



ΕΝΗΜΕΡΩΤΙΚΟ ΔΕΛΤΙΟ 28 – ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2019

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

- ΑΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ 16ΟΥ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟΥ ΣΥΝΕΔΡΙΟΥ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
- ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΕΝΗΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ (FRET)
- ΔΗΜΟΤΙΚΑ ΤΡΑΓΟΥΔΙΑ ΤΗΣ ΘΡΑΚΗΣ.

Το 16ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Χημείας έγινε στη Θρακική γη του Λεύκιππου και του Δημόκριτου, προσωκρατικών φιλοσόφων του 5ου πΧ αιώνα, που προσπαθώντας να απαντήσουν στο οντολογικό ερώτημα με το λόγο, εισήγαγαν την έννοια των ατόμων και του κενού - *αίτιή δ' άτομα καὶ κενόν, στην πραγματικότητα υπάρχουν μόνον τα άτομα και το κενό**. Η Αλεξανδρούπολη μας δέχτηκε φιλόξενα κι εμείς επιστρέψαμε στα εργαστήριά μας σε όλη την Ελλάδα με πολύτιμες γνώσεις για τις νεώτερες επιστημονικές εξελίξεις και καρδιά γεμάτη από εικόνες της Θράκης. Καλωσόρισαν το Συνέδριό μας στον Έβρο και μαζί με τις ευχές τους για την ευόδωσή του, μας κάλεσαν να ξαναπάμε το χειμώνα, όταν το χιόνι ομορφαίνει τον τόπο. *Χάρκαν πουλύ κι μι του π'λα τα ετ' που μη'παν, μας ακάλιασαν να ματαπάμε του χ'μώνα στα μέρια τς στουν Έβρου, άντα του χιόνι φαντάζει κι ευμουρφαίνει τον τόπου τς.*

Αγαπητοί συνάδελφοι, σε αυτό το τεύχος διαβάστε τον απολογισμό του Συνεδρίου μας και ενημερωθείτε για την τεχνική της Συντονισμένης Μεταφοράς Ενέργειας Φθορισμού (FRET) και τις εφαρμογές της στην κλινική διάγνωση.

*Υπάρχουν πράγματα για τα οποία αξίζει να ζης, αρκεί ένα φως να περάσει πάνω τους και να σου ανοίξει τα μάτια**.* Σας ευχόμαστε, σαν δυνατός προβολέας, η καινούργια χρονιά που προβάλλει μέσα στην καταχνιά, να τα εντοπίζει και να τα προβάλλει.

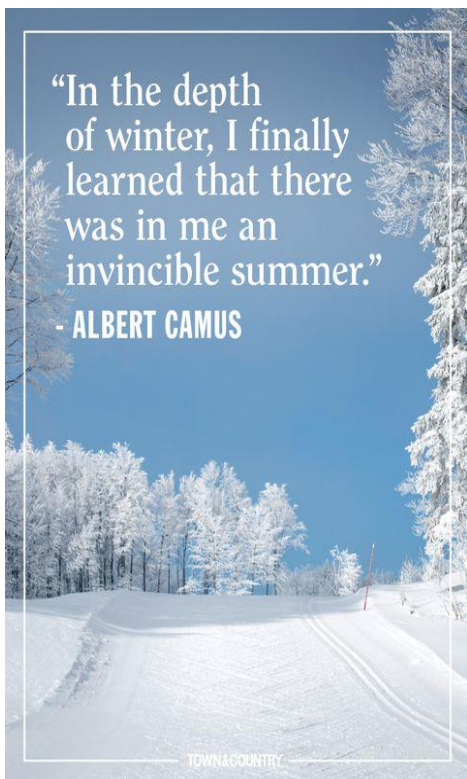
Χρόνια πολλά σε όλους,

Ανδριανή Γρηγοράτου

*Commentarii in Diogenem Laertium: Isaaci Casauboni notae atque Aegidii Menagii observationes et emendationes in Diogenem Laertium : addita est Historia mulierum philosopharum ab eodem Menagio scripta. Prostant Lipsiae: Apud C.F. Koehlerum; Londini : Apud Black, Young & Young, 1830-1833.

<http://n1.intelibility.com/ime/lyceum/?p=lemma&id=62&lang=1>

**Δημήτρης Νόλλας, «φωτεινή μαγική», Εκδ. Καστανιώτη, 2000.



Απολογισμός 16ου Πανελληνίου Συνεδρίου Κλινικής Χημείας



Μαριλένα Σταμούλη, Βιοχημικό εργαστήριο ΝΝΑ

Στο 16ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Χημείας, που πραγματοποιήθηκε τον Οκτώβριο του 2018 στην Αλεξανδρούπολη, συμμετείχαν 292 σύνεδροι. Οι 142 ήταν Χημικοί, Βιολόγοι, Ιατροί και Βιοχημικοί, οι 26 ήταν Τεχνολόγοι Ιατρικών εργαστηρίων και οι υπόλοιποι 124 φοιτητές, κυρίως της Σχολής Επιστημών Υγείας (Τμήμα Ιατρικής και Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής) του Δημοκριτείου Πανεπιστημίου Θράκης.

Ο Κωνσταντίνος Αναγνωστόπουλος, αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας στο Τμήμα Ιατρικής του Δημοκριτείου Πανεπιστημίου Θράκης, εκ μέρους της Επιστημονικής και Οργανωτικής Επιτροπής του Συνεδρίου απηύθυνε χαιρετισμό προς τους συνέδρους.

Το 16ο Πανελλήνιο Συνέδριό Κλινικής Χημείας, υπό την αιγίδα των International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC), European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) και του Δημοκριτείου Πανεπιστημίου Θράκης ξεκίνησε στις 11 Οκτωβρίου με δυο ομιλίες από το τμήμα Emerging Technologies Division of IFCC. Η πρώτη είχε ως θέμα "Introducing the Emerging Technologies Division of IFCC" και ομιλητή τον Sergio Bernardini (Professor of Internal Medicine and Clinical Biochemistry, University Hospital Tor Vergata, Laboratory of Clinical Biochemistry, Rome, Italy) και η δεύτερη είχε θέμα "Mobile Health and Clinical Laboratory: an Introduction" και ομιλητή τον Bernard Gouget (Conseiller Santé Publique-Fédération Hospitalière de France). Συντονιστής ήταν ο Αλέξανδρος Χαλιάσος, Πρόεδρος της ΕΕΚΧ-ΚΒ.



Ακολούθησε στρογγυλό τραπέζι για την **Κυτταρομετρία Ροής: Γνωριμία με τα φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα** - Προεδρείο οι Α. Ψαρρά και Γ. Μαρτίνης (Διευθυντής Κέντρου Αιμοδοσίας, ΠΓΝ Αλεξανδρούπολης) - που περιλάμβανε τις εξής ομιλίες:

- Γνωριμία με τα κύτταρα μέσω της Κυτταρομετρίας (Α. Ψαρρά, Χημικός, Τμήμα Ανοσολογίας - Ιστοσυμβατότητας, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Ο Ευαγγελισμός»)
- Ενδο-εγχειρητική Κυτταρομετρία Ροής στον Καρκίνο (Γ. Βαρθολομάτος, Βιοχημικός, Αιματολογικό Εργαστήριο, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ιωαννίνων).



Το απόγευμα έγινε η επίσημη έναρξη του Συνεδρίου με εναρκτήρια ομιλία με θέμα “Biomarker discovery techniques-focus on stroke” από τον Joan Montaner (Neurologist, Director, Neurovascular Research Laboratory Stroke Unit Vall d’Hebron Hospital Barcelona, Spain). Ακολούθησε η ομιλία υποδοχής «**Εικόνες και Ιστορίες από τη Θράκη**» από την αρχαιολόγο-μουσειολόγο-ξεναγό Νατάσα Μιχαηλίδου, συνεργάτη του Ιδρύματος Θρακικής Τέχνης και Παράδοσης.

Η δεύτερη ημέρα του συνεδρίου ξεκίνησε νωρίς με τις παρακάτω **Προφορικές Ανακοινώσεις**. Προεδρείο οι Π. Σπυροπούλου (NY Αιμοδοσίας, «Τζάνειο» ΓΝ Πειραιά) και Ε. Κώνστα (Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας, Πανεπιστήμιο Δυτ. Αττικής):

- Distinct biomarkers reflect pathophysiological differences of sickle cell disease (SCD) sub-phenotypes: viscosity-vaso-occlusion vs. hemolysis endothelial dysfunction. (I. Papassotiriou¹, K. Larissi², A Margeli¹, M. Politou³, E. Terpos⁴, E. Voskaridou². ¹Department Of Clinical Biochemistry, “Aghia Sophia” Children’s Hospital, Athens, Greece, ²Thalassemia And Sickle Cell Disease Center, “Laikon” University General Hospital, Athens, Greece, ³Laboratory Of Hematology And Blood Bank Unit, “Aretaieio” Hospital, Athens University Medical School, ⁴Department Of Clinical Therapeutics, Athens University Medical School).
- Δευτεροπαθής ερυθροκυττάρωση οφειλόμενη στην Hb San Diego ή β109 (G11) Val>Met ή GTG>ATG: Δομική και λειτουργική μελέτη (I. Παπασωτηρίου¹, Δημήτριος Χριστούλας², Β. Ντούνα³, J. Traeger-Συνοδινού⁴). ¹Τμήμα Κλινικής Βιοχημείας, Νοσοκομείο Παίδων «Αγία Σοφία», Αθήνα ²Αιματολογική Κλινική, 251 Γενικό Νοσοκομείο Αεροπορίας Αθηνών, ³Αιματολογικό Εργαστήριο, ΓΠΝΑ «Παναγιώτη και Αγλαΐας Κυριακού», ⁴Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής, ΕΚΠΑ, Αθήνα.
- Μεταβολές βιοδεικτών και συσχέτιση τους με νευροφυσιολογικούς δείκτες σε συνθήκες προσομοίωσης έλλειψης βαρύτητας σε πείραμα υποχρεωτικής κατάκλισης με κλίση κεφαλής και η επίδραση αντισταθμιστικών μηχανισμών (C. Muswamba-Nday¹, Χρ. Φραντζίδης², Λ. Χατζηϊωαννίδης³, Σ. Γυλού¹, Δ. Γαλιατσάτος¹, Φ. Ντογραματζή⁴, Πολυξένη Γκιβόγκλη², Εμ. Κωστάκης¹, Χρ. Πλωμαρίτη¹, Λίνα Κωνσταντάρα¹, Π. Χρίσκος¹, Ζ. Αθανασιάδου⁴, Ελ. Βαγδατλή⁴, Gr. Jackson⁵, Παν. Μπαμίδης², Χρ. Κουρτίδου-Παπαδέλη²). ¹Εργαστήριο Ιατρικής Φυσικής, Ιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, ²Εργαστήριο Ιατρικής Φυσικής, Ιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Ελληνική Εταιρεία Αεροπορικής Ιατρικής και Διαστημικής Έρευνας, Θεσσαλονίκη, ³Τμήμα Γεωπονίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης,

⁴Εργαστήριο Βιοχημείας, Γενικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης Ιπποκράτειο, ⁵Department of Chemistry, University of Cape Town, South Africa.

