



Παρουσίαση πρακτικής άσκησης

Χριστίνα Μούλτου

1111201900058

Εργαστήριο Εξωσωμικής ανάλυσης & Παθολογίας εγκεφάλου - ExoBrain

Η έρευνα του εργαστηρίου επικεντρώνεται:

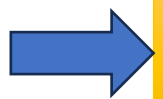
- 1) στην μελέτη των αιτιοπαθολογικών μηχανισμών που συνδέουν το στρες με την ΝΑ και την κατάθλιψη,
- 2) στην δοκιμή νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων (π.χ. αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια- ASOs),
- 3) Στη διερεύνηση της πιθανής χρήσης των εξωσωμάτων ως βιοδείκτες.



ExoBrain

Μεγάλο μέρος των ερευνητικών προσπαθειών του εργαστηρίου επικεντρώνεται στην κυτταρική κατανόηση της δράσης παραγόντων κινδύνου της ΝΑ και της κατάθλιψης, όπως το χρόνιο ψυχολογικό στρες.

(Sotiropoulos et al., 2019; Dioli et al., 2023)



Μελέτες του εργαστηρίου έχουν δείξει ότι το χρόνιο στρες ενεργοποιεί τους παθολογικούς μηχανισμούς της ΝΑ!

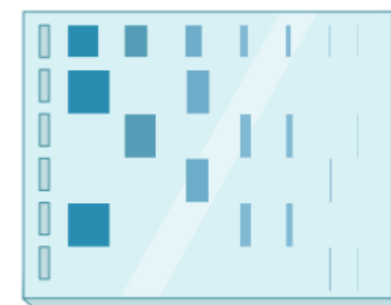
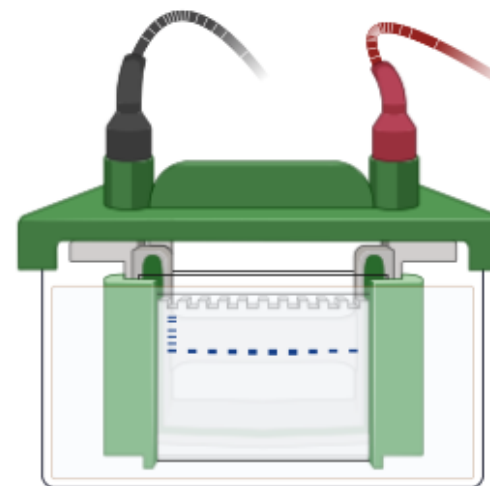
(Monteiro-Fernandes et al., Mol Psych 2022; Sotiropoulos et al., J Neurosci 2011; Lopes et al. PNAS 2016; Vaz-Silva et al., EMBO 2018)

Βασικές τεχνικές που εφαρμόζονται στο εργαστήριο

Κατά τη διάρκεια της πρακτικής μου άσκησης ήρθα σε επαφή και εξοικειώθηκα με βασικές τεχνικές Νευροχημείας και Νευροβιολογίας όπως:

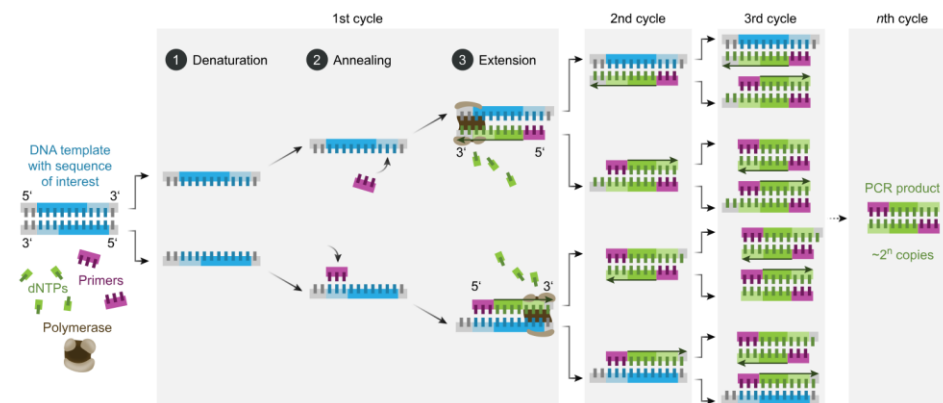
Western blot

- Πρόκειται για μια εξαιρετικά πολύτιμη μέθοδο για τη μοριακή βιολογία και την ανοσολογία. Με εφαρμογή της μπορεί να ταυτοποιηθεί και να ποσοτικοποιηθεί μια συγκεκριμένη ουσία (πρωτεΐνη, DNA, RNA) που συνήθως αποτελεί συστατικό ενός μίγματος.
 - Διεξάγεται σε δύο εργαστηριακές μέρες όπου η 1^η εργαστηριακή μέρα περιλαμβάνει την προετοιμασία των buffers και gels και φόρτωση των δειγμάτων στη συσκευή ηλεκτροφόρησης βάζοντας στη θέση 1 τον protein ladder. Ακολουθεί transfer των πρωτεϊνών σε μεμβράνη.
- Τη 2^η εργαστηριακή μέρα πραγματοποιείται η εμφάνιση και η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών (συνήθως η ποσοτικοποίηση γίνεται βάσει της ιστόνης (που είναι άφθονη στον πυρήνα).



