

Περιεχόμενα

- ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ
- ΤΑ ΝΕΑ GNRH ΑΝΑΛΟΓΑ, CON3 ΚΑΙ CON7 ΑΣΚΟΥΝ ΑΝΤΙΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ
- Η ΣΤΙΒΑΔΑ ΤΟΥ ΟΖΟΝΤΟΣ

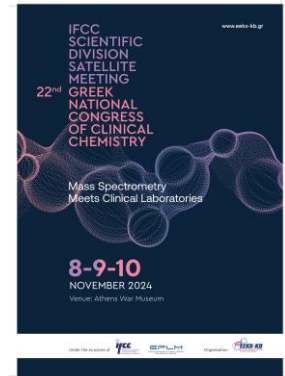
Συντακτική Επιτροπή

ΑΝΔΡ. ΓΡΗΓΟΡΑΤΟΥ

ΕΥΗ ΚΩΝΣΤΑ

ΑΓΓΕΛ. ΜΕΛΠΙΔΟΥ

ΜΑΡΙΛ. ΣΤΑΜΟΥΛΗ



ΕΝΗΜΕΡΩΤΙΚΟ ΔΕΛΤΙΟ 51 – ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2024

Αγαπητοί συνάδελφοι,

σε αυτό το τεύχος περιλαμβάνονται ενδιαφέροντα άρθρα που αναφέρονται στις Υψηλής Απόδοσης Μεθοδολογίες Αλληλούχησης (High Throughput DNA Sequencing-HTS) και τα νέα GnRH ανάλογα, con3 και con7, που ασκούν αντινεοπλασματική δράση σε καρκινικά κύτταρα ενδομητρίου. Εν συνεχεία διαβάστε και άρθρο σχετικό με τον εορτασμό της Διεθνούς Ημέρας για τη διατήρηση της στιβάδας του όζοντος.

Εύχομαι σε όλους υγεία και ευημερία.

Με φιλικούς χαιρετισμούς,

Ανδριανή Γρηγοράτου.

Στη ζωή, "Έχεις τα πινέλα, έχεις τα χρώματα, ζωγράφισε τον παράδεισο και μπες μέσα!" Νίκος Καζαντζάκης, Ο Χριστός ξανασταυρώνεται (1954).

5 Νοεμβρίου: Πανευρωπαϊκή ημέρα κλινικών εργαστηρίων



<https://www.eflm.eu/site/tg-european-lab-day/5november>

Welcome to European Laboratory Day 2024! On November 5th, we come together to celebrate the vital, yet often unseen, contributions of laboratory medicine professionals across Europe—from local labs to world-class research centres.

Laboratory Medicine professionals are working behind the healthcare scene 24/7: we are at the heart of modern medicine, driving advancements in medical research, providing precise diagnoses, and ensuring effective treatments for millions. Whether it's routine tests guiding daily healthcare decisions or groundbreaking discoveries, our work is essential in shaping a healthier future for all. Our profession is vital in healthcare and it is our duty to show what we do and who is behind the numbers from a laboratory report.

European Laboratory Day initiative has the aim to incite EFLM members to organize an open-door day in their laboratories and organize activities in public that promote and advocate the role of Laboratory Medicine. Join us in celebrating the diversity, skills, and dedication of laboratory medicine professionals who are helping to build healthier communities across Europe and beyond!

[1st EFLM EuLabDay 2022](#): Lab Medicine to the front Public Health Scene

[2nd EFLM EuLabDay 2023](#): video with the different celebrations in European countries

Let's Make European Laboratory Day Bigger and Better Together!

Υψηλής Απόδοσης Μεθοδολογίες Αλληλούχισης (High Throughput DNA Sequencing-HTS)

Διαμάντω Κουνιάκη, Ph.D.

Ανοσολογικό εργαστήριο ΠΓΝ «Ο Ευαγγελισμός»

Αλληλογραφία: kouniakitzeni@yahoo.gr

Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια τεράστιες τεχνολογικές εξελίξεις παρείχαν στις βιολογικές επιστήμες την δυνατότητα απόκτησης μεγάλου όγκου γενετικών δεδομένων υψηλότερης ανάλυσης και χαμηλότερου κόστους σε σχετικά σύντομα χρονικά διαστήματα. Οι νέες αυτές στρατηγικές είναι γνωστές ως Υψηλής Απόδοσης Μεθοδολογίες Αλληλούχισης (High Throughput DNA Sequencing-HTS) ή ως Μαζική Παράλληλη Αλληλούχιση (Massive Parallel Sequencing). Πρόκειται για καινοτόμα γονιδιωματικά εργαλεία τα οποία επιτρέπουν την ταχεία παράλληλη μαζική παραγωγή γενετικών δεδομένων σε μία μόνο αντίδραση, ξεπερνώντας τους περιορισμούς της συμβατικής Sequencing-based Typing-SBT ("πρώτη γενιά αλληλούχισης"). Σήμερα, βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στη γονιδιωματική διαγνωστική, αλλά και τη θεραπευτική προσέγγιση σε νόσους όπως ο καρκίνος, ο σακχαρώδης διαβήτης, οι νευροαναπτυξιακές νόσοι όπως η σχιζοφρένεια και ο αυτισμός, καθώς και σε άλλες πολυπαραγοντικές νόσους. Παρέχουν δε τη μοναδική δυνατότητα αναγνώρισης όλων των ειδών μεταλλάξεων, σημειακών μεταλλάξεων και πολυμορφισμών (SNPs), ή και μεγαλύτερων διαταραχών όπως οι αλλαγές στον αριθμό των αντιγράφων και τις χρωμοσωμικές αναδιατάξεις.

Σήμερα διατίθεται μία σειρά πλατφορμών αλληλούχισης, οι οποίες με βάση το μήκος του τμήματος DNA/RNA που αλληλουχείται μπορούν να κατηγοριοποιηθούν στις:

- α). πλατφόρμες δεύτερης γενιάς (2^{ης} ή επόμενης γενιάς αλληλούχισης, Next Generation Sequencing-NGS): είναι εμπορικά διαθέσιμες πλατφόρμες ανάλυσης μεσαίου μεγέθους αναγνωσμάτων (250-1000b), κατάλληλες για κλινικές εφαρμογές, οι οποίες προϋποθέτουν PCR ενίσχυση (Life Technology SOLiD, Personal Genome Machine-PGM, Proton και Illumina HiSeq/MiSeq συστήματα) και
- β). πλατφόρμες τρίτης γενιάς (3^{ης} γενιάς αλληλούχισης ή Third Generation Sequencing-TGS): με αυτές επιτυγχάνεται ανάλυση μεγάλου μεγέθους αναγνωσμάτων (>10kb) (Helicos, Pacific Biosciences και Oxford NanoporeTM), στις οποίες η αλληλούχιση γίνεται άμεσα.

Βασικές αρχές αλληλούχισης NGS

Οι πλατφόρμες 2^{ης} γενιάς δεν μπορούν να ανιχνεύσουν μονού μορίου DNA (single-molecule) αντιδράσεις. Για αυτό το λόγο απαιτείται ενίσχυση του προτύπου DNA/RNA για την παραγωγή επαρκούς σήματος και το οποίο

επιτυγχάνεται με την παρασκευή βιβλιοθήκης (sequencing library). Η ροή εργασίας για την παρασκευή της βιβλιοθήκης για την 2^η γενιάς NGS περιλαμβάνει:

α) διάτμηση του DNA/RNA μορίου με ενζυμική πέψη (fragmentation) κάνοντας χρήση είτε ενζύμων DNase I/fragmentase, είτε μέσω υπερήχων για να διασπαστούν τα πρότυπα DNA σε μικρότερα τμήματα ώστε να καταστούν ικανά για αλληλούχιση (100-5000 bp),

β) επιλογή του επιθυμητού μεγέθους των DNA στόχων,

γ) άμβλυνση των 5' άκρων μέσω φωσφορυλίωσης και προσθήκη στα 3' άκρα poly-A ουράς (end-repair),

δ) πρόσδεση ειδικών ολιγονουκλεοτιδικών προσαρμογέων (adaptors) στα άκρα των γραμμικών θραυσμάτων της βιβλιοθήκης και σήμανση των δειγμάτων μέσω διαφορετικών γραμμοκωδικοποιημένων εκκινητών (primers) που κωδικοποιούν ειδικά για την ταυτότητα του δείγματος (DNA barcoding) και οι οποίοι χρησιμεύουν ως εκκινητές για πρόσθια (forward) ή/και ανάστροφη (reverse) ενίσχυση. Η πολυπλεξία των δειγμάτων μέσω του DNA barcoding, επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση μεγάλου όγκου δειγμάτων (indexes) αυξάνοντας έτσι σημαντικά την απόδοση της διαδικασίας και

ε) ποσοτικοποίηση του τελικού προϊόντος βιβλιοθήκης για αλληλούχιση.

Ο χωροταξικός διαχωρισμός και η ακινητοποίηση των κλωνικών πληθυσμών DNA για την αλληλούχιση γίνεται πάνω σε στερεό υπόστρωμα. Βάση των διαφορετικών μεθόδων που μπορούν να εφαρμοστούν στην ακινητοποίηση του DNA διατίθενται σήμερα στο εμπόριο τρεις τεχνολογίες:

(α) υψηλής απόδοσης αλληλούχιση μέσω δημιουργίας πυροσυσσωματώματος πάνω σε σφαιρίδια (Pyrosequencing, 454/Roche),

(β) αλληλούχιση μέσω πρόσδεσης σε σφαιρίδια (Sequencing by Ligation-SBL, Roche/Ion Torrent) και

(γ) αλληλούχιση με σύνθεση σε γυάλινο υπόστρωμα (Sequencing by Synthesis-SBS, Illumina/Solexa, ABI/SOLiD).

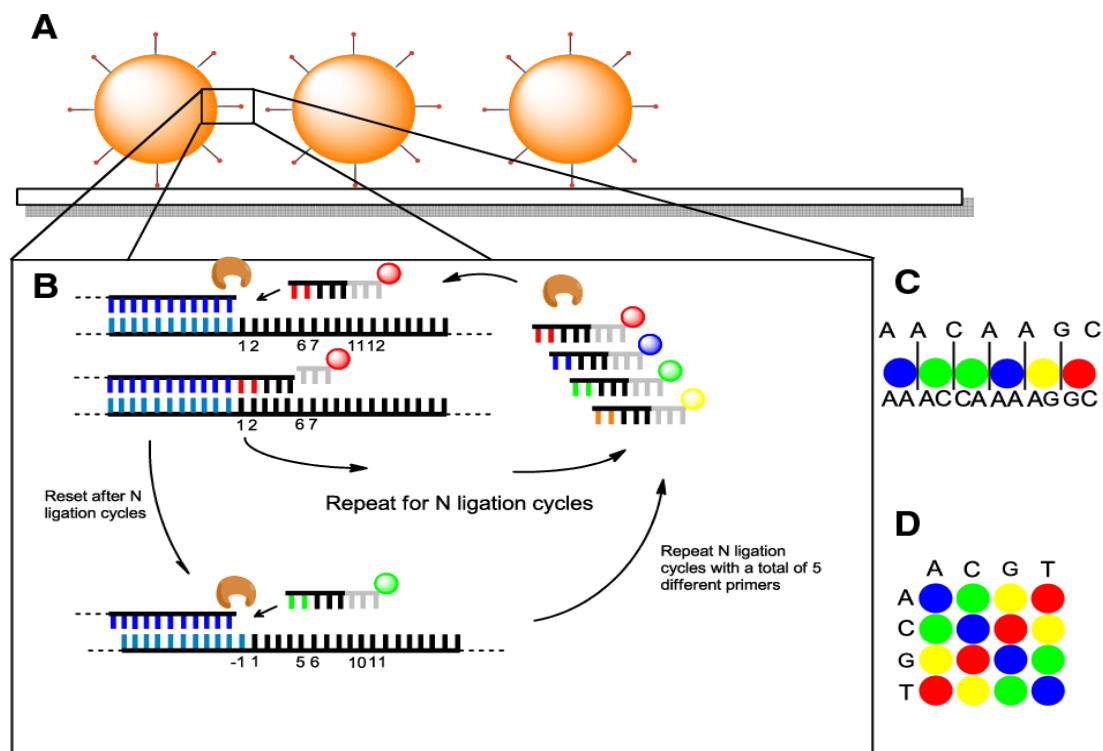
Κάθε πλατφόρμα NGS εφαρμόζει μια σειρά εκατομμυρίων επαναλαμβανόμενων χημικών μικροαντιδράσεων που εκτελούνται και ανιχνεύονται αυτόματα σε κυψελίδα ροής ή σφαιρίδιο πάνω στα οποία βρίσκονται ακινητοποιημένα πρότυπα DNA. Η ανάλυση των δεδομένων περιλαμβάνει την επεξεργασία οπτικών εικόνων για τη δημιουργία αλληλουχιών βάσεων και διεξάγεται από το λογισμικό της πλατφόρμας. Ο τεράστιος όγκος των παραγόμενων δεδομένων (megabases - gigabases) συναρμολογείται και ευθυγραμμίζεται με γονιδίωμα αναφοράς, εάν είναι διαθέσιμο (resequencing), ή διεξάγεται de novo συναρμολόγηση για την δημιουργία μιας νέας αλληλουχίας αναφοράς.

