



Δράση «Εμβληματικές δράσεις σε διαθεματικές επιστημονικές περιοχές με ειδικό ενδιαφέρον για την σύνδεση με τον παραγωγικό ιστό» ID 16618

Εθνικό δίκτυο έρευνας για την ανάδειξη της γενετικής βάσης των νευροεκφυλιστικών νόσων Alzheimer και Parkinson, την ανίχνευση αξιόπιστων βιοδεικτών και την ανάπτυξη καινοτόμων υπολογιστικών τεχνολογιών και θεραπευτικών στρατηγικών στη βάση της ιατρικής ακριβείας (BRAIN PRECISION, TAEDR-0535850)

ΤΙΤΛΟΣ ΠΑΡΑΔΟΤΕΟΥ: Ανάπτυξη τεχνολογίας για μελέτη νευρικών αποκρίσεων σε ζωικά μοντέλα νευροεκφυλισμού

ΕΝΟΤΗΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 4: Ανάπτυξη κυτταρικών και ζωικών μοντέλων, καθώς και νέων βιοδεικτών για τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες Alzheimer και Parkinson

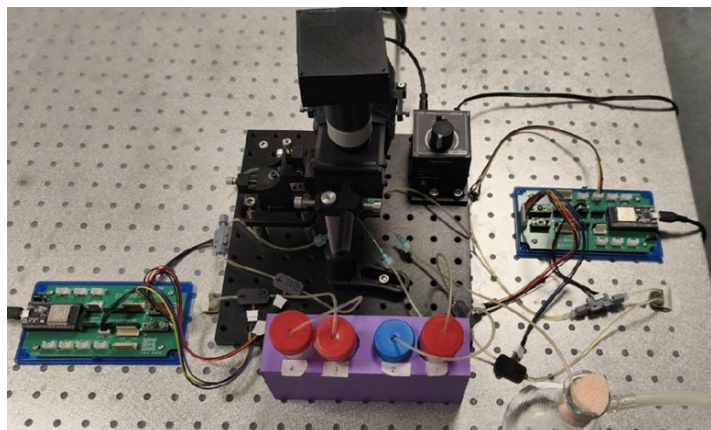
ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ): ΔΑΦΝΗ ΜΠΑΖΟΠΟΥΛΟΥ (ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ)

Ανάπτυξη τεχνολογίας για μελέτη νευρικών αποκρίσεων σε ζωικά μοντέλα νευροεκφυλισμού

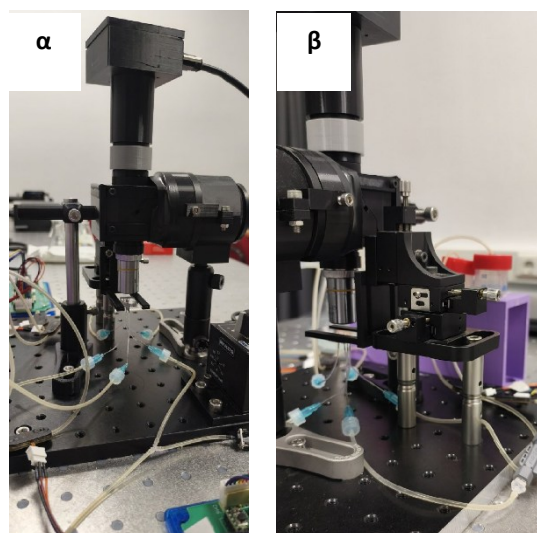
ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Η χρήση αυτοματοποιημένων συστημάτων που βασίζονται στην μικρορευστομηχανική τεχνολογία (microfluidics) μας επέτρεψε στο παρελθόν (Bazoroulou et al., 2017, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09651-x>) 1) την βιοαπεικόνιση νευρικών λειτουργιών και την καταγραφή της φθοράς που επιδεικνύουν κατά τη γήρανση στον οργανισμό – μοντέλο *C. elegans* και 2) την εκπόνηση ποιοτικού ελέγχου φαρμάκων (drug screening) για την ταυτοποίηση παρασκευασμάτων τα οποία να προστατεύουν από τη φθορά αυτή. Οι έρευνες πάνω στη γήρανση και τον νευροεκφυλισμό είναι αλληλένδετες: η ταυτοποίηση φαρμάκων που συντηρούν ένα υγιές νευρικό σύστημα κατά τη γήρανση μπορούν να επιβραδύνουν ή να και να απαλείψουν τον νευροεκφυλισμό.

