



Σε αυτό το τεύχος:

Προμετωπίδα

Επιστημονικά θέματα

Επιστημονικές εκδηλώσεις

Περιοδικά για Ζώα
Εργαστηρίου

Αγαπητοί φίλοι και μέλη της Ε.Ε.Β.Ε.Ζ.Ε.,

Ευχόμαστε ολόψυχα το 2020 να είναι ένα έτος γεμάτο υγεία, ευτυχία και δημιουργικότητα.

Την Παρασκευή, 07/02/2020 και ώρα 19.00 θα πραγματοποιηθεί στο Αμφιθέατρο του Εργαστηρίου Έρευνας Παθήσεων Μυοσκελετικού Συστήματος του Νοσοκομείου ΚΑΤ η ετήσια Γενική Συνέλευση, η κοπή της βασιλόπιτας και η ψηφοφορία για την εκλογή των μελών του νέου Διοικητικού Συμβουλίου της Εταιρείας (περίοδος 2020-2022).

Την ίδια ημέρα θα προηγηθεί η ημερίδα με τίτλο «Εισαγωγή στην Έρευνα με Χρήση Ζώων Εργαστηρίου», στον ίδιο χώρο (ώρα 15:30). Η ημερίδα διοργανώνεται από την Ε.Ε.Β.Ε.Ζ.Ε. στον ίδιο χώρο, στα πλαίσια των Επιμορφωτικών Σεμιναρίων για την εφαρμογή της Οδηγίας 2010/63/ΕΕ και του Π.Δ. 56/2013.

Για εγγραφές μπορείτε να επισκεφτείτε της ιστοσελίδα της ΕΕΒΖΕ στη διεύθυνση: <http://hsblas.gr/intro/>.

ΕΕΒΖΕ

Επιμορφωτικά σεμινάρια
για την εφαρμογή της Οδηγίας 2010/63/ΕΕ & του ΠΔ 56/2013

**Εισαγωγή στην Έρευνα με
χρήση Ζώων Εργαστηρίου**

Παρασκευή 7 Φεβρουαρίου 2020, ώρα 15.30
Εργαστήριο Έρευνας Παθήσεων Μυοσκελετικού Συστήματος ΕΚΠΑ,
Νοσοκομείο ΚΑΤ, Κηφισιά

Για όσους από τους αναγνώστες ενδιαφέρονται να γίνουν μέλη της ΕΕΒΖΕ, η εγγραφή είναι δυνατή μετά τη συμπλήρωση της σχετικής αίτησης που υπάρχει στην ιστοσελίδα της ΕΕΒΖΕ, <http://hsblas.gr/>. Είναι απαραίτητη η αποστολή βιογραφικού σημειώματος καθώς και η πρόταση της υποψηφιότητας από δύο μέλη της εταιρείας. Το κόστος εγγραφής είναι 20€ και η ετήσια συνδρομή για το 2019 παραμένει στα 20€.

**ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΕΙΣ ΕΝΔΟΝΕΥΡΩΝΩΝ
ΓΙΑ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΤΟΥ
ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ**