Πλατφόρμες 2^{ης} γενιάς μεθοδολογίας αλληλούχισης (2th ή Next Generation Sequencing-NGS)

1. Life Technologies/SOLiD

Η αλληλούχιση μέσω της Oligo Ligation Detection (SOLiD) τεχνολογίας διεξάγεται μέσω διαδοχικών κύκλων πρόσδεσης, στους οποίους ο εκκινητής δεσμεύεται σε οκταμερή ολιγονουκλεοτιδικό ανιχνευτή σημασμένο με φθορίζουσα ουσία. (Εικόνα 1) Η αλληλούχιση των βιβλιοθηκών πραγματοποιείται σε στερεό υπόστρωμα (κυψελίδα ροής, flow-cell). Στα τέλη του 2012 κυκλοφόρησε το σύστημα αλληλούχισης SOLiD 5500xl ικανό να παράξει μήκος αναγνωσμάτων 85bp, ακρίβειας 99,99% και απόδοσης 30Gb/διαδρομή. Το σύστημα SOLiD εμφανίζει το χαμηλότερο ποσοστό σφάλματος με συνηθέστερο τύπο την αντικατάσταση (substitution). Εν τούτοις, η ανάλυση είναι δαπανηρή, καθώς απαιτεί εκτεταμένο δίκτυο υπολογιστών, εξειδικευμένο προσωπικό ενώ ο χρόνος εξέτασης είναι αρκετά μεγάλος (επτά ημέρες).

Ligase Sequencing (SOLiD)



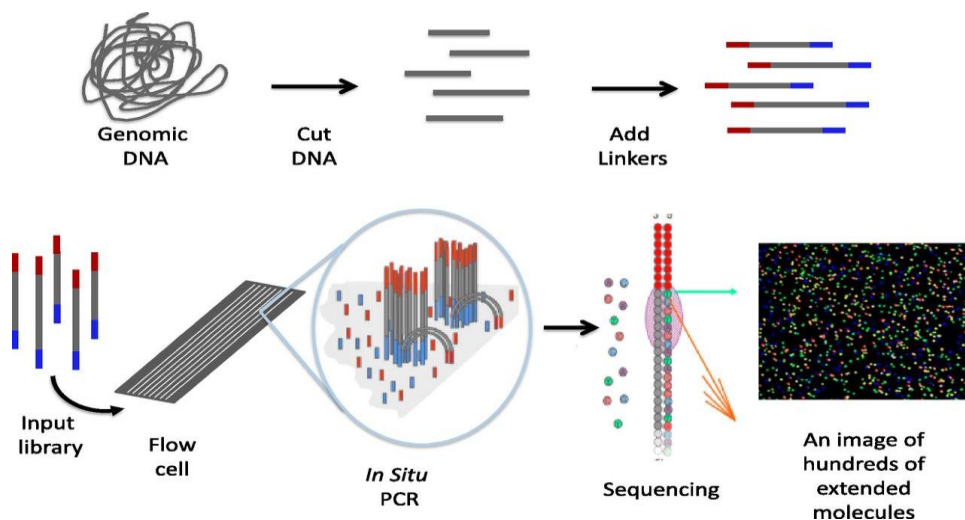
Εικόνα 1. SOLiD αλληλούχιση με Ligation τεχνολογία: προετοιμασία της βιβλιοθήκης, πρόσδεση και ενίσχυση σε γαλάκτωμα, ακολουθεί η εναπόθεση των σφαιριδίων και η αλληλούχιση μέσω σύνδεσης, αλλαγή του εκκινητή και επανάληψη της διαδικασίας. (Τροποποιημένο από Morey M, Fernández-Marmiesse A, Castiñeiras D, Fraga JM, Couce ML, Cocho JA. Corrigendum to "A glimpse into past, present, and future DNA sequencing" [Mol. Genet. Metab. 110 (2013) 3-24]. Mol Genet Metab. 2015;114(3):484. doi:10.1016/j.ymgme.2015.01.009)

2. Illumina / Solexa

Η χημεία της Illumina, βασίζεται στην αλληλούχιση με σύνθεση (SBS). Συνίσταται στην οπτική παρακολούθηση της ενσωμάτωσης από την DNA πολυμεράση των τεσσάρων φθορίζοντων νουκλεοτιδίων συζευγμένων με αναστρέψιμο τερματιστή στο 3'-υδροξυλοτελικό άκρο (reversibly-blocked terminator). Συγκριμένα, συμπληρωματικές ειδικές αλληλουχίες εμπρόσθιων και οπίσθιων ολιγονουκλεοτιδικών adaptors προσαρτώνται στα 5' και 3' άκρα των DNA προτύπων μετά τη δημιουργία βιβλιοθήκης επιτρέποντας την δέσμευσή τους σε στερεή φάση (κυψελίδα ροής). Προς ενίσχυση του σήματος αλληλούχισης, δημιουργούνται "ομάδες" μορίων μονόκλωνου DNA έως και 1000 πανομοιότυπα αντίγραφα του αρχικού προτύπου. Αυτά, συνδεδεμένα με την επιφάνεια της κυψελίδας ροής ενεργούν όχι μόνο ως μόρια σύλληψης για

b διαρκεί περίπου 16 h. την αλληλούχιση των προτύπων, αλλά και ως εκκινήτες για την ενίσχυση της περιοχής γεφύρωσης (PCR bridge amplification). Η σήμανση των τεσσάρων ολιγονουκλεοτιδίων έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε να τερματίζεται ο πολυμερισμός όταν μόνο ένα νουκλεοτίδιο προστίθεται σε κάθε κύκλο πολυμερισμού. (Εικόνα 2)

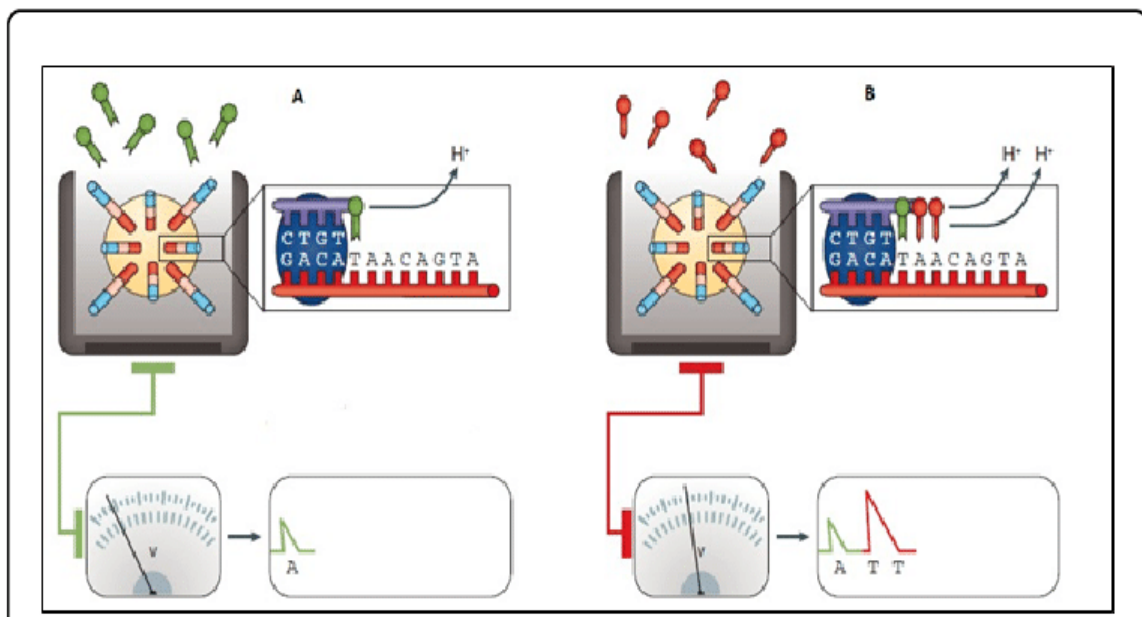
Η Illumina εφαρμόζοντας την τεχνολογία Solexa, η οποία αναπτύχθηκε από το Πανεπιστήμιο του Cambridge, διαθέτει έξι μηχανές αλληλούχισης (NextSeq 500, HiSeq 2500, 3000 και 4000 και HiSeq X5 και X10) με μέση έως υψηλή απόδοση γενετικών δεδομένων/διαδρομή (120-1500 Gb), καθώς και τον εργαστηριακό αναλυτή MiSeq (2011). Το σύστημα αυτό, αν και μικρό σε μέγεθος, έχει απόδοση/διαδρομή από 0,3 έως 15Gb, ενώ τα μήκη των αναγνωσμάτων περιορίζονται στο μέγιστο των 2x150bp. Τα πιο ελκυστικά χαρακτηριστικά της τεχνολογίας Solexa είναι τα σχετικά μεγάλα αναγνώσματα (~300b), η απουσία ομοπολυμερών σφαλμάτων, η υψηλή κάλυψη των δεδομένων αλληλούχισης και η υψηλότερη σε ακρίβεια αλληλούχιση που διατίθεται σήμερα στην αγορά (ποσοστό σφάλματος ~0.1%), ενώ οι αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίων είναι ο συνηθέστερος τύπος σφαλμάτων. Οι χρόνοι πραγμάτωσης της αλληλούχισης παραμένουν αρκετά υψηλοί, καθώς η διαμόρφωση 2x150



Εικόνα 2. Illumina αλληλούχιση με Synthesis τεχνολογία: προετοιμασία του δείγματος DNA, προσκόλληση των τμημάτων στην επιφάνεια, ενίσχυση με bridge PCR, δημιουργία δίκλωνων τμημάτων, αποδιάταξη αυτών, ενίσχυση, προσδιορισμός βάσης, καταγραφή σήματος. (Τροποποιημένο από [Sagar Aryal](#). *Next-Generation Sequencing (NGS) Definition, Types*. *Molecular Biology*. 2022)

3. Ion Torrent

Η αλληλούχιση βασίζεται στη μέτρηση των απελευθερωμένων ιόντων υδρογόνου (H^+) κατά την ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων από την DNA πολυμεράση. Κάθε φρεάτιο της σταθερής επιφάνειας ενίσχυσης (chip) μπορεί να δεχτεί ένα μοναδικό σφαιρικό σωματίδιο ιόντων (Ion Sphere Particle-ISP) το οποίο φέρει, μέσω PCR αντίδρασης γαλακτώματος, κλωνικά ενισχυμένο μόριο προτύπου DNA στόχου. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αλληλούχισης μετά την υβριδοποίηση του εκκινητή στο 5' άκρο της βιβλιοθήκης, την διαδοχική προσθήκη των τεσσάρων νουκλεοτιδίων στο chip με συγκεκριμένη σειρά και την ενσωμάτωση του συμπληρωματικού νουκλεοτιδίου, ακολουθεί απελευθέρωση ιόντων H^+ τα οποία μεταβάλλουν το τοπικό pH του διαλύματος. Η μεταβολή αυτή ανιχνεύεται και μεταφράζεται σε ψηφιακό σήμα από αισθητήρα στον πυθμένα της μικροκυψελίδας. (Εικόνα 3) Τα πλεονεκτήματα της πλατφόρμας Ion Torrent είναι η ταχύτητα των αναλύσεων, καθώς διαθέτει το συντομότερο χρόνο αλληλούχισης πλατφορμών μεσαίου μεγέθους (~3h / 400b). Κύριες αδυναμίες αυτής της μεθοδολογίας είναι η άνιση κάλυψη και ο υψηλός βαθμός σφάλματος λόγω ύπαρξης ομοπολυμερών περιοχών (>3-4 ίδια νουκλεοτιδία), γεγονός που οφείλεται στο ότι όταν δύο ή περισσότερες πανομοιότυπες βάσεις ενσωματώνονται, η καταγραφόμενη μετατόπιση σήματος δεν αυξάνεται αναλογικά του αριθμού των βάσεων, οδηγώντας σε μία ακολουθία σφαλμάτων τύπου προσθήκη/διαγραφή σε ποσοστό ~1%.