- Εκτίμηση δεικτών ποιότητας της προαναλυτικής φάσης με χρήση των μεθόδων six sigma και pareto (Ζ. Αθανασιάδου, ²Π. Καρκαλούσος). ¹Βιοχημικό Εργαστήριο, Γενικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης Ιπποκράτειο, Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών, Διαχείριση και Τεχνολογία Ποιότητας, ²Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο.
- Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού αρωματικών αμινοξέων με HPLC/UV (Ε. Α. Χατζησταυρή, Γ. Ε. Τσότσου, Π. Καρκαλούσος). Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Αθήνα.
- Προσδιορισμός μη στεροειδών αντιφλεγμονοδών φαρμάκων σε ορό αίματος με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (Α. Κρόκος¹, Ελ. Τσακελίδου¹, Ελ.Μιχοπούλου², Ν.Ράϊκος¹, Γ. Θεοδωρίδης³, Ελ. Γκίκα¹). ¹Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, ²Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, ³Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- Διερεύνηση του μεταβολικού προφίλ του αίματος ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου (1H NMR) Αικ. Δήμου¹, Καλ. Αζαριάδη², Χρ. Κωσταρά¹, Καλ. Ζάχου², Γ. Νταλέκος², Ελ. Μπαϊρακτάρη¹).¹Εργαστήριο Κλινικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, ²Παθολογική Κλινική και Ομώνυμο Ερευνητικό Εργαστήριο, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα.
- Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού ουρικού οξέος σε κλινικά δείγματα με HPLC αντίστροφης φάσης (Χ. Μπάσσα¹, Γ. Ε. Τσότσου¹, Κ. Μακρή², Π. Καρκαλούσος¹). ¹Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Αθήνα, ²Βιοχημικό Εργαστήριο, ΓΝΑ «Ο Ευαγγελισμός», Αθήνα.
- Διαφοροποίηση του λιπιδικού προφίλ των HDL λιποπρωτεϊνών σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και ασθενείς με εγκατεστημένη καρδιαγγειακή νόσο (Χρ. Κωσταρά¹, Μ. Ελισάφ², Β. Τσιμιχόδημος, Ελ. Μπαϊρακτάρη¹). ¹Εργαστήριο Κλινικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, ²Τομέας Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.



Στο στρογγυλό τραπέζι για τη **Φαρμακογονιδιωματική και εξατομικευμένη θεραπεία**, (Προεδρείο οι Ε. Μανωλόπουλος και Γ. Κολιός) περιλαμβάνονταν οι παρακάτω ομιλίες:

- Η φαρμακογονιδιωματική στην καρδιολογική κλινική πράξη (Ε. Μανωλόπουλος, Καθηγητής Φαρμακολογίας, Διευθυντής Εργαστηρίου Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης)
- Φαρμακογονιδιωματική των ψυχιατρικών φαρμάκων (Γ. Ράγια, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης)

Ακολούθησε η κύρια ομιλία (invited lecture) του Ιωάννη Παπασωτηρίου (Κλινικός Βιοχημικός, Διευθυντής Βιοχημικού Τμήματος, Γ.Ν. Παιδών «Η Αγία Σοφία», Αθήνα) με θέμα: The clinical significance of Glycated Hemoglobin in patients with Hemoglobinopathies και μετά Δορυφορικό Συμπόσιο (LERIVA) με θέμα: Η εξέλιξη των βιολογικών δεικτών στον προσυμπτωματικό έλεγχο του καρκίνου του προστάτη, με ομιλητή τον Γ. Κολιό (Βιοχημικός, EurClinChem, Βιοχημικό Εργαστήριο, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ιωαννίνων).

Κατόπιν έγινε η «παρουσίαση των νέων κατευθυντηρίων οδηγιών για την οστεοπόρωση στην Ελλάδα με ομιλητή τον Π. Μάκρα (Ενδοκρινολόγος, Αναπληρωτής Διευθυντής, Ενδοκρινολογική Κλινική - Τμηματάρχης Εργαστηρίου Βιοιατρικής Έρευνας, 251 Γ.Ν. Αεροπορίας, Αθήνα). Συντονιστής ήταν ο Κ. Μακρής.



Ακολούθησε η παρουσίαση του «Νέου προγράμματος εξωτερικού ελέγχου ποιότητας για τις μεταλλάξεις του γονιδίου EGFR» με ομιλητή τον Α. Χαλιάσο (Ιατρός, Κλινικός Χημικός, EurSpLM, ΕΣΕΑΠ, Αθήνα) και συντονίστρια την Ε. Μπότουλα (Ορμονολογικό Εργαστήριο του ΠΓΝΑ «Ο Ευαγγελισμός»).



Στο επόμενο στρογγυλό τραπέζι για τον **Διαβήτη** (Προεδρείο Ν. Παπάνας, Καθηγητής Παθολογίας-Σακχαρώδους Διαβήτη, Υπεύθυνος Κέντρου-Ιατρείου διαβητικού ποδιού, Β΄ Παθολογική Κλινική, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Αντιπρόεδρος Ευρωπαϊκής ομάδας μελέτης διαβητικού ποδιού) αναπτύχθηκαν τα θέματα:

- Βιοδείκτες ορού και ούρων ως διαγνωστικό εργαλείο στον σακχαρώδη διαβήτη. Τι νεώτερο; (Χ. Τσίγαλου, Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης)
- Metabolomics: Η επιστροφή των μεταβολιτών; Το παράδειγμα του σακχαρώδη διαβήτη (Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Βιοχημικό Εργαστήριο, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ιωαννίνων)
- Εντερικό μικροβίωμα και χρόνια φλεγμονή του λιπώδους ιστού στην παχυσαρκία. Υποθέσεις-Αποδείξεις-Μελλοντικοί στόχοι και παρεμβάσεις (Χ. Τσίγαλου, Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης)

Το επόμενο δορυφορικό συμπόσιο (Abbott και Thermo Fischer Scientific) είχε ως συντονιστή τον Κ. Μακρή (Βιοχημικό Εργαστήριο Νοσ. ΚΑΤ, Κηφισιά) και περιελάμβανε τα παρακάτω θέματα:

- Προκαλιτονίνη, ασφαλής και αποτελεσματική της εφαρμογή στη διαχείριση λοιμώξεων και στην ορθολογική χρήση αντιβιοτικών (Π. Ευαγγελάκου, Marketing Specialist, Europe Region East, Abbott Diagnostics Division)
- Παρουσίαση των νέων κατευθυντηρίων οδηγιών για τη βιταμίνη D στην Ελλάδα (Κ. Κώτσα, Επίκουρη Καθηγήτρια Ενδοκρινολογίας-Διαβητολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Ενδοκρινολογίας, Διαβήτη και Μεταβολισμού, Διαβητολογικό Κέντρο, Α΄ Παθολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης "ΑΧΕΠΑ")



Το πρόγραμμα της δεύτερης ημέρας του συνεδρίου ολοκληρώθηκε με ένα στρογγυλό τραπέζι σχετικά με την «Υπογονιμότητα: Κλινικά χαρακτηριστικά και εργαστηριακή διερεύνηση» (συντονιστής Δ. Ρίζος) και περιελάμβανε τις παρακάτω ομιλίες:

- Υπογονιμότητα: Εισαγωγή (Ν.Κουτλάκη-Κούρτη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μαιευτικής- Γυναικολογίας, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης)
- Εργαστηριακή διερεύνηση υπογονιμότητας στις γυναίκες (Δ.Ρίζος, Αναπληρωτής Καθηγητής Κλινικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ορμονολογικό Εργαστήριο, Αρεταίειο Νοσοκομείο Αθηνών)
- Εργαστηριακή διερεύνηση υπογονιμότητας σε άνδρες (Δ.Τζανακάκη, Κλινική Εμβρυολόγος, Αρεταίειο Νοσοκομείο, Αθήνα)
- Θεραπευτική προσέγγιση υπογονιμότητας (Ν.Κουτλάκη-Κούρτη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης)

Η τρίτη ημέρα του συνεδρίου ξεκίνησε νωρίς με τις εξής **Προφορικές Ανακοινώσεις** (Προεδρείο Α. Γρηγοράτου και Χ. Ψαχούλια και οι δυο από το Βιοχημικό Εργαστήριο του ΠΓΝΑ «Ο Ευαγγελισμός»).

- Μοριακός έλεγχος μεταλλάξεων *ras* στο πλάσμα ασθενών με μη χειρουργήσιμο παγκρεατικό καρκίνο μέσω υγρών βιοψιών (ψηφιακή *pcr*) και κλινικές εφαρμογές στην εξατομικευση της θεραπείας. (Μ. Καστρισιού¹, Χρ. Τζάλλας², Γ.Πενθερουδάκης^{3*}, Αγγελική Μαγκλάρα^{1*}). ¹Εργαστήριο Κλινικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, ²Βιοχημικό Εργαστήριο, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ιωαννίνων, ³Ογκολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, * ισάξια συνεισφορά.
- Κυκλοφορούντες επιγενετικοί βιοδείκτες στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου II (Μακρίνα Καραγλάνη, Μαρία Παναγοπούλου, Μαρία Μαρκάκη, Ιωάννα Μπαλγκουρανίδου, Ευαγγελία Νένα, Γεώργιος Κολιός, Ευάγγελος Μανωλόπουλος, Ιωάννης Τσαμαρδίνος, Ευστράτιος Μαλτζέζος, Νικόλαος Παπάνας, Γεώργιος Μαστοράκος, Αικατερίνη Αλεξίου-Χατζάκη)

- Ανάπτυξη μεθοδολογίας για την ανίχνευση σημειακού πολυμορφισμού στο TCF4 γονίδιο και συσχέτιση με την όψιμη-έναρξης ενδοθηλιακή δυστροφία κερατοειδούς του FUCHS στον ελληνικό πληθυσμό (Ανδριανή Διαμαντοπούλου, Μαριλίτα Μόσχου, Κωνσταντίνος Δρούτσας, Γεώργιος Κίτσος, Χρήστος Κρούπης)
- Ανάπτυξη μεθόδου ανάλυσης προφίλ ελευθέρων λιπαρών οξέων στο αίμα και μελέτη συσχέτισης τους με τον πολυμορφισμό ABCB1 2677G>T/A σε υγιείς και υπερλιπιδαιμικούς ασθενείς (Θωμάη Μουσκεφταρά, Ελένη Γκίκα, Ανδρέα Ασημοπούλου, Αντώνιος Γούλας)
- Μοριακός χαρακτηρισμός του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων με multiplex real time PCR στον ασυμπτωματικό γυναικείο και ανδρικό πληθυσμό (Ειρήνη Μάστορα, Αθανάσιος Ζηκόπουλος, Ελισάβετ Χατζή, Ιωάννα Μπούμπα, Θωμάς Βρεκούσης, Ιωάννης Γεωργίου)
- Μεθυλίωση του γονιδίου ESR1 σε δείγματα πρωτοπαθών όγκων και αντίστοιχου κυκλοφορούντος καρκινικού DNA ασθενών με ορώδη καρκίνο ωοθηκών υψηλού βαθμού κακοήθειας (Λυδία Γιαννοπούλου, Σοφία Μαστοράκη, Paul Buderath, Αρετή Στρατή, Αικατερίνη Παυλάκη, Sabine Kasimir-Bauer, Εύη Λιανίδου)
- Ανάπτυξη πολυ-παραγοντικών ταξινομητών πρόγνωσης και πρόβλεψης στον καρκίνο του μαστού μέσω της ανάλυσης του ελεύθερου κυκλοφορούντος DNA (Μαρία Παναγοπούλου, Μακρίνα Καραγλάνη, Ιωάννα Μπαλκουρανίδου, Βασίλειος Βασιλακάκης, Ειρήνη Μπιζιώτα, Τριανταφυλλιά Κουκάκη, Ευάγγελος Καραμιτρούσης, Ευαγγελία Νένα, Ιωάννης Τσαμαρδίνος, Γεώργιος Κολιός, Εύη Λιανίδου, Στυλιανός Κακολύρης, Αικατερίνη Χατζάκη)

Στη συνέχεια ακολούθησε η ομιλία του καθηγητή της Νευρολογίας στο Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης Ι. Ηλιόπουλου (Συντονιστής Χ. Κρούπης) με θέμα «PNS Αντισώματα παρανεοπλασματικών νόσων του νευρικού συστήματος» .