Εισαγωγή

Νέοι νευρώνες γεννιούνται και ενσωματώνονται στο ενήλικο κεντρικό νευρικό σύστημα πολλών ειδών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Ωστόσο, η γέννηση νέων νευρώνων στα ενήλικα θηλαστικά περιορίζεται σε συγκεκριμένες περιοχές, όπως ο ιππόκαμπος και ο οσφρητικός λοβός. Στις περιοχές αυτές, οι νεογέννητοι νευρώνες συμβάλλουν στην τροποποίηση των δικτύων στα οποία συμμετέχουν π.χ. στον ιππόκαμπο κατά τις διαδικασίες της μνήμης και μάθησης, όχι όμως και στην επιδιόρθωση παθολογικών καταστάσεων. Μεταμοσχεύσεις κυττάρων στον εγκέφαλο και άλλες δομές του κεντρικού νευρικού συστήματος νεογνών ή ενήλικων ατόμων (τα οποία, όπως οι πολυδύναμοι ενήλικοι νευρώνες θα μεταναστεύουν, διαφοροποιούνται και ενσωματώνονται στα υπάρχοντα νευρικά δίκτυα), θα συνέβαλαν ουσιαστικά στη θεραπεία ασθενειών και άλλων παθολογικών καταστάσεων του νευρικού συστήματος. Μέχρι πρόσφατα μία τέτοια θεραπευτική προσέγγιση ήταν ουτοπική, εφόσον το ενήλικο κεντρικό νευρικό σύστημα δεν ευνοούσε την επιβίωση των κυτταρικών τύπων που μεταμοσχεύθηκαν. Ωστόσο, οι εμβρυϊκοί ενδονευρώνες του φλοιού, μια ομάδα

νευρώνων του εγκεφάλου, αποτέλεσαν την εξαίρεση στον κανόνα. Εμβρυϊκοί ενδονευρώνες οι οποίοι μεταμοσχεύθηκαν σε διάφορες περιοχές του κεντρικού νευρικού συστήματος, όπως στον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό νεογέννητων αλλά και ενήλικων μυών, διασκορπίστηκαν, επιβίωσαν και ενσωματώθηκαν λειτουργικά στα υπάρχοντα νευρωνικά δίκτυα. Η ανακάλυψη αυτή, σε συνδυασμό με νέες τεχνολογίες όπως η παραγωγή ενδονευρώνων από πολυδύναμα εμβρυϊκά κύτταρα ή ινοβλάστες ανθρώπου, και η δυνατότητα τροποποίησης αυτών, έδωσε νέα ώθηση στην έρευνα που στοχεύει στην εφαρμογή μεταμοσχεύσεων ενδονευρώνων για τη θεραπεία μιας σειράς ασθενειών που σχετίζονται εν μέρει με τη δυσλειτουργία τους, όπως επιληψία, αυτισμός, σχιζοφρένεια, αλλά και για την βελτίωση της αποκατάστασης της εγκεφαλικής λειτουργίας μετά από τραυματισμό.

Λίγα λόγια για τους ενδονευρώνες

Η αντίληψη του περιβάλλοντος μέσω των αισθήσεών μας τροποποιεί συνεχώς τα νευρικά δίκτυα του εγκεφάλου μας για την αποθήκευση νέων πληροφοριών. Ωστόσο, για την ορθή λειτουργία του εγκεφάλου, η συνεχόμενη τροποποίηση της λειτουργίας των νευρικών δικτύων δεν πρέπει να οδηγεί σε αποκλίσεις από το βέλτιστο εύρος νευρικής δραστηριότητας. Αλλαγές στην ισορροπία μεταξύ διέγερσης και καταστολής, των δύο αντίθετων δράσεων των νευρώνων που καθορίζουν το επίπεδο της νευρικής δραστηριότητας του εγκεφάλου,

