ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
Α' ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ
ΧΩΡΕΜΕΙΟ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ-ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΓΕΩΡΓΙΟΣ Π. ΧΡΟΥΣΟΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΚΟΙΝΩΝ ΟΔΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ IN VITRO ΚΑΙ IN VIVO ΣΤΟΥΣ ΟΓΚΟΥΣ ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΕΥΡΕΣΗ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΥΠΟ:
ΓΕΩΡΓΙΟΥ Ι. ΛΑΜΠΡΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΥ

ΑΘΗΝΑ 2013

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
Α' ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ
ΧΩΡΕΜΕΙΟ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ-ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΓΕΩΡΓΙΟΣ Π. ΧΡΟΥΣΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΚΟΙΝΩΝ ΟΔΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *IN VITRO* ΚΑΙ *IN VIVO* ΣΤΟΥΣ ΟΓΚΟΥΣ ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΕΥΡΕΣΗ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ

ΥΠΟ:
ΓΕΩΡΓΙΟΥ ΛΑΜΠΡΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΥ

ΑΘΗΝΑ 2013

NATIONAL AND KAPODISTRIAN
UNIVERSITY OF ATHENS
MEDICAL SCHOOL
FIRST DEPARTMENT OF PEDIATRICS
OF THE UNIVERSITY OF ATHENS
CHOREMEIO RESEARCH LABORATORY
DIRECTOR: PROF. GEORGE P. CHROUSOS

Ph.D. THESIS

COMMON *IN VITRO* AND *IN VIVO* GENE EXPRESSION OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM NEOPLASIAS IN THE DISCOVERY OF HEMATOLOGIC BIOMARKERS

GEORGE I. LAMBROU
BIOLOGIST

ATHENS 2013

Ημερομηνία αιτήσεως: 2 Ιουλίου 2004

Ημερομηνία ορισμού 3 μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 15 Ιουλίου 2004

Μέλη της 3 μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

1. ΤΖΩΡΤΖΑΤΟΥ-ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΥ ΦΩΤΕΙΝΗ, Ομότιμη Καθηγήτρια Παιδιατρικής Αιματολογίας-Ογκολογίας Πανεπιστημίου Αθηνών (Επιβλέπουσα)
2. ΓΕΩΡΓΙΟΣ Π. ΧΡΟΥΣΟΣ, Καθηγητής-Διευθυντής Α' Παιδιατρικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών
3. ΑΡΙΑΔΝΗ ΜΑΥΡΟΥ, Καθηγήτρια Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών

Ημερομηνία ορισμού του θέματος: 2 Ιουλίου 2004

Ημερομηνία καταθέσεως της διδακτορικής διατριβής: 30 Ιανουαρίου 2013

Πρόεδρος της Ιατρικής Σχολής: Καθηγητής Δημήτριος Δημόπουλος

Μέλη επταμελούς επιτροπής:

1. ΤΖΩΡΤΖΑΤΟΥ-ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΥ ΦΩΤΕΙΝΗ, Ομότιμη Καθηγήτρια Παιδιατρικής Αιματολογίας-Ογκολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή (Επιβλέπουσα)
2. ΓΕΩΡΓΙΟΣ Π. ΧΡΟΥΣΟΣ, Καθηγητής-Διευθυντής Α' Παιδιατρικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή
3. ΑΡΙΑΔΝΗ ΜΑΥΡΟΥ, Ομότιμη Καθηγήτρια Γενετικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή
4. ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΟΥΤΣΟΥΡΗΣ, Καθηγητής Βιοϊατρικής Μηχανικής, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών, Τμήμα Βιοιατρικής Μηχανικής
5. ΙΩΑΝΝΗΣ ΧΑΤΖΗΑΓΑΠΙΟΥ, Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Φυσικής
6. ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΖΟΥΜΠΟΥΡΛΗΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής Ερευνών, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Τμήμα Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας
7. ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΗΣ ΧΑΤΖΗΙΩΑΝΝΟΥ, Επίκουρος Καθηγητής Ερευνών, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Τμήμα Μεταβολικής Μηχανικής

Βαθμός Διατριβής: Άριστα

ΑΘΗΝΑ 2013

Η ΠΑΡΟΥΣΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΚΑΤΑΤΙΘΕΤΑΙ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΩΝ ΠΡΟΫΠΟΘΕΣΕΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΚΤΗΣΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ

Thesis application: 2nd July 2004

Date of assignment of Thesis counselling committee: 15th July 2004

Supervising Committee:

EMERITUS PROF. FOTINI TZORTZATOU-STATHOPOULOU

PROF. GEORGE P. CHROUSOS

PROF. ARIADNI MAVROU

Date of Thesis topic assignment: 2nd July 2004

Date of Thesis submission: 30th January 2013

Dean of Medical School: Professor Demetrios Dimopoulos

Members of the examining committee:

1. FOTINI TZORTZATOU-STATHOPOULOU, Emeritus Professor of Pediatric Hematology/Oncology, National and Kapodistrian University of Athens, Medical School (Supervisor)
2. GEORGE P. CHROUSOS, Professor of Pediatrics, Director of First Department of Pediatrics of the University of Athens, National and Kapodistrian University of Athens, Medical School
3. ARIADNI KALPINI-MAVROU, Emeritus Professor of Genetics, National and Kapodistrian University of Athens, Medical School
4. DEMETRIOS KOUTSOURIS, Professor of Biomedical Engineering, National Technical University of Athens, School of Electrical Engineering, Department of Biomedical Engineering
5. IOANNIS CHATZIAGAPIOU, Associate Professor of Physics, National and Kapodistrian University of Athens, School of Natural Sciences, Department of Physics
6. VASILEIOS ZOUMBOURLIS, Associate Research Professor, National Hellenic Research Foundation, Department of Biological Research and Biotechnology
7. ARISTOTELIS CHATZIIOANNOU, Assistant Research Professor, National Hellenic Research Foundation, Department of Metabolic Engineering

Grade:

ATHENS, 2013

THIS THESIS IS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΟΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ⊿ΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝ⊿Ε ΚΑΙ ΣΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝ⊿Ε. ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ⊿Ι⊿ΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΙΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑ⊿ΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΑΥΤΟΥ Α⊿ΕΛΦΕΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ ΚΑΙ ⊿Ι⊿ΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΙΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΣΥΓΓΡΑΦΗΣ. ΠΑΡΑΙΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑ⊿ΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΥΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣ ΚΑΙ ΤΟΙΣ ΤΟΥ ΕΜΕ ⊿Ι⊿ΑΞΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΩΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ ⊿Ε ΟΥ⊿ΕΝΙ. ⊿ΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ⊿ΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ. ΕΠΙ ⊿ΗΛΗΣΕΙ ⊿Ε ΚΑΙ Α⊿ΙΚΙΗ ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ⊿ΩΣΩ ⊿Ε ΟΥ⊿Ε ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥ⊿ΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥ⊿Ε ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΣΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝ⊿Ε, ΟΜΟΙΩΣ ⊿Ε ΟΥ⊿Ε ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ⊿ΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ⊿Ε ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ⊿ΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ ⊿Ε ΟΥ⊿Ε ΜΗΝ ΛΙΘΙΩΝΤΑΣ , ΕΚΧΩΡΗΣΩ ⊿Ε ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ Α⊿ΡΑΣΙΝ ΠΡΗΞΙΟΣ ΤΗΣ⊿Ε. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ⊿Ε ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ, ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ Α⊿ΙΚΙΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟ⊿ΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝ⊿ΡΕΙΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ⊿ΟΥΛΩΝ. Α ⊿' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ Η Ι⊿Ω Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΙΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝ⊿Ε ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΣΥΤΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ, ⊿ΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ, ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ⊿Ε ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

ΟΡΚΙΖΟΜΑΙ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΤΟΝ ΙΑΤΡΟ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΣΚΛΗΠΙΟ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΗΝ ΠΑΝΑΚΕΙΑ ΚΑΙ ΕΙΣ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΘΕΟΥΣ ΚΑΙ ΤΙΣ ΘΕΕΣ, ΕΠΙΚΑΛΟΥΜΕΝΟΣ ΑΥΤΟΥΣ ΩΣ ΜΑΡΤΥΡΕΣ, ΟΤΙ ΘΑ ΤΗΡΗΣΩ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ ΑΥΤΟΝ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΚΑΙ ΑΥΤΟ ΕΔΩ ΤΟ ΣΥΜΒΟΛΑΙΟ ΜΟΥ. ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΕΚΕΙΝΟΝ Ο ΟΠΟΙΟΣ ΜΕ ΔΙΔΑΞΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΑΥΤΗ ΙΣΟ ΠΡΟΣ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΜΟΙΡΑΣΤΩ ΜΑΖΙ ΤΟΥ ΤΑ ΥΠΑΡΧΟΝΤΑ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΒΟΗΘΩ ΟΤΑΝ ΕΥΡΙΣΚΕΤΑΙ ΣΕ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΑΝΑΓΚΗ. ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΤΟΥΣ ΑΠΟΓΟΝΟΥΣ ΤΟΥ ΩΣ ΑΔΕΛΦΟΥΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΥΣ ΔΙΔΑΣΚΩ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΑΥΤΗ, ΕΑΝ ΕΠΙΘΥΜΟΥΝ ΝΑ ΤΗ ΜΑΘΟΥΝ, ΧΩΡΙΣ ΑΜΟΙΒΗ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΛΑΙΟ. ΘΑ ΜΕΤΑΔΩΣΩ ΜΕ ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΕΣ, ΟΔΗΓΙΕΣ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΥΛΕΣ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΥΠΟΛΟΙΠΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΤΟΥ ΔΙΔΑΣΚΑΛΟΥ ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΟΥΣ ΜΑΘΗΤΕΣ ΟΙ ΟΠΟΙΟΙ ΕΧΟΥΝ ΟΡΚΙΣΤΕΙ ΟΤΙ ΘΑ ΤΗΡΟΥΝ ΤΟΥΣ ΙΑΤΡΙΚΟΥΣ ΚΑΝΟΝΕΣ ΚΑΙ ΕΧΟΥΝ ΣΥΜΦΩΝΗΣΕΙ ΕΓΓΡΑΦΩΣ, ΕΙΣ ΟΥΔΕΝΑ ΔΕ ΑΛΛΟΝ. ΘΑ ΘΕΡΑΠΕΥΩ ΤΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ, ΧΩΡΙΣ ΠΟΤΕ ΕΚΟΥΣΙΩΣ ΝΑ ΤΟΥΣ ΒΛΑΨΩ Η ΝΑ ΤΟΥΣ ΑΔΙΚΗΣΩ. ΔΕ ΘΑ ΧΟΡΗΓΗΣΩ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟ ΦΑΡΜΑΚΟ ΣΕ ΚΑΝΕΝΑΝ, ΟΥΤΕ ΚΑΙ ΕΑΝ ΜΟΥ ΖΗΤΗΘΕΙ ΚΑΙ ΟΥΤΕ ΘΑ ΔΩΣΩ ΤΕΤΟΙΑ ΣΥΜΒΟΥΛΗ. ΕΠΙΣΗΣ ΔΕ ΘΑ ΔΩΣΩ ΣΕ ΓΥΝΑΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΟ ΓΙΑ ΝΑ ΑΠΟΒΑΛΕΙ. ΘΑ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΤΟ ΒΙΟ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ ΚΑΤΑ ΤΡΟΠΟ ΑΓΝΟ ΚΑΙ ΣΥΜΦΩΝΟ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΘΕΙΟ ΝΟΜΟ. ΔΕ ΘΑ ΧΕΙΡΟΥΡΓΗΣΩ ΟΥΤΕ ΤΟΥΣ ΠΑΣΧΟΝΤΑΣ ΑΠΟ ΛΙΘΙΑΣΙΝ, ΑΛΛΑ ΘΑ ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΤΗΝ ΠΡΑΞΗ ΑΥΤΗ ΣΤΟΥΣ ΕΙΔΙΚΟΥΣ. ΣΕ ΟΣΕΣ ΔΕ ΟΙΚΙΕΣ ΕΙΣΕΛΘΩ, ΘΑ ΕΙΣΕΛΘΩ ΓΙΑ ΩΦΕΛΕΙΑ ΤΩΝ ΠΑΣΧΟΝΤΩΝ, ΑΠΕΧΟΝΤΑΣ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΕΚΟΥΣΙΑ ΑΔΙΚΙΑ ΚΑΙ ΑΛΛΗ ΖΗΜΙΑ ΚΑΙ ΚΑΘΕ ΓΕΝΕΤΗΣΙΑ ΠΡΑΞΗ ΕΠΙ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΙΚΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ Η ΔΟΥΛΩΝ. ΟΣΑ ΔΕ ΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΣΚΗΣΗ ΤΟΥ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΟΣ ΜΟΥ Η ΚΑΙ ΕΚΤΟΣ, ΓΙΑ ΤΗ ΖΩΗ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΠΟΤΕ ΝΑ ΚΟΙΝΟΠΟΙΗΘΟΥΝ, ΘΑ ΚΡΑΤΗΣΩ ΜΥΣΤΙΚΑ, ΘΕΩΡΩΝΤΑΣ ΟΤΙ ΑΥΤΑ ΕΙΝΑΙ ΑΠΟΡΡΗΤΑ. ΟΣΟ ΛΟΙΠΟΝ ΘΑ ΤΗΡΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΑΥΤΟΝ ΚΑΙ ΔΕ ΘΑ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΩ, ΕΙΘΕ ΝΑ ΑΠΟΛΑΥΩ ΚΑΙ ΤΗΣ ΖΩΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΗΣ, ΕΚΤΙΜΩΜΕΝΟΣ ΕΣΑΕΙ ΑΠΟ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ. ΕΑΝ ΟΜΩΣ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΩ ΚΑΙ ΓΙΝΩ ΕΠΙΟΡΚΟΣ, ΝΑ ΥΠΟΣΤΩ ΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ ΑΠΟ ΑΥΤΑ.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα νεοπλασματικά νοσήματα έχουν πάρει πλέον τη μορφή επιδημίας. Η αιτιολογία της ογκογένεσης παραμένει στο μεγαλύτερο μέρος της άγνωστη. Έχουν διατυπωθεί αρκετές θεωρίες για τους μηχανισμούς ογκογένεσης αλλά καμία μέχρι σήμερα δεν έχει δώσει μια ικανοποιητική εξήγηση. Ειδικότερα όταν αναφερόμαστε στις παιδικές νεοπλασίες η κατανόηση του φαινομένου λαμβάνει πιο ιδιαίτερες διαστάσεις λόγω της ευαισθησίας του πληγμένου πληθυσμού. Η πλειοψηφία των παιδικών νεοπλασιών αφορά στις αιματολογικές κακοήθειες, όπως είναι η Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (ΟΛΛ). Στην περίπτωση της ΟΛΛ έχει γίνει τεράστια πρόοδος στη θεραπευτική προσέγγισή της αφού τα επίπεδα επιβίωσης αγγίζουν το 75%-80%. Το αποτέλεσμα είναι εκπληκτικό αν σκεφθεί κανείς ότι 40 έτη πριν η λευχαιμία ήταν θανατηφόρα στο 90% των περιπτώσεων. Παρά την πρόοδο που έχει επιτευχθεί υπάρχει ακόμα ένα 10-20% των ασθενών, που υποτροπιάζει. Τα αίτια των υποτροπών ακόμα δεν έχουν εξηγηθεί ή κατανοηθεί πλήρως.

Η περίπτωση του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) είναι αρκετά πιο περίπλοκη. Τα ποσοστά επιβίωσης είναι αρκετά χαμηλά και το προσδόκιμο επιβίωσης δεν ξεπερνάει τα δύο με τρία έτη. Τα νεοπλάσματα του ΚΝΣ έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και βαρύτητα για δύο λόγους. Ο πρώτος λόγος είναι ότι τα κύτταρα του εγκεφάλου δεν πολλαπλασιάζονται, ή τουλάχιστον δεν επιτελούν αυτή τη διαδικασία στο βαθμό που γίνεται στα υπόλοιπα κύτταρα του σώματος και ο δεύτερος λόγος είναι ότι η λειτουργία του εγκεφάλου αποτελεί από μόνη της μια πρόκληση, που ακόμα δεν έχει απαντηθεί ή κατανοηθεί.

Το κύριο βάρος στην έρευνα έχει δοθεί στην κατανόηση των μηχανισμών της ογκογένεσης, την ταυτοποίηση προγνωστικών παραγόντων και εν γένει την ταξινόμηση και διαφοροποίηση των νεοπλασιών με τη βοήθεια μοριακών χαρακτηριστικών. Στο σημείο αυτό πρέπει να θυμίσουμε ότι το κύριο δόγμα της έρευνας ήταν η διατύπωση μιας υπόθεσης και η μετέπειτα διερεύνησή της. Με την εμφάνιση των νέων πειραματικών τεχνολογιών, όπως οι μικροσυστοιχίες, η έρευνα άρχισε να κινείται προς την κατεύθυνση της διερεύνησης με βάση την ανακάλυψη. Δηλαδή, πρώτα παρατηρούμε και μετά διερευνούμε. Κατά την προσωπική μας άποψη η παρατήρηση μεγάλου όγκου δεδομένων δεν αποκλείει την πρότερη διατύπωση υποθέσεως αλλά αντιθέτως της δίνει και μεγαλύτερη βαρύτητα.

Η εφαρμογή αυτών των τεχνολογιών φάνηκε ιδιαίτερα χρήσιμη σε εφαρμογές, όπως η ταυτοποίηση τύπων νεοπλασμάτων με καλύτερα αποτελέσματα από τις κλασσικές μεθόδους που μπορούσαν να εξετάσουν μόνο μερικούς παράγοντες ανά βιολογικό φαινόμενο. Από την άλλη όμως, οι νέες τεχνολογίες δεν μας βοήθησαν αρκετά στο να κατανοήσουμε το μηχανισμό ασθενειών, όπως οι νεοπλασίες, αλλά δημιούργησαν περισσότερα ερωτήματα. Πιθανότατα αυτό να οφείλεται στο γεγονός ότι τα βιολογικά φαινόμενα είναι εξαιρετικά περίπλοκα και η κατανόησή τους περνάει μέσα από άλλες οδούς.

Η εφαρμογή των νέων τεχνολογιών στη βιολογία και βιοϊατρική οδήγησε στη δημιουργία μιας νέας προσέγγισης στη θεραπευτική που ονομάστηκε ασθενο-κεντρική προσέγγιση. Η προσέγγιση αυτή στοχεύει στο να ανιχνεύσει ειδικούς παράγοντες που διαφοροποιούν, όχι πλέον τη νόσο αλλά τον ασθενή. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφέρουμε ότι η παρούσα εργασία κινείται στον αντίθετο άξονα από την επικρατούσα τάση. Η φιλοσοφία της παρούσης εργασίας αφορά στην κατανόηση των βιολογικών φαινομένων και στη διατύπωση γενικών νόμων ή θεωριών που να περιγράφουν τα βιολογικά φαινόμενα. Κατά συνέπεια αν αυτό το προεκτείνουμε στην καρκινική οντογένεση θα λέγαμε, ότι διερευνήσαμε την πιθανότητα ύπαρξης κοινών οδών και μηχανισμών στην καρκινική βιολογία. Η ιδέα πίσω από τη φιλοσοφία προκύπτει από το γεγονός (και πράγματι αυτό είναι ένα γεγονός) ο καρκινικός φαινότυπος είναι παρόμοιος είτε μιλάμε για όγκους του ΚΝΣ είτε του ήπατος είτε του αίματος. Τέτοια παρόμοια χαρακτηριστικά είναι η μη ελεγχόμενη πολλαπλασιαστική δυναμική, η απώλεια των μηχανισμών της απόπτωσης, η απώλεια της ιδιότητας της αναστολής λόγω μεμβρανικής αλληλεπίδρασης και άλλα. Αυτή η κοινή μηχανική πιθανότατα να προκύπτει από κοινούς μοριακούς μηχανισμούς.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε τέσσερα εργαλεία. Το πρώτο είναι ο πειραματισμός, το δεύτερο ήταν η θεωρία συστημάτων, το τρίτο ήταν η χαοτική μηχανική ήτοι τα μη-γραμμικά συστήματα και το τέταρτο ήταν η φυσική βιολογία. Δεν πιστεύουμε ότι υπάρχει καλύτερος τρόπος να περιγράψουμε την παρούσα προσέγγιση παρά μέσα από τα λόγια του μαθηματικού του 19^{ου} αιώνα, *Henri Poincaré*:

"*…life is a relationship among molecules and not a property of any molecule…"*

"…Science is built up of facts, as a house is with stones. But a collection of facts is no more a science, than a heap of stones is a house…"

Επίσης έχει τεράστιο ενδιαφέρον να παραθέσουμε τα λόγια ενός φυσικού του 20^{ου} αιώνα του *Erwin Schrödinger* του οποίου οι εργασίες μας επηρέασαν κατά τη μελέτη των παρόντων φαινομένων, "*…how can we, from the point of view of statistical physics, reconcile the facts that the gene structure seems to involve only a comparatively small number of atoms and that nevertheless it displays a most regular and lawful activity with adurability or permanence that borders upon them miraculous?...the evidence that two features, similar in appearance, are based on the same principle, is always precarious as long as the principle itself is unknown."*

Για να συνοψίσουμε, η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε σε μια βασική ερώτηση: ποιες είναι οι αλλαγές και μηχανισμοί που λαμβάνουν χώρα κατά τον καρκινικό πολλαπλασιασμό πριν τη διάγνωση; Για να επιχειρήσουμε να δώσουμε μια απάντηση σε αυτό το ερώτημα χρησιμοποιήσαμε τέσσερις άξονες διερεύνησης. Ο πρώτος άξονας αφορούσε στη δημιουργία ενός *in vitro*, πολλαπλασιαστικού μοντέλου με στόχο να εξετάσουμε την πορεία των καρκινικών κυττάρων από τη στιγμή της εμφάνισής τους μέχρι τη στιγμή λίγο πριν τη διάγνωση. Ο δεύτερος άξονας αφορούσε στη διερεύνηση κρίσιμων σηματοδοτικών οδών κατά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με τη χρήση

αναστολέων και/ή φαρμάκων γνωστών για τη δράση τους. Ο τρίτος άξονας αφορούσε στη γονιδιακή έκφραση και ρύθμιση κατά τα στάδια του πολλαπλασιασμού και τέλος ο τέταρτος άξονας αφορούσε στη διερεύνηση των αλλαγών στο εξωκυττάριο περιβάλλον και ειδικότερα στις αλλαγές στις φυσικοχημικές/ηλεκτροχημικές ιδιότητες των περιβαλλόντων βιολογικών υγρών.

ABSTRACT

Human neoplasias are becoming an epidemic. The etiology of tumorigenesis is still unknown. Several theories have been proposed throughout time for the possible causes of tumors but none, still, explains in full the occurrence of this disease. Especially, for the case of childhood neoplasias, these are more important since they affect a sensitive part of the population. The majority of childhood neoplasias occur as hematologic malignancies such as Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) which is the most common in children. In the case of ALL, huge progress has been made since survival rates reach a 75%-80%. This is an amazing progress in the case of ALL, if we consider the fact that the disease was lethal in the 90% of cases just 40 years ago. Yet, in the case of ALL, there is still a 10-20% that relapses. The etiology of relapse is still unknown since the tumorigenic machinery is very complicate.

The case of Central Nervous System (CNS) tumors is much more complicated. Survival rates are very low and usually life expectancy does not exceed 2-3 years. Brain tumors are interesting for two reasons. The first is that the brain does not have cells that proliferate; at least as much as other cells do in the human body, and the second is that the function of the brain itself is still a challenge.

The main focus in research has been given to the understanding of the mechanisms that underlie tumorigenesis, the discovery of prognostic factors and in general the classification of tumors and brain tumors in particular into distinct types that would add to the knowledge of better treatments.

The main dogma in research consisted from the formulation of a hypothesis and its subsequent confirmation with experimental procedures. With the advent of high-throughput methodologies a new approach started namely the discovery-driven research.

The application of such technologies has been proven useful in the classification of disease i.e. tumors, which yielded better results than the classical methods. This was due to the fact that older methods took into account few factors at a time, such as gene expression of genomic polymorphism. Yet, high-throughput methodologies have not helped us much with the understanding of disease machinery because of the extreme complexity of the investigated phenomena.

At the same time, it is true that there is a tendency towards the so called patient-specific treatment or personalized medicine nowadays. This approach aims in identifying key factors that discriminate patient as far as treatment and prognosis are concerned, since it is also true that similar diseases can be as diverse as the persons carrying those. However, that present approach relies and heads towards a direction opposite to the personalized directive. It aims in discovering

similar i.e. global factors that would determine tumorigenesis and tumour progression. The idea behind it is that since the tumorigenic phenotype is the same that is uncontrollable proliferation, apoptosis evasion and others, there should be, down to the bottom-line, a similar mechanism driving all these forces. We use for this purpose four tools: the first is experimentation, the second is systems theory the third is chaos and nonlinear dynamics and the fourth is physical biology. We could not describe it in better way for each of these approaches than some giants of science have already mentioned it. The first are the words of the universal genius, a 19th century mathematician *Henri Poincaré*:

"*…life is a relationship among molecules and not a property of any molecule…"*

"…Science is built up of facts, as a house is with stones. But a collection of facts is no more a science, than a heap of stones is a house…"

Also, a very interesting comment of *Erwin Schrödinger* a 20th century physicist and one of the founders of quantum physics:

"*…how can we, from the point of view of statistical physics, reconcile the facts that the gene structure seems to involve only a comparatively small number of atoms and that nevertheless it displays a most regular and lawful activity with adurability or permanence that borders upon them miraculous?...the evidence that two features, similar in appearance, are based on the same principle, is always precarious as long as the principle itself is unknown."*

The present work has focused on one main question: what are the changes in tumor proliferation before diagnosis or presentation? To answer this question we have used four axes of investigation. The first was the development of a proliferation model that would simulate tumor growth *in vitro*, right after the onset of tumorigenesis and close to diagnosis, the second was the investigation of critical pathways n cell proliferation through the use of chemotherapeutics/inhibitors, the third was the investigation of gene expression during the stages of proliferation and the fourth was the investigation of changes in extracellular environment during proliferation as far as electrochemical and physicochemical properties are concerned.

Στην κόρη μου Νικολέττα

Στους γονείς μου

Στους Δασκάλους μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Χωρέμειο Εργαστήριο Εργαστήριο της Α' Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θερμές ευχαριστίες αποτείνω προς την τριμελή συμβουλευτική επιτροπή, τους κκ. Καθηγητή Γεώργιο Π. Χρούσο, Ομότιμο Καθηγήτρια Φωτεινή Τζωρτζάτου-Σταθοπούλου και Καθηγήτρια Αριάδνη Καλπίνη-Μαύρου, που στήριξε και καθοδήγησε την παρούσα εργασία. Ιδιαίτερα δε, στους δύο πρώτους, για την εμπιστοσύνη που έδειξαν σε εμένα και τις πρωτοβουλίες που μου επετράπησαν να πάρω, παρά το γεγονός ότι πολλές φορές ο στόχος δεν ήταν πάντα προφανής.

Τους ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη τους!

