικής και εφαρμοσμένης έρευνας και την παροχή αξιόπιστων διαπιστευμένων διαγνωστικών υπηρεσιών.

Στο workshop που διοργανώνεται στο ΙΝΕΒ, στα πλαίσια του 13ου Πανελλήνιου Συνεδρίου της ΠΕΒ, οι συμμετέχοντες θα ακολουθήσουν την πορεία του δείγματος από την παραλαβή ως την αλληλούχηση στους ειδικά διαμορφωμένους εργαστηριακούς χώρους του ΙΝΕΒ και με τη βοήθεια εξειδικευμένου προσωπικού θα έρθουν σε επαφή με καινοτόμες μεθοδολογίες σε διαφορετικές πλατφόρμες αλληλούχησης.

Σε ποιους απευθύνεται: Προπτυχιακοί και Μεταπτυχιακοί φοιτητές Βιολογίας

Ημέρα και ώρα διεξαγωγής :

- ✓ Workshop 1A: Παρασκευή 9/12/2022, 15:00-16:30
- ✓ Workshop 1B: Σάββατο 10/12/2022, 09:30-11:00

Χώρος διεξαγωγής : Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών στο Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης (ΙΝΕΒ | ΕΚΕΤΑ).

WORKSHOP 2 : Βασικά βήματα διερεύνησης μιας τροφιμογενούς επιδημίας – Ο ρόλος της εργαστηριακής επιτήρησης

Συντονίστρια
Γεωργία Μανδηλαρά
Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας, Σχολή Δημόσιας Υγείας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Επιστημονική Υπεύθυνη Εθνικού Κέντρου Αναφοράς Σαλμονελών, Σιγκελών και λοιπών τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών

Κάθε χρόνο καταγράφεται ένας μεγάλος αριθμός τροφιμογενών επιδημιών, οι οποίες πλέον εκδηλώνονται σε εκτεταμένες γεωγραφικές περιοχές και χρονικές περιόδου λόγω της παγκοσμιοποίησης των τροφίμων, καθιστώντας την (εργαστηριακή) διερεύνηση μια μεγάλη πρόκληση. Η Σαλμονέλα αποτελεί το πιο κοινό αίτιο βακτηριακής τροφιμογενούς επιδημίας. Στην Ελλάδα έχουν καταγραφεί και διερευνηθεί αρκετές συρροές τα τελευταία χρόνια.

Στο Workshop, με εργαλείο ένα case-study (μελέτη περίπτωσης) διερεύνησης μιας πραγματικής επιδημίας σαλμονέλωσης που ξεκίνησε στην Ελλάδα και στη συνέχεια επεκτάθηκε σε χώρες της Ε.Ε , θα αποτυπωθούν όλα τα στάδια διερεύνησης μιας τροφιμογενούς επιδημίας. Το case-study θα πραγματοποιηθεί με ερωτο-απαντήσεις με τους συμμετέχοντες.

Μετά την ολοκλήρωση αυτής της μελέτης περίπτωσης, ο συμμετέχων θα πρέπει να είναι σε θέση να:

- ✓ Περιγράψει τα συμπτώματα, τα μέσα διάγνωσης και τον έλεγχο της σαλμονέλωσης.
- ✓ Περιγράψει πώς η τυποποίηση της σαλμονέλας μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην διερεύνηση/αναγνώριση μιας επιδημίας .
- ✓ Περιγράψει πώς το εργαστήριο που επιτηρεί τη σαλμονέλα επηρεάζει τα συστήματα επιτήρησης και τη χρησιμότητα των δεδομένων.
- ✓ Υπολογίσει τη συχνότητα εμφάνισης μιας ασθένειας εάν δίνεται ο αριθμός των κρουσμάτων και το μέγεθος του πληθυσμού.
- ✓ Δημιουργήσει και να ερμηνεύσει ένα γράφημα.
- ✓ Γνωρίζει τα στάδια διερεύνησης μιας τροφιμογενούς επιδημίας και τους εμπλεκόμενους φορείς στην Ελλάδα/Ε.Ε.