προκαλούν μια σειρά από νευρολογικές και ψυχιατρικές ασθένειες, όπως επιληψία, σχιζοφρένεια, και αυτισμό. Στον εγκέφαλο, και ειδικά στον εγκεφαλικό φλοιό, στην περιοχή που σχετίζεται με όλες τις ανώτερες εγκεφαλικές λειτουργίες όπως η μνήμη, η μάθηση, η λήψη αποφάσεων κ.α., η ισορροπία μεταξύ διέγερσης και καταστολής ρυθμίζεται μέσω της αντίθετης δράσης δύο ομάδων νευρώνων: των διεγερτικών πυραμιδικών νευρώνων, και των κατασταλτικών ενδονευρώνων του φλοιού. Κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, οι ενδονευρώνες γεννιούνται εκτός του εγκεφαλικού φλοιού, στην κοιλιακή περιοχή του πρόσθιου τμήματος του εγκέφαλου, η οποία ονομάζεται πρόδρομη περιοχή του ραβδωτού, και από εκεί μεταναστεύουν προς τον εγκεφαλικό φλοιό. Από τους νέους αυτούς ενδονευρώνες, μόνο τα 2/3 επιβιώνουν, ενώ διαφοροποιούνται σε παραπάνω από 20 υπο-τύπους, ο κάθε τύπος με ξεχωριστή λειτουργία, που συνδυαστικά σχηματίζουν κατασταλτικά νευρωνικά δίκτυα τα οποία ρυθμίζουν τη λειτουργία των πυραμιδικών νευρώνων του εγκεφαλικού φλοιού. Η σημασία των ενδονευρώνων αντικατοπτρίζεται στο γεγονός ότι ένας σημαντικός αριθμός μεταλλάξεων που σχετίζονται με νευροαναπτυξιακές ασθένειες χαρτογραφούνται σε γονίδια τα οποία είναι σημαντικά για την ανάπτυξη και λειτουργία των ενδονευρώνων. Για παράδειγμα, μεταλλάξεις στο γονίδιο ARX, ένα σημαντικό μεταγραφικό παράγοντα για την παραγωγή ενδονευρώνων, έχουν χαρακτηριστεί σε ασθενείς με σύνδρομο WEST, μια βαριά μορφή επιληψίας. Αντίστοιχα, μεταλλάξεις στο γονίδιο GAD67, ένα ένζυμο που εμπλέκεται στην παραγωγή του νευροδιαβιβαστή γ-αμινο-βουτυρικό

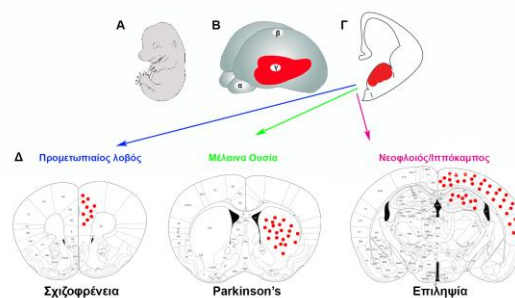
οξύ (GABA), του κύριου νευροδιαβιβαστή των ενδονευρώνων, έχουν συσχετιστεί με μια συγκεκριμένη μορφή σχιζοφρένειας που εμφανίζεται σε παιδιά.

Οι μεταμοσχεύσεις ενδονευρώνων ως θεραπευτική προσέγγιση νευροαναπτυξιακών ασθενειών

Όπως αναφέραμε ήδη, ένας σημαντικός αριθμός νευρολογικών και ψυχιατρικών διαταραχών, όπως επιληψία, αυτισμός, σχιζοφρένεια, αλλά και άλλες παθολογικές καταστάσεις όπως οι νόσοι Alzheimer's, Parkinson's και Huntington's, φαίνεται πως είναι αποτέλεσμα της διαταραχής της ισορροπίας μεταξύ διέγερσης και καταστολής των νευρώνων. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως οι εμβρυϊκοί ενδονευρώνες μπορούν και μεταναστεύουν, επιβιώνουν, διαφοροποιούνται και ενσωματώνονται σε νευρικά δίκτυα όταν μεταμοσχεύονται στο νευρικό σύστημα νεογέννητων ή ενήλικων τρωκτικών. Οι δύο αυτές διαπιστώσεις οδήγησαν στη διερεύνηση της αποτελεσματικότητας των μεταμοσχεύσεων εμβρυϊκών ενδονευρώνων ως στρατηγική αποκατάστασης της καταστολής στα δυσλειτουργικά νευρικά δίκτυα που χαρακτηρίζουν τις παραπάνω ασθένειες. Μέχρι σήμερα δεκάδες πειράματα μεταμοσχεύσεων ενδονευρώνων έχουν πραγματοποιηθεί σε μια σειρά διαγονιδιακών μύν-προτύπων για νόσους όπως: Parkinson's, επιληψία, σχιζοφρένεια, και χρόνια πόνος, με αξιοσημείωτη επιτυχία. Πιο συγκεκριμένα, μεταλλαγμένοι μύες για τον δίαυλο καλίου Kv1.1, αποτελούν πρότυπο για ένα τύπο επιληψίας που χαρακτηρίζεται από σοβαρά επεισόδια σπασμών στους ανθρώπους.