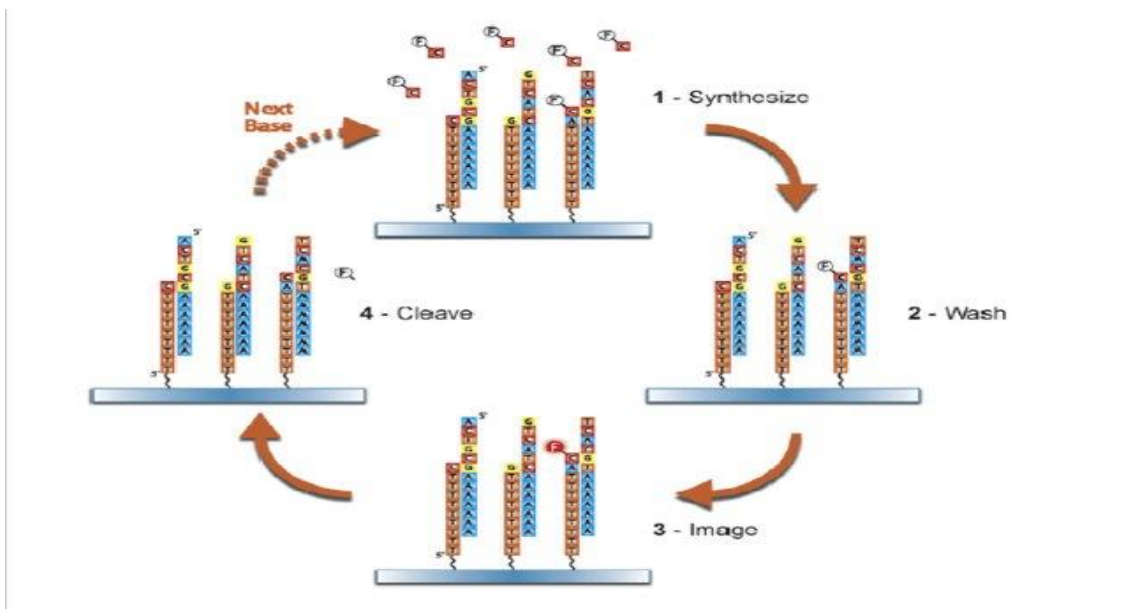
Εικόνα 3. Ion Torrent αλληλούχιση με Ligation τεχνολογία: μικροσφαιρίδια ιόντων (Ion Sphere Particle-ISP) βυθισμένα σε φρεάτιο σταθερής επιφάνειας ενίσχυσης (chip), τα οποία φέρουν κλωνικά ενισχυμένο μόριο προτύπου DNA στόχου, καταγραφή της αλλαγής του pH κατά την ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων και επεξεργασία του σήματος. (Τροποποιημένο από Kchouk Mehdi, Gibrat Jean-François and Elloumi Mourad. *Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation. Biol Med (Aligarh)* 2017; 09:03. doi: 10.4172/0974-8369.1000395)

Πλατφόρμες 3^{ης} γενιάς μεθοδολογίες αλληλούχισης (3th ή Third Generation Sequencing-TGS)

Τεχνολογικό άλμα στην εξέλιξη του NGS απετέλεσε η επίτευξη αλληλούχισης μονόκλωνων DNA μορίων σε πραγματικό χρόνο (Single Molecule Real Time, SMRT), χωρίς προηγηθείσα κλωνική ενίσχυση. Τα νέα αυτά εργαλεία είναι σε θέση να παράξουν μεγάλου μήκους αναγνώσματα (Kb-1Mb, nanopore) και δίνουν τη δυνατότητα αλληλούχισης εξαιρετικά μικρών ποσοτήτων DNA/RNA, υποβαθμισμένων ή τροποποιημένων προτύπων, ακόμη και από ένα μόνο κύτταρο. Η μέχρι σήμερα εμπορική διαθεσιμότητά των SMRT μεθοδολογιών είναι περιορισμένη και τα μέσα ανάλυσης είναι ακόμη πολύ πρώιμα.

1. Heliscope/Helicos

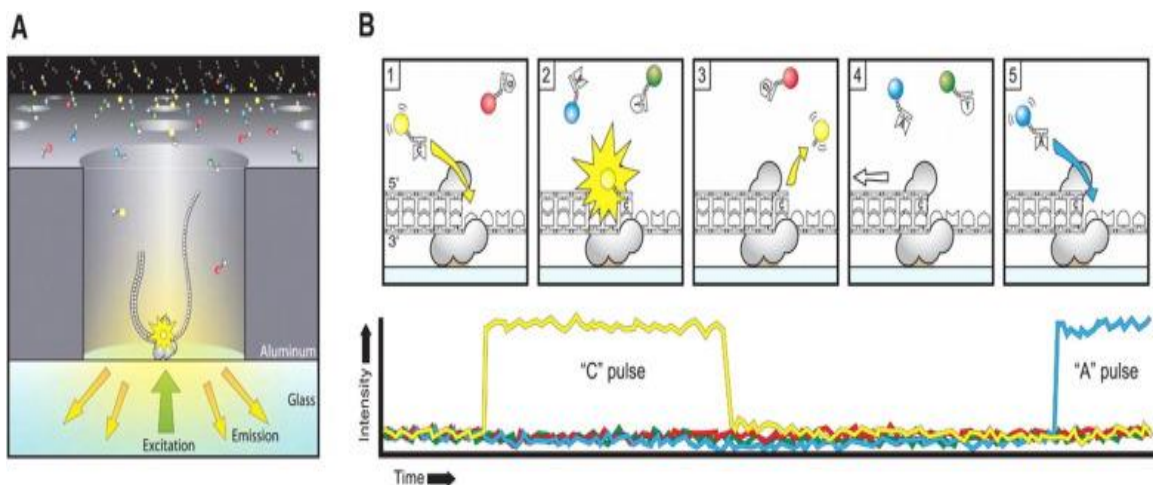
Το σύστημα Helicos είναι η πρώτη εμπορικά διαθέσιμη πλατφόρμα αλληλούχισης μονού μορίου DNA/RNA (Single Molecule Sequencing-SMS, 2010). Σε αυτό το σύστημα, μονόκλωνο DNA poly-A συλλαμβάνεται από poly-T ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές προσδεδεμένους στην επιφάνεια της κυψελίδας ροής. Η αλληλούχιση πραγματοποιείται μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων επέκτασης ενός εκκινητή από την DNA πολυμεράση και χρησιμοποιεί ένα εξαιρετικά ευαίσθητο σύστημα ανίχνευσης φθορισμού για την άμεση αναγνώριση του νεοσυντιθέμενου νουκλεοτιδίου. (Εικόνα 4) Το μήκος ανάγνωσης κυμαίνεται από 30 bp έως 35bp, με ακρίβεια βάσης >99% και 20-28Gbp νουκλεοτιδικής ακολουθίας/κύκλο. Ο ρυθμός σφάλματος του συστήματος είναι υψηλός (3-5%) με κύριο τύπο σφαλμάτων τη διαγραφή. Η μέθοδος ήταν σχετικά αργή, κοστοβόρα και καθώς παρήγαγε σύντομες αναγνώσεις (~ 32 bp) απεδείχθη μη εμπορικά βιώσιμη.



Εικόνα 4. Ροή εργασίας αλληλούχισης μέσω της Helicos Heliscope πλατφόρμας: Η αλληλούχιση πραγματοποιείται μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων επέκτασης ενός εκκινητή από την DNA πολυμεράση. (Τροποποιημένο από Halima B, Abdalrahim O, Bensaheb1 F, Behl1 S and Nazir1 M. Evaluating emerging technologies applied in forensic analysis. Int. J. Engg. Res. & Sci. & Tech. 2015; 4:3)

2. Pacific Bioscience

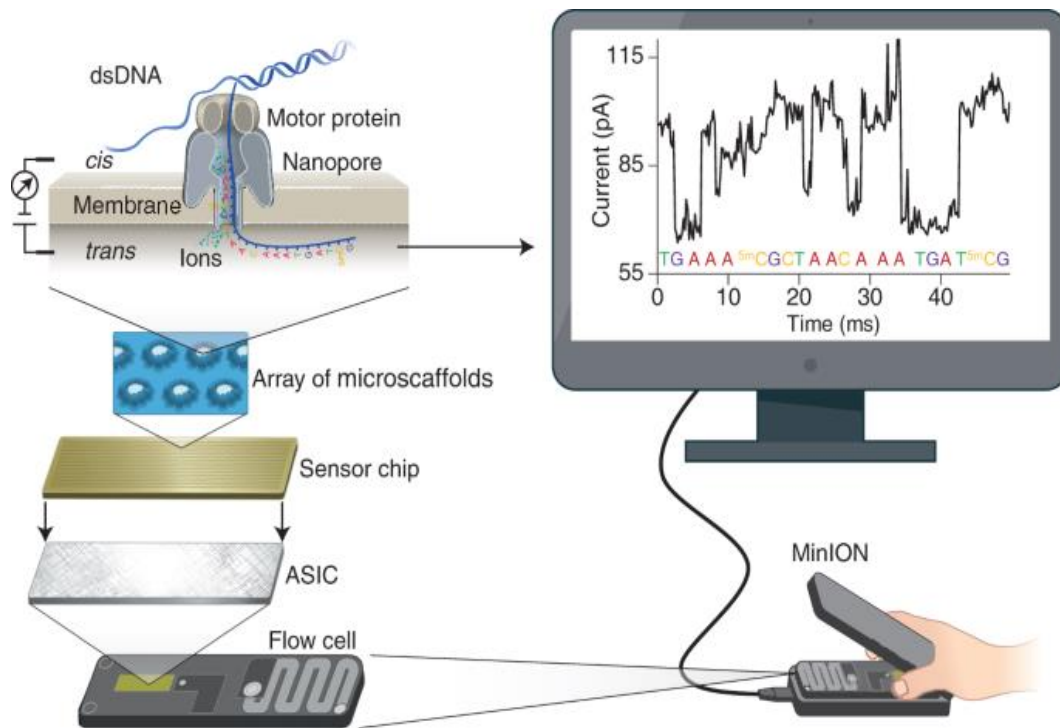
Είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνολογία αλληλούχισης 3^{ης} γενιάς η οποία εφαρμόζει την τεχνολογία Single Molecule Real Time-SMRT. Στηρίζεται στην οπτική παρακολούθηση της ενσωμάτωσης απλών φθορίζοντων νουκλεοτιδίων από ακινητοποιημένη DNA πολυμεράση σε μικροσκοπικά φρεάτια. Με την χρήση ολιγονουκλεοτιδικών adaptors, το πρότυπο DNA σχηματίζει κυκλικό δίκλωνο μόριο, το οποίο αλληλουχείται αρκετές φορές. (Εικόνα 5) Κύριο πλεονέκτημα είναι το μήκος του αναγνώσματος που λαμβάνεται (~10 kbp), ενώ η προετοιμασία του δείγματος απαιτεί 4-6h αντί ημερών που απαιτούν άλλες τεχνολογίες NGS. Αν και η επικράτηση της τεχνολογίας αυτής εξακολουθεί να περιορίζεται από τη χαμηλή απόδοση (μέγιστη 260 Mb/διαδρομή) και τα υψηλά ποσοστά σφαλμάτων αλληλούχισης (ακρίβεια 87%), η δυνατότητα δημιουργίας αναγνωσμάτων μέχρι και 40kb την καθιστά μία από τις υποψήφιες και πλέον ελπιδοφόρες, για την αλληλούχιση μεγάλων γενετικών περιοχών, τεχνολογίες χωρίς ασάφειες φάσης.



Εικόνα 5. PacBio αλληλούχιση: οπτική παρακολούθηση της ενσωμάτωσης απλών φθορίζοντων νουκλεοτιδίων από ακινητοποιημένη DNA πολυμεράση σε μικροσκοπικά φρεάτια. (Τροποποιημένο από Rhoads A, Au KF. PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2015;13(5):278-289).

3. Oxford Nanopore τεχνολογία

Η MinION φορητή συσκευή 3^{ης} γενιάς της Oxford Nanopore τεχνολογίας μοιάζει με ένα μεγάλο USB μνήμης. Δεν βασίζεται στη χρήση DNA πολυμεράσης, αλλά στην τεχνολογία νανοπόρων (nanopore) η οποία επιτρέπει τη διάκριση μεμονωμένων νουκλεοτιδίων μετρώντας τη μεταβολή της ηλεκτρικής αγωγιμότητας, καθώς μονόκλινα μόρια DNA περνούν μέσω νανοπόρων του πρωτεϊνικού συμπλόκου CsgG. (Εικόνα 6) Η Oxford Nanopore τεχνολογία παράγει μεγάλου μήκους αναγνώσματα (~50 kb) με χαμηλό κόστος. Φέρει υψηλό ρυθμό σφάλματος ~12%, (~3% γενετικές ανομοιότητες, ~4% προσθήκες και ~5% διαγραφές), και την δυσκολία αλληλούχισης περιοχών πλούσιων σε GC. Η τρέχουσα απόδοση ανά διαδρομή είναι χαμηλή και δεν υπερβαίνει τα 400 Mb σε 48h. Σήμερα πιστεύεται ότι θα μπορούσε να αποτελέσει μια καλή συμπληρωματική τεχνολογία σε συνδυασμό με άλλες υψηλότερης ακρίβειας. Πρόσφατα αναπτύχθηκε η νέα πλατφόρμα PromethION με 48 ανεξάρτητες κυψελίδες ροής (σύνολο 3000 πόροι), ισοδύναμο με 48 MinIONs και λειτουργεί στα 500bp/sec.