Σε ποιους απευθύνεται : Προπτυχιακοί και Μεταπτυχιακοί φοιτητές Βιολογίας

Ημέρα και ώρα διεξαγωγής : Παρασκευή 9/12/2022, 17:00-18:30

Χώρος διεξαγωγής : Αμφιθέατρο ΙΙΙ, ΚΕΔΕΑ

ΒΡΑΒΕΙΟ «ΦΩΤΗΣ ΚΑΦΑΤΟΣ»

ΑΠΟΝΟΜΗ ΒΡΑΒΕΙΟΥ «ΦΩΤΗΣ ΚΑΦΑΤΟΣ» ΣΤΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΤΟΥ 13ου ΣΥΝΕΔΡΙΟΥ ΤΗΣ ΠΕΒ

Το βραβείο Αριστείας στη Βιολογία «Φώτης Καφάτος» απονέμεται κάθε δύο χρόνια από την ΠΕΒ, μετά από ανοιχτή πρόσκληση και κατάθεση υποψηφιοτήτων, σε Ελληνίδες/Έλληνες ερευνήτριες/ες που δημοσίευσαν κατά τη χρονική περίοδο 2021-2022 (ή των οποίων έχει γίνει αποδεκτή προς δημοσίευση) πρωτότυπη εργασία σε έγκριτο περιοδικό υψηλής απήχησης.

Το βραβείο, το οποίο τελεί υπό την αιγίδα της Γενικής Γραμματείας Έρευνας και Τεχνολογίας, συνοδεύεται από το συνολικό ποσό των 2000€, χορηγία του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας, ενώ στο σύνολο των βραβευθέντων αποδίδονται συγγράμματα αξίας 1.000€, προσφορά των Πανεπιστημιακών Εκδόσεων Κρήτης του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας.

Για το 2023, η τελετή απονομής του βραβείου και των επαίνων πραγματοποιήθηκε την Κυριακή 11 Δεκεμβρίου 2023, κλείνοντας τις εργασίες του 13ου συνεδρίου της ΠΕΒ, σε ανοιχτή διαδικτυακή μετάδοση από το κανάλι της ΠΕΒ στο youtube (https://www.youtube.com/watch?v=PO7_D-Hnl90&t=578s).

Το βραβείο και τους επαίνους ανακοίνωσε, εκ μέρους της Επιτροπής Αξιολόγησης των υποψηφιοτήτων, ο καθηγητή Μοριακής Βιολογίας Συστημάτων της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης και Πρόεδρος του ΔΣ του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ) κύριος Νεκτάριος Ταβερναράκης.

Το βραβείο απονεμήθηκε στην **κα Παναγιώτα Μαυροειδή** για την εργασία της με τίτλο «Autophagy mediates the clearance of oligodendroglial SNCA/alpha- synuclein and TPPP/ p25A in multiple system atrophy models» και στον **κ. Βασίλειο Κωνσταντάκο**, για τις δύο εργασία του με τίτλο «CRISPR–Cas9 gRNA efficiency prediction: an overview of predictive tools and the role of deep learning» και «CRISPRedict: a CRISPR-Cas9 web tool for interpretable efficiency predictions». Επιπλέον, έπαινοι δόθηκαν στον **κ. Ηλία Γκίκα** και στις **κ.κ. Έντζι Πρίφτη, Ελένη Τσακίρη** και **Εργίνα Βούρκου.**

Ακολουθεί το πρακτικό της Επιτροπής Αξιολόγησης.

ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ
ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΩΝ ΠΡΟΤΑΣΕΩΝ
ΓΙΑ ΤΟ ΒΡΑΒΕΙΟ ΑΡΙΣΤΕΙΑΣ ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΠΑ «ΦΩΤΗΣ ΚΑΦΑΤΟΣ»
ΤΗΣ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΑΣ ΕΝΩΣΗΣ ΒΙΟΕΠΙΣΤΗΜΟΝΩΝ

ΣΥΝΕΔΡΙΑ της 31.10.2022

Σήμερα, 31 Οκτωβρίου 2022, ημέρα Δευτέρα, και ώρα 1 μ.μ. συνήλθε, μέσω τηλεδιάσκεψης (Zoom), έπειτα από συμφωνία των Μελών της, η Ειδική Επιτροπή Αξιολόγησης, με θέμα Ημερήσιας Διάταξης την:

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΩΝ ΠΡΟΤΑΣΕΩΝ ΓΙΑ ΤΟ ΒΡΑΒΕΙΟ ΤΗΣ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΑΣ ΕΝΩΣΗΣ ΒΙΟΕΠΙΣΤΗΜΟΝΩΝ «ΦΩΤΗΣ ΚΑΦΑΤΟΣ»

Στη συνεδρίαση παρίστανται οι κ.κ.:

1.	**Νεκτάριος ΤΑΒΕΡΝΑΡΑΚΗΣ**	Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας Συστημάτων, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης. Πρόεδρος ΔΣ του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ).	*Πρόεδρος Επιτροπής*
2.	**Ηλίας ΚΑΖΑΝΗΣ**	Επίκουρος Καθηγητής, Τομέας Γενετικής Βιολογίας Κυττάρου & Ανάπτυξης, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών.	*Μέλος*
3.	**Απόστολος ΚΛΙΝΑΚΗΣ**	Ερευνητής Α', Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών.	*Μέλος*
4.	**Παναγούλα ΚΟΛΛΙΑ**	Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.	*Μέλος*
5.	**Ιωσήφ ΠΑΠΑΜΑΤΘΑΙΑΚΗΣ**	Ομότιμος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης. Μέλος του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας & Βιοτεχνολογίας του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ).	*Μέλος*
6.	**Αριστείδης ΠΑΡΜΑΚΕΛΗΣ**	Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοποικιλότητας και Οικολογίας Πληθυσμών, Πρόεδρος Τμήματος	*Μέλος*

		Βιολογίας Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.	
7.	**Θεοχάρης ΠΑΤΑΡΓΙΑΣ**	Ομότιμος Καθηγητής Βιολογίας και Γενετικής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.	*Μέλος*
8.	**Χαράλαμπος ΣΑΒΒΑΚΗΣ**	Ομότιμος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Μέλος ΔΣ της Εθνικής Επιτροπής Βιοηθικής.	*Μέλος*
Η κα **Αναστασία ΧΑΤΖΗΔΗΜΗΤΡΙΟΥ**, δεν κατάφερε να συμμετάσχει στη συνεδρίαση, όμως κατέθεσε γραπτώς τις αξιολογήσεις της.			
9.	**Αναστασία ΧΑΤΖΗΔΗΜΗΤΡΙΟΥ**	Ερευνήτρια στο Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών του Εθνικού Κέντρου Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης (ΙΝΕΒ | ΕΚΕΤΑ). Μέλος ΔΣ της ΠΕΒ.	*Μέλος*

Υπαρχούσης απαρτίας, αρχίζει η εξέταση του θέματος της ημερησίας διατάξεως.

Ο Πρόεδρος της Επιτροπής, Καθηγητής Νεκτάριος Ταβερναράκης, λόγω Conflict of Interest, ζήτησε την εξαίρεσή του από τη διαδικασία αξιολόγησης, και αποχωρεί από τη συνεδρίαση.

Λόγω Conflict of Interest:
Ο κ. Κλινάκης δεν αξιολόγησε 1 πρόταση, και
Ο κ. Σαββάκης δεν αξιολόγησε 1 πρόταση.

ΥΠΟΨΗΦΙΟΙ

Η Επιτροπή εξέτασε και μελέτησε λεπτομερώς τις **7 Προτάσεις** που υπεβλήθησαν.
Υποψήφιοι για το βραβείο είναι οι:

1. **Παναγιώτα ΜΑΥΡΟΕΙΔΗ**, έπειτα από πρόταση του Ερευνητή Α' του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, Δρ. Κώστα ΒΕΚΡΕΛΛΗ.
2. **Έντζι ΠΡΙΦΤΗ, Ελένη ΤΣΑΚΙΡΗ και Εργίνα ΒΟΥΡΚΟΥ**, έπειτα από πρόταση του Διευθυντή και Προέδρου Διοικητικού Συμβουλίου του Ερευνητικού Κέντρου Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμιγκ», Δρ. Γεώργιου ΠΑΝΑΓΙΩΤΟΥ.