Μεταμοσχεύσεις ενδονευρώνων στον εγκεφαλικό φλοιό Kv1.1 μεταλλαγμένων μυών έδειξαν πως καταστέλλουν κατά 90% τον αριθμό των τυχαίων επιληπτικών γεγονότων. Αντίστοιχα, μεταμοσχεύσεις ενδονευρώνων σε επίμυες στους οποίους έχει πραγματοποιηθεί βλάβη στη Μέλαινα Ουσία με ένεση της χημικής ουσίας, 6-υδροξυ-ντοπαμίνη, και αποτελούν πρότυπο για τα κινητικά προβλήματα που εμφανίζουν ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο του Parkinson's, οδήγησαν σε δραματική βελτίωση της κινητικότητάς τους. Επίσης, η μεταμόσχευση ενδονευρώνων στον προμετωπιαίο λοβό νεογέννητων μυών, μιας περιοχής του εγκεφάλου που εμπλέκεται σε μία πληθώρα γνωστικών λειτουργιών, όπως τον σχεδιασμό και εκτέλεση κινητικών συμπεριφορών τόσο σε τρωκτικά όσο και στον άνθρωπο, προλαμβάνει την εμφάνιση σχιζοφρενικών συμπεριφορών στον ενήλικο μυ μετά την ένεση της χημικής ουσίας φαινκυκλιδίνη (Εικόνα 1). Παρά την επιτυχία των συγκεκριμένων πειραμάτων, ένα κοινό πρόβλημα αποτελεί ο μεγάλος αριθμός ενδονευρώνων που είναι απαραίτητος να μεταμοσχευθεί, εφόσον το ποσοστό επιβίωσης των μεταμοσχευμένων κυττάρων είναι πολύ χαμηλό, της τάξης του 10-20% του αρχικού πληθυσμού. Αξίζει δε να σημειωθεί, πως το ποσοστό επιβίωσης είναι ακόμα μικρότερο όταν στον εγκέφαλο τρωκτικών μεταμοσχεύονται ενδονευρώνες που έχουν διαφοροποιηθεί από ανθρώπινα εμβρυϊκά πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (ES) (5%). Οι παραπάνω διαπιστώσεις κάνουν αναγκαία τη μελέτη των μηχανισμών επιβίωσης των ενδονευρώνων, έτσι ώστε να βελτιστοποιηθούν τα πρωτόκολλα

μεταμοσχεύσεων και να είναι δυνατή η κλινική εφαρμογή τους στον άνθρωπο.



Εικόνα 1: Πειράματα μεταμοσχεύσεων εμβρυϊκών ενδονευρώνων για τη θεραπεία ασθενειών του κεντρικού νευρικού συστήματος.

(Α-Γ) Ανώριμοι εμβρυϊκοί ενδονευρώνες απομονώνονται από την πρόδρομη περιοχή του ραβδωτού (γ, Γ) του εγκεφάλου (Β) εμβρύων τρωκτικών (Α). (Δ) Ακολούθως μεταμοσχεύονται σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου, όπως στον προμετωπιαίο λοβό, στη μέλαινα ουσία, στον νεοφλοιό και τον υπόκαμπο. Ανάλογα με την περιοχή που γίνεται η μεταμόσχευση, οι ενδονευρώνες ενσωματώνονται στα εκεί νευρικά δίκτυα τα οποία και τροποποιούν, βελτιώνοντας τη φυσιολογία διάφορων μυών-προτύπων για ασθένειες του κεντρικού νευρικού συστήματος όπως σχιζοφρένεια, Parkinson's και επιληψία. α, σφηρητικός λοβός, β, φλοιός εγκεφάλου. Τα διαγράμματα των εγκάρσιων τομών εγκεφάλου ενήλικου μυός έχουν τροποποιηθεί από τον άτλαντα "The mouse brain in stereotaxic coordinates" (G. Paxinos, Franklin K.B.J., 2004).

