

Πανελλήνια Ένωση Βιοεπιστημόνων

ΠΡΑΚΤΙΚΑ 12^{ου} ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟΥ ΣΥΝΕΔΡΙΟΥ
«ΒΙΟΕΠΙΣΤΗΜΟΝΕΣ & ΕΝΙΑΙΑ ΥΓΕΙΑ
ΑΝΘΡΩΠΟΣ – ΖΩΑ – ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ»
27/11/2020 – 29/11/2020, Αθήνα



ΕΝΙΑΙΑ ΥΓΕΙΑ

*Επιμέλεια
Πολύζος Αθανάσιος*

ISBN: 978-618-81159-7-2

Επιμέλεια έκδοσης
Πολύζος Αθανάσιος

Εκδότης
Πανελλήνια Ένωση Βιοεπιστημόνων

ISBN
978-618-81159-7-2

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 12ου Πανελληνίου Συνεδρίου Π.Ε.Β. «ΒΙΟΕΠΙΣΤΗΜΟΝΕΣ & ΕΝΙΑΙΑ ΥΓΕΙΑ : ΑΝΘΡΩΠΟΣ - ΖΩΑ -ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ», (σσ.χχ-χχ). Αθήνα: Πανελλήνια Ένωση Βιοεπιστημόνων ISBN: 978-618-81159-7-2

Σημείωση Επιμελητών και Π.Ε.Β.

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

Πίνακας περιεχομένων

Χαιρετισμός Πρόεδρων Οργανωτικής & Επιστημονικής Επιτροπής	7
Οργανωτική Επιτροπή	9
Επιστημονική Επιτροπή	10
Πρόγραμμα Συνεδρίου	12
ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΣΥΝΕΔΡΙΟΥ	20
Ι.ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ	21
ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ (Παρασκευή 27-11-2020)	22
Η Ενιαία Υγεία στα Σχολικά Εγχειρίδια Βιολογίας του Λυκείου	23
Η εκπαίδευση στον καιρό της πανδημίας COVID-19	25
Άσκηση και υγεία: απόψεις και στάσεις μαθητών Α΄ Γυμνασίου	28
Συγκριτική αποτύπωση εγκεκριμένων εκπαιδευτικών προτάσεων για το HIV/AIDS	30
Διδακτική παρέμβαση σε μαθητές Λυκείου για την αναγνώριση των εμβολιαστικών φόβων και των αιτίων τους	34
ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΥΓΕΙΑΣ & ΤΡΙΤΟΒΑΘΜΙΑΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ (Παρασκευή 27-11-2020)	37
Ανίχνευση βακτηρίων-μυκήτων, Adenovirus και SARS-Cov-2 στον αέρα εσωτερικών χώρων δομών υγείας	38
Πολυμορφισμοί του συστήματος RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosterone) και ο ρόλος τους στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης	42
Μελέτη της Χρόνιας Νόσου των νεφρών μέσω πρωτεομικής τοπολογικής και single cell ανάλυσης ιστολογικών δειγμάτων	46
Επαναστόχευση φαρμάκων στη Μη Αλκοολική Λιπώδη Νόσο του ήπατος βάσει ανάλυσης βιολογικών δικτύων	49
Πρωτεωμική στην ενιαία υγεία	53
Διπλή CRISPR/Cas9 –γονιδιακή επεξεργασία των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (HSCs) για τη θεραπεία της θαλασσαιμίας μέσω της επανενεργοποίησης της ενδογενούς γ-σφαιρίνης	56
CANVAS: Μελέτη της πεντανουκλεοτιδικής επανάληψης του γονιδίου <i>RFC1</i> στον Ελληνικό πληθυσμό.	59
Μελέτη του γονιδίου <i>C9ORF72</i> σε Έλληνες ασθενείς με νευροεκφυλιστικά νοσήματα	62
Μελέτη της έκφρασης γονιδίων επιδιόρθωσης του γενετικού υλικού σε ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα	64
Διερεύνηση της νευρογενετικής επίδρασης της μικρονευροτροφίνης BDNF-20 στο παρκινσονικό μοντέλο «weaver» και σε ανθρώπινα επαγόμενα πολυδύναμα κύτταρα (iPSCs) ασθενών.	66
Γενετικές Παραλλαγές του Υποδοχέα της Μελατονίνης και Συσχέτιση με Καρδιαγγειακά Νοσήματα	69
Ο ρυθμιστικός ρόλος των αιμοπεταλίων στη διαφοροποίηση προς την ολιγοδενδρογλοιακή μοίρα των ενήλικων Νευρικών Βλαστικών Κυττάρων της Υποεπενδυματικής Ζώνης	71

ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ Κ ΤΡΟΦΙΜΩΝ (Σάββατο 28-11-2020)	74
Διάδοση καινοτόμων λύσεων για τη διαχείριση της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά- DISARM	75
Εποχική μελέτη του μεταβολισμού των λιπιδίων στην εκτρεφόμενη τσιπούρα (<i>Sparus aurata</i>)	78
Επίδραση των απορρυπαντικών - απολυμαντικών ουσιών καθαριότητας στην ανάπτυξη ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στελεχών βακτηρίων σε οικιακούς σπόγγους	81
II. ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ (e-Poster)	85
Το στρες της μητρικής αποστέρησης αλλάζει την έκφραση του υποδοχέα της ντοπαμίνης DRD1 και του προνευρικού bHLH μεταγραφικού παράγοντα Neurogenin2 στην περιοχή του ιππόκαμπου.	86
Αξιολόγηση της κλιματικής σταθερότητας των μεταναστευτικών διαδρόμων των θαλάσσιων χελωνών στην περιοχή της Μεσογείου	89
Γνώσεις και στάσεις των μαθητών απέναντι στη χρήση των αντιβιοτικών	92 92
Ανιχνεύοντας το αλλεργιογόνο της Θεσσαλονίκης: ατμοσφαιρικό αποτύπωμα σπορίων μυκήτων οριζοντίως και καθ' ύψος στην πόλη	95
Διερεύνηση μηχανισμού ενδοκυττάρωσης κυτταρικών κυστιδίων απομονωμένων από καρκινικά κύτταρα μαστού	98
Ταυτοποίηση εντομοπαθογόνων μυκήτων από περιοχές περιαστικού πράσινου της πόλης της Πάτρας του Νομού Αχαΐας	101
Χαρακτηρισμός πιθανών προβιοτικών μικροοργανισμών και διερεύνηση της παθογένειας δυνητικά παθογόνων μικροοργανισμών στο εδώδιμο χερσαίο σαλιγκάρι <i>Cornu aspersum</i> (Müller, 1774)	104
Ακινητοποίηση του βακτηριακού στελέχους S3/K σε φυσικά υποστρώματα με στόχο την αναγωγή υψηλών συγκεντρώσεων Cr(VI)	107
Συμβίωση και δυσβίωση στον εντερικό βλεννογόνο των σαλιγκαριών-Αναβίωση με τη χορήγηση πιθανών προβιοτικών μικροοργανισμών.	110
Απομόνωση πιθανών προβιοτικών μικροοργανισμών από την εντερική μικροχλωρίδα του εδώδιμου χερσαίου σαλιγκαριού <i>Cornu aspersum maxima</i> και διερεύνηση της ανοσοτροποποιητικής τους δράσης.	113
Συγκριτική μελέτη της επίδρασης του Tobacco Heating System 2.2 και του συμβατικού τσιγάρου στη συμπεριφορά ενήλικων αρσενικών μυών.	116
Επίδραση κανναβιδιόλης στην έκφραση κυτταροκινών σε ηπατική βλάβη	119
Μελέτη της πορείας ωρίμανσης και της απόπτωσης των κοκκωδών κυττάρων ωοθυλακίων προερχόμενων από γυναίκες που υποβάλλονται σε τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής	122
Μελέτη της αλληλεπίδρασης του α7 νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης και της ακίδας (Spike) των SARS-CoV και SARS-CoV-2	125
Επίδραση των μικρορευμάτων σε κυτταρικές σειρές που εμπλέκονται στην επούλωση ελκών και καταγμάτων	129
Σύγκριση εμπορικά διαθέσιμων kit απομόνωσης βακτηριακού DNA από τρόφιμα με τη μέθοδο θερμικής λύσης	132

<i>In vitro</i> φωτοκαταλυτική αδρανοποίηση παθογόνων για την ανάπτυξη εναλλακτικών μεθόδων διαχείρισης Επικίνδυνων Ιατρικών Υγρών Αποβλήτων	136
Αξιοποίηση συνδυασμών γνωστών και νέων βιοδεικτών για τη διαφοροδιάγνωση νευροεκφυλιστικών διαταραχών	139
<i>In vitro</i> μελέτη της επίδρασης της νικοτίνης στα επίπεδα του μεμβρανικού ACE2	142
Έλεγχος της επίδρασης της επιμόλυνσης με Scrapie στην γονιδιακή έκφραση κυτταρικής σειράς νευροβλαστώματος (N2a) και μελέτη του ρόλου της μετα-μεταγραφικής τροποποίησης στοιχειοθεσίας του RNA μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης	145
Ανίχνευση γενετικών δεικτών, με χρήση φθορισμικού υβριδισμού (FISH), στις νεοπλασίες και αξιοποίησή τους στην κλινική πράξη	148
Τα αιμοπετάλια ως ρυθμιστές του πολλαπλασιασμού, της κυτταρικής μοίρας και του αγγειακού συστήματος στη νευροβλαστική φωλιά της Υποεπενδυματικής Ζώνης (YEZ) στον ενήλικο εγκέφαλο ποντικών.	152
Η επίδραση του μικροπεριβάλλοντος στις νευρογενετικές και ολιγοδενδρογενετικές ιδιότητες των ενήλικων νευρικών βλαστικών κυττάρων του εγκεφάλου	154
Βιοτεχνολογική προσέγγιση της καλλιέργειας του εντομοπαθογόνου μύκητα <i>Cordyceps militaris</i> : Παραγωγή μυκηλιακής βιομάζας και αρχική αξιολόγηση της βιοδραστικότητας της κορντισεπίνης	156
Ανάπτυξη μεθόδου για την ανίχνευση βακτηρίων από θαλασσινό νερό και εφαρμογή της σε LAB-ON-CHIP συσκευή.	159
Εκτίμηση Αντιμικροβιακής Δράσης Ενεργής, Εύκαμπτης Συσκευασίας για την Επέκταση του Χρόνου Ζωής Επιλεγμένων Εγχώριων Τυριών	162
Multi-locus-sequence-typing σε στελέχη <i>Listeria monocytogenes</i> στην Ελλάδα, την περίοδο 2010-2019	165
Λοιμώξεις από Ρικέτσιες της Ομάδας κηλιδωδών πυρετών στην Ελλάδα: τα αποτελέσματα έρευνας 15 ετών	168
Αναζήτηση αντιγονικών πρωτεϊνών έναντι της <i>Legionella pneumophila</i>	171
Μελέτη των προφίλ αντοχής περιβαλλοντικών στελεχών <i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>) από τη Λιβαδειά	174
Μελέτη των αντιγονικών πρωτεϊνών Com1 και UPF0422 του παθογόνου βακτηρίου <i>Coxiella burnetii</i> , για την ικανότητά τους να διαγιγνώσκουν την χρόνια φάση του πυρετού Q.	178
Μοριακή ταυτοποίηση προέλευσης γευμάτων αίματος για τον προσδιορισμό ξενιστών του <i>Culex pipiens</i> s.l. στην περιοχή του Μαραθώνα	181
Αποσιώπηση του γονιδίου <i>dicer-2</i> σε κύτταρα Λεπιδοπτέρων με χρήση των τεχνικών RNAi και CRISPR/Cas9	182
Ανάπτυξη ενός ολοκληρωμένο πρωτοκόλλου αλληλούχησης επόμενης γενιάς και χρήση του για τη συγκριτική μελέτη του προκαρυωτικού μικροβιώματος οινοποιητικών ποικιλιών αμπέλου	185
Μελέτη του προκαρυωτικού μικροβιώματος υγρού βελτιωτικού που παράγεται από ζύμωση για χρήση σε βιολογικές καλλιέργειες	189
Η υπερέκφραση της <i>Abracl</i> στην κυτταρική σειρά <i>Neuro2A</i> αυξάνει το ρυθμό πολλαπλασιασμού	192
<i>Salmonella</i> Oranienburg, ένας ιδιαίτερα λοιμογόνος ορότυπος-Ελληνικά δεδομένα	196

III.ΚΕΝΤΡΙΚΕΣ ΟΜΙΛΙΕΣ	198
<i>Η Ενιαία Υγεία και η εφαρμογή των αρχών της. Παρελθόν, παρόν και μέλλον</i>	199
<i>Διάδοση της ιατρικής πληροφορίας- ένα σοβαρό θέμα δημόσιας υγείας</i>	199
<i>Ανάδυση νέων παθογόνων και Ενιαία Υγεία-Κίνδυνοι, προκλήσεις και διδάγματα από την πανδημία COVID-19</i>	200
<i>Καταγραφή Επαγγελματικής Απασχόλησης Βιοεπιστημόνων στην Υγεία</i>	202
<i>Emerging zoonoses from a One Health perspective- COVID19 and beyond</i>	202
<i>COVID-19 – diagnostics and vaccine development</i>	204
IV.ΣΤΡΟΓΓΥΛΕΣ ΤΡΑΠΕΖΕΣ	206
ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ 1 Επίκαιρα θέματα δημόσιας υγείας σχετιζόμενα με νερό και τρόφιμα στην τουριστική βιομηχανία	207
<i>Πισίνες και τουρισμός</i>	207
<i>Στοιχεία ΕΟΔΥ για τροφικές δηλητηριάσεις σε τουρίστες</i>	209
<i>Πολύ-κριτηριακή ανάλυση της επίδρασης πολλαπλών παραγόντων στην παρουσία της Legionella σε συστήματα νερού ξενοδοχειακών μονάδων της Κρήτης</i>	209
<i>Η σημασία του Ιολογικού Εγγραμματισμού: RNA ιοί: Συνεχείς επιδημιολογικές προκλήσεις κατά τον 20^ο και 21^ο αιώνα</i>	210
<i>Η σημασία του ανοσολογικού εγγραμματισμού στην καθημερινή ζωή - Τσιτσιλώνη</i>	210
<i>Βιοτεχνολογία και Κλιματική Αλλαγή: Υπάρχει ελπίδα?</i>	210
ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ 3 Omics-Ομική και ο ρόλος τους στην υγεία	212
<i>Ολιστικές προσεγγίσεις για την καταπολέμηση του άγχους και του στρες</i>	212
<i>Σηματοδοτικά Μονοπάτια και Γενετικά Προγράμματα που Ελέγχουν το Πεπρωμένο των Νευρικών Βλαστικών Κυττάρων</i>	212
<i>Η ολιστική μεταβολομική ανάλυση στη βιολογία της μετάγγισης αίματος</i>	213
ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ 4 Αγωγή Υγείας, Σεξουαλική Αγωγή και Βιολογία	214
<i>Και όμως γίνεται!!! Η εμπειρία από την εφαρμογή της σεξουαλικής αγωγής στην Γ Γυμνασίου στο Πειραματικό Γυμνάσιο Ρεθύμνης του Πανεπιστημίου Κρήτης</i>	214
<i>Σεξουαλική αγωγή στο σχολείο: από ποιον, για ποιον και γιατί; Μια κριτική προσέγγιση</i>	215
ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ 5 Εθνικό Δίκτυο Ιατρικής Ακριβείας στην Ογκολογία	216
<i>Το θεσμικό πλαίσιο και τις προοπτικές του Δικτύου</i>	216
<i>Δίκτυο Ιατρικής Ακριβείας στην ογκολογία σκοπός δημιουργίας προοπτικές</i>	216
<i>Μεθοδολογικές εξελίξεις και Ιατρική Ακριβείας</i>	216
ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ 6 Το μέλλον των Προστατευόμενων Περιοχών στην Ελλάδα	217
<i>Το μέλλον των προστατευόμενων περιοχών</i>	217
<i>Ενσωματώνοντας τον ρόλο των Προστατευόμενων Περιοχών στον αναπτυξιακό σχεδιασμό για την επίτευξη των στόχων βιώσιμης ανάπτυξης</i>	218
ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ 7 Διεπιστημονικές ερευνητικές προσεγγίσεις στοχεύοντας στην ενιαία υγεία	219
<i>Από τη ζωική συμπεριφορά στην Ψυχική Υγεία</i>	219
<i>Η Μοριακή Βιολογία στη διάγνωση και την πρόγνωση</i>	219

<i>Η νανοτεχνολογία στην υπηρεσία της διαγνωστικής στην Υγεία</i>	220
<i>Η ποιότητα των προκλινικών μελετών στη διάρκεια της πανδημίας</i>	221
ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ 8 Ανουκτή συζήτηση σε θέματα Ενιαίας Υγείας	223
ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ 9 Το μέλλον της Βιολογίας και των Βιολογικών Τμημάτων	224
ΑΠΟΝΟΜΗ ΒΡΑΒΕΙΟΥ «ΦΩΤΗΣ ΚΑΦΑΤΟΣ» ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΟΥ 12ου ΣΥΝΕΔΡΙΟΥ ΤΗΣ ΠΕΒ	226
ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΚΡΙΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟΨΗΦΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟ ΒΡΑΒΕΙΟ ΤΗΣ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΑΣ ΕΝΩΣΗΣ ΒΙΟΕΠΙΣΤΗΜΟΝΩΝ «ΦΩΤΗΣ ΚΑΦΑΤΟΣ»	227

Χαιρετισμός Προέδρων Οργανωτικής & Επιστημονικής Επιτροπής

Με ιδιαίτερη χαρά σας καλωσορίζουμε στο 12ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Πανελληνίας Ένωσης Βιοεπιστημόνων, «**ΒΙΟΕΠΙΣΤΗΜΟΝΕΣ ΚΑΙ ΕΝΙΑΙΑ ΥΓΕΙΑ - ΑΝΘΡΩΠΟΣ – ΖΩΑ - ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ**», 27 - 29 Νοεμβρίου 2020. Το Συνέδριο λόγω της πανδημίας της COVID 19 πραγματοποιείται αποκλειστικά ηλεκτρονικά.

Ενιαία Υγεία (One Health approach), γιατί είναι τόσο σημαντική;

Ο όρος «Ενιαία Υγεία» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 2003 - 2004 από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας και συσχετίστηκε με την αναδυόμενη τότε επιδημία SARS και στη συνέχεια με την γρίπη των πτηνών (H5N1). Έκτοτε γίνεται όλο και περισσότερο σαφές ότι πολλές αναδυόμενες νόσοι και κυρίως οι περισσότερες ανθρωποζωνόσοι, σχετίζονται με ανθρώπινες δραστηριότητες, όπως η βίαιη παρέμβαση στα οικοσυστήματα, οι χρήσεις γης, η εντατική γεωργία, η αστυφιλία, το διεθνές εμπόριο και ο τουρισμός.

Επομένως, για την πρόληψη και την αντιμετώπιση των ασθενειών δεν επαρκεί πλέον η παραδοσιακή ιατροκεντρική παρέμβαση. Απαιτείται μια διεπιστημονική προσέγγιση η οποία, ξεπερνώντας τα στεγανά μεταξύ της υγείας των ανθρώπων, των ζώων και της περιβαλλοντικής προστασίας, θα μελετήσει και θα κατανοήσει τις σύνθετες διαδρομές και αλληλεπιδράσεις που συνεπάγονται ασθένειες, θα προχωρήσει σε σχεδιασμούς εκτίμησης κινδύνων και θα αναπτύξει δράσεις προστασίας για τον έλεγχό τους. Η επιδημία COVID 19 φαίνεται να αποτελεί ένα αρχετυπικό παράδειγμα μείζονος συμβάντος Δημόσιας Υγείας, του οποίου η πρόληψη, η μελέτη και η αντιμετώπιση απαιτεί δράσεις Ενιαίας Υγείας. Απαιτεί την ιατρική παρέμβαση σε όλες τις εκφράσεις της, όμως απαιτεί και τον έλεγχο των νερών, των τροφίμων και των λυμάτων, απαιτεί και απαντήσεις για την έναρξη αυτής καθ'εαυτής της πανδημίας που πιθανόν κρύβεται στα μέχρι πρότινος απρόσιτα δάση της κεντρικής Ασίας, τα οποία λεηλατήθηκαν για τις αγορές τροφίμων.

Επίσης, για την αντιμετώπιση της COVID 19 αλλά και πολλών άλλων νόσων σήμερα, η προσέγγιση της **Ενιαίας Υγείας** προσβλέπει στον σχεδιασμό και την εφαρμογή Πολιτικών Υγείας, νομοθετικών ρυθμίσεων και έρευνας για τις οποίες απαιτείται η συνεργασία πολλών κοινωνικών τομέων ώστε να επιτευχθεί το βέλτιστο αποτέλεσμα για τη Δημόσια Υγεία. Βασική διαδικασία παραμένει η ευαισθητοποίηση του κοινού, όπου η εκπαίδευση των νέων παίζει κομβικό ρόλο.

Οι Βιοεπιστήμονες, έχοντας ενεργό επιστημονικό ρόλο, στελεχώνουν κρίσιμους τομείς της κοινωνίας, όπως η υγεία, τα τρόφιμα και η διατροφή, το περιβάλλον, η εκπαίδευση, η έρευνα και εν τέλει η μαχόμενη καθημερινότητα. Το παρόν Συνέδριο στόχο έχει να συμβάλει στην αντιμετώπιση της πανδημίας και να αναδείξει τον ρόλο του Βιοεπιστήμονα στην οινωνία των πολιτών. Διοργανώθηκε μέσα από μια πρωτοπόρα διαδικασία από τα μέλη των Θεματικών Επιτροπών της Πανελληνίας Ένωσης

Βιοεπιστημόνων (ΠΕΒ), οι οποίες και στελέχωσαν την Οργανωτική Επιτροπή και διαρθρώθηκε με τέτοιο τρόπο ώστε να καλύψει τα ειδικά ενδιαφέροντα των συμμετεχόντων αλλά ταυτόχρονα να θεμελιώσει ουσιαστικές γέφυρες επικοινωνίας και συνεργασίας, που άλλες μεν είναι αυτονόητες αλλά και άλλες απρόσμενες.

Προς αυτή την κατεύθυνση θα βοηθήσουν διακεκριμένες/οι ομιλήτριες/ές από την Ελλάδα και το εξωτερικό, που προέρχονται από κορυφαία εκπαιδευτικά και ερευνητικά ιδρύματα και δομές Υγείας. Η ποικιλία της θεματολογίας των συνεδριάσεων ελπίζουμε, έστω και υπό τις παρούσες δυσμενείς συνθήκες, να προκαλέσει γόνιμες συζητήσεις και να αποτελέσει τροφή για προβληματισμούς και νέες προσεγγίσεις. Η συνεδρία της ανοικτής συζήτησης μεταξύ βιολόγων με εξέχουσα θέση στην επιστημονική κοινότητα ελπίζουμε να αποτελέσει την κορύφωση αυτής της διαδικασίας και να απαντήσει στις ερωτήσεις σας. Επίσης είναι τιμητική για το συνέδριο η Συνεδρία με τους Προέδρους των 7 Βιολογικών Τμημάτων, οι οποίοι θα καταθέσουν τους προβληματισμούς τους για το μέλλον της βιολογίας.

Για τη διοργάνωση αυτή θερμές ευχαριστίες οφείλουμε:

- ✓ στην Γενική Γραμματεία Ερευνας και Τεχνολογίας και στο Υπουργείο Παιδείας και Θρησκευμάτων, για την ανάληψη της αιγίδας του Συνεδρίου
- ✓ στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ για την φιλοξενία, ασχέτως που οι έκτακτες περιστάσεις λόγω covid-19 μας στέρησαν τη χαρά της χρήσης των χώρων του
- ✓ στους συναδέλφους που διοργάνωσαν τα ενδιαφέροντα workshops
- ✓ στους χορηγούς του συνεδρίου, τον χρυσό χορηγό εταιρεία ROCHE, τους αργυρούς χορηγούς ΜΑΛΒΑ, ΒΙΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΑΡΝΑΟΥΤΗΣ, ΜΕΝΑΡΙΝΙ, και τους υποστηρικτές μας ΜΕΤΡΟΛΑΒ, AIRHOTEL και στη εταιρεία ΔΑΙΔΑΛΟΣ που κάλυψε τα έξοδα εγγραφής βραβευθέντων φοιτητών που ξεχώρισαν για τις παρουσιάσεις τους σύμφωνα με την κρίση της ΕΕ.

Με τις σκέψεις αυτές σας ευχόμαστε ένα συνέδριο που θα ανταποκριθεί στις προσδοκίες σας. Με την λήξη του Συνεδρίου, σας προτρέπουμε να συμπληρώσετε το έντυπο αξιολόγησης όπου θα καταθέσετε τις εντυπώσεις σας, μια διαδικασία αξιολόγησης εξαιρετικά σημαντική για την ΠΕΒ.

Για την Οργανωτική Επιτροπή



Αθηνά Μαυρίδου

Για την Επιστημονική Επιτροπή



Ζαχαρίας Σκούρας

Για το Δ.Σ της Π.Ε.Β.



Απόστολος Βανταράκης

Οργανωτική Επιτροπή

Πρόεδρος

Μαυρίδου Αθηνά, Ομότιμη Καθηγήτρια, μέλος Δ.Σ. Π.Ε.Β.

Μέλη

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

Βανταράκης Απόστολος, Καθηγητής, Παν/μιο Πατρών, Πρόεδρος Δ.Σ. Π.Ε.Β.

Βέρροιος Γεώργιος, Εκπαιδευτικός Δ.Ε., μέλος Δ.Σ. Π.Ε.Β.

Γιώτη Αικατερίνη, Εκπαιδευτικός ΔΕ

Διακίδη – Κώστα Αικατερίνη, Εκπαιδευτικός ΔΕ

Δροσοπούλου Γαρυφαλλιά, Ερευνήτρια Β', ΙΒΕ, ΕΚΕΦΕ “Δημόκριτος”

Καζάνης Ηλίας, Λέκτορας, τμήμα Βιολογίας, Παν/μιο Πατρών, μέλος Δ.Σ. Π.Ε.Β.

Κατωπόδης Γεώργιος, Εκπαιδευτικός Δ.Ε., Γενικός Γραμματέας Δ.Σ. Π.Ε.Β.

Μανδηλαρά Γεωργία, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας, ΣΔΥ,
Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Μπάρκα Δήμητρα, Ιδιωτική υπάλληλος

Νίνου Ελπινίκη, Υποψήφια διδάκτωρ Ι.Ι.Β.Ε.Α.Α.

Πολύζος Αθανάσιος, Εκπαιδευτικός Δ.Ε.

Ρίζου Ελένη, Τμήμα Γενετικής ΑΟΝΑ “Ο Άγιος Σάββας”, μέλος Δ.Σ. Π.Ε.Β.

Ταλαμάγκας Ασημάκης, Εκπαιδευτικός Δ.Ε., Ταμίας Δ.Σ. Π.Ε.Β.

Τσοχαντάρη Μαρία, Υπεύθυνη Κεντρικού Βιοχημικού Εργαστηρίου 1ης Υγειονομικής Περιφέρειας.

Ψαρίδη Λουκία, Μονάδα Μοριακής Διαγνωστικής, Παθολογοανατομικό Τμήμα, Κοργιαλένιο
Μπενάκειο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών

ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΑ ΣΥΝΕΔΡΙΟΥ

<https://12pev.pev.gr/>

Υπεύθυνος Ιστοσελίδας

Καρτσιώτης Θεόδωρος, Εκπαιδευτικός Δευτεροβάθμιας Εκπαίδευσης

ΓΡΑΦΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΟΥ

Παπά Ιωάννα, Αρχιτέκτων

Επιστημονική Επιτροπή

Πρόεδρος

Σκούρας Ζαχαρίας, Καθηγητής Γενετικής, Τμήματος Βιολογίας Α.Π.Θ.

Μέλη

Αρσενάκης Μηνάς, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Βατόπουλος Αλκιβιάδης, Καθηγητής, Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Βώκου Δέσποινα, Πρόεδρος Τμήματος Βιολογίας Α.Π.Θ.

Γιάγκου Μηνάς, Καθηγητής Ανοσοβιολογίας-Μοριακής Βιολογίας, Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Α.Π.Θ.

Γρηγορίου Μαριρένα, Καθηγήτρια Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής, Δ.Π.Θ.

Δαρδαβέσης Θεόδωρος, Καθηγητής, Εργαστήριο Υγιεινής, Κοινωνικής-Προληπτικής Ιατρικής και Ιατρικής Στατιστικής, Κοσμήτορας της Σχολής Επιστημών Υγείας

Δερμιτζάκης Μανώλης, Καθηγητής Γενετικής στο Πανεπιστήμιο της Γενεύης Πρόεδρος του Εθνικού Συμβουλίου Έρευνας, Τεχνολογίας και Καινοτομίας (ΕΣΕΤΕΚ)

Ζερεφός Χρήστος, Καθηγητής, Ακαδημαϊκός Επόπτης του Κέντρου Έρευνας Φυσικής της Ατμοσφαιρας και Κλιματολογίας της Ακαδημίας Αθηνών

Ζούρος Ελευθέριος, Ομότιμος καθηγητής Εξελικτικής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, Αντεπιστέλλον Μέλος της Ακαδημίας Αθηνών, Επίτιμο μέλος της Π.Ε.Β.

Θάνος Δημήτριος, Βιολόγος, Πρόεδρος Επιστημονικού Συμβουλίου ΠΒΕΑΑ, Επίτιμο μέλος της Π.Ε.Β.

Κατσώρης Παναγιώτης, Πρόεδρος Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Πατρών

Κεσανόπουλος Κωνσταντίνος, Βιολόγος PhD, Τμήμα Δημόσιας και Κοινωνικής Υγείας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Κλέτσας Δημήτρης, Διευθυντής Ινστιτούτου Βιολογικών Ερευνών του Ε.Κ. Δημόκριτος

Κοντογιάννης Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας Κυττάρου, Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας Α.Π.Θ.

Κυρπίδης Νικόλαος, Καθηγητής, Joint Genome Institute, Berkeley, CA, USA

Λογοθέτης Νίκος, Διευθυντής του τμήματος «Φυσιολογίας των Γνωσιακών Διαδικασιών» στο Ινστιτούτο Βιολογικής Κυβερνητικής Max Planck, Τύμπιγκεν, Γερμανίας

Μαμούρης Ζήσης, Βιολόγος, Πρύτανης Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος, Πρόεδρος Τμήματος, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μαυρικάκη Ευαγγελία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Παιδαγωγικό Τμήμα Δημοτικής Εκπαίδευσης,
Ε.Κ.Π.Α.

Μιχαηλίδης Θεολόγος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών,
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Μοσχονάς Νίκος, Καθηγητής Βιολογίας-Ιατρικής Μοριακής Γενετικής, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου
Πατρών,

Μουστάκας Αριστείδης, Καθηγητής, Department of Medical Biochemistry & Microbiology, Uppsala
University, Sweden

Παπαϊωάννου Νικόλαος, Καθηγητής Κτηνιατρικής, Πρύτανης ΑΠΘ

Παπαματθαϊάκης Ιωσήφ, Ομότιμος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης – Μέλος
του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του ΙΤΕ

Παπασιδέρη Ισιδώρα, Πρόεδρος Τμήματος Βιολογίας Ε.Κ.Π.Α.

Παυλίδης Μιχαήλ, Πρόεδρος Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

Παφίλης Παναγιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής Ζωικής Ποικιλότητας, Τμήμα Βιολογίας ΕΚΠΑ,

Σαμαρά Μαρία, Επίκουρη Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Λάρισας.

Στυλιανοπούλου Φωτεινή, Καθηγήτρια Τμήματος Νοσηλευτικής Ε.Κ.Π.Α., Πρόεδρος του Ελληνικού
Ινστιτούτου Παστέρ

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

Τσιτσιλώνη Ουρανία, Καθηγήτρια Ανοσολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

Χλίγλια Αικατερίνη, Πρόεδρος Τμήματος Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής, Δημοκρίτειου
Πανεπιστημίου Θράκης

Ψαρουλάκη Άννα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Πρόγραμμα Συνεδρίου

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ 27-11-2020

ΩΡΕΣ	Live Streaming	ΩΡΕΣ	ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΑΜΦΙΘΕΑΤΡΟ (*)
09:00-9:20	ΧΑΙΡΕΤΙΣΜΟΙ		
09:20-09:50	<p>ΟΜΙΛΙΑ</p> <p>"Η Ενιαία Υγεία και η εφαρμογή των αρχών της. Παρελθόν, παρόν και μέλλον"</p> <p>Δρ Λινού Μαρία Συντονίστρια Γραφείου Ενιαίας Υγείας, Ε.Ι. Παστέρ</p> <p>Συντονίστρια Μαυρίδου Αθηνά Ομότιμη Καθηγήτρια ΤΕΙ Αθήνας, Πρόεδρος Οργανωτικής Επιτροπής μέλος Δ.Σ. Π.Ε.Β.</p>		
09:50-10:00	Διάλειμμα 10 λεπτών		
10:00-10:30	<p>ΟΜΙΛΙΑ</p> <p>"Διάδοση της ιατρικής πληροφορίας- ένα σοβαρό θέμα δημόσιας υγείας"</p> <p>Σίμου Έφη Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Πολιτικών της Δημόσιας Υγείας, Σχολή Δημόσιας Υγείας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής</p> <p>Συντονίστρια Μαυρίδου Αθηνά Ομότιμη Καθηγήτρια ΤΕΙ Αθήνας, Πρόεδρος Οργανωτικής Επιτροπής μέλος Δ.Σ. Π.Ε.Β.</p>		
10:30-11:30	<p>ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ 1</p> <p>Επίκαιρα θέματα δημόσιας υγείας σχετιζόμενα με νερό και τρόφιμα στην τουριστική βιομηχανία</p> <p>"Πισίνες και τουρισμός" Μανδηλαρά Γεωργία Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας, Σχολή Δημόσιας Υγείας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής</p> <p>"Στοιχεία ΕΟΔΥ για τροφικές δηλητηριάσεις σε τουρίστες" Μέλλου Κασσιανή Υπεύθυνη Γραφείου Τροφιμογενών και Υδατογενών Νοσημάτων. ΕΟΔΥ- Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας</p> <p>"Πολύ-κριτηριακή ανάλυση της επίδρασης πολλαπλών παραγόντων στην παρουσία της Legionella σε συστήματα νερού ξενοδοχειακών μονάδων της Κρήτης" Χοχλάκης Δημοσθένης Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Μικροβιακής Παθολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης</p> <p>Συντονίστρια Μαυρίδου Αθηνά Ομότιμη Καθηγήτρια ΤΕΙ Αθήνας, Πρόεδρος Οργανωτικής Επιτροπής μέλος Δ.Σ. Π.Ε.Β.</p>		

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ 27-11-2020 (συνέχεια)

11:30-11:45	Διάλειμμα 15 λεπτών		Workshop 1
11:30-11:45	ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ 2 Σημασία του βιολογικού εγγραμματος στην καθημερινή ζωή		"Πως να συγγράψετε επιστημονικές δημοσιεύσεις και προτάσεις για χρηματοδότηση"
11:45-13:15	Μπελούκας Απόστολος Επίκουρος καθηγητής, Διευθυντής Εργαστηρίου Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής	11:30-13:00	Δρ. Κούστα Σταυρούλα Chief Editor στο Nature Human Behaviour
11:45-13:15	Τσιτσιλώνη Ουρανία Καθηγήτρια Ανοσολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ		Δρ. Αλισσάφη Θέμις Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ)
11:45-13:15	Χατζηνικολάου Δημήτρης Αναπληρωτής Καθηγητής Μικροβιακής Βιοτεχνολογίας Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ		
11:45-13:15	Συντονιστής Σκούρας Ζαχαρίας Καθηγητής Γενετικής, Τμήμα Βιολογίας Α.Π.Θ.		
13:15-14:10	ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ		
13:15-14:10	Συντονιστής Βέρροιος Γιώργος Εκπαιδευτικός ΔΕ, Υπεύθυνος Επιτροπής Παιδείας ΠΕΒ		
14:10-15:30	Διάλειμμα 90 λεπτών		Webinar ROCHE "Molecular testing along the cancer patient journey"
14:10-15:30		14:00-14:45	Carlo G.M. Messina MD, M.Phil. Senior Director - Oncology - Medical Affairs Roche Sequencing Solutions
14:10-15:30			Συντονίστρια Τσόλη Έφη PhD, Women's Health MSL, Medical & Scientific Affairs, Roche Diagnostics (Hellas) S.A
15:30-16:50	ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ 3 Optics-Ομική και ο ρόλος τους στην υγεία		Workshop 2
15:30-16:50	"Γονιδιωματική και Ογκολογία (εφαρμογές στην πρόγνωση, διάγνωση και επιλογή θεραπευτικής αγωγής)"		"Εφαρμογή του 17025:2017 με έμφαση στον υπολογισμό της αβεβαιότητας σε δείγματα νερού και τροφίμων "
15:30-16:50	Τράγκα Θεώνη Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων	16:00-17:30	

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ 27-11-2020 (συνέχεια)

ΩΡΕΣ	Live Streaming	ΩΡΕΣ	ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΑΜΦΙΘΕΑΤΡΟ(*)
	<p>"Σηματοδοτικά Μονοπάτια και Γενετικά Προγράμματα που Ελέγχουν το Πεπρωμένο των Νευρικών Βλαστικών Κυττάρων" Μιχαηλίδης Θεολόγος Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Γενετικής, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων</p> <p>"Η ολιστική μεταβολομική ανάλυση στη βιολογία της μετάγγισης αίματος" Αντωνέλου Μαριάννα Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας Ζωικού Κυττάρου Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ</p> <p>Συντονίστρια Κόλλια Παναγούλα Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ</p>		<p>Στυλιανουδάκη Μαρία Χημικός Μηχανικός της εταιρείας Qplan A.E</p> <p>Θεοφίλου Αντωνία Τεχνολόγο Ιατρικών εργαστηρίων, MSc, Υπεύθυνη Ποιότητας του Κεντρικού Εργαστηρίου Δημόσιας Υγείας (ΚΕΔΥ - ΕΟΔΥ).</p>
16:50-17:00	Διάλειμμα 10 λεπτών		
17:00-19:15	<p>ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΥΓΕΙΑΣ & ΤΡΙΤΟΒΑΘΜΙΑΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ "Διεπιστημονικές ερευνητικές προσεγγίσεις στοχεύοντας στην ενιαία υγεία"</p> <p>Συντονίστριες Δεναξιά Μυρτώ Υπεύθυνη ερευνητικής ομάδας, Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών "Αλέξανδρος Φλέμιγκ"</p> <p>Κωστούρου Βάσω Υπεύθυνη ερευνητικής ομάδας, Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών "Αλέξανδρος Φλέμιγκ"</p>		
19:15-19:30	Διάλειμμα 15 λεπτών		
19:30-19:45	<p>ΚΕΝΤΡΙΚΟΣ ΧΑΙΡΕΤΙΣΜΟΣ κ. Κοντοζαμάνης Βασίλειος Υφυπουργός Υπουργείου Υγείας</p> <p>Συντονιστής: Βανταράκης Απόστολος Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πρόεδρος ΠΕΒ</p>		
19:45-20:15	<p>ΚΕΝΤΡΙΚΗ ΟΜΙΛΙΑ "ΕΠΙΣΤΗΜΗ - στη Συζυγία των μυστηρίων, στη συζυγία των απαντήσεων και ένα ποίημα" Μαρμαρινός Μιχαήλ Βιολόγος, Αναπληρωτής Καθηγητής Σχολής Καλών Τεχνών ΑΠΘ, Ηθοποιός, Σκηνοθέτης</p> <p>Συντονίστρια Μαυρίδου Αθηνά Ομότιμη Καθηγήτρια ΤΕΙ Αθήνας, Πρόεδρος Οργανωτικής Επιτροπής, μέλος Δ.Σ. Π.Ε.Β.</p>		
20:15	<p>Stand Up Comedy Anthropocene: The Zoonemics Strike Back! Γιατζόγλου Στέφανος Βιολόγος, Εκπαιδευτικός, Science Comedian</p>		

ΣΑΒΒΑΤΟ 28-11-2020

ΩΡΕΣ	Live Streaming	ΩΡΕΣ	ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΑΜΦΙΘΕΑΤΡΟ(*)
09:00-20:00	Ανάρτηση e-poster		
09:30-10:00	<p>ΟΜΙΛΙΑ</p> <p>"Ανάδυση νέων παθογόνων και Ενιαία Υγεία-Κίνδυνοι, προκλήσεις και διδάγματα από την πανδημία COVID-19"</p> <p>Ψαρουλάκη Άννα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης</p> <p>Συντονίστρια Μαυρίδου Αθηνά Ομότιμη Καθηγήτρια ΤΕΙ Αθήνας, Πρόεδρος Οργανωτικής Επιτροπής, μέλος Δ.Σ. Π.Ε.Β.</p>		
10:00-10:10	Διάλειμμα 10 λεπτών		
10:10-10:50	<p>ΟΜΙΛΙΑ (Στα αγγλικά)</p> <p>"Rights and obligation for biologists in today's society"</p> <p>Harm Jaap Smit Πρόεδρος European Countries Biologists Association</p> <p>Συντονιστής Βανταράκης Απόστολος Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πρόεδρος ΠΕΒ</p>		<p>Workshop 3</p> <p>"Πρακτικές εφαρμογές NGS στην ογκολογία"</p> <p>Μαχαίρα Λουίζα Ph.D υπεύθυνη της κλινικής ανάλυσης με NGS συμπαγών όγκων (καρκινωμάτων, σαρκωμάτων) και αιματολογικών κακοηθειών, του Εργαστηρίου Γενετικής του Ογκολογικού Νοσοκομείου "ο Άγιος Σάββας"</p> <p>Κοντελής Βασίλης Βιολόγος, MSc στη Γενετική</p>
10:50-11:00	Διάλειμμα 10 λεπτών	10:00-11:30	
11:00-12:20	<p>ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ 4</p> <p>Αγωγή Υγείας, Σεξουαλική Αγωγή και Βιολογία</p> <p>"Και όμως γίνεται!!! Η εμπειρία από την εφαρμογή της σεξουαλικής αγωγής στην Γ Γυμνασίου στο Πειραματικό Γυμνάσιο Ρεθύμνης του Πανεπιστημίου Κρήτης".</p> <p>Αναγνωστάκης Μανώλης Εκπαιδευτικός ΔΕ Βιολόγος Πειραματικό Γυμνάσιο Ρεθύμνης Πανεπιστημίου Κρήτης</p> <p>Γερούκη Μαργαρίτα Εκπαιδευτικός ΔΕ πρώην Σχολική Σύμβουλος, Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Πανεπιστήμιο της Jyväskylä</p> <p>"Σεξουαλική αγωγή στο σχολείο: από ποιον, για ποιον και γιατί; Μια κριτική προσέγγιση"</p> <p>Πελτέκης Απόστολος Κλινικός Ψυχολόγος, MSc</p> <p>Συντονίστρια Μαυρικάκη Ευαγγελία Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας και Αγωγής Υγείας, Παιδαγωγικό Τμήμα Δημοτικής Εκπαίδευσης ΕΚΠΑ</p>		
12:20-12:30	Διάλειμμα 10 λεπτών		

ΣΑΒΒΑΤΟ 28-11-2020 (συνέχεια)

ΩΡΕΣ	Live Streaming	ΩΡΕΣ	ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΑΜΦΙΘΕΑΤΡΟ(*)
12:30-14:15	<p>ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ 5 Εθνικό Δίκτυο Ιατρικής Ακριβείας στην Ογκολογία</p> <p>"Το θεσμικό πλαίσιο και τις προοπτικές του Δικτύου" κ. Αθανάσιος Κυριαζής Γενικός Γραμματέας Έρευνας και Τεχνολογίας</p> <p>"Δίκτυο Ιατρικής Ακριβείας στην ογκολογία σκοπός δημιουργίας προοπτικές" Θάνος Δημήτρης Ακαδημαϊκός, Πρόεδρος του Επιστημονικού Συμβουλίου και Διευθυντής του Κέντρου Βασικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών</p> <p>«Μεθοδολογικές εξελίξεις και Ιατρική Ακριβείας» Χατζηδημητρίου Αναστασία Διδάκτωρ Ανοσογενετικής, Ερευνήτρια INEB/ΕΚΕΤΑ</p> <p>Συντονιστής Ρίζου Ελένη Τμήμα Γενετικής ΑΟΝΑ "Ο Άγιος Σάββας", μέλος Δ.Σ. Π.Ε.Β.</p>	13:30-15:00	<p>Workshop 4</p> <p>"Ποσοτική Εκτίμηση επικινδυνότητας σε μικρόβια (QMRA)"</p> <p>Βανταράκης Απόστολος Καθηγητής Υγιεινής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Πατρών</p> <p>Δρ. Χατζηπροδρομίδου Ιωάννα</p>
14:15-14:30	<p>ΟΜΙΛΙΑ</p> <p>"Καταγραφή Επαγγελματικής Απασχόλησης Βιοεπιστημόνων στην Υγεία"</p> <p>Κεσανόπουλος Κωνσταντίνος MSc, PhD, Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό, Τμήμα Δημόσιας & Κοινωνικής Υγείας, Σχολή Δημόσιας Υγείας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής</p> <p>Συντονιστής Ρίζου Ελένη Τμήμα Γενετικής ΑΟΝΑ "Ο Άγιος Σάββας", μέλος Δ.Σ. Π.Ε.Β.</p>		
14:30-16:00	<p>Διάλεμμα 90 λεπτών</p>	15:00-15:30	<p>WEBINAR ΒΙΟΔΥΝΑΜΙΚΗΣ "Sequence with confidence with highly accurate long reads"</p> <p>Nicolas Piganeau Ph.D., Field Applications Specialist, PacBio</p> <p>Συντονίστρια Μπενζονάνα Λώρα PhD Business Development Manager Βιοδυναμική ΑΕ</p>
16:00-16:30	<p>ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ Κ ΤΡΟΦΙΜΩΝ</p> <p>Συντονιστής Ψαρουλάκη Άννα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης</p>	16:00-17:30	<p>Workshop 5</p> <p>"Χρήση κυτταρομετρίας ροής στην ταξινόμηση αιματολογικών νεοπλασιών"</p>

ΣΑΒΒΑΤΟ 28-11-2020 (συνέχεια)

16:30-17:30	<p align="center">ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ 6 Το μέλλον των Προστατευόμενων Περιοχών στην Ελλάδα</p> <p align="center">Κώστας Τριάντης Αν. Καθηγητής ΕΚΠΑ, Διευθύνων Σύμβουλος ΟΦΥΠΕΚΑ</p> <p align="center">Παναγιώτης Δημόπουλος Καθηγητής Πανεπιστημίου Πατρών, Πρόεδρος Επιτροπής Natura</p> <p align="center">Ιφιγένεια Κάγκαλου Καθηγήτρια Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου, Πρόεδρος Φορέα Διαχείρισης Κάρλας</p> <p align="center"><u>Συντονιστής</u> Παφίλης Παναγιώτης Αναπληρωτής Καθηγητής Ζωικής Ποικιλότητας, Τμήμα Βιολογίας ΕΚΠΑ</p>	<p align="center">Βουτσάς Ιωάννης Ph.D, Ανοσοβιολόγος, υπεύθυνος κλινικής ανάλυσης του Εργαστηρίου Ανοσολογίας του Ογκολογικού Νοσοκομείου "ο Άγιος Σάββας"</p>
17:30-17:40	<p align="center">Διάλειμμα 10 λεπτών</p>	
17:40-18:30	<p align="center">ΟΜΙΛΙΑ "Από τον πάγκο στην κλινική: σύνδεση της βασικής έρευνας με πρακτικές εφαρμογές στην υγεία"</p> <p align="center">Δερμιτζάκης Εμμανουήλ Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Γενεύης, Department of Genetic Medicine and Development Director, Health 2030 Genome Center</p> <p align="center"><u>Συντονίστρια</u> Μαριρένα Γρηγορίου Αναπλ. Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας, τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Δημοκρίτειο Παν/μιο Θράκης</p>	
18:30-20:00	<p align="center">ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ 7 Διεπιστημονικές ερευνητικές προσεγγίσεις στοχεύοντας στην ενιαία υγεία</p> <p align="center">"Από τη ζωική συμπεριφορά στην Ψυχική Υγεία" Σταματάκης Αντώνης Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας- Βιολογίας της Συμπεριφοράς, τμήμα Νοσηλευτικής, ΕΚΠΑ</p> <p align="center">"Η Μοριακή Βιολογία στη διάγνωση και την πρόγνωση" Κοσσυβάκης Θάνας Μοριακός Βιολόγος, Τεχνικός Υπεύθυνος Εθνικού Εργαστηρίου Αναφοράς Γρίπης Νοτίου Ελλάδος, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ</p> <p align="center">"Η νανοτεχνολογία στην υπηρεσία της διαγνωστικής στην Υγεία" Δημητράκης Παναγιώτης Κύριος Ερευνητής Ινστιτούτο Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος"</p> <p align="center">"Ζωικά μοντέλα ασθενειών" Κωστομητσόπουλος Νικόλαος Ειδικός Λειτουργικός Επιστήμονας Α', ΙΙΒΕΑΑ</p> <p align="center"><u>Συντονιστές</u> Ταραβήρας Σταύρος Καθηγητής, τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών</p> <p align="center">Καζάνης Ηλίας Λέκτορας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών</p>	

ΚΥΡΙΑΚΗ 29-11-2020

ΩΡΕΣ	Live streaming	ΩΡΕΣ	ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΑΜΦΙΘΕΑΤΡΟ (*)
			Workshop 6
10:30-11:50	<p style="text-align: center;">ΟΜΙΛΙΕΣ (στα Αγγλικά)</p> <p style="text-align: center;">“COVID-19 – diagnostics and vaccine development”. Lundkvist Åke Prof. Director, Zoonosis Science Center, Uppsala University,</p> <p style="text-align: center;">“Emerging zoonoses from a One Health perspective- COVID19 and beyond” Lindhahl Johanna Assoc. Prof. Zoonosis Science Center, Uppsala University. Specialist on One-Health research.</p> <p style="text-align: center;">Συντονιστής Μουστάκας Αριστείδης Καθηγητής, Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Uppsala University</p>	10:00-11:30	<p style="text-align: center;">“Πρακτικές οδηγίες για ορθή χρήση του προτύπου 15189 στο εργαστήριο”</p> <p>Δρ. Ψαρίδη Λουκία Μονάδα Μοριακής Διαγνωστικής, Παθολογοανατομικού Εργ., Κοργιαλένιο Μπενάκειο Γενικό Νοσ. Αθηνών</p> <p>Δρ. Λείμονη Ειρήνη Υπεύθυνη Διασφάλισης Ποιότητας και Προστασίας Προσωπικών Δεδομένων AFFIDEA</p> <p>Δρ. Κανελλόπουλος Παναγιώτης Βιοχημικό Τμήμα, ΓΝΑ Λαϊκό</p>
11:50-12:00	<p style="text-align: center;">Διάλειμμα 10 λεπτών</p>		
12:00-13:00	<p style="text-align: center;">ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ 8 Ανοικτή συζήτηση σε θέματα Ενιαίας Υγείας</p> <p style="text-align: center;">Δερμιτζάκη Εμμανουήλ Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Γενεύης, Department of Genetic Medicine and Development Director, Health 2030 Genome Center,</p> <p style="text-align: center;">Θάνος Δημήτρης Ακαδημαϊκός, Πρόεδρος του Επιστημονικού Συμβουλίου και Διευθυντής του Κέντρου Βασικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.</p> <p style="text-align: center;">Μουστάκας Αριστείδης Καθηγητής, Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Uppsala University,</p> <p style="text-align: center;">Ταβερναράκης Νεκτάριος Καθηγητής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, Πρόεδρος του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας, Μέλος του Διοικητικού Συμβουλίου του Ευρωπαϊκού Ινστιτούτου Καινοτομίας και Τεχνολογίας</p> <p style="text-align: center;">Συντονιστής Βανταράκης Απόστολος Καθηγητής Υγιεινής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Πατρών</p>		
13:30-13:10	<p style="text-align: center;">Διάλειμμα 10 λεπτών</p>		

ΚΥΡΙΑΚΗ 29-11-2020 (συνέχεια)

ΩΡΕΣ	Live Streaming	ΩΡΕΣ	ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΑΜΦΙΘΕΑΤΡΟ(*)
	<p>ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ 9 Το μέλλον της Βιολογίας και των Βιολογικών Τμημάτων</p> <p>Γαρίνης Γεώργιος Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Βιολογίας Κρήτης</p> <p>Γιάγκου Μηνάς Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Βιολογίας Α.Π.Θ.</p> <p>Καρπούζας Δημήτριος Καθηγητής, Πρόεδρος του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας</p> <p>Κατσώρης Παναγιώτης Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Βιολογίας Πάτρας</p> <p>Μαραγκός Πέτρος Αναπληρωτής Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών Ιωαννίνων</p> <p>Παρμακέλης Αριστείδης Αναπληρωτής Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Βιολογίας Ε.Κ.Π.Α.</p> <p>Χλίχλια Κατερίνα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Πρόεδρος Τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής ΔΠΘ,</p> <p>Συντονιστής Σκούρας Ζαχαρίας Καθηγητής Γενετικής, Τμήμα Βιολογίας Α.Π.Θ.</p>		
13:10-14:30			
14:30-15:00	ΒΡΑΒΕΙΟ ΚΑΦΑΤΟΣ - ΒΡΑΒΕΙΑ ΣΥΝΕΔΡΙΟΥ		
15:00			ΛΗΞΗ

ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΣΥΝΕΔΡΙΟΥ

Ι.ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ (Παρασκευή 27-11-2020)

Η Ενιαία Υγεία στα Σχολικά Εγχειρίδια Βιολογίας του Λυκείου

Γεώργιος ΑΜΠΑΤΖΙΔΗΣ
Πανεπιστήμιο Πατρών, ampatzidis@upatras.gr

Περίληψη

Η Ενιαία Υγεία είναι μια προσέγγιση σχεδιασμού και εφαρμογής πολιτικών και έρευνας στη δημόσια υγεία η οποία προϋποθέτει τη συνεργασία διαφορετικών κοινωνικών τομέων και σχετίζεται με την ασφάλεια των τροφίμων, τον έλεγχο των ζωνοσόων και την καταπολέμηση της ανθεκτικότητας των μικροβίων στα αντιβιοτικά. Λόγω της σημασίας αντιμετώπισης των κινδύνων που απειλούν τη δημόσια υγεία μέσα από την οπτική της Ενιαίας Υγείας, προτείνεται η διδασκαλία της στη δευτεροβάθμια εκπαίδευση. Το άρθρο αυτό εστιάζει στη διερεύνηση των ελληνικών εγχειριδίων βιολογίας του λυκείου αναφορικά με την παρουσία της έννοιας της Ενιαίας Υγείας, και συγκεκριμένα πληροφοριών για τις ζωνοσώους και την ανθεκτικότητα των μικροβίων στα αντιβιοτικά. Η ανάλυση 4 εγχειριδίων δείχνει πως μόνο σε ένα εγχειρίδιο (α) αναπτύσσεται η ιδέα της μετάδοσης ασθενειών μεταξύ ανθρώπων και ζώων, και (β) γίνεται αναφορά στην ανθεκτικότητα των μικροβίων στα αντιβιοτικά.

Λέξεις-κλειδιά

Ενιαία Υγεία, σχολικά εγχειρίδια, βιολογία, ζωνοσώοι, ανθεκτικότητα μικροβίων

Εισαγωγή

Η Ενιαία Υγεία είναι μια προσέγγιση σχεδιασμού και εφαρμογής πολιτικών και έρευνας όπου πολλοί κοινωνικοί τομείς συνεργάζονται για την επίτευξη του βέλτιστου αποτελέσματος στη δημόσια υγεία. Πιο συγκεκριμένα, τα πεδία με τα οποία σχετίζεται η Ενιαία Υγεία περιλαμβάνουν την ασφάλεια των τροφίμων, τον έλεγχο των ζωνοσόων και την καταπολέμηση της ανθεκτικότητας των μικροβίων στα αντιβιοτικά (WHO 2017).

Η παρουσία της Ενιαίας Υγείας είναι αισθητή με διαφορετικές διατυπώσεις από νωρίς στη δυτική σκέψη: στο έργο του «Περί αέρων, υδάτων και τόπων» ο Ιπποκράτης αναγνωρίζει τη σύνδεση της υγείας των ανθρώπων με το καθαρό περιβάλλον. Πιο σύγχρονα, ο Rudolf Virchow εισήγαγε τον όρο «ζωνοσώος» τον 19ο αιώνα και ο όρος «Ενιαία Υγεία» προτάθηκε κατά τη διάρκεια ενός συνεδρίου της Εταιρείας Διατήρησης της Άγριας Ζωής, όπου συζητήθηκε η διασπορά ασθενειών μεταξύ ανθρώπων και άγριων/οικόσιτων ζώων (Evans & Leighton 2014).

Λόγω της σημασίας αντιμετώπισης των κινδύνων που απειλούν τη δημόσια υγεία μέσα από αυτή την οπτική, σήμερα προτείνεται η διδασκαλία της Ενιαίας Υγείας στη δευτεροβάθμια εκπαίδευση (Haxton et al. 2015). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, στόχος αυτής της εργασίας είναι η διερεύνηση της παρουσίας της Ενιαίας Υγείας, και συγκεκριμένα αναφορών για τις ζωνοσώους και την ανθεκτικότητα των μικροβίων στα αντιβιοτικά, στα ελληνικά εγχειρίδια βιολογίας του λυκείου.

Μεθοδολογία

Στο πλαίσιο της έρευνας μελετήθηκαν ψηφιακά αντίγραφα των βιβλίων *Βιολογία Α' Γενικού Λυκείου* (εγχειρίδιο-1), *Βιολογία Β' Γενικού Λυκείου Γενικής Παιδείας* (εγχειρίδιο-2), *Βιολογία Β' και Γ' Γενικού Λυκείου Τεύχος Α'* (εγχειρίδιο-3), και *Βιολογία Γ' Γενικού Λυκείου Ομάδας Προσανατολισμού Σπουδών Υγείας Τεύχος Β'* (εγχειρίδιο-4) που είναι διαθέσιμα στο αποθετήριο Φωτόδεντρο. Η διερεύνηση αφορούσε (α) το κυρίως κείμενο, (β) τα ένθετα, και (γ) τις λεζάντες των εικόνων· δεν ήταν μέρος της ανάλυσης οι ερωτήσεις/ασκήσεις στο τέλος των κεφαλαίων. Η ανάλυση του κειμένου έγινε με άξονες την παρουσία πληροφοριών για (α) τη μετάδοση ασθενειών μεταξύ ανθρώπων και ζώων, και (β) την ανάπτυξη ανθεκτικότητας των μικροβίων στα αντιβιοτικά.

Αποτελέσματα

Σε τρία από τα τέσσερα εγχειρίδια που διερευνήθηκαν δεν υπάρχει καμία αναφορά στη μετάδοση

ασθενειών μεταξύ ανθρώπων και ζώων ούτε στην ανθεκτικότητα των μικροβίων στα αντιβιοτικά. Σχετικές αναφορές εντοπίζονται μόνο στο εγχειρίδιο-3.

Πιο συγκεκριμένα, στο εγχειρίδιο-3 γίνεται αναφορά σε τέσσερις ζωνοσους. Για τον άνθρακα αναφέρεται πως προσβάλλει αγροτικά και άγρια ζώα ενώ παρατηρούνται κρούσματα σε επαγγελματίες που ασχολούνται με ζώα και ζωικά προϊόντα. Για τη νόσο των βοοειδών αναφέρεται πως είναι ένας τύπος σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας η οποία εμφανίστηκε το 1986 σε βοοειδή της Βρετανίας και το 1996 ανακοινώθηκε πως μεταδίδεται και στον άνθρωπο.

Στο ίδιο εγχειρίδιο, αναφέρεται πως ο Jenner παρατήρησε ότι οι κτηνοτρόφοι που έρχονταν σε επαφή με αγελάδες προσβεβλημένες από δαμαλίτιδα αποκτούσαν ανοσία στην ευλογιά, η οποία προκαλείται από στενά συγγενικό ιό. Ακόμα, υπάρχει η πληροφορία πως ο ιός του AIDS έχει προέλθει από μετάλλαξη ενός ιού που προσβάλλει τους πιθήκους ο οποίος με άγνωστο τρόπο μεταδόθηκε στον άνθρωπο. Τέλος, γίνεται αναφορά στην ανθεκτικότητα των μικροβίων στα αντιβιοτικά με τη σημείωση πως η αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στελεχών.

Θα πρέπει να σημειωθεί πως στο εγχειρίδιο-4 αναφέρεται η νόσος των βοοειδών ως ένας τύπος σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας, ωστόσο δεν γίνεται καμία αναφορά στη μετάδοση από τα βοοειδή στον άνθρωπο. Ακόμα, στο ίδιο εγχειρίδιο επισημαίνεται πως η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA χρησιμοποιείται για τη δημιουργία αντιβιοτικών με ισχυρότερη δράση, ωστόσο δεν γίνεται αναφορά στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας των μικροβίων στα αντιβιοτικά.

Συζήτηση

Οι επιπτώσεις της πανδημίας του κορωνοϊού SARS-CoV-2 στη δημόσια υγεία, την οικονομία και τις κοινωνικές σχέσεις υπογραμμίζουν με έμφαση την επίδραση που μπορούν να έχουν οι ζωνοσοί στις ανθρώπινες κοινωνίες. Η παρουσία πληροφοριών για τη μετάδοση ασθενειών μεταξύ ανθρώπων και ζώων στα εγχειρίδια βιολογίας του Λυκείου φαίνεται να είναι περιορισμένη. Σε ένα μόνο από τα τέσσερα εγχειρίδια η ιδέα της μετάδοσης ασθενειών μεταξύ ανθρώπων και ζώων (α) αναπτύσσεται ρητά μέσα από τα παραδείγματα του άνθρακα και της νόσου των βοοειδών, (β) υπονοείται στο παράδειγμα της δαμαλίτιδας, και (γ) αναφέρεται ως προέλευση της νόσου στην περίπτωση του AIDS. Φαίνεται πως η ελληνική εκπαίδευση απέχει αρκετά στην προσπάθεια οικοδόμησης γνώσης στα πεδία ενδιαφέροντος της Ενιαίας Υγείας σε σχέση, για παράδειγμα, με τη Σουηδία, όπου η Ενιαία Υγεία είναι μέρος του αναλυτικού προγράμματος σπουδών του λυκείου (Haxton et al. 2015).

Η ανάλυση των σχολικών εγχειριδίων δείχνει πως η παρουσία αναφορών στην ανθεκτικότητα των μικροβίων στα αντιβιοτικά είναι, επίσης, περιορισμένη. Η ανθεκτικότητα των μικροβίων στα αντιβιοτικά έχει χαρακτηριστεί ως μια από τις μεγαλύτερες προκλήσεις του 21^{ου} αιώνα για τη δημόσια υγεία από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας και την Παγκόσμια Τράπεζα (Hernando-Amado et al. 2019). Ωστόσο, στα εγχειρίδια βιολογίας του λυκείου η αναφορά είναι συνοπτική: καταλαμβάνει μία παράγραφο, στην οποία δεν περιγράφεται ο μηχανισμός εμφάνισης στελεχών βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά ούτε αναδεικνύεται το μέγεθος του προβλήματος.

Βιβλιογραφία

- Evans, B. R., & Leighton, F. A. (2014). A history of One Health. *Scientific and Technical Review*, 33(2), 413–420.
- Haxton, E., Lindberg, A., Troell, K., & Redican, K. J. (2015). One Health education meets science. *Infection Ecology & Epidemiology*, 5(1), 30264.
- Hernando-Amado, S., Coque, T. M., Baquero, F., & Martínez, J. L. (2019). Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nature Microbiology*, 4(9), 1432–1442.
- WHO (2017). *One Health*. <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/one-health>

Η εκπαίδευση στον καιρό της πανδημίας COVID-19

Μάρθα ΓΕΩΡΓΙΟΥ

Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, martgeor@biol.uoa.gr

Περίληψη

Από τις αρχές του 2020 ο πλανήτης μας βιώνει την πανδημία COVID-19, με αποτέλεσμα να έχει επηρεαστεί κυρίως ο τομέας της Υγείας, όπου καταμετρώνται μεγάλες απώλειες ανθρώπινων ζωών, αλλά και κομβικοί τομείς όπως η εργασία, η οικονομία, ο πολιτισμός καθώς και η εκπαίδευση. Στις επιπτώσεις της πανδημίας στην εκπαίδευση αναφέρεται η παρούσα εργασία, μέσα από μία βιβλιογραφική ανασκόπηση επιστημονικών άρθρων που δημοσιεύθηκαν από το ξέσπασμα της πανδημίας μέχρι σήμερα. Ο μεγαλύτερος όγκος των δημοσιεύσεων αφορά στην Τριτοβάθμια εκπαίδευση, επισκοπώντας κυρίως κλάδους της ιατρικής εκπαίδευσης και προτείνοντας σχετικές προσαρμογές. Ελάχιστα άρθρα αφορούν στη Δευτεροβάθμια εκπαίδευση και κανένα που να αφορά στον επιστημονικό και κυρίως βιολογικό εγγραμματισμό, που αναμφισβήτητα θα μπορούσε να ενισχύσει τους μαθητές στην κατανόηση της παρούσας κατάστασης, τονώνοντας το αίσθημα ατομικής και κοινωνικής ευθύνης και μειώνοντας ψευδοεπιστημονικές απόψεις και εικασίες.

Λέξεις κλειδιά

COVID-19, πανδημία, εκπαίδευση, βιολογικός εγγραμματισμός

Εισαγωγή

Οι πανδημίες, που αποτελούν εξαπλώσεις λοιμωδών ασθενειών σε παγκόσμια κλίμακα (Morens, Folkers & Fauci 2009), έχουν κατά καιρούς δοκιμάσει την ανθρωπότητα. Ο λοιμός των Αθηνών ή σύνδρομο του Θουκυδίδη, η πανούκλα του Ιουστινιανού, η λέπρα, η μαύρη πανώλη, η πανούκλα του Λονδίνου, η χολέρα, η ισπανική γρίπη, το AIDS (Hollingsworth & Hollingsworth 1971, Wylie & Stubbs 1983, Trilla, Trilla & Daer 2008, Ryan 2011, Hemelaar 2012) αποτελούν κάποιες από τις πανδημίες που αφάνισαν εκατομμύρια ανθρώπων.

Οι επιπτώσεις μίας πανδημίας δεν περιορίζονται μόνο στη θνησιμότητα, επηρεάζουν κάθε τομέα της ανθρώπινης δραστηριότητας, συνοπτικά αναφέροντας την οικονομία, την ψυχολογία, τη συμπεριφορά, την υγεία, την κοινωνία (Shell 2000, Taylor 2019).

Από τα τέλη του 2019 η ανθρωπότητα ζει στους ρυθμούς της πανδημίας COVID-19 με τον τομέα της υγείας να πλήττεται κατά κύριο λόγο (οι θάνατοι αγγίζουν το 1 εκατομμύριο - <https://www.who.int/>) και τους προαναφερόμενους τομείς να ακολουθούν, με τις ανάλογες διαφοροποιήσεις ανά χώρα. Ανάμεσα σε όλα τα παραπάνω η εκπαίδευση έχει επίσης επηρεαστεί καθώς απαιτήθηκε άμεση αναπροσαρμογή ώστε να χρησιμοποιηθεί κάθε δυνατή μορφή επικοινωνίας μεταξύ διδασκόντων και διδασκόμενων με σκοπό την απρόσκοπτη και αποτελεσματική μάθηση.

Στο πλαίσιο αυτό δημοσιεύτηκαν αρκετά άρθρα από τις αρχές του 2020 με σκοπό να αναδείξουν τις αλλαγές στην εκπαίδευση διάφορων βαθμίδων και ειδικοτήτων εν μέσω πανδημίας (Ahmed, Allaf & Elghazaly 2020, Crawford et al. 2020).

Στην παρούσα εργασία επιχειρείται μία πρώτη διερεύνηση και κατηγοριοποίηση του περιεχομένου των δημοσιευμένων άρθρων με θέμα την εκπαίδευση εν καιρώ πανδημίας COVID-19.

Μεθοδολογία

Η αναζήτηση των άρθρων έγινε μέσω της πλατφόρμας Google Scholar με κριτήρια ταυτόχρονης αναζήτησης τα στοιχεία COVID και education. Ακολούθησε καταγραφή και κατηγοριοποίηση των άρθρων ανάλογα με τη βαθμίδα και τον τομέα εκπαίδευσης και τη χώρα αναφοράς.

Αποτελέσματα

Από τις αρχές του 2020, εν καιρώ πανδημίας COVID-19, έχουν δημοσιευθεί πάνω από 150 άρθρα σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά που αφορούν, κυρίως, στην Τριτοβάθμια εκπαίδευση. Η πλειοψηφία των άρθρων (>140) αναφέρεται στην ιατρική εκπαίδευση διάφορων τομέων, όπως χειρουργική, οδοντιατρική, καρδιολογία, ορθοπαιδική, νευροχειρουργική κ.ά. Η γεωγραφική προέλευση των άρθρων ήταν παγκόσμιας εμβέλειας (Γερμανία, Ν. Αφρική, Ιταλία, Η.Π.Α., Ιράν, Ν. Αμερική, Τουρκία, Πακιστάν, Νιγηρία, Αυστραλία, Κίνα, Αγγλία, Ν. Κορέα, Αίγυπτος κ.ά.) ενώ το περιεχόμενο σε κάθε περίπτωση ήταν σχετικό με:

1. τις τροποποιήσεις που χρειάστηκε να κάνουν οι διδάσκοντες προκειμένου να διδάξουν αποτελεσματικά τους φοιτητές τους με την αξιοποίηση online εργαλείων και κατάλληλων εκπαιδευτικών πλαισίων (>120 άρθρα, π.χ. προσομοιώσεων, απομακρυσμένων εργαστηρίων, ψηφιακών εφαρμογών κ.ά.),
2. την επίδραση της τροποποιημένης διδασκαλίας στην απόδοση των φοιτητών (7 άρθρα) αλλά και στην ψυχολογία και την πνευματική τους υγεία (5 άρθρα) και
3. τις ανισότητες στις ευκαιρίες για εκπαίδευση ανάμεσα στους φοιτητές (2 άρθρα).

Επτά μόνο άρθρα αφορούσαν στη Δευτεροβάθμια εκπαίδευση, αναφέροντας τις δυσκολίες διεξαγωγής της διδασκαλίας και προτείνοντας ταυτόχρονα σχετικές λύσεις.

Ένα μόνο άρθρο έθιγε ζητήματα ιστορίας της επιστήμης, αναφέροντας πώς θα μπορούσαν αποτελεσματικά να συνδράμουν στην εκπαίδευση με στόχο την αντιμετώπιση κρίσεων, όπως αυτή η πανδημία (Erduran 2020).

Τέλος, εντοπίστηκε ένα άρθρο με σαφείς αναφορές σε έλλειψη εγγραμματισμού σχετικά με την υγεία (health literacy) χωρίς ωστόσο προτάσεις αντιμετώπισης.

Συζήτηση

Μέσα από την παρούσα έρευνα έγινε φανερό πως μία πληθώρα ερευνητών ασχολήθηκε και δημοσίευσε ζητήματα που αφορούν στην εκπαίδευση. Οι έρευνες επικεντρώθηκαν στη λειτουργία κυρίως των εκπαιδευτικών ιδρυμάτων, προτείνοντας λύσεις και χρηστικά εκπαιδευτικά εργαλεία, με προεξάρχουσα την ιατρική εκπαίδευση. Βεβαίως κάτι τέτοιο θα μπορούσε ίσως να αιτιολογηθεί από το γεγονός πως αυτού του είδους η εκπαίδευση πλήττεται κατά μέτωπο καθώς περιλαμβάνει έντονη εργαστηριακή διαζώσης διδασκαλία, η οποία κυρίως πραγματοποιείται σε χώρους (νοσοκομεία) που εξυπηρετούν διαφορετικές ανάγκες υπό τις παρούσες συνθήκες.

Όλες οι δημοσιεύσεις επικεντρώθηκαν στην πρόταση γρήγορων και πρακτικών εκπαιδευτικών λύσεων. Όμως εκτός των εκπαιδευτικών πλατφορμών, των online εργαλείων και όλων εκείνων των τεχνολογικών μέσων που μπορούν να υποστηρίξουν την εξ αποστάσεως διδασκαλία, η οποία επιβλήθηκε σε συνθήκες πανδημίας, είναι πολύ σημαντικό να απασχολήσει την επιστημονική κοινότητα πώς θα μπορούσε να συνεισφέρει μακροπρόθεσμα και με διάρκεια στην «αποφυγή πανδημιών» και κυρίως συμπεριφορών που καθιστούν απαραίτητες τις συνθήκες απομόνωσης.

Ο βιολογικός εγγραμματισμός είναι μία σπουδαία βάση οικοδόμησης, που απαιτεί όμως μία σειρά από απαραίτητες συνιστώσες. Η συγκυρία της πανδημίας έθιξε ξεκάθαρα τη συνιστώσα της βιολογικής γνώσης, της ιστορίας της ζωής και της εξάπλωσή της πάνω στον πλανήτη καθώς και της ιστορίας της επιστήμης. Είναι λοιπόν καιρός, να ενισχυθεί η βιολογική γνώση από τα πρώτα στάδια της εκπαίδευσης του ανθρώπου, από την Προσχολική και την Πρωτοβάθμια Εκπαίδευση ώστε οι μαθητές και μελλοντικοί πολίτες να γνωρίσουν τις βιολογικές διαδικασίες όχι μόνο ως γνωστικό περιεχόμενο αλλά και ως αναπόσπαστο κομμάτι του φυσικού κόσμου μέσα στον οποίο ο άνθρωπος καλείται να συμβιώσει με πλήθος άλλων οργανισμών.

Βιβλιογραφία

Ahmed, H., Allaf, M., & Elghazaly, H. (2020). COVID-19 and medical education. *The Lancet Infectious Diseases*.

Crawford, J., Butler-Henderson, K., Rudolph, J., Malkawi, B., Glowatz, M., Burton, R. & Lam, S. (2020). COVID-19: 20 countries' higher education intra-period digital pedagogy responses. *Journal of Applied Learning & Teaching*, 3(1), 1-20.

Erduran, S. (2020). Science Education in the Era of a Pandemic: How Can History, Philosophy and Sociology of Science Contribute to Education for Understanding and Solving the Covid-19 Crisis?. *Science & Education*, 29(2), 233-235.

Hemelaar, J. (2012). The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends in molecular medicine*, 18(3), 182-192.

Hollingsworth, M. F., & Hollingsworth, T. H. (1971). Plague mortality rates by age and sex in the parish of St. Botolph's without Bishopsgate, London, 1603. *Population Studies*, 25(1), 131-146.

Morens, D. M., Folkers, G. K., & Fauci, A. S. (2009). What Is a Pandemic? *The journal of infectious diseases*, 200(7), 1018-1021.

Ryan, E. T. (2011). The cholera pandemic, still with us after half a century: time to rethink. *PLoS Negl Trop Dis*, 5(1), e1003.

Shell, R. (2000). Halfway to the holocaust: the economic, demographic and social implications of the AIDS pandemic to the year 2010 in the southern African region. *HIV/AIDS: A threat to the African renaissance*, 19-20.

Taylor, S. (2019). *The psychology of pandemics: Preparing for the next global outbreak of infectious disease*. Cambridge Scholars Publishing.

Trilla, A., Trilla, G., & Daer, C. (2008). The 1918 “Spanish flu” in Spain. *Clinical infectious diseases*, 47(5), 668-673.

Wylie, J. A., & Stubbs, H. W. (1983). The plague of Athens: 430-428 BC Epidemic and epizoötic. *Classical Quarterly*, 6-11.

Άσκηση και υγεία: απόψεις και στάσεις μαθητών Α΄ Γυμνασίου

Φλώρα ΖΑΡΑΝΗ, Αναστάσιος ΦΙΛΙΠΠΟΥ, Μιχαήλ ΚΟΥΤΣΙΛΙΕΡΗΣ

Εργαστήριο Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ, 1. fzarani@med.uoa.gr, 2. tfilipou@med.uoa.gr, 3. mkoutsil@med.uoa.gr

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία εξετάζονται οι απόψεις και στάσεις 166 μαθητών Α΄ τάξης δυο Γυμνασίων, του Βαρβακείου και των Μελισσίων, όσον αφορά την άσκηση και τα οφέλη της στην υγεία. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δείχνουν ότι οι μαθητές του Βαρβακείου Πρότυπου Γυμνασίου είναι περισσότερο ενημερωμένοι για την άσκηση και τα οφέλη της, και οι γενικότερες επιλογές τους δείχνουν ένα πιο «υγιεινό» τρόπο ζωής σε σχέση με τους μαθητές των Μελισσίων. Το ποσοστό μαθητών που αθλούνται επαρκώς ανέρχεται σε 24.7%, με τα αγόρια να παρουσιάζουν καλύτερες επιδόσεις από τα κορίτσια. Τα αθλήματα που προτιμούν τα αγόρια είναι κυρίως το ποδόσφαιρο και το μπάσκετ, ενώ η πλειοψηφία των κοριτσιών ασχολείται με το χορό και το βόλεϊ.

Λέξεις-κλειδιά

Άσκηση, υγεία, μαθητές, Α΄ Γυμνασίου, ερωτηματολόγιο

Εισαγωγή

Στο πλαίσιο του εκπαιδευτικού προγράμματος με τίτλο «Η άσκηση είναι φάρμακο» (Ζαράνη & Νταλαχάνη 2019), σχεδιάστηκε ερωτηματολόγιο με στόχο την καταγραφή των απόψεων και στάσεων των μαθητών όσον αφορά στη σωματική άσκηση και τα οφέλη της στην υγεία και την ανάδειξη πιθανής διαφορετικότητας στις απόψεις και προτιμήσεις των μαθητών σε σχέση με τη φυσιογνωμία του σχολείου (Πρότυπο Γυμνάσιο – Δημόσιο Γυμνάσιο) και το φύλο (αγόρια – κορίτσια), με σκοπό την ευαισθητοποίηση και κινητοποίηση των μαθητών στην τακτική σωματική άσκηση.

Μεθοδολογία

Η έρευνα πραγματοποιήθηκε με τη διανομή ερωτηματολογίου σε συνολικά 166 μαθητές Α΄ Γυμνασίου, ηλικίας 12.1 ± 0.3 ετών: 91 μαθητές (63 αγόρια - 28 κορίτσια) του Βαρβάκειου Πρότυπου Γυμνασίου και 75 μαθητές (43 αγόρια - 32 κορίτσια) του 2^{ου} Γυμνασίου Μελισσίων. Ο σχεδιασμός του ερωτηματολογίου βασίστηκε κυρίως στο βιβλίο Φυσικής Αγωγής Ε΄ και ΣΤ΄ Δημοτικού (Διγγελίδης κ.ά. 2013), και του αντίστοιχου βιβλίου του Γυμνασίου (Θεοδωράκης κ.ά. 2012). Η καταγραφή και η ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη χρήση φύλλου εργασίας XL και οι συγκρίσεις με τη χρήση του στατιστικού t-test.

Αποτελέσματα

Οι γνώσεις μου: άσκηση και υγεία

Σύμφωνα με την έρευνά μας, οι μαθητές που φοιτούν στο Βαρβάκειο είναι περισσότερο ενημερωμένοι όσον αφορά την άσκηση και τη σημαντικότητά της στην υγεία, σε σχέση με το Γυμνάσιο Μελισσίων, αφού ο μέσος όρος βαθμολογίας τους στις σχετικές ερωτήσεις είναι για το Βαρβάκειο 9.53 ± 2.20 και για τα Μελίσσια 8.27 ± 2.20 ($p < 0.01$).

Οι επιλογές μου: έχω υγιεινές συνήθειες;

Οι μαθητές και των δυο σχολείων φαίνεται να επιλέγουν αρκετές φορές να περπατούν και να μετακινούνται με ποδήλατο, γυμνάζονται τουλάχιστον τρεις φορές την εβδομάδα και συμμετέχουν τακτικά σε παιχνίδια, ή σπορ. Η ενασχόλησή τους όμως με τα ηλεκτρονικά διαφέρει: οι μαθητές των Μελισσίων συνηθίζουν να περνούν, συχνότερα απ' ότι οι μαθητές του Βαρβακείου, περισσότερο από 2 ώρες καθημερινά στις οθόνες. Ο χρόνος απασχόλησης με ηλεκτρονικά είναι παρόμοιος και στα δυο φύλα.

Οι προτιμήσεις μου

Ο μέσος χρόνος άθλησης των μαθητών (αγοριών και κοριτσιών) είναι ίδιος και στα δυο σχολεία: 4 ημέρες την εβδομάδα, 5.5 συνολικά ώρες. Όπως προκύπτει από την ανάλυση των δεδομένων των δυο σχολείων μόνο το 24.7% των μαθητών ασκούνται επαρκώς (7 ή περισσότερες ώρες την εβδομάδα). Στο Βαρβάκειο το ποσοστό αυτό είναι υψηλότερο, ενώ στα Μελίσσια είναι χαμηλότερο. Το συνολικό

ποσοστό των κοριτσιών που αθλούνται επαρκώς είναι χαμηλότερο από των αγοριών (18.3% έναντι 26.4%). Όσον αφορά τα αθλήματα που επιλέγουν οι μαθητές, διαφέρουν ανάλογα με το φύλο, αλλά και το σχολείο που φοιτούν.

Συμπεράσματα

Οι κατευθυντήριες οδηγίες της Αυστραλίας (Australian Guidelines 2019) συνιστούν τα παιδιά και οι έφηβοι ηλικίας 5 έως 17 ετών να περνούν όχι περισσότερο από 2 ώρες την ημέρα μπροστά σε μια οθόνη ψυχαγωγίας. Τις συγκεκριμένες οδηγίες καλύπτουν λιγότεροι από τους μισούς (42%) από τους μαθητές του Βαρβακείου, και μόνο το 17% των μαθητών από τα Μελίσσια.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO 2020) τα παιδιά και οι έφηβοι 5-17 ετών πρέπει να αφιερώνουν καθημερινά τουλάχιστο 1 ώρα σε μέτρια ή έντονη σωματική άσκηση. Σε έρευνα που παρουσιάστηκε πρόσφατα (Guthold et al. 2019) αναφέρεται ανεπάρκεια σωματικής δραστηριότητας στους Έλληνες εφήβους ηλικίας 11-17 ετών, η οποία ανήλθε σε 84.5% το 2016. Επίσης, σε δημοσίευση του Ευρωβαρόμετρου (2018) αναφέρεται ότι στις ηλικίες 4-12 ετών το ποσοστό επαρκούς άθλησης στην Ελλάδα είναι 62% για τα αγόρια και 65% για τα κορίτσια, ενώ στην ηλικία των 13 ετών το ποσοστό επαρκούς άθλησης αλλάζει: μόνο το 8% των κοριτσιών και το 19% των αγοριών ασκούνται συστηματικά. Τα ποσοστά αυτά συνάδουν με τα αποτελέσματα της έρευνάς μας.

Έρευνα σε 300 μαθητές Δημοτικού, Γυμνασίου, Λυκείου (Γογγάκη Κ. 2003), δείχνει ότι τα αθλήματα που επιλέγουν είναι: ποδόσφαιρο (25.5%), μπάσκετ (18.9%), βόλεϊ (11.8%). Αυτά ισχύουν σε γενικές γραμμές και στη δική μας έρευνα: Τα πλέον δημοφιλή αθλήματα των μαθητών Α΄ Γυμνασίου είναι το ποδόσφαιρο (24.7%), το μπάσκετ (19.3%), ο χορός (12.1%) και το βόλεϊ (9.6%).

Βιβλιογραφία

Γογγάκη Κ. (2003). Εκπαιδευτική έρευνα: ευκαιρίες άθλησης και αναπαραστάσεις του μαθητικού πληθυσμού του Λεκανοπεδίου Αττικής για τη Φυσική Αγωγή και τον Αθλητισμό. *Αντιτετράδια*, 67.

Διγγελίδης, Ν., Θεοδωράκης, Ι., Ζέτου, Ε. & Δήμας, Ι. (2013). *Φυσική αγωγή Ε΄ και ΣΤ΄ Δημοτικού*. Αθήνα: ΙΤΥΕ - ΔΙΟΦΑΝΤΟΣ.

Ζαράνη, Φ. & Νταλαχάνη, Κ. (2019). Διδακτική Παρέμβαση: Στάσεις και Απόψεις των Μαθητών της Α΄ Τάξης του Βαρβακείου Προτύπου Γυμνασίου για τη Σωματική Άσκηση και τα Οφέλη της στην Υγεία. Στο Π., Γεωργογιάννης (επιμ.) *Αγωγή Υγείας, Κοινωνική Παιδαγωγική και Ιατρική, Κοινωνική Παιδαγωγική, Συμβουλευτική και Ειδική Αγωγή*, 21-37. Πάτρα.

Θεοδωράκης, Ι., Τζιαμούρτας, Α., Νάτσης, Π. & Κοσμίδου, Ε. (2012). *Φυσική Αγωγή Α΄ - Β΄ - Γ΄ Γυμνασίου*. Αθήνα: ΙΤΥΕ - ΔΙΟΦΑΝΤΟΣ.

Australian 24-Hour Movement Guidelines for Children and Young People (5-17 years) – An Integration of Physical Activity, Sedentary Behaviour and Sleep. <https://www1.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/health-24-hours-phys-act-guidelines> Page last updated: 12 April 2019

Guthold, R., Stevens, G. A., Riley, L. M. & Bull, F. C. (2019). Global trends in insufficient physical activity among adolescents: a pooled analysis of 298 population-based surveys with 1.6 million participants. *The Lancet Child & Adolescent Health*, 4, 23–35.

Special Eurobarometer 472 (2018). Sport and physical activity <https://ec.europa.eu/commfrontoffice/publicopinion/index.cfm/survey/getsurveydetail/instruments/special/surveyky/2164> https://ec.europa.eu/sport/sites/sport/files/physical-activity-factsheets-2018/physical-activity-factsheets-2018/greece-physical-activity-factsheet-2018_en.pdf

WHO, (2020) Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health - Physical activity and young people, Recommended levels of physical activity for children aged 5 - 17 years, Retrieved from https://www.who.int/dietphysicalactivity/factsheet_young_people/en/

Συγκριτική αποτύπωση εγκεκριμένων εκπαιδευτικών προτάσεων για το HIV/AIDS

Μαργαρίτα ΒΕΛΕΝΤΖΑ¹, Ευαγγελία ΜΑΥΡΙΚΑΚΗ²

1. Παιδαγωγικό Τμήμα Δημοτικής Εκπαίδευσης, ΕΚΠΑ, marvele321@gmail.com
2. Παιδαγωγικό Τμήμα Δημοτικής Εκπαίδευσης, ΕΚΠΑ, emavrikaki@primedu.uoa.gr

Περίληψη

Η παρούσα εργασία επιχειρεί να καταγράψει τις διαφορές σε γνώσεις και στάσεις σχετικά με τον ιό HIV και το AIDS στο παρελθόν και σήμερα μέσα από τον τρόπο που αυτές αποτυπώνονται σε εγκεκριμένα από το Υπουργείο Παιδείας και Θρησκευμάτων εκπαιδευτικά προγράμματα για τη δευτεροβάθμια εκπαίδευση. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται η Κριτική Ανάλυση Λόγου, η οποία αναδεικνύει τον τρόπο με τον οποίο οι διάφορες γλωσσικές επιλογές επηρεάζουν κοινωνικές πρακτικές, κοινωνικές σχέσεις, στάσεις, αλλά και πώς διαμορφώνουν την ίδια τη γνώση. Από τη σύγκριση των εκπαιδευτικών υλικών προκύπτει ότι η πιο σύγχρονη παρέμβαση χρησιμοποιεί το λόγο με τέτοιο τρόπο ώστε να προάγει αφενός πιο υπεύθυνες συμπεριφορές για τον περιορισμό της εξάπλωσης του HIV, αφετέρου να καταρρίψει στερεότυπα που συνδέονται με τον HIV και το AIDS αλλά και με τα άτομα που είναι οροθετικά.

Λέξεις-κλειδιά

HIV/AIDS, Σεξουαλική Αγωγή, στερεότυπα/προκαταλήψεις, Κριτική Ανάλυση Λόγου, Αγωγή Υγείας

Εισαγωγή

Στο ελληνικό εκπαιδευτικό σύστημα, η σεξουαλική αγωγή θεωρείται ακόμα θέμα «ταμπού». Σύμφωνα με ρεπορτάζ της εφημερίδας ΤΑ ΝΕΑ 2020 <https://www.tanea.gr/2020/02/07/greece/anastelletai-to-programma-seksoualikhis-agogis-friksos/> (ανακτήθηκε στις 15/06/2020). Το πρόγραμμα σεξουαλικής αγωγής «ΦΡΙΞΟΣ» ανεστάλη το 2020 και παραπέμφθηκε σε επανεξέταση από τη νέα διοίκηση του ΙΕΠ μετά από παρεμβάσεις από παράγοντες της εκκλησίας. Η εισαγωγή μιας παρέμβασης στο σχολείο για τον HIV/AIDS, είναι ένα θέμα που εμπίπτει στον τομέα της σεξουαλικής αγωγής. Ωστόσο, και σε αυτό το θέμα φορείς όπως το Κέντρο Ζωής, έχουν επισημάνει το κενό που υπάρχει στην εκπαίδευση.

Ο HIV/AIDS αντιμετωπίζεται από κοινωνικούς αναλυτές ως κοινωνικο-πολιτιστικό φαινόμενο, καθώς η εμφάνισή του συνταυτίστηκε με τον πανικό της επιδημίας, τον κίνδυνο απομόνωσης και στιγματισμού διάφορων κοινωνικών ομάδων και τη δημιουργία νέων ορίων στις ανθρώπινες ανταλλαγές και επικοινωνίες.

Η παρούσα εργασία διερευνά διαφορές στις γνώσεις και τις στάσεις που είχαμε στο παρελθόν σχετικά με τον ιό HIV και το AIDS σε σχέση με σήμερα εξετάζοντας τη χρήση του λόγου όταν αναφερόμαστε σε διάφορες πτυχές αυτού του θέματος και πώς αυτός επηρεάζει κοινωνικές πρακτικές, κοινωνικές σχέσεις, στάσεις, αλλά και πώς διαμορφώνει την ίδια τη γνώση.

Θεωρούμε πως η συγκεκριμένη έρευνα θα φανεί χρήσιμη στους εκπαιδευτικούς όλων των βαθμίδων που ασχολούνται ή σκοπεύουν να ασχοληθούν όχι μόνο με το θέμα του HIV/AIDS, αλλά και γενικότερα με τη σεξουαλική αγωγή. Η επίγνωση ότι η χρήση συγκεκριμένου λεξιλογίου ή γενικά ο συγκεκριμένος χειρισμός της γλώσσας κατά τη διδασκαλία μπορεί να οδηγήσει στην άρση ή διαίωνηση στερεοτύπων, μπορεί να προσφέρει στην παρέμβαση του εκπαιδευτικού κάτι παραπάνω από απλή πληροφόρηση σχετικά με το HIV/AIDS. Η παρούσα έρευνα μπορεί να προσφέρει μια σταθερή θεωρητική και πολυδιάστατη βάση στην οποία μπορεί να χτιστεί μία νέα παρέμβαση σε μαθητές για τον HIV και το AIDS η οποία θα καλλιεργεί την «κριτική γλωσσική συνειδητοποίηση» (Fairclough 2006) των εκπαιδευτικών και των μαθητών.

Μέθοδοι

Στόχος της έρευνας είναι η σύγκριση εκπαιδευτικών προτάσεων του ΥΠΘ για το HIV/AIDS όσον αφορά

τον τρόπο με τον οποίο προσεγγίζεται το θέμα. Ο στόχος, όπως είναι διατυπωμένος, υποβάλλει μία επαγωγική κατεύθυνση που θα ακολουθήσουμε γι' αυτό και επιλέχθηκε η ποιοτική έρευνα.

Για την ποιοτική ανάλυση των δεδομένων της παρούσας εργασίας, επιλέχθηκε η Κριτική Ανάλυση Λόγου (ΚΑΛ). Η ΚΑΛ δίνει ιδιαίτερο βάρος στον ενεργό ρόλο που διαδραματίζει ο λόγος στην κατασκευή του κοινωνικού κόσμου και δίνει ιδιαίτερη βάση στη διαμόρφωση πιο συμμετρικών σχέσεων εξουσίας στις διαδικασίες της επικοινωνίας και την κοινωνία εν γένει και γι' αυτό επιλέχθηκε ως μέθοδος ανάλυσης.

Η ανάλυση αυτή θα πραγματοποιηθεί μέσω της σύγκρισης δύο παρεμβάσεων του Υπουργείου Παιδείας και Θρησκευμάτων (ΥΠΘ) στη δευτεροβάθμια εκπαίδευση _μία του 1992 και μία του 2019_ προκειμένου να καταδειχθούν οι διαφορές στη χρήση του λόγου. Μέσω αυτής της σύγκρισης, εκπαιδευτικοί που προσεγγίζουν το συγκεκριμένο θέμα στις τάξεις τους ίσως αναγνωρίσουν και πρακτικές λόγου που ασυνείδητα χρησιμοποιούν και οι ίδιοι και πώς αυτές οι πρακτικές υπαγορεύουν κοινωνικές πρακτικές.

Ως κομβικό σημείο στην ιστορία της εξέλιξης του HIV/AIDS θεωρείται το έτος 1995 καθώς τότε ανακοινώνονται τα πρώτα θετικά αποτελέσματα κλινικών ερευνών για την ανακάλυψη των πρώτων αντιρετροϊκών φαρμάκων που θα καθυστερούσαν την ανάπτυξη ανοχής του HIV και της εκδήλωσης AIDS και θα μείωναν το ποσοστό θνησιμότητας. Στο ίδιο πλαίσιο εγκαινιάζεται η εποχή της HAART (Highly Active Anti-Retroviral Therapy / Αντιρετροϊκή Θεραπεία Υψηλής Δραστηριότητας) το 1996, ενώ το γεγονός αυτό σηματοδοτεί και πολλές κοινωνικές και πολιτικές αλλαγές τόσο για την καταπολέμηση του στίγματος για τα άτομα που ζουν με τον HIV, όσο και πολιτικές αλλαγές σχετικά με τη διάθεση των αντιρετροϊκών φαρμάκων (<https://www.kentrozois.gr/#>). Το μοναδικό εγχειρίδιο που γράφτηκε πριν το 1995 και αφορούσε αμιγώς στο AIDS, ήταν το εγχειρίδιο που επιλέξαμε για ανάλυση. Το δεύτερο δείγμα, ανταποκρίνεται στις σημερινές γνώσεις και στάσεις αναφορικά με τον HIV/AIDS καθώς η ιστοσελίδα ενημερώνεται συνεχώς με την πιο σύγχρονη βιβλιογραφία που επίσης αναρτάται.

Σύμφωνα με τα κριτήρια που προαναφέρθηκαν, το πρώτο δείγμα έπρεπε να έχει συγγραφεί πριν το 1995. Το εγχειρίδιο που επιλέξαμε ήταν το μοναδικό που πληρούσε αυτό το κριτήριο. Συνεπώς ήταν αδύνατη η τυχαία δειγματοληψία. Αν και είχαμε πληθώρα ιστοσελίδων για επιλογή δεύτερου δείγματος, ωστόσο, σκόπιμα επιλέχθηκε αυτή του «Κέντρου Ζωής», καθώς πληρούσε κατά τη γνώμη μας περισσότερο τα κριτήρια αυθεντικότητας, αξιοπιστίας, αντιπροσωπευτικότητας και νοήματος. Ταυτόχρονα, ο εν λόγω ιστότοπος πληρούσε και το κριτήριο του «πλαισίου», καθώς συστηματικά από το 2016 ενημερώνει μαθητές Δευτεροβάθμιας Εκπαίδευσης αναφορικά με τον HIV/AIDS.

Αποτελέσματα

Αρχικά, συγκρίναμε τις δύο εκπαιδευτικές παρεμβάσεις ως προς τον γνωστικό τομέα και προέκυψαν αρκετές διαφορές. Ενδεικτικά αναφέρουμε ότι σήμερα επικρατεί ο όρος «Συμπεριφορά υψηλού κινδύνου» έναντι του όρου «ομάδες υψηλού κινδύνου» που επικρατούσε στην παλαιότερη παρέμβαση. Ο τελευταίος όρος βοηθά στην ενίσχυση των αντιλήψεων για τη «διαφορετικότητα»-ότι, δηλαδή η μόλυνση προέρχεται από τους ανθρώπους των οποίων η ταυτότητα και ο τρόπος ζωής προσαρμόζονται στα επιδημιολογικά δεδομένα (Nettleton 2013).

Στη συνέχεια, πραγματοποιήσαμε κειμενική ανάλυση προτάσεων των δύο κειμένων (Fairclough, 2006). Μερικές από τις προτάσεις που αναλύθηκαν είναι οι εξής:

1. *Εκφράσεις όπως «κόλλησε AIDS» ή φορέας του AIDS **θα πρέπει να αποφεύγονται**, καθώς, όχι μόνο είναι λανθασμένες αλλά και αναπαράγουν αρνητικά στερεότυπα για τους ανθρώπους που ζουν με HIV (<https://www.kentrozois.gr/>).*

Έγκλιση

Η χρήση υποτακτικής εκφράζει το επιθυμητό και αναγκαίο. Η κατευθυντική λέξη «πρέπει», δίνει ακόμα μεγαλύτερη έμφαση στην αναγκαιότητα και δηλώνει εμπλοκή του αναγνώστη. Στην πρόταση (1), δίνεται έμφαση στον τρόπο ορθής και μη στιγμιστικής χρήσης της γλώσσας, κάτι που δεν

παρατηρήθηκε στον έντυπο οδηγό. Παρατηρείται πως μια πιο σύγχρονη παρέμβαση, λαμβάνει υπόψη της και την καλλιέργεια της κριτικής επίγνωσης της γλώσσας (Fairclough 1992). Προκειμένου να γινόμαστε κριτικοί χρήστες της γλώσσας .

Συμφυρματική γλώσσα

Λογοτεχνικός λόγος

2. «Προς το παρόν αποτελεσματική θεραπευτική αντιμετώπιση του AIDS δεν υπάρχει και κατά συνέπεια το πιο σημαντικό και ίσως το μοναδικό όπλο που διαθέτουμε είναι η σωστή και υπεύθυνη ενημέρωση του κοινού» (Ρωτώ και μαθαίνω για το AIDS, 1992, σελ. 8).

Στο εγχειρίδιο του 1992, χρησιμοποιούνται λογοτεχνικές λέξεις όπως «όπλο» που παραπέμπουν σε πόλεμο ενάντια στον ιό. Σύμφωνα με τη Φραγκουδάκη 1987, «ο συγκεκριασμός επιστημονικού και λογοτεχνικού λόγου έχει στόχο την υποβολή και όχι τη μετάδοση γνωστικών μηνυμάτων και πληροφοριών» (σελ. 166-167).

Στην ίδια πρόταση, παρατηρούμε την αντωνυμία α' πληθυντικού προσώπου (μας) η οποία προσδιορίζει τη λέξη χώρα. Ήδη ο Αγραφιώτης 1988, είχε επισημάνει ότι η επικράτηση του ξενόγλωσσου όρου AIDS αντί για ΣΕΑΑ, υπονοεί ότι το κακό έρχεται έξω από την ελληνική κοινωνία. Αξίζει να σημειώσουμε πως στη Γαλλία επικρατεί ο γαλλικός όρος SIDA αντί του AIDS. Συνεπώς, η φράση «...τα θύματα του AIDS στη χώρα μας...», εμφανίζεται ιδιαίτερα φορτισμένη καθώς υποδηλώνει ότι μία «ξένη» απειλή αφήνει θύματα και στη χώρα μας. Ένας τέτοιος συνειρμός, ενδέχεται να οδηγήσει στη δημιουργία ξενοφοβικών τάσεων και προκαταλήψεων.

Συντακτικές επιλογές

Έμφαση του δράστη

3. Το AIDS είναι ένα νόσημα που καταλύει ένα μέρος της άμυνας του οργανισμού και τον καθιστά επιρρεπή σε μια σειρά από ασυνήθεις θανατηφόρες αρρώστιες.

Η έμφαση του δράστη («AIDS») πραγματοποιείται με τη χρήση δύο μεταβατικών ρημάτων σε ενεργητική φωνή («καταλύει», «καθιστά»), που τοποθετούν το δράστη της πράξης στην αρχή της πρότασης. Η αρχή μια πρότασης έχει εμφατική λειτουργία γιατί αποτελεί το θέμα της πρότασης, ενώ αυτό που έπεται παίζει δευτερεύοντα ρόλο καθώς αποτελεί το σχόλιο δηλαδή για το θέμα της πρότασης (Halliday 1994).

Σχήμα λόγου «άρση και θέση»

4. (Άρση): το AIDS δεν είναι ένα κληρονομικό νόσημα, δεν οφείλεται σε γενετικούς

(Θέση): αλλά σε περιβαλλοντικούς παράγοντες και, συγκεκριμένα, στη μόλυνση και την επακόλουθη λοίμωξη από τον ιό HIV, η οποία μπορεί να συμβεί κάποια στιγμή κατά τη διάρκεια της ζωής του ατόμου.

Το σχήμα αυτό δίνει πρώτα έμφαση στο τι δεν είναι AIDS. Έτσι, μπορούν να αποφευχθούν γνωστικές παρανοήσεις που μπορούν να δημιουργήσουν στερεοτυπικές στάσεις σχετικά με τον ιό και τα άτομα που ζουν με αυτόν, αλλά και να αποσαφηνιστούν οι τρόποι μετάδοσής του.

Συμπεράσματα

Παρατηρήσαμε ότι υπάρχει σύγκρουση ανάμεσα στις γνωστικές προτάσεις των δύο κειμένων η οποία συνεπάγεται και σύγκρουση ανάμεσα στους διαφορετικούς λόγους που αντιπροσωπεύουν και εναλλακτικούς τρόπους κατανόησης διαστάσεων του κόσμου. Από την ανάλυση προκύπτει ότι στη σύγχρονη παρέμβαση, εκτός από τη μετάδοση πληροφοριών σχετικά με τον ιό, το βάρος μετατοπίζεται και στην εξάλειψη του στίγματος γύρω από το θέμα. Επομένως, με όρους κειμενικής πρακτικής θα πρέπει να είμαστε προσεκτικοί κατά τη σύνταξη κειμένου για διδακτικές παρεμβάσεις σε θέματα πολυσύνθετα όπως το HIV/AIDS.

Ένας περιορισμός που συνάντησε η έρευνά μας ήταν το γεγονός ότι δεν υπήρχαν διαθέσιμα δεδομένα σχετικά με την «κατανάλωση» των δύο διαφορετικών κειμένων στα πλαίσια των παρεμβάσεων γεγονός που παρατηρείται συχνά στην ΚΑΛ. Γι' αυτόν το λόγο στην εργασία μας παρατίθενται μόνο οι διαδικασίες «παραγωγής» των κειμένων στη μελέτη των ρηματικών πρακτικών και όχι η ερμηνεία τους από το ακροατήριο (μαθητές, εκπαιδευτικοί, γονείς). Μία πρώτη πρόταση αυτής της έρευνας, είναι να συλλεχθούν στο μέλλον ποσοτικά και ποιοτικά δεδομένα με τα αποτελέσματα των παρεμβάσεων και να είναι διαθέσιμα στο κοινό, καθώς μια τέτοια πρακτική μπορεί να αποφέρει γόνιμο διάλογο για

αποτίμηση και βελτιστοποίηση, ενδεχομένως των παρεμβάσεων στο μέλλον. Μια δεύτερη πρόταση της έρευνάς μας είναι η δημιουργία μιας παρέμβασης για τον HIV και το AIDS που θα αξιοποιεί την τεχνική της κριτικής γλωσσικής συνειδητοποίησης όπως ονομάζει και ο Fairclough. Μέσω μιας τέτοιου είδους παρέμβασης, τα άτομα θα διαπαιδαγωγηθούν κατάλληλα ώστε να κατανοούν τη ρηματική πρακτική στην οποία συμμετέχουν, όταν χρησιμοποιούν τη γλώσσα και καταναλώνουν διάφορα κείμενα. Μια τέτοια προσέγγιση μπορεί να οδηγήσει στην απόκτηση μιας βαθύτερης επίγνωσης των περιορισμών που έχουν επιβληθεί στην κοινωνική τους πρακτική αλλά και να συνειδητοποιήσουν τα περιθώρια αντίστασης που έχουν για αλλαγή.

Βιβλιογραφία

Αναστασιάδη-Συμεωνίδη, Ά. (2015). Γραμματική του Νεοελληνικού Επιστημονικού Λόγου., *Ελληνική Γλώσσα και Ορολογία*, 1-19. Αθήνα.

Αναστέλλεται το πρόγραμμα σεξουαλικής αγωγής "Φρίξος". (2020, 2 7). *TA NEA*. Ανάκτηση 6 15, 2020, από <https://www.tanea.gr/2020/02/07/greece/anastelletai-to-programma-seksoualikhis-agogis-friksos/>

Γκούβρα, Μ., & Πετρίδου, Ε. (1992). Ρωτώ και μαθαίνω για το AIDS - Σύντομος οδηγός διδασκαλίας για την πρόληψη του AIDS. Αθήνα: Αθηνών, Ελληνική Εταιρία Κοινωνικής Παιδιατρικής και Προαγωγής της Υγείας Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου.

Φραγκουδάκη, Ά. (1987). *Γλώσσα και Ιδεολογία-Κοινωνιολογική Προσέγγιση της Ελληνικής Γλώσσας* (3 εκδ.). Αθήνα: Οδυσσέας.

Fairclough, N. (2006). *Analysing Discourse-Textual analysis for social research*. Routledge Taylor & Francis Group.

Halliday, M. A. (2004). *An Introduction to Functional Grammar*. Hodder Education.

Nettleton, S. (2013). *The Sociology of Health and Illness* (3 εκδ.). Cambridge: Polity Press.

Διδακτική παρέμβαση σε μαθητές Λυκείου για την αναγνώριση των εμβολιαστικών φόβων και των αιτίων τους

ΛΑΓΩΝΙΚΑ Φωτεινή, ΜΑΥΡΙΚΑΚΗ Ευαγγελία, ΤΣΙΤΣΙΛΩΝΗ Ουρανία

1. Βιολόγος Med, Α Λύκειο Τοσίτσειο, mlagonika@gmail.com
2. Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΠΤΔΕ ΕΚΠΑ, emavrikaki@primedu.uoa.gr
3. Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ, rtsitsil@biol.uoa.gr

Περίληψη

Στη διάρκεια της σχολικής χρονιάς 2019-2020 στα πλαίσια του μαθήματος project της Β΄ Λυκείου εφαρμόσαμε σχέδιο μαθήματος σχετικά με τον εμβολιαστικό δισταγμό. Το μάθημα περιλάμβανε την παρακολούθηση βίντεο με θέμα «Γιατί οι γονείς φοβούνται τα εμβόλια», της σειράς TEDx Oslo με ομιλήτρια τη δημοσιογράφο Tara Haelle. Δημιουργήθηκε και δόθηκε στους μαθητές ερωτηματολόγιο προκειμένου να αναδειχθούν τα ψυχολογικά αίτια του εμβολιαστικού δισταγμού, με βάση την αφήγηση που παρακολούθησαν στο βίντεο. Ακολούθησε ποιοτική ανάλυση του ερωτηματολογίου, από την οποία φάνηκε ότι μέσω κατάλληλα σχεδιασμένων εκπαιδευτικών παρεμβάσεων, οι μαθητές είναι δυνατόν να κατανοήσουν ιδιαίτερα δύσκολες αφηρημένες έννοιες. Το γεγονός αυτό καθίσταται ιδιαίτερα σημαντικό στην καλλιέργεια της κριτικής σκέψης, της αυτογνωσίας, της δυνατότητας συνειδητών επιλογών συμπεριφοράς.

Λέξεις κλειδιά

εμβόλια, εμβολιαστικός δισταγμός, εκπαιδευτικές παρεμβάσεις

Εισαγωγή

Η χρήση των εμβολίων απειλείται από ένα φάσμα φόβων, παραπληροφόρησης και αντιεμβολιαστικής προπαγάνδας. Πολλή έρευνα έχει διεξαχθεί σχετικά με τις πιο κοινές παρανοήσεις σχετικά με τον εμβολιασμό, η οποία είναι χρήσιμη για την αντιμετώπιση των αντιεμβολιαστικών ισχυρισμών. Μερικοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι οι προσπάθειες να αντιμετωπιστεί ο εμβολιαστικός δισταγμός θα πρέπει να επικεντρωθούν περισσότερο στα παιδιά και τους νέους, για δύο λόγους: α) Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι, ανάλογες παρεμβάσεις στους ενήλικους, μπορούν να αποβούν αντιπαραγωγικές και να οδηγήσουν σε ενδυνάμωση των αντιεμβολιαστικών θέσεων (Nyhan et al. 2014). β) Δεδομένου ότι οι στάσεις σχετικά με τον εμβολιασμό μοιάζουν να είναι σταθερά διαμορφωμένες στην ενήλικη ζωή, αν υποθέσουμε ότι οι απόψεις συχνά διαμορφώνονται στη διάρκεια της παιδικής ζωής και της πρώιμης εφηβείας, τότε παρουσιάζεται μια ευκαιρία να ισχυροποιηθούν τα θετικά μηνύματα σχετικά με τον εμβολιασμό, μέσα από τα σχολικά προγράμματα, ώστε να επηρεάσουν τις μελλοντικές αποφάσεις των νέων ανθρώπων σχετικά με τον εμβολιασμό των δικών τους παιδιών (Carolan et al. 2018), (Hilton et al. 2013).

Καθώς ο ρόλος του εκπαιδευτικού έγκειται στο να καθοδηγήσει τους μαθητές να βρουν οι ίδιοι τις απαντήσεις σε ερωτήματα που ο ίδιος επιλέγει και σχετίζονται με την ανάδειξη των λανθασμένων ιδεών τους, είναι δηλαδή κυρίαρχο στοιχείο στη διαδικασία της μάθησης (Χαλκιά, 2008), θεωρήσαμε χρήσιμο να διερευνήσουμε εάν μια σχεδιασμένη διδακτική παρέμβαση βασισμένη στις αρχές της ευρετικής (heuristics) θα ήταν αποτελεσματική για την αναγνώριση των εμβολιαστικών φόβων και των αιτίων τους.

Μεθοδολογία έρευνας

Για τους σκοπούς της εργασίας σχεδιάστηκε μάθημα το οποίο εντάχθηκε σε ένα ευρύτερο διδακτικό σενάριο με θέμα τον εμβολιασμό που περιλάμβανε 3 μέρη:

- οι επιτυχίες και η σημασία των εμβολιασμών μέσα από επιστημονικά και ιστορικά στοιχεία,
- διερεύνηση των μεθόδων παραγωγής των εμβολίων μέσα από πηγές και
- διερεύνηση των ψυχολογικών αιτίων του εμβολιαστικού δισταγμού.

Γενικός σκοπός του σεναρίου είναι να συνειδητοποιήσουν οι μαθητές ότι «Κάλλιον του θεραπεύειν το

προλαμβάνει» ώστε να υιοθετήσουν σωστή συμπεριφορά ως προς τον εμβολιασμό, αλλά και γενικότερα η υιοθέτηση σωστών προτύπων συμπεριφοράς σε θέματα που αφορούν την υγεία τους.

Περιγραφή μαθήματος

Στόχοι

Μετά την ολοκλήρωση της διδακτικής ενότητας ο μαθητής θα πρέπει να είναι σε θέση να :

Στόχοι γνωστικοί

- αναγνωρίζει τους εμβολιαστικούς φόβους
- διακρίνει τα αίτια των εμβολιαστικών φόβων
- απαντά στους εμβολιαστικούς φόβους με επιστημονικά και ιστορικά στοιχεία.

Στόχοι δεξιοτήτων – στάσεων

- να αναπτύξει κριτική σκέψη
- να αναπτύξει θετική στάση απέναντι στην επιστημονική μέθοδο ώστε να αναγνωρίζει τις τεκμηριωμένες ιατρικές πρακτικές
- να αναπτύξει επιστημονικό τρόπο σκέψης ώστε να επιλέγει ορθολογικές πρακτικές και στάση ζωής για τη διατήρηση της υγείας του
- να αξιολογεί την αξιοπιστία των πηγών πληροφόρησης που είναι διαθέσιμες στο διαδίκτυο

Διδακτικές ενέργειες

1. Γράφουμε στον πίνακα τις ακόλουθες φράσεις:
 - ✓ Εμβολιαστικός δισταγμός= vaccine hesitancy
 - ✓ Ευρετικές μέθοδοι = Heuristics, γνωσιακές συντομεύσεις ή προδιαθέσεις (mental shortcuts)
 και ενημερώνουμε τους μαθητές ότι θα παρακολουθήσουμε ένα βίντεο σχετικά με αυτές τις έννοιες, ενώ στη συνέχεια θα συμπληρώσουν ένα σχετικό φύλλο εργασίας.
2. Μοιράζουμε το φύλλο εργασίας και προτρέπουμε τους μαθητές να διαβάσουν τις 5 πρώτες ερωτήσεις για να εντοπίσουν πιο εύκολα τις απαντήσεις στο βίντεο.
3. Παρακολουθούμε με τους μαθητές το βίντεο “Why parents fear vaccines” https://www.youtube.com/channel/UC7KxE5LbRXAP7vm1cO_abLA?view_as=subscriber
4. Στα 2 περίπου λεπτά διακόπτουμε και ζητάμε από τους μαθητές να απαντήσουν τις 5 πρώτες ερωτήσεις.
5. Συνεχίζουμε το βίντεο μέχρι τα 7.25 λεπτά, όπου διακόπτουμε και ζητάμε από τους μαθητές να απαντήσουν τις ερωτήσεις 6 ως 10.
6. Βλέπουμε το υπόλοιπο βίντεο και ζητάμε από τους μαθητές να απαντήσουν τις υπόλοιπες ερωτήσεις 10 ως 17.
7. Τέλος ζητάμε από τους μαθητές να συμπληρώσουν τις ασκήσεις αξιολόγησης στο φύλλο εργασίας.
8. Ακολουθεί συζήτηση σχετικά με τις σκέψεις που τους προκάλεσε η αφήγηση στο βίντεο.