Στα πλαίσια της εμβληματικής δράσης, κατασκευάσαμε μια αποδοτική και οικονομικά προσιτή μικρορευστομηχανική πλατφόρμα βιοαπεικόνισης για τη μελέτη νευρικών αποκρίσεων σε στελέχη *C. elegans*, μοντέλα της ασθένειας Alzheimer (*C. elegans* AD). Η πλατφόρμα (**Εικόνες 15 & 16**) έχει τη δυνατότητα να ακινητοποιεί μεμονωμένα σκουλήκια *Caenorhabditis elegans* μέσα σε μικρορευστομηχανικό μικροκυκλώμα (chip), να διεγείρει χημειο-ευαίσθητους νευρώνες μέσω ελεγχόμενης ροής διαλυτοποιημένου διεγέρτη, ενώ ταυτόχρονα συλλέγει δεδομένα απεικόνισης από την περιοχή εστίασης, απαιτώντας ελάχιστη χειροκίνητη παρέμβαση. Η πλατφόρμα απαρτίζεται από δύο ανεξάρτητα συστήματα: το ηλεκτρονικό σύστημα άντλησης, υπεύθυνο για την παρουσία ροής στην πλατφόρμα, και το σύστημα μικροσκοπίας, για την παρατήρηση φθοριζόντων στοιχείων σε πραγματικό χρόνο και σε υψηλή ανάλυση. Η λειτουργία του συστήματος άντλησης οφείλεται σε ηλεκτρονική πλακέτα (mp-Multiboard2 Evaluation Board), υπεύθυνη για την ενεργειακή τροφοδότηση, καθώς και την διαχείριση των επιμέρους ηλεκτρονικών μερών. Συνδέεται με τις ηλεκτρονικές μικροαντλίες, αλλά και με τους αισθητήρες πίεσης και ροής. Το χαμηλού κόστους μικροσκόπιο κατασκευάστηκε με συνδυασμό εξαρτημάτων τρισδιάστατης εκτύπωσης και εύκολα διαθέσιμων οπτικών στοιχείων. Χρησιμοποιείται μια πηγή LED που εκπέμπει σε κύριο μήκος κύματος 470 nm για την οπτική διέγερση του δείγματος. Το φως στη συνέχεια περνά μέσα από ένα οπτικό φίλτρο ζώνης (band pass) που περιορίζει το εύρος ζώνης στην επιθυμητή φασματική περιοχή πριν ανακλαστεί από έναν διχρωϊκό καθρέφτη στον αντικειμενικό φακό με αριθμητική διάμετρο 0.25. Ο αντικειμενικός φακός εστιάζει το φως στο δείγμα, συλλέγοντας παράλληλα την ανακλώμενη ή φθορίζουσα ακτινοβολία. Χρησιμοποιείται λογισμικό ανοικτού κώδικα για τον έλεγχο του μικροσκοπίου καθώς και για την εξαγωγή και ανάλυση των δεδομένων.



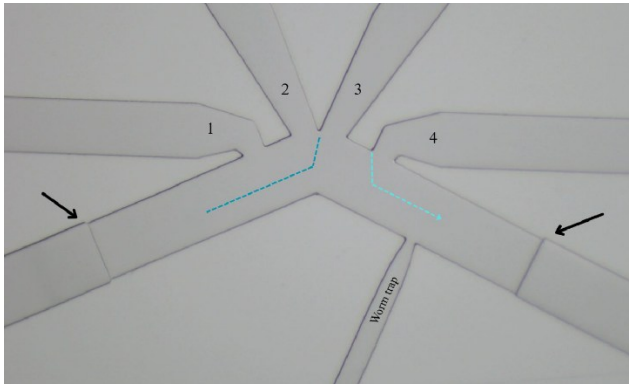
Εικόνα 15. Πλατφόρμα μικρορευστομηχανικής βιοαπεικόνισης. Το υγρό στοιχείο που χρησιμοποιείται για τα πειράματα αντλείται άμεσα από ένα δοχείο, και στη συνέχεια ρέει προς το μικροτσιπ που είναι τοποθετημένο στην ειδική 3D εκτυπωμένη θήκη του μικροσκοπίου. Η απόδοση της μικροαντλίας βασίζεται στην επαναλαμβανόμενη κίνηση διαφράγματος, επομένως, το υγρό ωθείται παλμικά, διαμέσου ελαστικών σωληνίσκων, προς το εσωτερικό του τσιπ. Κάθε αντλία λειτουργεί ανεξάρτητα και ο χρήστης έχει τη δυνατότητα να ρυθμίζει τις απαραίτητες παραμέτρους, όπως το πλάτος και τη συχνότητα των παλμών, μέσω της χρήσης ψηφιακού λογισμικού. Επίσης, το σύστημα περιλαμβάνει έναν αισθητήρα πίεσης και έναν αισθητήρα ροής, οι οποίοι αντλούν πειραματικά δεδομένα για την ασκούμενη πίεση και τον ρυθμό ροής για το εκάστοτε συνδεδεμένο κανάλι του τσιπ, αντίστοιχα. Τέλος, χάρη στη συμβολή της συμπληρωματικής αντλίας κενού, ο όγκος του υγρού που έχει εισχωρήσει στο τσιπ αποβάλλεται από το κανάλι εξόδου του τελευταίου, και καταλήγει σε εξωτερικό γυάλινο δοχείο φιλτραρίσματος. Οι δύο πλακέτες αξιολόγησης διακρίνονται εύκολα στις δύο πλευρές του μικροσκοπίου. Οι αριθμοί 1 και 2 αντιστοιχούν στη μικροαντλία και τον αποσβεστήρα (mp-damper), ενώ οι αριθμοί 3 και 4 αναφέρονται στους αισθητήρες ροής και πίεσης, αντίστοιχα.