Το στρογγυλό τραπέζι που ακολούθησε, με θέμα **Laboratory Biomarkers in Dementias**, (προεδρείο S.Bernardini, A.Haliassos και C.Kroupis) περιελάμβανε τις παρακάτω ομιλίες:

- Standardization of CSF biomarker assays-preanalytical and analytical aspects of CSF biomarker assays (S. Bernardini, Professor of Internal Medicine and Clinical Biochemistry, University Hospital Tor Vergata, Laboratory of Clinical Biochemistry, Rome, Italy)
- Genetic biomarkers in dementia (C. Kroupis, Επίκουρος Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας-Μοριακής Διαγνωστικής, Πανεπιστημιακό Νοσοκομειακό Αθηνών "Αττικόν", Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ, Αθήνα)

Το πρόγραμμα συνέχισε με ένα ακόμη στρογγυλό τραπέζι που είχε σαν θέμα **"Potential role of biomarkers in stroke: from early diagnosis to guidance of therapy"** (προεδρείο A. Haliassos και K. Makris). Οι ομιλίες στο στρογγυλό τραπέζι ήταν οι παρακάτω:

- Use of biomarkers in clinical practice and research (J. Montaner, Neurologist, Director, Neurovascular Research Laboratory Stroke Unit Vall d'Hebron Hospital Barcelona, Spain)
- Analytical and pre-analytical issues-the need for standardization (K. Makris, Βιολόγος, Βιοχημικό Τμήμα Νοσοκομείο ΚΑΤ, Κηφισιά, Αθήνα)

Σειρά είχαν δυο ομιλίες, η πρώτη με θέμα "Διάγνωση νοητικών διαταραχών ή διαφορική διάγνωση άνοιας» (συντονιστής Κ. Μακρής) και ομιλήτη τον Καθηγητή της Νευρολογίας στο Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης Κ. Βαδικόλια, και η δεύτερη με θέμα «Επιληπτική κρίση και επιληψία, διαγνωστική προσέγγιση» και ομιλήτρια την Επίκουρη Καθηγήτρια Νευρολογίας στο Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης Α. Τερζούδη.



Με τη **Διαχείριση της νόσου Alzheimer** ασχολήθηκε το δορυφορικό συμπόσιο (Roche) (συντονιστής Κ. Βαδικόλιας), το οποίο περιλάμβανε δυο ομιλίες:

- Νόσος Alzheimer: διάγνωση και κλινική αντιμετώπιση (Μ. Τσολάκη, Νευρολόγος-Ψυχίατρος, Θεολόγος, Καθηγήτρια, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη, Διευθύντρια Α' Νευρολογικής Κλινικής, Νοσοκομείο ΑΧΕΠΑ)
- CSF Automated biomarker assays and their implication for Alzheimer disease management
-

Οι εργασίες του συνεδρίου ολοκληρώθηκαν με το συμπόσιο για τους νέους επιστήμονες **IFCC Task force Young Scientists** (Προεδρείο Ε. Κώνστα). Το συμπόσιο περιελάμβανε τρεις ομιλίες:

- Education and application of clinical chemistry in Sweden (Ρ. Komprogiannis, Φοιτητής Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής)
- Discovering the post-transcriptional regulation of HLA class I APM components and its clinical relevance in melanoma as a PhD student in Germany (Μ. Lazaridou, Υποψήφια διδάκτορας, Institute for medical immunology, Halle Saale, Γερμανία)
- Succeeding as a young scientist (Α. Velts, Head of Laboratory at West Tallinn Central Hospital, Tallinn, Estonia)

Έγινε αναφορά στα συμπεράσματα του συνεδρίου και ακολούθησε η βράβευση των παρακάτω εργασιών από τον Πρόεδρο του Συνεδρίου, Καθ. Κ. Αναγνωστόπουλο.

1^ο Βραβείο καλύτερης προφορικής ανακοίνωσης: Distinct biomarkers reflect pathophysiological differences of sickle cell disease (SCD) sub-phenotypes: viscosity-vaso-occlusion vs. hemolysis-endothelial dysfunction (Ι. Papassotiriou, Κ. Larissi, Α. Margeli, Μ. Politou, Ε. Terpos, Ε. Voskaridou)

2^ο βραβείο καλύτερης προφορικής ανακοίνωσης: Ανάπτυξη πολυ-παραγοντικών ταξινομητών πρόγνωσης και πρόβλεψης στον καρκίνο του μαστού μέσω της ανάλυσης του ελεύθερου κυκλοφορούν DNA (Μ. Παναγοπούλου, Μ. Καραγλάνη, Ι. Μπαλκουρανίδου, Β. Βασιλακάκης, Ει. Μπιζιώτα, Τ. Κουκάκη, Ε. Καραμιτρούσης, Ε. Νένα, Ι. Τσαμαρδίνος, Γ. Κολιός, Ε. Λιανίδου, Σ. Κακολύρης, Αι. Χατζάκη)

1^ο βραβείο καλύτερης αναρτημένης ανακοίνωσης: Οι πολυμορφισμοί των γονιδίων των τελομερασών σχετίζονται με την ηλικία εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα (Π. Κούλη, Γ. Ράγια, Ι. Μπαλκουρανίδου, Ν. Ξενίδης, Κ. Αμαραντίδης, Ει. Μπιζιώτα, Τ. Κουκάκη, Σ. Κακολύρης, Ε. Γ. Μανωλόπουλος)

2^ο βραβείο καλύτερης αναρτημένης ανακοίνωσης PSA, FPSA, [-2] PROPSA και Prostate Health Index (PHI) στην ανίχνευση ασθενών με καρκίνο του προστάτη (Γ. Κολιός, Κ. Κοντοδήμου, Χ. Καλογερά, Ι. Βλάχου, Δ. Μπαλτογιάννης, Σ. Τσαμπαλάς, Ε. Μπαϊρακτάρη)



Η τεχνική της Συντονισμένης Μεταφοράς Ενέργειας Φθορισμού (FRET) και οι εφαρμογές αυτής στην κλινική διάγνωση.

Σιμωνέτη Σωτηρία,

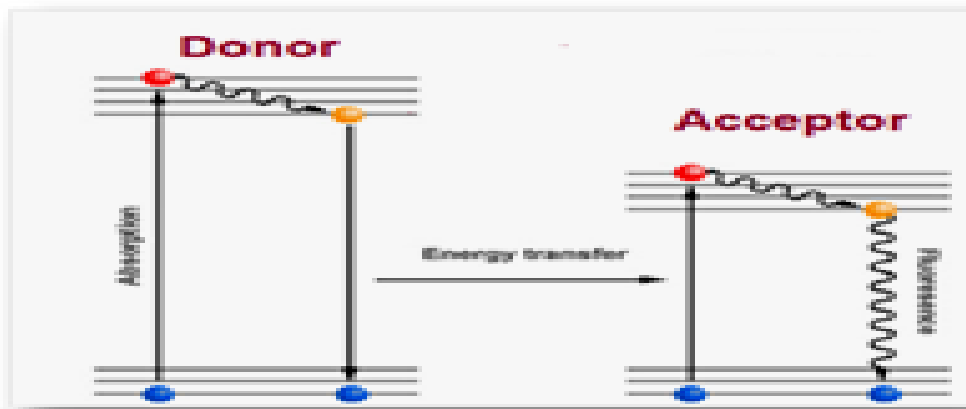
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Κατεύθυνση Ιατρικών Εργαστηρίων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η τεχνική της Συντονισμένης Μεταφοράς Ενέργειας Φθορισμού (FRET) είναι μια μέθοδος με ποικίλες εφαρμογές, για πάνω από 50 χρόνια, στους χώρους της βιο-έρευνας και της φαρμακολογίας. Σκοπός της παρούσας ανασκόπησης είναι η ανάλυση της βασικής αρχής της τεχνικής FRET και η συνοπτική παρουσίαση των εφαρμογών της στην κλινική διάγνωση και έρευνα. Εάν και η τεχνική δεν αντικαθιστά κλασσικές διαγνωστικές μεθόδους σε τομείς όπως η μοριακή βιολογία, η πρωτεομική (proteomics), η ανοσολογία κ.ά., τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της, όπως η μεταφορά ενέργειας φθορισμού ανάμεσα σε δύο φθορίζουσες ουσίες σε κοντινή απόσταση, την καθιστούν πολύτιμη μέθοδο για τη μελέτη διαμοριακών αλληλεπιδράσεων και ενδομοριακών μεταβολών. Ταυτόχρονα, ο ελάχιστος προαπαιτούμενος πειραματικός σχεδιασμός, σε σύγκριση με άλλες μεθόδους, η σχετικά απλή ανάλυση των εξαγόμενων αποτελεσμάτων, ανάλογα με το παραγόμενο φθορίζον σήμα, η μηδενική, κατά περιπτώσεις, επεξεργασία του δείγματος αλλά και οι πρόσφατες, υπό εξέλιξη, τεχνολογικές εφαρμογές της μεθόδου επιτρέπουν τη σταδιακή ένταξή της σε εργαστήρια ρουτίνας.

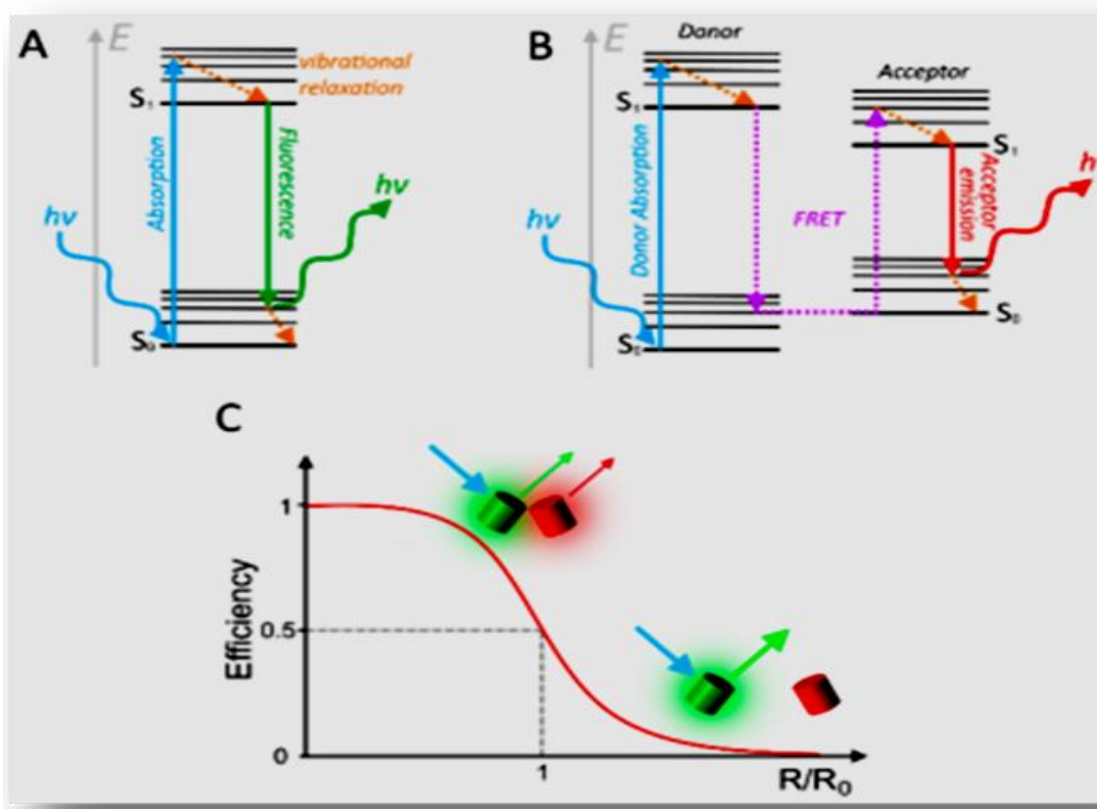
ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ FRET

Η τεχνική της FRET είναι μια απεικονιστική μέθοδος άρρηκτα συνδεδεμένη με την απόσταση (διαμοριακή και ενδομοριακή). Ο μηχανισμός της FRET στηρίζεται στην ύπαρξη μιας φθορίζουσας ουσίας, η οποία λειτουργεί ως δέκτης (donor) και η οποία, αμέσως μετά τη διέγερσή της με ακτινοβολία από πηγή φωτός, είναι σε θέση να αποδώσει την ενεργειακή της περίσσεια, όχι με την εκπομπή ενός φωτονίου συγκεκριμένου ενεργειακού περιεχομένου, αλλά διεγείροντας μια δεύτερη φθορίζουσα ή μη ουσία, σε κοντινή απόσταση, κατά το μοντέλο αλληλεπίδρασης διπόλου με δίπολο (Εικόνα 1). Σύμφωνα με αυτό, είναι δυνατή η ανταλλαγή ενέργειας ανάμεσα σε φθορίζουσες ουσίες, όπου ο δότης, ο οποίος προηγουμένως έχει διεγερθεί με ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος και ταλαντώνεται σε συγκεκριμένη συχνότητα, προβαίνει σε απόδοση ενέργειας σε μια δεύτερη, φθορίζουσα ουσία – δέκτη, η οποία ταλαντώνεται σε συγχρονισμό με αυτόν. [1].