Φύλλο εργασίας: Εμβολιαστικός δισταγμός και Γνωσιακές προδιαθέσεις

Αφού παρακολουθήσετε προσεχτικά το βίντεο, “Why parents fear vaccines” https://www.youtube.com/channel/UC7KxE5LbRXAP7vm1cO_abLA?view_as=subscriber απαντήστε στις ερωτήσεις που ακολουθούν:

Ερωτήσεις

1. Πόσοι άνθρωποι πέθαναν ή έμεναν παράλυτοι τις δεκαετίες 1940, 1950 στις ΗΠΑ;
2. Οι ασθένειες τέτανος, διφθερίτιδα, κίτρινος πυρετός αντιμετωπίζονται εμβολιαστικά;
3. Οι ασθένειες ερυθρά, ηπατίτιδα Α και Β, πνευμονιόκοκκος, μηνιγγιτιδόκοκκος αντιμετωπίζονται εμβολιαστικά;
4. Είναι δυνατόν ένα εμβόλιο να προστατεύει από καρκίνο; Εξηγήστε.
5. Τι είναι ο εμβολιαστικός δισταγμός (vaccine hesitancy);
6. Πότε και από ποια αιτία έχασε το γιο του ο Βενιαμίν Φράνκλιν;
7. Γιατί μας ενδιαφέρει αν οι άλλοι γύρω μας εμβολιάζονται ή όχι;
8. Ποια είναι η συχνότητα εμφάνισης μιας σοβαρής παρενέργειας εξαιτίας του εμβολιασμού;

9. Γιατί σήμερα ο κόσμος φοβάται περισσότερο τα εμβόλια παρά τις ασθένειες, π.χ. την πολιομυελίτιδα;
10. Σε τι μας χρησιμεύουν οι διαδικασίες σκέψης που χαρακτηρίζονται γνωσιακές συντομεύσεις (mental shortcuts: Heuristics);
11. Δώστε ένα παράδειγμα της διαδικασίας σκέψης που ονομάζεται προδιάθεση της συχνότητας (availability bias).
12. Δώστε ένα παράδειγμα της διαδικασίας σκέψης που ονομάζεται προδιάθεση της παράλειψης (omission bias).
13. Γιατί πολλοί γονείς συνδέουν την εμφάνιση αυτισμού με τον εμβολιασμό με το MMR;
14. Ποια διαδικασία σκέψης ονομάζεται προδιάθεση της επιβεβαίωσης;
15. Γιατί τα επιστημονικά δεδομένα δεν πείθουν τους γονείς που φοβούνται τα εμβόλια;
16. Πόσο επικίνδυνη είναι η φορμαλδεΰδη που υπάρχει σε ορισμένα εμβόλια;
17. Κάτω από ποιες συνθήκες λειτουργούν οι γνωσιακές προδιαθέσεις (συντομεύσεις);

Αποτελέσματα

Η ποιοτική ανάλυση των απαντήσεων των μαθητών στα ερωτηματολόγια έδειξε ότι οι μαθητές κατανόησαν σε μεγάλο βαθμό αφηρημένες έννοιες όπως είναι οι ευρετικές μέθοδοι. Μέσα από κατάλληλα σχεδιασμένες εκπαιδευτικές παρεμβάσεις, μπορούν να κατανοήσουν τον τρόπο σκέψης τους, να καλλιεργήσουν την κριτική τους ικανότητα, να «απαλλαγούν» από προκαταλήψεις. Παρόλο που το δείγμα ήταν μικρό (20 μαθητές Β Λυκείου), τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά, όσον αφορά την αποτελεσματικότητα της διδακτικής παρέμβασης. Οι μαθητές ήταν τμήματος Γενικής Παιδείας με εύρος επιδόσεων.

Συζήτηση

Οι μαθητές αγνοούν ή δεν έχουν συνειδητοποιήσει ότι η σκέψη είναι μια βιολογική λειτουργία του εγκεφάλου. Ο εγκέφαλος έχει κάποια προκαθορισμένα μοτίβα σκέψης. Οι διάφορες εκστρατείες πληροφόρησης γνωρίζουν και βασίζονται σε αυτά για να προσανατολίσουν τη σκέψη των ανθρώπων, ιδιαίτερα των νέων σε συγκεκριμένους δρόμους. Τα εκπαιδευτικά προγράμματα πρέπει να συμβάλλουν στην ικανότητα των νέων να αξιολογούν τις πληροφορίες που δέχονται από το Διαδίκτυο και τα μέσα πληροφόρησης. Η διδασκαλία της ευρετικής στους νέους μπορεί να γίνει με επιτυχία (Swinkels, 2003) ακόμη και στο σχολείο στα πλαίσια του μαθήματος Βιολογίας. Μέσω της παρακολούθησης κατάλληλα επιλεγμένων βίντεο διευκολύνεται η προσοχή, η κατανόηση αφηρημένων εννοιών και η συζήτηση για ευαίσθητα και περίπλοκα θέματα, όπως π.χ. ο εμβολιαστικός δισταγμός. Προκαλείται το ενδιαφέρον του μαθητή και η ενεργός εμπλοκή του στη μαθησιακή διαδικασία μέσω της συμμετοχής περισσότερων αισθήσεων. Έτσι, ακόμη και μαθητές που δε συμμετέχουν στο παραδοσιακό μάθημα είναι δυνατό να κατανοήσουν ιδιαίτερα δύσκολες αφηρημένες έννοιες με θετικό αποτέλεσμα στην αυτοεκτίμησή τους.

Βιβλιογραφία

- Χαλκιά, Κ. (2008). Διδάσκοντας Φυσικές Επιστήμες: Θεωρητικά ζητήματα, προβληματισμοί, προτάσεις.
- Carolan, K., Verran, J., Crossley, M., Redfern, J., Whitton, N., & Amos, M. (2018). Impact of educational interventions on adolescent attitudes and knowledge regarding vaccination: A pilot study. *PLOS ONE*, 13(1), e0190984. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190984>
- Hilton, S., Patterson, C., Smith, E., Bedford, H., & Hunt, K. (2013). Teenagers' understandings of and attitudes towards vaccines and vaccine-preventable diseases: a qualitative study. *Vaccine*, 31(22), 2543-2550.
- Nyhan B, Reifler J, Richey S, Freed GL. Effective messages in vaccine promotion: a randomized trial. *Pediatrics*. 2014; 133(4):e835–e842
- Swinkels, A. (2003). An effective exercise for teaching cognitive heuristics. *Teaching of Psychology*, 30(2), 120-122.

ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΥΓΕΙΑΣ & ΤΡΙΤΟΒΑΘΜΙΑΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ (Παρασκευή 27-11-2020)

Ανίχνευση βακτηρίων-μυκήτων, Adenovirus και SARS-Cov-2 στον αέρα εσωτερικών χώρων δομών υγείας

ΚΟΤΣΑΛΟΥ Χρυσούλα¹, ΣΤΑΥΡΟΥ Βένια², ΔΗΜΗΤΡΑΚΟΠΟΥΛΟΥ Μαρία Ελένη²,
ΒΑΝΤΑΡΑΚΗΣ Απόστολος⁴

Εργαστήριο Υγιεινής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, chrysoulakotsalou@gmail.com¹

Εργαστήριο Υγιεινής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, veniastavrou@yahoo.gr²

Εργαστήριο Υγιεινής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, dimitrakopoulou@upatras.gr³

Εργαστήριο Υγιεινής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, avanta@upatras.gr⁴

Περίληψη

Ο Αδενοϊός, παθογόνα βακτήρια και μύκητες αποτελούν κίνδυνο για τη Δημόσια Υγεία και δη για τις ευπαθής ομάδες. Παράλληλα, η Πανδημία που ξέσπασε τον Μάρτιο του 2020 οφειλόμενη στον Κορωνοϊό (Sars-Cov-2) αποτέλεσε το έναυσμα για τον σχεδιασμό της συγκεκριμένης μελέτης, με στόχο την ανίχνευση και καταμέτρησή των συγκεκριμένων ιών αλλά και βακτηρίων και μυκήτων στον αέρα δομών υγείας. Διεξήχθη έλεγχος OMX 36°C, Αδενοϊού (Adenovirus) και Κορωνοϊού (Sars-Cov-2) σε αέρα εσωτερικών χώρων δομών υγείας στην περιοχή της Πάτρας (νοσοκομεία, κλινικές, μαιευτήρια, γηροκομεία και δομές ψυχικής νοσηλείας), όπου ελέγχθηκε η μικροβιολογική ποιότητα του αέρα. Χρησιμοποιήθηκε δειγματολήπτης αέρα που υποδέχεται τρυβλία, με το κατάλληλο υπόστρωμα ανάλογα με τον μικροοργανισμό ή τον ιό που ελέγχεται. Εξετάστηκαν 31 δείγματα αέρα πολυσύχναστων χώρων δομών υγείας. Βρέθηκαν πέντε δείγματα θετικά για Αδενοϊό και κανένα θετικό για Κορωνοϊό. Παρατηρείται ότι ο αριθμός των αποικιών των βακτηρίων κυμαίνεται έως 48 και ο αριθμός των αποικιών των μυκήτων έως 12 ανά 450 lt αέρα

Λέξεις κλειδιά

Δειγματοληψία αέρα, Βακτήρια, Μύκητες, Αδενοϊός, Sars-Cov-2

Εισαγωγή

Υπάρχει πληθώρα μικροοργανισμών στον εξωτερικό και εσωτερικό αέρα. Τα βακτήρια του εξωτερικού αέρα προέρχονται κυρίως από χώμα και φυτά.(Barberán et al., 2015) Σε εσωτερικούς χώρους, τα αερομεταφερόμενα παθογόνα αποτελούν μέρος αερολυμάτων που διαδίδονται μέσω συστημάτων θέρμανσης, εξαερισμού, κλιματισμού ή υγραντήρα (HVAC) των κτιρίων. Ο εξοπλισμός HVAC και η πυκνότητα του πληθυσμού πρέπει να ληφθούν υπόψη για να αποφευχθεί η εξάπλωση παθογόνων μικροοργανισμών μέσω του αέρα.(Gonzalez, 2019) Ο ανεπαρκής σχεδιασμός των κτιρίων οδηγεί σε μειωμένη ανανέωση αέρα, περιορισμό του φυσικού φωτός και ευνοεί την αύξηση της συγκέντρωσης και της διάδοση των αερομεταφερόμενων παθογόνων βακτηρίων που μπορούν να προκαλέσουν ανθρώπινες ασθένειες.(Balloy and Chignard, 2009)

Όσον αφορά τους εισπνεόμενους ιούς οι κύριες οδοί μετάδοσης από άτομο σε άτομο είναι οι εξής:

- 1) η άμεση ή έμμεση επαφή με μολυσμένο άτομο,
- 2) τα μεγάλα σταγονίδια που εκπέμπονται από βήχα / φτάρνισμα που φτάνει σε ένα μη μολυσμένο άτομο
- 3) η εισπνοή μικρών αερομεταφερόμενων σωματιδίων που παραμένουν στον αέρα.(Eissenberg et al., 2020)

Πιο συγκεκριμένα ο Κορωνοϊός μεταδίδεται με σταγονίδια (>5μm) που πέφτουν γρήγορα στο έδαφος και αερολύματα δηλαδή μικρότερα σωματίδια (<5μm) που εξατμίζονται γρήγορα στον αέρα, αφήνοντας πίσω τους πυρήνες σταγονιδίων που αιωρούνται στον αέρα για ώρες. Έρευνες έχουν δείξει ότι η ομιλία και ο βήχας παράγουν ένα μείγμα τόσο σταγονιδίων όσο και αερολυμάτων που μπορούν να ταξιδέψουν μαζί για πάνω από 27 πόδια. (Lee et al., 2001)

Οι κατάλληλοι έλεγχοι ποιότητας αέρα κρίνονται απαραίτητοι για τη μείωση των βιολογικών κινδύνων σε κλειστούς χώρους και την λήψη των κατάλληλων μέτρων. Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν οι μικροβιακοί έλεγχοι αέρα σε 31 εσωτερικούς χώρους δέκα δομών παροχής υγείας της Αχαΐας. Μελετήθηκε η ολική μεσόφιλη χλωρίδα (OMX 36°C) στους 36°C και η παρουσία

Αδενοϊού και Κορωνοϊού στον αέρα των χώρων αυτών.

Υλικά και Μέθοδοι

Μεθοδολογία ανίχνευσης και καταμέτρηση των βακτηρίων και μυκήτων (OMX 36°C) σε δείγμα αέρα:

Η δειγματοληψία αέρα πραγματοποιήθηκε με τον δειγματολήπτη Surface Air System (SAS International Pbi, Italy), όπου τρυβλία των 60mm προσαρμόστηκαν στην ειδική υποδοχή και ακολούθησε εισρόφηση 450 lt αέρα. Πραγματοποιήθηκε επώαση στους 36 °C για δύο ημέρες σύμφωνα με το πρωτόκολλο ISO 6222 και καταμέτρηση των αποικιών. Καταγράφηκε ξεχωριστά ο αριθμός των αποικιών των μυκήτων και των βακτηρίων.

Μεθοδολογία ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης ιών σε δείγμα αέρα:

Για την δειγματοληψία αέρα χρησιμοποιήθηκε ο δειγματολήπτης Surface Air System (SAS International Pbi, Italy). Τρυβλία LMA των 60mm προσαρμόστηκαν στην ειδική υποδοχή τους και ακολούθησε εισρόφηση 450 lt αέρα. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA ή RNA με NucliSENS Extraction Reagents και Nuclisens Lysis Buffer. Για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του Αδενοϊού ακολούθησε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qPCR). Για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του Κορωνοϊού ακολούθησε αντίστροφη μεταγραφή και συνέχεια αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-qPCR)

Πίνακας 1 : Primers και οι probes που χρησιμοποιήθηκαν για τους 2 ιούς

		Primers	Probes
Adeno virus	AdF	5'- CWTACATGCACATCKCSGG -3'	
	AdR	5'- CRCGGGCRAAYTGCACCAG -3'	
	AdP1		5'-FAM- CCGGGCTCAGGTACTCCGAG GCGTCCT-TAMRA-3'
Coronav irus	E_Sarbeco F1	ACAGGTACGTTAATAGTTA ATAGCGT	
	E_Sarbeco R2	ATATTGCAGCAGTACGCAC ACA	
	E_Sarbeco P1		ACACTAGCCATCCTTACTGCG CTTCG [5']Fam [3']BHQ-1

Αποτελέσματα

Παρατηρείται ότι ο αριθμός των βακτηρίων κυμαίνεται από 0 έως 48 αποικίες στα 450 lt αέρα και ο αριθμός των μυκήτων-ζυμών από 0 έως 12 αποικίες. Μόνο σε 2 από τους 31 χώρους δεν ανιχνευθήκαν βακτήρια στον αέρα και σε 6 χώρους δεν βρέθηκαν μύκητες. Καμία δομή δεν ήταν απαλλαγμένη από βακτήρια ή μύκητες σε όλους τους χώρους που μελετήθηκαν. Σε τέσσερις από τις 10 δομές και 5 από τους 31 εσωτερικούς χώρους ανιχνεύτηκε Αδενοϊός. Το 100% των δομών ήταν απαλλαγμένο από τον Κορωνοϊό στον αέρα.

Πίνακας 2 : Αποτελέσματα βακτηρίων, μυκήτων και ιών ανά δομή και χώρο

ΜΟΝΑΔΕΣ	ΣΗΜΕΙΟ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ	ΒΑΚΤΗΡΙΑ	ΖΥΜΕΣ-ΜΥΚΗΤΕΣ	ΑΔΕΝΟΪΟΣ	ΚΟΡΩΝΟΪΟΣ
Νοσοκομείο 1	Παθολογικό Ιατρείο	2	7	Απουσία	Απουσία
	Fast track	23	6	Απουσία	Απουσία
	Διαλογή	31	3	Απουσία	Απουσία
Νοσοκομείο 2 (παίδων)	Διαλογή	20	2	Παρουσία	Απουσία
	Χειρουργείο	48	2	Απουσία	Απουσία
	Αίθουσα πρόωρων	28	4	Απουσία	Απουσία
Νοσοκομείο 3	Δωμάτιο διεγματολ. Covid-19	29	3	Απουσία	Απουσία
	Αρνητική πίεση Covid-19	1	0	Απουσία	Απουσία
	Οφθαλμολογική δωμάτιο Α102	15	1	Απουσία	Απουσία
	ΜΕΘ Covid-19	3	0	Απουσία	Απουσία
Κλινική 1	Κεντρική είσοδος	30	10	Απουσία	Απουσία
	Αίθουσα αναμονής 1ος	6	9	Απουσία	Απουσία
	2ος Όροφος	14	8	Απουσία	Απουσία
Κλινική 2	Αναμονή ακτινολογικού	31	0	Απουσία	Απουσία
	Κυλικείο	16	1	Απουσία	Απουσία
	Αναμονή μαιευτηρίου	22	0	Απουσία	Απουσία
Δομή ψυχικής νοσηλείας	Ασανσέρ	8	6	Απουσία	Απουσία
	Τραπεζαρία	12	5	Απουσία	Απουσία
	Καθιστικό	17	2	Απουσία	Απουσία
Κέντρο ημέρας	Καθιστικό 1	22	7	Απουσία	Απουσία
	Κουζίνα	19	0	Απουσία	Απουσία
	Καθιστικό 2	7	1	Παρουσία	Απουσία
Μαιευτήριο	Αίθουσα Τοκετών	13	1	Παρουσία	Απουσία
	Αίθουσα Επισκεπτών	11	3	Απουσία	Απουσία
	Αίθουσα αναμονής 2ος	22	2	Παρουσία	Απουσία
Γηροκομείο 1	Τραπεζαρία Ισόγειο	33	2	Απουσία	Απουσία
	Κουζίνα	33	12	Παρουσία	Απουσία
	Καθιστικό	38	0	Απουσία	Απουσία
Γηροκομείο 2	Τραπεζαρία	2	10	Απουσία	Απουσία
	Κουζίνα	0	10	Απουσία	Απουσία
	Δωμάτιο	0	5	Απουσία	Απουσία

Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα των δειγματοληψιών έδειξαν ότι τα βακτήρια και οι μύκητες είναι παρόντα στους εσωτερικούς χώρους δημόσιων και ιδιωτικών δομών υγείας, γεγονός που συμφωνεί με την έρευνα των Warner *Et al.* (Warner et al., 1963), οι οποίοι συνδέουν αποτελεσματικά την ύπαρξη βακτηρίων στον αέρα νοσοκομείων με την ανθρώπινη δραστηριότητα.

Ο Αδενοϊός ανιχνεύτηκε στο 17,8% του συνόλου των εσωτερικών χώρων των δομών, ποσοστό που συμφωνεί με τα αποτελέσματα της έρευνας των Wan *Et al.* (Wan et al., 2012) οι οποίοι βρήκαν θετικό το 18,3% των δειγμάτων αέρα των επειγόντων της παιδιατρικής. Βάση των Echavarria *M. Et al.* (Echavarria et al., 2000) οι οποίοι υποστηρίζουν ότι η ύπαρξη του ιού στον αέρα σχετίζεται με την παρουσία στον χώρο φορέων του ιού, συμπεραίνουμε πως στους χώρους που ανιχνεύθηκε Αδενοϊός παρευρεθήκαν φορείς του ιού.

Η έλλειψη θετικών δειγμάτων στον Κορωνοϊό βάση της επιστημονική έρευνα των Liu *Et al.* (Liu et al., 2020) μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι στους χώρους αυτούς δεν υπήρξε ασθενής για να απελευθερώσει μολυσμένα αερολύματα με Κορωνοϊό. Επίσης στο νοσοκομείο 3, που αποτελεί κέντρο αναφοράς ασθενών με Κορωνοϊό, δεν ανιχνεύτηκε ο ιός, δεδομένου ότι μεσολάβησε μια εβδομάδα από τη νοσηλεία ασθενούς με Covid-19. Το γεγονός αυτό συμφωνεί με την μελέτη των Doremalen *Et al.* (Doremalen et al., 2020) που υποστηρίζει ότι η ημίσεια ζωή του ιού στον αέρα κυμαίνεται από 1.1 με 1.2 ώρες.

Βιοβιβλιογραφία

- Barberán, A., Ladau, J., Leff, J. W., Pollard, K. S., Menninger, H. L., Dunn, R. R., & Fierer, N. (2015). Continental-scale distributions of dust-associated bacteria and fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18), 5756-5761.
- Gonzalez-Martin, C. (2019). Airborne infectious microorganisms. *Encyclopedia of Microbiology*, 52.
- Balloy, V., & Chignard, M. (2009). The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*. *Microbes and Infection*, 11(12), 919-927.
- Eissenberg, T., Kanj, S. S., & Shihadeh, A. L. (2020). Treat COVID-19 as Though It Is Airborne: It May Be. *AANA journal*, 88(3), 29.
- Lee, M. S., Chang, P. C., Shien, J. H., Cheng, M. C., & Shieh, H. K. (2001). Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *Journal of virological methods*, 97(1-2), 13-22.
- Warner, P., & Glassco, A. (1963). Enumeration of airborne bacteria in hospital. *Canadian Medical Association Journal*, 88(26), 1280.
- Wan, G. H., Huang, C. G., Huang, Y. C., Huang, J. P., Yang, S. L., Lin, T. Y., & Tsao, K. C. (2012). Surveillance of airborne adenovirus and *Mycoplasma pneumoniae* in a hospital pediatric department. *PLoS One*, 7(3), e33974.
- Echavarria, M., Kolavic, S. A., Cersovsky, S., Mitchell, F., Sanchez, J. L., Polyak, C., ... & Binn, L. N. (2000). Detection of adenoviruses (AdV) in culture-negative environmental samples by PCR during an AdV-associated respiratory disease outbreak. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(8), 2982-2984.
- Liu, Y., Ning, Z., Chen, Y., Guo, M., Liu, Y., Gali, N. K., ... & Liu, X. (2020). Aerodynamic analysis of SARS-CoV-2 in two Wuhan hospitals. *Nature*, 582(7813), 557-560.
- Van Doremalen, N., Bushmaker, T., Morris, D. H., Holbrook, M. G., Gamble, A., Williamson, B. N., ... & Lloyd-Smith, J. O. (2020). Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *New England Journal of Medicine*, 382(16), 1564-1567.

Πολυμορφισμοί του συστήματος RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosterone) και ο ρόλος τους στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης

- Ιωάννα ΦΑΡΜΑΚΙΩΤΗ, *Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, ioannafarmakioti@gmail.com*
- Μαρία ΠΑΠΑΘΑΝΑΣΙΟΥ, *Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, marionp03@gmail.com*
- Βασίλειος ΤΖΩΡΤΖΗΣ, *Ουρολογική Κλινική, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, vtzortzis@med.uth.gr*
- Μαρία ΣΑΤΡΑ, *Εργαστήριο Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, msatra@med.uth.gr*
- Μαρία ΙΩΑΝΝΟΥ, *Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, mioan@med.uth.gr*
- Γεώργιος ΚΟΥΚΟΥΛΗΣ, *Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, kougeo@med.uth.gr*
- Μαρία ΣΑΜΑΡΑ, *Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, msamar@med.uth.gr*

Περίληψη

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης αποτελεί το δέκατο συχνότερο τύπο καρκίνου. Η υπερέκφραση πολλών συστατικών του συστήματος RAAS στους ιστούς έχει αναδείξει το ρόλο του στην καρκινογένεση. Πλήθος πολυμορφισμών επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων και επιδρούν στην καρκινογένεση αυξάνοντας τον κίνδυνο ή δρώντας προστατευτικά. Μελετήσαμε την κατανομή των πολυμορφισμών rs5186 (A1166C) του *AT1R* γονιδίου, rs11091046 (C3123A) του *AT2R* γονιδίου, rs12750834 (C5312T) του *REN* γονιδίου και rs4762 (C620T), rs699 (T803C) του *ANG* γονιδίου στον ελληνικό πληθυσμό και τον πιθανό ρόλο τους στον κίνδυνο εμφάνισης ουροθηλιακού καρκίνου. Οι rs5186, rs11091046 των *AT1R* και *AT2R* γονιδίων φαίνεται να έχουν προστατευτική δράση. Η παρουσία των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων στους rs11091046 και rs4762 συνδέεται με μικρότερης διαμέτρου όγκους.

Λέξεις-Κλειδιά

καρκίνος ουροδόχου κύστης, σύστημα RAAS, πολυμορφισμοί

Εισαγωγή

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης αποτελεί κατέχει τη δέκατη σε συχνότητα θέση παγκοσμίως με υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης στην Νοτιοδυτική Ευρώπη και στη Βόρεια Αμερική. Είναι τέσσερις φορές συχνότερος στα άρρενα άτομα σε σχέση με τα θήλεα και εμφανίζεται κυρίως σε άτομα μέσης και άνω ηλικίας με μέση ηλικία διάγνωσης τα 73 έτη. Η Ελλάδα καταλαμβάνει τη δεύτερη σε συχνότητα εμφάνισης θέση μετά το Λίβανο. Η πλειοψηφία των καρκίνων της ουροδόχου κύστης εντοπίζονται σε πρώιμο στάδιο κι ως εκ τούτου τα ποσοστά επιβίωσης είναι υψηλά. Οι κυριότεροι παράγοντες κινδύνου εμφάνισης της νόσου είναι το κάπνισμα και η επαγγελματική έκθεση σε καρκινογόνες ουσίες, ενώ υπάρχουν ενδείξεις και για τη λήψη μεγάλων ποσοτήτων αναλγητικών και τις χρόνιες λοιμώξεις (Cumberbatch et al 2018). Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης δεν θεωρείται κληρονομικού τύπου, ωστόσο, ορισμένα σύνδρομα προδιαθέτουν για την εμφάνισή του. Ιστολογικά, το 90% των περιπτώσεων είναι ουροθηλιακά καρκινώματα. Η εντοπισμένη νόσος έχει εξαιρετική πρόγνωση, αλλά στον μυοδιηθητικό καρκίνο τα ποσοστά επιβίωσης μειώνονται εξαιρετικά.

Το σύστημα Ρενίνης-Αγγειοτενσίνης-Αλδοστερόνης (RAAS) είναι η κύρια ενδοκρινής οδός που εμπλέκεται στη ρύθμιση των καρδιαγγειακών, νεφρικών και νευροενδοκρινικών λειτουργιών (Passos-Silva, Brandan & Santos 2015, Patel et al 2017, Smyth et al 2019). Ρυθμίζει την πίεση του αίματος και την ηλεκτρολυτική ισορροπία συμβάλλοντας στη διατήρηση της ομοιόστασης. Η τοπική έκφραση του RAAS σε όργανα και ιστούς ανέδειξε το ρόλο του στην αγγειογένεση, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην απόπτωση και στη φλεγμονή (Amme, Walter & Ross 2010, Munro et al 2017, Wegman et al 2015,

Wolgien et al 2016). Επιπρόσθετα, η ποικίλη έκφραση συστατικών του RAAS σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου καταδεικνύει την εμπλοκή του στην καρκινογένεση, στην αύξηση του όγκου και στο μεταστατικό δυναμικό (Amme, Walter & Ross 2010). Η οδός σηματοδότησης AngII/AT1R συμβάλλει στο ανοσοκατασταλτικό μικροπεριβάλλον όγκου με πολλούς τρόπους, καθιστώντας τους αναστολείς RAS σημαντικούς στη θεραπεία του καρκίνου (Blute et al 2015, Pallasch & Schumacher 2020, Pei et al 2017, Perini et al 2020, Printer & Jain 2017). Μελέτες έχουν αναδείξει πλήθος πολυμορφισμών στα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες του συστήματος RAAS (Amme, Walter & Ross 2010, Cheng & Liu 2019, Deckers et al 2015, Fishchuk & Gorovenko 2013, Lin, Chen & Liu 2015, Liu et al 2016, Pringle et al 2016, Xi et al 2011). Οι θέσεις πολλών πολυμορφισμών στην 3' ρυθμιστική περιοχή ή κοντά σε ενισχυτές επηρεάζουν τη μεταγραφή και την έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων (Fuchs et al 2002, Jeunemaitre et al 1992, Sethupathy et al 2007). Σκοπός της εργασίας είναι η μελέτη της κατανομής συγκεκριμένων πολυμορφισμών γονιδίων του συστήματος RAAS στον ελληνικό πληθυσμό και ο πιθανός ρόλος τους στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης.

Μέθοδοι

Συλλέξαμε περιφερικό αίμα από 44 υγιή άτομα, 25 άρρενες (56.82%) και 19 θήλεα άτομα (43.18%) ηλικίας μικρότερης των 30 ετών και 54 ασθενείς με ουροθηλιακό καρκίνο, 50 άρρενες (92.59%) και 4 θήλεα (7.41%) διάμεσης ηλικίας 70 ± 10 έτη. Απομονώσαμε γενωμικό DNA και ακολούθησε PCR και RFLP ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα για τους μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς rs5186 (A1166C) του *AT1R* γονιδίου, rs11091046 (C3123A) του *AT2R* γονιδίου, rs12750834 (C5312T) του *REN* γονιδίου και rs4762 (C620T), rs699 (T803C) του *ANG* γονιδίου. Συλλέξαμε κλινικές πληροφορίες για παραμέτρους όπως το στάδιο, ο βαθμός κακοήθειας, η υποτροπή, ο αριθμός των χημειοθεραπειών, ο αριθμός και η διάμετρος του όγκου, το κάπνισμα και η κατανάλωση αλκοόλ. Έγινε συσχέτιση των κλινικοεργαστηριακών ευρημάτων με την παρουσία των πολυμορφισμών και στατιστική επεξεργασία με το πρόγραμμα SPSS v22 και τη χ^2 δοκιμασία.

Αποτελέσματα

Στα υγιή άτομα, για τον πολυμορφισμό rs5186, 13/44 (29.5%) φέρουν το αλληλόμορφο A (A/A) και 31/44 (70.5%) φέρουν το αλληλόμορφο C (A/C, C/C). 29/54 ασθενείς (53.7%) έχουν γονότυπο A/A και 25/54 (46.3%) φέρουν το αλληλόμορφο C σε ετεροζυγωτία. Η παρουσία του αλληλομόρφου C είναι λιγότερο συχνή στους ασθενείς. Η συσχέτιση είναι στατιστικώς σημαντική ($p=0.016$), αναδεικνύοντας έναν πιθανό προστατευτικό ρόλο έναντι του κινδύνου εμφάνισης του ουροθηλιακού καρκινώματος (OR= 0.3, 95% CI= 0.15-0.8). Ο πολυμορφισμός rs11091046 είχε την ακόλουθη κατανομή: στα υγιή άτομα, 5/44 (11.36%) είχαν γονότυπο C/C, ενώ το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο A ήταν παρόν σε 39/44 άτομα (88.64%) συνολικά. Στους ασθενείς το αλληλόμορφο A (γονότυποι A/C, A/A) ήταν παρόν σε 26/54 άτομα (48.15%). Η παρουσία του A αλληλομόρφου είναι λιγότερο συχνή στους ασθενείς υποδηλώνοντας έναν πιθανό προστατευτικό ρόλο ($p<0.001$) (OR= 0.12, 95% CI= 0.04- 0.35). Ο πολυμορφισμός rs12750834 του *REN* γονιδίου έδειξε ανάλογη κατανομή στις δύο ομάδες (υγιείς – ασθενείς). Όλοι οι ασθενείς (54/54, 100%) και η πλειοψηφία των υγιών ατόμων (42/44, 95.45%) έφεραν το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο T ($p>0.05$). Για το *ANG* γονίδιο εξετάσαμε τους πολυμορφισμούς rs4762 και rs699. Σχετικά με τον πρώτο πολυμορφισμό, το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο T κατανέμεται εξίσου σχεδόν στις δύο ομάδες, σε ποσοστό της τάξης 25% και βρίσκεται μόνο σε ετεροζυγωτία ($p>0.05$). Ο rs699 πολυμορφισμός του *ANG* γονιδίου δείχνει ανάλογη κατανομή στις δύο ομάδες ($p>0.05$). Σημειώνεται ωστόσο, ότι ενώ στα υγιή άτομα το T αλληλόμορφο απαντάνται σε ομοζυγωτία σε 11/44 υγιή άτομα (25.00%), όλοι οι ασθενείς (54/54, 100%) φέρουν σε ομοζυγωτία το αλληλόμορφο T (γονότυπος T/T). Στη συνέχεια εξετάσαμε τους πολυμορφισμούς σε σχέση με τα κλινικοεργαστηριακά ευρήματα. Η διάμετρος του όγκου συσχετίστηκε με την κατανομή των πολυμορφισμών rs11091046 και rs4762 των *AT2R* και *ANG* γονιδίων αντίστοιχα. Ασθενείς με διάμετρο όγκου ≤ 2 εκ. έφεραν στην πλειοψηφία τους το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο A (14/22, 63.64%). Η συσχέτιση που προκύπτει είναι στατιστικώς σημαντική ($p=0.027$). Όσον αφορά στον rs4762 πολυμορφισμό του *ANG* γονιδίου, οι ασθενείς με διάμετρο όγκου > 2 εκ. έφεραν στην πλειοψηφία τους το γονότυπο C/C. Η παρουσία του T αλληλομόρφου σχετίζεται με μικρότερης διαμέτρου, ≤ 2 εκ. όγκους

($p=0.03$). Αναφορικά με την κατανάλωση αλκοόλ, 42/54 ασθενείς (77.78%) κατανάλωναν αλκοόλ. Οι ασθενείς που κατανάλωναν αλκοόλ έφεραν όλοι (42/42, 100%) το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο T (γονότυποι C/T 50%, T/T 50%). Οι ασθενείς που δεν κατανάλωναν αλκοόλ έφεραν στην πλειοψηφία τους τον γονότυπο T/T (36/42, 85.7%) ($p=0.009$).

Συμπεράσματα

Οι πολυμορφισμοί rs5186 (A1166C, C αλληλόμορφο) και rs11091046 (C3123A, A αλληλόμορφο) των *AT1R* και *AT2R* γονιδίων φαίνεται να έχουν προστατευτική δράση. Οι πολυμορφισμοί των γονιδίων *REN* γονιδίου και *ANG* δεν έχουν επίδραση έναντι του κινδύνου εμφάνισης ουροθηλιακού καρκίνου. Η παρουσία των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων των πολυμορφισμών rs11091046 και rs4762 συνδέεται με μικρότερης διαμέτρου όγκους. Χρειάζεται εκτενέστερη ανάλυση σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων.

Βιβλιογραφία

- Amme, J. G., Walter, G. T., & Ross, D. H. (2010). The renin-angiotensin system and cancer: Old dog, new tricks. *Nature Reviews Cancer*, 10, 745-759.
- Blute, M. L., Rushmer, T. J., Shi, F., Fuller, B. J., Abel, E. J., Jarrard, D. F., Downs, T. M. (2015). Renin-Angiotensin Inhibitors Decrease Recurrence after Transurethral Resection of Bladder Tumor in Patients with Nonmuscle Invasive Bladder Cancer. *Journal of Urology*, 194(5), 1214–1219.
- Cheng, Z., & Liu, Z. (2019). Renin-angiotensin system gene polymorphisms and colorectal cancer risk: a meta-analysis. *JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 20(4), 1-6.
- Cumberbatch, M. G. K., Jubber, I., Black, P. C., Esperto, F., Figueroa, J. D., Kamat, A. M., Catto, J. W. F. (2018). Epidemiology of Bladder Cancer: A Systematic Review and Contemporary Update of Risk Factors in 2018. *European Urology*, 74(6), 784-795.
- Deckers, I. A., Van Den Brandt, P. A., Van Engeland, M., Van Schooten, F. J., Godschalk, R. W., Keszei, A. P., Schouten, L. J. (2015). Polymorphisms in genes of the renin-angiotensin-aldosterone system and renal cell cancer risk: Interplay with hypertension and intakes of sodium, potassium and fluid. *International Journal of Cancer*, 136(5), 1104–1116.
- Fishchuk, L. E., & Gorovenko, N. G. (2013). *GENETIC POLYMORPHISMS OF THE RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM IN BREAST CANCER PATIENTS*. *Experimental Oncology*, 35(2), 101-104.
- Fuchs, S., Philippe, J., Germain, S., Mathieu, F., Jeunemaitre, X., Corvol, P., Pinet, F. (2002). Functionality of two new polymorphisms in the human renin gene enhancer region. *Journal of Hypertension*, 20(12), 2391–2398.
- Jeunemaitre, X., Soubrier, F., Kotelevtsev, Y. V., Lifton, R. P., Williams, C. S., Charu, A., Corvol, P. (1992). Molecular basis of human hypertension: Role of angiotensinogen. *Cell*, 71(1), 169–180.
- Lin, J., Chen, J., & Liu, C. (2015). AGT M235T variant is not associated with risk of cancer. *JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 16(2), 448–452.
- Liu, Z., Weng, M., Dai, F., Zhang, Y., & Wu, S. (2016). The relationship between angiotensin II type 1 receptor gene A1166C polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 9(6), 9134-9142.
- Munro, M. J., Wickremesekera, A. C., Davis, P. F., Marsh, R., Tan, S. T. (2017). Renin-Angiotensin system and cancer: A review. *Integrative Cancer Science and Therapeutics*, 4(2), 1-6.
- Pallasch, F. B., & Schumacher, U. (2020). Angiotensin Inhibition, TGF- β and EMT in Cancer. *Cancers*, 12(10), 2-22.
- Passos-Silva, D. G., Brandan, E., & Santos, R. A. S. (2015). Angiotensins as therapeutic targets beyond heart disease. *Trends in Pharmacological Sciences*. 36(5), 310-320.
- Patel, S., Rauf, A., Khan, H., & Abu-Izneid, T. (2017). Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 94, 317–325.

- Pei, N., Mao, Y., Wan, P., Chen, X., Li, A., Chen, H., Li, H. (2017). Angiotensin II type 2 receptor promotes apoptosis and inhibits angiogenesis in bladder cancer. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 36(1), 1-12.
- Perini, M. V., Dmello, R. S., Nero, T. L., & Chand, A. L. (2020). Evaluating the benefits of renin-angiotensin system inhibitors as cancer treatments. *Pharmacology and Therapeutics*, 211, 1-18.
- Pinter, M., & Jain, R. K. (2017). Targeting the renin-angiotensin system to improve cancer treatment: Implications for immunotherapy. *Science Translational Medicine*, 9, 1-11.
- Pringle, K. G., Delforce, S. J., Wang, Y., Ashton, K. A., Proietto, A., Otton, G., Lumbers, E. R. (2016). Renin-angiotensin system gene polymorphisms and endometrial cancer. *Endocrine Connections*, 5(3), 128–135.
- Wegman, O. T., Soto, R. E., Vidal, M. S., & Sánchez, C. J. (2015). The renin-angiotensin system meets the hallmarks of cancer. *JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 16(2), 227-233.
- Xi, B., Zeng, T., Liu, L., Liang, Y., Liu, W., Hu, Y., & Li, J. (2011). Association between polymorphisms of the renin-angiotensin system genes and breast cancer risk: A meta-analysis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 130(2), 561–568.

Μελέτη της Χρόνιας Νόσου των νεφρών μέσω πρωτεομικής τοπολογικής και single cell ανάλυσης ιστολογικών δειγμάτων

ΧΡΥΣΟΠΟΥΛΟΥ Μαρία, ΖΑΡΕΙΦΗ Δανάη-Στέλλα, ΑΛΕΞΟΠΟΥΛΟΣ Λεωνίδας
Σχολή Μηχανολόγων Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, mari.chrysopoulou@gmail.com
Σχολή Μηχανολόγων Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, danae.zar@gmail.com
Σχολή Μηχανολόγων Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, leo@mail.ntua.gr

Περίληψη

Η χρόνια νόσος των νεφρών αποτελεί μία πολυπαραγοντική συστημική ασθένεια που καταλήγει σε νεφρική ανεπάρκεια. Η έγκαιρη διάγνυσή της, απαιτεί ακριβείς δείκτες, γι αυτό η έρευνα στρέφεται πλέον σε συστημικές προσεγγίσεις και τη διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών της ασθένειας. Στην παρούσα εργασία, βελτιστοποιήθηκε και εφαρμόστηκε ένα πρωτόκολλο πολυπλεκτικού ανοσοφθορισμού σε τομές ιστών νεφρών, από υγιή άτομα και ασθενείς των σταδίων 2 και 3 της νόσου. Επίσης, αναπτύχθηκε μια σειρά βημάτων επεξεργασίας των εικόνων η οποία ανέδειξε πληροφορίες ως προς την έκφραση και τη χωρική τους κατανομή σε διαφορετικές νεφρικές περιοχές. Ελέγχθηκε η ταυτόχρονη έκφραση και τοπολογική κατανομή 40 πρωτεϊνών σε κάθε τομή, από τις οποίες 15 εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ υγιών και ασθενών, ενώ επιβεβαιώθηκε και η συμμετοχή αυτών σε σημαντικά για τη νόσο μοριακά μονοπάτια. Η καινοτόμα αυτή ερευνητική προσέγγιση προσφέρει υψηλές δυνατότητες εξέλιξης και κλινικής εφαρμογής.

Λέξεις-Κλειδιά

Χρόνια νεφρική νόσος, πρωτεομική ανάλυση, χωρική κατανομή πρωτεϊνών, πολυπλεκτικός ανοσοφθορισμός, ανάλυση εικόνας

Εισαγωγή

Η χρόνια νεφρική νόσος (XNN) είναι μια συστημική ασθένεια που περιλαμβάνει ένα εύρος παθολογικών καταστάσεων των νεφρών που χαρακτηρίζονται από προοδευτική βλάβη και απώλεια λειτουργίας τους και οδηγεί σε νεφρική ανεπάρκεια. Οι αρχικές της αιτιολογίες είναι πολυποίκιλες, με κύριες τον διαβήτη τύπου II, παθολογίες του καρδιαγγειακού συστήματος και την παχυσαρκία. Η διάγνυσή της βασίζεται στην μέτρηση του πειραματικού ρυθμού διήθησης (GFR), στα επίπεδα αλβουμινουρίας και σε βιοψίες ιστών. Ωστόσο, οι μετρήσεις αυτές δεν διαθέτουν την απαιτούμενη ευασθησία και ειδικότητα (Kiryluk et al. 2018), ενώ δεν έχουν βρεθεί ακόμα δείκτες αντιπροσωπευτικοί του σταδίου και της αρχικής αιτιολογίας της ασθένειας.

Σύγχρονες διαγνωστικές μέθοδοι της νόσου θα πρέπει να βασίζονται σε συστημικές προσεγγίσεις και σε ομάδες δεικτών με συσχετιζόμενη λειτουργία, συνεπώς είναι αναγκαία η διερεύνηση των υποκείμενων μηχανισμών της XNN. Μια κοινή διαγνωστική και ερευνητική τεχνική για τη XNN είναι η εφαρμογή πρωτοκόλλων ανοσοϊστοχημείας και ανοσοφθορισμού, ενώ η αποτελεσματικότερη εφαρμογή αυτών απαιτεί την ταυτόχρονη πολυπλεκτική μέτρηση έκφρασης πρωτεϊνών στην ίδια τομή και την συνδυαστική ανάλυσή τους. Ένα τέτοιο πρωτόκολλο πολυπλεκτικού ανοσοφθορισμού είναι και το πρωτόκολλο Multiple Iterative Labeling by Antibody Neodeposition (MILAN) που αναπτύχθηκε από τους Cattoretti et al. (2019).

Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι η μελέτη των υποκείμενων μηχανισμών της XNN με χρήση του πρωτοκόλλου MILAN και τοπολογική ανάλυση της έκφρασης πρωτεϊνών σε επίπεδο κυττάρου.

Μέθοδοι

Αρχικά έγινε εφαρμογή του πρωτοκόλλου MILAN, σε τομές από υγιείς και ασθενείς, μονιμοποιημένες σε φορμαλίνη και παραφίνη (Πανεπιστήμιο Άαχεν). Αρχικά, έγινε ανάκτηση αντιγόνων μέσω χημικής και θερμικής επεξεργασίας των τομών. Ακολούθησε ο λεγόμενος κύκλος χρώσης και αφαίρεσης αντισωμάτων, που επαναλήφθηκε 20 φορές, και περιλαμβάνει την εφαρμογή αντισωμάτων για την πρωτεΐνη-στόχο, και φθορίζοντων αντισωμάτων εντοπισμού, λήψη εικόνων από τη χρώση των

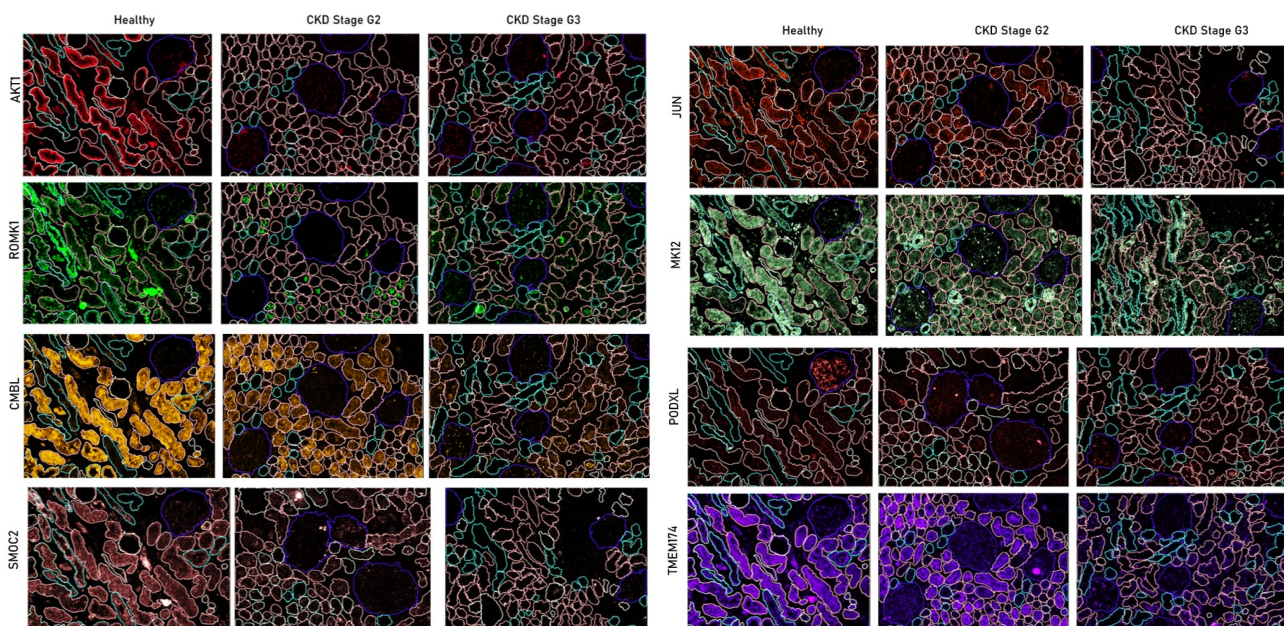
αντισωμάτων, αφαίρεση των αντισωμάτων με θέρμανση σε β-μερκαπτοαιθανόλη και λήψη εικόνων μετά την αφαίρεση. Συνολικά ελέγχθηκαν 40 αντισώματα.

Η ανάλυση των εικόνων πραγματοποιήθηκε μέσω των προγραμμάτων ελεύθερου λογισμικού Fiji και QuPath. Στο λογισμικό Fiji γράφτηκε κώδικας που περιλαμβάνει ευθυγράμμιση των εικόνων, αφαίρεση του αυτοφθορισμού του ιστού, οργάνωση σε συστάδες και εφαρμογή ψευδοχρώσεων για την κάθε πρωτεΐνη. Οι συστάδες μεταφέρθηκαν στο QuPath για αναγνώριση των κυττάρων, των νεφρικών περιοχών (εγγείς και άπω εσπειραμένα σωληναρία και σπειραμάτα) και την ποσοτική μέτρηση της έντασης φθορισμού κάθε πρωτεΐνης σε κάθε κύτταρο και σε κάθε περιοχή. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με ANOVA, k-clustering και tSNE.

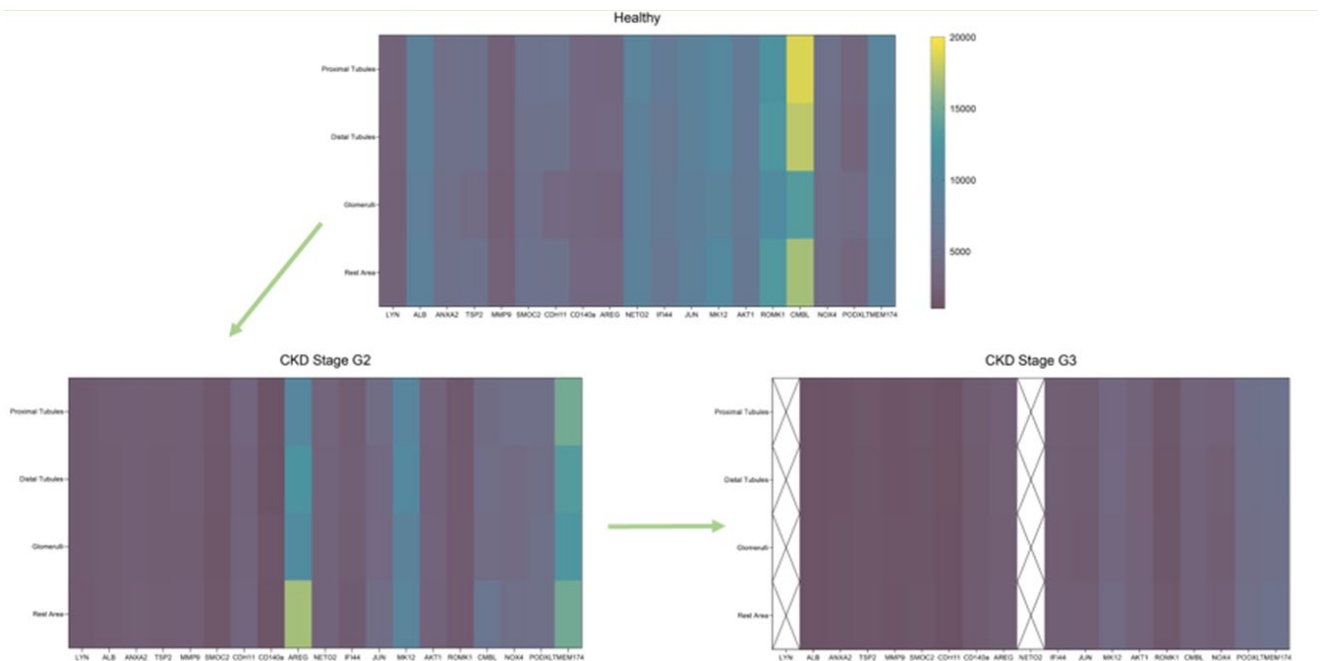
Αποτελέσματα

Η επιτυχία της μεθόδου επιβεβαιώθηκε μέσω της χρήσης του αντισώματος GAPDH ως θετικό μάρτυρα, που εμφάνισε υψηλότερη ένταση φθορισμού κατά τη χρώση συγκριτικά με τα προηγούμενα βήματα. Επίσης, παρατηρήθηκε μικρή φθορά του ιστού μετά από 20 συνεχόμενους κύκλους χρώσης-αφαίρεσης αντισωμάτων. Σε αυτούς τους κύκλους ελέγχθηκαν 40 πρωτεΐνες. Η χρώση ορισμένων από αυτές απεικονίζονται στην Εικόνα 1.

Η στατιστική ανάλυση μέσω ANOVA ανέδειξε 15 πρωτεΐνες με στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων υγιών και ασθενών. Από την μέτρηση της έντασης προέκυψαν θερμοκοί χάρτες για την κάθε κλινική εικόνα (Εικόνα 2) όπου έγινε εμφανής η διαφορετική έκφραση των πρωτεϊνών στις διάφορες νεφρικές περιοχές. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των πρωτεϊνών AREG, TMEM174, MMP9, MK12 στο στάδιο 2 της ΧΝΝ, ενώ στο στάδιο 3, όλες οι πρωτεΐνες εμφανίζουν σημαντική μείωση. Ο υπολογισμός του ποσοστού των κυττάρων, στο οποίο εκφράζονται οι πρωτεΐνες σε κάθε περιοχή στα 3 στάδια επιβεβαιώνει πως η έκφραση των πρωτεϊνών σε κάθε νεφρική περιοχή διαφέρει, ενώ την μεγαλύτερη μείωση της έκφρασης πρωτεϊνών ανά ποσοστό κυττάρων εμφανίζουν οι περιοχές των άπω εσπειραμένων σωληναρίων και των σπειραμάτων. Τέλος, η ανάλυση των αποτελεσμάτων με k-clustering έδειξε πως από την συγκεκριμένη διαδικασία μπορούν να ανιχνευθούν 6 διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι των νεφρών.



Εικόνα 1. Εικόνες από τη χρώση αντισωμάτων στις τρεις διαφορετικές κλινικές καταστάσεις.



Εικόνα 2. Θερμικοί χάρτες της διάμεσης τιμής της έντασης κάθε πρωτεΐνης σε κάθε περιοχή και σε κάθε στάδιο που μελετήθηκε.

Συμπεράσματα

Κατά την παρούσα ερευνητική διαδικασία έγινε βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου MILAN σε ιστούς απο νεφρούς, με την επιτυχή επανάληψη 20 συνεχόμενων πειραματικών γύρων χρώσης-αφαίρεσης αντισωμάτων και τελικό έλεγχο 40 πρωτεϊνών σε δείγματα από υγιείς και ασθενείς.

Η ανάλυση των εικόνων ανέδειξε σημαντικά μοτίβα διαφορικής έκφρασης πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη ρύθμιση της φλεγμονώδους αντίδρασης και της εξέλιξης της νεφρικής ίνωσης και σε πολυάριθμα μοριακά μονοπάτια στα διάφορα στάδια της ΧΝΝ σε σύγκριση με τα υγιή δείγματα. Η ανάλυση της χωρικής κατανομής των πρωτεϊνών ανέδειξε μεγαλύτερη μείωση του ποσοστού κυττάρων στα οποία έχουν εκφραστεί πρωτεΐνες στα άπω εσπειραμένα σωληνάκια και τα σπειράματα. Τα αποτελέσματα αυτά, μαζί με την αναγνώριση 6 διαφορετικών νεφρικών κυτταρικών τύπων μέσω αλγορίθμων ομαδοποίησης, αναδεικνύουν την σπουδαιότητα της μεθόδου για την ανάλυση των υποκείμενων μηχανισμών της ΧΝΝ και υπογραμμίζουν την αναγκαιότητα ανάλυσης των μηχανισμών σε επίπεδο ενός κυττάρου.

Βιβλιογραφία

Cattoretto, G., Bosisio, F.M., Marcelis, L., Bolognesi, M.M. (2019). Multiple Iterative Labeling by Antibody Neodeposition (MILAN) (preprint). *Protocol Exchange*.

Kirylyuk, K., Bomback, A.S., Cheng, Y.-L., Xu, K., Camara, P.G., Rabadan, R., Sims, P.A., Barasch, J. (2018). Precision Medicine for Acute Kidney Injury (AKI): Redefining AKI by Agnostic Kidney Tissue Interrogation and Genetics. *Seminars in Nephrology*, 38, 40–51.

Επαναστόχευση φαρμάκων στη Μη Αλκοολική Λιπώδη Νόσο του ήπατος βάσει ανάλυσης βιολογικών δικτύων

ΖΑΡΕΙΦΗ Δανάη Στέλλα, ΧΑΛΙΩΤΗΣ Οδυσσέας, ΧΑΛΑ Ναυσικά, ΖΕΑΚΗΣ Κωνσταντίνος, ΠΑΝΤΙΩΡΑ Ειρήνη, ΜΑΤΣΟΠΟΥΛΟΣ Γεώργιος, *ΒΕΖΑΚΗΣ Αντώνιος, ΦΡΑΓΚΟΥΛΙΔΗΣ Γεώργιος, ΑΛΕΞΟΠΟΥΛΟΣ Λεωνίδα

Σχολή Μηχανολόγων Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, danae.zar@gmail.com

Σχολή Μηχανολόγων Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, od.chaliotis@outlook.com

Σχολή Μηχανολόγων Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, chala.nafsika@gmail.com

Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, zeakis.konstantinos@gmail.com

**B' Χειρουργική Κλινική, «Αρεταίειον» Νοσοκομείο, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, eirinipantiora@gmail.com*

Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, gmatso@esd.ece.ntua.gr

**B' Χειρουργική Κλινική, «Αρεταίειον» Νοσοκομείο, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, avezakis@hotmail.com*

**B' Χειρουργική Κλινική, «Αρεταίειον» Νοσοκομείο, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, gfragoulid@med.uoa.gr*

Σχολή Μηχανολόγων Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, leo@mail.ntua.gr

Περίληψη

Ο αυξανόμενος επιπολασμός της Μη Αλκοολικής Λιπώδους Νόσου του Ήπατος (ΜΑΛΝΗ) την ανάγει σταδιακά σε ένα από τα σημαντικότερα αίτια χρόνιας ηπατικής νόσου, ωστόσο δεν υπάρχει μέχρι σήμερα εγκεκριμένη θεραπεία για κανένα στάδιο της νόσου. Στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων, η επαναστόχευση φαρμάκων κερδίζει συνεχώς έδαφος καθώς μειώνει την πιθανότητα απόρριψης, το χρόνο έγκρισης και το κόστος κυκλοφορίας ενός φαρμάκου. Με σκοπό την ανάδειξη φαρμακολογικών ουσιών για τη θεραπεία της ΜΑΛΝΗ, αναπτύχθηκε μια υπολογιστική πλατφόρμα επαναστόχευσης φαρμάκων που μέσω υπολογιστικών συγκρίσεων μεταξύ δικτύων της νόσου και δικτύων φαρμάκων προτείνει ουσίες για τη θεραπεία της νόσου. Επιπρόσθετα αναπτύχθηκαν *in vitro* κυτταρικά μοντέλα και μέθοδοι υψηλής απόδοσης όπου ελέγχθηκαν τα αποτελέσματα της υπολογιστικής πλατφόρμας και αναδείχθηκαν 2 φάρμακα που βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές και 4 νέα φάρμακα για τη θεραπεία της νόσου. Τέλος, μέσω πρωτεομικών αναλύσεων των *in vitro* πειραμάτων αναλύθηκαν τα σηματοδοτικά προφίλ των νέων φαρμάκων.

Λέξεις Κλειδιά

Επαναστόχευση φαρμάκων, ανάλυση δικτύων, μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος, ανακάλυψη φαρμάκων

Εισαγωγή

Η Μη Αλκοολική Λιπώδης Νόσος του Ήπατος (ΜΑΛΝΗ) χαρακτηρίζεται από συσσώρευση λίπους στο ήπαρ απουσία αυξημένης κατανάλωσης αλκοόλ. Η παθογένεσή της είναι πολυπαραγοντική και οδηγεί σε ένα ευρύ φάσμα κλινικών εικόνων, από στεάτωση έως Μη Αλκοολική Στεατοηπατίτιδα (ΜΑΣ), ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και κίρρωση του ήπατος. Σχετίζεται με ποικίλες μεταβολικές παθήσεις, συμπεριλαμβανομένου του διαβήτη τύπου ΙΙ και του μεταβολικού συνδρόμου (Younossi, 2019). Ο μεγάλος επιπολασμός της νόσου (>25% το 2018), η απουσία εγκεκριμένων φαρμάκων από των Ευρωπαϊκό ή Αμερικανικό Οργανισμό Φαρμάκων, σε συνδυασμό με τα πολλά ασυμπτωματικά στάδια, υπογραμμίζουν την αναγκαιότητα ύπαρξης θεραπείας και πρόγνωσης (Rinella, 2019).

Η επαναστόχευση φαρμάκων (ΕΦ) χρησιμοποιεί σύγχρονες πειραματικές και υπολογιστικές προσεγγίσεις, με σκοπό την απόδοση νέων ενδείξεων σε ήδη εγκεκριμένα φάρμακα ελαχιστοποιώντας το κόστος, το χρόνο και το ρίσκο αποτυχίας της κλασσικής *de novo* ανακάλυψης νέων φαρμάκων (Poroiakon & Druzhilovskiy, 2019). Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η δημιουργία μια υπολογιστικής και *in vitro* πλατφόρμας ΕΦ για τη ΜΑΛΝΗ/ΜΑΣ.

Μέθοδοι

Για την *in vitro* επαγωγή της ΜΑΛΝΗ, οι ηπατοκυτταρικές σειρές HuH7, HepG2, Hep3B και FOCUS εκτέθηκαν για 24 ώρες σε μίγμα ελεύθερων λιπαρών οξέων και στις στεατογόνες ουσίες amiodarone, tamoxifen, tetracycline και valproic acid. Η δημιουργία λιποσταγονιδίων παρατηρήθηκε μέσω μικροσκοπίας φθορισμού υψηλής απόδοσης, μετά από χρώση των κυττάρων με Nile Red και Hoechst 33342, και η ανάλυση των εικόνων έγινε σε MATLAB. Το οξειδωτικό στρες ποσοτικοποιήθηκε μέσω του φθορίζοντος υποστρώματος CM-H₂DCFDA.

Πυρήνα της πλατφόρμας ΕΦ αποτέλεσε η σύγκριση δικτύων γονιδιακής έκφρασης από ασθενείς με ΜΑΛΝΗ, με αντίστοιχα δίκτυα φαρμακολογικών ουσιών. Τα δίκτυα της ΜΑΛΝΗ κατασκευάστηκαν βάσει ανάλυσης γονιδιακών δεδομένων από βιοψίες ασθενών από το GEO-NCBI. Παράλληλα, μέσω των βάσεων δεδομένων DrugBank, MSigDB και ConnectivityMap δημιουργήθηκαν δίκτυα φαρμακολογικών ουσιών με σκοπό την αναγνώριση αυτών που επηρεάζουν θετικά ή αρνητικά το μηχανισμό της νόσου.

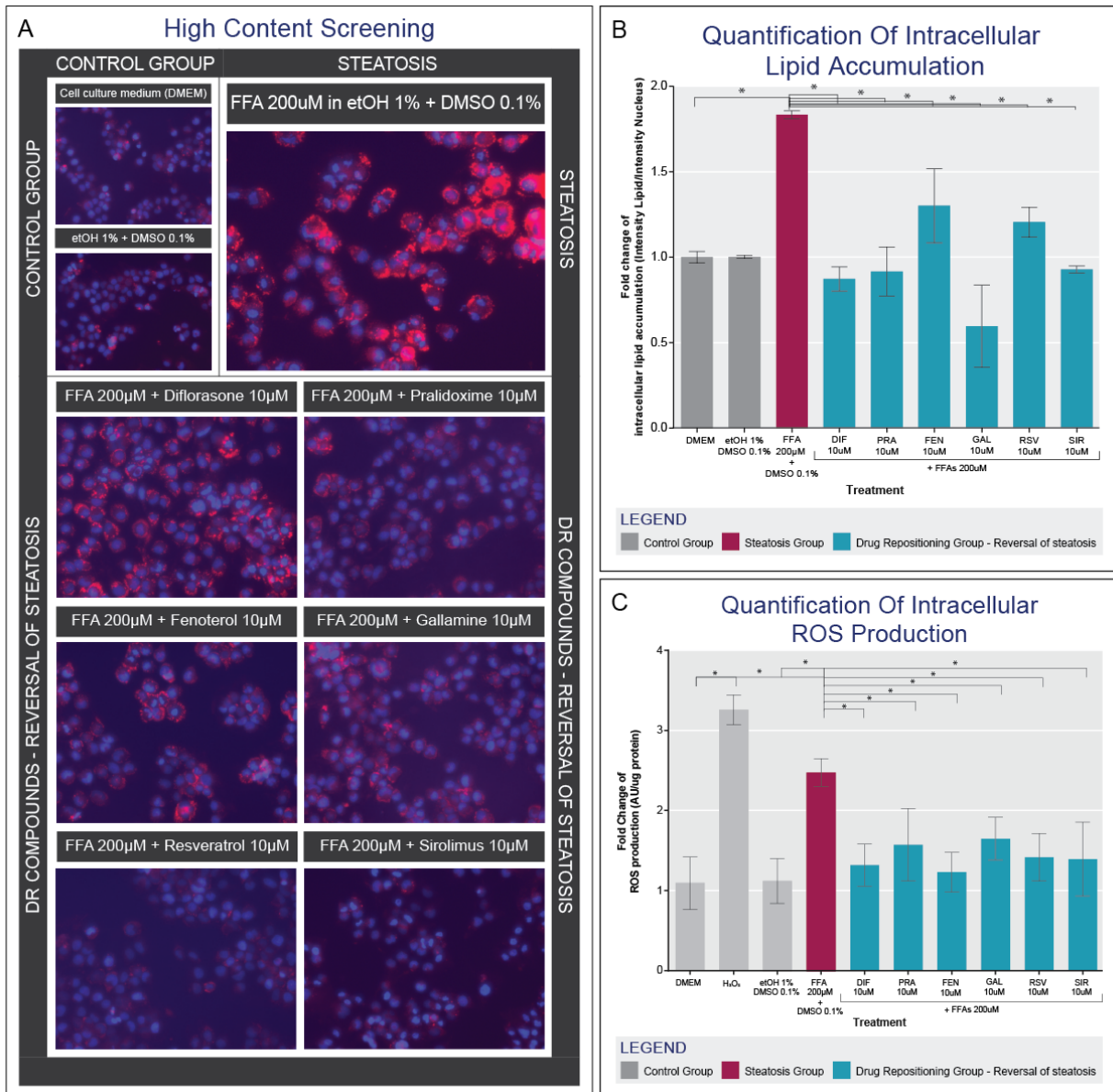
Η επίδραση των ουσιών ως προς την ικανότητα μείωσης της στεάτωσης και του οξειδωτικού στρες ελέγχθηκε *in vitro* με συγχρόνηση ελεύθερων λιπαρών οξέων με μεθόδους υψηλής απόδοσης. Πολυπλεκτική ELISA (Luminex xMAP) χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών σηματοδότησης που σχετίζονται με τη ΜΑΛΝΗ ώστε να μελετηθούν τα σηματοδοτικά προφίλ των φαρμάκων. Η ανάλυση εικόνων, οξειδωτικού στρες και πρωτεϊνικής έκφρασης οδήγησε στην ομαδοποίηση των φαρμάκων βάσει ομοιότητας σε στεατογόνα, θεραπευτικά ή μη, με χρήση ανάλυσης PCA και k-means clustering.

Αποτελέσματα

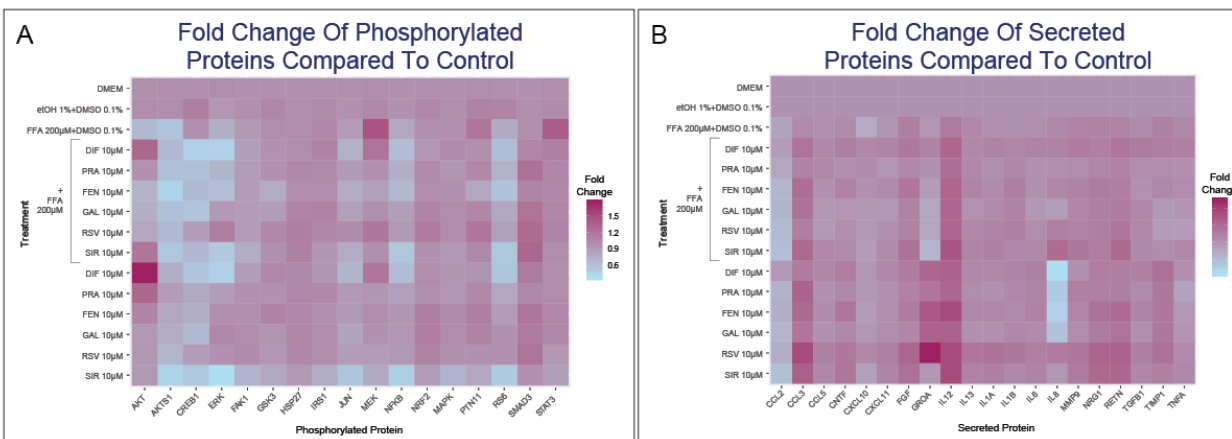
Αρχικά, επιτεύχθηκε η επαγωγή ΜΑΛΝΗ στις προαναφερθείσες ηπατοκυτταρικές σειρές όπως επιβεβαιώθηκε από την παρουσία λιποσταγονιδίων και την αύξηση του οξειδωτικού στρες ενδοκυτταρικά. Τα μοντέλα αυτά ενσωματώθηκαν στην πλατφόρμα ΕΦ και χρησιμοποιήθηκαν για την επικύρωση των υπολογιστικών αποτελεσμάτων.

Στα πρώτα βήματα υπολογιστικής ανάλυσης γονιδιακών δεδομένων, καθώς και δικτύων στεατογόνων φαρμάκων, αναγνωρίστηκαν γονίδια και μονοπάτια τα οποία είναι διαφορετικώς εκφρασμένα στη ΜΑΛΝΗ. Τα δίκτυα αυτά συγκρίθηκαν με δίκτυα εγκεκριμένων φαρμάκων με μια σειρά στατιστικών δοκιμών και αναγνωρίστηκαν 46 φάρμακα που στοχεύουν τα διαφορετικώς εκφρασμένα γονίδια και μονοπάτια. Από αυτά, 25 απορρίφθηκαν ως ηπατοτοξικές, 5 έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς ή είναι σε κλινικές δοκιμές (Resveratrol, Sirolimus), ενώ 21 διερευνήθηκαν περαιτέρω. Από την πειραματική μελέτη αυτών, 4 χαρακτηρίστηκαν ως εν δυνάμει θεραπευτικές (Gallamine, Fenoterol, Pralidoxime, Diflorasone) (Εικόνα 1).

Τα τέσσερα φάρμακα που χαρακτηρίστηκαν ως εν δυνάμει θεραπευτικά, καθώς και τα Resveratrol και Sirolimus (ομάδα θετικού ελέγχου), αναλύθηκαν περαιτέρω ως το προφίλ μοριακής σηματοδότησης μέσω μετρήσεων φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών και εκκρινόμενων κυτταροκινών. Παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα φωσφορυλίωσης των STAT3, CREB1 σε όλες τις θεραπείες, ενώ κατά περιπτώσεις διαφοροποιήσεις παρατηρήθηκαν και στις πρωτεΐνες MEK, PTN11, RS6, ERK, AKTS1, NFKB, IL8, IL12, CCL2 και CCL3. Η εφαρμογή αλγορίθμων ομαδοποίησης στα δεδομένα αυτά ανέδειξε το Diflorasone ως το πιο υποσχόμενο φάρμακο για ΕΦ (Εικόνα 2).



Εικόνα 1. Α) Συσσώρευση λιπασταγονιδίων μετά από χρώση με Nile Red και Hoechst33342 (20x μεγέθυνση). Β) Ποσοτικοποίηση της συσσώρευσης λιπασταγονιδίων μέσω ανάλυσης εικόνων. Γ) Ποσοτικοποίηση του ενδοκυτταρικούς στρες. Στον άξονα ψ παρουσιάζονται οι κατεργασίες των κυττάρων και στον χ ο λόγος μεταβολής με τις ομάδες ελέγχου.



Εικόνα 2. Θερμικοί χάρτες απεικόνισης του λόγου μεταβολής των Α) φωσφορλιωμένων πρωτεϊνών και Β) εκκρινόμενων κυτταροκινών.

Συμπεράσματα

Στην εργασία αυτή επιχειρήθηκε και αναπτύχθηκε επιτυχώς μια *in silico* και *in vitro* πλατφόρμα επαναστόχευσης φαρμάκων για τη ΜΑΛΝΗ/ΜΑΣ. Αναπτύχθηκαν επιτυχώς *in vitro* μοντέλα για τη ΜΑΛΝΗ σε τέσσερις ηπατοκυτταρικές σειρές με χρήση ελεύθερων λιπαρών οξέων και τεσσάρων γνωστών στεαοτογονικών φαρμάκων. Τα μοντέλα αυτά ενσωματώθηκαν στην πλατφόρμα ΕΦ και χρησιμοποιήθηκαν για την επικύρωση των υπολογιστικών αποτελεσμάτων. Από το σύνολο των ουσιών που απέδωσε η πλατφόρμα ΕΦ, τα 5 βρίσκονταν ήδη σε κλινικές δοκιμές και 2 εξ αυτών χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα θετικού ελέγχου στην πειραματική διακρίβωση της πλατφόρμας. Περαιτέρω πειράματα ανέδειξαν 4 νέα φάρμακα που μειώνουν στατιστικά σημαντικά τη στεάτωση και το οξειδωτικό στρες *in vitro*, αποδίδοντας έτσι στην πλατφόρμα ποσοστό επιτυχίας 8.7%. Τέλος, η πρωτεομική ανάλυση της επίδρασης των υποσχόμενων φαρμάκων φανέρωσε στατιστικά σημαντικές διαφορές στα μοτίβα φωσφορυλίωσης και έκκρισης πρωτεϊνών και είναι υπό διερεύνηση. Εν γνώσει μας, είναι η πρώτη προσέγγιση που συνδυάζει την υπολογιστική ΕΦ με την *in vitro* εξακρίβωση των αποτελεσμάτων, ενώ η *in silico* προσέγγιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την ΕΦ άλλων μεταβολικών ασθενειών.

Βιβλιογραφία

- Poroikov, V., Druzhilovskiy, D., 2019. Drug Repositioning: New Opportunities for Older Drugs, in: *In Silico Drug Design*. Elsevier, pp. 3–17.
- Rinella, M.E., Tacke, F., Sanyal, A.J., Anstee, Q.M., 2019. Report on the AASLD/EASL joint workshop on clinical trial endpoints in NAFLD. *J. Hepatol.* 71, 823–833.
- Younossi, Z.M., 2019. Non-alcoholic fatty liver disease – A global public health perspective. *J. Hepatol.* 70, 531–544.

Πρωτεωμική στην ενιαία υγεία

Ελένη Ι. ΚΑΤΣΑΡΟΥ¹, Χαράλαμπος ΜΠΙΛΛΙΝΗΣ^{1,2}, Γεώργιος Θ. ΤΣΑΓΚΑΡΗΣ³,
Γιώργος Χ. ΦΘΕΝΑΚΗΣ¹, Αγγελική Η. ΚΑΤΣΑΦΑΔΟΥ²

¹ Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Καρδίτσα

² Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Δημόσιας και Ενιαίας Υγείας, Καρδίτσα, agkatsaf@vet.uth.gr

³ Ερευνητική Μονάδα Πρωτεωμικής, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών, Αθήνα

Περίληψη

Η πρωτεωμική αναφέρεται στην εξέταση του συνόλου των πρωτεϊνών κάποιου ιστού ή μικροοργανισμού και μπορεί να χρησιμοποιηθεί, μεταξύ άλλων, για εύρεση μορίων-βιοδεικτών, μελέτες παθογένειας νοσημάτων και ανάδειξη αντιγόνων για παρασκευή εμβολίων. Ορισμένες εφαρμογές της πρωτεωμικής στην ενιαία υγεία αφορούν στη μελέτη μικροβιακών ή παρασιτικών ζωνοτικών νοσημάτων, στην ταυτοποίηση στελεχών παθογόνων βακτηρίων ανθεκτικών σε αντιμικροβιακούς παράγοντες, στην αξιολόγηση της ποιότητας των τροφίμων, στον εντοπισμό ενδεχόμενων κινδύνων για την υγεία των καταναλωτών και στην ανίχνευση πιθανών αλλεργιογόνων στα τρόφιμα.

Λέξεις-κλειδιά

ασφάλεια τροφίμων, ενιαία υγεία, κλινική κτηνιατρική, μικροβιακή ανοχή, πρωτεωμική.

Εισαγωγή

Το πρωτέωμα περιλαμβάνει όλες τις πρωτεΐνες σε ένα κύτταρο ή έναν ιστό κάθε στιγμή, λαμβάνοντας έτσι υπόψη όλες τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Το πρωτέωμα είναι δυναμικό και μεταβάλλεται ανάλογα με διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις στους ιστούς κάποιου οργανισμού. Ο στόχος της πρωτεωμικής είναι ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών που υπάρχουν σε ένα δείγμα ενδιαφέροντος, και ο ποσοτικός προσδιορισμός των μεταβολών στην έκφραση των πρωτεϊνών από διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Στην παρουσίαση ανασκοπούνται οι εφαρμογές των πρωτεωμικών τεχνολογιών στο πλαίσιο της ενιαίας υγείας.

Εφαρμογές της πρωτεωμικής σε ζωνοτικά νοσήματα

Η εφαρμογή πρωτεωμικών τεχνικών στη μελέτη νοσημάτων των ζώων έχει διαλευκάνει θέματα ζωνοτικών λοιμώξεων (Katsafadou et al. 2015, 2016).

Το ενδοκυτταρικό βακτήριο *Coxiella burnetii* είναι το αίτιο του πυρετού Q. Στα ζώα, η μόλυνση είναι συνήθως ασυμπτωματική ή οδηγεί σε αποβολή ή σε γέννηση θνησιγενών ή αδύναμων νεογνών. Το βακτήριο αποβάλλεται στα κοιλικά εκκρίματα, τους αποβληθέντες ιστούς, το γάλα, τα κόπρανα και το ούρο. Με την εφαρμογή πρωτεωμικών μεθοδολογιών, έχουν ταυτοποιηθεί βακτηριακές πρωτεΐνες που θεωρούνται σημαντικές για την ανάπτυξη νέων εμβολίων.

Σχετικά με το βακτήριο *Brucella melitensis*, αίτιο του μελιταίου πυρετού, έχει παρουσιαστεί το πλήρες πρωτεωμικό προφίλ αυτού, που μπορεί να χρησιμοποιείται ως αναφορά για τη λοιμογόνο δράση των στελεχών του βακτηρίου. Επίσης, με πρωτεωμικές μελέτες σε δείγματα ορών από πρόβατα, έχει επιτευχθεί η αξιολόγηση του εμβολιασμού έναντι της νόσου και ο έλεγχος αυτής.

Έχουν πραγματοποιηθεί εκτενείς πρωτεωμικές μελέτες στελεχών *Leptospira* spp. Συγκεκριμένα, έχουν πραγματοποιηθεί συγκρίσεις μεταξύ *L. interrogans* και *L. canicola*, *L. copenhageni*, *L. pomona*, *L. Lai*, *L. australis*, *L. bratislava* και *L. autumnalis*, καθώς και μεταξύ *L. icterohaemorrhagiae* και *L. biflexa*. Η ταυτοποίηση διαφορών στις πρωτεΐνες, δηλαδή τελικά στην αντιγονικότητα αυτών, αποσκοπούσε στην ανάπτυξη εμβολίων με βάση αυτές τις πρωτεΐνες.

Για τα πρωτόζωα *Leishmania* spp. έχουν χρησιμοποιηθεί ποσοτικές πρωτεωμικές μεθοδολογίες για προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών μεταξύ των διαφορετικών σταδίων ζωής του

πρωτοζώου. Ειδικά μελετήθηκαν στελέχη ανθεκτικά και ευαίσθητα σε αντι-λεισμανιακά φάρμακα, καθώς και αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτοζώου και ξενιστή.

Ο *Echinococcus granulosus* είναι υπεύθυνος για την κυστική εχينوκοκκίαση. Με πρωτεωμική ανάλυση της σύστασης των κύστεων έχει ταυτοποιηθεί πληθώρα πρωτεϊνών από στελέχη *Echinococcus* spp. και τους ξενιστές αυτού, για κατανόηση στρατηγικών επιβίωσης των παρασίτων και μοριακών μηχανισμών αλληλεπίδρασης παρασίτου-ξενιστή. Επιπλέον, η ανάλυση των πρωτεϊνών οδηγεί σε εντοπισμό μοριακών δεικτών για ανάπτυξη μεθόδων διάγνωσης και παρακολούθησης της νόσου.

Τα κεστώδη παράσιτα *Taenia* έχουν παγκόσμια διάδοση. Χρησιμοποιώντας πρωτεωμικές τεχνικές, ανιχνεύθηκε το πρωτεωμικό προφίλ αυτών και διακρίθηκε από αυτό του ξενιστή. Επιπλέον, βρέθηκαν κοινές πρωτεΐνες με τον *E. granulosus* και μελετήθηκαν τα μοριακά μονοπάτια – στα οποία συμμετέχουν αυτές.

Τέλος, για τη μελέτη ιών, π.χ. στελεχών ιού γρίπης H1N1, έχουν ανιχνευτεί σε πρωτεωμικό επίπεδο διαφορές στις αλληλεπιδράσεις τους με ξενιστές, παρέχοντας έτσι πληροφορίες για την παθογένεια του νοσήματος.

Εφαρμογές της πρωτεωμικής στη μικροβιακή αντοχή στα αντιβιοτικά

Με την πρωτεωμική έχουν μελετηθεί στελέχη βακτηρίων ανθεκτικών σε αντιμικροβιακούς παράγοντες για την παρουσία διαφορετικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών και μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Η ταξινόμηση των διαφορετικά εκφραζόμενων μικροβιακών πρωτεϊνών οδηγεί σε αποκάλυψη συγκεκριμένων αποκρίσεων εμφανιζόμενων μετά από τη χορήγηση φαρμάκων και σε ιεράρχηση των χημικών ενώσεων που αξιολογούνται για την επιλεκτικότητα και ειδικότητά τους. Η ανίχνευση των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που σχετίζονται με αντοχή σε αντιμικροβιακά υποβοηθά στον εντοπισμό πιθανών στόχων για την πρόληψη της ανάπτυξης ανθεκτικότητας (Chernov et al. 2019).

Εφαρμογές της πρωτεωμικής στην ασφάλεια των τροφίμων

Η πρωτεωμική στη βιομηχανία τροφίμων είναι ένας αναπτυσσόμενος τομέας, τμήμα του 'foodomics' και δίνει τη δυνατότητα ενσωμάτωσης στην παραγωγή τροφίμων, διαδικασιών, οι οποίες σχετίζονται με την υγεία των ζώων και αφορούν στην παρακολούθηση παθογόνων που μπορεί να μεταδοθούν σε ανθρώπους με τα τρόφιμα (Roncada et al. 2013). Το *foodomics* στοχεύει στην αύξηση των γνώσεων σχετικά με την ποιότητα, την ασφάλεια, την ιχνηλασιμότητα και τη βιοδραστικότητα των τροφίμων, στο πλαίσιο της ενιαίας υγείας μέσω τεχνολογιών βιομικής. Με τις πρωτεωμικές τεχνολογίες μπορεί να παρακολουθείται η ποιότητα της παραγωγής τροφίμων και να εντοπίζονται πιθανές απειλές για την υγεία των καταναλωτών, π.χ. παρουσία εντεροτοξινών σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Επιπλέον, οι τεχνολογίες εφαρμόζονται για χαρτογράφηση των πρωτεϊνών διαφόρων προϊόντων, για ανάπτυξη τεχνικών για ανίχνευση νοθειών και για εντοπισμό πιθανών αλλεργιογόνων σε τρόφιμα.

Ως συγκεκριμένα παραδείγματα εφαρμογής, αναφέρονται η αξιολόγηση της βακτηριακής επιμόλυνσης ζωικών τροφίμων, η μελέτη του βαθμού καταπόνησης των ζώων κατά τη σφαγή, η ανίχνευση της οξειδωτικής βλάβης και της λανθασμένης πορείας ωρίμανσης σε γαλακτοκομικά προϊόντα και των τεχνολογικών λαθών στην παραγωγή ξηρού ζαμπόν.

Συμπεράσματα

Οι εφαρμογές της πρωτεωμικής στην ενιαία υγεία είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για την πρόληψη διάγνωση και θεραπεία ζωνοσόων, για τη μελέτη της μικροβιακής αντοχής και στη χρήση της στη βιομηχανία τροφίμων, περιλαμβανόμενη στον όρο 'foodomics', που αναφέρεται στην αύξηση της διαθέσιμης γνώσης για την ποιότητα και την ασφάλεια των τροφίμων, μέσω της εφαρμογής σύγχρονων '-ωμικών' τεχνολογιών.

Βιβλιογραφία

- Chernov, V.M., Chernova, O.A., Mouzykantov, A.A., Lopukhov, L.L. & Aminov, R.I. (2019). Omics of antimicrobials and antimicrobial resistance. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 14, 455-468.
- Katsafadou, A.I., Tsangaris, G.T., Billinis, C. & Fthenakis, G.C. (2015). Use of proteomics in the study of microbial diseases in small ruminants. *Veterinary Microbiology*, 181, 27-33.
- Katsafadou, A.I., Tsangaris, A.T., Billinis, C. & Fthenakis, G.C. (2016). Applied proteomics in companion animal medicine. *Current Proteomics*, 13, 165-171.
- Roncada, P., Stipetic, L.H., Bonizzi, L., Burchmore, R.J.S. & Kennedy, M.W. (2013). Proteomics as a tool to explore human milk in health and disease. *Journal of Proteomics*, 88, 47-57.

Διπλή CRISPR/Cas9 –γονιδιακή επεξεργασία των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (HSCs) για τη θεραπεία της θαλασσαιμίας μέσω της επανενεργοποίησης της ενδογενούς γ-σφαιρίνης

Κυριακή ΠΑΣΧΟΥΔΗ, Αφροδίτη ΓΕΩΡΓΑΚΟΠΟΥΛΟΥ, Νικολέτα ΨΑΘΑ, Αναστασία ΑΘΑΝΑΣΙΑΔΟΥ, Μαρία ΓΚΑΪΤΑΤΖΗ, Chang LI, Γιώργος ΘΥΦΡΟΝΙΤΗΣ, Μηνάς ΓΙΑΓΚΟΥ, Αναστασία ΚΟΥΒΑΤΣΗ, Αχιλλέας ΑΝΑΓΝΩΣΤΟΠΟΥΛΟΣ, Andre LIEBER, Ευαγγελία ΓΙΑΝΝΑΚΗ

Μονάδα Γονιδιακής & Κυτταρικής Θεραπείας, Αιματολογική – ΜΜΜΟ, Γ.Ν.Θ. «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη και Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, kiriaki.pa1997@gmail.com

Μονάδα Γονιδιακής & Κυτταρικής Θεραπείας, Αιματολογική – ΜΜΜΟ, Γ.Ν.Θ. «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη και Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, aphroditegeo@hotmail.com

Altius Institute for Biomedical Sciences, Seattle, USA, npsatha@altius.org

Μονάδα Γονιδιακής & Κυτταρικής Θεραπείας, Αιματολογική – ΜΜΜΟ, Γ.Ν.Θ. «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη, anastasiaathanas@yahoo.gr

Μονάδα Γονιδιακής & Κυτταρικής Θεραπείας, Αιματολογική – ΜΜΜΟ, Γ.Ν.Θ. «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη, mgkaitatzi@gmail.com

University of Washington, Seattle, USA, cli1239@uw.edu

Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, gthyfron@uoi.gr

Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, yangou@bio.auth.gr

Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, akouvats@bio.auth.gr

Μονάδα Γονιδιακής & Κυτταρικής Θεραπείας, Αιματολογική – ΜΜΜΟ, Γ.Ν.Θ. «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη, achanagh@gmail.com

University of Washington, Seattle, USA, lieber00@uw.edu

Μονάδα Γονιδιακής & Κυτταρικής Θεραπείας, Αιματολογική – ΜΜΜΟ, Γ.Ν.Θ. «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη, evannaki@uw.edu

Περίληψη

Η γονιδιακή θεραπεία της θαλασσαιμίας μέσω γονιδιακής τροποποίησης αποτελεί μία καινοτόμα προσέγγιση. Για το σκοπό αυτό θαλασσαιμικά CD34⁺ κύτταρα διαμολύνθηκαν με έναν μη-ενσωματούμενο, αδενοϊκό φορέα (HDA5/35⁺⁺), που φέρει ως διαγονίδιο την εδονουκλεάση Cas9 και στοχεύει την δράση και έκφραση του καταστολέα της γ-σφαιρίνης (BCL11A), μέσω δύο περιοχών. Η αποτελεσματικότητα της γονιδιακής τροποποίησης ελέγχθηκε με την μέθοδο T7E1 ως προς το ποσοστό στόχευσης και με κυτταρομετρία ροής ως προς την έκφραση γ-σφαιρίνης, τόσο σε καλλιέργεια ερυθροειδικής διαφοροποίησης, όσο και σε αποικίες μεθυλοκυτταρίνης. Το ποσοστό στόχευσης για τη BCL11A και την περιοχή HBG1/HBG2 ήταν 12,1±2,1% και 15,6±1,7%, αντίστοιχα. Η επιτυχής στόχευση οδήγησε σε σημαντικά υψηλότερη έκφραση της γ-σφαιρίνης σε BFU-E αποικίες και στην ερυθροειδική καλλιέργεια, καθώς και σε βελτιωμένα χαρακτηριστικά του θαλασσαιμικού φαινοτύπου.

Λέξεις-κλειδιά: β-θαλασσαιμία, αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, γονιδιακή θεραπεία, CRISPR-Cas9, γενετική τροποποίηση

Εισαγωγή

Η β-θαλασσαιμία χαρακτηρίζεται από μειωμένη σύνθεση (β⁺/β⁺) ή πλήρης ανεπάρκεια της β-σφαιρίνης (β⁰/β⁰) που οδηγεί σε καταστροφή των ερυθροκυττάρων και ανάπτυξη αναιμίας, σπληνομεγαλίας και εξωμυελικής ερυθροποίησης. Η θεραπεία της β-θαλασσαιμίας είναι συμπτωματική και περιλαμβάνει συνεχείς μεταγγίσεις αίματος και θεραπεία αποσιδήρωσης. Μόνη θεραπεία πλήρους ίασης αποτελεί η μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων.

Τα τελευταία χρόνια, η ανάπτυξη της γονιδιακής θεραπείας για την θεραπεία μονογονιδιακών νοσημάτων, αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη προσέγγιση. Τα τρέχοντα πρωτόκολλα γονιδιακής θεραπείας για τη β-θαλασσαιμία περιλαμβάνουν την απομόνωση των CD34⁺ κυττάρων (HSCs), την ex

νίνο γενετική τροποποίηση τους με ενσωμάτωση του γονιδίου της β- ή γ-σφαιρίνης, μέσω θεραπευτικών λεντι-ικών 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.

Η γονιδιακή επεξεργασία σε συγκεκριμένες θέσεις του γονιδιώματος αποτελεί μία καινοτόμα, αποτελεσματική και ασφαλέστερη προσέγγιση. Είναι γνωστό ότι η κληρονομική παραμονή της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης (HPFH) σε θαλασσαιμικούς ασθενείς βελτιώνει κλινικά τον φαινότυπο της β-θαλασσαιμίας. Στόχος της μελέτης είναι η επανενεργοποίηση της έκφρασης της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης (HbF) με γονιδιακή επεξεργασία ως θεραπευτική προσέγγιση της β-θαλασσαιμίας. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ένας μη-ενσωματούμενος, αδενοϊικός φορέας (HDAd5/35++), υψηλής συγγένειας με τον υποδοχέα-CD46 των CD34⁺ κυττάρων που φέρει ως διαγονιδίο το σύστημα CRISPR/Cas9, καθώς και δύο gRNAs που στοχεύουν τον ερυθροειδικό ενισχυτή του καταστολέα της γ-σφαιρίνης (BCL11A) και ταυτόχρονα την περιοχή πρόσδεσής του (HBG1/HBG2) (HDAd-CRISPR-Dual).

Μέθοδοι

Κρυσουτηρημένα CD34⁺ κύτταρα που απομονώθηκαν από ασθενείς με β-θαλασσαιμία σε προηγούμενη κλινική μελέτη κινητοποίησης, καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο παρουσία κυτοκινών και διαμολύνθηκαν με τον HDAd-CRISPR-Dual για 48 ώρες, σε πιάτα χαμηλής προσκόλλησης. 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 το πέρας των καλλιεργειών, προσδιορίστηκε με T7EI το ποσοστό επιτυχούς στόχευσης της CRISPR/Cas9 και με κυτταρομετρία ροής 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. Τέλος, στο πλαίσιο αξιολόγησης της ασφάλειας της μεθόδου έγιναν κυτταρογενετικές αναλύσεις με στόχο την ανίχνευση τυχόν χρωμοσωμικής αντιμετάθεσης.

Αποτελέσματα

Η ταυτόχρονη γενετική τροποποίηση των περιοχών BCL11A και HBG1/2, δεν επηρέασε τον αρχέγονο χαρακτήρα των κυττάρων (CD34⁺/CD38⁻/CD90⁺), την κλωνογενή ικανότητα και τον ρυθμό έκπτυξης κατά την ερυθροειδική διαφοροποίηση.

Κατά τη διάρκεια της ερυθροειδικής καλλιέργειας παρατηρήθηκε από την ημέρα 7, σημαντική αύξηση του ποσοστού των τροποποιημένων κυττάρων σε σχέση με την έναρξη της καλλιέργειας (p=0,03), υποδεικνύοντας επιλεκτική επιβίωση και έκπτυξη των γενετικά διορθωμένων θαλασσαιμικών κυττάρων. Στο τέλος της ερυθροειδικής διαφοροποίησης το ποσοστό των GlyA⁺ ερυθροκυττάρων ήταν σημαντικά υψηλότερο συγκριτικά με το αντίστοιχο των μη-γενετικά τροποποιημένων CD34⁺ κυττάρων (p=0,03).

Το ποσοστό της επιτυχούς στόχευσης της περιοχής των περιοχών BCL11A και HBG1/2 ήταν 12,1±2,1% και 15,6±1,7%, αντίστοιχα στο τέλος της ερυθροειδικής διαφοροποίησης, ενώ σε μονήρεις BFU-E αποικίες το ποσοστό στόχευσης ήταν 9% και 4% για τις περιοχές BCL11A και HBG1/2 αντίστοιχα, και το ποσοστό διπλής στόχευσης (BCL11A+HBG1/2) 18%. Η επιτυχής στόχευση μεταφράστηκε σε σημαντικά υψηλότερη έκφραση της γ-σφαιρίνης, σε BFU-Es που προήλθαν από τα CRISPR-Dual τροποποιημένα κύτταρα συγκριτικά με αυτές των μη τροποποιημένων κυττάρων (%HbF: 79,81±2,97 vs 51,69±9,25%, p=0,01/MFI: 835±149,71 vs 410,34±75,73, p=0,03) και στην ερυθροειδική καλλιέργεια (%HbF: 22,25±4,19% vs 9,5±2,09%, p=0,04).

Την ημέρα 18, παρατηρήθηκε πως η αυξημένη έκφραση της γ-σφαιρίνης οδήγησε σε σημαντική μείωση των επιπέδων ROS και αναστολή της καθήλωσης των θαλασσαιμικών ερυθροβλαστών στα πρωιμότερα στάδια διαφοροποίησης καθώς και αυξημένο ποσοστό τελικώς διαφοροποιημένων ερυθροκυττάρων στη μικροσκόπηση κυτταροφυγοκεντρημάτων. Σημαντικά, η καρυοτυπική ανάλυση σε γενετικά τροποποιημένους και μη ερυθροβλάστες, δεν κατέδειξε χρωμοσωμικές αναδιατάξεις και απαλοιφές σε (τουλάχιστον) 20 μεταφάσεις που μελετήθηκαν.

Συμπεράσματα

Συνοπτικά, προτείνεται μία εναλλακτική θεραπευτική προσέγγιση για τη γονιδιακή θεραπεία της β-θαλασσαιμίας, μέσω χρήσης του άδενο-ϊκού φορέα HDAd-CRISPR-Dual ως πλατφόρμα μεταφοράς ενός καινοτόμου συστήματος CRISPR-Cas9 νουκλεάσης που στοχεύει στην επανενεργοποίηση της γ-σφαιρίνης.

Βιβλιογραφία

- Higgs DR, Engel JD, Stamatoyannopoulos G. Thalassaemia. *Lancet*. 2012;379(9813):373-383. doi:10.1016/S0140-6736(11)60283-3
- Psatha N, Papayanni P-G, Yannaki E. A New Era for Hemoglobinopathies: More Than One Curative Option. *Curr Gene Ther*. 2018;17(5):364-378. doi:10.2174/1566523218666180119123655
- Li C, Lieber A. Adenovirus vectors in hematopoietic stem cell genome editing. *FEBS Lett*. 2019;593(24):3623-3648. doi:10.1002/1873-3468.13668

CANVAS: Μελέτη της πεντανουκλεοτιδικής επανάληψης του γονιδίου *RFC1* στον Ελληνικό πληθυσμό.

Ζωή ΚΟΝΤΟΓΕΩΡΓΙΟΥ¹, Χρυσάνθη ΤΣΙΡΑΙΓΚΑΝΗ¹, Χρυσούλα ΚΑΡΤΑΝΟΥ¹, Μιχάλης ΠΕΝΤΖΟΣ², Ευάγγελος ΑΝΑΓΝΩΣΤΟΥ³, Μάριος ΠΑΝΑΣ¹, Γεωργία ΚΑΡΑΔΗΜΑ^{1*}, Γεώργιος ΚΟΥΤΣΗΣ^{1*}

¹Μονάδα Νευρογενετικής, Α' Νευρολογική Κλινική, Αιγινήτειο Νοσοκομείο, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ.

²Α' Νευρολογική Κλινική, Αιγινήτειο Νοσοκομείο, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ.

³Εργαστήριο Οφθαλμοκινητικότητας και Ισορροπίας, Α' Νευρολογική Κλινική, Αιγινήτειο Νοσοκομείο, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ.

* Ίση συνεισφορά

Περίληψη

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες το CANVAS (cerebellar ataxia, neuropathy, vestibular areflexia syndrome) αποδίδεται σε μια διαλλαλική επέκταση μιας πεντανουκλεοτιδικής επανάληψης στο γονίδιο *RFC1*. Πρόκειται για πολυμορφική επανάληψη με τρεις περιγεγραμμένες πιθανές αλληλουχίες η επέκταση μίας εκ των οποίων, της AAGGG, έχει χαρακτηριστεί ως παθολογική. Η διαλλαλική επέκταση ανιχνεύεται σπανιότερα και σε ασθενείς με ατελές CANVAS ή οψίμου ενάρξεως παρεγκεφαλιδική αταξία. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανίχνευση της παθολογικής επέκτασης που οδηγεί στο CANVAS σε Έλληνες ασθενείς. Για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκαν για διερεύνηση 71 ασθενείς δείκτες, με κλινικά χαρακτηριστικά CANVAS, ατελούς CANVAS ή οψίμου ενάρξεως παρεγκεφαλιδικής αταξίας. Αναφέρουμε ότι οι 5 από τους 71 ασθενείς της μελέτης είναι ομόζυγοι για την πεντανουκλεοτιδική παθολογική επέκταση. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στη Μονάδα Νευρογενετικής της Α' Νευρολογικής κλινικής του Αιγινήτειου Νοσοκομείου και τα αποτελέσματα της αναδεικνύουν για πρώτη φορά την παρουσία της διαλλαλικής επέκτασης στο *RFC1* στον Ελληνικό πληθυσμό.

Λεξεις-Κλειδια

CANVAS, ελληνικός πληθυσμός, πεντανουκλεοτιδική επανάληψη, *RFC1*

Εισαγωγή

Ο όρος CANVAS χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από παρεγκεφαλιδική αταξία όψιμης έναρξης, αισθητική αξονική πολυνευροπάθεια και διαταραχή του αιθουσαίου συστήματος (Migliaccio *et al.*, 2004). Το CANVAS συνδέθηκε πρόσφατα με διαλλαλική επέκταση πεντανουκλεοτιδικής επανάληψης στην poly (A) ουρά ενός στοιχείου AluSx3 στο εσόνιο 2 του γονιδίου της υπομονάδας 1 του παράγοντα αναπαραγωγής C, *RFC1* (Replication Factor C Subunit 1). Η αλληλουχία της επανάληψης είναι πολυμορφική και φαίνεται ότι οι διαμορφώσεις (AAAAG)_{exp} και (AAAGG)_{exp} χαρακτηρίζονται ως μη παθολογικές ενώ η διαμόρφωση (AAGGG)_{exp} (>400 επαναλήψεις) ως παθολογική. Η παρούσα μελέτη έχει στόχο τη διερεύνηση του CANVAS σε Έλληνες ασθενείς.

Υλικά & Μέθοδοι

Η τρέχουσα μελέτη εξετάζει τη συχνότητα της παθολογικής επέκτασης AAGGG σε 71 δείγματα Ελλήνων ασθενών δεικτών. Τα κριτήρια επιλογής των ασθενών δεικτών ήταν η εμφάνιση αταξίας όψιμης έναρξης (> 30 ετών) με ή χωρίς αξονική αισθητική πολυνευροπάθεια, με ή χωρίς κατάργηση του αιθουσαίου αντανακλαστικού, και γενεαλογικό δέντρο συμβατό με υπολειπόμενη ή σποραδική κληρονομηση. Οι ασθενείς προέρχονται από όλη την Ελλάδα και επιλέχθηκαν από βάση δεδομένων 454 ασθενών με παρεγκεφαλιδική αταξία της Μονάδας Νευρογενετικής. Όλοι οι ασθενείς έχουν παραχωρήσει ενήμερη συγκατάθεση.

Στην πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε το γενωμικό DNA των ασθενών από την αντίστοιχη βιοτράπεζα της Μονάδας. Αρχικά όλα τα δείγματα εξετάστηκαν για την παρουσία επέκτασης πολυμορφικής πεντανουκλεοτιδικής αλληλουχίας ανεξαρτήτου διαμόρφωσης, εκτελώντας sizing PCR. Τα δείγματα που δεν παρουσίαζαν ζώνες στο sizing χαρακτηρίστηκαν ομόζυγα για επέκταση. Στη

συνέχεια πραγματοποιήθηκαν για αυτά τα δείγματα τρεις διαφορετικές RP-PCRs για την ταυτοποίηση των πιθανών διαμορφώσεων που προκύπτουν από το συνδυασμό της παθολογικής AAGGG και των μη παθολογικών AAAAG και AAAGG επεκτάσεων (Cortese et al. 2019).

Αποτελέσματα

Από τα 71 δείγματα τα 61 ήταν αρνητικά για ομόζυγη επέκταση. Τα υπόλοιπα 10 θεωρήθηκαν ομόζυγα για επέκταση, από αυτά τα 5 δείγματα χαρακτηρίστηκαν ως ομόζυγα για την παθολογική επέκταση AAGGG ενώ τα 3 ως απλοί φορείς της και σε 2 δεν ταυτοποιήθηκε η παθογόνος επέκταση AAGGG. Συγκεκριμένα, η επέκταση εντοπίστηκε σε 2 από 3 ασθενείς με πλήρες CANVAS, σε 2 από 15 ασθενείς με ατελές CANVAS και σε 1 από 53 ασθενείς με παρεγκεφαλιδική αταξία όψιμης έναρξης (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Συχνότητα της διαλληλικής παθολογικής επέκτασης στο γονίδιο *RFC1* σε Έλληνες ασθενείς με CANVAS, ατελές CANVAS ή παρεγκεφαλιδική αταξία όψιμης έναρξης και σύγκριση με άλλους πληθυσμούς.

Μελέτη	Πλήρες CANVAS	p-value *	Ατελές CANVAS	p-value *	Αταξία όψιμης έναρξης	p-value *
Cortese et al. 2019	11/12 (92%)	0.37	32/51 (63%)	0.001	33/153 (22%)	<0.001
Cortese et al. 2020	63/70 (90%)	0.30	-	-	42/293 (14%)	0.005
Aboud Syriani et al. 2020	8/11 (73%)	0.67	14/63 (22%)	0.36	7/673 (1%)	0.46
Gisatulin et al. 2020	15/17 (88%)	0.40	2/9 (22%)	0.49	4/70 (6%)	0.28
Akcimen et al. 2020	-	-	-	-	2/177 (1%)	0.55
Tsuchiya et al. 2020	-	-	-	-	4/37 (11%)	0.09
Παρούσα μελέτη	2/3 (66%)	-	2/15 (13%)	-	1/53 (2%)	-

* Σύγκριση με παρούσα μελέτη, δοκιμασία Fisher's exact.

Συζήτηση

Η ομόζυγη επέκταση του πεντανουκλεοτιδίου AAGGG (>400 επαναλήψεις) στο γονίδιο *RFC1*, βρέθηκε αρχικά να ευθύνεται για το 92% των περιστατικών με πλήρες CANVAS, το 66% των περιστατικών με ατελές CANVAS και το 22% των αταξιών όψιμης έναρξης στην πιλοτική μελέτη από το Ηνωμένο Βασίλειο (Cortese et al., 2019).

Πρόσφατες μελέτες σε άλλους Καυκάσιους πληθυσμούς και σε ανάλογες ομάδες ασθενών, περιέγραψαν αντίστοιχα υψηλή συχνότητα (70-90%) σε ασθενείς με πλήρες CANVAS αλλά μικρότερα ποσοστά σε ασθενείς με ατελές CANVAS (22%) και σε ασθενείς με αταξία όψιμης έναρξης (1-6%) (Gisatulin et al, 2019, Aboud Syriani et al, 2020).

Στην παρούσα μελέτη ταυτοποιείται μοριακά για πρώτη φορά το CANVAS σε Έλληνες ασθενείς και περιγράφονται 5 θετικά περιστατικά. Επιβεβαιώνεται ότι η διαλληλική επέκταση AAGGG στο γονίδιο *RFC1* είναι πολύ συχνή σε ασθενείς με πλήρες CANVAS, σε συμφωνία με όλες τις μελέτες, αλλά λιγότερο συχνή στην ομάδα με ατελές CANVAS και σπάνια στην συχνότερη ομάδα των παρεγκεφαλιδικών αταξιών όψιμης έναρξης. Ενδέχεται λοιπόν η πιλοτική μελέτη να είχε υπερεκτιμήσει τη συχνότητα της παθολογικής επέκτασης σε πληθυσμούς αταξίας, χωρίς ειδικά χαρακτηριστικά CANVAS. Η επέκταση της παρούσας μελέτης σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών αναμένεται να οδηγήσει στην ολοκλήρωση της περιγραφής του γονιδιακού προφίλ των Ελλήνων ασθενών με κλινικά χαρακτηριστικά CANVAS και να βοηθήσει στην παροχή ακριβούς προσυμπτωματικού,

συμπτωματικού και προγεννητικού ελέγχου καθώς και γενετικής συμβουλής.

Βιβλιογραφία

- Akçimen, F. *et al.* (2019) 'Investigation of the RFC1 Repeat Expansion in a Canadian and a Brazilian Ataxia Cohort: Identification of Novel Conformations.', *Frontiers in genetics*, 10, p. 1219. doi: 10.3389/fgene.2019.01219.
- About Syriani, D *et al* (2020) ' Prevalence of RFC1-mediated spinocerebellarataxia in a North American ataxia cohort.', *Neurology Genetics* 6(3):e440 doi: 10.1212/NXG.0000000000000440
- Cortese, A. *et al.* (2019) 'Biallelic expansion of an intronic repeat in RFC1 is a common cause of late-onset ataxia.', *Nature genetics*, 51(4), pp. 649–658. doi: 10.1038/s41588-019-0372-4.
- Gisatulin, M. *et al.* (2020) 'Clinical spectrum of the pentanucleotide repeat expansion in the RFC1 gene in ataxia syndromes.', *Neurology*. United States. doi: 10.1212/WNL.00000000000010744.
- Migliaccio, A. A. *et al.* (2004) 'Cerebellar ataxia with bilateral vestibulopathy: description of a syndrome and its characteristic clinical sign.', *Brain : a journal of neurology*. England, 127(Pt 2), pp. 280–293. doi: 10.1093/brain/awh030.

Μελέτη του γονιδίου *C9ORF72* σε Έλληνες ασθενείς με νευροεκφυλιστικά νοσήματα

Χρυσούλα ΚΑΡΤΑΝΟΥ¹, Μαριάνθη ΜΠΙΡΕΖΑ¹, Κωνσταντίνος ΠΟΤΑΓΑΣ², Ελισσάβη ΚΑΠΑΚΗ³, Γεώργιος ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣ³, Βασίλειος ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΙΔΗΣ³, Μιχαήλ ΡΕΝΤΖΟΣ⁴, Λεωνίδα ΣΤΕΦΑΝΗΣ⁵, Σωκράτης ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ⁶, Μάριος ΠΑΝΑΣ¹, Γεώργιος ΚΟΥΤΣΗΣ^{1*}, Γεωργία ΚΑΡΑΔΗΜΑ^{1*}

¹ Μονάδα Γενετικής του Νευρικού Συστήματος, Αιγινήτειο Νοσοκομείο, Α' Νευρολογική Κλινική Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

² Μονάδα Νευροψυχολογίας και Παθολογίας του Λόγου, Αιγινήτειο Νοσοκομείο, Α' Νευρολογική Κλινική Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

³ Μονάδα Νευροχημείας και Βιολογικών δεικτών, Αιγινήτειο Νοσοκομείο, Α' Νευρολογική Κλινική Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

⁴ Αιγινήτειο Νοσοκομείο, Α' Νευρολογική Κλινική Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

⁵ Αιγινήτειο Νοσοκομείο, Α' Νευρολογική Κλινική Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Αττικό Νοσοκομείο, Β' Νευρολογική Κλινική Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ).

⁶ Μονάδα Νοητικών Διαταραχών/Άνοιας, Αττικό Νοσοκομείο, Β' Νευρολογική Κλινική Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

*ίση συνεισφορά

Περίληψη

Η εξανουκλεοτιδική επέκταση του γονιδίου *C9ORF72* αποτελεί μια καθιερωμένη γενετική αιτία της πλαγίας μυατροφικής σκλήρυνσης (ALS) και της μετωποκροταφικής άνοιας (FTD). Έχει, επίσης, συσχετιστεί με σύνδρομο Huntington-like (HD-like) και σπάνια με τη νόσο του Parkinson (PD) και τη νόσο Alzheimer (AD). Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση του γονοτυπικού και φαινοτυπικού προφίλ των νοσημάτων που σχετίζονται με το γονίδιο *C9ORF72* στην Ελλάδα. Για το σκοπό αυτό, 860 ασθενείς (399 με ALS, 44 με σύνδρομο HD-like, 224 με άνοια, 178 με PD και 15 με κληρονομική σπαστική παραπληγία, (HSP)) και 321 μάρτυρες ελέγχθηκαν για τη μεταλλαγή. Τριάντα οκτώ ασθενείς με ALS (9,5%), 2 με σύνδρομο HD-like (4,5%), 8 με FTD (8,5%), 1 με AD (1,7%) και 2 με PD (1,1%) αποδείχθηκαν θετικοί για την επέκταση. Τα αποτελέσματα της μελέτης τονίζουν τη σημασία του γενετικού ελέγχου για το γονίδιο *C9ORF72* σε Έλληνες ασθενείς με οικογενείς και σποραδικές μορφές ALS ή/και FTD και σύνδρομο HD-like.

Λέξεις-κλειδιά

Γονίδιο *C9ORF72*, ελληνικός πληθυσμός, νευροεκφυλιστικά νοσήματα

Εισαγωγή

Το 2011, ανακαλύφθηκε από δύο ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες, ότι μια δυναμική μεταλλαγή (επέκταση του αριθμού των επαναλήψεων του εξανουκλεοτιδίου GGGGCC) στην μη κωδική περιοχή του γονιδίου *C9ORF72* φαίνεται να εμπλέκεται στην αιτιοπαθογένεια της ALS και FTD (DeJesus-Hernandez et al 2011, Renton et al 2011). Έκτοτε έχει αποδειχθεί ότι η επέκταση του *C9ORF72* μπορεί να οδηγήσει και σε σύνδρομο HD-like και σπάνια σε PD και AD. Πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν μελετήσει την συχνότητα της μεταλλαγής σε διάφορους πληθυσμούς, πραγματοποιώντας συσχετίσεις γονοτύπου-φαινοτύπου. Στον ελληνικό πληθυσμό ο οποίος ήταν και από τους πρώτους που μελετήθηκαν η μεταλλαγή βρέθηκε ότι είναι παρούσα στο 50% των οικογενών και στο 8% των σποραδικών μορφών ALS (Mok et al 2012), στο 5% των ασθενών με σύνδρομο HD-like (Koutsis et al 2015) και στο 28% των οικογενών και στο 2% των σποραδικών μορφών FTD (Kartanou et al 2018). Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ταυτοποίηση της επέκτασης σε μεγαλύτερες ομάδες ασθενών με ALS και FTD και η διεύρυνση των νοσημάτων που σχετίζονται με την επέκταση του γονιδίου *C9ORF72*, με τη μελέτη ασθενών με PD και HSP, καθώς και υγιών μαρτύρων για τους οποίους δεν υπάρχουν ακόμη δεδομένα για τον ελληνικό πληθυσμό.

Υλικά και Μέθοδοι

Οκτακόσιοι εξήντα ασθενείς δείκτες (399 με ALS, 44 με σύνδρομο HD-like, 224 με άνοια, 178 με PD

και 15 με HSP) και 321 υγιείς μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας και φύλου υποβλήθηκαν σε γονιδιακό έλεγχο για την επέκταση του γονιδίου *C9ORF72* στη Μονάδα Γενετικής του Νευρικού Συστήματος του Αιγινήτειου Νοσοκομείου. Η μεθοδολογία για τη μοριακή ανίχνευση της επέκτασης περιελάμβανε την εφαρμογή της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης της DNA πολυμεράσης (PCR) προσαρμοσμένης και σχεδιασμένης ώστε να ανιχνεύει μεγάλου αριθμού επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (repeat primed – PCR, RP-PCR). Όλοι οι ασθενείς έδωσαν γραπτή συγκατάθεση για τη διενέργεια του γενετικού ελέγχου και η μελέτη εγκρίθηκε από την επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του νοσοκομείου.