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ 13
ABSTRACT 17
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ 21
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ 23
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ 31
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΩΝ 53
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ 55
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ 57
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΩΝ 59
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΟΡΙΣΜΩΝ 61
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΩΝ 65
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ 71
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ 73
ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΙ-ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ-ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ 75
ΔΙΑΦΟΡΙΚΩΣ ΕΚΦΡΑΖΟΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ 77
NSUN3 77
DDX4 77
ΜΕΡΟΣ Ι 101
ΕΙΣΑΓΩΓΗ 101
ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΧΟΛΙΑ 103
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 107
ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ 107
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 117
ΟΓΚΟΙ ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ 117
ΜΕΡΙΚΑ ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ 118
ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ 120
ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ 122
ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ 123
ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ 123
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 127
ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΚΑΙ ΝΕΟΠΛΑΣΙΕΣ 127
ΓΡΑΜΜΙΚΑ ΚΑΙ ΜΗ-ΓΡΑΜΜΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ 137
ΜΟΝΤΕΛΑ ΘΕΩΡΙΑΣ ΠΑΙΓΝΙΩΝ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ 143
ΜΟΝΤΕΛΑ ΘΕΡΜΟΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ 149
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 151
ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ 151

ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ ... 152
MG132 (PROTEASOME INHIBITOR) ... 155
RAPAMYCIN (mTOR INHIBITOR) ... 156
BAY11 (IKB INHIBITOR) ... 158
TRICHOSTATIN (HISTONE DEACETYLASE INHIBITOR) ... 159
CHLOROQUINE ... 160
PI3K INHIBITOR ... 161
SP600 (JNK II INHIBITOR) ... 162

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ... 163

ΟΔΟΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ ... 163

ΑΠΟΠΤΩΣΗ (APOPTOSIS) ... 163
ΝΕΚΡΩΣΗ (NECROSIS) ... 164
ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ (AUTOPHAGY) ... 165
ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ ... 166
ΦΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ... 167
ΦΑΣΗ ΗΡΕΜΙΑΣ G_0 ... 167
ΜΕΣΟΦΑΣΗ, ΦΑΣΗ G_1 ... 167
ΜΕΣΟΦΑΣΗ, ΦΑΣΗ *S* ... 167
ΜΕΣΟΦΑΣΗ, ΦΑΣΗ G_2 ... 168
ΜΙΤΩΣΗ, ΦΑΣΗ *M* ... 168
ΓΟΝΙΔΙΑ ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ... 168
ΣΗΜΕΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ... 170

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ... 171

ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ (MICROARRAYS) ... 171

ΣΥΝΤΟΜΗ ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ... 171
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ ... 172
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΚΑΙ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ ... 173
ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ ... 175
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ ... 177
ΜΟΝΑΔΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΑΙ ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΟ ΜΕΛΛΟΝ ... 180
ΟΙ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ ΣΤΟΥΣ ΟΓΚΟΥΣ ΤΟΥ ΚΝΣ ... 181
ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΚΑΙ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ ... 181

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ... 183

ΠΕΡΙ ΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ... 183

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΧΟΛΙΑ ... 183
Η ΔΙΗΛΕΚΤΡΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΑ ... 184
ΗΛΕΚΤΡΙΚΑ ΔΙΠΟΛΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ... 188
ΑΜΙΝΟΞΕΑ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ... 188
ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ ... 189
ΛΙΠΙΔΙΑ ... 190
ΗΛΕΚΤΡΟΛΥΤΕΣ ... 190

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 ... 197

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ... 197

ΜΕΡΟΣ ΙΙ ... 201

ΥΛΙΚΟ- ΜΕΘΟΔΟΙ ... 201

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9 ... 203

IN VITRO ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ: ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ 203

Η ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ TE671 204
Η ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ A172 205
Η ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ 1321N1 206
Η ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ DBTRG.05MG 207
Η ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ SK-PN-DW 208
Η ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ BE(2)M17 210
Η ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ CCRF-CEM 211
Η ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ A673 212
Η ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ IPTP98 (RAT) 213
Η ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ RD 214
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ IN VITRO ΣΥΝΘΗΚΕΣ 215

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10 217

ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΜΕΤΡΙΑ 217

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11 221

EX VIVO ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ 221

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12 223

ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ Ι: ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΑΡΧΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ 223

ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΗΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΠΛΑΚΑ NEUBAUER 223
ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΗΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ COULTER 225
ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΗΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΜΕ ΦΩΤΑΥΓΕΙΑ 227

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13 231

ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΙΙ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ 231

ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ (CONTROL EXPERIMENTS) 231
ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ (CALIBRATION EXPERIMENTS) 232
ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ (MINIMUM GROWTH EXPERIMENTS [MINGR]) 233
ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ CONSTANT VOLUME VS. CONSTANT INITIAL NUMBER (CV/CIN) 235
ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ VARIABLE INITIAL NUMBER VS VARIABLE VOLUME (VV/VIN) 238
ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΧΡΟΝΟΣΕΙΡΩΝ (TIME SERIES EXPERIMENTS) 240

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 14 243

ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ 243

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ NADP ΚΑΙ NADPH 243
ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΜΕ CALCEIN AM 246
ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΜΕ (3,3'-DIETHYLOXACARBOCYANINE IODIDE ($DIOC_2(3)$) ΚΑΙ CARBONYL CYANIDE 3-CHLOROPHENYLHYDRAZONE (CCCP) 248
ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΜΕ PROPIDIUM IODIDE 249
ΣΥΝΤΟΜΗ ΑΝΑΦΟΡΑ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΚΑΙ ΛΟΙΠΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ (ΜΕΡΟΣ Ι) 250

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 15 251

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ/ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ 251

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 16 255

ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ 255

ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ 255
ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΓΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ 255

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 17 257

ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ (FLOW CYTOMETRY) - ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ, ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ 257

ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΚΑΙ ΝΕΚΡΩΣΗΣ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ 259
ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ DNA ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ 260

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 18 263

ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ-ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΑΙ ΥΠΟΣΤΗΡΙΚΤΙΚΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ 263

ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ 263
ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΕ ΓΕΛΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 265
ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟ ΚΑΙ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ DNA 266
ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ RNA ΚΑΙ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΤΟΥ DNA ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΙΠΩΝ DNASE . 266

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 19 267

ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ (MICROARRAYS)-ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ 267

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΧΟΛΙΑ 267
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ 271
ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ 271
ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA 272
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΠΡΟΣ ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ 273
Άμεση επισήμανση 274
Έμμεση επισήμανση 275
IN VITRO ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΗ 275
ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ 276
ΑΝΑΣΤΟΛΗ 277
ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ 277
Έκπλυση 278
ΑΠΟΚΤΗΣΗ ΨΗΦΙΑΚΗΣ ΕΙΚΟΝΑΣ 279

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 20 283

ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΣΧΕΤΙΚΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ 283

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 21 285

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ, ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΑ ΕΡΓΑΛΕΙΑ ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ 285

ΒΑΣΙΚΟΙ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΟΙ ΟΡΙΣΜΟΙ 285
ΠΟΛΥΩΝΥΜΙΚΕΣ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙΣ 290
ΕΚΘΕΤΙΚΕΣ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙΣ 290
ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΙΣ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙΣ 291
ΣΥΝΑΡΤΗΣΗ ΚΑΙ ΕΚΘΕΤΗΣ LYAPUNOV 291

ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΕΙΣ POINCARE 292
ΙΔΙΟΔΙΑΝΥΣΜΑΤΑ (EIGENVECTORS), ΙΔΙΟΤΙΜΕΣ (EIGENVALUES) ΚΑΙ ΙΔΙΟΧΩΡΟΙ (EIGENSPACES) 293
ΣΥΝΤΟΜΗ ΑΝΑΦΟΡΑ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΚΑΙ ΛΟΙΠΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ (ΜΕΡΟΣ ΙΙ) 294
ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗ ΘΕΩΡΙΑ ΠΑΙΓΝΙΩΝ 295
ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΙ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ 297
ΔΙΑΝΥΣΜΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΕΩΜΕΤΡΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ 299
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΑ ΕΡΓΑΛΕΙΑ ΤΩΝ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ 303
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ 304
ΛΟΓΙΣΜΙΚΟ, ΣΥΓΓΡΑΦΗ ΚΩΔΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ 305

ΜΕΡΟΣ ΙΙΙ 307

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 307

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ 309

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 22 311

IN VITRO ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ-ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ 311

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 23 315

IN VITRO ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ-ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ 315

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 24 335

IN VITRO ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ-ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ (MINIMUM GROWTH EXPERIMENTS) 335

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 25 351

IN VITRO ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ-ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ CONSTANT VOLUME VS. CONSTANT INITIAL NUMBER (CV/CIN EXPERIMENTS) 351

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 26 419

IN VITRO ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ-ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ VARIABLE VOLUME VS. VARIABLE INITIAL NUMBER (VV/VIN EXPERIMENTS) 419

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 27 441

IN VITRO ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ-ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΧΡΟΝΟΣΕΙΡΩΝ (TIME-SERIES EXPERIMENTS) 441

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 28 465

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ *IN VITRO* ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ 465

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 29 493

ΠΕΡΙ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ *IN VITRO* ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ 493

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 30 505

ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΕΣ/ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΤΑ ΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ 505

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 31 511

ΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ ΟΔΟΙ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ *IN VIVO* ΚΑΙ *EX VIVO* 511

ΜΕΡΟΣ IV 565
ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 565
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 591
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι 613
ΥΛΙΚΟ, ΧΗΜΙΚΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΕΣ 613
ΧΗΜΙΚΑ 619
HEPES free-acid (Sigma Aldrich GmbH) 620
ΠΑΡΑΣΚΕΥΕΣ 629
1× PHOSPHATE BUFFERED SALINE (PBS) 629
10× PHOSPHATE BUFFERED SALINE (PBS) 629
50× TAE Buffer (Tris-Acetate-EDTA) 629
50× TBE Buffer (Tris-Borate-EDTA) 630
3M AMMONIUM ACETATE (CH_3COONH_4) 630
3M SODIUM ACETATE (CH_3COONa) 630
20× SSC (SALINE-SODIUM CITRATE BUFFER) 631
10% SDS (SODIUM DODECYL SULFATE) 631
2% SDS (SODIUM DODECYL SULFATE) 631
1% SDS (SODIUM DODECYL SULFATE) 631
HEPES FREE-ACID 2M 631
3×SSC/0.1% SDS WASH SOLUTION 631
SODIUM BICARBONATE 0.1M pH 9.0 632
ΕΤΟΙΜΑ ΚΙΤ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ 632
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ 633
ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ 633
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΕΠΙΚΟΛΛΩΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ IN VITRO 635
ΥΛΙΚΟ 635
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 635
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑ IN VITRO 637
ΥΛΙΚΟ 637
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 637
ΚΡΥΟΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΜΑΚΡΟΧΡΟΝΙΑ ΦΥΛΑΞΗ 639
ΥΛΙΚΟ 639
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 639
ΑΠΟΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΜΑΚΡΟΧΡΟΝΙΑ ΦΥΛΑΞΗ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΥΓΡΟΥ ΑΖΩΤΟΥ 641
ΥΛΙΚΟ 641
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 641
ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΠΛΑΚΑ NEUBAUER 643
ΥΛΙΚΟ 643
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 643
ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΜΕΤΡΗΤΗ COULTER 644
ΥΛΙΚΟ 644
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 644
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΟΥ IN VITRO ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ 645
ΥΛΙΚΟ 645
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 645
ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΓΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΚΑΙ ΝΕΚΡΩΣΗΣ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ 647
ΥΛΙΚΟ 647
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 647
ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΓΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ 648
ΥΛΙΚΟ 648
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 648

ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΓΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA ΜΕ ΦΥΛΑΞΗ ΣΕ RNALATER 649
ΥΛΙΚΟ 649
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 649
ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΓΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA ΜΕ ΦΥΛΑΞΗ ΣΕ TRIZOL® REAGENT 650
ΥΛΙΚΟ 650
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 650
ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΓΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA 651
ΥΛΙΚΟ 651
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 651
ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΧΡΩΣΗ GIEMSA 652
ΥΛΙΚΟ 652
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 652
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΚΑΙ ΝΕΚΡΩΣΗΣ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ ΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΣΕ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑ 653
ΥΛΙΚΟ 653
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 653
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΚΑΙ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ DNA ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ ΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΣΕ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑ 655
ΥΛΙΚΟ 655
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 655
ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ (RNA) ΜΕ ΤΗΝ ΑΡΧΗ ΤΟΥ TRIZOL® ΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΣΕ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑ 656
ΥΛΙΚΟ 656
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 656
ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ 658
ΥΛΙΚΟ 658
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 658
ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΓΕΛΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 659
ΥΛΙΚΟ 659
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 659
ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟ ΚΑΙ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ DNA 660
ΥΛΙΚΟ 660
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 660
ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ RNA ΚΑΙ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΤΟΥ DNA ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΙΠΩΝ DNASE . 661
ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ RNA ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΦΑΙΝΟΛΗΣ/ΧΛΩΡΟΦΟΡΜΙΟΥ ΚΑΙ ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗΣ ΜΕ ΟΞΙΚΟ ΝΑΤΡΙΟ Ή ΑΜΜΩΝΙΟ 661
ΥΛΙΚΟ 661
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 661
ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ RNA ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ KIT 662
ΥΛΙΚΟ 662
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 662
CODELINK EXPRESSION SYSTEM PROTOCOL (cDNA Microarrays) 664
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ 681
ΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ 681
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV 683
ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΔΟΧΕΣ ΚΑΙ ΥΠΟΘΕΣΕΙΣ 683
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V 687
ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΑΡΜΟΛΟΓΗΣΗ ΟΡΓΑΝΩΝ ΜΕΤΡΗΣΗΣ 687
ΜΟΝΑΔΑ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΕΙΚΟΝΑΣ 689
ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗΣ ΜΟΝΑΔΑΣ (WORKSTATION) 690
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΑΞΗ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ 692
ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗΣ ΜΟΝΑΔΑΣ (WORKSTATION) 693
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VI 695

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....695

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Ιπποκράτης (έργο του *Peter Paul Rubbens,* 1638)**.** 107

Εικόνα 2. Το «Ασκληπιείο» της Κω. 108

Εικόνα 3. Γαληνός. Λιθογραφία του *Pierre Roche Vigneron*. (Παρίσι: *Lith de Gregoire et Deneux*, ca. 1865). 108

Εικόνα 4. *Andreas Vesalius* (πηγή: www.wikipedia.org) 109

Εικόνα 5. Το έργο του *Vesalius's*, "*Fabrica"*, περιείχε πολλές αξιοπρόσεκτες απεικονίσεις, οι οποίες μάλιστα βρισκόντουσαν σε αλληγορικές παραστάσεις (αριστερά). Η βάση του εγκεφάλου, όπου για πρώτη φορά απεικονίζονται το *Οπτικό Χίασμα*, η Παρεγκεφαλίδα και τα οπτικά νεύρα (δεξιά) (πηγή: www.wikipedia.org). 109

Εικόνα 6. *Paul Broca.* (Πηγή: http://de.wikipedia.org/wiki/Paul_Broca). 110

Εικόνα 7. *Johann Ludwig Wilhelm Thudichum* 110

Εικόνα 8. Luigi Galvani (πηγή: www.wikipedia.org). 111

Εικόνα 9. Ο εγκέφαλος του *κου Tan,* όπου φαίνονται οι μορφολογικές αλλοιώσεις των μετωπιαίων λοβών, στους οποίους οφείλετο η γλωσσική διαταραχή. Με τη μελέτη αυτή ήταν η πρώτη φορά που συνδέθηκαν οι μορφολογικές εγκεφαλικές κακώσεις με νευρικές δυσλειτουργίες. 111

Εικόνα 10. Η πειραματική διάταξη του Galvani με τους μυς βατράχων, όπως δημοσιεύθηκε στο έργο του *De viribus electricitatis in motu musculari* (πηγή: www.wikipedia.org). 112

Εικόνα 11. Το έργο του Galvani, όπως τυπώθηκε στην επιθεώρηση του πανεπιστημίου της *Bologna* το 1791 με τον τίτλο *De Bononiensi Scientiarum et Artium*. Το έργο του ήταν στη σελίδα 363 με τη μορφή *Opuscula*, δηλαδή *Σύντομη Ανασκόπηση* και τον τίτλο *De Viribus Electricitatis In Motu Musculari* (πηγή: www.wikipedia.org). 113

Εικόνα 12. Ramon y' Cajal (πηγή: www.wikipedia.org). 113

Εικόνα 13. Απεικόνιση των νευρώνων του ημισφαιρίου του εγκεφάλου όρνιθας. Από το έργο του Cayal "Estructura de los centros nerviosos de las aves", (Madrid, 1905) (**A**). Απεικόνιση των κυττάρων *Purkinje* του ημισφαιρίου του εγκεφάλου του περιστεριού, του Ramón y Cajal, από δημοσίευση του 1899 (*Instituto Santiago Ramón y Cajal*, Μαδρίτη, Ισπανία) (**B**). Απεικόνιση του οπτικού χιάσματος του σπουργίτη από το έργο του *Ramón y Cajal* "*Estructura de los centros nerviosos de las aves*", (Μαδρίτη, 1905) (**C**). Απεικόνιση των νευρωνικών συνδέσεων του ιππόκαμπου τρωκτικού, από το έργο του *Ramón y Cajal*, "*Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertebretes*", Vol. 1 και 2. *A. Maloine,* Paris 1911 (**D**) (πηγή: www.wikipedia.org). 114

Εικόνα 14. *Jaroslav Heyrovský (Πηγή: http://en.wikipedia.org/wiki/Jaroslav_Heyrovsky).* 115

Εικόνα 15. Κατανομή Παιδικών Νεοπλασιών κατά Τύπο (Πηγή: American Cancer Society "Facts and Figures 2001") (προσαρμοσμένο από (Αναστασίου 2012)). 119

Εικόνα 16. Κατανομή των παιδικών νεοπλασιών του ΚΝΣ με βάση τη συχνότητά τους κατά την πρώτη διάγνωση (Πηγή: SEER Pediatric Monograph , 1975-1996, Bethesda, 1999) (προσαρμοσμένο από (Αναστασίου 2012)). 121

Εικόνα 17. *Ισαάκ Νεύτων* (αριστερά) έργο του *Godfrey Kneller* (Λονδίνο, 1689) και *Henri Poincare* (δεξιά) (πηγή: www.wikipedia.org). 130

Εικόνα 18. Ο Ελκυστής του Lorenz (*Lorenz attractor*). Μικρές αλλαγές στους παράγοντες του συστήματος επιφέρουν μεγαλύτερες αλλαγές στη συμπεριφορά του συστήματος. Εδώ παρουσιάζεται η επίδραση από τη μεταβολή του παράγοντα ρ για ρ=13 (**A**), ρ=14 (**B**), ρ=15 (**C**), ρ=28 (**D**). 131

Εικόνα 19. Η δυναμική δύο ειδών πληθυσμών συναρτήσει του χρόνου (A) και σε διάγραμμα phase-space, όπου φαίνεται η μη-γραμμική δυναμική τους και η εμφάνιση των ελκυστών που είχαν δειχθεί στα μοντέλα του Lorenz (B). Στο διάγραμμα (A) παρατηρούμε την ταλαντωτική μορφή που έχει ο πληθυσμός των ειδών που μελετώνται και η άμεση αλληλεπίδραση και αλληλεξάρτηση τους. Όταν μοντελοποιηθούν οι δύο πληθυσμοί ξεχωριστά ο ένας από τον άλλο αλλά με περιορισμούς στους πόρους (C) τότε οι δύο πληθυσμοί γίνονται ασυμπτωτικοί και πλησιάζουν ένα σταθερό σημείο ισορροπίας. Αντίστοιχα η διαγραμματική απεικόνιση ως phase-space, εμφανίζει πάλι ελκυστές κάτι το οποίο είναι σημάδι μη-γραμμικής συμπεριφοράς (D). 133

Εικόνα 20. *John von Neumann* (A), *Oskar Morgenstern* (B), *John Forbes Nash* (C), *John Maynard-Smith* (D) (πηγή: www.wikipedia.org). 135

Εικόνα 21. Max Planck (αριστερά) και Erwin Schrödinger (δεξιά) (πηγή: www.wikipedia.org)... 136

Εικόνα 22. Το διάγραμμα της σιγμοειδούς καμπύλης για k=2 και k=1.2. Η αναπαράσταση της συνάρτησης για k=2 (**A**) δείχνει ουσιαστικά την αύξηση ενός πληθυσμού και την μετέπειτα μείωσή του δεδομένων των περιορισμών χώρου (spatial) και πόρων (resources) και χωρίς την ανανέωσή του. Η αναπαράσταση της ίδιας συνάρτησης ως αναδρομικής για k=2 (**B**), αποδίδει τη σιγμοειδή μορφή, η οποία δείχνει ότι ένας πληθυσμός τείνει προς ένα ακρότατο όριο (εδώ το 0.5) το οποίο είναι το σημείο ισορροπίας μεταξύ «γεννήσεων» και «θανάτων». Αντιστοίχως παρουσιάζονται οι ίδιες καμπύλες για k=1.2 (**C**, **D**), όπου φαίνεται η αλλαγή της καμπύλης, δείγμα ότι ο παράγοντας αυτός (k) είναι καθοριστικός για διαμόρφωση του πληθυσμού. 138

Εικόνα 23. Μεγέθυνση της **Εικόνας 22A**, όπου φαίνεται μέρος της σιγμοειδούς καμπύλης. Η διακεκομμένη γραμμή αναπαριστά την τροχιά των κοινών σημείων μεταξύ της σιγμοειδούς καμπύλης και της ευθείας $y=x$. 139

Εικόνα 24. Τα διαγράμματα της σιγμοειδούς συνάρτησης για k=2.75 (**A**) και k=3.3 (**B**). Στην πρώτη περίπτωση παρατηρούμε έναν σταθερό ελκυστή (sink) ενώ στη δεύτερη η συμπεριφορά της συνάρτησης αλλάζει και οι τροχιές γίνονται περιοδικές με περίοδο 2. 141

Εικόνα 25. Η σιγμοειδής συνάρτηση αλλάζει δραστικά συμπεριφορά για k=3.75 (**A**). Η αναδρομική της μορφή γίνεται ταλαντωτική, όπως αυτό φαίνεται σε αντιδιαστολή με την ίδια συνάρτηση όταν ο k=1.2 (μπλε καμπύλη στο **A**). Ομοίως, η απεικόνιση της συνάρτησης και η απεικόνιση της τροχιάς που προαναφέραμε παρουσιάζει τρία σημεία περιόδου (περίοδο 3) (**B**). .. 142

Εικόνα 26. Η διαγραμματική αναπαράσταση του παράγοντα k σε σχέση με τον πληθυσμό δίνει περίπλοκες δυναμικές γνωστές ως *bifurcations*. Διαγραμματικά παρουσιάζεται η απεικόνιση για k=0 μέχρι k=4 (**A**) και για k=2 μέχρι k=4 (**B**). Η μεγέθυνση του σχήματος αυτού (**C**) αποκαλύπτει επαναλαμβανόμενες δομές, που έχουν δομή *fractal*. 143

Εικόνα 27. Διαγραμματική αναπαράσταση των βασικών μοντέλων παιγνίων για την πολλαπλασιαστική δυναμική των νεοπλασματικών κυττάρων. Η κλασσική θεώρηση για την αύξηση ενός όγκου: Τα γενετικώς μετασχηματισμένα κύτταρα (μαύρο χρώμα) πολλαπλασιάζονται. Σε αυτή τη διαδικασία ο κυτταρικός θάνατος λαμβάνει χώρα λόγω του ανταγωνισμού για πόρους (A). Μια από τις βασικές υποθέσεις για την αύξηση των νεοπλασματικών κυττάρων αναφέρεται στη συνεργασία. Τα αρχικά κύτταρα (γαλάζιο χρώμα) διαιρούνται σε νέους πληθυσμούς (γκρι χρώμα), τα οποία με τη σειρά τους συνεργάζονται για να παράξουν έναν τρίτο πληθυσμό (μαύρο χρώμα) εξελικτικά πιο βέλτιστο και ικανό να συνεχίσει την προαγωγή του όγκου (B). Τελική υπόθεση για την αύξηση των νεοπλασματικών κυττάρων, όπου τα αρχικά κύτταρα (γαλάζιο χρώμα) γεννούν δύο νέους πληθυσμούς (κόκκινο χρώμα και μαύρο χρώμα) ικανούς να συνεχίσουν τη νεοπλασία αλλά μόνο σε συνεργασία, παράγωντας π.χ. αυξητικούς παράγοντες (Growth Factors A, B) απαραίτητους για τον κάθε πληθυσμό χωρίς τους οποίους κανείς δεν μπορεί να προχωρήσει παρά μόνο σε συνέργεια (C) (Σχήμα προσαρμοσμένο από (Axelrod, Axelrod et al. 2006)). 148

Εικόνα 28. Η δισδιάστατη δομή της *Prednisolone* (αριστερά), και η τρισδιάστατη δομή της (δεξιά). 153

Εικόνα 29. Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών ως μονομερές (A) και ως διμερές (B) αντίστοιχα σε πρόσδεση με τη δεξαμεθαζόνη. 154

Εικόνα 30. Η δισδιάστατη (αριστερά) και τρισδιάστατη (δεξιά) του αναστολέα MG132. 155

Εικόνα 31. Η δισδιάστατη δομή της *Rapamycin* (αριστερά) και η τρισδιάστατη (δεξιά). 156

Εικόνα 32. Η δισδιάστατη (αριστερά) και τρισδιάστατη (δεξιά) του αναστολέα Bay11-7032. 158

Εικόνα 33. Η δισδιάστατη (αριστερά) και τρισδιάστατη (δεξιά) του αναστολέα Trichostatin A (TSA). 159

Εικόνα 34. Η δισδιάστατη δομή της Chloroquine (αριστερά) και η τρισδιάστατη δομή της (δεξιά). 160

Εικόνα 35. Η δισδιάστατη δομή του αναστολέα της PI3K *LY294002* (αριστερά) και η τρισδιάστατη δομή του (δεξιά). 161

Εικόνα 36. Η δισδιάστατη δομή του αναστολέα SP600 125 (αριστερά) και η τρισδιάστατη δομή του (δεξιά). 162

Εικόνα 37. Βήματα στη σηματοδότηση προς τον νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο (προσαρμοσμένο από τους *Golstein and Kroemer* 2007). RIP1: receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1 (RIPK1), ROS:Reactive Oxygen Species 164

Εικόνα 38. Διαγραμματική αναπαράσταση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου, όπου φαίνονται οι μεταβάσεις από το ένα σημείο του κυτταρικού κύκλου στο επόμενο. 166

Εικόνα 39. Διαγραμματική παρουσίαση των σηματοδοτικών οδών του κυτταρικού κύκλου (πηγή: KEGG Database, http://www.genome.jp/kegg/pathway/hsa/hsa04110.html). 169

Εικόνα 40. Το ευκαρυωτικό κύτταρο (A) έχει στατικές ηλεκτρικές ιδιότητες και ειδικότερα η κυτταρική μεμβράνη (B), λόγω της μεταφοράς ιόντων ένθεν και ένθεν αυτής. Σε συνέχεια οι πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης αλλά και αυτές του εξωκυττάριου χώρου λειτουργούν ως φορτισμένα σφαιροειδή φορτία (τα οποία μπορούμε να θεωρήσουμε ως ομογενή) (C), οι οποίες με τη σειρά τους μπορούν να θεωρηθούν ως ηλεκτρικά δίπολα (D) με ηλεκτρική ροπή ίση (m) με το εσωτερικό γινόμενο των φορτίων (q) επί τη μεταξύ τους απόσταση (s). 186