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση (διάγραμμα Jablonski) της μεταφοράς ενέργειας από το δότη στο δέκτη [1].

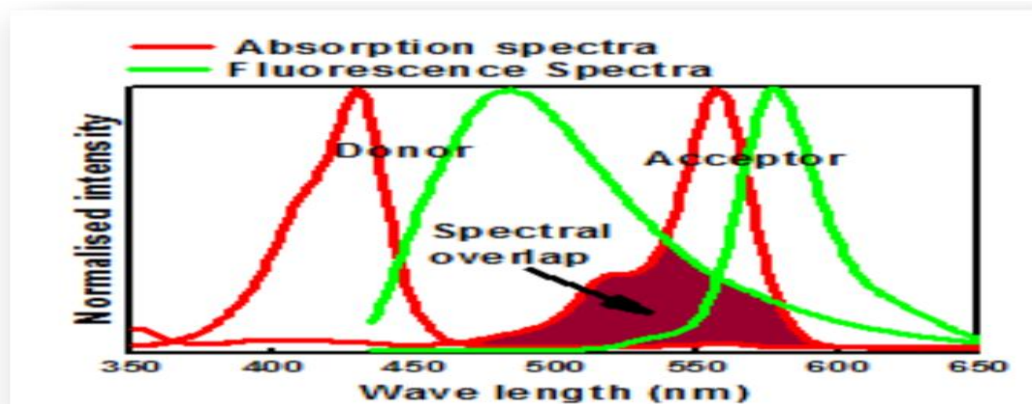
Κάθε ζεύγος φθορίζουσων ουσιών που αλληλεπιδρούν με αυτόν τον τρόπο είναι γνωστό ως ζεύγος δότη – δέκτη (donor – acceptor pair), με βασική παράμετρο για την αλληλεπίδρασή τους τη μεταξύ τους απόσταση, η οποία θα πρέπει να κυμαίνεται από 1 έως 10 nm. Η ανταλλαγή ενέργειας οδηγεί σε μείωση της έντασης φθορισμού του δότη, μείωση της διάρκειας του φθορισμού του (fluorescence lifetime) και αύξηση της έντασης φθορισμού του δέκτη, αντίστοιχα. Σημειώνεται ότι η φθορίζουσα φύση του δέκτη δεν είναι πάντα απαραίτητη. Στην περίπτωση μη φθορίζοντος δέκτη συμβαίνει απόσβεση του φθορισμού [1]. Στοιχεία όπως οι οπτικές ιδιότητες του δείγματος, η παρουσία μορίων του διαλύτη, η διηλεκτρική φύση του διαλυτικού μέσου κτλ. δεν φαίνεται να επηρεάζουν σημαντικά την αποτελεσματικότητα της τεχνικής [1]. Η εξάρτηση της τεχνικής από την απόσταση φαίνεται από τον τύπο : $E = 1 / [1 + (r / R_0)^6]$, όπου E η αποτελεσματικότητα του φαινομένου FRET, r η απόσταση μεταξύ δότη και δέκτη και R_0 η απόσταση μεταξύ δότη και δέκτη όπου επιτυγχάνεται μεταφορά του 50 % της δοθείσας ενέργειας για τη διέγερση του δότη (ακτίνα Förster) (Εικόνα 2) [2].



Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση του φαινομένου του φθορισμού (Α), της αρχής του φαινομένου FRET (Β) καθώς και της εξάρτησης της αποτελεσματικότητας του τελευταίου από την απόσταση (Γ). Παρατηρούμε ότι για απόσταση μικρότερη του R_0 ($r < R_0$), η αποτελεσματικότητα αυξάνεται σημαντικά, ενώ για $r > R_0$ μειώνεται. Ο λόγος, δηλαδή, των δύο αποστάσεων r / R_0 πρέπει να είναι μικρότερος του 1 για την επίτευξη υψηλής αποτελεσματικότητας συντονισμένης μεταφοράς ενέργειας φθορισμού [3].

Η τιμή R_0 είναι μοναδική για κάθε ζεύγος FRET. Παράγοντες που επηρεάζουν την R_0 και κατ' επέκταση επηρεάζουν και την αποτελεσματικότητα του φαινομένου FRET είναι, μεταξύ άλλων, η κβαντική απόδοση του φθορίζοντος δότη (Q_D), η γωνία μεταξύ των διανυσμάτων των διπόλων δότη και δέκτη και ο βαθμός αλληλοεπικάλυψης του φάσματος εκπομπής του δότη με το φάσμα διέγερσης του δέκτη, γνωστό και ως φασματική επικάλυψη (Εικόνα 3). Συμπερασματικά, προκειμένου να μεγιστοποιηθεί το προσλαμβανόμενο σήμα, απαραίτητη κρίνεται η επιλογή φθορίζοντος δότη με μεγάλη κβαντική απόδοση, καθώς και φθορίζοντος ή μη δέκτη με υψηλό βαθμό απορρόφησης.

Τα φάσματα εκπομπής και απορρόφησης δότη και δέκτη, αντίστοιχα, θα πρέπει να αλληλοεπικαλύπτονται σε σημαντικό βαθμό. Οι παράμετροι αυτές διαφοροποιούνται, ανάλογα με τον πειραματικό σχεδιασμό [2].



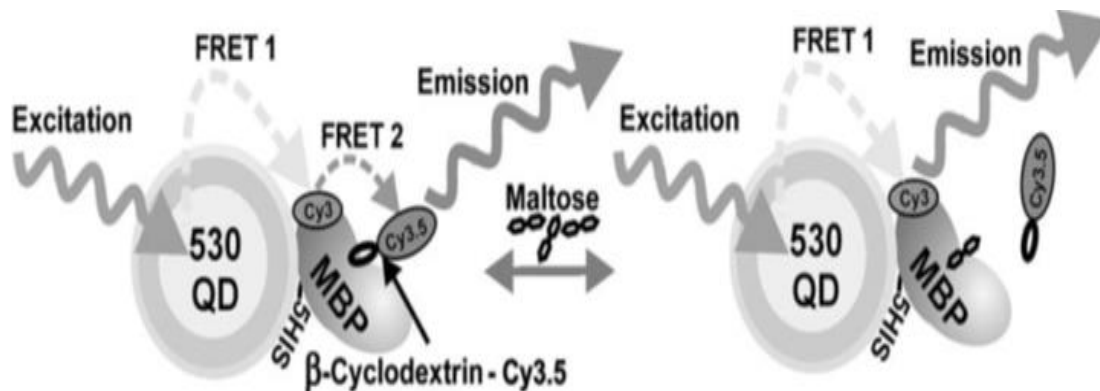
Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση της φασματικής επικάλυψης μεταξύ των φασμάτων εκπομπής (πράσινο) και διέγερσης (πορτοκαλί) μεταξύ του δότη και του δέκτη, αντίστοιχα [1].

Άλλοι παράγοντες που λαμβάνονται υπόψη στο σχεδιασμό ενός συστήματος FRET είναι: 1) η φωτεινότητα δότη και δέκτη. Όταν μετράται ταυτόχρονα ο φθορισμός του δότη και του δέκτη, για την ορθή μέτρηση του φθορισμού με την μικρότερη ένταση, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη και ο συστηματικός θόρυβος, 2) η στοιχειομετρία δότη και δέκτη, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο σε μελέτες πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, όπου η παρουσία ενός φθοριοχρώματος σε περίσσεια οδηγεί στην ανίχνευση του φαινομένου FRET σε μικρότερο βαθμό, καθώς και 3) οι παρεμβολές (cross-talk/ bleed-through), που παρατηρούνται σε περιπτώσεις αλληλοεπικαλυπτόμενων φασμάτων απορρόφησης και εκπομπής του δότη και του δέκτη. Σε αυτές τις περιπτώσεις παρατηρείται είτε απευθείας διέγερση του δέκτη από ακτινοβολία που προορίζεται για το δότη, είτε ανίχνευση του παραγόμενου φθορισμού του δότη από το κανάλι ανίχνευσης φθορισμού του δέκτη. Απαραίτητη σε αυτές τις περιπτώσεις κρίνεται η φασματική διαφοροποίηση του FRET ζεύγους [2].

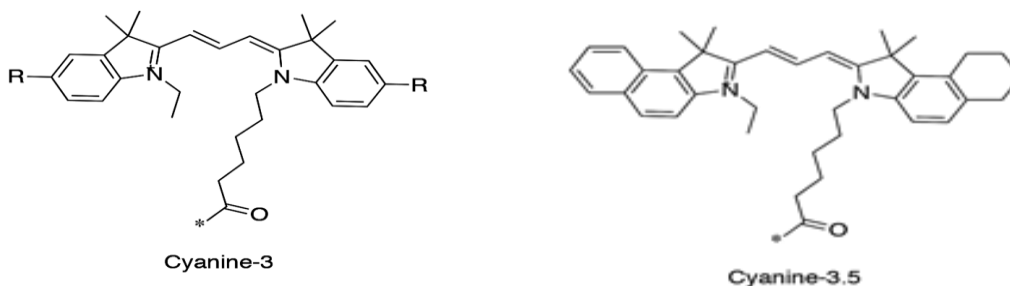
ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΟΥΣΙΕΣ & ΜΟΡΙΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ FRET

Από τις φθορίζουσες ουσίες και μόρια που χρησιμοποιούνται στην τεχνική FRET, ενδεικτικά αναφέρονται τα παρακάτω: 1) Φθορίζουσες ουσίες που εκπέμπουν στην υπεριώδη, ορατή και υπέρυθρη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, οι οποίες έχουν ως βάσεις τους χημικές ενώσεις όπως το πυρένιο, το ναφθαλίνιο κτλ., καθώς και ενώσεις παράγωγα της ροδαμίνης, της κυανίνης κτλ., αντίστοιχα, 2) Μόρια αποσβέσεως (quencher molecules), τα οποία είναι μη φθορίζοντα μόρια μεταλλικής ή οργανικής φύσεως (πχ. νανοσωματίδια χρυσού), με τη δυνατότητα αναστολής του φθορισμού του FRET δότη (εξ αποστάσεως ή εξ επαφής) και περιορισμού του συστηματικού θορύβου, 3) Περιβαλλοντικά εξαρτώμενες φθορίζουσες ουσίες, όπου η μεταβολή των φασματομετρικών τους χαρακτηριστικών από συγκεκριμένους αιτιολογικούς παράγοντες (πχ. pH), επιτρέπει την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των αιτιολογικών αυτών παραγόντων, 4) Νανοσωματίδια επενδεδυμένα με πολλαπλές φθορίζουσες ουσίες, 5) Δενδριμερή, τα οποία είναι πολυμερή μακρομόρια υψηλής διακλάδωσης, αποτελούμενα από ένα μονομερές μόριο – πυρήνα ή άλλα πολυμερή. Τα επισημασμένα με φθορίζουσες ουσίες δενδριμερή χρησιμοποιούνται, κυρίως, στη στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων, έχοντας ταυτόχρονα βιοαπεικονιστική λειτουργία για την ανίχνευση πχ. όγκων, 6) Φωτοχρωματικά μόρια, τα οποία λειτουργούν ως «μόρια – διακόπτες» του φαινομένου FRET. Η ακτινοβόλησή τους με δύο διαφορετικά μήκη κύματος, συγκεκριμένα για κάθε ένωση, οδηγεί στη χημική τους αναδιάταξη, οπότε και προκύπτουν δύο διαφορετικές χημικές δομές, με διαφορετικά φασματομετρικά χαρακτηριστικά. Έτσι, η μία εκ των δύο χημική δομή ευνοεί φασματικά το φαινόμενο FRET, σε αντίθεση με τη δεύτερη