Αποτελέσματα

Συνολικά, 38 ασθενείς με ALS (9,5%, 38/399), 14 με οικογενή μορφή (51,9%, 14/27) και 23 σποραδική μορφή (6,7%, 23/341) ήταν θετικοί για την επέκταση. Όσον αφορά την ομάδα των ανοιών, 8 ασθενείς με FTD (7,9%, 8/101), 6 με οικογενή μορφή (26,1%, 6/23), 2 με σποραδική μορφή (2,6% 2/78) και 1 ασθενής με AD (1,7% , 1/58) ήταν θετικοί για την επέκταση. Η επέκταση ανιχνεύθηκε, επίσης, σε 2 ασθενείς με σύνδρομα HD-like (4,5 % , 2/44). Τέλος, στην ομάδα των ασθενών με PD βρέθηκαν 2 ασθενείς θετικοί για την επέκταση (1,1%, 2/178). Η επέκταση δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα ασθενή με HSP ούτε στους υγιείς μάρτυρες.

Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη αποτελεί τον πρώτο πλήρη γενετικό και φαινοτυπικό χαρακτηρισμό ασθενών με νοσήματα που σχετίζονται με το γονίδιο *C9ORF72*, στην Ελλάδα. Από τα αποτελέσματα της μελέτης φαίνεται ότι η συχνότητα του γονιδίου σε οικογενείς μορφές ALS και FTD είναι μία από τις υψηλότερες στην Ευρώπη. Επιπλέον, η μεταλλαγή φαίνεται να αποτελεί την πιο συχνή γενετική αιτία των ασθενών με σύνδρομα HD-like στην Ελλάδα, ενώ σε Έλληνες ασθενείς με PD φαίνεται να ανευρίσκεται σπάνια. Συνεπώς, υπογραμμίζεται η σημασία του γενετικού ελέγχου για το γονίδιο *C9ORF72* σε Έλληνες ασθενείς με οικογενείς και σποραδικές μορφές ALS ή/και FTD και σύνδρομα HD-like.

Βιβλιογραφία

DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I.R., Boeve, B.F., Boxer, A.L., Baker, M., Rutherford, N.J., Nicholson, A.M., Finch, N.A., Flynn, H., Adamson, J., et al. (2011) Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in non-coding region of *C9ORF72* causes chromosome 9p-linked frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron*, 72(2), p.245–256.

Renton, A.E., Majounie, E., Waite, A., Simón-Sánchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J.R., Schymick, J.C., Laaksovirta, H., van Swieten, J.C., Myllykangas, L., et al. (2011) A hexanucleotide repeat expansion in *C9ORF72* is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*, 72(2), p.257–268.

Mok, K.Y., Koutsis, G., Schottlaender, L.V., Polke, J., Panas, M., Houlden, H., (2012) High frequency of the expanded *C9ORF72* hexanucleotide repeat in familial and sporadic Greek ALS patients. *Neurobiol Aging*, 33(8), p.1-5.

Koutsis, G., Karadima, G., Kartanou, C., Kladi, A., Panas, M., (2014) *C9ORF72* hexanucleotide repeat expansions are a frequent cause of Huntington disease phenocopies in the Greek population. *Neurobiology of aging*, 36(1), p.547.

Kartanou, C., Karadima, G., Koutsis G., Breza, M., Papageorgiou S.G., Paraskevas, G.P., Kapaki, E., Panas, M. (2017). Screening for the *C9ORF72* repeat expansion in a Greek frontotemporal dementia cohort. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration* (under review).

Μελέτη της έκφρασης γονιδίων επιδιόρθωσης του γενετικού υλικού σε ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα

Χρύσα ΚΑΛΙΓΕΡΟΥ*¹, Γεώργιος ΜΙΜΙΚΟΣ*¹, Σταματίνα ΡΟΥΣΣΟΥ*¹, Αγγελική ΤΑΛΙΟΥΡΑΚΗ¹, Ανδρομάχη ΒΑΓΕΝΑ¹, Χριστίνα-Νεφέλη ΚΟΝΤΑΝΔΡΕΟΠΟΥΛΟΥ², Νόρα-Αθηνά ΒΥΝΙΟΥ², Παναγούλα ΚΟΛΛΙΑ¹

¹Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

²Α' Παθολογική Κλινική, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα
*ισάζια συμμετοχή

Περίληψη

Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ) είναι μια ετερογενής ομάδα διαταραχών που σχετίζεται με δυσλειτουργία και αναποτελεσματικότητα του μυελού των οστών. Στα ΜΔΣ έχουν ταυτοποιηθεί μεταλλαγές σε γονίδια που εμπλέκονται σε βασικούς μηχανισμούς για την επιβίωση των κυττάρων, όπως η επιδιόρθωση των λαθών του DNA. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν η έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, όπως τα γονίδια *MPG*, *NEIL2* και *RPA1*, *XAB2*. Τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικά σημαντική αύξηση και μείωση της έκφρασης των γονιδίων *MPG* και *XAB2*, αντίστοιχα, στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς. Η έκφραση του γονιδίου *RPA1* είναι μειωμένη στα αρχικά στάδια της νόσου και αυξάνεται με την εξέλιξη της νόσου, ενώ η έκφραση του γονιδίου *NEIL2* αυξάνεται καθ' όλη τη διάρκεια εξέλιξης της ασθένειας. Συμπερασματικά, αναδείχθηκε ότι στα ΜΔΣ η απορρύθμιση των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA καθώς και η συμβολή συγκεκριμένων γονιδίων συμμετέχουν στην ανάπτυξη και εξέλιξη της νόσου.

Λέξεις-Κλειδιά

Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, γονίδια επιδιόρθωσης του DNA

Εισαγωγή

Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ) είναι μια ετερογενής ομάδα κλωνικών διαταραχών του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου, που χαρακτηρίζεται από διαταραχές της κυτταρικής διαφοροποίησης και μη αποδοτική αιμοποίηση (Zhang, Padron, and Lancet 2015). Τα ΜΔΣ εμφανίζονται κατά κανόνα σε άτομα άνω των 60 ετών. Το προσδόκιμο ζωής δεν είναι μεγάλο και υπάρχει πιθανότητα εξέλιξης της νόσου σε Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία. (Hellenic Society of Haematology 2011). Είναι πλέον γνωστό ότι τα ΜΔΣ χαρακτηρίζονται από πολυάριθμες μεταλλαγές σε γονίδια που συμμετέχουν σε κρίσιμα για την επιβίωση κυτταρικά μονοπάτια (Zhou et al. 2015). Σύμφωνα με ένα πιθανό μοντέλο παθογένειας, η έναρξη της νόσου και η πρόοδος της σε Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία, συνοδεύεται από συσσώρευση σημαντικού αριθμού μεταλλαγών και γενετική αστάθεια, που οφείλονται σε δυσλειτουργία των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA (Nolte and Hofmann 2008).

Υλικά και Μέθοδοι

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η έκφραση 84 γονιδίων επιδιόρθωσης του DNA με RT² Profiler PCR DNA Repair Arrays (Qiagen). Μελετήθηκαν έξι δείγματα περιφερικού αίματος από ασθενείς υψηλής (3 RAEB1, 3 RAEB2) και δύο χαμηλής κακοήθειας (RA) και 3 δείγματα υγιών μαρτύρων. Στη συνέχεια, τέσσερα εξ αυτών των γονιδίων, επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη, βάσει των αποτελεσμάτων που παρουσίαζαν στατιστική σημαντικότητα (p-value<0,05). Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν τα γονίδια *XAB2*, *RPA1* που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση με εκτομή νουκλεοτιδίων (NER) και τα γονίδια *NEIL2*, *MPG* που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση με εκτομή βάσης (BER). Η έκφραση των τεσσάρων γονιδίων μελετήθηκε σε 21 ασθενείς με ΜΔΣ, 11 υψηλής κακοήθειας (RAEB1, RAEB2) και δέκα χαμηλής κακοήθειας (RARS, RA, RCMD, Del5q) και σε 20 υγιείς μάρτυρες, με RT-PCR. Η σχετική έκφραση των γονιδίων επιδιόρθωσης υπολογίστηκε με τη μέθοδο 2^{-ΔΔCt}.

Αποτελέσματα

Η ανάλυση της έκφρασης των 84 γονιδίων κατέδειξε ότι τα περισσότερα γονίδια των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται συμμετέχουν στα μονοπάτια BER και NER. Συγκεκριμένα, τα γονίδια *MPG* ($p=0,042$), *NEIL2* ($p=0,028$), *RPA1* ($p=0,01$) και *XAB2* ($p=0,024$) παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική αλλαγή στην έκφραση τους. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε υπερέκφραση των γονιδίων *MPG*, *NEIL2*, *RPA1* και υποέκφραση του γονιδίου *XAB2*. Συγκεκριμένα για το γονίδιο *MPG* παρατηρήθηκε 4 φορές αύξηση της έκφρασης του σε σύγκριση με την ομάδα υγιών ($p=0,0087$). Το γονίδιο *MPG* υπερεκφράζεται 5 φορές στους ασθενείς χαμηλής κακοήθειας (RA, $p=0,05$) και 12 φορές στους ασθενείς υψηλής κακοήθειας (RAEB2, $p=0,009$). Επίσης τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *XAB2* μειώθηκαν κατά 2 φορές στους ασθενείς χαμηλής κακοήθειας (RA) σε σχέση με τους υγιείς ($p=0,007$) καθώς και στους ασθενείς υψηλής κακοήθειας (RAEB2, $p=0.002$). Αξιοσημείωτο είναι ότι η έκφραση του γονιδίου *RPA1* είναι μειωμένη στα αρχικά στάδια της νόσου (RA) και αυξάνεται με την εξέλιξη της νόσου (RAEB1), ενώ η έκφραση του γονιδίου *NEIL2* αυξάνεται καθώς η νόσος εξελίσσεται.

Συμπεράσματα

Η ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων επιδιόρθωσης ανέδειξε την απορρύθμιση των μονοπατιών επιδιόρθωσης του DNA με εκτομή νουκλεοτιδίων (*XAB2*, *RPA1*) και με εκτομή βάσεων (*NEIL2*, *MPG*). Η σταδιακή αύξηση της έκφρασης των γονιδίων *MPG* και *NEIL2* καταδεικνύει την απορρύθμιση των εμπλεκόμενων μονοπατιών που οδηγεί σε γενετική αστάθεια και τελικά στην πρόοδο της νόσου (Benitez-Buelga et al., 2017). Η μειωμένη έκφραση του γονιδίου *XAB2* και *RPA1*, που παρατηρείται στα αρχικά στάδια της νόσου (RA) και η επερχόμενη αύξηση της έκφρασης τους (RAEB1), υποδεικνύει συσσώρευση βλαβών στο DNA και πιθανή συμμετοχή των εμπλεκόμενων μηχανισμών στην εξέλιξη της νόσου. Η μεταβολή της έκφρασης των τεσσάρων γονιδίων στο σύνολο των ασθενών συνάδει με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, καθώς οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης τείνουν να είναι περισσότερο απορρυθμισμένοι στους ασθενείς υψηλής κακοήθειας σε σύγκριση με τους ασθενείς χαμηλής κακοήθειας και τους υγιείς (Valka et al., 2017). Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συμβάλλουν στην κατανόηση του ρόλου των μορίων που συμμετέχουν στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης με την παθογένεια των διαφορετικών κατηγοριών ΜΔΣ.

Βιβλιογραφία:

- Φώτης Ν. Μπερής, Ελένη Α. Παπαδάκη, Κωνσταντίνος Τσαταλάς, Ν.-Α. Βύνιου, Α. Συμεωνίδης. 2011. "Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα - 1ο Μέρος." Hellenic Society of Haematology vol.2.
- Benitez-Buelga, C., Baquero, J. M., Vaclova, T., Fernandez, V., Martin, P., Inglada-Perez, L., Benitez, J. (2017). Genetic variation in the NEIL2 DNA glycosylase gene is associated with oxidative DNA damage in BRCA2 mutation carriers. *Oncotarget*, 8(70), 114626-114636. doi:10.18632/oncotarget.22638
- Nolte, F., and W. K. Hofmann. 2008. "Myelodysplastic syndromes: molecular pathogenesis and genomic changes." *Ann Hematol* 87 (10):777-95. doi: 10.1007/s00277-008-0502-z.
- Valka, J., Vesela, J., Votavova, H., Dostalova-Merkerova, M., Horakova, Z., Campr, V., . . . Belickova, M. (2017). Differential expression of homologous recombination DNA repair genes in the early and advanced stages of myelodysplastic syndrome. *Eur J Haematol*, 99(4), 323-331. doi:10.1111/ejh.12920
- Zhang, L., E. Padron, and J. Lancet. 2015. "The molecular basis and clinical significance of genetic mutations identified in myelodysplastic syndromes." *Leuk Res* 39 (1):6-17. doi: 10.1016/j.leukres.2014.10.006.
- Zhou, T., P. Chen, J. Gu, A. J. Bishop, L. M. Scott, P. Hasty, and V. I. Rebel. 2015. "Potential relationship between inadequate response to DNA damage and development of myelodysplastic syndrome." *Int J Mol Sci* 16 (1):966-89. doi: 10.3390/ijms16010966.

Διερεύνηση της νευρογενετικής επίδρασης της μικρονευροτροφίνης BNN-20 στο παρκινσονικό μοντέλο «weaver» και σε ανθρώπινα επαγόμενα πολυδύναμα κύτταρα (iPSCs) ασθενών.

Θεοδώρα ΜΟΥΡΤΖΗ*, Δημήτρης ΔΗΜΗΤΡΑΚΟΠΟΥΛΟΣ¹, Δημήτρης ΚΑΚΟΓΙΑΝΝΗΣ¹, Χαράλαμπος ΣΑΛΟΔΗΜΗΤΡΗΣ¹, Αθανασία ΑΝΤΩΝΙΟΥ², Γεωργία ΚΟΥΡΟΥΠΗ², Φεβρωνία ΑΓΓΕΛΑΤΟΥ³, Ηλίας ΚΑΖΑΝΗΣ¹

[1]Εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα, 26504

[2]Εργαστήριο Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας – Βλαστικών Κυττάρων, Τμήμα Νευροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Βασιλίσσης Σοφίας 127, Αθήνα, 11521.

[3]Εργαστήριο Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα, 26500

*mourtzi@upatras.gr

Περίληψη

Οι υπάρχουσες θεραπείες για τη Νόσο του Parkinson (NP) παραμένουν ανεπαρκείς. Αποτελέσματά μας στο παρκινσονικό μοντέλο «weaver», ανέδειξαν τη μικρομοριακή νευροτροφίνη BNN-20, ως πλειοτροπικό νευροπροστατευτικό/νευρογενετικό παράγοντα, που μιμείται τη δράση του BDNF. Χρόνια χορήγηση BNN-20 στο μυ «weaver» (P14-P60) προάγει ντοπαμινεργική νευρογένεση, ιστοειδικά στην ενήλικη μέλαινα ουσία (SNpc), αποκαθιστώντας σημαντικά τον αριθμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Οι νεογεννηθέντες νευρώνες προέρχονται τουλάχιστον εν μέρει από τα νευρικά βλαστικά/προγονικά κύτταρα (NSPCs) της υποεπενδυματικής ζώνης των πλάγιων κοιλιών, ενώ η δράση του BNN-20 ασκείται κυρίως μέσω της ενίσχυσης της διαφοροποίησης των NSPCs σε νευρώνες. Βάσει των ανωτέρω ενθαρρυντικών αποτελεσμάτων προχωράμε σήμερα στον χαρακτηρισμό της επίδρασης του BNN-20 σε ανθρώπινους νευρώνες προερχόμενους από επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs) ασθενών NP, αλλά και σε μεταμοσχεύσεις NSPCs στην SNpc μύων «weaver». Εάν οι ευεργετικές δράσεις του προεκτείνονται στον άνθρωπο, το BNN-20 θα μπορούσε να αποτελέσει βάση ανάπτυξης καινοτόμων θεραπευτικών στρατηγικών.

Λέξεις-Κλειδιά

Νόσος Parkinson, Ενήλικη νευρογένεση, BNN-20, Μικρονευροτροφίνες

Εισαγωγή

Η Νόσος του Parkinson (NP) αποτελεί τη δεύτερη συχνότερη νευροεκφυλιστική διαταραχή, με σοβαρό κοινωνικο-οικονομικό αντίκτυπο. Η αντιμετώπισή της παραμένει συμπτωματική, ανίκανη να αναστείλει/αναστρέψει την εξέλιξη της νόσου. Νευροτροφικοί παράγοντες όπως ο BDNF έχουν αναδείξει ευεργετικότερη δράση σε προκλινικά μοντέλα της NP, αλλά η κλινική χρήση τους περιορίζεται αφού δε διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (BBB).

Η μικρονευροτροφίνη BNN-20, συνθετικό ανάλογο της δεϋδροξυεπιανδροστερόνης (DHEA), αποτελεί ένα παράγοντα με ισχυρή νευροπροστατευτική δράση, ικανό να διαπεράσει το BBB. Προηγούμενα αποτελέσματά μας, στο παρκινσονικό μοντέλο μύος «weaver», ανέδειξαν το BNN-20 ως πλειοτροπική νευροπροστατευτική νευροτροφίνη, που μιμείται το BDNF, ενεργοποιώντας τον υποδοχέα του TrkB και τις καθοδικές οδούς TrkB-PI3K-Akt-NFκB και TrkB-ERK1/2-NFκB (Botsakis et al., 2017, Panagiotakoulou et al., 2020).

Η έναρξη χρόνιας χορήγησης BNN-20 τη μεταγεννητική ημέρα P14, όπου έχει εκφυλιστεί το 40% των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μέλαινας ουσίας (SNpc) (P14-P40 ή P14-P60), ασκεί πλειοτροπική (αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική, αντιαποπτωτική) νευροπροστατευτική δράση, αναστέλλοντας την περαιτέρω εκφύλιση και αυξάνοντας τον αριθμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Επιπρόσθετα, βελτιώνει την κινητικότητα των μύων “weaver”, καθώς και τα επίπεδα της ντοπαμίνης στο ραβδωτό σώμα (Botsakis et al., 2017, Panagiotakoulou et al., 2020).

Βάσει των ανωτέρω, στόχο της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η διερεύνηση της ύπαρξης ντοπαμινεργικής νευρογένεσης στην ενήλικη SNpc μύων αγρίου-τύπου και των “weaver” μύων, η οποία μέχρι πρότινος ήταν αμφιλεγόμενη (Frielingsdorf et al., 2004, Zhao et al., 2003), και δεύτερον η αξιολόγηση της ικανότητας του BNN-20 να ενισχύει την ενήλικη ντοπαμινεργική νευρογένεση στην SNpc, προάγοντας την αναγέννηση των

ντοπαμινεργικών νευρώνων.

Μέθοδοι

Χρησιμοποιήσαμε *in vivo* ιχνηθέτηση με χορήγηση 5-βρώμο-2-δεοξουριδίνης (BrdU) και διπλό ανοσοφθορισμό, για την επιβεβαίωση της ύπαρξης νευρογένεσης στην ενήλικη SNpc και για τη διερεύνηση της νευρογενετικής επίδρασης του BNN-20 (P14-P60, 100mg/kg σωματικού βάρους, i.p.) στην SNpc και στις κλασικές νευρογενετικές ζώνες του ενήλικου εγκεφάλου μύων “weaver” και αγρίου-τύπου [οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου και υποεπενδυματική ζώνη των πλάγιων κοιλιών (SEZ)].

Για τη διερεύνηση της προέλευσης των νεογεννηθέντων ντοπαμινεργικών νευρώνων, τα νευρικά βλαστικά/προγονικά κύτταρα (NSPCs) της υποεπενδυματικής ζώνης των πλάγιων κοιλιών (SEZ) σημάνθηκαν με στερεοταξική ενδοκοιλιακή (icv) έγχυση της λιπόφιλης χρωστικής DiI και ακολούθησε ανοσοφθορισμική ανίχνευση διπλά-θετικών TH+/DiI+ ντοπαμινεργικών νευρώνων στην SNpc.

Για πιο αναλυτική μελέτη της νευρογενετικής δράσης του BNN-20, πραγματοποιήσαμε απομόνωση NSPCs από τη μέλαινα ουσία και τη SEZ αγρίου-τύπου και «weaver» μύων τα οποία καλλιεργήθηκαν με πρωτόκολλα διαφοροποίησης και πολλαπλασιασμού παρουσία/απουσία BNN-20 στο θρεπτικό μέσο ($10^{-7}M$).

Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματά μας ανέδειξαν την ύπαρξη ενήλικης ντοπαμινεργικής νευρογένεσης στην SNpc μύων αγρίου-τύπου και «weaver» μύων, την οποία επαληθεύσαμε με την ιχνηθέτηση των νεογεννηθέντων νευρώνων με BrdU, αλλά και με την επιτυχή απομόνωση/καλλιέργεια NSPCs από τη μέλαινα ουσία.

Στους μύες αγρίου-τύπου, η χορήγηση BNN-20 ενισχύει τον χαμηλό ρυθμό γένεσης ντοπαμινεργικών νευρώνων, χωρίς όμως μεταβολή του συνολικού τους αριθμού, πιθανότατα μέσω φαινομένων αντικατάστασης (turnover) των κυττάρων.

Η χορήγηση BNN-20 παρουσιάζει ισχυρή νευρογενετική δράση αποκαθιστώντας σημαντικά τον αριθμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων στην SNpc «weaver» μύων. Με βάση τα πειράματα σήμανσης με DiI, οι νέοι ντοπαμινεργικοί νευρώνες της SNpc προέρχονται, τουλάχιστον εν μέρει, από τα NSPCs της SEZ.

Η νευρογενετική δράση του BNN-20 περιορίζεται στην περιοχή της βλάβης, αφού ο νευρογενετικός ρυθμός στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου και τη SEZ παρέμεινε αμετάβλητος.

Τέλος, σύμφωνα με τα πειράματα σε κυτταροκαλλιέργειες NPSCs, η νευρογενετική επίδραση του BNN-20 ασκείται κυρίως μέσω της ενίσχυσης της διαφοροποίησής τους σε νευρώνες.

Συμπεράσματα

Με βάση τα παραπάνω, το BNN-20 αποτελεί ένα ισχυρό νευρογενετικό παράγοντα, ικανό να αναχαιτίσει και να αναστρέψει τη ντοπαμινεργική νευροεκφύλιση στο παρκινσονικό μοντέλο μύος «weaver».

Για να διερευνήσουμε εάν η ευεργετική δράση του BNN-20 θα μπορούσε να βρει θεραπευτική εφαρμογή στη NP, γεγονός που θα ήταν μεγάλης κλινικής σημασίας, συνεχίζουμε την έρευνα σε δύο κατευθύνσεις: Α) στην αξιολόγηση της δράσης του BNN-20 σε ανθρώπινους νευρώνες προερχόμενους από επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs) υγιών δοτών και ασθενών NP και Β) στην αξιολόγηση της πιθανότητας η χορήγηση του BNN-20 να αυξάνει την επιτυχία μιας μεταμόσχευσης NSPCs στην SNpc μύων «weaver», είτε χορηγούμενο στο ζώο, είτε κατά την καλλιέργεια του μοσχεύματος.

Εάν οι παραπάνω υποθέσεις επαληθευτούν, το BNN-20 θα μπορούσε να αποτελέσει βάση για την ανάπτυξη θεραπειών κυτταρικής αποκατάστασης (Cell Replacement Therapies), στοχεύοντας είτε στην ενεργοποίηση/ενίσχυση της ενδογενούς νευρογένεσης, είτε στην αύξηση της επιτυχίας μιας μεταμόσχευσης.

Βιβλιογραφία

Botsakis, K., Mourtzi, T., et al.(2017). BNN-20, a synthetic microneurotrophin, strongly protects dopaminergic neurons in the "weaver" mouse, a genetic model of dopamine-denervation, acting through the TrkB neurotrophin receptor. *Neuropharmacology* 121, 140-157.

Frielingdorf, H., Schwarz, K. et al.,(2004). No evidence for new dopaminergic neurons in the adult

mammalian substantia nigra. PNAS US 101, 10177.

Panagiotakopoulou, V., Botsakis, K., Mourtzi, T., et al.(2020). Anti-neuroinflammatory, protective effects of the synthetic microneurotrophin BNN-20 in the advanced dopaminergic neurodegeneration of “weaver” mice. Neuropharmacology 165, 107919.

Zhao, M. et al.,(2003). Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. PNAS 100, 7925.

Γενετικές Παραλλαγές του Υποδοχέα της Μελατονίνης και Συσχέτιση με Καρδιαγγειακά Νοσήματα

Γεώργιος ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ¹, Ανδρομάχη ΒΑΓΕΝΑ¹, Σταματίνα ΡΟΥΣΣΟΥ¹, Ιωάννα-Αικατερίνη ΑΓΓΕΛΗ², Παναγούλα ΚΟΛΛΙΑ¹

¹Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

²Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

Περίληψη:

Μία από τις κύριες αιτίες θανάτου στον σύγχρονο κόσμο, είναι τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η πιθανή συσχέτιση της παρουσίας πολυμορφισμών στο γονίδιο *MT2* του υποδοχέα της μελατονίνης με την ανάπτυξη καρδιαγγειακών παθήσεων. Η μελατονίνη είναι μια νευροορμόνη, η οποία επηρεάζει πολλές λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού. Πολυμορφισμοί στον *MT2* υποδοχέα έχουν ήδη συσχετισθεί με πολλά νοσήματα, όπως ο διαβήτης και η υπέρταση. Συγκεκριμένα στην παρούσα εργασία, μελετήθηκαν τρεις πολυμορφισμοί του συγκεκριμένου υποδοχέα, ο rs-10830962, ο rs-4753426 και ο rs-12804291 σε δέκα ασθενείς και σε 5 υγιείς. Από την ανάλυση προέκυψε ότι οι περισσότεροι ασθενείς έφεραν τους πολυμορφισμούς rs-10830962 και rs-4753426, σε αντίθεση με τον rs-12804291 ο οποίος δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα ασθενή. Συμπερασματικά, η παρουσία των πολυμορφισμών rs-10830962 και rs-4753426 στον υποδοχέα *MT2* της μελατονίνης είναι πιθανό να συσχετίζεται με την εμφάνιση καρδιαγγειακών παθήσεων.

Λέξεις-Κλειδιά:

Καρδιαγγειακά νοσήματα, μελατονίνη, *MT2* υποδοχέας

Εισαγωγή

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα είναι μια από τις κύριες αιτίες θανάτου στο σύγχρονο κόσμο με κύρια αιτία πρόκλησης τους την αθηροσκλήρωση, που οδηγεί στην εμφάνιση της στεφανιαίας νόσου (Gurr and Harwood, 1991). Οι κυριότεροι παράγοντες κινδύνου για την εκδήλωσή τους είναι το κάπνισμα, η παχυσαρκία, ο διαβήτης, οι υψηλές συγκεντρώσεις λιπιδίων στο αίμα και η υπέρταση (Prince et al. 2013). Τελευταίες μελέτες έχουν συσχετίσει την παρουσία πολυμορφισμών στον υποδοχέα *MT2* της μελατονίνης με την εμφάνιση σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2, υπέρτασης και τελικά με τα καρδιαγγειακά νοσήματα (Radziuk and Pye 2006, Bai et al. 2020). Η μελατονίνη είναι μια νευροορμόνη η οποία εκκρίνεται κυρίως από την επίφυση με αντιοξειδωτική δράση, η οποία επηρεάζει πληθώρα λειτουργιών του ανθρώπινου οργανισμού. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της συσχέτισης της παρουσίας των πολυμορφισμών rs10830962 (C>A,G,T), rs4753426 (T>C) και rs12804291 (C>T) στο γονίδιο του υποδοχέα *MT2* της μελατονίνης με την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων. Οι πολυμορφισμοί rs10830962, rs4753426 βρίσκονται ανοδικά του γονιδίου, ενώ ο rs12804291 εντοπίζεται εντός του γονιδίου.

Υλικά και μέθοδοι

Στην παρούσα εργασία αναλύθηκαν 5 υγιή άτομα με μέσο όρο ηλικίας τα 63 έτη ± 6 και 10 ασθενείς με μέσο όρο ηλικίας τα 71 έτη ±6. Η κατηγοριοποίηση των ασθενών έγινε με βάση τα αποτελέσματα του σπινθηρογραφήματος, σε συνδυασμό με τεστ κοπώσεως. Η ανίχνευση των πολυμορφικών θέσεων πραγματοποιήθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger των προϊόντων PCR για κάθε πολυμορφισμό.

Αποτελέσματα

Η ανίχνευση των πολυμορφισμών με αλληλούχηση κατά Sanger έδειξε αρχικά για την ομάδα αναφοράς ότι οι πολυμορφισμοί rs-10830962 και rs-12804291 ανευρίσκονται σε ετεροζυγωτία σε ένα μόνο άτομο (1/5), ενώ 4/5 άτομα έφεραν το φυσιολογικό αλληλόμορφο. Σχετικά με τον rs-4753426, 3/5 άτομα έφεραν το φυσιολογικό αλληλόμορφο (T/T) και 2 έφεραν τον πολυμορφισμό σε ετεροζυγωτία (T/C). Σε

ό,τι αφορά την ομάδα μελέτης ο πολυμορφισμός rs-10830962 ανιχνεύθηκε σχεδόν σε όλους τους ασθενείς (7/10) σε ετεροζυγωτία (C/G), ενώ 1 ασθενής έφερε τον πολυμορφισμό σε ομοζυγωτία (G/G). Ως προς τον rs-4753426 δεδομένα υπήρχαν για τους 6 ασθενείς εκ των οποίων οι 3 έφεραν τον πολυμορφισμό σε ετεροζυγωτία (T/C), 1 σε ομοζυγωτία (C/C) και 2 έφεραν το φυσιολογικό αλληλόμορφο (T/T). Τέλος, σχετικά με το rs-12804291, αξιοσημείωτο είναι ότι κανένας ασθενής δεν έφερε τον πολυμορφισμό.

Συζήτηση

Η ανίχνευση του πολυμορφισμού rs10830962 (C>G) για την ομάδα αναφοράς έδειξε ότι το 80% (4/5) έφερε το φυσιολογικό αλληλόμορφο και μόνο το 20% (1/5) έφερε τον πολυμορφισμό σε ετεροζυγωτία. Αντίθετα, στην ομάδα μελέτης ο πολυμορφισμός ανιχνεύθηκε σε ετεροζυγωτία στο 70% (7/10) και σε ομοζυγωτία στο 10% (1/10) και μόνο το 20% (2/10) έφερε το φυσιολογικό αλληλόμορφο (C). Βιβλιογραφικά η αντικατάσταση C>G του rs10830962 έχει συσχετισθεί με μειωμένα επίπεδα ινσουλίνης, καθώς και με υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα (Staiger et al. 2008). Σχετικά με τον rs4753426 (T>C), το 60% (3/5) της ομάδας αναφοράς δεν έφερε την πολυμορφική θέση και το 40% (2/5) έφερε τον πολυμορφισμό σε ετεροζυγωτία. Στην ομάδα μελέτης το 50% (3/6) έφερε το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο σε ετεροζυγωτία, το 16,7% (1/6) σε ομοζυγωτία και 33,3% (2/6) έφερε το φυσιολογικό αλληλόμορφο (T). Βιβλιογραφικά η παρουσία του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου έχει συσχετισθεί με μείωση της έκφρασης του υποδοχέα MT2, μείωση της λειτουργίας της μελατονίνης καθώς και συσχέτιση με ασθένειες όπως διαβήτη τύπου 2 και πολυκυστικές ωοθήκες (Yang et al. 2015). Τέλος ο rs-12804291 (C>T) δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα άτομο της ομάδας μελέτης. Συμπερασματικά, καταδεικνύεται πιθανή συσχέτιση των πολυμορφισμών rs10830962 και rs4753426 του υποδοχέα MT2 της μελατονίνης με την εμφάνιση καρδιαγγειακών παθήσεων, ενώ για τον πολυμορφισμό rs12804291 δε φαίνεται να προκύπτει αντίστοιχη συσχέτιση.

Βιβλιογραφία

- Gurr, M. I., and J. L. Harwood. 1991. "Lipid Biochemistry." <https://doi.org/10.1007/978-94-011-3062-2>.
- Prince, Jip F., Maarten L. J. Smits, Joost A. van Herwaarden, Mark J. Arntz, Evert-Jan P. A. Vonken, Maurice A. A. J. van den Bosch, and Gert Jan de Borst. 2013. "Endovascular Treatment of Internal Iliac Artery Stenosis in Patients with Buttock Claudication." *PloS One* 8 (8): e73331.
- Radziuk, J., and S. Pye. 2006. "Diurnal Rhythm in Endogenous Glucose Production Is a Major Contributor to Fasting Hyperglycaemia in Type 2 Diabetes. Suprachiasmatic Deficit or Limit Cycle Behaviour?" *Diabetologia* 49 (7): 1619–28.
- Bai, Jiachen, Leying Zhang, Zimo Zhao, Ning Li, Bin Wang, and Ling Yang. 2020. "Expression of Melatonin Receptors and CD4 in the Ovine Thymus, Lymph Node, Spleen and Liver during Early Pregnancy." *Immunology* 160 (1): 52–63.
- Staiger, Harald, Fausto Machicao, Silke A. Schäfer, Kerstin Kirchhoff, Konstantinos Kantartzis, Martina Guthoff, Günther Silbernagel, Norbert Stefan, Hans-Ulrich Häring, and Andreas Fritsche. 2008. "Polymorphisms within the Novel Type 2 Diabetes Risk Locus MTNR1B Determine Beta-Cell Function." *PloS One* 3 (12): e3962.
- Yang, Mingyuan, Xianzhao Wei, Wu Yang, Yanming Li, Haijian Ni, Yingchuan Zhao, Ziqiang Chen, Yushu Bai, and Ming Li. 2015. "The Polymorphisms of Melatonin Receptor 1B Gene (MTNR1B) (rs4753426 and rs10830963) and Susceptibility to Adolescent Idiopathic Scoliosis: A Meta-Analysis." *Journal of Orthopaedic Science: Official Journal of the Japanese Orthopaedic Association* 20 (4): 593–600.

Ο ρυθμιστικός ρόλος των αιμοπεταλίων στη διαφοροποίηση προς την ολιγοδενδρογλοιακή μοίρα των ενήλικων Νευρικών Βλαστικών Κυττάρων της Υποεπενδυματικής Ζώνης

Χριστίνα ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ, Δημήτριος ΛΑΓΟΓΙΑΝΝΗΣ, Γεώργιος – Μάριος ΘΕΟΧΑΡΟΠΟΥΛΟΣ, Κωνσταντίνος ΠΑΠΑΔΗΜΗΤΡΙΟΥ, Κωνσταντίνος ΡΟΥΣΣΗΣ, Cédric GHEVAERT, Robin JM FRANKLIN, Ηλίας ΚΑΖΑΝΗΣ

1.Εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Ρίο, Ελλάδα, 2. Wellcome Trust- MRC Cambridge Stem Cell Institute & Department of Clinical Neurosciences, University of Cambridge, Cambridge, UK, chdimit12@gmail.com

Εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Ρίο, Ελλάδα, dimitrislagogiannisbio@gmail.com

Εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Ρίο, Ελλάδα, georgemariosbb@gmail.com

Εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Ρίο, Ελλάδα, kotsos_93@hotmail.com

Εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Ρίο, Ελλάδα, roussiskonstantinos@hotmail.com

Wellcome Trust - MRC Cambridge Stem Cell Institute & Department of Haematology, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom, cg348@cam.ac.uk

Wellcome Trust - MRC Cambridge Stem Cell Institute & Department of Clinical Neurosciences, University of Cambridge, Cambridge, UK, rjf1000@cam.ac.uk

1. Εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα, Ελλάδα, 2.

Wellcome Trust- MRC Cambridge Stem Cell Institute & Department of Clinical Neurosciences, University of Cambridge, Cambridge, UK, ikazanis@upatras.gr

Περίληψη

Νευρικά Βλαστικά Κύτταρα (NBK) επιβιώνουν στο ενήλικο εγκέφαλο των θηλαστικών, σε συγκεκριμένα μικροπεριβάλλοντα, τις νευρογενετικές φωλεές, όπως η Υποεπενδυματική Ζώνη (YEZ) των πλάγιων κοιλιών. Καίριο ρυθμιστικό ρόλο στην YEZ διαδραματίζει το αγγειακό σύστημα της περιοχής. Πρόσφατα αποκαλύφθηκε πως εστιασμένη απομυελίνωση στο μεσολόβιο μυών επιφέρει συσσώρευση αιμοπεταλίων στα αιμοφόρα αγγεία της YEZ καθώς και η θετική επίδραση των αιμοπεταλιακών παραγόντων στον πολλαπλασιασμό των NBK *in vitro*. Συγκαλλιέργειες NBK και αιμοπεταλίων και ιστολογική ανάλυση σε διαγονιδιακούς μύες μοντέλα θρομβοκυττοπενίας (Nbeal2^{-/-}, Crlf3^{-/-}) και θρομβοφιλίας (JAK2V6^{fl/+}) υποδεικνύουν πως τα αιμοπετάλια επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των NBK και επάγουν τη δέσμευσή τους προς την ολιγοδενδρογλοιακή μοίρα, υποδεικνύοντας τη λειτουργική αλληλεπίδραση των δύο πληθυσμών. Σε αυτό συνηγορεί, η αδυναμία απόκρισης της YEZ των θρομβοκυττοπενικών μυών έπειτα από εστιασμένη απομυελίνωση του μεσολοβίου λόγω μειωμένης ενεργοποίησης των ολιγοδενδρογλοιακών προγονικών κυττάρων.

Λέξεις – κλειδιά

Νευρικά Βλαστικά Κύτταρα, Αιμοπετάλια, Υποεπενδυματική Ζώνη, Βλάβες ΚΝΣ

Εισαγωγή

Μετά την ολοκλήρωση της εμβρυικής και πρώιμης μεταγεννητικής ανάπτυξης του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) των θηλαστικών, Νευρικά Βλαστικά Κύτταρα (NBK) επιβιώνουν σε εξειδικευμένα μικροπεριβάλλοντα, τις φωλεές βλαστικών κυττάρων (ΦBK), όπως η Υποεπενδυματική Ζώνη (YEZ) των πλάγιων τοιχωμάτων των πλάγιων κοιλιών του εγκεφάλου. Τα NBK της YEZ μεταναστεύουν μέσω του πρόσθιου μεταναστευτικού ρεύματος στους οσφρητικούς βολβούς όπου διαφοροποιούνται σε λειτουργικούς νευρώνες, ενώ ένα μικρό ποσοστό διαφοροποιείται σε ολιγοδενδρογλοιακά προγονικά κύτταρα, τα οποία εγκαθίστανται στο μεσολόβιο. (Kazanis, 2012) Το αγγειακό σύστημα αποτελεί βασικό ρυθμιστικό στοιχείο της YEZ. Τα NBK επικοινωνούν με τα αγγεία μέσω μίας μακριάς αποφυάδας. Περιαγγειακά παρατηρούνται μιτωτικώς ενεργά NBK, ενώ, άμεσες και έμμεσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των NBK και των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων ελέγχουν τη

διατήρηση, την κυτταρική μοίρα, τον πολλαπλασιασμό και τον quiescent χαρακτήρα της φωλεάς. Η λειτουργική διαφοροποίηση των αγγείων της YEZ συνυπάρχει και με ανατομικές ιδιαιτερότητες, όπως μεγαλύτερη πυκνότητα δικτύου, αυξημένη διαπερατότητα των αγγείων και χαμηλή ροή οξυγόνου. (Tavazoie et al, 2008)

Βιβλιογραφικά έχει αναφερθεί, η εμπλοκή των αιμοπεταλίων σε αναγεννητικές διαδικασίες του ΚΝΣ. Λειτουργικά, πέραν της αιμόστασης, διαθέτουν επίσης αντιφλεγμονώδεις, αγγειογενετικές και ιστοαναπλαστικές ιδιότητες. Αυτές σχετίζονται με υποκυτταρικές δομές που φέρουν, τα α-κοκκία, «πυκνά» κοκκία και λυσοσώματα, όπου εδράζεται πληθώρα δραστικών παραγόντων, οι οποίοι υπό συνθήκες, εκκρίνονται μαζικά στον εξωκυττάριο χώρο δρώντας σε κύτταρα στόχους. (Kazanis et al., 2015) Μετά από τραυματισμό ή βλάβη του ΚΝΣ, τα αιμοπετάλια εμπλέκονται στην οξεία φλεγμονώδη αντίδραση και κατ' επέκταση σε περιπτώσεις σηψαιμίας, ανοσολογικών διαταραχών, σε παθολογίες όπως η Σκλήρυνση κατά Πλάκας και η ισχαιμία. Ωστόσο, ο ακριβής ρόλος των αιμοπεταλίων στις ΦΒΚ και ο τρόπος αλληλεπίδρασης με τους κυτταρικούς πληθυσμούς των NBK και των απογόνων τους παραμένει ασαφής.

Πρόσφατα, αποκαλύφθηκε πως πειραματική εστιασμένη απομυελίνωση στο μεσολόβιο μυών επιφέρει συσσώρευση αιμοπεταλίων (CD41+) στα αιμοφόρα αγγεία (Laminin+) της YEZ των πλάγιων κοιλίων, ενώ αιμοπεταλιακοί παράγοντες ευνοούν την επιβίωση των NBK *in vitro*. (Kazanis et al., 2015) Σκοπό της παρούσας εργασίας αποτελεί η μελέτη της άμεσης διακυτταρικής (cell-to-cell) αλληλεπίδρασης μεταξύ NBK και αιμοπεταλίων.

Μέθοδοι

Στην παρούσα εργασία, αρχικά, εγκαθιστούμε σύστημα συγκαλλιέργειών *in vitro*, όπου σε πρωτογενείς καλλιέργειες NBK προερχόμενων από την απομόνωση της ανατομικής περιοχής της YEZ των πλάγιων κοιλίων του εγκεφάλου ενήλικων μυών, προστίθενται σε διαφορετικές πυκνότητες «καθαρά», μη-ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απομονωμένα από δείγμα ολικού αίματος συλλεχθέν από την IVC ενήλικων μυών. Οι συγκαλλιέργειες διατηρούνται σε συνθήκες πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης για πολλαπλά χρονικά διαστήματα και αξιολογούνται με τη διενέργεια χρώσεων ανοσοφθορισμού βάσει μοριακών κυτταρικών δεικτών για το βλαστικό/προγονικό χαρακτήρα (Nestin, Sox2), τον πολλαπλασιασμό (Ki67), την κυτταρική μοίρα (Olig2, PDGFRa, Dcx, GFAP) και τον εντοπισμό αιμοπεταλίων (CD41, CD62P). Παράλληλα, επεκτείνουμε τη διερεύνηση *in vivo*, με τη χρήση διαγονιδιακών μυών με διαταραγμένο αριθμό αιμοπεταλίων (θρομβοκυττοπενία: Nbeal2^{-/-}, Crlf3^{-/-}, θρομβοφιλία: JAK2V6^{fl/+}), στους οποίους προκαλείται τοπική απομυελίνωση σε υπερκείμενη της YEZ περιοχή του μεσολοβίου με έγχυση λυσολεκθίνης και έπειτα αξιολογείται ιστολογικά η απόκριση στον τραυματισμό των κυτταρικών πληθυσμών της YEZ και του μεσολοβίου, καθώς και του αγγειακού συστήματος της YEZ. Επιπρόσθετα, η ίδια αξιολόγηση πραγματοποιείται σε μύες wild type (WT), έπειτα από ετερόλογη μεταμόσχευση σημασμένων με φθορίζουσα χρωστική (PKH26), μη-ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων από μύες WT στο ραχιαίο τμήμα της YEZ.

Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν πως η συγκαλλιέργεια των NBK με αυξημένο αριθμό αιμοπεταλίων, επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των βλαστοκυττάρων, με τρόπο που εξαρτάται από την παρουσία ή μη μιτογόνων παραγόντων στο περιβάλλον τους· οδηγώντας σε αύξηση και μείωση της μιτωτικής δραστηριότητας τους, απουσία και παρουσία αυξητικών παραγόντων, αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, η παρουσία υψηλού αριθμού αιμοπεταλίων στις συγκαλλιέργειες αυξάνει το ποσοστό των κυττάρων της ολιγοδενδρογλοιακής μοίρας (Olig2+) παρουσία αυξητικών παραγόντων, χωρίς να τον επηρεάζει απουσία αυτών, υποδεικνύοντας πως τα αιμοπετάλια δρουν στο στάδιο της δέσμευσης (commitment) των NBK προς την ολιγοδενδρογλοιακή μοίρα, *in vitro*. Ωστόσο, όταν οι συγκαλλιέργειες των NBK μυών WT διενεργούνται με αιμοπετάλια προερχόμενα από μύες Nbeal2^{-/-} (30% του φυσιολογικού αριθμού αιμοπεταλίων, απουσία α-κοκκίων), δεν παρατηρείται κάποια επίδραση τόσο στον πολλαπλασιασμό, όσο και στη διαφοροποίηση των NBK, προτείνοντας τον ενδεχόμενο ρόλο των α-

κοκκίων στην άμεση αλληλεπίδραση NBK και αιμοπεταλίων. Ακολούθως, έπειτα από ιστολογική ανάλυση στους θρομβοκυττοπενικούς μύες $Crlf3^{-/-}$ και $Nbeal2^{-/-}$ παρατηρείται μειωμένη ενεργοποίηση των ολιγοδενδρογλοιακών προγονικών κυττάρων ($Nkx2.2+$) στο ημισφαίριο του τραυματισμού τόσο στην περιοχή της νευρογενετικής φωλεάς της YEZ όσο και στο μεσολόβιο, χωρίς αλλαγές στα επίπεδα πολλαπλασιασμού ($Ki67+$) και νευρογένεσης ($Doublecortin+$) στην YEZ, συγκριτικά με WT μύες.

Συμπεράσματα

Συνολικά, τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν την ύπαρξη λειτουργικής αλληλεπίδρασης των αιμοπεταλίων με τα NBK της YEZ. Τα αιμοπετάλια υποστηρίζουν τη μιτωτική δραστηριότητα των NBK, σε συνθήκες που δεν ευνοείται ο πολλαπλασιασμός, ενώ εμπλέκονται και στη διαφοροποίησή τους, πιθανότατα προωθώντας τα προς την ολιγοδενδρογλοιακή μοίρα. Επιπλέον, η αδυναμία απόκρισης της φωλεάς έπειτα από την απομυελινωτική βλάβη στο υπερκείμενο μεσολόβιο, στους θρομβοκυττοπενικούς μύες, υπογραμμίζει τη σημασία και προεκτείνει το λειτουργικό ρόλο των αιμοπεταλίων στη ρύθμιση εν γένει της νευρογενετικής φωλιάς της YEZ, εν μέρει μέσω των α-κοκκίων που περιέχουν. Άλλωστε, η σημασία των α-κοκκίων, γίνεται εμφανής και σε παθολογικές καταστάσεις, απόρροια διαταραχών ποιοτικών ή ποσοτικών χαρακτηριστικών τους, όπως στο Σύνδρομο Φαιού Αιμοπεταλίου (Grey Platelet Syndrome). Τέλος, δεδομένων των παρόντων αποτελεσμάτων, της βιβλιογραφικά καταγεγραμμένης σημασίας των αιμοπεταλίων για το ΚΝΣ και του γεγονότος ότι αποτελούν κυτταρικό πληθυσμό που αξιοποιείται ήδη στο πλαίσιο της κλινικής πράξης, γίνεται φανερή η μεταφραστική «απόληξη» της παραπάνω ερευνητικής δραστηριότητας ως βάση για δυνητική κλινική εφαρμογή.

Βιβλιογραφία

- Kazanis, I. (2012). Can adult neural stem cells create new brains? Plasticity in the adult mammalian neurogenic niches: realities and expectations in the era of regenerative biology. *The Neuroscientist*, 18(1), 15-27.
- Kazanis, I., Feichtner, M., Lange, S., Rotheneichner, P., Hainzl, S., Öller, M., ... & Bauer, H. C. (2015). Lesion-induced accumulation of platelets promotes survival of adult neural stem/progenitor cells. *Experimental neurology*, 269, 75-89.
- Tavazoie, M., Van der Veken, L., Silva-Vargas, V., Louissaint, M., Colonna, L., Zaidi, B., ... & Doetsch, F. (2008). A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell stem cell*, 3(3), 279-288.

ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ Κ ΤΡΟΦΙΜΩΝ (Σάββατο 28-11-2020)

Διάδοση καινοτόμων λύσεων για τη διαχείριση της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά-DISARM

Αλέξανδρος ΜΑΥΡΟΜΜΑΤΗΣ, Αντωνία ΜΑΤΑΡΑΓΚΑ, Ιωάννης ΟΙΚΟΝΟΜΟΠΟΥΛΟΣ, Ελένη ΤΣΙΠΛΑΚΟΥ, Γεώργιος ΖΕΡΒΑΣ*

*Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής, Σχολή Επιστήμης των Ζώων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, Αθήνα, Τ.Κ. 11855 *gzervas@aua.gr*

Περίληψη

Το DISARM στοχεύει στη διάδοση καινοτόμων λύσεων για τον έλεγχο της διάδοσης της ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Πρόκειται για μια δημιουργική συνεργασία μεταξύ κτηνοτρόφων-παραγωγών, κτηνιάτρων, γεωπόνων-ζωοτεχνών, συμβουλευτικών υπηρεσιών, ερευνητών, ακαδημαϊκών και βιομηχανίας που θα ενδυναμώσει και θα καθιερώσει μια πιο συνετή και υπεύθυνη χρήση των αντιβιοτικών στη ζωική παραγωγή, με απώτερο στόχο την αντιμετώπιση της απειλής από την αντοχή των μικροβίων στα αντιβιοτικά. Μέχρι σήμερα, σε εθνικό επίπεδο, έχουν αξιολογηθεί ως προς τη βιοασφάλειά τους, 5 κτηνοτροφικές μονάδες προβάτων με διαφορετικό παραγωγικό συστήματα. Στις μονάδες αυτές έχουν συσταθεί Ομάδες Υγείας με σκοπό τη σχεδίαση και εφαρμογή εξειδικευμένων, στοχευμένων, ορθών πρακτικών για τη μείωση της χορήγησης αντιβιοτικών. Επιπλέον, βιολογικά και περιβαλλοντικά δείγματα συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν με σκοπό την ανίχνευση παθογόνων αλλά και την εκτίμηση της ανθεκτικότητας ορισμένων βακτηρίων στα πλέον χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά.

Λέξεις κλειδιά

αντιβιοτικά, ανθεκτικότητα, ενιαία υγεία, βιοασφάλεια, ζωική παραγωγή

Εισαγωγή

Η σε παγκόσμιο επίπεδο αυξανόμενη απειλή της αντοχής των μικροβίων στα αντιβιοτικά, απαιτεί άμεση απάντηση τόσο για τους ανθρώπους όσο και για τη ζωική παραγωγή (Landers et al. 2012). Γι' αυτό το έργο DISARM έχει οργανώσει μια στενή συνεργασία μεταξύ των εταίρων που εμπλέκονται στον τομέα της ζωικής παραγωγής, ώστε να αναζητηθούν, να συζητηθούν και να δημοσιοποιηθούν καινοτόμες ιδέες, η εφαρμογή των οποίων στην πράξη όχι μόνο θα αντιμετωπίσει την αντοχή των μικροβίων στα αντιβιοτικά αλλά θα αποτελέσει τον καταλύτη για την εδραίωση και διατήρηση των κανόνων βιοασφάλειας στις εκτροφές. Το έργο ξεκίνησε τον Ιανουάριο του 2019 και θα ολοκληρωθεί στο τέλος Δεκεμβρίου του 2021, με συμμετοχή δεκαπέντε Οργανισμών και Ιδρυμάτων από εννέα Ευρωπαϊκές χώρες, που έχει δημιουργήσει μια ομάδα συνεργατών για να επεξεργαστεί και να προτείνει αποτελεσματικές πρακτικές και προσεγγίσεις βιοασφάλειας.

Μέθοδοι

Κατά την πρώτη φάση του έργου αναζητήθηκαν πέντε (5) κτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις γαλακτοπαραγωγού προβατοτροφίας, αντιπροσωπευτικές διαφόρων παραγωγικών συστημάτων, με σκοπό την κάλυψη ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος του κλάδου στη χώρα μας. Οι κτηνοτροφικές αυτές εκμεταλλεύσεις, αξιολογήθηκαν με βάση το διεθνώς αναγνωρισμένο ερωτηματολόγιο βιοασφάλειας Biocheck.UGent (Rodrigues et al. 2019), μετά από κάποιες σημαντικές τροποποιήσεις ώστε να ανταποκρίνεται πλήρως στις ιδιομορφίες του κλάδου στη χώρα μας.

Εν συνεχεία, καταρτίστηκαν οι Ομάδες Υγείας για κάθε μια από τις πρότυπες αυτές κτηνοτροφικές ομάδες, αποτελούμενες από τους συμμετέχοντες ερευνητές του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, τους κτηνιάτρους της εκάστοτε εκμετάλλευσης, τους γεωτεχνικούς συμβούλους και τους ιδιοκτήτες. Οι Ομάδες Υγείας αξιολόγησαν τα επίπεδα βιοασφάλειας, επισήμαναν τα καίρια σημεία τα οποία επιτάσσουν διορθωτικές παρεμβάσεις και ξεκίνησαν το σχεδιασμό και το χρονοδιάγραμμα υλοποίησής τους.

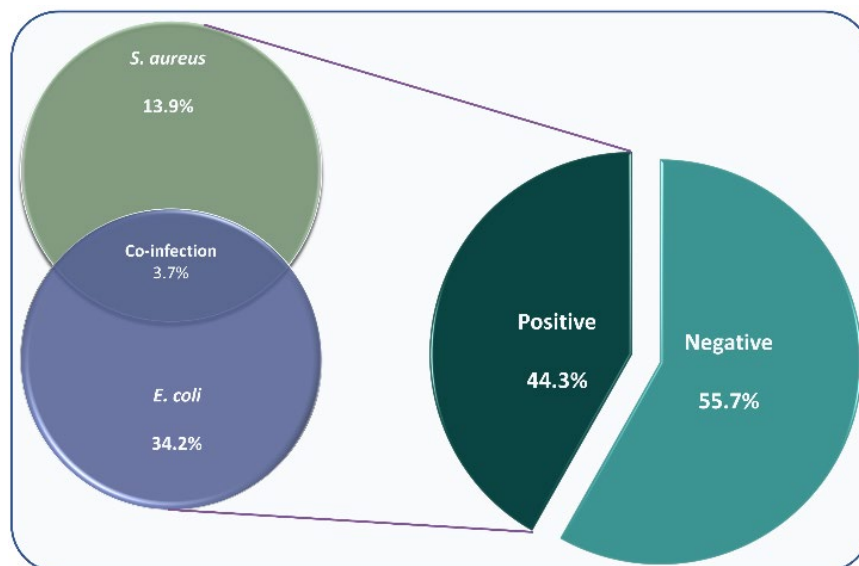
Στο επόμενο στάδιο της καταγραφής της υφιστάμενης κατάστασης των κτηνοτροφικών μονάδων,

πραγματοποιήθηκε η συλλογή δειγμάτων: 1) γάλακτος (ατομικά δείγματα), 2) γάλακτος από τη δεξαμενή προψύξης του γάλακτος (παγολεκάνη), 3) νερού (πόσιμου αλλά και του δικτύου), 4) τροφής 5) επιδαπέδιας στρωμένης καθώς και 6) κοπράνων. Ακολούθησε σπορά των δειγμάτων σε στείρα υποστρώματα για την ανάπτυξη και απομόνωση των *Escherichia coli* και *Staphylococcus aureus*, βακτήρια τα οποία επιλέχθηκαν ως δείκτες λόγω της μεγάλης, κατά κανόνα, διάδοσής τους στην εκτροφή. Αναλόγως του είδους του δείγματος, τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: Αιματούχο, MacConkey, Chromocult Coliform και Baird-Parker άγαρ. Στα δείγματα στα οποία εντοπίστηκαν η *Escherichia coli* ή/και ο *Staphylococcus aureus* προσδιορίστηκε η πιθανή αντοχή τους στα πλέον χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά. Ως αντιβιοτικά επελέγησαν: η κεφοξιτίνη, η κεφταζιδίμη, η μεροπενέμη, η κεφοταξίμη, η αμοξυκιλλίνη, η σιπροφλοξασίνη, η γενταμικίνη, η τετρακυκλίνη, η αμικιλίνη, η τριμεθοπρίνη, η πενικιλίνη και η ερυθρομυκίνη.

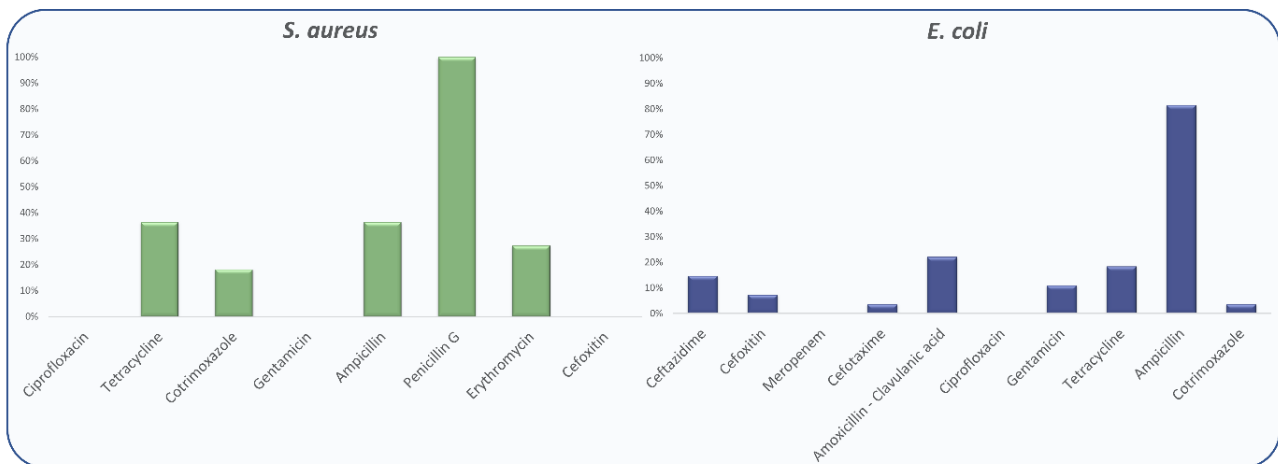
Αποτελέσματα

Συνολικά, η βαθμολόγηση των μέτρων βιοασφάλειας και υγιεινής με βάση το ερωτηματολόγιο Biocheck.UGent, έδωσε μέσο όρο για τις Ελληνικές εκμεταλλεύσεις που εξετάστηκαν **61 %** με τιμές οι οποίες διακυμάνθηκαν από το **59%** έως το **72%** όταν ο παγκόσμιος μέσος όρος εκτιμάται στο **56%**. Παρά τη φαινομενικά υψηλή βαθμολογία των κτηνοτροφικών μονάδων του έργου, καταγράφηκαν σημαντικοί παράγοντες οι οποίοι συνεισφέρουν αρνητικά στο επίπεδο υγιεινής της μονάδας και νευραλγικά πρωτόκολλα βιοασφάλειας τα οποία εφαρμόζονται μερικώς ή δεν εφαρμόζονται ορθά, με αποτέλεσμα να θίγεται η υγεία των ζώων και να απαιτείται η χρήση των αντιβιοτικών.

Στο επόμενο στάδιο της καταγραφής της υφιστάμενης κατάστασης των κτηνοτροφικών μονάδων, το 44,3 % των συλλεχθέντων δειγμάτων βρέθηκε θετικό στα υπό εξέταση παθογόνα (Γράφημα 1), ενώ στα δείγματα στα οποία ανιχνεύτηκε η *Escherichia coli*, το 15% βρέθηκε ανθεκτικό στην κεφταζιδίμη, το 7% στην κεφοξιτίνη, το 4% στην κεφοταξίμη, το 22% στην αμοξυκιλλίνη, το 11% στη γενταμικίνη, το 19% στην τετρακυκλίνη, το 81% στην αμικιλίνη (Γράφημα 2) ενώ για το *Staphylococcus aureus* παρατηρήθηκε ανθεκτικότητα 36% στην τετρακυκλίνη, 18% στην τριμεθοπρίνη, 36% στην αμικιλίνη, 100% στην πενικιλίνη και 27% στην ερυθρομυκίνη (Γράφημα 2).



Γράφημα 1. Ποσοστό ανίχνευσης των βακτηρίων *Escherichia coli* και *Staphylococcus aureus* στα δείγματα που συλλέχθηκαν από της κτηνοτροφικές μονάδες



Γράφημα 2. Ποσοστό ανθεκτικότητας του *Staphylococcus aureus* και *Escherichia coli* στα ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά.

Εξετάζοντας ολιστικά τα αποτελέσματα της κάθε εκμετάλλευσης, η ομάδα του έργου DISARM, κατέστρωσε σχέδια δράσης με διορθωτικές ενέργειες διαχείρισης με σκοπό τη βελτίωση και την προάσπιση της υγείας του ζωικού κεφαλαίου, με απώτερο στόχο την ορθολογική χρήση των αντιβιοτικών στη ζωική παραγωγή. Κατά την επόμενη φάση, οι προαναφερθείσες κτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις θα επαναξιολογηθούν ως προς τα μέτρα βιοασφάλειας που εφαρμόζουν με βάση το ερωτηματολόγιο Biocheck.UGent, ώστε να επιβεβαιωθεί η εφαρμογή των ορθών πρακτικών που τους προτάθηκε. Εν συνεχεία, θα επαναυπολογιστεί η ετήσια κατανάλωση αντιβιοτικών φαρμάκων και μια νέα σειρά δειγμάτων θα συλλεχθεί για να επανεξεταστεί η παρουσία παθογόνων καθώς και η ανθεκτικότητα τους στα ίδια αντιβιοτικά.

Συμπεράσματα

Η υπεύθυνη χρήση των αντιβιοτικών στη ζωική παραγωγή γίνεται πιο επίκαιρη από ποτέ και επιτάσσει τη στενή συνεργασία επιστημόνων από διάφορους ερευνητικούς τομείς υπό την αιγίδα της νεοφερθείσας εννοίας της Ενιαίας Υγείας (One Health). Η αρνητική επίδραση της μη ορθολογικής χρήσης των αντιβιοτικών δεν περιορίζεται μόνο στην ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών στα αντιβιοτικά, αλλά επεκτείνεται στη μόλυνση του εδάφους και του υδροφόρου ορίζοντα, επιφέροντας αλλαγές στη μικροβιακή βιοποικιλότητα και ως εκ τούτου συμβάλλει αρνητικά στην κλιματική αλλαγή. Ωστόσο, η υψηλή παρακαταθήκη γνώσης των ερευνητικών φορέων θα πρέπει να γεφυρωθεί με την εφαρμογή ορθών πρακτικών διαχείρισης και τη χρήση ολιστικών προσεγγίσεων.

Βιβλιογραφία

Landers, T. F., Cohen, B., Wittum, T. E., & Larson, E. L. (2012). A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. *Public health reports* (Washington, D.C. : 1974), 127(1), 4–22.

Rodrigues da Costa, M., Gasa, J., Calderón Díaz, J.A. Using the Biocheck.UGent™ scoring tool in Irish farrow-to-finish pig farms: assessing biosecurity and its relation to productive performance. *Porc Health Manag* 5, 4 (2019).

Εποχική μελέτη του μεταβολισμού των λιπιδίων στην εκτρεφόμενη τσιπούρα (*Sparus aurata*)

Βασιλική ΜΑΚΡΗ¹, Αντωνία ΓΟΥΓΟΥΣΗ¹, Ιωάννης Α. ΓΙΑΝΤΣΗΣ², Ελένη Π. ΚΑΛΟΓΙΑΝΝΗ³, Βασίλειος ΜΙΧΑΗΛΙΔΗΣ¹.

¹Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων, Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη, makrivasil@bio.auth.gr, agougousi@gmail.com

²Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Μακεδονίας, Φλώρινα

³Εργαστήριο Ελαιόλαδου και Λιπαρών Υλών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Διεθνές Πανεπιστήμιο της Ελλάδας, Θεσσαλονίκη

Περίληψη

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ο τομέας των υδατοκαλλιεργειών, απειλείται λόγω της κλιματικής αλλαγής. Παράλληλα, οι αυξανόμενες απαιτήσεις σε τρόφιμα, επιβάλλουν την συνεχή κάλυψη των διατροφικών αναγκών με τρόφιμα υψηλής διατροφικής αξίας. Ο μεταβολισμός των λιπιδίων έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών τις τελευταίες δεκαετίες λόγω της σημασίας καλύτερης κατανόησης των μεταβολικών μονοπατιών που οδηγούν στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα τα οποία ο άνθρωπος προσλαμβάνει μόνο μέσω της διατροφής του. Η παρούσα έρευνα επικεντρώνεται στη μελέτη των εποχικών μεταβολών στα πρότυπα του μεταβολισμού των λιπιδίων της τσιπούρας τα οποία έμμεσα επηρεάζουν την ανθρώπινη υγεία. Μελετήθηκαν γονίδια που καθιστούν δείκτες του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων ενώ πραγματοποιήθηκε και προσδιορισμός των ολικών λιπιδίων. Τα αποτελέσματα έδειξαν έντονες μεταβολές στην έκφραση των γονιδίων σε επίπεδο mRNA. Η έρευνα συμβάλει στη διερεύνηση της σχέσης της εποχικότητας με τον μεταβολισμό των λιπιδίων, της μεταβολής της ποιότητας σάρκας της και στον τρόπο συσχέτισης με την ανθρώπινη υγεία.

Λέξεις-Κλειδιά: Μεταβολισμός, Λιπίδια, Λιπαρά Οξέα, Τσιπούρα, Εποχικές Μεταβολές

Εισαγωγή

Η υδατοκαλλιέργεια και κυρίως η ιχθυοκαλλιέργεια αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς κλάδους του πρωτογενούς τομέα ζωικής παραγωγής που παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της συμβολής του στην οικονομική ανάπτυξη της χώρας. Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) είναι σημαντικό είδος της μεσογειακής υδατοκαλλιέργειας (FAO 2016). Στις αναπτυσσόμενες χώρες τα ψάρια θεωρούνται όλο και περισσότερο τρόφιμα με υψηλή διατροφική αξία και είναι απαραίτητο να συμπεριλαμβάνονται σε μια υγιεινή διατροφή.

Οι αποσατουράσες είναι ένζυμα υπεύθυνα για την εισαγωγή διπλών δεσμών σε μια συγκεκριμένη θέση της ακυλικής αλυσίδας των λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας (Monroig et al. 2011b). Αυτό το ένζυμο είναι υπεύθυνο για το πρώτο βήμα της διαδικασίας αποκορεσμού / επιμήκυνσης στη σύνθεση των λιπαρών οξέων. Τα λιπαρά οξέα είναι οι πρόδρομες ενώσεις των εικοσανοειδών τα οποία έχουν αντιφλεγμονώδη δράση, αντικαρκινικές και αντιθρομβωτικές ιδιότητες στον ανθρώπινο οργανισμό.

Η Λιποπρωτεϊνική Λιπάση είναι ένα ένζυμο γλυκοπρωτεϊνης που διαδραματίζει εξειδικευμένο ρόλο στο μεταβολισμό των λιπιδίων (Albalat et al. 2007). Επίσης, η Λιποπρωτεϊνική Λιπάση παίζει πρωταρχικό ρόλο στο μεταβολισμό των τριαγλυκεριδίων (Braun & Severson 1982).

Τα λιπίδια είναι μια από τις κύριες πηγές ενέργειας και αποτελούν τα βασικά εργαλεία για το σχηματισμό μεμβρανών στα κύτταρα (Sargent et al 2002). Το ενδιαφέρον για την μελέτη των λιπιδίων και των λιπαρών οξέων προκύπτει από το γεγονός ότι είναι πολύ σημαντικά για την ανάπτυξη των ιχθύων.

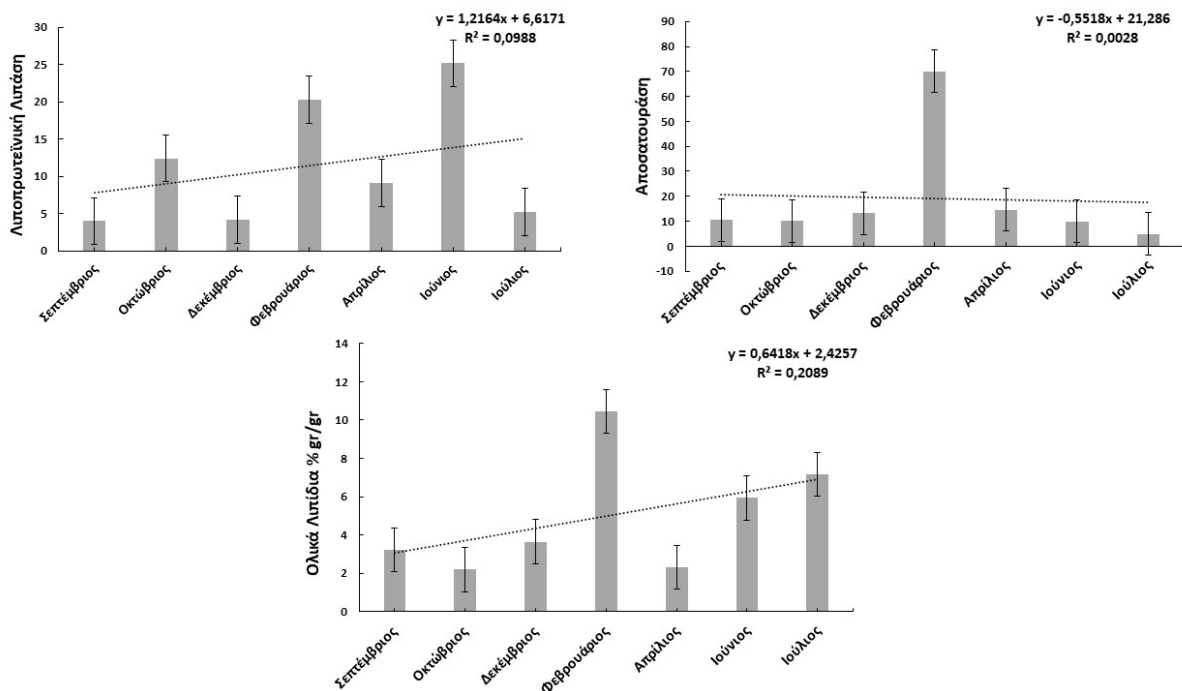
Μέθοδοι

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στον Βόρειο Ευβοϊκό Κόλπο και σε συνεργασία με την ιχθυοκαλλιέργεια Προμηθέας ΕΠΕ. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν με βάση το εποχικό προφίλ των

θερμοκρασιών των προηγούμενων ετών σε δείγματα τσιπούρας όπου απομονώθηκε ο λευκός μυς. Η απομόνωση του RNA πραγματοποιήθηκε με Nucleozol (Macherey-Nagel). Το mRNA μεταγράφηκε σε cDNA με τη χρήση του PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara) και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των ολικών λιπιδίων είναι με τη χρήση χλωροφόρμιου και μεθανόλης (Μέθοδος Bligh & Dyer 1959).

Αποτελέσματα

Στο γονίδιο αποσατουράση παρατηρήθηκε έντονη έκφραση τον μήνα Φεβρουάριο. Παράλληλα, παρατηρείται από τον Σεπτέμβριο έως το Δεκέμβριο χαμηλή έκφραση, και μείωση για τους επόμενους μήνες. Όσον αφορά την Λιποπρωτεϊνική Λιπάση από τον Σεπτέμβριο έως τον Απρίλιο εμφανίζονται μικρές αυξομειώσεις στην έκφραση του γονιδίου ενώ παρατηρείται έντονη έκφραση τον μήνα Φεβρουάριο και Ιούνιο. Τα ολικά λιπίδια παρουσίασαν έντονες εποχικές μεταβολές. Η μεγαλύτερη τιμή εμφανίζεται τον Φεβρουάριο. Όσον αφορά τις θερμοκρασίες αξιοσημείωτο είναι πως τον μήνα Φεβρουάριο καταγράφηκε η χαμηλότερη θερμοκρασία ενώ τον μήνα Ιούνιο και Ιούλιο καταγράφηκαν οι υψηλότερες (Εικόνα 1.).



Εικόνα 1. Εποχική μεταβολή των γονιδίων του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων και των ολικών λιπιδίων.

Συμπεράσματα

Συνοπτικά η παρούσα μελέτη παρουσιάζει στοιχεία έκφρασης των γονιδίων Λιποπρωτεϊνική Λιπάση και Αποσατουράση σε σχέση με την συγκέντρωση των ολικών λιπιδίων αλλά και το πως επηρεάζονται από την θερμοκρασία. Η έκφραση των παραπάνω γονιδίων είναι ένα εργαλείο που συντελεί στην κατανόηση του μεταβολισμού των λιπιδίων και στον τρόπο που αυτά εκφράζονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Παράλληλα, ο προσδιορισμός των ολικών λιπιδίων βοηθάει στην κατανόηση της κατανομής των λιπιδίων, της αποθήκευσης και της κινητοποίησής τους. Η μελέτη του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον καθώς προσφέρουν ωφέλιμες ιδιότητες στον άνθρωπο. Τον Χειμώνα τα ψάρια μειώνουν την πρόσληψη τροφής λόγω της χαμηλής θερμοκρασίας του νερού και ξεκινούν την κινητοποίηση των αποθέσεων λίπους ενώ το καλοκαίρι, παρατηρείται μια διεγερμένη συμπεριφορά.

Τα ψάρια, τα οποία είναι τρόφιμα υψηλής διατροφικής αξίας, ανταποκρίνονται στις αλλαγές της

θερμοκρασίας και στις επιπτώσεις που έχουν αυτές οι αλλαγές στις μεταβολικές διεργασίες, την ευζωία και την ανάπτυξη τους. Η θερμοκρασία είναι ο πιο σημαντικός αβιοτικός παράγοντας και επηρεάζει τις φυσιολογικές και μεταβολικές λειτουργίες ενός οργανισμού και η μεταβολή της έχει άμεση σχέση με την κλιματική αλλαγή. Παράλληλα, η ολοένα έντονη αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού μας στρέφει στην αύξηση της παραγωγής ζωικών προϊόντων με αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής των εκτρεφόμενων ιχθύων υψηλής διατροφικής αξίας.

Βιβλιογραφία

- Albalat, A. et al. (2007). Insulin regulation of lipoprotein lipase (LPL) activity and expression in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 148,151-159.
- Bligh, E. G. & Dyer W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, (8): 911-917.
- Braun, J. E. & Severson, D. L. (1992). Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochemical Journal* 287, 337–347.
- FAO (2016a). *Food and agriculture – key to achieving the 2030 Agenda for Sustainable Development*. Rome.
- Monroig, Ó. et al. (2011b). Long-chain polyunsaturated fatty acids in fish: recent advances on desaturases and elongases involved in their biosynthesis. In: *Cruz-Suarez LE et al (eds) Proceedings of the XI international symposium on aquaculture nutrition*, 257–282. Monterrey: Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Sargent, J.R. et al. (2002). The lipids. In: J.E. Halver and R.W. Hardy (Eds.), *Fish nutrition*, 3rd ed., 182-246. USA: Academic Press.

Επίδραση των απορρυπαντικών - απολυμαντικών ουσιών καθαριότητας στην ανάπτυξη ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στελεχών βακτηρίων σε οικιακούς σπόγγους

Ευάγγελος ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ¹, Ανέστης ΤΣΙΤΣΟΣ², Κατερίνα Ακυλίνα ΑΠΟΣΤΟΛΟΥ³, Ηρακλής ΣΑΚΚΑΣ⁴, Νικόλαος ΣΟΥΛΤΟΣ⁵

¹Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης – Κτηνιατρικής Δημόσιας Υγείας, Τμήμα Κτηνιατρικής, ΑΠΘ. boikonom@vet.auth.gr

²Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης – Κτηνιατρικής Δημόσιας Υγείας, Τμήμα Κτηνιατρικής, ΑΠΘ. tsitanes@vet.auth.gr

³Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης – Κτηνιατρικής Δημόσιας Υγείας, Τμήμα Κτηνιατρικής, ΑΠΘ. akulinavet@gmail.com

⁴Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο [Ιωαννίνων](http://www.uoi.gr). isakkas@uoi.gr

⁵Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης – Κτηνιατρικής Δημόσιας Υγείας, Τμήμα Κτηνιατρικής, ΑΠΘ. soultos@vet.auth.gr

Περίληψη

Οι σπόγγοι κουζίνας μπορούν να μολυνθούν από παθογόνους και μη μικροοργανισμούς. Σκοπός της μελέτης ήταν να διερευνηθεί την επίδραση εμπορικά διαθέσιμων ιδιοσκευασμάτων απορρυπαντικών – απολυμαντικών στην ανάπτυξη ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων. Χρησιμοποιήθηκαν σπόγγοι, οι οποίοι ενοφθαλμίστηκαν με μικτή καλλιέργεια ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών *Escherichia coli* και *Enterococcus* spp. (ESBL και βανκομυκίνη ανθεκτικοί αντίστοιχα). Στους σπόγγους εφαρμόστηκε πρωτόκολλο προσομοίωσης της χρήσης τους κατά τον καθαρισμό πιάτων με εμπορικά ιδιοσκευάσματα απορρυπαντικών, καθώς και εφαρμογής μικροκυμάτων. Ο πληθυσμός των ανθεκτικών στελεχών *E.coli*, που αποίκισαν τους σπόγγους ήταν μεγαλύτερος έναντι των ανθεκτικών εντεροκόκκων. Η εφαρμογή μικροκυμάτων και ιδιοσκευάσματος με γαλακτικό οξύ είχε μικρή επίδραση στους υπό εξέταση μικροοργανισμούς. Αντίθετα τα απορρυπαντικά με υποχλωριώδες νάτριο και τεταρτοταγείς ενώσεις αμμωνίου μείωσαν σημαντικά τον πληθυσμό των βακτηρίων. Ενδιαφέρον όμως παρουσίασε η αύξηση των ανθεκτικών στελεχών *E.coli* μετά την τρίτη εβδομάδα, γεγονός που υποδηλώνει την επιλογή αυτών των στελεχών από τα απορρυπαντικά υποχλωριώδους νατρίου και τεταρτοταγών ενώσεων αμμωνίου.

Λέξεις-κλειδιά

Escherichia coli, *Enterococcus*, αντιμικροβιακή αντοχή, απορρυπαντικά.

Εισαγωγή

Οι σπόγγοι κουζίνας μπορούν να αποτελέσουν πηγή μόλυνσης από διάφορους παθογόνους και μη μικροοργανισμούς (Cardinale *et al.*, 2017), όπως μεταξύ άλλων τα εντεροβακτηριοειδή εντερικής προέλευσης (Gerba *et al.*, 2014). Σε ανάλογες μελέτες έχει αναφερθεί η εμφάνιση αντοχής στα αντιβιοτικά σε στελέχη μικροοργανισμών οικιακής προέλευσης (Marshall *et al.*, 2012). Στις οικίες χρησιμοποιείται ποικιλία προϊόντων με απορρυπαντικές - απολυμαντικές ιδιότητες. Η συνύπαρξη όμως και ο πολλαπλασιασμός μικροοργανισμών σε περιορισμένα ενδιαίτηματα, μπορεί να έχει ως συνέπεια τη μεταφορά παραγόντων αντοχής, ιδιαίτερα όταν υπάρχει πίεση επιλογής από άλλους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Σκοπός της μελέτης ήταν να διερευνηθεί την επίδραση εμπορικά διαθέσιμων ιδιοσκευασμάτων απορρυπαντικών – απολυμαντικών και πρακτικών εξυγίανσης (μικροκύματα) στην επιλογή ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων.

Μέθοδοι

Στην παρούσα εργασία έγινε προσομοίωση της οικιακής διαδικασίας καθαρισμού των πιάτων. Επίσης εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα της εξυγίανσης των σπόγγων με χρησιμοποίηση φούρνου μικροκυμάτων. Χρησιμοποιήθηκαν τρία εμπορικά διαθέσιμα ιδιοσκευάσματα πιάτων που περιείχαν υποχλωριώδες νάτριο (4,8%), γαλακτικό οξύ (1,4%) ή τεταρτοταγείς ενώσεις αμμωνίου (1,92%). Οι σπόγγοι ενοφθαλμίστηκαν με μίγμα ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών *Escherichia coli* ή *Enterococcus* spp.. Το μίγμα στελεχών περιείχε ένα ανθεκτικό στέλεχος (ESBL *E.coli* και βανκομυκίνη ανθεκτικό στέλεχος *E.faecium* αντίστοιχα) και τρία ευαίσθητα. Οι σπόγγοι μολύνθηκαν με πληθυσμό

10⁵ cfu/ml και εμποτίζονταν με 25 ml ζωμού κρέατος όπου παρέμεναν για 15 λεπτά, πέντε φορές την εβδομάδα για ένα μήνα. Ακολούθως οι σπόγγοι εκθέτονταν στο διάλυμα απορρυπαντικού - απορρυπαντικού. Μετά από έκπλυση, τα σφουγγάρια στέγνωσαν και αποθηκεύονταν σε θερμοκρασία δωματίου.

Πίνακας 1. Πειραματικές ομάδες.

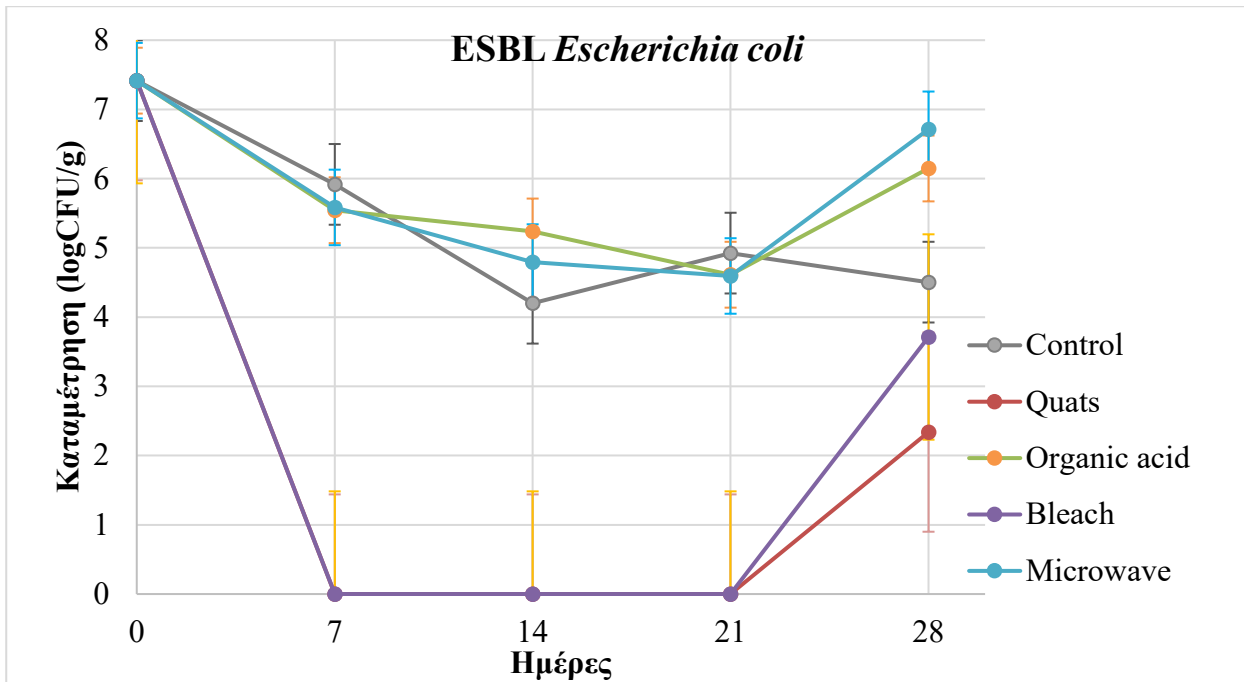
Ομάδα	Ημερήσια διαδικασία	Αντιμικροβιακός παράγοντας	Ενοφθαλμισμός
A	Απιονισμένο νερό (μάρτυρες)	-	Ναι
B	Απορρυπαντικό 1	Τεταρτοταγείς ενώσεις αμμωνίου	Ναι
Γ	Απορρυπαντικό 2	Γαλακτικό οξύ	Ναι
Δ	Απορρυπαντικό 3	Υποχλωριώδες νάτριο	Ναι
E	Έκθεση σε μικροκύματα	Θέρμανση	Ναι
ΣΤ	Μάρτυρες	-	Όχι

Κάθε εβδομάδα λαμβάνονταν δείγματα σπόγγων που εκπλένονταν με Nutrient Broth και χρήση stomacher για 2 λεπτά. Ακολουθούσε παρασκευή διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων σε Maximum Recovery Diluent και ενοφθαλμισμός σε διπλή σειρά τρυβλίων με Slanetz Bartley agar με ή χωρίς προσθήκη 6 mg/L βανκομυκίνης (*Enterococcus* spp.) ή Chromocult Coliform agar (*E.coli*) με ή χωρίς την προσθήκη 1 mg/L κεφοταξίμης. Επιλεγμένες αποικίες επιβεβαιώνονταν με μοριακές ή φαινοτυπικές δοκιμές.

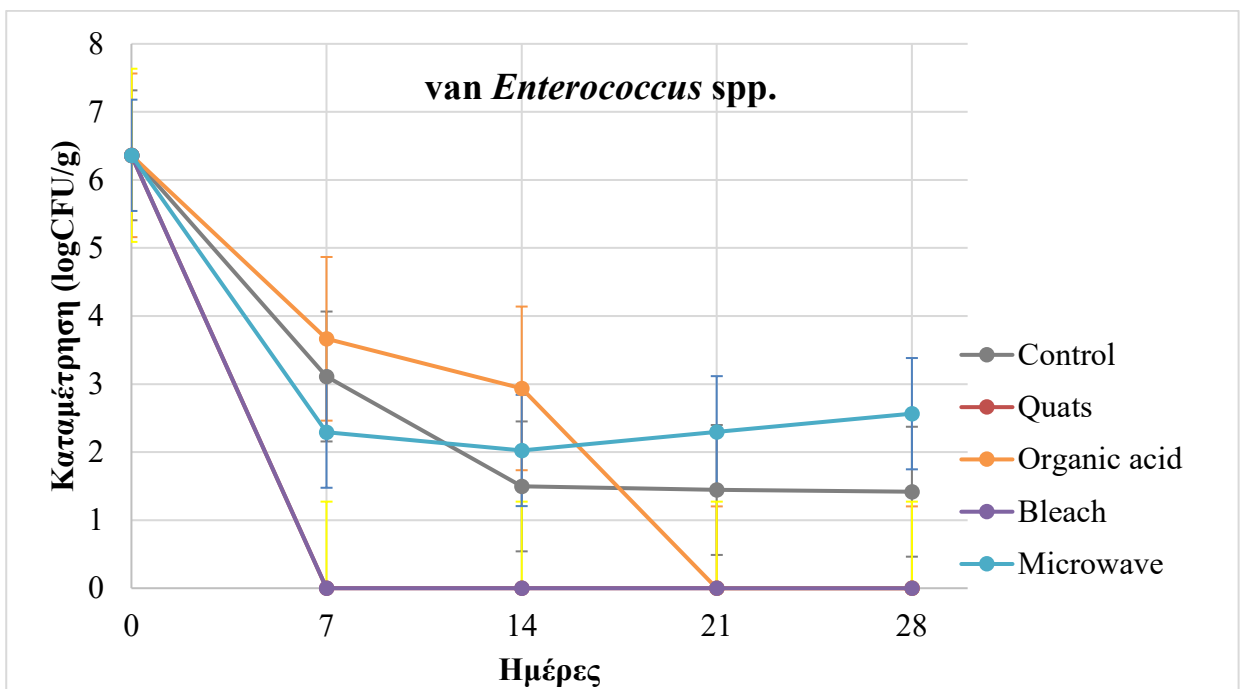
Αποτελέσματα – Συζήτηση

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα Γραφήματα 1 και 2. Σύμφωνα με τους μάρτυρες, ο πληθυσμός των *E.coli* παρουσίασε μείωση κατά δύο δεκαδικούς λογάριθμους. Μεγαλύτερη μείωση εμφανίστηκε στον πληθυσμό των *Enterococcus* spp. όπου η μείωση ήταν περίπου της τάξεως των πέντε δεκαδικών λογάριθμων. Αναφορικά με τις μεθόδους εξυγίανσης, η επίδραση μικροκυμάτων ή του ιδιοσκεύασματος με οργανικά οξέα δεν είχαν σημαντική διαφορά έναντι των μαρτύρων. Αντίθετα τα ιδοσκευάσματα με υποχλωριώδες νάτριο ή τεταρτοταγείς ενώσεις του αμμωνίου προκάλεσαν μεγάλη μείωση των πληθυσμών των ανθεκτικών στελεχών. Ενδιαφέρον όμως παρουσίασε η αύξηση των ESBL *E.coli* μετά την τρίτη εβδομάδα κατεργασίας, πιθανότατα λόγω ταυτόχρονης εμφάνισης αντοχής στους απολυμαντικούς παράγοντες και στα προστιθέμενα αντιβιοτικά.

Ως μηχανισμοί επιβίωσης των Gram αρνητικών βακτηρίων στο υποχλωριώδες νάτριο έχουν αναφερθεί η παραγωγή σαπερονών, η ενεργοποίηση μεταφραστικών ρυθμιστών και η δημιουργία βιοϋμενίων (Nizer *et al.*, 2020). Μάλιστα οι Hou *et al.* (2019) αναφέρουν την εμφάνιση αντοχής στην κεφταξιδίμη των *Pseudomonas aeruginosa* μετά από έκθεση σε 4 mg/L υποχλωριώδους νατρίου. Αναφορικά με τις τεταρτοταγείς ενώσεις του αμμωνίου, η ανάπτυξη αντοχής οφείλεται κυρίως στην ενεργοποίηση των αντλιών (Morrison *et al.*, 2019). Παρόλα αυτά, και στους *Enterococcus* spp. έχουν περιγραφεί ιδιαίτερα ενεργές αντλίες. Αντίθετα, οι Wieland *et al.* (2017) αναφέρουν ότι η παρουσία μικρών συγκεντρώσεων τεταρτοταγών ενώσεων του αμμωνίου μπορεί να οδηγήσει στην επιλογή των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά εντεροκόκκων, αλλά όχι των ESBL *E.coli*. Πιθανώς, η διαφορά μεταξύ των δύο ερευνών να οφείλεται στα στελέχη που εξετάστηκαν.



Γράφημα 1. Καταμετρήσεις των ESBL *Escherichia coli*.



Γράφημα 2. Καταμετρήσεις των ανθεκτικών στη βανκομυκίνη εντεροκόκκων.

Βιβλιογραφικές αναφορές

- Cardinale M., Kaiser D., Lueders T., *et al.* (2017). Microbiome analysis and confocal microscopy of used kitchen sponges reveal massive colonization by *Acinetobacter*, *Moraxella* and *Chryseobacterium* species. *Sci Rep*, 7:5791.
- Hou A-, Yang D, Miao J, *et al.* (2019). Chlorine injury enhances antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* through over expression of drug efflux pumps. *Water Res*, 156:366-71.
- Marshall B.M., Robleto E., Dumont T. *et al.* (2012). The frequency of antibiotic-resistant bacteria in homes differing in their use of surface antibacterial agents. *Curr Microbiol*, 65, 407–415.

- Morrison K.R., Allen R.A., Minbiole K.P.C., *et al.* (2019). More QACs, more questions: Recent advances in structure activity relationships and hurdles in understanding resistance mechanisms. *Tetrahedron Letters*, 60(37) 150935.
- Nizer W.S.D.C., Inkovskiy V., Overhage, J. (2020). Surviving reactive chlorine stress: Responses of gram-negative bacteria to hypochlorous acid. *Microorganisms*, 8(8), 1-27.
- Wieland N, Boss J, Lettmann S, et al. (2017). Susceptibility to disinfectants in antimicrobial-resistant and -susceptible isolates of *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from poultry-ESBL/AmpC-phenotype of *E.coli* is not associated with resistance to a quaternary ammonium compound, DDAC. *J Appl Microbiol.* 122(6):1508-1517.

Π.ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ (e-Poster)

Σάββατο 28-11-2020, 09:00-20:00

Το στρες της μητρικής αποστέρησης αλλάζει την έκφραση του υποδοχέα της ντοπαμίνης DRD1 και του προνευρικού bHLH μεταγραφικού παράγοντα Neurogenin2 στην περιοχή του υπόκαμπου.

Ευαγγελία ΚΩΦΙΔΟΥ¹, Κυριακή ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ, Μαρούσα ΔΑΡΣΙΝΟΥ, Ευαγγελία ΚΕΣΙΔΟΥ, Πασχάλης ΘΕΟΤΟΚΗΣ, Μαρία ΚΑΡΑΚΩΤΑ, Όλγα ΤΟΥΛΟΥΜΗ, Ευαγγελία ΝΟΥΣΙΟΠΟΥΛΟΥ, Μαρίκα ΣΥΡΡΟΥ, Νικόλαος ΓΡΗΓΟΡΙΑΔΗΣ, Θεολόγος Μ. ΜΙΧΑΗΛΙΔΗΣ²

1. Εργαστήριο Πειραματικής Νευρολογίας & Νευροανοσολογίας, Β' Παν/κή Νευρολογική κλινική, Γενικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο 'ΑΧΕΠΑ' Θεσσαλονίκης, evikofidou@gmail.com

2. Τμήμα Βιοϊατρικών Ερευνών, Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας (IMBB-ITE), Ιωάννινα, tmichael@uoi.gr, theologos_michailidis@imbb.forth.gr

Περίληψη

Η διατάραξη της σχέσης μητέρας-παιδιού στην πρώιμη παιδική ηλικία αποτελεί έναν ισχυρό παράγοντα χρόνιου στρες ο οποίος επιδρά σημαντικά στην διαμόρφωση της συμπεριφοράς και της ικανότητας προσαρμογής του ενήλικου ατόμου. Για την μελέτη της σχέσης αυτής εφαρμόστηκε ένα από τα πιο ισχυρά πρωτόκολλα μητρικού αποχωρισμού και πρόωρου απογαλακτισμού σε νεογνούς μύες. Όταν οι μύες ενηλικιώθηκαν, υποβλήθηκαν σε συμπεριφορικές δοκιμασίες και βιοχημικές μετρήσεις προκειμένου να εκτιμηθούν οι επιπτώσεις της διατάραξης της σχέσης μητέρας-μυ κατά την πρώιμη ηλικία, τόσο στην λειτουργία του άξονα HPA (hypothalamus-pituitary-adrenal) όσο και στην προσαρμογή στο στρες κατά την ενήλικη περίοδο. Αργότερα τα ζώα θυσιάστηκαν, και απομονώθηκε ο υπόκαμπος του εγκεφάλου ώστε να διερευνηθεί η επίδραση του πρώιμου μητρικού στρες στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη ρύθμιση του άξονα HPA, τη νευροπλαστικότητα και τη νευρογένεση. Αναλύθηκε επίσης το πρότυπο έκφρασης του υποδοχέα GR καθώς και η κατανομή της ενεργοποιημένης μορφής του στην ευρύτερη περιοχή του υπόκαμπου.

Λέξεις –Κλειδιά

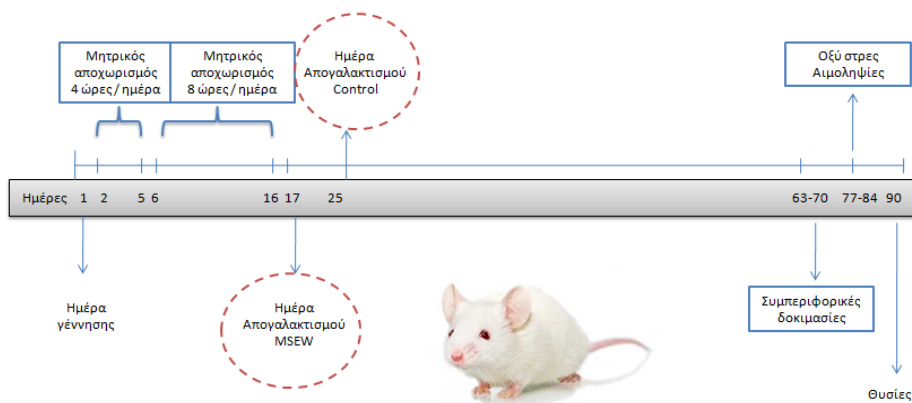
Μητρικό στρες, Άξονας HPA, Νευρογένεση

Εισαγωγή

Ένας από τους ισχυρότερους παράγοντες στρες που μπορεί να υποβληθεί ένα νεογνό κατά τα πρώιμα στάδια της ζωής του, είναι η αποστέρηση από την μητέρα του (μητρική αποστέρηση ή μητρικός αποχωρισμός). Η σημαντικότητα της σχέσης μητέρα-παιδί έχει απασχολήσει πολύ την επιστημονική κοινότητα εδώ και πολλά χρόνια. Για τη διερεύνηση των μηχανισμών μέσω των οποίων το πρώιμο μητρικό στρες διαταράσσει τη λειτουργία του άξονα HPA και οδηγεί σε αγχώδεις και οι καταθλιπτικές συμπεριφορές, έχουν αναπτυχθεί διάφορα πειραματικά μοντέλα που προσομοιάζουν την κατάσταση αυτή.

Μέθοδοι

Ως μοντέλο μητρικής αποστέρησης και παραμέλησης στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια της ζωής επιλέχθηκε ένα πρωτόκολλο μητρικού αποχωρισμού και πρόωρου απογαλακτισμού μυών (George κ.ά 2010) που φαίνεται να μιμείται σε σημαντικό βαθμό την κατάσταση αυτή (Εικόνα 1), γνωστό ως πρωτόκολλο MSEW (Maternal-Separation with Early-Weaning).



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση του πρωτόκολλου MSEW.

Το πρωτόκολλο εφαρμόστηκε σε νεογέννητους μύες της φυλής Balb/c τις πρώτες 17 ημέρες μετά την γέννηση τους και περιλάμβανε τον μητρικό αποχωρισμό τους για τέσσερις ώρες από την 2^η έως την 5^η μεταγεννητική ημέρα (ΜΓΗ2-ΜΓΗ5), και για οκτώ ώρες από την 6^η έως την 16^η ημέρα (ΜΓΗ6-ΜΓΗ16), και τον πρόωρο απογαλακτισμό τους την 17^η ημέρα. Παράλληλα με την ομάδα MSEW μεγάλωνε μια ομάδα μυών που παρέμεινε φυσιολογικά με την μητέρα τους, δεν υποβλήθηκε σε κάποιο πειραματικό χειρισμό, και απογαλακτίστηκε την ΜΓΗ25.

Όταν τα ζώα ενηλικιώθηκαν, υποβλήθηκαν στις συμπεριφορικές δοκιμασίες του ανυψωμένου λαβυρίνθου και της εξαναγκασμένης κολύμβησης ώστε να αξιολογηθεί η πιθανή «αγχώδης» και «καταθλιπτική» συμπεριφορά, αντίστοιχα. Προκειμένου να εκτιμηθεί η ευαισθησία του άξονα HPA, πραγματοποιήθηκε βιοχημικός έλεγχος της συγκέντρωσης της ορμόνης κορτικοστερόνης (ELISA), στον ορό του αίματός τους, πριν και μετά από την έκθεσή τους σε έναν οξύ στρεσογόνο παράγοντα.

Για την μελέτη των αλλαγών της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με την προσαρμογή στο στρες, τη νευρογένεση και τη νευροπλαστικότητα στον ιππόκαμπο των πειραματόζωων σε επίπεδο RNA, εφαρμόστηκε η τεχνική της αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription, RT) σε συνδυασμό με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-qPCR).

Η ανάλυση του πρότυπου έκφρασης του υποδοχέα GR και της κατανομής της ενεργοποιημένης μορφής του στην οδοντωτή έλικα του ιππόκαμπου των μυών που υπέστησαν την μητρική αποστέρηση, έγινε με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού και παρατήρησης με συνεστιακή μικροσκοπία.

Αποτελέσματα

Τα πειραματόζωα της ομάδας MSEW παρουσίασαν πιο «αγχώδη» και «καταθλιπτική» συμπεριφορά σε σχέση με εκείνα της ομάδας ελέγχου, επιβεβαιώνοντας την αποτελεσματικότητα του μοντέλου μητρικής αποστέρησης που εφαρμόστηκε. Επιλέχθηκαν αντιπροσωπευτικά άτομα για την αξιολόγηση της εύρυθμης λειτουργίας του άξονα HPA μέσω προσδιορισμού της μεταβολής των επιπέδων κορτικοστερόνης πριν και μετά από την εφαρμογή οξέος στρες. Διαπιστώσαμε ότι οι αλλαγές που εντοπίστηκαν σε συμπεριφορικό επίπεδο αντανακλώνονται και σε ορμονικό επίπεδο, και ότι κάποια από τα πειραματόζωα απέκλιναν σημαντικά από τον μέσο όρο τόσο στη συμπεριφορά όσο και στα επίπεδα κορτικοστερόνης.

Διερευνώντας την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την λειτουργία του άξονα HPA, διαπιστώσαμε μεταβολές στα επίπεδα mRNA των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών, GR και MR στον ιππόκαμπο των πειραματόζωων. Παρατηρήσαμε επίσης αυξημένη ενεργοποίηση του GR στην ομάδα MSEW, ενώ

ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι η αύξηση του αριθμού των κυττάρων στα οποία ο υποδοχέας είναι ενεργός (phospho-GR^{Ser211+}) συμπεριελάμβανε και την κοκκιώδη στιβάδα της οδοντωτής έλικας, υποδηλώνοντας μια πιθανή απορρύθμιση της νευρογένεσης στα ζώα που είχαν υποστεί το μητρικό στρες.

Η μητρική αποστέρηση οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *DRD1*, ενός μέλους της οικογένειας των υποδοχέων GPCR (*G-protein-coupled receptors*) τύπου D1, το οποίο εμπλέκεται σε πολυάριθμες λειτουργίες του εγκεφάλου και γνωστικές διεργασίες (Baddeley 2003), καθώς και σημαντική μείωση του μεταγραφικού παράγοντα NGN2, ο οποίος παίζει σπουδαίο ρόλο στον καθορισμό του πεπρωμένου των νευρικών βλαστικών κυττάρων και τη νευρογένεση στον υπόκαμπο (Galichet κ.ά 2008). Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι το μητρικό στρες μπορεί να οδηγεί σε απορρύθμιση της γέννησης νέων νευρώνων στον ενήλικο εγκέφαλο, μια διαδικασία η οποία θεωρείται ιδιαίτερα ευαίσθητη στους περιβαλλοντικούς παράγοντες στα πρώτα στάδια της ζωής (Karten, Olariu, & Cameron 2005).

Συμπεράσματα

Το μοντέλο μητρικού στρες προκάλεσε αλλαγές στην συμπεριφορά και στην ευαισθησία του άξονα HPA στην ενήλικη περίοδο.

Η μητρική αποστέρηση επηρέασε σημαντικά την έκφραση γονιδίων που συνδέονται με τη ρύθμιση της νευροπλαστικότητας και νευρογένεσης στην περιοχή του υπόκαμπου.

Βιβλιογραφία

- Baddeley, A. (2003). Working memory: Looking back and looking forward. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(10), 829–839.
- Galichet, C., Guillemot, F., & Parras, C. M. (2008). Neurogenin 2 has an essential role in development of the dentate gyrus. *Development*, 135(11), 2031–2041.
- George, E. D., Bordner, K. A., Elwafi, H. M., & Simen, A. A. (2010). Maternal separation with early weaning: A novel mouse model of early life neglect. *BMC Neuroscience*, 11.
- Karten, Y. J. G., Olariu, A., & Cameron, H. A. (2005). Stress in early life inhibits neurogenesis in adulthood. *Trends in Neurosciences*.

Αξιολόγηση της κλιματικής σταθερότητας των μεταναστευτικών διαδρόμων των θαλάσσιων χελωνών στην περιοχή της Μεσογείου

Βασιλική ΑΛΜΠΑΝΙΔΟΥ¹, Αμαλία ΚΥΠΡΙΩΤΗ², Αντώνιος Δ. ΜΑΖΑΡΗΣ³

¹Τομέας Οικολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη, valmpani@bio.auth.gr

²Τομέας Οικολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη, kpamalia@bio.auth.gr

³Τομέας Οικολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη, amazaris@bio.auth.gr

Περίληψη

Οι θαλάσσιες χελώνες, ως ποικιλόθερμα μεταναστευτικά είδη, είναι ιδιαίτερα ευάλωτες στην κλιματική αλλαγή. Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η εκτίμηση της κλιματικής σταθερότητας κατά μήκος των μεταναστευτικών διαδρόμων της *Caretta caretta* στη Μεσόγειο. Διερευνήσαμε πιθανές μεταβολές στην ταχύτητα της κλιματικής αλλαγής στη διάρκεια 150 ετών, από το 1950 έως το 2099, κατά τη μετανάστευση από τις παραλίες ωτοκίας στις περιοχές τροφοληψίας, χρησιμοποιώντας δεδομένα για τη θερμοκρασία της επιφάνειας της θάλασσας. Στους τέσσερις βασικούς μεταναστευτικούς διαδρόμους που εντοπίστηκαν βρέθηκε ότι οι παρατηρούμενες μεταβολές παρουσιάζουν ένα πολύπλοκο χωροχρονικό πρότυπο. Παρατηρήθηκε ωστόσο, ότι οι κλιματικά σταθερές περιοχές, που χαρακτηρίζονται από χαμηλή ταχύτητα, καλύπτουν μικρό ποσοστό των διαδρόμων. Η έρευνα αυτή συμβάλλει στην παροχή κατευθυντήριων γραμμών για τον εντοπισμό ευάλωτων περιοχών, τις οποίες χρησιμοποιούν οι θαλάσσιες χελώνες κατά τη μετανάστευση, και την εφαρμογή αποτελεσματικών μέτρων διαχείρισης και μετριασμού των πιθανών επιπτώσεων της κλιματικής αλλαγής σε αυτές.

Λέξεις κλειδιά

αξιολόγηση κινδύνου, *Caretta caretta*, διαχειριστικά μέτρα, ταχύτητα της κλιματικής αλλαγής, προστασία

Εισαγωγή

Η κλιματική αλλαγή αποτελεί μια σημαντική απειλή για τη θαλάσσια βιοποικιλότητα. Η πρόκληση είναι ακόμη μεγαλύτερη για τα μεταναστευτικά είδη, καθώς εξαρτώνται από τις συνθήκες στα διαφορετικά ενδιαιτήματα που χρησιμοποιούν. Οι θαλάσσιες χελώνες, ως ποικιλόθερμα είδη, με εξαιρετική ικανότητα διασποράς (Hays & Scott 2013), επηρεάζονται από το κλίμα καθ' όλη τη ζωή τους, με το ρυθμό της σύγχρονης κλιματικής αλλαγής να εγείρει ανησυχίες για την επιβίωση τους (Fuentes et al. 2013). Οι θαλάσσιες χελώνες αποτελούν, επιπλέον, ευαίσθητους οικολογικούς δείκτες καθώς αντανακλούν διαφορές στους περιβαλλοντικούς παράγοντες και διακρίνουν καταστάσεις στρες και αλλαγών (Aguirre & Lutz 2004), καθιστώντας τες έτσι, ιδανικούς οργανισμούς για την αξιολόγηση της υγείας και καλής κατάστασης των θαλάσσιων οικοσυστημάτων, υπό το πρίσμα της κλιματικής αλλαγής.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση πιθανών αλλαγών στις κλιματικές συνθήκες κατά μήκος των μεταναστευτικών διαδρόμων που χρησιμοποιούν οι θαλάσσιες χελώνες *Caretta caretta*, κατά τη μετακίνηση από τις παραλίες ωτοκίας στις περιοχές τροφοληψίας, στην περιοχή της Μεσογείου, από το 1950 έως το 2099.

Μέθοδοι

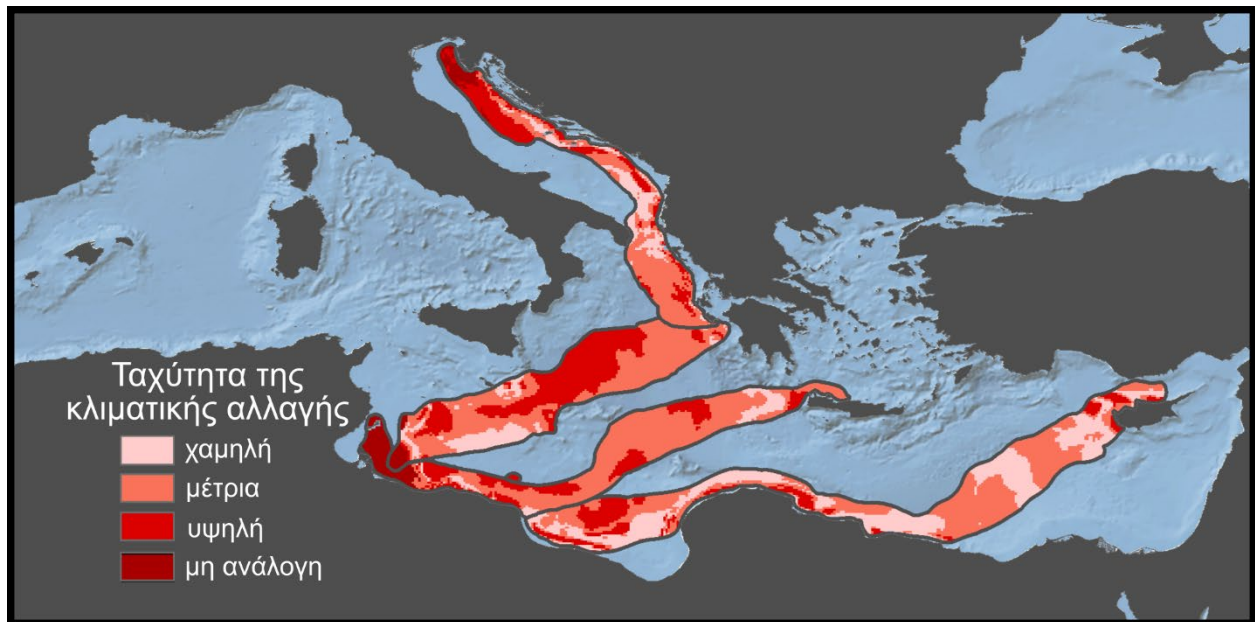
Για τον προσδιορισμό των μεταναστευτικών διαδρόμων των θαλάσσιων χελωνών *C. caretta* στην περιοχή της Μεσογείου, δημιουργήθηκε μια βάση με όλα τα διαθέσιμα δημοσιευμένα τηλεμετρικά δεδομένα. Για τον καθορισμό των χωρικών ορίων κάθε μεταναστευτικού διαδρόμου, εφαρμόστηκε η εκτίμηση πυκνότητας πυρήνα, χρησιμοποιώντας τα τηλεμετρικά δεδομένα που συγκεντρώθηκαν ως διακριτές γραμμές.

Για τη διερεύνηση πιθανών μεταβολών στις κλιματικές συνθήκες κατά μήκος των μεταναστευτικών διαδρόμων, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα για τη θερμοκρασία της επιφάνειας της θάλασσας από το 1950

έως το 2099. Για την αξιολόγηση της κλιματικής σταθερότητας των διαδρόμων, το χρονικό αυτό διάστημα διαιρέθηκε σε πέντε περιόδους των τριάντα ετών (1950-1979, 1980-2009 κ.ο.κ.). Στη συνέχεια, εκτιμήθηκε η αναλογική ταχύτητα της κλιματικής αλλαγής μεταξύ διαδοχικών ζευγών, δηλαδή εντοπίστηκαν περιοχές οι οποίες αναμένεται να παρουσιάζουν ανάλογες κλιματικές συνθήκες από τη μια μελετώμενη περίοδο στην επόμενη. Οι τιμές που υπολογίστηκαν για την ταχύτητα της κλιματικής αλλαγής διακρίθηκαν σε τρεις κλάσεις (χαμηλή, μέτρια, υψηλή), με τις χαμηλές ταχύτητες να υποδηλώνουν ανάλογες συνθήκες σε κοντινή απόσταση και συνεπώς, να αντιπροσωπεύουν κλιματικά σταθερές περιοχές.

Αποτελέσματα

Εντοπίστηκαν τέσσερις κύριοι μεταναστευτικοί διάδρομοι (Εικόνα 1), οι οποίοι οδηγούν σε σημαντικές περιοχές τροφοληψίας για τις ενήλικες *C. caretta* στη Μεσόγειο. Δύο διάδρομοι ξεκινούν από τις παραλίες ωτοκίας στη Ζάκυνθο και καταλήγουν ο ένας στη Βόρεια Αδριατική και ο άλλος στην Τυνησία, στον κόλπο του Γκαμπές. Στον ίδιο κόλπο καταλήγουν και οι διάδρομοι που έχουν την αρχή τους στις περιοχές αναπαραγωγής της Κύπρου και της Κρήτης.