Εικόνα 41. Τα σύμπλοκα της μορφής $[A^{+}(H_2O)^{0}\lambda]^{+}$ και $[B^{-}(H_2O)^{0}\mu]^{-}$ (όπου λ και μ, ο αριθμός μορίων που έχουν γύρω τους τα ιόντα). Τα ιόντα (I) του διισταμένου άλατος, δημιουργούν σύμπλοκα με το νερό. 195

Εικόνα 42. Μικροσκοπική λήψη των κυττάρων TE671. Η λήψη έγινε με ανάστροφο μικροσκόπιο, φίλτρο πολωμένου φωτός και αντιστροφή φάσης (μεγέθυνση ×100). 204

Εικόνα 43. Μικροσκοπική φωτογράφηση των κυττάρων A172. Η λήψη έγινε με ανάστροφο μικροσκόπιο και αντιστροφή φάσης σε πλάκα 96 πηγαδιών (μεγέθυνση ×100). 205

Εικόνα 44. Μορφολογία των κυττάρων 1321N1. Η λήψη έγινε με ανάστροφο μικροσκόπιο και αντιστροφή φάσης (μεγέθυνση ×100). 206

Εικόνα 45. Η μορφολογία των κυττάρων DBTRG.05MG. Η λήψη έγινε με ανάστροφο μικροσκόπιο και αντιστροφή φάσης (μεγέθυνση ×100). 207

Εικόνα 46. Παρουσιάζεται η μορφολογία των κυττάρων SK-PN-DW σε επικολλώμενη κατάσταση (A-C) και σε κατάσταση εναιωρήματος (D, E). Τα κύτταρα αυτά και στους δύο σχηματισμούς δημιουργούν συσσωματώματα. Ως επί το πλείστον έχουν την ιδιότητα να αυξάνονται σε εναιώρημα. Η λήψη έγινε με ανάστροφο μικροσκόπιο και αντιστροφή φάσης (μεγέθυνση ×100). Οι εικόνες A-C αποτελούν επικόλληση συνεχόμενων λήψεων βίντεο συνολικού μήκους 3mm. 209

Εικόνα 47. Η μορφολογία των κυττάρων BE(2)M17. Η λήψη έγινε με ανάστροφο μικροσκόπιο και αντιστροφή φάσης και φίλτρο πολωμένου φωτός (μεγέθυνση ×100). 210

Εικόνα 48. Η μορφολογία των κυττάρων CCRF-CEM. Η λήψη έγινε με ανάστροφο μικροσκόπιο και αντιστροφή φάσης και φίλτρο πολωμένου φωτός (μεγέθυνση ×100). 211

Εικόνα 49. Η μορφολογία των κυττάρων IPTP/98 (αρουραίος). Η λήψη έγινε με ανάστροφο μικροσκόπιο και αντιστροφή φάσης και φίλτρο πολωμένου φωτός (μεγέθυνση ×100). 213

Εικόνα 50. Η μορφολογία των κυττάρων RD. Η λήψη έγινε με ανάστροφο μικροσκόπιο και αντιστροφή φάσης και φίλτρο πολωμένου φωτός (μεγέθυνση ×100). 214

Εικόνα 51. Πανοραμική διάταξη του συστήματος μικροσκοπίας και ανάλυσης εικόνας (Α) και επεξηγηματική παρουσίαση (Β). 218

Εικόνα 52. Μικρόμετρο Nikon τύπου MBM 11100 (stage micrometer type A), συνολικού μήκους 1mm και διαβάθμιση 0.01mm (=100μm). Παρουσιάζονται, το συνολικό οπτικό πεδίο του μικροσκοπίου σε μεγέθυνση ×100 συμπεριλαμβανομένης της κλίμακας (**A**) και η κλίμακα με διόρθωση γωνίας 1^{o} μοίρας (**B**). 220

Εικόνα 53. Διάγραμμα της πλάκας *Neubauer*, με επιμέρους μεγεθύνσεις των σημείων όπου γίνεται η μέτρηση των κυττάρων. Η πλάκα *Neubauer* έχει εννέα τετράγωνα εμβαδού $1mm^2$ όπως φαίνεται στην πρώτη μεγέθυνση. Τα τετράγωνα αυτά χωρίζονται περαιτέρω σε 16 μικρότερα τετράγωνα εμβαδού $0.0625\ mm^2$, τα οποία με τη σειρά τους χωρίζονται σε 25 μικρότερα τετράγωνα εμβαδού $0.0025\ mm^2$. Εφόσον η απόσταση μεταξύ καλυπτρίδας και εστιακού σημείου είναι 0.1mm τότε οι όγκοι που δημιουργούνται στο χώρο μεταξύ καλυπτρίδας και κυττάρων είναι $0.1mm^3$, $0.00625mm^3$ και $0.00025mm^3$ αντίστοιχα. 224

Εικόνα 54. Η αρχή της μεθόδου Coulter, για τη μέτρηση κυττάρων. Τα κύτταρα βρίσκονται σε ισότονο, ηλεκτρολυτικό διάλυμα. Η οπή που σχηματίζεται αποτελεί το σημείο εισόδου στο ηλεκτρικό πεδίο. Όταν περνάει ένα κύτταρο, μετατοπίζει το διάλυμα και αλλάζει την εμπέδηση του ηλεκτρικού πεδίου στο σημείο εισόδου. Η διαφορά στην εμπέδηση είναι μετρήσιμη και είναι ανάλογη του μεγέθους του κυττάρου. Μάλιστα κατά αυτόν τον τρόπο είναι εφικτό να διαχωριστούν και άλλοι υποπληθυσμοί μέσα στο ίδιο εναιώρημα. Επίσης ο αριθμός των «χτυπημάτων» *(hits*) του ρυθμού δηλαδή που θα διέρχονται κύτταρα μέσα από την οπή είναι ανάλογος του αριθμού των κυττάρων. Αν είναι γνωστό πόσος όγκος εναιωρήματος πέρασε, τότε είναι δυνατή η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων ανά μονάδα όγκου. 226

Εικόνα 55. Το σύστημα VICTOR3 (Perkin Elmer, CA USA). 229

Εικόνα 56. Η πειραματική διάταξη τυποποίησης (calibration) για επικολλώμενα κύτταρα και χρώση με Alamar Blue. 233

Εικόνα 57. Παρουσιάζεται μια γενική δομή των πειραμάτων ελάχιστης ανάπτυξης, όπου αναλόγως του κυτταρικού τύπου χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί αρχικοί αριθμοί κυττάρων (π.χ. όπως φαίνεται στα έγχρωμα πεδία δεξιά) και σε πολλές περιπτώσεις διαφορετικοί όγκοι καλλιεργητικού υλικού (επάνω κέντρο). 234

Εικόνα 58. Η πειραματική διάταξη CV/CIN. Για λεπτομερή περιγραφή βλ. κείμενο. 237

Εικόνα 59. «Κύβος» δεδομένων της πειραματικής διαδικασίας CV/CIN στον άξονα Χ είναι η μεταβολή του όγκου, στον άξονα Υ είναι οι αρχικοί αριθμοί καθώς στον άξονα Ζ βρίσκεται ο χρόνος. Η ανάλυση των δεδομένων αυτών βασίζεται στη διανυσματική ανάλυση και γραμμική άλγεβρα, μιας και κάθε στοιχείο του σχήματος αυτού μπορεί να αναπαρασταθεί με ένα διάνυσμα. 238

Εικόνα 60. Διαγραμματική αναπαράσταση της πειραματικής διάταξης VV/VIN. Η πρώτη διάταξη ξεκίνησε από πλάκα 48 θέσεων, μόλις έφταναν σε κορεσμό (confluence) μεταφερόντουσαν στην επόμενη φάση ήτοι 24 θέσεις, 12 θέσεις και 6 θέσεις. Τα κύτταρα μελετήθηκαν ως προς την κατανομή του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση. Κατά τη μεταφορά από τη μια φάση στην επόμενη κύτταρα κρατήθηκαν για μελέτη με μικροσυστοιχίες. 239

Εικόνα 61. Διαγραμματική παρουσίαση της πειραματικής διάταξης των χρονοσειρών για κύτταρα σε εναιώρημα. 240

Εικόνα 62. Διαγραμματική παρουσίαση της πειραματικής διάταξης χρονοσειρών για επικολλούμενα κύτταρα. Στο κάτω μέρος παρουσιάζονται οι αρχικοί αριθμοί από τους οποίους ξεκίνησε η πειραματική διαδικασία. 241

Εικόνα 63. Διαγραμματική παρουσίαση της πειραματικής διάταξης μέτρησης του κυτταρικού αυτοφθορισμού/NADH. 246

Εικόνα 64. Διαγραμματική παρουσίαση της πειραματικής διάταξης μέτρησης του ηλεκτρικού δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης με CalceinAM. 247

Εικόνα 65. Διαγραμματική παρουσίαση της πειραματικής διάταξης μέτρησης του ηλεκτρικού δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης με $DiOC_2(3)$. 248

Εικόνα 66. Διαγραμματική παρουσίαση της πειραματικής διάταξης μέτρησης της κατανομής των κυτταρικών πληθυσμών και του περιεχομένου DNA κατά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. 249

Εικόνα 67. Η δομή ανάλυσης των δεδομένων των μεταβολικών και λοιπών μετρήσεων. Την ονομάσαμε "cube-in-a-cube". 250

Εικόνα 68. Διαγραμματική παρουσίαση των πειραμάτων επώασης με αναστολείς και χημειοθεραπευτικούς παράγοντες στα κύτταρα A172, 1321N1, TE671. 252

Εικόνα 69. Ενδεικτικά πειράματα επώασης κυττάρων με αναστολείς και χημειοθεραπευτικούς παράγοντες στα κύτταρα 1321N1 και TE671. Εδώ παρουσιάζονται πειράματα σε πλάκες μικροτιτλοποίησης 48-πηγαδιών (48-well plates). 253

Εικόνα 70. Απλουστευμένη διαγραμματική παρουσίαση της αρχής της κυτταρομετρίας ροής. Το βασικότερο σημείο είναι η υδροδυναμική εστίαση της ροής των κυττάρων που προκύπτει από το διαφορετικό ιξώδες των δύο υγρών δηλαδή του ισότονου *Sheath Fluid* και του μίγματος κυττάρων/διαλύτη. 258

Εικόνα 71. Phosphatidyl Serine 259

Εικόνα 72. Annexin A5 259

Εικόνα 73. Χαρακτηριστική προσομοίωση του κυτταρικού κύκλου όπως αυτός προκύπτει από την κυτταρομετρία ροής. Οι σκιασμένες περιοχές αντιστοιχούν σε περιοχές του κυτταρικού κύκλου, όπως φαίνεται και στη λεζάντα μέσα στο διάγραμμα, οι οποίες έχουν προκύψει από τη μαθηματική ανάλυση των δεδομένων. 261

Εικόνα 74. Απλοποιημένη αναπαράσταση του νόμου των *Beer-Lambert*. Παρουσιάζει τη βασική αρχή της φωτομέτρησης (πηγή: **http://en.wikipedia.org/wiki/Beer-Lambert_law**). 264

Εικόνα 75. Παρουσιάζεται εικόνα ηλεκτροφόρησης RNA, όπου φαίνονται τα φορτία, η κατεύθυνση του ηλεκτρικού πεδίου και οι ζώνες 28S και 18S του RNA. 265

Εικόνα 76. Στάθμιση της ευαισθησίας των χρωστικών Cy3 και Cy5 με το όργανο μέτρησης ScanArray 4000XL (Perkin Elmer Inc.). Παρουσιάζονται συγκεντρώσεις της χρωστικής Cy3 από 75pmol-7zmol και της χρωστικής Cy5 από 122pmol-122zmol. 269

Εικόνα 77. Τύποι σαρωτών για μικροσυστοιχίες DNA. (α) Σαρωτής LASER. Η ακτίνα LASER ανακλάται από το διχρωϊκό κάτοπτρο (διακεκομμένες γραμμές), και περνώντας μέσα από τον αντικειμενικό φακό εστιάζεται στην επιφάνεια της μικροσυστοιχίας. Η εκπεμπόμενη φθορίζουσα ακτινοβολία (συνεχείς γραμμές) ανακλάται από το κάτοπτρο και περνά μέσα από κατάλληλο φίλτρο εκπομπής, το φακό ανίχνευσης, και την ίριδα για να καταλήξει στο φωτοπολλαπλασιαστή (PMT). (β) Σαρωτής CCD. Λευκό φώς υψηλής έντασης (διακεκομμένες γραμμές) διέρχεται μέσω κατάλληλου φίλτρου διέγερσης, ώστε να παραχθεί φώς στο επιθυμητό μήκος κύματος, το οποίο εν συνεχεία οδηγείται μέσω κατάλληλης διάταξης οπτικών ινών σε μια μεγάλη περιοχή της επιφάνειας του πλακιδίου, την οποία και διεγείρει. Η εκπεμπόμενη ακτινοβολία (συνεχείς γραμμές) διερχόμενη μέσω του φίλτρου εκπομπής και του διαφράγματος συλλέγεται από την κάμερα CCD. Το διάφραγμα

ελέγχει τη διέλευση του φωτός στην κάμερα (Russell, Meadows et al. 2009)(Προσαρμοσμένο από (Σηφάκης 2012)). 281

Εικόνα 78. Η πειραματική διάταξη μέτρησης φυσικοχημικών και ηλεκτροχημικών παραγόντων. Η διάταξη αποτελείται από την υπολογιστική μονάδα, μια γεννήτρια συναρτήσεων (5MHz Function Generator 2005, Global Specialties Electronics, USA), έναν ψηφιακό παλμογράφο (DSO2100, Hung Chang Industries, China), ένα πολύμετρο (M890F, MASTECH, PRECISION MASTECH ENTERPRISES (HONG KONG) LIMITED) και ένα πολύμετρο για τις μετρήσεις του σήματος εξόδου (CM2400, TELE, Aspropyrgos, Hellas). 284

Εικόνα 79. Παραδείγματα των τομών *Poincare*. Ένα γράφημα (P(x)) τέμνει μια επιφάνεια σε δύο σημεία όπου ισχύει $x=P(x)$ (A). Το γράφημα μιας *Χαμιλτονιανής* συνάρτησης (B) με την αντίστοιχη τομή *Poincare* (C). Απεικόνιση Poincare για ένα σύστημα *Duffing*, φθινουσών ταλαντώσεων (D). 293

Εικόνα 80. Το διάγραμμα του *Loop* microarray design (Kerr and Churchill 2001) (A).Γεωμετρική ερμηνεία τριών πειραμάτων, όπου τα διανύσματα, το καθένα σε τρεις επαναλήψεις, όπου τα διανύσματα V_1, V_2, V_3 είναι ο μέσος των διανυσμάτων $w_{1,i,j}$, $w_{2,i,j}$ and $w_{3,i,j}$ του i^{th} γονιδίου στο j^{th} πείραμα και με συντεταγμένες $x_1(0.0)$ έως $x_2(x_n, y_n)$, όπου x_n, y_n είναι οι συντεταγμένες του κεντροειδούς των τριών επαναλήψεων (B, D). Κάθε διάνυσμα v_1, v_2, v_3 με διευθύνσεις θ_1, θ_2, θ_3 αντίστοιχα αναπαριστούν την έκφραση του ίδιου γονιδίου σε τρία ανεξάρτητα πειράματα (επαναλήψεις). Ορίζουμε τρία νέα διανύσματα c_1, c_2, c_3 , τα οποία αποτελούν τη διαφορά μεταξύ των ζευγών των πειραμάτων (C). Παράδειγμα ενός *"loop" design* με πέντε πειραματικές διατάξεις με βάση τη γεωμετρική μας ερμηνεία (E). 302

Εικόνα 81. Διαγραμματική παρουσίαση των πειραμάτων ελέγχου για τα κύτταρα TE671, 1321N1, A172 και SKPNDW. Τα SKPNDW δεν έδειξαν να αυξάνονται μέσα στο χρονικό περιθώριο που έγινε το πείραμα ελέγχου. Οι υπόλοιπες κυτταρικές σειρές αυξήθηκαν και μάλιστα ακολουθώντας το εκθετικό μοντέλο με βάση το οποίο είχαν αρχικά καλλιεργηθεί. 312

Εικόνα 82. Τρισδιάστατες απεικονίσεις των πειραμάτων τυποποίησης για τα κύτταρα A172 (A,B), 1321N1 (C,D) και TE671 (E,F). Παρουσιάζονται δύο τύποι παλινδρόμησης η *Interpolant* και η *πολυωνυμική*. Ο δείκτης R^2 (adjusted R^2) ήταν αντίστοιχα για κάθε παλινδρόμηση: A: R^2=1, B: R^2=0.97, C:R^2=1, D: R^2=0.88, E: R^2=1, F: R^2=0.95. Οι άξονες αντιπροσωπεύουν, X: time (t), Y: log_2 of TINC (Total Initial Number of Cells), Z: Absorption. Έχει ενδιαφέρον να παρατηρήσουμε τις «κοιλάδες» που σχηματίζονται κατά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (μαύρα βέλη). 313

Εικόνα 83. Διαγραμματική παρουσίαση των αποτελεσμάτων τυποποίησης του μετρητή Coulter με σφαιρίδια. Παρουσιάζεται ο αριθμός των σφαιριδίων όπως υπολογίσθηκε από τις αραιώσεις που έγιναν (A), καθώς και οι μετρήσεις από το μετρητή Coulter (B). Φαίνεται από τις μετρήσεις ότι υπήρξε πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ του πειραματικού και θεωρητικού μοντέλου (R^2=0.9791). Επίσης παρουσιάζονται τα διαγράμματα για κάθε μέτρηση όπως αυτά παρουσιάζονται από το μετρητή Coulter (C). 316

Εικόνα 84. Μετρήσεις ευαισθησίας και «κατωφλίου» στον μετρητή Coulter. Παρουσιάζονται οι μετρήσεις για όλα τα thresholds και για ευαισθησία 3 (A), 4 (B), 5 (C), 6 (D). 317

Εικόνα 85. Χαρακτηριστικά ιστογράμματα για τα κύτταρα 1321N1 (A), A172 (B), TE671 (C) και CCRFCEM (D). Η μπλε γραμμή υποδηλώνει το σημείο όπου σημειώνεται το μέγιστο της κατανομής του κάθε κυτταρικού τύπου, ενώ η κόκκινη διακεκομμένη γραμμή υποδηλώνει το σημείο, όπου θα έπρεπε να εμφανίζεται ιδανικά. Παρεκκλίσεις είναι αναμενόμενες μιας και η ιδανική κατανομή προερχόταν από τέλεια διαμορφωμένα σφαιρίδια. 318

Εικόνα 86. Διάγραμμα των καμπυλών τυποποίησης (calibration) για τα κύτταρα A172 συναρτήσει του χρόνου και με ημι-γραμμική (quasi-linear) αρχική κατανομή πληθυσμού (TINC: Total Initial Cell Number). 319

Εικόνα 87. Ενδεικτικές παλινδρομήσεις του πειράματος τυποποίησης για τα κύτταρα 1321N1 (TINC: Total; Initial Number of Cells). 321

Εικόνα 88. Ιστόγραμμα της κυτταρικής ανάπτυξης συναρτήσει του χρόνου, όπου παρουσιάζονται ενδεικτικές χρονικές στιγμές για τη γραμμική κατανομή (επάνω) και την εκθετική κατανομή (κάτω). 322

Εικόνα 89. Τρισδιάστατα διαγράμματα των πειραμάτων τυποποίησης των κυττάρων A172. Παρουσιάζονται όλες οι μεταβλητές του πειράματος. Στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t), στον άξονα των Y είναι ο αρχικός αριθμός των κυττάρων (TINC: Total Initial Number of Cells) τόσο τη γραμμική κατανομή (linear) όσο και για την εκθετική (exponential). Ειδικά για την εκθετική κατανομή χρησιμοποιήθηκε τόσο η αυτούσια κατανομή όσο και η λογαριθμισμένη ($\log_2$(TINC)). Τα μαύρα βέλη στους άξονες δείχνουν την αύξουσα φορά των τιμών. Σε κάθε διάγραμμα αναφέρετε και ο δείκτης παλινδρόμησης (R^2) και αφορά στην τιμή *Adjusted* R^2. Τα μπλε βέλη υποδεικνύουν τα σημεία, όπου η καμπύλη σχηματίζει «κοιλάδες»..... 324

Εικόνα 90. Τρισδιάστατα διαγράμματα των πειραμάτων τυποποίησης των κυττάρων 1321N1. Παρουσιάζονται όλες οι μεταβλητές του πειράματος. Στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t), στον άξονα των Y είναι ο αρχικός αριθμός των κυττάρων (TINC: Total Initial Number of Cells) τόσο τη γραμμική κατανομή (linear) όσο και για την εκθετική (exponential). Ειδικά για την εκθετική κατανομή χρησιμοποιήθηκε τόσο η αυτούσια κατανομή όσο και η λογαριθμισμένη ($\log_2$(TINC)). Τα μαύρα βέλη στους άξονες δείχνουν την αύξουσα φορά των τιμών. Σε κάθε διάγραμμα αναφέρεται και ο δείκτης παλινδρόμησης (R^2) και αφορά στην τιμή *Adjusted* R^2. Τα μπλε βέλη υποδεικνύουν τα σημεία, όπου η καμπύλη σχηματίζει «κοιλάδες»..... 325

Εικόνα 91. Τρισδιάστατα διαγράμματα των πειραμάτων τυποποίησης των κυττάρων TE671. Παρουσιάζονται όλες οι μεταβλητές του πειράματος. Στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t), στον άξονα των Y είναι ο αρχικός αριθμός των κυττάρων (TINC: Total Initial Number of Cells) τόσο τη γραμμική κατανομή (linear) όσο και για την εκθετική (exponential). Ειδικά για την εκθετική κατανομή χρησιμοποιήθηκε τόσο η αυτούσια κατανομή όσο και η λογαριθμιμένη ($\log_2$(TINC)). Τα μαύρα βέλη στους άξονες δείχνουν την αύξουσα φορά των τιμών. Σε κάθε διάγραμμα αναφέρετε και ο δείκτης παλινδρόμησης (R^2) και αφορά στην τιμή *Adjusted* R^2. Τα μπλε βέλη υποδεικνύουν τα σημεία, όπου η καμπύλη σχηματίζει «κοιλάδες»..... 326

Εικόνα 92. Παράδειγμα κυτταρικού κύκλου από πειραματική διάταξη βαθμονόμησης. Στο κάτω μέρος παρουσιάζεται η μεγέθυνση του κυτταρικού κύκλου, όπου με σκιασμένο τρόπο παρουσιάζεται η S-φάση. Η φάση αυτή μπορεί να χωρισθεί περαιτέρω σε μικρότερες υπο-ομάδες, που η κάθε μια αντιστοιχεί σε έναν πληθυσμό κυττάρων με διαφορετικό επίπεδο σύνθεσης χρωματίνης. Ως εκ τούτου, αν τα κύτταρα έχουν περιεχόμενο DNA *2n* στη G_1 φάση, τότε μέχρι τη G_2 παρεμβάλλονται *x* πληθυσμοί, όπου $x=\{k_0,k_1,\ldots k_n\}$ και όπου *k* ένας ασύμμετρος παράγοντας και όπου ισχύει $k_0+k_1+\ldots+k_n \approx 2n$..... 328

Εικόνα 93. Προσομοιώσεις των δεδομένων του κυτταρικού κύκλου από τα πειράματα βαθμονόμησης. Η S-φάση διαχωρίστηκε σε τμήματα (compartments), τα οποία αντιπροσωπεύουν τους κυτταρικούς πληθυσμούς που εισέρχονται σε σύνθεση χρωματίνης συναρτήσει του χρόνου. Από τη γραμμική παλινδρόμηση (**A**) για τα κύτταρα σε καλλιέργεια εκθετικών πληθυσμών φάνηκε ότι υπήρχε πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ των τμημάτων της S-φάσης και του αρχικού αριθμού των κυττάρων. Το αποτέλεσμα αυτό φαίνεται και πολύ ωραία στην Interpolant παλινδρόμηση (**B**) καθώς και την πολυωνιμική (**C**). Αντίστοιχα στα πειράματα βαθμονόμησης, όπου οι αρχικοί πληθυσμοί ακολουθούσαν γραμμική κατανομή παρουσίασαν παρόμοια αποτελέσματα για τη γραμμική (**D**), interpolant (**E**) και πολυωνιμική παλινδρόμηση (**F**) αντίστοιχα (TINC: Total Initial Number of Cells). 329

Εικόνα 94. Παλινδρομήσεις των τμημάτων της S-φάσης στα κύτταρα TE671 στις πειραματικές διατάξεις βαθμονόμησης στη γραμμική αρχική κατανομή (επάνω) και στην εκθετική αρχική κατανομή (κάτω). 331

Εικόνα 95. Παλινδρόμηση των δεδομένων του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης στα πειράματα βαθμονόμησης με την κυτταρική σειρά A172. Παρουσιάζονται οι παλινδρομήσεις για την απόπτωση στη γραμμική κατανομή (**A**), την απόπτωση στην εκθετική κατανομή (**B**), τις φάσεις του

κυτταρικού κύκλου στη γραμμική κατανομή (**C**-**E**) τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου στην εκθετική κατανομή (**F**-**H**).....332

Εικόνα 96. Λήψεις μικροσκοπίας των κυττάρων RD σε πείραμα ελάχιστης ανάπτυξης. Φαίνονται ευδιάκριτα διαφορετικές μορφολογίες των κυττάρων ειδικά μεταξύ αυτών που βρέθηκαν απομονωμένα και αυτών που μεγάλωσαν κοντά σε άλλα. 336

Εικόνα 97. Μωσαϊκό των εικόνων της Εικόνα 96. Φαίνεται η σύζευξη δύο κυττάρων (επάνω). Η μορφολογία των κυττάρων που βρέθηκαν κοντά είναι ατρακτοειδής ενώ αυτών που ήταν πιο απομακρυσμένα είχαν τελείως διαφορετική μορφολογία από τα υπόλοιπα. Ενδιαφέρον επίσης είναι το γεγονός ότι η επιφάνεια του μεγαλύτερου κυττάρου (υπ. Αριθμ. 1 κάτω) ήταν μέχρι και επτά φορές μεγαλύτερη από τα άλλα κύτταρα, όπως φαίνεται στο ιστόγραμμα. 337

Εικόνα 98. Μικροσκοπικές λήψεις της αρχικής καλλιέργειας των κυττάρων A172. Παρουσιάζεται το αρχικό σταγονίδιο που τοποθετείτο στα πηγάδια των πλακών μικροτιτλοποίησης. Τα πηγάδια που παρουσιάζονται εδώ ήταν τα A1 και A2 με θεωρητικό αρχικό αριθμό κυττάρων 4.....339

Εικόνα 99. Μικροσκοπικές λήψεις του πειράματος ελάχιστης ανάπτυξης στα κύτταρα A172. Παρουσιάζονται τα κύτταρα στην τρίτη και έκτη ημέρα αντίστοιχα.....340

Εικόνα 100. Μικροσκοπικές λήψεις του πειράματος ελάχιστης ανάπτυξης των κυττάρων A172. Παρουσιάζονται διάφορα πηγάδια στις 16 ημέρες καλλιέργειας και από 256 κύτταρα αρχικό κυτταρικό πληθυσμό. 342