η οποία το αναστέλλει (λειτουργία διακόπτη switch on – switch off). Επιπλέον, χρησιμοποιούνται: 7) Φθορίζουσες πρωτεΐνες (FPs), οι οποίες είναι γνωστές ως πρωτεΐνες – χίμαιρες, προϊόντα, δηλαδή, βιοτεχνολογικής παρέμβασης σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, επιφορτίζοντάς τες με νέες φθορίζουσες ιδιότητες, 8) Μόρια κβαντικές κουκκίδες (quantum dots/ QD), τα οποία είναι φωτοβόλοι, ημιαγώγιμοι νανοκρύσταλλοι, με προσαρμοζόμενα φασματομετρικά χαρακτηριστικά και 9) Πολυσυστήματα FRET, όπου βιολογικές δομές (DNA, πρωτεϊνικοί υποδοχείς κτλ.) αξιοποιούνται ως σκελετός για την δέσμευση πολλαπλών φθορίζουσων ουσιών [4] (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Χαρακτηριστικό πολυσύστημα FRET για την ανίχνευση της μαλτόζης. Το πολυσύστημα αποτελείται από μια κβαντική κηλίδα (quantum dot, QD), μια πρωτεΐνη δέσμευσης της μαλτόζης (maltose binding protein, MBP), σεσημασμένη με τη φθορίζουσα ουσία Cy3 (χρωστική κυανίνης, cyanine dye, Cy3) και ένα μοριακό ανάλογο της μαλτόζης (β-κυκλοδεξτρίνη), σεσημασμένο με τη φθορίζουσα Cy3.5. Η β-κυκλοδεξτρίνη συνδέεται επί της πρωτεΐνης MBP, οδηγώντας σε αναδίπλωση της MBP, με τις δύο φθορίζουσες ουσίες να έρχονται κοντά η μία στην άλλη. Η διέγερση του QD μορίου οδηγεί σε μεταφορά ενέργειας από το QD μόριο στη Cy3 και από αυτήν στη φθορίζουσα ουσία Cy3.5, η οποία παράγει φθορισμό. Παρουσία μαλτόζης, η μαλτόζη ανταγωνίζεται τη β-κυκλοδεξτρίνη για την πρόσδεσή της στην MBP, ανακόπτοντας τη μεταφορά ενέργειας προς την Cy3.5 και αυξάνοντας το φθορισμό της Cy3 [4]. Η αύξηση του φθορισμού της Cy3 εις βάρος του φθορισμού της Cy3.5 αποτελεί ένδειξη της παρουσίας μαλτόζης.



Εικόνα 4α. Cy3: Διέγερση (512), 550 nm / Εκπομπή 570, (615) nm / Κβαντική απόδοση Quantum yield, QY 0.15. **4b.** Cy3.5 Διέγερση 579 nm / Εκπομπή 589 nm.

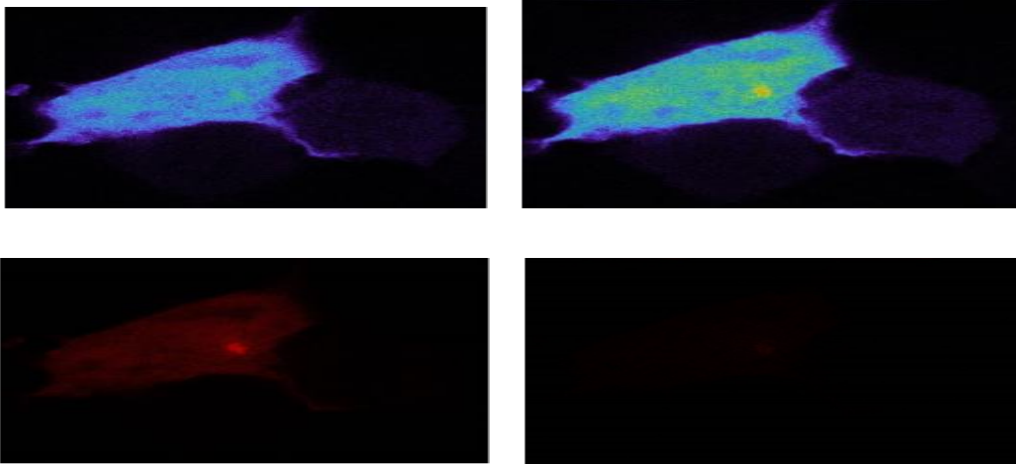
ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟΥ FRET

Πέντε είναι οι κυριότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του φαινομένου FRET:

- 1) Μέθοδος της ευαισθητοποιημένης εκπομπής (Sensitized emission- seFRET), η οποία αφορά την ανίχνευση του φαινομένου FRET, μέσω διαφοροποιήσεων στην ένταση φθορισμού του δότη, του δέκτη ή και των δύο [5]. Τα δύο φάσματα εκπομπής (δότη και δέκτη) οπτικοποιούνται ταυτόχρονα, με δύο διαφορετικά κανάλια

ανίχνευσης φθορισμού [2]. Απαραίτητη είναι η επεξεργασία των ληφθεισών εικόνων, λόγω του φαινομένου παρεμβολής (cross-talk) με ποικιλία οπτικών φίλτρων [6].

- 2) Μέθοδος μείωσης φθορισμού του δέκτη ή επαναφοράς φθορισμού του δότη (acceptor photobleaching/ donor dequenching). Η αρχή λειτουργίας της είναι αντιστρόφως ανάλογη της βασικής αρχής του φαινομένου FRET [2]. Εφόσον το φαινόμενο FRET βρίσκεται σε εξέλιξη, η αποσιώπηση του φθορισμού του δέκτη, παρουσία μοριακού οξυγόνου και ακτινοβολίας υψηλής έντασης [7], οδηγεί σε επαναφορά του φθορισμού του δότη (Εικόνα 5).
- 3) Απεικόνιση του χρόνου ημιζωής του φθορισμού (Fluorescence Imaging Lifetime Microscopy/ FLIM), η οποία επικεντρώνεται στο προσδιορισμό της διάρκειας φθορισμού του δότη, ύστερα από τη διέγερσή του με σύντομο φωτεινό παλμό και την επακόλουθη, εκθετικού τύπου, απόσβεση του παραγόμενου φθορισμού του [2].
- 4) Η μέθοδος της φασματικής απεικόνισης (spectral imaging- siFRET), η οποία προσομοιάζει με την seFRET, με τη διαφορά ότι λαμβάνεται ένα συγχωνευμένο φάσμα εκπομπής, στο οποίο συνεισφέρει τόσο ο φθορισμός του δότη όσο και του δέκτη. Κατά τη διάρκεια του φαινομένου, στο οπτικό αποτέλεσμα συμμετέχει σταδιακά ο φθορισμός του δέκτη [2].
- 5) Απεικόνιση πόλωσης φθορισμού (Polarization Anisotropy Imaging), η οποία στηρίζεται στην απώλεια της ανισοτροπίας του παραγόμενου φθορισμού, ως αποτέλεσμα του FRET ανάμεσα σε δύο φθορίζοντα μόρια [2]. Η ανισοτροπία του παραγόμενου φθορισμού, η διαφοροποίηση δηλαδή της έντασης αυτού σε διαφορετικές κατευθύνσεις [8], εκδηλώνεται ύστερα από ακτινοβόληση του δείγματος με πολωμένο φως, οπότε και διεγείρονται αποκλειστικά τα φθορίζοντα μόρια εκείνα, με προσανατολισμό παράλληλο προς το άνωμα πόλωσης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας [2].

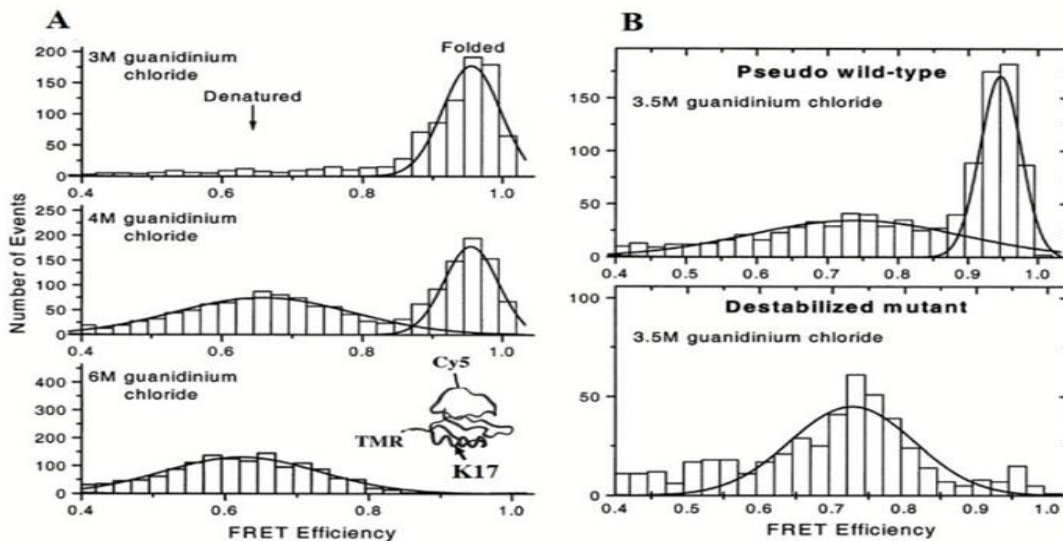


Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση του παραγόμενου φθορισμού του δότη (επάνω) και του δέκτη (κάτω). Οι εικόνες στα αριστερά αφορούν τον παραγόμενο φθορισμό πριν τη φωτολεύκανση (photobleaching) δηλ. τη μη αναστρέψιμη καταστροφή του διεγερμένου φθοροφόρου, ενώ οι εικόνες στα δεξιά τον παραγόμενο φθορισμό, μετά την αποσιώπηση του φθορισμού του δέκτη. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HEK (Human Embryonic Kidney Cells) ενώ ως δότης η eGFP (enhanced green fluorescent protein) και ως δέκτης η mRFP (monomeric red fluorescent protein) πρωτεΐνη [9].