Εικόνα 1. Η ταχύτητα της κλιματικής αλλαγής μεταξύ των περιόδων 2040-2069 και 2070-2099 κατά μήκος των μεταναστευτικών διαδρόμων των θαλάσσιων χελωνών *Caretta caretta* στην περιοχή της Μεσογείου.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αν και παρατηρούνται διαφοροποιήσεις ως προς τη μεταβολή στην ταχύτητα της κλιματικής αλλαγής μεταξύ των διαφορετικών διαδρόμων, ένα μικρό κομμάτι τους μόνο θα περιλαμβάνει περιοχές με σταθερές κλιματικές συνθήκες, δηλαδή με χαμηλή ταχύτητα (Εικόνα 1). Για παράδειγμα, οι διάδρομοι που ξεκινούν από τη Ζάκυνθο βρέθηκαν να περιλαμβάνουν τριπλάσιο ποσοστό περιοχών με υψηλή ταχύτητα προς το τέλος αυτού του αιώνα σε σχέση με τον προηγούμενο.

Συμπεράσματα

Η παρούσα έρευνα έδειξε ότι οι *C. caretta* στη Μεσόγειο θα έρθουν αντιμέτωπες με σημαντικές μεταβολές στις κλιματικές συνθήκες κατά τη διάρκεια των μεταναστεύσεών τους. Αναδεικνύεται έτσι, η ανάγκη να κατανοήσουμε περαιτέρω τις πιθανές επιπτώσεις της περιορισμένης κλιματικής σταθερότητας κατά μήκος των μεταναστευτικών διαδρόμων στους οργανισμούς, διερευνώντας την επίδραση των αλλαγών στις ενεργειακές τους απαιτήσεις, στις φυσιολογικές τους αποκρίσεις αλλά και στη συνολικότερη ευρωστία τους κατά τη μετακίνηση (Poloczanska et al. 2016). Παράλληλα, η

μεθοδολογία που αναπτύχθηκε, επιτρέπει να αναγνωριστούν περιοχές-κλειδιά για τις θαλάσσιες χελώνες, οι οποίες αναμένεται να είναι περισσότερο εκτεθειμένες στην κλιματική αλλαγή και στις οποίες χρειάζεται να δοθεί προτεραιότητα ως προς τη διαχείριση και την εφαρμογή μέτρων μετριασμού, τονίζοντας την ανάγκη συνυπολογισμού του μεταβαλλόμενου κλίματος στην προστασία και διατήρηση (Wilson et al. 2020).

Ευχαριστίες

Η παρούσα έρευνα συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση Μεταδιδασκτόρων ερευνητών/ερευνητριών - Β΄ Κύκλος» (MIS-5033021), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).

Βιβλιογραφία

- Aguirre, A.A., Lutz, P.L. (2004). Marine turtles as sentinels of ecosystem health: is fibropapillomatosis an indicator? *EcoHealth*, 1, 275-283.
- Fuentes, M.M., Pike, D.A., Dimatteo, A., Wallace, B.P. (2013). Resilience of marine turtle regional management units to climate change. *Global Change Biology*, 19, 1399-1406.
- Hays, G.C., Scott, R. (2013). Global patterns for upper ceilings on migration distance in sea turtles and comparisons with fish, birds and mammals. *Functional Ecology*, 27, 748-756.
- Poloczanska, E.S., Burrows, M.T., Brown, C.J., García Molinos, J., Halpern, B.S., Hoegh-Guldberg, O., Kappel, C.V., Moore, P.J., Richardson, A.J., Schoeman, D.S., Sydeman, W.J. (2016). Responses of marine organisms to climate change across oceans. *Frontiers in Marine Science*, 3, 62.
- Wilson, K.L., Tittensor, D.P., Worm, B., Lotze, H.K. (2020). Incorporating climate change adaptation into marine protected area planning. *Global Change Biology*, 26, 3251-3267.

Γνώσεις και στάσεις των μαθητών απέναντι στη χρήση των αντιβιοτικών

ΚΟΥΤΣΟΚΩΣΤΑ Παυλίνα ¹, ΤΣΙΤΣΙΛΩΝΗ Ουρανία ², ΓΑΛΑΝΗ Αποστολία ³, ΜΑΥΡΙΚΑΚΗ Ευαγγελία ⁴

1. Βιολόγος, εκπαιδευτικός Δευτεροβάθμιας, Υπ. Διδάκτορας ΠΤΔΕ ΕΚΠΑ, kpavlina70@gmail.com
2. Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ, rtsitsil@biol.uoa.gr
3. Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΠΤΔΕ ΕΚΠΑ, ligalani@primedu.uoa.gr
4. Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΠΤΔΕ ΕΚΠΑ, emavrikaki@primedu.uoa.gr

Περίληψη

Η αδικαιολόγητη κατανάλωση αντιβιοτικών αποτελεί την κύρια κινητήρια δύναμη για την ανάπτυξη της ανθεκτικότητας των βακτηρίων απέναντι στα αντιβιοτικά. Η αναζήτηση ανασκοπικών άρθρων και ερευνητικών μελετών που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, καταδεικνύει ότι για την κατάσταση αυτή, τόσο στην Ελλάδα, όσο και σε διεθνές επίπεδο, ευθύνεται πρωτίστως η ανεπαρκής ενημέρωση του πληθυσμού, αλλά και η ελλιπής, αν όχι ανύπαρκτη πληροφόρηση στη πρωτοβάθμια και δευτεροβάθμια εκπαίδευση σε θέματα πρόληψης της υγείας και επιπλέον ότι θα πρέπει να συμπεριληφθούν στο πρόγραμμα σπουδών, διδακτικές ενότητες για τη μικροβιολογία, με έμφαση στη σωστή χρήση αντιβιοτικών. Πιστεύουμε ότι αύξηση των ωρών της Βιολογίας στη Β΄-θμια Εκπαίδευση και εμπλουτισμός του ΑΠ με ζητήματα που άπτονται της Αγωγής Υγείας, θα οδηγήσει στην υιοθέτηση των επιθυμητών στάσεων στον τομέα της Πρόληψης της Υγείας.

Λέξεις- κλειδιά

Αντιβιοτικά, Ανθεκτικότητα βακτηρίων, Έλλειψη ενημέρωσης, Αγωγή Υγείας, Βιολογία

Εισαγωγή

Τόσο στη χώρα μας, όσο και διεθνώς, η εξάπλωση ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών αποτελεί πλέον μείζον πρόβλημα, κυρίως εξαιτίας της υπερκατανάλωσης των αντιβιοτικών στον άνθρωπο, στην κτηνοτροφία και στην αλιεία. Η κατάσταση αυτή αποδίδεται σε μεγάλο βαθμό σε άγνοια του πληθυσμού και στην απουσία Αγωγής Υγείας στα σχολεία. Πιστεύουμε ότι Αγωγή Υγείας θα μπορούσε να επιτευχθεί στα σχολεία, μέσα από το μάθημα της Βιολογίας, μετά από αναδιαμόρφωση του Αναλυτικού Προγράμματος Σπουδών και ότι η ενέργεια αυτή θα οδηγούσε στην τροποποίηση στάσεων και συμπεριφορών που αφορούν μεταξύ άλλων και στη χρήση αντιβιοτικών, επιφέροντας τεράστια οφέλη στη δημόσια υγεία.

Σκοπός

Η ανάδειξη των γνώσεων και των στάσεων των μαθητών της δευτεροβάθμιας εκπαίδευσης, μέσα από τη σύγχρονη ανασκόπηση της διεθνούς αλλά και της ελληνικής βιβλιογραφίας, απέναντι στη χρήση των αντιβιοτικών, ώστε μέσα από αναπροσαρμογή και εμπλουτισμό του Αναλυτικού Προγράμματος του μαθήματος της Βιολογίας, με θέματα που αφορούν στην Αγωγή Υγείας, να επιτευχθεί υιοθέτηση υγιεινών προτύπων συμπεριφοράς.

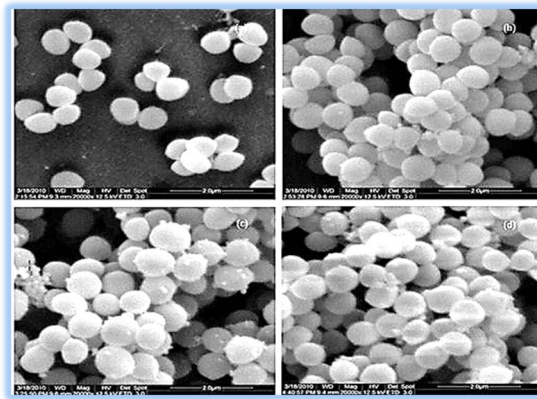
Μεθοδολογία

Πραγματοποιήθηκε αναζήτηση ανασκοπικών άρθρων και ερευνητικών μελετών δημοσιευμένων στην Αγγλική και στην Ελληνική γλώσσα, οι οποίες αναφέρονταν στις γνώσεις και στις στάσεις διαφόρων ηλικιακών ομάδων του πληθυσμού σε διεθνές επίπεδο, σχετικά με τους μικροοργανισμούς και τη σωστή χρήση των αντιβιοτικών.

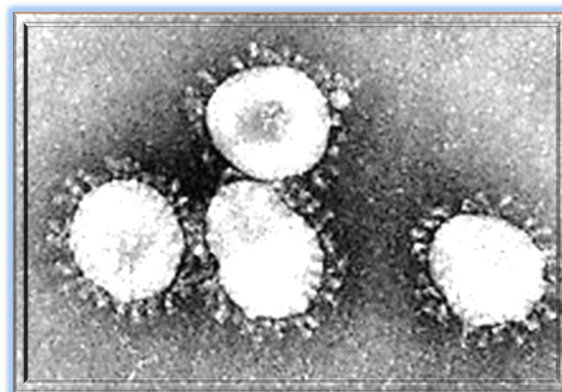
Αποτελέσματα

Διαπιστώθηκε η ύπαρξη σημαντικών παρανοήσεων γύρω από τα μικρόβια και ελάχιστη γνώση γύρω από την ορθολογική χρήση των αντιβιοτικών, τους κινδύνους από την κατάχρησή τους, τη δημιουργία ανθεκτικότητας στα βακτήρια (Εικόνα1). Πιο συγκεκριμένα:

- Οι ιδέες των παιδιών για τους μικροοργανισμούς είναι ανεπαρκώς τεκμηριωμένες, συχνά αντιφατικές, ενώ διακρίνονται και έντονες φοβικές στάσεις απέναντι στους μικροοργανισμούς (Bandiera 2007, Byrne & Sharp 2006).
- Οι ρόλοι των μικροοργανισμών ως βιολογικά όπλα καθώς και τα πιο θετικά οφέλη των μικροοργανισμών στη βιοτεχνολογία και στη γονιδιακή θεραπεία ήταν εμφανώς απόντα (Jones & Rua 2006).
- Ειδικά στην Ελλάδα, η πρακτική της «αυτο-φαρμακευτικής» αγωγής με αντιβιοτικά χωρίς ιατρική συνταγή είναι μια συνήθης πρακτική, κυρίως στην περίπτωση ιογενών λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού, που οφείλονται κατά κύριο λόγο σε ρινοϊούς και κορωνοϊούς (Κουτσοκόστα 2019, Panagakou et al 2011) (Εικόνα 2).
- Η ύπαρξη αυτών των στάσεων και των γνωσιακών αποκλίσεων αποδίδεται σε απουσία επίσημης εκπαίδευσης σε θέματα υγείας. Οι πηγές πληροφόρησης των παιδιών είναι κυρίως οι γονείς τους (Baltazar et al 2009).
- Υποστηρίζεται ότι θα πρέπει να συμπεριληφθούν στο πρόγραμμα σπουδών, διδακτικές ενότητες για τη μικροβιολογία, με έμφαση στη σωστή χρήση αντιβιοτικών (Baltazar et al 2009).



Εικόνα 1. Στελέχη του Χρυσίζοντα Σταφυλόκοκκου Ανθεκτικού στη Μεθικιλίνη (MRSA) ευθύνονται για μεγάλο αριθμό ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων (ResearchGate).



Εικόνα 2. Κορωνοϊοί όπως φαίνονται από ένα ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Ο ιός είναι γνωστός για τις ακίδες στην επιφάνειά του (Soni, N. R. Outbreak of Middle East Looming of SARS).

Συμπεράσματα – Συζήτηση

Οι ανθρώπινες στάσεις και συμπεριφορές, πολύ συχνά αποτελούν καθοριστικούς παράγοντες στην αιτιολογία και την επιδημιολογία πολλών ασθενειών. Η αποτελεσματικότητα οποιασδήποτε πολιτικής που εφαρμόζεται στο τομέα της υγείας, εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από το επίπεδο συνειδητότητας

του πληθυσμού πάνω σε θέματα που αφορούν την υγεία του. Η εκπαίδευση στο σχολείο θεωρείται ως η πιο αποτελεσματική μέθοδος για τη διαμόρφωση ή την αλλαγή στάσεων και συμπεριφορών, γιατί τα παιδιά στα σχολεία αποτελούν πρόσφορο έδαφος για την εφαρμογή κατάλληλων διδακτικών προσεγγίσεων. Πιστεύουμε ότι αύξηση των ωρών της Βιολογίας στη Β΄-θμια Εκπαίδευση και εμπλουτισμός του ΑΠ με ζητήματα που άπτονται της Αγωγής Υγείας, θα οδηγούσε στην υιοθέτηση των επιθυμητών στάσεων στον τομέα της Πρόληψης της Υγείας.

Βιβλιογραφία

- Κουτσοκόστα, Π. (2019). *Λοιμώξεις και αντιβιοτικά: από την κατάχρηση στην ορθολογική χρήση* (Αδημοσίευτη Μεταπτυχιακή εργασία). ΕΚΠΑ, Αθήνα.
- Baltazar, F., Azevedo, M. M., Pinheiro, C., & Yaphe, J. (2009). Portuguese students' knowledge of antibiotics: a cross-sectional study of secondary school and university students in Braga, 1-6. *BMC Public Health, Portugal*.
- Bandiera, M. (2007). Micro-organisms: Everyday knowledge predates and contrasts with school knowledge. In *Contributions from science education research* (pp. 213-224). Springer, Dordrecht.
- Byrne, J., & Sharp, J. (2006). Children's ideas about micro-organisms. *School Science Review*, 88(322), 71-79.
- Jones, M. G., & Rua, M. J. (2006). Conceptions of germs: Expert to novice understandings of microorganisms. *Electronic Journal of Science Education*, 10(3).
- Panagakou, S. G., Papaevangelou, V., Chadjipanayis, A., Syrogiannopoulos, G. A., Theodoridou, M., & Hadjichristodoulou, C. S. (2012). Risk factors of antibiotic misuse for upper respiratory tract infections in children: results from a cross-sectional knowledge-attitude-practice study in Greece. *ISRN pediatrics*, 2012

Ανιχνεύοντας το αλλεργιογόνο της Θεσσαλονίκης: ατμοσφαιρικό αποτύπωμα σπορίων μυκήτων οριζοντίως και καθ' ύψος στην πόλη

Αθανάσιος ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΠΟΥΛΟΣ¹, Αθανάσιος ΔΑΜΙΑΛΗΣ², Δέσποινα ΒΩΚΟΥ³
 Τομέας Οικολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη,
athchara@bio.auth.gr, athanchar@gmail.com, th_damialis@hotmail.com vokou@bio.auth.gr

Περίληψη

Τα σπόρια μυκήτων (ΣΜ) ευθύνονται σε μεγάλο βαθμό για την εκδήλωση αλλεργικών συμπτωμάτων στον ανθρώπινο πληθυσμό. Γι' αυτό, είναι απαραίτητη η συνεχής παρακολούθησή τους. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη των ατμοσφαιρικών συγκεντρώσεων των ΣΜ σε διαφορετικές θέσεις σε ένα αστικό περιβάλλον, συγκεκριμένα στην πόλη της Θεσσαλονίκης. Έγιναν δειγματοληψίες με φορητό συλλέκτη σε έξι θέσεις (σταθμούς) χαμηλά (σε ύψος 1.5 m) και με σταθερό συλλέκτη σε μία θέση ψηλά (30 m), επί δύο έτη, σε εβδομαδιαία βάση. Καταγράφηκαν σπόρια από 27 taxa μυκήτων. Το *Cladosporium* υπερκυριαρχεί (>75%) σε όλους τους σταθμούς δειγματοληψίας και ακολουθούν τα *Alternaria* και *Ustilago*. Οι συνολικές συγκεντρώσεις ΣΜ στους σταθμούς χαμηλά ήταν περίπου τέσσερις φορές μεγαλύτερες από τις συγκεντρώσεις ψηλά υποδεικνύοντας ότι απαιτούνται νέες προσεγγίσεις για την ακριβέστερη αποτύπωση της έκθεσης στα ΣΜ από αυτήν που συνήθως εφαρμόζεται στις πόλεις, δηλαδή με έναν συλλέκτη σε ύψος πάνω από 15 m.

Λέξεις κλειδιά

αεροβιολογία, βιοπαρακολούθηση, δημόσια υγεία, βιο-αεροαλλεργιογόνα

Εισαγωγή

Τα σπόρια μυκήτων (ΣΜ) αποτελούν ένα από τα πιο άφθονα βιο-αερολύματα παγκοσμίως και παράλληλα σημαντικά βιο-αεροαλλεργιογόνα, με σοβαρές επιπτώσεις στη δημόσια υγεία (Damialis et al. 2015, Núñez & Diego 2020). Συνεπώς, η βιοπαρακολούθησή τους είναι πολύ σημαντική, πολύ περισσότερο υπό την επίδραση της κλιματικής αλλαγής, η οποία φαίνεται να τροποποιεί τα καταγραμμένα πρότυπα (Ziska 2020). Η συνήθης μέθοδος καταγραφής των ατμοσφαιρικών συγκεντρώσεών τους, με χρήση ενός σταθερού συλλέκτη σε απόσταση >15 m από το έδαφος, σε μία μόνο θέση μιας πόλης, φαίνεται να μην αποτυπώνει την πραγματική έκθεση των ανθρώπων στα ΣΜ (Rojo et al. 2019). Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι να καταγραφούν οι συγκεντρώσεις των ΣΜ σε διαφορετικές περιοχές της Θεσσαλονίκης και σε δύο διαφορετικά ύψη, ώστε να μπορεί να εκτιμηθεί η κατά τόπους πραγματική επιβάρυνση του ατμοσφαιρικού περιβάλλοντος από αλλεργιογόνα ΣΜ.

Μέθοδοι

Κατά την περίοδο 2012-2013, πραγματοποιήθηκε λήψη δειγμάτων αέρα από έξι σταθμούς, σε ύψος 1,5 m από το έδαφος στην πόλη της Θεσσαλονίκης, με φορητό ογκομετρικό συλλέκτη (Burkard Manufacturing Co. Ltd., UK), σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό που περιγράφουν οι Charalampopoulos et al. (2018). Παράλληλα έγινε λήψη δεδομένων από τον αεροβιολογικό σταθμό (HUn) σε ύψος 30 m από το έδαφος, στο κέντρο της πόλης, όπου λειτουργεί σταθερός συλλέκτης συνεχούς λειτουργίας (Burkard Manufacturing Co. Ltd., UK), ίδιας προσροφητικής ικανότητας με τον φορητό (προδιαγραφές κατασκευαστή). Οι σταθμοί δειγματοληψίας ήταν οι εξής: οδός Αριστοτέλους (Ari), σταθμός ΚΤΕΛ Μακεδονία (Kte), Ζωολογικός Κήπος (Zoo), οδός Εθνικής Αμύνης (EAm), οδός Ν. Πλαστήρα [Αρετσού] (Are) και Πλατεία Χημείου ΑΠΘ (Uni), ακριβώς κάτω από τον σταθμό HUn. Για τις συγκρίσεις μεταξύ δεδομένων ψηλά και χαμηλά, χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα του σταθερού συλλέκτη που αντιστοιχούν στις ημέρες και ώρες που λαμβάνονταν δείγματα με τον φορητό συλλέκτη. Τα δεδομένα εκφράζονται ως ΣΠ m⁻³ ανά δώρο ή έτος (ανάλογα με το υπό διερεύνηση ερώτημα).

Αποτελέσματα

Από τα συνολικά 27 taxa ΣΜ που καταγράφηκαν, αφρονότερα βρέθηκαν τα σπόρια των *Cladosporium*, *Alternaria*, *Ustilago* με μέση συμμετοχή αθροιστικά > 90% του συνολικού μυκητικού φορτίου στην

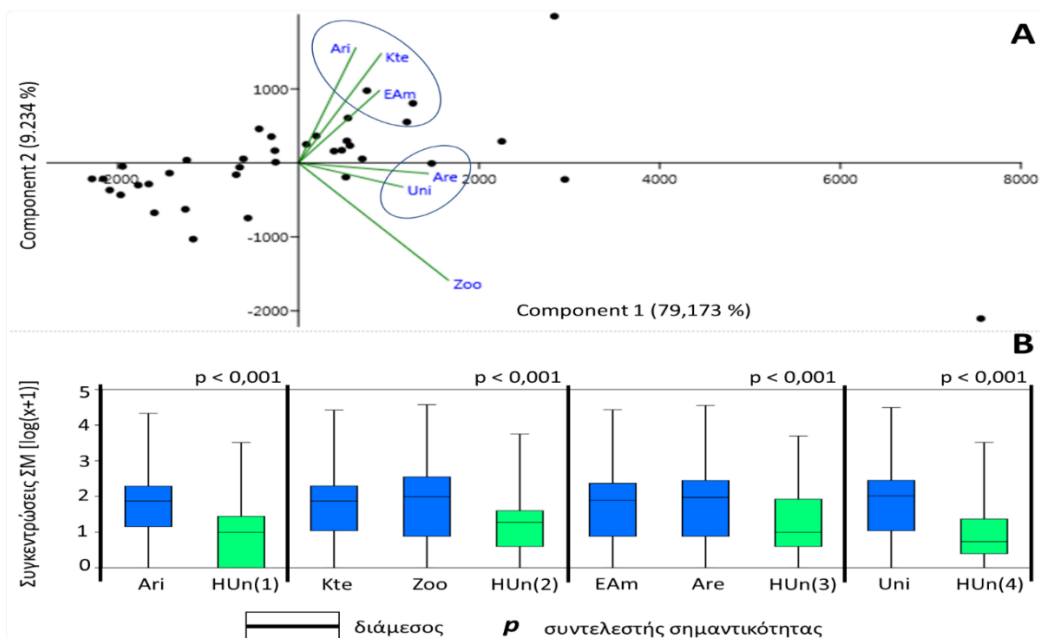
ατμόσφαιρα, σε κάθε σταθμό και για όλη την περίοδο δειγματοληψίας (Πίνακας 1). Από τους σταθμούς δειγματοληψίας χαμηλά, ο ημιφυσικός σταθμός κοντά στον ζωολογικό κήπο (Zoo) διαχωρίζεται καθαρά από τους υπόλοιπους (Εικόνα 1A). Οι συγκεντρώσεις στους σταθμούς χαμηλά ήταν πάντοτε υψηλότερες (2,9-5,2 φορές) συγκριτικά με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις στον σταθμό ψηλά, τόσο για το σύνολο των ΣΜ όσο και για τα τρία άφθονότερα taxa (Πίνακας 1 – Εικόνα 1B). Στον σταθμό κοντά στον ζωολογικό κήπο καταγράφηκαν οι υψηλότερες συγκεντρώσεις ΣΜ.

Πίνακας 1: Μέσες ετήσιες συγκεντρώσεις (μ.ε.σ.) για το σύνολο του μυκητικού φορτίου στην ατμόσφαιρα της Θεσσαλονίκης και εκατοστιαία συμμετοχή των πιο άφθονων taxa σε κάθε σταθμό.

Taxa	Ari	Kte	Zoo	EAm	Are	Uni	HUn
Σύνολο ΣΜ (μ.ε.σ.)	26590,0	32780,0	47960,0	32880,0	42870,0	38096,7	9278,5
<i>Cladosporium</i> (%)	80,41	80,06	78,20	81,94	83,55	82,33	81,99
<i>Alternaria</i> (%)	6,48	8,31	9,34	6,62	6,36	6,25	6,11
<i>Ustilago</i> (%)	4,21	4,19	3,75	3,80	3,09	3,53	4,00

Συμπεράσματα

Το ατμοσφαιρικό μυκητικό φορτίο στην Θεσσαλονίκη κυριαρχείται από το *Cladosporium*, με συμμετοχή >75% σε όλους τους σταθμούς, είτε χαμηλά είτε ψηλά. Οι συγκεντρώσεις των ΣΜ στην πόλη ήταν μεγαλύτερες στην ημιφυσική περιοχή του ζωολογικού κήπου. Ως προς την υψομετρική διαβάθμιση, οι συγκεντρώσεις στο επίπεδο κοντά στο έδαφος βρέθηκαν κατά μέσο όρο τέσσερις φορές μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις στον σταθμό ψηλά. Συνεπώς, οι μετρήσεις από συλλέκτη σε μεγάλο ύψος από το έδαφος συνεπάγονται υποεκτίμηση του βαθμού έκθεσης των ανθρώπων στα αερομεταφερόμενα ΣΜ. Για την ακριβέστερη πρόβλεψη της έκθεσης στα σωματίδια αυτά είναι αναγκαία η ποσοτικοποίηση της καθ' ύψους διαβάθμισης των συγκεντρώσεών τους και η εκτίμηση της διασποράς τους εντός του αστικού ιστού.



Εικόνα 1. A) Principal Component Analysis μεταξύ των μέσων ετήσιων συγκεντρώσεων ΣΜ όλων των taxa σε κάθε σταθμό δειγματοληψίας χαμηλά. B) Wilcoxon matched pairs test μεταξύ των συγκεντρώσεων ΣΜ [μετασχηματισμένες με log(x+1)] σε κάθε σταθμό χαμηλά και στον σταθμό ψηλά. Οι τιμές στον σταθμό ψηλά [HUn(1)-(4)] αντιστοιχούν σε διαφορετικά δίωρα, εντός των οποίων έγιναν οι δειγματοληψίες στον εκάστοτε συγκρινόμενο σταθμό χαμηλά.

Ευχαριστίες

Η παρούσα έρευνα συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση Μεταδιδασκτόρων ερευνητών/ερευνητριών - Β΄ Κύκλος» (MIS-5033021), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).

Βιβλιογραφία

Charalampopoulos, A., Lazarina, M., Tsiripidis, I., & Vokou, D. (2018). Quantifying the relationship between airborne pollen and vegetation in the urban environment. *Aerobiologia*, 34, 285–300.

Damialis, A., Vokou, D., Gioulekas, D. & Halley, J.M. (2015). Long-term trends in airborne fungal-spore concentrations: a comparison with pollen. *Fungal Ecology*, 13, 150–156.

Núñez, A., & Moreno, D.A. (2020). The differential vertical distribution of the airborne biological particles reveals an atmospheric reservoir of microbial pathogens and aeroallergens. *Microbial Ecology*, 80, 322–333.

Rojo, J., Oteros, J., Pérez-Badia, R., Cervigón, P., Ferencova, Z., Gutiérrez-Bustillo, A.M., et al. (2019). Near-ground effect of height on pollen exposure. *Environmental Research*, 174, 160-169.

Ziska, L.H. (2020). An overview of rising CO₂ and climatic change on aeroallergens and allergic diseases. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 12, 771-782.

Διερεύνηση μηχανισμού ενδοκυττάρωσης κυτταρικών κυστιδίων απομονωμένων από καρκινικά κύτταρα μαστού

Παρασκευή ΣΩΤΗΡΟΠΟΥΛΟΥ, Αντωνία ΜΑΡΑΖΙΩΤΗ, Σοφία Γ. ΑΝΤΙΜΗΣΙΑΡΗ

Πανεπιστήμιο Πατρών & ΙΤΕ/ΙΕΧΜΗ, up1020509@upnet.gr

Πανεπιστήμιο Πατρών, amarazioti@upatras.gr

Πανεπιστήμιο Πατρών & ΙΤΕ/ΙΕΧΜΗ, santimis@upatras.gr

Περίληψη

Τα λιποσώματα είναι σφαιρικά κυστίδια, αποτελούμενα από λιπίδια και χρησιμοποιούνται ως φορείς φαρμάκων. Τα κυτταρικά κυστίδια (Cell-derived Vesicles- CVs) αποτελούν βιο- εμπνευσμένους φορείς φαρμάκων, καθώς προκύπτουν από την επεξεργασία κυττάρων με φυσικές μεθόδους, διατηρώντας στην επιφάνειά τους τη σύσταση της πλασματικής μεμβράνης των αντίστοιχων κυττάρων. Λόγω αυτού, παρουσιάζουν το φαινόμενο του οργανοτροπισμού και καθιστούν δυνατή τη στόχευση ιστών. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση του μηχανισμού ενδοκυττάρωσης λιποσωμάτων και αυτόλογων κυστιδίων σε 3 καρκινικές σειρές του καρκίνου του μαστού. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η πρόσληψή τους από τα κύτταρα απουσία ή παρουσία αναστολέων των μονοπατιών ενδοκυττάρωσης μέσω κλαθρίνης ή καβεολίνης και μετά από επώαση των κυττάρων στους 4°C, όπου απενεργοποιούνται οι ενεργητικές διαδικασίες. Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η πρόσληψη των κυστιδίων πραγματοποιείται κυρίως ενεργητικά, μέσω του μονοπατιού καβεολίνης, ενώ τα λιποσώματα προσλαμβάνονται από τα κύτταρα ενεργητικά, αλλά και παθητικά, αφού δεν επηρεάζεται η πρόσληψή τους από τους 4°C.

Λέξεις-κλειδιά

λιποσώματα, κυστίδια, καρκίνος μαστού

Εισαγωγή

Τα λιποσώματα είναι κολλοειδή σωματίδια σφαιρικού σχήματος που περιέχουν μία ή περισσότερες διπλοστοιβάδες λιπιδίων που εναλλάσσονται με υδατικά τμήματα. Η διάμετρός τους κυμαίνεται από δεκάδες νανόμετρα ως μικρόμετρα. Χρησιμοποιούνται ως φορείς φαρμάκων λόγω της ικανότητάς τους να ενσωματώνουν βιοδραστικά υδρόφιλα, αμφίφιλα και λιπόφιλα μόρια. Όμως, πρέπει να τροποποιηθούν με κατάλληλους προσδέτες για στοχευμένη δράση (Antimisiaris, Kallinteri & Fatouros 2010).

Η χρήση των κυτταρικών κυστιδίων αποτελεί εναλλακτική στη μεταφορά φαρμάκων με λιποσώματα. Τα κυτταρικά κυστίδια απομονώνονται από κύτταρα με φυσικά μέσα και διατηρούν στην επιφάνειά τους τις μεμβρανικές πρωτεΐνες, βελτιστοποιώντας τη στόχευση ιστών. Μερικά πλεονεκτήματά τους είναι η βιοσυμβατότητα, η μεταφορά φαρμακομορίων, η απλή παραγωγή και η δυνατότητα στόχευσης (Goh et al. 2017β). Τα τελευταία χρόνια έχουν δημοσιευτεί μελέτες σχετικά με τη χρήση τους για μεταφορά αντικαρκινικών φαρμάκων εκλεκτικά στα καρκινικά κύτταρα, ενισχύοντας τη δράση τους και μειώνοντας τις επιδράσεις σε άλλους ιστούς (Goh et al. 2017α).

Η κατανόηση του τρόπου ενδοκυττάρωσης των κυστιδίων είναι σημαντική για την ενίσχυση της στόχευσης και την εξακρίβωση της ενδοκυττάριας δράσης τους (dos Santos et al. 2011). Στην εργασία αυτή, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μηχανισμών ενδοκυττάρωσης 3 τύπων κυστιδίων, παραγόμενα από τις καρκινικές σειρές 4T1, MDA-MB-231 και MCF-7. Οι δύο πρώτες σειρές είναι κύτταρα του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού, προερχόμενες από ποντικό και άνθρωπο αντίστοιχα. Η τρίτη σειρά αφορά καρκινικά κύτταρα του μαστού, αρνητικά μόνο για την πρωτεΐνη HER-2. Μελετήθηκε η επίδραση που έχει στην πρόσληψη σημασμένων με FITC κυστιδίων η επώαση των κυττάρων με αναστολείς της κλαθρίνης και καβεολίνης, χλωροπρομαζίνη και φιλιπίνη αντίστοιχα, και η διατήρηση των κυττάρων στους 4°C κατά τη διάρκεια του πειράματος. Στις ίδιες κυτταρικές σειρές και συνθήκες μελετήθηκε και η πρόσληψη λιποσωμάτων.

Μέθοδοι

Κυτταρικές σειρές και συνθήκες καλλιέργειας

4T1, MDA-MB-231 και MCF-7 σειρές καλλιεργήθηκαν σε RPMI 1640 (Gibco®), εμπλουτισμένο με 10% FBS και 1% διάλυμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης στους 37°C και 5% CO₂. Η ανακαλλιέργειά τους έγινε με πλύση με PBS και προσθήκη 0,25% Trypsin (Biowest).

Παραγωγή λιποσωμάτων

Λιποσώματα σύστασης PC(φωσφατιδυλοχολίνη):PG(φωσφατιδυλγλυκερόλη):CHOL (χοληστερόλη) 9:1:5 παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο λεπτού υμενίου, ενυδατώθηκαν με 10% PBS και αφέθηκαν σε ακίδα υπερήχων.

Απομόνωση κυτταρικών κυστιδίων

Τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από φλάσκες με τη χρήση τρυψίνης, συλλέχθηκαν, πλύθηκαν 3 φορές με PBS και επαναιωρήθηκαν σε απεσταγμένο νερό. Ακολούθησε υπερφυγοκέντρωση για 2hr, επαναιώρηση σε 10% PBS και extrusion από μεμβράνες 400 και 200nm. Μετρήθηκε η πρωτεϊνική συγκέντρωση με τη μέθοδο Bradford και η λιπιδική με τη μέθοδο Stewart.

Ενσωμάτωση FITC

Σε 1mg/mL λιπιδικής συγκέντρωσης λιποσωμάτων ή κυστιδίων προστέθηκε διάλυμα της φθορίζουσας ουσίας FITC και το μίγμα λυοφιλοποιήθηκε. Στη συνέχεια, η κόνις ενυδατώθηκε και υπερφυγοκεντρήθηκε για 2hr. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε PBS και πραγματοποιήθηκε extrusion από μεμβράνες 400 και 200nm.

Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός

Το μέγεθος, ο δείκτης πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό μετρήθηκαν σε συσκευή Dynamic Light Scattering στους 25°C και 173°. Για την μέτρηση, κάθε δείγμα αραιώθηκε με PBS μέχρι συγκέντρωσης λιπιδίου 0,4mg/mL.

Μελέτη κυτταρικής πρόσληψης

Κύτταρα (1×10^5 cells/mL) από τις 3 κυτταρικές σειρές επιστρώθηκαν σε 6-well-plates. Την επόμενη ημέρα, τα 2 wells χρησιμοποιήθηκαν ως αναφορά, στα 2 προστέθηκε διάλυμα χλωροπρομαζίνης 30min πριν την προσθήκη του δείγματος και στα άλλα 2 προστέθηκε στον ίδιο χρόνο διάλυμα φιλιπίνης. Άλλο 6-well τοποθετήθηκε 30min πριν το πείραμα στους 4°C. Ποσότητα λιποσωμάτων ή αυτόλογων κυστιδίων σημασμένων με FITC προστέθηκε στα wells και αφέθηκαν για 2hr, τα πρώτα στους 37°C και τα δεύτερα στους 4°C. Τελικά, τα wells πλύθηκαν 3 φορές με PBS, σε αυτά προστέθηκε 20% Triton και συλλέχθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Η πρόσληψη μετρήθηκε με φθορισμομετρία στα 490-520nm και η συγκέντρωση πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.

Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα της πρόσληψης έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά για τα κυστίδια με τη χρήση των αναστολέων, με τη μεγαλύτερη μείωση να παρατηρείται με την φιλιπίνη. Στους 4°C παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της πρόσληψης, που υποδεικνύει απουσία παθητικού μηχανισμού. Στα λιποσώματα δεν παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της πρόσληψης στους 4°C.

Συμπεράσματα

Η πρόσληψη των κυστιδίων 4T1, MDA-MB-231 και MCF-7 σε αυτόλογα κύτταρα πραγματοποιείται κυρίως μέσω του μονοπατιού καβεολίνης, δηλαδή ενεργητικά. Η πρόσληψη λιποσωμάτων στις ίδιες κυτταρικές σειρές πραγματοποιείται ενεργητικά μέσω και των δύο μηχανισμών αλλά και παθητικά.

Βιβλιογραφία

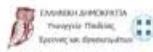
- Antimisiaris, S.G., Kallinteri, P. & Fatouros, D.G. (2010). Liposomes and Drug Delivery. *Pharmaceutical Sciences Encyclopedia: Drug Discovery, Development, and Manufacturing*, 1-91.
- dos Santos, T., Varela, J., Lynch, I., Salvati, A. & Dawson, K. (2011). Effects of Transport Inhibitors

on the Cellular Uptake of Carboxylated Polystyrene Nanoparticles in Different Cell Lines. *PLoS ONE*, 6(9), e24438.

Goh, W.J., Lee, C.K., Zou, S., Woon, E.C., Czarny, B. & Pastorin, G. (2017α). Doxorubicin-loaded cell-derived nanovesicles: an alternative targeted approach for anti-tumor therapy. *Int J Nanomedicine*, 12, 2759-2767.

Goh, W.J., Zou, S., Ong, W.Y., Torta, F., Alexandra, A.F., Schiffelers, R.M., Storm, G., Wang, J.W., Czarny, B. & Pastorin, G. (2017β). Bioinspired Cell-Derived Nanovesicles *versus* Exosomes as Drug Delivery Systems: a Cost-Effective Alternative. *Sci Rep*, 7, 14322.

Η εργασία υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Δράσης ΕΡΕΥΝΩ-ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ-ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ που συγχρηματοδοτήθηκε από το Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης (ΕΤΠΑ) της Ευρωπαϊκής Ένωσης και εθνικούς πόρους μέσω του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα & Καινοτομία (ΕΠΑνΕΚ) (κωδικός πράξης: MIS5031802).



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Ταυτοποίηση εντομοπαθογόνων μυκήτων από περιοχές περιαστικού πράσινου της πόλης της Πάτρας του Νομού Αχαΐας

Ιωάννης ΛΑΓΩΓΙΑΝΝΗΣ¹, Αριστείδης ΝΤΟΥΚΑΣ¹, Αντωνία ΦΟΥΡΤΟΥΝΗ², Σπυρίδων ΜΑΝΤΖΟΥΚΑΣ^{1*} και Κωνσταντίνος ΠΟΥΛΑΣ^{1*}

¹Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Ανοσολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πανεπιστημιούπολη Ρίου, τ.κ. 26500 kroulas@upatras.gr, mantzoukas@upatras.gr

²Δήμος Πατρέων, Δ/ση Τοπικής Οικονομίας, Τμήμα Γεωργικής Ανάπτυξης, Μαιζώνος 147, Τ.Κ. 26110 afoutrouni@patras.gr

Περίληψη

Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες αποτελούν μια κατηγορία οργανισμών με μεγάλη αξία στον τομέα των εντομοκτόνων, καθώς ορισμένοι από αυτούς επιδρούν σημαντικά έναντι επιβλαβών εντόμων. Η κατανομή τους σε μια περιοχή εξαρτάται από παράγοντες όπως το έδαφος, η χλωρίδα της περιοχής και τα έντομα-δολώματα. Στην παρούσα εργασία, ελήφθησαν δείγματα εδάφους από τις περιοχές Δασύλλιο και Έλος (Αγυιά) της Πάτρας (νομός Αχαΐας). Με τη χρήση εντόμων-δολωμάτων απομονώθηκαν ένας μεγάλος αριθμός εντομοπαθογόνων μυκήτων και καλλιεργήθηκαν σε κατάλληλο στερεό θρεπτικό υλικό. Εξετάστηκαν τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά σε μικροσκοπικό, αλλά και σε μακροσκοπικό επίπεδο για την ταυτοποίηση του είδους, ενώ ακολούθησε απομόνωση γενετικού υλικού και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για περαιτέρω έλεγχο. Η παρούσα μελέτη συμβάλλει στην κατανόηση της ποικιλομορφίας των εντομοπαθογόνων μυκήτων, οι οποίοι είναι μεγάλης οικονομικής σημασίας για την Βιολογική γεωργία.

Λέξεις – Κλειδιά

Εντομοπαθογόνοι μύκητες, απομόνωση, ταυτοποίηση

Εισαγωγή

Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες (EPF) είναι μία από την κατηγορίες των φυσικών εχθρών των επιβλαβών εντόμων. Περισσότερα από 800 είδη παθογόνων μυκήτων έχουν απομονωθεί από έντομα, εκ των οποίων τουλάχιστον 12 έχουν αξιοποιηθεί ως εντομοκτόνα (Lacey et al, 2015). Η παρουσία των εντομοπαθογόνων μυκήτων επηρεάζεται τόσο από το είδος του εδάφους καθώς και/ή από το έντομο-δολώμα που χρησιμοποιείται (Mantzoukas et al, 2020). Πρόκειται για μια μέθοδο με αποκλειστική χρήση στην απομόνωση εντομοπαθογόνων μυκήτων από εδάφη (Mantzoukas, Pettas & Lagogiannis, 2020). Τα δείγματα εδάφους που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της ποικιλομορφίας των εντομοπαθογόνων μυκήτων, προέρχονται από το Δασύλλιο και το Έλος (Αγυιά) της Πάτρας (νομός Αχαΐας) χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικά είδη εντόμων ως δολώμα (εργαστήριο ΕΜΒΙΑ). Για την προς μελέτη απομόνωση εντομοπαθογόνων μυκήτων, εξετάστηκαν 184 τυχαία δείγματα εδάφους με τη μέθοδο δολώματος εντόμου (galleria bait method) χρησιμοποιώντας δύο κολεόπτερα: *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae) και *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). Τα σημεία δειγματοληψίας καταγράφηκαν με χρήση συσκευής GPS (Google Maps) και χρησιμοποιώντας γεωγραφικά πληροφοριακά συστήματα (GIS).

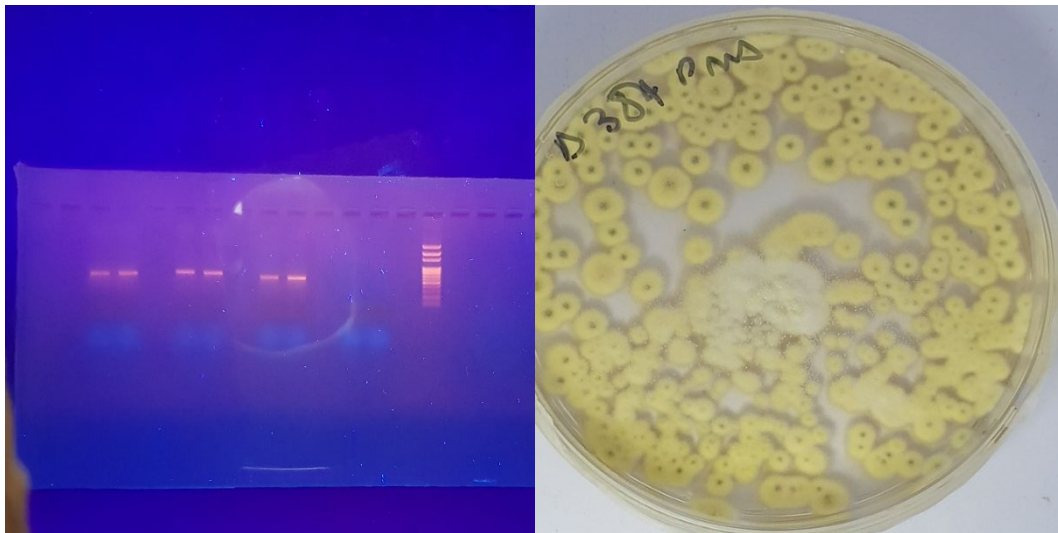
Μέθοδοι

Το κάθε δείγμα περιείχε 300 g χώματος και προήλθε από βάθος 10 cm. Δέκα (10) νεαρά ενήλικα από κάθε ένα από τα δύο έντομα, *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae) και *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). Τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένο τρυβλίο Petri που περιείχε κατάλληλα προετοιμασμένο χώμα (10 g) από τις θέσεις δειγματοληψίας και επαναλήφθηκε δέκα φορές. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου 25±10 °C και αναποδογυρίζονταν για να μπορούν τα νεαρά ενήλικα να κινούνται μέσα στα δείγματα. Μετρήσεις έλαβαν χώρα κάθε επτά ημέρες για το έλεγχο της θνησιμότητας. Οι μετρήσεις διήρκεσαν είκοσι οκτώ ημέρες. Τα νεκρά ενήλικα απομακρύνθηκαν και αποστειρώθηκαν σε 1% χλωριούχο νάτριο για μερικά δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε πλαστικά αποστειρωμένα τρυβλία τύπου Petri που είχαν πολύ υγρασία (διηθητικό χαρτί + αποστειρωμένο νερό) για να επιταχυνθεί η σπορογένεση. Μετά από 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου

25±10 °C, υπό συνθήκες νηματικής ροής, ελήφθησαν δείγματα από τα ενήλικα που παρουσίασαν συμπτώματα εντομοπαθογόνου μύκητα και τα τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri με υπόστρωμα Sabouraud Dextrose Agar (SDA). Έπειτα, τα τρυβλία αυτά, τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 25±10 °C και 75±5% σχετική υγρασία. Παρέμειναν σε αυτές τις συνθήκες για 15 ημέρες περίπου τα ¾ της επιφάνειας του τρυβλίου μα καλυφθούν από το μυκήλιο και τα σπόρια του μύκητα. Όλοι οι πιθανά εντομοπαθογόνοι μύκητες εξεταστήκαν μικροσκοπικά, για να επιβεβαιώσουμε το είδος βάση του σχήματος και του μεγέθους των σπορίων. Ακολούθησε απομόνωση γενετικού υλικού και μοριακή ταυτοποίηση με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), με την ενίσχυση των ITS rDNA περιοχών. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

Αποτελέσματα

Ένας μεγάλος αριθμός εντομοπαθογόνων μυκήτων διαφόρων μορφολογικών χαρακτηριστικών έχει απομονωθεί. Τα πιο συχνά απομονωμένα εντομοπαθογόνα είδη μυκήτων ήταν τα *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) (Bals.-Criv.) Vuill και *Metarhizium* sp. (Hypocreales: Clavicipitaceae). Αυτό αποτυπώθηκε τόσο από τη μελέτη της μορφολογίας τους όσο από την περιοχή του γενετικού τους υλικού, η οποία ενισχύθηκε με PCR. Η περιοχή αυτή δίνει μια ζώνη, που αντιστοιχεί σε ~600 bp (Εικ.1).



Εικόνα 2. Αριστερά: Πήκτωμα αγαρόζης μετά από ηλεκτροφόρηση στο οποίο παρατηρούνται οι ζώνες των ενισχυμένων με PCR περιοχών από τρία δείγματα μυκήτων. Πραγματοποιήθηκαν δύο PCR για κάθε δείγμα.

Δεξιά: Ανάπτυξη εντομοπαθογόνου μύκητα σε υπόστρωμα SDA (Δασύλλιο δείγμα εδάφους 1, *Sitophilus zeamais*)

Συζήτηση - Συμπεράσματα

Βασικός σκοπός της εργασίας είναι η επέκταση της τεχνικής παγίδευσης (εντομοπαθογόνων μυκήτων μέσω δολώματος-εντόμων), ενισχύοντας τις χρήσεις που υπήρχαν μέχρι σήμερα. Επίσης γίνεται προσπάθεια για μία σαφέστερη κατανόηση της ποικιλομορφίας αυτής της σημαντικής ομάδας των εντομοπαθογόνων μυκήτων και να επισημάνουμε τα κενά στις γνώσεις μας και να παρακινήσουμε άλλες μελέτες. Οι αιτίες και τα αποτελέσματα της δράσης εντομοπαθογόνων μυκήτων είναι μεγάλης οικονομικής σημασίας για την Βιολογική γεωργία όπου η χρήση εντομοπαθογόνων μυκήτων θα μπορέσει να αποτελέσει την βάση των γενικών αρχών του Βιολογικού Ελέγχου.

Βιβλιογραφία

- Lacey, L. A. 'et al., (2015). Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *J Invertebr Pathol*, 132, 1–41.
- Mantzoukas, S. et al., (2020). Trapping entomopathogenic fungi from vine terroir soil samples with

insect baits for controlling serious pests. *Appl Sci*, 10, 1–11.

Mantzoukas, S.; Pettas, I. & Lagogiannis, I. (2020). Stored product pests as models for trapping entomopathogenic fungi from olive tree orchards in Western Greece. *J Stored Prod Res*, 87, 101584.

Χαρακτηρισμός πιθανών προβιοτικών μικροοργανισμών και διερεύνηση της παθογένειας δυνητικά παθογόνων μικροοργανισμών στο εδώδιμο χερσαίο σαλιγκάρι *Cornu aspersum* (Müller, 1774)

ΧΑΡΙΖΑΝΗ Ελισσάβετ¹, ΜΙΧΑΗΛ Σωτηρούλλα¹, ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ Χρήστος¹, ΚΥΡΙΤΣΗ Μαρία¹, ΚΟΤΖΑΜΑΝΙΔΗΣ Χαράλαμπος¹ ΣΤΑΙΚΟΥ Αλεξάνδρα¹, ΓΙΑΓΚΟΥ Μηνάς¹

1. Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Α.Π.Θ.

2. Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Α.Π.Θ.

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται αποτελέσματα που αφορούν τον χαρακτηρισμό πιθανών προβιοτικών και την διερεύνηση της παθογένειας δυνητικά παθογόνων που σχετίζονται με καταστάσεις δυσβίωσης, παθογένειας και πλήττουν το ανοσοποιητικό σύστημα στο χερσαίο σαλιγκάρι *Cornu aspersum*. Πιθανά προβιοτικά στελέχη που έχουν απομονωθεί από τον εντερικό βλεννογόνο σαλιγκαριών χαρακτηρίστηκαν ως *Lactobacillus plantarum*. Ακολούθως, διερευνήθηκε η παθογένεια των βακτηριακών στελεχών *Listeria* και *Pseudomonas*, που απομονώθηκαν από νοσούντα σαλιγκάρια *Cornu aspersum* από το Ινστιτούτο κτηνιατρικών ερευνών του ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκαν η ικανότητα διέλευσης των στελεχών αυτών στο γατρεντερικό σωλήνα των σαλιγκαριών, η παθογένεια τους καθώς και διάφοροι ανοσολογικοί παράγοντες. Επίσης, ακολούθησε διερεύνηση της αντιβακτηριακής και ανοσοτροποποιητικής δράσης των προβιοτικών καθώς και η αυξομείωση των ανοσολογικών παραγόντων έπειτα από χορήγηση τους σε σαλιγκάρια. Καταλήγοντας, υποδηλώνονται περίπλοκες σχέσεις μεταξύ των ανοσολογικών καταρρακτών, ωστόσο υπάρχει ένδειξη ότι οι πιθανοί προβιοτικοί μικροοργανισμοί θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την καταπολέμηση αυτών των παθογόνων.

Λέξεις Κλειδιά

Cornu aspersum, προβιοτικά, έμφυτη άμυνα, παθογόνα σαλιγκαριών

Εισαγωγή

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος κατέχει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση και ενίσχυση της ομοιόστασης του εντέρου. Η χορήγηση προβιοτικών, ζωντανών μικροοργανισμών που σε κατάλληλες ποσότητες προάγουν υγεία του ξενιστή, αποτελεί στρατηγική θεραπείας και βελτιωμένης παραγωγής σε ζώα εκτροφής καθώς συμβάλλει στην αύξηση του ρυθμού αύξησης και στη μείωση της θνησιμότητας. Ωστόσο, μέχρι σήμερα υπάρχει περιορισμένη πληροφορία για τη σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας και τη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος και των προβιοτικών στα ασπόνδυλα ζώα.

Οι πιο σημαντικοί μηχανισμοί όπου τα προβιοτικά ασκούν ευεργετικά αποτελέσματα περιλαμβάνουν την διαφοροποίηση της μικροχλωρίδας του εντέρου και την ανοσολογική ρύθμιση. Τα προβιοτικά συμβάλλουν στη μείωση παραγωγής τοξικών προϊόντων στο έντερο και στη ρύθμιση των εντερικών ανοσολογικών αποκρίσεων (Canesi et al., 2002). Τα ασπόνδυλα δεν διαθέτουν επίκτητη ανοσία έτσι δεν έχουν την ικανότητα παραγωγής κυττάρων μνήμης και το ανοσοποιητικό τους δεν χαρακτηρίζεται ούτε από προσαρμογή αλλά ούτε από εξειδίκευση. Αντίθετα, έχουν καλά ανεπτυγμένη έμφυτη ανοσία (Decker & Jaenicke, 2004). Η πρώτη γραμμή άμυνας των σαλιγκαριών αποτελείται από το κέλυφος και η βλέννα που λειτουργούν ως φυσικοί φραγμοί, ενώ η δεύτερη γραμμή είναι οι εσωτερικοί ιστοί που αποκρίνονται με μηχανισμούς όπως η χυμική και η κυτταρική απόκριση (Aladaileh et al., 2007).

Υλικά-Μέθοδοι

Πειραματόζωα-Μικροοργανισμοί

Χρησιμοποιήθηκαν σαλιγκάρια *Cornu aspersum* (Müller, 1774) ενώ, τα βακτηριακά στελέχη ήταν τα παθογόνα στελέχη, *Listeria monocytogenes* (SN1), *Listeria monocytogenes* (SN3), *Pseudomonas fragi* 6, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* 8 και *Pseudomonas fragi* 9 και τα πιθανά προβιοτικά στελέχη τα οποία απομονώθηκαν από το έντερο σαλιγκαριών am11, am19, D7, 13AMP και 20A.

Χαρακτηρισμός προβιοτικών, αντιμικροβιακή και ανοσοτροποποιητική δράση

Πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός των προβιοτικών με την μέθοδο αλληλούχισης 16S rRNA, ενώ διερευνήθηκε η αντιμικροβιακή τους δράση με τη μέθοδο διάχυσης δισκίων Whatman. Η ανοσοτροποποιητική τους δράση ελέγχθηκε έπειτα από χορήγηση τους στο σώμα του ξενιστή.

Διερεύνηση της αντοχής και παθογένειας των δυνητικά παθογόνων

Αναμείχθηκαν εξωτερική ή γαστρική βλέννα σαλιγκαριών με καλλιέργειες παθογόνων, για την διερεύνηση της επιβίωσης τους. Η παθογένεια τους προσδιορίστηκε έπειτα από χορήγηση τους στα σαλιγκάρια και ακολούθησε καταγραφή θνησιμότητας καθώς και μέτρηση κυττάρων της αιμολέμφου και φαγοκυττάρωσης.

Ανοσολογικοί παράγοντες

Η φαινολοξειδάση και τα νιτρικά προσδιορίστηκαν έπειτα από χορήγηση των παθογόνων μικροοργανισμών ή των προβιοτικών στο σώμα των σαλιγκαριών.

Αποτελέσματα

Τα προβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν, χαρακτηρίστηκαν ως *Lactobacillus plantarum* και παρουσίασαν αντιβακτηριακή δράση έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών. Τα παραπάνω στελέχη διερευνήθηκαν για την ανοσοτροποποιητική τους δράση εμφανίζοντας αύξηση τόσο στη συσσώρευση διαφόρων κυττάρων της αιμολέμφου όσο και στη φαγοκυττάρωση. Τα στελέχη *Listeria* και *Pseudomonas* είναι ικανά να διαπεράσουν τόσο τον φραγμό της εξωτερικής όσο και της γαστρικής βλέννας των σαλιγκαριών. Επίσης, εμφάνισαν υψηλή θνησιμότητα με τα παθογόνα *Listeria* να προκαλούν πάνω από 80% θνησιμότητα τη δεύτερη κιάλας ημέρα. Παράλληλα, τα επίπεδα χημειόταξης παρατηρούνται αυξημένα στα παθογόνα στελέχη δηλώνοντας την ισχυρή ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού λόγω μόλυνσης. Αντίθετα, η φαγοκυττάρωση των κυττάρων της αιμολέμφου παραμένει μειωμένη στα περισσότερα. Η δραστηριότητα της φαινολοξειδάσης παρουσιάζει σημαντική αύξηση στην περίπτωση του SN3 καθώς και σε δύο από τα στελέχη *Pseudomonas*. Τέλος, η συγκέντρωση νιτρικών έχει αυξηθεί στις περιπτώσεις των SN3, D7 και am11.

Συζήτηση

Η διερεύνηση των πιθανών προβιοτικών μικροοργανισμών προσφέρει μια ένδειξη ότι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την καταπολέμηση των παθογόνων καθώς εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση έναντι των παθογόνων και ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα των σαλιγκαριών, εμφανίζοντας ανοσοτροποποιητική δράση. Αντίθετα, ενώ παρατηρείται υψηλή χημειόταξη έπειτα από τη χορήγηση των παθογόνων η φαγοκυττάρωση κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα για τα περισσότερα, φαινόμενο το οποίο μπορεί να οφείλεται στην εμπόδιση της φαγοκυττάρωσης από τα παθογόνα βακτήρια τα οποία παρατηρείται ότι εισέρχονται στα φαγοκύτταρα και σταματούν τη δράση τους. Όσον αφορά την δραστηριότητα της φαινολοξειδάσης η αύξηση της μπορεί να οφείλεται στην ισχυρή ανοσοποίηση του οργανισμού οδηγώντας στην υψηλή παραγωγή της για την καταπολέμηση των παθογόνων που εισήλθαν στον ξενιστή. Ενώ, η μειωμένη δραστηριότητα της μπορεί να οφείλεται στο ότι χρησιμοποιείται πολύ περισσότερο από ότι παράγεται ώστε να καταπολεμήσει το αντιγόνο (Decker & Jaenicke, 2004). Τέλος, η αύξηση της συγκέντρωσης των νιτρικών είτε λόγω χορήγησης παθογόνων είτε προβιοτικών μπορεί να ενεργοποιήθηκε από διαφορετικά μονοπάτια που είτε οδηγούν σε κυτταρική απόπτωση λόγω στρες και παρατηρούνται υψηλά ποσοστά θνησιμότητας, είτε οδηγούν σε προστασία του ξενιστή λόγω ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού και προστασίας του από άλλους μικροοργανισμούς αντίστοιχα. Συμπερασματικά, τα ευρήματα αυτής της εργασίας υποδεικνύουν περίπλοκες σχέσεις μεταξύ των ανοσολογικών παραγόντων που επάγουν το ανοσοποιητικό σύστημα καθώς εμφανίζουν αυξομειώσεις ανάλογα με τον μικροοργανισμό. Γι' αυτό το λόγο απαιτούνται περισσότερες μελέτες για τους διάφορους καταρράκτες ενεργοποίησης αυτών των ανοσολογικών παραμέτρων.

Βιβλιογραφία

- Aladaileh, S., Nair, S. V., Birch, D., & Raftos, D. A. (2007). Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: morphology and function. *Journal of invertebrate pathology*, 96(1), 48-63.
- Decker, H., & Jaenicke, E. (2004). Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial

activity of hemocyanins. *Developmental and comparative immunology*, 7(28), 673-687.

Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M., & Pruzzo, C. (2002). Bacteria–hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microscopy research and technique*, 57(6), 469-476.

Ακίνητοποίηση του βακτηριακού στελέχους S3/K σε φυσικά υποστρώματα με στόχο την αναγωγή υψηλών συγκεντρώσεων Cr(VI)

Αγγελική ΔΑΙΟΥ*, Νικολέττα ΧΡΙΣΤΟΥΔΙΑ*, Δήμητρα ΣΑΚΟΥΛΑ, Ζαχαρίας ΣΚΟΥΡΑΣ, Μηνάς ΓΙΑΓΚΟΥ

Α.Π.Θ., Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, angeldaiou@bio.auth.gr, cnikolet@bio.auth.gr, scouras@bio.auth.gr, yangou@bio.auth.gr,

* Ισάξια συνεισφορά

Περίληψη

Η ικανότητα των βακτηριακών κυττάρων να ακίνητοποιούνται σε υποστρώματα έχει δημιουργήσει νέες προοπτικές στον τομέα της διαχείρισης και βιοαπορρύπανσης βιομηχανικών λυμάτων επιβαρυσμένων με εξασθενές χρώμιο Cr(VI). Σε προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου μας απομονώθηκε το βακτηριακό στέλεχος *Acinetobacter radioresistens* S3/K, το οποίο έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται και να ανάγει υψηλές συγκεντρώσεις Cr(VI). Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η ικανότητα του μικροοργανισμού να ακίνητοποιείται σε διατάξεις μικρής και μεγάλης κλίμακας, αποτελούμενες από διάφορα πληρωτικά υλικά, τόσο φυσικά (πούδρα ξύλου *Populus alba*, ρινίσματα σιδήρου, κυτταρίνη και λιγνίνη) όσο και συνθετικά υλικά (πολυστερένιο, υαλοβάμβακας και ψιλό σύρμα) καθώς και νανοϋλικά (υπερ-παραμαγνητικά νανοσωματίδια τριοξειδίου του σιδήρου), με στόχο την αποτελεσματικότερη αναγωγή υψηλών συγκεντρώσεων Cr(VI). Ως αποδοτικότερες χαρακτηρίστηκαν οι διατάξεις που αποτελούνταν από πούδρα ξύλου *Populus alba* και ρινίσματα σιδήρου καθώς ενίσχυσαν τόσο το ρυθμό ανάπτυξης του στελέχους S3/K όσο και την ικανότητα του να ανέχεται αλλά και να ανάγει συγκεντρώσεις χρωμίου έως 1750 mg/L.

Λέξεις-κλειδιά

Acinetobacter radioresistens, χρώμιο, αποτοξικοποίηση, βιοαπορρύπανση

Εισαγωγή

Το εξασθενές χρώμιο αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους ρυπαντές του φυσικού περιβάλλοντος (Jiang et al., 2019). Γι' αυτό, τα τελευταία χρόνια υπάρχει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον για τη βιολογική αποτοξικοποίησή του με τη μεσολάβηση μικροοργανισμών ικανών να ανάγουν το εξασθενές Cr(VI) στο λιγότερο τοξικό τρισθενές χρώμιο Cr(III) (Jobby et al., 2018). Σε προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου μας, απομονώθηκε το βακτηριακό στέλεχος *Acinetobacter radioresistens* S3/K από την ενεργό ιλύ μονάδας επεξεργασίας αστικών λυμάτων της Καστοριάς. Το στέλεχος S3/K χαρακτηρίστηκε από αυξημένη ικανότητα να ανέχεται και να ανάγει υψηλές συγκεντρώσεις Cr(VI). Η ικανότητα αυτή συσχετίστηκε τόσο με μηχανισμούς ανθεκτικότητας στο Cr(VI) όσο και αποτοξικοποίησής του, συμπεριλαμβανομένου της παραγωγής ενζύμων που ανάγουν το Cr(VI) σε Cr(III) και μηχανισμών εξωκυτταρικής μεταφοράς του χρωμίου. Η ακίνητοποίηση βακτηριακών κυττάρων ικανών να ανάγουν το εξασθενές χρώμιο σε φυσικά ή συνθετικά υποστρώματα (π.χ. φλοιός ξύλου, άγαρ, πολυακρυλαμίδη) έχει εγείρει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς φαίνεται να αποτελεί την πιο ασφαλή και οικονομική λύση για την απομάκρυνση τοξικών μετάλλων από επιβαρυσμένα βιομηχανικά απόβλητα μέσω βιολογικών διεργασιών (Arshad et al., 2017).

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η ακίνητοποίηση των κυττάρων του βακτηριακού στελέχους S3/K σε λειτουργικές διατάξεις (στήλες) εργαστηριακής κλίμακας, μικρού αλλά και μεγάλου όγκου, χρησιμοποιώντας φυσικά υλικά, συνθετικά πολυμερή καθώς και νανοϋλικά, με στόχο την αναγωγή ιδιαίτερα υψηλών συγκεντρώσεων Cr(VI). Επιπλέον, διερευνήθηκε ο ρόλος διαφορετικών πηγών σιδήρου στην ανάπτυξη του στελέχους S3/K και στη διαδικασία της αναγωγής.

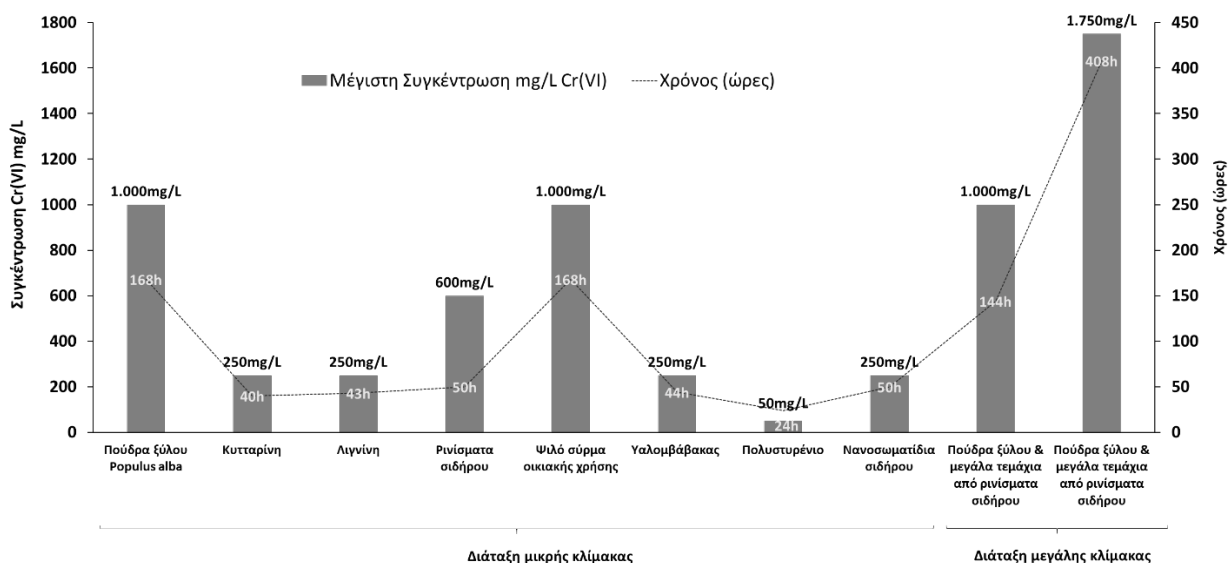
Μεθοδολογία

Για την κατασκευή στήλης εργαστηριακής κλίμακας μικρού όγκου χρησιμοποιήθηκαν πλαστικές σύριγγες των 60mL, ενώ για τις στήλες μεγάλου όγκου κατασκευάστηκαν ειδικές κυλινδρικές διατάξεις από Plexiglass όγκου 5L. Ως πληρωτικά υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν φυσικά υλικά όπως α)

πούδρα ξύλου *Populus alba* καθώς και τα επιμέρους συστατικά του ξύλου β) κυτταρίνη και γ) λιγνίνη, υποστρώματα πλούσια σε σίδηρο όπως δ) ρινίσματα σιδήρου, συνθετικά υλικά όπως ε) πολυστυρένιο, στ) υαλοβάμβακα και ζ) ψιλό σύρμα οικιακής χρήσης καθώς και νανοϋλικά όπως θ) τα υπερ-παραμαγνητικά νανοσωματίδια τριοξειδίου του σιδήρου διατεταγμένα σε ισχυρό μαγνητικό πεδίο. Στις στήλες προστέθηκε θρεπτικό υλικό (συνθετικό λύμα παρουσία ή απουσία $FeCl_3$) με συγκέντρωση $Cr(VI)$ από 0 mg/L έως και 1750 mg/L καθώς και καλλιέργεια του στελέχους S3/K (5×10^9 CFU). Σε τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνονταν δείγματα για τον προσδιορισμό της ανάπτυξης του στελέχους και της αναγωγής του $Cr(VI)$ με τη μέθοδο του 1,5-διφαινυλκαρβαζιδίου (Liu, Leng and Lin, 2016).

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι η ακινητοποίηση των βακτηριακών κυττάρων του στελέχους S3/K σε πληρωτικά υποστρώματα αυξάνει την ικανότητα του να ανέχεται και να ανάγει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις $Cr(VI)$ (>1.000 mg/L), συγκριτικά με προηγούμενα αποτελέσματα, όπου η χρησιμοποίηση ελεύθερων κυττάρων οδηγούσε στην αναγωγή έως 125 mg/L $Cr(VI)$. Στις στήλες μικρής κλίμακας, οι οποίες αποτελούνταν από πούδρα ξύλου *Populus alba*, ρινίσματα σιδήρου ή ψιλό σύρμα οικιακής χρήσης, το στέλεχος S3/K μπορούσε να ανάγει έως 1000 mg/L $Cr(VI)$ σε χρονικό διάστημα 168 ωρών (Εικόνα 1). Αντίθετα, συνθετικά υποστρώματα όπως το πολυστυρένιο, ο υαλοβάμβακας, τα υπερ-παραμαγνητικά νανοσωματίδια, καθώς και τα επιμέρους συστατικά του ξύλου όπως η κυτταρίνη και η λιγνίνη φαίνονται λιγότερο αποδοτικά καθώς οδηγούσαν στην αναγωγή έως 250 mg/L $Cr(VI)$ (Εικόνα 1). Η αυξημένη αναγωγική ικανότητα του μικροοργανισμού παρουσία πούδρας ξύλου, ρινισμάτων σιδήρου και ψιλού σύρματος οικιακής χρήσης συσχετίστηκε με i) την ικανότητα των συστατικών του ξύλου και του σιδήρου να απορροφούν ποσότητα χρωμίου (λιγνίνη-30 mg/L $Cr(VI)$, σίδηρος-100 mg/L $Cr(VI)$) και να επιταχύνουν την αναγωγική διαδικασία καθώς και ii) την ευεργετική επίδραση των ιόντων σιδήρου $FeCl_3$ στην ανάπτυξη του στελέχους S3/K, καθώς παρατηρήθηκε αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης του στελέχους S3/K και επιτάχυνση του ρυθμού αναγωγής $Cr(VI)$ για αυξανόμενες συγκεντρώσεις $FeCl_3$ έως 500 mg/L. Η χρήση μείγματος πούδρας ξύλου *Populus alba* και ρινισμάτων σιδήρου, ως πληρωτικά μέσα στη διάταξη μεγάλης κλίμακας, απέδειξε τη συνδυαστική δράση των δύο αυτών υλικών στην ενίσχυση της αναγωγικής ικανότητας του στελέχους S3/K καθώς παρατηρήθηκε αύξηση του ρυθμού αναγωγής και αναγωγή συγκεντρώσεων έως 1750 mg/L. Συμπερασματικά, η ικανότητα του στελέχους S3/K να ακινητοποιείται σε πληρωτικά υποστρώματα και να ανάγει ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις $Cr(VI)$ χρίζει περαιτέρω διερεύνησης καθώς μπορεί να αποτελέσει ιδανικό μέσο για τη βιολογική διαχείριση και βιοαπορρύπανση λυμάτων επιβαρυσμένων με $Cr(VI)$.



Εικόνα 1. Μέγιστη συγκέντρωση $Cr(VI)$ που ανάγει το βακτηριακό 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.

Συμβίωση και δυσβίωση στον εντερικό βλεννογόνο των σαλιγκαριών-Αναβίωση με τη χορήγηση πιθανών προβιοτικών μικροοργανισμών.

Εσμεράλντα ΝΤΟΥΣΚΟΥ*, Χαράλαμπος ΚΟΤΖΑΜΑΝΙΔΗΣ*, Καλοδότη ΑΥΓΟΥΣΤΗ¹, Αργυρώ ΚΑΡΑΘΟΔΩΡΟΥ¹, Κυριακή ΜΠΙΛΙΟΥΡΗ¹, Άννα ΣΠΥΡΟΠΟΥΛΟΥ¹, Αλεξάνδρα ΝΤΑΓΚΑ¹, Αντώνιος ΖΔΡΑΓΑΣ², Γεώργιος ΒΑΦΕΑΣ, Βιργινία ΓΙΑΝΤΖΗ², Αλεξάνδρα ΣΤΑΙΚΟΥ³, Μηνάς ΓΙΑΓΚΟΥ¹

1) Α.Π.Θ., Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας

2) Ελληνικός Γεωργικός Οργανισμός ΔΗΜΗΤΡΑ, Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών

3) Α.Π.Θ., Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Ζωολογίας,

nesmeral@bio.auth.gr, kotzam@vri.gr, kavgousti@bio.auth.gr, argykara@bio.auth.gr, kmpiliou@bio.auth.gr, anndimspy@bio.auth.gr, alexntag@bio.auth.gr, zdragas@vri.gr, vafeas@vri.gr, vgiantzi@vri.gr, astaikou@bio.auth.gr, viangou@bio.auth.gr

* Ισάξια συνεισφορά

Περίληψη

Στη παρούσα ερευνητική εργασία απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά δυνητικοί παθογόνοι μικροοργανισμοί του είδους *Listeria monocytogenes* από εδώδιμα σαλιγκάρια *Cornu aspersum maxima*. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της εντερικής μικροχλωρίδας και των έμφυτων μηχανισμών άμυνας των σαλιγκαριών σε καταστάσεις ‘συμβίωσης’ και ‘δυσβίωσης’, καθώς και η διερεύνηση της ικανότητας προβιοτικών στελεχών των σαλιγκαριών να ασκούν αντιβακτηριακή και ανοσοτροποποιητική δράση ενισχύοντας έτσι την άμυνα των σαλιγκαριών. Με βάση τα ποσοστά θνησιμότητας των σαλιγκαριών, τα στελέχη *L. monocytogenes* χαρακτηρίστηκαν ως υπερ-λοιμογόνα, λοιμογόνα ή μη παθογόνα. Η παθογένεια τους χαρακτηρίστηκε από αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας σε συνδυασμό με ιστολογικές αλλοιώσεις του εντερικού βλεννογόνου, καταστολή της φαγοκυτταρικής ικανότητας των κυττάρων της αιμολέμφου και έντονο οξειδωτικό στρες. Η ‘αναβίωση’ του οργανισμού επιτυγχάνθηκε με τη χορήγηση του προβιοτικού στελέχους *Lactobacillus plantarum* Sgs14 που κατέστειλε τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις και μείωσε τα ποσοστά θνησιμότητας των σαλιγκαριών.

Λέξεις-Κλειδιά

L. monocytogenes, συμβίωση, δυσβίωση, αναβίωση, προβιοτικά

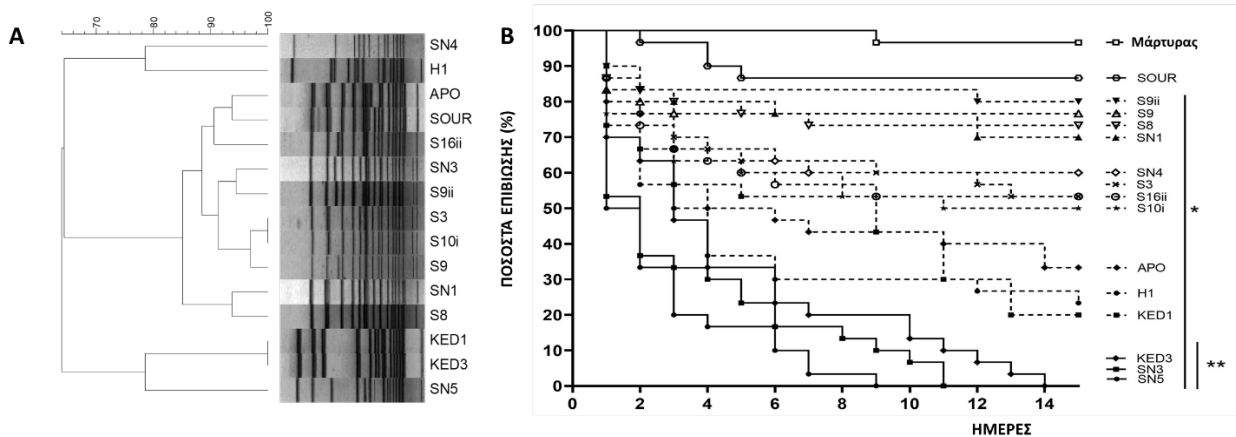
Εισαγωγή

Ξενιστές και συμβιωτικοί μικροοργανισμοί έχουν «συν-εξελιχθεί» μέσω αμοιβαίων αλληλεπιδράσεων που βασίζονται σε διατροφικά οφέλη και για τις δύο πλευρές. Η συμβίωση αυτή διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σωστή λειτουργία και δομική ακεραιότητα του γαστρεντερικού σωλήνα καθώς και στη διατήρηση και ενίσχυση της ομοιόστασης του οργανισμού (Allam & Pales 2016). Η οποιαδήποτε διαταραχή της μικροβιακής χλωρίδας, γνωστή και ως δυσβίωση, μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση ανοσορρυθμιστικών, μεταβολικών και μολυσματικών ασθενειών (Ivanov & Honda 2012). Η αναβίωση μπορεί να επιτευχθεί μέσω στοχευμένης τροποποίησης της σύστασης της εντερικής μικροχλωρίδας με τη χορήγηση προβιοτικών μικροοργανισμών (Leser, & Mølbak 2009). Ωστόσο οι μηχανισμοί με τους οποίους η εντερική μικροχλωρίδα αλληλεπιδρά με τους έμφυτους μηχανισμούς άμυνας των ασπόνδυλων οργανισμών, όπως των σαλιγκαριών, παραμένουν ασαφείς, καθώς περιορισμένος αριθμός συμβιωτικών ή δυνητικά παθογόνων μικροοργανισμών έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός δυνητικά παθογόνων βακτηρίων των εκτρεφόμενων σαλιγκαριών και η διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της εντερικής μικροχλωρίδας και των έμφυτων μηχανισμών άμυνας των σαλιγκαριών σε καταστάσεις ‘συμβίωσης’ και ‘δυσβίωσης’.

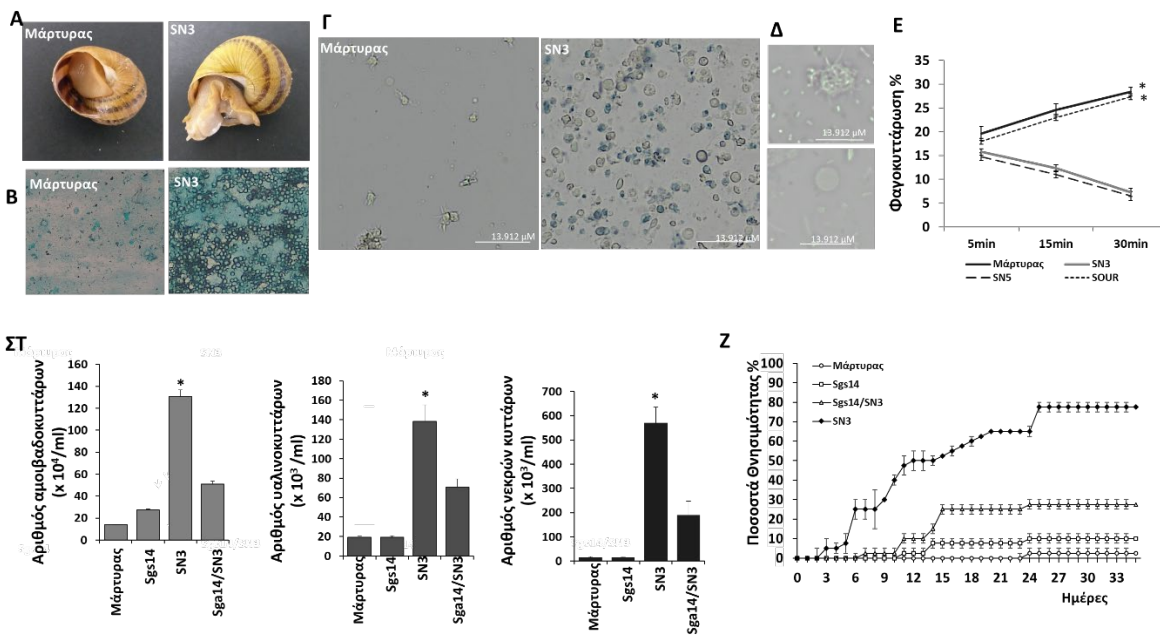
Μεθοδολογία & Αποτελέσματα

Δεκαπέντε στελέχη *L. monocytogenes* απομονώθηκαν από εκτροφεία σαλιγκαριών της Κεντρικής Μακεδονίας, τα οποία παρουσίαζαν υψηλά ποσοστά θνησιμότητας και ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους και στελέχους (Εικόνα 1Α). Όλα τα στελέχη χαρακτηρίστηκαν από την ύπαρξη γονιδίων παθογένειας *inlA*, *inlC*, *inlJ*, *plcA*, *actA*, *hlyA* και *iap*. Ωστόσο η χορήγηση τους στο ραχιαίο αιμόκοιλο των σαλιγκαριών, οδήγησε στη διάκριση των στελεχών, ως i) υπερ-λοιμογόνα (SN3, SN5, KED3), ii) λοιμογόνα (SN1, SN4, KED1, S3, S8, S9, S9ii, S10i, S16ii, APO, H1) και iii) μη λοιμογόνα/παθογόνα (SOUR), με βάση τα ποσοστά θνησιμότητας των σαλιγκαριών (Εικόνα 1B).



Εικόνα 1. Α) Διάκριση των στελεχών *L. monocytogenes* με Ηλεκτροφόρηση Παλλόμενου Πεδίου, Β) Ποσοστά θνησιμότητας σαλιγκαριών.

Η λοιμογονικότητα των *L. monocytogenes* στελεχών συσχετίστηκε θετικά με i) την ικανότητα τους να διέρχονται από τους έμφυτους φραγμούς άμυνας των σαλιγκαριών (αντοχή στη γαστρική και εξωτερική βλέννα και στις όξινες γαστρικές εκκρίσεις), ii) την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου, αυτοσυσσωμάτωσης και υδροφοβίας), iii) την ικανότητα τους να ανέχονται την αντιβακτηριακή δράση της αιμόλεμφο, να εισέρχονται ενδοκυτταρικά στα αμοιβαδοκύτταρα της αιμόλεμφο και να αναστέλλουν τη φαγοκυτταρική τους ικανότητα. Η παθογένεια των υπερ-λοιμογόνων στελεχών χαρακτηρίστηκε από i) ειδικό φαινότυπο θανάτωσης των σαλιγκαριών (ακινητοποίηση του σώματος των σαλιγκαριών εξωτερικά από το κέλυφος) (Εικόνα 2Α), ii) έκκριση μεγάλων ποσοστών βλέννας στα κόπρανα (Εικόνα 2Β), iii) αυξημένη χημειόταξη υαλινοκυττάρων και αμοιβαδοκυττάρων στην αιμόλεμφο των σαλιγκαριών, iv) αυξημένα ποσοστά νέκρωσης κυττάρων της αιμόλεμφο (Εικόνα 2Γ), v) μειωμένη φαγοκυτταρική ικανότητα αμοιβαδοκυττάρων (Εικόνα 2Δ-Ε), vi) αυξημένη παραγωγή φαινολοξειδάσης, δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και αζώτου (NO^-) και vi) ιστολογικές αλλοιώσεις του εντερικού βλεννογόνου. Η χορήγηση του προβιοτικού στελέχους των σαλιγκαριών *L. plantarum* Sgs14, το οποίο χαρακτηρίστηκε από αυξημένη αντιβακτηριακή και ανοσοτροποποιητική δράση (Dushku et al., 2019), ανέστειλε την εμφάνιση των παραπάνω κλινικοπαθολογικών συμπτωμάτων (Εικόνα 2ΣΤ) και μείωσε τα ποσοστά θνησιμότητας πάνω από 50% (Εικόνα 2Ζ) συμβάλλοντας στην αναβίωση των οργανισμών.



Εικόνα 2. Α) Κλινικοπαθολογικός φαινότυπος θανάτωσης μολυσμένων σαλιγκαριών, Β) Κύτταρα-βλέννας στα κόπρανα των σαλιγκαριών (χρώση Alcian blue), Γ) Κύτταρα της αιμόλεμφου των σαλιγκαριών (χρώση Trypan blue), Δ) Παρουσία κυττάρων *L. monocytogenes* ενδοκυτταρικά στα αιμοβλαδοκύτταρα και όχι στα υαλινοκύτταρα, Ε) Φαγοκυτταρική ικανότητα έπειτα από τη χορήγηση υπερ-λοιμογόνων και μη λοιμογόνων στελεχών, ΣΤ) Ποσοστά κυττάρων της αιμόλεμφου, Ζ) Ποσοστά θνησιμότητας.

Συμπεράσματα

- Η λοιμογονικότητα των *L. monocytogenes* στελεχών στα εκτρεφόμενα σαλιγκαρία σχετίζεται με την αλληλεπίδραση τους με τους έμφυτους μηχανισμούς άμυνας, την αντοχή τους έναντι των φυσιολογικών φραγμών άμυνας των σαλιγκαριών, την ικανότητα τους να καταστέλλουν κυτταρικούς μηχανισμούς άμυνας όπως η φαγοκυττάρωση οδηγώντας τα κύτταρα της αιμόλεμφου σε εκτεταμένο οξειδωτικό στρες (ROS, NO⁻) και νέκρωση.
- Αναδείχθηκε για πρώτη φορά η συμβολή των υαλινοκυττάρων στην έμφυτη ανοσία των σαλιγκαριών, η δράση των οποίων σχετίστηκε με φλεγμονώδεις αποκρίσεις έναντι υπερ-λοιμογόνων στελεχών. Παρατηρήθηκε ότι ο πληθυσμός των υαλινοκυττάρων αυξάνεται παρουσία μόνο υπερ-λοιμογόνων στελεχών, ενώ δε μεταβάλλεται έπειτα από τη χορήγηση πιθανών προβιοτικών στελεχών, όπως το *L. plantarum* Sgs14 ή μη λοιμογόνων *L. monocytogenes* στελεχών.
- Το προβιοτικό στέλεχος *L. plantarum* Sgs14 χρίζει περαιτέρω διερεύνησης ώστε να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο-ζωοτροφών με στόχο τη πρόληψη και θεραπεία των μολυσματικών ασθενειών που πλήττουν τον τομέα της σαλιγκαροτροφίας.

Βιβλιογραφία

- Allam, B. & Pales E. (2016). Bivalve immunity and response to infections: Are we looking at the right place? *Fish Shellfish Immunol*, 53, 4-12.
- 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.
- Ivanov, I.I. & Honda, K. (2012). Intestinal commensal microbes as immune modulators. *Cell Host Microbe*, 12, 496–508.
- Leser, T.D. & Mølbak, L. (2009). Better living through microbial action: The benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. *Environ. Microbiol*, 11, 2194–2206.

Απομόνωση πιθανών προβιοτικών μικροοργανισμών από την εντερική μικροχλωρίδα του εδώδιμου χερσαίου σαλιγκαριού *Cornu aspersum maxima* και διερεύνηση της ανοσοτροποποιητικής τους δράσης.

Καλοδότη ΑΥΓΟΥΣΤΗ^{1*}, Αργυρώ ΚΑΡΑΘΟΔΩΡΟΥ^{1*}, Κυριακή ΜΠΙΛΙΟΥΡΗ¹, Άννα ΣΠΥΡΟΠΟΥΛΟΥ¹, Μαρία ΚΥΡΙΤΣΗ¹, Αλεξάνδρα ΝΤΑΓΚΑ¹, Εσμεράλτα ΝΤΟΥΣΚΟΥ¹, Αλεξάνδρα ΣΤΑΙΚΟΥ², Μηνάς ΓΙΑΓΚΟΥ¹

1) Α.Π.Θ., Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας

2) Α.Π.Θ., Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Ζωολογίας,

kavgousti@bio.auth.gr, argykara@bio.auth.gr, kmpiliou@bio.auth.gr, anndimspy@bio.auth.gr,

kyritsime@bio.auth.gr, alexntag@bio.auth.gr, nesmeral@bio.auth.gr, astaikou@bio.auth.gr,

yangou@bio.auth.gr

* Ισάξια συνεισφορά

Περίληψη

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση και ενίσχυση της ομοιόστασης του οργανισμού. Η τροποποίηση της σύστασης της εντερικής μικροχλωρίδας με τη χορήγηση προβιοτικών, ζωντανών μικροοργανισμών που όταν χορηγηθούν σε κατάλληλες ποσότητες προάγουν την υγεία του ξενιστή, αποτελεί στρατηγική θεραπείας και βελτιωμένης παραγωγής σε ζώα εκτροφής. Ωστόσο, υπάρχει περιορισμένη πληροφορία για το ρόλο της εντερικής μικροχλωρίδας στην ανάπτυξη-υγεία εκτρεφόμενων ασπόνδυλων ζώων. Σε προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου μας απομονώθηκαν για πρώτη φορά γαλακτικά βακτήρια από το γαστρεντερικό σωλήνα του *Cornu aspersum maxima* και διερευνήθηκαν *in vitro* οι προβιοτικές τους ιδιότητες. Στη παρούσα εργασία διερευνήθηκε *in vivo* η ικανότητα των στελεχών αυτών να αποικίζουν το γαστρεντερικό σωλήνα και να αλληλεπιδρούν με του έμφυτους κυτταρικούς και χυμικούς μηχανισμούς άμυνας των σαλιγκαριών, καθώς και να ασκούν αντιβακτηριακή δράση έναντι δυνητικά παθογόνων στελεχών.

Λέξεις-Κλειδιά προβιοτικά, μικροχλωρίδα, ανοσία, σαλιγκάρια, ανοσοενίσχυση

Εισαγωγή

Οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί διαθέτουν φυσικούς μηχανισμούς άμυνας που ενεργοποιούνται ως απόκριση σε πλήθος εσωτερικών (γενετικών) και εξωτερικών (περιβαλλοντικών) παραγόντων. Ανάμεσα στους μηχανισμούς αυτούς συγκαταλέγεται και η γαστρεντερική μικροχλωρίδα, η οποία μαζί με τα κύτταρα του ξενιστή δομούν ένα πολυσύνθετο οικοσύστημα που λειτουργεί ως σύνολο και εκτελεί σημαντικές προστατευτικές και μεταβολικές διεργασίες (Kau et al., 2011, Rowland et al., 2018). Στο πλαίσιο αυτό, ο χειρισμός της εντερικής μικροχλωρίδας μέσω της χορήγησης προβιοτικών αποτελεί σύγχρονη πρακτική για τη δημιουργία ‘λειτουργικών τροφίμων’ και θεραπευτική προσέγγιση για την αντιμετώπιση φλεγμονωδών και μολυσματικών νόσων (Wang et. al., 2017). Ωστόσο, μέχρι σήμερα οι γνώσεις μας σχετικά τόσο με τη σύσταση και λειτουργία της εντερικής μικροχλωρίδας όσο και με τους έμφυτους μηχανισμούς ανοσίας ασπονδύλων ζώων, όπως των σαλιγκαριών, είναι περιορισμένες. Σε προηγούμενα δημοσιευμένα πειράματα του εργαστηρίου μας (Dushku et al., 2019) απομονώθηκαν για πρώτη φορά πιθανοί προβιοτικοί μικροοργανισμοί από τον γαστρεντερικό σωλήνα των σαλιγκαριών και διερευνήθηκε η ικανότητα τους να διέρχονται από τους φυσικούς φραγμούς άμυνας του πεπτικού σωλήνα των σαλιγκαριών (εξωτερική βλέννα, γαστρική βλέννα, όξινο περιεχόμενο του στομάχου) καθώς και τα χαρακτηριστικά της κυτταρικής επιφάνειάς τους, που σχετίζονται με τη δυνατότητα αποικισμού του εντερικού σωλήνα (σχηματισμός βιοϋμενίου, αυτοσυσσωμάτωση, υδροφοβία). Με βάση τόσο τα αποτελέσματα αυτά, όσο και με μετέπειτα δεδομένα που προέκυψαν από σύνολο 100 βακτηριακών στελεχών, επιλέχθηκαν 14 στελέχη (12 *Lactobacillus plantarum*, 1 *Enterococcus casseliflavus* και 1 *Enterococcus malodoratus*) για περαιτέρω *in vivo* διερεύνηση των προβιοτικών ιδιοτήτων τους.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της ικανότητας των πιθανών προβιοτικών στελεχών *Lactobacillus* και *Enterococcus* να προσκολλώνται στο γαστρεντερικό σωλήνα των σαλιγκαριών και να

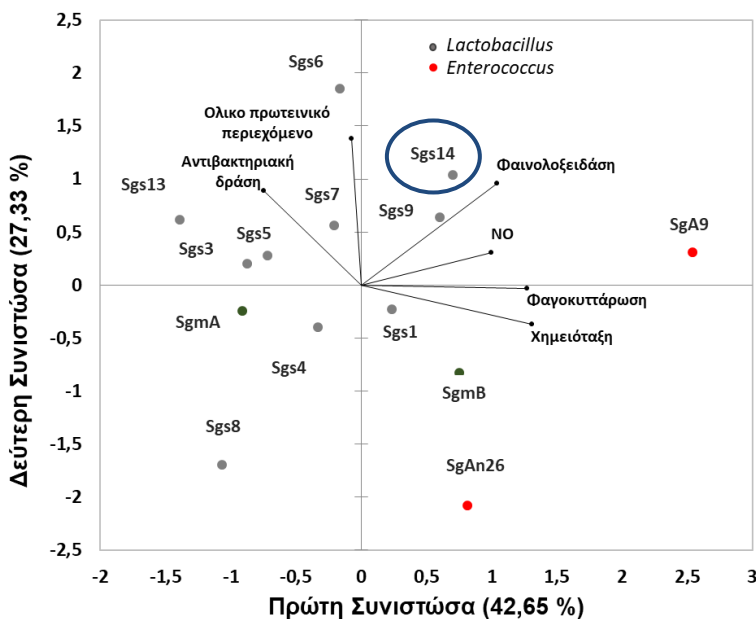
ασκούν ανοσοτροποποιητική και αντιβακτηριακή δράση.

Μεθοδολογία & Αποτελέσματα

Τα βακτηριακά στελέχη χορηγήθηκαν υποδερμικά με ένεση στο ραχιαίο αιμόκοιλο των σαλιγκαριών και διερευνήθηκε η ικανότητα τους να αλληλεπιδρούν με τους έμφυτους κυτταρικούς και χυμικούς μηχανισμούς άμυνας των σαλιγκαριών. Παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση ανάμεσα στην ικανότητα των βακτηριακών στελεχών να ενισχύουν α) τη χημειοτακτική και β) φαγοκυτταρική ικανότητα των κυττάρων της αιμολέμφου και να αυξάνουν γ) τα επίπεδα της φαινολοξειδάσης και δ) το ολικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο στον ορό της αιμολέμφου (Εικόνα 1). Τα στελέχη *Enterococcus* (SgA9 και SgAn26) καθώς και 8 στελέχη *Lactobacillus* (Sgs1, Sgs4, Sgs5, Sgs6, Sgs7, Sgs9, Sgs14, και SgmB) εμφάνισαν αυξημένη ανοσοτροποποιητική δράση καθώς σηματοδότησαν τη συσσώρευση μεγάλου αριθμού αμοιβαδοκυττάρων στην αιμόλεμφο των σαλιγκαριών ($>2 \times 10^4$ αμοιβαδοκύτταρα/ml αιμολέμφου), τα οποία ταυτόχρονα εμφάνισαν αυξημένη ικανότητα φαγοκυττάρωσης ($>40\%$) σε σύγκριση με τα ζώα-μάρτυρες (10^4 αμοιβαδοκύτταρα/ml, 22% φαγοκυττάρωση). Ενώ η χορήγηση 5 από αυτά τα στελέχη (Sgs6, Sgs7, Sgs9, Sgs14 και SgsA9) οδήγησε ταυτόχρονα και στην ενεργοποίηση του μονοπατιού της φαινολοξειδάσης και αύξηση του ολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου στην αιμόλεμφο των σαλιγκαριών. Η φαινολοξειδάση συντίθεται στα κύτταρα της αιμολέμφου και έχει συσχετιστεί με την αποκοκκίωση, τη φαγοκυττάρωση, το σχηματισμό μελανίνης, τη παραγωγή ελεύθερων ριζών, κυτοκινών και αντιμικροβιακών πεπτιδίων. Ωστόσο μόνο στο στέλεχος SgsA9 παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων των δραστικών ριζών αζώτου (NO^-). Το στέλεχος Sgs14 που εμφάνισε την υψηλότερη ανοσοτροποποιητική αλλά και αντιβακτηριακή δράση έναντι δυνητικά παθογόνων στελεχών *Salmonella*, *Listeria*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Staphylococcus* και *Rhodococcus*. χορηγήθηκε μέσω της τροφής. Παρατηρήθηκε ότι το στέλεχος Sgs14 προσκολλάται στον εντερικό σωλήνα των σαλιγκαριών (σε αντίθεση με το βακτηριακό στέλεχος SgmB, το οποίο είχε απομονωθεί από το τμήμα οισοφάγου-προστόμαχου) (Εικόνα 2), ενισχύει την έκφραση των υποδοχέων TLR2/4/5/6/9 και κατ' επέκταση αυξάνει τη χημειοτακτική και φαγοκυτταρική ικανότητα των κυττάρων της αιμολέμφου με παράλληλη αύξηση της αντιβακτηριακής δράσης της αιμολέμφου έναντι δυνητικά παθογόνων μικροοργανισμών.

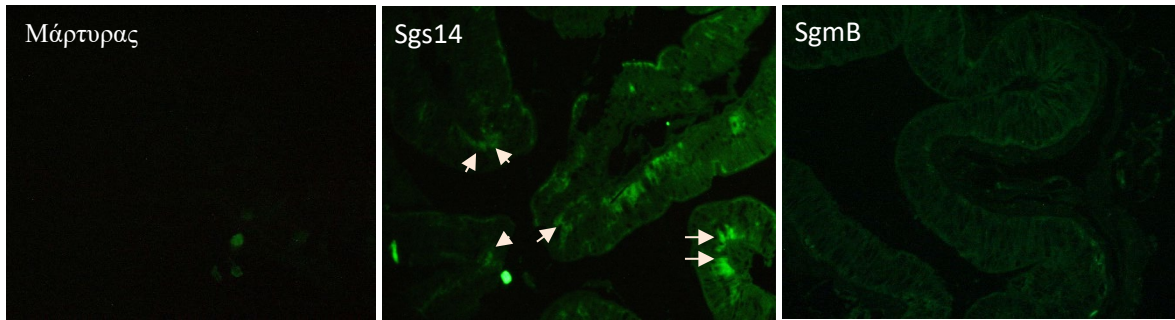
Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής αποτελούν τη βάση τόσο για την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των έμφυτων μηχανισμών άμυνας και της εντερικής μικροχλωρίδας των σαλιγκαριών όσο και για την ορθολογική χρήση των προβιοτικών ως πρόσθετα ζωοτροφών με στόχο τη βελτίωση της υγείας και ευημερίας των εκτρεφόμενων σαλιγκαριών.



Εικόνα 1. Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών. Διάκριση των βακτηριακών στελεχών με βάση την

ανοσοτροποποιητική και αντιβακτηριακή τους δράση.



Εικόνα 2. Φωτογραφίες μικροσκοπίας φθορισμού σε τομές εντέρου που απεικονίζουν το στέλεχος Sgs14 επισημασμένο με ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC) να προσκολλάται στον εντερικό βλεννογόνο των σαλιγκαριών.

Βιβλιογραφία

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.

Kau, A.L., Ahern, P.P., Griffin, N.W., Goodman, A.L. & Gordon, J.I. (2011). Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature*, 474, 327–336.

Rowland, I, Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I. & Tuohy, K. (2018). Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur. J. Nutr.*, 57, 1–24.

Wang, B., Yao, M., Lv, L., Ling, Z. & Li, L. (2017) The human microbiota in health and disease. *Engineering*, 3, 71–82.

Συγκριτική μελέτη της επίδρασης του Tobacco Heating System 2.2 και του συμβατικού τσιγάρου στη συμπεριφορά ενήλικων αρσενικών μυών.

Κορίνα ΑΤΣΟΠΑΡΔΗ, Κωνσταντίνος ΜΕΣΙΑΚΑΡΗΣ, Ιωάννης ΠΛΑΣΤΟΥΡΓΟΣ, Γεώργιος ΚΑΡΑΝΑΣΙΟΣ, Μαριγούλα ΜΑΡΓΑΡΙΤΗ, Κωνσταντίνος ΠΟΥΛΑΣ

Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Ανοσολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, & Εργαστήριο Φυσιολογίας Ανθρώπου και Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, kor.atsop@gmail.com

Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Ανοσολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, kostasmes95@gmail.com.

Εργαστήριο Φυσιολογίας Ανθρώπου και Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, giannisplas@hotmail.com

Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Ανοσολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, geokaranasios@hotmail.com

Εργαστήριο Φυσιολογίας Ανθρώπου και Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, margar@upatras.gr

Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Ανοσολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών kpoulas@upatras.gr

Περίληψη

Μελέτες συσχέτισης του καπνίσματος με το άγχος και την κατάθλιψη επιδεικνύουν ποικίλα αποτελέσματα. Με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία, σκοπός της εργασίας είναι να διερευνηθεί η επίδραση του Tobacco Heating System 2.2 (THS2.2) και του τσιγάρου στην αγχώδη συμπεριφορά και στην κινητικότητα ενήλικων αρσενικών μυών. Η έκθεση πραγματοποιήθηκε σε ειδική συσκευή με έκθεση ολόκληρου του σώματος στον καπνό των τσιγάρων (1 και 2 τσιγάρα) και στο αερόλυμα του THS2.2 (2,9 THS2.2) αντίστοιχα. Η συμπεριφορική μελέτη πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της δοκιμασίας ανοιχτού πεδίου όπου καταμετρήθηκαν, στα 5min και 10min, ο χρόνος θιγμοτακτισμού (δείκτης αγχώδους συμπεριφοράς) και οι εισοδοί στο ανοιχτό πεδίο (δείκτης κινητικότητας). Τα αποτελέσματα παρουσίασαν αύξηση της αγχώδους συμπεριφοράς μόνο μετά την έκθεση των πειραματόζωων στα 2 τσιγάρα στα 10min καθώς και μείωση της αγχώδους συμπεριφοράς μόνο στα 5min με την έκθεση στο THS2.2. Τέλος παρατηρήθηκε αύξηση στην κινητικότητα μόνο μετά την έκθεση στο THS2.2 στα 10min.

Λέξεις-κλειδιά

Συμπεριφορά, Άγχος, THS2.2, IQOS, Κάπνισμα, Τσιγάρο

Εισαγωγή

Σύμφωνα με τις εκθέσεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) το κάπνισμα έχει αναγνωριστεί ως η κύρια αναστρέψιμη αιτία θανάτου με δυνατότητα πρόληψης (WHO, 2015). Ανατρέχοντας στη διεθνή βιβλιογραφία κατά κύριο λόγο οι μελέτες ερευνούν τα προβλήματα που προκαλεί η νικοτίνη, το κύριο αλκαλοειδές του καπνού, τους μηχανισμούς εθισμού και απορρόφηση της καθώς και τους τρόπους μπορεί να γίνει η χορήγηση της χωρίς την καύση τσιγάρου. Έχουν αναπτυχθεί νέα προϊόντα που η βασική τους αρχή είναι ότι δεν υπάρχει καύση του καπνού του τσιγάρου αλλά θέρμανση και αναφέρονται ως Tobacco Heating System. Η νικοτίνη έχει περιγραφεί ως το κύριο συστατικό του τσιγάρου το οποίο είναι υπεύθυνο για μια ευρεία ποικιλία νευροχημικών και συμπεριφορικών επιδράσεων (Fowler 2008, Slotkin 2002). Λίγες όμως είναι οι μελέτες που διερευνούν τη σχέση της νικοτίνης με την αγχώδη διαταραχή και τις διαφορές στη συμπεριφορά, με την ακριβή σχέση της νικοτίνης και του άγχους/φόβου να μην έχει ερμηνευτεί (Fluharty *et al.* 2017, Parrott *et al.* 1999). Το κάπνισμα επηρεάζει την ικανότητα εκτέλεσης κινήσεων (είτε μηχανικών είτε νοητικών), το άγχος και το βάρος (Heishman 1999, Moylan 2015). Με βάση τα ανωτέρω, σκοπός της εργασίας είναι να διερευνηθεί η επίδραση του THS2.2 και του τσιγάρου στην αγχώδη συμπεριφορά και στην κινητικότητα ενήλικων αρσενικών μυών.

Μέθοδοι

Οι μύες χωρίστηκαν σε 4 ομάδες: α) ομάδα μαρτύρων, β) ομάδα που εκτέθηκε σε 1 τσιγάρο, γ) ομάδα που εκτέθηκε σε 2 τσιγάρα και δ) ομάδα που εκτέθηκε σε 2,9 ράβδους THS2.2. Με βάση τη βιβλιογραφία η ποσότητα της νικοτίνης των 2 συμβατικών τσιγάρων αντιστοιχεί με την ποσότητα της νικοτίνης σε 2,9 THS2.2. Η έκθεση πραγματοποιήθηκε σε ειδική συσκευή με έκθεση ολόκληρου του σώματος στον καπνό των τσιγάρων και στο αερόλυμα του THS2.2 αντίστοιχα. Για την συμπεριφορική μελέτη πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (Open Field Test) (Simon *et al.* 1996). Καταμετρήθηκαν ο χρόνος θιγμοκτισμού και οι εισοδοί στο ανοιχτό πεδίο

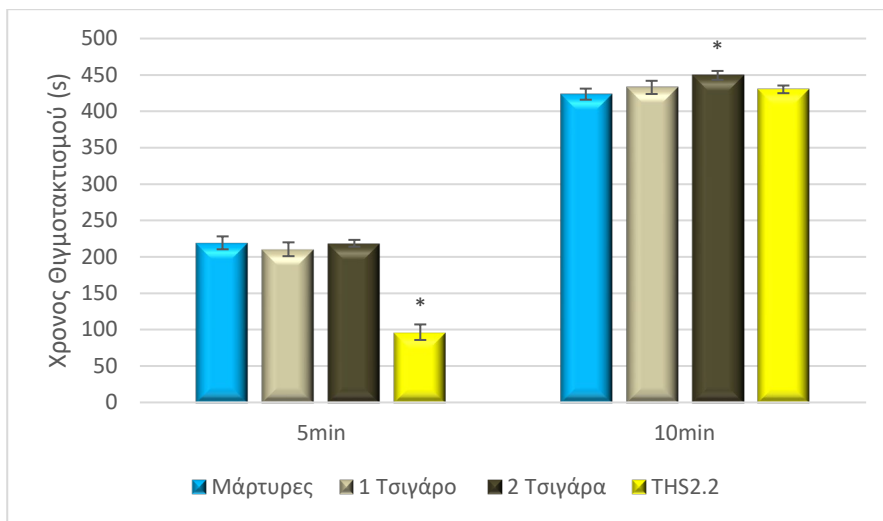
στα 5 και 10min της δοκιμασίας. Ο χρόνος θιγμοτακτισμού που αποτελεί το χρόνο που τα πειραματόζωα καταναλώνουν κοντά στα τοιχώματα της συσκευής και αποτελεί δείκτης αγγώδους συμπεριφοράς και αντίστοιχα ο αριθμός των εισόδων στο ανοιχτό πεδίο της συσκευής αποτελεί δείκτης κινητικότητας.

Αποτελέσματα

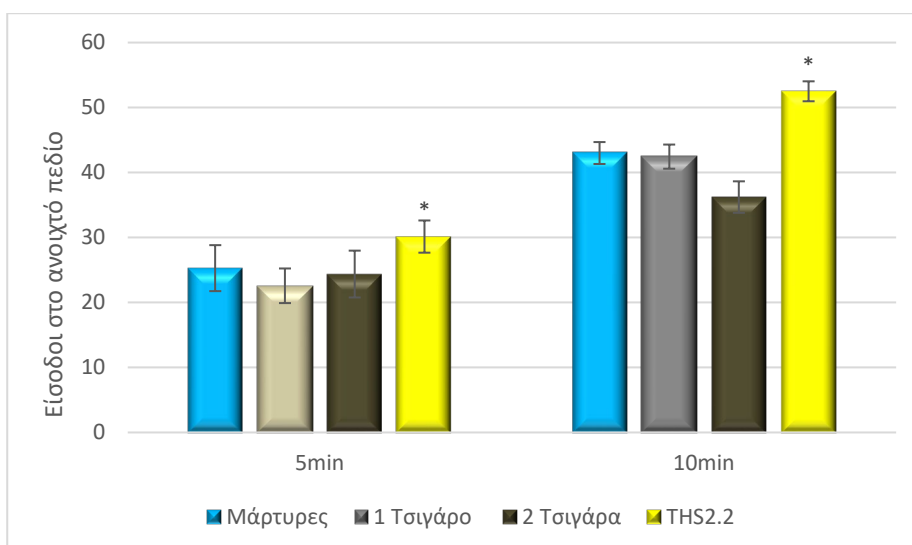
Παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση του χρόνου θιγμοτακτισμού μετά την έκθεση στο THS2.2 μόνο στα 5min. Κατά την καταμέτρηση στα 10min παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση του χρόνου θιγμοτακτισμού μόνο στην ομάδα που είχε εκτεθεί στον καπνό 2 τσιγάρων (Εικόνα 1). Αναφορικά με τον αριθμό των εισόδων παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση μετά από την έκθεση στο THS2.2 στα 5 και 10min ενώ δεν παρατηρήθηκε μεταβολή με την έκθεση στο τσιγάρο (Εικόνα 2).

Συμπεράσματα

Με βάση τα αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι η έκθεση στο αερόλυμα του THS2.2 προκαλεί μείωση της αγγώδους συμπεριφορά των πειραματόζωων μόνο κατά αρχή της δοκιμασίας (5min) και αύξηση της κινητικότητας στα 10min. Τέλος η έκθεση στο συμβατικό τσιγάρο προκάλεσε αύξηση του άγχους στα 10min μόνο μετά την έκθεση σε 2 τσιγάρια και δεν παρατηρήθηκε επίδραση στην κινητικότητα.



Εικόνα 1. Επίδρασης της έκθεσης σε 1&2 τσιγάρια και στο THS2.2 στη αγγώδη συμπεριφορά ενήλικων αρσενικών μυών 3-4 μηνών. Οι τιμές αντιστοιχούν στους μέσους όρους±SE από 8-12 μύες/ομάδα. *Σύγκριση με μάρτυρες ($p<0,05$).



Εικόνα 1. Επίδρασης της έκθεσης σε 1&2 τσιγάρια και στο THS2.2 στη κινητικότητα ενήλικων αρσενικών μυών 3-4 μηνών. Οι τιμές αντιστοιχούν στους μέσους όρους±SE από 8-12 μύες/ομάδα. *Σύγκριση με μάρτυρες ($p<0,05$).

Βιβλιογραφία

Fluharty M., Taylor A.E., Grabski M., Munafo M.R., (2017), The Association of Cigarette Smoking With Depression and Anxiety, *Nicotine & Tobacco Research*, 19(1),3-13.

Fowler C.D., Arends M.A., Kenny P.J., (2008) Subtypes of nicotinic acetylcholine receptors in nicotine reward, dependence, and withdrawal: Evidence from genetically modified mice. *Behavioural Pharmacology*, 19(5-6),461–484.

Heishman S.J. (1999) Behavioral and cognitive effects of smoking: relationship to nicotine addiction. *Nicotine & Tobacco Research*. 1(2),143-166.

Moylan S., Gustavson K., Overland S., Karevold E.B., Jacka F.N., Pasco J.A., Berk M., (2015) The impact of maternal smoking during pregnancy on depressive and anxiety behaviors in children:the Norwegian Mother and Child Cohort Study. *BMC Medicine* 3;13:24.

Parrott, A.C., (1999). Does cigarette smoking cause stress? *American Psychologist*, 54(10),817–820

Simon, P., Dupuis, R., Costentin, J., (1994). Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. *Behavioural Brain Research*, 61(1),59–64.

Slotkin, T.A., (2002) Nicotine and the adolescent brain: insights from an animal model. *Neurotoxicology & Teratology*, 24,369–84.

World Health Organization report on the global tobacco epidemic, 2015. (http://www.who.int/tobacco/global_report/2015/en/).

Επίδραση κανναβιδιόλης στην έκφραση κυτταροκινών σε ηπατική βλάβη

Κωνσταντίνος ΜΕΣΙΑΚΑΡΗΣ, Κορίνα ΑΤΣΟΠΑΡΔΗ, Κωνσταντίνος ΠΟΥΛΑΣ, Μαριγούλα ΜΑΡΓΑΡΙΤΗ

Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Ανοσολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, kostasmes95@gmail.com.

Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Ανοσολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, & Εργαστήριο Φυσιολογίας Ανθρώπου και Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, kor.atsop@gmail.com

Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Ανοσολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών kpoulas@upatras.gr

Εργαστήριο Φυσιολογίας Ανθρώπου και Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, margar@upatras.gr

Περίληψη

Η κανναβιδιόλη αποτελεί ένα από τα κύρια κανναβινοειδή, σε αντίθεση με την Δ9-Τετραυδροκανναβινόλη στερείται ευφορικών ιδιοτήτων. Το CBD εμφανίζει αγχολυτικά, αντιφλεγμονώδη και ανοσορρυθμιστικά οφέλη. Η Concanavalin A (ConA) είναι μια λεκτίνη που βρίσκεται στο *Canavalia ensiformis* και έχει συσχετιστεί με μια ποικιλία τοξικολογικών επιδράσεων (μιτογόνο, κυτταροτοξικό και ηπατοτοξικό). Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της αντιφλεγμονώδους επίδρασης του CBD σε μυς, που έχουν υποστεί οξεία ηπατική βλάβη. Τα πειραματόζωα έλαβαν προφυλακτική προθεραπεία με CBD (20 mg/kg/5d, PO) και για πρόκληση ηπατικής βλάβης χορηγήθηκε η ConA (20 mg/kg, IV) την πέμπτη ημέρα. Η αντιφλεγμονώδης ανάλυση αξιολογήθηκε με προσδιορισμό των επιπέδων INF- γ , IL-2, IL-4 και IL-10 στο πλάσμα. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν αύξηση των κυτταροκινών με τη πρόκληση της ηπατικής βλάβης ενώ η λήψη του CBD οδηγεί σε μειωμένα συγκριτικά επίπεδα των IL-2 και IL-4 και αύξηση της IL-10.