PCR (polymerase chain reaction)

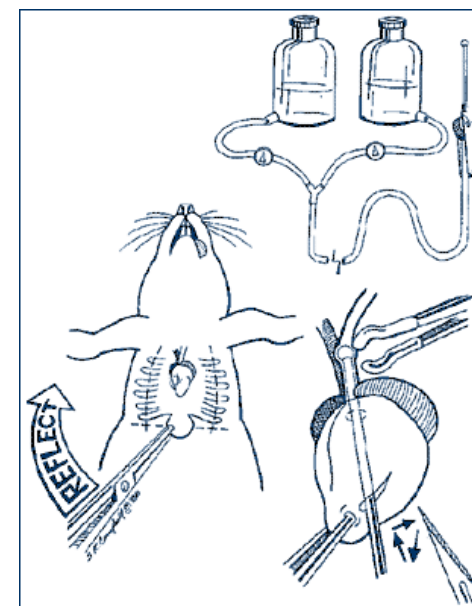
Είναι μία μέθοδος βιοχημείας και μοριακής βιολογίας για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μίας αλληλουχίας DNA, μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA χωρίς τη χρήση ζωντανών μικροοργανισμών, όπως το βακτήριο E.coli ή οι ζύμες. Είναι μία in vitro μέθοδος που μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς περιορισμούς στη μορφή του χρησιμοποιούμενου DNA.



Perfusion method

Το ζώο αναισθητοποιείται πλήρως με τη χορήγηση κεταμίνης-ξυλαζίνης σε αναλογία σύμφωνα με το βάρος του. Η διαδικασία του perfusion ξεκινάει με την κοπή του δέρματος από την κοιλιακή χώρα προς το διάφραγμα ώσπου να αποκαλυφθεί η καρδιά. Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία αποκόπτεται η κεφαλή του ζώου και απομονώνεται ο εγκέφαλος.

Αυτή η τεχνική χρησιμοποιείται για μελέτες ανοσοϊστοχημείας.

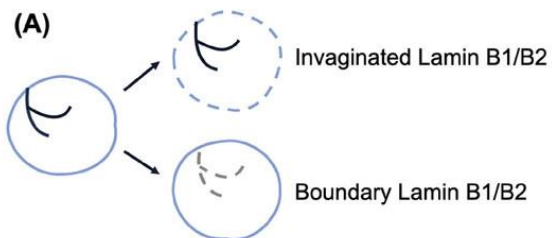


Perfusion Setup Diagram



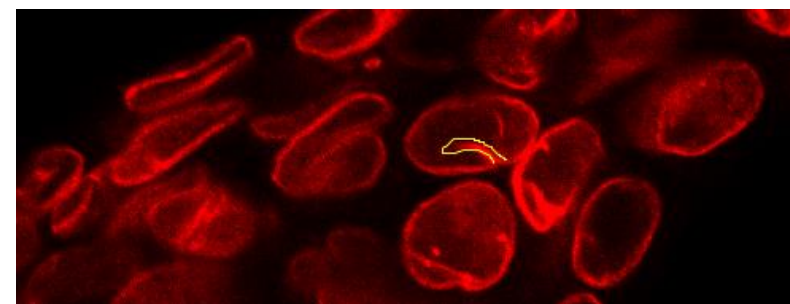
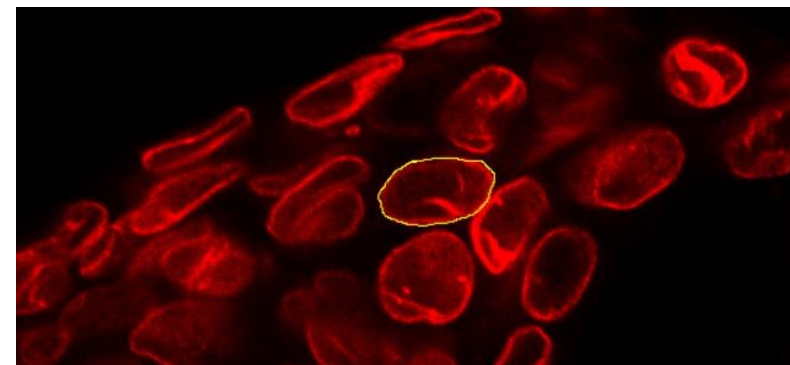
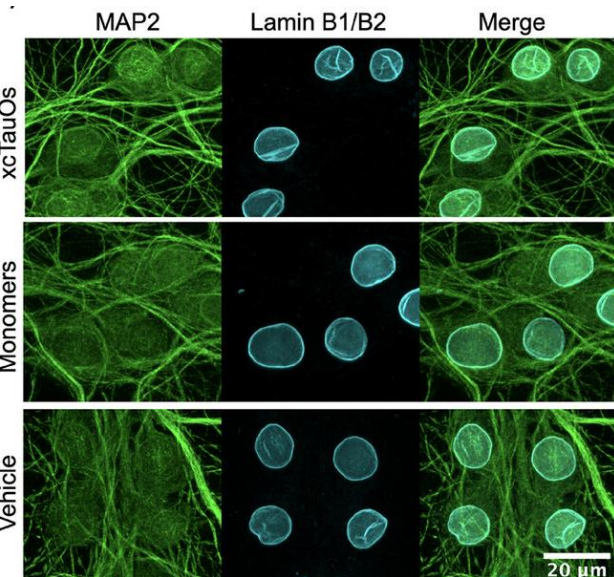
Μέτρηση της εγκόλπωσης (invagination) της LMNB1 σε primary neurons