Εικόνα 16. Μικροσκόπιο με μικρορευστομηχανικό μικροκυκλώμα (chip) τοποθετημένο στη βάση του. Διακρίνονται επίσης οι συνδέσεις μεταξύ μικροαντλίας και chip καθώς και η κάμερα τύπου CCD (α). Χειροκίνητοι ελεγκτές για την τοποθέτηση της βάσης του chip στη σωστή θέση (β).

Η σχεδίαση του μικροκυκλώματος (chip) (**Εικόνα 17**) είναι ταυτόσημη με αυτή που περιγράφεται από τους Chronis et al. 2007 (<https://doi.org/10.1038/nmeth1075>). Η παγίδα νηματωδών (worm

trap) έχει σχεδιαστεί ειδικά για νεαρούς ενήλικες (1^η ημέρα ενηλικίωσης). Η μορφή της ακραίας περιοχής του καναλιού αντιστοιχεί στις διαστάσεις της κεφαλής και της μύτης του νηματώδους η οποία έρχεται σε επαφή με τον διεγέρτη μέσω ελεγχόμενης ροής. Το εισερχόμενο κανάλι μπορεί να είναι στενότερο κατά σχεδίαση, αλλά επιτρέπει την αναστρέψιμη ακινητοποίηση των σκουληκιών, διατηρώντας μέρος της κινητικότητάς τους. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι εσωτερικές δομές του μικροκυκλώματος (chip) δεν παραμορφώνουν ούτε καταπιέζουν το σώμα του νηματώδους.

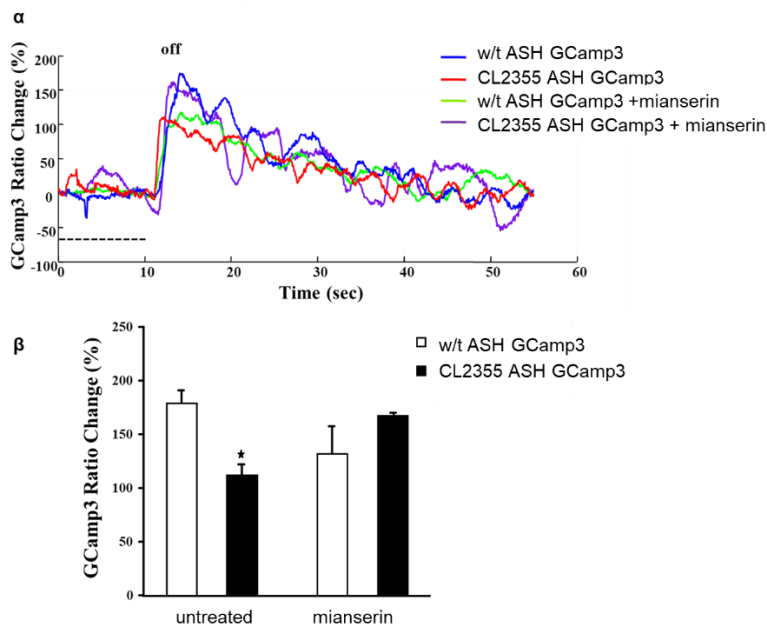


Εικόνα 17. Μικρορευστομηχανικό μικροκυκλώμα (chip). Η διαμόρφωση των καναλιών είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία ενός συγκεκριμένου μοτίβου ροής. Οι μπλε διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν τη διαίρεση του κύριου καναλιού που περιέχει τον διεγέρτη, καθώς και τη ροή του (ελέγχεται ON/OFF) μπροστά από την παγίδα νηματωδών. Σε μικροσκοπική κλίμακα, τα υγρά δεν αναμειγνύονται οπότε όταν τα κανάλια είναι ανοιχτά, οι διαφορετικές ροές σχηματίζουν ξεχωριστές, παράλληλες ροές κατά μήκος του κύριου καναλιού.