Λέξεις-κλειδιά

κανναβιδιόλη, φλεγμονή, ηπατική βλάβη, αντιφλεγμονώδης δράση

Εισαγωγή

Η χρήση κάνναβης για θεραπευτικούς σκοπούς έχει αναφερθεί από την αρχαιότητα. Η βιολογική δραστηριότητα του φυτού οφείλεται σε μια κατηγορία ενώσεων που ονομάζονται κανναβινοειδή. Τα κανναβινοειδή ή τα φυτοκανναβινοειδή, αντιπροσωπεύουν μια ομάδα ενώσεων που αποτελείται από 21 ή 22 άτομα άνθρακα (C21 ή C22), η κανναβιδιόλη (CBD) είναι ένα από τα 110 κανναβινοειδή που βρέθηκαν στο φυτό κάνναβης και αντιπροσωπεύουν έως και το 40% του φυτικού εκχυλίσματος (Campos A.C., 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. 2017). Ένας πιθανός μηχανισμός της αντιφλεγμονώδους δράσης της είναι η απορρύθμιση της παραγωγής κυτταροκινών από τα ανοσοκύτταρα και η διακοπή της φυσιολογικά ρυθμιζόμενης ανοσοαπόκρισης. Τα ενδοκανναβινοειδή, τα μεταβολικά ένζυμα και οι υποδοχείς τους έχουν ταυτοποιηθεί σε μονοκύτταρα, μακροφάγα, βασεόφιλα, λεμφοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα και ο ρόλος τους είναι να ρυθμίζουν την ανοσοποιητική λειτουργία με αυτοκρινή και παρακρινή τρόπο (Mackie K., 2006). Η φλεγμονώδης βλάβη του ήπατος μπορεί να οφείλεται είτε σε ιογενή λοίμωξη, σε αυτοάνοση παθολογία ή σε έκθεση σε φάρμακα ή ξеноβιοτικά και είναι το αποτέλεσμα μη ειδικής ή ακόμη και ειδικής ανοσοαπόκρισης. Κρίσιμοι παράγοντες στην ανάπτυξη της ηπατίτιδας και η προοδευτική εξέλιξη της ηπατίτιδας σχετίζεται με αρκετές προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως IL-2, IL-6, IL-1 β και TNF- α (Shen M., 2014). Το αντιφλεγμονώδες προφίλ του CBD, καθώς και η έρευνα σε ζωικά μοντέλα φλεγμονωδών ασθενειών, οδήγησαν σε αυτή τη μελέτη της χορήγησης CBD σε ένα μοντέλο ηπατικής βλάβης. Υπάρχουν πολλά μοντέλα μελέτης της ηπατικής λειτουργίας, όπως το μοντέλο ConA, το μοντέλο D-γαλακτοζαμίνης / λιποπολυσακχαρίτη (GalN / LPS) και το μοντέλο LPS (Sass G., 2002). Το μοντέλο ConA έχει επιλεγεί καθώς μοιάζει με την παθοφυσιολογία των ανοσολογικά μεσολαβούμενων ηπατικών διαταραχών όπως AIH (Takahashi Y., 2017), Παρ 'όλα αυτά, δεν υπάρχουν πληροφορίες που να

περιγράφουν τις επιδράσεις του CBD στο μοντέλο της Concanavalin A. Αυτή η μελέτη στοχεύει να εξετάσει τις πιθανές αλλαγές στην παραγωγή κυτταροκινών μετά τη χορήγηση CBD και τη δυνατότητα χρήσης του CBD ως θεραπευτικού εργαλείου για τη διαχείριση φλεγμονωδών και ηπατικών διαταραχών.

Μέθοδοι

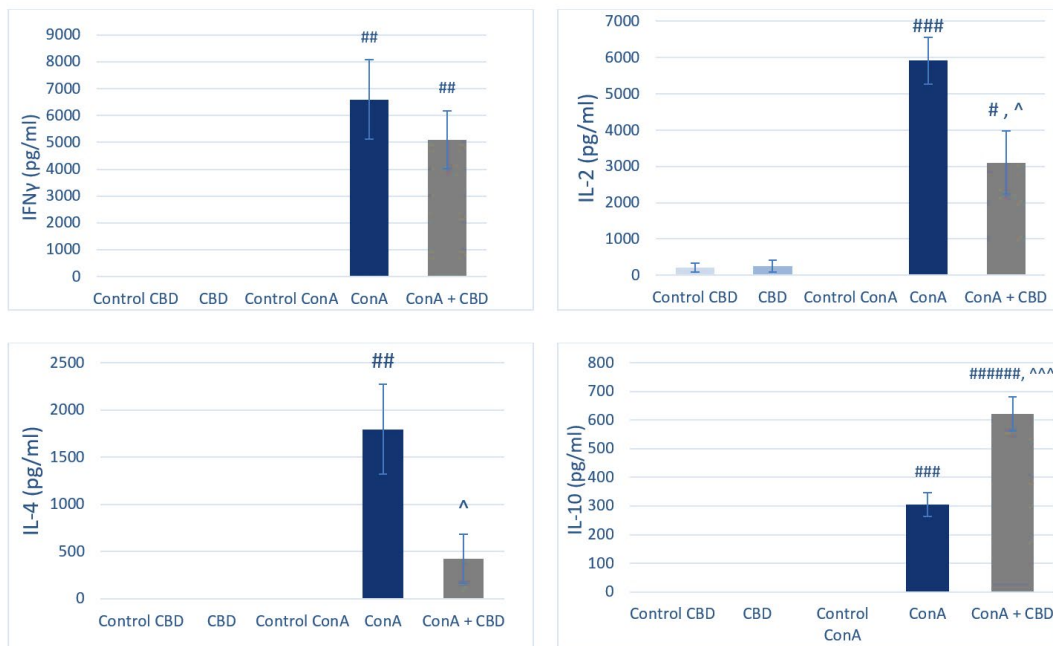
Τα πειραματόζωα (ενήλικοι αρσενικοί μύες) έλαβαν προφυλακτική θεραπεία με CBD (20 mg/kg/5d, PO) και για πρόκληση ηπατικής βλάβης χορηγήθηκε η ConA (20 mg/kg, IV) την πέμπτη ημέρα Control ConA φυσιολογικό ορό (0,9%, IV). Η αντιφλεγμονώδης ανάλυση αξιολογήθηκε με προσδιορισμό των επιπέδων INF- γ , IL-2, IL-4 και IL-10 στο πλάσμα μέσω ELISA.

Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα, όπως φαίνονται και στην εικόνα 1, υποδεικνύουν αύξηση των κυτταροκινών με τη πρόκληση της ηπατικής βλάβης. Συγκεκριμένα τα επίπεδα των INF γ , IL-2 και IL-4 εμφάνισαν πολύ υψηλά επίπεδα, ενώ η IL-10 εμφάνισε χαμηλά επίπεδα. Η λήψη του CBD οδήγησε σε στατιστικώς σημαντικά μειωμένα επίπεδα των IL-2 και IL-4 και αύξηση της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-10.

Συμπεράσματα

Η χορήγηση την Concanavalin A (20 mg/kg, IV) επιτυγχάνει την παραγωγή υψηλών επιπέδων INF- γ , IL-2, IL-4 και χαμηλών επιπέδων IL-10 στο πλάσμα. Επιπλέον, η χορήγηση του CBD (20 mg/kg, PO) μειώνει τα επίπεδα της IL-2 και της IL-4 και αυξάνει τα επίπεδα της IL-10, υποδεικνύοντας αντιφλεγμονώδη δράση μέσω της ρύθμισης των επιπέδων των κυτταροκινών. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης υποστηρίζουν ότι η χορήγηση της κανναβιδιόλης προφυλακτικά δύναται να επηρεάσει την εξέλιξη της φλεγμονής κατά την πρόκληση της ηπατικής βλάβης και μπορεί να αποτελέσει ένα νέο εργαλείο στη διαχείριση της.



Εικόνα 1. Επίδραση χορήγησης του CBD (20 mg/kg) στη παραγωγή κυτταροκινών σε ηπατική βλάβη

Οι μπάρες αντιστοιχούν στη μέση τιμή \pm το τυπικό σφάλμα, σε 5 πειραματόζωα σε κάθε πειραματική ομάδα (n = 5). #: p < 0.05, ##: p < 0.01, ###: p < 0.001, #####: p < 0.0000001 σε σχέση με την ομάδα Control ConA (One-Way Anova Analysis), ^: p < 0.05, ^^: p < 0.001 σε σχέση με την ομάδα ConA (One-Way Anova Analysis).

Βιβλιογραφία

Campos, A. C., Moreira, F. A., Gomes, F. V., del Bel, E. A. & Guimarães, F. S. Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **367**, 3364–3378 (2012).

Mackie, K. & Stella, N. Cannabinoid receptors and endocannabinoids: Evidence for new players. *AAPS J.* **8**, E298–E306 (2006).

Pisanti, S. et al. Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications. *Pharmacology and Therapeutics* **175**, 133–150 (2017).

Sass, G. et al. Cytokine expression in three mouse models of experimental hepatitis. *Cytokine* **19**, 115–20 (2002).

Shen, M. et al. Ethyl pyruvate pretreatment attenuates concanavalin A-induced autoimmune hepatitis in mice. *PLoS One* **9**, (2014).

Takahashi, Y. & Fukusato, T. Animal Models of Liver Diseases. in *Animal Models for the Study of Human Disease: Second Edition* 313–339 (Elsevier Inc., 2017). doi:10.1016/B978-0-12-809468-6.00013-9

Μελέτη της πορείας ωρίμανσης και της απόπτωσης των κοκκωδών κυττάρων ωοθυλακίων προερχόμενων από γυναίκες που υποβάλλονται σε τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής

Κυριακή ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ^{1,2}, Ειρήνη ΜΑΣΤΟΡΑ^{3,4}, Αθηνά ΓΕΝΟΠΟΥΛΟΥ^{1,2}, Αιμιλία ΖΗΣΙΑΔΗ^{1,2}, Αθανάσιος ΖΗΚΟΠΟΥΛΟΣ⁴, Μαρία Ε. ΓΡΗΓΟΡΙΟΥ⁵, 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 Μοριακής Βιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοϊατρικών Ερευνών, Πανεπιστημιούπολη, Ιωάννινα

p_kyriaki@uoi.gr, athinagen1@gmail.com, aimiliazis@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

irinimastoral@gmail.com, zikopoulos.athan@outlook.com, igeorgio@uoi.gr

⁵ Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Αλεξανδρούπολη

mgrigor@mbg.duth.gr

Περίληψη

Μια από τις βασικότερες τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής είναι η τεχνητή γονιμοποίηση (*in vitro fertilization* - IVF) κατά την οποία οι γυναίκες υπόκεινται σε ελεγχόμενη διέγερση των ωοθηκών, μέσω της χορήγησης κατάλληλων ορμονών προκειμένου να παράγουν όσο το δυνατόν περισσότερα ώριμα ωοθυλάκια. Έχουν αναπτυχθεί διάφορα πρωτόκολλα διέγερσης που στηρίζονται στο συνδυασμό φαρμακευτικών αναλόγων της ορμόνης GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone) με τις γοναδοτροπίνες FSH και LH. Απομονώσαμε καθαρούς πληθυσμούς κοκκωδών κυττάρων από ωοθυλάκια γυναικών οι οποίες υποβλήθηκαν σε τεχνητή γονιμοποίηση, με διαφορετικά πρωτόκολλα διέγερσης, και ελέγξαμε την έκφραση γονιδίων – δεικτών της ποιότητας και της ωρίμανσης των ωοθυλακίων καθώς και γονιδίων τα οποία σχετίζονται με την απόπτωση. Τα προκαταρκτικά αποτελέσματα δείχνουν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης των παραπάνω γονιδίων μεταξύ των διαφορετικών πρωτοκόλλων διέγερσης των ωοθυλακίων.

Λέξεις-κλειδιά

κοκκώδη κύτταρα, FSH, hMG, ωρίμανση, απόπτωση

Εισαγωγή

Ένα βασικό πρόβλημα της σημερινής κοινωνίας και ειδικά της χώρας μας, είναι η υπογονιμότητα. Οι αποτυχημένες προσπάθειες τεκνοποίησης υποχρεώνουν ολοένα και περισσότερα ζευγάρια να αναζητούν λύσεις στην ιατρικώς υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Κατά την τεχνητή γονιμοποίηση εφαρμόζονται διαφορετικά πρωτόκολλα, ανάλογα με την απόκριση κάθε γυναίκας. Βασικό χαρακτηριστικό αυτών των πρωτοκόλλων είναι η χορήγηση ανασυνδυασμένης ανθρώπινης FSH (r-hFSH) με (ή χωρίς) ανασυνδυασμένη LH (r-hLH) ή η χορήγηση ανθρώπινης εμμηνοπαυσιακής γοναδοτροπίνης (HP-hMG, Highly Purified human Menopausal gonadotropin) που είναι ένας συνδυασμός των γοναδοτροπινών FSH και LH (οι οποίες, φυσιολογικά, παράγονται στην υπόφυση και εξασφαλίζουν την ανάπτυξη και την ωρίμανση των ωοθυλακίων). Η χορήγηση των παραπάνω ορμονών γίνεται σε συνδυασμό με αγωνιστές ή ανταγωνιστές της εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών – GnRH οι οποίοι ρυθμίζουν την παραγωγή της FSH και της LH στην υπόφυση (Shrestha, La, Feng 2015).

Υπάρχουν αρκετές μελέτες που συγκρίνουν την επίδραση της rhFSH ή της rhFSH + rhLH και της HP-hMG στη διέγερση των ωοθηκών και στο ποσοστό των κυήσεων, οι οποίες όμως αναλύουν μόνο την κλινική εικόνα των γυναικών χωρίς να συσχετίζουν τα αποτελέσματά τους με τις αλλαγές σε μοριακό

επίπεδο που συμβαίνουν στα ωοθυλάκια (Orvieto 2019). Αξίζει να σημειωθεί ότι σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση του ωαρίου (και του ωοθυλακίου) κατέχουν τα κοκκώδη κύτταρα τα οποία περιβάλλουν το ωάριο τροφοδοτώντας το με τα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξή του (Binelli, Murphy 2010). Επίσης, η απόπτωση των κοκκωδών κυττάρων έχει συσχετιστεί με την ποιότητα των ωαρίων και την επιτυχία της γονιμοποίησης (Regan et al. 2017). Στην παρούσα έρευνα μελετάμε την επίδραση που έχουν οι διαφορετικοί συνδυασμοί γοναδοτροπινών στην έκφραση γονιδίων που εκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα και είναι χαρακτηριστικά της ωρίμανσης του ωοθυλακίου.

Μέθοδοι

Στη μελέτη συμμετέχουν 40 γυναίκες οι οποίες υποβάλλονται σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων με ενήμερη συγκατάθεσή τους. Οι γυναίκες έχουν χωριστεί σε δυο κατηγορίες: Η ομάδα Α περιλαμβάνει 20 γυναίκες ηλικίας 30 – 35 ετών και χωρίζεται σε δυο υποομάδες: την υποομάδα Α1 (rhFSH) και την Α2 (HP-hMG). Η ομάδα Β περιλαμβάνει 20 γυναίκες ηλικίας 38 – 42 ετών και χωρίζεται σε δυο υποομάδες: την υποομάδα Β1 στην οποία χορηγείται rhFSH (+ rhLH, λόγω χαμηλών επιπέδων LH σε αυτές τις ηλικίες) και την Β2 στην οποία χορηγείται HP-hMG. 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 και στη συνέχεια απομονώνονται τα κοκκώδη κύτταρα με πρωτόκολλο που έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριο. Ακολουθεί η απομόνωση του RNA των κοκκωδών κυττάρων και αντίστροφη μεταγραφή (RT) ενώ η ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων γίνεται μέσω ημι-ποσοτικής PCR (semi-qPCR). Η ανάλυση περιλαμβάνει γονίδια που επάγουν την ωρίμανση των ωοθυλακίων (*ZP3*, *AHR*), γονίδια απαραίτητα για τη βιοσύνθεση των γοναδοτροπινών, όπως τα *CYP17A1* και *CYP19A1*, γονίδια που κωδικοποιούν τους υποδοχείς των *FSH*, *LH* και γονίδια χαρακτηριστικά της απόπτωσης (*CASPASE-3* και *BAX*).

Αποτελέσματα

Προκαταρκτικά αποτελέσματα από 4 γυναίκες έδειξαν αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *LHR* και του *CYP17A1*, ύστερα από χορήγηση r-hFSH σε σχέση με το HP-hMG και στις δυο ομάδες γυναικών, ενώ φαίνεται να μειώνεται η έκφραση του υποδοχέα *FSHR*. Επίσης, η χορήγηση r-hFSH στις γυναίκες της ομάδας Α οδήγησε σε περισσότερα ώριμα ωοθυλάκια σε σχέση με την HP-hMG, όπως φαίνεται από την έκφραση των γονιδίων *ZP3* και *AHR* κάτι το οποίο δεν παρατηρήθηκε σε γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας. Τέλος, η χορήγηση r-hFSH μείωσε τα επίπεδα mRNA των προ-αποπτωτικών γονιδίων, σε μεγαλύτερο βαθμό στις γυναίκες της ομάδας Α σε σχέση με την ομάδα Β.

Συμπεράσματα

Τα παραπάνω αποτελέσματα αποκαλύπτουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των καθιερωμένων πρωτοκόλλων διέγερσης και των διαφορετικών συνδυασμών γοναδοτροπινών που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη, στην ωρίμανση των ωοθυλακίων και στην απόπτωση των κοκκωδών κυττάρων μεταξύ γυναικών διαφορετικής ηλικίας. Η μελέτη μεγαλύτερου αριθμού γυναικών αναμένεται να συμβάλει στην ανάπτυξη βιοδεικτών τόσο για τη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης κοκκωδών κυττάρων-ωαρίου, όσο και για τη μελλοντική δυνατότητα εξατομίκευσης της θεραπείας, ανάλογα με τον ασθενή.

Ενδεικτική βιβλιογραφία

Binelli M, Murphy BD. (2010). Coordinated regulation of follicle development by germ and somatic cells Rep Fertil Dev.

Orvieto (2019). HMG versus recombinant FSH plus recombinant LH in ovarian stimulation for IVF: does the source of LH preparation matter? RBMO, volume 39, issue 6.

Regan SLP, Knight PG, Yovich JL, Stanger JD, Leung Y, Arfuso F, Almahbobi, G, Dharmarajan A. (2017). The effect of ovarian reserve and receptor signalling on granulosa cell apoptosis during human follicle development. Mol Cell Endocrinol 470:219-227

Shrestha D, La X, Feng HL. (2015). Comparison of different stimulation protocols used in in vitro fertilization: a review. Ann Transl Med.

Μελέτη της αλληλεπίδρασης του α7 νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης και της ακίδας (Spike) των SARS-CoV και SARS-CoV-2

Γεώργιος ΛΑΓΟΥΜΙΝΤΖΗΣ, Χρήστος ΧΑΣΑΠΗΣ, Νικόλαος ΑΛΕΞΑΝΔΡΗΣ, Δημήτριος Ι. ΚΑΣΑΡΤΖΙΑΝ, Μαρία ΚΟΤΣΙΡΑ, Σωκράτης ΤΖΑΡΤΟΣ, Ηλίας ΗΛΙΟΠΟΥΛΟΣ, Κωνσταντίνος ΦΑΡΣΑΛΙΝΟΣ, Κωνσταντίνος ΠΟΥΛΑΣ

Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Ανοσολογίας, glagoum@upatras.gr; cchasapis@upatras.gr; nalexandris@upatras.gr; kasartziandimitris@gmail.com; marikleia.k@gmail.com; kfarsalinos@gmail.com; kpoulas@upatras.gr

Τζάρτος Νευροδιαγνωστική, Έσλιν 3, Αθήνα, Ελλάδα, stzartos@neurodiagnostics.gr
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Γενετικής, eliop@aua.gr

Περίληψη

Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η νικοτίνη μπορεί να έχει πιθανή προστατευτική δράση έναντι στον SARS-CoV-2, δεδομένου της επίδρασής της στο χολινεργικό αντιφλεγμονώδες μονοπάτι. Έχουμε δείξει την πιθανή αλληλεπίδραση της SARS-CoV-2 Spike και του α9 nAChR σε έναν επίτοπο της Spike που είναι ομόλογος με τον επίτοπο των nAChRs στον οποίο προσδένονται νευροτοξίνες φιδιών. Στην παρούσα μελέτη, διερευνούμε την μοριακή αλληλεπίδραση της SARS-CoV και SARS-CoV-2 Spike με τον α7 nAChR που είναι ο κατεξοχήν ρυθμιστής του χολινεργικού αντιφλεγμονώδους μονοπατιού. Οι *in silico* μελέτες μας, αναδεικνύουν ότι υπάρχει διαμοριακή επαφή μεταξύ των πρωτεϊνικών συμπλοκών που περιλαμβάνει την περιοχή της SARS-CoV και SARS-CoV-2 Spike που είναι ομόλογη με τη θέση πρόσδεσης νευροτοξινών στον α7 nAChR. Τα ευρήματά μας αυτά παρέχουν περαιτέρω υποστήριξη στην υπόθεση σχετικά με τον πιθανό προστατευτικό ρόλο της νικοτίνης και άλλων χολινεργικών αγωνιστών, ενώ ενισχύουν την ανάγκη για επιπρόσθετες μελέτες προς αυτή την κατεύθυνση.

Λέξεις Κλειδιά

COVID-19; molecular modeling; nAChRs; Spike glycoprotein; CR3022

Εισαγωγή

Η συσχέτιση του καπνίσματος με την έκβαση της COVID-19 είναι υπό διερεύνηση. Αρκετές μελέτες έχουν εντοπίσει έναν ασυνήθιστα χαμηλό επιπολασμό του καπνίσματος σε νοσοκομειακούς ασθενείς με COVID-19 (Chow et al, 2020; Farsalinos, Barbouni, Niaura, 2020; Simons et al, 2020). Είναι πιθανό ο SARS-CoV-2 να μπορεί να προσβάλλει τους νικοτινικούς υποδοχείς της ακετυλοχολίνης (nAChRs), οι οποίοι εδράζονται δίπλα στον υποδοχέα εισόδου του ιού στα κύτταρα και έμμεσα να απορυθμίζει το χολινεργικό αντιφλεγμονώδες μονοπάτι (XAM), οδηγώντας στην εκδήλωση συμπτωματολογίας όπως η «καταιγίδα των κυτταροκινών».

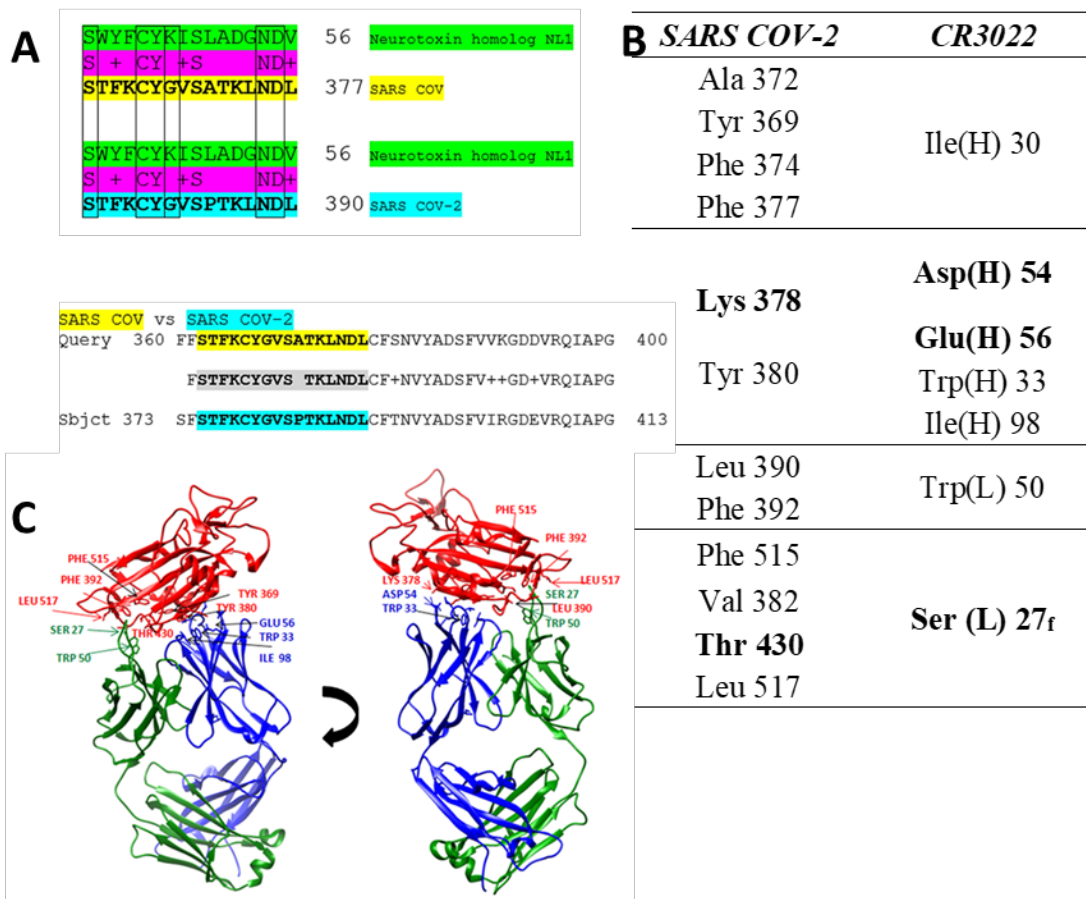
Πρόσφατα δείξαμε την ύπαρξη μια αλληλουχίας στην SARS-CoV-2 Spike, ομόλογη με αλληλουχίες νευροτοξινών φιδιών και η οποία μπορεί να δεσμεύεται στην περιοχή στους nAChRs (Farsalinos, Eliopoulos, Leonidas, et al, 2020). Η ύπαρξη αυτής της ομόλογης περιοχής μπορεί να ερμηνεύει την απορυθμιστική δράση του ιού στο XAM κυρίως μέσω των nAChRs. Χρησιμοποιώντας μοντέλα βιοπληροφορικής, επεκτείνουμε τις μελέτες μας παρουσιάζοντας τα σύμπλοκα των SARS-CoV και των SARS-CoV-2 Spike πρωτεϊνών με το εξωκυττάριο τμήμα (extracellular domain: ECD) του ανθρώπινου α7 nAChR, στην "ανοιχτή" και "κλειστή" διαμόρφωσή τους.

Μέθοδοι

Για την στοίχιση των αλληλουχιών των SARS-CoV και SARS-CoV-2 Spike και των “toxin binding sites” στους nAChRs, χρησιμοποιήσαμε τις βάσεις δεδομένων του NCBI. Η πρόβλεψη δομής πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό ROSETA. Τα σύμπλοκα των SARS-CoV και SARS-CoV-2 Spike, του mAb CR3022 και του ECD του α7 nAChR, μοντελοποιήθηκαν με HADDOCK.

Αποτελέσματα

Στην Εικόνα 1Α παρουσιάζεται η στοίχιση των ομόλογων αλληλουχιών για τις SARS-CoV, και SARS-CoV-2 Spike και της neurotoξίνης NL1, ενώ η αλληλεπίδραση μεταξύ των αμινοξέων της SARS-CoV-2 Spike και του κρυπτικού επίτοπου του εξουδετερωτικού για τον SARS-CoV mAb CR3022, φαίνεται στην Εικόνα 1B. Στην Εικόνα 1C παρουσιάζεται η 3D μοντελοποίηση της αλληλεπίδρασης της SARS-CoV-2 Spike και του mAb CR3022.



Εικόνα 1. (A) Στοίχιση των ομόλογων αμινοξικών αλληλουχιών μεταξύ της Spike των SARS-CoV και SARS-CoV-2 και της Neurotoxin homolog NL1. (B) Αμινοξική αλληλεπίδραση μεταξύ της SARS-CoV-2 Spike με το mAb CR3022. (C) Αλληλεπίδραση μεταξύ της SARS-CoV-2 Spike (κόκκινο), με τη βαριά (μπλε) και τη ελαφριά αλυσίδα (πράσινο) του CR3022.

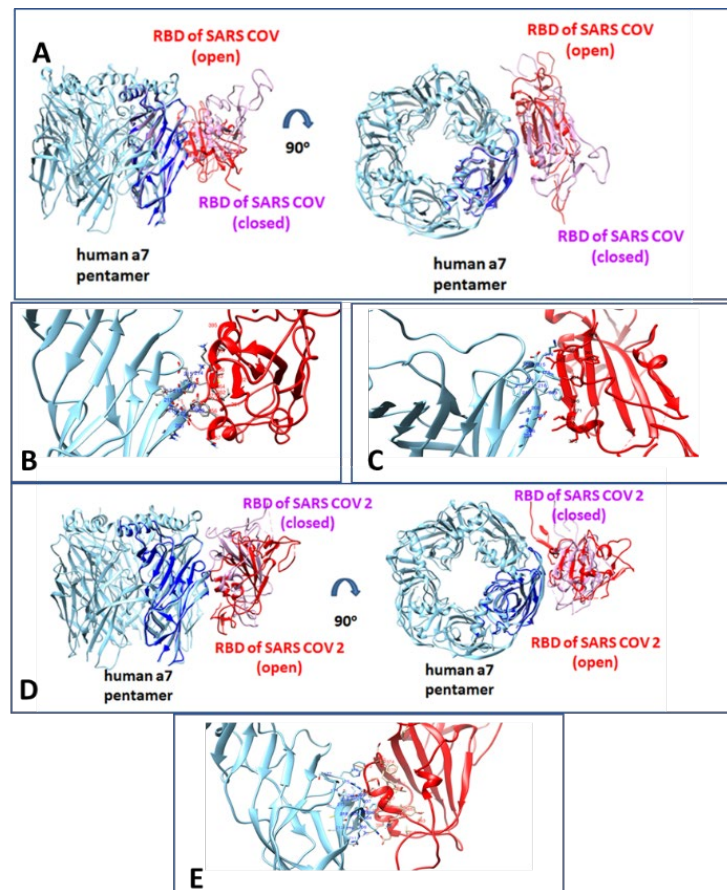
Τα δεδομένα της HADDOCK ανάλυσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Δεδομένα Haddock των συμπλόκων της SARS-CoV και SARS-CoV-2 Spike με το ECD της $\alpha 7$ του nAChR.

	SARS-CoV S1		SARS-CoV-2 S1	
	Open	Closed	Open	Closed
with human $\alpha 7$ nAChR ECD				
ΔG (kcal mol ⁻¹)	-8,5	-10,6	-10	-9,4
Kd (Molar) at 25.0 °C	5.6E-07	1.6E-08	4.6E-08	1.3E-07
HADDOCK score	-117.6 (8.5)	-96.2 (4.4)	-38.9 (12.0)	-46.2 (7.9)

Electrostatic Energy (kcal mol⁻¹)	-174.4 (31.4)	-114.6 (28.9)	-198.9 (19.6)	-41.6 (14.5)
Buried Surface Area (Å²)	1777.7 (251.6)	1845.9 (109.3)	1561.8 (60.3)	1677.1 (122.5)

Η HADDOCK ανάλυση αναδεικνύει ότι η επαφή μεταξύ της SARS-CoV, SARS-CoV-2 Spike και του ECD της $\alpha 7$ του nAChR περιλαμβάνει την πλειονότητα των αλληλουχιών που εμφανίζουν ομολογία με την περιοχή πρόσδεσης των νευροτοξινών των φιδιών στους nAChRs (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. (A) HADDOCK ανάλυση των συμπλόκων της SARS-CoV Spike στην ανοιχτή και κλειστή διαμόρφωσή της με το ECD του $\alpha 7$ nAChR. (B) Επιφάνεια επαφής μεταξύ της SARS-CoV Spike στην ανοιχτή διαμόρφωση (κόκκινο χρώμα) και του ECD του $\alpha 7$ nAChR (κυανό χρώμα). (C) Επιφάνεια επαφής μεταξύ της SARS-CoV Spike στην κλειστή διαμόρφωση (κόκκινο χρώμα) και του ECD του $\alpha 7$ nAChR (κυανό χρώμα). (D) HADDOCK ανάλυση της SARS-CoV-2 Spike στην ανοιχτή και κλειστή διαμόρφωσή της με το ECD του $\alpha 7$ nAChR. (E) Επιφάνεια επαφής μεταξύ της SARS-CoV-2 Spike στην ανοιχτή διαμόρφωση (κόκκινο χρώμα) και του ECD του $\alpha 7$ nAChR (κυανό χρώμα).

Συζήτηση

Τα ευρήματά μας υποστηρίζουν την υπόθεσή μας ότι ο SARS-CoV-2 μέσω της Spike μπορεί να αλληλοεπιδράσει με τους nAChRs και ειδικότερα με τον $\alpha 7$ nAChR, σε περιοχές που είναι ομόλογες με αυτές που προσδέονται οι νευροτοξίνες φιδιών, πιθανώς αναστέλλοντας την ενεργοποίηση του XAM. Τέτοιες μοριακές αλληλεπιδράσεις μπορεί να ενισχύουν ανεξέλεγκτες ανοσοαποκρίσεις, προκαλώντας φλεγμονώδη σύνδρομα (καταιγίδα κυτταροκινών), τα οποία μπορεί -εν μέρει- να ευθύνονται για την εκδήλωση της σοβαρής παθοφυσιολογίας της COVID-19.

Βιβλιογραφία

Chow N, Fleming-Dutra K, Gierke R, Hall A, Hughes M, Pilishvili T, et al. Preliminary Estimates of the Prevalence of Selected Underlying Health Conditions Among Patients with Coronavirus Disease 2019 - United States, February 12–March 28, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2020.

Farsalinos K, Barbouni A, Niaura R. Systematic review of the prevalence of current smoking among hospitalized COVID-19 patients in China: could nicotine be a therapeutic option? *Internal and Emergency Medicine.* 2020.

Simons D, Shahab L, Brown J, Perski O. The association of smoking status with SARS-CoV-2 infection, hospitalisation and mortality from COVID-19: A living rapid evidence review with Bayesian meta-analyses (version 7). *Addiction.* 2020

Farsalinos K, Eliopoulos E, Leonidas D, Papadopoulos G, Tzartos S, Poulas, K. Molecular Nicotinic Cholinergic System and COVID-19: In Silico Identification of an Interaction between SARS-CoV-2 and Nicotinic Receptors with Potential Therapeutic Targeting Implications. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(16);5807.

Επίδραση των μικρορευμάτων σε κυτταρικές σειρές που εμπλέκονται στην επούλωση ελκών και καταγμάτων

Ευαγγελία ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ, Ζωή ΖΑΓΟΡΙΤΗ, Κωνσταντίνος ΠΟΥΛΑΣ
 Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Ανοσολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών
ekonstan@upatras.gr, zoizag@upatras.gr, kpoulas@upatras.gr

Περίληψη

Η επούλωση ελκών είναι μία διαδικασία, αρκετά σημαντική για όλους τους οργανισμούς, που αποτελείται από τέσσερα διαδοχικά και αλληλεπικαλυπτόμενα στάδια. Τα τελευταία χρόνια η ηλεκτροδιέγερση με τη μορφή μικρορευμάτων έχει αρχίσει να χρησιμοποιείται για την επιτάχυνση της επουλωτικής διαδικασίας στο δέρμα ή στα οστά καθώς μιμείται το ρεύμα που δημιουργείται, φυσιολογικά, μετά από κάθε έλκος. Στην παρούσα μελέτη προσπαθήσαμε να ταυτοποιήσουμε τους μοριακούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στη διαδικασία επούλωσης, ελκών και καταγμάτων, έπειτα από διέγερση με μικρορεύματα χρησιμοποιώντας δύο κυτταρικές σειρές: ινοβλάστες και οστεοβλάστες.

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι τα μικρορεύματα πιθανόν επάγουν τη διαδικασία της επούλωσης μέσω ενός συνδυασμού μεταγωγής σήματος, λόγω φωσφορυλίωσης των MAP κινασών, και μεταγραφικής ενεργοποίησης γονιδίων που εμπλέκονται στην επουλωτική διαδικασία. Αυτοί οι μηχανισμοί δράσης των μικρορευμάτων πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω προκειμένου να περιοριστούν οι αρνητικές επιπτώσεις από τη χρήση τους για την επούλωση ελκών ή καταγμάτων στην κλινική πράξη.

Λέξεις-κλειδιά

Ινοβλάστες, οστεοβλάστες, μικρορεύματα

Εισαγωγή

Η διαδικασία της επούλωσης είναι μία εγγενής ικανότητα του ανθρώπινου οργανισμού, η οποία μπορεί να συμβεί σε όλους τους ιστούς και τα όργανά του και περιλαμβάνει μία αλληλουχία προγραμματισμένων και αλληλεπικαλυπτόμενων γεγονότων (Velnar et al. 2009). Σε κάθε φάση της επουλωτικής διαδικασίας συμμετέχουν διαφορετικοί τύποι κυττάρων και αλληλεπιδρούν μεταξύ τους προκειμένου να επιτευχθεί η αποκατάσταση του τραυματισμένου ιστού (Falanga 2005; Reinke and Sorg 2012). Έχει παρατηρηθεί ότι μετά τη δημιουργία ενός έλκους παράγεται ρεύμα χαμηλής έντασης (γνωστό ως φυσικό ρεύμα τραύματος), το οποίο ενεργοποιεί και κατευθύνει τους διάφορους τύπους κυττάρων στην υπό επούλωση περιοχή. Συγκεκριμένα αυτά τα ηλεκτρικά πεδία επάγουν την διαίρεση, τον πολλαπλασιασμό και την κατευθυνόμενη μετανάστευση διαφόρων τύπων κυττάρων (Taghian et al. 2015; Zhao et al. 2006).

Η ηλεκτροδιέγερση χρησιμοποιείται ως ένα μέσο για την επούλωση ελκών και καταγμάτων καθώς μιμείται το φυσικό ρεύμα τραύματος, επάγει τη μετανάστευση διαφόρων τύπων κυττάρων, τη σύνθεση DNA και πρωτεϊνών από τους ινοβλάστες, τη σύνθεση της εξωκυττάριας μήτρας καθώς και την έκκριση διαφόρων αυξητικών παραγόντων (Isseroff and Dahle 2012; Todd et al. 2001). Τα τελευταία χρόνια τα μικρορεύματα, που είναι ένα είδος ηλεκτροδιέγερσης, χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο για την επούλωση χρόνιων ελκών, δηλαδή ελκών που δεν έχουν επουλωθεί λόγω διακοπής ή παρατεταμένης διάρκειας μίας εκ των φάσεων της επουλωτικής διαδικασίας, τα οποία έχουν δημιουργηθεί είτε στο δέρμα είτε στα οστά (Eming et al. 2014; Falanga 2005; Lee et al. 2007).

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθούν οι μοριακοί μηχανισμοί που ενεργοποιούνται κατά την επούλωση ελκών και καταγμάτων, έπειτα από την επίδραση των μικρορευμάτων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε μία κυτταρική σειρά ινοβλαστών (NIH3T3 κύτταρα), καθώς οι ινοβλάστες συμμετέχουν στη διαδικασία επούλωσης ελκών και μία ανθρώπινη κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος που παρουσιάζει οστεοβλαστικά χαρακτηριστικά (MG-63 κύτταρα), καθώς οι οστεοβλάστες συμμετέχουν στην επούλωση καταγμάτων.

Μέθοδοι

1. Καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών NIH3T3 και MG-63
2. Ανάλυση κατά western των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων που απομονώθηκαν από τα NIH3T3 και τα MG-63 κύτταρα έπειτα από επίδραση με μικρορεύματα
3. Μέθοδος επούλωσης ελκών δι' αμυγλής με τη χρήση αναστολέων ειδικών για τις MAP κινάσες ERK 1/2 και p38
4. Μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού
5. Προσδιορισμός των επιπέδων του TGF-β1 σε υπερκείμενα κυττάρων
6. Μελέτη του μεταγραφικού προφίλ των MG-63 και NIH3T3 κυττάρων

Αποτελέσματα

1. Τα μικρορεύματα επάγουν την ενεργοποίηση των MAP κινασών ERK 1/2 και p38 στα NIH3T3 και MG-63 κύτταρα
2. Η διέγερση με μικρορεύματα επάγει την επούλωση ελκών *in vitro* με έναν phospho-ERK 1/2 ή phospho-p38 εξαρτώμενο τρόπο
3. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, σε κύτταρα διεγερμένα από μικρορεύματα, γίνεται με έναν phospho-ERK 1/2 και phospho-p38 εξαρτώμενο τρόπο
4. Τα μικρορεύματα επάγουν την έκκριση του παράγοντα TGF-β1 με έναν phospho-ERK 1/2 και phospho-p38 εξαρτώμενο τρόπο
5. Τα μικρορεύματα προκαλούν αλλαγές στο μεταγραφικό προφίλ των MG-63 κυττάρων
6. Η διέγερση με μικρορεύματα επάγει την ενεργοποίηση γονιδίων που συμμετέχουν στην επούλωση ελκών και στο μεταγραφικό μονοπάτι Hedgehog στα NIH3T3 κύτταρα

Συζήτηση

1. Η επίδραση με μικρορεύματα δεν προκαλεί αλλαγή στη θερμοκρασία ή το pH του θρεπτικού μέσου επομένως τα αποτελέσματα οφείλονται αποκλειστικά στην δράση των μικρορευμάτων.
2. Η ηλεκτροδιέγερση μεταβάλλει τη δράση των MAP κινασών και στη δική μας περίπτωση είδαμε ότι ενεργοποιούνται και υπάρχει βέλτιστος αριθμός φορτίων για να έχουμε ταυτόχρονη ενεργοποίηση των ERK 1/2 και p38 και στις δύο κυτταρικές σειρές.
3. Έχει δειχθεί ότι ρεύμα χαμηλής έντασης επάγει την έκκριση του TGF-β1 και τα αποτελέσματα μας έρχονται σε συμφωνία με αυτό.
4. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού Hedgehog καθώς και του μονοπατιού της κινάσης p38 μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις, επομένως είναι απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη δράσης των μικρορευμάτων.

Βιβλιογραφία

- Eming, Sabine A., Paul Martin, and Marjana Tomic-Canic. 2014. "Wound Repair and Regeneration: Mechanisms, Signaling, and Translation." *Science Translational Medicine* 6(265).
- Falanga, Vincent. 2005. "Wound Healing and Its Impairment in the Diabetic Foot." *Lancet* 366(9498): 1736–43.
- Isseroff, R. Rivkah, and Sara E. Dahle. 2012. "Electrical Stimulation Therapy and Wound Healing: Where Are We Now?" *Advances in Wound Care* 1(6): 238–43.
- Lee, Bok Y., Keith Wendell, Noori Al-Waili, and Glenn Butler. 2007. "Ultra-Low Microcurrent Therapy: A Novel Approach for Treatment of Chronic Resistant Wounds." *Advances in Therapy* 24(6): 1202–9.
- Reinke, J. M., and H. Sorg. 2012. "Wound Repair and Regeneration." *European Surgical Research* 49(1): 35–43.
- Taghian, T., D. A. Narmoneva, and A. B. Kogan. 2015. "Modulation of Cell Function by Electric Field: A High-Resolution Analysis." *Journal of the Royal Society Interface* 12(107): 21–25.
- Todd, I. et al. 2001. "Electrical Stimulation of Transforming Growth Factor-B1 Secretion by Human Dermal Fibroblasts and the U937 Human Monocytic Cell Line." *ATLA Alternatives to Laboratory Animals* 29(6): 693–701.

Velnar, Tomaz, T. Bailey, and V. Smrkolj. 2009. “The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms.” *Journal of International Medical Research* 37(5): 1528–42.

Zhao, Min et al. 2006. “Electrical Signals Control Wound Healing through Phosphatidylinositol-3-OH Kinase- γ and PTEN.” *Nature* 442(7101): 457–60.

Σύγκριση εμπορικά διαθέσιμων kit απομόνωσης βακτηριακού DNA από τρόφιμα με τη μέθοδο θερμικής λύσης

ΔΗΜΗΤΡΑΚΟΠΟΥΛΟΥ Μαρία Ελένη¹, ΣΤΑΥΡΟΥ Βένια², ΚΟΤΣΑΛΟΥ Χρυσούλα³,
ΒΑΝΤΑΡΑΚΗΣ Απόστολος⁴

Εργαστήριο Υγιεινής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, dimitrakopoulou@upatras.gr¹

Εργαστήριο Υγιεινής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, veniastavrou@yahoo.gr²

Εργαστήριο Υγιεινής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, chrysoulakotsalou@gmail.com³

Εργαστήριο Υγιεινής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, avanta@upatras.gr⁴

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια η εξέλιξη των μη καλλιεργητικών μεθόδων σε συνδυασμό με τη χρήση μοριακών τεχνολογιών έχουν προκαλέσει επανάσταση στην κατανόηση των μικροβιακών οικοσυστημάτων. Η απομόνωση του γενετικού υλικού από τα μικροβιακά οικοσυστήματα αποτελεί ένα κρίσιμο βήμα και πολλές μέθοδοι όπως και πολλά εμπορικά kit είναι διαθέσιμα. Σε αυτή τη μελέτη στόχος ήταν η σύγκριση 5 εμπορικών διαθέσιμων kit και της μεθόδου θερμικής λύσης για απομόνωση βακτηριακού DNA από τρόφιμα. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε 4 διαφορετικά είδη τροφίμων: ελιά, σταφίδα, αυγοτάραχο και μπέικον. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε (1) με την χρήση σπεκτροφωτομέτρου, με το οποίο ελέγχθηκε η καθαρότητα και την συγκέντρωση του απομονωμένου DNA, (2) με ηλεκτροφόρηση όπου ελέγχθηκε η ακεραιότητα του DNA και τέλος (3) με ενίσχυση - PCR ακολουθούμενη από ηλεκτροφόρηση αгарόζης. Αποδείχτηκε ότι η μέθοδος θερμικής λύσης και στα τέσσερα τρόφιμα δίνει καλύτερης καθαρότητας και υψηλότερης συγκέντρωσης DNA και παρουσία ζώνης μετά την αντίδραση της PCR.

Λέξεις κλειδιά

Βακτηριακό DNA, μέθοδος θερμικής λύσης, PCR, τρόφιμα

Εισαγωγή

Μέχρι πρόσφατα οι γνώσεις και η κατανόηση της ερευνητικής κοινότητας για τα μικροβιακά οικοσυστήματα βασιζόταν αποκλειστικά στις καλλιεργητικές μεθόδους. Λόγω της ανάγκης για γρήγορα αποτελέσματα, τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκαν οι μέθοδοι που βασίζονται στο DNA οι οποίες είναι ανεξάρτητες από τις καλλιέργειες. Αυτές οι μέθοδοι προσφέρουν την δυνατότητα ανίχνευσης μικροοργανισμών στα τρόφιμα, όπως επίσης και της κατανόησης των μικροβιακών τους κοινοτήτων (Ceuppens et al., 2014), (Mateus-Barros et al., 2019), (Quigley et al., 2012). Οι μέθοδοι που βασίζονται στο DNA έχουν υψηλή ειδικότητα, αναπαραγωγιμότητα, ευαισθησία, ταχύτητα και είναι οικονομικά αποδοτικές (Pinto et al., 2007). Το ζητούμενο είναι η εκχύλιση ακέραιου DNA επαρκούς συγκέντρωσης και καθαρότητας. Η λήψη ακέραιου DNA χωρίς αναστολές, κατάλληλου για την χρήση σε μεθόδους βασισμένες στο DNA αποτελεί ένα συχνό πρόβλημα όσον αφορά τα τρόφιμα, λόγω της παρουσίας αναστολέων όπως λίπη, πρωτεΐνες, ασβέστιο στο ίδιο το τρόφιμο (Quigley et al., 2012). Επίσης, προβλήματα στην εκχύλιση του DNA μπορούν να δημιουργηθούν και από άλλους παράγοντες όπως η ελλιπής κυτταρική λύση, η προσρόφιση του DNA σε κάποιο συγκεκριμένο υλικό, η ταυτόχρονη εκχύλιση του μαζί με ενζυματικούς αναστολές και η κατακερμάτιση ή βλάβη του DNA (Jara et al., 2008). Σήμερα υπάρχουν διαθέσιμα αρκετά εμπορικά kit εξαγωγής DNA. Στη συγκεκριμένη μελέτη στοχεύσαμε στην σύγκριση της αποτελεσματικότητας 5 εξ αυτών και ενός μη εμπορικού πρωτοκόλλου σε 4 διαφορετικά τρόφιμα.

Υλικά και Μέθοδοι

Είδη τροφίμων

Δείγματα ελιάς και σταφίδας αμέσως μετά τη συγκομιδή συλλέχτηκαν κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Δείγματα αυγοτάραχου συλλέχτηκαν σε αποστειρωμένες σακούλες αμέσως μετά το στάδιο του κερώματος. Επίσης, ελήφθησαν συσκευασμένα δείγματα bacon. Τα δείγματα (τρία για το κάθε τρόφιμο) αποθηκεύτηκαν στους -20°C, μέχρι να ξεκινήσει η διαδικασία απομόνωσης.

Μέθοδοι απομόνωσης βακτηριακού DNA

Έξι διαφορετικοί τρόποι απομόνωσης βακτηριακού DNA επιλέχθηκαν να δοκιμαστούν και να συγκριθούν μεταξύ τους. Χρησιμοποιήθηκαν πέντε εμπορικά ΚΙΤ και μία μέθοδο θερμικής λύσης: Nucleospin Plant II, QiAamp DNA Stool Mini kit, DNeasy Ultraclean Microbial kit, Nucleospin Tissue, Dneasy Mericon Food kit (Qiagen Ltd, Crawley, West Sussex, UK). Ακολουθήθηκαν οι οδηγίες των ΚΙΤ της εταιρείας Qiagen. Για την μέθοδο θερμικής λύσης (Ribeiro et al., 2016): 10gr τρόφιμου ομογενοποιήθηκαν με 90ml Brain Heart Infusion σε stomacher, 10 ml μεταφέρθηκαν σε falcon και τοποθετήθηκαν για επώαση στους 30°C για 18 ώρες. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 14.000g για 20 λεπτά. Το ίζημα μεταφέρθηκε σε erpendorf με 1ml αποστειρωμένο νερό και τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 100°C για 10 λεπτά. Επαναλήφθηκε η φυγοκέντρηση στα 1000g για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο αποθηκεύτηκε στους -20°C. Πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις για την κάθε μέθοδο ανά τρόφιμο.

Μέτρηση DNA και ηλεκτροφόρηση ελέγχου

Η ποσότητα του απομονωμένου DNA με τις έξι διαφορετικές μεθόδους αξιολογήθηκε αρχικά με τη χρήση σπεκτροφωτόμετρου για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης και της καθαρότητας (A260/280). Η ηλεκτροφόρηση αгарόζης (0.8% (w/v)) πραγματοποιήθηκε για να διαπιστωθεί η επιτυχής απομόνωση DNA ή ο κατακερματισμός του. Το gel φωτογραφήθηκε με σύστημα UVP.

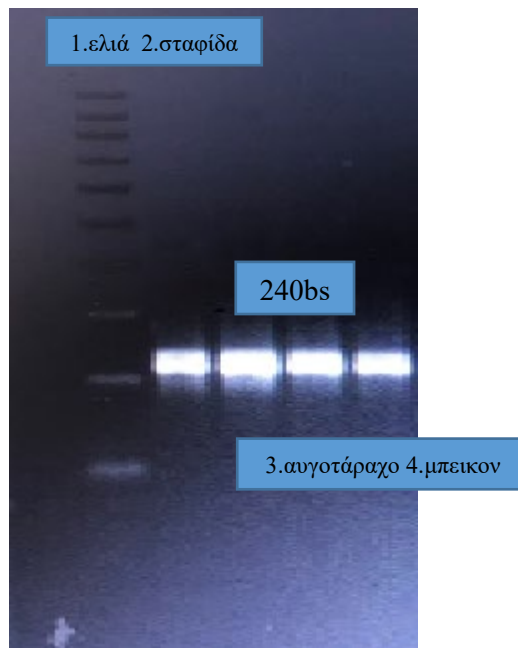
Αλσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Για την ενίσχυση της διατηρημένης V3 περιοχής του γονιδίου 16srRNA των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε PCR. Χρησιμοποιήθηκε το Kara Taq PCR kit σε μηχανήμα Thermocycler της Biorad για 30 κύκλους. Οι universal εκκινητές : GC338F (5'CGCCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGAC-TCCTACGGGAGGCAGCAG, Sigma, France) και 518R (5'ATTACCGCGGCTGCTGG, Sigma, France). Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση αгарόζης 2% (w/v). Το gel φωτογραφήθηκε με σύστημα UVP.

Αποτελέσματα

Πίνακας 1: Μέσος όρος συγκεντρώσεων και A260/280 των επαναλήψεων σε κάθε τρόφιμο με τους 6 διαφορετικούς τρόπους απομόνωσης. Παρουσία ζωνών ύστερα από την αντίδραση της PCR.

Τρόφιμο	Μέθοδος απομόνωσης	Συγκέντρωση ng/μL	260/280	16s ζώνη	Ακεραιότητα DNA
Ελιά	plant	17,9	1,3	+	Ακέραιο
Ελιά	tissue	28,7	1,59		Κατακερματισμένο
Ελιά	stool	7,9	1,55	+	Ακέραιο
Ελιά	microbial	5,2	1,3		Κατακερματισμένο
Ελιά	food mericon	7,2	1,5		Κατακερματισμένο
Ελιά	overheat	622,11	1,8	+	Ακέραιο
Αυγοτάραχο	plant	1492,66	1,9		Κατακερματισμένο
Αυγοτάραχο	tissue	102,25	1,2	+	Ακέραιο
Αυγοτάραχο	stool	571,5	2	+	Ακέραιο
Αυγοτάραχο	microbial	3,46	1,21		Κατακερματισμένο
Αυγοτάραχο	food mericon	15,2	1,6		Κατακερματισμένο
Αυγοτάραχο	overheat	862,2	1,8	+	Ακέραιο
Σταφίδα	plant	12,55	0,76	+	Ακέραιο
Σταφίδα	tissue	32	1,3		Κατακερματισμένο
Σταφίδα	stool	1,5	1,6		Κατακερματισμένο
Σταφίδα	microbial	5,9	1,4		Κατακερματισμένο
Σταφίδα	food mericon	2,25	1,3	+	Ακέραιο
Σταφίδα	overheat	565,1	1,8	+	Ακέραιο
Μπεικον	plant	10,2	1,5		Κατακερματισμένο
Μπεικον	tissue	7,9	1,4		Κατακερματισμένο
Μπεικον	stool	17,8	1,4	+	Ακέραιο
Μπεικον	microbial	4,9	1,5		Κατακερματισμένο
Μπεικον	food mericon	50,51	1,9	+	Ακέραιο
Μπεικον	overheat	211,1	1,9	+	Ακέραιο



Εικόνα 1. Ικανότητα απομόνωσης βακτηριακού DNA από 4 διαφορετικά τρόφιμα με την μέθοδο θερμικής λύσης (ηλεκτροφόρηση αγαρόζης 2% έπειτα από την PCR).

Παρατηρείται ότι η χρήση της θερμικής λύσης αποτελεί αποτελεσματική μέθοδο για την απομόνωση βακτηριακού DNA από την ελιά και τη σταφίδα. Όσον αφορά το αυγοτάραχο εξίσου αποτελεσματική με την θερμική λύση αποδεικνύεται και η εκχύλιση του DNA με το QiAamp DNA Stool Mini kit. Παρά την μεγάλη συγκέντρωση του DNA και την καθαρότητα του με τη χρήση Nucleospin Plant II συμπεραίνουμε από τις ηλεκτροφορήσεις ότι το DNA είναι κατακερματισμένο. Η χρήση της θερμικής λύσης και του Dneasy Mericon Food kit ήταν οι πιο αποτελεσματικές μέθοδοι για την απομόνωση βακτηριακού DNA από το μπέικον.

Συμπεράσματα

Η μέθοδος θερμικής λύσης αποδεικνύεται να είναι η πιο αποτελεσματική για την απομόνωση βακτηριακού DNA και από τα 4 διαφορετικά είδη τρόφιμου ως προς την καθαρότητα αλλά και ως προς την συγκέντρωση. Ακόμα, η παρουσία ζώνης σε όλα τα διαφορετικά δείγματα ύστερα από την PCR με την μέθοδο θερμικής λύσης τεκμηριώνει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Συμπεραίνουμε ότι μία απλή, οικονομική, γρήγορη μέθοδος χωρίς την απαίτηση εξειδικευμένων αντιδραστηρίων είναι πιο αποτελεσματική συγκριτικά με τα Kit που ελέγχθηκαν στα τέσσερα συγκεκριμένα τρόφιμα.

Βιβλιογραφία

- Ceuppens, S., Li, D., Uyttendaele, M., Renault, P., Ross, P., Ranst, M. Van, Cocolin, L., Donaghy, J., 2014. Molecular methods in food safety microbiology: Interpretation and implications of nucleic acid detection. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 13, 551–577. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12072>
- Jara, C., Mateo, E., Guillamón, J.M., Torija, M.J., Mas, A., 2008. Analysis of several methods for the extraction of high quality DNA from acetic acid bacteria in wine and vinegar for characterization by PCR-based methods. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 336–341. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.008>
- Mateus-Barros, E., Meneghine, A.K., Bagatini, I.L., Fernandes, C.C., Kishi, L.T., Vieira, A.A.H., Sarmiento, H., 2019. Comparison of two DNA extraction methods widely used in aquatic microbial ecology. *J. Microbiol. Methods* 159, 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.02.005>
- Pinto, A. Di, Forte, V.T., Guastadisegni, M.C., Martino, C., Schena, F.P., Tantillo, G., 2007. A comparison of DNA extraction methods for food analysis. *Food Control* 18, 76–80. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.08.011>
- Quigley, L., O’Sullivan, O., Beresford, T.P., Paul Ross, R., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D., 2012. A

comparison of methods used to extract bacterial DNA from raw milk and raw milk cheese. *J. Appl. Microbiol.* 113, 96–105. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05294.x>
Ribeiro, J.C., Tamanini, R., Soares, B.F., De Oliveira, A.M., De Godoi Silva, F., Da Silva, F.F., Augusto, N.A., Beloti, V., 2016. Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk. *Semin. Agrar.* 37, 3069–3078. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5p3069>

In vitro φωτοκαταλυτική αδρανοποίηση παθογόνων για την ανάπτυξη εναλλακτικών μεθόδων διαχείρισης Επικίνδυνων Ιατρικών Υγρών Αποβλήτων

Ιωάννης ΠΑΣΠΑΛΤΣΗΣ¹, Ειρήνη ΚΑΝΑΤΑ¹, Αικατερίνη ΔΑΟΥΤΗ¹, Αλίκη ΠΟΠΙΔΟΥ¹, Ζωή ΠΑΤΣΑΝΗ¹, Δάφνη ΔΟΔΟΠΟΥΛΟΥ¹, Χριστίνα-Νιόβη ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ¹, Δέσποινα ΧΑΡΙΤΑΚΗ², Μαρία ΤΕΡΖΙΔΟΥ², Αναστασία ΜΠΑΚΑ², Κωνσταντίνος ΞΑΝΘΟΠΟΥΛΟΣ¹, Δήμητρα ΝΤΑΦΟΥ², Μηνάς ΑΡΣΕΝΑΚΗΣ³, Θεόδωρος ΣΚΛΑΒΙΑΔΗΣ¹

¹Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Φαρμακευτικής, Τομέας Φαρμακογνωσίας-Φαρμακολογίας, Εργαστήριο Φαρμακολογίας, ipaspalt@pharm.auth.gr, ekanata@bio.auth.gr, amdaouti@pharm.auth.gr, alikipopid@pharm.auth.gr, zoipts@gmail.com, dododafn@pharm.auth.gr, papanikcd@pharm.auth.gr, xantho@pharm.auth.gr, sklaviad@pharm.auth.gr

²Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Εργαστήριο Βιολογίας Ανάπτυξης, charitakd@bio.auth.gr, mariterz@bio.auth.gr, bl01726@uoi.gr, dafoud@bio.auth.gr

³Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Εργαστήριο Γενικής Μικροβιολογίας, arsenaki@bio.auth.gr

Περίληψη

Τα επικίνδυνα ιατρικά υγρά απόβλητα (ΕΙΥΑ) προκύπτουν από τη λειτουργία υγειονομικών μονάδων. Περιέχουν επιβλαβή χημικά και μολυσματικούς παράγοντες και απαιτούν αδρανοποίηση πριν την τελική τους διάθεση. Οι αντιδράσεις φωτοκαταλυτικής οξείδωσης αξιοποιούν την ισχυρή οξειδωτική δράση ελευθέρων ριζών υδροξυλίου, που παράγονται κατά τις αντιδράσεις και προσβάλλουν μη επιλεκτικά όλες τις κατηγορίες παθογόνων και οργανικών ουσιών προς τελικό σχηματισμό CO₂ και ανόργανων ιόντων. Η κατεργασία ΕΙΥΑ με φωτοκαταλυτικές μεθόδους παρέχει τη δυνατότητα εναλλακτικών και φιλικών προς το περιβάλλον μεθόδων αδρανοποίησης των επικίνδυνων συστατικών τους. Παρουσιάζουμε αποτελέσματα που αφορούν τη βελτιστοποίηση και σύγκριση της αποτελεσματικότητας αντιδράσεων ομογενούς και ετερογενούς φωτοκατάλυσης για την αδρανοποίηση μικροοργανισμών και παθογόνων παραγόντων (βακτηριακά σπόρια, βακτήρια και prions) σε εργαστηριακή κλίμακα. Τα αποτελέσματά μας θα αξιοποιηθούν για την ανάπτυξη πρωτοκόλλων λειτουργίας ενός καινοτόμου συστήματος φωτοκαταλυτικής οξείδωσης (ΣΦΑ) στα πλαίσια βιομηχανικής έρευνας για την αποτελεσματική, οικονομική και φιλική προς το περιβάλλον επεξεργασία των ΕΙΥΑ.

Λέξεις-κλειδιά

Φωτοκαταλυτική οξείδωση, βακτήρια, σπόρια, prions, επικίνδυνα ιατρικά υγρά απόβλητα (ΕΙΥΑ)

Εισαγωγή

Η εφαρμογή φωτοκαταλυτικών μεθόδων για την αδρανοποίηση επιβλαβών ουσιών και μικροοργανισμών σε υγρά έχει αναφερθεί (Berberidou et al 2019, Berberidou et al 2012, Chatzitakis et al 2008, Paspaltsis et al 2006). Οι φωτοκαταλυτικές μέθοδοι στηρίζονται σε αντιδράσεις, που οδηγούν στην παραγωγή ριζών υδροξυλίου (HO•), το δεύτερο πιο ισχυρό οξειδωτικό μέσο στη φύση. Ανάλογα με το εάν ο χρησιμοποιούμενος καταλύτης είναι διαλυμένος ή βρίσκεται σε εναιώρημα, οι φωτοκαταλυτικές αντιδράσεις διακρίνονται σε ομογενείς και ετερογενείς. Η συγκριτική μελέτη ομογενών και ετερογενών φωτοκαταλυτικών αντιδράσεων ως προς την αποτελεσματικότητα αδρανοποίησης μικροοργανισμών/παθογόνων και η βελτιστοποίησή τους είναι το αντικείμενο της παρούσας εργασίας. Απώτερος σκοπός είναι η αξιοποίηση των αποτελεσμάτων για την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση εναλλακτικών και φιλικών προς το περιβάλλον πρωτοκόλλων απενεργοποίησης παθογόνων που περιέχονται σε υγρά νοσοκομειακά λύματα (ΕΙΥΑ).

Μέθοδοι

Εφαρμόστηκαν ομογενείς (photo-Fenton) και ετερογενείς (TiO₂) αντιδράσεις φωτοκατάλυσης. Το αντιδραστήριο Fenton (Fe⁺⁺ +H₂O₂) αποτελεί τον καταλύτη των ομογενών αντιδράσεων, η αποτελεσματικότητα των οποίων αυξάνεται με την επίδραση UV-A ακτινοβολίας (photo-Fenton).

Νανοδοματίδια διοξειδίου του τιτανίου (TiO₂ P25) και UV-A ακτινοβολία, χρησιμοποιήθηκαν στις ετερογενείς αντιδράσεις. Οι αντιδράσεις διενεργήθηκαν σε αντιδραστήρα αποτελούμενο από πέντε παράλληλες λυχνίες UV-A ακτινοβολίας (απόσταση 10 cm από τα δείγματα, ένταση ακτινοβολίας 4.59 mW cm⁻²). Παράγοντες βελτιστοποίησης που μελετήθηκαν αφορούσαν τη συγκέντρωση καταλύτη και H₂O₂. Μελετήθηκαν οι εξής μικροοργανισμοί/παθογόνα: α) πρότυπο στέλεχος *Staphylococcus aureus* (ATCC6538), β) σπόρια του προτύπου στελέχους *Bacillus stearothermophilus* (ATCC7953) και γ) prions (προσαρμοσμένο σε ποντίκια στέλεχος της scrapie, RML). Η αποτελεσματικότητα αδρανοποίησης εκτιμήθηκε με βάση τη μείωση του αρχικού τίτλου των μικροοργανισμών (αριθμός αποικιών). Στην περίπτωση των prion, η αποτελεσματικότητα της αδρανοποίησης εκτιμήθηκε *in vitro* κατόπιν κατεργασίας ομογενοποιημένου εγκεφάλου RML-μυός με τις υπό μελέτη μεθόδους. Στην περίπτωση αυτή προσδιορίστηκε η ένταση της ζώνης της παθολογικής PrP^{Sc} πρωτεΐνης (ανοσοσύτρωμα κατά Western). *In vivo* πειράματα για τον ακριβή προσδιορισμό της μείωσης του τίτλου των prions είναι σε εξέλιξη.

Αποτελέσματα

Η αποτελεσματικότητα των αντιδράσεων ομογενούς και ετερογενούς φωτοκατάλυσης ως προς την απενεργοποίηση των μικροοργανισμών/παθογόνων παρουσίασε παρόμοιο πρότυπο, συμφωνώντας με τη γενικότερη κατάταξη ως προς την ανθεκτικότητα απενεργοποίησής τους με συμβατικές μεθόδους αδρανοποίησης (prions>σπόρια>*Staphylococcus aureus*). Η ομογενής φωτοκατάλυση αποδείχθηκε πιο αποτελεσματική (μικρότερος απαιτούμενος χρόνος κατεργασίας για την επίτευξη του ίδιου βαθμού μείωσης του αρχικού τίτλου). Ωστόσο, βελτιστοποιήσεις που αφορούσαν την προσθήκη H₂O₂ στις ετερογενείς αντιδράσεις αύξησαν σημαντικά την αποτελεσματικότητα αδρανοποίησης και έδωσαν συγκρίσιμα αποτελέσματα με αυτά των ομογενών. Επιπρόσθετα, η χρήση χαμηλής και ενδιάμεσης συγκέντρωσης TiO₂ αποδείχθηκε πιο αποτελεσματική, πιθανόν λόγω σκέδασης της ακτινοβολίας που παρατηρείται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις του καταλύτη.

Συμπεράσματα

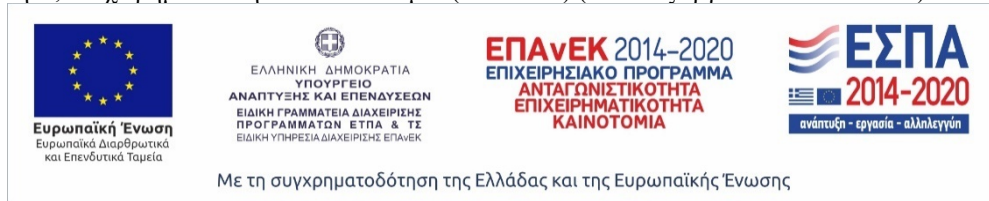
Τα αποτελέσματά μας καταδεικνύουν την αποτελεσματικότητα των φωτοκαταλυτικών μεθόδων στην αδρανοποίηση παθογόνων. Η ομογενής μέθοδος φαίνεται πιο αποτελεσματική, ωστόσο βελτιστοποιήσεις (προσθήκη H₂O₂) επιτρέπουν την αύξηση της αποτελεσματικότητας και των δυο μεθόδων. Ο χρόνος επεξεργασίας διαφέρει ανά περίπτωση και σχετίζεται με χαρακτηριστικά των υπό αδρανοποίηση στόχων (δομή, μέγεθος, σύσταση κυτταρικού τοιχώματος, μηχανισμοί αντιμετώπισης οξειδωτικού πλήγματος). Επεξεργασία τριών ωρών με τις βέλτιστες συνθήκες ομογενούς κατάλυσης είναι αποτελεσματική για την πλήρη αδρανοποίηση υψηλού αρχικού τίτλου σπορίων (μείωση κατά 6 λογαριθμικές μονάδες). Εφαρμογή της ίδιας μεθόδου για χρονικό διάστημα τεσσάρων ωρών αποδομεί την PrP πρωτεΐνη σε υλικό ομογενοποιημένου εγκεφάλου πειραματόζωου μολυσμένου με prion. Οι φωτοκαλυτικές μέθοδοι επιτρέπουν την αποτελεσματική αδρανοποίηση παθογόνων σε υγρά, με σχετικά μικρούς χρόνους κατεργασίας και χαμηλό κόστος. Τα δεδομένα θα αξιοποιηθούν για την ανάπτυξη πρωτοκόλλων λειτουργίας ενός συστήματος φωτοκαταλυτικής αδρανοποίησης ΕΙΥΑ στα πλαίσια βιομηχανικής έρευνας και την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητάς τους.

Βιβλιογραφία

- Berberidou C. et al. (2019). Photocatalytic disinfection and purification of water employing reduced graphene oxide/TiO₂ composites. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 94(12)
- Berberidou C. et al. (2012). Heterogenous photocatalytic inactivation of *B. stearothermophilus* endospores in aqueous suspensions under artificial and solar irradiation. *Applied Catalysis B: Environmental*. 125
- Chatzitakis A. et al. (2008). Photocatalytic degradation and drug activity reduction of Chloramphenicol. *Water Research* 42(1-2)
- Paspaltsis I. et al. (2006). Titanium dioxide photocatalytic inactivation of prions *Journal of general*

virology. 87(10)

«Η εργασία υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Δράσης ΕΡΕΥΝΩ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ – ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ συγχρηματοδοτήθηκε από το Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης (ΕΤΠΑ) της Ευρωπαϊκής Ένωσης και εθνικούς πόρους μέσω του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα & Καινοτομία (ΕΠΑνΕΚ) (κωδικός έργου:Τ1ΕΔΚ- 02678)»



Αξιοποίηση συνδυασμών γνωστών και νέων βιοδεικτών για τη διαφοροδιάγνωση νευροεκφυλιστικών διαταραχών

Αθανασία ΧΑΤΖΗΕΥΣΤΑΘΙΟΥ¹, Ειρήνη ΚΑΝΑΤΑ², Κωνσταντίνος ΞΑΝΘΟΠΟΥΛΟΣ², Κωνσταντίνος ΒΕΚΡΕΛΛΗΣ³, Matthias SCHMITZ⁴, Franc LLORENS⁵, Inga ZERR⁴, Δήμητρα ΝΤΑΦΟΥ¹, Θεόδωρος ΣΚΛΑΒΙΑΔΗΣ²

¹ Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Εργαστήριο Βιολογίας Ανάπτυξης, athkoncha@bio.auth.gr, dafoud@bio.auth.gr

² Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Φαρμακευτικής, Τομέας Φαρμακογνωσίας-Φαρμακολογίας, Εργαστήριο Φαρμακολογίας, ekanata@bio.auth.gr, xantho@pharm.auth.gr, sklaviad@pharm.auth.gr

³ Κέντρο Βασικής Έρευνας, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών, Ακαδημίας Αθηνών, vekrellis@bioacademy.gr

⁴ Πανεπιστημιακό Ιατρικό Κέντρο Γκέτινγκεν και Γερμανικό Κέντρο Νευροεκφυλιστικών Νόσων (DZNE), Τμήμα Νευρολογίας, matthias.schmitz@med.uni-goettingen.de, ingazerr@med.uni-goettingen.de

⁵ Κέντρο Βιοϊατρικής Έρευνας στο δίκτυο νευροεκφυλιστικών ασθενειών (CIBERNED), Ινστιτούτο Βιοϊατρικής Έρευνας Bellvitge (IDIBELL), franc.llorens@gmail.com

Περίληψη

Η εναπόθεση μη φυσιολογικών πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων είναι κοινό χαρακτηριστικό των νευροεκφυλιστικών διαταραχών (Neurodegenerative Disorders - NDs), που περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων τις νόσους Creutzfeldt-Jakob (CJD) και άλλες μεταδοτικές σπογγώδεις εγκεφαλοπάθειες (ασθένειες prion), Πάρκινσον (PD), Αλτσχάιμερ (AD), την Αμυοτροφική Πλευρική Σκλήρυνση (ALS) και άλλες Ταυοπαθίες. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανάπτυξη και καθιέρωση μεθόδου για τη διαφορική διάγνωση των NDs. Το εγχείρημα αυτό βασίζεται στην ανίχνευση πολλαπλών βιοδεικτών (νέων ή βιβλιογραφικά επικυρωμένων, πρωτεϊνικών ή/και μικρών RNA) στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και αίμα ασθενών αξιοποιώντας τις υπάρχουσες συμβατικές μεθόδους ανίχνευσης (ELISA, Western Blot, RT-QuIC) σε συνδυασμό με τεχνολογία αιχμής (Luminex™). Απώτερος στόχος είναι ο εντοπισμός κοινών και διαφορικών βιοδεικτών σε NDs που παρουσιάζουν παρόμοια κλινικά χαρακτηριστικά και άνοια διαφορετικών αιτιολογιών, έτσι ώστε να παρέχεται έγκαιρη διαφορική διάγνωση.

Λέξεις-κλειδιά

Νευροεκφυλισμός, πρωτεϊνικοί-νουκλεϊκοί βιοδείκτες, Luminex™

Εισαγωγή

Οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (NDs) χαρακτηρίζονται από τη συσσωμάτωση συγκεκριμένων πρωτεϊνών και μοιράζονται πολλές θεμελιώδεις διαδικασίες που σχετίζονται με προοδευτική νευρωνική δυσλειτουργία και θάνατο. Διαταραχές της ομοιοστάσης των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στις νευροεκφυλιστικές διαταραχές μπορεί να εκδηλωθούν πριν την έναρξη των κλινικών χαρακτηριστικών. Επιπλέον, είναι δυνατή η συνύπαρξη περισσότερων από μία νευροεκφυλιστικών νόσων στο ίδιο άτομο. Η ανίχνευση μη φυσιολογικά διαμορφωμένων πρωτεϊνών και συσσωματωμάτων τους και, η κυτταρική και νευροανατομική κατανομή τους διασφαλίζουν ειδική νευροπαθολογική διάγνωση. Η έγκαιρη και υψηλής βεβαιότητας διαφορική διάγνωση των NDs με την αξιοποίηση βιοδεικτών παρέχει τη δυνατότητα έγκαιρης θεραπευτικής παρέμβασης και αποτελεί πεδίο έντονου ερευνητικού ενδιαφέροντος. Εγκαθιδρυμένοι πρωτεϊνικοί δείκτες για τη διάγνωση των NDs είναι η tau και η Αβ(1-42), οι οποίες σχηματίζουν νευροϊνιδιακά συμπλέγματα (Neurofibrillary tangles – NFTs) και πλάκες αμυλοειδούς, αντίστοιχα, στη νόσο Αλτσχάιμερ, καθώς και η πρωτεΐνη 14-3-3, που αποτελεί δείκτη απόπτωσης των νευρώνων. Πρόσφατες τεχνολογίες επιτρέπουν επίσης την ανίχνευση της PrP^{Sc} -που αποτελεί ειδικό δείκτη των νόσων prion- καθώς και άλλων πρωτεϊνών που έχουν την τάση να σχηματίζουν συσσωματώματα, όπως είναι η α-συνουκλεΐνη, που εμπλέκεται στην παθολογία της νόσου Πάρκινσον (Constantinides et al. 2017). Η αξιοποίηση γνωστών και νέων βιοδεικτών για τη διαφοροδιάγνωση των NDs αποτελεί αντικείμενο εκτεταμένου ερευνητικού ενδιαφέροντος.

Μέθοδοι

Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY) ασθενών με νευροεκφυλιστικές διαταραχές των κατηγοριών Creutzfeldt-Jakob, Πάρκινσον και άλλες συνουκλεινοπάθειες, Αλτσχάιμερ και άλλες Ταυοπαθίες. Αναλύθηκαν μη αιμολυτικά δείγματα (Combur test), ώστε να διασφαλιστεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων (Barkovits et al. 2020). Εφαρμόστηκε η τεχνική Western Blot για την ανίχνευση της πρωτεΐνης 14-3-3, που είναι ενδεικτική για την επιβεβαίωση ύπαρξης νευροεκφυλισμού. Ακολούθως, εφαρμόστηκαν πρωτόκολλα ELISA ή/και Luminex™ για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση επιλεγμένων πρωτεϊνικών βιοδεικτών. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για την ανίχνευση της tau και της φωσφορυλιωμένης μορφής της (p-tau), της Αβ-42, της NFL (Neurofilament light chain), της YKL-40, της α-συνουκλείνης και της uPAR. Για τη διασφάλιση υψηλής βεβαιότητας διάγνωσης της νόσου sCJD εφαρμόστηκε η εξειδικευμένη τεχνική RT-QuIC που επιτρέπει την ανίχνευση της παθολογικής PrP^{Sc} στο ENY. Επιπλέον, αναπτύσσονται πρωτόκολλα για την ανάπτυξη και καθιέρωση πολυπλεκτικών μεθόδων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης αξιοποιώντας την τεχνολογία Luminex™. Οι αναλύσεις αυτές είναι γρήγορες, ακριβείς, ευαίσθητες, αναπαραγωγίμες, οικονομικές και δίνουν δυνατότητα για πολυπλεκτικά πρωτόκολλα ανίχνευσης έως 50 διαφορετικών βιομαρτύρων ταυτόχρονα, στο ίδιο δείγμα.

Αποτελέσματα

Η αποτελεσματικότητα της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε επιβεβαιώνεται από την ανάπτυξη της ικανότητας κατηγοριοποίησης των δειγμάτων σε πιο ευκρινείς κατηγορίες νευροεκφυλισμού ανάλογα με το πρότυπο βιομαρτύρων και τα κλινικά χαρακτηριστικά. Έτσι, καθίσταται δυνατή η διαφοροδιάγνωση της Creutzfeldt-Jakob από άλλες νευροεκφυλιστικές διαταραχές, όπως την Πάρκινσον και άλλες συνουκλεινοπάθειες και τη νόσο Αλτσχάιμερ. Πιο συγκεκριμένα, από καλά χαρακτηρισμένες κοόρτες δειγμάτων έχουν οριστεί τα όρια αποκοπής για αυξημένη βεβαιότητα διάγνωσης της sCJD για τους εξής βιομάρτυρες: t-tau > 1300pg/mL, p-tau/t-tau < 0.075, a-syn > 3300 pg/mL, NFL > 7000 pg/mL, YKL-40 > 315 ng/mL (Llorens et al. 2020). Αναφορικά με την uPAR, αν και είναι ακόμη σε πειραματικό στάδιο, ελέγχεται η αποτελεσματικότητά της ως χρήσιμος βιομάρτυρας σε ασθενείς με sCJD. Τα πρώτα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά, αλλά χρειάζεται μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων προκειμένου να ολοκληρωθεί η στατιστική ανάλυση.

Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης καταδεικνύουν την ανάγκη για εφαρμογή συνδυαστικής προσέγγισης μεταξύ των τεχνικών που ήδη εφαρμόζονται (ELISA, Western Blot και RT-QuIC) με μεθόδους νέας τεχνολογίας (Luminex™), προκειμένου να ενισχυθεί η ανίχνευση βιοδεικτών σε βιολογικό υλικό. Οι αναλύσεις Luminex στηρίζονται στη χρήση τεχνολογίας μαγνητικών σφαιριδίων παρέχοντας ως ανταγωνιστικό πλεονέκτημα μεγαλύτερη ακρίβεια και ευαισθησία. Αυτά, σε συνδυασμό με την χρήση σημαντικά μικρότερης ποσότητας δείγματος και τη δυνατότητα πολλαπλής ανίχνευσης βιομαρτύρων, καθιστά την τεχνολογία χρήσιμη και αναγκαία. Επιπλέον, δεδομένα από την ανάλυση εγκεφαλικών ιστών και βιολογικών υγρών μέσω τεχνικών ανάλυσης νέας γενιάς (New Generation Sequencing - NGS) παρέχουν τη δυνατότητα ανίχνευσης νέων βιοδεικτών. Πιο συγκεκριμένα, η εύρεση νέων μοριακών στόχων, τόσο πρωτεϊνικών όσο και νουκλεϊκών θα εμπλουτίσει την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία, ενώ ταυτόχρονα θα ευοδωθεί η αξιοποίηση τους μέσω της πολυπλεκτικής δυνατότητας της xMAP τεχνολογίας Luminex™. Απώτερος στόχος της παρούσας έρευνας είναι να επεκταθούν τα ήδη αναπτυγμένα πρωτόκολλα σε μεγαλύτερες κοόρτες ασθενών νευροεκφυλισμού, ώστε να εφαρμοστεί στατιστική ανάλυση που θα αποδώσει στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα, όπου συνδυαστικά με την εύρεση νέων βιοδεικτών θα επιτευχθεί αποτελεσματικότερος διαχωρισμός των ασθενειών.

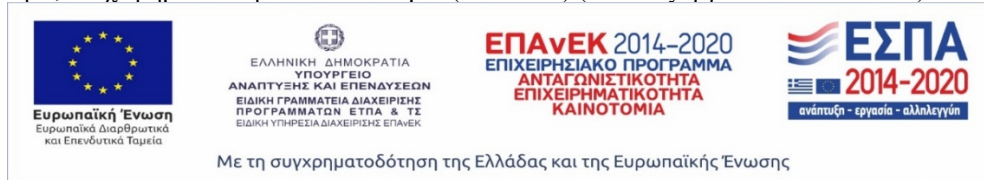
Βιβλιογραφία

- Constantinides V C. et al. (2017). CSF biomarkers β-amyloid, tau proteins and a-synuclein in the differential diagnosis of Parkinson. *Journal of the neurological sciences*, 382, 91-95.
- Barkovits K. et al. (2020). Blood Contamination in CSF and Its Impact on Quantitative Analysis of

Alpha-Synuclein. Cells, 9, 370.

Llorens F. et al. (2020). Diagnostic Accuracy of Prion Disease Biomarkers in Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob Disease. Biomolecules, 10, 290.

«Η εργασία υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Δράσης ΕΡΕΥΝΩ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ – ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ συγχρηματοδοτήθηκε από το Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης (ΕΤΠΑ) της Ευρωπαϊκής Ένωσης και εθνικούς πόρους μέσω του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα & Καινοτομία (ΕΠΑνΕΚ) (κωδικός έργου:Τ1ΕΔΚ- 03884)»



In vitro μελέτη της επίδρασης της νικοτίνης στα επίπεδα του μεμβρανικού ACE2

Ζωή ΖΑΓΟΡΙΤΗ, Ευαγγελία ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ, Κωνσταντίνα ΠΕΤΡΟΥΤΣΟΥ, Κωνσταντίνος ΦΑΡΣΑΛΙΝΟΣ, Κωνσταντίνος ΠΟΥΛΑΣ

Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Ανοσολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών,
zoizag@upatras.gr

Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Ανοσολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών,
evikonst24@gmail.com

Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Ανοσολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών,
konpetroutsou@gmail.com

Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Ανοσολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών,
kfarsalinos@gmail.com

Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Ανοσολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών,
kpoulas@upatras.gr

Περίληψη

Είναι γνωστό ότι ο ιός SARS-CoV-2 χρησιμοποιεί το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης τύπου 2 (ACE2) για να εισέλθει στα κύτταρα του οργανισμού. Ο ACE2 ανιχνεύεται στη μεμβράνη διαφόρων κυτταρικών τύπων, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων του αναπνευστικού επιθηλίου, τα οποία εκφράζουν, επίσης, τον νικοτινικό υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (nAChR). Ο ρόλος της νικοτίνης στα επίπεδα έκφρασης του μεμβρανικού ACE2 χρήζει διερεύνησης στα πλαίσια της νόσου COVID-19. Στην παρούσα μελέτη, τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ACE2 προσδιορίστηκαν ανά τακτά χρονικά διαστήματα, έπειτα από χορήγηση διαφόρων συγκεντρώσεων νικοτίνης στην κυτταρική σειρά A549, με χρήση της μεθόδου ELISA. Από τα εν εξελίξει πειράματά μας, φαίνεται ότι χαμηλές συγκεντρώσεις νικοτίνης, πιθανώς, συντελούν στην άμεση αύξηση της έκφρασης του ACE2, η οποία φθίνει με την πάροδο του χρόνου. Αντίθετα, η χορήγηση υψηλότερης δοσολογίας για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, επιφέρει μείωση των επιπέδων του μεμβρανικού ACE2. Περαιτέρω πειράματα είναι αναγκαία για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Λέξεις-κλειδιά

SARS-CoV-2, μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης τύπου 2 (ACE2), νικοτίνη, νικοτινικός υποδοχέας της ακετυλοχολίνης (nAChR)

Εισαγωγή

Το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης τύπου 2 (Angiotensin Converting Enzyme 2, ACE2) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, με δράση καρβοξυπεπτιδάσης που εκφράζεται σε διάφορους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του αναπνευστικού επιθηλίου (Hamming *et al.*, 2004). Εκτός της φυσιολογικής λειτουργίας του ACE2 ως αρνητικού ρυθμιστή του ενεργοποιημένου συστήματος ρενίνης – αγγειοτενσίνης – αλδοστερόνης, είναι γνωστό ότι η εξωκυττάρια περιοχή του ACE2 αλληλεπιδρά με υψηλή συγγένεια με τη γλυκοπρωτεΐνη Spike στην επιφάνεια του SARS-CoV-2, επιτρέποντας στον ιό να εισέλθει και να πολλαπλασιαστεί στα κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού (Hoffmann *et al.*, 2020).

Επιδημιολογικές μελέτες για τη νόσο COVID-19 που προκαλείται από τον SARS-CoV-2, έδειξαν χαμηλές τιμές επιπολασμού σε καπνιστές που έπασχαν από τη νόσο και έχρηζαν νοσοκομειακής περίθαλψης, συγκριτικά με το ποσοστό των καπνιστών στον γενικό πληθυσμό (Farsalinos, Barbouni and Niaura, 2020). Ωστόσο, *in vitro* μελέτες σχετικά με την πιθανή επίδραση της νικοτίνης ή του καπνού του τσιγάρου στα επίπεδα του μεμβρανικού ACE2 σε κύτταρα του αναπνευστικού επιθηλίου, έχουν οδηγήσει σε αντικρουόμενα αποτελέσματα (Caruso *et al.*, 2020; Russo *et al.*, 2020). Επιπλέον, η ανάλυση του ολικού μεταγραφώματος των επιθηλιακών κυττάρων των μικρών αεραγωγών (βρογχιολίων) έδειξε σημαντικά αυξημένη γονιδιακή έκφραση του ACE2 σε καπνιστές, σε σύγκριση με μη καπνιστές και πρώην καπνιστές (Leung *et al.*, 2020).

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση του ρόλου της νικοτίνης στα επίπεδα έκφρασης του μεμβρανικού ACE2 στην κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος A549, η οποία φέρει χαρακτηριστικά

κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων. Μελλοντικά, πρόκειται να αξιολογηθεί η επίδραση του καπνού του τσιγάρου, αλλά και του ατμού του ηλεκτρονικού τσιγάρου στην έκφραση του ACE2, με ανάπτυξη κυτταροκαλλιιεργειών σε air-liquid interface (ALI culture).

Μέθοδοι

Αρχικά, η κυτταρική σειρά A549 καλλιιεργήθηκε σε θρεπτικό μέσο DMEM, παρουσία ορού (10% FBS) και αντιβιοτικών πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης (1% v/v), στους 37° C, σε ατμόσφαιρα κορεσμένη με υδρατμούς και με σταθερή παροχή 5% CO₂. Η παρουσία του α7 νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (α7 nAChR) στα κύτταρα A549 προσδιορίστηκε μέσω της έκφρασης του *CHRNA7*, με τη μέθοδο της RT-PCR. Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η πιθανή κυτταροτοξική δράση της νικοτίνης και της α-μπουγκαροτοξίνης με τη χρωματομετρική μέθοδο MTT. Συγκεκριμένα, δοκιμάστηκαν οι συγκεντρώσεις 0,1μM, 1μM και 10μM νικοτίνης και α-μπουγκαροτοξίνης, αντίστοιχα, για 24 h κυτταρικής έκθεσης. Η α-μπουγκαροτοξίνη αποτελεί ανταγωνιστή της ακετυλοχολίνης. Τέλος, για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του μεμβρανικού ACE2 σε κύτταρα A549 εφαρμόστηκε ELISA (Human ACE2 SimpleStep ELISA® Kit της εταιρίας Abcam). Έπειτα από επίδραση με 0,1μM, 1μM, 10μM νικοτίνης, απουσία και παρουσία του ανταγωνιστή (συγχορήγηση 0,1μM νικοτίνης και 1μM α-μπουγκαροτοξίνης) για 1 h, 4 h και 8 h, ακολούθησε λύση των κυττάρων και απομονώθηκε το κυτταρικό εκχύλισμα.

Αποτελέσματα

Το *CHRNA7* που κωδικοποιεί την α7 υπομονάδα του nAChR, φάνηκε ότι μεταγράφεται σε σχετικά χαμηλά επίπεδα στην κυτταρική σειρά A549. Ο έλεγχος κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT έδειξε ότι στις δεδομένες συγκεντρώσεις, η νικοτίνη και η α-μπουγκαροτοξίνη δεν επηρεάζουν την κυτταρική βιωσιμότητα, έπειτα από 24 h έκθεσης.

Με βάση πρώιμα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης του μεμβρανικού ACE2 στα κυτταρικά εκχύλισματα που είχαν συλλεχθεί, μετά από επίδραση 0,1 μM νικοτίνης για 1 h, γεγονός που αναστάληκε παρουσία της α-μπουγκαροτοξίνης. Ωστόσο, έπειτα από μεγαλύτερους χρόνους επώασης με 0,1 μM νικοτίνης, τα επίπεδα του ACE-2 δε διέφεραν σημαντικά από το control. Αντιθέτως, η χορήγηση 10 μM νικοτίνης για χρονικό διάστημα > 1 h προκάλεσε μείωση της συγκέντρωσης του ACE2 στα A549 κύτταρα. Περαιτέρω πειράματα είναι απαραίτητα, ώστε να επιβεβαιωθούν τα παραπάνω ευρήματα.

Συμπεράσματα

Δεδομένης της αλληλεπίδρασης του ACE2 με τον SARS-CoV-2 και της επακόλουθης μόλυνσης των κυττάρων του αναπνευστικού επιθηλίου, είναι σημαντικό να αποσαφηνιστεί ο πιθανός ρόλος της νικοτίνης – η οποία καταναλώνεται ευρέως μέσω του καπνίσματος – στα επίπεδα του μεμβρανικού ACE2. Αρχικά πειράματα έχουν δείξει ότι υψηλότερες συγκεντρώσεις νικοτίνης (10 μM) πιθανώς να σχετίζονται με μειωμένα επίπεδα μεμβρανικού ACE2 στην επιφάνεια των A549 κυττάρων. Συγκριτικά πειράματα έκθεσης σε καπνό τσιγάρου ή ατμό ηλεκτρονικού τσιγάρου πρόκειται να πραγματοποιηθούν σε κύτταρα A549 που αναπτύσσονται σε καλλιέργεια ALI, στην οποία η άνω επιφάνεια των κυττάρων βρίσκεται σε επαφή με τον αέρα, προσομοιάζοντας στο επιθήλιο των αεραγωγών. Ο προσδιορισμός των επιπέδων του μεμβρανικού ACE2 και σε αυτές τις συνθήκες θα οδηγήσει σε ασφαλέστερα συμπεράσματα σχετικά με τον ρόλο της νικοτίνης και του καπνίσματος στη νόσο COVID-19.

Βιβλιογραφία

Caruso, M. *et al.* (2020) ‘Role of cigarette smoke on ACE-2 protein membrane expression in bronchial epithelial cells using an air-liquid interface model’. Preprints. doi: 10.20944/preprints202010.0114.v1.

Farsalinos, K., Barbouni, A. and Niaura, R. (2020) ‘Systematic review of the prevalence of current smoking among hospitalized COVID-19 patients in China: could nicotine be a therapeutic option?’, *Internal and Emergency Medicine*. Springer. doi: 10.1007/s11739-020-02355-7.

Hamming, I. *et al.* (2004) ‘Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis’, *Journal of Pathology*. Wiley-Blackwell, 203(2), pp. 631–637. doi: 10.1002/path.1570.

Hoffmann, M. *et al.* (2020) ‘SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor’, *Cell*. Cell Press, 181(2), pp. 271-280.e8. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.

Leung, J. M. *et al.* (2020) ‘ACE-2 expression in the small airway epithelia of smokers and COPD patients: implications for COVID-19’, *European Respiratory Journal*. European Respiratory Society (ERS), 55(5), p. 2000688. doi: 10.1183/13993003.00688-2020.

Russo, P. *et al.* (2020) ‘COVID-19 and Smoking. Is Nicotine the Hidden Link?’, *The European respiratory journal*. NLM (Medline). doi: 10.1183/13993003.01116-2020.

Έλεγχος της επίδρασης της επιμόλυνσης με Scrapie στην γονιδιακή έκφραση κυτταρικής σειράς νευροβλαστώματος (N2a) και μελέτη του ρόλου της μετα-μεταγραφικής τροποποίησης στοιχειοθεσίας του RNA μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης

Αλέξανδρος ΜΑΡΟΥΔΑΣ^{1*}, Γεώργιος ΧΑΔΙΟΣ^{1*}, Κωνσταντίνος ΞΑΝΘΟΠΟΥΛΟΣ², Ειρήνη ΚΑΝΑΤΑ², Θεόδωρος ΣΚΛΑΒΙΑΔΗΣ², Δήμητρα ΝΤΑΦΟΥ¹

¹Α.Π.Θ, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Γενετικής Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας amaroudas@bio.auth.gr, gchadios@bio.auth.gr, dafoud@bio.auth.gr

²Α.Π.Θ Τμήμα Φαρμακευτικής, Τομέας Φαρμακογνωσίας-Φαρμακολογίας, Εργαστήριο Φαρμακολογίας xantho@pharm.auth.gr, ekanata@bio.auth.gr, sklaviad@pharm.auth.gr.

*Ισάζια συμμετοχή

Περίληψη

Οι ασθένειες Prion είναι θανατηφόρες νευροεκφυλιστικές ασθένειες και χαρακτηρίζονται ως μεταδοτικές σπογγώδεις εγκεφαλοπάθειες και περιλαμβάνουν τη μετατροπή της φυσιολογικής Prion πρωτεΐνης (PrP^C) στην παθολογική αναδιπλούμενη ισομορφή PrP^{SC}. Η μελέτη επιμολυσμένων (scN2a) και μη (N2a) με scrapie νευροβλαστικών κυτταρικών σειρών χρησιμοποιείται ώστε να παρατηρηθούν συνέπειες της prion παθογένειας ή αντισταθμιστικοί μηχανισμοί έναντι αυτής. Για το σκοπό αυτό δημιουργήθηκαν και μελετήθηκαν προφίλ διαφορικής μεταγραφωματικής έκφρασης και επιγραφωματικών τροποποιήσεων των N2a και scN2a νευροβλαστικών κυτταρικών σειρών και αναδείχθηκε ο ρόλος της μετα-μεταγραφικής διαδικασίας της στοιχειοθεσίας του RNA σε κύτταρα με παθολογική αναδιπλούμενη ισομορφή PrP^{SC}.

Λέξεις-κλειδιά

Prions, N2a, RNA-seq, Στοιχειοθεσία RNA

Εισαγωγή

Ο νευροεκφυλισμός περιγράφει μια παθολογική κατάσταση που αναφέρεται στον εκφυλισμό ιστών και οργάνων (Amor et al., 2009), με τις ασθένειες Prion να επηρεάζουν τόσο τον άνθρωπο όσο και τα ζώα. Το βασικό γεγονός τέτοιων νοσημάτων είναι η μετατροπή της φυσιολογικής Prion πρωτεΐνης (PrP^C) στην παθολογική αναδιπλούμενη ισομορφή (PrP^{SC}) όπου συμβαίνει μετατροπή της α-έλικας της πρωτεΐνης σε β-ελάσματα με ταυτόχρονη αντίσταση της PrP^{SC} σε αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα (Pan et al., 1993), ώστε να αναπτύσσονται φαινόμενα απώλειας νευρώνων λόγω συσσωματωμάτων. Έχει αναδειχθεί ο ρόλος της μετα-μεταγραφικής τροποποίησης στοιχειοθεσίας του RNA στον νευροεκφυλισμό (Kanata et al., 2019) όπου παρατηρείται μετατροπή της αδενοσίνης (A) προς ινοσίνη (I) πάνω στο RNA, που καταλύεται από μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών ADAR καθώς και με την αλλαγή της κυτοσίνης (C) σε ουρακίλη (U) που καταλύεται από το ένζυμο Arobec1, μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών AID/APOBEC (Meusburger, Hengesbach, & Helm, 2011).

Μεθοδολογία

Συστοιχία Υλοποίησης Υπολογιστικών Αναλύσεων - AUPh High Performance Computing (HPC)

Για την διεκπεραίωση των παρακάτω εργασιών έγινε χρήση της Υπολογιστικής Συστοιχίας και των παρεχόμενων υπηρεσιών υποστήριξης του Κέντρου Ηλεκτρονικής Διακυβέρνησης του Α.Π.Θ.

Πρωτόκολλο γονιδιακής διαφορικής έκφρασης - Περιβάλλον εργασίας LINUX/R-Studio

Το πρωτόκολλο για την εύρεση διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων απαιτεί τα δεδομένα RNA-seq να στοιχίζονται στο γονιδίωμα αναφοράς με χρήση του λεγόμενου πακέτου TopHat. Το αποτέλεσμα χρησιμοποιείται ως είσοδος στο «πακέτο» Cufflinks όπου συναρμολογείται το μεταγράφομα, και τελικά μέσω Cuffdiff αποτυπώνεται η στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο αυτών καταστάσεων. Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων γίνεται μέσω R-Studio και χρήση της βιβλιοθήκης CummeRbund. Έπειτα για την εύρεση των μοριακών μηχανισμών και μονοπατιών που συνδέουν τα διαφορικά

εκφραζόμενα γονίδια χρησιμοποιήθηκε το δημόσια διαθέσιμο εργαλείο DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (Huang et al., 2009).

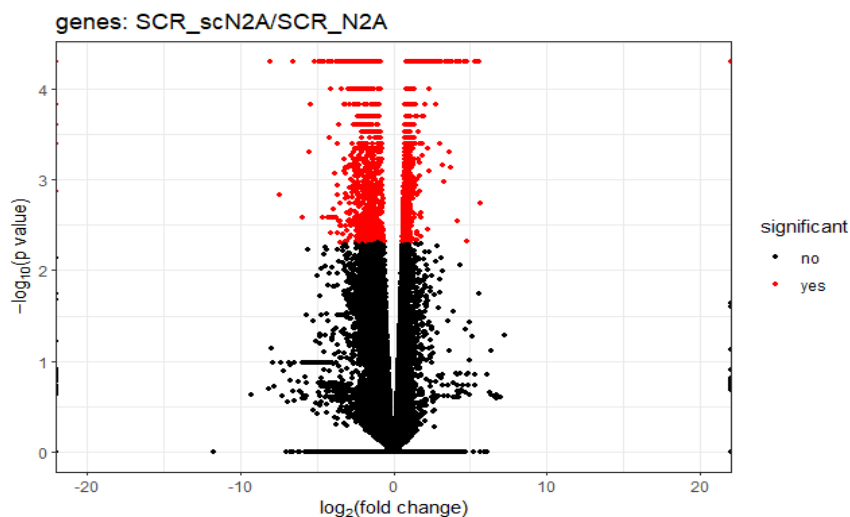
Πρωτόκολλο εύρεσης θέσεων στοιχειοθεσίας RNA - Περιβάλλον εργασίας LINUX/R-Studio

Προκειμένου να εντοπιστούν οι θέσεις όπου φέρεται να εμφανίζεται το φαινόμενο της στοιχειοθεσίας RNA χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό SPRINT (Zhang et al., 2017) όπου χρησιμοποιώντας δεδομένα RNA-seq και ένα γνωστό γονιδίωμα αναφοράς είμαστε να θέση να ανακαλύψουμε RNA Editing Sites. Η καινοτομία του SPRINT συγκριτικά με τις ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους εύρεσης θέσεων RNA Editing έγκειται στην αναγνώριση όλων των Single Nucleotide Variants (SNVs) και ταυτόχρονο φιλτράρισμα των Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs).

Αποτελέσματα

Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης

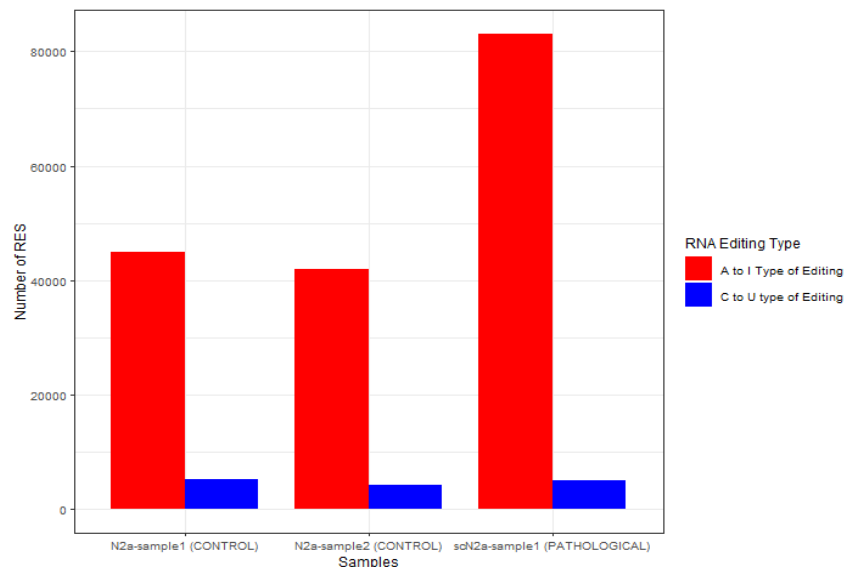
Αρχικά τέθηκε το ερώτημα πόσο αλλάζει η γονιδιακή έκφραση των N2a κυττάρων σε συνθήκες νευροεκφυλισμού. Έτσι, συγκρίθηκαν τα προφίλ έκφρασης των δύο καταστάσεων, επιμολυσμένων και μη με scrapie και βρέθηκαν 2011 διαφορετικά εκφραζόμενα γονίδια, αποδεικνύοντας ότι η γονιδιακή έκφραση επηρεάζεται σημαντικά (**Εικόνα 1**). Έπειτα με χρήση του DAVID ερευνήθηκαν τα μονοπάτια όπου εμπλέκονται και βρέθηκε να συνδέονται με κυτταρικό κύκλο και λειτουργία πρωτεασώματος με το p-value να προκύπτει ότι είναι $3,18 \cdot 10^{-12}$ και $3,4 \cdot 10^{-8}$ αντίστοιχα. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τα δεδομένα που προκύπτουν από την βιβλιογραφία για την παθολογική αναδιπλούμενη ισομορφή PrP^{Sc} η οποία φέρει ανθεκτικότητα στην αποδόμηση από το πρωτεάσωμα.



Εικόνα 1. Διάγραμμα Volcano των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων (κουκκίδες) ανάμεσα σε Control (SCR_N2a) και επιμολυσμένων με scrapie κυττάρων (SCR_scN2a). Ο κάθετος άξονας αναπαριστά την σημαντικότητα των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων με τις υψηλότερες θέσεις να αναπαριστούν τα πιο σημαντικά γονίδια (κόκκινες κουκκίδες) ενώ ο οριζόντιος άξονας αναπαριστά τα επίπεδα αλλαγής στην έκφραση αυτών με την δεξιά πλευρά να αναπαριστά τα υπερεκφραζόμενα γονίδια ενώ η αριστερή τα υποεκφραζόμενα

Ανάλυση των RESs (RNA Editing Sites)

Από την εύρεση θέσεων RNA editing (RESs) που ανακαλύφθηκαν από το SPRINT προκύπτει ότι οι A-to-I αντικαταστάσεις αυξάνονται στην κατάσταση νευροεκφυλισμού αποδεικνύοντας ότι το πρότυπο RNA Editing μεταβάλλεται σε παθολογικές συνθήκες αντίθετα δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές που να ισχύουν για τις C-to-U τροποποιήσεις (**Εικόνα 2**).



Εικόνα 2. Πλήθος A-I και C-U RNA Editing Sites σε control (N2a) και επιμολυσμένα με scrapie (scN2a) δείγματα

Συμπεράσματα

Από τις παραπάνω αναλύσεις προκύπτει ότι το προφίλ έκφρασης των N2a κυττάρων μεταβάλλεται σε συνθήκες νευροεκφυλισμού και οι αλλαγές αυτές σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο και τις λειτουργίες του πρωτεασώματος. Όσον αφορά στην μετα-μεταγραφική διαδικασία στοιχειοθεσίας του RNA παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της A-to-I RNA στοιχειοθεσίας στα επιμολυσμένα με scrapie δείγματα (scN2a) κάτι που προδίδει την πιθανή επίδραση της σε κατάσταση νευροεκφυλισμού. Τέλος, ενδιαφέρουσα θα μπορούσε να είναι μελλοντικά η εύρεση των C-to-U θέσεων που εμφανίζονται σε κύτταρα με μειωμένη έκφραση του APOBEC1 ενζύμου τόσο σε φυσιολογική όσο και παθολογική κατάσταση, καθώς και η συσχέτιση τους με τα διαφορετικά εκφραζόμενα γονίδια μεταξύ των καταστάσεων, ώστε να ερευνηθεί ο ρόλος του APOBEC1-διαμεσολαβούμενου RNA editing στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

Βιβλιογραφία

- Amor A., (2009). Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology*, 129, 154-169.
- Huang W., (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, 4, 44-57.
- Kanata E., (2019). RNA editing alterations define manifestation of prion diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116, 19727-19735
- Meusburger M., (2011). A post-labeling approach for the characterization and quantification of RNA modifications based on site-directed cleavage by DNAzymes. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 718, 259-270.
- Pan K.M., (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 10962-10966.
- Zhang F., (2017). SPRINT: an SNP-free toolkit for identifying RNA editing sites. *Bioinformatics*, 33, 3538-3548.

«Η εργασία υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Δράσης ΕΡΕΥΝΩ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ – ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ συγχρηματοδοτήθηκε από το Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης (ΕΤΠΑ) της Ευρωπαϊκής Ένωσης και εθνικούς πόρους μέσω του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα & Καινοτομία (ΕΠΑνΕΚ) (κωδικός έργου:Τ1ΕΔΚ- 03884)»



Ανίχνευση γενετικών δεικτών, με χρήση φθορισμικού υβριδισμού (FISH), στις νεοπλασίες και αξιοποίησή τους στην κλινική πράξη

Αλεξάνδρα ΠΑΠΑΚΩΣΤΑ M.Sc¹, Δήμητρα ΜΙΧΑΛΗ MD²,
 Αναστάσιος ΚΥΡΙΑΖΟΓΛΟΥ MD Ph.D³, Λουΐζα ΜΑΧΑΙΡΑ Ph.D¹,
 Φραγκίσκη ΑΝΘΟΥΛΗ ΑΝΑΓΝΩΣΤΟΠΟΥΛΟΥ MD Ph.D⁴, Ελένη ΡΙΖΟΥ Ph.D¹

1. Τμήμα Γενετικής, ΠΑΟΝΑ «ο Άγιος Σάββας».
2. Ιατρική Σχολή Πανεπιστήμιο Κρήτης.
3. Β' Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική, Π.Γ.Ν. «Αττικόν».
4. Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Περίληψη

Η γονιδιακή επέκταση είναι μία από τις γενετικές αλλαγές των νεοπλασματικών κυττάρων η οποία αξιοποιείται συχνά στην κλινική πρακτική. Για συγκεκριμένα γονίδια, σε περιπτώσεις καρκινωμάτων, καθορίζει την πρόγνωση και τη θεραπευτική αντιμετώπιση του ασθενούς ενώ στους μεσεγχοματογενείς όγκους αποτελεί έναν αξιόπιστο δείκτη για την ορθή ιστολογική ταξινόμησή τους. Η συνήθης μεθοδολογική προσέγγισή για την ανίχνευση γονιδιακής επέκτασης στην κλινική ρουτίνα είναι η τεχνική του φθορισμικού υβριδισμού (FISH).

Λέξεις-κλειδιά

γονιδιακή επέκταση, ογκογονίδια, FISH, λιποσάρκωμα, νευροβλάστωμα, λίπωμα, *MYCN*, *MDM2*

Εισαγωγή

Η γονιδιακή επέκταση, δηλαδή η δημιουργία πολλαπλών αντιγράφων ενός γονιδίου αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς με τους οποίους ένα αρχικά φυσιολογικό γονίδιο (πρωτοογκογονίδιο) που ρυθμίζει κυτταρικές λειτουργίες πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης, μετατρέπεται σε ογκογονίδιο και συντελεί στην καρκινική εξαλλαγή. Ενδεικτικά τέτοιου είδους ογκογονίδια είναι το *HER-2* στα καρκινώματα του μαστού [Loibl & Gianni 2017], το *AKT1* στον καρκίνο των ωοθηκών, καθώς και τα *MYCN* και *MDM2* στο νευροβλάστωμα και το λιποσάρκωμα αντίστοιχα.

Σκοπός

Η ανίχνευση μέσω FISH ανάλυσης της γονιδιακής επέκτασης των γονιδίων *MYCN* και *MDM2* σε περιστατικά συμπαγών όγκων και η αξιοποίηση των αποτελεσμάτων στη κλινική πράξη.

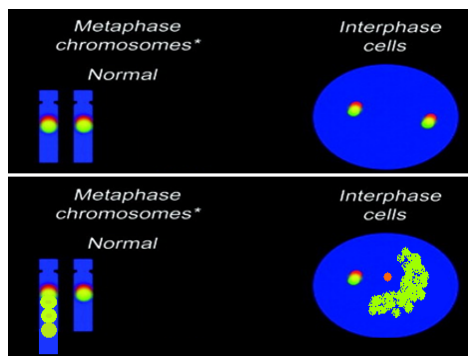
Υλικά

Πραγματοποιήθηκε γενετική ανάλυση για ύπαρξη γονιδιακής επέκτασης σε 20 περιστατικά συμπαγών όγκων. Σε 9 όγκους μεσεγχοματογενούς προέλευσης για το γονίδιο *MDM2* & σε 11 όγκους γλοιοβλαστώματος για το *MYCN*. Τα περιστατικά προέρχονταν από τα Νοσοκομεία Παίδων « η Αγία Σοφία» και το Ογκολογικό Νοσοκομείο «ο Άγιος Σάββας».

Μεθοδολογία

Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε «FISH ειδικών στόχων» με 2 διαφορετικούς ιχνηθέτες σημασμένους με διαφορετικά φθοριοχρώματα. Ένας, με πράσινο, που υβριδοποιείται με το προς έλεγχο γονίδιο και ένας δεύτερος, με κόκκινο, για περιοχική εσωτερικού μάρτυρα (εικ.1). Η υβριδοποίηση έγινε σύμφωνα με το προτεινόμενο πρωτόκολλο του προμηθευτή των αντιδραστηρίων (Zytovision 2020). Μαζί με τα δείγματα υβριδοποιήθηκε και φυσιολογικός ιστός ως αρνητικό control. Συνοπτικά τα βήματα ήταν: 1.επίστρωση τομής 4μm από το υλικό βιοψίας σε αντικειμενοφόρο. 2.Αποπαραφίνωση με ξυλόλη. 3.Πρωτεόλυση με ενζυμική μεταχείριση. 4.Υβριδοποίηση. 4.Έκλυση της περίσσειας του ιχνηθέτη και αντιχρώση με DAPI διάλυμα. 7.Μικροσκοπική παρατήρηση 8.Μέτρηση τουλάχιστον 100 πυρήνων με σήματα υβριδισμού ακολουθώντας τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης Κυτταρογενετιστών.(ECA 2012) 9.Εκδοση αποτελέσματος με βάση το κατώτατο όριο θετικότητας.