Εικόνα 101. Μικροσκοπικές λήψεις πειράματος ελάχιστης ανάπτυξης των κυττάρων TE671. Παρουσιάζονται οι αρχικοί πληθυσμοί τεσσάρων και 256 κυττάρων αντίστοιχα στις 5, 6, 11, 13 και 8 ημέρες αντίστοιχα. 344

Εικόνα 102. Διαγραμματική αναπαράσταση του χρόνου επίτευξης συγκεκριμένου αριθμού κυττάρων συναρτήσει του αρχικού αριθμού κυττάρων στα κύτταρα CCRFCEM, σε πείραμα ελάχιστης ανάπτυξης και σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων (TINC: Total Initial Number of Cells)....345

Εικόνα 103. Η καμπύλη ανάπτυξης των κυττάρων CCRFCEM σε πείραμα ελάχιστης ανάπτυξης σε φλάσκα επιφάνειας 75cm^2.....347

Εικόνα 104. Σχηματική αναπαράσταση του πειράματος ελάχιστης ανάπτυξης των κυττάρων CCRFCEM. Τα κύτταρα αφέθηκαν να μεγαλώσουν σε πηγάδι εμβαδού 0.3165cm2 (**A**) και σε φλάσκα καλλιέργειας 75cm2 (**B**). Παρουσιάζονται τα αυτοκρινή και παρακρινή μοντέλα μετάδοσης σήματος. Η αναλογία μεγέθους των δύο μέσων καλλιέργειας φαίνεται στο τμήμα (**C**) της εικόνας (σηματοδοτείται από το μαύρο βέλος), όπου είναι εμφανής η διαφορά στο χώρο που ήταν διαθέσιμος για τα κύτταρα. 348

Εικόνα 105. Διαγραμματικές αναπαραστάσεις της προσομοίωσης του πολλαπλασιασμού των κυττάρων A172 (**A**-**C**), 1321N1 (**D**-**F**) και TE671 (**G**-**I**). Παρουσιάζονται και οι τρεις τύποι παλινδρόμησης ο Interpolant, ο γραμμικός και ο πολυωνιμικός. 349

Εικόνα 106. Παλινδρομήσεις του αρχικού αριθμού των κυττάρων συναρτήσει του όγκου του θρεπτικού υλικού και του χρόνου. Σε κάθε εικόνα αναπαρίσταται ο αρχικός αριθμός των κυττάρων. 353

Εικόνα 107. Τρισδιάστατες απεικονίσεις των παραμέτρων των μετρήσεων για τα κύτταρα A172. Παρουσιάζονται όλοι οι συνδυασμοί, που είναι ο αρχικός αριθμός κυττάρων, ο όγκος και η απορρόφηση (**A**), ο όγκος, ο χρόνος και η απορρόφηση (**B**) και ο αρχικός αριθμός κυττάρων, ο χρόνος και η απορρόφηση (**C**). 354

Εικόνα 108. Παλινδρομήσεις του δεύτερου πειράματος CV/CIN των κυττάρων A172. Αναπαρίστανται όλοι οι αρχικοί κυτταρικοί αριθμοί συναρτήσει του όγκου θρεπτικού υλικού και του χρόνου. 355

Εικόνα 109. Γραφική αναπαράσταση των μη-γραμμικών παραγόντων πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Κάθε επιφάνεια αντιστοιχεί σε μια χρονική στιγμή. 356

Εικόνα 110. Παλινδρομήσεις της πρώτης παραγώγου (κλίσης) του πολλαπλασιασμού των κυττάρων με αρχικό αριθμό 25 κύτταρα και σε όλους τους όγκους θρεπτικού υλικού συναρτήσει του χρόνου. Οι επιμέρους καμπύλες (B-G) προσομοιώθηκαν με τη συνάρτηση του αθροίσματος ημιτόνων. Τα μπλε σημεία σε κάθε διάγραμμα υποδηλώνουν την πραγματική μέτρηση και η καμπύλη υποδηλώνει την προσομοίωση. 358

Εικόνα 111. Παλινδρομήσεις της πρώτης παραγώγου (κλίσης) του πολλαπλασιασμού των κυττάρων με αρχικό αριθμό 400 κύτταρα και σε όλους τους όγκους θρεπτικού υλικού συναρτήσει του χρόνου. Οι επιμέρους καμπύλες (B-G) προσομοιώθηκαν με τη συνάρτηση του αθροίσματος ημιτόνων. Τα μπλε σημεία σε κάθε διάγραμμα υποδηλώνουν την πραγματική μέτρηση και η καμπύλη υποδηλώνει την προσομοίωση. 359

Εικόνα 112. Παλινδρομήσεις της πρώτης παραγώγου (κλίσης) του πολλαπλασιασμού των κυττάρων με αρχικό αριθμό 3000 κύτταρα και σε όλους τους όγκους θρεπτικού υλικού συναρτήσει του χρόνου. Οι επιμέρους καμπύλες (B-G) προσομοιώθηκαν με τη συνάρτηση του αθροίσματος ημιτόνων. Τα μπλε σημεία σε κάθε διάγραμμα υποδηλώνουν την πραγματική μέτρηση και η καμπύλη υποδηλώνει την προσομοίωση. 360

Εικόνα 113. Παλινδρομήσεις της δεύτερης παραγώγου (κλίσης) του πολλαπλασιασμού των κυττάρων με αρχικό αριθμό 25 κύτταρα και σε όλους τους όγκους θρεπτικού υλικού συναρτήσει του χρόνου. Οι επιμέρους καμπύλες (B-G) προσομοιώθηκαν με τη συνάρτηση του αθροίσματος ημιτόνων. Τα μπλε σημεία σε κάθε διάγραμμα υποδηλώνουν την πραγματική μέτρηση και η καμπύλη υποδηλώνει την προσομοίωση. 362

Εικόνα 114. Παλινδρομήσεις της δεύτερης παραγώγου (κλίσης) του πολλαπλασιασμού των κυττάρων με αρχικό αριθμό 400 κύτταρα και σε όλους τους όγκους θρεπτικού υλικού συναρτήσει του χρόνου. Οι επιμέρους καμπύλες (B-G) προσομοιώθηκαν με τη συνάρτηση του αθροίσματος ημιτόνων. Τα μπλε σημεία σε κάθε διάγραμμα υποδηλώνουν την πραγματική μέτρηση και η καμπύλη υποδηλώνει την προσομοίωση. 363

Εικόνα 115. Παλινδρομήσεις της δεύτερης παραγώγου (κλίσης) του πολλαπλασιασμού των κυττάρων με αρχικό αριθμό 3000 κύτταρα και σε όλους τους όγκους θρεπτικού υλικού συναρτήσει του χρόνου. Οι επιμέρους καμπύλες (B-G) προσομοιώθηκαν με τη συνάρτηση του αθροίσματος ημιτόνων. Τα μπλε σημεία σε κάθε διάγραμμα υποδηλώνουν την πραγματική μέτρηση και η καμπύλη υποδηλώνει την προσομοίωση. 364

Εικόνα 116. Σχηματική αναπαράσταση των μετασχηματισμών του αρχικού κύβου ώστε να προκύψει ένας νέος κύβος δεδομένων, όπου στον άξονα των *x* θα είναι πλέον ο αρχικός αριθμός των κυττάρων (TINC) και στον άξονα των *y* ο χρόνος (t). Τα βέλη δείχνουν την πορεία που ακολουθείται για το μετασχηματισμό και η κόκκινη τελεία δείχνει την πορεία που ακολουθούν τα «φύλλα» του κύβου. 366

Εικόνα 117. Μετασχηματισμοί Fourier των χρονοσειρών για κάθε αρχικό πληθυσμό κυττάρων (άξονας των ***y***) 368

Εικόνα 118. Phase-space γράφημα των παραγόντων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού συναρτήσει του πληθυσμού σε χρόνο *t*, σε χρόνο *t-1* και χρόνο *t-2*. Τα γραφήματα αυτά έδειξαν ότι οι μεταβλητές αυτές παρουσιάζουν σημεία σύγκλισης (sinks, attractors) που είναι ένα σημαντικό εύρημα για την ύπαρξη χάους στο φαινόμενο του πολλαπλασιασμού (σηματοδοτούνται με τα κόκκινα βέλη). 369

Εικόνα 119. Διαγραμματική αναπαράσταση σε τρεις διαστάσεις με τη μορφή επιφάνειας μαζί με το γράφημα *θερμότητας (heat-map)* (αριστερά) 370

Εικόνα 120. Γράφημα του μετασχηματισμού Fourier για όλο το χρονικό φάσμα ανεξαρτήτως αρχικού πληθυσμού και όγκου θρεπτικού υλικού ή χώρου 371

Εικόνα 121. Διαγραμματική αναπαράσταση των μετασχηματισμών Fourier για κάθε χρονοσειρά για χρόνο *t*, *t-1* και *t-2*. Παρουσιάζονται δύο διαφορετικές οπτικές γωνίες της επιφάνειας που

σχηματίζεται από τα δεδομένα (**A**, **B**), όπου φαίνεται η ημι-συμμετρικότητα του γραφήματος. Αυτό παρουσιάζεται ακόμα καλύτερα στο γράφημα *θερμότητας* (*Heat-map*) (**C**). 372

Εικόνα 122. Γραφήματα μετασχηματισμών Fourier της ταχύτητας του πολλαπλασιασμού των κυττάρων σε όλους τους αρχικούς αριθμούς. 373

Εικόνα 123. Γραφήματα των χρονοσειρών που προέκυψαν από το μετασχηματισμό του κύβου δεδομένων ως προς την ταχύτητα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπου παρουσιάζεται η ταχύτητα πολλαπλασιασμού για *t* και *t-1* (A), *t-2* και *t-1* (B), *t*, *t-1*, *t-2* (C) σε τρεις διαστάσεις για την ταχύτητα (D) και για την επιτάχυνση (E). 374

Εικόνα 124. Γράφημα του μετασχηματισμού Fourier, της ταχύτητας πολλαπλασιασμού (**A**) και της επιτάχυνσης (**B**). Παρατηρείται η ίδια ταλαντωτική συμπεριφορά όπως και στην περίπτωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού. 375

Εικόνα 125. Γραφική αναπαράσταση των βασικών μεταβλητών του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Παρουσιάζεται η φωτομετρική απορρόφηση συναρτήσει του αρχικού αριθμού κυττάρων (TINC) και του όγκου θρεπτικού (A), συναρτήσει του χρόνου και του όγκου θρεπτικού υλικού (B) και συναρτήσει του αρχικού αριθμού κυττάρων και του χρόνου (C). 376

Εικόνα 126. Τρισδιάστατα γραφήματα της φωτομετρικής απορρόφησης συναρτήσει του όγκου θρεπτικού και του χρόνου καλλιέργειας για κάθε αρχικό αριθμό κυττάρων. 377

Εικόνα 127. Παρουσιάζονται: η τρισδιάστατη απεικόνιση της πρώτης μερικής παραγώγου του ρυθμού πολλαπλασιασμού για 25 κύτταρα αρχικό πληθυσμό (A) και οι επιμέρους ταχύτητες πολλαπλασιασμού για κάθε αρχικό αριθμό κυττάρων συναρτήσει του όγκου θρεπτικού υλικού (B-G). 378

Εικόνα 128. Παρουσιάζονται: η τρισδιάστατη απεικόνιση της πρώτης μερικής παραγώγου του ρυθμού πολλαπλασιασμού για 400 κύτταρα αρχικό πληθυσμό (A) και οι επιμέρους ταχύτητες πολλαπλασιασμού για κάθε αρχικό αριθμό κυττάρων συναρτήσει του όγκου θρεπτικού υλικού (B-G). 379

Εικόνα 129. Παρουσιάζονται: η τρισδιάστατη απεικόνιση της πρώτης μερικής παραγώγου του ρυθμού πολλαπλασιασμού για 3000 κύτταρα αρχικό πληθυσμό (A) και οι επιμέρους ταχύτητες πολλαπλασιασμού για κάθε αρχικό αριθμό κυττάρων συναρτήσει του όγκου θρεπτικού υλικού (B-G). 380

Εικόνα 130. Παρουσιάζονται η τρισδιάστατη απεικόνιση της δεύτερης μερικής παραγώγου του ρυθμού πολλαπλασιασμού για 25 (A) και 400 (B) κύτταρα αρχικό πληθυσμό και οι επιμέρους ταχύτητες πολλαπλασιασμού για αρχικό αριθμό 25 κυττάρων συναρτήσει του όγκου θρεπτικού υλικού (C-H). 382

Εικόνα 131. Μετασχηματισμοί Fourier των χρονοσειρών για κάθε αρχικό πληθυσμό κυττάρων (άξονας των *x*). 384

Εικόνα 132. Γράφημα του μετασχηματισμού Fourier για όλο το χρονικό φάσμα ανεξαρτήτως αρχικού πληθυσμού και όγκου θρεπτικού υλικού ή χώρου. 385

Εικόνα 133. Phase-space γράφημα των παραγόντων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού συναρτήσει του πληθυσμού σε χρόνο *t*, σε χρόνο *t-1* και χρόνο *t-2*. Τα γραφήματα αυτά έδειξαν ότι οι μεταβλητές αυτές παρουσιάζουν σημεία σύγκλισης (sinks, attractors) που είναι ένα σημαντικό εύρημα για την ύπαρξη χάους στο φαινόμενο του πολλαπλασιασμού (σηματοδοτούνται με τα κόκκινα βέλη). 386

Εικόνα 134. Διαγραμματική αναπαράσταση σε τρεις διαστάσεις με τη μορφή επιφάνειας από δύο οπτικές γωνίες: από πάνω (**A**) και από κάτω (**B**), μαζί με το γράφημα *θερμότητας (heat-map)* (**C**). 387

Εικόνα 135. Γραφήματα των χρονοσειρών που προέκυψαν από το μετασχηματισμό του κύβου δεδομένων ως προς την ταχύτητα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπου παρουσιάζεται η ταχύτητα πολλαπλασιασμού για *t* και *t-1* (A), *t-2* και *t-1* (B), *t*, *t-1*, *t-2* (C) σε τρεις διαστάσεις για την

ταχύτητα (D), για την επιτάχυνση για *t* και *t-1* (E), *t-2* και *t-1* (F), σε τρεις διαστάσεις για την επιτάχυνση (G). 388

Εικόνα 136. Γράφημα του μετασχηματισμού Fourier, της ταχύτητας πολλαπλασιασμού (A) και της επιτάχυνσης (B). Παρατηρείται η ίδια ταλαντωτική συμπεριφορά όπως και στην περίπτωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού. 389

Εικόνα 137. Διαγραμματική αναπαράσταση των μετασχηματισμών Fourier για κάθε χρονοσειρά για χρόνο *t*, *t-1* και *t-2*. Παρουσιάζονται δύο διαφορετικές οπτικές γωνίες της επιφάνειας που σχηματίζεται από τα δεδομένα (A, B), όπου φαίνεται η ημι-συμμετρικότητα του γραφήματος. Αυτό παρουσιάζεται ακόμα καλύτερα στο γράφημα *θερμότητας* (*Heat-map*) (C). 390

Εικόνα 138. Γραφική αναπαράσταση των βασικών μεταβλητών του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα κύτταρα 1321N1 κατά τη φάση II. Παρουσιάζεται η φωτομετρική απορρόφηση συναρτήσει του αρχικού αριθμού κυττάρων (TINC) και του χρόνου θρεπτικού (A), συναρτήσει του χρόνου και του όγκου θρεπτικού υλικού (B) και συναρτήσει του αρχικού αριθμού κυττάρων και του όγκου θρεπτικού υλικού (C). 391

Εικόνα 139. Μετασχηματισμοί Fourier των χρονοσειρών για κάθε αρχικό πληθυσμό κυττάρων (άξονας των *x*) στα κύτταρα 1321N1 Φάση II. 393

Εικόνα 140. Phase-space γράφημα των παραγόντων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού συναρτήσει του πληθυσμού σε χρόνο *t*, σε χρόνο *t-1* και χρόνο *t-2*. Τα γραφήματα αυτά έδειξαν ότι οι μεταβλητές αυτές παρουσιάζουν σημεία σύγκλισης (sinks, attractors) που είναι ένα σημαντικό εύρημα για την ύπαρξη χάους στο φαινόμενο του πολλαπλασιασμού (σηματοδοτούνται με τα κόκκινα βέλη). Επίσης φαίνεται πολύ καθαρά η μετατόπιση του ελκυστή σε σχέση με τα κύτταρα στη Φάση I του πειράματος (A-C). Αντίστοιχα αυτό φαίνεται πολύ ωραία στη διαγραμματική αναπαράσταση σε τρεις διαστάσεις με τη μορφή επιφάνειας από δύο οπτικές γωνίες: από πάνω (D) και από κάτω (E), μαζί με το γράφημα *θερμότητας (heat-map)* (F). Φαίνεται η μετατόπιση της ημι-συμμετρίας σε σχέση με τα ίδια κύτταρα στη Φάση I. 395

Εικόνα 141. Γραφήματα των χρονοσειρών που προέκυψαν από το μετασχηματισμό του κύβου δεδομένων ως προς την ταχύτητα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπου παρουσιάζεται η ταχύτητα πολλαπλασιασμού για *t* και *t-1* (A), *t-2* και *t-1* (B), *t*, *t-1*, *t-2* (C), για την επιτάχυνση για *t* και *t-1* (D), *t-2* και *t-1* (E), σε τρεις διαστάσεις για την επιτάχυνση για *t*, *t-1*, *t-2* (F). 396

Εικόνα 142. Γράφημα του μετασχηματισμού Fourier για όλο το χρονικό φάσμα ανεξαρτήτως αρχικού πληθυσμού και όγκου θρεπτικού υλικού ή χώρου στα κύτταρα 1321N1 στη Φάση II της πειραματικής διάταξης. 397

Εικόνα 143. Τρισδιάστατες αναπαραστάσεις της μετασχηματισμένης χρονοσειράς όσον αφορά την ταχύτητα πολλαπλασιασμού (A), την επιτάχυνση (B), των μετασχηματισμένων σειρών με Fourier (C) και διάγραμμα *θερμότητας* (heat-map) των χρονοσειρών Fourier (D). 398

Εικόνα 144. Τρισδιάστατες αναπαραστάσεις των βασικών μεταβλητών για τη Φάση I & II. 399

Εικόνα 145. Παρουσιάζονται: η τρισδιάστατη απεικόνιση της πρώτης μερικής παραγώγου του ρυθμού πολλαπλασιασμού για 25 κύτταρα αρχικό πληθυσμό (A) και οι επιμέρους ταχύτητες πολλαπλασιασμού για κάθε αρχικό αριθμό κυττάρων συναρτήσει του όγκου θρεπτικού υλικού (B-G) συγκεντρωτικά για τις φάσεις I και II της πειραματικής διάταξης των κυττάρων 1321N1. 400

Εικόνα 146. Παρουσιάζονται: η τρισδιάστατη απεικόνιση της πρώτης μερικής παραγώγου του ρυθμού πολλαπλασιασμού για 400 κύτταρα αρχικό πληθυσμό (A) και οι επιμέρους ταχύτητες πολλαπλασιασμού για κάθε αρχικό αριθμό κυττάρων συναρτήσει του όγκου θρεπτικού υλικού (B-G) συγκεντρωτικά για τις φάσεις I και II της πειραματικής διάταξης των κυττάρων 1321N1. 401

Εικόνα 147. Παρουσιάζονται: η τρισδιάστατη απεικόνιση της πρώτης μερικής παραγώγου του ρυθμού πολλαπλασιασμού για 3000 κύτταρα αρχικό πληθυσμό (A) και οι επιμέρους ταχύτητες

πολλαπλασιασμού για κάθε αρχικό αριθμό κυττάρων συναρτήσει του όγκου θρεπτικού υλικού (B-G) συγκεντρωτικά για τις φάσεις Ι και ΙΙ της πειραματικής διάταξης των κυττάρων 1321N1. 402

Εικόνα 148. Μετασχηματισμοί Fourier των χρονοσειρών για κάθε αρχικό πληθυσμό κυττάρων (άξονας των *x*) στα κύτταρα 1321N1 Φάση Ι & ΙΙ. 404

Εικόνα 149. Γραφήματα των χρονοσειρών που προέκυψαν από το μετασχηματισμό του κύβου δεδομένων ως προς την ταχύτητα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπου παρουσιάζεται η ταχύτητα πολλαπλασιασμού για *t* και *t-1* (A), *t-2* και *t-1* (B), *t*, *t-1*, *t-2* (C), για την επιτάχυνση για *t* και *t-1* (D), *t-2* και *t-1* (E), σε τρεις διαστάσεις για την επιτάχυνση για *t*, *t-1*, *t-2* (F). Οι αναπαραστάσεις αυτές αφορούν στη ζεύξη των δύο φάσεων (Ι και ΙΙ) της πειραματικής διάταξης για τα κύτταρα 1321N1.Ενδιαφέρον έχει η αλλαγή της συμμετρίας σε σχέση με τη φάση ΙΙ του πειράματος (A, B). 405

Εικόνα 150. Γραφήματα των χρονοσειρών που προέκυψαν από το μετασχηματισμό του κύβου δεδομένων ως προς την ταχύτητα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπου παρουσιάζεται η ταχύτητα πολλαπλασιασμού για *t* και *t-1* (**A**), *t-2* και *t-1* (**B**), *t*, *t-1*, *t-2* (**C**) 406

Εικόνα 151. Γραφήματα των μετασχηματισμών Fourier για όλο το φάσμα των χρονοσειρών ανεξαρτήτως αρχικού αριθμού και όγκου θρεπτικού για τα κύτταρα 1321N1 και για τις δύο φάσεις (Φάση Ι και ΙΙ) της πειραματικής διάταξης. Παρουσιάζονται τα διαγράμματα για το ρυθμό πολλαπλασιασμού (A), την ταχύτητα πολλαπλασιασμού (B) και για την επιτάχυνση (C). 407

Εικόνα 152. Γραφική αναπαράσταση των βασικών μεταβλητών του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Παρουσιάζεται η φωτομετρική απορρόφηση συναρτήσει του αρχικού αριθμού κυττάρων (TINC) και του χρόνου (A), συναρτήσει του χρόνου και του όγκου θρεπτικού υλικού (B) και ο ρυθμός πολλαπλασιασμού *k* συναρτήσει του αρχικού αριθμού κυττάρων και του χρόνου (C). 408

Εικόνα 153. Τρισδιάστατα γραφήματα της φωτομετρικής απορρόφησης συναρτήσει του όγκου θρεπτικού και του χρόνου καλλιέργειας για κάθε αρχικό αριθμό κυττάρων. 409

Εικόνα 154. Παρουσιάζονται τα διαγράμματα της πρώτης μερικής παραγώγου του ρυθμού πολλαπλασιασμού για 25 κύτταρα αρχικό πληθυσμό και οι επιμέρους ταχύτητες πολλαπλασιασμού συναρτήσει του όγκου θρεπτικού υλικού 411

Εικόνα 155. Παρουσιάζονται τα διαγράμματα της πρώτης μερικής παραγώγου του ρυθμού πολλαπλασιασμού για 400 κύτταρα αρχικό πληθυσμό και οι επιμέρους ταχύτητες πολλαπλασιασμού συναρτήσει του όγκου θρεπτικού υλικού 412

Εικόνα 156. Παρουσιάζονται τα διαγράμματα της πρώτης μερικής παραγώγου του ρυθμού πολλαπλασιασμού για 3000 κύτταρα αρχικό πληθυσμό και οι επιμέρους ταχύτητες πολλαπλασιασμού συναρτήσει του όγκου θρεπτικού υλικού 413

Εικόνα 157. Μετασχηματισμοί Fourier των χρονοσειρών για κάθε αρχικό πληθυσμό κυττάρων (άξονας των ***x***) στα κύτταρα TE671 Φάση Ι & ΙΙ. 414

Εικόνα 158. Γραφήματα των χρονοσειρών που προέκυψαν από το μετασχηματισμό του κύβου δεδομένων ως προς την ταχύτητα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπου παρουσιάζεται η ταχύτητα πολλαπλασιασμού για *t* και *t-1* (A), *t-2* και *t-1* (B), *t*, *t-1*, *t-2* (C). Οι αναπαραστάσεις αυτές αφορούν στη ζεύξη των δύο φάσεων (Ι και ΙΙ) της πειραματικής διάταξης για τα κύτταρα TE671. 415

Εικόνα 159. Γραφήματα των χρονοσειρών που προέκυψαν από το μετασχηματισμό του κύβου δεδομένων ως προς την ταχύτητα (A) και την επιτάχυνση (B) του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπου παρουσιάζεται η ταχύτητα πολλαπλασιασμού για *t*, *t-1*, *t-2*. Τα διαγράμματα αφορούν στα κύτταρα TE671 και στις δύο φάσεις της πειραματικής διάταξης. 416

Εικόνα 160. Παρουσιάζονται οι μετασχηματισμοί Fourier για όλο το φάσμα των χρονοσειρών για το ρυθμό πολλαπλασιασμού (A), για την ταχύτητα πολλαπλασιασμού (B) και για την επιτάχυνση (C). 417

Εικόνα 161. Μετρήσεις του συνολικού πληθυσμού κυττάρων κατά την πειραματική διάταξη VN/VIN σε όλους τους κυτταρικούς τύπους ήτοι για τα A172 (**A**), 1321N1 (**B**) και TE671 (**C**). 420

Εικόνα 162. Γραφική αναπαράσταση των μετρήσεων του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα A172 και συγκεκριμένα της G_1 φάσης, όπου φαίνονται οι μετρήσεις του ποσοστού των κυττάρων σε G_1 φάση σε χρόνο *t* (**A**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**B**), το ποσοστό των κυττάρων στη G_1 φάση αλλά σε χρόνο *t-1* σε σχέση με το διάγραμμα (**A**) (**C**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**D**), και ο ρυθμός μεταβολής (*k*) των κυττάρων σε G_1 φάση (**E**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**F**). 422

Εικόνα 163. Γραφική αναπαράσταση των μετρήσεων του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα A172 και συγκεκριμένα της G_2 φάσης, όπου φαίνονται οι μετρήσεις του ποσοστού των κυττάρων σε G_2 φάση σε χρόνο *t* (**A**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**B**), το ποσοστό των κυττάρων στη G_2 φάση αλλά σε χρόνο *t-1* σε σχέση με το διάγραμμα (**A**) (**C**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**D**), και ο ρυθμός μεταβολής (*k*) των κυττάρων σε G_2 φάση (**E**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**F**). 423

Εικόνα 164. Γραφική αναπαράσταση των μετρήσεων του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα A172 και συγκεκριμένα της G_2 φάσης, όπου φαίνονται οι μετρήσεις του ποσοστού των κυττάρων σε *S* φάση σε χρόνο *t* (**A**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**B**), το ποσοστό των κυττάρων στη *S* φάση αλλά σε χρόνο *t-1* σε σχέση με το διάγραμμα (**A**) (**C**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**D**), και ο ρυθμός μεταβολής (*k*) των κυττάρων σε *S* φάση (**E**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**F**). 424

Εικόνα 165. Γραφική αναπαράσταση των μετρήσεων του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα A172 και συγκεκριμένα της απόπτωσης, όπου φαίνονται οι μετρήσεις του ποσοστού των κυττάρων σε απόπτωση σε χρόνο *t* (**A**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**B**), το ποσοστό των κυττάρων σε απόπτωση αλλά σε χρόνο *t-1* σε σχέση με το διάγραμμα (**A**) (**C**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**D**), και ο ρυθμός μεταβολής (*k*) των κυττάρων σε απόπτωση (**E**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**F**). 425