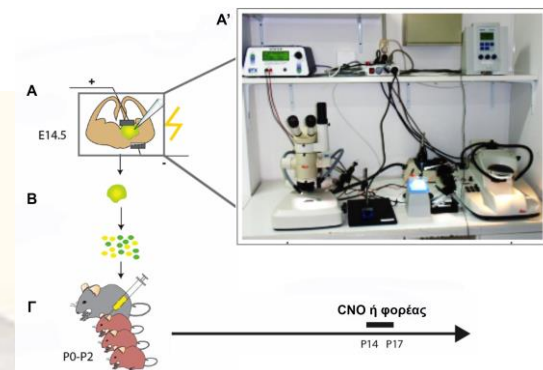
Χημογενετική τροποποίηση της δραστηριότητας των ενδονευρώνων για τη βελτίωση της επιβίωσης τους σε πειράματα μεταμοσχεύσεων

Πρόσφατες μελέτες σε μύες έδειξαν πως αλλαγές στην ενδογενή δραστηριότητα των ενδονευρώνων κατά τις δύο πρώτες εβδομάδες μετά τη γέννηση τους, επηρεάζουν το ποσοστό επιβίωσή τους. Σε μία από τις παραπάνω μελέτες τροποποίησαν γενετικά εμβρυϊκούς

ενδονευρώνες μύες ώστε να αυξηθούν τα επίπεδα της ενδογενούς δραστηριότητάς τους, και διαπίστωσαν πως με τη μέθοδο αυτή αυξάνεται ο αριθμός των ενδονευρώνων που επιβιώνουν όταν αυτοί μεταμοσχεύονται στον εγκέφαλο νεογέννητων μυών. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα επιμόλυνσης με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου εμβρυϊκών ενδονευρώνων της μεσαίας πρόδρομης περιοχής του ραβδωτού με πλασμίδια που φέρουν μεταλλαγμένους υποδοχείς ακετυλοχολίνης (Designer Receptros Exclusively Activated by Designer Drugs; DREADD). Οι συγκεκριμένοι υποδοχείς (DqDREADD) μπορούν να επάγουν την δραστηριότητα των νευρώνων μόνο μετά από πρόσδεση του κατάλληλου μορίου-προσδέτη, στην προκειμένη περίπτωση της χημικής ουσίας Clozapine-N-Oxide (CNO). Πρόδρομοι ενδονευρώνες οι οποίοι εξέφραζαν την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP μαζί με ή χωρίς τον υποδοχέα DqDREADD, ο οποίος έφερε και την κόκκινη φθορίζουσα χρωστική RFP, μεταμοσχεύθηκαν με ενδοκρανιακή ένεση που πραγματοποιήθηκε σε νεογέννητους μύες, ενώ μετά από δύο εβδομάδες πραγματοποιήθηκαν ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις με CNO ή φορέα για τρεις συνεχόμενες ημέρες (Εικόνα 2). Τα πειράματα αυτά έδειξαν μία σημαντική αύξηση του ποσοστού των ενδονευρώνων που εκφράζουν DqDREADD σε σχέση με το συνολικό αριθμό μεταμοσχευμένων κυττάρων που επιβιώνουν σε μύες που έγινε ένεση CNO έναντι των μυών αναφοράς.