Η γονιδιακή επέκταση ορίστηκε ως: α) «μετρίου βαθμού» (+) αν πλέον του 25% των εξετασθέντων πυρήνων είχε πενταπλάσια έως δεκαπλάσια σήματα (πράσινο) για το γονίδιο σε σχέση με τα σήματα (κόκκινο) του εσωτερικού μάρτυρα β) «υψηλού βαθμού» (++) αν πλέον του 25% των εξετασθέντων πυρήνων είχε περισσότερα από δεκαπλάσια (συντά και 100πλάσια) σήματα του γονιδίου σε σχέση με τον μάρτυρα γ) «απουσία» (-) αν ο λόγος σημάτων γονιδίου/μάρτυρα ήταν ίσος ή μικρότερος του 2 για την πλειοψηφία των σεσημασμένων πυρήνων



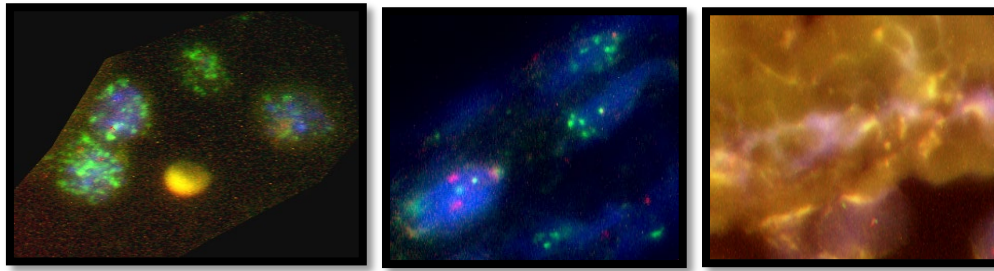
Εικόνα 1. Σχηματικά FISH ομαλών πυρήνων (πάνω) και πυρήνων με πολλαπλά σήματα (κάτω) για γονίδιο σημασμένο με πράσινο ιχνηθέτη

Αποτελέσματα

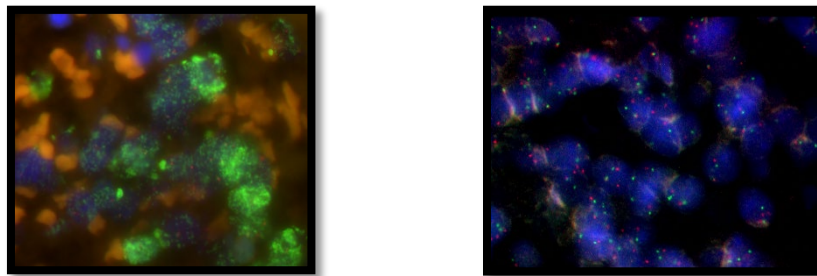
Τα αποτελέσματα της γενετικής ανάλυσης και τα αντίστοιχα κλινικά συμπεράσματα συνοψίζονται στον πίνακα 1. Στις εικόνες 2,3 παρουσιάζονται χαρακτηριστικά αποτελέσματα υβριδισμού για τα *MDM2* και *MYCN* γονίδια αντίστοιχα και τα εξαχθέντα κλινικά συμπεράσματα

ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΠΕΚΤΑΣΗ	ΠΛΗΘΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ-ΚΛΙΝΙΚΟ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ
(?) <i>MDM2</i>	1	Αδυναμία περάτωσης του υβριδισμού λόγω ακαταλληλότητας της τομής (βλέπε εικόνα 2)
(-) <i>MDM2</i>	3	απουσία γονιδιακής επέκτασης / το περιστατικό πιθανότατα είναι άτυπο λίπωμα
(+) <i>MDM2</i>	2	Ήπιου βαθμού γονιδιακή επέκταση / το περιστατικό πιθανότατα είναι λιποσάρκωμα/ (βλέπε εικόνα 2)
(++) <i>MDM2</i>	3	Παρουσία υψηλού βαθμού γονιδιακής επέκτασης/ η διαφοροδιάγνωση συνηγορεί υπερ λιποσάρκωματος (βλέπε εικόνα 2)
(?) <i>MYCN</i>	1	ήπιου βαθμού γονιδιακή επέκταση στο 15% των πυρήνων που είναι το κατώτατο κατώφλι/ ασαφές αποτέλεσμα
(-) <i>MYCN</i>	5	απουσία γονιδιακής επέκτασης/καλό προγνωστικό στοιχείο σε περίπτωση νευροβλαστώματος
(+) <i>MYCN</i>	1	Ήπιου βαθμού γονιδιακή επέκταση / γλοιοβλάστωμα ενδιάμεσης πρόγνωσης
(++) <i>MYCN</i>	4	Μεγάλου βαθμού γονιδιακή επέκταση / γλοιοβλάστωμα με κακή πρόγνωση

Πίνακας 1. αποτελέσματα μελέτης



Εικόνα 2. Γονιδιακή επέκταση *MDM2* γονιδίου, υψηλού βαθμού (αριστερά), μετρίου (κέντρο), ακατάλληλο υλικό και αδυναμία υβριδοποίησης (δεξιά)



Εικόνα 3. Γονιδιακή επέκταση *MYCN* υψηλού βαθμού (αριστερά) και απουσία (δεξιά)

Συζήτηση

Το FISH ειδικών στόχων έδωσε κλινικά αξιοποιήσιμα στοιχεία σε σύντομο χρόνο αποδεικνύοντας ότι είναι η κατάλληλη επιλογή για ανίχνευση γονιδιακής επέκτασης σε βιοπτικό υλικό. Στο περιστατικό όπου ο υβριδισμός δεν έδωσε αποτέλεσμα, αναδεικνύεται η σημασία ορθής τεχνικής προετοιμασίας του δείγματος (καλός εγκλεισμός του ιστού στην παραφίνη ή/και κατάλληλο πάχος τομής). Ένα αποτέλεσμα ήταν στο κατώτατο όριο θετικότητας και τέτοια περιστατικά, με οριακές τιμές, μπορούν εύκολα να χαρακτηριστούν ψευδώς αρνητικά ή θετικά. Σε αυτές τις περιπτώσεις όπου το αποτέλεσμα είναι επισφαλές, λόγω περιορισμών της μεθοδολογίας, θα πρέπει να επιβεβαιωθεί και με άλλη τεχνική. Επίσης το κατώφλι θετικού ορίου (threshold) θα πρέπει να επιβεβαιώνεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα με διαδικασίες ελέγχου και με αρνητικούς και θετικούς μάρτυρες.

Στα 5 περιστατικά όπου ανιχνεύτηκε γονιδιακή επέκταση του *MDM2* ογκογονιδίου αποσαφηνίστηκε ότι το περιστατικό ήταν λιποσάρκωμα και όχι άτυπο λίπωμα. Επομένως το «καλά διαφοροποιημένο λιποσάρκωμα», όγκος ενδιάμεσης κακοήθειας, διαθέτει γενετικό δείκτη για την διαφορική του διάγνωση και αυτός είναι η παρουσία μέτριας ή υψηλής γονιδιακής επέκταση στη χρωμοσωμική περιοχή 12q13-q15 όπου εδράζεται το γονίδιο *MDM2* (Sandberg 2004). Γενικά στους μεσεγχυματογενείς όγκους, η γενετική ανάλυση έχει αποκαλύψει τα τελευταία χρόνια διαγνωστικούς δείκτες που επικυρώνουν τη βιοψία. Εκτός από τη γονιδιακή επέκταση υπάρχουν και άλλου είδους γενετικές αλλαγές χαρακτηριστικές στα σαρκώματα με πιο συνήθεις την παρουσία χιμαιρικών γονιδίων που έχουν προέλθει από ανακατατάξεις της γενετικής αλληλουχίας φυσιολογικών γονιδίων (πχ *EWS-FLI* και *SYT-SSX1* στα σαρκώματα Ewing και Συνοβιοσάρκωμα αντίστοιχα) ή και μεταλλάξεις γονιδίων (πχ *C-KIT*, *PDGFRA* στους γαστρεντερικούς στρωματικούς όγκους). Κάθε νέο γενετικό δεδομένο βοηθά όχι μόνο στη διάγνωση της, ιστολογικά, ετερογενούς αυτής ομάδας μεσεγχυματογενών όγκων αλλά δίνει και χρήσιμες πληροφορίες για την καλύτερη θεραπευτική αντιμετώπισή τους.

Γονιδιακή επέκταση του *MYCN* γονιδίου ανιχνεύτηκε σε 5 από τα συνολικά 11 εξετασθέντα νευροβλαστώματα ενώ σε ένα δείγμα, όπως προαναφέρθηκε, το αποτέλεσμα ήταν οριακό. Τα νευροβλαστώματα είναι όγκοι με διαφορετική επιθετικότητα. Όγκοι με υψηλού βαθμού γονιδιακή επέκταση του *MYCN* έχουν συσχετιστεί με κακή πρόγνωση, ενώ εντοπισμένα νευροβλαστώματα με αριθμητικές μόνο χρωμοσωμικές ανωμαλίες, σε ηλικίες κάτω του ενός έτους, θεωρούνται καλής πρόγνωσης. Γίνεται κατανοητό ότι η ανίχνευση συγκεκριμένων γενετικών αλλαγών καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τις θεραπευτικές επιλογές και την κλινική πορεία του ασθενούς με νευροβλάστωμα.

(Brodeur et al. 1984). Γονιδιακή επέκταση του MYCN έχει επίσης ανιχνευτεί και σε άλλες κατηγορίες νευρογενών όγκων (όπως μυελοβλάστωμα, γλοιώμα) καθώς και σε λεμφώματα. Η σπουδαιότητα της γενετικής πληροφορίας στην αντιμετώπιση της νεοπλασίας είναι πλέον εμφανής. Για το λόγο αυτό η γενετική ανάλυση συνεχίζεται, με τις πλέον σύγχρονες μεθοδολογικές προσεγγίσεις (πχ NGS), με τελικό σκοπό να βρεθεί το ακριβές γενετικό προφίλ κάθε όγκου, να υπάρξουν αποτελεσματικότεροι θεραπευτικοί στόχοι ώστε να γίνει πραγματικότητα η εξατομικευμένη θεραπεία του ασθενούς.

Συμπεράσματα

1. Η γονιδιακή επέκταση των γονιδίων *MDM2* και *MYCN* αποτελεί χρήσιμο κλινικό δείκτη για τη διαφορική διάγνωση και ιστολογική κατάταξη των μεσεγχυματογενών όγκων και την πρόγνωση των νευροβλαστωμάτων.
2. Το FISH ειδικών στόχων ενδείκνυται για την ανίχνευση γονιδιακής επέκτασης στην κλινική πράξη .
3. Ο συνδυασμός και η επιλογή κατάλληλων γενετικών τεχνικών καθώς και η συνεργασία των Εργαστηρίων εγγυάται την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.
4. Η προσπάθεια εύρεσης επιπλέον γενετικών δεικτών – θεραπευτικών στόχων συνεχίζεται

Βιβλιογραφία

- G M Brodeur et al (1984). Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 08 Jun 1984: Vol. 224, Issue 4653, pp. 1121-1124
- E.C.A. - European Cytogeneticists Association (2012) https://www.e-c-a.eu/files/downloads/Guidelines/E-C-A_Recommendations_FISH-on-Histological-Sections-of-Solid-Tumors.pdf
- Loibl S & Gianni L (2017).HER2-positive breast cancer. *The Lancet*, 17–23 June 2017, volume 389, Issue 10087, pp. 2415-2429
- Sandberg AA (2004). Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: liposarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* . 2004 Nov;155(1): pp1-24
- Zytovision (2020): <https://www.zytovision.com/products/zytolight/z-2013>

Τα αιμοπετάλια ως ρυθμιστές του πολλαπλασιασμού, της κυτταρικής μοίρας και του αγγειακού συστήματος στη νευροβλαστική φωλιά της Υποεπενδυματικής Ζώνης (YEZ) στον ενήλικο εγκέφαλο ποντικών.

Δημήτριος ΛΑΓΟΓΙΑΝΝΗΣ^{1*}, Χριστίνα ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ¹, Cedric GHEVAERT², Ηλίας ΚΑΖΑΝΗΣ^{1,3}

¹Εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Ρίο, Ελλάδα

²Wellcome Trust- MRC Cambridge Stem Cell Institute & Department of Hematology, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom

³Wellcome Trust- MRC Cambridge Stem Cell Institute & Department of Clinical Neurosciences, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom

* dimitrislagogiannisbio@gmail.com

Περίληψη

Σε προηγούμενη ερευνητικής εργασίας μας αναδείχθηκε η ιδιότητα των αιμοπεταλίων να συσσωρεύονται στο αγγειακό σύστημα της βλαστικής φωλιάς της Υποεπενδυματικής Ζώνης (YEZ), ύστερα από μεσολοβιακές απομυελινώσεις, επάγοντας ταυτόχρονα αύξηση της επιβίωσης των ενήλικων νευρικών βλαστικών κυττάρων. Εδώ μελετάμε εκτενέστερα το μικροπεριβάλλον της YEZ με τη χρήση διαγονιδιακών ζωικών μοντέλων θρομβοκυτταροπενίας (μύες *Crlf3*^{-/-}) και θρομβοκυτταροφιλίας (μύες *Jak2* V6) μία εβδομάδα μετά από απομυελίνωση στο μεσολόβιο του ενός ημισφαιρίου. Σε παχιές τομές που ελήφθησαν έγινε ανοσοϊστοχημική χρώση για laminin (δείκτης ενεργοποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων), PCNA (δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού), Olig2 (δείκτης ολιγοδενδρογλοιακής μοίρας) και GFAP (δείκτης αστρογλοιακής μοίρας). Τα αποτελέσματά μας έδειξαν μείωση των επιπέδων laminin στα τραυματισμένα ημισφαίρια των διαγονιδιακών μυών σε σύγκριση με τους μυς αγρίου τύπου, ενώ οι υπόλοιποι δείκτες δεν άλλαξαν, φανερώνοντας έτσι έναν πρωταρχικό υποκείμενο ρόλο των αιμοπεταλίων στη διαμόρφωση και λειτουργία του αγγειακού συστήματος της YEZ.

Λέξεις-κλειδιά

Υπόεπενδυματική Ζώνη, αιμοπετάλια, αγγειακό σύστημα, νευροβλαστικά κύτταρα, κυτταρικός πολλαπλασιασμός

Εισαγωγή

Η Υπόεπενδυματική Ζώνη που εδράζει στο πλάγιο τοίχωμα των πλαγίων κοιλιών του εγκεφάλου, αποτελεί μια φωλιά (niche) νευρικών βλαστικών κυττάρων με ιδιαίτερη δυναμική πολλαπλασιασμού και κυτταρικής διαφοροποίησης. Σε προηγούμενη ερευνητική εργασία μας (Kazanis et al. 2015) δείξαμε: α) ότι ως απόκριση σε μεσολοβιακές απομυελινώσεις αιμοπετάλια συσσωρεύονται στο τοπικό αγγειακό σύστημα, και β), πως αιμοπεταλιακοί παράγοντες αυξάνουν την επιβίωση των ενήλικων νευρικών βλαστικών, *in vitro*.

Μέθοδοι

Εδώ προεκτείνουμε την παραπάνω έρευνα, μελετώντας τις πιθανές αλλαγές που επιφέρουν στη λειτουργία και τη δομή της YEZ η περίσσεια (μύες *Jak2* V6) ή η έλλειψη (μύες *Crlf3*^{-/-}) αιμοπεταλίων στην κυκλοφορία, μετά από απομυελίνωση του μεσολοβίου με έγχυση λυσολεκθίνης. Πραγματοποιήθηκαν ιστολογικές αναλύσεις σε εγκεφαλικό ιστό διαγονιδιακών μυών και μυών αγρίου τύπου μια εβδομάδα μετά τον τραυματισμό. Η ανάλυση έγινε με ανοσοϊστοχημικές χρώσεις σε παχιές τομές για δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού (PCNA), κυτταρικής μοίρας (Olig2, GFAP) και ενεργοποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων των αιμοφόρων αγγείων (laminin).

Αποτελέσματα

Στο τραυματισμένο ημισφαίριο των μυών αγρίου τύπου καταγράφηκε σημαντική αύξηση στην πυκνότητα των ανοσοθετικών στη laminin αιμοφόρων αγγείων. Αντιθέτως, τόσο στους θρομβοκυτταροπενικούς όσο και στους θρομβοκυτταροφιλικούς μύες στο τραυματισμένο ημισφαίριο τα επίπεδα της laminin ήταν παρόμοια με το μη τραυματισμένο ημισφαίριο των μυών αγρίου τύπου,

οδηγώντας στο συμπέρασμα πως τα επίπεδα των κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων συνδέονται με την ικανότητα απόκρισης του αγγειακού συστήματος στον τραυματισμό. Ο τραυματισμός του μεσολοβίου δεν βρέθηκε να επηρεάζει τη λειτουργία της YEZ, καθώς η πυκνότητα των PCNA θετικών κυττάρων δεν μεταβλήθηκε στην YEZ του τραυματισμένου ημισφαιρίου τόσο στα ζώα αγρίου τύπου, όσο και στα διαγονιδιακά ζώα. Το ίδιο αποτέλεσμα είχαμε και ως προς τη διαφοροποίηση των κυττάρων της YEZ προς την ολιγοδενδρογλοιακή ή την αστρογλοιακή μοίρα, σε συνάρτηση με την απομυελίνωση, αν και στους θρομβοκυτταροπενικούς μύες η πυκνότητα των κυττάρων της ολιγοδενδρογλοιακής σειράς ήταν μειωμένη τόσο στο φυσιολογικό, όσο και στο τραυματισμένο ημισφαίριο, στα όρια του στατιστικά σημαντικού.

Σύνοψη

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν πως οι θετικές και αρνητικές αποκλίσεις από τα φυσιολογικά επίπεδα αιμοπεταλίων επηρεάζουν σημαντικά την ικανότητα του αγγειακού συστήματος της Υποεπενδυματικής Ζώνης να ενεργοποιηθεί σε περιπτώσεις τραυματισμού του μεσολοβίου. Παρόλο που τα αγγεία αποτελούν κρίσιμο ρυθμιστικό παράγοντα της YEZ, δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στη λειτουργική απόκριση της φωλιάς στον τραυματισμό. Όμως, στους θρομβοκυτταροπενικούς μύες εντοπίστηκε απόκλιση στην παρουσία κυττάρων της ολιγοδενδρογλοιακής μοίρας η οποία ήταν στα όρια του στατιστικά σημαντικού.

Βιβλιογραφία

Kazanis, Ilias et al. 2015. “Lesion-Induced Accumulation of Platelets Promotes Survival of Adult Neural Stem / Progenitor Cells.” *Experimental Neurology* 269: 75–89.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.03.018>.

Η επίδραση του μικροπεριβάλλοντος στις νευρογενετικές και ολιγοδενδρογενετικές ιδιότητες των ενήλικων νευρικών βλαστικών κυττάρων του εγκεφάλου

Μαρία ΑΝΕΣΤΗ, Ηλίας ΚΑΖΑΝΗΣ

Εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Ρίο, 26504, Ελλάδα,
anestimaria@gmail.com, ikazanis@upatras.gr

Περίληψη

Στον ώριμο εγκέφαλο των θηλαστικών εντοπίζονται δυο ομάδες βλαστικών κυττάρων, τα νευρικά βλαστικά κύτταρα (NBK) και τα ολιγοδενδρογλοιακά προγονικά κύτταρα, με διακριτές ιδιότητες και χωρικές προτιμήσεις. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η πιθανή επίδραση του μικροπεριβάλλοντος, στις νευρογενετικές και ολιγοδενδρογενετικές ιδιότητες των NBK και στη δράση νευροπροστατευτικών παραγόντων. Για το σκοπό αυτό, σχεδιάστηκε και εφαρμόστηκε ένα πρωτόκολλο καλλιέργειας στο οποίο τα επιστρωμένα NBK δημιουργούν μικροπεριβάλλοντα διαφορετικής αρχιτεκτονικής. Πρωταρχικά αποτελέσματα έδειξαν ότι η νευρογένεση περιορίζεται στην περιφέρεια πυκνών τρισδιάστατων δομών, ενώ η ολιγοδενδρογένεση είναι ανεξάρτητη από την κυτταρική πυκνότητα. Η προσθήκη λαμινίνης οδήγησε σε ομοιόμορφη δισδιάστατη διαμόρφωση, ενώ η αναστολή της λειτουργίας του υποδοχέα της μείωσε σημαντικά τη νευρογένεση. Τέλος, η προσθήκη της μικρονευροτροφίνης BNN-20 αύξησε τη διαφοροποίηση των NBK προς τις δυο κυτταρικές μοίρες, ανεξαρτήτως κυτταροαρχιτεκτονικής. Συμπερασματικά, η ανάλυση που εφαρμόσαμε αποτελεί ένα νέο εργαλείο για την περαιτέρω διερεύνηση πιθανών θεραπευτικών στρατηγικών και μορίων στόχων ως προς την ρύθμιση της νευρογένεσης/ολιγοδενδρογένεσης.

Λέξεις-κλειδιά

Νευρικά βλαστικά κύτταρα, μικροπεριβάλλον, εξωκυττάρια ουσία, μικρονευροτροφίνη BNN-20, νευροπροστασία

Εισαγωγή

Δύο κύριοι πληθυσμοί βλαστικών κυττάρων εντοπίζονται στον ώριμο εγκέφαλο των τρωκτικών, αλλά και του ανθρώπου. Τα νευρικά βλαστικά κύτταρα (NBK) και τα ολιγοδενδρογλοιακά προγονικά κύτταρα (ΟΠΚ) (Agathou, Káradóttir & Kazanis 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. Τα πολυδύναμα NBK της YEZ έχουν τόσο νευρογενετική όσο και γλοιογενετική δράση, συμβάλλοντας στην ομοιοστατική λειτουργία, αλλά και στην απόκριση του εγκεφάλου στο τραύμα, ενώ εμφανίζουν μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού με την αύξηση της ηλικίας (Kazanis et al. 2017). Αντίθετα, τα ΟΠΚ παραμένουν ενεργά σε όλη τη διάρκεια ζωής του οργανισμού και βρίσκονται διάσπαρτα στο παρέγχυμα του εγκεφάλου (Hughes et al. 2013), έχοντας χάσει την ικανότητα νευρογένεσης. Καθώς τα NBK συγκεντρώνονται μόνο στις βλαστικές φωλιές, ενώ τα ΟΠΚ έχουν προσαρμοστεί στο να επιβιώνουν στο παρέγχυμα, στόχος της παρούσας εργασίας είναι να διερευνηθεί, αρχικά in vitro, αν οι ιδιότητες των NBK επηρεάζονται από την αρχιτεκτονική του μικροπεριβάλλοντός τους. Επιπρόσθετα, εξετάζεται η πιθανή επίδραση μορίων εξωκυττάριας ουσίας και των υποδοχέων τους, όπως για παράδειγμα της λαμινίνης και του υποδοχέα β1 ιντεγκρίνης (Kazanis et al. 2010), καθώς και νευροπροστατευτικών παραγόντων, με την προσθήκη της μικρονευροτροφίνης BNN-20 (Botsakis et al. 2017), στη διαφοροποίηση των ενήλικων NBK, με στόχο να εντοπιστούν στρατηγικές που ευνοούν την νευροπροστασία και τη νευρογένεση/ολιγοδενδρογένεση.

Μέθοδοι

NBK απομονώθηκαν από την YEZ των πλάγιων τοιχωμάτων των πλάγιων κοιλιών του εγκεφάλου ενήλικων μυών (πρωτογενείς καλλιέργειες), ανακαλλιεργήθηκαν και στη συνέχεια επιστρώθηκαν κατάλληλα ως 3D συσσωματώματα (νευρόσφαιρες), ώστε να δημιουργηθούν διαφορετικά μικροπεριβάλλοντα. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία λαμινίνης ή/και αναστέλλοντας τη

λειτουργία του υποδοχέα της β1-ιντεγκρίνης, ή με την προσθήκη της μικρονευροτροφίνης BNN-20, σε συνθήκες διαφοροποίησης. Κύτταρα της νευρικής (εκφράζουν *doublecortin*, *Beta tubulin III*) ή της ολιγοδενδρογλοιακής μοίρας (εκφράζουν τον παράγοντα *Olig2*), καθώς και πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα (PCNA+) ταυτοποιήθηκαν με ανοσοφθορισμό και χρησιμοποιήθηκε συνεστιακή μικροσκοπία για την λήψη εικόνων και τον προσδιορισμό τρισδιάστατων (αντιπροσωπεύουν τη νευροβλαστική φωλιά *in vivo*) και δισδιάστατων (αντιπροσωπεύουν το παρέγχυμα του εγκεφάλου) μικροπεριβάλλοντων.

Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η νευρογένεση παρουσιάζει ανομοιόμορφη κατανομή και εμφανίζεται σημαντικά αυξημένη στα δισδιάστατα μικροπεριβάλλοντα και στην περιφέρεια των νευρόσφαιρων, ενώ η ολιγοδενδρογένεση παρουσιάζει μια ομοιόμορφη κατανομή στις διαφορετικές περιοχές της καλλιέργειας. Η προσθήκη λαμινίνης άλλαξε την αρχιτεκτονική του μικροπεριβάλλοντος, επάγοντας μια πιο ομοιόμορφη δισδιάστατη κατανομή των κυττάρων, ενώ προκάλεσε επίσης μείωση στη διαφοροποίηση των NBK, η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Αντίθετα, η προσθήκη του αντισώματος έναντι της β1 ιντεγκρίνης μείωσε στατιστικά σημαντικά τη νευρογένεση. Τέλος, η προσθήκη της μικρονευροτροφίνης BNN-20 στην καλλιέργεια των NBK προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση της νευρογένεσης, αλλά και της ολιγοδενδρογένεσης, χωρίς να επηρεάζει και να επηρεάζεται από την αρχιτεκτονική του μικροπεριβάλλοντος των κυττάρων.

Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία διερευνώνται οι νευρογενετικές και ολιγοδενδρογενετικές ιδιότητες των NBK σε σχέση με το μικροπεριβάλλον τους. Αρχικά παρατηρήθηκε ότι η νευρογένεση ευνοείται *in vitro* σε συγκεκριμένα μικροπεριβάλλοντα, υποδεικνύοντας ότι εξαρτάται από χωρικές προτιμήσεις, όπως παρατηρείται *in vivo*, ενώ η ολιγοδενδρογένεση είναι ανεξάρτητη από την πυκνότητα/αρχιτεκτονική των κυττάρων. Παρουσία λαμινίνης η μορφολογία του μικροπεριβάλλοντος αλλάζει και γίνεται πιο ομοιόμορφα δισδιάστατη, χωρίς να επηρεάζεται σημαντικά η διαφοροποίηση, ενώ αντίθετα η αναστολή της λειτουργίας της β1 ιντεγκρίνης, αναστέλλει τη νευρογένεση. Τέλος, η μικρονευροτροφίνη BNN-20, επάγει τη διαφοροποίηση των NBK τόσο προς τη νευρική, όσο και προς την ολιγοδενδρογλοιακή κυτταρική μοίρα.

Βιβλιογραφία

- 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., Lathia, J.D., Vadakkan, T.J., et al. (2010). Quiescence and Activation of Stem and Precursor Cell Populations in the Subependymal Zone of the Mammalian Brain Are Associated with Distinct Cellular and Extracellular Matrix Signals. *Journal of Neuroscience*, 30 (29), 9771-9781
- 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.
- Botsakis, K., Mourtzi, T., Panagiotakopoulou, V., et al. (2017). BNN-20, a synthetic microneurotrophin, strongly protects dopaminergic neurons in the "weaver" mouse, a genetic model of dopamine-denervation, acting through the TrkB neurotrophin receptor. *Neuropharmacology*, 121, 140-157

Βιοτεχνολογική προσέγγιση της καλλιέργειας του εντομοπαθογόνου μύκητα *Cordyceps militaris*: Παραγωγή μυκηλιακής βιομάζας και αρχική αξιολόγηση της βιοδραστικότητας της κορντισεπίνης

Δημήτριος ΚΟΝΤΟΓΙΑΝΝΑΤΟΣ¹, Γεώργιος ΚΟΥΤΡΩΤΣΙΟΣ¹, Χαριτίμη Γεωργία ΜΠΑΜΠΑΤΣΙΚΟΥ², Σαββίνα ΞΕΚΑΛΑΚΗ¹, Χάρης ΠΡΑΤΣΙΝΗΣ³, Δημήτρης ΚΛΕΤΣΑΣ³, Luc SWEVERS⁴, Άννα ΚΟΥΡΤΗ⁵, Πέτρος ΤΑΡΑΝΤΙΛΗΣ^{2,*}, Γεώργιος Ι. ΖΕΡΒΑΚΗΣ^{1,*}

^{1,*}Εργαστήριο Γενικής & Γεωργικής Μικροβιολογίας, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, Αθήνα, 11 855, E-mail: zervakis@aua.gr

^{2,*}Εργαστήριο Γενικής Χημείας, Τμήμα Επιστημών Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, Αθήνα, 11 855, E-mail: ptara@aua.gr

³Εργαστήριο Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης, Ινστιτούτο Βιοεπιστημών & Εφαρμογών, Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών "ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ", Νεαπόλεως 27 &, Πατριάρχου Γρηγορίου Ε, Αγ. Παρασκευή, 153 41, E-mail: dkletsas@bio.demokritos.gr

⁴Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Εντόμων και Βιοτεχνολογίας, Ινστιτούτο Βιοεπιστημών & Εφαρμογών, Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών "ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ", Νεαπόλεως 27 &, Πατριάρχου Γρηγορίου Ε, Αγ. Παρασκευή, 153 41, E-mail: swevers@bio.demokritos.gr

⁵Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, Αθήνα, 11 855, E-mail: akourti@aua.gr

Περίληψη

Οι μύκητες αποτελούν τη δεύτερη μεγαλύτερη ταξινομική ομάδα μετά από τα έντομα και συνιστούν μια σημαντική πηγή φυσικών φαρμάκων. Ο εντομοπαθογόνος ασκομύκητας *Cordyceps militaris* (*Cordycipitaceae*, *Hypocreales*) εμφανίζει εξαιρετικό ενδιαφέρον λόγω της σύνθεσης της βιοδραστικής ένωσης κορντισεπίνη στο μυκήλιο και στις καρποφορίες του. Η κορντισεπίνη είναι παράγωγο της αδενοσίνης και η δράση της σχετίζεται με αντιοξειδωτική προστασία, ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος, αντιγήρανση, παρεμπόδιση ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων, ενίσχυση της σεξουαλικής απόδοσης κ.α. Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται προκαταρκτικά αποτελέσματα καλλιέργειας του *C. militaris* σε διάφορα υποστρώματα με στόχο την παραλαβή βιομάζας καθώς και στοιχεία που αφορούν την παραγωγή κορντισεπίνης και την αξιολόγηση της βιοδραστικότητάς της.

Λέξεις-κλειδιά:

εντομοπαθογόνος μύκητας, κορντισεπίνη, *Cordyceps militaris*

Εισαγωγή

Πολλά προϊόντα βασιζόμενα στις βιοδραστικές ουσίες ή/και τα εκχυλίσματα των μανιταριών έχουν κατακλύσει τις αγορές και λόγω των θεραπευτικών ιδιοτήτων τους αποτελούν τομείς προτεραιότητας για τη φαρμακευτική βιομηχανία (Patel and Goyal 2012, Sabaratnam et al. 2013). Τα είδη του γένους *Cordyceps* συνιστούν μια από τις σημαντικότερες πηγές μυκητιακών προϊόντων, πολλά από τα οποία έχουν πλέον αξιολογηθεί από κλινικής πλευράς (Olatunji et al. 2018). Εντούτοις, λόγω της δυσκολίας στη μαζική καλλιέργεια των ειδών *Cordyceps*, καταγράφεται ένα μεγάλο κενό προσφοράς στην ολοένα αυξανόμενη ζήτηση. Η παρούσα εργασία στοχεύει να απαντήσει ερωτήματα που αφορούν την καλλιέργεια του *C. militaris* και την παραγωγή κορντισεπίνης σε σχέση τόσο με τα υποστρώματα ανάπτυξης όσο και με την επίδραση που αυτά εμφανίζουν στη βιοδραστικότητα των παραγόμενων προϊόντων.

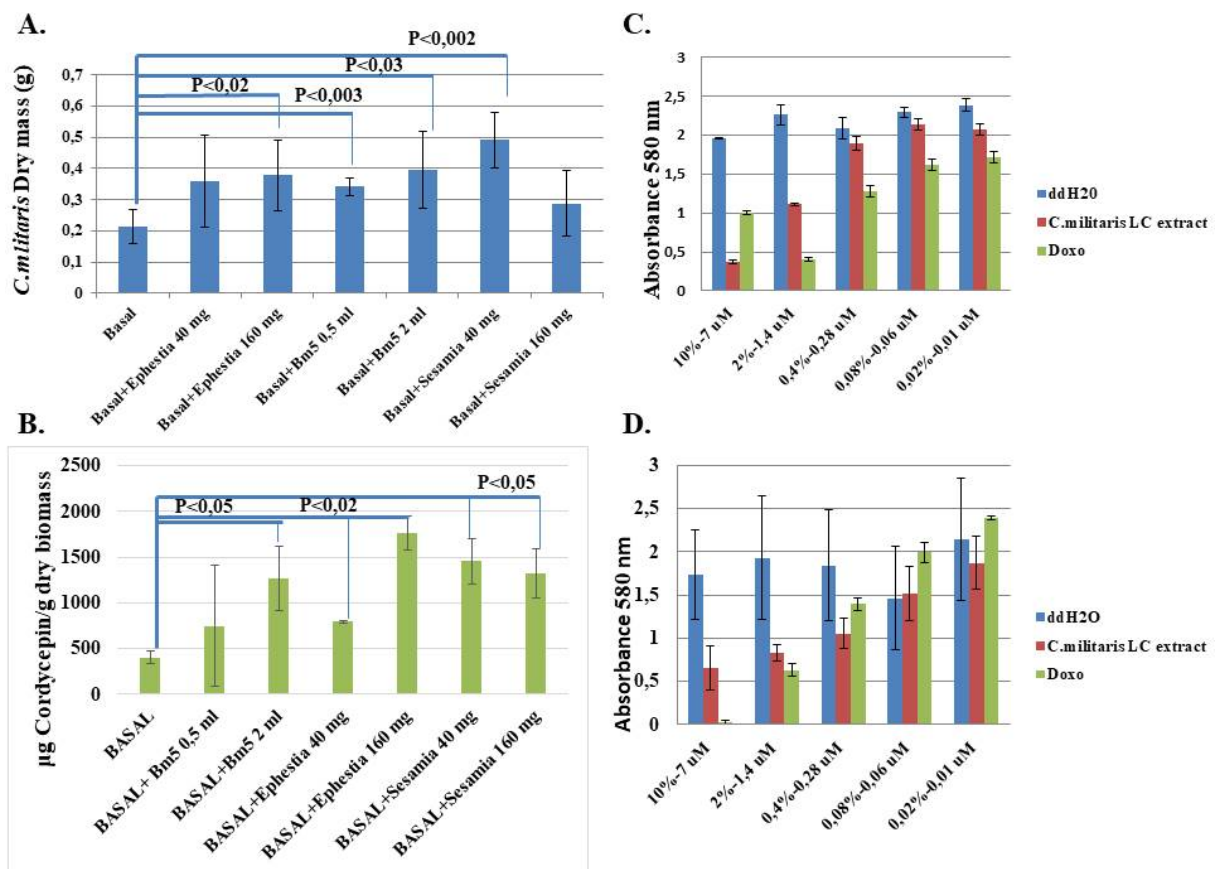
Μέθοδοι

Στέλεχος του *C. militaris* αναπτύχθηκε σε υγρές καλλιέργειες 100 ml βασικού υποστρώματος. Το βασικό υπόστρωμα ενισχύθηκε με 0,5 ή 2,0 ml εναιωρήματος κυττάρων της σειράς Bm5 του εντόμου *Bombyx mori* (*Lepidoptera: Bombycidae*) (συγκέντρωσης 10⁸ κύτταρα/ml) είτε με 40 ή 160 mg λειοτριβημένων ιστών ολόκληρων αποξηραμένων εντόμων των ειδών *Sesamia nonagrioides*

(*Lepidoptera:Noctuidae*) και *Ephestia kuehniella* (*Lepidoptera: Pyralidae*). Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε στατικές συνθήκες για 20 ημέρες στους 25°C σε συνεχές σκοτάδι. Μετά το πέρας των 20 ημερών η παραχθείσα βιομάζα συλλέχθηκε και αφού αποξηράνθηκε και ζυγίστηκε, εκχυλίστηκε και αναλύθηκε με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης. Για κάθε επέμβαση χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις επαναλήψεις και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με την μέθοδο του t-TEST. Για την ανάλυση της βιοδραστικότητας τα εκχυλίσματα αραιώθηκαν με νερό σε συγκεντρώσεις 10%, 2%, 0,40%, 0,08% και 0,02% v/v. Οι συγκεντρώσεις αυτές εφαρμόστηκαν σε κύτταρα ανθρώπινων ινοβλαστών και ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών μαστού βάσει κλασικών πρωτοκόλλων (Pratsinis et al. 2010). Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκε νερό, όπως περιγράφηκε παραπάνω, καθώς και 7,00, 1,40, 0,28, 0,06 και 0,01 μM του χημειοθεραπευτικού Doxorubicin Hydrochloride. Μετά από 3 ημέρες από την εφαρμογή, οι κυτταρικές σειρές αναλύθηκαν για τη βιωσιμότητά τους με τη μέθοδο του MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Για κάθε επέμβαση χρησιμοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις.

Αποτελέσματα

Σε όλα τα συμπληρώματα, πλην των 40 και 160 mg σκόνης αποξηραμένων ιστών των εντόμων *E. kuehniella* και *S. nonagrioides* αντίστοιχα, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση της βιομάζας του μύκητα σε σχέση με τον μάρτυρα ($p < 0,03$, $p < 0,02$, $p < 0,003$, $p < 0,002$) μετά από 20 ημέρες καλλιέργειας σε στατικές συνθήκες (Εικ. 1.A). Επιπροσθέτως τα αποτελέσματα έδειξαν πως σε όλες τις εφαρμογές ιστών ή/και κυττάρων εντόμων, πλην της συγκέντρωσης 0,5 ml της καλλιέργειας κυττάρων Bm5, η παραγωγή κορντισεπίνης ήταν στατιστικά υψηλότερη από εκείνη που παρατηρήθηκε στο βασικό υπόστρωμα ανάπτυξης του μύκητα ($p < 0,05$, $p < 0,02$) (Εικ. 1.B). Τέλος, το μεθανολικό εκχύλισμα του *C. militaris* αποδείχθηκε κυτταροτοξικό τόσο στις κυτταρικές σειρές ανθρώπινων ινοβλαστών όσο και των καρκινικών κυττάρων μαστού (Εικ. 1.C, 1.D).



Εικόνα 1. Α. Παραγωγή μυκηλιακής βιομάζας (g ξηρού βάρους) σε καλλιέργειες *C. militaris*. Β. Συγκέντρωση κορντισεπίνης (μg ανά g ξηρού βάρους) σε μυκηλιακή βιομάζα *C. militaris*. Βιωσιμότητα

C. κυτταρικών σειρών ανθρώπινων ινοβλαστών και **D.** ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων μαστού ύστερα από την εφαρμογή μυκηλιακού εκχυλίσματος *C. militaris* εκφρασμένη ως απορρόφηση στα 580 nm για την παραγωγή φορμαζάνης (MTT).

Συζήτηση

Ο *C. militaris*, ως εντομοπαθογόνος μύκητας, φαίνεται να αποκρίνεται θετικά σε υποστρώματα ανάπτυξης στα οποία έχουν προστεθεί κύτταρα ή ιστοί διαφόρων ειδών λεπιδοπτέρων. Επιπροσθέτως τα εκχυλίσματά του αποδεικνύονται κυτταροτοξικά επιβεβαιώνοντας έτσι την ισχυρή αντικαρκινική δράση τους. Λόγω της σημαντικής βιοδραστικότητας του *C. militaris*, διερευνάται η δυνατότητα μαζικής παραγωγής καρποφοριών του μύκητα στο Εργαστήριο Γενικής & Γεωργικής Μικροβιολογίας (ΓΠΑ) με τα ως τώρα αποτελέσματα να είναι ενθαρρυντικά (Εικ.2).



Εικόνα2. Παραγωγή καρποφοριών *C. militaris* σε εργαστηριακές συνθήκες.

Βιβλιογραφία

Olatunji O.J., Tang J., Tola A., Auberon F., Oluwaniyi O., Ouyang Z. (2018). The genus *Cordyceps*: An extensive review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology, *Fitoterapia*, 129, 293-316.

Patel S. and Goyal A. (2012). Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review, *3 Biotech*, 2, 1–15.

Pratsinis H., Kletsas D., Melliou E., Chinou I. (2010) Antiproliferative activity of Greek Propolis, *J. Med. Food*, 13, 286-290.

Sabaratham V., Kah-Hui W., Naidu M. and Rosie David P. (2013). Neuronal health—can culinary and medicinal mushrooms help? *J. Tradit. Complement. Med.*, 3, 62–68.

Η παρούσα έρευνα συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση Μεταδιδασκτόρων ερευνητών/ερευνητριών - Β' Κύκλος» (MIS-5033021), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).

Ανάπτυξη μεθόδου για την ανίχνευση βακτηρίων από θαλασσίνο νερό και εφαρμογή της σε LAB-ON-CHIP συσκευή.

Κοτσίρη Ζωή, Παντελέλλη Ευστρατία, Βανταράκης Απόστολος
Εργαστήριο Υγιεινής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Περίληψη

Η παράκτια ζώνη αποτελεί χώρο φιλοξενίας πολλών κολυμβητών ετησίως. Η μόλυνση της από μέσω αστικών και βιομηχανικών λυμάτων οδηγεί στην παρουσία των βακτηρίων *E. coli* και enterococci. Η παρακολούθηση των βακτηρίων αυτών αποτελεί προϋπόθεση της νομοθεσίας. Η ανάλυση της ποιότητας του θαλασσινού νερού είναι μια χρονοβόρα διαδικασία. Υπάρχει αναγκαιότητα για άμεσα και αξιόπιστα αποτελέσματα σε πραγματικό χρόνο. Στην εργασία αυτή παρουσιάζεται η ανάλυση θαλασσινού νερού για την παρουσία *E. coli* και *E. faecalis* με μια μεθοδολογία η οποία μπορεί να προσαρτηθεί σε ένα βιοαισθητήρα

Λέξεις-κλειδιά

μικροοργανισμοί, θαλασσίνο νερό, βιοαισθητήρας, LAMP, μαγνητικά σφαιρίδια

Εισαγωγή

Η παράκτια ζώνη αντιπροσωπεύει ένα μοναδικό οικολογικό σύστημα που επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τη βιομηχανική ανάπτυξη και απόρριψη λυμάτων. Η μόλυνση των θαλάσσιων υδάτων χαρακτηρίζεται από αύξηση της συγκέντρωσης *Escherichia coli* και εντεροκόκκων. Οι *E. coli* και enterococci χρησιμοποιούνται ως δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης σε αναλύσεις ποιότητας νερού σε όλο τον κόσμο (EU BDW 2006/7 / EK). Η τακτική παρακολούθηση της συγκέντρωσης τους στο νερό επιτρέπει την αποφυγή κινδύνων για την υγεία, την παρακολούθηση και τον έλεγχο της μικροβιολογικής ποιότητας για την κολύμβηση και ψυχαγωγία. Η συνήθης πρακτική είναι η τακτική δειγματοληψία και ανάλυση νερού για τα επίπεδα των βακτηρίων σε εβδομαδιαία ή μηνιαία βάση (Bäumler et al. 2016). Η ευρωπαϊκή οδηγία 2006/7/EK σχετικά με τη διαχείριση της ποιότητας των υδάτων κολύμβησης αναφέρει ως «εξαιρετική ποιότητα» παράκτιο νερό με λιγότερο από 250 CFU για την *E. coli* και 100 CFU για τον εντερόκοκκο σε 100 mL, και ως νερό «καλής ποιότητας» έως 500 CFU για την *E. coli* και 200 CFU για τον εντερόκοκκο σε 100 mL θαλασσινού νερού. Υπάρχει απαίτηση για έγκαιρη και γρήγορη πληροφόρηση σχετικά με την ποιότητα του θαλασσινού νερού. Για το λόγο αυτό κρίνεται απαραίτητη η δημιουργία ενός βιοαισθητήρα όπου το εργαλείο αυτό θα μπορεί να ανιχνεύει την παρουσία των βακτηρίων.

Μέθοδοι

Καλλιέργεια βακτηρίων

Για την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν στελέχη *Enterococcus faecalis* NCTC 775 και *Escherichia coli*. Τα στελέχη καλλιεργήθηκαν και επώαστηκαν βάσει των οδηγιών. Μεμονωμένες αποικίες επώαστηκαν σε Tryptic Soy Broth στους 37°C για 16-18 ώρες. Διαδοχικές αραιώσεις της καλλιέργειας επώαστηκαν σε εκλεκτικά τρυβλία SB και CCA για τον προσδιορισμό της αρχικής συγκέντρωσης των βακτηρίων στην καλλιέργεια.

Μέθοδοι απομόνωσης βακτηριακού γενετικού υλικού

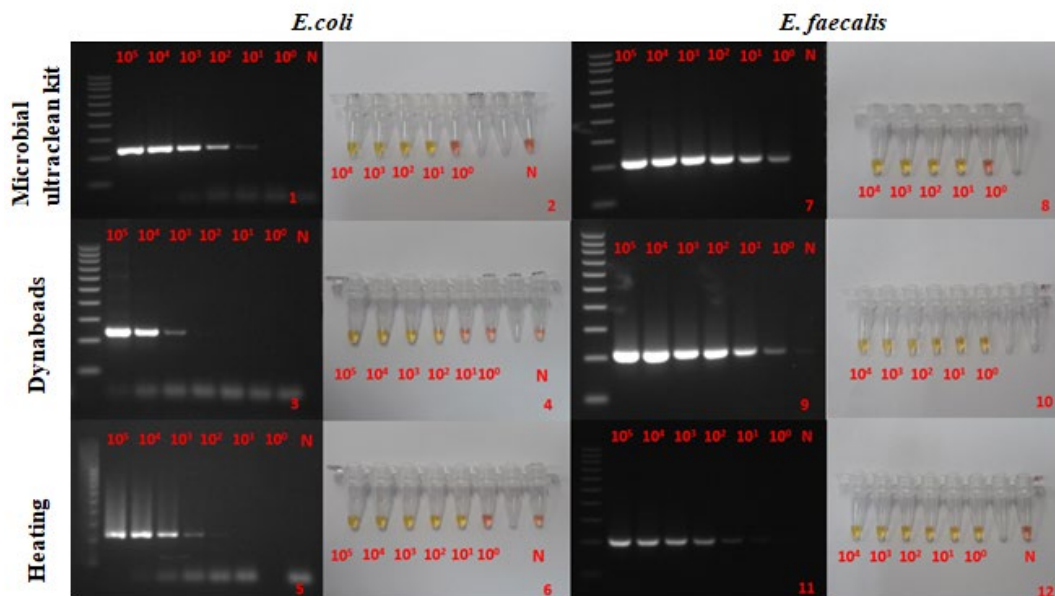
Βακτηριακό DNA απομονώθηκε από υγρή καλλιέργεια βακτηρίων χρησιμοποιώντας το DNeasy UltraClean Microbial Kit (Qiagen, Germany) και Dynabeads DNA DIRECT Universal Kit (Thermo Fisher Scientific, US) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Βακτηριακό DNA απομονώθηκε επίσης με την μέθοδο της θερμικής λύσης, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Okada et al. 2010). Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του DNA (A260/A280) που απομονώθηκε με όλους τους παραπάνω τρόπους προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας το φασματοφωτόμετρο πλήρους φάσματος Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, US).

Προ-συμπύκνωση βακτηρίων σε θαλασσινό νερό με μαγνητικά σφαιρίδια

Σε δοχείο τοποθετήθηκαν 100 mL θαλασσινού νερού και επιμολύνθηκαν με καλλιέργεια βακτηρίων με γνωστή συγκέντρωση. Το δοχείο επώαστηκε σε υδατόλουτρο για 10 λεπτά στους 100 °C και στη συνέχεια 50 mL από τα 100 mL θαλασσινού νερού τοποθετήθηκαν σε low DNA binding δοχείο (Eppendorf, Fisher Scientific). Ποσότητες μαγνητικών σφαιριδίων όγκου 200, 100 και 50 µL προστέθηκαν σε διαφορετικά δοχεία με θαλασσινό νερό και επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση για 20 λεπτά. Με χρήση μαγνήτη συγκρατήθηκαν τα μαγνητικά σφαιρίδια και αφαιρέθηκε το θαλασσινό νερό από το δοχείο, στο οποίο τοποθετήθηκαν τα υπόλοιπα 50 mL θαλασσινού νερού και επώαστηκαν για ακόμα 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, μαγνήτης συγκράτησε τα μαγνητικά σφαιρίδια και ακολούθησε πλύση με 200 µl 1x Washing buffer (Thermo kit Dynabeads) δυο φορές. Τα μαγνητικά σφαιρίδια διαλύονται σε 40 µl elution buffer (Thermo kit magnetic beads) ή εναλλακτικά σε 25µl PCR/LAMP αντίδρασης. Το πρωτόκολλο της PCR 95 °C για 5 min, 36 κύκλοι για 95 °C για 30 sec, 55 °C για 30 sec, 72 °C 30 sec και 72 °C 1 min για ενώ το πρωτόκολλο της LAMP περιλαμβάνει 65 °C για 60 min για τη LAMP.

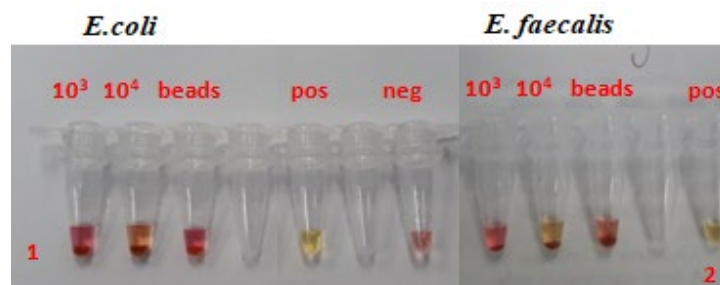
Αποτελέσματα

Το γενετικό υλικό που απομονώθηκε από καλλιέργειες για κάθε έναν από τους μικροοργανισμούς με 10⁸ CFU/ mL, ελέγχθηκε παράλληλα με τη συμβατική μέθοδο της PCR καθώς και τη διαδικασία ενίσχυσης LAMP.



Εικόνα 1. Οι φωτογραφίες 1-6 και 7-11 δείχνουν την απομόνωση *E. coli* και *E. faecalis*, αντίστοιχα, με τρεις διαφορετικούς τρόπους απομόνωσης και ενίσχυσης του υλικού σε διαδοχικές αραιώσεις με συμβατή PCR και ενίσχυση με LAMP.

Ανάλυση δειγμάτων θαλασσινού νερού χρησιμοποιώντας συνδυασμό των δύο μεθόδων, θέρμανσης και μαγνητικών σφαιριδίων για την απομόνωση γενετικού υλικού χωρίς περαιτέρω προ επεξεργασία των δειγμάτων.



Εικόνα 2. Η φωτογραφία 1 δείχνει αποτελέσματα ανάλυσης 100 mL θαλασσινού νερού με προσθήκη 10³ και 10⁴ βακτήρια για *E. coli* και *E. faecalis*. (beads: δείγμα ελέγχου διαδικασίας)

Συμπεράσματα

Συνδυάζοντας τις μεθόδους με θέρμανση και μαγνητικά σφαιρίδια για την βακτηριακή απομόνωση DNA, συγκεντρώθηκε αρκετή ποσότητα DNA χωρίς στάδιο προ επεξεργασίας. Η σύγκριση της PCR με τους τρεις τρόπους, έδειξε ότι η θέρμανση παρέχει ικανοποιητική ποσότητα DNA. Παρά το γεγονός ότι η μέθοδος της θέρμανσης δεν αποδίδει υψηλής καθαρότητας γενετικό υλικό, έδωσε ικανοποιητικό αποτέλεσμα με τη διαδικασία LAMP. Η τεχνολογία αυτή έχει την ικανότητα ενίσχυσης του γενετικού υλικού ακόμα και με παρουσία αναστολέων. Το πρωτόκολλο αυτό λόγω της ευκολίας που παρουσιάζει, έχει τη δυνατότητα να αυτοματοποιηθεί έτσι ώστε να προσαρμοστεί σε ένα φορητό σύστημα για την ανίχνευση των βακτηρίων στο πεδίο. Έως σήμερα, το όριο ανίχνευσης της μεθοδολογίας είναι 10^4 CFU/100 mL και δοκιμάζονται τρόποι βελτίωσης για να μειωθεί το όριο ανίχνευσης σύμφωνα με την ευρωπαϊκή οδηγία στο 10^2 CFU/100mL.

Βιβλιογραφία

Bäumler, A. J., & Sperandio, V. (2016). Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature*, 535(7610), 85-93.

Okada, K., Chantaroj, S., Taniguchi, T., Suzuki, Y., Roobthaisong, A., Puiprom, O., Honda, T. & Sawanpanyalert, P. (2010). A rapid, simple, and sensitive loop-mediated isothermal amplification method to detect toxigenic *Vibrio cholerae* in rectal swab samples. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 66(2), 135-139.

Οδηγία 2006/7/ΕΚ Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 15^{ης} Φεβρουαρίου 2006 με θέμα τη διαχείριση της ποιότητας των υδάτων κολύμβησης και την κατάργηση της οδηγίας 76/160/ΕΟΚ

Εκτίμηση Αντιμικροβιακής Δράσης Ενεργής, Εύκαμπτης Συσκευασίας για την Επέκταση του Χρόνου Ζωής Επιλεγμένων Εγχώριων Τυριών

Ελένη ΟΥΡΑΝΟΥ, Δημοσθένης ΧΟΧΛΑΚΗΣ, Νίκος ΚΟΝΙΟΣ, Μαρία ΚΑΛΥΒΑ, Άννα ΨΑΡΟΥΛΑΚΗ, Μαρία ΒΑΜΒΑΚΑΚΗ

Μονάδα Τροφίμων, Ύδατος και Περιβάλλοντος, Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Μικροβιακής Παθολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης, eleniouranou@yahoo.com

Μονάδα Τροφίμων, Ύδατος και Περιβάλλοντος, Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Μικροβιακής Παθολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης, surreydimos@hotmail.com

Μονάδα Τροφίμων, Ύδατος και Περιβάλλοντος, Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Μικροβιακής Παθολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης, psaroulaki@uoc.gr

Εργαστήριο Συνθετικής Χημείας Υλικών, Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Υλικών, Πανεπιστήμιο Κρήτης, nikonios1245@gmail.com

Εργαστήριο Συνθετικής Χημείας Υλικών, Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Υλικών, Πανεπιστήμιο Κρήτης, kalivm@iesl.forth.gr

Εργαστήριο Συνθετικής Χημείας Υλικών, Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Υλικών, Πανεπιστήμιο Κρήτης, vamvakak@iesl.forth.gr

Περίληψη

Η δημιουργία καινοτόμων συσκευασιών θεωρείται καθοριστική για την επιστήμη και τη βιομηχανία τροφίμων καθώς σχετίζεται με την ασφάλεια από μικροβιακή άποψη και την διατήρηση της ποιότητας. Αναπτύξαμε μία ενεργή, εύκαμπτη συσκευασία βασισμένη σε ήδη υπάρχουσες, ευρέως χρησιμοποιούμενες από την βιομηχανία τροφίμων με βάση το πολυαιθυλένιο, όπου προσδένονται επικαλύψεις με ενισχυμένες αντιμικροβιακές ιδιότητες. Οι επικαλύψεις επέδειξαν έντονη αντιμικροβιακή δράση έναντι στον μικροοργανισμό *S.aureus*. Επιπλέον παρατηρείται σημαντική μείωση πληθυσμών *L.monocytogenes* και *E.coli*. Περαιτέρω μελέτες αφορούν τυροκομικά προϊόντα στοχεύοντας στην επέκταση χρόνου ζωής και στην προστασία έναντι παθογόνων μικροοργανισμών τροφιμογενούς προέλευσης όπως *L.monocytogenes*.

Λέξεις-Κλειδιά

Ασφάλεια Τροφίμων, Ενεργή Συσκευασία, Αντιμικροβιακή Δράση, *S. aureus*, *L.monocytogenes*

Εισαγωγή

Η παραγωγή μικροβιολογικά ασφαλών προϊόντων αποτελεί προτεραιότητα της βιομηχανίας τροφίμων. Μικροοργανισμοί τροφιμογενούς προέλευσης όπως οι *L.monocytogenes*, *S.aureus* και *E.coli* προκαλούν ετησίως απώλειες σε ανθρώπινες ζωές. Η *L. monocytogenes* είναι κύρια ανησυχία, καθώς τα κρούσματα λιστερίωσης αυξάνονται την τελευταία δεκαετία (EFSA, 2018). Οι *S.aureus* και *E.coli* επίσης κατατάσσονται στα κύρια αίτια πρόκλησης τροφικής δηλητηρίασης (WHO, 2017).

Οι καινοτόμες συσκευασίες που προκαλούν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην επιστήμη τροφίμων δύναται να φέρουν ομάδες με ενισχυμένες αντιμικροβιακές ιδιότητες. Για παράδειγμα, έρευνες αναφέρουν αναστολή της ανάπτυξης *L. monocytogenes* σε μαλακά τυριά και σε κρέας και επέκταση χρόνου ζωής των προϊόντων με χρήση επικαλύψεων σχετικής τεχνολογίας (Sandoval L.N., *et.al.*, 2016, Serio, A., *et.al.*, 2018). Παρά τις δυνατότητες των καινοτόμων επικαλύψεων, η εφαρμογή τους σε βιομηχανική κλίμακα απαιτεί εκτενή μελέτη (Priyadarshi, R., & Rhim, J-W., 2020).

Στα πλαίσια του ερευνητικού έργου «ΕΥΖΗΝ, Ενεργή, Εύκαμπτη Συσκευασία με Αντιμικροβιακές Ιδιότητες για την Επέκταση του Χρόνου Ζωής Επιλεγμένων Εγχώριων Τυριών» αναπτύχθηκε νέα συσκευασία τροφίμων. Συγκεκριμένα δημιουργήθηκαν επικαλύψεις με βάση καινοτόμα (QCS) και μη (CS) βιοπολυμερή σε ήδη υπάρχουσες συσκευασίες τροφίμων πολυαιθυλενίου (PE). Στο παρόν παρουσιάζονται οι μελέτες εκτίμησης της αντιμικροβιακής δράσης των επικαλύψεων.

Αρχικά μελετήσαμε την αντιμικροβιακή δράση των CS και QCS ώστε να προσδιοριστεί η επιθυμητή

σύσταση των επικαλύψεων. Έπειτα αναπτύχθηκαν επικαλύψεις στην επιφάνεια του PE με βάση τα CS και QCS με 55% παρουσία ομάδων που προσδίδουν αντιμικροβιακές ιδιότητες (QCS55), και εκτιμήθηκε η δράση τους έναντι ορισμένων παθογόνων μικροοργανισμών. Τυριά συσκευασμένα με τις καινοτόμες επικαλύψεις δίδουν δυναμική προστασία έναντι παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών. Έτσι προσφέρεται η δυνατότητα τα προϊόντα να έχουν αυξημένο χρόνο ζωής και να διατίθενται ασφαλώς για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Μέθοδοι

Προσδιορισμός αντιμικροβιακής δράσης των πολυμερών

Τα πολυμερή που χρησιμοποιούνται για την δημιουργία των επικαλύψεων μελετώνται ως προς την αντιμικροβιακή τους δράση. Πληθυσμός *L.monocytogenes*, *S.aureus* (ATTC6538P) και *E.coli* (ATTC8739) $6 \cdot 10^5$ CFU/ml εμβολιάστηκε σε κλινές συγκεντρώσεων των ουσιών στους 4°C και 20°C, και ακολούθησαν δειγματοληψίες έως την πλήρη θανάτωση ή με το πέρας 24 ωρών. Η πλέον δραστική ουσία χρησιμοποιείται για την δημιουργία των συσκευασιών.

In vitro αντιμικροβιακή δράσης

Η αντιμικροβιακή δράση των επικαλύψεων προσδιορίζεται in vitro, κατά το ISO22196/2011. Επικαλύψεις PE, CS και QCS55 συγκεκριμένων διαστάσεων εμβολιάζονται όπως προαναφέρθηκε. Σε 24 ώρες τα ζώντα κύτταρα συλλέγονται και καλλιεργούνται. Ακολουθεί σύγκριση των πληθυσμών και στατιστική ανάλυση (t test, $p < 0.05$). Ανά επανάληψη εξετάζονται τουλάχιστον 6 δείγματα- μάρτυρες, σε 3 από τα οποία οι μικροοργανισμοί συλλέγονται αμέσως μετά τον εμβολιασμό και τα υπόλοιπα σε 24 ώρες (Control, μεμβράνη πολυαιθυλενίου-PE), 3 δείγματα PE-QCS55 και 3 PE-CS. Ολοκληρώνοντας τουλάχιστον τρεις πειραματικές επαναλήψεις ανά μικροοργανισμό, προκύπτουν 2 τιμές, που εκφράζουν την αντιμικροβιακή δράση.

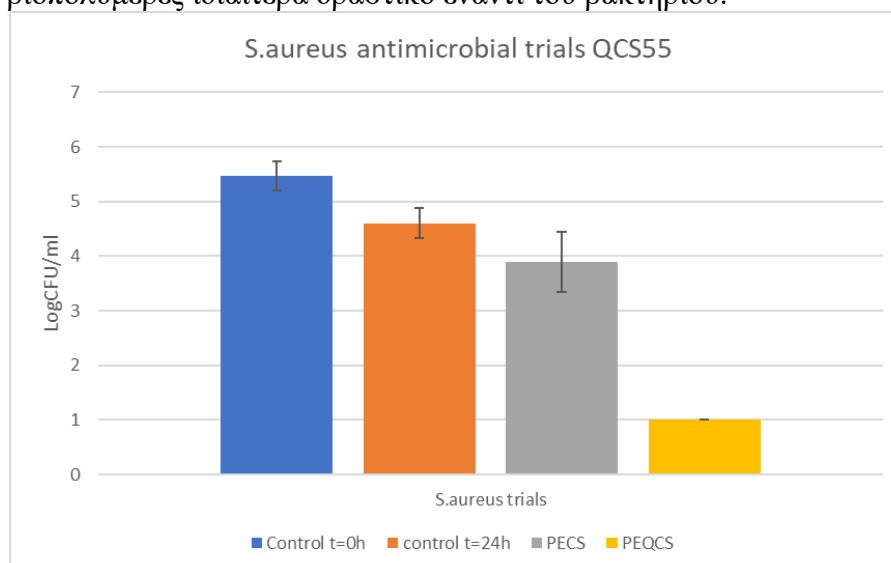
Αποτελέσματα

Επιλογή βιοπολυμερούς για την δημιουργία επικαλύψεων

Το QCS55 έδωσε ενθαρρυντικά αποτελέσματα αναφορικά με την αντιμικροβιακή δράση έναντι στους *L.monocytogenes* και *S.aureus*, καθώς οι πληθυσμοί θανατώθηκαν πλήρως στις 24 ώρες έκθεσης. Ο πληθυσμός *L.monocytogenes*, θανατώνεται απότομα στην πρώτη ώρα έκθεσης, με μείωση έως 3Log (99,9% θανάτωση) στην συγκέντρωση 0.1%w/w ουσίας στους 20°C.

Προσδιορισμός αντιμικροβιακής δράσης επικαλύψεων

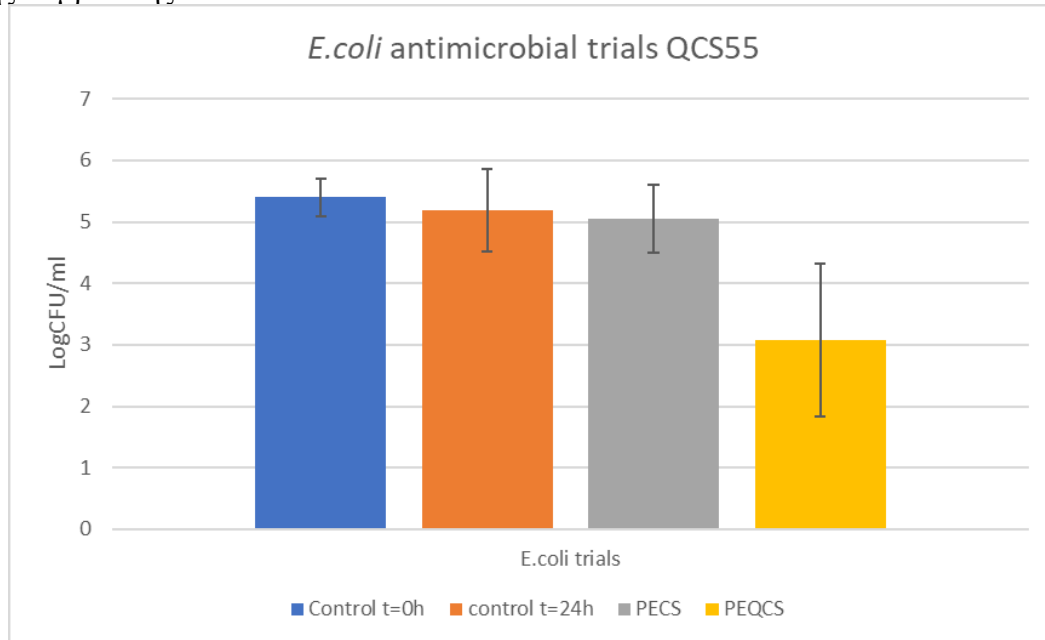
Οι PE-QCS55 προκάλεσαν πλήρη θανάτωση του πληθυσμού *S.aureus* σε 24 ώρες έκθεσης (παρουσιάζεται στο γράφημα 1 ως 1Log). Η αντιμικροβιακή δράση υπολογίστηκε ως $R=3.88$, καθιστώντας το βιοπολυμερές ιδιαίτερα δραστικό έναντι του βακτηρίου.



Γράφημα 1. Μείωση *S.aureus*.

Αντίστοιχα πραγματοποιήθηκαν δοκιμές για τους *E.coli* (γράφημα 2), και *L.monocytogenes*. Σημειώνεται σημαντική μείωση του πληθυσμού έως και 2,5Log και στις δύο περιπτώσεις. Η αντιμικροβιακή δράση είναι μικρότερη συγκριτικά με τον *S.aureus*. με τις τιμές να είναι $R(E.coli)=0,7$ και $R(L.mon)=0,3$

Σε κάθε μικροοργανισμό, η αντιμικροβιακή δράση της PE-QCS55 επικάλυψης είναι πολλαπλάσια της δράσης της συμβατικής PE-CS.



Γράφημα 2: Μείωση πληθυσμού *E.coli*

Συμπεράσματα

Η δημιουργία της καινοτόμου τροποποιημένης επικάλυψης προσφέρει νέες προοπτικές για την συσκευασία τροφίμων και ειδικότερα τυριών, καθώς βρέθηκε ότι δρα έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών τροφιμογενούς προέλευσης, *S.aureus*, *L. monocytogenes* και *E.coli*. Επιπλέον στόχος είναι η μελέτη επέκτασης χρόνου ζωής σε τυρί φέτας στην συσκευασία. Η ενίσχυση της ασφάλειας και η διατήρηση της ποιότητας των προϊόντων παρουσιάζει ευκαιρίες σε εμπορικό, οικονομικό και οικολογικό επίπεδο για την βιομηχανία και την επιστήμη τροφίμων.

Βιβλιογραφία

European Food Safety Authority, (2018) “The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne out- breaks in 2017, EFSA Journal, vol. 16, no. 12, p. 20449

Priyadarshi, R., & Rhim, J-W., (2020). Chitosan-based biodegradable functional films for food packaging applications. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 102346. 10.1016/j.ifset.2020.102346.

Sandoval, L. N., López, M., Montes-Díaz, E., Espadín, A., Tecante, A., Gimeno, M., & Shirai, K. (2016). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Fresh Cheese Using Chitosan-Grafted Lactic Acid Packaging. *Molecules* (Basel, Switzerland), 21(4), 469. <https://doi.org/10.3390/molecules21040469>

Serio, A., Chaves-López, C., Sachetti, G., Rossi, C., & Paparella, A. (2018). Chitosan Coating Inhibits the Growth of *Listeria monocytogenes* and Extends the Shelf Life of Vacuum-Packed Pork Loins at 4 °C. *Foods* (Basel, Switzerland), 7(10), 155. <https://doi.org/10.3390/foods7100155>

World Health Organization, 2017. The burden of foodborne diseases in the WHO European Region.

Multi-locus-sequence-typing σε στελέχη *Listeria monocytogenes* στην Ελλάδα, την περίοδο 2010-2019

Δημοσθένης ΧΟΧΛΑΚΗΣ¹, Βασίλειος ΣΑΝΔΑΛΑΚΗΣ¹, Σοφία ΜΑΚΚΑ^{1,2}, Ειρήνη ΜΑΚΡΙΔΑΚΗ¹,
Ελένη ΟΥΡΑΝΟΥ¹, Νίκη Θαλασσινάκη¹, Άννα ΨΑΡΟΥΛΑΚΗ¹

¹Μονάδα Μικροβιολογίας, Τροφίμων, Ύδατος και Περιβάλλοντος, Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Μικροβιακής Παθογένεσης, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, surreydimos@hotmail.com

¹Μονάδα Μικροβιολογίας, Τροφίμων, Ύδατος και Περιβάλλοντος, Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Μικροβιακής Παθογένεσης, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, vassand@gmail.com

²Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, makkasofia@gmail.com

¹Μονάδα Μικροβιολογίας, Τροφίμων, Ύδατος και Περιβάλλοντος, Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Μικροβιακής Παθογένεσης, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, rmakridaki@yahoo.gr

¹Μονάδα Μικροβιολογίας, Τροφίμων, Ύδατος και Περιβάλλοντος, Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Μικροβιακής Παθογένεσης, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, eleniouranou@yahoo.com

¹Μονάδα Μικροβιολογίας, Τροφίμων, Ύδατος και Περιβάλλοντος, Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Μικροβιακής Παθογένεσης, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, ngthal@yahoo.gr

¹Μονάδα Μικροβιολογίας, Τροφίμων, Ύδατος και Περιβάλλοντος, Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Μικροβιακής Παθογένεσης, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, psaroulaki@uoc.gr

Περίληψη

Στην Ευρώπη τα τελευταία χρόνια συναντάται έξαρση κρουσμάτων λιστερίωσης γεγονός που επιβάλλει την ανάγκη προσδιορισμού των στελεχών που “κυκλοφορούν” σε αυτήν. Η παρούσα έρευνα αποτελεί μια προσπάθεια χαρακτηρισμού, και πιο συγκεκριμένα γονοτυπικής τυποποίησης, στελεχών με προέλευση την Ελλάδα μέσω της μεθόδου MLST (multi-locus-sequence-typing). Παράλληλα, μελετάται η ύπαρξη πιθανών μεταλλάξεων, η φυλογένεσή τους, καθώς και ο τύπος αλληλουχίας (ST) που χαρακτηρίζει καθένα από αυτά, μέσω λογισμικών πακέτων βιοπληροφορικής.

Λέξεις-κλειδιά

Listeria monocytogenes, multi-locus-sequence-typing (MLST), τύπος αλληλουχίας (ST), γονοτύπηση, φυλογένεση

Εισαγωγή

Η *Listeria monocytogenes* είναι ένα τροφιμογενές παθογόνο, το οποίο μπορεί να προκαλέσει νόσο (λιστερίωση) (Law, Ab Mutalib et al. 2015), τόσο μετά από κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων, όσο κι μετά από επαφή με μολυσμένες επιφάνειες - υλικά συσκευασίας (Teixeira, Lima et al. 2008). Στην Ελλάδα, από το 2015 τα κρούσματα αυξήθηκαν αισθητά από 1,1 σε 3,04/10⁶ άτομα, σύμφωνα με στοιχεία της EFSA.

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η τυποποίηση στελεχών *L. monocytogenes*, η γονοτυπική τυποποίησή τους μέσω της μεθόδου MLST, η αλληλουχία και η φυλογένεσή τους και τελικώς η εύρεση αλληλικών προφίλ (STs).

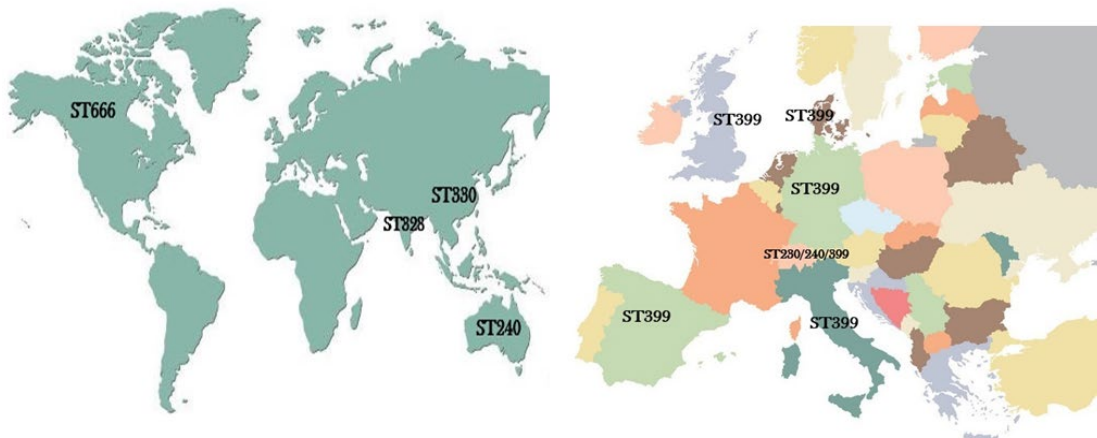
Μέθοδος

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε 40 στελέχη *Listeria monocytogenes* που είχαν απομονωθεί από διάφορα

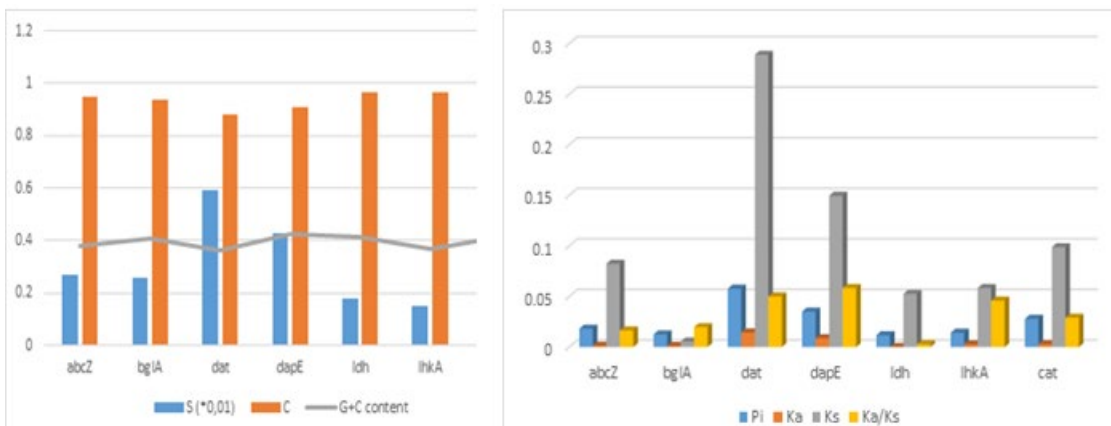
τρόφιμα με προέλευση την Κρήτη. Αφού αρχικά έγινε η καλλιέργεια των δειγμάτων, ακολούθησε η ταυτοποίηση του παθογόνου και η εκχύλιση του γενομικού του DNA. PCRs πραγματοποιήθηκαν για καθένα από τα 40 στελέχη και για τα 7 housekeeping γονίδια (*abcZ*, *bglA*, *dat*, *dapE*, *cat*, *ldh*, *lhkA*) όπως ορίζεται από τη μέθοδο MLST (<http://bigsdB.web.pasteur.fr/listeria/>). Παράλληλα, τα “καθαρισμένα”, με ενζυματικό τρόπο, PCR products αλληλουχίστηκαν και οι αλληλουχίες επεξεργάστηκαν με διάφορα λογισμικά όπως το DnaSP (βλέπε εικόνα 2) για την εύρεση του αριθμού πολυμορφικών θέσεων, μη συνώνυμων και συνώνυμων μεταλλάξεων, της νουκλεοτιδικής ποικιλομορφίας και του βαθμού συντήρησης του DNA και το MEGA-X. Το τελευταίο χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων (single και concatenated), προκειμένου να ανακαλυφθούν οι αποστάσεις τόσο μεταξύ των στελεχών όσο και από τον κοινό πρόγονο. Τέλος, τα STs καθορίστηκαν με την εφαρμογή MLST του Centre for Genomic Epidemiology.

Αποτελέσματα

Καταγράφηκαν 6 διαφορετικά STs με παγκόσμια διασπορά (βλέπε εικόνα 1). Πιο συγκεκριμένα, το ST230 (η μόνη καταγεγραμμένη αναφορά εντοπίζεται στην Ελβετία) (Ebner, Stephan et al. 2015), το ST240 (έχει βρεθεί σε ασθενή στην Ελβετία, υπάρχουν αναφορές για κλινικές περιπτώσεις και στην Αυστραλία) (Laksanalamai, Huang et al. 2014), το ST666 (εντοπίστηκε σε ασθενή στη Β. Αμερική) (Lee, Chen et al. 2018), το ST328 (από τα πιο κοινά στην Ινδία) (Haase, Didelot et al. 2014, Barbuddhe, Doijad et al. 2016, Jennison, Masson et al. 2017, Kishnani, Kurkure et al. 2019), το ST399 (εμφανίζει μεγάλη διασπορά στην Ευρώπη) (Dreyer, Aguilar-Bultet et al. 2016), το ST330 (αναφορές σε πόλεις μας Κίνας σε προϊόντα κρέατος και στο οποίο παρατηρείται έκφραση του λοιμογόνου γονιδίου *lIsX*) (Chen, Cheng et al. 2018, Chen, Cheng et al. 2019).



Εικόνα 1. Διασπορά των καταγεγραμμένων STs παγκοσμίως βάσει των ήδη δημοσιευμένων αναφορών



Εικόνα 2. Ομαδοποίηση στελεχών ανά γονίδιο για περαιτέρω ανάλυση βάσει του λογισμικού DnaSP (S: αριθμός πολυμορφικών θέσεων, C: συντήρηση αλληλουχίας DNA, Pi: νουκλεοτιδική ποικιλομορφία, Ka: αριθμός μη συνώνυμων μεταλλάξεων, Ks: αριθμός συνώνυμων μεταλλάξεων)

μεταλλάξεων, Ka/Ks: λόγος που αντιπροσωπεύει ένα δείκτη επιλεκτικής πίεσης που ασκείται στα γονίδια)

Συμπεράσματα

Επιβεβαιώθηκε ότι η πρώτη ύλη “ακολουθεί” το τρόφιμο μέχρι το στάδιο μας κατανάλωσης. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι για ένα τροφιμογενές παθογόνο δεν υπάρχουν σύνορα. Είναι επιτακτική η άμεση και τακτική καταγραφή των STs σε τρόφιμα και σε απομονώσεις από ασθενείς στη χώρα μας, καθώς μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν καταγεγραμμένα δεδομένα. Σε επόμενο στάδιο, η μελέτη θα επεκταθεί και στα γονίδια που σχετίζονται με τη λοιμογόνο δύναμη.

Βιβλιογραφία

- Barbuddhe, S. B., S. P. Doijad, A. Goesmann, R. Hilker, K. V. Poharkar, D. B. Rawool, N. V. Kurkure, D. R. Kalorey, S. S. Malik, I. Shakuntala, S. Chaudhari, V. Waskar, D. D'Costa, R. Kolhe, R. Arora, A. Roy, A. Raorane, S. Kale, A. Pathak, M. Negi, S. Kaur, R. Waghmare, S. Warke, S. Shoukat, B. Harish, A. Poojary, C. Madhavaprasad, K. Nagappa, S. Das, R. Zende, S. Garg, S. Bhosle, S. Radriguez, A. Paturkar, M. Fritzenwanker, H. Ghosh, T. Hain and T. Chakraborty (2016). "Presence of a widely disseminated *Listeria monocytogenes* serotype 4b clone in India." *Emerg Microbes Infect* 5: e55.
- Chen, M., J. Cheng, J. Zhang, Y. Chen, H. Zeng, L. Xue, T. Lei, R. Pang, S. Wu, H. Wu, S. Zhang, X. Wei, Y. Zhang, Y. Ding and Q. Wu (2019). "Isolation, Potential Virulence, and Population Diversity of *Listeria monocytogenes* From Meat and Meat Products in China." *Front Microbiol* 10: 946.
- Chen, M., J. Cheng, Q. Wu, J. Zhang, Y. Chen, L. Xue, T. Lei, H. Zeng, S. Wu, Q. Ye, J. Bai and J. Wang (2018). "Occurrence, Antibiotic Resistance, and Population Diversity of *Listeria monocytogenes* Isolated From Fresh Aquatic Products in China." *Front Microbiol* 9: 2215
- Dreyer, M., L. Aguilar-Bultet, S. Rupp, C. Guldemann, R. Stephan, A. Schock, A. Otter, G. Schupbach, S. Brisse, M. Lecuit, J. Frey and A. Oevermann (2016). "*Listeria monocytogenes* sequence type 1 is predominant in ruminant rhombencephalitis." *Sci Rep* 6: 36419.
- Ebner, R., R. Stephan, D. Althaus, S. Brisse, M. Maury and T. Tasara (2015). "Phenotypic and genotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* strains isolated during 2011-2014 from different food matrices in Switzerland." *Food Control* 57: 321-326.
- Haase, J. K., X. Didelot, M. Lecuit, H. Korkeala, L. m. M. S. Group and M. Achtman (2014). "The ubiquitous nature of *Listeria monocytogenes* clones: a large-scale Multilocus Sequence Typing study." *Environ Microbiol* 16(2): 405- 416.
- Jennison, A. V., J. J. Masson, N. X. Fang, R. M. Graham, M. I. Bradbury, N. Fegan, K. S. Gobius, T. M. Graham, C. J. Guglielmino, J. L. Brown and E. M. Fox (2017). "Analysis of the *Listeria monocytogenes* Population Structure among Isolates from 1931 to 2015 in Australia." *Front Microbiol* 8: 603.
- Kishnani, P. M., N. V. Kurkure, S. B. Barbuddhe, S. P. Doijad, T. Chakraborty, H. F. Dagainawala, L. K. Singh and R. S. Kashyap (2019). "Draft Genome Sequence of *Listeria monocytogenes* CIIMS-NV-3, a Strain Isolated from Vaginal Discharge of a Woman from Central India." *Microbiol Resour Announc* 8(6).
- Laksanalamai, P., B. Huang, J. Sabo, L. S. Burall, S. Zhao, J. Bates and A. R. Datta (2014). "Genomic characterization of novel *Listeria monocytogenes* serotype 4b variant strains." *PLoS One* 9(2): e89024.
- Law, J. W., N. S. Ab Mutalib, K. G. Chan and L. H. Lee (2015). "An insight into the isolation, enumeration, and molecular detection of *Listeria monocytogenes* in food." *Front Microbiol* 6: 1227.
- Lee, S., Y. Chen, L. Gorski, T. J. Ward, J. Osborne and S. Kathariou (2018). "*Listeria monocytogenes* Source Distribution Analysis Indicates Regional Heterogeneity and Ecological Niche Preference among Serotype 4b Clones." *MBio* 9(2).
- Ragon, M., T. Wirth, F. Hollandt, R. Lavenir, M. Lecuit, A. Le Monnier and S. Brisse (2008). "A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution." *PLoS Pathog* 4(9): e1000146.
- Tamura, K., M. Nei and S. Kumar (2004). "Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(30): 11030-11035.
- Teixeira, P., J. Lima, J. Azeredo and R. Oliveira (2008). "Adhesion of *Listeria monocytogenes* to materials commonly found in domestic kitchens." *International Journal of Food Science and Technology* 43(7): 1239-1244.

Λοιμώξεις από Ρικέτσιες της Ομάδας κηλιδωδών πυρετών στην Ελλάδα: τα αποτελέσματα έρευνας 15 ετών

Δημοσθένης ΧΟΧΛΑΚΗΣ¹, Εμμανουήλ ΓΙΑΧΝΑΚΗΣ², Ειρήνη ΜΑΚΡΙΔΑΚΗ¹, Σοφία ΜΑΚΚΑ¹, Άννα ΨΑΡΟΥΛΑΚΗ¹

¹Μονάδα Ζωονόσων, Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Μικροβιακής Παθογένεσης, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης 71110 Ηράκλειο, Ελλάδα, surreydimos@hotmail.com

²Unit of Biomedical data analysis, Department of Mother and Child Health, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece, dr.manolis.yachnakis@gmail.com

¹Μονάδα Ζωονόσων, Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Μικροβιακής Παθογένεσης, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης 71110 Ηράκλειο, Ελλάδα, rmakridaki@yahoo.gr

¹Μονάδα Ζωονόσων, Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Μικροβιακής Παθογένεσης, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης 71110 Ηράκλειο, Ελλάδα, makkasofia@gmail.com

¹Μονάδα Ζωονόσων, Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Μικροβιακής Παθογένεσης, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης 71110 Ηράκλειο, Ελλάδα, psaroulaki@uoc.gr

Περίληψη

Μέχρι πρόσφατα μόνο δύο είδη ρικετσιών (*Rickettsia conorii* και *R. typhi*) είχαν ελεγχθεί συστηματικά σε ανθρώπινα δείγματα που έφτασαν στο Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Μικροβιακής Παθογένεσης της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Η ανίχνευση άλλων ρικετσιών της Ομάδας Κηλιδωδών Πυρετών (Spotted Fever Rickettsiae), ώθησε προς την εφαρμογή ενός πρωτοκόλλου στο οποίο ελέγχονται πέντε SFGR (*R. conorii*, *R. mongolotimonae*, *R. slovaca*, *R. felis* και *R. massiliae*). Η παρούσα μελέτη επικεντρώνεται στην καταγραφή των ρικετσιώσεων στην ελληνική επικράτεια τα τελευταία 15 χρόνια, και επιχειρεί μια προσέγγιση σχετικά με τις πιθανές επιπτώσεις του κλίματος στην παρουσίαση/ανάπτυξη της νόσου. Από το σύνολο των 8512 δειγμάτων που ελέγχθηκαν, 811 (9,5%) εξετάστηκαν θετικά για *Rickettsia* spp. Δεν βρέθηκε σαφής συσχέτιση μεταξύ των κλιματικών αλλαγών και των μολύνσεων από *Rickettsia*. Οι κλιματικές αλλαγές μπορεί να συμβάλουν στην εμφάνιση των ρικετσιώσεων, ωστόσο, είναι ακόμη δύσκολο να μοντελοποιηθεί αυτός ο πιθανός αντίκτυπος.

Λέξεις-κλειδιά

Spotted Fever Group Rickettsiae, κλιματικές συνθήκες, ανοσοφθορισμός, Ελλάδα

Εισαγωγή

Οι ρικετσιώσεις τυπικά ταξινομούνται στην τυφοειδή ομάδα (ΤΟ), η οποία περιλαμβάνει την *R. prowazekii* που προκαλεί τον επιδημικό τύφο και την *R. typhi*, και την ομάδα των κηλιδωδών πυρετών (SFGR) που αποτελείται από περισσότερα από 20 είδη *Rickettsiae* (Fournier, P.E. et al. 2005). Κάθε είδος ρικέτσιας μεταδίδεται από έναν ή περισσότερους φορείς, επομένως η γεωγραφική κατανομή, η εποχιακή δραστηριότητα, η “τακτική αναζήτησης ξενιστή” ή η τάση αυτών των αρthropόδων να δαγκώνουν τον άνθρωπο παίζουν καθοριστικό ρόλο στην επιδημιολογία της νόσου (Parola, P., D. Raoult 2001). Οι φορείς για τα SFGR είναι συνήθως κρότωνες (με εξαίρεση τα *R. akari* και *R. felis*, που μεταδίδονται από ακάρεα και ψύλλους, αντίστοιχα). Δεδομένου ότι τα συμπτώματα των λοιμώξεων από ρικέτσια δεν είναι συνήθως συγκεκριμένα, η διάγνωση βασίζεται κυρίως σε κλινική υποψία και ορολογική ανάλυση, ακολουθούμενη από πολλαπλασιασμό του DNA του παθογόνου (PCR) ή ακόμη και απομόνωση του ίδιου του παθογόνου.

Σκοπός

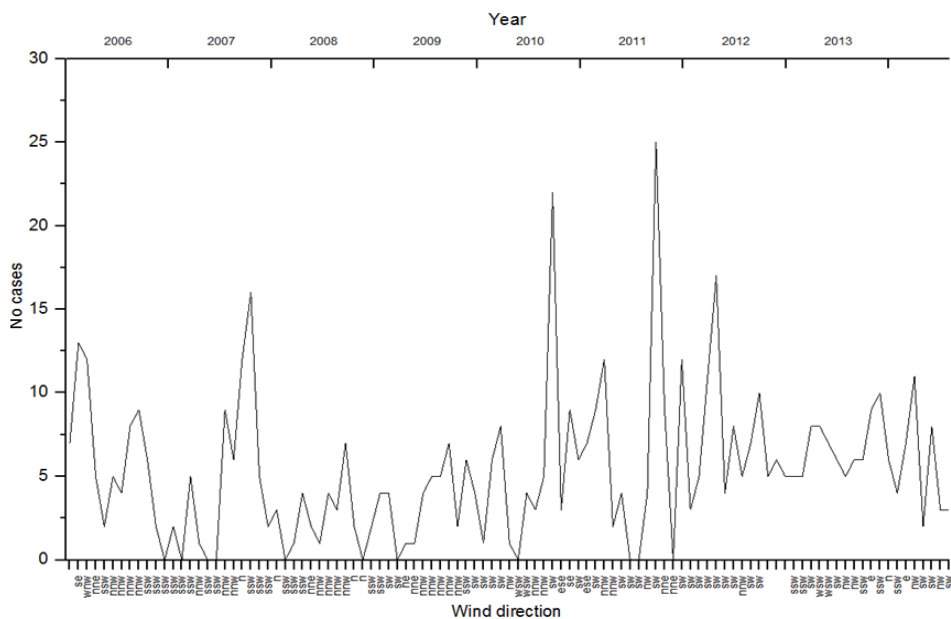
Η παρούσα μελέτη στοχεύει στην καταγραφή των ρικετσιώσεων από διάφορες περιοχές της ελληνικής επικράτειας (νομός Θεσσαλίας, Βόρειας Μακεδονίας, νησιά Κρήτης και Κέρκυρας, νομός Αττικής) τα τελευταία 15 χρόνια. Εστιάζοντας βαθύτερα στην Κρήτη, έγινε μια προσπάθεια αναζήτησης πιθανής σύνδεσης μεταξύ της νόσου και των κλιματικών συνθηκών.

Μέθοδος

8512 δείγματα ασθενών ελέγχθηκαν για SFGR. Οι οροί μεταφέρθηκαν στους 4°C, πάντα μετά από φυγοκέντρηση, ενώ τα δείγματα ολικού αίματος μεταφέρθηκαν στους -20°C. Οι οροί ελέγχθηκαν με δοκιμή έμμεσου ανοσοφθορισμού (IFA) έναντι των *R. conorii*, *R. mongolotimonae*, *R. slovaca*, *R. felis* και *R. massiliae* ενώ τα δείγματα ολικού αίματος υποβλήθηκαν σε έλεγχο με PCR. Σε περίπτωση θετικού δείγματος, είτε ήταν ορός είτε ολικό αίμα, πραγματοποιήθηκε επαναληπτικός έλεγχος στις 21 ημέρες. Στοιχεία σχετικά με τη θερμοκρασία του αέρα, την κατεύθυνση του ανέμου, τη μέση σχετική υγρασία και τις βροχοπτώσεις συλλέχθηκαν από την Ελληνική Εθνική Μετεωρολογική Υπηρεσία και το Εθνικό Αστεροσκοπείο Αθηνών. Όσον αφορά στη μοριακή ανάλυση, αρχικά πραγματοποιούνταν εκχύλιση του DNA των δειγμάτων, το οποίο στη συνέχεια υποβάλλονταν σε Real-time PCR για το γονίδιο *gltA* (Stenos et al. 2005), μήκους 381 bp. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το πακέτο IBM SPSS Statistics Version 21. Η στατιστική σημασία ορίστηκε σε $p=0,05$ (two-tailed $P_s < 0,05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά).

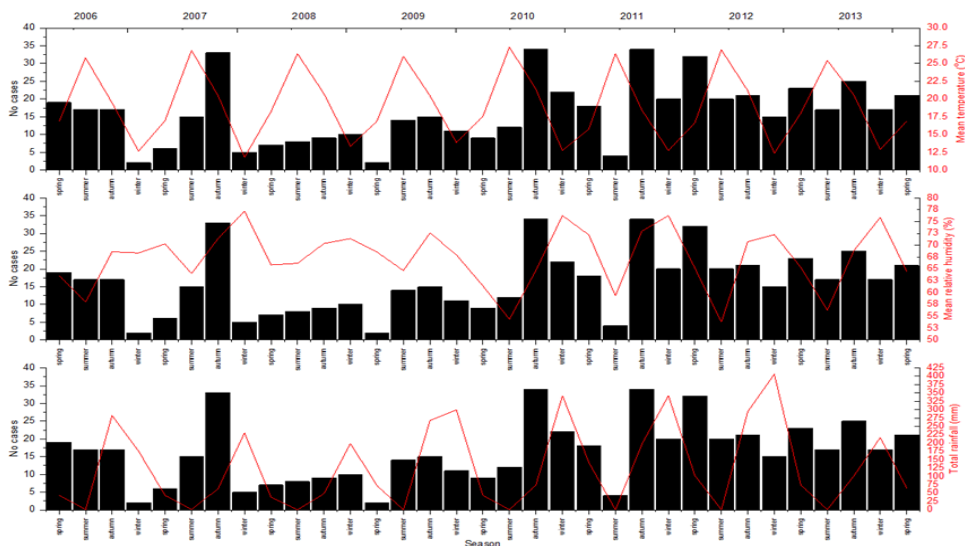
Αποτελέσματα

Η συντριπτική πλειοψηφία των περιστατικών ταυτοποιήθηκε ως θετική στη *Rickettsia conorii* (586/811, 72.3%). Επιπλέον, τέσσερα δείγματα εξετάστηκαν θετικά για *R. slovaca* (0,5%), επτά για *R. mongolotimonae* (0,9%), τρία για *R. felis* (0,4%) και ένα για *R. massiliae* (0,1%). Λαμβάνοντας υπόψιν την εποχικότητα, τα περισσότερα περιστατικά φάνηκαν να κορυφώνονται κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου και στη συνέχεια σταδιακά μειώθηκαν. Γενικά, παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των κρουσμάτων παρουσία βόρειων ανέμων ή/και παραλλαγών του, όπως βορειοδυτικών και βορειοανατολικών ανέμων.



Εικόνα 1. Διασπορά των κρουσμάτων σχετικά με την κατεύθυνση του ανέμου

Όσον αφορά στη θερμοκρασία, τα περιστατικά φαίνεται να αυξήθηκαν σε αριθμό κατά τα τέλη του καλοκαιριού και στις αρχές του φθινοπώρου και σχεδόν πάντα όταν η θερμοκρασία αρχίζει να μειώνεται. Μία εξαίρεση παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια του χειμώνα '05 - άνοιξη '06, καθώς και το χειμώνα '11 - άνοιξη '12, όπου επίσης καταγράφηκε ελαφρά κορύφωση των κρουσμάτων. Ωστόσο, η αύξηση των θερμοκρασιών γενικά δεν φαίνεται να ευνοεί την εμφάνιση περιστατικών ρικετσίωσης. Επιπλέον, όσον αφορά στις βροχοπτώσεις, η παρουσία αυξημένων ανθρώπινων περιπτώσεων όπως περιγράφηκε παραπάνω συνέπεσε με την έναρξη ελαφρών βροχών, με εξαιρέσεις τις περιόδους που περιγράφονται παραπάνω. Όσον αφορά την υγρασία, τα περισσότερα ανθρώπινα κρούσματα περιγράφονταν συνήθως κατά τη διάρκεια μειωμένων επιπέδων, είτε κατά την πτώση είτε λίγο πριν από την άνοδο της.



Εικόνα 2. Διασπορά των κρουσμάτων σχετικά με τα επίπεδα θερμοκρασίας, υγρασίας και βροχοπτώσεων

Ωστόσο, η μεταβλητότητα στον αριθμό των περιστατικών δεν συσχετίστηκε σημαντικά με καμία από τις παραπάνω τρεις ποσοτικές μεταβλητές (θερμοκρασία, υγρασία, επίπεδο βροχόπτωσης) και, ως εκ τούτου, δεν μπορέσαμε να ορίσουμε ένα ουσιαστικό μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης που περιγράφει την εξάρτηση του αριθμού των θετικών δειγμάτων σε αυτές τις μεταβλητές.

Συμπεράσματα

Προσεγγίσεις όπως η παρακολούθηση της κυκλοφορίας των παθογόνων στην άγρια ζωή, τα κατοικίδια ζώα ή τα βοοειδή (Hai, V.V. et al. 2014), η δοκιμή του ρόλου των ζώων ως φρουρών του παθογόνου ή / και της κατανομής κροτώνων, περιλαμβάνουν κλασικά εργαλεία μικροβιολογίας. Πέραν των προαναφερθέντων, υπάρχει αυξημένη τάση ενσωμάτωσης επιστημονικών εργαλείων, όπως η χρήση μαθηματικών μοντέλων και η προσεκτική παρατήρηση των κλιματικών αλλαγών που θα χρησιμοποιηθούν ως συστήματα έγκαιρης προειδοποίησης. Οι κλιματικές συνθήκες μπορεί, υπό ορισμένες συνθήκες, να επηρεάσουν έμμεσα την παρουσία και την επικράτηση λοιμώξεων από ρικέτσια σε μια συγκεκριμένη περιοχή. Αν και η εφαρμογή ενός μοντέλου πρόβλεψης φαίνεται εντυπωσιακή, ένας αριθμός κρίσιμων παραγόντων μικρής ή μεγάλης σημασίας, όπως η παρουσία κροτώνων ή των ξενιστών τους κ.λ.π. φαίνεται να επηρεάζουν την παρουσία της νόσου, καθιστώντας την κατασκευή ενός ισχυρού μοντέλου λίγο πιο περίπλοκη από το αναμενόμενο. Δεν επιχειρήσαμε καμία συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας συγκεκριμένων κλινικών σημείων και συμπτωμάτων έναντι των κλιματικών συνθηκών. Ωστόσο, αυτό θα μπορούσε να είναι μέρος μιας μελλοντικής μελέτης.

Βιβλιογραφία

- Fournier, P.E., et al., Lymphangitis-associated rickettsiosis, a new rickettsiosis caused by *Rickettsia sibirica mongolotimonae*: seven new cases and review of the literature. *Clin Infect Dis*, 2005. 40(10): p. 1435-44.
- Parola, P. and D. Raoult, Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infect Dis*, 2001. 32(6): p. 897-928.
- Stenos, J., S.R. Graves, and N.B. Unsworth, A highly sensitive and specific real-time PCR assay for the detection of spotted fever and typhus group *Rickettsiae*. *Am J Trop Med Hyg*, 2005. 73(6): p. 1083-5.
- Hai, V.V., et al., Monitoring human tick-borne disease risk and tick bite exposure in Europe: available tools and promising future methods. *Ticks Tick Borne Dis*, 2014. 5(6): p. 607-19.

Αναζήτηση αντιγονικών πρωτεϊνών έναντι της *Legionella pneumophila*

Μυρτώ ΚΟΥΤΑΝΤΟΥ¹, Δημοσθένης ΧΟΧΛΑΚΗΣ², Σοφία ΜΑΚΚΑ², Άννα ΨΑΡΟΥΛΑΚΗ², Γεώργιος ΤΣΙΩΤΗΣ¹

¹Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, Ελλάδα, myrto.koutantou@gmail.com

²Μονάδα Ζωονόσων, Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Μικροβιακής Παθογένεσης, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, surreydimos@hotmail.com

²Μονάδα Ζωονόσων, Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Μικροβιακής Παθογένεσης, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, makkasofia@gmail.com

²Μονάδα Ζωονόσων, Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Μικροβιακής Παθογένεσης, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, psaroulaki@uoc.gr

¹Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, Ελλάδα, tsiotis@uoc.gr

Περίληψη

Η *Legionella pneumophila* είναι ένα βακτήριο το οποίο ευθύνεται για την πρόκληση της νόσου των Λεγεωνάριων. Η καθυστέρηση στη διάγνωση μπορεί να αποβεί μοιραία εάν δεν αντιμετωπιστεί σωστά η νόσος και εξελιχθεί σε ταχέως εξελισσόμενη θανατηφόρα πνευμονία. Η πιο αξιόπιστη τεχνική διάγνωσης είναι η απομόνωση του μικροοργανισμού από τις εκκρίσεις του κατώτερου αναπνευστικού και η καλλιέργειά του σε ειδικό θρεπτικό υλικό στο εργαστήριο η οποία όμως απαιτεί 3-5 μέρες. Οι άλλες υπάρχουσες τεχνικές διάγνωσης δεν είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες και δεν ανιχνεύουν όλους τους ορότυπους του παθογόνου. Επομένως, υπάρχει ανάγκη για την ανάπτυξη ενός γρήγορου κι ευαίσθητου διαγνωστικού τεστ. Στόχος της έρευνας αυτής είναι η εύρεση ικανών και αξιόπιστων αντιγονικών πρωτεϊνών, οι οποίες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη διαγνωστικού τεστ. Στην έρευνα αυτή χρησιμοποιήθηκαν 43 περιβαλλοντικά και 2 κλινικά στελέχη, οροί από ασθενείς με νόσο των Λεγεωνάριων και οι τεχνικές ELISA, Western Blot και 2DE.

Λέξεις κλειδιά

Legionella pneumophila serogroup 1, Αντιγονικές πρωτεΐνες, Διάγνωση, ELISA, Western Blot

Εισαγωγή

Η *Legionella pneumophila* είναι ένα Gram – αρνητικό, αερόβιο, ευκαιριακά παθογόνο βακτήριο του γένους *Legionella*. Αναπτύσσεται σε υδάτινα και εδαφικά οικοσυστήματα παγκοσμίως, κυρίως σε υγρά τοπία, λίμνες, θερμές πηγές και περιστασιακά σε τεχνητά συστήματα διανομής νερού. Μπορεί να προκαλέσει την νόσο των Λεγεωνάριων (Legionnaire's disease), μία άτυπη πνευμονία, η οποία μπορεί να αποβεί μοιραία. Ο θάνατος συμβαίνει μέσω προοδευτικής πνευμονίας με αναπνευστική ανεπάρκεια ή/και σοκ και ανεπάρκεια πολλαπλών οργάνων.

Η νόσος των Λεγεωνάριων διαγιγνώσκεται επί του παρόντος κυρίως με την ανίχνευση αντισωμάτων (από IFA μέσω εμπορικά διαθέσιμων κιτ που ανιχνεύουν έως και 5 ορότυπους της *L. pneumophila*) ή μέσω χρωματογραφικής μεθόδου στα ούρα. Η τελευταία κυρίως, αλλά όχι αποκλειστικά, ανιχνεύει *L. pneumophila* sg 1.

Ο στόχος της τρέχουσας μελέτης ήταν να προσδιοριστούν πρωτεΐνες οι οποίες θα μπορούσαν δυνητικά να χρησιμοποιηθούν έναντι του *L. pneumophila* sg 1 ως πρώτο βήμα προς την ανάπτυξη ταχείας δοκιμής που θα είναι σε θέση να ανιχνεύσει και να διακρίνει (όπου είναι δυνατόν) τη *L. pneumophila* και άλλα είδη *Legionella* ως αιτίες ανθρώπινης λοίμωξης.

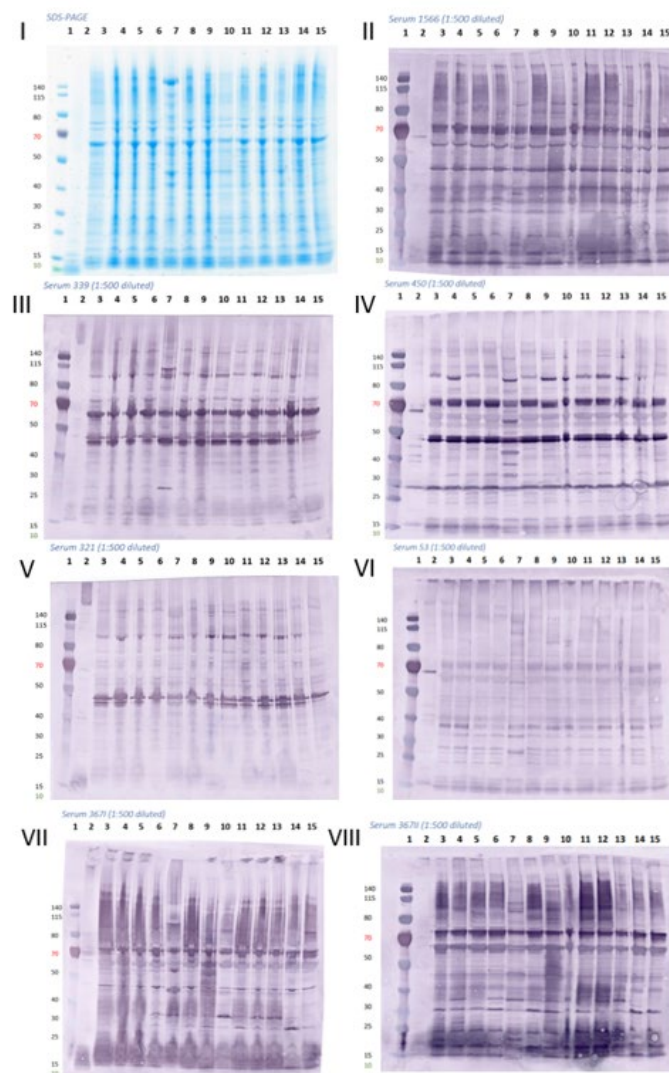
Μέθοδοι

Χρησιμοποιήσαμε 43 περιβαλλοντικά στελέχη, που έχουν ταυτοποιηθεί ως *L. pneumophila* sg 1, τα οποία συλλέχθηκαν από υδάτινα συστήματα από διαφορετικές ξενοδοχειακές μονάδες από ολόκληρη την Κρήτη και δύο στελέχη που απομονώθηκαν από ασθενείς οι οποίοι νοσηλεύτηκαν με τη νόσο των Λεγεωνάριων. Μετά την καλλιέργεια των στελεχών, απομονώθηκαν κυρίως μεμβρανικές πρωτεΐνες μέσω οσμωτικού σοκ. Μια δοκιμασία ELISA βελτιστοποιήθηκε (Elverdal et al. 2013, Sun et al. 2015)

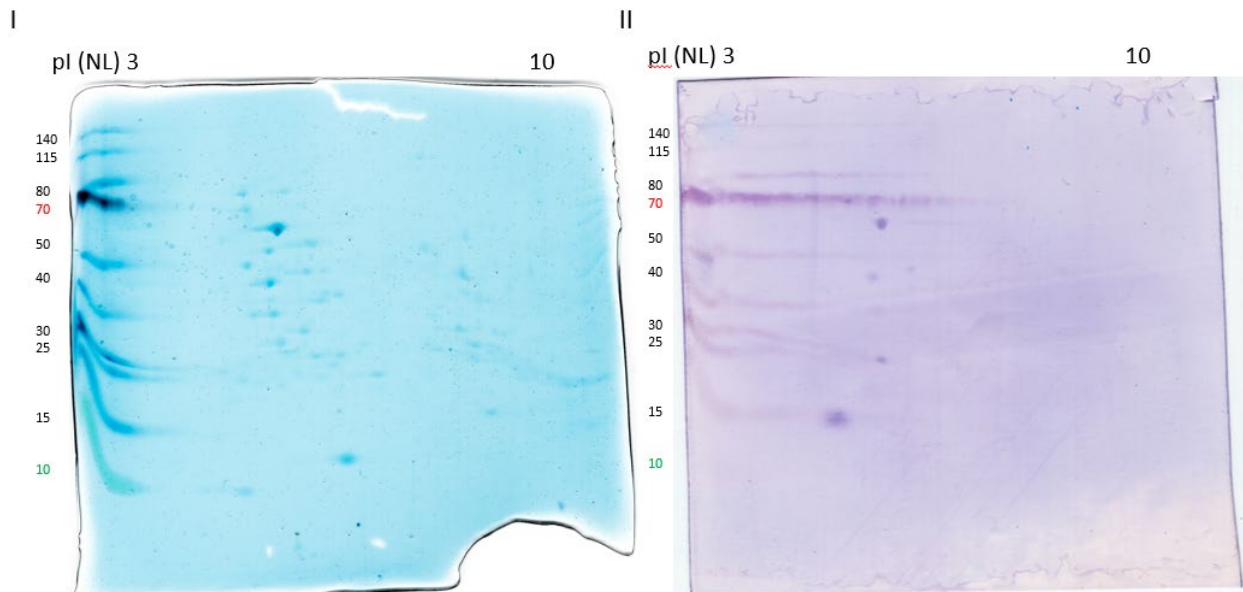
χρησιμοποιώντας αυτές τις πρωτεΐνες (το κάθε στέλεχος σε ξεχωριστό πηγάδι) η αντιγονικότητα των οποίων δοκιμάστηκε έναντι ανθρώπινων ορών από ασθενείς με διαγνωσμένη νόσο των Λεγεωνάριων (Barka, Tomasi, & Stadtsbaeder 1986). Τα στελέχη που εμφάνισαν σημαντικές οπτικές πυκνότητες ($OD > 1$), ελέγχθηκαν περαιτέρω με ηλεκτροφόρηση (1D SDS-PAGE και 2D IEF / SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωμα (Western Blot) για έλεγχο των «μοτίβων» των διάφορων στελεχών έναντι των ίδιων ορών.

Αποτελέσματα

Από τα 46 στελέχη που ελέγχθηκαν με ELISA, εννέα (όλα περιβαλλοντικής προέλευσης) δεν αντέδρασαν με κανένα από τα δείγματα ορών. Από τα υπόλοιπα στελέχη, πέντε διαφορετικά «μοτίβα» αποκαλύφθηκαν με το ανοσοαποτύπωμα, που σχετίζονται με τους διάφορους ορούς. Τα «μοτίβα» μεταβάλλονταν σημαντικά από ορό σε ορό, αλλά όχι από στέλεχος σε στέλεχος. Οροί προερχόμενοι από τον ίδιο ασθενή οι οποίοι όμως συλλέχθηκαν σε διαφορετικές περιόδους κατά τη διάρκεια της νόσου έδωσαν επίσης διαφορετικά «μοτίβα».



Εικόνα 1. SDS-PAGE και Western Blot με 14 διαφορετικά στελέχη και 7 διαφορετικούς ορούς. I) SDS-PAGE, II) Western Blot με τον ορό ασθενούς (1:500 αραιώση) ως πρωτοταγές αντίσωμα, III) Western Blot με τον ορό άλλου ασθενούς (1:500 αραιώση), IV) Western Blot με ορό τρίτου ασθενούς (1:500 αραιώση, V) Western Blot με ορό τέταρτου ασθενούς (1:500 αραιώση), VI) Western Blot με ορό πέμπτου ασθενούς (1:500 αραιώση) VII) Western Blot με ορό ασθενούς στην ενεργή φάση της λοίμωξης (1:500 αραιώση), VIII) Western Blot με ορό του ίδιου ασθενούς στην αποδρομή της λοίμωξης (1:500 αραιώση).



Εικόνα 2. I) Πηκτή 2DE IEF/SDS-PAGE, II) Western Blot με ορό ασθενούς (1:500 αραιώση)

Συμπεράσματα

Δεν μπορούν όλα τα περιβαλλοντικά στελέχη να «παράξουν» αντιγονικές πρωτεΐνες. Τα «μοτίβα» που αποκαλύφθηκαν αφορούσαν τους διαφορετικούς ορούς ενισχύοντας την υποψία ότι διαφορετικές πρωτεΐνες μπορούν να καταγραφούν σε διαφορετικά στάδια κατά τη διάρκεια της νόσου. Αυτό θα μπορούσε να αποδειχθεί εξαιρετικά χρήσιμο σε περίπτωση που μια γρήγορη διαγνωστική δοκιμή όχι μόνο μπορεί να κάνει διακρίσεις μεταξύ οροομάδων ή/και ειδών, αλλά και να δώσει μια υπόδειξη για το στάδιο της νόσου. Το επόμενο βήμα μας είναι να συνεχίσουμε με τον εντοπισμό των αντιγονικών πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας, να ταυτοποιήσουμε, κλωνοποιήσουμε, καθαρίσουμε και να δοκιμάσουμε ξανά τις υπάρχουσες πρωτεΐνες χρησιμοποιώντας αυτή την φορά chromatographic papers για να ελέγξουμε την ικανότητά τους να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικοί πρωτεϊνικοί-στόχοι.