Cultured Mouse WT Neurons



$$\% \text{ invagination} = \left(\frac{\text{Invaginated Lamin B1}}{\text{Invag.} + \text{Boundary Lamin B1/B2}} \right) \times 100\%$$

values $\geq 10\%$ scored as invaginated nuclei



Με τη βοήθεια του προγράμματος imageJ μετρούνται οι εγκολπώσεις στον πυρήνα βάσει πρωτοκόλλου. Για να θεωρηθεί ένας πυρήνας θετικός σε εγκόλπωση πρέπει το ποσοστό του παραπάνω τύπου να είναι μεγαλύτερο του 30%. Παρατηρείται γενικά αύξηση του ποσοστού των εγκολπώσεων στις stress συγκριτικά με τις control καταστάσεις.

Συμπεριφορική ανάλυση

Για την μελέτη της επίδρασης/αποτελεσματικότητας ενός φαρμάκου ή μιας ουσίας διεξάγονται συμπεριφορικά τεστ (κυρίως σε ποντίκια), μερικά από τα οποία που σκόραρα είναι τα εξής:

CFC

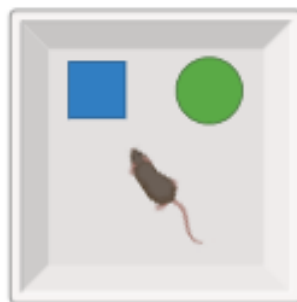
(contextual fear conditioning test)



Μετρά την ικανότητα του ζώου να μαθαίνει και να θυμάται έναν συσχετισμό μεταξύ μιας δυσάρεστης εμπειρίας και των περιβαλλοντικών ενδείξεων. Όλες οι παράμετροι της δοκιμής μετρούνται αυτόματα με σύστημα παρακολούθησης.

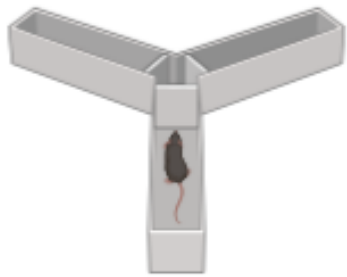
NORT

(novel object recognition test)



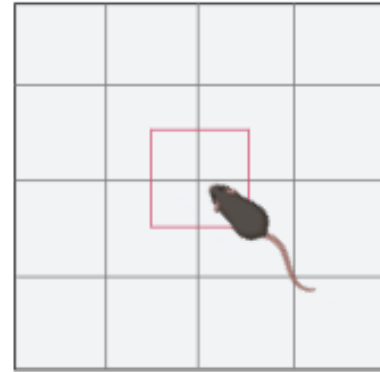
Κατά τη διάρκεια της εκπαίδευσης, το ποντίκι επιτρέπεται να εξερευνήσει 2 πανομοιότυπα αντικείμενα. Την ημέρα της δοκιμής, ένα από τα αντικείμενα εκπαίδευσης αντικαθίσταται με ένα νέο αντικείμενο. Επειδή τα ποντίκια έχουν μια έμφυτη προτίμηση για εξερεύνηση, εάν το ποντίκι αναγνωρίσει το οικείο αντικείμενο, θα περάσει τον περισσότερο χρόνο του στο νέο αντικείμενο.

Y-maze test



Χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της βραχυπρόθεσμης χωρικής μνήμης των ζώων.

Open field test



Μετράμε τον χρόνο που πέρασε το ζώο στο κέντρο του ανοιχτού πεδίου, σε σχέση με το συνολικό χρόνο στο λαβύρινθο.

FST (forced swim test)



Αξιολόγηση της αντικαταθλιπτικής δράσης των ενώσεων.

Σας ευχαριστώ πολύ!