Εικόνα 6. Oxford Nanopore αλληλούχιση: η τεχνολογία νανοπόρων επιτρέπει τη διάκριση μεμονωμένων νουκλεοτιδίων μετρώντας τη μεταβολή της ηλεκτρικής αγωγιμότητας, καθώς μονόκλιωνα μόρια DNA περνούν μέσω νανοπόρων ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου (Τροποποιημένο από Wang, Y., Zhao, Y., Bollas, A. et al. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. Nat Biotechnol 2021;39: 1348–1365)

Περιορισμοί των NGS και TGS μεθοδολογιών αλληλούχισης

1. Τα βραχύτερα μήκη ανάγνωσης (30-400 bp) θέτουν κάποιους περιορισμούς. Είναι δύσκολο να συναρμολογηθεί η ακολουθία ενός γονιδιώματος de novo χρησιμοποιώντας σύντομες αλληλουχίες αναφοράς, καθώς η πλειονότητα των τεχνολογιών αυτών βασίζεται στη σύγκριση της πυκνότητας και της περιεκτικότητας των συντόμων αυτών αναγνώσεων με εκείνη του γονιδιώματος αναφοράς. Επιπλέον, τα βραχύτερα μήκη ανάγνωσης μπορεί να μην ευθυγραμμίζονται μοναδικά στο γονιδίωμα αναφοράς, αφήνοντας συχνά περιοχές του γονιδιώματος αχαρτογράφητες, ιδιαίτερα σε επαναλαμβανόμενες περιοχές.
2. Όλα τα βήματα ενίσχυσης μπορούν να εισάγουν σφάλματα προσδιορισμού βάσεων στα κλωνικά ενισχυμένα DNA/RNA μόρια, ιδιαίτερα στις μεγαλύτερες αναγνώσεις, τα οποία στη συνέχεια κατά την ανάλυση μεταφράζονται ως παραλλαγές της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Επιπλέον, τα βήματα ενίσχυσης ενδεχομένως μπορεί να μειώνουν και την δυνατότητα εντοπισμού πολυμορφισμών χαμηλής συχνότητας πχ στην ανίχνευση σωματικών μεταλλάξεων χαμηλής συχνότητας που παρατηρούνται σε ένα μικρό ποσοστό καρκινικών κυττάρων εντός φυσιολογικού ιστού.
3. Οι παραγόμενες αλληλουχίες μπορεί να μην αντιπροσωπεύουν ομοιόμορφα όλες τις γονιδιωματικές θέσεις, καθώς περιοχές πλούσιες σε GC ή ομοπολυμερείς περιοχές ενισχύονται ανεπαρκώς (χαμηλή κάλυψη).
4. Η ταυτόχρονη ενίσχυση ψευδογονιδίων καθιστά δύσκολη τη στοχευμένη αλληλούχιση.

5. Η ανάλυση δεδομένων NGS είναι χρονοβόρα και απαιτεί επαρκή γνώση της Βιοπληροφορικής. Η επίλυση αυτών των προβλημάτων επιτυγχάνεται με τη λήψη μεγαλύτερης ποσότητας γενετικών δεδομένων για κάθε γενετική περιοχή που ονομάζεται "κάλυψη" ή "βάθος αλληλούχισης" και η οποία αναφέρεται στον μέσο αριθμό κατά τον οποίο ένα ζεύγος βάσεων αλληλουχίζεται. Το ελάχιστο "βάθος αλληλούχισης" εξαρτάται από την απαιτούμενη ευαισθησία ανάλυσης, τη στοχευμένη μέθοδο αλληλούχισης και το είδος της μετάλλαξης που μελετάται.

Εφαρμογές - Μελλοντικές ανάγκες και εξελίξεις

Η NGS τεχνολογία αποτελεί μία διαφορετική αλλά θεμελιώδης προσέγγιση αλληλούχισης και έφερε μια νέα επανάσταση στη γονιδιωματική έρευνα. Έχει βρει χρήση σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, όπως de novo αλληλούχιση, επανα-αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος, στοχευμένη αλληλούχιση εξονίων (έλεγχος πολυμορφισμών που απαιτούνται στην διάγνωση και παρακολούθηση μολυσματικών ασθενειών, έλεγχος αντιμικροβιακής αντοχής, 16S αλληλούχιση, HLA τυποποίηση), ανάλυση μεταγραφώματος (προφίλ γονιδιακής έκφρασης, small RNA ανάλυση, ανάλυση ολόκληρου μεταγραφώματος/RNA-Seq), στην αναγνώριση επιγενετικών δεικτών (ανοσοκαταβύθιση χρωματοσίνης-Chromatin immunoprecipitation, αλληλούχιση DNA υψηλής απόδοσης-high-throughput DNA sequencing/ChIP-seq) και ανίχνευση επιγενετικών τροποποιήσεων. Αποτελεί ένα ισχυρό και ευέλικτο εργαλείο, καθώς παρέχει γρήγορη και χαμηλού κόστους αλληλούχιση DNA/RNA ξεπερνώντας τους περιορισμούς των συμβατικών μεθόδων. Συγκεκριμένα, η κλωνική ενίσχυση και ο τεράστιος όγκος των παραγόμενων δεδομένων επιτρέπει την επίλυση των cis-trans ασαφειών, ενώ η δυνατότητα ανάλυσης πολλαπλών δειγμάτων και τόπων (πολυπλεξία) σε μία μόνο διαδρομή μειώνει το κόστος ανά δείγμα. Στα επόμενα χρόνια αναμένεται να σημειωθούν σημαντικές αλλαγές στο πλαίσιο αξιολόγησης των γενετικών δεδομένων, οι οποίες θα αλλάξουν ριζικά την έρευνα στις Επιστήμες Υγείας (κατανόηση της παθογένειας της ανθρώπινης νόσου, εξατομικευμένη ιατρική). Εντούτοις, θα πρέπει να ξεπεραστούν σημαντικοί περιορισμοί της HTS μεθοδολογίας πριν η τελική εφαρμογή της στη γονιδιωματική Ιατρική καταστεί πρακτικά εφαρμόσιμη και γόνιμη.

Ενδεικτική βιβλιογραφία

1. Kchouk M, Gibrat JF, Elloumi M. Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation. *Biol Med.* 2017;9:1-8.
2. Feng K, Costa J, Edwards JS. Next-generation sequencing library construction on a surface. *BMC Genomics.* 2018;19:416.
3. Yohe S, Thyagarajan B. Review of Clinical Next-Generation Sequencing. *Arch Pathol Lab Med.* 2017;141:1544-1557.

4. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol.* 2018;122:e59./
5. Zhao M, Liu D, Qu H. Systematic review of next-generation sequencing simulators: computational tools, features and perspectives. *Brief Funct Genomics* 2017;16:121-128.
6. Midha M, Wu M, Chiu KP. Long-read sequencing in deciphering human genetics to a greater depth. *Hum Genet.* 2019;138:1201-1215.
7. van Dijk EL, Jaszczyszyn Y, Naquin D, Thermes C. The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends Genet.* 2018;34:666-681.
8. Seifi M, Ghasemi A, Raeisi S, Heidarzadeh S. Application of Next-generation Sequencing in Clinical Molecular Diagnostics. *Braz Arch Biol Technol.* 2017;60: 170414.
9. Lu H, Giordano F, Ning Z. Oxford nanopore MinION sequencing and genome assembly. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2016;14: 265-279.
10. Jain M, Koren S, Miga K. et al. Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads. *Nat Biotechnol.* 2018;36:338-345.
11. Kumar KR, Cowley MJ, Davis RL. Next-Generation Sequencing and Emerging Technologies. *Semin Thromb Hemost.* 2019;45:661-673.
12. Wang X, Kadarmideen HN. Genome-wide DNA methylation analysis using next-generation sequencing to reveal candidate genes responsible for boar taint in pigs. *Anim Genet.* 2019;50:644-659.
13. Ma X, Shao Y, Tian L. et al. Analysis of error profiles in deep next-generation sequencing data. *Genome Biol.* 2019;20:50.
14. Bernardo A, Amand PSt, Le HQ, Su Z, Bai G. Multiplex restriction amplicon sequencing: a novel next-generation sequencing-based marker platform for high-throughput genotyping. *Plant Biotechnol J.* 2020;18:254-265.

15. Tran JN, Sherwood KR, Mostafa A, Benedicto RV, ElaAlim A, Greenshields,A, Keown P, Liwski R, Lan JH. Novel alleles in the era of next-generation sequencing-based HLA typing calls for standardization and policy. *Front. Genet.* **2023**; 14: 1282834.
16. Zhong Y, Xu F, Wu J, Schubert J, Li MM. Application of Next Generation Sequencing in Laboratory Medicine. *Ann. Lab. Med.* **2021**; 41: 25–43.
17. Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh, A. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Hum. Immunol.* **2021**; 82: 801–811
18. Kouniaki DI, Fotopoulos KV, Tarassi K, Tsirogianni, A. Utilizing Massively Parallel Sequencing (MPS) of Human Leukocyte Antigen (HLA) Gene Polymorphism to Assess Relatedness in Deficiency Parentage Testing. *Genes* **2024**; 15: 150.

Τα νέα GnRH ανάλογα, con3 και con7 ασκούν αντινεοπλασματική δράση σε καρκινικά κύτταρα ενδομητρίου

***Χ. Μαρκάτος¹, Β. Καραγεώργος¹, Α. Καλαντίδου³, Μ. Δεικτάκης³,
Γ. Μπινιάρη², Μ. Βενυχάκη³, Θ. Τσέλιος², Γ. Λιαπάκης¹***

¹Τμήμα Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης, Ηράκλειο

²Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα

³Τμήμα Κλινικής Χημείας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης, Ηράκλειο

Εισαγωγή

Ο καρκίνος του ενδομητρίου (ΚΕ) σχηματίζεται στο επιθηλιακό στρώμα της μήτρας, (ενδομήτριο) και αποτελεί μια από τις πιο συχνές γυναικολογικές κακοήθειες¹. Οι επιλογές θεραπείας ποικίλλουν ανάλογα με το στάδιο του καρκίνου και περιλαμβάνουν τη χειρουργική επέμβαση, ακτινοθεραπεία, χημειοθεραπεία, ορμονοθεραπεία ή στοχευμένη θεραπεία^{2,3,4}. Ο ΚΕ μπορεί να ταξινομηθεί σε 2 υπότυπους, τον τύπου I που είναι θετικός στους ορμονικούς υποδοχείς και έχει καλύτερη πρόγνωση και ο τύπου II που απουσία των ορμονικών υποδοχέων έχει χειρότερη πρόγνωση⁵. Έχει βρεθεί ότι ο τύπου 1 ΚΕ μπορεί να αναπτυχθεί λόγω παρατεταμένης έκθεσης σε ενδογενή ή εξωγενή οιστρογόνα και ιδιαίτερα απουσία επαρκούς δραστηριότητας προγεσταγόνου⁶. Οι τύπου 1 ΚΕ, μπορούν να αντιμετωπιστούν με ορμονικές θεραπείες, όπως προγεσταγόνα ή με ουσίες που τροποποιούν τη δράση των οιστρογόνων^{3,5}. Στην αντιμετώπιση του καρκίνου του ενδομητρίου μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ανάλογα της ορμόνης απελευθέρωσης γοναδοτροπινών (GnRH)⁶.

Η ορμόνη απελευθέρωσης γοναδοτροπινών GnRH είναι ένα υποθαλαμικό δεκαπεπτίδιο που ρυθμίζει την απελευθέρωση της ωχρινότροπου ορμόνης (LH) και της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH) από την υπόφυση^{7,8,9}. Η GnRH εκτός από τον υποθάλαμο, εκφράζεται επίσης στο φυσιολογικό ενδομήτριο και όγκους του^{6,10}.

Η GnRH ασκεί τις δράσεις της αλληλοεπιδρώντας με τον ειδικό για αυτήν υποδοχέα της, GnRH-R, ο οποίος έχει βρεθεί ότι εκφράζεται τόσο στην υπόφυση όσο και σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα ενδομητρίου^{6,10}. Διάφορα ανάλογα της GnRH μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην θεραπευτική αντιμετώπιση του πρώιμου ΚΕ, καταστέλλοντας την έκκριση των υποφυσιακών γοναδοτροπινών και επακόλουθα των οιστρογόνων (έμμεση δράση)⁶. Επιπρόσθετα της έμμεσης δράσης τους στη θεραπεία του ΚΕ, τα GnRH ανάλογα έχει βρεθεί ότι ασκούν άμεση αντικαρκινική δράση μέσω αλληλεπίδρασης τους με τους GnRH-R που εκφράζονται σε κύτταρα ΚΕ^{6,9,10}.

Ένας άλλος τρόπος προσέγγισης για τη θεραπευτική αντιμετώπιση όγκων που εκφράζουν τον GnRH-R είναι η χορήγηση GnRH αγωνιστών, συζευγμένων με κυτταροτοξικά φάρμακα, τα οποία δεσμεύονται στους GnRH-R των καρκινικών κυττάρων στοχευμένα απελευθερώνοντας την αντικαρκινική ουσία στα κύτταρα. Ένα από τα πιο γνωστά φάρμακα αυτού του τύπου είναι το σύζευγμα ζοπαρελίνης-δοξορουβικίνης, (AEZS-108, AN-152), που αποτελείται από τον GnRH αγωνιστή, [D-Lys⁶] GnRH συζευγμένο με το κυτταροτοξικό φάρμακο δοξορουβικίνη¹¹. Όμως το σύζευγμα αυτό εμφάνισε σε κλινικές δοκιμές ανεπιθύμητες ενέργειες¹²⁻¹⁷. Επιπρόσθετα, το σύζευγμα αυτό μπορεί να υδρολυθεί από τις καρβοξυλεστεράσες του πλάσματος, απελευθερώνοντας την αντικαρκινική ουσία

πριν αυτή φτάσει στον καρκινικό κύτταρο που στοχεύει¹⁸. Τα παραπάνω μειονεκτήματα του συζεύγματος ζοπταρελίνη-δοξορουβικίνη μας οδήγησαν να σχεδιάσουμε και συνθέσουμε δύο νέα ανάλογα της GnRH, που φέρουν την ονομασία con3 και con7, και είναι συζευγμένα μέσω του ανθεκτικού σε πρωτεολυτικά ένζυμα δισουλφιδικού δεσμού με τον καλά ανεκτό αντικαρκινικό παράγοντα μιτοξανδρόνη¹⁹. Σε προηγούμενη μελέτη μας δείξαμε ότι τα ανάλογα αυτά δεσμεύονται με υψηλή συγγένεια στους GnRH υποδοχείς¹⁹. Στη παρούσα μελέτη προσδιορίσαμε τις αντικαρκινικές ιδιότητες των con3 και con7.