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ FRET ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

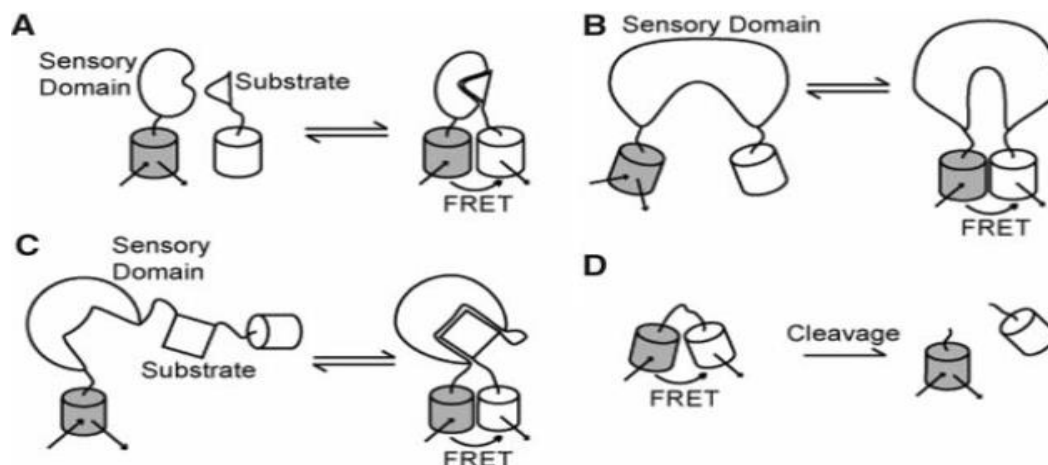
Σημαντικές εφαρμογές της τεχνικής στην κλινική έρευνα αποτελούν η μελέτη της δομής των πρωτεϊνών και των αλληλεπιδράσεών τους με άλλα βιομόρια, καθώς και η μελέτη της δομικής τους ετερογένειας και της κατανομής τους επί των κυτταρικών μεμβρανών [10,11,12]. Ποικίλες παραλλαγές του φαινομένου FRET, όπως η single – molecule FRET

(smFRET), τεχνική η οποία επιτρέπει την αξιολόγηση της FRET αποτελεσματικότητας σε επίπεδο ενός και μόνο επισημασμένου πρωτεϊνικού μορίου και τη δημιουργία ιστογραμμάτων κατανομής που πληροφορούν για τους υπάρχοντες πρωτεϊνικούς πληθυσμούς (Εικόνα 6), οι FRET βιοαισθητήρες [13] κ.ά. σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους και πειραματικά μοντέλα, όπως η νανοτεχνολογία [14] και η μοριακή δυναμική [15], χρησιμοποιούνται για την απεικόνιση και μελέτη των πρωτεϊνών τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, για την ανίχνευση ενζύμων και την αξιολόγηση της δραστηριότητάς τους [16] και για την ανίχνευση τοξινών, ιχνοστοιχείων κτλ. Άλλες εφαρμογές αποτελούν η μελέτη της δομής του DNA [17], η ανίχνευση γονιδιακών μεταλλάξεων και γονιδιακών αλληλομόρφων [18,19], η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time polymerase chain reaction, Real-Time PCR) [20], η ανίχνευση της μεθυλίωσης του DNA [21], η ανίχνευση καρκινικών κυττάρων και η θανάτωσή τους μέσω της φωτοθεραπείας [22]. Σε επίπεδο κυτταρικών μεμβρανών σημαντικές είναι οι εφαρμογές της τεχνικής στη μελέτη της δομής αυτών και των αλληλεπιδράσεών τους με άλλα μόρια και μεμβράνες, αλλά και των διαφοροποιήσεων στο δυναμικό τους [23,24,25,26]. Τέλος, η τεχνική της FRET χρησιμοποιείται σε ανοσολογικές δοκιμασίες αυξημένης ευαισθησίας, κατ'αντιστοιχία της Elisa, για την ανίχνευση τοξινών, παθογόνων και φαρμάκων [27,28,29,4], αλλά και σε πρωτόκολλα αξιολόγησης της αποτελεσματικότητας της φαρμακευτικής αγωγής [30,31]. Χαρακτηριστικά παραδείγματα φαίνονται στις εικόνες 6 - 12 που ακολουθούν.

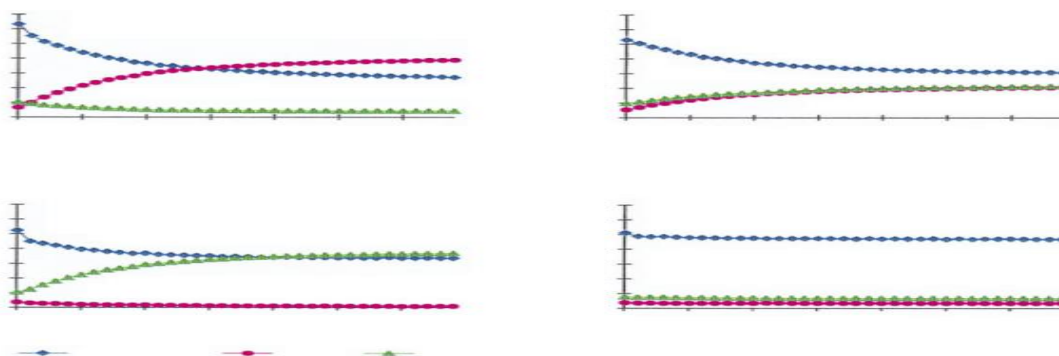


Εικόνα 6. Δομική μελέτη του αναστολέα της χυμοθρυψίνης 2 (chymotrypsin inhibitor 2, CI2) με τη μέθοδο της smFRET για διαφορετικές συγκεντρώσεις διαλύματος μετουσίωσης. Η τεταρτοταγής δομή του αναστολέα φαίνεται στην εικόνα A, στο κατώτερο ιστόγραμμα, δεξιά, με τις αντίστοιχες θέσεις πρόσδεσης των φθορίζουσων ουσιών Cys5 και TMR (6-carboxytetramethylrhodamine). Μετά την εφαρμογή συγκεκριμένων συνθηκών στο διάλυμα όπου εντοπίζονται τα προς μελέτη πρωτεϊνικά μόρια (πχ. μετουσιωτικά διαλύματα), οι οποίες οδηγούν σε αναδιάταξη των δομών τους, είναι δυνατή η ανίχνευση των φυσιολογικών και μετουσιωμένων πρωτεϊνικών δομών, καθώς και τυχόν ενδιάμεσων πρωτεϊνικών δομών, σύμφωνα με μεταβολές στο ιστόγραμμα της FRET αποτελεσματικότητας. Τα ιστογράμματα κατασκευάζονται προσδιορίζοντας την αποτελεσματικότητα FRET για κάθε σεσημασμένο πρωτεϊνικό μόριο του διαλύματος. Η πλήρως συσπειρωμένη δομή (folded) καθώς και η αποδιατεταγμένη δομή (denatured) παρουσιάζουν δύο διαφορετικές κορυφές στο ιστόγραμμα της αποτελεσματικότητας (Εικόνα A). Η παρατήρηση επιπλέον κορυφών στο ιστόγραμμα της αποτελεσματικότητας, υποδηλώνει την παρουσία κάποιας ενδιάμεσης πρωτεϊνικής δομής, πριν την πλήρη αποδιάταξη της πρωτεΐνης. Στα ιστογράμματα B φαίνεται η κατανομή της αποτελεσματικότητας του φαινομένου, ύστερα από την προσθήκη διαλύματος μετουσίωσης στην αγρίου τύπου WT μορφή της πρωτεΐνης CI2 (αναστολέας της χυμοθρυψίνης 2), καθώς και στην ασταθή, γενετικά τροποποιημένη μορφή του αναστολέα (K17G). Η απουσία δεύτερης κορυφής στο ιστόγραμμα της ασταθούς δομής, υποδηλώνει την απουσία

ενδιάμεσων δομών κατά την αποδιάταξή της (μηχανισμός δύο σταδίων συσπείρωσης, two – state folding mechanism) [10].

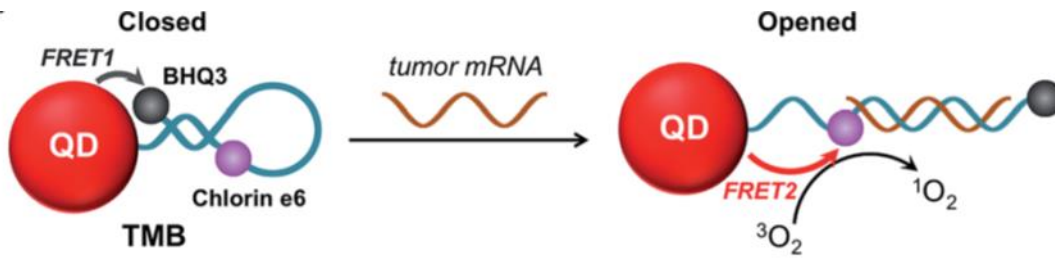


Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση των διαφορετικών τύπων FRET βιοαισθητήρων που αξιοποιούν τις πρωτεϊνικές δομικές αλλαγές. Στην εικόνα A φαίνεται η ανίχνευση μιας διαμοριακής πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης (ενζύμου – υποστρώματος ή υποδοχέα – συνδέτη) με τη βοήθεια της FRET. Στην εικόνα B δίνεται ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα ανίχνευσης των ενδοπρωτεϊνικών δομικών αλλαγών μέσω της FRET. Δεδομένου ότι κάποιες από τις αλλαγές αυτές επάγονται από συγκεκριμένους παράγοντες, είναι δυνατή η ανίχνευση και αξιολόγηση των παραγόντων αυτών. Σε περιπτώσεις όπου η επαγόμενη αναδίπλωση των πρωτεϊνών δεν παράγει ικανοποιητικό FRET σήμα, η πρωτεΐνη χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το υπόστρωμά της (Εικόνα C). Στην τελευταία περίπτωση (Εικόνα D) φαίνεται ότι η πρωτεΐνη χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το υπόστρωμά της (Εικόνα C). Στην τελευταία περίπτωση (Εικόνα D) φαίνεται ότι η πρωτεΐνη χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το υπόστρωμά της (Εικόνα C). Στην τελευταία περίπτωση (Εικόνα D) φαίνεται ότι η πρωτεΐνη χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το υπόστρωμά της (Εικόνα C). Στην τελευταία περίπτωση (Εικόνα D) φαίνεται ότι η πρωτεΐνη χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το υπόστρωμά της (Εικόνα C). Στην τελευταία περίπτωση (Εικόνα D) φαίνεται ότι η πρωτεΐνη χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το υπόστρωμά της (Εικόνα C).

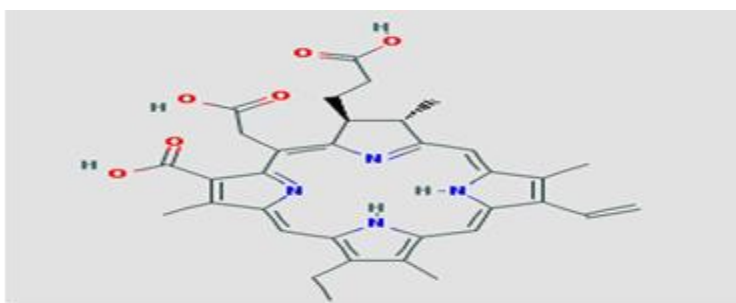


Εικόνα 8. Χαρακτηριστικά διαγράμματα του παραγόμενου φθορισμού στη μέθοδο TDI (Thiol-disulfide interchange) για την ανίχνευση της μετάλλαξης ΔF508. Η μέθοδος περιλαμβάνει την αξιοποίηση PCR εκκινητών επισημασμένων με φλουορεσκεΐνη, κλασικών dNTPs (deoxy-nucleotide triphosphate) καθώς και σεσημασμένων ddNTPs (dideoxy-nucleotide triphosphate), με τις φθορίζουσες ουσίες ροδαμίνη και TAMRA ((N,N,N',N'-Tetramethyl- 5(6)-carboxyrhodamine, που αναφέρεται και ως TMR στην εικ. 6), αντίστοιχα, με διαφορετική ειδικότητα σε διαφορετικά αλληλόμορφα. Η παρουσία του ενός ή και των δύο αλληλομόρφων (φυσιολογικού & μεταλλαγμένου), οδηγεί σε FRET ανάμεσα στον PCR εκκινητή και τα ddNTPs, με συνέπεια μεταβολές στον παραγόμενο φθορισμό. Έτσι, η αύξηση του φθορισμού της ροδαμίνης (ροζ), η μείωση του φθορισμού της φλουορεσκεΐνης (μπλε) και η σταθερότητα στο φθορισμό TAMRA (πράσινο) (Εικόνα επάνω αριστερά) υποδηλώνει ομοζυγωτία για το φυσιολογικό αλληλόμορφο. Η αύξηση του φθορισμού της ροδαμίνης και του TAMRA και η μείωση του φθορισμού της φλουορεσκεΐνης υποδηλώνει ετεροζυγωτία (φυσιολογικό & μεταλλαγμένο αλληλόμορφο) (Εικόνα επάνω δεξιά), ενώ η μείωση του φθορισμού της

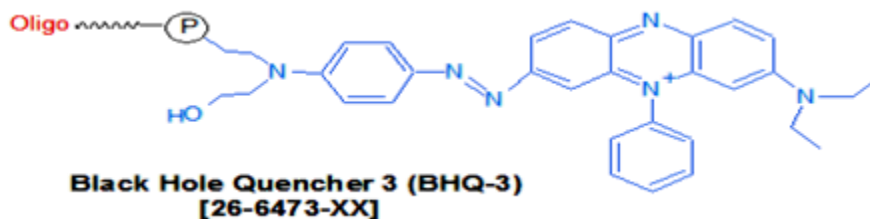
φλουορεσκεΐνης, η αύξηση του TAMRA και η σταθερότητα του φθορισμού της ροδαμίνης υποδηλώνει ομοζυγωτία για το παθολογικό αλληλόμορφο (Εικόνα κάτω αριστερά). Η εικόνα κάτω δεξιά αφορά το αρνητικό control [19].