Βιβλιογραφία

Barka, N., Tomasi, J. P., & Stadtsbaeder, S. (1986). ELISA using whole *Legionella pneumophila* cell as antigen. Comparison between monovalent and polyvalent antigens for the serodiagnosis of human legionellosis. *Journal of immunological methods*, 93(1), 77–81. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90435-7](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90435-7)

Elverdal, P. L., Jørgensen, C. S., Krogfelt, K. A., & Uldum, S. A. (2013). Two years' performance of an in-house ELISA for diagnosis of Legionnaires' disease: detection of specific IgM and IgG antibodies against *Legionella pneumophila* serogroup 1, 3 and 6 in human serum. *Journal of microbiological methods*, 94(2), 94–97. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.04.010>

Sun, H., Ma, H., Liu, L., Cao, X., & Yang, Z. (2015). A new ELISA method for serological diagnosis of *Legionella pneumophila*: use of five purified proteins, FLA, MOMP, MIP, IP, and PILE, as diagnostic antigen. *Clinical laboratory*, 61(3-4), 275–282. <https://doi.org/10.7754/clin.lab.2014.140908>

Μελέτη των προφίλ αντοχής περιβαλλοντικών στελεχών *Escherichia coli* (*E.coli*) από τη Λιβαδειά

Χρυσούλα ΔΙΟΛΗ, Όλγα ΠΑΠΠΑ, Αναστασία-Μαρία ΚΕΦΑΛΑ, Αθηνά ΜΑΥΡΙΔΟΥ, Ελένη ΓΙΑΝΝΟΥΛΑΚΗ, Παναγιώτα ΓΙΑΚΚΟΥΠΗ, Βιβή ΜΥΡΙΑΓΚΟΥ, Απόστολος ΜΠΕΛΟΥΚΑΣ
Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Αθήνα cdioli@uniwa.gr

Κεντρικό Εργαστήριο Δημόσιας Υγείας, Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας (ΕΟΔΥ)
Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας, Σχολή Δημόσιας Υγείας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Αθήνα
Εργαστήριο Βακτηριολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα

Περίληψη

Τα υδάτινα οικοσυστήματα και τα λύματα αποτελούν σημαντικές δεξαμενές ανθεκτικών και πολύ-ανθεκτικών μικροβίων, συμπεριλαμβανομένων στελεχών *E.coli*. Η παρούσα εργασία στοχεύει στην μελέτη της αντιμικροβιακής αντοχής και των γονοτύπων των στελεχών *E.coli*, που κυκλοφορούν σε σύνθετα υδάτινα περιβάλλοντα, εφαρμόζοντας πρότυπες καλλιεργητικές τεχνικές και τη μοριακή μέθοδο Phylogrouping. Το 67% των περιβαλλοντικών στελεχών *E.coli* χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικά (Resistant; R), το 14% ως πολύ-ανθεκτικά (Multidrug Resistant; MDR) και το 19% ως άγριου τύπου που δεν φέρουν επίκτητους μηχανισμούς αντοχής. Σύμφωνα με την μοριακή τυποποιητική τεχνική Phylogrouping το 53% των στελεχών κατατάχθηκε στην ομάδα A. Τα αποτελέσματα της μελέτης θα συνεισφέρουν στην εκτίμηση του κινδύνου της έκθεσης των ατόμων σε ανθεκτικά και πολύ-ανθεκτικά βακτήρια, που προέρχονται από το περιβάλλον (λύματα και υδάτινα ενδιαιτήματα) καθώς και του κινδύνου της επαναχρησιμοποίησης του λύματος ως νερό άρδευσης ή βελτιωτικό εδάφους.

Λέξεις-κλειδιά

περιβάλλον, *E.coli*, αντιβιοτικά, αντοχή

Εισαγωγή

Η μικροβιακή αντοχή σε σχεδόν όλα τα διαθέσιμα αντιβιοτικά και η εξάπλωση των γονιδίων αντοχής στους βακτηριακούς πληθυσμούς αποτελεί μείζον ζήτημα για την παγκόσμια υγεία. Τα υδάτινα οικοσυστήματα και τα λύματα αποτελούν πηγές ανθεκτικών και πολύ-ανθεκτικών μικροβίων, συμπεριλαμβανομένων των ανθεκτικών στελεχών *E.coli*, εκθέτοντας σε περαιτέρω κίνδυνο την υγεία του ανθρώπου [Deshmukh et al. 2006, Solomon S.L 2017]. Η συστηματική επιτήρηση της αντιμικροβιακής αντοχής στο περιβάλλον κρίνεται απαραίτητη.

Σκοπός

Έλεγχος της ποικιλομορφίας των προφίλ αντοχής και των κυκλοφορούντων γονοτύπων των στελεχών *E.coli* που έχουν συλλεχθεί από σύνθετα υδάτινα ενδιαιτήματα.

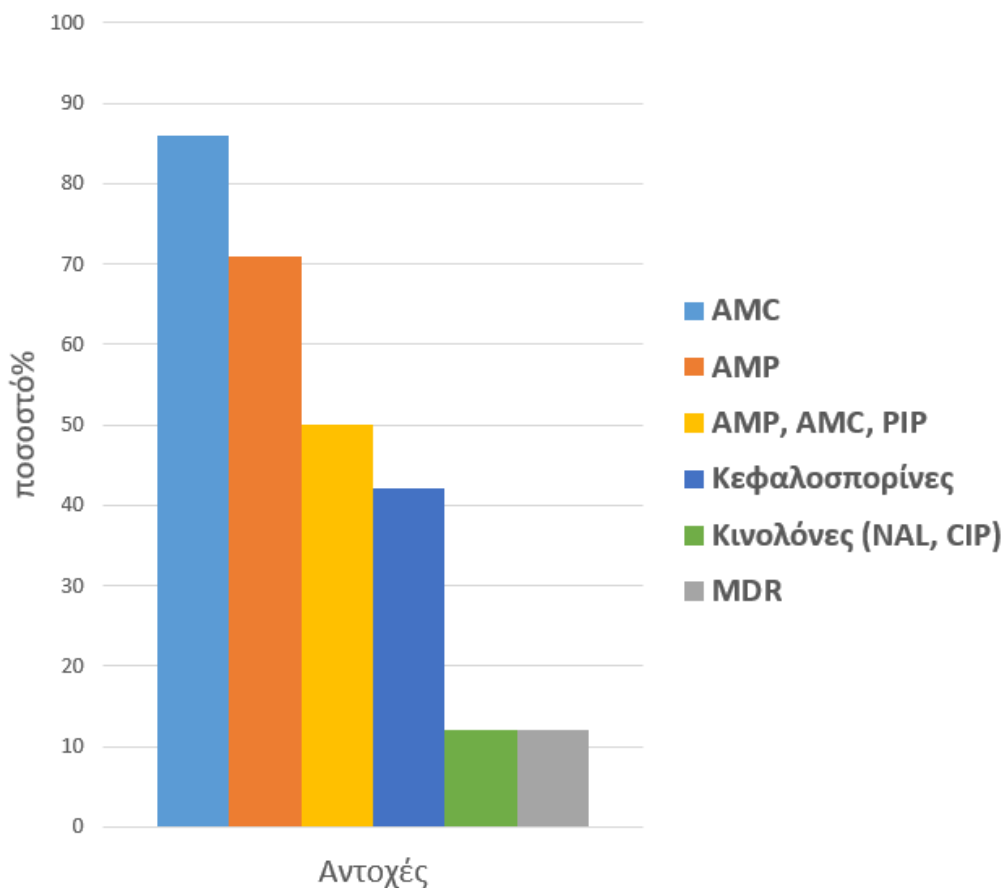
Υλικά/Μέθοδοι

Την περίοδο Ιουλίου 2019- Φεβρουαρίου 2020, απομονώθηκαν 133 στελέχη *E.coli*, από δείγματα λύματος και νερού ποταμών από την περιοχή της Λιβαδειάς. Συγκεκριμένα απομονώθηκαν: α) 50 στελέχη από δείγμα λύματος που συλλέχθηκε από την έξοδο της Μονάδας Επεξεργασίας Λυμάτων της Λιβαδειάς (Ε.Ε.Λ Λιβαδειάς), β) 20 στελέχη από δείγμα μερικώς επεξεργασμένου λύματος από το Γενικό Νοσοκομείο Λιβαδειάς και γ) 63 στελέχη από δείγμα νερού από τους ποταμούς Έρκυνα και Βοιωτικό Κηφισό. Τα δείγματα επεξεργάστηκαν στο Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής και τα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν ταυτοποιήθηκαν και φυλάχθηκαν σε κατάλληλες συνθήκες στο αρχείο βιολογικών δειγμάτων του εργαστηρίου. Το σύνολο των στελεχών υποβλήθηκε σε έλεγχο μικροβιακής ευαισθησίας σε 21 ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών σε άγαρ (μέθοδος Kirby Bauer) (http://www.eucast.org/ast_of_bacteria) και σε φαινοτυπικό τεστ Double-Disc Synergy Test (DDST) για την ανίχνευση β-λακταμασών εκτεταμένου φάσματος (extended-spectrum β-lactamases, ESBLs). Επίσης τυποποιήθηκαν σε φυλογενετικές ομάδες, με την μοριακή τεχνική Phylogrouping

[Clermont O et al. 2000].

Αποτελέσματα:

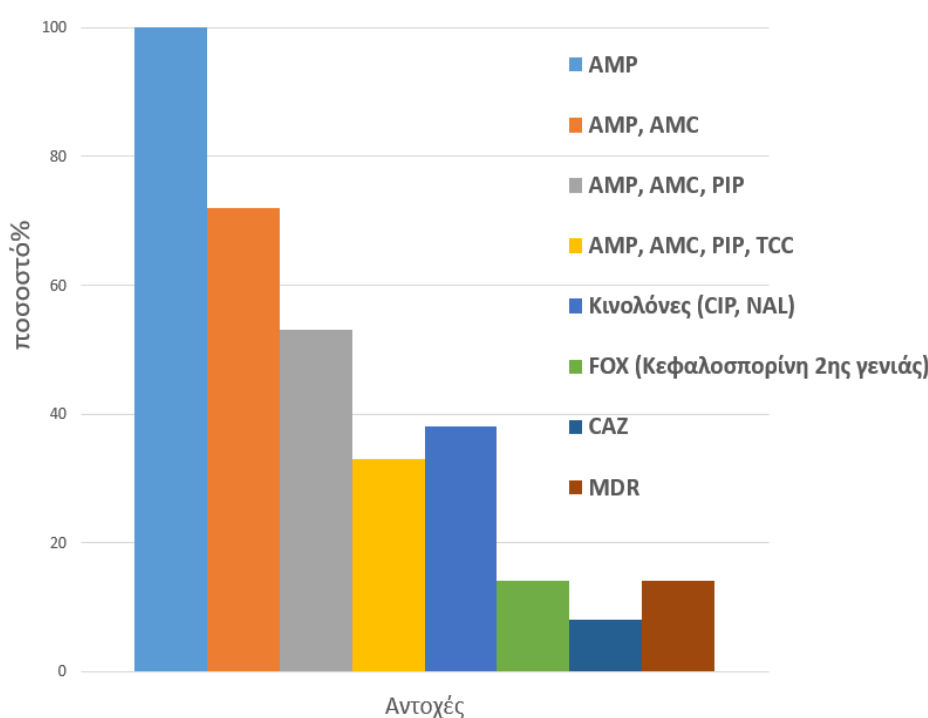
Σύμφωνα με τα επιδημιολογικά όρια (EUCAST/ECOFF), ως ανθεκτικά χαρακτηρίστηκαν: α) τα 31 από τα 50 (62%) στελέχη που απομονώθηκαν από λύμα της Μονάδας Επεξεργασίας Λύματος, ενώ τα 5 από τα 50 (10%) εμφάνισαν πολύ-ανθεκτικότητα, β) τα 46 από τα 63 (73%) στελέχη που απομονώθηκαν από το νερό των δύο ποταμών, ενώ τα 6 από τα 63 (9%) χαρακτηρίστηκαν ως πολύ-ανθεκτικά, γ) τα 10 από τα 20 (50%) στελέχη που προήλθαν από το νοσοκομειακό λύμα, ενώ τα 7 από τα 20 (35%) ήταν πολυανθεκτικά. Στο Σχήμα 1 και Σχήμα 2 παρουσιάζονται τα πιο συχνά πρότυπα αντοχής των ανθεκτικών στελεχών *E.coli* που απομονώθηκαν από δείγματα νερού ποταμών και λύματος της Ε.Ε.Λ, αντίστοιχα. Η φαινοτυπική διαδικασία DDST ανέδειξε 8 στελέχη θετικά για ESBLs, τα οποία εμφάνισαν και πολλαπλές αντοχές (όπως παρουσιάζονται στους Πίνακες 1, 2 και 3). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της τυποποιητικής μεθόδου του Phylogrouping, τα 70 από τα 133 (53%) στελέχη *E.coli*, κατατάχθηκαν στην ομάδα A ενώ ακολούθησαν οι ομάδες B2, B1 και D με συχνότητα 23% (31/133), 15% (20/133) και 9% (12/133) αντίστοιχα. Στους Πίνακες 1, 2 και 3 παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των στελεχών *E.coli*, με αξιοσημείωτες αντοχές, που απομονώθηκαν από τα ποτάμια Έρκυνα και Βοιωτικό Κηφισό, από λύμα της Ε.Ε.Λ και από μερικώς επεξεργασμένο νοσοκομειακό λύμα, αντίστοιχα.



Σχήμα 1: Οι σημαντικότερες αντοχές των R και MDR στελεχών *E.coli* που απομονώθηκαν από δείγματα νερού ποταμών

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά MDR στελεχών *E.coli* που απομονώθηκαν από τα Ποτάμια Έρκυνα και Βοιωτικό Κηφισό

No στελέχους	Αντοχές	DDST	Προφίλ Αντοχής	Φυλογενετική ομάδα
311	AMP, AMC, PIP, TCC, CXM, CRO, ATM		MDR	D
356	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM	+	MDR	D
404	AMP, AMC, PIP, TZP, TCC, FEP, SXT, CIP		MDR	A
405	AMP, AMC, PIP, CXM, CTX, CRO, ATM, CIP, NAL		MDR	D
408	AMP, AMC, TZP, PIP, TCC, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, MEM, SXT		MDR	D
409	AMP, AMC, PIP, SXT, CIP, NAL		MDR	A



Σχήμα 2: Οι σημαντικότερες αντοχές των R και MDR στελεχών *E.coli* που απομονώθηκαν από το λύμα της Ε.Ε.Λ Λιβαδεΐας

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά MDR και R στελεχών *E.coli* που απομονώθηκαν από λύμα της Ε.Ε.Λ Λιβαδεΐας

No στελέχους	Αντοχές	DDST	Προφίλ Αντοχής	Φυλογενετική ομάδα
297	AMP, AMC, PIP, CAZ, CRO, ATM, AN	+	MDR	A
299	AMP, AMC, PIP, TCC, CAZ, ATM, NAL, CIP		MDR	B1
326	AMP, PIP, CAZ, FOX, ATM	+	MDR	B2
332	AMP, AMC, PIP, GM, AN, SXT, CIP, NAL		MDR	A
385	AMP, AMC, PIP, TCC, IMP		R	B2
386	AMP, AMC, PIP, TCC, SXT		R	D
388	AMP, AMC, PIP, TCC		R	B2
390	AMP, PIP, GN, SXT, CIP, NAL		MDR	B2

Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά MDR στελεχών *E.coli* που απομονώθηκαν από μερικώς επεξεργασμένο νοσοκομειακό λύμα (από το Γενικό Νοσοκομείο Λιβαδειάς)

Νο στελέχους	Αντοχές	Προφίλ Αντοχής	DDST	Φυλογενετική Ομάδα
426	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, CRO, ATM, CIP, NAL	MDR	+	D
427	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, CRO, ATM, AN, CIP, NAL	MDR	+	B2
431	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, CRO, ATM, AN, CIP, NAL	MDR	+	B2
434	AMP, AMC, PIP, CAZ, CTX, CRO, ATM, CIP, NAL	MDR	+	B2
436	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, CRO, ATM, AN, CIP	MDR	+	B2

Συμπεράσματα

Η ανίχνευση ανθεκτικών και πολύ-ανθεκτικών στελεχών *E.coli* στα υπό εξέταση περιβάλλοντα κρούει το σήμα κινδύνου για τη Δημόσια Υγεία. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης θα χρησιμοποιηθούν στην εκτίμηση κινδύνου της έκθεσης των ατόμων σε ανθεκτικά και πολύ-ανθεκτικά βακτήρια που προέρχονται από το περιβάλλον καθώς και για την ασφαλή επαναχρησιμοποίηση του λύματος ως νερό άρδευσης ή ως βελτιωτικού εδάφους. Μελλοντικά, θα μελετηθούν τα επίπεδα αντοχής κλινικών στελεχών *E.coli*, που έχουν απομονωθεί από το προσωπικό του μικροβιολογικού εργαστηρίου του Νοσοκομείου της Λιβαδειάς. Επιπρόσθετα, σε όλα τα στελέχη, κλινικά και περιβαλλοντικά, θα πραγματοποιηθεί η τυποποιητική μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε παλλόμενο πεδίο (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE) καθώς και η ανίχνευση γονιδίων αντοχής. Η διαδικασία επιδιώκει τον επιδημιολογικό συσχετισμό μεταξύ των γονοτύπων που κυκλοφορούν στα υδάτινα οικοσυστήματα και αυτών που κυριαρχούν στο νοσοκομείο, με στόχο την ανίχνευση επιδημικών συμβάντων που σχετίζονται με έκθεση σε κοινή περιβαλλοντική πηγή.

Βιβλιογραφία

- Deshmukh R., Joshi K., Bhand S. & Roy U. (2016). Recent developments in detection and enumeration of waterborne bacteria: a retrospective minireview. *Microbiology Open*, 5(6):901–922.
- Solomon S.L. (2017). The Unique Contribution of One Health to combating Antibiotic Resistance. <https://www.cdc.gov/onehealth/multimedia/factsheet.html>
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing' (EUCAST) (ECOFFs και Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10, 2020: http://www.eucast.org/ast_of_bacteria
- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E: Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group, *Appl Environ Microbiol*. 2000 Oct, 66(10):4555-8
- Ribot EM., Fair MA, Gautom R., (2006), Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of Escherichia coli O157:H7, Salmonella, and Shigella for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis* 3, 59–67. doi:10.1089/fpd.2006.3.59

Μελέτη των αντιγονικών πρωτεϊνών Com1 και UPF0422 του παθογόνου βακτηρίου *Coxiella burnetii*, για την ικανότητά τους να διαγιγνώσκουν την χρόνια φάση του πυρετού Q.

Ειρήνη ΜΑΘΙΟΥΔΑΚΗ¹, Cornelia MUENKE², Ιωσήφ ΒΡΑΝΑΚΗΣ³, Μυρτώ ΚΟΥΤΑΝΤΟΥ¹, Δημοσθένης ΧΟΧΛΑΚΗΣ³, Άννα ΨΑΡΟΥΛΑΚΗ³, Hao XIE² και Γεώργιος ΤΣΙΩΤΗΣ^{1*}

Τομέας Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, 71003 Βούτες, Ηράκλειο, Ελλάδα,

eirini.mathiou@gmail.com

Max Planck Institute for Biophysics, Max-von-Laue-Straße 3, D-60438 Φρανκφούρτη, Γερμανία,

conny.muenke@biophys.mpg.de

Μονάδα Ζωονόσων, Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Μικροβιακής Παθογένεσης, Ιατρική Σχολή,

Πανεπιστήμιο Κρήτης 71110 Ηράκλειο, Ελλάδα, iosif.vranakis@gmail.com

Τομέας Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, 71003 Βούτες, Ηράκλειο, Ελλάδα,

mykou.xakou@gmail.com

Μονάδα Ζωονόσων, Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Μικροβιακής Παθογένεσης, Ιατρική Σχολή,

Πανεπιστήμιο Κρήτης 71110 Ηράκλειο, Ελλάδα, surreydimos@hotmail.com

Μονάδα Ζωονόσων, Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Μικροβιακής Παθογένεσης, Ιατρική Σχολή,

Πανεπιστήμιο Κρήτης 71110 Ηράκλειο, Ελλάδα, psaroulaki@uoc.gr

Max Planck Institute for Biophysics, Max-von-Laue-Straße 3, D-60438 Φρανκφούρτη, Γερμανία,

hao.xie@biophys.mpg.de

Τομέας Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, 71003 Βούτες, Ηράκλειο, Ελλάδα, tsiotis@uoc.gr

Περίληψη

Η χρόνια μορφή του πυρετού Q είναι μία αρκετά επικίνδυνη ασθένεια, η οποία είναι αρκετά δύσκολο να διαγνωσθεί και να θεραπευτεί. Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται τα πρώιμα βήματα για την ανάπτυξη ενός νέου, διαγνωστικού εργαλείου ενάντια στον χρόνια πυρετό Q, το οποίο θα στηρίζεται στην ιδιότητα ορισμένων πρωτεϊνών να διαφορο- διαγιγνώσκουν την συγκεκριμένη νόσο.

Λέξεις- κλειδιά

χρόνιος πυρετός Q, *Coxiella burnetii*, αντιγονικές πρωτεΐνες, ELISA

Εισαγωγή

Το υποχρεωτικά ενδοκυττάριο παθογόνο βακτήριο *Coxiella burnetii* αποτελεί τον αιτιολογικό παράγοντα του πυρετού Q στον άνθρωπο. Ο πυρετός Q είναι μια ζωονόσος με παγκόσμια διασπορά και διαφορετικές κλινικές εκδηλώσεις ανάλογα με την οξεία ή την χρόνια μορφή του [Raoult et al, 2005]. Το βακτήριο *Coxiella burnetii* έχει εντοπιστεί σε ένα ευρύ φάσμα άγριων και κατοικίδιων ζώων, συμπεριλαμβανομένων αρθρώπων, πτηνών, τρωκτικών, σαρκοφάγων και οπληφόρων ζώων.

Ο οξύς πυρετός Q είναι κυρίως μια αυτοπεριοριζόμενη, ήπια, παρόμοια με τη γρίπη ασθένεια, που ορισμένες φορές περιπλέκεται από σοβαρή πνευμονία ή ηπατίτιδα. Ένα ποσοστό των ασθενών που έχουν μολυνθεί από το *C. burnetii*, θα εξελιχθεί στη χρόνια μορφή του πυρετού Q μετά την αρχική λοίμωξη. Ο χρόνιος πυρετός Q οδηγεί σε υψηλά ποσοστά θνησιμότητας, εάν δεν αντιμετωπιστεί έγκαιρα, γεγονός που καθιστά την γρήγορη διάγνωση κρίσιμη για ασθενείς με υψηλό κίνδυνο [Raoult, Marrie, 2002].

Επιπλέον, ο πυρετός Q έχει υψηλές κοινωνικοοικονομικές επιπτώσεις, οι οποίες προέρχονται τόσο από την απειλή της δημόσιας υγείας όσο και της υγείας των ζώων [Asseldonk et al, 2015]. Κατά τα τελευταία 25 χρόνια, 32 εξάρσεις έχουν εντοπισθεί στην Ευρώπη, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο αριθμός των κρουσμάτων πυρετού Q αυξάνεται συνεχώς. Ο πυρετός Q έχει γίνει ένα σοβαρό πρόβλημα δημόσιας υγείας σε πολλές περιοχές που δεν ήταν προηγουμένως γνωστές ως ενδημικές ζώνες και αντιπροσωπεύει σημαντικό κίνδυνο για την υγεία των ανθρώπων και των ζώων [Khabbaz et al, 2014]. Η σημασία της οικονομικής και δημόσιας υγείας της νόσου υπογραμμίστηκε πρόσφατα μετά τη μεγαλύτερη έξαρση

πυρετού Q που εκδηλώθηκε ποτέ, η οποία εμφανίστηκε από το 2007 έως το 2011 στην Ολλανδία [Schneeberger et al, 2014].

Όσον αφορά την έγκαιρη διάγνωση του χρόνιου πυρετού Q, υπάρχει διαγνωστικό πρόβλημα δεδομένου ότι η τρέχουσα τυπική μέθοδος για τη διάγνωση, ο ανοσοφθορισμός, παρουσιάζει πολλά μειονεκτήματα. Για παράδειγμα, η αντικειμενικότητα της ερμηνείας των αποτελεσμάτων, οι πιθανές διασταυρούμενες αντιδράσεις, η ανάγκη έμπειρου προσωπικού κ.λπ. είναι κάποια από αυτά. Σε προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας, εντοπίστηκαν και προσδιορίστηκαν αντιγονικές πρωτεΐνες που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως υποκατάστατο των υπάρχοντων πρωτοκόλλων, που βασίζονται στην ανίχνευση αντισωμάτων ή θα μπορούσαν να εξελιχθούν σε ένα γρήγορο ανοσοχρωματογραφικό kit.

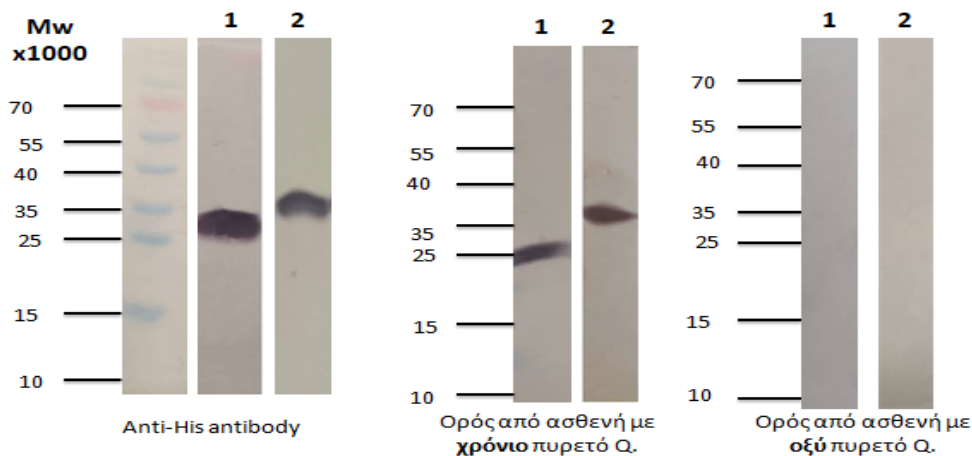
Στην τρέχουσα εργασία, ελέγξαμε τις Com1 και CBU_0937 (UPF0422), πρωτεΐνες εξωτερικής μεμβράνης από το στέλεχος Nine-Mile της *C. burnetii*, για την ικανότητά τους να διαφοροδιαγιγνώσκουν τον χρόνιο πυρετό Q σε ορούς δειγμάτων ασθενών.

Μέθοδοι

Μέσω της τεχνικής κλωνοποίησης του ανασυνδυασμένου DNA, κατασκευάστηκαν πλασμίδια τα οποία έφεραν τα γονίδια για τις πρωτεΐνες Com1 και CBU_0937. Έπειτα, η πρωτεϊνική έκφραση πραγματοποιήθηκε ετερόλογα σε *E. coli* competent cells. Οι πρωτεΐνες απομονώθηκαν από τις βακτηριακές μεμβράνες και ελέγχθηκαν με Western blot και ELISA για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του χρόνιου πυρετού Q. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν 160 διαφορετικοί οροί (από ασθενείς που έπασχαν από χρόνιο πυρετού Q, οξύ πυρετό, ρευματοειδή νοσήματα και υγιείς αιμοδότες) και στο τέλος πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων προκειμένου να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με την ειδικότητα και την ευαισθησία της κάθε πρωτεΐνης.

Αποτελέσματα

Μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό τους, οι δύο πρωτεΐνες ελέγχθηκαν μέσω Western blot, αρχικά για τον εντοπισμό τους με anti-His antibody κι έπειτα για την ικανότητά τους να διαγιγνώσκουν την χρόνια φάση του πυρετού Q. Για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν οροί από ασθενείς που έπασχαν από την οξεία και τη χρόνια φάση της νόσου, αντίστοιχα (Εικόνα 1). Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες ελέγχθηκαν με την μέθοδο στην ELISA και τέλος πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση με βάση τα αποτελέσματα αυτά. Σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση, και οι δύο πρωτεΐνες παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα σχετικά με τη διάγνωση της χρόνιας μορφής του πυρετού Q, ενώ η Com1 φαίνεται να έχει τα μεγαλύτερα ποσοστά ευαισθησίας και ειδικότητας από όλες τις πρωτεΐνες που ελέγχθηκαν.



Εικόνα 1: Western blot των δύο πρωτεϊνών με anti- His antibody, ορό από ασθενή που πάσχει από χρόνιο πυρετό Q και ορό από ασθενή που πάσχει από οξύ πυρετό Q. Παρατηρούμε ότι και οι δύο αντιγονικές πρωτεΐνες φαίνεται να αντιδρούν με τον ορό του ασθενούς τη χρόνια μορφή της νόσου, ενώ ο ορός από ασθενή με την οξεία μορφή δεν δείχνει καμία αντίδραση. 1. Com1 2. CBU_0937.

Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας είναι αρκετά ενθαρρυντικά όσον αφορά τη βελτιστοποίηση της αξιοπιστίας των υπάρχοντων μεθόδων διάγνωσης του χρόνιου πυρετού Q στους ανθρώπους. Προχωρώντας σε περαιτέρω μελέτες, θα είμαστε σε θέση να ελέγξουμε περισσότερες αντιγονικές πρωτεΐνες, ως προς την ικανότητα διάγνωσης της οξείας μορφής της νόσου, προτείνοντας έτσι ένα αξιόπιστο εργαλείο για την βέβαιη διάγνωση, όχι μόνο του πυρετού Q, αλλά και της μορφής αυτού στον εκάστοτε ασθενή.

Βιβλιογραφία

D. Raoult, T. Marrie, J. Mege, (2005) Natural history and pathophysiology of Q fever, *Lancet Infect Dis*, 5 219-226.

T.J. Marrie, D. Raoult, (2002) Update on Q fever, including Q fever endocarditis., *Current Clinical Topics in Infectious Diseases*, 22 97-124.

M.A. van Asseldonk, D.M. Bontje, J.A. Backer, H.J. Roermund, R.H. Bergevoet, (2015) Economic aspects of Q fever control in dairy goats, *Prev Vet Med.*, 121 115-122.

R.F. Khabbaz, R.R. Moseley, R.J. Steiner, A.M. Levitt, B.P. Bell (2014), Challenges of infectious diseases in the USA, *Lancet*, 384 53–63.

P.M. Schneeberger, C. Wintenberger, W. van der Hoek, J.P. Stahl (2014), Q fever in the Netherlands - 2007-2010: what we learned from the largest outbreak ever., *Med Mal Infect.*, 44 339-353.

Μοριακή ταυτοποίηση προέλευσης γευμάτων αίματος για τον προσδιορισμό ξενιστών του *Culex ripiens* s.l. στην περιοχή του Μαραθώνα

ΜΠΕΛΕΡΗ Σταυρούλα¹, ΦΥΤΡΟΥ Νατάσα¹, ΔΑΜΕ Θεόδωρος², ΤΕΓΟΣ Νικόλαος¹, ΜΠΑΛΑΤΣΟΣ Γεώργιος³, ΚΑΡΡΑΣ Βασίλειος³, ΜΠΙΜΠΙΑ Αναστασία¹, ΠΑΠΑΒΑΣΙΛΟΠΟΥΛΟΣ Βασίλειος¹, ΠΑΠΑΧΡΗΣΤΟΣ Δημήτριος³, ΒΟΓΙΑΤΖΑΚΗ Χρύσα², ΠΑΤΣΟΥΛΑ Ελένη^{1*} & ΜΙΧΑΗΛΑΚΗΣ Αντώνιος³

¹ Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας, Σχολή Δημόσιας Υγείας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

² Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

³ Επιστημονική Διεύθυνση Εντομολογίας και Γ. Ζωολογίας, Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο

*epatsoula@uniwa.gr

Περίληψη

Η λήψη αίματος είναι μια διαδικασία απαραίτητη για τον κύκλο αναπαραγωγής των περισσότερων κουνουπιών που επηρεάζεται από γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες και παίζει καθοριστικό ρόλο στη μετάδοση παθογόνων στους ξενιστές. Το γένος *Culex* αποτελεί το πλέον διαδεδομένο γένος κουνουπιών, περιλαμβάνοντας είδη που τρέφονται ευκαιριακά τόσο από τον άνθρωπο όσο και από τα ζώα κι επομένως είναι ικανοί διαβιβάστες παθογόνων που προκαλούν ζωοανθρωπονόσους. Η παρούσα μελέτη είναι μια πρώτη καταγραφή της πηγής γευμάτων αίματος ενηλίκων *Culex ripiens* s.l. από δείγματα που συλλέχτηκαν στην περιοχή του Μαραθώνα τη διετία 2017-2018. Από τα επιλεγμένα δείγματα απομονώθηκε DNA, στη συνέχεια ενισχύθηκε με PCR τμήμα του γονιδιακού τύπου 16s rRNA με χρήση κοινών για τα σπονδυλωτά εκκινητών και η ταυτοποίηση του είδους του ξενιστή βασίστηκε στην αλληλούχηση των προϊόντων της PCR. Η διερεύνηση της επιλογής ξενιστή για λήψη αίματος συμβάλει στη βαθύτερη κατανόηση της οικολογίας και του ρόλου τους στη μετάδοση παθογόνων.

Αποσιώπηση του γονιδίου *dicer-2* σε κύτταρα Λεπιδοπτέρων με χρήση των τεχνικών RNAi και CRISPR/Cas9

Anna KOLLIPOULOU, Aleksander Józef MAZUREK, Dimitrios KONTOGIANNATOS, Luc SWEVERS

Ινστιτούτο Βιοεπιστημών & Εφαρμογών (ΙΒΕ), ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», και Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, ΣΕΥΠ, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής (ΠΑΔΑ), akolliopoulou@uniwa.gr
 Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, ΣΕΥΠ, ΠΑΔΑ, ml16049@uniwa.gr
 ΙΒΕ, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», dimkonto@bio.demokritos.gr
 ΙΒΕ, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», swevers@bio.demokritos.gr

Περίληψη

Στα πλαίσια του ελέγχου επιβλαβών εντόμων για τις καλλιέργειες, η ανάπτυξη περιβαλλοντικά ασφαλέστερων μεθόδων καταπολέμησης σε σχέση με τα χημικά εντομοκτόνα αποτελεί καίριο στόχο. Μία ενδιαφέρουσα προσέγγιση είναι η πρόσληψη ειδικά σχεδιασμένων δίκλωνων μορίων RNA (dsRNA) από έντομα για την αποσιώπηση γονιδίων μέσω RNA παρεμβολής (RNAi). Για τη μεταφορά των dsRNA θα χρησιμοποιούνται ιόμορφα σωματίδια που παράγονται μέσω ιών. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι η λειτουργία του ενζύμου-κλειδιού του RNAi μηχανισμού που κωδικοποιείται από το γονίδιο *dicer-2* μετατρέπει τα dsRNA σε μικρά παρεμβαλλόμενα RNA (siRNA). Προκειμένου να καταστεί εφικτή η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων dsRNA, στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η χρήση αποτελεσματικών μεθόδων αποσιώπησης του γονιδίου *dicer-2* σε κύτταρα ωοθήκης του Λεπιδοπτέρου *Spodoptera frugiperda* (Sf21). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν μοριακές κατασκευές οι οποίες αξιοποιούν τις τεχνικές RNAi και CRISPR/Cas9.

Λέξεις-κλειδιά

RNAi, CRISPR/Cas9, γονιδιακή αποσιώπηση, dsRNA, έντομα

Εισαγωγή

Η καταπολέμηση των επιβλαβών εντόμων είναι ένα πεδίο που αποτελεί σημαντικό στόχο παγκοσμίως. Μέχρι σήμερα χρησιμοποιούνται ευρέως χημικά εντομοκτόνα, που όμως αποδεικνύονται επικίνδυνα για το περιβάλλον και, συνεπώς, τον άνθρωπο. Η βιοτεχνολογική έρευνα μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη εντομοκτόνων πιο φιλικών προς το περιβάλλον σε σχέση με τα ήδη χρησιμοποιούμενα εντομοκτόνα, καθώς τα σύγχρονα εργαλεία της Μοριακής Βιολογίας αναδεικνύουν νέες προοπτικές στις μεθόδους γονιδιακής αποσιώπησης, που μπορούν να αξιοποιηθούν περαιτέρω.

Η ιδέα της πρόσληψης ειδικά σχεδιασμένων dsRNA από επιβλαβή έντομα για την αποσιώπηση συγκεκριμένων γονιδίων μέσω RNAi θα είναι εφαρμόσιμη εφόσον επιτευχθεί αποτελεσματικά αφενός η παραγωγή dsRNA σε μεγάλες ποσότητες, αφετέρου δε η μεταφορά τους στα έντομα-στόχους. Σχετικά με τη μεταφορά προτείνεται η χρήση ιόμορφων σωματιδίων που θα παράγονται μέσω RNA ιών (Kolliopoulou et al. 2017). Ταυτόχρονα, η παρούσα μελέτη εστιάζεται στην αυξημένη παραγωγή dsRNA. Καθώς η λειτουργία του ενζύμου Dicer-2 του RNAi μηχανισμού είναι να μετατρέπει τα μόρια dsRNA σε siRNA, εδώ για την αυξημένη παραγωγή dsRNA χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα Sf21 στα οποία επιχειρήθηκε η αποσιώπηση του γονιδίου *dicer-2*. Έτσι σχεδιάστηκαν και δημιουργήθηκαν οι κατάλληλες μοριακές κατασκευές, αξιοποιώντας τις τεχνικές RNAi και CRISPR/Cas9, προκειμένου να αποσιωπηθεί το γονίδιο *dicer-2*.

Μέθοδοι

RNAi

Με την τεχνική RNAi, στόχος ήταν η δημιουργία σταθερής κυτταρικής σειράς, η οποία να παρουσιάζει ελαττωματική έκφραση του γονιδίου *dicer-2*. Για την εφαρμογή αυτής της μεθόδου, προηγήθηκε ο σχεδιασμός της αλληλουχίας που περιελάμβανε συμπληρωματική αλληλουχία με αυτή του *dicer-2*, η οποία όταν μεταγράφεται θα οδηγεί στην παραγωγή ειδικής RNA φουρκέτας ως προς το *dicer-2* (SfHrDcr-2). Η δράση του ενζύμου Dicer-2, έχει ως αποτέλεσμα η παραγόμενη φουρκέτα να κατακερματίζεται σε μικρά μόρια, τα οποία λόγω της συμπληρωματικότητας τους υβριδίζουν με το

mRNA του *dicer-2* και το αποσιωπών. Το DNA που αντιστοιχεί στη φουρκέτα κλωνοποιήθηκε στο φορέα έκφρασης pEA (pEA-SfHpDcr-2) και έπειτα κύτταρα Sf21 διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αυτό για τη δημιουργία κυτταρικής σειράς όπου το *dcr-2* θα μειορρυθμίζεται σταθερά. Κατόπιν επιλογής των μετασηματισμένων κυττάρων παρουσία πουρομυκίνης για 5-7 εβδομάδες, τα κύτταρα ελέγχθηκαν πολλαπλώς. Αρχικά, απομονώθηκε DNA για την επιβεβαίωση ύπαρξης του διαγονιδίου που κωδικοποιεί τη φουρκέτα μέσω PCR. Ακολούθησε απομόνωση RNA και RT-PCR / qPCR, για τον έλεγχο τόσο της έκφρασης της φουρκέτας, όσο και της μείωσης της έκφρασης του *dicer-2*. Παράλληλα, δημιουργήθηκε επιπλέον κυτταρική σειρά μάρτυρας στην οποία κωδικοποιείται RNA φουρκέτα με στόχο το μη ενδογενές γονίδιο της λουσιφεράσης (HpLuc).

CRISPR

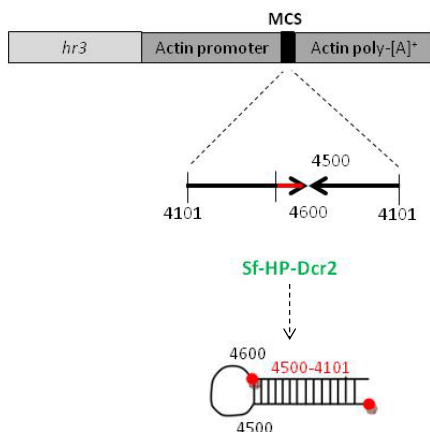
Η δεύτερη μέθοδος αποσιώπησης του γονιδίου *dicer-2* αξιοποιεί το μηχανισμό CRISPR/Cas9, στα πλαίσια του οποίου η ενδονουκλεάση SpCas9, καθοδηγούμενη από έναν RNA-οδηγό, και μέσω συμπληρωματικότητας, προξενεί αποδιάταξη των κλώνων και βλάβη στο γονιδιωματικό DNA με τη μορφή δίκλωνης πέψης. Η επιδιόρθωση της βλάβης γίνεται με επαναϋβριδισμό των κλώνων με αποτέλεσμα την απώλεια βάσεων. Στη στρατηγική κλωνοποίησης στο πλασμίδιο pCRISPR/Cas9 (Mabashi-Asazuma & Jarvis, 2017) αρχικά εντοπίστηκαν πιθανές αλληλουχίες PAM (NGG) στο *dicer-2*, καθώς η PAM είναι απαραίτητη για την πέψη από την SpCas9. Ακολούθησε προσδιορισμός της 5' θέσης έναρξης της αλληλουχίας-στόχου, αριθμώντας 20 νουκλεοτίδια ανοδικά της PAM. Οι πιθανές αλληλουχίες-στόχοι στο *dicer-2* προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια του online εργαλείου crispr.dbcls.jp/doc, σύμφωνα με τις ακόλουθες παραμέτρους: α) για λόγους σταθερότητας του RNA, προτιμάται η αλληλουχία να διαθέτει περιεχόμενο βάσεων GC σε ποσοστό 40-80%, β) για την αποφυγή δράσης εκτός στόχου, συνιστάται η αλληλουχία να έχει μήκος 17-24 βάσεις, και γ) η προς κλωνοποίηση αλληλουχία πρέπει να ξεκινά με G. Ακολούθως επιλέχθηκαν 4 αλληλουχίες-στόχοι, οι οποίες κλωνοποιήθηκαν στις θέσεις *SapI* στο πλασμίδιο pCRISPR/Cas9 καθοδικά του υποκινητή SfU6 της RNA πολυμεράσης III. Έπειτα, κύτταρα Sf21 διαμολύνθηκαν με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια, ενώ απομονώθηκε DNA και RNA, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η βλάβη στο γονίδιο *dicer-2* μέσω PCR και αλληλούχησης, καθώς και να διασαφηνιστεί η αποσιώπηση του μέσω RT-PCR.

Αποτελέσματα

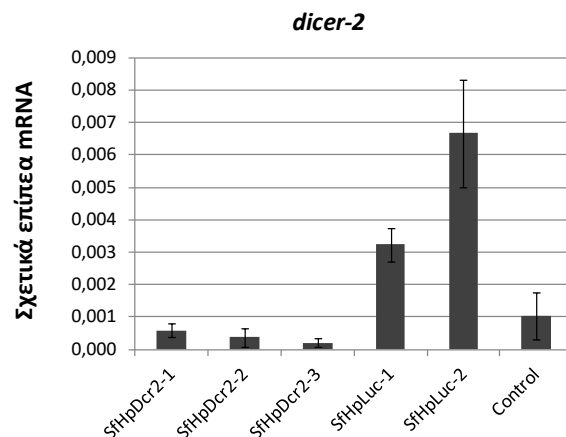
RNAi

Σχεδιάστηκε και κατασκευάστηκε ο φορέας pEA-SfHpDcr2, με τον οποίο μετασηματίστηκαν σταθερά επιτυχώς κύτταρα Sf21, όπου η έκφραση του *dicer-2* είναι σταθερά μειωμένη σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες (Εικόνα 1).

(α)



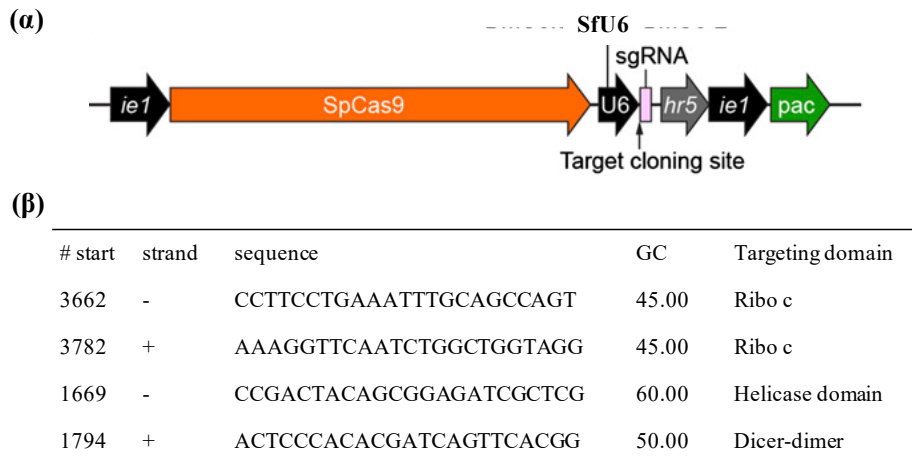
(β)



Εικόνα 1. (α) Στρατηγική κλωνοποίησης της φουρκέτας SfHpDcr2 στο φορέα έκφρασης pEA. (β) Ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου *dicer-2* με qPCR χρησιμοποιώντας το γονίδιο *a-tub* ως γονίδιο αναφοράς.

CRISPR/Cas9

Σχεδιάστηκαν και κατασκευάστηκαν 4 διαφορετικοί φορείς pCRISPR/Cas9 έναντι του *dicer-2*, οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν στα πειράματα γονιδιακής αποσιώπησης (Εικόνα 2). Ο έλεγχος της έκτασης των βλαβών στο DNA βρίσκεται σε εξέλιξη.



Εικόνα 2. (α) Στρατηγική κλωνοποίησης των αλληλουχιών-στόχων στο φορέα pCRISPR/Cas9. (β) Οι επιλεγμένες αλληλουχίες-στόχοι για το γονίδιο *dicer-2*.

Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη δείχθηκε ότι δύο παράλληλες προσεγγίσεις όπως είναι οι τεχνικές RNAί και CRISPR/Cas9, μπορούν να χρησιμοποιηθούν με στόχο την παρεμπόδιση της έκφρασης του γονιδίου *dicer-2* στα κύτταρα Sf21, ούτως ώστε να είναι εφικτή σε μελλοντικά πειράματα η αυξημένη παραγωγή ειδικών μορίων dsRNA έναντι επιβλαβών εντόμων.

Ενδεικτική βιβλιογραφία

Kolliopoulou A., Taning C.N., Smagghe G. & Swevers L. (2017). Viral Delivery of dsRNA for Control of Insect Agricultural Pests and Vectors of Human Disease: Prospects and Challenges. *Front Physiol.* 8, 399.

Mabashi-Asazuma H. & Jarvis D.L. (2017). CRISPR-Cas9 vectors for genome editing and host engineering in the baculovirus-insect cell system. *PNAS*, 114, 9068-9073.

Ανάπτυξη ενός ολοκληρωμένου πρωτοκόλλου αλληλούχησης επόμενης γενιάς και χρήση του για τη συγκριτική μελέτη του προκαρυωτικού μικροβιώματος οινοποιητικών ποικιλιών αμπέλου

Θεοδώρα ΤΣΙΡΚΑ¹, Σπυριδούλα ΣΑΓΡΟΠΟΥΛΟΥ¹, Εμμανουήλ ΣΤΕΡΓΙΟΥΔΗΣ¹, Κυριακή ΧΑΤΖΗΣΑΒΒΑ², Γεώργιος ΣΚΑΒΔΗΣ¹, Πέτρος ΚΟΛΟΒΟΣ¹ και Μαρία ΓΡΗΓΟΡΙΟΥ¹

1 : Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής (ΤΜΒΓ), ΔΠΘ

ttsirka@mbg.duth.gr, emmaste@mbg.duth.gr, pkolovos@mbg.duth.gr, gskavdis@mbg.duth.gr,
mgrigor@mbg.duth.gr

2: Αμπελώνες Χατζησάββα, kikihatzis@gmail.com

Περίληψη

Στα αγροοικοσυστήματα η αποτύπωση της μικροβιακής βιοποικιλότητας (μικροβιώματος) και ο χαρακτηρισμός του ρόλου της έχει μεγάλη σημασία για την παραγωγή και τη βελτίωσή της. Επιπλέον, η ταυτοποίηση αυτόχθονων μικροοργανισμών και η αποκάλυψη του ρόλου τους στη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των παραγόμενων προϊόντων παρέχει σημαντικές δυνατότητες για την ανάπτυξη προϊόντων με ιδιαίτερα, τοπικά χαρακτηριστικά αλλά και για το σχεδιασμό τεχνολογιών ιχνηλάτησης ή πιστοποίησης της προέλευσής τους. Ο οινικός κλάδος αποτελεί έναν δυναμικά αναπτυσσόμενο κλάδο της ελληνικής οικονομίας όπου η αξιοποίηση του μικροβιώματος μπορεί να αποτελέσει τομέα αιχμής για την ανάπτυξη προϊόντων και υπηρεσιών υψηλής προστιθέμενης αξίας. Η πρόσφατη ανάπτυξη της τεχνολογίας αλληλούχησης επόμενης γενιάς επιτρέπει την ανάλυση μικροβιωμάτων γρήγορα και σε μεγάλη κλίμακα. Στο πλαίσιο αυτό αναπτύξαμε ένα ολοκληρωμένο πρωτόκολλο αποτύπωσης του προκαρυωτικού μικροβιώματος από περιβαλλοντικά δείγματα το οποίο χρησιμοποιούμε για την αποτύπωση και συγκριτική ανάλυση του μικροβιώματος από τις ποικιλίες Μαυρούδι και Παμίδι.

Λέξεις-κλειδιά

μεταγονιδιωματική, μικροβίωμα, αλληλούχηση, ελληνικές ποικιλίες

Εισαγωγή

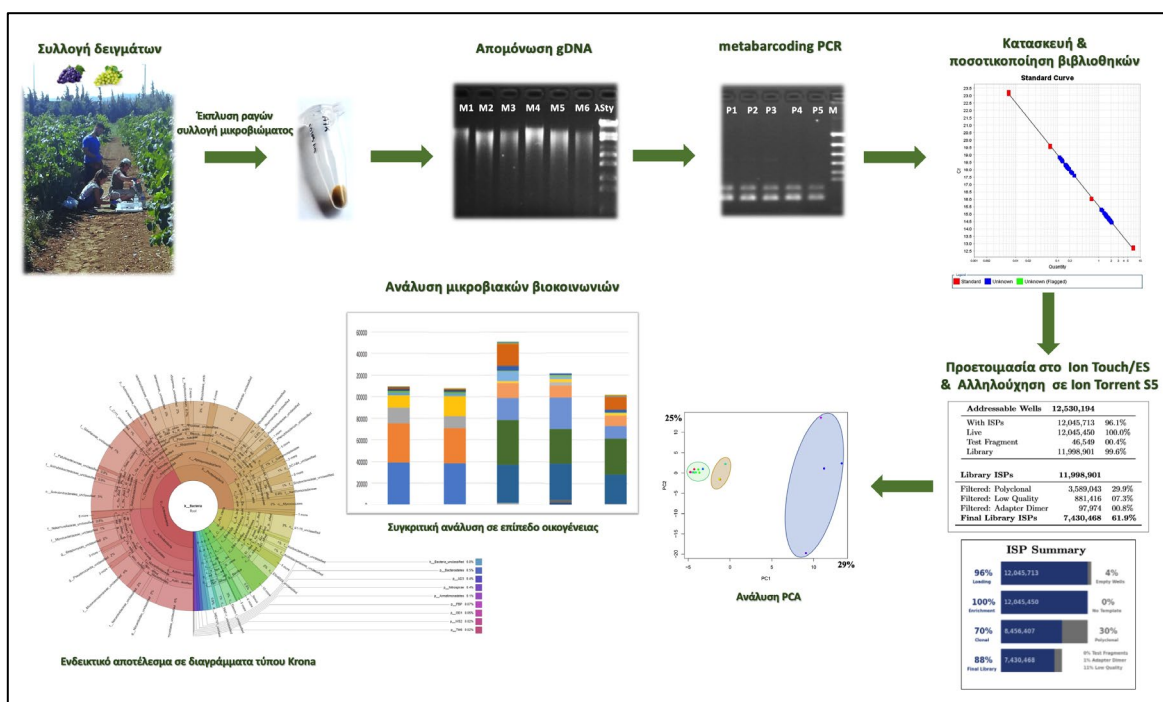
Τα τελευταία χρόνια με την ανάπτυξη της τεχνολογίας αλληλούχησης επόμενης γενιάς έχει ξεκινήσει σε διάφορα αγροοικοσυστήματα η εντατική μελέτη των μικροβιακών βιοκοινωνιών οι οποίες έχουν κεντρικό ρόλο στην παραγωγή και είναι δυνατόν να αξιοποιηθούν για τη βελτίωση της. Επιπλέον, ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στην ταυτοποίηση της αυτόχθονης μικροβιακής βιοποικιλότητας (αυτόχθονου μικροβιώματος) καθώς, αρκετές μελέτες δείχνουν ότι υπάρχουν δυνατότητες αξιοποίησής της τόσο για την παραγωγή προϊόντων με ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά όσο και για το χαρακτηρισμό της προέλευσής τους. Στην Ελλάδα η αμπελοκαλλιέργεια καλύπτει περίπου 1.000.000 στρέμματα, με τις οινοποιήσιμες ποικιλίες να αποτελούν περίπου το 60%, ενώ ο οινικός τομέας είναι ένας από τους δυναμικότερους κλάδους της ελληνικής αγροτικής παραγωγής αριθμώντας παραπάνω από 600 ενεργά οινοποιεία. Στο πλαίσιο αυτό, η μοριακή αποτύπωση του αυτόχθονου μικροβιώματος του καρπού αυτόχθονων ποικιλιών αμπέλου και η κατανόηση του ρόλου του στη διαμόρφωση χαρακτηριστικών των παραγόμενων οίνων (Belda *et al.*, 2017) παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς μπορεί να αξιοποιηθεί για την παραγωγή οίνων υψηλής προστιθέμενης αξίας με τοπικό χαρακτήρα και γεύση ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την ανάπτυξη μεθοδολογιών ιχνηλάτησης.

Οι μελέτες ανάλυσης του μικροβιώματος της αμπέλου που έχουν γίνει στις ΗΠΑ, τη Γαλλία, την Ισπανία και την Ιταλία δείχνουν ότι το προφίλ του μικροβιώματος, γνωστό και ως μικροβιακό μωσαϊκό, (*microbial terroir*) συσχετίζεται με την τοποθεσία του αμπελώνα, το κλίμα, το έδαφος, τις πρακτικές καλλιέργειας και με την ποικιλία (Mezzasalma *et al.*, 2017, Bokulich *et al.* 2014, 2016, Taylor *et al.*, 2017). Καθοριστικό βήμα για την ανάλυση του μικροβιακού μωσαϊκού, την κατανόηση του ρόλου του και την αξιοποίησή του αποτελεί ο χαρακτηρισμός του «πυρηνικού» (core) μικροβιώματος που χαρακτηρίζει μια συγκεκριμένη ποικιλία, ανεξάρτητα από άλλους παράγοντες. Στο πλαίσιο αυτό αναπτύξαμε ένα ολοκληρωμένο πρωτόκολλο αλληλούχησης επόμενης γενιάς για την μελέτη του

προκαρυωτικού μικροβιώματος στην πλατφόρμα Ion Torrent με επακόλουθη ανάλυση των δεδομένων με βιοστατιστικά εργαλεία και εργαλεία πληροφορικής και, σε συνεργασία με τους αμπελώνες Χατζησάββα, αναλύουμε δείγματα του καρπού των ποικιλιών Μαυρούδι και Παμίδι.

Μέθοδοι & Αποτελέσματα

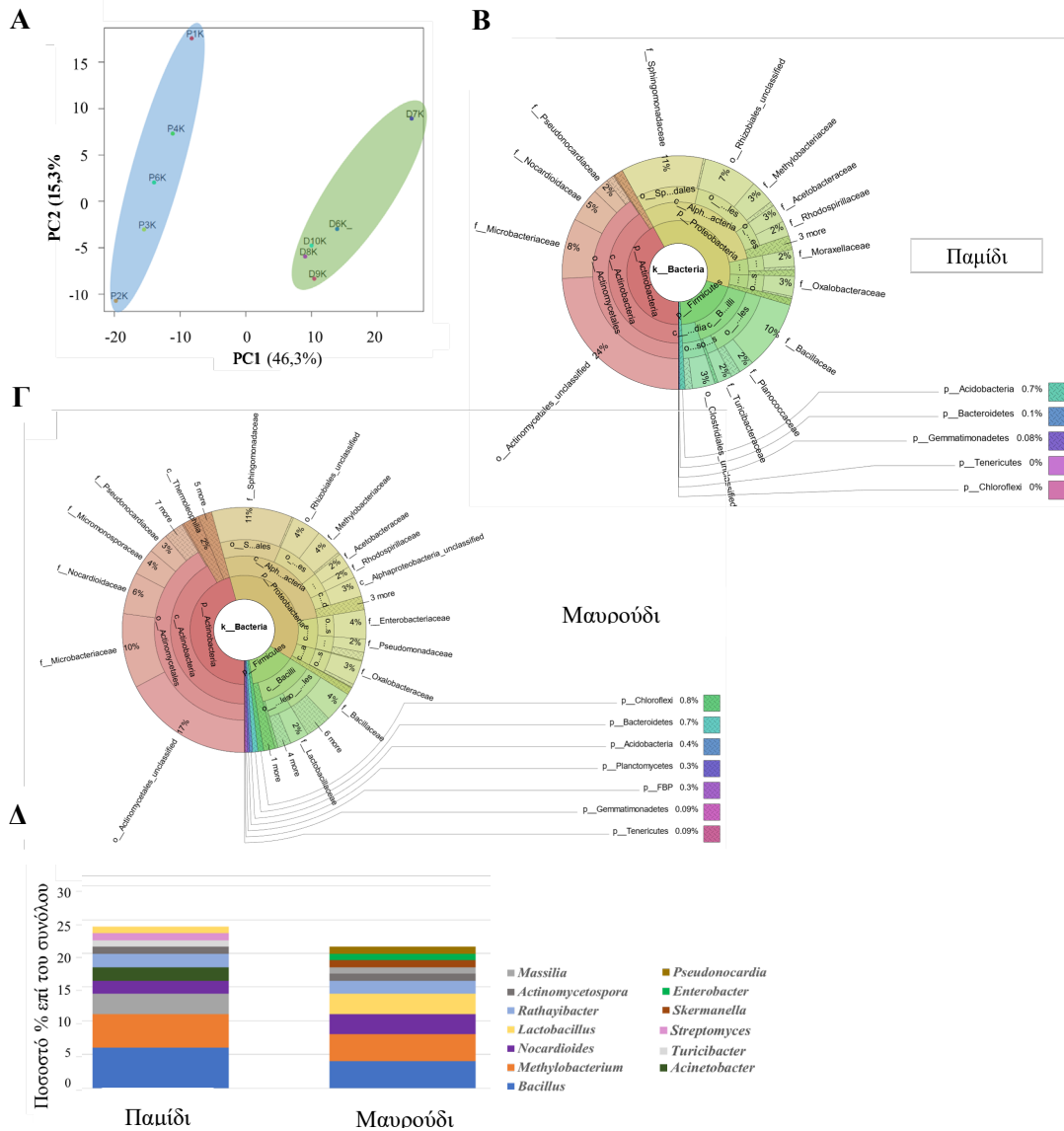
Στην Εικόνα 1 παρουσιάζεται διαγραμματικά το πρωτόκολλο που αναπτύξαμε από τη συλλογή μέχρι την ανάλυση των δεδομένων. Από τα πρέμνα πραγματοποιείται συλλογή δειγμάτων καρπών και γίνεται μέτρηση των σακχάρων με οπτικό διαθλασίμετρο (ATC). 120 g υγιείς ράγες εμβαπτίζονται σε 80 ml φυσιολογικού ορού και μετά από έκπλυση υπό ανάδευση για 3 h απομονώνεται, μετά από φυγοκέντρηση, το σύνολο του μικροβιακού πληθυσμού της επιφάνειας του καρπού. Από το ίζημα απομονώνεται το μικροβιακό DNA και πραγματοποιείται metabarcoding PCR με εκκινητές που ενισχούν την μεταβλητή περιοχή V3 του γονιδίου 16S rRNA (5'-ACTGAGACACGGTCCAGACT-3' και 5'-GTATTACCGCGGCTGCTG-3'). Η κατασκευή βιβλιοθηκών και η αλληλούχηση γίνεται σε πλατφόρμα IonTorrent S5.



Εικόνα 1: Διαγραμματική απεικόνιση του πρωτοκόλλου αλληλούχησης και ανάλυσης του προκαρυωτικού μικροβιώματος.

Το πρωτόκολλο αυτό χρησιμοποιήθηκε αρχικά πιλοτικά σε δείγματα καρπών από διάφορους αμπελώνες της Θράκης από τον τρύγο του 2018 και οι αλληλουχίες που προέκυψαν από κάθε δείγμα συγκρίθηκαν με αυτές από την αλληλούχηση των ίδιων δειγμάτων σε εμπορικές εταιρείες ώστε να επιβεβαιωθούν.

Στα πρωτογενή δεδομένα αλληλούχησης γίνεται ποιοτική αξιολόγηση, ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA), ανάλυση στην πλατφόρμα Galaxy (Afgan *et al.* 2018), χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων GreenGenes (DeSantis *et al.* 2006), και ταυτοποίηση λειτουργικών ταξινομικών μονάδων. Κατά τη ροή της ανάλυσης αφαιρούνται αναγνώσεις χαμηλής ποιότητας, ακατάλληλου μήκους, χιμαιρικές ή μη βακτηριακές καθώς και όσες λειτουργικές ταξινομικές μονάδες (Operational Taxonomic Units, OTUs) προκύπτουν από λιγότερες από 5 αναγνώσεις. Η ταξινόμηση των αλληλουχιών γίνεται με όριο ομοιότητας 97% και η ομαδοποίηση των αναγνώσεων σε λειτουργικές ταξινομικές μονάδες με 55% κατώφλι εμπιστοσύνης.



Εικόνα 2: Α: Ανάλυση PCA- παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των δειγμάτων που αναλύθηκαν Διαγραμματική απεικόνιση του πρωτοκόλλου αλληλούχησης και ανάλυσης του προκαρυωτικού μικροβιώματος. Β: Διάγραμμα Krona όπου παρουσιάζεται το προκαρυωτικό μικροβίωμα της ποικιλίας Παμίδι μέχρι το επίπεδο της οικογένειας. Γ: Διάγραμμα Krona όπου παρουσιάζεται το προκαρυωτικό μικροβίωμα της ποικιλίας Μαυρούδι μέχρι το επίπεδο της οικογένειας. Δ: Διάγραμμα που παρουσιάζει συγκριτικά τα 10 επικρατέστερα γένη στις δύο ποικιλίες.

Η ανάλυση των καρπών των ποικιλιών Μαυρούδι και Παμίδι (Εικόνα 2) ξεκίνησε με συλλογή δειγμάτων καρπών στον τρύγο του 2019 (13 και 14 βαθμοί Baume αντίστοιχα) από μικτό βιολογικό αμπελώνα. Ακολούθησε αλληλούχηση των δειγμάτων και τα δείγματα από Μαυρούδι λήφθηκαν συνολικά 771,310 αναγνώσεις της περιοχής V3 ενώ για το Παμίδι 525. Με βάση την PCA επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση 5 δείγματα από κάθε ποικιλία- αξίζει να σημειωθεί ότι από την PCA τα δεδομένα των δύο ποικιλιών υποδεικνύουν διαφορές στη σύσταση του μικροβιώματος τους.

Μετά την βιοπληροφορική ανάλυση, αναδείχθηκαν σημαντικές διαφορές σε ό,τι αφορά τις δύο βιοκοινωνίες - το αντιπροσωπευτικό δείγμα για το Μαυρούδι αριθμεί 408 OTUs ενώ το Παμίδι 173. Εκτός από τη διαφορά στον αριθμό των OTUs παρατηρείται διαφορά σε επίπεδο φύλου με τα *Firmicutes* (16% στο Παμίδι και 11% στο Μαυρούδι) και τα *Lactobacillales* (2% στο Παμίδι και 3% στο Μαυρούδι). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρουσία ~5% και στις δύο ποικιλίες των *Rhodospirillales* που εμπλέκονται στην αλλοίωση του οίνου. Οι οικογένειες *Micromonosporaceae* (5%), *Kineosporiaceae* (1%) και *Gaiellaceae* (1%) απαντούν αποκλειστικά στο Μαυρούδι, ενώ οι *Moraxellaceae* (2%),

Planococcaceae (2%) και *Turicibacteraceae* (1%) μόνο στο Παμίδι. Τέλος στο επίπεδο του γένους, 7 από τα 10 κύρια γένη είναι κοινά για τις δύο ποικιλίες με τα *Bacillus* και τα *Methylobacterium* να αποτελούν τα πιο πολυπληθή γένη και στις 2 ποικιλίες. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το *Lactobacillus* 1% στο Παμίδι και 3% στο Μαυρούδι. Ακριβώς το αντίθετο ισχύει για το γένος *Massilia*. Τέλος, το *Acinetobacter* με 2% στο Παμίδι, δεν ανιχνεύεται καθόλου στο Μαυρούδι.

Συμπεράσματα

Η προκαταρκτική ανάλυση του προκαρυωτικού μικροβιώματος των δύο ποικιλιών που μελετήθηκαν αναδεικνύει σημαντικές διαφορές στη σύσταση των βιοκοινωνιών του καρπού στις δύο υπό μελέτη ποικιλίες. Με δεδομένο ότι τα δείγματα έχουν συλλεγεί από μικτό αμπελώνα όπου οι δύο ποικιλίες συγκαλλιεργούνται οπότε παράμετροι όπως η σύσταση του εδάφους, οι καλλιεργητικές πρακτικές, ή το κλίμα είναι κοινοί, οι διαφορές που αναδεικνύονται αντικατοπτρίζουν διαφορές των δύο πυρηνικών μικροβιωμάτων. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα παραπάνω προκαταρκτικά αποτελέσματα έχουν προκύψει από την ανάλυση δειγμάτων του 2019, και καθώς οι συνθήκες δεν είναι κάθε χρόνο ίδιες θα πρέπει να πραγματοποιηθούν αντίστοιχη ανάλυση και από δείγματα τουλάχιστον μιας ακόμα χρονιάς, ενώ και τα αποτελέσματα από την ανάλυση του ευκαρυωτικού μικροβιώματος που είναι σε εξέλιξη φαίνεται να προκύπτουν παρόμοια αποτελέσματα.

Βιβλιογραφία

- Afgan E., Baker, D., Batut, B., van den Beek, M., Bouvier, D., Cech, M., Chilton, J., Clements, D., Coraor, N., Grüning, B. A., Guerler, A., Hillman-Jackson, J., Hiltemann, S., Jalili, V., Rasche, H., Soranzo, N., Goecks, J., Taylor, J., Nekrutenko, A., & Blankenberg, D. (2018). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic acids research*, 46(W1), W537–W544.
- Belda I, Ruiz J, Esteban-Fernández A, Navascués E, Marquina D, Santos A, et al. Microbial Contribution to Wine Aroma and Its Intended Use for Wine Quality Improvement. *Molecules*. 2017 Jan 24;22(2):189. Leveau J.H.J., Tech J.J., (2011).
- Bokulich N.A., Thorngate J. H., Richardson P.M., Mills D.A., (2014). Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate, *Proceedings of the National Academy of Sciences* Jan 2014, 111 (1) E139-E148
- Bokulich, N. A., Collins, T. S., Masarweh, C., Allen, G., Heymann, H., et al. (2016). Associations among wine grape microbiome, metabolome, and fermentation behavior suggest microbial contribution to regional wine characteristics. *mBio* 7:e00631-16.
- DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., & Andersen, G. L. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and environmental microbiology*, 72(7), 5069–5072.
- Grapevine Microbiomics: Bacterial Diversity on Grape Leaves and Berries Revealed by High-Throughput Sequence Analysis of 16S rRNA Amplicons, *Acta Hort.*, 905, 31-42
- Latruffe N. & Rifler J. P., (2019). *Special Issue: Wine and Vine Components and Health. Diseases*, 7(1), 30.
- Mezzasalma, V., Sandionigi, A., Bruni, I., Bruno, A., Lovicu, G., Casiraghi, M., et al. (2017). Grape microbiome as a reliable and persistent signature of field origin and environmental conditions in Cannonau wine production. *PLoS One* 12:e0184615.
- Taylor, M. W., Tsai, P., Anfang, N., Ross, H. A., and Goddard, M. R. (2014). Pyrosequencing reveals regional differences in fruit-associated fungal communities. *Environ. Microbiol.* 16, 2848–2858.

Η εργασία αυτή υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Εθνικής Ερευνητικής Υποδομής OMIC-ENGINE που χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα "Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία 2014-2020" του ΕΣΠΑ (Κωδικός MIS 5002636).

Μελέτη του προκαρυωτικού μικροβιώματος υγρού βελτιωτικού που παράγεται από ζύμωση για χρήση σε βιολογικές καλλιέργειες

Θεοδώρα ΤΣΙΡΚΑ¹, Σωτήρης ΧΑΤΖΗΣ², Γεώργιος ΣΚΑΒΔΗΣ¹, Πέτρος ΚΟΛΟΒΟΣ¹ και Μαρία ΓΡΗΓΟΡΙΟΥ¹

*1: Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Αλεξανδρούπολη
tsirka@mbg.duth.gr, gskavdis@mbg.duth.gr, pkolovos@mbg.duth.gr, mgrigor@mbg.duth.gr*

2: Micro-life IKE & Θαυμάσιο Ρόδι ΕΕ, info@micro-life.gr

Περίληψη

Οι μικροβιακές βιοκοινωνίες (μικροβίωμα) ρυθμίζουν σε μεγάλο βαθμό τις φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους και έτσι μικροοργανισμοί που έχουν επιθυμητές ιδιότητες είναι δυνατόν να αξιοποιηθούν σε λιπάσματα για αγροτικές βιολογικές καλλιέργειες με οφέλη τόσο για την παραγωγή όσο και για το περιβάλλον. Πολλές μέθοδοι παραγωγής βιολογικών λιπασμάτων που αξιοποιούν την αναερόβια ζύμωση οργανικών υλικών, συνήθως από πίτουρο ρυζιού ή βρώμης μετά από εμβολιασμό με κατάλληλη σύνθετη εναρκτήρια καλλιέργεια χρησιμοποιούνται σήμερα όλο και περισσότερο. Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας χαρακτηρίσαμε με αλληλούχηση επόμενης γενιάς τη σύσταση υγρού βελτιωτικού που αξιοποιείται από την Θαυμάσιο Ρόδι ΕΕ και χρησιμοποιείται μέσω ριζοποτίσματος ή/και ψεκασμού σε βιολογικό οπωρώνα ροδιάς.

Λέξεις-κλειδιά

μικροβίωμα, μεταγονιδιοματική, αλληλούχηση, βελτιωτικό καλλιέργειας

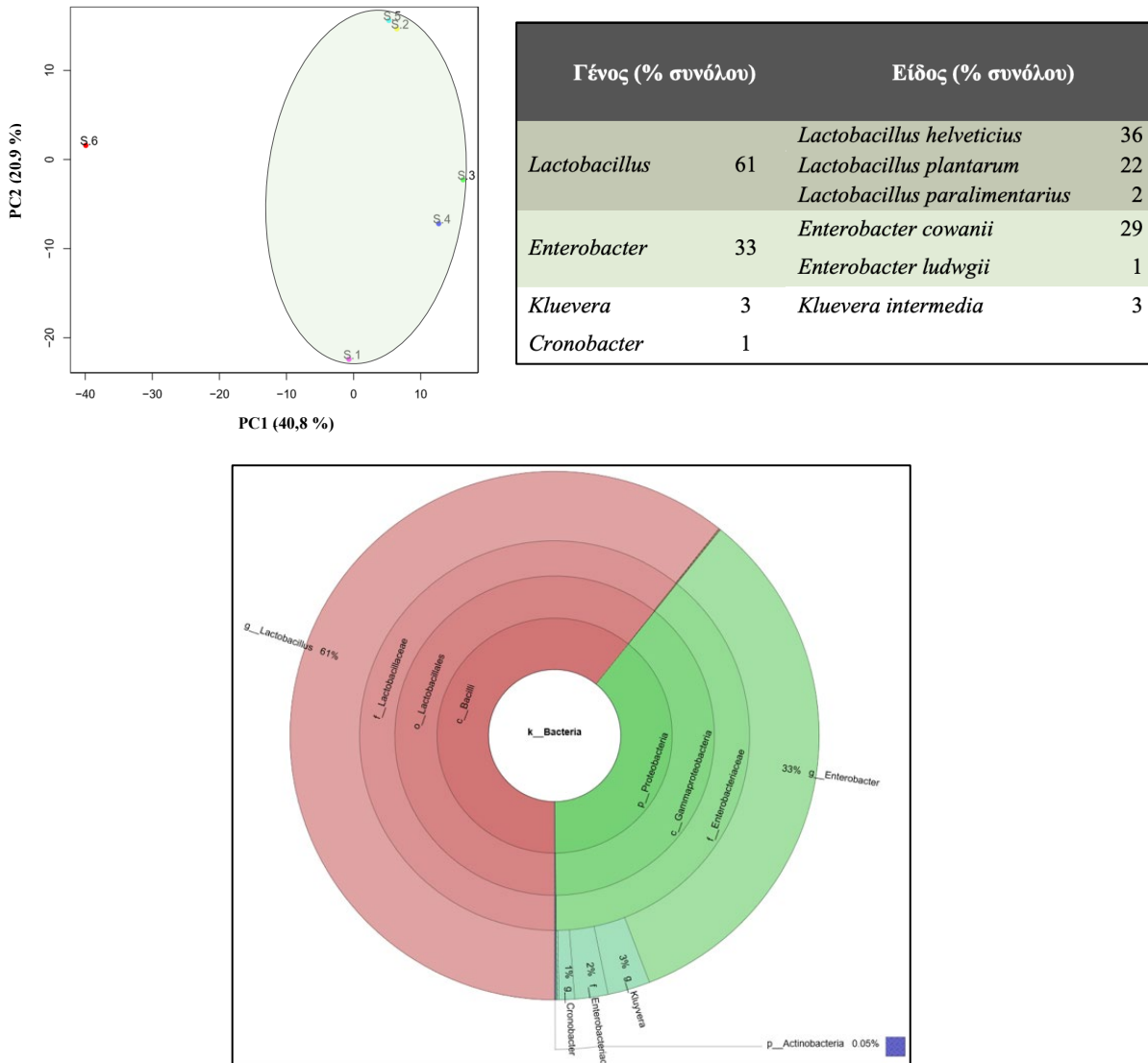
Εισαγωγή

Η ποιότητα των αγαθών που παράγονται καθώς και η ασφαλής κατανάλωσή τους είναι σε μεγάλο βαθμό αντανάκλαση των καλλιεργητικών πρακτικών που εφαρμόζονται στις αγροτικές μονάδες. Η αντικατάσταση των χημικών λιπασμάτων με βιολογικά παρασκευάσματα ενισχύει την ασφάλεια των προϊόντων ευνοεί την παραγωγή χωρίς να επιβαρύνει το περιβάλλον προς όφελος τόσο των παραγωγών όσο και του καταναλωτή. Η αξιοποίηση αναερόβιας ζύμωσης οργανικών υλικών, συνήθως από πίτουρο ρυζιού ή βρώμης για την παραγωγή βιολογικών λιπασμάτων μια πρακτική που προέρχεται από την Ανατολική Ασία, υιοθετείται όλο και περισσότερο και σε χώρες όπως π.χ οι Ηνωμένες Πολιτείες. Στα πλαίσια αυτό σε συνεργασία με τις εταιρείες «Θαυμάσιο Ρόδι» και «Micro-life IKE», αναλύσαμε την προκαρυωτική μικροβιακή σύσταση υγρών μικροβιακών καλλιεργειών που έχουν αναπτύξει και χρησιμοποιούν είτε ως ενισχυτικό εδάφους, μέσω ριζοποτίσματος είτε με ψεκασμό.

Μέθοδοι & Αποτελέσματα

Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν μετά από ανάδευση σε επωαστήρα της εταιρείας Micro-life IKE, στους 30°C, αναμειγνύοντας 55 lt νερό με 5,5 kg ρύζι βιολογικής καλλιέργειας, 1,8 kg ζάχαρη βιολογικής καλλιέργειας και 600 gr ακατέργαστου αλατιού. Μετά από 5 ημέρες καλλιέργειας 50 ml φυγοκεντρήθηκαν στις 300 rpm και συλλέχθηκε το ίζημα που περιλαμβάνει και τον μικροβιακό πληθυσμό. Από το ίζημα απομονώθηκε DNA και πραγματοποιήθηκε metabarcoding PCR με εκκινητές που ενισχύουν την μεταβλητή περιοχή V3 του γονιδίου 16S rRNA (5'-ACTGAGACACGGTCCAGACT-3' και 5'-GTATTACCGCGGCTGCTG-3'). Στα πρωτογενή δεδομένα αλληλούχησης γίνεται ποιοτική αξιολόγηση, ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA), ανάλυση στην πλατφόρμα Galaxy (Afgan *et al.* 2018), χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων GreenGenes (DeSantis *et al.* 2006), και ταυτοποίηση λειτουργικών ταξινομικών μονάδων. Κατά τη ροή της ανάλυσης αφαιρούνται αναγνώσεις χαμηλής ποιότητας, ακατάλληλου μήκους, χημικές ή μη βακτηριακές καθώς και όσες λειτουργικές ταξινομικές μονάδες (Operational Taxonomic Units, OTUs) προκύπτουν από λιγότερες από 5 αναγνώσεις. Η ταξινόμηση των αλληλουχιών γίνεται με όριο ομοιότητας 97% και η ομαδοποίηση των αναγνώσεων σε λειτουργικές ταξινομικές μονάδες με 55% κατώφλι εμπιστοσύνης. Συνολικά παρήχθησαν 695,112 αναγνώσεις. Σύμφωνα με την ανάλυση των κυρίων συνιστωσών (PCA, Εικόνα 1Α) από τα 6 δείγματα το ένα δεν ομαδοποιείται με τα υπόλοιπα και εξαιρέθηκε από τις

αναλύσεις. Το μικροβίωμα, που αποτυπώνει την τυπική σύσταση των 5 δειγμάτων είναι μονότονο και αποτελείται κατά 61% από βακτήρια της οικογένειας *Lactobacillaceae* με κύριο το γένος *Lactobacillus* και το υπόλοιπο 39% από βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae* και με κύριο το 33% επί του συνόλου ανήκει στο γένος *Enterobacter* (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Α. Ανάλυση κύριων συνιστωσών των 6 δειγμάτων (S1, S2, S3, S4, S5, S6). Η βαρύτητα κάθε συνιστώσας (PC1, PC2) υποδεικνύεται (%) σε καθέναν από τους δύο άξονες (X,Y). Β, Γ. Η τυπική σύσταση του υγρού βελτιωτικού όπως προκύπτει από την ανάλυση σε πίνακα και σε διάγραμμα Krona.

Συμπεράσματα

Η *Lactobacillaceae* με κύριο το γένος *Lactobacillus* αποτελούν την κύρια οικογένεια του υγρού βελτιωτικού γεγονός που ερμηνεύει τη θετική επίπτωση που έχει παρατηρηθεί στη χρήση του από τη Θαυμάσιο Ρόδι καθώς έχει βρεθεί ότι η συγκεκριμένη οικογένεια ευνοεί την ανάπτυξη και την ευρωστία του φυτού και η ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται εύκολα τα έχει καθιερώσει ως εναλλακτική καλλιεργητική τεχνική (Lamont *et al.* 2017). Θα πρέπει ωστόσο να μελετηθούν περισσότερα δείγματα για να βρεθούν συνθήκες στις οποίες να μην παρατηρούνται μεγάλες διαφορές μεταξύ των διαφορετικών παρασκευών του βελτιωτικού.

Βιβλιογραφία

Afgan E., Baker, D., Batut, B., van den Beek, M., Bouvier, D., Cech, M., Chilton, J., Clements, D., Coraor, N., Grüning, B. A., Guerler, A., Hillman-Jackson, J., Hiltmann, S., Jalili, V., Rasche, H., Soranzo, N., Goecks, J., Taylor, J., Nekrutenko, A., & Blankenberg, D. (2018). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic acids*

research, 46(W1), W537–W544.

de Sousa M, Rama G, de Souza CFV, Granada CE, (2020). Acid lactic lactobacilli as a biotechnological toll to improve food quality and human health *Biotechnol Prog* 36(2):e2937

DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., & Andersen, G. L. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and environmental microbiology*, 72(7), 5069–5072.

Hurtado-Barroso S, Tresserra-Rimbau A, Vallverdú-Queralt A, Lamuela-Raventós RM., (2019). Organic food and the impact on human health. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 59(4):704-714.

Lamont J., Wilkins O., Bywater-Ekegård ., Smith D., (2017) From yogurt to yield: Potential applications of lactic acid bacteria in plant production. *Soil Biology and Biochemistry* 111:1-9

Mu Q., Tavella, V. J., & Luo, X. M. (2018). Role of *Lactobacillus reuteri* in Human Health and Diseases. *Frontiers in microbiology*, 9, 757.

Watts G. S., Youens-Clark, K., Slepian, M. J., Wolk, D. M., Oshiro, M. M., Metzger, G. S., Dhingra, D., Cranmer, L. D., & Hurwitz, B. L. (2017). 16S rRNA gene sequencing on a benchtop sequencer: accuracy for identification of clinically important bacteria. *Journal of applied microbiology*, 123(6), 1584–1596.

Η εργασία αυτή υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Εθνικής Ερευνητικής Υποδομής OMIC-ENGINE που χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα "Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία 2014-2020" του ΕΣΠΑ (Κωδικός MIS 5002636).

Η υπερέκφραση της Abracl στην κυτταρική σειρά Neuro2A αυξάνει το ρυθμό πολλαπλασιασμού

Βενετία ΓΙΟΥΡΟΥ, Κώστας ΝΤΙΤΣΙΑΣ, Ηλέκτρα ΣΤΥΛΙΑΝΟΠΟΥΛΟΥ, Μαρία ΑΝΑΣΤΑΣΙΑΔΟΥ, Πωλίνα ΜΑΜΟΥΡΗ, Γιώργος ΣΚΑΒΔΗΣ, Μαρία ΓΡΗΓΟΡΙΟΥ
 Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Αλεξανδρούπολη
venetiag69@gmail.com, kostasalexan@gmail.com, ilektrastylian@mbg.duth.gr,
marianastas6@gmail.com, polyxmamo@gmail.com, gskavdis@mbg.duth.gr, mgrigor@mbg.duth.gr

Περίληψη

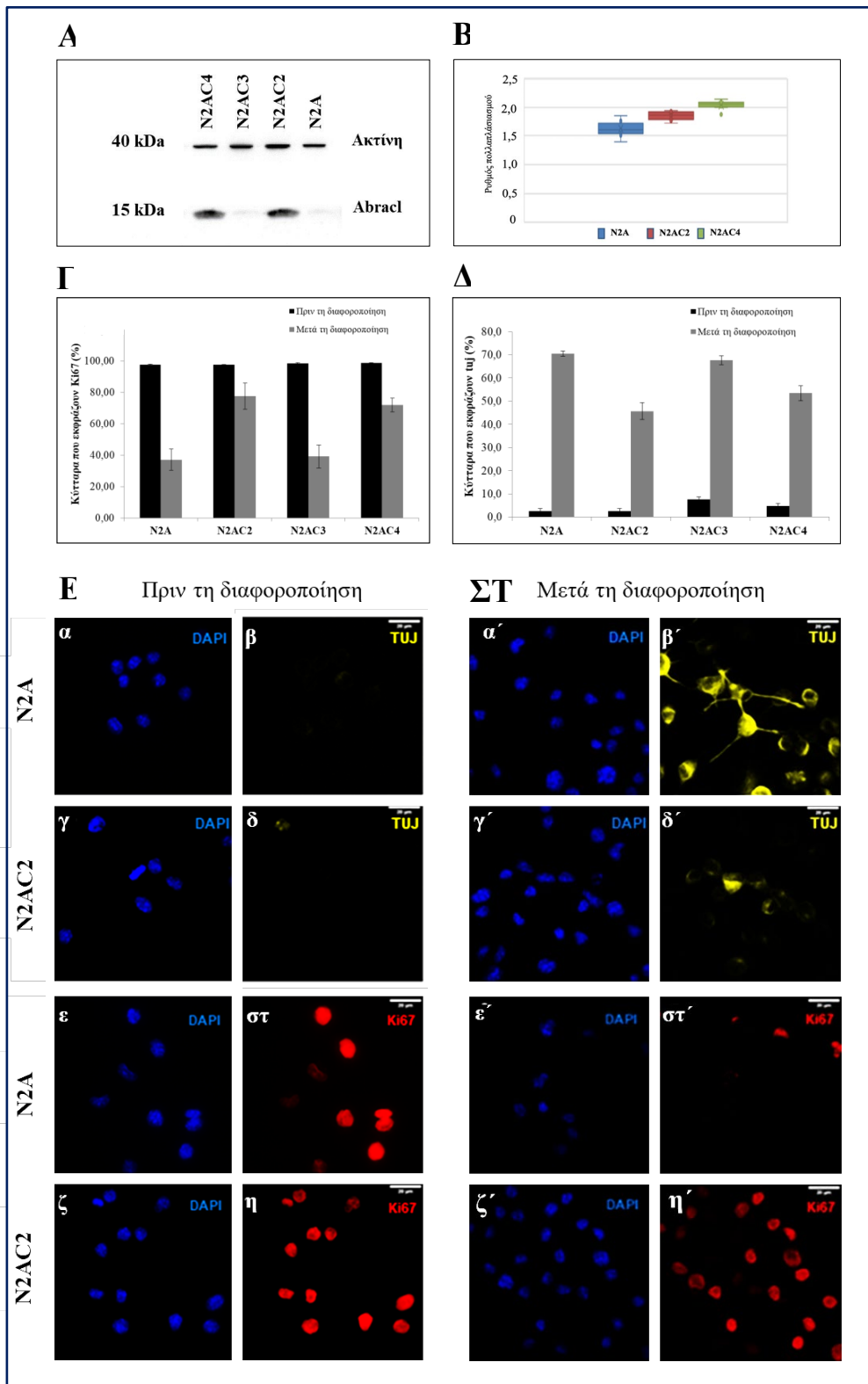
Η Abracl είναι μία μικρομοριακή πρωτεΐνη με δομή μη τυπικής φτερωτής έλικας. Πρόκειται για μία εξαιρετικά συντηρημένη πρωτεΐνη, η οποία απαντά σε όλους τους ευκαρυώτες εκτός από τους μύκητες. Στο αναπτυσσόμενο και στο ώριμο νευρικό σύστημα η Abracl εντοπίζεται κυρίως σε ζώνες νευρογένεσης του τελεγκεφάλου. Προηγούμενα πειράματα της ομάδας μας στην κυτταρική σειρά Neuro2A έδειξαν πως στα κύτταρα αυτά η έκφραση της Abracl είναι υψηλή, αλλά μειώνεται κατά τη νευρική διαφοροποίηση. Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, πραγματοποιήθηκαν πειράματα υπερέκφρασης στα Neuro2A και απομονώθηκαν σταθερά διαμολυσμένοι κλώνοι με διαφορετικά επίπεδα έκφρασης της Abracl. Η ανάλυση του ρυθμού πολλαπλασιασμού σε αυτούς τους κλώνους, έδειξε ότι τα υψηλά επίπεδα έκφρασης της Abracl οδηγούν σε αύξησή του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων ενώ κατά την επαγωγή της νευρικής διαφοροποίησης παρατηρήθηκε μείωση του ποσοστού των διαφοροποιημένων κυττάρων. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η Abracl εμπλέκεται στην διατήρηση του δυναμικού πολλαπλασιασμού των κυττάρων.

Λέξεις- κλειδιά

Abracl, νευρική διαφοροποίηση, κυτταρικός πολλαπλασιασμός

Εισαγωγή

Η Abracl (Abra C-Terminal like protein) είναι μια μικρομοριακή πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 9 kDa και δομή μη τυπικής φτερωτής έλικας. Εκφράζεται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς εκτός από τους μύκητες και είναι εξαιρετικά συντηρημένη μεταξύ των ειδών (Lin *et al.* 2011). Η Abracl εμφανίζει ομοιότητα με το καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης ABRA (Actin-binding Rho- activating protein), το οποίο περιλαμβάνει δύο περιοχές αλληλεπίδρασης με την ακτίνη, χωρίς όμως να είναι σαφές αν η Abracl έχει αυτή την ιδιότητα- πειράματα στο *Dictyostelium discoideum* υποδεικνύουν ότι ίσως εμπλέκεται στον αποπολυμερισμό της F-ακτίνης ή δρα ανασταλτικά στην διαδικασία πολυμερισμού της (Pang *et al.* 2010). Κατά την ανάπτυξη, η Abracl εντοπίζεται αποκλειστικά στο νευρικό σύστημα, σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα της υποκοιλιακής ζώνης του κοιλιακού τελεγκεφάλου, ενώ στον ενήλικο εγκέφαλο η έκφρασή της παραμένει στην ίδια ζώνη (Stylianou *et al.* 2016). Προηγούμενα πειράματά μας στη νευροβλαστωματική κυτταρική σειρά Neuro2A έδειξαν πως στα κύτταρα αυτής της σειράς η Abracl εκφράζεται, αλλά η έκφρασή της μειώνεται κατά τη νευρική διαφοροποίηση, ενώ παροδική υπερέκφρασή της φαίνεται να αναστέλλει τη διαφοροποίηση (Stylianou *et al.* 2016). Τα παραπάνω σε συνδυασμό με αποτελέσματα ανάλυσης της έκφρασης της Abracl σε γλοιοβλαστωματικές κυτταρικές σειρές (Β. Γιούρου, Διπλωματική Εργασία) καθώς και σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως ο καρκίνος των ωοθηκών (Ura *et al.* 2017) ή του στομάχου (Wang *et al.* 2019) που έδειξαν ότι η έκφραση της εντοπίζεται σε υψηλά επίπεδα σε διαιρούμενα κύτταρα, υποδεικνύουν ότι η Abracl εμπλέκεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και η απορρύθμισή της ενδέχεται να συνδέεται με προβλήματα στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος ή και τον καρκίνο. Στην παρούσα εργασία μελετάται η επίδραση της υπερέκφρασης της Abracl στην νευροβλαστωματική κυτταρική σειρά Neuro2A και αναλύονται τα αποτελέσματά της στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στη νευρική διαφοροποίηση.



Εικόνα 1: Α. Ανάλυση της έκφρασης της Abracl με ανοσοαποτύπωση Western. Β. Ανάλυση του ρυθμού πολλαπλασιασμού με δοκιμασία Alamar Blue. Γ. Ποσοτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της επίδρασης της υπερέκφρασης της Abracl στην έκφραση του δείκτη πολλαπλασιασμού Ki67, σε καλλιέργειες ρουτίνας πριν και μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης. Δ. Ποσοτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της επίδρασης της υπερέκφρασης της Abracl στην έκφραση του δείκτη TuJ πριν και μετά τη διαφοροποίησή σε καλλιέργειες ρουτίνας πριν και μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης. Ε, ΣΤ. Ενδεικτικά αποτελέσματα πειραμάτων ανοσοφθορισμού. Με μπλε χρώμα εμφανίζονται οι πυρήνες DAPI με κίτρινο τα θετικά για TuJ κύτταρα και με κόκκινο τα θετικά για Ki67 κύτταρα. Κλίμακα 20μm.

Μέθοδοι

Για την υπερέκφραση της *Abracl* χρησιμοποιήθηκε κατασκευή σε δικιστρονικό φορέα έκφρασης που φέρει εσωτερική θέση πρόσδεσης του ριβοσώματος (IRES, Sadikoglou *et al.* 2014) που επιτρέπει και την ταυτόχρονη έκφραση της *eGFP*. Έγινε διαμόλυνση κυττάρων *Neuro2A* και μετά από επιλογή, χαρακτηρίστηκαν τρεις κλώνοι. Σε κάθε κλώνο αναλύθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του mRNA με qPCR καθώς και της πρωτεΐνης με ανοσοαποτύπωση Western. Για τη μελέτη του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες Alamar Blue (Thermo) και πειράματα ανοσοφθορισμού με αντισώματα έναντι του δείκτη πολλαπλασιασμού *Ki67* και του δείκτη νευρικής διαφοροποίησης *Tuj*, τόσο σε καλλιέργειες ρουτίνας όσο και μετά από την επαγωγή της διαφοροποίησης σε χαμηλή συγκέντρωση ορού για 72h και ποσοτική ανάλυση με καταμέτρηση 700 κυττάρων. Η παρατήρηση των δειγμάτων έγινε σε μικροσκόπιο φθορισμού LEICADM 5500B με κάμερα Leica DFC 7000T και η στατιστική ανάλυση έγινε είτε με την μέθοδο two-tailed t-test (δοκιμασία πολλαπλασιασμού) ή με την μέθοδο one way anova ($p < 0,1$ - ανοσοφθορισμός).

Αποτελέσματα

Η ανάλυση των επιπέδων έκφρασης της *Abracl* στους κλώνους *N2AC2*, *N2AC3* και *N2AC4* έδειξε ότι ο *N2AC3* εκφράζει παρόμοια επίπεδα έκφρασης *Abracl* με τα *Neuro2A*, ενώ οι *N2AC2* και *N2AC4* πολλαπλάσια επίπεδα κατά 21 και 26 φορές, αντίστοιχα (Εικόνα 1Α). Ακολούθησε ανάλυση του ρυθμού πολλαπλασιασμού με δοκιμασία Alamar Blue που έδειξε για τους *N2AC2* και *N2AC4* σημαντική αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού (1,8 και 2) σε σχέση με την καλλιέργεια αναφοράς (1,5- Εικόνα 1Β). Πειράματα ανοσοφθορισμού σε καλλιέργειες *Neuro2A* και στους κλώνους *N2AC2* και *N2AC4* πριν (Εικόνα 1Γ, 1Δ, 1Ε) και μετά από επαγωγή της διαφοροποίησης (Εικόνα 1Γ, 1Δ, 1ΣΤ) με αντισώματα έναντι του *Ki67* και του *Tuj* έδειξαν, μετά από ποσοτικοποίηση ότι ο αριθμός των κυττάρων που εξακολουθούν και εκφράζουν *Ki67* μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης και επομένως είναι κύτταρα που δεν έχουν εγκαταλείψει τον κυτταρικό κύκλο, είναι κατά περίπου διπλάσιος (36% στα *Neuro2A* 80% στον κλώνο *N2AC2* και 75 % στον *N2AC4*). Επιπλέον, παρατηρείται σημαντική μείωση των θετικών στο *Tuj* κυττάρων (από 72% σε 42% στον κλώνο *N2AC2* και 52% στον κλώνο *N2AC4*). Ενδεικτικά αποτελέσματα των πειραμάτων ανοσοφθορισμού πριν και μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης, στην κυτταρική σειρά *Neuro2A* και στον κλώνο *N2AC2* με αντισώματα έναντι του *Tuj* και του *Ki67* παρουσιάζονται στην Εικόνα 1Ε και 1ΣΤ.

Συμπεράσματα

- Η υπερέκφραση της *Abracl* οδηγεί στην αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού.
- Η υπερέκφραση της *Abracl* διατηρεί τα κύτταρα σε κατάσταση πολλαπλασιασμού, αναστέλλοντας τη διαφοροποίησή τους
- Η *Abracl* φαίνεται να ενέχεται στην ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού – προκαταρκτικά αποτελέσματα και από πειράματα καταστολής της μέσω siRNA υποστηρίζουν τα παραπάνω.

Βιβλιογραφία

- Lin J., Zhou T. & Wang, J. (2011). Solution structure of the human HSPC280 protein. *Protein Science*, 20, 216–223.
- Pang T. L., Chen F. C., Weng Y. L., Liao H. C., Yi Y. H. Ho, C. L., Chen M. Y. (2010). Costars, a Dictyostelium protein similar to the C-terminal domain of STARS, regulates the actin cytoskeleton and motility. *Journal of Cell Science*, 123, 3745–3755.
- Sadikoglou E, Daoutsali E, Petridou E, Grigoriou M, Skavdis G. (2014). Comparative analysis of internal ribosomal entry sites as molecular tools for bicistronic expression. *J Biotechnology*, 10, 31-4.
- Stylianopoulou E., Kalamakis G., Pitsiani M., Fysekis I., Ypsilantis P., Simopoulos C., Grigoriou M. E. (2016). HSPC280, a winged helix protein expressed in the subventricular zone of the developing ganglionic eminences, inhibits neuronal differentiation. *Histochemistry and Cell Biology*, 145, 175–184.

Ura B., Monasta L., Arrigoni G., Franchin C., Radillo O., Peterlunger I., Scrimin F. (2017). A proteomic approach for the identification of biomarkers in endometrial cancer uterine aspirate. *Oncotarget*, 8, 109536–109545.

Wang D., Liu H. Q., Ren C. & Wang L. (2019). High Expression of ABRACL Is Associated with Tumorigenesis and Affects Clinical Outcome in Gastric Cancer. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 23, 91–97.

Salmonella Oranienburg, ένας ιδιαίτερα λοιμογόνος ορότυπος-Ελληνικά δεδομένα

ΠΑΝΑΓΙΩΤΙΔΟΥ Έμιλυ, ΝΤΟΥΥΡΟ Νταγιάννα, ΜΑΝΔΗΛΑΡΑ Γεωργία
Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Σαλμονελλών, Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής,
gmandilara@uniwa.gr

Λέξεις-Κλειδιά

Salmonella, ορότυπος, επιτήρηση

Εισαγωγή

Η *Salmonella* spp. σύμφωνα με το Ευρωπαϊκό Κέντρο Ελέγχου Νοσημάτων αποτελεί τη «βασιλίτσα» των τροφιμογενών παθογόνων μικροβίων. Για το έτος 2018 η δηλούμενη επίπτωση στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης ήταν 20 /100.000 πληθυσμού, ενώ για την Ελλάδα την περίοδο 2004-2019 η μέση ετήσια δηλούμενη επίπτωση του νοσήματος ήταν 5,9 κρούσματα ανά 100.000 πληθυσμού. Ο ορότυπος Enteritidis της *Salmonella enterica enterica* αποτελεί τον συχνότερο ορότυπο και στην Ελλάδα και στην Ευρωπαϊκή Ένωση και σχετίζεται κυρίως με κατανάλωση μολυσμένων αυγών και κρέατος πουλερικών.

Στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Σαλμονελλών αποστέλλονται καλλιεργήματα σαλμονελλών που απομονώνονται από όλα τα Νοσοκομεία της Ελλάδος για περαιτέρω τυποποίηση και μελέτη, 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 σαλμονέλλωσης αλλά και πιθανές αυξητικές τάσεις-διασπορά κάποιων συγκεκριμένων στελεχών, με σκοπό τις άμεσες ενέργειες παρέμβασης για την προστασία της δημόσιας υγείας.

Ο ορότυπος *S. Oranienburg* αποτελεί έναν από τους λιγότερο συχνούς ορότυπους που απομονώνονται στην Ελλάδα. Από το 2006-2019 ο μέσος όρος συχνότητας απομόνωσης της *S. Oranienburg* από ανθρώπους επί του συνόλου των οροτύπων ήταν 2,7% (min 0.5-max 6%). Το 2020 από τον Ιούλιο μέχρι τον Σεπτέμβριο παρατηρήθηκε μια αυξημένη απομόνωση του συγκεκριμένου ορότυπου (8%).

Σκοπός

Ελέγχθηκε αν η αυξημένη συρροή καλλιεργημάτων *S. Oranienburg* οφείλεται σε ένα συγκεκριμένο στέλεχος ή όχι.

Υλικά και Μέθοδοι

Μελετήθηκαν όλα τα καλλιεργήματα *S. Oranienburg* (n=35) των ετών 2018-2020 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).

Αποτελέσματα

Όλα τα καλλιεργήματα *S. Oranienburg* ήταν ευαίσθητα στα εξετασθέντα αντιβιοτικά. Η μοριακή τυποποίηση έδειξε μια ποικιλία μοριακών τύπων μεταξύ των καλλιεργημάτων του 2020 αλλά και υψηλή ομοιότητα μεταξύ μη σχετιζόμενων επιδημιολογικά καλλιεργημάτων (διαφορετικό έτος, γεωγραφική περιοχή).

Συμπεράσματα

Από τη μελέτη προκύπτει ότι η αυξημένη συρροή καλλιεργημάτων *S. Oranienburg* το τρίμηνο Ιούλιος-Σεπτέμβριος 2020 δεν οφείλεται σε ένα συγκεκριμένο στέλεχος αλλά σε διαφορετικά στελέχη. Η εργαστηριακή επιτήρηση όλων των σαλμονελλών του συγκεκριμένου οροτύπου θα συνεχιστεί και για όλα τα καλλιεργήματα που θα απομονωθούν και θα σταλούν στο Κέντρο Αναφοράς, προκειμένου

έγκαιρα να αναγνωριστούν πιθανές αυξητικές τάσεις συγκεκριμένων στελεχών.

Βιβλιογραφία

- Επιδημιολογικά δεδομένα για τη σαλμονέλλωσης στην Ελλάδα, 2014-2019, ΕΟΔΥ (2020)
The European Union One Health 2018 Zoonoses Report, , EFSA Journal 2019
Greek System for the Surveillance of Antimicrobial Resistance (<http://www.mednet.gr/whonet/>)
European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (<https://www.eucast.org/>)
Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of Escherichia coli O157:H7, Escherichia coli non-O157 (STEC), Salmonella serotypes, Shigella sonnei and Shigella flexneri (PNL05 Last Updated December 2017)

III.ΚΕΝΤΡΙΚΕΣ ΟΜΙΛΙΕΣ

*Η Ενιαία Υγεία και η εφαρμογή των αρχών της. Παρελθόν, παρόν και μέλλον***Δρ Λινού Μαρία**

Συντονίστρια Γραφείου Ενιαίας Υγείας, Ε.Ι. Παστέρ

Πρόκειται για μια παγκόσμια στρατηγική αντιμετώπισης της υγείας σαν σύνολο στο οποίο συμπεριλαμβάνονται η υγεία του ανθρώπου, των ζώων και του περιβάλλοντος. Η ολιστική και διεπιστημονική προσέγγιση σε σοβαρά προβλήματα δημόσιας υγείας η οποία κατακτά ολοένα και περισσότερο έδαφος τα τελευταία χρόνια με αποκορύφωμα την εποχή που ζούμε. Η έννοια της Ενιαίας Υγείας είναι γνωστή ήδη από πολύ παλιά, η σχηματοποίησή της σε κίνημα και στρατηγική όμως, καθώς και εφαρμογή των αρχών της άρχισαν τον 21ο αιώνα από την ανάγκη αντιμετώπισης επαπειλούμενων επιδημιών.

Γνωρίζοντας ότι περισσότερο από το 75% των αναδυόμενων λοιμωδών νοσημάτων του ανθρώπου προέρχονται με κάποιο τρόπο από τα ζώα, η ανάγκη για συνεργασία στη χάραξη πολιτικών για θέματα δημόσιας υγείας έγινε επιτακτική. Ξεκινώντας από το 2004 από την γρίπη των πτηνών φτάσαμε στην πανδημία COVID19 που αποτελεί το πλέον τρανταχτό παράδειγμα της ανάγκης για συνεργασία σε τοπικό και διεθνές επίπεδο για τον έγκαιρο εντοπισμό, άμεση αντιμετώπιση και πρόληψη παγκόσμιων υγειονομικών απειλών.

Η εφαρμογή των αρχών της Ενιαίας Υγείας δεν είναι μόδα ή τάση. Είναι πλέον ανάγκη και μονόδρομος στην σφαιρική αντιμετώπιση της υγείας –σωματικής, κοινωνικής και ψυχικής- μέσα από τη διεπιστημονική συνεργασία σε τοπικό, εθνικό και παγκόσμιο επίπεδο.

*Διάδοση της ιατρικής πληροφορίας- ένα σοβαρό θέμα δημόσιας υγείας***Σίμου Εφη**

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Πολιτικών της Δημόσιας Υγείας, Σχολή Δημόσιας Υγείας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Η επικοινωνία διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην προώθηση στρατηγικών και πολιτικών δημόσιας υγείας, συμπεριλαμβανομένων της πρόληψης των ασθενειών, της προαγωγής της υγείας, της ποιότητας ζωής και ευεξίας.

Ένας από τους στόχους της Δημόσιας Υγείας είναι να επικοινωνήσει τις πληροφορίες υγείας με αποτελεσματικό τρόπο, ώστε να αποκωδικοποιηθούν σωστά από τα άτομα και την κοινωνία με σκοπό την προστασία και την προαγωγή της ατομικής και δημόσιας υγείας. Ειδικότερα σε εποχές κρίσης η πρόσβαση στη σωστή πληροφορία, τη σωστή στιγμή είναι καθοριστικής και ζωτικής σημασίας.

Η αύξηση των πληροφοριών που σχετίζονται με ένα συγκεκριμένο θέμα υγείας μπορεί να συμβαίνει εκθετικά σε σύντομο χρονικό διάστημα, λόγω ενός συγκεκριμένου περιστατικού όπως η παρούσα πανδημία. Σε αυτή την κατάσταση, παραπληροφόρηση και φήμες εμφανίζονται στο προσκήνιο, μαζί με χειραγώγηση πληροφοριών με αμφίβολη πρόθεση.

Το κόστος της παραπληροφόρησης θα μπορούσε να είναι τεράστιο, καθώς υπονομεύει τα μηνύματα δημόσιας υγείας και θέτει σε κίνδυνο την εμβέλεια και τη βιωσιμότητα του παγκόσμιου συστήματος υγείας.

Οι ανακριβείς και ψεύτικες ειδήσεις διαδίδονται γρηγορότερα και πιο εύκολα σήμερα μέσω του διαδικτύου και των μέσων κοινωνικής δικτύωσης και από διεθνείς μελέτες καταγράφεται ότι δύνανται να συντελέσουν σε φαινόμενα ρατσισμού, κοινωνικού στιγματισμού και αποδόμησης της κοινωνικής συνοχής. Οι ψευδείς ειδήσεις συχνά μας λένε αυτό που θα θέλαμε να πιστέψουμε και είμαστε ήδη επιρρεπής εύκολα να το αποδεχτούμε, κυρίως λόγω των δικών μας προκαταλήψεων, δεδομένου ότι οι άνθρωποι τείνουν να μοιράζονται μόνο πράγματα με τα οποία συμφωνούν.

Αυτό που πολλές φορές αποδεικνύεται σωτήριο σε περιόδους κρίσεως είναι να ενημερωνόμαστε για ένα θέμα που μας ενδιαφέρει από πολλές πηγές, ώστε να μπορούμε να αναπτύξουμε το κριτήριο αναφορικά με το τι από όλα αυτά που διαβάζουμε είναι αξιόπιστο.

Η στάση την οποία υιοθετούν οι ερευνητές και οι επίσημες πηγές απέναντι στον κίνδυνο επηρεάζει επίσης τη διασπορά ανακριβών και ψευδών πληροφοριών. Όταν επικοινωνούμε κατά τη διάρκεια μια κρίσης είναι σημαντικό να δημοσιοποιούμε πληροφορίες απλές, αξιόπιστες, συνεπείς, έγκυρες και έγκαιρες. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει τα επιστημονικά δεδομένα για έναν κίνδυνο να παρουσιάζονται με απολυτότητα, καθώς σπανίως οι επιστημονικές μελέτες αποτελούν την τελευταία εξέλιξη στον τομέα τους, ενώ πολλές όψεις κινδύνων για τη δημόσια υγεία παραμένουν στο σκοτάδι. Τέλος είναι σημαντικό η επιστημονική αβεβαιότητα αναφορικά με έναν κίνδυνο να παρουσιάζεται στο κοινό με απλό και κατανοητό τρόπο, με διαφάνεια και ειλικρίνεια.

Ανάδυση νέων παθογόνων και Ενιαία Υγεία-Κίνδυνοι, προκλήσεις και διδάγματα από την πανδημία COVID-19

Ψαρουλάκη Άννα

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τις τελευταίες δεκαετίες, αυξανόμενες απειλές εμφανίζονται από νέα αναδυόμενα, ή από επανεμφανιζόμενα γνωστά από το παρελθόν λοιμώδη νοσήματα (ΛΝ), που αυξάνουν τη διασπορά τους σε νέες γεωγραφικές περιοχές ή πληθυσμούς. Η πλειονότητα τους να είναι ζωνόσοι προερχόμενες κυρίως από τις δεξαμενές άγριας ζωής και είναι ως επί το πλείστον ιογενούς αιτιολογίας. Τα αναδυόμενα και επανεμφανιζόμενα ΛΝ συνιστούν μείζονες απειλές για την ανθρώπινη υγεία και έχουν τεράστιο αντίκτυπο στις ανθρώπινες κοινωνίες παγκοσμίως, με σημαντικά κοινωνικοοικονομικά προβλήματα.

Μερικά από τα πιο απειλητικά αναδυόμενα παθογόνα εκ των οποίων κάποια με αυξημένο δυναμικό πανδημίας είναι ιοί RNA λόγω της απaráμιλλης ικανότητας προσαρμογής τους σε νέα περιβάλλοντα και νέους ξενιστές συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων. Κάποιο νεοεμφανιζόμενοι ιοί συχνά είναι εξαιρετικά μολυσματικοί στον άνθρωπο, αφού δεν έχει ανοσία εναντίον τους, καθώς δεν έχουν «συναντηθεί» προηγουμένως με το ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα. Παραδείγματα των τελευταίων δεκαετιών περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων τους ιούς: Έμπολα, MERS, SARS, Nipah, Lassa, Hanta, τον ιό του πυρετού Rift Valley, West Nile virus, ιοί υψηλής παθογονικής γρίπης των πτηνών, ιός Zika και πρόσφατα τον SARS-COV-2.

Οι παράγοντες που προωθούν την εμφάνιση και τη γεωγραφική εξάπλωση νέων παθογόνων είναι πολύπλοκοι και σχετίζονται με ένα μεμονωμένο συμβάν ή αλυσίδα πολλαπλών γεγονότων που επηρεάζονται από: α) τη γενετική εξέλιξη και την μικροβιακή προσαρμογή των παθογόνων, β) περιβαλλοντικές και κλιματικές αλλαγές, γ) ανθρωπολογικές και δημογραφικές αλλαγές, δ) από τροποποιήσεις της κινητικότητας και συμπεριφοράς ανθρώπων και ζώων.

Η αύξηση του παγκόσμιου ανθρώπινου πληθυσμού, η αστικοποίηση, οι μεγάλες αλλαγές στα πρότυπα διαβίωσης του ανθρώπινου είδους, οι ριζικές αλλαγές στις διατροφικές συνήθειες με την αυξανόμενη ζήτηση για ζωική πρωτεΐνη παγκοσμίως, η ταχεία παγκόσμια κυκλοφορία ανθρώπων, ζώων και προϊόντων τους συνέπεια της τεράστιας αύξησης των διεθνών ταξιδιών και της παγκοσμιοποίησης του εμπορίου, διευκόλυναν την εξάπλωση των μικροοργανισμών και των ξενιστών τους, τη μετάδοση σε μεγάλες αποστάσεις, και την είσοδο τους σε νέους πληθυσμούς. Η κλιματική αλλαγή επηρεάζει τη βιολογία και την οικολογία των μικροοργανισμών, αλλάζοντας τα επιδημιολογικά πρότυπα και τη δυναμική μετάδοσης και διασποράς των ΛΝ. Η άνιση ικανότητα των συστημάτων δημόσιας υγείας παγκοσμίως και η κατάρρευση πρωτοβουλιών δημόσιας υγείας που επιδεινώνονται με τη φτώχεια, την κοινωνική ανισότητα και πολέμους συμβάλλουν σε μέγιστο βαθμό.

Σε γενικές γραμμές, η ανάδυση και επανεμφάνιση ΛΝ είναι το αποτέλεσμα πολλών συνδεδεμένων παραγόντων που μειώνουν την απόσταση και αυξάνουν τα ποσοστά επαφής μεταξύ ανθρώπων και άγριων ζώων, και των ίδιων των ανθρώπων.

Πολλά αναδυόμενα νοσήματα έχουν προκύψει από την άγρια φύση, και είναι το αποτέλεσμα ραγδαίων αλλαγών στη σχέση του είδους μας με τα ζώα, στη διεπαφή άγριας ζωής-ανθρώπου.

Η καταστροφή των οικοσυστημάτων, αλλαγές στη γεωργία και στην κτηνοτροφία επηρεάζουν αρνητικά τη βιοποικιλότητα, ενώ παράλληλα η διατάραξη οικοτόπων άγριας ζωής, έχει ως αποτέλεσμα μια αυξανόμενη μετακίνηση άγριων ζώων, που επιτρέπει σε μικροοργανισμούς που εντοπίζονταν σε άγρια ζώα σε απομονωμένα οικοσυστήματα, να έρθουν σε επαφή με άλλα ζώα ή ανθρώπους, να «μοιραστούν» παθογόνα δημιουργώντας συνθήκες ευνοϊκές στην πρόκληση επιδημιών και πανδημιών. Η αποδάσωση, συχνά τροφοδοτούμενη από τη γεωργία και την κτηνοτροφία και την επέκταση των πόλεων ευθύνεται για τη μεγαλύτερη μείωση των εκτάσεων των οικοτόπων παγκοσμίως.

Από τις βασικές αιτίες για την ανάδυση και εξάπλωση των νέων επιδημιών είναι οι εντατικές συνθήκες εκτροφής των ζώων, η κατανάλωση και εμπορία εξωτικών/άγριων ειδών και η ένταξή τους στη διατροφική αλυσίδα αξίας, χωρίς να έχει ελεγχθεί η διατροφική ασφάλειά τους.