Εικόνα 166. Γραφική αναπαράσταση των μετρήσεων του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα 1321N1 και συγκεκριμένα της G_1 φάσης, όπου φαίνονται οι μετρήσεις του ποσοστού των κυττάρων σε G_1 φάση σε χρόνο *t* (**A**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**B**), το ποσοστό των κυττάρων στη G_1 φάση αλλά σε χρόνο *t-1* σε σχέση με το διάγραμμα (**A**) (**C**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**D**), και ο ρυθμός μεταβολής (*k*) των κυττάρων σε G_1 φάση (**E**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**F**). 426

Εικόνα 167. Γραφική αναπαράσταση των μετρήσεων του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα 1321N1 και συγκεκριμένα της G_2 φάσης, όπου φαίνονται οι μετρήσεις του ποσοστού των κυττάρων σε G_2 φάση σε χρόνο *t* (**A**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**B**), το ποσοστό των κυττάρων στη G_2 φάση αλλά σε χρόνο *t-1* σε σχέση με το διάγραμμα (**A**) (**C**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**D**), και ο ρυθμός μεταβολής (*k*) των κυττάρων σε G_2 φάση (**E**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**F**). 427

Εικόνα 168. Γραφική αναπαράσταση των μετρήσεων του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα 1321N1 και συγκεκριμένα της *S* φάσης, όπου φαίνονται οι μετρήσεις του ποσοστού των κυττάρων σε *S* φάση σε χρόνο *t* (**A**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**B**), το ποσοστό των κυττάρων στη *S* φάση αλλά σε χρόνο *t-1* σε σχέση με το διάγραμμα (**A**) (**C**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**D**), και ο ρυθμός μεταβολής (*k*) των κυττάρων σε *S* φάση (**E**) μαζί με τα μετασχηματισμένο σήμα (**F**).....428

Εικόνα 169. Γραφική αναπαράσταση των μετρήσεων του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα 1321N1 και συγκεκριμένα της απόπτωσης, όπου φαίνονται οι μετρήσεις του ποσοστού των κυττάρων σε απόπτωση σε χρόνο *t* (**A**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**B**), το ποσοστό των κυττάρων σε απόπτωση αλλά σε χρόνο *t-1* σε σχέση με το διάγραμμα (**A**) (**C**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**D**), και ο ρυθμός μεταβολής (*k*) των κυττάρων σε απόπτωση (**E**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**F**). 429

Εικόνα 170. Γραφική αναπαράσταση των μετρήσεων του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα TE671 και συγκεκριμένα της G_1 φάσης, όπου φαίνονται οι μετρήσεις του ποσοστού των κυττάρων σε G_1 φάση σε χρόνο *t* (**A**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**B**), το ποσοστό των κυττάρων στη G_1

φάση αλλά σε χρόνο *t-1* σε σχέση με το διάγραμμα (**A**) (**C**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**D**), και ο ρυθμός μεταβολής (*k*) των κυττάρων σε G_1 φάση (**E**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**F**). 430

Εικόνα 171. Γραφική αναπαράσταση των μετρήσεων του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα TE671 και συγκεκριμένα της G_2 φάσης, όπου φαίνονται οι μετρήσεις του ποσοστού των κυττάρων σε G_2 φάση σε χρόνο *t* (**A**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**B**), το ποσοστό των κυττάρων στη G_2 φάση αλλά σε χρόνο *t-1* σε σχέση με το διάγραμμα (**A**) (**C**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**D**), και ο ρυθμός μεταβολής (*k*) των κυττάρων σε G_2 φάση (**E**) μαζί με τα μετασχηματισμένο σήμα (**F**). 431

Εικόνα 172. Γραφική αναπαράσταση των μετρήσεων του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα TE671 και συγκεκριμένα της *S* φάσης, όπου φαίνονται οι μετρήσεις του ποσοστού των κυττάρων σε *S* φάση σε χρόνο *t* (**A**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**B**), το ποσοστό των κυττάρων στη *S* φάση αλλά σε χρόνο *t-1* σε σχέση με το διάγραμμα (**A**) (**C**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**D**), και ο ρυθμός μεταβολής (*k*) των κυττάρων σε *S* φάση (**E**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**F**)..... 432

Εικόνα 173. Γραφική αναπαράσταση των μετρήσεων του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα TE671 και συγκεκριμένα της απόπτωσης, όπου φαίνονται οι μετρήσεις του ποσοστού των κυττάρων σε απόπτωση σε χρόνο *t* (**A**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**B**), το ποσοστό των κυττάρων σε απόπτωση αλλά σε χρόνο *t-1* σε σχέση με το διάγραμμα (**A**) (**C**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**D**), και ο ρυθμός μεταβολής (*k*) των κυττάρων σε απόπτωση (**E**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**F**). 433

Εικόνα 174. Διαγραμματική αναπαράσταση του μοντέλου μετάβασης των κυτταρικών πληθυσμών από τη μια χρονική στιγμή στην επόμενη. Διαχωρίζονται τέσσερις πληθυσμοί, τα κύτταρα σε φάση G_1, τα κύτταρα σε φάση G_2, τα κύτταρα στη φάση *S* και τα αποπτωτικά κύτταρα ή γενικότερα ο κυτταρικός θάνατος (Cell Death - CD). 435

Εικόνα 175. Αριθμητική προσέγγιση (προσομοίωση των κυτταρικών πληθυσμών σε χρόνο *t+1* ($N_{p,x+1}$) συναρτήσει των πληθυσμών σε χρόνο t ($N_{p,x}$ και $N_{p,y}$). Παρουσιάζονται η δισδιάστατη προσομοίωση (**A**) και οι τρισδιάστατες προσομοιώσεις για τους πληθυσμούς $N_{p,x}$ και $N_{p,y}$ (**B**) και $N_{p,x}$ και $N_{p,z}$ (**C**). Τα αποτελέσματα αυτά έδωσαν ενδείξεις για μη-γραμμικά φαινόμενα καθώς η δυναμική έδωσε τη δομή μιας «σέλας» (saddle)..... 438

Εικόνα 176. Γραφική αναπαράσταση της πρώτης μερικής παραγώγου των κυτταρικών πληθυσμών, που υποδεικνύει την ταχύτητα μετάβασης του συστήματος από το ένα στάδιο στο επόμενο, όπως διατυπώθηκαν στον μοντέλο μετάβασης από τη μια χρονική στιγμή στην επόμενη. Παρουσιάζεται ο πληθυσμός $N_{p,x+1}$ συναρτήσει των πληθυσμών $N_{p,x}$ και $N_{p,y}$ (**A**, **B**) και $N_{p,x+1}$ συναρτήσει των πληθυσμών $N_{p,x}$ και $N_{p,z}$ (**C**, **D**). 439

Εικόνα 177. Διαγραμματική αναπαράσταση της χρονοσειράς των κυττάρων A172. Παρουσιάζονται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός (**A**), όπου στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t), στον άξονα των Y είναι ο λογάριθμος του αρχικού αριθμού κυττάρων (TINC) και στον άξονα των Z είναι ο φωτομετρική απορρόφηση. Ο παράγοντας πολλαπλασιασμού ήτοι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού (**B**), όπου στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t), στον άξονα των Y είναι ο λογάριθμος του αρχικού αριθμού κυττάρων (TINC) και στον άξονα των Z είναι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού εκφραζόμενος ως N_{t+1}/N_t. Η ταχύτητα πολλαπλασιασμού (**C**), όπου στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t), στον άξονα των Y είναι ο λογάριθμος του αρχικού αριθμού κυττάρων (TINC) και στον άξονα των Z είναι η ταχύτητα πολλαπλασιασμού εκφραζόμενη ως dN/dt. Τέλος, η επιτάχυνση πολλαπλασιασμού (**D**), όπου στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t), στον άξονα των Y είναι ο λογάριθμος του αρχικού αριθμού κυττάρων (TINC) και στον άξονα των Z είναι η επιτάχυνση πολλαπλασιασμού εκφραζόμενη ως d^2N/dt^2..... 443

Εικόνα 178. Διαγραμματική αναπαράσταση της χρονοσειράς των κυττάρων 1321N1. Παρουσιάζονται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός (**A**), όπου στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t), στον άξονα των Y είναι ο λογάριθμος του αρχικού αριθμού κυττάρων (TINC) και στον άξονα των Z

είναι ο φωτομετρική απορρόφηση. Ο παράγοντας πολλαπλασιασμού ήτοι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού (**B**), όπου στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t), στον άξονα των Y είναι ο λογάριθμος του αρχικού αριθμού κυττάρων (TINC) και στον άξονα των Z είναι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού εκφραζόμενος ως N_{t+1}/N_t. Η ταχύτητα πολλαπλασιασμού (**C**), όπου στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t), στον άξονα των Y είναι ο λογάριθμος του αρχικού αριθμού κυττάρων (TINC) και στον άξονα των Z είναι η ταχύτητα πολλαπλασιασμού εκφραζόμενη ως dN/dt. Τέλος, η επιτάχυνση πολλαπλασιασμού (**D**), όπου στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t), στον άξονα των Y είναι ο λογάριθμος του αρχικού αριθμού κυττάρων (TINC) και στον άξονα των Z είναι η επιτάχυνση πολλαπλασιασμού εκφραζόμενη ως d^2N/dt^2. 444

Εικόνα 179. Διαγραμματική αναπαράσταση της χρονοσειράς των κυττάρων TE671. Παρουσιάζονται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός (**A**), όπου στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t), στον άξονα των Y είναι ο λογάριθμος του αρχικού αριθμού κυττάρων (TINC) και στον άξονα των Z είναι ο φωτομετρική απορρόφηση. Ο παράγοντας πολλαπλασιασμού ήτοι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού (**B**), όπου στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t), στον άξονα των Y είναι ο λογάριθμος του αρχικού αριθμού κυττάρων (TINC) και στον άξονα των Z είναι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού εκφραζόμενος ως N_{t+1}/N_t. Η ταχύτητα πολλαπλασιασμού (**C**), όπου στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t), στον άξονα των Y είναι ο λογάριθμος του αρχικού αριθμού κυττάρων (TINC) και στον άξονα των Z είναι η ταχύτητα πολλαπλασιασμού εκφραζόμενη ως dN/dt. Τέλος, η επιτάχυνση πολλαπλασιασμού (**D**), όπου στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t), στον άξονα των Y είναι ο λογάριθμος του αρχικού αριθμού κυττάρων (TINC) και στον άξονα των Z είναι η επιτάχυνση πολλαπλασιασμού εκφραζόμενη ως d^2N/dt^2. 445

Εικόνα 180. Διαγραμματική παρουσίαση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ανά αρχικό αριθμό κυττάρων για τα κύτταρα A172. Στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t) και στον άξονα των Y είναι η φωτομετρική απορρόφηση. 446

Εικόνα 181. Διαγραμματική παρουσίαση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ανά αρχικό αριθμό κυττάρων για τα κύτταρα 1321N1. Στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t) και στον άξονα των Y είναι η φωτομετρική απορρόφηση. 447

Εικόνα 182. Διαγραμματική παρουσίαση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ανά αρχικό αριθμό κυττάρων για τα κύτταρα TE671. Στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t) και στον άξονα των Y είναι η φωτομετρική απορρόφηση. 448

Εικόνα 183. Διαγραμματική παρουσίαση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ανά αρχικό αριθμό κυττάρων για τα κύτταρα CCRFCEM. Στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t) και στον άξονα των Y είναι ο κυτταρικός πληθυσμός σε κύτταρα ανά μl. Τα βέλη υποδεικνύουν τα χρονικά σημεία, όπου υπήρχε αλλαγή του θρεπτικού υλικού. 449

Εικόνα 184. Γραφική αναπαράσταση του ρυθμού πολλαπλασιασμού όλων των κυττάρων A172 (**A**, **B**), 1321N1 (**C**, **D**), TE671 (**E**, **F**) και CCRFCEM (**G**, **H**), όπου παρουσιάζεται ο ρυθμός πολλαπλασιασμού σε μορφή ενιαίας χρονοσειράς (αριστερή στήλη για κάθε κυτταρικό τύπο αντίστοιχα) και phase-space διαγράμματα του ρυθμού πολλαπλασιασμού σε συνάρτηση με τις χρονικές στιγμές t-2 και t-1 (δεξιά στήλη για κάθε κυτταρικό τύπο αντίστοιχα). 451

Εικόνα 185. Συσχέτιση (cross-correlation) του ρυθμού πολλαπλασιασμού (k) για κάθε αρχικό αριθμό κυττάρων και κάθε κυτταρικό τύπο ήτοι για τα κύτταρα A172 (**A**), 1321N1 (**B**), TE671 (**C**), CCRFCEM (**D**). Για τη συσχέτιση χρησιμοποιήθηκαν όλοι οι ρυθμοί πολλαπλασιασμού σε μορφή ενός πίνακα διαστάσεων $m \times n$ (στο παράδειγμα αυτό 45×6)Στον άξονα των X βρίσκονται όλοι οι συνδυασμοί των επιμέρους αρχικών πληθυσμών και ισούται με $\textit{πλήθος}(k)^2=n^2$ (στο συγκεκριμένο παράδειγμα ο αρχικός αριθμός των κυττάρων είχε έξι παραλλαγές, από 30 έως 960 κύτταρα, οπότε ο άξονας των X αποτελείται από 36 σημεία), στον άξονα των Y είναι το πλήθος των χρονικών στιγμών, όπως έχει μετασχηματισθεί από τον αλγόριθμο συσχέτισης (είναι ίσο με το *πλήθος των χρονικών στιγμών*2 μείον 1*, ήτοι $m*2-1=94$) και στον άξονα των Z βρίσκεται η τιμή της συσχέτισης. 452

Εικόνα 186. Διαγραμματική αναπαράσταση της ταχύτητας πολλαπλασιασμού των κυττάρων A172, για κάθε αρχικό πληθυσμό κυττάρων από 30 έως 960 κύτταρα (**A**-**F**). Στον άξονα των X παρουσιάζεται ο χρόνος (t) και στον άξονα των Y παρουσιάζεται η ταχύτητα ως η πρώτη παράγωγος της καμπύλης πολλαπλασιασμού, που παρουσιάσθηκε στην **Εικόνα 180**. 454

Εικόνα 187. Διαγραμματική αναπαράσταση της επιτάχυνσης των κυττάρων A172, για κάθε αρχικό πληθυσμό κυττάρων από 30 έως 960 κύτταρα (**A**-**F**). Στον άξονα των X παρουσιάζεται ο χρόνος (t) και στον άξονα των Y παρουσιάζεται η ταχύτητα ως η δεύτερη παράγωγος της καμπύλης πολλαπλασιασμού, που παρουσιάσθηκε στην **Εικόνα 180**. 455

Εικόνα 188. Διαγραμματική αναπαράσταση της ταχύτητας (**A**, **B**) και επιτάχυνσης τ(**C**, **D**) των κυττάρων CCRFCEM, για κάθε αρχικό πληθυσμό κυττάρων ήτοι 20 και 200 κύτταρα (**A**-**D**). Στον άξονα των X παρουσιάζεται ο χρόνος (t) και στον άξονα των Y παρουσιάζεται η ταχύτητα ως η δεύτερη παράγωγος της καμπύλης πολλαπλασιασμού, που παρουσιάσθηκε στην **Εικόνα 183**. 456

Εικόνα 189. Διαγραμματική παρουσίαση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων CCRFCEM. Η εξίσωση πολλαπλασιασμού δίνεται από $\dot{x}_n = kx_n(1-x_n)$, και διαγράφοντας τον πληθυσμό συναρτήσει της ταχύτητας πολλαπλασιασμού παρατηρούμε ότι και για τους δύο αρχικούς αριθμούς οι καμπύλες καταλήγουν σε ένα σταθερό σημείο/ελκυστή (**A**) Οι συνεχείς καμπύλες είναι η προσομοίωση για κάθε αρχικό αριθμό κυττάρων (συνεχής γραμμή για 200 κύτταρα και διακεκομμένη καμπύλη για 20 κύτταρα αρχικό αριθμό αντίστοιχα). Όταν διαγράφουμε την ταχύτητα σε χρόνο t και σε χρόνο t+1, ήτοι $\left(\frac{dx_{n+1}}{dt_{n+1}}\right)$ και $\left(\frac{dx_n}{dt_n}\right)$αντίστοιχα λαμβάνουμε δύο καμπανοειδείς καμπύλες, όπου φαίνονται δύο ελκυστές και περιοδική τροχιά με περίοδο 3 (**B**,**C**), η διαγώνιος που διασχίζει τα διαγράμματα B, C είναι η συνάρτηση y=x. Τέλος, υπολογίζοντας τους εκθέτες *Lyapunov* για τις καμπύλες ανάπτυξης των κυττάρων βλέπουμε ότι τα κύτταρα με αρχικό αριθμό 20 έχουν θετικούς εκθέτες και κατά συνέπεια ενδεχομένως ακολουθούν χαοτικές τροχιές (**D**). 458

Εικόνα 190. Ο χιονάνθρωπος του *Mandelbrot*. Ένα από τα κλασσικά παραδείγματα δομών *fractal*. Επάνω παρουσιάζεται ολόκληρος ο χιονάνθρωπος και στις κάτω εικόνες παρουσιάζονται δύο μεγεθύνσεις ×8 και ×4 αντίστοιχα. Η αυτο-ομοιότητα έγκειται στο γεγονός ότι όσο και μεγεθυνθεί το αρχικό σχήμα παραμένει το ίδιο. 459

Εικόνα 191. Διαγραμματική παρουσίαση του αλγόριθμου υπολογισμού της διάστασης Kolmogorov, χρησιμοποιώντας ως παράδειγμα τον υπολογισμό της διάστασης των ακτών της Βρετανίας. Τετράγωνα τοποθετούνται στο σχήμα και το μέγεθός τους σε συνάρτηση με τον αριθμό τους σχηματίζουν τη διάσταση του σχήματος. 460

Εικόνα 192. Διαγραμματική παρουσίαση των παραγόντων του συντελεστή fractal για τα κύτταρα A172. Ενδεικτικά παρουσιάζεται η σχέση του αριθμού των τετραγώνων (*N*) που απαιτούνται για να προσομοιωθεί το διάνυσμα του ρυθμού πολλαπλασιασμού (*k*) συναρτήσει του μεγέθους των τετραγώνων (*R*) (**A**). Επίσης παρουσιάζεται η πρώτη παράγωγος του αριθμού *N* ως προς το μέγεθος *R* συναρτήσει του μεγέθους των τετραγώνων (**B**). Πρακτικά, όσο παραμένει η παράγωγος *dln*N/*dln*R σταθερή κατά μήκος του μεγέθους των τετραγώνων αυτή είναι η διάσταση fractal του διανύσματος. Αντίστοιχα διαγράμματα παρουσιάζονται για την ταχύτητα πολλαπλασιασμού (**C**), την επιτάχυνση (**D**), και τέλος την επιφάνεια συσχέτισης (*cross-correlation*) που παρουσιάσαμε στην **Εικόνα 185** (**E**, **F**). 462

Εικόνα 193. Διαγραμματική παρουσίαση των παραγόντων του συντελεστή fractal για τα κύτταρα 1321N1, TE671 και CCRFCEM. Ενδεικτικά παρουσιάζεται η πρώτη παράγωγος του αριθμού *N* ως προς το μέγεθος *R* συναρτήσει του μεγέθους των τετραγώνων για τα κύτταρα 1321N1 (**A**) και την επιφάνεια συσχέτισης (*cross-correlation*) που παρουσιάσαμε στην **Εικόνα 185** για τα ίδια κύτταρα (**B**). Η πρώτη παράγωγος του αριθμού *N* ως προς το μέγεθος *R* συναρτήσει του μεγέθους των τετραγώνων για τα κύτταρα TE671 (**C**) και την επιφάνεια συσχέτισης (*cross-correlation*) που παρουσιάσαμε στην **Εικόνα 185** για τα ίδια κύτταρα (**D**). Η πρώτη παράγωγος του αριθμού *N* ως

προς το μέγεθος *R* συναρτήσει του μεγέθους των τετραγώνων για τα κύτταρα CCRFCEM (**E**) και την επιφάνεια συσχέτισης (*cross-correlation*) που παρουσιάσαμε στην **Εικόνα 185** για τα ίδια κύτταρα (**F**). 463

Εικόνα 194. Τρία σχήματα με γνωστή διάσταση fractal, που έχουν όμως την ίδια τιμή με τα διανύσματα του ρυθμού πολλαπλασιασμού, της ταχύτητας και επιτάχυνσης. Επάνω παρουσιάζονται δύο παραλλαγές του συνόλου Cantor, που έχει διάσταση 1 ακριβώς όπως και ο ρυθμός πολλαπλασιασμού. Κάτω παρουσιάζεται ο *Απολλώνιος Δίσκος* που έχει διάσταση 0.8 όπως η ταχύτητα και επιτάχυνση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. 464

Εικόνα 195. Πολλαπλασιασμός των κυττάρων A172 υπό την επιδραση αναστολέων. Σε κάθε υπο-εικόνα παρουσιάζονται ο πολλαπλασιασμός του πειράματος ελέγχου σε σύγκριση με το πείραμα του αναστολέα. 467

Εικόνα 196. Διαγραμματική παρουσίαση του αποπτωτικού θανάτου των κυττάρων A172 υπό την επιδραση αναστολέων. Σε κάθε υπο-εικόνα παρουσιάζονται η απόπτωση του πειράματος ελέγχου σε σύγκριση με το πείραμα του αναστολέα. 469

Εικόνα 197. Διαγραμματική παρουσίαση του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων A172 υπό την επίδραση αναστολέων. Το πείραμα ελέγχου και τα πειράματα των αναστολέων παρουσιάζονται ξεχωριστά. 471

Εικόνα 198. Μικροσκοπικές εικόνες των κυττάρων A172, από το πείραμα ελέγχου της επώασης των κυττάρων με τους αναστολείς. Παρουσιάζονται τα κύτταρα στις 48 ώρες (**A**, **B**) και στις 120 ώρες πειράματος (τέλος πειραματικής διαδικασίας) με χρώση Giemsa. Η αναπαράσταση στις 120 ώρες αποτελεί συνένωση διαφορετικών καρέ από βίντεο που λήφθηκε κατά τη μελέτη του φαινομένου. . 472

Εικόνα 199. Μικροσκοπικές εικόνες των κυττάρων A172, από το πείραμα επώασης των κυττάρων με Prednisolone. Παρουσιάζονται τα κύτταρα στις 48 ώρες (**A**-**C**) και στις 120 ώρες πειράματος (τέλος πειραματικής διαδικασίας) (**D**) με χρώση Giemsa. Η αναπαράσταση στις 120 ώρες αποτελεί συνένωση διαφορετικών καρέ από βίντεο που λήφθηκε κατά τη μελέτη του φαινομένου. 473

Εικόνα 200. Μικροσκοπικές εικόνες των κυττάρων A172, από το πείραμα επώασης των κυττάρων με Trichostatin A. Παρουσιάζονται τα κύτταρα στις 48 ώρες (**A**-**C**) και στις 120 ώρες πειράματος (τέλος πειραματικής διαδικασίας) (**D**, **E**) με χρώση Giemsa. 474

Εικόνα 201. Μικροσκοπικές εικόνες των κυττάρων A172, από το πείραμα επώασης των κυττάρων με MG132. Παρουσιάζονται τα κύτταρα στις 48 ώρες (**A**-**C**) και στις 120 ώρες πειράματος (τέλος πειραματικής διαδικασίας) (**D**-**F**) με χρώση Giemsa. 475

Εικόνα 202. Μικροσκοπικές εικόνες των κυττάρων A172, από το πείραμα επώασης των κυττάρων με Chloroquine. Παρουσιάζονται τα κύτταρα στις 48 ώρες (**A**-**C**) και στις 120 ώρες πειράματος (τέλος πειραματικής διαδικασίας) (**D**-**F**) με χρώση Giemsa. 476

Εικόνα 203. Μικροσκοπικές εικόνες των κυττάρων A172, από το πείραμα επώασης των κυττάρων με Rapamycin. Παρουσιάζονται τα κύτταρα στις 48 ώρες (**A**-**C**) και στις 120 ώρες πειράματος (τέλος πειραματικής διαδικασίας) (**D**-**F**) με χρώση Giemsa. 477

Εικόνα 204. Μικροσκοπικές εικόνες των κυττάρων A172, από το πείραμα επώασης των κυττάρων με PI3K Inhibitor. Παρουσιάζονται τα κύτταρα στις 48 ώρες (**A**-**C**) και στις 120 ώρες πειράματος (τέλος πειραματικής διαδικασίας) (**D**-**F**) με χρώση Giemsa. 478

Εικόνα 205. Μικροσκοπικές εικόνες των κυττάρων A172, από το πείραμα επώασης των κυττάρων με Bay11. Παρουσιάζονται τα κύτταρα στις 48 ώρες (**A**, **B**) και στις 120 ώρες πειράματος (τέλος πειραματικής διαδικασίας) (**C**-**F**) με χρώση Giemsa. 479

Εικόνα 206. Μικροσκοπικές εικόνες των κυττάρων A172, από το πείραμα επώασης των κυττάρων με SP600 Inhibitor. Παρουσιάζονται τα κύτταρα στις 48 ώρες (**A**-**C**) και στις 120 ώρες πειράματος (τέλος πειραματικής διαδικασίας) (**D**-**F**) με χρώση Giemsa. 480

Εικόνα 207. Πολλαπλασιασμός των κυττάρων 1321N1 υπό την επιδραση αναστολέων. Σε κάθε υπο-εικόνα παρουσιάζονται ο πολλαπλασιασμός του πειράματος ελέγχου σε σύγκριση με το πείραμα του αναστολέα. 482

Εικόνα 208. Διαγραμματική παρουσίαση του αποπτωτικού θανάτου των κυττάρων 1321N1 υπό την επίδραση αναστολέων. Σε κάθε υπο-εικόνα παρουσιάζονται η απόπτωση του πειράματος ελέγχου σε σύγκριση με το πείραμα του αναστολέα. 484

Εικόνα 209. Διαγραμματική παρουσίαση του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων 1321N1 υπό την επίδραση αναστολέων. Το πείραμα ελέγχου και τα πειράματα των αναστολέων παρουσιάζονται ξεχωριστά. 486

Εικόνα 210. Πολλαπλασιασμός των κυττάρων TE671 υπό την επιδραση αναστολέων. Σε κάθε υπο-εικόνα παρουσιάζονται ο πολλαπλασιασμός του πειράματος ελέγχου σε σύγκριση με το πείραμα του αναστολέα. 488

Εικόνα 211. Διαγραμματική παρουσίαση του αποπτωτικού θανάτου των κυττάρων TE671υπό την επίδραση αναστολέων. Σε κάθε υπο-εικόνα παρουσιάζονται η απόπτωση του πειράματος ελέγχου σε σύγκριση με το περίραμα του αναστολέα. 490

Εικόνα 212. Διαγραμματική παρουσίαση του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων TE671 υπό την επιδραση αναστολέων. Το πείραμα ελέγχου και τα πειράματα των αναστολέων παρουσιάζονται ξεχωριστά. 492