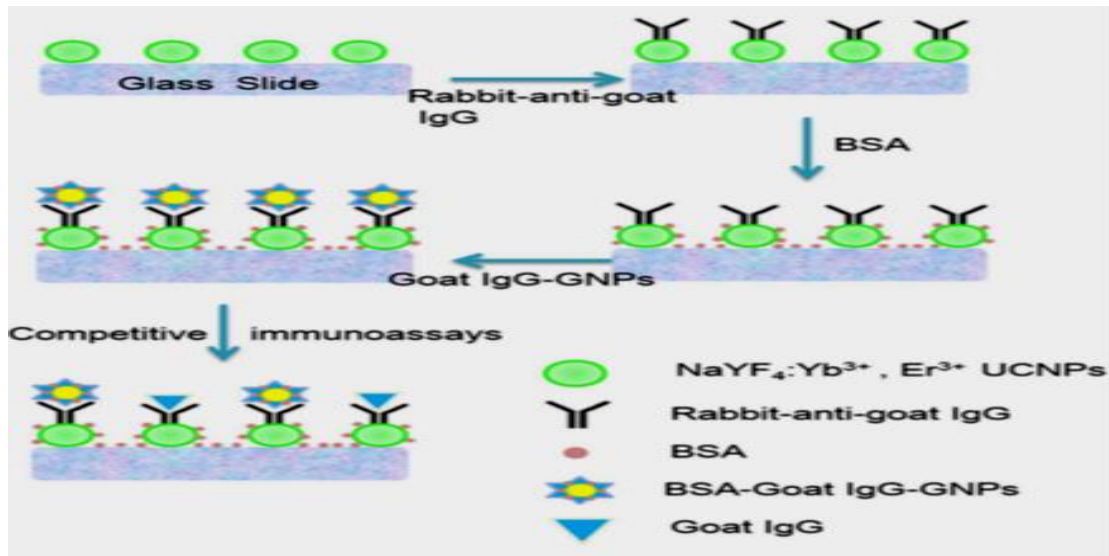


Εικόνα 9. Ο διδιάστατος νουκλεοτιδικός μοριακός φάρος TMB ("two -dimensional" molecular beacon) στη θεραπεία και διάγνωση του καρκίνου. Ο μοριακός φάρος έχει τη χαρακτηριστική δομή DNA φουρκέτας και αποτελείται από 3 φθορίζουσες ουσίες: μια κβαντική κουκκίδα QD, ένα μόριο αποσβέτη BHQ3 (Black Hole Quencher, BHQ3) και ένα φωτο-ευαισθητοποιητή Chlorin e6 (photosensitizer, PS). Απουσία του νεοπλασματικού mRNA, η DNA φουρκέτα διατηρεί την κλειστή της δομή, με αποτέλεσμα η κοντινή απόσταση ανάμεσα στα μόρια QD και BHQ3 να διατηρεί το μοριακό σύστημα στο σκοτάδι. Παρουσία του καρκινικού mRNA, η DNA φουρκέτα αναδιπλώνεται και προσδένεται λόγω συμπληρωματικότητας στο mRNA του όγκου. Η απομάκρυνση του BHQ3, απελευθερώνει το QD φθορισμό, ενεργοποιώντας, μέσω FRET το φωτο- ευαισθητοποιητή. Η ενεργοποίηση του τελευταίου οδηγεί στην παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου, που θανατώνουν τα νεοπλασματικά κύτταρα. Σε ποντίκια σε διάστημα 10 ημερών στην περιοχή της έγχυσης παρατηρείται μείωση του καρκινικού όγκου κατά 63%. [22].

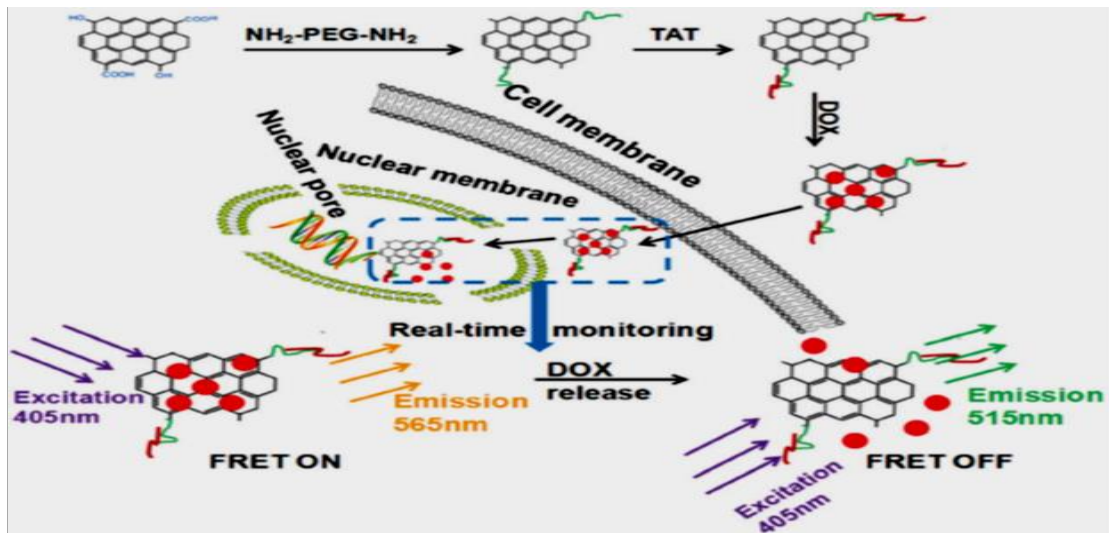


Εικόνα 9α. Ο φωτο-ευαισθητοποιητής Chlorin e6 ή phytychlorin.

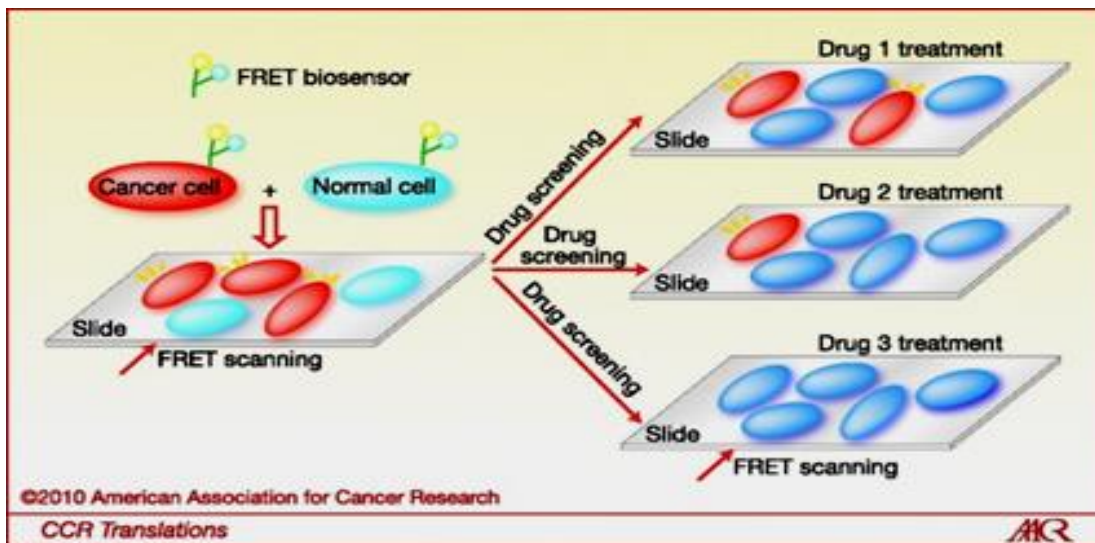




Εικόνα 10. FRET ανταγωνιστική ανοσολογική *in situ* δοκιμασία σταθερής φάσης σε δείγμα ολικού αίματος για την ανίχνευση της ανοσοφαιρίνης IgG αιγός. Προηγήθηκε η ακινητοποίηση των νανοσωματιδίων UCNPs (Upconverting nanoparticles) σε γυάλινη επιφάνεια και η σήμανσή τους με έναντι αιγός anti – goat αντισώματα κονίκλου. Ταυτόχρονα, χρησιμοποιήθηκαν νανοσωματίδια χρυσού (gold nanoparticles, GNPs), σεσημασμένα με αντισώματα αιγός. Η απουσία των IgG αντισωμάτων από το δείγμα, επιτρέπει την απρόσκοπτη σύνδεση των νανοσωματιδίων χρυσού στα anti-goat αντισώματα κονίκλου και τη μεταφορά ενέργειας μέσω του φαινομένου FRET (αναστολή του παραγόμενου φθορισμού του δέκτη). Ωστόσο, τα αντισώματα IgG αιγός ανταγωνίζονται τα BSA (Bovine serum albumin) – Goat – IgG - GNPs για τις θέσεις πρόσδεσης, περιορίζοντας το φαινόμενο FRET. Ο βαθμός αποκατάστασης του φθορισμού των UCNPσ συνδέεται και με τη συγκέντρωση των IgGs αιγός στο δείγμα [32].



Εικόνα 11. Ανίχνευση της ενδοπυρηνικής μεταφοράς φαρμάκων μέσω FRET. Στο παραπάνω πειραματικό μοντέλο χρησιμοποιήθηκαν κβαντικές κουκκίδες γραφενίου, λειτουργώντας ως μόρια μεταφορείς του χημειοθεραπευτικού DOX (doxorubicin) σε καρκινικά κύτταρα αλλά και ως δότες του FRET συστήματος. Ως FRET δέκτης χρησιμοποιήθηκε η ίδια η ουσία DOX. Η είσοδος των κβαντικών κουκκίδων εντός του πυρήνα, μέσω του προσδεμένου πεπτιδίου – ενεργοποιητή της μεταγραφής TAT (TAT peptide: GRKKRRQRRRPQ, transactivator of transcription) που διευκολύνει τη διέλευσή τους μέσω της κυτταρικής μεμβράνης, και η ενδοπυρηνική απελευθέρωση του φαρμάκου, οδηγεί σε διακοπή της FRET και ανάκαμψη του φθορισμού του δότη [30].