Μεθοδολογία

Πειράματα κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Τα κύτταρα Ishikawa επώαστηκαν σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 96 οπών (37°C, 5% CO₂) με τα con3 και con7 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0,1nM – 10μM) για 2-4 ημέρες. Στη συνέχεια εκπλύθηκαν και επώαστηκαν με MTT για 4 ώρες σε 37°C υπό σκιά. Το αναγόμενο MTT σχημάτισε κρυστάλλους φορμαζάνης, τους οποίους διασπάσαμε με 4% HCl σε διάλυμα ισοπροπανόλης. Ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά απουσία φωτός και προσδιορίστηκε η απορρόφηση του αναγομένου MTT (μωβ χρώμα, μήκος κύματος 594 nm) με τη χρήση φασματοφωτόμετρου. Η τεχνική MTT βασίζεται στην ικανότητα των ζωντανών, μεταβολικά ενεργών κυττάρων να ανάγουν το κίτρινο τετραζόλιο MTT (3(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), σε μωβ κρυστάλλους φορμαζάνης.

Πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας

Στα πειράματα αυτά διεγείραμε τα κύτταρα Ishikawa που έχουν επωαστεί (37°C, 5% CO₂) για 6 ώρες με τα con3, con7 ή μιτοξανδρόνη στα 638 nm και προσδιορίσαμε την απορρόφηση στα 650 nm-700 nm, χρησιμοποιώντας το συνεστιακό μικροσκόπιο SP8. Η μιτοξανδρόνη έχει φάσμα διέγερσης με κορυφές στα 610 και 660 nm και μέγιστο εκπομπής στα 685 nm²⁰.

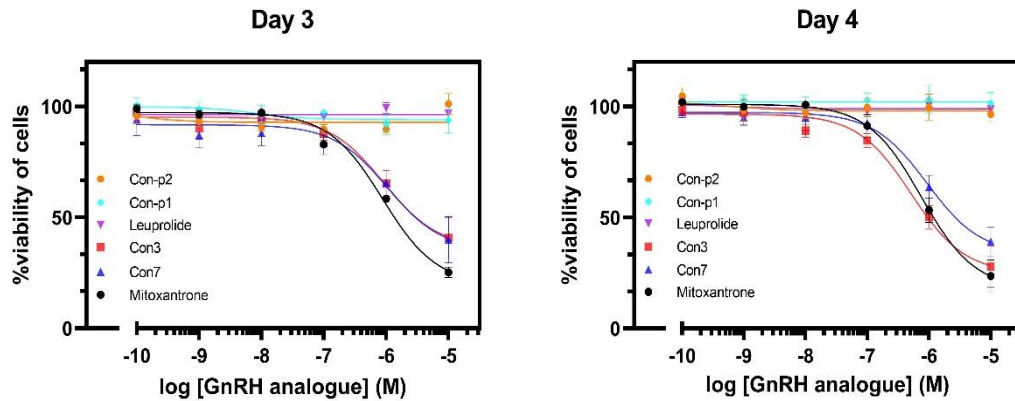
Πειράματα απόπτωσης

Μετά από επώαση των καρκινικών κυττάρων Ishikawa (37°C, 5% CO₂) με τα GnRH ανάλογα, για 2 έως 4 μέρες, τα κύτταρα συλλέχτηκαν και επώαστηκαν για 30 λεπτά απουσία φωτός στους 4°C με Annexin-V και ιωδιούχο προπύδιο (PI). Οι μετρήσεις λήφθηκαν σε μηχανήμα κυτταρομετρίας ροής και οι αναλύσεις έγιναν με το πρόγραμμα FlowJo, version 10.

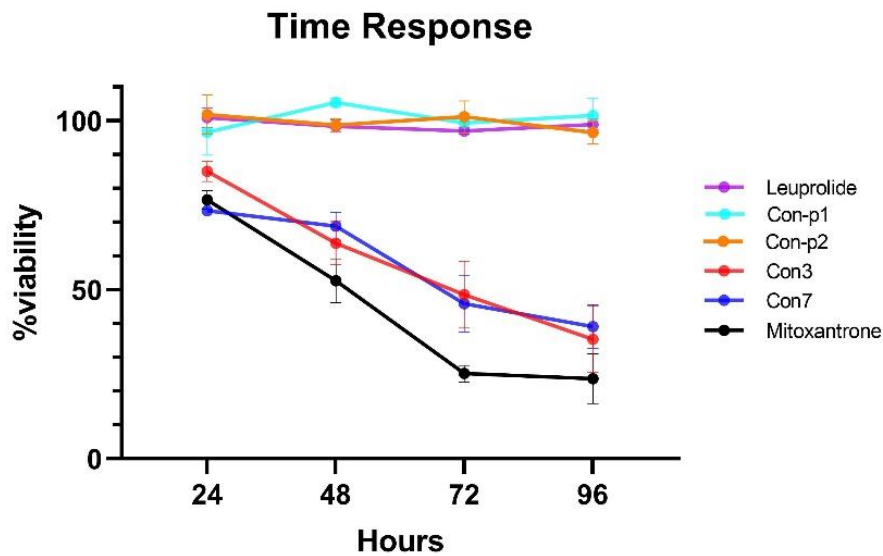
Αποτελέσματα

Αντιπολλαπλασιαστική δράση των αναλόγων con3, con7

Στα πειράματα MTT προσδιορίσαμε την ικανότητα των con3 και con7 να ασκούν αντιπολλαπλασιαστική δράση σε καρκινικά κύτταρα ενδομητρίου Ishikawa. Αξιολογήσαμε επίσης την αντιπολλαπλασιαστική δράση των ελευθέρων, μη συζευγμένων με μιτοξανδρόνη GnRH αναλόγων con-p1 και con-p2 που αντιστοιχούν στα συζευγμένα με δισουλφιδικό δεσμό ανάλογα con7 και con3, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα όλων των παραπάνω GnRH αναλόγων συγκρίθηκαν με την δράση τόσο της λευπρολίνης όσο και της ελεύθερης μιτοξανδρόνης.



Εικόνα 1: Δοσοεξαρτώμενη αντιπολλαπλασιαστική δράση των con3 και con7 σε καρκινικά κύτταρα Ishikawa μετά από 3 (Day 3) και 4 (Day 4) μέρες επώασης. Οι μέσοι όροι των τιμών και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που πραγματοποιήθηκε 3 φορές με παρόμοια αποτελέσματα.

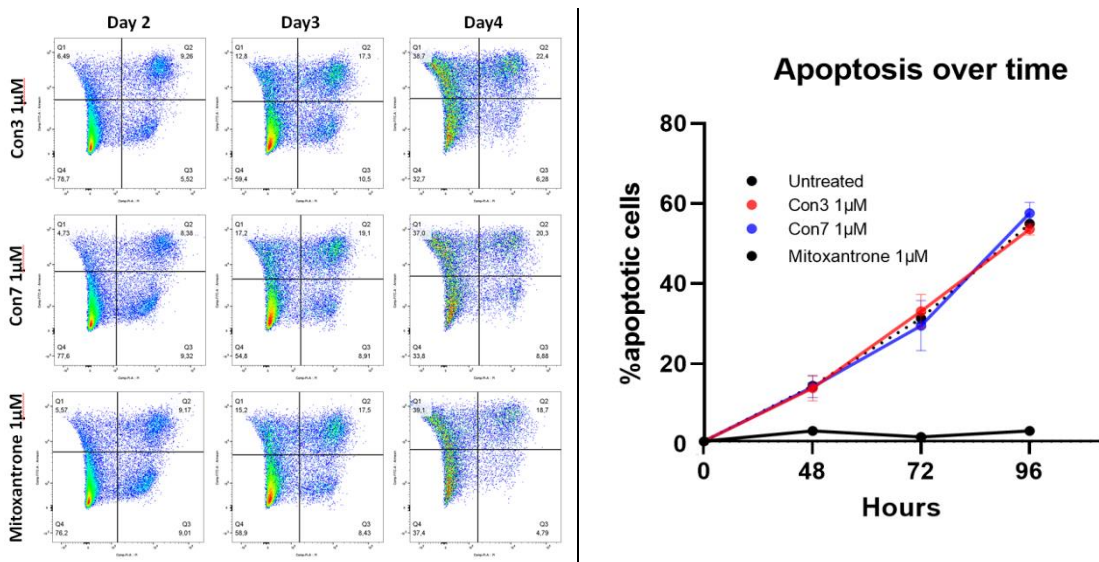


Εικόνα 2: Χρονοεξαρτώμενη αντιπολλαπλασιαστική δράση σταθερής συγκέντρωσης con3 και con7 (10μM) σε καρκινικά κύτταρα Ishikawa. Τα αποτελέσματα αναπαριστούν την μέση τιμή +/- σταθερό λάθος από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

Ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων Ishikawa αναστέλλεται από τα con3, con7 ή μιτοξανδρόνη με δοσοεξαρτώμενο και χρονοεξαρτώμενο τρόπο (εικόνες 1 και 2). Η ισχύς αναστολής του con3 είναι 0,67 μM και 0,84 μM, την τρίτη και τέταρτη μέρα αντίστοιχα. Η ισχύς αναστολής του con7 είναι 0,84 μM και 1 μM την τρίτη και τέταρτη μέρα αντίστοιχα. Παρόμοια, η ισχύς αναστολής της μιτοξανδρόνης είναι 0,88 μM και 0,77 μM την τρίτη και τέταρτη μέρα αντίστοιχα. Αντίθετα η λευπρολίνη, και τα μη συζευγμένα GnRH ανάλογα con-p2 και con-p1 δεν είχαν καμία επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Αποπτωτική δράση των αναλόγων con3, con7

Σε μελέτες κυτταρομετρίας ροής προσδιορίσαμε ότι τα con3, con7, και η ελεύθερη μιτοξανδρόνη, αλλά όχι τα con-p2, con-p1 και λευπρολίδη, επάγουν τον θάνατο σε καρκινικά κύτταρα Ishikawa, κυρίως μέσω απόπτωσης. Συγκεκριμένα, η επώαση των κυττάρων με con3, con7 ή μιτοξανδρόνη (1 μ M) αύξησε το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται σε απόπτωση/προαπόπτωση με χρονοεξαρτώμενο τρόπο (εικόνα 3). Τη δεύτερη μέρα το μεγαλύτερο μέρος των καρκινικών κυττάρων είναι ζωντανά μη αποπτωτικά-νεκρωτικά μετά από επώαση με con3 (78,7,7%), con7 (77,6%), ή μιτοξανδρόνη (76,2%). Την τρίτη μέρα τα ζωντανά κύτταρα μη αποπτωτικά-νεκρωτικά κύτταρα μειώθηκαν (59,4% με con3, 54,8% με con7, 58,9% με μιτοξανδρόνη), ενώ τη τέταρτη μέρα τα ζωντανά μη αποπτωτικά-νεκρωτικά κύτταρα μειώθηκαν ακόμα περισσότερο (32,7% με con3, 33,8% με con7, 32,7% με μιτοξανδρόνη). Αντίστοιχα, αυξήθηκε με χρονοεξαρτώμενο τρόπο το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται στο στάδιο της απόπτωσης (εικόνα 3). Σε όλες τις φάσεις το ποσοστό των νεκρωτικών κυττάρων είναι πολύ μικρό. Αντίθετα τα μη συζευγμένα με μιτοξανδρόνη πεπτιδία (con-p1 και con-p2) καθώς και η λευπρολίδη δεν είχαν καμία επίδραση στα κύτταρα αυτά (η εικόνα δεν παρουσιάζεται).