Εκτός των άλλων, η αυξανόμενη εντατικοποίηση της παραγωγής τροφίμων που υπαγορεύεται με την αυξανόμενη ζήτηση για τρόφιμα ζωικής προέλευσης ωθεί στη χρήση αντιμικροβιακών στη γεωργία, στις εκτροφές ζώων, στην ιχθυοκαλλιέργεια επιτείνοντας το τεράστιο πρόβλημα της εξάπλωσης της μικροβιακής αντοχής.

Η απάντηση στις προκλήσεις είναι ενέργειες συντονισμένες και παγκόσμιες που θα στηρίζονται στη φιλοσοφία της «Ενιαίας υγείας» (One Health) με μια προσέγγιση που θα εστιάζει στη σχέση και τις πολύπλοκες διασυνδέσεις μεταξύ ανθρώπων, ζώων και περιβάλλοντος, και θα αναγνωρίζει ότι η υγεία και η ευημερία των ανθρώπων συνδέεται στενά με την υγεία των ζώων και του περιβάλλοντος τους (και αντίστροφα). Μια τέτοια προσέγγιση μπορεί να συμβάλει στην κατανόηση της οικολογικής και επιδημιολογικής δυναμικής που διαμορφώνει τους κινδύνους από μια νόσο, στην έγκαιρη πρόβλεψη και αξιολόγηση του κινδύνου, διευρύνοντας την ικανότητα προληπτικής αντιμετώπισης και ελέγχου της.

Η εμπειρία από την πανδημία COVID-19, ενίσχυσε τη σημασία των αρχών της Ενιαίας Υγείας στην παγκόσμια διακυβέρνηση των μολυσματικών ασθενειών.

Η πανδημία COVID-19, υπογράμμισε δραματικά τον κίνδυνο εμφάνισης αναδυόμενων παθογόνων ικανών να ξεπεράσουν το φράγμα των ειδών και να εξαπλωθούν με τεράστια ταχύτητα παγκοσμίως, με καταστροφικές επιπτώσεις σε κοινότητες, συστήματα υγείας και οικονομίες. Ανέδειξε ένα σύνολο παραγόντων σχετιζόμενων με την εξάπλωση ενός αναδυόμενου παθογόνου που αφορούν σε τοπικές, εθνικές και παγκόσμιες ρυθμίσεις διακυβέρνησης, υπαγορεύοντας την επιτακτική ανάγκη για ολιστική προσέγγιση, κοινές δράσεις και αντιμετώπιση. Υπογράμμισε εμφατικά την επείγουσα ανάγκη για καλύτερα προετοιμασμένα και συντονισμένα τοπικά, περιφερειακά και διεθνή συστήματα δημόσιας υγείας, με την οικοδόμηση υποδομών έγκαιρης απόκρισης που θα δίνουν έμφαση στην ανταλλαγή πληροφοριών και τον συντονισμό δράσεων σε τοπικό, εθνικό και διεθνές επίπεδο. Κατέδειξε την ανάγκη για προώθηση διατομεακής/διεπιστημονικής συνεργασίας και συντονισμού στα πλαίσια της «Ε.Υ».

Καθώς το φάντασμα της επικείμενης καταστροφής για την υγεία σπάνια υπάρχει στο προ-επιδημικό στάδιο (τότε όμως που η δράση είναι πιο κρίσιμη), αναδεικνύονται δύσκολες προκλήσεις διακυβέρνησης και εφαρμογής σχετικά με την Έτοιμότητα, την Έγκαιρη και αξιόπιστη Επιδημιολογική Επιτήρηση, την Έγκαιρη αναγνώριση/ανίχνευση πιθανών πανδημικών παθογόνων και την Ταχεία απόκριση με έγκαιρες κατευθυντήριες γραμμές και παρεμβάσεις πρόληψης και ελέγχου.

Οι τεράστιες προκλήσεις για το μέλλον:

Η κατανόηση και η απόκριση στις οικολογικές, κοινωνικές και οικονομικές συνθήκες που πυροδοτούν την εμφάνιση και διευκολύνουν τη μετάδοση των αναδυόμενων ΛΝ, αποτελεί μια από τις σημαντικότερες προκλήσεις για την ανθρωπότητα σήμερα.

Οι βιώσιμες λύσεις για πρόληψη των αναδυόμενων ΛΝ απαιτούν προσέγγιση παγκόσμιας κλίμακας. Στο επίκεντρο θα πρέπει να βρίσκεται η αξιολόγηση και διαχείριση των κινδύνων και η διεθνής επικοινωνία.

Οι παγκόσμιες προσπάθειες για την ενίσχυση των συστημάτων επιτήρησης, την ανάπτυξη της ικανότητας ευαισθητοποίησης και απόκρισης σε όλες τις χώρες με πρωταρχική έμφαση στις αδύναμες χώρες και ευάλωτους πληθυσμούς.

Η οικοδόμηση μακροπρόθεσμων, βιώσιμων, αξιόπιστων ουσιαστικών και δίκαιων αποτελεσματικών συνεργασιών με το σχεδιασμό και την εφαρμογή προγραμμάτων, πολιτικών, νομοθεσίας και έρευνας, όπου, σε μια προσέγγιση Ενιαίας Υγείας, πολλοί τομείς θα επικοινωνούν και θα συνεργάζονται.

Τέλος, η τεράστια πρόκληση στο πώς θα συγκεραστούν ανταγωνιστικά συμφέροντα, όπως η γεωργική παραγωγικότητα, οι ανάγκες του αυξανόμενου παγκόσμιου πληθυσμού, η αγροτική διαβίωση, με την αειφορία, την υγειονομική ασφάλεια και τη Δημόσια Υγεία.

Τα παραπάνω απαιτούν Πολυτομεακή, Διεπιστημονική συνεργασία, ρυθμίσεις σε διασυνοριακά ζητήματα, στα πλαίσια της προσέγγισης της Ενιαίας Υγείας αλλά και Πολιτική Βούληση και Δέσμευση για Επένδυση.

Καταγραφή Επαγγελματικής Απασχόλησης Βιοεπιστημόνων στην Υγεία **Κεσανόπουλος Κωνσταντίνος**

MSc, PhD, Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό, Τμήμα Δημόσιας & Κοινωνικής Υγείας, Σχολή Δημόσιας Υγείας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Στο πλαίσιο της προσπάθειας της Επιτροπής Υγείας της Πανελλήνιας Ένωσης Βιοεπιστημόνων (Π.Ε.Β) να καταγράψει τα διαφορετικά εργαστήρια, υπηρεσίες και δομές του δημόσιου και ιδιωτικού τομέα που σχετίζονται με την Υγεία και στα οποία απασχολούνται συνάδελφοι βιοεπιστήμονες, πραγματοποιήθηκε έρευνα μέσω ηλεκτρονικού ερωτηματολογίου. Η έρευνα απεστάλη σε όλα τα μέλη της Π.Ε.Β στα οποία ζητήθηκε να συμμετέχουν καθώς και να την προωθήσουν σε όσους συναδέλφους γνώριζαν ότι απασχολούνται στον χώρο της Υγείας και δεν ήταν μέλη της ένωσης. Στο χρονικό διάστημα Μαρτίου 2019-Νοεμβρίου 2020 συνολικά συμμετείχαν 145 άτομα τα οποία σε ποσοστό 83% ήταν βιολόγοι. Οι συμμετέχοντες ήταν κάτοχοι μεταπτυχιακού σε ποσοστό 64,1% και κάτοχοι διδακτορικού σε ποσοστό 47,2%. Το 61% των συμμετεχόντων εργάζονταν στο δημόσιο τομέα με το 68% του συνόλου όσων απάντησαν να κατέχουν Θέση ευθύνης και το 64% να υπογράφει αποτελέσματα.

Συνολικά το 60% είχε ως αντικείμενο απασχόλησης τη διάγνωση. Ως κύριοι φορείς απασχόλησης καταγράφηκαν τα νοσοκομεία (58%) και τα ιδιωτικά εργαστήρια (45%).

Από το σύνολο των απαντήσεων προκύπτει ότι οι συμμετέχοντες είναι μέλη της Π.Ε.Β (37,9%) ή είχαν εγγραφεί στο παρελθόν (39,3%) ενώ το 21,3% δεν ήταν ποτέ μέλος της ένωσης

Emerging zoonoses from a One Health perspective- COVID19 and beyond

Johanna F Lindahl

Uppsala University, Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Zoonosis Science Center, Uppsala, Sweden

International Livestock Research Institute, Hanoi, Vietnam

Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Clinical Sciences, Uppsala, Sweden

On average, three new human disease appear every year, and around 75% of the emerging diseases are zoonotic. There are many drivers of disease emergence, including land-use change (including

deforestation, irrigation, urbanization), climate change, population growth, and globalization. Most of these drivers are anthropogenic and actually desired for different reasons, such as economic development, food production and recreation. In the growing cities, there is not only a high density of humans, but also livestock that are raised in the cities, or brought there for sales, and urban wildlife. The increasing need for food is connected with changes in rural areas as well. Expansion of agricultural lands means that earlier pristine forest areas are cut down, with increased potential for new pathogens to jump to humans and cause outbreaks. In addition, irrigation schemes are being expanded to improve food production and alleviate poverty. The increased irrigation may contribute to more mosquitoes breeding, and thus increase the incidence of vector-borne diseases.

Invertebrate vectors are also dependent on temperature and rainfall, and global warming together with more extreme weather events may contribute to the emergence of vector-borne diseases as well. However, whereas climate change will expand the range of many vectors and irrigation schemes are being developed, it is not the most common explanation to why these diseases emerge. Globalization, trade and migrations are causing vectors as well as their diseases to move to new areas. *Aedes albopictus* for example, the Asian tiger mosquito, has spread from its presumed origin in Southeast Asia to most other parts of Asia, the Americas, Africa and Europe, and it is believed that the trade of used car tires may be responsible for at least part of these introductions. Transfer of infected mosquitoes with airplanes is also the main mean of outbreaks of “Airport malaria”. Sometimes, vectors are already present in a geographical area, and introduction of a viremic host is the only thing needed to start local transmission, as in the case of Chikungunya virus in Italy. In the global world of today, these disease introductions are likely to happen even more frequently.

Surrounding humans are not only the livestock but also peri-domestic wildlife, including scavenging rodents, birds and dogs. These animals can also transmit zoonotic infections to humans. In many countries there are also wet markets, which often sell animal products as well as live animals. Many people depend on these markets for their livelihoods and food supply. The mix of humans, retailers and customers; live animals for sale; wild and scavenging animals; and food products including ready-to-eat food, creates a perfect recipe for emerging infectious diseases. These markets have been the source of zoonotic viruses, including avian influenza viruses (AIV) and coronaviruses, CoV, including severe acute respiratory syndrome (SARS) CoV-2, causing COVID19 pandemic, which is unprecedented in modern times in terms of human health and economic impact.

In order to prevent future outbreaks, it is important to understand the drivers that cause pathogens to jump species, as well as to understand how the ecologies and social structures in communities allows further transmission. To mitigate the risk factors, it is also important to do this without jeopardizing the livelihood and food security of the poor people that are often dependent on agriculture, irrigation and wet markets.

Νεοεμφανιζόμενες ζωνοόσεις από την σκοπιά της Ενιαίας Υγείας-COVID19 και όχι μόνο

Κατά μέσον όρο, τρεις νέες ανθρώπινες ασθένειες εμφανίζονται κάθε χρόνο, και περίπου το 75% των νεο-εμφανιζόμενων ασθενειών είναι ζωνοτικές. Υπάρχουν πολλοί λόγοι που οδηγούν στην εμφάνιση νέων ασθενειών, πέρα από την αλλαγή χρήσης γης (π.χ. αποψίλωση δασών, άρδευση, αστικοποίηση), την κλιματική αλλαγή, την πληθυσμιακή αύξηση και την παγκοσμιοποίηση. Οι λόγοι αυτοί είναι ως επί το πλείστον ανθρωπογενείς και ουσιαστικά θεμιτοί για διαφορετικούς λόγους, όπως λόγου χάριν η οικονομική ανάπτυξη, η παραγωγή τροφής και η αναψυχή. Στις αναπτυσσόμενες πόλεις, δεν υπάρχει μόνον υψηλή πυκνότητα ανθρώπων, αλλά και κατοικιδίων ζώων τα οποία είτε εκτρέφονται στις μεγαλουπόλεις, είτε μεταφέρονται στις πόλεις ζωντανά για εμπόριο. Επιπλέον οι αστικές περιοχές κατοικούνται και από την εκάστοτε άγρια πανίδα. Η συνεχώς αυξανόμενη ανάγκη για τρόφιμα συνδέεται με αλλαγές στις αγροτικές περιοχές. Επέκταση αγροτικών γαιών σημαίνει ότι προηγούμενες περιοχές πολύτιμης δασικής κάλυψης αποψιλώνονται, με συνέπεια την αυξανόμενη πιθανότητα ανάπτυξης νέων παθογόνων οργανισμών οι οποίοι μεταδίδονται στους ανθρώπους και δημιουργούν ασθένειες. Επιπλέον, τα αρδευτικά συστήματα επεκτείνονται για να βελτιστοποιήσουν την παραγωγή ανθρώπινης τροφής και να εξαλείψουν την φτώχεια. Η αυξανόμενη άρδευση συμβάλλει ενδεχομένως

στην αύξηση του πληθυσμού των κουνουπιών, οπότε αυξάνεται και η συχνότητα μολυσματικών ασθενειών.

Οι ασπόνδυλοι ξενιστές εξαρτώνται επίσης από τη θερμοκρασία και τη βροχόπτωση και η παγκόσμια άνοδος της θερμοκρασίας σε συνδυασμό με τα αυξανόμενα ακραία καιρικά φαινόμενα πιθανώς να συντείνουν στην δημιουργία νέων ασθενειών οι οποίες μεταφέρονται μέσω ξενιστών. Εντούτοις, παρ' όλο που εξ ορισμού η κλιματική αλλαγή συντείνει περαιτέρω στην ποικιλομορφία ξενιστών και μολονότι αναπτύσσονται όλο και πιο ορθολογικά σχήματα άρδευσης, όμως αυτά δεν εξηγούν γιατί δημιουργούνται οι ζωνοτικές ασθένειες. Παγκοσμιοποίηση, εμπόριο και μεταναστεύσεις υποχρεώνουν τους ξενιστές αλλά και τις ασθένειες που μεταφέρουν, να μετακινούνται γεωγραφικά. Το *Aedes albopictus* π.χ., το ασιατικό κουνούπι τίγρης, έχει επεκταθεί από την υποτιθέμενη πηγή του στην νοτιανατολική Ασία προς σχεδόν όλες τις περιοχές της Ασίας, Αμερικής, Αφρικής και Ευρώπης, και εικάζεται ότι το εμπόριο μεταχειρισμένων ελαστικών αυτοκινήτων ίσως να είναι υπεύθυνο τουλάχιστον μερικώς για τις μεταναστεύσεις αυτές. Μεταφορά μολυσμένων κουνουπιών με αεροπλάνα είναι επίσης ένας κύριος τρόπος εξάπλωσης και εξάρσης της «ελονοσίας των αεροδρομίων». Μερικές φορές οι ξενιστές βρίσκονται σε μία γεωγραφική περιοχή και η εισαγωγή ενός φορέα με υψηλή δόση μόλυνσης στο αίμα του μπορεί να αρκεί για την εκκίνηση της τοπικής μετάδοσης, όπως στην περίπτωση του ιού Chikungunya στην Ιταλία. Στον παγκοσμιοποιημένο κόσμο του σήμερα, αυτές οι πύλες εισόδου ασθενειών αναμένεται να εμφανίζονται όλο και συχνότερα.

Το ανθρώπινο περιβάλλον δεν αποτελείται μόνο από κατοικίδια ζώα αλλά και από περι-αστική άγρια πανίδα, πουλιά και σκύλους, αλλά και πτωματοφάγα ζώα. Τα ζώα αυτά επίσης μεταδίδουν ζωνοτικές μολυσματικές ασθένειες στους ανθρώπους. Σε πολλές χώρες υπάρχουν επίσης αγορές όπου συχνά διακινούνται και ζωικά προϊόντα εκτός από ζωντανά ζώα. Πολλοί άνθρωποι εξαρτώνται από τις λαϊκές αυτές αγορές για τις διατροφικές ανάγκες τους και την επιβίωσή τους. Ο συνδυασμός από εμπόρους, μεταποιητές και αγοραστές, ζωντανών ζώων, άγριων ζώων, ζώων που τρέφονται με κουφάρια άλλων ζώων, και διατροφικών προϊόντων όπως έτοιμη προς κατανάλωση τροφή, όλα αυτά, δημιουργούν μία τέλεια συνταγή για την γέννηση νέων μολυσματικών ασθενειών. Οι λαϊκές αυτές αγορές έχουν γίνει οι πηγές ζωνοτικών ιώσεων, συμπεριλαμβανομένων των ιών γρίπης των πουλερικών (AIV) και των κωροναϊών (CoV), όπου ανήκει και ο ιός του σοβαρού οξέως αναπνευστικού συνδρόμου τύπου 2, γνωστός με το όνομα SARS (severe acute respiratory syndrome, SARS) CoV-2, που είναι υπεύθυνος για τη χωρίς προηγούμενο πανδημία COVID19 από άποψη ανθρώπινης υγείας και οικονομικών επιπτώσεων, στη σύγχρονη εποχή.

Προκειμένου να αποτραπούν οι μελλοντικές εξάρσεις, είναι σημαντικό να κατανοηθούν οι δυνάμεις που ευθύνονται και προξενούν την μεταβίβαση παθογόνων οργανισμών από είδος σε είδος, καθώς και να κατανοηθεί το πώς οι οικολογίες και οι κοινωνικές δομές στις κοινωνίες μας επιτρέπουν περαιτέρω εξάπλωση και μετάδοση. Για να μετριαστούν οι παράγοντες κινδύνου, είναι επίσης σημαντικό να προχωρήσουμε χωρίς να θέτουμε σε κίνδυνο τον βιοπορισμό και την εξασφάλιση διατροφής των φτωχών ανθρώπων του πλανήτη, οι οποίοι συχνά εξαρτώνται από την γεωργία, την άρδευση και τις λαϊκές αγορές ζωντανών ζώων.

COVID-19 – diagnostics and vaccine development

Åke Lundkvist

Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Zoonosis Science Center, Uppsala University, Uppsala, Sweden

At the end of 2019, a novel coronavirus, severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) started to spread around the world, disrupting healthcare systems and affecting the lives of millions of people. On March 11, 2020, the viral pneumonia COVID-19, caused by SARS-CoV-2, got classified by the World Health Organization as the second pandemic of the 21st century. In the end of October the global count of registered COVID-19 cases has risen to over 44 million with over 1.17 million deaths. Many reports, however, indicate that a large number of SARS-CoV-2 infections are asymptomatic and

therefore remain undiagnosed. In Europe, the number of cases has started to rapidly rise again, similar to the situation during the spring.

Reliable and efficient methods for COVID-19 patient diagnosis were established as soon as the genome sequence of SARS-CoV-2 was available. Serological methods to date either rely on quantitative laboratory-based EIA assays or on qualitative LFIA. While rapid lateral flow tests have the advantage of being a POC-analysis where results can be given directly to the patient within minutes from sample collection, rapid POC-tests have been attributed a potential risk of production errors that may result in unreliable performance of the test.

A huge number of potential vaccine candidates have been reported and several of them have already reached phase 3 studies. The presentation will summarize the current knowledge on basic virology, molecular and serological diagnostics, and where we are in the development of effective COVID-19 vaccines.

COVID-19 – διάγνωση και ανάπτυξη εμβολίου

Στα τέλη του 2019, ένας νέος κωροναϊός, ο ιός του σοβαρού Οξέως Αναπνευστικού Συνδρόμου τύπου 2, γνωστός με το όνομα SARS (severe acute respiratory syndrome)-CoV-2 άρχισε να διασπείρεται σε όλον τον κόσμο, προκαλώντας δυσλειτουργία στα εθνικά συστήματα ιατρικής περίθαλψης και επηρεάζοντας τις ζωές εκατομμυρίων ανθρώπων. Την 11^η Μαρτίου 2020, η ιική πνευμονία COVID-19 που προκαλείται από τον SARS-CoV-2 αναγνωρίστηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας ως η δεύτερη πανδημία του 21^{ου} αιώνα. Στα τέλη του Οκτωβρίου 2020, η παγκόσμια καταμέτρηση εγγεγραμμένων περιστατικών COVID-19 ανήλθε στα 44 εκατομμύρια, εκ των οποίων τα 1,17 εκατομμύρια απεβίωσαν. Πολλές αναφορές εντούτοις, καταδεικνύουν ότι ένας μεγάλος αριθμός μολύνσεων SARS-CoV-2 είναι ασυμπτωματικές, και συνεπώς, λανθάνουν διάγνωσης. Στην Ευρώπη, ο αριθμός των περιστατικών έχει αρχίσει να αυξάνεται και πάλι ραγδαία, παρόμοια με την κατάσταση της άνοιξης 2020.

Αξιόπιστες και αποτελεσματικές μέθοδοι διάγνωσης των ασθενών με COVID-19 αναπτύχθηκαν αμέσως μετά την ανάλυση του γονιδιώματος του SARS-CoV-2. Οι ανοσολογικές μέθοδοι βασίζονται μέχρι σήμερα είτε σε ποσοτικές εργαστηριακές αναλύσεις EIA είτε σε ποιοτικές αναλύσεις LFIA. Παρότι οι ταχείες δοκιμές πλευρικής ροής έχουν το πλεονέκτημα να προσφέρουν την αμεσότητα των POC (επί σημείου περίθαλψης)- δηλαδή αναλύσεις των οποίων τα αποτελέσματα μπορούν να ανακοινωθούν στον ασθενή άμεσα, μέσα σε λίγα λεπτά μετά την λήψη δείγματος, όμως στις δοκιμές POC αποδίδονται υψηλοί δείκτες πιθανού σφάλματος, οπότε αυξάνεται το ενδεχόμενο τα αποτελέσματα να καθίστανται μη αξιόπιστα.

Ένας τεράστιος αριθμός υποψηφίων εμβολίων έχουν αναφερθεί και πολλά από αυτά έχουν ήδη φθάσει στο στάδιο μελέτης 3. Στη διάλεξη θα παρουσιαστούν συνοπτικά οι τρέχουσες γνώσεις/πληροφορίες σχετικά με τη βασική ιολογία, τις μοριακές και ανοσολογικές διαγνωστικές, και η πρόοδος της ανάπτυξης αποτελεσματικών εμβολίων κατά του COVID-19.

IV.ΣΤΡΟΓΓΥΛΕΣ ΤΡΑΠΕΖΕΣ

ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ 1 Επίκαιρα θέματα δημόσιας υγείας σχετιζόμενα με νερό και τρόφιμα στην τουριστική βιομηχανία

*Συντονίστρια
Μαυρίδου Αθηνά*

Ομότιμη Καθηγήτρια ΤΕΙ Αθήνας, Πρόεδρος ΟΕ, Μέλος ΔΣ ΠΕΒ

*Πισίνες και τουρισμός
Μανδηλαρά Γεωργία*

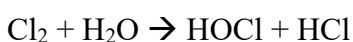
*Βιολόγος PhD- Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Δημόσιας Υγείας - Μοριακής Μικροβιολογίας
Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας, Σχολή Δημόσιας Υγείας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής*

Ο τουρισμός στη σύγχρονη εποχή είναι πολύ διαδεδομένος τρόπος ψυχαγωγίας στον αναπτυγμένο κόσμο και αποτελεί ένα πολυσύνθετο κοινωνικό και οικονομικό φαινόμενο.

Η χρήση κολυμβητικών δεξαμενών στα καταλύματα στα οποία επιλέγουμε να διαμένουμε, η χρήση νεροτσουλήθρων και δεξαμενών υδρομάλαξης (π.χ. jacuzzi) και θερμαλισμού είναι στενά συνυφασμένη με τον τουρισμό. Την ευεξία, ψυχαγωγία, θεραπεία που προσφέρει το κολύμπι σε τέτοιες δεξαμενές απολαμβάνουν όλες οι ηλικίες, από βρέφη, μέχρι ηλικιωμένους. Το κολύμπι όμως ενέχει και πολλούς κινδύνους (hazards), και όταν η έκθεση σε αυτούς τους κινδύνους γίνει με λανθασμένους τρόπους υπάρχει πιθανότητα να υποστεί κάποιος μια βλάβη, μικρή ή μεγάλη (=επικινδυνότητα, risk). Η πιθανότητα αυτή είναι μεγαλύτερη σε συγκεκριμένες ομάδες πληθυσμού, π.χ. παιδιά, ηλικιωμένοι, ανοσοκατεσταλμένοι. Τέτοιοι κίνδυνοι είναι το κολύμπι υπό την επήρεια αλκοόλ, κακή ικανότητα κολύμβησης, κολύμπι χωρίς επίβλεψη, κακός σχεδιασμός και συντήρηση πισίνας (με πιθανή κατάληξη τον πνιγμό), χτύπημα σε σκληρές επιφάνειες (με πιθανότητα τραυματισμού), η κατάποση, εισπνοή ή επαφή με παθογόνα μικρόβια από το νερό της πισίνας (και άρα πιθανότητα μόλυνσης), κ.λ.π.

Οι παθογόνοι ή δυνητικά παθογόνοι (επηρεάζουν μόνο ευπαθείς ομάδες πληθυσμού) μικροοργανισμοί στο νερό μιας κολυμβητικής δεξαμενής μπορεί να αποτελούν φυσιολογική χλωρίδα του νερού (π.χ. *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*) ή να προέρχονται από μόλυνση του νερού από κοπρανώδες υλικό, από το περιβάλλον, από ζώα ή από τους ίδιους τους λουόμενους. Επειδή το περιβάλλον του νερού είναι oligotroφικό, τα παθογόνα δύσκολα πολλαπλασιάζονται. Υπάρχει όμως κίνδυνος τα παθογόνα (κυρίως Λεγιονέλλες και Ψευδομονάδες) να εγκαθίστανται και να πολλαπλασιάζονται μέσα σε σχηματισμούς βιοϋμενίων (biofilm), δηλαδή σε επικαθήσεις αλάτων και οργανικών ουσιών. Εκεί οι συνθήκες είναι εξαιρετικά ευνοϊκές για τα μικρόβια, μιας και το περιβάλλον είναι πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά, αλλά και προστατεύονται από την επίδραση απολυμαντικών ουσιών, π.χ. χλωρίου. Η μετάδοση λοιμωδών νοσημάτων κατά τη διάρκεια της κολύμβησης σε μια πισίνα μπορεί να γίνει είτε με επαφή με μολυσμένο νερό, με κατάποση, με εισπνοή μολυσμένων υδατοσταγονιδίων και οι πιο συνηθείς λοιμώξεις είναι οι δερματοπάθειες, λοιμώξεις ματιών και ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, πνευμονία, μηνιγγίτιδα κ.ά. Ιδιαίτερα οι δεξαμενές υδρομάλαξης ζεστού νερού ενοχοποιούνται για λοιμώξεις από *Legionella pneumophila*, μιας και η θερμοκρασία του νερού επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό του παθογόνου και επομένως την παραγωγή μολυσμένων υδατοσταγονιδίων.

Είναι απαραίτητη η απολύμανση του νερού της πισίνας προκειμένου να απομακρύνονται οι παθογόνοι μικροοργανισμοί και να είναι το νερό ασφαλές για κολύμπι. Η χλωρίωση είναι η συνηθέστερη μέθοδος. Το μόριο ή τα ιόντα του χλωρίου καταστρέφουν το κυτταρικό τοίχωμα των μικροοργανισμών. Το χλώριο σε αντίδραση με το νερό δίνει υποχλωριώδες οξύ (HOCl -το κύριο απολυμαντικό) και υδροχλώριο.



Ελεύθερο ή υπολειμματικό χλώριο είναι το χλώριο στη μοριακή του μορφή και τα παράγωγά του, δηλαδή HOCl και OCl⁻. Η παραγόμενη ποσότητα HOCl εξαρτάται από τη θερμοκρασία και την οξύτητα (pH) του νερού. Ιδανικό pH για να διατηρείται το μέγιστο ελεύθερο χλώριο σε απολυμαντική μορφή είναι το ελαφρά αλκαλικό (pH=7.2), όπου παράλληλα εξασφαλίζεται η καλύτερη προστασία των συστημάτων από διάβρωση και σχηματισμό βιοϋμενίων, αλλά και προστατεύεται το pH του σώματος του κολυμβητή (pH 7.2-7.8). Τα βακτήρια είναι εξαιρετικά ευαίσθητα στη χλωρίωση, όχι όμως και τα πρωτόζωα και κάποιες ομάδες ιών. Μια σημαντική παράμετρος που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στη διαδικασία χλωρίωσης είναι η σχέση: συγκέντρωση απολυμαντικού (C) και ο χρόνος επαφής (t). Οι τιμές C.t θα πρέπει να καθορίζονται μετά από πειράματα στα συγκεκριμένα συστήματα απολύμανσης, με πρόβλεψη μεταβολής τους ανάλογα με τη θερμοκρασία, το pH και τη θολερότητα του νερού.

Από τη χλωρίωση του νερού προκύπτουν παραπροϊόντα επικίνδυνα για τη δημόσια υγεία, όπως τα τριαλομεθάνια (από αντιδράσεις χλωρίου με οργανικές ενώσεις), π.χ. χλωροφόρμιο, που ενοχοποιούνται για σοβαρές παρενέργειες (π.χ. καρκινογόνο δράση). Κατά τη χλωρίωση του νερού παράγονται και οι χλωραμίνες (αντίδραση χλωρίου με αζωτούχες οργανικές ενώσεις ή αμμωνία). Οι χλωραμίνες έχουν ασθενή απολυμαντική δράση και προκαλούν τη γνωστή οσμή χλωρίνης στον χώρο των δεξαμενών.

Στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης δεν υπάρχει κοινή νομοθεσία (όπως π.χ. για το πόσιμο νερό) που να διέπει τη λειτουργία των κολυμβητικών δεξαμενών. Υπάρχει Κατευθυντήρια Οδηγία από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας και κάθε χώρα έχει τις δικές της νομοθεσίες. Στην Ελλάδα υπάρχει από το 1973 η Υγειονομική Διάταξη Γ1/443/73 (ΦΕΚ 87 Β) «περί κολυμβητικών δεξαμενών μετά οδηγιών κατασκευής και λειτουργίας αυτών» και τροποποιήσεις της, που καθορίζουν κατασκευαστικά και τεχνικά στοιχεία της πισίνας και του περιβάλλοντος χώρου, στοιχεία για το προσωπικό λειτουργίας και τις βοηθητικές εγκαταστάσεις και φυσικά για την ποιότητα νερού. Η ποιότητα του νερού πλήρωσης των δεξαμενών καθορίζεται, μεταξύ άλλων, από τη συγκέντρωση ελεύθερου χλωρίου (0,4-0,7mg/L), το pH (7,2 - 8,2) και τη μικροβιολογική ποιότητα με τη χρήση μικροβιακών δεικτών (π.χ. 0 αποικίες *E.coli* σε 100ml νερού). Στην ελληνική νομοθεσία δεν υπάρχει αναφορά για την παρουσία της *Pseudomonas aeruginosa*, για τα παραπροϊόντα της χλωρίωσης, για τη συσχέτιση χλωρίου με τη θερμοκρασία, το pH, τις τιμές C.t

Η πανδημία του SARS-CoV2 έφερε νέα δεδομένα στη χρήση των κολυμβητικών δεξαμενών. Ο SARS-CoV2 φαίνεται να είναι ένας ιός ευαίσθητος σε απορρυπαντικά και συνήθεις συγκεντρώσεις απολυμαντικών ουσιών, εξαιτίας της παρουσίας λιπιδικού περιβλήματος. Επίσης ο ιός αυτός έχει απομονωθεί σε κόπρανα ασθενών με COVID-19, και σε λύματα, δεν έχει απομονωθεί όμως σε επιφανειακά νερά. Δεν έχει παρατηρηθεί λοίμωξη μέσω της κοπρανοστοματικής οδού. Παρόλα αυτά, έπρεπε να διασφαλιστεί η προστασία των λουόμενων από τη μετάδοση του ιού μέσω μολυσμένων σταγονιδίων στο χώρο των κολυμβητικών δεξαμενών και να μηδενιστούν κατά το δυνατό οι πιθανότητες μετάδοσης ικανής ποσότητας ιικών μονάδων και πρόκληση κρουσμάτων. Στην Ελλάδα εκδόθηκαν δύο διαφορετικές εγκύκλιοι λειτουργίας κολυμβητικών δεξαμενών για την περίοδο της πανδημίας. Η μία Εγκύκλιος εκδόθηκε από το Υπουργείο Υγείας για τις δεξαμενές των δήμων, τις αθλητικές κλπ. Το Υπουργείο Τουρισμού εξέδωσε ειδικά πρωτόκολλα υγειονομικού περιεχομένου (ΚΥΑ 1881/29.05.2020) βάσει των οποίων λειτουργούν οι τουριστικές επιχειρήσεις μέσω πανδημίας, και εκεί καθορίζεται και η λειτουργία τουριστικών κολυμβητικών δεξαμενών. Έτσι, απαγορεύτηκε η λειτουργία εσωτερικών κολυμβητικών δεξαμενών, αυξήθηκε το όριο υπολειμματικού χλωρίου (1-3 mg/L για τις κολυμβητικές δεξαμενές και έως 5 mg/L για τις δεξαμενές υδρομάλαξης), καθορίστηκε μέγιστος συνολικός αριθμός εισερχομένων εντός της δεξαμενής κάθε στιγμή (δεν θα είναι μεγαλύτερος από έναν λουόμενο ανά 5m² επιφανείας νερού) και φυσικά τονίζεται η τήρηση αυστηρών κανόνων ατομικής υγιεινής και υγιεινής περιβάλλοντος. Τροποποίηση της ανωτέρω ΚΥΑ (8958/20020) καθορίζει τη λειτουργία δεξαμενών θερμαλισμού, μιας και στις δεξαμενές αυτές το νερό δεν χλωριώνεται, προκειμένου να διατηρήσει τις ιαματικές του ιδιότητες.

Συνεπώς είναι σαφές ότι μπορούμε να κολυμπάμε στις κολυμβητικές δεξαμενές αρκεί να τηρούνται απαρέγκλιτα και από τους υπεύθυνους της εγκατάστασης και από τους λουόμενους όλοι οι κανόνες ατομικής υγιεινής και υγιεινής περιβάλλοντος (π.χ. ντους πριν την είσοδο και μετά την έξοδο από το

νερό, τήρηση φυσικών αποστάσεων, σωστή και ελεγχόμενη χλωρίωση-η υπερβολική χλωρίωση έχει αντίθετα αποτελέσματα, αποφυγή εμβάπτισης του κεφαλιού στο νερό κ.λ.π). Με αυτόν τον τρόπο προστατεύουμε και τον εαυτό μας αλλά και τους υπόλοιπους επισκέπτες της κολυμβητικής δεξαμενής

Στοιχεία ΕΟΔΥ για τροφικές δηλητηριάσεις σε τουρίστες

Μέλλου Κασσιανή

Υπεύθυνη Γραφείου Τροφιμογενών και Υδατογενών Νοσημάτων. ΕΟΔΥ- Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας

Η Ελλάδα είναι ένας δημοφιλής τουριστικός προορισμός. Το 2019 σημειώθηκε αύξηση στις αφίξεις μη κατοίκων από το εξωτερικό στη χώρα μας που ξεπέρασαν τις 31.000 συνολικά.

Η οικονομία της χώρας βασίζεται σε σημαντικό βαθμό στη λεγόμενη «τουριστική βιομηχανία» και οι υπηρεσίες που παρέχονται στους επισκέπτες είναι απαραίτητο να είναι υψηλού επιπέδου.

Η ασφάλεια των τροφίμων και του νερού είναι σημαντική προϋπόθεση για την απρόσκοπτη παραμονή των ταξιδιωτών στη χώρα μας.

Με βάση τα δεδομένα των συστημάτων επιτήρησης παρά τον μεγάλο αριθμό τουριστών ο αριθμός των καταγεγραμμένων περιστατικών τροφιμογενών νοσημάτων στον πληθυσμό αυτό είναι μικρός.

Παρόλα αυτά, οι αρχές δημόσιας υγείας θα πρέπει να είναι σε εγρήγορση για αναγνώριση πιθανών κινδύνων ιδιαίτερα σε τουριστικές περιοχές και να λαμβάνουν όλα τα κατάλληλα μέτρα για την πρόληψη εμφάνισης κρουσμάτων στον πληθυσμό των ταξιδιωτών που επιλέγουν να επισκεφτούν τη χώρα μας κατά τη διάρκεια των διακοπών τους.

Πολύ-κριτηριακή ανάλυση της επίδρασης πολλαπλών παραγόντων στην παρουσία της Legionella σε συστήματα νερού ξενοδοχειακών μονάδων της Κρήτης

Χοχλάκης Δημοσθένης

Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Μικροβιακής Παθογένεσης, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Η Legionella έχει εντοπιστεί σε διαφορετικά φυσικά και τεχνητά περιβάλλοντα νερού. Προστατεύεται από βιομεμβράνες που σχηματίζονται στις εσωτερικές επιφάνειες του δικτύου σωλήνων νερού. Διάφοροι παράγοντες μπορεί να εμπλέκονται στην παρουσία και επιβίωση του παθογόνου. Κατά την περίοδο 2018-2020 συλλέχθηκαν δείγματα νερού από Ξενοδοχεία και αναλύθηκαν για την ύπαρξη Legionella, E. coli, Coliforms, Pseudomonas και Ολικής μεσόφιλης χλωρίδας. Χρησιμοποιήθηκαν διάφορα στατιστικά πακέτα για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων. Οι έλεγχοι με μεθόδους κλασικής καλλιέργειας δεν μπορούν πάντα να αποκαλύψουν αξιόπιστα τους κινδύνους μόλυνσης. Η ανάλυση μεμονωμένων παραμέτρων ειδικά για μεμονωμένα σημεία δειγματοληψίας δεν μπορεί να προβλέψει αξιόπιστα την εμφάνιση μόλυνσης από Legionella.

ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ 2 Σημασία του βιολογικού εγγραμματισμού στην καθημερινή ζωή

Συντονιστής

Ζαχαρίας Σκούρας

Καθηγητής Γενετικής, Τμήματος Βιολογίας Α.Π.Θ.

Η σημασία του Ιολογικού Εγγραμματισμού: RNA ιοί: Συνεχείς επιδημιολογικές προκλήσεις κατά τον 20^ο και 21^ο αιώνα

Μπελούκας Απόστολος

Επίκουρος καθηγητής, Διευθυντής Εργαστηρίου Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Οι μεγαλύτερες επιδημίες και όλες οι πανδημίες που βίωσε (συμπεριλαμβανομένης και της τρέχουσας της νόσου COVID-19) η ανθρωπότητα από τον 20^ο αιώνα και έπειτα προκλήθηκαν από RNA ιούς. Γιατί όμως τα συγκεκριμένα παθογόνα, αν και διαθέτουν «αρχέγονο» γενετικό υλικό κατορθώνουν και προκαλούν ανά τακτά χρονικά διαστήματα επιδημίες ή και πανδημίες στους ανθρώπινους πληθυσμούς; Ποια τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά έχουν που τους δίνουν αυτή τη δυνατότητα και πως ο άνθρωπος καλείται, εάν μπορεί, να βρει λύσεις για την αντιμετώπιση τους;

Η σημασία του ανοσολογικού εγγραμματισμού στην καθημερινή ζωή - Τσιτσιλώνη

Τσιτσιλώνη Ουρανία

Καθηγήτρια Ανοσολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Ο νέος κορωνοϊός έφερε ξανά στο προσκήνιο βασικές ανοσολογικές έννοιες αλλά και πολλούς προβληματισμούς. Σήμερα ξέρουμε ότι η COVID-19, η νόσος που προκαλεί ο SARS-CoV-2, είναι νόσος και (ίσως μάλιστα κυρίως) του ανοσοποιητικού συστήματος. Αντισώματα έναντι του SARS-CoV-2 από αναρρώσαντες ασθενείς αποτελούν μια θεραπευτική λύση για τους ασθενείς, ενώ τα εμβόλια αναμένονται να παίξουν καθοριστικό ρόλο στον έλεγχο της πανδημίας. Θα πρέπει να παραδειγματιστούμε από τις επιδημικές εξάρσεις της ιλαράς που ζήσαμε την τελευταία πενταετία ως αποτέλεσμα του αντιεμβολιαστικού κινήματος. Θα πρέπει να κατανοήσουμε τα οφέλη των εμβολίων, όχι μόνο στον περιορισμό της εξάπλωσης λοιμωδών νοσημάτων, αλλά και στην αντιμετώπιση του καρκίνου, και μάλιστα σε περιστατικά που λίγα χρόνια πριν θεωρούντο ανίατα. Η σωστή γνώση της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος και ο τρόπος που αποκρίνεται όταν ο οργανισμός μας κινδυνεύει είναι το «κλειδί».

Βιοτεχνολογία και Κλιματική Αλλαγή: Υπάρχει ελπίδα?

Χατζηνικολάου Δημήτρης

Αναπληρωτής Καθηγητής Μικροβιακής Βιοτεχνολογίας Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Ζούμε μια περίοδο όπου τα φώτα της δημοσιότητας είναι στραμμένα στην αντιμετώπιση της πανδημίας COVID-19. Η συντριπτική πλειοψηφία των επιστημόνων όμως, θεωρεί πως το μεγαλύτερο τρέχον πρόβλημα της ανθρωπότητας είναι αυτό της Κλιματικής Αλλαγής (ΚΑ), οι συνέπειες της οποίας έχουν ήδη αρχίσει να εκδηλώνονται με διάφορες μορφές. Βασική αιτία της ΚΑ είναι η υπερθέρμανση του πλανήτη, κυρίως ως συνέπεια της πρωτοφανούς ανθρωπογενούς αύξησης των επιπέδων των αερίων θερμοκηπίου στην ατμόσφαιρα. Πρόκειται για μια ιδιαίτερα δύσκολη στην αντιμετώπιση κατάσταση, καθώς οι αιτίες της βασίζονται στον τρόπο που έχει δομηθεί τα τελευταία 150 χρόνια η παγκόσμια οικονομία. Η ανθρωπότητα, παρασυρόμενη από την αίσθηση της «αφθονίας» πρώτων υλών και

ενέργειας που δημιουργούσε ο χαμηλός σχετικά παγκόσμιος πληθυσμός στις αρχές του προηγούμενου αιώνα, υιοθέτησε ένα αναπτυξιακό πρότυπο βασισμένο στον καταναλωτισμό και την άμετρη σπατάλη φυσικών πόρων. Το μοντέλο αυτό είχε προφανή οφέλη για κάποια τμήματα του πληθυσμού και υποστήριξε ως ένα βαθμό την ταχεία τεχνολογική εξέλιξη. Είναι όμως προφανές, τουλάχιστον σε αυτούς που δε φορούν πολιτικές παρωπίδες οποιουδήποτε χρώματος, πως δε μπορεί πια να συντηρηθεί, καθώς σε επίπεδο κλασσικών ενεργειακών πόρων και πρώτων υλών ο πλανήτης αποτελεί ένα «κλειστό» οικοσύστημα. Ο ανθρώπινος πληθυσμός πλησιάζει στα 8 δις, και οι αρνητικές επιπτώσεις στο κλίμα, την ποιότητα του περιβάλλοντος, την ανθρώπινη υγεία και κατ' επέκταση στην προοπτική επιβίωσης του είδους μας είναι πια ορατές.

Μια λογική λύση στο διαφαινόμενο αδιέξοδο, αποτελεί η δραστική μεταστροφή της οικονομίας προς μια βιώσιμη κατεύθυνση, με έμφαση στην αποτροπή της περιβαλλοντικής υποβάθμισης και την προστασία της βιοποικιλότητας. Και αυτό δεν σημαίνει απλά μια «αφελή» εφαρμογή τεχνολογιών συμβατικής ανακύκλωσης και «επιφανειακών» προσεγγίσεων εταιρικής κοινωνικής ευθύνης. Οι πρακτικές αυτές έχουν αποδεδειγμένα ελάχιστα θετικό περιβαλλοντικό πρόσημο, συνήθως γίνονται κυρίως για λόγους δημοσιότητας, και αρκετές φορές αποτελούν απλά άλλοθι για την κάλυψη περιβαλλοντικών ατασθαλιών.

Η ουσιαστική αντιμετώπιση της κλιματικής αλλαγής θα προέλθει από την αξιοποίηση της μόνης πραγματικά ανανεώσιμης πηγής για το γήινο οικοσύστημα, που δεν είναι άλλη από την ηλιακή ακτινοβολία. Η τελευταία προσφέρεται συνεχώς και ανεξάντλητα τόσο άμεσα ως ενέργεια (ακτινοβολία, άνεμοι, κλπ) όσο και έμμεσα ως χημικές πρώτες ύλες μέσω της φωτοσυνθετικής δράσης αυτότροφων μικροοργανισμών και φυτών. Η φωτοσύνθεση είναι μια βασική βιολογική διαδικασία που μετατρέπει τον οξειδωμένο άνθρακα (διοξειδίο του άνθρακα) σε ανηγμένες μορφές (πολυσακχαρίτες, λίπη, πρωτεΐνες κλπ) ικανές να χρησιμεύσουν ως πρώτη ύλη για ένα πλήθος χημικών μετατροπών. Στο πλαίσιο αυτό έχει αναπτυχθεί τις τελευταίες δεκαετίες η έννοια του «βιοδιυλιστηρίου». Πρόκειται για ένα σύνολο καθετοποιημένων βιοτεχνολογικών διεργασιών, κατά την οποία ο άνθρακας, στην υπολειμματική φυτική βιομάζα και σε ένα πλήθος αποβλήτων, μπορεί να μετατραπεί μέσω ενζυμικών και μικροβιακών δράσεων σε μια σειρά από χρήσιμες ενώσεις στις οποίες περιλαμβάνονται βιοκαύσιμα (βιοαιθανόλη, βιοαέριο, κ.ά) και χημικές πρώτες ύλες (οργανικά οξέα, βιοδιασπώμενα πολυμερή κλπ). Καθώς τα προϊόντα αυτά παράγονται σήμερα από το πετρέλαιο, τα βιοδιυλιστήρια μπορούν να τροφοδοτήσουν με ενέργεια και πρώτες ύλες την οικονομία, υπό συνθήκες ενός κλειστού ισοζυγίου διοξειδίου του άνθρακα, συμβάλλοντας έτσι αποτελεσματικά στην ανάσχεση της Κλιματικής Αλλαγής.

Τροφοδοτούμενες από την τεράστια πρόοδο στις εφαρμοσμένες βιολογικές επιστήμες που έχει συντελεστεί τις τελευταίες δεκαετίες, οι τεχνολογίες βιοδιυλιστηρίου έχουν εξελιχθεί σε πολύ μεγάλο βαθμό. Όμως απέχουν ακόμα πολύ από το να αντικαταστήσουν τις αντίστοιχες πετροχημικές, σε ποσοστό που θα μπορούσε να επηρεάσει την εξέλιξη της Κλιματικής Αλλαγής. Οι προσπάθειες όμως είναι συνεχείς και η διαφορά οικονομικότητας διαρκώς ελαττώνεται. Είναι όμως αβέβαιο ότι αυτή θα μηδενιστεί σε ένα σύντομο χρονικό διάστημα ώστε να αποτραπεί η συνεχιζόμενη υποβάθμιση του περιβάλλοντος. Η μετάβαση σε μια βιώσιμη, κυκλική και περιβαλλοντικά φιλική οικονομία ίσως απαιτήσει δραστικότερες πολιτικές και αλλαγές νοοτροπίας. Θα πρέπει να γίνει αντιληπτό στο ευρύ κοινό πως η κλιματική αλλαγή απειλεί την επιβίωση του ανθρώπινου είδους και πως δεν υπάρχει «χρόνος» να περιμένουμε μέχρι οι περιβαλλοντικά φιλικές τεχνολογίες να καταστούν φθηνότερες από τις αντίστοιχες ρυπογόνες. Η αντιμετώπισή της ΚΑ θα απαιτήσει ουσιαστικό «ξεβόλεμα», το οποίο θα μεταφραστεί σε μείωση της κατανάλωσης ενέργειας και πρώτων υλών ανά άτομο, και απαλλαγή από ρυπογόνες συνήθειες του παρελθόντος. Ενδεχόμενα να απαιτηθεί και αλλαγή οικονομικού μοντέλου με αναζήτηση μορφών ελεύθερης αγοράς που δε θα βασίζονται στον καταναλωτισμό και τη συνεχή ανάπτυξη (growth). Όλα αυτά ενέχουν πολύ σημαντικά κόστη που θα πρέπει να επιμεριστούν δίκαια σε κάθε κοινωνική ομάδα.

ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ 3 Omics-Ομική και ο ρόλος τους στην υγεία

Συντονίστρια

Παναγούλα Κόλλια,

Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

Ολιστικές προσεγγίσεις για την καταπολέμηση του άγχους και του στρες

Μιχαέλα Φίλιου

Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων & Τμήμα Βιοιατρικών Ερευνών, Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας

Το ψυχολογικό στρες και οι διαταραχές άγχους αποτελούν ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα των σύγχρονων κοινωνιών. Η ανάπτυξη αποτελεσματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων είναι απαραίτητη για τη βελτίωση της ποιότητας ζωής τόσο των ανθρώπων που υποφέρουν από σχετικές παθολογίες όσο και των οικογένειών τους. Εδώ, θα εστιάσουμε στο πώς μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε σύγχρονες μεθοδολογικές προσεγγίσεις -omics, όπως η πρωτεομική και η μεταβολομική, για να διερευνήσουμε εμπλεκόμενους μοριακούς μηχανισμούς και φαρμακολογικούς στόχους σε ασθένειες των οποίων η μοριακή βάση δεν είναι πλήρως κατανοητή. Στη συνέχεια θα συζητήσουμε πώς αυτά τα μεθοδολογικά εργαλεία μπορούν να μας βοηθήσουν στην ανακάλυψη νέων θεραπευτικών στόχων για την καταπολέμηση διαταραχών σχετικών με το άγχος και το στρες.

Σηματοδοτικά Μονοπάτια και Γενετικά Προγράμματα που Ελέγχουν το Πεπρωμένο των Νευρικών Βλαστικών Κυττάρων

Μιχαηλίδης Θεολόγος

Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Γενετικής, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων και Τμήμα Βιοιατρικών Ερευνών, Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας

Στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου τα νευρικά βλαστικά κύτταρα παράγουν νέους νευρώνες σε όλη την ενήλικη ζωή. Τα περιβαλλοντικά σήματα που ελέγχουν τη νευρογένεση μεταφράζονται σε μια ιεραρχημένη ακολουθία προγραμμάτων γονιδιακής έκφρασης εξειδικευμένων για κάθε στάδιο, τα οποία ενορχηστρώνουν την ομαλή ανάπτυξη του βλαστικού κυττάρου σε ώριμο νευρώνα. Τα γονίδια της οικογένειας SoxC αποτελούν ισχυρούς ρυθμιστές της ανάπτυξης του νευρικού συστήματος και παίζουν σημαντικό ρόλο στην πορεία της νευρογένεσης στον ενήλικο ιππόκαμπο. Ο bHLH μεταγραφικός παράγοντας Ngn2 ελέγχει την έκφραση γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τη σωστή πορεία και ολοκλήρωση της νευρικής διαφοροποίησης και συμβάλλει καθοριστικά στον σχηματισμό της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου. Μέλη της οικογένειας SoxC αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη Ngn2 και ενισχύουν σημαντικά την ικανότητά της να επαναπρογραμματίζει αστροκύτταρα σε νευρώνες. Θα συζητήσουμε ενδείξεις για την παρουσία ενός μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης μεταξύ της Ngn2 και της HuD, μιας πρωτεΐνης με ιδιότητες πρόσδεσης στο RNA, η οποία έχει την ικανότητα να επηρεάζει τη μετάφραση των mRNA-στόχων της. Παρατηρήσαμε ότι η αλληλεπίδραση των μεταγραφικών παραγόντων Ngn2 και Sox11 επηρεάζει την έκφραση της HuD και μπορεί να συντονίζει τη ρύθμιση της έκφρασης και άλλων γονιδίων-στόχων τους. Επιχειρήσαμε επίσης να αναλύσουμε το σύνολο των γονιδίων που μεταγράφονται (RNAseq), σε διακριτά στάδια της νευρικής διαφοροποίησης στα οποία το πρότυπο έκφρασης της Ngn2 μεταβάλλεται με καθορισμένο τρόπο. Η ανάλυση έδειξε ότι αρκετές κύριες κατηγορίες GO ήταν σημαντικά εμπλουτισμένες σε κάθε επιμέρους στάδιο, αποκαλύπτοντας μια συντονισμένη ρύθμιση της έκφρασης συγκεκριμένων ομάδων γονιδίων στην πορεία της νευρικής διαφοροποίησης.

*Η ολιστική μεταβολομική ανάλυση στη βιολογία της μετάγγισης αίματος***Αντωνέλου Μαριάννα**

Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας Ζωικού Κυττάρου Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Η χρονική και χωρική αποσύνδεση αιμοδοσίας και μετάγγισης, που εξυπηρετεί λόγους διαχείρισης, ελέγχου ποιότητας και ασφάλειας της θεραπείας, προϋποθέτει επεξεργασία και αποθήκευση του αίματος και των παραγώγων του σε κατάλληλες συνθήκες. Οι σημερινές πρακτικές αποθήκευσης είναι οι καλύτερες που είχαμε ποτέ όμως δεν είναι τέλειες. Στην κρίσιμη μεσοπερίοδο από την αιμοδοσία μέχρι τη μετάγγιση τα ερυθροκύτταρα υφίστανται μια καλά χαρακτηρισμένη υποβάθμιση της δομικής και λειτουργικής τους επάρκειας η οποία απορρέει κυρίως από βλάβες στο ενεργειακό και οξειδοαναγωγικό τους δυναμικό. Αυτή η υποβάθμιση σε συνδυασμό με τη συσσώρευση εξοκυττάρων βιοδραστικών συστατικών (τροποποιητές βιολογικής απόκρισης) στις μονάδες μετάγγισης αποδίδεται με τον όρο Αποθηκευτική Βλάβη Ερυθροκυττάρου και ενδέχεται να σχετίζεται με μειωμένο θεραπευτικό αποτέλεσμα και δυσμενείς κλινικές συνέπειες στο δέκτη της μετάγγισης. Η δυναμική της γενικής ή στοχευμένης ολιστικής μεταβολομικής ανάλυσης (metabolomics), η οποία σε σημαντικό βαθμό συνιστά μετεξέλιξη της κλασσικής βιοχημείας, έγκειται στην υψηλή αναλυτική ικανότητα, ευαισθησία και ειδικότητα ταυτοποίησης πολλών μικρών (<1Kd), τυπικά υδατοδιαλυτών βιομορίων που είναι ενδιάμεσα ή παράγωγα του υπερδραστήριου κυτταρικού μεταβολισμού, σε ελάχιστο χρόνο και όγκο δείγματος. Η συμβολή της στη μελέτη της Αποθηκευτικής Βλάβης αρχικά υποτιμήθηκε ως παροχή «κυμάτων» περιγραφικών βιοχημικών δεδομένων, ελάχιστα αξιοποιήσιμων στην έρευνα και -πολύ περισσότερο- στην κλινική πράξη. Αυτή η θεώρηση γρήγορα ανατράπηκε καθώς οι μεταβολομικές αναλύσεις οδήγησαν σε καλύτερο χαρακτηρισμό του φαινομένου και των ποικίλων παραμέτρων του σε μοριακό επίπεδο και φώτισαν σκοτεινές περιοχές όπως τη σημαντική επίδραση των διαφορετικών στρατηγικών επεξεργασίας/αποθήκευσης και της βιολογικής ετερογένειας των αιμοδοτών στην αποθηκευτική ικανότητα και στην απόδοση της μετάγγισης. Μεγάλης κλίμακας πολυκεντρικές κλινικο-εργαστηριακές μελέτες όπως η REDS-III που οργανώθηκαν μετά το 2015 στοχεύουν στην ολιστική αποτίμηση της Αποθηκευτικής Βλάβης και στην ανεύρεση μηχανιστικών σχέσεων μεταξύ βιολογικών και κλινικών παραγόντων του αιμοδότη και του δέκτη, βασιζόμενες στη συλλογή και ανάλυση μεταβολομικών και άλλων ολιστικών δεδομένων. Αυτή και άλλες συναφείς μελέτες αναμένεται να συμβάλουν στην επικαιροποίηση των κριτηρίων ποιότητας και αποτελεσματικότητας της μετάγγισης (καθώς τα τρέχοντα κριτήρια κρίνονται αναγκαία αλλά όχι επαρκή) και στο σχεδιασμό και αξιολόγηση νέων στρατηγικών επεξεργασίας αίματος και αποθήκευσης. Η αναλυτική σε έκταση και βάθος αξιολόγηση ολιστικών αποτυπωμάτων ως προς την αποθηκευτική ικανότητα και την κλινική έκβαση κάθε γεγονότος μετάγγισης μπορεί να οδηγήσει στην ταυτοποίηση μιας μικρής ομάδας βιοδεικτών ποιότητας, ικανών να χαρακτηρίσουν συστημικές αποκρίσεις και συμπεριφορές. Ο έλεγχος αυτών των βιοδεικτών ενδέχεται να εισάγει τη δυναμική των πολύπλοκων τεχνολογιών omics από το ερευνητικό πεδίο στην καθημερινή πράξη της αιμοδοσίας και της μετάγγισης, σε μία περισσότερο εξατομικευμένη κατεύθυνση.

ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ 4 Αγωγή Υγείας, Σεξουαλική Αγωγή και Βιολογία

Συντονίστρια

Μαυρικάκη Ευαγγελία,

*Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας και Αγωγής Υγείας, Παιδαγωγικό Τμήμα Δημοτικής Εκπαίδευσης
Ε.Κ.Π.Α.*

*Και όμως γίνεται!!! Η εμπειρία από την εφαρμογή της σεξουαλικής αγωγής στην Γ Γυμνασίου στο
Πειραματικό Γυμνάσιο Ρεθύμνης του Πανεπιστημίου Κρήτης*

Αναγνωστάκης Μανώλης

Εκπαιδευτικός ΔΕ Βιολόγος Πειραματικό Γυμνάσιο Ρεθύμνης Πανεπιστημίου Κρήτης

Γερούκη Μαργαρίτα

*Εκπαιδευτικός ΠΕ πρώην Σχολική Σύμβουλος, Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Πανεπιστήμιο της
Jyväskylä*

Η παρούσα ανακοίνωση αφορά το σχεδιασμό και εφαρμογή ενός ετήσιου πιλοτικού προγράμματος Σεξουαλικής Αγωγής και Διαπροσωπικών Σχέσεων για την Γ' Γυμνασίου. Η σεξουαλική αγωγή και η αγωγή των διαπροσωπικών σχέσεων προσεγγίζονται, συνήθως, ως τμήμα ενός ευρύτερου συνόλου παρεμβάσεων στο πλαίσιο της Αγωγής Υγείας. Ως σεξουαλική αγωγή ορίζουμε τη μακροχρόνια, διαβίου διαδικασία προβληματισμού, κατάκτησης πληροφοριών και διαμόρφωσης συμπεριφορών, πεποιθήσεων και αξιών γύρω από την ταυτότητα του φύλου, τις σχέσεις και την οικειότητα. Αφορά σε θέματα σεξουαλικής ανάπτυξης, αναπαραγωγικής υγείας, διαπροσωπικών σχέσεων και οικειότητας, ενώ επίσης, πραγματεύεται θέματα αυτό-αντίληψης και εικόνας του σώματος, καθώς και θέματα που αφορούν τους ρόλους των φύλων (WHO Regional Office for Europe 2010). Ο σχεδιασμός του προγράμματος στηρίχθηκε στο *International Guidelines on Sexuality Education* έκδοση της UNESCO, για την ηλικιακή ομάδα 12-15 και στη διερεύνηση αναγκών των μαθητών/τριων μέσα από ανώνυμες ερωτήσεις. Η θεματολογία και οι μαθησιακοί στόχοι καλύπτουν τέσσερις διαστάσεις της μαθησιακής διαδικασίας:

- 1. Γνώσεις – πληροφόρηση:** ακριβής πληροφόρηση για την ανθρώπινη σεξουαλικότητα, συμπεριλαμβανομένων: ανάπτυξη, σεξουαλική ανατομία και φυσιολογία, αναπαραγωγή, αντισύλληψη, κύηση, τεκνοποιία, HIV/ AIDS, ΣΜΝ, οικογενειακή ζωή και διαπροσωπικές σχέσεις, σεξουαλικότητα και κουλτούρα, δικαιώματα του φύλου, ενδυνάμωση, ισότητα και ρόλοι των φύλων, σεξουαλική συμπεριφορά, σεξουαλική ποικιλομορφία, σεξουαλική απόλαυση, σεξουαλική κακοποίηση, έμφυλη βία και επιβλαβής παραδοσιακές πρακτικές.
- 2. Αξίες, στάσεις και κοινωνικά πρότυπα:** η σεξουαλική αγωγή προσφέρει στους μαθητές και μαθήτριες ευκαιρίες να διερευνήσουν αξίες, στάσεις και πρότυπα (προσωπικά, οικογενειακά, ομότιμων και της κοινότητας) σε σχέση με τη σεξουαλική συμπεριφορά, την υγεία, την ανάληψη ρίσκου και αποφάσεων και αντιστοιχία με τις αρχές της ανοχής, του σεβασμού, της ισότητας και των δικαιωμάτων των φύλων.
- 3. Διαπροσωπικές και κοινωνικές δεξιότητες:** η σεξουαλική αγωγή προωθεί την κατάκτηση δεξιοτήτων σε σχέση με τη λήψη αποφάσεων, αυτοπεποίθηση, επικοινωνία, διαπραγμάτευση και άρνηση. Τέτοιες δεξιότητες είναι δυνατό να συμβάλλουν σε πιο πλήρεις σχέσεις στην οικογένεια, τους ομότιμους, τους φίλους και τους ρομαντικούς ή ερωτικούς συντρόφους.
- 4. Υπευθυνότητα:** η σεξουαλική αγωγή ενθαρρύνει τους μαθητές και τις μαθήτριες να αναλαμβάνουν την ευθύνη της προσωπικής τους συμπεριφοράς καθώς και της συμπεριφοράς τους απέναντι σε άλλους ανθρώπους μέσω στρατηγικών όπως: ο σεβασμός, η αυτοπεποίθηση, η ανοχή και η ενσυναίσθηση για τους άλλους ανεξάρτητα από τη κατάσταση της υγείας τους, το σεξουαλικό τους προσανατολισμό, δίνοντας έμφαση στην ισότητα των φύλων, με στόχο την αντίσταση απέναντι σε πρώιμες, ανεπιθύμητες ή εκβιαστικές σεξουαλικές σχέσεις και εφαρμόζοντας τεχνικές ασφαλούς σεξ, συμπεριλαμβανομένων τη σωστή και συστηματική χρήση προφυλακτικών και αντισυλληπτικών μέσων.

Οι διδακτικές προσεγγίσεις σχεδιάστηκαν ώστε να αξιοποιείται η ομαδοσυνεργατική, διερευνητική μάθηση και διδασκαλία. Όπως έδειξαν τόσο οι εργασίες των μαθητριών/των κατά τη διάρκεια του προγράμματος, όσο και συνεντεύξεις που πραγματοποιήθηκαν με την ολοκλήρωσή του, το πρόγραμμα υπήρξε σημαντική πηγή επιστημονικής πληροφόρησης, ενίσχυσε την κριτική σκέψη και δημιούργησε ευκαιρίες ουσιαστικότερης επικοινωνίας για τα θέματα σεξουαλικής υγείας στους μαθητές και τις μαθήτριες.

Σεξουαλική αγωγή στο σχολείο: από ποιον, για ποιον και γιατί; Μια κριτική προσέγγιση

Πελέκης Απόστολος

Κλινικός Ψυχολόγος, MSc

Η σεξουαλική αγωγή, με τη στενή σημασία μιας εκπαιδευτικής διαδικασίας στον χώρο του σχολείου, αποτελεί πεδίο συνάντησης τριών εξαιρετικά σύνθετων εννοιών: της παιδικότητας, της σεξουαλικότητας και της παιδαγωγικής. Καθεμία από αυτές τις έννοιες έχει τη δική της νοηματική εξέλιξη, η οποία αντανακλά τις εκάστοτε ιστορικές και κοινωνικές συνθήκες. Οι επιδιώξεις και οι μεθοδολογικές προσεγγίσεις της σύγχρονης σεξουαλικής αγωγής κατ' ανάγκη εκφράζουν τις σημασίες που σήμερα αποδίδουμε στην παιδική ηλικία, στη σεξουαλικότητα και στην παιδαγωγική πράξη. Ένα σύνθημα που διατρέχει πολλά προγράμματα σεξουαλικής αγωγής είναι αυτό της προστασίας των παιδιών από κινδύνους για τη σωματική και ψυχική τους υγεία που σχετίζονται με τη σεξουαλικότητα. Η επιδίωξη της προστασίας προκύπτει από τη (σχετικά πρόσφατη στην ιστορία) κοινωνική κατασκευή της παιδικής ηλικίας ως εποχής της αθωότητας και της ευαλωτότητας, η οποία περισσότερο υποδηλώνει τους φόβους και τις ελπίδες των ενηλίκων παρά αντιστοιχεί στην εμπειρία των ίδιων των παιδιών και, κατά συνέπεια, εξυπηρετεί πρωτίστως τον έλεγχο παρά την αυτενέργεια των τελευταίων. Η σεξουαλική αγωγή μπορεί να προάγει την ατομική ευτυχία των παιδιών και την κοινωνική δικαιοσύνη, εφόσον όμως θέσει ουσιαστικά στο επίκεντρο το ίδιο το παιδί, ως ισότιμο και αυτενεργό μέλος της κοινωνίας.

ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ 5 Εθνικό Δίκτυο Ιατρικής Ακριβείας στην Ογκολογία

Συντονίστρια

Ρίζου Ελένη

Τμήμα Γενετικής ΑΟΝΑ “Ο Άγιος Σάββας”, μέλος Δ.Σ. Π.Ε.Β.

Συμμετείχαν

Το θεσμικό πλαίσιο και τις προοπτικές του Δικτύου

κ. Αθανάσιος Κυριαζής

Γενικός Γραμματέας Έρευνας και Τεχνολογίας

Δίκτυο Ιατρικής Ακριβείας στην ογκολογία σκοπός δημιουργίας προοπτικές

Θάνος Δημήτρης

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

Μεθοδολογικές εξελίξεις και Ιατρική Ακριβείας

Χατζηδημητρίου Αναστασία

Διδάκτωρ Ανοσογενετικής, Ερευνήτρια INEB/ΕΚΕΤΑ

Ο Γενικός Γραμματέας Έρευνας, Καθηγητής Κυριαζής Αθανάσιος χαρακτήρισε το «Εθνικό Δίκτυο Ιατρικής ακριβείας στην Ογκολογία» ως ένα καινοτόμο θεσμό με άμεσο κοινωνικό όφελος. Τόνισε ότι η ΓΓΕΤ στηρίζει και προωθεί τις καινοτόμες δράσεις όπως το Δίκτυο, το οποίο δημιουργήθηκε το 2018 και έκτοτε αναπτύσσεται, χρηματοδοτείται και επεκτείνεται. Διευκρίνισε ότι ήδη υλοποιείται από την Πολιτεία, με πρότυπο το υφιστάμενο Δίκτυο της Ογκολογίας, δημιουργία Δικτύων και για άλλες παθήσεις όπως τα νευρολογικά και καρδιαγγειακά νοσήματα.

Ο Ακαδημαϊκός, Δρ Θάνος Δημήτρης, μέλος της Επιστημονικής Επιτροπής του Δικτύου παρουσίασε τη διοικητική διάρθρωσή του, τους συμμετέχοντες φορείς και τον τρόπο λειτουργίας του. Προχώρησε σε απολογισμό των μέχρι τώρα δράσεων παραθέτοντας στοιχεία για τις διενεργηθείσες γενετικές αναλύσεις και αναφέρθηκε στη δημιουργία βάσης δεδομένων για καταγραφή των γενετικών αλλαγών που χαρακτηρίζουν τις νεοπλασίες του ελληνικού πληθυσμού. Τόνισε ότι ο τελικός στόχος είναι η αξιοποίηση των πληροφοριών και της αποκτούμενης εμπειρίας στην προαγωγή της Έρευνας του Καρκίνου και κυρίως στη «στοχεύουσα θεραπεία», δηλαδή στην επιλογή των βέλτιστων φαρμάκων, ανάλογα με τα γενετικά ευρήματα, για την αντιμετώπιση του ογκολογικού ασθενή.

Η συνεδρία συνεχίστηκε με την εισήγηση της Ερευνήτριας Δρ Χατζηδημητρίου, υπεύθυνης της Τεχνικής επιτροπής του Δικτύου, η οποία επικεντρώθηκε στις μεθοδολογικές προσεγγίσεις με τις οποίες διενεργείται η γενετική ανάλυση. Πρόσθεσε ότι σύγχρονες μεθοδολογίες όπως η «αλληλούχηση νέας γενιάς» (NGS) έχουν ενσωματωθεί στην κλινική μοριακή διαγνωστική και μαζί με την ανάπτυξη εξειδικευμένων υπολογιστικών εργαλείων για την ανάλυση των βιοδεδομένων μεγάλης κλίμακας, επιτρέπουν τον ακριβή γενετικό χαρακτηρισμό των νεοπλασιών. Τόνισε ότι οι υψηλού επιπέδου υπηρεσίες του Δικτύου και οι διενεργούμενες για τον ασθενή εξετάσεις παρέχονται σύμφωνα με τις εθνικές και διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες και συστάσεις.

Ενισχύθηκε η διαπίστωση ότι οι Βιοεπιστήμονες, λόγω των σπουδών και της εμπειρίας τους, παίζουν πρωτεύοντα ρόλο τόσο στις εξετάσεις μοριακής διαγνωστικής όσο και στην ανάλυση και αξιοποίηση της προερχόμενης από αυτές γενετικής πληροφορίας.

Η συζήτηση ολοκληρώθηκε με την ευχή οι υπηρεσίες αυτές να αρχίσουν να παρέχονται σε πιο ευρεία κλίμακα, δηλαδή να ενσωματωθούν στην κλινική ρουτίνα μέσω διασύνδεσης του Δικτύου Ογκολογίας με το Εθνικό Σύστημα Υγείας

ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ 6 Το μέλλον των Προστατευόμενων Περιοχών στην Ελλάδα

Συντονιστής

Παφίλης Παναγιώτης,

Αναπληρωτής Καθηγητής Ζωικής Ποικιλότητας, Τμήμα Βιολογίας ΕΚΠΑ

Το μέλλον των προστατευόμενων περιοχών

Παναγιώτης Δημόπουλος

Καθηγητής Πανεπιστημίου Πατρών, Πρόεδρος Εθνικής Επιτροπής ΦΥΣΗ 2000

Μέχρι πρόσφατα και 20 χρόνια μετά τον 2742/99, σε θεσμικό επίπεδο συνεχίζουν να υπάρχουν προβλήματα όπως: έλλειψη κεντρικού/στρατηγικού συντονισμού στην διακυβέρνηση των Προστατευόμενων Περιοχών (ΠΠ), δυσκολίες και προβλήματα λειτουργίας σχετιζόμενα και με την χρηματοδότηση του συστήματος ΠΠ μέσω των Φορέων Διαχείρισης Προστατευόμενων Περιοχών, μερικώς συμμετοχική διακυβέρνηση μέσω των ΦΔΠΠ, εκκρεμεί η θεσμική κατοχύρωση των περιοχών. Επίσης σε διαχειριστικό επίπεδο, δεν έχουν καθιερωθεί μέχρι σήμερα στόχοι διατήρησης (conservation objectives) σε εθνικό και τοπικό επίπεδο, δεν έχουμε εγκεκριμένα σχέδια διαχείρισης ΠΠ, δεν εφαρμόζονται μέτρα διατήρησης με σκοπό τη διαχείριση (υποχρέωση για όλα τα Κ-Μ για το 2012), δεν έχει ακόμη καθιερωθεί ένα μόνιμο ενιαίο σύστημα παρακολούθησης ειδών και οικοτόπων.

Το 2018, με τον ν. 4519/2018: οι ΦΔΠΠ καλύπτουν όλες τις περιοχές του δικτύου Natura 2000 και αποτελούν το μοναδικό σχήμα διοίκησης και διαχείρισης των προστατευόμενων περιοχών, προβλέπεται ετήσια επιχορήγηση από τον τακτικό προϋπολογισμό, προβλέπεται κεντρική υποστήριξη από το ΥΠΕΝ, τίθεται ένα πλαίσιο αξιολόγησης για το έργο των προστατευόμενων περιοχών. Ωστόσο, και μετά την εφαρμογή του ν. 4519/2018, οι ΦΔΠΠ συνέχιζαν: να βρίσκονται σε μεταβατική φάση λειτουργίας, να παρατηρούνται καθυστερήσεις & ασυνέπεια, να μην επιλύονται τα βασικά επιχειρησιακά προβλήματα και οι αδυναμίες του συστήματος ΠΠ, να μην έχουν επαρκείς κεντρικές κατευθύνσεις.

Λαμβάνοντας υπόψη μας ότι οι έννοιες Εθνικό Σύστημα Προστατευόμενων Περιοχών και Φορείς Διαχείρισης δεν είναι ταυτόσημες έννοιες, όπως μέχρι σήμερα θεωρούνταν (1999-2020), γίνεται σαφές ότι στο Εθνικό Σύστημα Προστατευόμενων Περιοχών θα πρέπει εκτός από τις δομές διαχείρισης των προστατευόμενων περιοχών (ΦΔΠΠ), να είναι ενεργός και αποφασιστικός ο ρόλος των δομών του κράτους (στον σχεδιασμό) των περιφερειακών δομών και των δομών της τοπικής αυτοδιοίκησης (στην εφαρμογή περιβαλλοντικών πολιτικών διαχείρισης).

Αντιλαμβανόμαστε λοιπόν ότι το 2020, αναδεικνύεται η ανάγκη ύπαρξης ενός λειτουργικού, συνεκτικού και αποτελεσματικού Εθνικού Συστήματος Προστατευόμενων Περιοχών με τα εξής χαρακτηριστικά: 1. να είναι συμβατό με τις Εθνικές, Ευρωπαϊκές και Διεθνείς υποχρεώσεις και δεσμεύσεις της χώρας, 2. να έχει στρατηγικά σχεδιασμένους στόχους, χρονικά ορόσημα και να λειτουργεί τόσο με κεντρικό, όσο και με περιφερειακό συντονισμό για τη διαχείριση, την παρακολούθηση και τη φύλαξη των προστατευόμενων περιοχών, όπως και την εντός τους έρευνα, 3. ξεκάθαρη δομή και ένα σαφές πλέγμα διοικητικών σχέσεων και αρμοδιοτήτων όλων των υπηρεσιών και φορέων που απαρτίζουν το Εθνικό αυτό Σύστημα, 4. δυνατότητες και ευελιξίες ώστε να ενσωματώσει όλες τις νέες προσαρμογές και αλλαγές στο μοντέλο διοίκησης και διαχείρισης των προστατευόμενων περιοχών.

Το 2020, με το ν. 4685/2020, το Σύστημα Διακυβέρνησης Προστατευόμενων Περιοχών διαρθρώνεται σε κεντρικό επίπεδο (ΥΠΕΝ = συντονιστής φορέας του Συστήματος Διακυβέρνησης ΠΠ, ΟΦΥΠΕΚΑ (άρθρο 27, συναρμόδια κατά περίπτωση Υπουργεία) και σε περιφερειακό επίπεδο (Μονάδες Διαχείρισης Προστατευόμενων Περιοχών- ΜΔΠΠ, Αποκεντρωμένες Διοικήσεις, Περιφέρειες, Δήμοι) ενώ κατοχυρώνει λειτουργικά την πολυεπίπεδη διακυβέρνηση (Multi-level Governance) για τις

προστατευόμενες περιοχές, αξιοποιώντας τρία σύγχρονα εργαλεία του δημόσιου μάνατζμεντ (public management): τον προγραμματισμό (programming), τη δικτύωση (networking) και την συμβασιοποίηση (contractualisation).

Μετά το ν. 4685/2020 χρειάζεται γρήγορη εφαρμογή των προβλεπόμενων κρίσιμων θεμάτων (λειτουργία ΟΦΥΠΕΚΑ, ολοκλήρωση ενσωμάτωσης των ΜΔΠΠ), ολοκλήρωση των ΕΠΜ/Σχεδίων Διαχείρισης στις ΠΠ, ολοκλήρωση της καθιέρωσης των Εθνικών και Τοπικών Στόχων Διατήρησης για είδη και τύπους οικοτόπων, εξασφάλιση βέλτιστων όρων λειτουργίας των ΜΔΠΠ (χρηματοδότηση, εργαζόμενοι), έναρξη εφαρμογής μέτρων διαχείρισης στις ΠΠ, η καθιέρωση του συστήματος παρακολούθησης ειδών και οικοτόπων για υλοποίηση των δετών υποχρεώσεων της Ελλάδας.

Η συλλογικότητα στη λήψη των αποφάσεων για ένα λειτουργικό, συνεκτικό και αποτελεσματικό Εθνικό Σύστημα Προστατευόμενων Περιοχών θα συμβάλει καθοριστικά στην επιτυχία του εγχειρήματος μέσω του Οργανισμού Φυσικού Περιβάλλοντος και Κλιματικής Αλλαγής (Ο.Φ.Υ.Π.Ε.Κ.Α.). Το μεγάλο ζητούμενο ο συντονισμός της εφαρμογής της πολιτικής για τις προστατευόμενες περιοχές από τον ΟΦΥΠΕΚΑ, αναλαμβάνοντας την επιστημονική και διοικητική υποστήριξη της διακυβέρνησης του εθνικού συστήματος προστατευόμενων περιοχών, και την ενιαία αντιμετώπιση συλλογής και τεκμηρίωσης περιβαλλοντικών δεδομένων μέσω ενός συστήματος μόνιμης επιστημονικής παρακολούθησης και εφαρμογής των σχεδίων διαχείρισης.

Ενσωματώνοντας τον ρόλο των Προστατευόμενων Περιοχών στον αναπτυξιακό σχεδιασμό για την επίτευξη των στόχων βιώσιμης ανάπτυξης

Ιφιγένεια Κάγκαλου

Καθ. Πολυτεχνική Σχ. ΔΠΘ, Πρόεδρος ΦΔ «Κάρλας-Μαυροβουνίου-Κεφαλοβρύσου-Βελεστίνου-Δέλτα Πηνειού», Μέλος της Επιτροπής ΦΥΣΗ 2000.

Η «ατζέντα 2030» για την βιώσιμη ανάπτυξη είναι το «εργαλείο» για την εγκαθίδρυση της βιώσιμης ανάπτυξης σε παγκόσμια κλίμακα καθώς και για την διατήρηση της επόμενης δεκαετία. Η εφαρμογή της «ατζέντας 2030» υλοποιείται μέσω των στόχων βιώσιμης ανάπτυξης (SDGs). Παρά το γεγονός ότι το δίκτυο των Προστατευόμενων Περιοχών (ΠΠ), αποδεδειγμένα, παρέχει πλήθος ωφελειών σε κοινωνικό και οικονομικό επίπεδο μέσω των παρεχόμενων οικοσυστημικών υπηρεσιών, η σύνδεσή τους με τους στόχους βιώσιμης ανάπτυξης δεν είναι σαφής. Επιπλέον ισχύει ότι τα υγιή, εύρυθμα οικοσυστήματα εντός των ΠΠ ενισχύουν την ανθεκτικότητά τους απέναντι σε φυσικούς κινδύνους και αυξάνουν την προσαρμοστικότητά τους σε μεταβολές ακόμη και πέραν των γεωγραφικών ορίων τους. Δεδομένης της αναθεώρησης των «περιβαλλοντικών» SDGs σύμφωνα με τους στόχους της Σύμβασης για τη βιοποικιλότητα για «μετά το 2020» η παρούσα χρονική στιγμή είναι κατάλληλη για την κοινότητα των ΠΠ να επικοινωνήσουν την συμβολή των ΠΠ στην ατζέντα της αειφόρου ανάπτυξης. Η Εθνική στρατηγική για την αειφόρο ανάπτυξη και όπως αυτή επιμερίζεται σε τομειακές πολιτικές οφείλει να συζητήσει τα θεσμικά και τεχνικά εργαλεία, τις προτεραιότητες, τα κριτήρια ενσωμάτωσης του ρόλου των ΠΠ και κυρίως τις μεθόδους ενεργοποίησης των πολιτών.

ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ 7 Διεπιστημονικές ερευνητικές προσεγγίσεις στοχεύοντας στην ενιαία υγεία

Συντονιστές

Σταύρος Ταραβήρας

Καθηγητής, τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Ηλίας Καζάνης

Λέκτορας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών

Από τη ζωική συμπεριφορά στην Ψυχική Υγεία

Σταματάκης Αντώνης

Καθηγητής Βιολογίας- Βιολογίας της Συμπεριφοράς, Τμήμα Νοσηλευτικής, ΕΚΠΑ

Οι πρώιμες εμπειρίες, ιδιαίτερα η σχέση μητέρας-νεογνού, έχουν σημαντικές επιπτώσεις στη συμπεριφορά του ενήλικου οργανισμού: Επηρεάζουν την ανάπτυξη του εγκεφάλου και ως εκ τούτου τη μετέπειτα λειτουργία του, που ελέγχει τη συμπεριφορά του οργανισμού. Ο προμετωπιαίος φλοιός είναι η τελευταία περιοχή του εγκεφάλου που ωριμάζει. Αυτή η καθυστερημένη ωρίμανση τον καθιστά ευάλωτο στις επιδράσεις αρνητικών εμπειριών για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Από επιδημιολογικές μελέτες είναι γνωστό ότι στους ανθρώπους δυσμενείς κοινωνικές πρώιμες εμπειρίες (κακοποίηση, αποστέρηση τροφού-ιδρυματοποίηση, καταθληπτική μητέρα ή μητρική παραμέληση) επηρεάζουν τη δομή και τη λειτουργία του προμετωπιαίου φλοιού. Η μητρική παραμέληση είναι αρκετά συχνότερη από άλλες πιο ακραίες μορφές νεογνικής κακοποίησης και στο Εργαστήριο Βιολογίας-Βιοχημείας του Τμήματος Νοσηλευτικής-ΕΚΠΑ, έχουμε αναπτύξει ένα πειραματικό μοντέλο πρώιμων εμπειριών που προσομοιώνει συνθήκες μητρικής παραμέλησης, όπου η μητέρα είναι παρούσα αλλά μη διαθέσιμη στο νεογνό. Στο μοντέλο αυτό, νεογνά επίμου ψάχνουν τη μητέρα τους σε έναν λαβύρινθο σχήματος T αλλά όταν τη βρουν παρεμποδίζεται η σωματική/απτική αλληλεπίδραση μαζί της («Μητρική Παραμέληση»). Η εμπειρία της «Νεογνικής Παραμέλησης» οδηγεί στην ενήλικη ζωή στην εμφάνιση συμπεριφορικής ακαμψίας (αδυναμία αναπροσαρμογή μιας εκμαθημένης συμπεριφοράς όταν μεταβάλλονται οι περιβαλλοντικές συνθήκες) καθώς και σε αυξημένη επιθετικότητα υπό συνθήκες «κοινωνικής πίεσης». Αυτές οι συμπεριφορικές αλλαγές συνοδεύονται από μεταβολές στη λειτουργία του ντοπαμινεργικού, του σεροτονινεργικού και του γλουταματεργικού συστήματος του προμετωπιαίου φλοιού. Τα δεδομένα μας υποστηρίζουν την άποψη ότι οι δυσμενείς κοινωνικές πρώιμες εμπειρίες μπορούν να οδηγήσουν σε συμπεριφορικές δυσλειτουργίες κατά την ενήλικη ζωή μέσω μεταβολών στη κυτταρική και νευροχημική οργάνωση του εγκεφάλου.

Η Μοριακή Βιολογία στη διάγνωση και την πρόγνωση

Κοσσυβάκης Θάνος

Μοριακός Βιολόγος, Τεχνικός Υπεύθυνος Εθνικού Εργαστηρίου Αναφοράς Γρίπης Νοτίου Ελλάδος, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

Οι λέξεις “μοριακή” και “διάγνωση” εμφανίζονται στη βιβλιογραφία στα μέσα του ‘80 και έκτοτε αναφέρονται με εκθετική αύξηση. Η λέξη “μοριακή” σημαίνει συνήθως DNA ή RNA, αποκλείοντας “αδίκως” πρωτεΐνες, μικρά μόρια, ηλεκτρολύτες και άλλα πολυμερή .

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR - Polymerase Chain Reaction) θεωρείται μία από τις πιο επαναστατικές και σημαντικές επιστημονικές ανακαλύψεις του 20ου αιώνα, η οποία έχει αλλάξει ριζικά την μελέτη του γενετικού υλικού και έχει συμβάλει σημαντικά στην ευρεία εφαρμογή της Μοριακής Βιολογίας στην ιατρική έρευνα και διάγνωση. Οι εφαρμογές της εκτείνονται σε οποιοδήποτε βιολογικό υλικό για την ανίχνευση και τυποποίηση εξωγενούς γενετικού υλικού παθογόνων οργανισμών, κυρίως ιών και μικροβίων, την ανίχνευση της έκφρασης ενδογενούς γενετικού υλικού, που

σχετίζεται με παθολογικές ή μη καταστάσεις και την ανίχνευση γενετικών μεταλλαγών ή πολυμορφισμών ανθρώπινων γονιδίων, που σχετίζονται με την καρκινογένεση ή την κληρονομική προδιάθεση ασθενειών.

Υπό το πρίσμα της πρόληψης, η PCR μπορεί να ανιχνεύσει γονιδιακές μεταλλάξεις ακόμη και σε ένα νεοπλασματικό κύτταρο. Η πρόωπη διάγνωση των καρκίνων μπορεί να γίνει πιο εύκολα, επιφέροντας σημαντικά κοινωνικό-οικονομικά οφέλη.

Οι πρακτικές εφαρμογές δεν περιορίζονται μόνο στον εντοπισμό των προς διερεύνηση παθογόνων (ποιοτικός προσδιορισμός), αλλά επεκτείνονται στην αναγνώριση και ταυτοποίηση συγκεκριμένων στελεχών και υποτύπων ενός παθογόνου (π.χ. τυποποίηση HPV), καθώς και στον ποσοτικό προσδιορισμό συγκεκριμένων παθογόνων στον οργανισμό μας (ποσοτικός προσδιορισμός του ιού της ηπατίτιδας Β και C).

Επιπρόσθετα, η μέθοδος Αλληλούχισης DNA Νέας Γενιάς (Next Generation Sequencing - NGS), αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα άλματα της μοριακής βιολογίας των τελευταίων 20 ετών. Η ανάλυση DNA μέσω NGS αποτελεί την πλέον σύγχρονη τεχνολογία ανάλυσης DNA με τις εφαρμογές της να πληθαίνουν καθημερινά τόσο στην έρευνα όσο και στην παροχή υπηρεσιών υγείας, πρόληψης και έγκαιρης διάγνωσης.

Η μέχρι σήμερα κλασική προσέγγιση για τη διάγνωση όλων των γενετικών νοσημάτων αφορούσε τη στοχευμένη διερεύνηση συγκεκριμένων γονιδίων (1-5), που εκτιμούσαμε ότι είναι δυνατό να σχετίζονται με τον παρατηρούμενο φαινότυπο. Πλέον είναι δυνατή η ταυτόχρονη ανάλυση δεκάδων κι εκατοντάδων γονιδίων (gene panels) που έχουν σχέση με διάφορες κατηγορίες νοσημάτων με γενετική αιτιολογία.

Η νανοτεχνολογία στην υπηρεσία της διαγνωστικής στην Υγεία **Δημητράκης Παναγιώτης**

Κύριος Ερευνητής, Ινστιτούτο Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας ΕΚΕΦΕ “Δημόκριτος”

Η εξέλιξη της Νανοτεχνολογίας τον τελευταίο μισό αιώνα, έχει συμβάλει σημαντικά στην κατασκευή νέων υλικών όσο και στην κατασκευή νέων μέσων παρατήρησης και μεθόδων χαρακτηρισμού των υλικών, τα οποία μας επιτρέπουν να κατανοήσουμε σε βάθος τον γεμάτο ενδιαφέρον κόσμο που υπάρχει σε διαστάσεις μικρότερες από 100nm. Τον Νανόκοσμο.

Όπως συμβαίνει σε όλη την εξέλιξη του Ανθρώπου, η επιστημονική πρόοδος είναι άμεσα συνυφασμένη με την βελτίωση της ποιότητας της ανθρώπινης ζωής. Ειδικότερα, η πρόοδος στις επιστήμες υγείας συνεισφέρει σημαντικά στην ποιότητα ζωής. Η πρόληψη και η έγκαιρη αντιμετώπιση προβλημάτων υγείας έχουν εξέχουσα θέση στην βελτίωση της ποιότητας της διαβίωσής μας.

Στην παρούσα ομιλία, θα κάνουμε μια σύντομη εισαγωγή στην νανοτεχνολογία και θα δείξουμε τους συνδέσμους της με την νανο-βιοεπιστήμες και την νανο-ηλεκτρονική. Στην συνέχεια θα αναφερθούμε σε σύγχρονες διαγνωστικές μεθόδους βασισμένες σε αισθητήρες οι οποίοι χρησιμοποιούν πολυλειτουργικά νανοϋλικά, όπως νανοσωματίδια, νανονήματα ημιαγωγών, προσφέροντας αυξημένη ευαισθησία και παράλληλα στοχευμένη διάγνωση. Το μεγάλο πλεονέκτημα τους είναι η φορητότητα σε βαθμό που πλέον μπορούμε να έχουμε μικροσυστήματα τα οποία όχι μπορούν να παρακολουθούν διαφορετικές παραμέτρους της υγείας του οργανισμού μας αλλά να παίρνουν και αποφάσεις και να μας χορηγούν την κατάλληλη θεραπεία. Τα σύγχρονα αυτά μικροσυστήματα υπάρχουν πλέον με την μορφή αυτοκόλλητων επιθεμάτων.

Παράλληλα, οι σύγχρονες διαγνωστικές μέθοδοι επιτρέπουν την σε βάθος μελέτη του ανθρώπινου εγκεφάλου και την κατανόηση πολλών λειτουργιών του αλλά και παθήσεων του. Στο δεύτερο μέρος της ομιλίας θα αναφέρουμε πειραματικά και θεωρητικά αποτελέσματα των σχετικά με την μελέτη νευρωνικών κυττάρων σε πολύ σύγχρονα υποστρώματα γραφενίου. Επίσης, θα δείξουμε πως μπορούμε να κατασκευάσουμε νανοηλεκτρονικές διατάξεις οι οποίες μιμούνται τις νευρωνικές συνάψεις ώστε να

κατασκευάσουμε υπολογιστικά συστήματα μιμούμενοι τον τρόπο λειτουργίας του εγκεφάλου. Η νέα αυτή κατηγορία ηλεκτρονικών συστημάτων ονομάζονται νευρομορφικά ηλεκτρονικά.

Η ποιότητα των προκλινικών μελετών στη διάρκεια της πανδημίας

Κωστομητσόπουλος Νικόλαος

Ειδικός Λειτουργικός Επιστήμονας Α', Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

Η χρήση ζώων στις προκλινικές μελέτες αποτελεί επιστημονική πρακτική που σκοπό έχει την τεκμηρίωση της χρησιμότητας νέων φαρμακευτικών μορίων, τεχνικών ή ακόμα και ιατρικών συσκευών στην κλινική πράξη. Παράλληλα αποτελεί σημαντική πηγή πληροφόρησης που συμβάλει στο σωστό αλλά και ασφαλή σχεδιασμό και υλοποίηση των κλινικών δοκιμών στον άνθρωπο. Αν και τα τελευταία χρόνια έχει επιτευχθεί σημαντική πρόοδος στη σωστή φροντίδα και τη χρήση των ζώων που χρησιμοποιούνται σε τέτοιες μελέτες, έντονη κριτική ασκείται σχετικά με την ποιότητα των αποτελεσμάτων των προκλινικών μελετών, που εκφράζεται με την αδυναμία επαναληψιμότητας αλλά και την έλλειψη μεταφραστικότητας. Παράγοντες που σχετίζονται και επηρεάζουν την ποιότητα των αποτελεσμάτων αυτών μπορεί να είναι ο κακός σχεδιασμός της μελέτης, ο κακός χειρισμός των ζώων, αλλά και η κακή παρουσίαση των αποτελεσμάτων (Munafò MR et al 2017, Begley CG & Ioannidis JP 2015).

Από τις πρώτες μέρες του 2020 η υφήλιος βιώνει ένα πανδημικό κύμα που οφείλεται στο ιό SARS-COV-2. Από την πρώτη στιγμή της πανδημίας η κοινή γνώμη έστρεψε το βλέμμα στη επιστημονική ερευνητική κοινότητα αποζητώντας απαντήσεις που αφορούσαν τόσο στη θεραπευτική προσέγγιση των νοσούντων όσο και στα μέτρα πρόληψης για τους υγιείς. Κάτω από την πίεση του χρόνου και της κοινής γνώμης για άμεσα αποτελέσματα είναι πολύ πιθανό τα προβλήματα που εμφανίζουν οι προκλινικές μελέτες να ενταθούν ή ακόμα χειρότερα να αγνοηθούν, εις βάρος πάντα της ποιότητας και της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων τους. Ένα άλλο επίσης θέμα που θα πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη, ειδικά στην περίοδο της πανδημίας, είναι η ευκολία με την οποία ανακοινώνονται αποτελέσματα ερευνητικών εργασιών, με τη μορφή προδημοσιεύσεων, χωρίς να έχουν περάσει τη βάση της αξιολόγησης από έγκριτους κριτές περιοδικών. Λόγω της επικαιρότητας τα δημοσιεύματα αυτά μπορούν να διαχυθούν ταχύτατα στον έντυπο και ηλεκτρονικό τύπο καθώς και στα μέσα κοινωνικής δικτύωσης (Guterman & Braunstein 2020). Σκοπός λοιπόν της εν λόγω παρουσίασης είναι να αναδείξει το συγκεκριμένο πρόβλημα αλλά και να παρουσιάσει τα εργαλεία εκείνα που, αυτή τη συγκεκριμένη χρονική περίοδο, είναι διαθέσιμα στη φαρέτρα των επιστημόνων.

Τέτοια εργαλεία είναι καταρχή οι οδηγίες για το πώς σχεδιάζεται μια προκλινική μελέτη (PREPARE Guidelines) (Norecopa, 2020a). Πρόκειται στην ουσία για μια αλληλουχία ενεργειών που απαιτείται να γίνουν πριν από την έναρξη αλλά ακόμα και κατά τη διάρκεια υλοποίησης μιας μελέτης. Η βιβλιογραφική ανασκόπηση, η κάλυψη των νομοθετικών και ηθικών απαιτήσεων, ο σχεδιασμός των πειραμάτων και η επιλογή του κατάλληλου στατιστικού σχήματος, οι υποδομές και το ανθρώπινο δυναμικό, η επιλογή του κατάλληλου ζωικού προτύπου και οι πειραματικές διαδικασίες είναι μερικά από τα σημαντικά θέματα που θα πρέπει να διερευνηθούν πριν την έναρξη των μελετών. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί και η ύπαρξη διαφόρων βάσεων δεδομένων (preclinicaltrials.eu, animalstudyregistry.org) όπου οι ερευνητές μπορούν να μοιραστούν μεθοδολογίες, πρωτόκολλα και υποθέσεις, πριν πραγματοποιήσουν τα πειράματά τους. Η συγκεκριμένη δυνατότητα έχει ξεκινήσει από το 2018 και μέχρι στιγμής έχει προσελκύσει πολλά μέλη από την ακαδημαϊκή κοινότητα (van Naald et al. 2020).

Εκτός από τον σχεδιασμό μιας προκλινικής μελέτης, σημασία έχει και ο τρόπος με τον οποίο αναφέρονται τα αποτελέσματά της. Η πληροφόρηση που θα πρέπει να δίνει μια δημοσίευση θα πρέπει να έχει συγκεκριμένες προδιαγραφές έτσι ώστε να διακολύνει στο μέγιστο δυνατό βαθμό την αξιοποίησή της. Γι' αυτό ακριβώς το λόγο έχουν εκδοθεί και θα πρέπει να εφαρμόζονται σαφείς οδηγίες (ARRIVE Guidelines) (Norecopa, 2020b).

Η προσπάθεια για εφαρμογή της Συνθήκης των 3Rs που αφορά στην αντικατάσταση της χρήσης των ζώων στα πειράματα (Replacement), τη μείωση του χρησιμοποιούμενου αριθμού ζώων (Reduction), καθώς βελτίωση των πειραματικών τεχνικών ώστε τα ζώα να υποφέρουν το λιγότερο δυνατό (Refinement) αποτελεί διαχρονική υποχρέωση του ερευνητικού προσωπικού που ασχολείται με προκλινικές ή άλλου είδους μελέτες με τη χρήση ζώων.

Είναι λοιπόν σαφές ότι, ειδικά σε περιόδους υγειονομικής κρίσης όπου ο χρόνος είναι λιγοστός και η πίεση της κοινότητας για άμεσα αποτελέσματα μεγάλη, οι ερευνητές θα πρέπει να τηρούν με θρησκευτική ευλάβεια όλους εκείνους τους κανόνες και τις αρχές προκειμένου να διασφαλίσουν, χωρίς εκπτώσεις, την ποιότητα της επιτελούμενης έρευνας.

ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ 8 Ανοικτή συζήτηση σε θέματα Ενιαίας Υγείας

Συντονιστής

Βανταράκης Απόστολος

Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πρόεδρος Π.Ε.Β.

Συμμετείχαν

Δερμιτζάκη Εμμανουήλ

Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Γενεύης, Department of Genetic Medicine and Development Director, Health 2030 Genome Center,

Θάνος Δημήτρης

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

Μουστάκας Αριστείδης

Καθηγητής, Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Uppsala University,

Ταβερναράκης Νεκτάριος

Καθηγητής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, Πρόεδρος του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας, Μέλος του Διοικητικού Συμβουλίου του Ευρωπαϊκού Ινστιτούτου Καινοτομίας και Τεχνολογίας

Εγινε ανοικτή συζήτηση σε θέματα που αφορούσαν την Δημόσια Υγεία. Κατά την συνεδρία τοποθετήθηκαν αρχικά με μια σύντομη ομιλία τους οι εισηγητές με τους παρακάτω τίτλους:

Ο κος Εμ. Δερμιτζάκης, «Η σύνδεση έρευνας και συστήματος υγείας στην υπηρεσία της επανάστασης στην ιατρική» που τόνισε τη σημασία της σύνδεσης της έρευνας με το σύστημα υγείας και το ρόλο που θα μπορούσε να έχει. Επίσης πρότεινε τρόπους για την καλύτερη σύνδεση με κυρίως καλύτερη ενημέρωση και εκπαίδευση.

Στη συνέχεια ο κος Δ. Θάνος μίλησε για το ρόλο της Ενιαίας Υγείας στο πλαίσιο ενός νέου παραγωγικού μοντέλου ανάπτυξης της χώρας μας, και ανέλυσε τη σημασία της Ενιαίας υγείας σαν κλάδος και το ρόλο της Μοριακής Βιολογίας στο χώρο αυτό.

Στη συνέχεια ο κος Α. Μουστάκας μίλησε για τους Μηχανισμούς ενδυνάμωσης της βιοεπιστημονικής δραστηριότητας σε τοπικό επίπεδο και το ρόλο που έχουν στη δημιουργία λύσεων μακράς βιωσιμότητας. Ανέφερε παραδείγματα από τη Σουηδία των εφαρμογών της βιοεπιστημονικής δραστηριότητας σε τοπικό επίπεδο και τοπικές επιχειρήσεις.

Τέλος, ο κος Ν. Ταβερναράκης ανέλυσε το ρόλο του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας στην υπηρεσία της σύγχρονης ιατρικής πρακτικής και της αντιμετώπισης της πανδημίας COVID-19 αναλύοντας 2 εφαρμογές ταχείας μοριακής διάγνωσης που έχει αναπτύξει.

Στη συνέχεια κατά την ανοικτή συζήτηση όλοι οι διακεκριμένοι επιστήμονες απάντησαν σε ερωτήματα των συνέδρων, ανέλυσαν το ρόλο της σύγχρονης Μοριακής Βιολογίας και τόνισαν τη σημασία της για το μέλλον και το γενικότερο ρόλο των Βιολογικών Επιστημών.

ΣΤΡΟΓΓΥΛΗ ΤΡΑΠΕΖΑ 9 Το μέλλον της Βιολογίας και των Βιολογικών Τμημάτων

Συντονιστής

Ζαχαρίας Σκούρας

Καθηγητής Γενετικής, Τμήματος Βιολογίας Α.Π.Θ.

Συμμετείχαν

Γαρίνης Γεώργιος

Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Βιολογίας Κρήτης

Γιάγκου Μηνάς

Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Βιολογίας Α.Π.Θ.

Καρπούζας Δημήτριος

Καθηγητής, Πρόεδρος του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Κατσώρης Παναγιώτης

Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Βιολογίας Πάτρας

Μαραγκός Πέτρος

Αναπληρωτής Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών Ιωαννίνων

Παρμακέλης Αριστείδης

Αναπληρωτής Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Βιολογίας Ε.Κ.Π.Α.

Χλίγλια Κατερίνα

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Πρόεδρος Τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής Δ.Π.Θ.

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 Ένωση Βιοεπιστημόνων.

Κλείσιμο της Στρογγυλής Τράπεζας από τον Συντονιστή κ. Ζ. Σκούρα.

Αξιότιμοι Πρόεδροι όλων των Πανεπιστημιακών Τμημάτων των Βιοεπιστημών κα **Χλίγλια**, κ. **Αριστείδη Παρμακέλη**, κ. **Παναγιώτη Κατσώρη**, κ. **Γεώργιε Γαρίνη**, κ. **Μηνά Γιάγκου**, κ. **Πέτρο Μαραγκέ**, κ. **Δημήτριά Καρπούζα** κλείνοντας αυτή την τελευταία αλλά πολύ ουσιαστική Τράπεζα του Συνεδρίου μας θέλω τόσο προσωπικά όσο και εκ μέρους της ΠΕΒ να ευχαριστήσω θερμά για την παρουσία σας, τη συζήτηση, την ουσιαστική συμμετοχή σας και το κύρος που προσδώσατε στο συνέδριό μας μιλώντας για το μέλλον της Βιολογίας, των Πανεπιστημιακών μας Τμημάτων και των Βιοεπιστημόνων που παραδίδουμε στην κοινωνία μας.

Θέλω να ευχαριστήσω θερμά την Πρόεδρο και την Οργανωτική Επιτροπή του Συνεδρίου καθώς και τον Πρόεδρο και ΔΣ της ΠΕΒ για αυτή την εξαιρετική πρωτοβουλία της διοργάνωσης της Τράπεζας.

Κρατώ τη βεβαιότητα, οι βάσεις που τέθηκαν σήμερα να καρποφορήσουν και να αποτελέσουν ένα μόνιμο βήμα επαφής της ΠΕΒ με την πηγή παραγωγής των βιοεπιστημόνων, τα Πανεπιστήμια.

Θέλω να πιστεύω ότι η ΠΕΒ θα ενδυναμώσει με την προσχώριση όλων των βιοεπιστημόνων στην ένωση, ώστε να ισχυροποιηθεί η Βιολογία ως επιστήμη, να διαδίδονται όσο περισσότερο μπορούμε οι έννοιες, οι ερμηνείες των φαινομένων και τα αποτελέσματα των βιοεπιστημών, των επιστημών της ζωής, σε όλα τα μέλη της κοινωνίας, ώστε ο πολίτης μέσα από τον βιολογικό εγγραμματισμό να κατανοεί, να ερμηνεύει και να πράττει για το προσωπικό και το κοινό καλό. Άλλωστε δεν υπάρχει ύπαρξη χωρίς συνύπαρξη.

Η Ενιαία Υγεία είναι ένας χώρος τομής που ενσωματώνει και αναδεικνύει τον ρόλο του Βιοεπιστήμονα στην κοινωνία των ανθρώπων και του πλανήτη ολόκληρου.

Ελπίζω ότι του χρόνου σαν σήμερα, όταν ο ρόλος του Βιοεπιστήμονα στους Τομείς **Εκπαίδευσης, Υγείας, Περιβάλλοντος, Απολυμάνσεων, Εντομοκτονιών, Ιχθυολογίας, Υδάτων, Τροφίμων, Ποτών, Βιοτεχνολογίας, Γενετικών Πόρων, Τροφογενετικής, Φαρμακολογίας, Κοσμετολογίας, Βιοπληροφορικής** θα έχει θεσμοθετεί από την Πολιτεία ώστε να ρυθμισθούν σε πρακτικό επίπεδο οι συνθήκες και οι όροι επαγγελματικής απασχόλησης των Βιοεπιστημόνων στα αντικείμενα αυτά, θέτοντας όμως ως βασική προϋπόθεση ότι θα πληρούνται όλα τα εχέγγυα επιστημονικής κατάρτισης και αξιοπιστίας, προκειμένου να παρασχεθούν στο μέγιστο δυνατό βαθμό ποιοτικές υπηρεσίες στο κοινωνικό σύνολο, που καθίσταται και τελικός αποδέκτης αυτών.

Ενωμένοι όλοι οι Βιοεπιστήμονες, από όποιο μετερίζι και αν μάχονται, να ενώσουν τις δυνάμεις τους για την επίτευξη όλων των παραπάνω ευγενικών, ηθικών, επιστημονικών και κοινωνικών σκοπών για την ευημερία του Πολίτη, σε μια ευνομούμενη Πολιτεία, με ένα δίκαιο σύστημα διαχείρισης προς το συμφέρον όλου του κοινωνικού συνόλου.

ΑΠΟΝΟΜΗ ΒΡΑΒΕΙΟΥ «ΦΩΤΗΣ ΚΑΦΑΤΟΣ» ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΟΥ 12ου 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/Ελληνες ερευνήτριες/ες που δημοσίευσαν κατά τη χρονική περίοδο 2019-2020 (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.

Φέτος, η τελετή απονομής του βραβείου και δύο επαίνων πραγματοποιήθηκε την Κυριακή 29 Νοεμβρίου, κλείνοντας τις εργασίες του 12^{ου} συνεδρίου της ΠΕΒ, σε ανοιχτή διαδικτυακή μετάδοση από το κανάλι της ΠΕΒ στο youtube (https://www.youtube.com/watch?v=PO7_D-Hn190&t=578s).

Την τελετή τίμησε με σύντομο χαιρετισμό η σύζυγος του Φώτη Καφάτου, κυρία Σάρα Καφάτου, καθώς και ο πρόεδρος της ΠΕΒ καθηγητής του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών κύριος Απόστολος Βανταράκης. 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 εξ ημισείας, εφόσον ήταν ισότιμοι πρώτοι συγγραφείς, στους Μαριάνθη Γκιουλμπασάνη και Αλέξανδρο Γαλάρα, για την εργασία τους με τίτλο «The transcription factor BCL-6 controls early development of innate-like T cells» η οποία δημοσιεύθηκε στο Nature Immunology (doi: 10.1038/s41590-020-0737-y).

Έπαινοι δόθηκαν στην Αικατερίνη Χατζηγιάννου για την εργασία με τίτλο «An intrinsic role of IL-33 in Treg cell-mediated tumor immunoevasion» η οποία δημοσιεύθηκε στο Nature Immunology (doi.org/10.1038/s41590-019-0555-2), καθώς και -εξ ημισείας- στους Αναστάσιο Λιάκο και Δημήτριο Κωνσταντόπουλο, για την εργασία τους με τίτλο «Continuous transcription initiation guarantees robust repair of all transcribed genes and regulatory regions» η οποία δημοσιεύθηκε στο Nature Communication (doi.org/10.1038/s41467-020-14566-9).

ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΚΡΙΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟΨΗΦΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟ ΒΡΑΒΕΙΟ ΤΗΣ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΑΣ ΕΝΩΣΗΣ ΒΙΟΕΠΙΣΤΗΜΟΝΩΝ «ΦΩΤΗΣ ΚΑΦΑΤΟΣ»

ΣΥΝΕΔΡΙΑ της 9.11.2020

Σήμερα 9 Νοεμβρίου 2020, ημέρα Δευτέρα, και ώρα 11 π.μ. συνήλθε, μέσω τηλεδιάσκεψης (Zoom), έπειτα από συμφωνία των Μελών της, η Ειδική Επιτροπή Κρίσης, με θέμα Ημερήσιας Διάταξης την:

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟΨΗΦΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟ ΒΡΑΒΕΙΟ ΤΗΣ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΑΣ ΕΝΩΣΗΣ ΒΙΟΕΠΙΣΤΗΜΟΝΩΝ «ΦΩΤΗΣ ΚΑΦΑΤΟΣ»

Στη συνεδρίαση παρίστανται οι κ.κ.:

1.	Νεκτάριος ΤΑΒΕΡΝΑΡΑΚΗΣ	Πρόεδρος Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας(ΙΤΕ), Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης	<i>Πρόεδρος Επιτροπής</i>
2.	Ηλίας ΚΑΖΑΝΗΣ	Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών	<i>Μέλος</i>
3.	Απόστολος ΚΛΙΝΑΚΗΣ	Διευθυντής Ερευνών, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών	<i>Μέλος</i>
4.	Παναγούλα ΚΟΛΛΙΑ	Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ	<i>Μέλος</i>
5.	Χαράλαμπος ΣΑΒΒΑΚΗΣ		<i>Μέλος</i>
6.	Ιωσήφ ΠΑΠΑΜΑΤΘΑΙΑΚΗΣ	Ομότιμος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης, Συνεργαζόμενος Ερευνητής ΙΤΕ	<i>Μέλος</i>

Υπαρχούσης απαρτίας, αρχίζει η εξέταση του θέματος της ημερησίας διατάξεως.

ΥΠΟΨΗΦΙΟΙ

Η Επιτροπή εξέτασε και μελέτησε λεπτομερώς τις 8 Προτάσεις που υπεβλήθησαν.

Υποψήφιοι για το βραβείο είναι οι:

1. **Ραφαέλα ΠΑΝΤΕΛΕΡΗ και Γεώργιος-Ραφαήλ ΣΑΜΑΝΤΣΙΔΗΣ**, έπειτα από πρόταση της Καθηγήτριας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, κας Δέσποινας Αλεξανδράκη.
2. **Σοφία ΔΗΜΟΥ**, έπειτα από πρόταση του Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης & Συνεργαζόμενου Μέλους ΔΕΠ του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του ΙΤΕ, κ. Χρήστου Δελιδάκη.
3. **Μαρία Ελένη ΛΑΛΙΩΤΗ**, έπειτα από πρόταση του Ερευνητή Γ του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, κ. Παναγιώτη Πολίτη.
4. **Αναστάσιος ΛΙΑΚΟΣ και Δημήτρης ΚΩΝΣΤΑΝΤΟΠΟΥΛΟΣ**, έπειτα από πρόταση του Διευθυντή του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας, Δρ. Ιωάννη Ταλιανίδη.
5. **Παναγιώτα ΜΑΥΡΟΕΙΔΗ**, έπειτα από πρόταση του Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Σπυρίδωνος Ευθυμιόπουλου.
6. **Αικατερίνη ΧΑΤΖΗΩΑΝΝΟΥ**, έπειτα από πρόταση του Ερευνητή Α' του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, Δρ. Πασχάλη Σιδερά.
7. **Μαριάνθη ΓΚΙΟΥΛΜΠΑΣΑΝΗ και Αλέξανδρος ΓΑΛΑΡΑΣ**, έπειτα από πρόταση του Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών & Συνεργαζόμενου Καθηγητή του Ερευνητικού Κέντρου Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμιγκ», κ. Γεώργιου Κόλλια.
8. **Στεφανία ΚΑΨΕΤΑΚΗ**, έπειτα από πρόταση του Ομότιμου Καθηγητή Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, κ. Ελευθέριου Ζούρου.

ΑΠΟΦΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΚΡΙΤΩΝ

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 **Γκιουλμπασάνη και τον κ. Γαλαρά**, για το Βραβείο της Πανελλήνιας Ένωσης Βιοεπιστημόνων







«Φώτης Καφάτος». Η επιλογή της κυρίας Γκιουλμπασάνη και του κ. Γαλαρά 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 στην κ. Αικατερίνη Χατζηωάννου και στους Αναστάσιο Λιάκο και Δημήτριο Κωνσταντόπουλο.

Η υποψηφιότητα της κας Στεφανίας ΚΑΨΕΤΑΚΗ κρίθηκε μη αξιολογήσιμη, καθώς το πειραματικό μέρος της εργασίας πραγματοποιήθηκε εκτός Ελλάδας.

Ακολούθως, λύνεται η συνεδρίαση της Επιτροπής.

ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ	ΥΠΟΓΡΑΦΗ
Νεκτάριος ΤΑΒΕΡΝΑΡΑΚΗΣ	 N. Ταβερναράκης
Ηλίας ΚΑΖΑΝΗΣ	
Απόστολος ΚΛΙΝΑΚΗΣ	
Παναγούλα ΚΟΛΛΙΑ	
Χαράλαμπος ΣΑΒΒΑΚΗΣ	
Ιωσήφ ΠΑΠΑΜΑΤΘΑΙΑΚΗΣ	

1973—ΣΗΜΕΡΑ

ΓΙΑ ΤΗΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΗ



**ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΑ
ΕΝΩΣΗ
ΒΙΟΕΠΙΣΤΗΜΟΝΩΝ**

ΔΕΙΤΕ ΤΙΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ
www.pev.gr
ΤΗΣ ΠΕΒ ΣΤΗΝ ΕΣΤΡΑΤΕΙΑ