Εικόνα 213. Παρουσιάζεται μια ενδεικτική πειραματική διάταξη, ήτοι η πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων (πηγαδιών) και σε κάθε θέση φαίνεται το διάγραμμα πυκνότητας της σάρωσης. Το συγκεκριμένο διάγραμμα προέρχεται από πείραμα μέτρησης του NADH. Στις θέσεις A1-H1 βρίσκονται τα δείγματα κενού, θρεπτικό υλικό χωρίς κύτταρα, στις θέσεις A2-H2 βρίσκονται τα δείγματα ελέγχου, θρεπτικό υλικό με μεγάλο αριθμό κυττάρων ώστε να πιστοποιείται η θετική μέτρηση. Στις θέσεις A4-H6 βρίσκονται κύτταρα από 100 έως 12800 αρχικό αριθμό και 100μl θρεπτικού υλικού. Στις θέσεις A7-H9 βρίσκονται κύτταρα από 100 έως 12800 αρχικό αριθμό και 200μl θρεπτικού υλικού. Τέλος Στις θέσεις A10-H12 βρίσκονται κύτταρα από 100 έως 12800 αρχικό αριθμό και 300μl θρεπτικού υλικού. 494

Εικόνα 214. Τρισδιάστατες απεικονήσεις της παραγωγής NADH στα κύτταρα A172 σε συνάρτηση με το χρόνο και τον όγκο θρεπτικού. Στον άξονα των X παρουσιάζονται τα πηγάδια της πλάκας μικροτιτλοποίησης, στον άξονα των Y παρουσιάζονται οι μετρήσεις από τη σάρωση του πηγαδιού και στον άξονα των Z, παρουσιάζεται η εκπομπή φθορισμού του NADH. Τα δεδομένα αυτά βρίσκονται στο χώρο $\mathbb{R}^{3\times3}$ 496

Εικόνα 215. Τρισδιάστατες απεικονήσεις της παραγωγής NADH στα κύτταρα A172 σε συνάρτηση με το χρόνο και τον όγκο θρεπτικού. Στον άξονα των X παρουσιάζεται ο όγκος θρεπτικού, στον άξονα των Y παρουσιάζεται ο αρχικός αριθμός κυττάρων και στον άξονα των Z, παρουσιάζεται η εκπομπή φθορισμού του NADH. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η σταδιακή άνοδος της κατανάλωσης γλυκόζης στα 100μl συναρτήσει του χρόνου. 497

Εικόνα 216. Τρισδιάστατες απεικονήσεις της παραγωγής NADH στα κύτταρα A172 σε συνάρτηση με τον όγκο θρεπτικού και το χρόνο. Στον άξονα των X παρουσιάζεται ο χρόνος, στον άξονα των Y παρουσιάζεται ο αρχικός αριθμός κυττάρων και στον άξονα των Z, παρουσιάζεται η εκπομπή φθορισμού του NADH. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η εμφάνιση τοπικού μέγιστου στις 48 ώρες επώασης. 498

Εικόνα 217. Προβολές των αξόνων των τρισδιάστατων αναπαραστάσεων της **Εικόνας 214**. Κάθε χρονική στιγμή αναπαρίσταται ως ζεύγος, όπου στο πρώτο σκέλος του ζεύγους παρουσιάζονται τα πηγάδια της πλάκας μικροτιτλοποίησης, ήτοι ο άξονας X της **Εικόνας 214** συναρτήσει της εκπομπής φθορισμού και στο δεύτερο σκέλος παρουσιάζονται οι μετρήσεις της σάρωσης ήτοι ο άξονας Y της **Εικόνας 214** συναρτήσει της εκπομπής φθορισμού. 499

Εικόνα 218. Προβολές των αξόνων των τρισδιάστατων αναπαραστάσεων της πρώτης μερικής παραγώγου της ποσότητας του NADH. Το μέγεθος αυτό υποδεικνύει ουσιαστικά το ρυθμό με τον οποίο τα κύτταρα ακολουθούν το μεταβολισμό. Κάθε χρονική στιγμή αναπαρίσταται ως ζεύγος, όπου στο πρώτο σκέλος του ζεύγους παρουσιάζονται τα πηγάδια της πλάκας μικροτιτλοποίησης, ήτοι η προβολή τους, όπως αναφέρεται στην **Εικόνα 217**, συναρτήσει της εκπομπής φθορισμού και στο δεύτερο σκέλος παρουσιάζονται οι μετρήσεις της σάρωσης ήτοι η προβολή τους, όπως αναφέρεται στην **Εικόνα 217** συναρτήσει της εκπομπής φθορισμού. Όπου συναντώνται κόκκινες διακεκομένες γραμμές αυτές δείχνουν το πλάτος των μετρήσεων στις 36 ώρες και οι αντίστοιχες μαύρες διακεκομμένες γραμμές δείχνουν το πλάτος στη συγκεκριμένη χρονική στιγμή..... 500

Εικόνα 219. Παρουσιάζονται οι προσομοιώσεις του κυτταρικού μεταβολισμού για τα κύτταρα A172, συναρτήσει του χρόνου και για όλους τους αρχικούς αριθμούς (TINC), στα 100μl θρεπτικού υλικού. Επίσης σε κάθε διάγραμμα εκπομπής φθορισμού (emission) αντιστοιχεί δεύτερο διάγραμμα που παρουσιάζει την ταχύτητα μεταβολής του μεταβολισμού (dN/dt). 502

Εικόνα 220. Παρουσιάζονται οι προσομοιώσεις του κυτταρικού μεταβολισμού για τα κύτταρα A172, συναρτήσει του χρόνου και για όλους τους αρχικούς αριθμούς (TINC), στα 200μl θρεπτικού υλικού. Επίσης σε κάθε διάγραμμα εκπομπής φθορισμού (emission) αντιστοιχεί δεύτερο διάγραμμα που παρουσιάζει την ταχύτητα μεταβολής (dN/dt) του μεταβολισμού..... 503

Εικόνα 221. Παρουσιάζονται οι προσομοιώσεις του κυτταρικού μεταβολισμού για τα κύτταρα A172, συναρτήσει του χρόνου και για όλους τους αρχικούς αριθμούς (TINC), στα 300μl θρεπτικού υλικού. Επίσης σε κάθε διάγραμμα εκπομπής φθορισμού (emission) αντιστοιχεί δεύτερο διάγραμμα που παρουσιάζει την ταχύτητα μεταβολής (dN/dt) του μεταβολισμού..... 504

Εικόνα 222. Διαγραμματική παρουσίαση των βασικών ηλεκτροφυσικών ιδιοτήτων των κυτταρικών συστημάτων. Το πείραμα ελέγχου αφορά σε υγρά καλλιέργειας, που χωρίς κύτταρα και το πείραμα μέτρησης αφορούσε σε υγρά καλλιέργειας με κύτττταρα σε μετρήσεις συναρτήσει του χρόνου (**p<0.05*). 507

Εικόνα 223. Διαγραμματική παρουσίαση των υπολογισμών της εμπέδησης (*Z*) και της σχετικής διηλεκτρικής (ε_r) στα πειράματα ελέγχου και σε θρεπτικό υλικό με καλλιέργεια κυττάρων. Παρουσιάζονται τα ιστογράμματα της εμπέδησης και η παλινδρόμηση των μετρήσεων της εμπέδησης (**A**, **B**) καθώς και της σχετικής διηλεκτρικής σταθεράς (**C**, **D**) *(*p<0.05)*..... 508

Εικόνα 224. Διαγραμματική αναπαράσταση των μετασχηματισμών Fourier του σήματος παλμογράφου σε πειράματα ελέγχου και κυτταρικά συστήματα των οποίων το θρεπτικό υλικό περιείχε κύτταρα. Οι μετρήσεις έγιναν συναρτήσει του χρόνου και παρουσιάζονται τα ζεύγη των μετρήσεων ελέγχου και των πειραματικών μετρήσεων. Δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές παρά μόνο στις 24 ώρες..... 509

Εικόνα 225. Συσχέτιση των σημάτων των μετρήσεων σε πειράματα ελέγχου κα σε θρεπτικό υλικό που περιείχε κύτταρα. Παρουσιάζονται όλες οι συγκρίσεις για τα πειράματα ελέγχου ως προς το χρόνο καθώς και οι συγκρίσεις των πειραμάτων ελέγχου με τα πειράμαρα μετρήσεων σε αντίστοιχες χρονικές στιγμές. Δεν φάνηκε να υπάρχουν σημαντικές διαφορές, μιας και η διαφορά φάσης μεταξύ των σημάτων ήταν 0..... 510

Εικόνα 226. Μικροσκοπική απεικόνιση των κυττάρων CCRFCEM (**A**, **B**) και των κυττάρων TE671 (**C**, **D**) στις 72 ώρες επώασης όπως αναφέραμε στην ενότητα «Υλικό και Μέθοδος». Τα κύτταρα αυτά μελετήθηκαν με κυτταρομετρία ροής ως προς το μέγεθος και κοκκίωσή τους (**E**-**J**) συναρτήσει του χρόνου..... 512

Εικόνα 227. Κατανομή του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα CCRFCEM και TE671 (**A**-**D**) και η απόπτωση στα ίδια κύτταρα συναρτήσει του χρόνου (**E**, **F**). 513

Εικόνα 228. Διαγράμματα διασποράς (MA-Plots) των πειραμάτων μικροσυστοιχιών των κυττάρων CCRFCEM και TE671. Χρησιμοποιήθηκαν δύο πλατφόρμες πλακιδίων οι IntelliGene (TAKARA

Inc, Japan) και η IMT9.6k (IMT, Philipps-Universitaet, Marburg). Ο υβριδισμός αφορούσε σε δικάναλη χρώση και χρησιμοποιήθηκαν οι χρωστικές Cy3 και Cy5. 515

Εικόνα 229. Μεθοδολογίες κανονικοποίησης των μικροσυστοιχιών. Για επεξήγηση βλέπε κείμενο. 517

Εικόνα 230. Διαγραμματική παρουσιάση των διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων από τη σύγκριση μεταξύ των κυτταρικών σειρών CCRFCEM και TE671. Παρουσιάζονται τα γονίδια με βάση την έκφρασή τους ανά κανάλι (**A**), με βάση το λόγο έκφρασης Cy3/Cy5 (**B**) και τα κοινά γονίδια και στα δύο κανάλια (**C**). 519

Εικόνα 231. Κατανομή της γονιδιακής έκφρασης με βάση τα χρωμοσώματα. Παρουσιάζονται ο αριθμός των γονιδίων ανά χρωμόσωμα (**A**), η μέση έκφραση των γονιδίων ανά κυτταρική σειρά (**B**), η μέση έκφραση όλων των γονιδίων ανά χρωστική (**C**) και ένα *διάγραμμα θερμότητας*, που περικλείει τη γονιδιακή έκφραση παρουσιάζοντας τις πιο ενεργές χρωμοσωμικές περιοχές (**D**). Οι διακεκομένες γραμμές υποδεικνύουν το χρωμόσωμα, όπου έχουμε έντονη δραστηριότητα. 521

Εικόνα 232. Παρουσιάζεται η μέση έκφραση του λόγου Cy5/Cy3 με βάση τη χρωμοσωμική κατανομή. 522

Εικόνα 233. Παρουσιάζονται τα ιστογράμματα των διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων με βάση τη χρωμοσωμική κατανομή τους. Παρουσιάζεται ο αριθμός γονιδίων ανά χρωμόσωμα (**A**) και η μέση έκφραση για κάθε κανάλι (χρωστική) Cy3 και Cy5 (**B**). 523

Εικόνα 234. Διαγραμματική παρουσίαση της μέσης έκφρασης των διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων (**A**) και του λόγου έκφρασης Cy3/Cy5 (**B**). 524

Εικόνα 235. Διαγραμματική παρουσίαση της μέσης έκφρασης των μη-εκφραζόμενων γονιδίων (**A**), των επιμέρους τιμών των χρωστικών (**B**) και του λόγου των χρωστικών Cy3/Cy5 (**C**). 525

Εικόνα 236. Παλινδρομήσεις των χρωμοσωμικών κατανομών της γονιδιακής έκφρασης. Παρουσιάζονται οι παλινδρομήσεις των μη-διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων με τη χρώση Cy3 ως προς τη χρώση Cy5 (**A**), των μη-διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων με τη χρώση Cy3 ως προς τον αριθμό των γονιδίων (**B**), των μη-διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων με τη χρώση Cy5 ως προς τον αριθμό των γονιδίων (**C**), του λόγου Cy3/Cy5 των μη-διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων ως προς τον αριθμό των γονιδίων (**D**), το διάγραμμα επιφάνειας της έντασης του φθορισμού των Cy3, Cy5 ως προς τον αριθμό όλων των γονιδίων (**E**), το διάγραμμα επιφάνειας της έντασης του φθορισμού των Cy3, Cy5 ως προς τον αριθμό των διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων (**F**), το διάγραμμα επιφάνειας της έντασης του φθορισμού των Cy3, Cy5 ως προς τον αριθμό των μη-διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων (**G**) και το διάγραμμα επιφάνειας της έντασης του φθορισμού των Cy3, Cy5 ως προς το λόγο των μη-διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων (**H**). 527

Εικόνα 237. TFBM ανάλυση των κοινών, διαφορικών εκφραζόμενων γονιδίων (**A**), των μη-διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων (**B**) και επιλεγμένων γονιδίων από τα μη-διαφορικώς εκφραζόμενα (**C**). 529

Εικόνα 238. Μεταγραφικοί παράγοντες των διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων Παρουσιάζονται ο παράγοντες RORA1, ERR1 και NFY, οι οποίοι έδειξαν ρύθμιση γονιδίων με αυξανόμενη έκφραση. 531

Εικόνα 239. Πρόβλεψη των λειτουργιών των γονιδίων για τα διαφορικώς εκφραζόμενα (**A**) και τα μη-διαφορικώς εκφραζόμενα (**B**). 533

Εικόνα 240. Παρουσίαση των σηματοδοτικών οδών που συμμετέχουν τα μη-διαφορικώς εκφραζόμενα γονίδια. Οι αριθμοί πάνω από κάθε ιστόγραμμα αντιστοιχούν στον αριθμό των γονιδίων που συμμετέχει στη σηματοδοτική οδό. 535

Εικόνα 241. Διαγραμματική παρουσίαση των κυριότερων αλληλεπιδράσεων μεταξύ σηματοδοτικών οδών που ανεβρέθηκαν με την ανάλυση των γονιδίων. Οι αριθμοί σε παρένθεση υποδεικνύουν τον αριθμό γονιδίων που συμμετέχουν σε κάθε σηματοδοτική οδό.Παρουσιάζονται οι σηματοδοτικές

οδοί για *Cell Cycle* (**A**), *MAPK Signaling Pathway* (**B i-iv**), *Integrin-mediated Cell Adhesion* (**C**), *Wnt Signaling Pathway* (**D i-iii**), *TGF-beta Signaling Pathway* (**E**), *mTOR Signaling Pathway* (**F**), *VEGF Signaling Pathway* (**G**), *Calcium Signaling Pathway* (**H**), *Focal Adhesion Pathway* (**I**), *Jak-STAT Signaling Pathway* (**J**), *Notch Signaling Pathway* (**K**). 536

Εικόνα 242. Συνολική διαγραμματική παρουσίαση όλων των σηματοδοτικών οδών που βρέθηκαν από την παραπάνω ανάλυση (**A**), η διαγραμματική παρουσίαση των επιλεγμένων οδών JAK-STAT-MAPK (**B**, **C**). 538

Εικόνα 243 (Συνέχεια). Παρουσιάζονται οι σηματοδοτικές οδοί μαζί με τα σημαντικότερα γονίδια (αυτά με τη μεγαλύτερη έκφραση) ανά οδό (**A**, **B**). Προσομοιωτική αναπαράσταση των οδών TGFb-MAPK-PDGF (**C**). 540

Εικόνα 244. Διαγραμματική αναπαράσταση προσομοιωμένων συνδεδεμένων σηματοδοτικών οδών. 541

Εικόνα 245 (Συνέχεια). Μελετώντας το αθροιστικό αποτέλεσμα των γονιδίων που προαναφέραμε συναρτήσει του χρόνου παρατηρούμε πολύ ενδιαφέρουσες δυναμικές στα αθροίσματα JAK1/STAT1 (**G**), στα αθροίσματα STAT1/STAT1 dimer/PIAS2 (**H**), στα αθροίσματα JAK1/PIAS2 (**I**) και στα αθροίσματα CDK4/JAK1 (**J**). 544

Εικόνα 246. Ιεραρχική ταξινόμηση (Hierarchical Clustering) όλων των δειγμάτων με Ευκλείδια απόσταση. 545

Εικόνα 247. Ιεραρχική ταξινόμηση (Hierarchical Clustering) των δειγμάτων *ex vivo* με Ευκλείδια απόσταση. 546

Εικόνα 248. Ιεραρχική ταξινόμηση (Hierarchical Clustering) των δειγμάτων του πολλαπλασιαστικού μοντέλου για τα κύτταρα A172 με Ευκλείδια απόσταση. 547

Εικόνα 249. Ιεραρχική ταξινόμηση (Hierarchical Clustering) των δειγμάτων του πολλαπλασιαστικού μοντέλου για τα κύτταρα TE671 με Ευκλείδια απόσταση. 548

Εικόνα 250. Ιεραρχική ταξινόμηση (Hierarchical Clustering) των δειγμάτων του πολλαπλασιαστικού μοντέλου για τα κύτταρα 1321N1 με Ευκλείδια απόσταση. 548

Εικόνα 251. K-means ιεράρχηση των γονιδίων σε όλα τα υπό εξέταση δείγματα. 550

Εικόνα 252. K-means ιεράρχηση των γονιδίων σε δείγματα ασθενών. 551

Εικόνα 253. K-means ιεράρχηση των γονιδίων του μοντέλου πολλαπλασιασμού των κυττάρων A172. Σε κόκκινο περίγραμμα βρίσκονται τα γονίδια που χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω ανάλυση. 553

Εικόνα 254. K-means ιεράρχηση των γονιδίων του μοντέλου πολλαπλασιασμού των κυττάρων TE671. Σε κόκκινο περίγραμμα βρίσκονται τα γονίδια που χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω ανάλυση. 554

Εικόνα 255. K-means ιεράρχηση των γονιδίων του μοντέλου πολλαπλασιασμού των κυττάρων 1321N1. Σε κόκκινο περίγραμμα βρίσκονται τα γονίδια που χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω ανάλυση. 555

Εικόνα 256. Διάγραμμα Venn των γονιδίων που προέκυψαν από την ανάλυση του κοινού προφίλ των πολλαπλασιαστικών μοντέλων. Η ένωση των τριών κυτταρικών τύπων έδωσε 20 γονίδια από κοινού εκφραζόμενα (ένθετο με κόκκινο περίγραμμα) με τον τρόπο μεταβολής της γονιδιακής έκφρασης όπως περιγράφεται στο κείμενο. Δηλαδή, τα γονίδια αυτά αφορούν σε αυξημένα επίπεδα κατά τα πρώτα στάδια του πολλαπλασιασμού και μετάπειτα μείωση και/ή κορύφωση στα ενδιάμεσα στάδια του πολλαπλασιαστικού μοντέλου. 556

Εικόνα 257. Ανάλυση των λειτουργιών των κοινών γονιδίων κατά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων *in vitro*, με τη χρήση οντολογιών (GO). 559

Εικόνα 258. PCA ανάλυση των γονιδιακών εκφράσεων. Το διακεκομένο περίγραμμα δείχνει μια ομάδα γονιδίων, τα οποία δείχνουν γραμμική απόλυτα συσχέτιση μεταξύ των principal components (PCs) με απομονωμένα γονίδια εξαιρούμενα από αυτή τη σχέση. ***Υπόμνημα αξόνων***: **A**=A172 48-well, **B**=A172 24-well, **C**=A172 6-well, **D**=A172 control (75cm^2 flask), **E**=TE671 48-well, **F**=TE671 24-well, **G**=TE671 6-well, **H**=TE671 control (75cm^2 flask), **I**=1321N1 48-well, **J**=1321N1 24-well, **K**=1321N1 6-well, **L**=1321N1 control (75cm^2 flask). 560

Εικόνα 259 (συνέχεια). Αναπαράσταση των principal components 1-12 σε όλους τους συνδυασμούς μεταξύ του principal component 1 και των υπολοίπων. Παρουσιάστηκε γραμμική συσχέτιση στον ιδιοπίνακα της γονιδιακής έκφρασης με την εξαίρεση ορισμένων γονιδίων που παρουσιάζονται στα επιμέρους διαγράμματα. 563

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΩΝ

Appendix Figure 1. L-Glutamine 619
Appendix Figure 2. Penicillin 619
Appendix Figure 3. Streptomycin 620
Appendix Figure 4. HEPES 620
Appendix Figure 5. Phenol Red 620
Appendix Figure 6. Glucose 621
Appendix Figure 7. Galactose 621
Appendix Figure 8. Maltose 621
Appendix Figure 9. Fructose 622
Appendix Figure 10. Sucrose 622
Appendix Figure 11. Epichlorohydrin 622
Appendix Figure 12. Dimethyl Sulfoxide 623
Appendix Figure 13. Giemsa Stain 625
Appendix Figure 14. Propidium Iodide 625
Appendix Figure 15. Ethidium Bromide 625
Appendix Figure 16. Trypan Blue 626
Appendix Figure 17. Alamar Blue (Resazurin) 627
Appendix Figure 18. Calcein 627
Appendix Figure 19. $DiOC_2(3)$ 627
Appendix Figure 20. Προδιαγραφές της ψηφιακής κάμερας του συστήματος μικροσκοπίας και ανάλυσης εικόνας 689

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1. Παίγνιο μηδενικού αθροίσματος. Το άθροισμα κάθε ζεύγους αριθμών είναι ίσο με το μηδέν. 144

Διάγραμμα 2. Το *Δίλημμα του Φυλακισμένου*. 145

Διάγραμμα 3. Συνοπτική και συγκεντρωτική παρουσίαση των πειραματικών διαδικασιών για τη μελέτη των νεοπλασιών του ΚΝΣ. 200

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Κατανομή Παιδικών Νεοπλασιών κατά Τύπο. 119

Πίνακας 2. Τάση στο 5-ετές προσδόκιμο ζωής (%) σε παιδιά κάτω των 15 ετών, Ηνωμένες Πολιτείες, 1975-2003. 120

Πίνακας 3. Κατανομή των παιδικών νεοπλασιών του ΚΝΣ με βάση τη συχνότητά τους κατά την πρώτη διάγνωση (Πηγή: SEER Pediatric Monograph , 1975-1996, Bethesda, 1999)..... 121

Πίνακας 4. Κατηγοριοποίηση των κυριότερων νεοπλασιών του ΚΝΣ βάση της ταξινόμησης κατά Π.Ο.Υ. (Louis, Ohgaki et al. 2007). 122

Πίνακας 5. Γνωστά σύνδρομα που προκαλούνται από μεταλλάξεις σε γονίδια, κυρίως tumor suppressor genes, και προδιαθέτουν για την εμφάνιση νεοπλασιών (Ullrich 2008). 125

Πίνακας 6. Διηλεκτρικές σταθερές ηλεκτρολυτών (Pethig and Kell 1987). 196

Πίνακας 7. Αλλαγές στην ελεύθερη ενέργεια των βημάτων της γλυκόλυσης (Garrett and Charles M Grisham 2012). 245

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΩΝ

RPMI-1640 (Gibco, Invitrogen Inc., Cat. Nr. 52400-025) (Appendix Table 1) 616

DMEM (Gibco, Invitrogen Inc., Cat. Nr. 10567-014) (Appendix Table 2) 617

EMEM (Gibco, Invitrogen Inc., Cat. Nr. 32561-037) (Appendix Table 3) 617

NEA (non-essential amino acids) (Gibco, Invitrogen Inc. Cat. Nr. 11140035) (Appendix Table 4) 618

Appendix Table 5. Προδιαγραφές της υπολογιστικής μονάδας (workstation) του συστήματος μικροσκοπίας και ανάλυσης εικόνας. 691

Appendix Table 6. Τεχνικά στοιχεία του ψηφιακού παλμογράφου. 693

Appendix Table 7. Προδιαγραφές υπολογιστικής μονάδας φυσικοχημικών μετρήσεων. 694

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΟΡΙΣΜΩΝ

Ορισμός 1: Έστω ένας αριθμός $p\in\mathbb{R}$ και $\varepsilon>0$, τότε το ανοικτό διάστημα $(p-\varepsilon,p+\varepsilon)$ θα το λέμε περιοχή του p με κέντρο το p και ακτίνα ε. 140

Ορισμός 2: Έστω δύο μη κοινά σύνολα A, B. Το τυχαίο στοιχείο του A το συμβολίζουμε με x και το τυχαίο στοιχείο του B με y. Έστω ότι κάθε στοιχείο x του A με κάποιο νόμο ή διαδικασία f αντιστοιχεί σε ένα μόνο στοιχείο y του B, τότε το νόμο f το λέμε *συνάρτηση* ή μονοσήμαντη απεικόνιση του A στο B. Για να δηλώσουμε ότι έχουμε μία συνάρτηση, απεικόνιση f του A στο B γράφουμε: έστω η συνάρτηση f του A στο B: $f: A\to B$. Στη συνάρτηση $f: A\to B$, αν το $x\in A$ έχει αντίστοιχο στοιχείο το $y\in B$, γράφουμε $y=f(x)$ και λέμε ότι ο x είναι αρχέτυπο του y και ότι ο y είναι εικόνα το x ή ότι το y είναι η τιμή της συνάρτησης y στο x. 140

Ορισμός 3. Έστω μια απεικόνιση f στο $\mathbb{R}$ και $p\in\mathbb{R}$ τέτοιο ώστε $f(p)=p$ και $\varepsilon>0$, ορίζεται το ανοικτό διάστημα $(p-\varepsilon,p+\varepsilon)$. Αν όλα τα σημεία στο διάστημα $(p-\varepsilon,p+\varepsilon)$ συγκλίνουν στο p, θα ονομάζουμε το p *συγκλίνων σημείο* (*sink*) ή *σταθερό ελκυστή* (*attracting fixed point*). 140

Ορισμός 4. Έστω μια απεικόνιση f στο $\mathbb{R}$. Θα λέμε ότι το σημείο p είναι το σημείο περιόδου της f με περίοδο T, αν $f^k(p)=p$ και το T είναι ο μικρότερος ακέραιος αριθμός. Η τροχιά με αρχικό σημείο p ονομάζεται περιοδική τροχιά T-περιόδου. 141

Ορισμός 5. Έστω f μια απεικόνιση στο $\mathbb{R}$ και p ένα σημείο περιόδου T. Η τροχιά με περίοδο T του p θα ονομάζεται περιοδικό συγκλίνων σημείο (*periodic sink*)αν το p είναι συγκλίνων σημείο για την απεικόνιση f^k. Η τροχιά με περίοδο T του p θα ονομάζεται περιοδικό αποκλίνων σημείο (*periodic source*) αν το p είναι αποκλίνων σημείο για την απεικόνιση f^k. 141

Ορισμός 6. Ως *απόφαση* ορίζουμε την επιλογή ενός εμπλεκόμενου μέρους σε ένα παίγνιο, δεδομένων των νόμων και των συνθηκών του παιγνίου. 145