Στα πλαίσια της Εμβληματικής δράσης, προτείναμε τη δοκιμή της μικρορευστομηχανικής πλατφόρμας βιοαπεικόνισης στη μελέτη λειτουργίας χημειο-ευαίσθητων νευρώνων του οργανισμού, παρουσία του γενετικού υπόβαθρου νευροεκφυλισμού. Προς αυτήν την κατεύθυνση, στελέχη *C. elegans* που αποτελούν μοντέλα για μελέτες Alzheimer AD (που συνοψίζονται στον Πίνακα 1), κατασκευάστηκαν να συνεκφράζουν τον δείκτη ασβεστίου GCaMP5 στον οσφρητικό νευρώνα AWC ο οποίος σηματοδοτεί την απόκριση σε ελκτικές ουσίες όπως π.χ. η ισοαμλική αλκοόλη (IA). Οι νευρωνικές αποκρίσεις των διαγονιδιακών αυτών στελεχών σε IA εξετάστηκαν κατά τον πιλοτικό έλεγχο του φαρμάκου mianserin. Πρόκειται για ένα αντικαταθλιπτικό φάρμακο, το οποίο στοχεύει τη σηματοδότηση μέσω σεροτονίνης και έχει βρεθεί να παρατείνει τη διάρκεια ζωής του *C. elegans* κατά ~30% μέσω μηχανισμών διατροφικού περιορισμού (Petrascheck et al., 2007, <https://doi.org/10.1038/nature05991>), καθώς και να διατηρεί την κατά τα άλλα φθίνουσα ικανότητα διέγερσης χημειο-ευαίσθητων νευρώνων στον *C. elegans* και τη γήρανση (Bazoroulou et al., 2017, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09651-x>). Κατά τη δοκιμασία διέγερσης του νευρώνα AWC σε στελέχη CL2355, παρατηρήθηκε ότι επανέρχεται η νευρωνική απόκριση στα επίπεδα αγρίου τύπου, έπειτα από 24ωρη επώαση νηματωδών σε 50μM mianserin (Εικ. 18). Να σημειωθεί ότι τα στελέχη LGIII εμφανίζουν μηδενική απόκριση σε IA (δεν καταγράφηκε μεταβολή φθορισμού στον AWC νευρώνα) σε όποια συνθήκη και να εξετάστηκε (διαφορετικές συγκεντρώσεις mianserin και χρόνοι απόκρισης). Η προσέγγιση αυτή θα οδηγήσει στην ανάπτυξη μεθόδων για ποιοτικούς και ευρείας κλίμακας ελέγχους νέων φαρμάκων.

Πίνακας 1. Στελέχη *C. elegans* AD τα οποία κατασκευάστηκαν να συνεκφράζουν GCaMP στον νευρώνα AWC

<i>C. elegans</i> strain	Transgenic expression	Phenotype
LGIII: <i>ynIs12</i> [<i>P_{snb-1}::apl 1 cDNA, lin-15B(+)</i>]	Pan-neuronal	Chemotaxis defects, reduced brood size
CL2355: <i>pCL45</i> [<i>P_{snb-1}::SP::Aβ₁₋₄₂::long 3' UTR</i>]	Pan-neuronal	Defects in chemotaxis, memory, thrashing in liquid



Εικόνα 18. Αντιπροσωπευτικές αποκρίσεις AWC βάσει ποσοστιαίας μεταβολής της GCaMP3. Οι καμπύλες δείχνουν τη διέγερση του AWC κατά την απομάκρυνση (off) της ισοαμλικής αλκοόλης (1:10000) σε γενετικό υπόβαθρο αγρίου τύπου (w/t) ή σε στέλεχος CL2355, έπειτα από 24ωρη έκθεση σε 50μM mianserin. Η διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει τον αρχικό χρόνο χορήγησης ισοαμλικής αλκοόλης (α). Απεικόνιση της μέγιστης ποσοστιαίας μεταβολής της έντασης φθορισμού AWC κατά την απομάκρυνση της ισοαμλικής αλκοόλης (β). Οι νηματώδεις (n=15 για κάθε συνθήκη) κατά την 1^η μέρα ενηλικίωσης εκτέθηκαν σε 5 μl ισοαμλικής αλκοόλης για 1 ώρα πριν από τις καταγραφές. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη μη παραμετρική δοκιμασία Kruskal-Wallis (one-way ANOVA).*, p < 0,05.