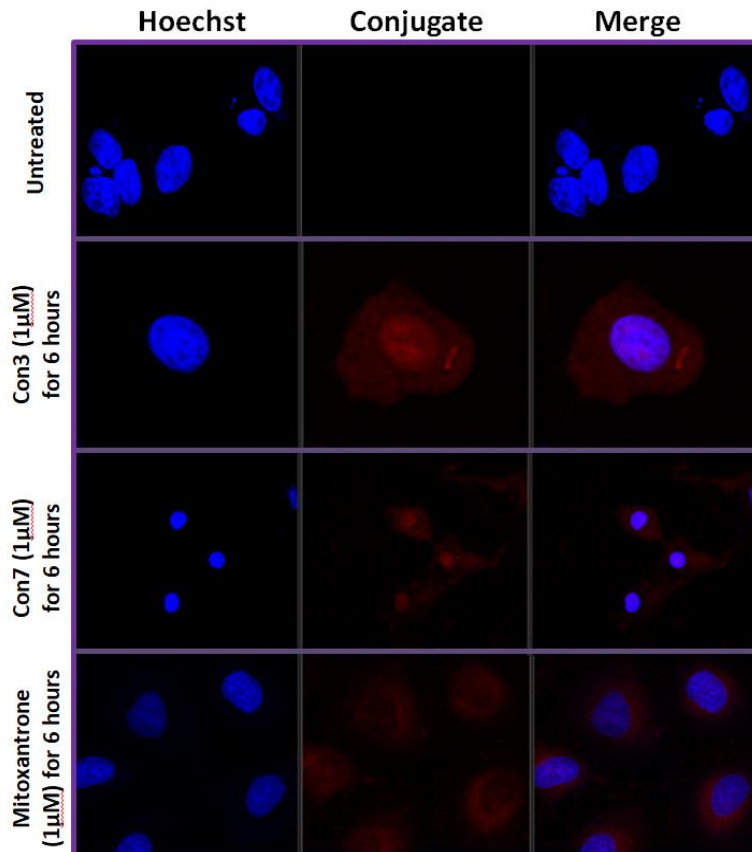


Εικόνα 3: Χρονοεξαρτώμενη επίδραση των con3 ή con7 ή μιτοξανδρόνη στον θάνατο των καρκινικών κυττάρων Ishikawa, για 48, 72 και 96 ώρες. Ποσοστό κυττάρων που ακολουθούν την αποπτωτική/προαποπτωτική οδό κατά την πάροδο του χρόνου χωρίς (μάρτυρας, untreated) ή με επώασή τους με τα συζεύγματα con3, con7, μιτοξανδρόνη. Τα αποτελέσματα αναπαριστούν την μέση τιμή +/- σταθερό λάθος από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

Εντοπισμός της μιτοξανδρόνης σε καρκινικά κύτταρα Ishikawa

Ο εντοπισμός της μιτοξανδρόνης στα καρκινικά κύτταρα Ishikawa προσδιορίστηκε με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου και αξιοποιώντας την ικανότητα της να φθορίζει στο ερυθρό. Ο φθορισμός εμφανίστηκε στα κύτταρα μετά από τουλάχιστον 6 ώρες επώασης με con3, con7, ή μιτοξανδρόνη (εικόνα 4). Αντίθετα δεν παρατηρήθηκε φθορισμός σε κύτταρα που δεν επώαστηκαν με con-p2, con-p1 ή λευπρολίδη (η εικόνα δεν παρουσιάζεται). Με σκοπό να παρατηρήσουμε τον πυρήνα των κυττάρων χρωματίστηκε αυτός με τη χρωστική

Hoechst (όπου διεγχειρόμενη με UVεκπέμπει μέγιστο στα 461nm και απεικονίζεται με μπλε χρώμα) (εικόνα 4). Συγχώνευση των εικόνων με το κόκκινο φθορισμό της μιτοξανδρόνης και τον μπλε της χρωστικής Hoechst έδειξε εντοπισμό της μιτοξανδρόνης τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων Ishikawa (εικόνα 4).



Εικόνα 4: Φθορισμός των κυττάρων Ishikawa χωρίς (μάρτυρα, control) ή μετά από επώαση με con3, con7 ή μιτοξανδρόνη (1μM) για 6 ώρες. Ο πυρήνας του κυττάρου χρωματίστηκε με Hoechst (μπλε), ενώ με κόκκινο φθορίζει η μιτοξανδρόνη. Τα αποτελέσματα είναι ενός αντιπροσωπευτικού πειράματος από 3 ανεξάρτητα πειράματα με παρόμοια αποτελέσματα.

Συζήτηση

Τα συζευγμένα με μιτοξανδρόνη GnRHανάλογα con3 και con7 μείωσαν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων ενδομητρίου Ishikawa, επάγοντας τον κυρίως μέσω απόπτωσης. Ο επαγόμενος από τα con3 και con7 συζεύγματα κυτταρικός θάνατος οφείλεται στην απελευθέρωση της συζευγμένης μιτοξανδρόνης και είσοδο της στο κύτταρο, στο οποίο και εντοπίζεται όπως αποδείχθηκε στις μελέτες συνεστιακής μικροσκοπίας. Η απελευθέρωση της συζευγμένης μιτοξανδρόνης είναι πολύ πιθανόν να επιτελείται σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο τα con3 και con7 δεσμεύονται στους GnRHυποδοχείς της πλασματικής μεμβράνης του καρκινικού κυττάρου με αποτέλεσμα τη συσσώρευση της συζευγμένης σε αυτά μιτοξανδρόνης γύρω από αυτό. Στο δεύτερο

στάδιο το σύστημα αναγωγής της θειορεδοξίνης (Trx), που υπερεκφράζεται σε καρκινικά κύτταρα, ανάγει τον δισουλφιδικό μεταξύ μιτοξανδρόνης και GnRH αναλόγων στις ενώσεις con3 και con7, απελευθερώνοντας έτσι την πρώτη. Στη συνέχεια η λιπόφιλη μιτοξανδρόνη εισέρχεται στο καρκινικό κύτταρο ασκώντας έτσι τις κυτταροτοξικές δράσεις της. Με βάση τα παραπάνω τα con3 και con7 θα μπορούσαν να αποτελέσουν τη βάση μιας στοχευμένης αντικαρκινικής θεραπείας των όγκων ενδομητρίου που εκφράζουν GnRH υποδοχείς.

Βιβλιογραφία

1. Makker V, et al. (2021). Endometrial cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2021 Dec 9;7(1):88. doi: 10.1038/s41572-021-00324-8. PMID: 34887451; PMCID: PMC9421940.
2. Wagner VM, Backes FJ. (2023). Do Not Forget about Hormonal Therapy for Recurrent Endometrial Cancer: A Review of Options, Updates, and New Combinations. *Cancers (Basel)*. 2023 Mar 16;15(6):1799. doi: 10.3390/cancers15061799. PMID: 36980685; PMCID: PMC10046539
3. Colombo N, et al. (2016). ESMO-ESGO-ESTRO Consensus Conference on Endometrial Cancer: diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2016 Jan;27(1):16-41. doi: 10.1093/annonc/mdv484. Epub 2015 Dec 2. Erratum in: *Ann Oncol*. 2017 Jul 1;28(suppl_4):iv167-iv168. PMID: 26634381.
4. Koh WJ, et al. (2018). Uterine Neoplasms, Version 1.2018, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2018 Feb;16(2):170-199. doi: 10.6004/jnccn.2018.0006. PMID: 29439178.
5. Morice P, et al. (2016). Endometrial cancer. *Lancet*. 2016 Mar 12;387(10023):1094-1108. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00130-0. Epub 2015 Sep 6. PMID: 26354523.
6. Emons, G. and Gründker, C. (2021). The Role of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) in Endometrial Cancer. *Cells* 2021, 10, 292. doi: 10.3390/cells10020292.
7. C. B. Lambalk. (2023). The enigma of the gonadotropin-releasing hormone pulse frequency governing individual secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone, *F&S Reports, Volume 4, Issue 2, Supplement, 2023, Pages 27-32, ISSN 2666-3341*. doi:10.1016/j.xfre.2023.02.010.
8. Matsuo H, et al. (1971). Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun*. 1971 Jun 18;43(6):1334-9. doi: 10.1016/s0006-291x(71)80019-0. PMID: 4936338.
9. Millar RP, et al. (2004). Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr Rev*. 2004 Apr;25(2):235-75. doi: 10.1210/er.2003-0002. PMID: 15082521.
10. Limonta P., et al. (2018). GnRH in the Human Female Reproductive Axis. *Vitamins and Hormones, Volume 107, 2018 Elsevier Inc. ISSN 0083-6729*. doi:10.1016/bs.vh.2018.01.003
11. C. Gründker and G. Emons. (2017). The Role of Gonadotropin-Releasing Hormone in Cancer Cell Proliferation and Metastasis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017; 8: 187. doi:10.3389/fendo.2017.00187.
12. Zoptarelin Doxorubicin (AEZS 108) as Second Line Therapy for Endometrial Cancer (ZoptEC). National Library of Medicine. <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT01767155>
13. J. Engel, et al. (2012). AEZS-108: a targeted cytotoxic analog of LHRH for the treatment of cancers positive for LHRH receptors. *Expert Opin. Investig. Drugs* 2012, 21, 891–899.
14. Emons, G. et al. (2014). Efficacy and Safety of AEZS-108 (INN: Zoptarelin Doxorubicin) an LHRH Agonist Linked to Doxorubicin in Women with platinum Refractory or Resistant Ovarian Cancer Expressing

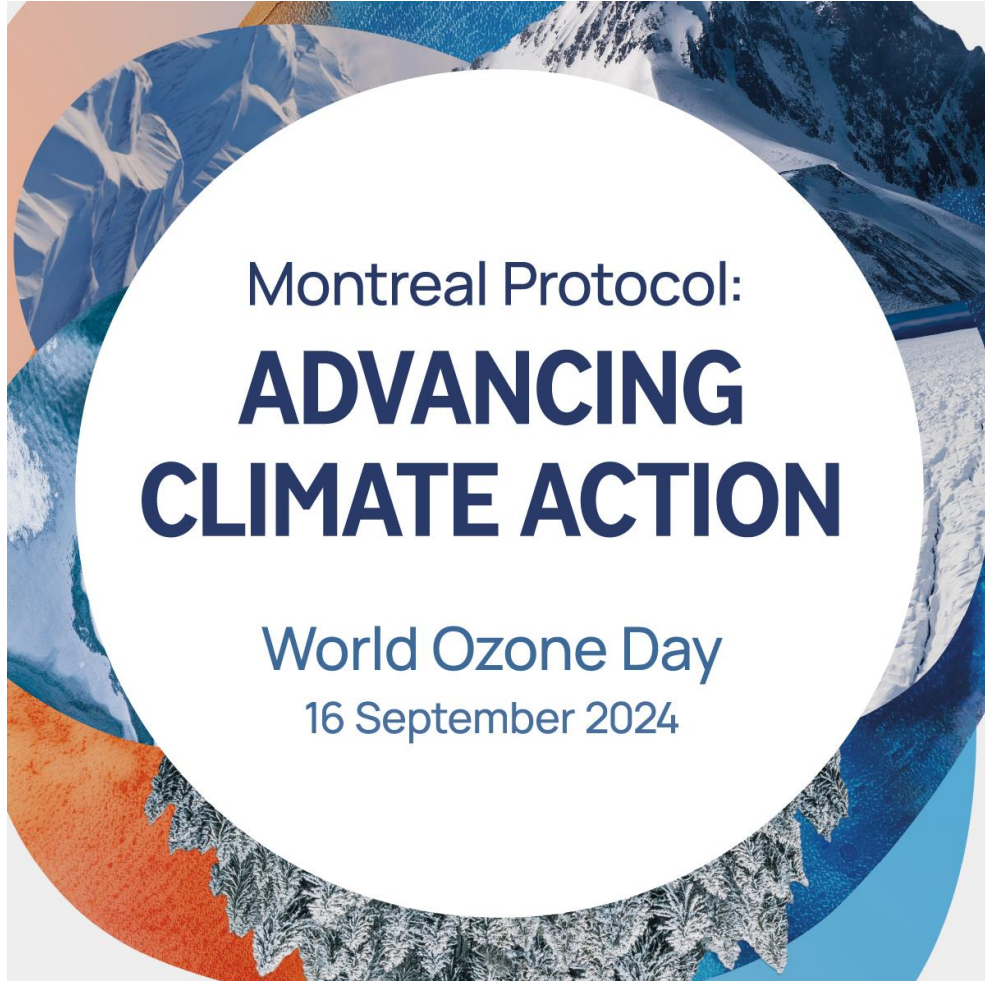
- Receptors: A Multicenter Phase II Trial of the ago-Study Group (AGO GYN 5). *Gynecol. Oncol.* 2014, 133, 427–432.
15. Emons, G. et al. (2010). Dose Escalation and Pharmacokinetic Study of AEZS-108(AN-152), an LHRH Agonist Linked to Doxorubicin, in women with LHRH Receptor-Positive Tumors. *Gynecol. Oncol.* 2010, 119, 457–461.
 16. Emons G. et al. (2014). Efficacy and Safety of AEZS-108 (LHRH Agonist Linked to Doxorubicin) in Women with Advanced or Recurrent Endometrial Cancer Expressing LHRH Receptors: a multicenter phase 2 trial (AGO-GYN5). *Int J Gynecol Cancer.* 2014 Feb;24(2):260-5. doi: 10.1097/IGC.000000000000044.
 17. Liu SV, et al. (2014). Phase I, Dose-Escalation Study of the Targeted Cytotoxic LHRH Analog AEZS-108 in Patients with Castration- and Taxane-Resistant Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* 15 December 2014; 20 (24): 6277–6283. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0489
 18. Nagy A, et al. (2000). Stability of cytotoxic luteinizing hormone-releasing hormone conjugate (AN-152) containing doxorubicin 14-O-hemiglutarate in mouse and human serum in vitro: implications for the design of preclinical studies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jan 18;97(2):829-34. doi: 10.1073/pnas.97.2.829. PMID: 10639165; PMCID: PMC15416.
 19. Biniari, G. et al. (2023). Rational Design, Synthesis and Binding Affinity Studies of Anthraquinone Derivatives Conjugated to Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Analogues towards Selective Immunosuppression of Hormone-Dependent Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, 24, 15232. doi:10.3390/ijms242015232
 20. Bell DH. (1988). Characterization of the fluorescence of the antitumor agent, mitoxantrone. *BiochimBiophysActa.* 1988 Jan 25;949(1):132-7. doi: 10.1016/0167-4781(88)90063-2. PMID: 3334848.

Η εργασία τιμήθηκε με το
1^ο Βραβείο Ανηρτημένης Ανακοίνωσης στο
21^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Χημείας

16 Σεπτεμβρίου 2024

Διεθνής Ημέρα για τη Διατήρηση της Στιβάδας του Όζοντος 2024.