Ορισμός 7. Ως *ορθολογική απόφαση* ορίζουμε την επιλογή του εμπλεκόμενου μέρους σε ένα παίγνιο δεδομένων των νόμων και των συνθηκών του παιγνίου, το οποίο θα φέρει άριστο αποτέλεσμα για τον εμπλεκόμενο. 145

Ορισμός 8. Ως *ορθολογικό παίκτη* ορίζουμε τον εμπλεκόμενο σε ένα παίγνιο, του οποίου οι αποφάσεις έχουν ως στόχο τη μεγιστοποίηση των οφελών του από το παίγνιο. 145

Ορισμός 9. Ορισμός της συνάρτησης *ένα-προς-ένα (1-1)*: $\underset{ορσ.}{\Leftrightarrow} \forall y\in \mathrm{R}(f)\ \exists\ x\in \mathrm{D}(f): \mathrm{f}(x)=y\}$ 285

Ορισμός 10. Ορισμός της συνάρτησης *ένα-προς-ένα (1-1)* : {θα λέμε ότι η f είναι (1-1)} $\underset{ορσ.}{\Leftrightarrow}$

$\{\forall x_1,x_2\, D(f)\, με\, x_1\neq x_2 \Rightarrow f(x_1)\neq f(x_2)\}$ 285

Ορισμός 11. Ορισμός της συνάρτησης *ένα-προς-ένα (1-1)* : {θα λέμε ότι η f είναι (1-1)}: $\underset{ορσ.}{\Leftrightarrow}$

$\{\forall x_1,x_2\in D(f)\, με\, f(x_1)=f(x_2)\Rightarrow x_1,x_2\, x_1=x_2\}$ 285

Ορισμός 12. Η έννοια της συνάρτησης γενικά: Έστω δύο μη κοινά σύνολα A, B. Το τυχαίο στοιχείο του A το συμβολίζουμε με x και το τυχαίο στοιχείο του B με y. Έστω ότι κάθε στοιχείο x του A με κάποιο νόμο ή διαδικασία f αντιστοιχεί σε ένα μόνο στοιχείο y του B, τότε το νόμο f το λέμε συνάρτηση (ή μονοσήμαντη απεικόνιση) του A στο B. Για να δηλώσουμε ότι έχουμε μία συνάρτηση f του A στο B γράφουμε: έστω η συνάρτηση f του A στο B: f: $A\to B$. Στη συνάρτηση $f: A\to B$, αν το x , έχει αντίστοιχο στοιχείο το $y\in B$ το γράφουμε $y=f(x)$ και λέμε ότι ο x είναι αρχέτυπο του y και ότι ο y είναι εικόνα το x ή ότι το y είναι η τιμή της συνάρτησης y στο x. 285

Ορισμός 13. Πεδίο ορισμού συνάρτησης: Έστω η συνάρτηση y:$A\to B$. Το σύνολο A το λέμε πεδίο ορισμού και το συμβολίζουμε με το $D(f)$. Το B το λέμε σύνολο άφιξης. Το σύνολο των στοιχείων του B που είναι τιμές της f, το λέμε πεδίο τιμών της f και το συμβολίζουμε με $f(A)$ ή με $R(f)$, δηλαδή $\{R(f)=\{y\in B:\exists x\in A\,\mu\varepsilon\, f(x)=y\}$ και ισχύει $R(f)\subseteq B$. Αν συμβαίνει να είναι $R(f)=B$, τότε τη συνάρτηση τη λέμε του A *επί του* B. 286

Ορισμός 14. Γράφημα – Γραφική Παράσταση Συνάρτησης: Έστω η συνάρτηση y το σύνολο των διαταγμένων ζευγών: πρότυπο – εικόνα δηλαδή το σύνολο $\{x,f(x),\ \forall x\in D(f)\}$. Το συμβολίζουμε S_f και το λέμε γράφημα της συνάρτησης f. 286

Ορισμός 15. Πραγματική Συνάρτηση – Πραγματικές Μεταβλητές: Τις συναρτήσεις f: $A\to B$, όπου $A\subseteq R$ και $B\subseteq R$, θα τις λέμε πραγματικές συναρτήσεις πραγματικών μεταβλητών. 286

Ορισμός 16. Μονοτονία συνάρτησης: θα λέω ότι η f είναι γνησίως αύξουσα στο $A\subseteq D(f)$ $\underset{ορσ.}{\Leftrightarrow}$

$\{\forall x_1,x_2\in A\,\mu\varepsilon\, x_1<x_2\Rightarrow f(x_{1)}<f(x_2)\}$ 286

Ορισμός 17. Μονοτονία συνάρτησης: θα λέω ότι η f είναι γνησίως φθίνουσα στο $A\subseteq D(f)$ $\underset{ορσ.}{\Leftrightarrow}$

$\{\forall x_1,x_2\in A\,\mu\varepsilon\, x_1>x_2\Rightarrow f(x_{1)}>f(x_2)\}$. 286

Ορισμός 18. Άρτια Συνάρτηση: θα λέμε ότι η f είναι άρτια $\underset{ορσ.}{\Leftrightarrow}$

$$\left\{\forall x\in D(f)\,\iota\sigma\chi\acute{\upsilon}ουν\ \begin{matrix}\alpha\cdot(-x)\in D(f)\\ \beta\cdot f(-x)=f(x)\end{matrix}\right\}.$$ 286

Ορισμός 19. Περιττή Συνάρτηση: θα λέμε ότι η f είναι περιττή $\underset{ορσ.}{\Leftrightarrow}$

$$\forall x\in D(f)\,\iota\sigma\chi\acute{\upsilon}ουν\ \begin{matrix}\alpha.(-x)\in D(f)\\ \beta.f(-x)=-f(x)\end{matrix}.$$ 287

Ορισμός 20. Περιοδική Συνάρτηση: θα λέμε ότι η f είναι περιοδική $\underset{ορσ.}{\Leftrightarrow}$

$\exists\tau\in R^*:\forall x\in D(f)\,\nu\alpha\,\iota\sigma\chi\acute{\upsilon}ουν:\begin{cases}\alpha\cdot(x+\tau)\in D(f)\\ \beta\cdot f(x+\tau)=f(x)\end{cases}$. Το τ το λέμε περίοδο της f. 287

Ορισμός 21. Σύνθεση Συναρτήσεων: Έστω οι συναρτήσεις $g\wedge f$. Ο τύπος $f(g(x))$ έχει νόημα για τα x εκείνα για τα οποία είναι $x\in D(g)\,\mu\varepsilon\, g(x)\in D(f)$. Αν λοιπόν, το σύνολο $A=\{x\in D(g):g(x)\in D(f)\,\varepsilon\acute{\iota}ναι\,\iota\neq\varnothing$ τότε ο τύπος $f(g(x))$ ορίζει τη συνάρτηση, $\forall x\in A$, που τη συμβολίζουμε $h=f\circ g$ και τη λέμε *Σύνθεση των g και f*. 287

Ορισμός 22. Συνέχεια συνάρτησης σε σημείο: Θα λέμε ότι η f είναι συνεχής στο $x_0\in D(f)$ $\underset{ορσ.}{\Leftrightarrow}$

$$\left\{\lim_{x\to x_0} f(x)=f(x_0)\right\}$$ 287

Ορισμός 23. Συνέχεια συνάρτησης σε όλο το πεδίο ορισμού: Θα λέμε ότι η f είναι συνεχής η f $\underset{ορσ.}{\Leftrightarrow}$ είναι συνεχής σε κάθε σημείο του $D(f)$. 287

Ορισμός 24. Πλευρική συνέχεια: Θα λέμε ότι η *f* είναι συνεχής αριστερά στο $x_0 \in D(f) \underset{ορσ.}{\Leftrightarrow}$

$\left\{\lim_{x\to x_0^-} f(x) = f(x_0)\right\}$ 287

Ορισμός 25. Πλευρική συνέχεια: Θα λέμε ότι η f είναι συνεχής από δεξιά στο $x_0 \in D(f) \underset{ορσ.}{\Leftrightarrow}$

$\left\{\lim_{x\to x_0^+} f(x) = f(x_0)\right\}$ 288

Ορισμός 26. Λόγος Μεταβολής: Έστω μια συνάρτηση *f* και $x_0 \in D(f)$. Θεωρώ μια νέα συνάρτηση με τύπο $\frac{f(x)-f(x_0)}{x-x_0} \forall x \in D(f) - \{x_0\}$. Τη συνάρτηση αυτή την ονομάζουμε *λ(χ)* και τη λέμε λόγο μεταβολής της *f* μεταξύ των x_0 και x ή πηλίκο διαφόρων της *f* στο x_0 δηλαδή $\lambda(x) = \frac{f(x)-f(x_0)}{x-x_0}, x \in D(f) - \{x_0\}$ 288

Ορισμός 27. Παράγωγος: Έστω η *f*, $x_0 \in D(f)$ *Θα λέμε ότι η f είναι παραγωγίσιμη στο x0* $\underset{ορσ.}{\Leftrightarrow}$

$\left\{\exists στο\ \mathbb{R} το \lim_{x\to x_0} \lambda(x)\right\}$. $\lim_{x\to x_0} \lambda(x) = f'(x_0)$ και το λέμε παράγωγο της *f* στο x_0 δηλαδή

$f'(x_0) = \lim_{x\to x_0} \frac{f(x)-f(x_0)}{x-x_0} \in \mathbb{R}$ 288

Ορισμός 28. Συνάρτηση Πρώτης, Δεύτερης κ.λ.π. Νιοστής Παραγώγου: Έστω η *f* ΠΑΡΑΓΩΓΙΣΙΜΗ. Ορίζουμε μία νέα συνάρτηση ως εξής: Κάθε $x_0 \in D(f) \to f'(x_0) = \lim_{x\to x_0} \frac{f(x)-f(x_0)}{x-x_0}$. Τη νέα συνάρτηση την ονομάζουμε συνάρτηση πρώτης παραγώγου *f* και τη συμβολίζουμε *f'(x)* ή $f^{(1)}$ ή $\frac{df(x)}{dx}$. Προφανώς *D(f')=D(f).* Αν η *f* ήταν παραγωγίσιμη σε ένα πεδίο $\Delta \subseteq D(f)$, τότε πάλι ορίζεται η συνάρτηση *f'(x)* αλλά *D(f')=Δ*. Θεωρούμε τώρα τη συνάρτηση *g(x)=f'(x).* Δέχομαι ότι η *g* είναι παραγωγίσιμη, οπότε ορίζω όπως και προηγουμένως τη συνάρτηση *g'(x)*, που τη συμβολίζω *f''(x)* ή $f^{(2)}(x)$ ή $\frac{d^2 f(x)}{d^2 x}$ και τη λέω *συνάρτηση δεύτερης παραγώγου* της *f.* Οπότε, επαγωγικά μπορώ να ορίσω τη συνάρτηση νιοστής παραγώγου της συνάρτησης *f*, που τη συμβολίζουμε $f^{(ν)}(x)$ ή $\frac{d^n f(x)}{d^n x}$. 288

Ορισμός 29. $\alpha_1 + \alpha_2 + \cdots + \alpha_\nu = \sum_{\kappa-1}^{\nu} \alpha_\kappa$ 288

Ορισμός 30. $\sum_{\kappa-1}^{\nu} (\lambda\alpha_\kappa) = \lambda \sum_{\kappa-1}^{\nu} \alpha_\kappa$ 289

Ορισμός 31. $\sum_{\kappa-1}^{\nu}(\alpha_\kappa \pm \beta_\kappa)=\sum_{\kappa-1}^{\nu}\alpha_\kappa \pm \sum_{\kappa-1}^{\nu}\beta_\kappa$ 289

Ορισμός 32. Έστω το διάστημα *[a,β]* και το x_0, x_1, x_2,…,x_n στοιχεία του τέτοια ώστε $\left\{\begin{array}{c}\alpha\cdot x_0 = a\cdot x_\nu = \beta \\ \beta\cdot x_0 < x_1 < x_2 \cdots < x_\nu\end{array}\right\}$, τότε το σύνολο $\delta=\{x_0,x_1,x_2,\ldots x_n\}$ το λέμε μια διαμέριση του *[a,β]*. Ορίζουμε το θετικό αριθμό $x_k - x_{k-1} = \delta x_k \; \forall \kappa = 1,2,...,n$. Το μέγιστο (max) του συνόλου {*δx1, δx2,…,δxn*} το συμβολίζουμε $\varpi(\sigma)$ και το λέμε πλάτος της διαμέρισης. 289

Ορισμός 33. Έστω η *f* συνεχής στο [α, β] και $\delta=\{x_0,x_1,x_2,\ldots x_n\}$ μία διαμέριση του [α, β]: $\left\{\begin{array}{l}Έστω\,\xi_1\,τυχαίο\;του\;[x_0,x_1] \\ Έστω\,\xi_2\,τυχαίο\;του\;[x_1,x_2] \\ Έστω\,\xi_\nu\,τυχαίο\;του\;[x_{\nu-1},x_\nu]\end{array}\right\}$, ... 289

Ορισμός 34. $\int_{\alpha}^{\beta} = \int_{\alpha}^{\gamma_1} + \int_{\gamma_1}^{\gamma_2} + \int_{\gamma_2}^{\gamma_3} + \cdots + \int_{\gamma_\kappa}^{\beta}$, όπου $\gamma_1,\gamma_2,\ldots,\gamma_\varkappa \in [\alpha,\beta]$ τυχαίοι. 289

Ορισμός 35. $\int_{\alpha}^{\beta} F'(x)\,g(x)dx = [F(x)]_{\alpha}^{\beta} - \int_{\alpha}^{\beta} F(x)\,g(x)dx$. Η *F(x)* λέγεται *παράγουσα συνάρτηση της f(x).* 290

Ορισμός 36. Εμβαδό: Έστω η *f* συνεχής στο [α, β] με $f(x) \geq 0, \forall x \in [a,\beta]$. Αν E είναι το εμβαδό που περικλείεται από το γράφημα της *f*, του *xx'* και τις ευθείες με εξισώσεις $x=a$ και $x=\beta$, τότε αποδεικνύεται ότι $\mathrm{E} = \int_{\alpha}^{\beta} f(x)\,dx$. 290

Ορισμός 37. Έστω μια απεικόνιση $V : \mathbb{R}^n \to \mathbb{R}$, συνεχής και παραγωγίσιμη στο $\mathbb{R}$, θα λέμε ότι η απεικόνιση V είναι μια συνάρτηση *Lyapunov* όταν $\mathrm{V}(0)=0$ και $\mathrm{V}(\mathrm{x}) > 0, \forall x \in U$, όπου U είναι μια περιοχή στο $\mathbb{R}$, όπου $\exists \varepsilon : N_\varepsilon(p) = \{x \in \mathbb{R} : |x-p| < \varepsilon\}$ 292

Ορισμός 38. Έστω *f* μια συνεχής συνάρτηση στο $\mathbb{R}$. Ο αριθμός *Lyapunov L(x1)* για το γράφημα $\{x_1,x_2,\ldots,x_n\}$ ορίζεται ως $L(x_1) = \lim_{n\to\infty}\left(|f'(x_1)|\ldots|f'(x_n)|\right)^{\frac{1}{n}}$, αν υπάρχει το όριο αυτό. Κατά συνέπεια ο εκθέτης *Lyapunov* ορίζεται ως $h(x_1) = \lim_{n\to\infty}\frac{1}{n}\left(\ln|f'(x_1)| + \ldots + \ln|f'(x_n)|\right)$ 292

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΩΝ

$\frac{dx}{dt} = \sigma(y - x)$

$\frac{dy}{dt} = x(\rho - z) - y$, Εξίσωση 1. Σύστημα εξισώσεων των ατμοσφαιρικών ροών του Lorenz. 130

$\frac{dz}{dt} = xy - \beta z$

$\dot{y} = ky$, Εξίσωση 2. Βασική συνάρτηση πολλαπλασιασμού. 131

$y(t) = y(0)e^{kt}$, Εξίσωση 3. Επίλυση της Εξίσωσης 2. 132

$\dot{y} = k\left(1 - \frac{y}{\mu}\right)y$, Εξίσωση 4. Η σιγμοειδής συνάρτηση (*logistic equation*) 132

$\frac{dy}{dt} = x(\alpha - \beta y)$

$\frac{dy}{dt} = -y(\gamma - \delta x)$, Εξίσωση 5. Σύστημα εξισώσεων Predator-Prey των Lotka-Volterra. 132

$f(x)=kx(1-x)$, **Εξίσωση 6.** Απλοποιημένη μορφή της σιγμοειδούς συνάρτησης. 137

$R_3 : R_3 = R_1 \cap R_2, \forall x_1, x_2 : f(x_1) = g(x_2)$, Εξίσωση 7. Πεδίο ορισμού των λύσεων των f και g. .. 139

$\dot{x} = x(zf_C - d)$

$\dot{y} = y(zf_D - d)$

$\dot{z} = -\dot{x} - \dot{y} = (x + y)d - z(xf_C + yf_D)$, Εξίσωση 8. Συνάρτηση των *Hauert και συνεργάτες* (2006). 147

$\varepsilon_r(\omega) = \frac{\varepsilon(\omega)}{\varepsilon_0}$, Εξίσωση 9. Γενική συνάρτηση της διηλεκτρικής σταθεράς. 186

$\varepsilon_r = \frac{C_x}{C_0}$, Εξίσωση 10. Εξίσωση μέτρησης της διηλεκτρικής σταθεράς. 186

$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty)}{(1 + i\omega t)}$, Εξίσωση 11. Εξίσωση διηλεκτρικής του *Debye*. 187

$\tau = \frac{\chi}{2kT}$, Εξίσωση 12. Στροφορμή ηλεκτρικού διπόλου. 187

$\chi = 8\pi\xi\alpha$, Εξίσωση 13. Στροφορμή ομογενούς σφαίρας σε ρευστό Ι. 188

$\tau = \frac{4\pi\theta a^3}{kT}$, Εξίσωση 14. Στροφορμή ομογενούς σφαίρας σε ρευστό ΙΙ. 188

$\varepsilon' = \varepsilon'_s + \delta C$, Εξίσωση 15. Διηλεκτρική σταθερά διαλύματος αμινοξέων. 188

$\tau = \frac{\pi \varepsilon_{se} L^2}{2uzq^2}$, Εξίσωση 16. Στροφορμή ηλεκτρικού διπόλου μορίου DNA, μήκους L, διηλεκτρικής σταθεράς του περιβάλλοντος διαλύματος ε_{se}, αποτελούμενο από z ιόντα και φορτίο q. 190

$F_{H_2O} = \frac{1}{4\pi\varepsilon_{H_2O}\varepsilon_0}\frac{Q_1 Q_2}{r^2}$, Εξίσωση 17. Δυνάμεις *Coulomb*..... 190

$K_{total,a,b} = K_1 K_2 \cdot ... \cdot K_n$, Εξίσωση 18. Σταθερά διάστασης σε πολύ-όξινα οξέα ή πολύ-βασικές βάσεις. 193

$K_{sp}=C_{Ag+}\ C_{Cl}$, Εξίσωση 19. Το γινόμενο διαλυτότητας. 194

$K_{sp}=C^{X}_{A+\Psi}C^{\Psi}_{B-X}$, Εξίσωση 20. Γενική εξίσωση γινομένου διαλυτότητας. 194

$\varepsilon'=\varepsilon'_f \delta C$, Εξίσωση 21. Διηλεκτρική διαλύματος ηλεκτρολυτών. 196

$C_1V_1 = C_2V_2$, **Εξίσωση 22**. 251

$\lambda = \frac{(A_{260} - A_{260,blank})}{A_{280}}$, Εξίσωση 23..... 263

$C_{RNA} = \frac{(A_{260} - A_{260,blank})}{\varepsilon l}$, Εξίσωση 24..... 263

$C_{RNA} = \frac{(A_{260} - A_{260,blank})}{\varepsilon l} \cdot dilution_factor$, Εξίσωση 25..... 264

$y = a_n x^n + a_{n-1}x^{n-1} + ... + a_1 x + a_0$, Εξίσωση 26..... 290

$y = a_3 x^3 + a_2 x^2 + a_1 x + a_0$, Εξίσωση 27..... 290

$p(t) = p_0 e^{rt}$, Εξίσωση 28..... 291

$f(x_{n+1})=kx_n(1-x_n)$, Εξίσωση 29..... 291

$\dot{x} = kx_n(1-x_n)$, Εξίσωση 30..... 291

$\vec{v}_{n+1} = A\vec{v}_n$, Εξίσωση 31..... 293

$\frac{dN_j(t)}{dt} = N_j(t)p_{jk}$, Εξίσωση 32..... 297

$\|\alpha - \beta\|_2 = \sqrt{\sum_i (\alpha_i - \beta_i)^2}$, Εξίσωση 33..... 298

$r = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}\sqrt{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \bar{y})^2}}$, Εξίσωση 34. 298

$\arg_s \min \sum_{i=1}^{k} \sum_{x_j \in S_i} \left\| x_j - \mu_i \right\|^2$, Εξίσωση 35. 298

$\| \ c_1^{\,2} \ \| = (G_2 - G_1)^2 + (R_1 - R_2)^2$
$\| \ c_2^{\,2} \ \| = (R_3 - R_2)^2 + (G_3 - G_2)^2$, Εξίσωση 36 300
$\| \ c_3^{\,2} \ \| = (G_3 - G_1)^2 + (R_3 - R_1)^2$

$c_1^2 = v_1^2 + v_2^2 - 2 \| \ v_1 \ \| \| \ v_2 \ \| \cos \omega_1$
$c_2^2 = v_2^2 + v_3^2 - 2 \| \ v_2 \ \| \| \ v_3 \ \| \cos(\omega_2 + \omega_1)$, Εξίσωση 37 300
$c_3^2 = v_1^2 + v_3^2 - 2 \| \ v_1 \ \| \| \ v_3 \ \| \cos \omega_2$

$\omega_1 = |\theta_2 - \theta_1|$
$\omega_2 = |\theta_1 - \theta_3|$, Εξίσωση 38 300
$\omega_1 + \omega_2 = |\theta_2 - \theta_3|$

$R_2 = G_1$
$R_3 = G_2$, Εξίσωση 39 300
$R_1 = G_3$

$V_1\left(\frac{x_{1,i,1} + x_{2,i,1} + x_{3,i,1}}{3}, \frac{y_{1,i,1} + y_{2,i,1} + y_{3,i,1}}{3} \right) = V_1(R_1, G_1)$
$V_2\left(\frac{x_{1,i,2} + x_{2,i,2} + x_{3,i,2}}{3}, \frac{y_{1,i,2} + y_{2,i,2} + y_{3,i,2}}{3} \right) = V_2(R_2, G_2)$, Εξίσωση 40 301
$V_3\left(\frac{x_{1,i,3} + x_{2,i,3} + x_{3,i,3}}{3}, \frac{y_{1,i,3} + y_{2,i,3} + y_{3,i,3}}{3} \right) = V_3(R_3, G_3)$

$\| \ c_n^2 \ \| = (G_{n+1} - G_n)^2 + (R_n - R_{n+1})^2$, Εξίσωση 41 301

$c_n^2 = v_n^2 + v_{n+1}^2 - 2 \| \ v_n \ \| \| \ v_{n+1} \ \| \cos(\omega_n)$
$c_{n+1}^2 = v_{n+1}^2 + v_{n+2}^2 - 2 \| \ v_{n+1} \ \| \| \ v_{n+2} \ \| \cos(\omega_n + \omega_{n+1})$, Εξίσωση 42 301
$c_{n+2}^2 = v_n^2 + v_{n+2}^2 - 2 \| \ v_n \ \| \| \ v_{n+2} \ \| \cos(\omega_{n+1})$

$R_i = G_{i-1}$ για $i=1,...,n$ και $R_1 = G_n$, Εξίσωση 43 301

$c_n^2 = v_n^2 + v_{n+1}^2 - 2 v_n v_{n+1} \cos(\omega_n)$
$c_{n+1}^2 = v_{n+1}^2 + v_{n+2}^2 - 2 v_{n+1} v_{n+2} \cos(\omega_n + \omega_{n+1})$, Εξίσωση 44 301
$c_{n+2}^2 = v_n^2 + v_{n+2}^2 - 2 v_n v_{n+2} \cos(\omega_{n+1})$

$I = \frac{V}{R}$, Εξίσωση 45 303

$I = \frac{dQ}{dt}$, Εξίσωση 46 303

$Z = |Z| e^{j\vartheta}$, Εξίσωση 47 303

$V = IZ = I|Z|e^{j\vartheta}$, Εξίσωση 48 303

$\varepsilon_r = \frac{C_x}{C_0}$, Εξίσωση 49 303

$C = \frac{Q}{V}$, Εξίσωση 50 303

$X_k = \sum_{n=0}^{N-1} x_n e^{-i 2\pi k \frac{n}{N}}, k = 0, \ldots N-1$, Εξίσωση 51 303

Υπολογισμός της μέσης τιμής: $\bar{x} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} x_i$ Εξίσωση 52. 304

Υπολογισμός σταθεράς απόκλισης (standard deviation): $\sigma = \sqrt{\int_x (x-\mu)^2 p(x) dx}$ Εξίσωση 53..... 304

$t = \frac{\overline{x} - \mu_0}{s/\sqrt{n}}, (A)$

$t = \frac{\overline{x}_1 - \overline{x}_2}{S_{x_1 x_2}\sqrt{\frac{2}{n}}}, (B)$ Εξίσωση 54. 304

$Z = \frac{M - \mu}{\sigma}$, Εξίσωση 55. 304

$P_t \circ K = P_{t+1}$, Εξίσωση 56 356

$(P_t \circ P_{t+1})_{i,j} = (P_t)_{i,j} \cdot (P_{t+1})_{i,j}$, Εξίσωση 57 356

$\nabla F = \frac{\partial F}{\partial x}\hat{i} + \frac{\partial F}{\partial y}\hat{j}$, Εξίσωση 58 357

$\nabla^2 F = \frac{\partial^2 F}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 F}{\partial y^2}$, Εξίσωση 59 357

$f(x) = \sum_{i=1}^{n} a_i \sin(b_i x + c_i)$, Εξίσωση 60 357

$N_{G_{1,t+1}} = N_{G_{1,t}} \cdot k_1 + N_{G_{2,t}} \cdot k_8$

$N_{S_{t+1}} = N_{S_t} \cdot k_4 + N_{G_{1,t}} \cdot k_2$

$N_{G_{2,t+1}} = N_{G_{2,t}} \cdot k_7 + N_{S_t} \cdot k_5$, Εξίσωση 61 436

$N_{CD_{t+1}} = N_{CD_t} + N_{G_{1,t}} \cdot k_3 + N_{G_{2,t}} \cdot k_9 + N_{S_t} \cdot k_6$

$N_{p_x,t+1} = N_{p_y,t} k_y + N_{p_z,t} k_z$, Εξίσωση 62 436

$f(x,y) = a_0 + a_1 \cos(xy) + a_2 \sin(xy)$, Εξίσωση 63 437

$k_1 = a_{0,1} + a_{1,1}\cos(N_{G_{1,t}} \cdot N_{G_{1,t+1}}) + a_{2,1}\sin(N_{G_{1,t}} \cdot N_{G_{1,t+1}})$

$k_2 = a_{0,2} + a_{1,2}\cos(N_{G_{1,t}} \cdot N_{S_{t+1}}) + a_{2,2}\sin(N_{G_{1,t}} \cdot N_{S_{t+1}})$