Βρισκόμαστε μόνο στην αρχή, ωστόσο, ανάλογες γενετικές τροποποιήσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν και σε ανθρώπινους ενδονευρώνες που

διαφοροποιούνται από εμβρυϊκά (ES) ή επαγόμενα (IPC) πολυδύναμα βλαστοκύτταρα, ανοίγοντας νέες δυνατότητες στην κλινική εφαρμογή μεταμοσχεύσεων ενδονευρώνων για τη θεραπεία ασθενειών του κεντρικού νευρικού συστήματος.



Εικόνα 2: Η πειραματική διαδικασία για την τροποποίηση και μελέτη της λειτουργίας εμβρυϊκών ενδονευρώνων που μεταμοσχεύονται στον εγκέφαλο νεογέννητων μυών.

(A) Πρόδρομοι ενδονευρώνες επιμολύνονται με τα κατάλληλα πλασμίδια μέσω της εφαρμογής ηλεκτρικού πεδίου σε τομές εγκεφάλου εμβρύου μύος, και (B) μετά από 12 ώρες οι τροποποιημένοι ενδονευρώνες απομονώνονται και (Γ) μεταμοσχεύονται στον φλοιό νεογέννητων μυών. Για να τροποποιηθεί η δραστηριότητα των μεταμοσχευμένων ενδονευρώνων, πραγματοποιούνται ενέσεις CNO ή φορέα στους νεαρούς μύες, στην κατάλληλη ηλικία (P14) και για το κατάλληλο χρονικό διάστημα (P14-P17). Α', η εγκατάσταση για την πραγματοποίηση των πειραμάτων επιμόλυνσης τομών εγκεφάλου εμβρύου.

Σχετική Βιβλιογραφία

Denaxa, M. *et al.* **Modulation of Apoptosis Controls Inhibitory Interneuron Number in the Cortex.** *Cell Reports.* doi:10.1016/j.celrep.2018.01.064 (2018).

Lim L, *et al.* **Development and Functional**

Diversification of Cortical Interneurons.
Neuron. doi: 10.1016/j.neuron.2018.10.009.
(2018).

Marin, O. **Interneuron dysfunction in psychiatric disorders.** *Nature Review Neuroscience.* doi:10.1038/nrn3155 (2012).

Southwell, D.G. *et al.* **Interneurons from embryonic development to cell-based therapy.** *Science.*
doi:10.1126/science.1240622 (2014).

Μυρτώ Δεναζά

Βιολόγος, PhD

Συνεργαζόμενη Ερευνήτρια
Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμιγκ»



ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ

**AST
2020**

**ANIMAL SCIENCE &
TECHNOLOGY CONFERENCE**
EDINBURGH 24 - 26 MARCH

Στις 24-26/03/2020 θα πραγματοποιηθεί το **AST 2020 Animal Science and Technology Conference**, στο Εδιμβούργο, Ηνωμένο Βασίλειο. Για περισσότερες πληροφορίες επισκεφθείτε την ιστοσελίδα <https://www.ast2020.org/>.

50
Scand-LAS
Tallinn, ESTONIA
13-15 May 2020

Στις 13-15/05/2020 θα πραγματοποιηθεί το **50th Symposium of Scand-LAS** στο Ταλίν, Εσθονία. Για περισσότερες πληροφορίες χρησιμοποιείστε την ιστοσελίδα:

<https://www.scandlas2020.ee/>.

**ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΠΟΥ ΑΦΟΡΟΥΝ ΣΤΗΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΤΩΝ ΖΩΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ**

Lab Animal Europe (Δωρεάν εγγραφή)

<http://www.labanimaleurope.eu/>

Scandinavian Journal of Laboratory
Animal Science

www.scandlas.org

Comparative Medicine

www.aalas.org

Journal of the American Association of
Laboratory Animal Science

www.aalas.org

Experimental Animals (Journal of the
Japanese Association for Laboratory
Animal Science)

http://www.soc.nii.ac.jp/jalas/english/en_journal.html

Laboratory Animals

<http://la.rsmjournals.com>



Επιμέλεια Σύνταξης:

Βασίλειος Ντάφης

Αναστασία Τσιγκοτζίδου