Montreal Protocol: Advancing Climate Action

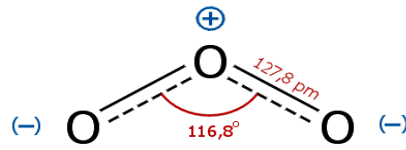


Το θέμα της Παγκόσμιας Ημέρας του Όζοντος 2024 είναι «Πρωτόκολλο του Μόντρεαλ: Προώθηση των Κλιματικών Δράσεων» που αντικατοπτρίζει τον κρίσιμο ρόλο του Πρωτοκόλλου του Μόντρεαλ τόσο στην προστασία της στιβάδας του όζοντος όσο και στην προώθηση ευρύτερων πρωτοβουλιών δράσης για το κλίμα παγκοσμίως. Τιμάται η θέσπιση του Πρωτοκόλλου του Μόντρεαλ το 1985, ώστε να ελαττωθούν οι συγκεντρώσεις των ενώσεων που καταστρέφουν το όζον. Χάρη στο Πρωτόκολλο του Μόντρεαλ, το στρώμα του όζοντος αναμένεται να επιστρέψει στις τιμές προ του 1980 μέχρι τα μέσα του 21ου αιώνα.

Protect the Ozone, Preserve Our Future.

<https://www.genevaenvironmentnetwork.org/resources/updates/international-day-for-the-preservation-of-the-ozone-layer/>

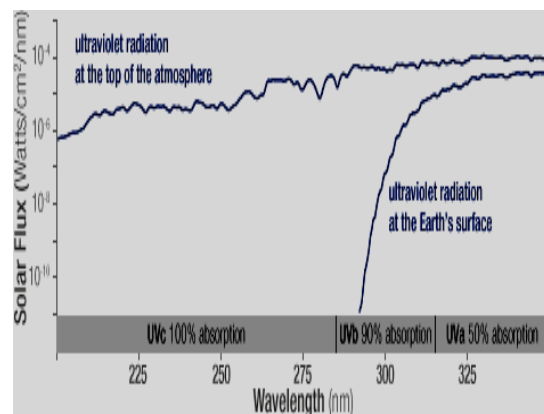
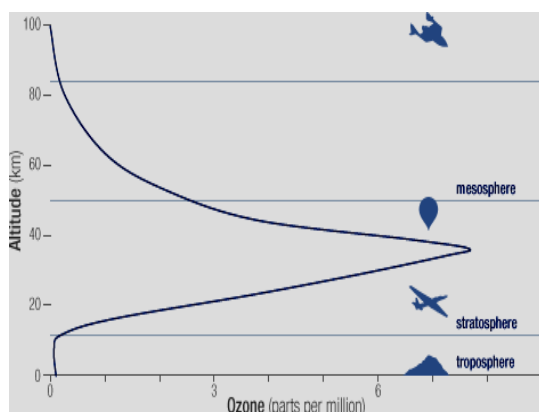
Η προστατευτική στιβάδα του όζοντος



Αντώνης Γιαννακάκης

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

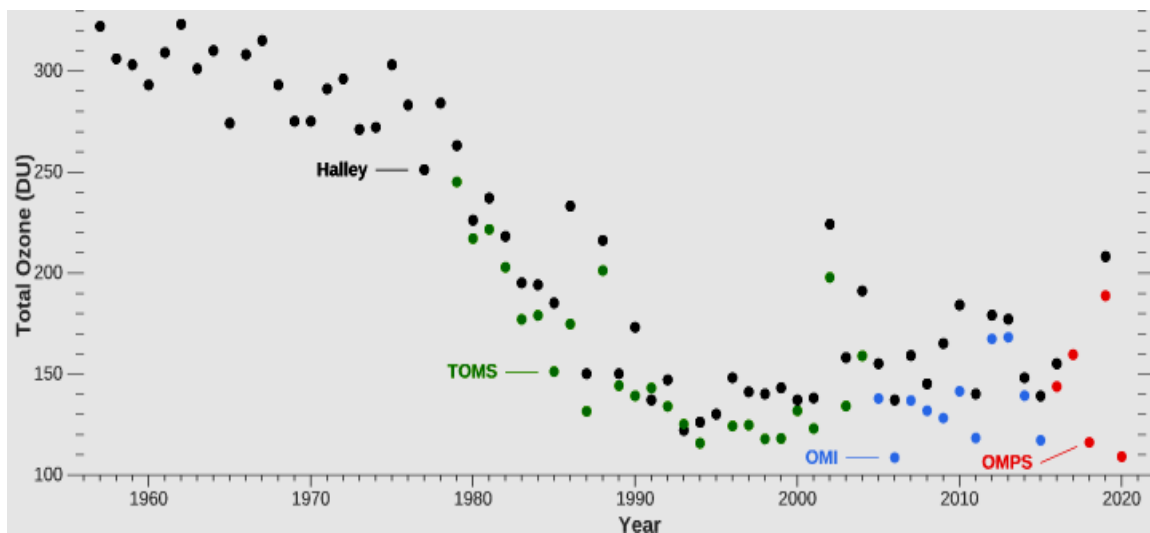
Το όζον O_3 οφείλει το όνομά του στη χαρακτηριστική έντονη οσμή του (όζει) και είναι αλλοτροπική μορφή του οξυγόνου. Θερμοδυναμικά είναι δραστικότερο από το οξυγόνο(1). Στην ατμόσφαιρα το οξυγόνο αποτελεί το 20% και προέκυψε από τη φωτοσύνθεση σε κυανοβακτήρια, φύκη και φυτά. Το όζον στα ανώτερα στρώματα της ατμοσφαιρας είναι προϊόν της επίδρασης της ηλιακή UV ακτινοβολίας πάνω στα μόρια οξυγόνου. Το όζον στην γήινη ατμόσφαιρα (Good up high, bad nearby) παρουσιάζει αντιστοιχίες με την ταινία «Ο καλός, ο κακός και ο άσχημος» ένα από τα ιταλικά σπαγγέτι-γουέστερν που μεσουρανούσαν τη δεκαετία του '70 (2). Το 10% του όζοντος της ατμόσφαιρας, βρίσκεται στην τροπόσφαιρα (0-15km), το χαμηλότερο στρώμα της ατμόσφαιρας. Χαρακτηρίζεται ως «κακό» όζον και είναι ρύπος ανθρωπογενούς προέλευσης. Προκύπτει από χημικές αντιδράσεις (φωτοχημικό νέφος) μεταξύ οξειδίων αζώτου (NO_x) και πτητικών οργανικών ενώσεων (volatile organic compounds, VOCs). Είναι εποχικός ρύπος, γιατί οι αντιδράσεις σχηματισμού του προϋποθέτουν ηλιοφάνεια και ψηλές θερμοκρασίες.



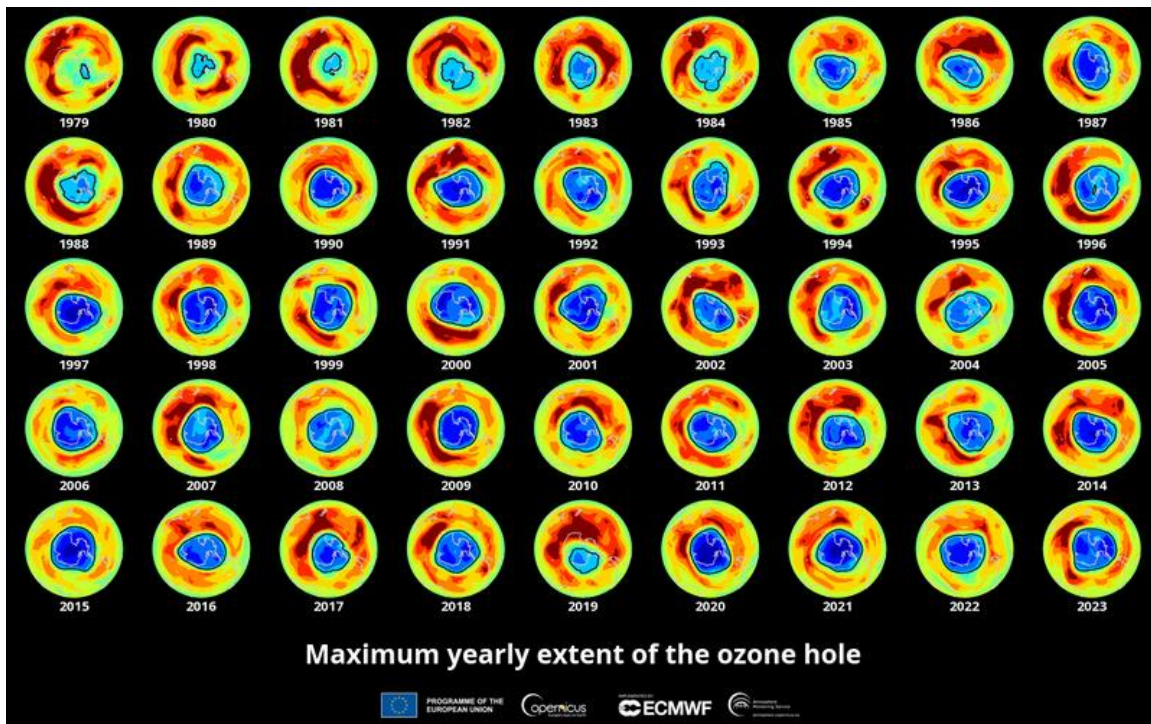
Σχήμα 1. α) Η συγκέντρωση του όζοντος στην ατμόσφαιρα. Η μέγιστη συγκέντρωση, κατά μέσο όρο $8ppm$, εμφανίζεται σε υψόμετρο 30 - 35 km και **β)** Η ηλιακή υπεριώδης ακτινοβολία στην κορυφή της ατμόσφαιρας (επάνω γραμμή) και στην επιφάνεια της Γης (50% μείωση της UV-a, 90% μείωση της UV-b, 100% μείωση της UV-c, κάτω γραμμή) (4). <https://ozonewatch.gsfc.nasa.gov/facts/SH.html>

Το υπόλοιπο 90%, το «καλό» όζον, βρίσκεται ψηλότερα στη στρατόσφαιρα (15-50 km), στην εξαιρετικά αραιή αλλά πολύτιμη στιβάδα του όζοντος, όπου δρα ως φίλτρο προστασίας από την επιβλαβή ηλιακή UV ακτινοβολία,

προστατεύοντας τους ζωντανούς οργανισμούς από οξειδωτικές βλάβες. Η στιβάδα του όζοντος ανακαλύφθηκε το 1913 από τους Charles Fabry και Henri Buisson και μελετήθηκε διεξοδικά από τον μετεωρολόγο G. M. B. Dobson. Για τη μέτρηση του στρατοσφαιρικού όζοντος από το έδαφος ο Dobson ανέπτυξε το Dobsonmeter, ένα απλό φασματοφωτόμετρο. Μεταξύ 1928 και 1958 δημιούργησε ένα παγκόσμιο δίκτυο σταθμών παρακολούθησης του στρατοσφαιρικού όζοντος, που λειτουργεί μέχρι σήμερα. Το Dobsonmeter μετράει την ηλιακή υπεριώδη ακτινοβολία σε 2 έως 6 διαφορετικά μήκη κύματος λ ($305 \text{ nm} < \lambda < 345 \text{ nm}$). Στα 305 nm το όζον απορροφά ισχυρά, ενώ στα 325 nm η απορρόφηση είναι ασθενής. Το πηλίκιο των υψών των δύο αυτών κορυφών, είναι μέτρο της μέσης συγκέντρωσης όζοντος, από τη θέση του φασματοφωτόμετρου μέχρι τα όρια της ατμόσφαιρας. Προς τιμήν του Dobson ονομάστηκε και η μονάδα Dobson Unit (DU), που αντιπροσωπεύει τον αριθμό των μορίων όζοντος στην ατμόσφαιρα, που απαιτούνται για τη δημιουργία υπό κανονικές συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης ($T=273.2^\circ \text{ K}$, $P=1 \text{ atm}$), ενός στρώματος καθαρού όζοντος πάχους 0,01 mm, σε μια στήλη από την επιφάνεια της γης έως το κενό του διαστήματος. Μια DU περιέχει $0,447 \text{ mmol O}_3/\text{m}^2$ και εκφράζει την μέση πυκνότητα του όζοντος πάνω από μια περιοχή της Γης. Έτσι, ένα πάχος ολικού όζοντος 3 mm αντιστοιχεί σε 300 DU. Συμβατικά έχουν τεθεί ως ελάχιστο όριο ασφάλειας οι 220 DU (1,5). Το συνολικό όζον ποικίλλει ανάλογα με το γεωγραφικό πλάτος. Όλες τις εποχές του χρόνου, οι μεγαλύτερες τιμές εμφανίζονται στα μεσαία και μεγάλα γεωγραφικά πλάτη, γιατί τη ταχύτητα παραγωγής όζοντος από την ηλιακή UV ακτινοβολία είναι υψηλότερη στις τροπικές περιοχές. Τα «άσχημα» νέα της τρύπας του όζοντος - θυμήσου την ταινία - μας χτύπησαν την πόρτα για πρώτη φορά το 1974 και το φαινόμενο της παραγωγής και καταστροφής του όζοντος μελετήθηκε διεξοδικά (Nobel Χημείας 1995).