Εικόνα 12. Αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της χορηγούμενης θεραπείας σε ιστολογικά δείγματα με την τεχνική της FRET. Η μέθοδος αφορά το σχεδιασμό ενός FRET βιοαισθητήρα για την αξιολόγηση της δραστηριότητας της κινάσης BCR-ABL. Οι ασθενείς με χρόνια μυελογενή λευχαιμία (*chronic myelogenous leukemia, CML*) σε ποσοστό >90% έχουν μια χρωμοσωμική ανωμαλία, που ονομάζεται χρωμόσωμα της Φιλαδέλφειας Ph (αμοιβαία αντιμετάθεση γενετικού υλικού στα χρωμοσώματα 9 και 22). Το βραχύ χρωμόσωμα Ph δίνει εντολή για τη σύνθεση της τυροσινικής κινάσης Bcr-Abl, που διαταράσσει τους μηχανισμούς σηματοδότησης που σχετίζονται με την παραγωγή λευκών αιμοσφαιρίων. Η παραγωγή FRET σήματος συνεπάγεται αυξημένη δραστηριότητα της εν λόγω κινάσης, κατηγοριοποιώντας τα κύτταρα που εμπλέκονται στην παραγωγή FRET σήματος ως καρκινικά. Κατ'έπекταση, κατά τη χορήγηση αποτελεσματικής θεραπείας, μείωση του καρκινικού πληθυσμού συνεπάγεται μείωση του FRET σήματος [31].

Ολοκληρώνοντας αυτή την ανασκόπηση αξίζει να αναφερθεί ένα πρόσφατο, χαρακτηριστικό παράδειγμα εφαρμογής της τεχνικής FRET στη μικροσκοπία δείγματος DNA, με όριο ανίχνευσης αντίστοιχο του κλασσικού μικροσκοπίου φθορισμού. Οι Noor και Knull αξιοποίησαν μια λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) και μια κάμερα ipad σε μια QD – FRET δοκιμασία DNA υβριδισμού σταθερής φάσης. Ως δότης χρησιμοποιήθηκε ένα κβαντική κηλίδα που εκπέμπει στο πράσινο (green – emitting QD), προσδεσμένη σε μια ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία συμπληρωματική του προς ανίχνευση DNA, και η Cy3, προσδεσμένη είτε στη DNA αλληλουχία – στόχο είτε σε μια συμπληρωματική αλληλουχία του (τύπου sandwich). Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου ήταν ελάχιστα κάτω από το όριο ανίχνευσης ενός κλασσικού μικροσκοπίου φθορισμού [34].

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η τεχνική της FRET είναι αρκετά διαδεδομένη στους χώρους της Μοριακής Βιολογίας και της Κλινικής έρευνας. Οι προαναφερθείσες, και όχι μόνο, FRET μέθοδοι, σε συνδυασμό με την ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας, επιτρέπουν την απλοποίηση των αναλύσεων, εξασφαλίζοντας σημαντική ευαισθησία και ειδικότητα, ελάχιστη απαιτούμενη ποσότητα και απλή επεξεργασία του δείγματος, εύκολη αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και μικρό χρόνο ανάλυσης, αποτελώντας σημαντική επένδυση για μελλοντικές διαγνωστικές εφαρμογές [14,33].

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Sasmal D.K. et al, *Single-Molecule Fluorescence Resonance Energy Transfer* S.A. Hussain et al. *An Introduction to Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)*, arxiv. org 2009

- 2) Piston DW and Kremers GJ, *Fluorescent Protein FRET: the good, the bad and the ugly*, *Trends Biochem Sci.* 2007, 32(9):407-14
- 3) Hochreiter B. et al. *Fluorescent proteins as genetically encoded FRET biosensors in life sciences*, *Sensors (Basel)*, 2015, 15(10):26281-314
- 4) I. L. Medintz et al. *Materials for Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis: Beyond Traditional Donor – Acceptor Combinations*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006, 45:4562 – 4588
- 5) Bajar BT. et al. *A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs*, *Sensors* 2016, 16 (9),1488
- 6) <http://coil.bio.ed.ac.uk/sensitized.html>
- 7) Swift, S.R., Trinkle-Mulcahy, L. *Basic principles of FRAP, FLIM and FRET*. *Proc. Royal Mic. Soc.* 2004, 39, 3–10
- 8) https://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence_anisotropy
- 9) <http://coil.bio.ed.ac.uk/acceptor.html>
- 10) Sasmal D.K. et al, *Single-Molecule Fluorescence Resonance Energy Transfer in Molecular Biology*, *Nanoscale* 2016, 8(48):19928-19944
- 11) Gambin Y. and Deniz A. *Multicolor single-molecule FRET to explore protein folding and binding*, *Mol Biosyst* 2010, 6(9):1540-7
- 12) Linden S. et al, *Terbium-based time-gated Förster resonance energy transfer imaging for evaluating protein – protein interactions on cell membranes*, *Dalton Trans.* 2015, 44(11):4994-5003
- 13) Li I.T. et al, *Protein biosensors based on the principle of fluorescence resonance energy transfer for monitoring cellular dynamics*, *Biotechnol Lett* 2006, 28:1971–1982
- 14) Benz C. et al, *Protein–protein interaction analysis in single microfluidic droplets using FRET and fluorescence lifetime detection*, *Lab Chip* 2013, 13(14):2808-14
- 15) Okamoto K. and Sako Y., *Recent advances in FRET for the study of protein interactions and dynamics*, *Current Opinion in Structural Biology* 2017, 46:16–23
- 16) Fretwell JF. et al, *Characterization of a randomized FRET library for protease specificity determination*, *Mol Biosyst* 2008, 4(8):862-70
- 17) Lee J.Y. et al, *Extreme conformational diversity in human telomeric DNA*, *Proc. Natil. Acad. Sci. U.S.A.* 2005, 102:18938–18943
- 18) Tang W. et al, *Single quantum dot-based biosensor for DNA point mutation assay*, *Analyst*. 2015, 140(17):5936-43
- 19) Chen X. et al, *Fluorescence energy transfer detection as a homogeneous DNA diagnostic method*, *Proc. Natl. Acad. Sci* 1997, Vol. 94, pp. 10756–10761
- 20) Navarro E. et al, *Real-time PCR detection chemistry*, *Clin Chim Acta* 2014, 439:231-50
- 21) Wu M. et al, *Sequence-specific detection of cytosine methylation in DNA via FRET mechanism between upconversion nanoparticles and gold nanorods*, *Chem. Commun* 2016, 52, 8377-8380
- 22) Wu D. et al, *A two-dimensional molecular beacon for mRNA activated intelligent cancer theranostics*, *Chem. Sci.* 2015, 6, 3839-3844
- 23) Szolosi J. et al, *Applications of fluorescence resonance energy transfer for mapping biological membranes*, *Reviews in Molecular Biotechnology* 82 2002, 251-266
- 24) Sun Z. et al, *Probing cell surface interactions using atomic force microscope cantilevers functionalized for quantum dot-enabled Förster resonance energy transfer*, *Journal of Biomedical Optics* 2014, Vol. 14(4), 040502-1 – 040502-3
- 25) Diao J. et al, *Single-molecule FRET study of SNARE-mediated membrane fusion*, *Biosci. Rep* 2011, 31 ,457–463
- 26) http://e3f99a4a3891332df177-b511c07cae915b9d1958179eaa4432ea.r82.cf1.rackcdn.com/assets/tech_resources/FRET%20White%20Paper.pdf

- 27) Li T. et al, *A label-free, direct and noncompetitive FRET immunoassay for ochratoxin A based on intrinsic fluorescence of an antigen and antibody complex*, *Chem. Commun* 2011, 47, 9098–9100
- 28) Kattke M.D. et al, *FRET-Based Quantum Dot Immunoassay for Rapid and Sensitive Detection of Aspergillus amstelodami*, *Sensors* 2011, 11, 6396-6410
- 29) Zeng Q. et al, *Multiple homogeneous immunoassays based on a quantum dots–gold nanorods FRET nanoplatfom*, *Chem. Commun* 2012, 48, 1781–1783
- 30) Chen H. et al, *A graphene quantum dot-based FRET system for nuclear-targeted and real-time monitoring of drug delivery*, *Nanoscale* 2015, 7, 15477-15486
- 31) Hussain S.A. et al, *Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) sensor* *J. Spectrosc. Dyn.* 2015, 5:7
- 32) Li C. et al, *One-step in situ solid-substrate-based whole blood immunoassay based on FRET between upconversion and gold nanoparticles*, *Biosens Bioelectron* 2017, 92:335-341
- 33) Noor M.O. et al, *On-chip multiplexed solid-phase nucleic acid hybridization assay using spatial profiles of immobilized quantum dots and fluorescence resonance energy transfer*, *Analytica Chimica Acta* 788 2013, 148– 157
- 34) Geißler D. and Hildebrandt N., *Recent developments in Förster resonance energy transfer (FRET) diagnostics using quantum dots.*, *Anal Bioanal Chem.* 2016, 408(17):4475-83.

Δημοτικά τραγούδια της Θράκης.

ΣΑΡΑΝΤΑ ΜΕΡΕΣ – κάλαντα Δυτ. Θράκης.

Σαράντα μέρις, σαράντα νύχτις η Παναγιά μας κοιλοπονούσι, κοιλοπονούσι, παρακαλούσι, τους Αρχαγγέλους τους Ιεράρχες: «Σεις Αρχαγγέλοι και Ιεράρχες να πά'να φέρτι μύρο κι μόσχο» Κι οι Αρχαγγέλοι για μύρο πάνε κι οι Ιεράρχες για μόσχο τρέχουν. Κι ώσπου να πάνε κι ώσπου να έρθουν η Παναγιά μας ξιλευτερώθ'κι. Ξιλευτερώθ'κι κι φανερώθ'κι, μέσα στις δάφνες, στα κυπαρίσσια. Χριστός γεννιέτι χαρά στον κόσμο, χαρά στον κόσμο, στα παλληκάρια.

Chronis Aidonidis & Nektaria Karantzi, <https://www.youtube.com/watch?v=oDp62vmlI0I>

ΔΩ ΣΤΑ ΛΙΑΝΟΧΟΡΤΑΡΟΥΔΙΑ – ζωναράδικος χορός.

Δω στα λια-κι αμάν – δω στα λιανοχορταρούδια, Δω στα λιανοχορταρούδια τι τρανός χουρός π'θα γένει. Τι τρανός – κι αμάν αμάν - τι τρανός χουρός π'θα γένει, Τι τρανός χουρός π'θα γένει, σα γαιτάνι θα πααίνει. Πέντε πέρδικις πιτούσαν μες'τον κάμπου λουγυρνούσαν για τι μας τα δυο ρουτούσαν, ποια είναι άσπρη, ποια είναι ρούσσα.

Χρόνης Αηδονίδης, https://www.youtube.com/watch?v=via_OqRAIRs

ΤΟ ΖΟΥΜΠΟΥΛΑΚΙ ΜΟΥ – χασάπικος χορός.

Ανάμεσα το ζουμπουλάκι μου – ανάμεσα να σε δυο βουνά, ζουμπουλάκι μου γαλάζιο - κλίμα ήταν φορτωμένο. Κάμνει σταφύ - το ζουμπουλάκι μου - κάμνει σταφύλι ραζακί, ζουμπουλάκι μου γαλάζιο – και το κρασί μελάτο. Το πίνουν οι άντρες δε μεθούν, μάνες παιδιά δεν κάμνουν. Ας το 'πινε και η μάνα μου, να μη είχε καμ' και μένα. Που μ'έκαμε και μ'έδωσε πολύ μακριά στα ξένα, όλο στα ξένα πολεμώ, στα ξένα παραδέρνω.

Χρόνης Αηδονίδης, <https://www.youtube.com/watch?v=tCW6w2Se5Co>



Παρουσίαση τοπικών χορών στην έναρξη του 16ου Πανελληνίου Συνεδρίου μας από τον Πολιτιστικό Σύλλογο Τριγωνιωτών Αλεξανδρούπολης, που φέτος γιορτάζει τα 25 χρόνια από την ίδρυσή του. Τα μέλη του κατάγονται από το Τρίγωνο Έβρου, που οριοθετείται από τους ποταμούς Έβρο και Άρδα και περιλαμβάνει 17 χωριά.