3. **Βασίλειος ΚΩΝΣΤΑΝΤΑΚΟΣ**, έπειτα από πρόταση του Ερευνητή Β' βαθμίδας του Ερευνητικού Κέντρου Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμιγκ», Δρ. Χριστόφορου ΝΙΚΟΛΑΟΥ.
4. **Αναστασία ΧΡΙΣΤΟΠΟΥΛΟΥ**, έπειτα από πρόταση της Ομότιμης Καθηγήτριας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Δρ. Μαργαρίτας ΑΡΙΑΝΟΥΤΣΟΥ.
5. **Ηλίας ΓΚΙΚΑΣ**, έπειτα από πρόταση του Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης και Συνεργαζόμενου Ερευνητή του IMBB – ITE, Δρ. Χρήστου ΔΕΛΙΔΑΚΗ.
6. **Πηνελόπη Γεωργία ΠΑΠΑΓΙΑΝΝΗ**, έπειτα από πρόταση του Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, Δρ. Μηνά ΓΙΑΓΚΟΥ.
7. **Ιωάννης ΓΕΩΡΓΟΥΛΗΣ**, έπειτα από πρόταση της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας του Τμήματος Βιολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, Δρ. Αλεξάνδρας Σταΐκου.

ΑΠΟΦΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

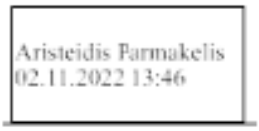
Η Επιτροπή αφού έλαβε υπόψη της τα παραπάνω, σημείωσε το υψηλό επιστημονικό επίπεδο των υποψηφίων, κι έπειτα από διεξοδική συζήτηση και ανταλλαγή απόψεων, αποφάσισε να προτείνει **την κα Παναγιώτα Μαυροειδή και τον κ. Βασίλειο Κωνσταντάκο**, για το Βραβείο της Πανελλήνιας Ένωσης Βιοεπιστημόνων «Φώτης Καφάτος». Η επιλογή της **κας Μαυροειδή και του κ. Κωνσταντάκου** έγινε με βάση τα ακόλουθα κριτήρια:

1. Την πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους της εργασίας στην Ελλάδα.
2. Τη συμβολή των προτεινόμενων στην ολοκλήρωση της εργασίας, και
3. Την επιστημονική σημασία / αντίκτυπο της εργασίας.

Επιπλέον, η επιτροπή πρότεινε την απονομή επαίνου στον **κ. Ηλία Γκίκα και στις κ.κ. Έντζι Πρίφτη, Ελένη Τσακίρη και Εργίνα Βούρκου**.

Ακολούθως, λύνεται η συνεδρίαση της Επιτροπής.

ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ	ΥΠΟΓΡΑΦΗ
Νεκτάριος ΤΑΒΕΡΝΑΡΑΚΗΣ	Ν. Ταβερναράκης

Ηλίας ΚΑΖΑΝΗΣ	
Απόστολος ΚΛΙΝΑΚΗΣ	
Παναγούλα ΚΟΛΛΙΑ	
Ιωσήφ ΠΑΠΑΜΑΤΘΑΙΑΚΗΣ	
Αριστείδης ΠΑΡΜΑΚΕΛΗΣ	
Θεοχάρης ΠΑΤΑΡΓΙΑΣ	
Χαράλαμπος ΣΑΒΒΑΚΗΣ	
Αναστασία ΧΑΤΖΗΔΗΜΗΤΡΙΟΥ	

1973—ΣΗΜΕΡΑ

ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΣΤΗΜΗ

ΔΕΙΤΕ ΤΙΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ www.pev.gr ΤΗΣ ΠΕΒ ΣΤΗΝ ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΑ

ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΑ ΕΝΩΣΗ ΒΙΟΕΠΙΣΤΗΜΟΝΩΝ

Έβρου 94-96, Αμπελόκηποι 11527 Αθήνα, τηλ/fax 2105224632, email: grammateia@gmail.com