Σχήμα 2. Οι τιμές του O_3 στην Ανταρκτική, στο έδαφος (Ερευνητικός Σταθμός Halley, μαύρο) και από δορυφόρους (TOMS, Total Ozone Mapping Spectrometer, πράσινο), (OMI, Ozone Monitoring Instrument, μπλε) και την τελευταία πενταετία (OMPS, Ozone Mapping and Profiler Suite, κόκκινο). Από τη δεκαετία του '80 παρατηρείται οξεία πτώση στο συνολικό όζον (4).



Εικόνα 1. Η τρύπα του όζοντος στη στρατόσφαιρα πάνω από την Ανταρκτική με βάση στοιχεία από δορυφόρο (Πηγή: Copernicus Atmosphere Monitoring Service, CAMS). Το μπλε για τις πιο χαμηλές, κίτρινο και κόκκινο για ψηλότερες τιμές O_3 . Οι απώλειες όζοντος είναι μεγαλύτερες στο Νότιο Πόλο με έξαρση Αύγουστο - Νοέμβριο. Το μέγιστο των απωλειών παρατηρείται στις αρχές Οκτωβρίου κάθε έτους (1,6).

Αν και οι απώλειες του όζοντος είναι μικρότερες στο βόρειο ημισφαίριο, εν τούτοις μείωση παρατηρείται και στην Αρκτική και στην Ευρώπη. Τον Μάρτιο του 2011 παρατηρήθηκε για πρώτη φορά όχι μόνο αραιώση, αλλά μια πραγματική τρύπα του όζοντος πάνω από την Αρκτική και περιοχές της Ευρώπης. Η καταστροφή του όζοντος εμφανίζεται μεγαλύτερη στον Νότιο Πόλο, γιατί η θερμοκρασία είναι πιο χαμηλή από την Αρκτική, αγγίζει τους $-80^{\circ}C$ και οι πολικοί στρόβιλοι παρεμποδίζουν την ανταλλαγή αέρα με τα πλούσια σε όζον μεσαία γεωγραφικά πλάτη. Στη στρατόσφαιρα σχηματίζονται υπερκατεψυγμένοι παγοκρύσταλλοι, που ευνοούνται από τα υψηλά βουνά της Ανταρκτικής και οι οποίοι εγκλωβίζουν υδατμούς, οξειδία αζώτου και χλωροφθοράνθρακες (Chlorofluorocarbons, CFCs) (1,6).

Φωτοχημικός κύκλος των αντιδράσεων παραγωγής O_3 στη στρατόσφαιρα (1,5,6)	
(αντιδράσεις Charman, 1930)	
$O_2 + h\nu (UV, \lambda < 242 \text{ nm}) \rightarrow 2O\bullet$	Από ένα μόριο O_2 προκύπτουν 2 δραστικότερες ρίζες ατομικού οξυγόνου $O\bullet$ με μονήρες ηλεκτρόνιο
$O\bullet + O_2 + M \rightarrow O_3 + M$	M τυχαίο μόριο της ατμόσφαιρας (πχ N_2, O_2) που απορροφά την πλεονάζουσα ενέργεια

Φωτοχημικός κύκλος των αντιδράσεων καταστροφής O₃ στη στρατόσφαιρα	
$H_2O + hv (UV) \rightarrow HO\bullet + H\bullet$	Δημιουργούνται ρίζες HO•
$HO\bullet + O_3 \rightarrow HOO\bullet + O_2$	Δημιουργούνται ρίζες HOO•
$HOO\bullet + O_3 \rightarrow HO\bullet + O_2$	Αναπαράγονται ρίζες HO•
$O_3 + hv (UV) \rightarrow O\bullet + O_2$	Το O ₃ απορροφά UV ακτινοβολία και διασπάται
Γενικότερα ο φωτοχημικός καταλυτικός κύκλος.	
Με bold σημειώνεται ο καταλύτης	
$X\bullet + O_3 \rightarrow XO\bullet + O_2$	Ρίζες (X• = H•, OH•, NO•, Cl•, Br•)
$XO\bullet + O\bullet \rightarrow X\bullet + O_2$	Οι ρίζες X• ξαναπαράγονται, ο κύκλος επαναλαμβάνεται. Κάθε Cl• μπορεί να καταστρέψει μέχρι και 100.000 μόρια O ₃ .
$O\bullet + O_3 \rightarrow 2 O_2$	Καταστροφή O ₃ (αλυσιδωτή αντίδραση)
Φωτοχημικός κύκλος των αντιδράσεων καταστροφής O₃ από χλωροφθοριομένους υδρογονάνθρακες (CFCs) - γνωστότερη εμπορική ονομασία Freon	
$CCl_2F_2 + hv (UV) \rightarrow CClF_2 + Cl\bullet$	Οι CFCs που είναι μη τοξικοί και άφλεκτοι, θεωρούντο ασφαλείς. Χρησιμοποιούνται σε διογκωτικά, καθαριστικά, ψυγεία, σπρέι, κλιματιστικά.
$Cl\bullet + O_3 \rightarrow ClO\bullet + O_2$	
$ClO\bullet + O\bullet \rightarrow Cl\bullet + O_2$	

Κύριοι υπαίτιοι αυτής της οικολογικής καταστροφής οι CFCs [κυρίως οι CFC11 (CCl₃F), το φρέον CFC12 (CCl₂F₂), CFC113 CCl₂F-CClF₂]. Επίσης οι CFCs απορροφούν υπέρυθη ακτινοβολία, οπότε δρώντας σαν αέρια του θερμοκηπίου, συνεισφέρουν στην υπερθέρμανση του πλανήτη και μάλιστα περισσότερο από το CO₂ προκαλώντας και οικονομικές επιπτώσεις. Η υπερβολική έκθεση στη UV ακτινοβολία μπορεί να οδηγήσει σε καρκίνο του δέρματος, βλάβη στο ανοσοποιητικό ή τα μάτια, μεταλλάξεις του γενετικού υλικού. Συγκεκριμένα σχετίζεται με την εμφάνιση των τριών πιο κοινών μορφών καρκίνου του δέρματος (το κακόηθες μελάνωμα, το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα και το ακανθοκυτταρικό ή πλακώδες καρκίνωμα). Ακόμη και τώρα, με την επιτυχή εφαρμογή του Πρωτοκόλλου του Μόντρεαλ, οι καρκίνοι του δέρματος είναι από τις πιο κοινές μορφές καρκίνου,

ειδικά σε πληθυσμούς με ανοιχτόχρωμο δέρμα. Εξ άλλου η έκθεση σε υψηλά επίπεδα υπεριώδους ακτινοβολίας οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο καταρράκτη (7, 8). Επηρεάζει αρνητικά χερσαία και θαλάσσια οικοσυστήματα (9, 10).

Από το 1987 με το Πρωτόκολλο του Μόντρεαλ και μεταγενέστερες Διεθνείς Συνθήκες φθίνει η χρήση των CFCs. Τα βρωμιούχα παράγωγα που αντικατέστησαν τους CFCs στην αρχή, προκαλούν παρόμοια προβλήματα και εγκαταλείφθηκαν. Οι CFCs παραμένουν επί μακρόν στην ατμόσφαιρα (5,11), οι συγκεντρώσεις τους θα μειωθούν μετά από 50 χρόνια. Η προσπάθεια για την αντικατάστασή τους εντάθηκε και μάλλον αποδίδει. Από το 1997 το στρατοσφαιρικό όζον αυξάνει 0,3-1,2% ανά δεκαετία. Το μέγεθος της τρύπας του όζοντος στην Ανταρκτική ελπίζεται να περιοριστεί (1,5,6), αν και τα τελευταία νέα δεν είναι αισιόδοξα (12).

Βιβλιογραφικές αναφορές.

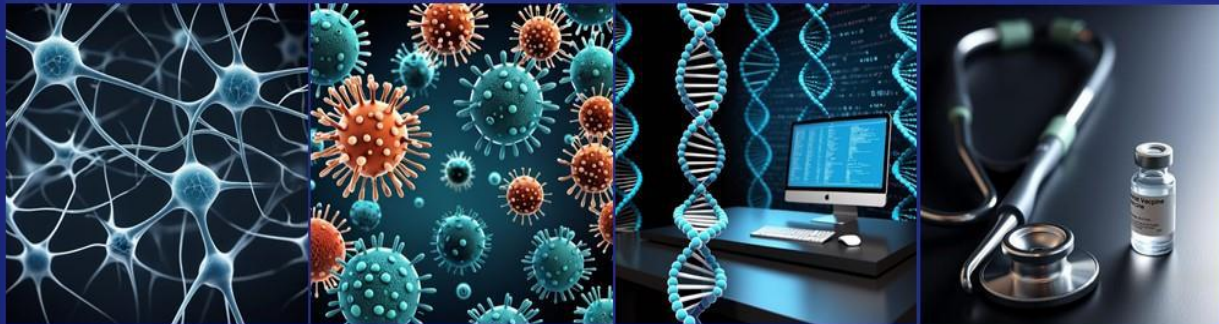
1. Α. Βαλαβανίδης, Κ. Ευσταθίου. Όζον. 2009. Η χημική ένωση του μήνα.
http://webapps.chem.uoa.gr/efs/chemicals/chem_ozone.htm
2. The Good the Bad and the Ugly. Σκηνοθεσία Sergio Leone, μουσική Ennio Morricone, 1966.
https://en.wikipedia.org/wiki/The_Good,_the_Bad_and_the_Ugly
3. EPA. United States Environmental Protection Agency. Ground-level Ozone Pollution
<https://www.epa.gov/ground-level-ozone-pollution/ground-level-ozone-basics>
4. National Aeronautics and Space Administration (NASA). Ozone watch.
<https://ozonewatch.gsfc.nasa.gov/facts/SH.html>
5. United Nations. Ozone. <https://ozone.unep.org/20-questions-and-answers>
6. European Environment Agency (EEA). <https://www.eea.europa.eu/en/topics/in-depth/climate-change-mitigation-reducing-emissions/current-state-of-the-ozone-layer>
7. Geneva Environment Network
<https://www.genevaenvironmentnetwork.org/resources/updates/international-day-for-the-preservation-of-the-ozone-layer/>
8. M. Norval, R. M. Lucas, A. P. Cullen, F. R. de Gruijl, J. Longstreth, Y. Takizawa, J. C. van der Leun. The human health effects of ozone depletion and interactions with climate change. Photochem Photobiol Sci. 2011 Feb;10(2):199-225. doi: 10.1039/c0pp90044c. Epub 2011 Jan 20.
9. P.W. Barnes, C.E. Williamson, R.M. Lucas, et al. Ozone depletion, ultraviolet radiation, climate change and prospects for a sustainable future. Nat Sustain 2, 569–579 (2019).

10. A. E.M. van den Oever, S. Puricelli, D. Costa, N.Thonemann, M. Lavigne Philippot, M. Messagie. Revisiting the challenges of ozone depletion in life cycle assessment. Cleaner Environmental Systems, Vol. 13, June 2024, 100196
11. S. A. Montzka, G.S. Dutton, P. Yu, et al. An unexpected and persistent increase in global emissions of ozone-depleting CFC-11. Nature 557, 413–417 (2018).
12. K. Charles. The ozone hole over the South Pole is now bigger than Antarctica. New Scientist, 15 September 2021. <https://www.newscientist.com/article/2290435-the-ozone-hole-over-the-south-pole-is-now-bigger-than-antarctica/#ixzz7D2sUMXxl>



7th Hellenic Pasteur Institute Young Scientists Conference 2024

17-18 October 2024



NEUROBIOLOGY

IMMUNOLOGY

BIOINFORMATICS

MICROBIOLOGY

PUBLIC HEALTH

BIOTECHNOLOGY



Hellenic Pasteur Institute, Central Amphitheater K8
127 Vasilissis Sofias Ave, Athens

**FREE
ENTRANCE**

Keynote Speakers

George Paxinos

Mark Mattson

Evangelos Giamarellos-Bourboulis

Emmanouil Maragkakis

**CALL FOR
ABSTRACTS**



21:00 Garden Latin Party & Dinner (18/10)



imerida2024@pasteur.gr



[imerida_pasteur_athens](https://www.instagram.com/imerida_pasteur_athens)



2144047540

Το καλοκαίρι που μας πέρασε, στις πηγές, τις κοίτες των ποταμών και τις λίμνες της πατρίδας μας και όλης της Ευρώπης το νερό ήταν λιγοστό. Ας αναπολήσουμε το τραγούδι του νερού.



Προηγούμενες χρονιές "Η πηγή Κρυστάλλω", στο Βουργαρέλι της Άρτας, στα Κεντρικά Τζουμέρκα. (φωτ. Στάθης Κουτσιαύτης)

Βρύση μου μαλαματένια

-Παραδοσιακό Μεσσηνίας-

Ωρέ βρύση μου μαλαματένια, πώς βαστάς κρύο νερό,

Ωρέ να ήμουν βρύση, να ήμουν στέρνα, να ήμουν γάργαρο νερό,

Ωρέ να'ρχεσαι σαν περδικούλα, με τη στάμνα για νερό

<https://www.tilestwra.com/50-apo-tis-oreoteres-paradosiakes-vrises-tis-elladas/>

<https://kithara.to/stixoi/MTY2NTAyNzI5/ore-brysi-mou-dimotiko-lyrics>