$k_3 = a_{0,3} + a_{1,3}\cos(N_{G_{1,t}} \cdot N_{CD_{t+1}}) + a_{2,3}\sin(N_{G_{1,t}} \cdot N_{CD_{t+1}})$

$k_4 = a_{0,4} + a_{1,4}\cos(N_{S_t} \cdot N_{S_{t+1}}) + a_{2,4}\sin(N_{S_t} \cdot N_{S_{t+1}})$

$k_5 = a_{0,5} + a_{1,5}\cos(N_{S_t} \cdot N_{G_{2,t+1}}) + a_{2,5}\sin(N_{S_t} \cdot N_{G_{2,t+1}})$

$k_6 = a_{0,6} + a_{1,6}\cos(N_{S_t} \cdot N_{CD_{t+1}}) + a_{2,6}\sin(N_{S_t} \cdot N_{CD_{t+1}})$

$k_7 = a_{0,7} + a_{1,7}\cos(N_{G_{2,t}} \cdot N_{G_{2,t+1}}) + a_{2,7}\sin(N_{G_{2,t}} \cdot N_{G_{2,t+1}})$

$k_8 = a_{0,8} + a_{1,8}\cos(N_{G_{2,t}} \cdot N_{G_{1,t+1}}) + a_{2,8}\sin(N_{G_{2,t}} \cdot N_{G_{1,t+1}})$

$k_9 = a_{0,9} + a_{1,9}\cos(N_{G_{2,t}} \cdot N_{CD_{t+1}}) + a_{2,6}\sin(N_{G_{2,t}} \cdot N_{CD_{t+1}})$

$k_{10} = 1$

, Εξίσωση 64 437

$k = a_0 + a_1\cos(N_{p_{y,z},t} N_{p_x,t+1}) + a_2\sin(N_{p_{y,z},t} N_{p_x,t+1})$, Εξίσωση 65 437

$$N_{p_{x,t+1}} = N_{p_{y,t}}\left[a_0 + a_1\cos\left(N_{p_{y,t}} N_{p_{x,t+1}}\right) + a_2\sin\left(N_{p_{y,t}} N_{p_{x,t+1}}\right)\right] + N_{p_{y,t}}\left[a_0 + a_1\cos\left(N_{p_{z,t}} N_{p_{x,t+1}}\right) + a_2\sin\left(N_{p_{z,t}} N_{p_{x,t+1}}\right)\right]$$

, Εξίσωση 66 437

$$\varepsilon_r = \frac{1}{\frac{0.0885\pi r^2}{Cd} + \frac{0.0885r}{C}\left(\ln\left(\frac{16\pi r}{d}\right) - 1\right)}$$, Εξίσωση 67. 507

$P=\varrho g h$, Εξίσωση 68 573

$N_{t+1}=N_t p_{j,k}=N_t k$, Εξίσωση 69 578

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

$R\text{-}C_x(H)(NH_3^+)\text{-}COO^-$, Χημική Ένωση 1. Γενικός τύπος αμινοξέων. 188

Χημική Ένωση 2. $(C_5H_4N_4)$Γενικός τύπος των πουρινών. 189

Χημική Ένωση 3. $(C_4H_4N_2)$ Γενικός τύπος των πυριμιδινών. 189

Χημική Ένωση 4. Ενδεικτική δομή της σύνδεσης αδενίνης, θυμίνης, γουανίνης και κυτοσίνης. Παρουσιάζεται μια μικρή αλυσίδα νουκλεοτιδίων, με σειρά ATGC. 189

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

$HCl+H_2O \rightarrow H_3O^+ + Cl^-$, Χημική Αντίδραση 1. Σχηματισμός μορίου οξωνίου σε διάλυμα οξέως. 191

$HCl \rightarrow H^+ + Cl^-$, Χημική Αντίδραση 2. 191

$NH_3 + HOH \leftrightarrow NH_4^+ + OH^-$, Χημική Αντίδραση 3. Αμμωνία, η μοναδική ασθενής βάση. 191

$HCN+H_2O \leftrightarrow H_3O^+ + CN^-$, Χημική Αντίδραση 4. 191

$H_2S+H_2O \leftrightarrow H_3O^+ + HS^-$, Χημική Αντίδραση 5. 1^o στάδιο διάστασης πολυόξινου οξέος. 193

$HS+H_2O \leftrightarrow H_3O^+ + S^{-2}$, Χημική Αντίδραση 6. 2^o στάδιο διάστασης πολυόξινου οξέος. 193

$AgCl(s) \leftrightarrow Ag^+ + Cl^-$, Χημική Αντίδραση 7. Διάσταση Χλωριούχου Αργύρου. 194

$A_X^{+\Psi} B_\Psi^{-X} \leftrightarrow XA^{+\Psi} + \Psi B^{-X}$, Χημική Αντίδραση 8. Γενική αντίδραση διάστασης. 194

$[A^+(H_2O)^0\lambda]^+ \leftrightarrow [A^+(H_2O)^0(\lambda-1)OH^-]^0$, Χημική Αντίδραση 9. Δυναμική ισορροπία υδρολυημένων ιόντων. 195

$[A^+(H_2O)^0\lambda]^+ \leftrightarrow [A^+(H_2O)^0(\lambda-1)OH^-]^0 + H^+$, Χημική Αντίδραση 10. Αντίδραση υδρόλυσης κατιόντων. 195

$[B^-(H_2O)^0\mu]^+ \leftrightarrow [B^-(H_2O)^0(\mu-1)OH^-]^0 + OH^-$, Χημική Αντίδραση 11. Αντίδραση υδρόλυσης ανιόντων. 195

Χημική Αντίδραση 12. Η αναγωγή του MTT, που είναι άλας της χημικής ομάδας *tetrazolium*, σε *formazan*. 227

Χημική Αντίδραση 13. Η αναγωγή της Resazurin σε Resorufin. 228

$RH_2 + NAD^+ \rightarrow NADH + H^+ + R$, Χημική Αντίδραση 14. 244

NAD^++ lactate → (catalyzed by lactate dehydrogenase) NADH+pyruvate, Χημική Αντίδραση 15. 244

NADH + resazurin → (catalyzed by diaphorase) NAD^+ + resorufin, Χημική Αντίδραση 16. 244

NAD^++ lactate↔(catalyzed by LDH) NADH+pyruvate+ resazurin→ (catalyzed by diaphorase) NAD^+ + resorufin, Χημική Αντίδραση 17. 244

$C_6H_{12}O_6+6O_2 \rightarrow 6CO_2+6H_2O+38ATP$, Χημική Αντίδραση 18. 244

$Glucose+2NAD^+ + 2P_i + 2ADP \rightarrow 2pyruvate+2NADH+2ATP+2H^+ + 2H_2O$, Χημική Αντίδραση 19. 244

pyruvic acid→acetic acid+CO_2+ $NADH^+$, Χημική Αντίδραση 20. 245

acetic acid +co-enzyme A→acetylCoA, Χημική Αντίδραση 21. 245

Pyruvic acid+NAD^++ coenzyme A + H_2O→acetyl coenzyme A +NADH+ H^++CO_2+2ATP, Χημική Αντίδραση 22. 245

$C_6H_{12}O_6 + 2\ ADP + 2\ P_i + 2\ NAD^+ \rightarrow 2\ CH_3COCOO^- + 2\ ATP + 2\ NADH + 2\ H_2O + 2H^+$, Χημική Αντίδραση 23. 246

ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΙ-ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ-ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ

$\forall$	(μαθηματικός συμβολισμός) ***Για Κάθε***	$\pm\infty$	(μαθηματικός συμβολισμός) ***Το συν/πλην Άπειρο***
$\in$	(μαθηματικός συμβολισμός) ***Ανήκει***	$\prod$	(μαθηματικός συμβολισμός) ***Γινόμενο***
$\subset$	(μαθηματικός συμβολισμός) ***Γνήσιο Υποσύνολο***	$\lvert X\rvert$	(μαθηματικός συμβολισμός) ***Απόλυτη Τιμή***
$\subseteq$	(μαθηματικός συμβολισμός) ***Υποσύνολο ή Ίσο***	$\widehat{\omega}$	(μαθηματικός συμβολισμός) ***Γωνία ω***
$\exists$	(μαθηματικός συμβολισμός) ***Υπάρχει***	$\vec{a}$	(μαθηματικός συμβολισμός) ***Διάνυσμα***
$\wedge$	(μαθηματικός συμβολισμός) ***Και***	$\overline{x}$	(μαθηματικός συμβολισμός) ***Ακέραιο μέρος πραγματικού αριθμού***
$\vee$	(μαθηματικός συμβολισμός) ***ή***	$\frac{dy}{dx}$	(μαθηματικός συμβολισμός) ***Πρώτη παράγωγος***
$\varnothing$	(μαθηματικός συμβολισμός) ***Το κενό***	$\begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} \end{pmatrix}$	(μαθηματικός συμβολισμός) ***Ορίζουσα 2×2***
$\mathbb{R}$	(μαθηματικός συμβολισμός) ***Το Σύνολο των Πραγματικών Αριθμών***	$\begin{pmatrix} a_{11} & \cdots & a_{1n} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ a_{m1} & \cdots & a_{mn} \end{pmatrix}$	(μαθηματικός συμβολισμός) ***Πίνακας m×n***
$\mathbb{Z}$	(μαθηματικός	$\cup$	(μαθηματικός

	συμβολισμός) ***Το Σύνολο των Ακέραιων Αριθμών***
$\mathbb{C}$	(μαθηματικός συμβολισμός) ***Το Σύνολο των Μιγαδικών Αριθμών***
$\mathbb{N}$	(μαθηματικός συμβολισμός) ***Το Σύνολο των Φυσικών Αριθμών***
$\mathbb{Q}$	(μαθηματικός συμβολισμός) ***Το Σύνολο των Ρητών Αριθμών***
$\mathbb{R}^*,\mathbb{Z}^*,\mathbb{C}^*,\mathbb{Q}^*,\mathbb{N}^*$	(μαθηματικός συμβολισμός) ***Τα σύνολα αριθμών χωρίς το 0***
∞	(μαθηματικός συμβολισμός) ***Το Άπειρο***
	συμβολισμός) ***Ένωση Συνόλων***
$\cap$	(μαθηματικός συμβολισμός) ***Τομή Συνόλων***
$x \mid y$	(μαθηματικός συμβολισμός) ***Εσωτερικό Γινόμενο ισοδύναμο με x×y***
π	(μαθηματικός συμβολισμός) ***ο αριθμός 3.14***
π ***(τριγωνομετρία)***	(μαθηματικός συμβολισμός) ***ημικύκλιο (180ο)***
$\sum$	(μαθηματικός συμβολισμός) ***Άθροισμα***
Μ.τ.σ.	Μετάφραση του Συντάκτη
ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
ΟΛΛ	Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία

ΔΙΑΦΟΡΙΚΩΣ ΕΚΦΡΑΖΟΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ

ΑΛΦΑΒΗΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΔΙΑΦΟΡΙΚΩΣ ΕΚΦΡΑΖΟΜΕΝΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

ΣΥΜΒΟΛΟ	ALIAS	ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ
EDIL3	AF143888	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3
NSUN3	AK025762	NOP2/Sun domain family, member 3
BTBD3	RP4-742J24.3, dJ742J24.1	BTB (POZ) domain containing 3
KCTD3	RP11-5F19.1, NY-REN-45	potassium channel tetramerisation domain containing 3
CYP39A1	hCYP39A1	cytochrome P450, family 39, subfamily A, polypeptide 1
DDX4	NM_016130, PRPF5, Prp5	Homo sapiens DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 46 (DDX46), mRNA
NPFF	FMRFAL	neuropeptide FF-amide peptide precursor
UBFD1	UBPH	ubiquitin family domain containing 1
IFNG	IFNG	interferon, gamma
POMP	POMP	proteasome maturation protein
PSMA2	PSMA2	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 2
PSME4	PSME4	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 4
LAMP2	LAMP2	lysosomal-associated membrane protein 2
SCARB2	SCARB2	scavenger receptor class B, member 2
AP1M2	AP1M2	adaptor-related protein complex 1, mu 2 subunit
AP3S1	AP3S1	adaptor-related protein complex 3, sigma 1 subunit
CTSO	CTSO	cathepsin O
CTSH	CTSH	cathepsin H
NAGA	NAGA	N-acetylgalactosaminidase, alpha-
DNAJC6	DNAJC6	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 6
CPA6	CPA6	carboxypeptidase A6
PNMA1	PNMA1	paraneoplastic Ma antigen 1
KDM4A	KDM4A	lysine (K)-specific demethylase 4A
HYAL3	HYAL3	hyaluronoglucosaminidase 3
IRF4	IRF4	interferon regulatory factor 4
ZNF727	ZNF727	zinc finger protein 727
IFT74	IFT74	intraflagellar transport 74 homolog (Chlamydomonas)
GSG1L	GSG1L	GSG1-like
ACSS3	ACSS3	acyl-CoA synthetase short-chain family member 3
CARHSP1	CARHSP1	calcium regulated heat stable protein 1,

		24kDa
ARHGAP20	ARHGAP20	Rho GTPase activating protein 20
GRAP2	GRAP2	GRB2-related adaptor protein 2
GNL3	GNL3	guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)
ZNF554	ZNF554	zinc finger protein 554
NBAS	NBAS	neuroblastoma amplified sequence
HDDC2	HDDC2	HD domain containing 2
SLC25A25	SLC25A25	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 25
TNIK	TNIK	TRAF2 and NCK interacting kinase
EMCN	EMCN	endomucin
DUSP12	DUSP12	dual specificity phosphatase 12
ABCB7	ABCB7	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 7
COX7A2L	COX7A2L	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 like
CNPY2	CNPY2	canopy 2 homolog (zebrafish)
PMPCA	PMPCA	peptidase (mitochondrial processing) alpha
ZBTB42	ZBTB42	zinc finger and BTB domain containing 42
DIAPH3	DIAPH3	diaphanous homolog 3 (Drosophila)
ARV1	ARV1	ARV1 homolog (S. cerevisiae)
CMTM8	CMTM8	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 8
NRN1L	NRN1L	neuritin 1-like
MACF1	MACF1	microtubule-actin crosslinking factor 1
SEC24D	SEC24D	SEC24 family, member D (S. cerevisiae)
UHRF1BP1	UHRF1BP1	UHRF1 binding protein 1
AMPH	AMPH	amphiphysin
G3BP1	G3BP1	GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 1
MPZL2	MPZL2	myelin protein zero-like 2
RGS5	RGS5	regulator of G-protein signaling 5
CHRNE	CHRNE	cholinergic receptor, nicotinic, epsilon (muscle)
GP1BA	GP1BA	glycoprotein Ib (platelet), alpha polypeptide
NUFIP2	NUFIP2	nuclear fragile X mental retardation protein interacting protein 2
DDB1	DDB1	damage-specific DNA binding protein 1, 127kDa
MAST2	MAST2	microtubule associated serine/threonine kinase 2
ZNF84	ZNF84	zinc finger protein 84
AGFG1	AGFG1	ArfGAP with FG repeats 1
KIAA0240	KIAA0240	KIAA0240
DAZAP1	DAZAP1	DAZ associated protein 1

KPNA4	KPNA4	karyopherin alpha 4 (importin alpha 3)
PDGFRL	PDGFRL	platelet-derived growth factor receptor-like
EEF2	EEF2	eukaryotic translation elongation factor 2
ZDHHC11	ZDHHC11	zinc finger, DHHC-type containing 11
RFWD3	RFWD3	ring finger and WD repeat domain 3
KRT82	KRT82	keratin 82
PEBP4	PEBP4	phosphatidylethanolamine-binding protein 4
SIAH2	SIAH2	siah E3 ubiquitin protein ligase 2
NUP98	NUP98	nucleoporin 98kDa
GPR107	GPR107	G protein-coupled receptor 107
FBXO34	FBXO34	F-box protein 34
RFX5	RFX5	regulatory factor X, 5 (influences HLA class II expression)
KIF26A	KIF26A	kinesin family member 26A
B3GALT4	B3GALT4	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 4
RHOXF1	RHOXF1	Rhox homeobox family, member 1
ANKRD16	ANKRD16	ankyrin repeat domain 16
LOC100287166	LOC100287166	uncharacterized LOC100287166
LOC646719	LOC646719	uncharacterized LOC646719
FAT4	FAT4	FAT tumor suppressor homolog 4 (Drosophila)
AP1G1	AP1G1	adaptor-related protein complex 1, gamma 1 subunit
FLJ33630	FLJ33630	uncharacterized LOC644873
SMAD2	SMAD2	SMAD family member 2
KLF11	KLF11	Kruppel-like factor 11
CBFB	CBFB	core-binding factor, beta subunit
LOC100422737	LOC100422737	uncharacterized LOC100422737
STK16	STK16	serine/threonine kinase 16
XK	XK	X-linked Kx blood group (McLeod syndrome)
AQP9	AQP9	aquaporin 9
MFSD7	MFSD7	major facilitator superfamily domain containing 7
MREG	MREG	melanoregulin
CHRM5	CHRM5	cholinergic receptor, muscarinic 5
RCCD1	RCCD1	RCC1 domain containing 1
FXYD6	FXYD6	FXYD domain containing ion transport regulator 6
YPEL4	YPEL4	yippee-like 4 (Drosophila)
TRAF6	TRAF6	TNF receptor-associated factor 6, E3 ubiquitin protein ligase
CCR6	CCR6	chemokine (C-C motif) receptor 6
EZH1	EZH1	enhancer of zeste homolog 1 (Drosophila)
ATP2C2	ATP2C2	ATPase, Ca++ transporting, type 2C,

		member 2
ZDHHC8	ZDHHC8	zinc finger, DHHC-type containing 8
CD1D	CD1D	CD1d molecule
TMEM174	TMEM174	transmembrane protein 174
KRT27	KRT27	keratin 27
PIKFYVE	PIKFYVE	phosphoinositide kinase, FYVE finger containing
ACTL6B	ACTL6B	actin-like 6B
ACADM	ACADM	acyl-CoA dehydrogenase, C-4 to C-12 straight chain
PHC1	PHC1	polyhomeotic homolog 1 (Drosophila)
FMR1	FMR1	fragile X mental retardation 1
TMSB15A	TMSB15A	thymosin beta 15a
DUSP3	DUSP3	dual specificity phosphatase 3
ANKMY1	ANKMY1	ankyrin repeat and MYND domain containing 1
LOC201651	LOC201651	arylacetamide deacetylase (esterase) pseudogene
C11orf52	C11orf52	chromosome 11 open reading frame 52
HNRPDL	HNRPDL	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like
SMPD4	SMPD4	sphingomyelin phosphodiesterase 4, neutral membrane (neutral sphingomyelinase-3)
SLC39A14	SLC39A14	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 14
CCNL1	CCNL1	cyclin L1
CDK15	CDK15	cyclin-dependent kinase 15
ST7L	ST7L	suppression of tumorigenicity 7 like
GLYATL1P2	GLYATL1P2	glycine-N-acyltransferase-like 1 pseudogene 2
ABL2	ABL2	v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 2
ASCC3	ASCC3	activating signal cointegrator 1 complex subunit 3
ZNF454	ZNF454	zinc finger protein 454
OCM2	OCM2	oncomodulin 2
BAHCC1	BAHCC1	BAH domain and coiled-coil containing 1
CAND1	CAND1	cullin-associated and neddylation-dissociated 1
SP110	SP110	SP110 nuclear body protein
PFKFB2	PFKFB2	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2
RNF141	RNF141	ring finger protein 141
PXMP4	PXMP4	peroxisomal membrane protein 4, 24kDa
FAM46B	FAM46B	family with sequence similarity 46, member B
LOC100129917	LOC100129917	uncharacterized LOC100129917
RFWD2	RFWD2	ring finger and WD repeat domain 2, E3

		ubiquitin protein ligase
SLC36A1	SLC36A1	solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member 1
SLC24A6	SLC24A6	solute carrier family 24 (sodium/lithium/calcium exchanger), member 6
RNFT1	RNFT1	ring finger protein, transmembrane 1
HIVEP2	HIVEP2	human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 2
DENR	DENR	density-regulated protein
CHRNA1	CHRNA1	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 1 (muscle)
DPM1	DPM1	dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 1, catalytic subunit
MSH4	MSH4	mutS homolog 4 (E. coli)
TLE3	TLE3	transducin-like enhancer of split 3 (E(sp1) homolog, Drosophila)
SP6	SP6	Sp6 transcription factor
LRRC8C	LRRC8C	leucine rich repeat containing 8 family, member C
HMGB4	HMGB4	high mobility group box 4
GTPBP1	GTPBP1	GTP binding protein 1
OGDH	OGDH	oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide)
MLLT6	MLLT6	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 6
GSS	GSS	glutathione synthetase
DSCAM	DSCAM	Down syndrome cell adhesion molecule
SLC18A3	SLC18A3	solute carrier family 18 (vesicular acetylcholine), member 3
P2RY6	P2RY6	pyrimidinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 6
RNF208	RNF208	ring finger protein 208
RIN3	RIN3	Ras and Rab interactor 3
ELAVL4	ELAVL4	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 4
SMAD3	SMAD3	SMAD family member 3
SLC6A1	SLC6A1	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 1
LOC613266	LOC613266	uncharacterized LOC613266
CFI	CFI	complement factor I
SCGB1C1	SCGB1C1	secretoglobin, family 1C, member 1
C20orf85	C20orf85	chromosome 20 open reading frame 85
PCF11	PCF11	PCF11, cleavage and polyadenylation factor subunit, homolog (S. cerevisiae)

SERTAD4	SERTAD4	SERTA domain containing 4
KRTAP4-3	KRTAP4-3	keratin associated protein 4-3
MPP7	MPP7	membrane protein, palmitoylated 7 (MAGUK p55 subfamily member 7)
FMO3	FMO3	flavin containing monooxygenase 3
C6orf108	C6orf108	chromosome 6 open reading frame 108
RAPGEF6	RAPGEF6	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6
AK4	AK4	adenylate kinase 4
SDF4	SDF4	stromal cell derived factor 4
ETFDH	ETFDH	electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase
TDRD3	TDRD3	tudor domain containing 3
CALHM1	CALHM1	calcium homeostasis modulator 1
ZC3H7A	ZC3H7A	zinc finger CCCH-type containing 7A
KCNC1	KCNC1	potassium voltage-gated channel, Shaw-related subfamily, member 1
KIF12	KIF12	kinesin family member 12
NBEA	NBEA	neurobeachin
PHF3	PHF3	PHD finger protein 3
TBC1D30	TBC1D30	TBC1 domain family, member 30
IZUMO1	IZUMO1	izumo sperm-egg fusion 1
VWA5A	VWA5A	von Willebrand factor A domain containing 5A
FHOD1	FHOD1	formin homology 2 domain containing 1
ZSCAN2	ZSCAN2	zinc finger and SCAN domain containing 2
KLF16	KLF16	Kruppel-like factor 16
GLE1	GLE1	GLE1 RNA export mediator homolog (yeast)
ZNF141	ZNF141	zinc finger protein 141
PAFAH1B1	PAFAH1B1	platelet-activating factor acetylhydrolase 1b, regulatory subunit 1 (45kDa)
KATNAL1	KATNAL1	katanin p60 subunit A-like 1
PAQR6	PAQR6	progestin and adipoQ receptor family member VI
MIB2	MIB2	mindbomb E3 ubiquitin protein ligase 2
ZBTB1	ZBTB1	zinc finger and BTB domain containing 1
RPS15A	RPS15A	ribosomal protein S15a
RMND5B	RMND5B	required for meiotic nuclear division 5 homolog B (S. cerevisiae)
CMTM1	CMTM1	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 1
SYT3	SYT3	synaptotagmin III
SIRT5	SIRT5	sirtuin 5
LCE1B	LCE1B	late cornified envelope 1B
TTC28	TTC28	tetratricopeptide repeat domain 28
SMUG1	SMUG1	single-strand-selective monofunctional uracil-

		DNA glycosylase 1
PIK3CA	PIK3CA	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha
NLRP2	NLRP2	NLR family, pyrin domain containing 2
TWISTNB	TWISTNB	TWIST neighbor
RNF146	RNF146	ring finger protein 146
LOC158863	LOC158863	uncharacterized LOC158863
MAOA	MAOA	monoamine oxidase A
CORO2A	CORO2A	coronin, actin binding protein, 2A
GLRX2	GLRX2	glutaredoxin 2
MYO19	MYO19	myosin XIX
ETNK2	ETNK2	ethanolamine kinase 2
DOCK8	DOCK8	dedicator of cytokinesis 8
UBA6	UBA6	ubiquitin-like modifier activating enzyme 6
ZNF10	ZNF10	zinc finger protein 10
DAB2IP	DAB2IP	DAB2 interacting protein
TRIM17	TRIM17	tripartite motif containing 17
RTTN	RTTN	rotatin
LOC150622	LOC150622	uncharacterized LOC150622
MYO1C	MYO1C	myosin IC
FADD	FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain
RBM23	RBM23	RNA binding motif protein 23
FAS	FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
NIN	NIN	ninein (GSK3B interacting protein)
C9orf37	C9orf37	chromosome 9 open reading frame 37
N4BP2L2	N4BP2L2	NEDD4 binding protein 2-like 2
LOC645638	LOC645638	WDNM1-like pseudogene
LRRTM2	LRRTM2	leucine rich repeat transmembrane neuronal 2
GRIN1	GRIN1	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1
TBR1	TBR1	T-box, brain, 1
PLAG1	PLAG1	pleiomorphic adenoma gene 1
LAT	LAT	linker for activation of T cells
PIF1	PIF1	PIF1 5'-to-3' DNA helicase homolog (S. cerevisiae)
CCDC65	CCDC65	coiled-coil domain containing 65
CHRNA4	CHRNA4	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 4 (neuronal)
LOC100049716	LOC100049716	uncharacterized LOC100049716
LYZL4	LYZL4	lysozyme-like 4
GCC2	GCC2	GRIP and coiled-coil domain containing 2
KBTBD3	KBTBD3	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 3
LLGL2	LLGL2	lethal giant larvae homolog 2 (Drosophila)
TUBB6	TUBB6	tubulin, beta 6 class V
FLJ42351	FLJ42351	uncharacterized LOC400999

FIP1L1	FIP1L1	FIP1 like 1 (S. cerevisiae)
RNF148	RNF148	ring finger protein 148
H6PD	H6PD	hexose-6-phosphate dehydrogenase (glucose 1-dehydrogenase)
ENSA	ENSA	endosulfine alpha
IPO8	IPO8	importin 8
GNAQ	GNAQ	guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide
BCL2	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
ZNF75A	ZNF75A	zinc finger protein 75a
QRICH2	QRICH2	glutamine rich 2
DOCK10	DOCK10	dedicator of cytokinesis 10
PSD4	PSD4	pleckstrin and Sec7 domain containing 4
ITPKB	ITPKB	inositol-trisphosphate 3-kinase B
C3AR1	C3AR1	complement component 3a receptor 1
FAM102B	FAM102B	family with sequence similarity 102, member B
CD36	CD36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)
IL24	IL24	interleukin 24
CCDC144B	CCDC144B	coiled-coil domain containing 144B (pseudogene)
SLC6A6	SLC6A6	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6
EMILIN1	EMILIN1	elastin microfibril interfacer 1
MUC7	MUC7	mucin 7, secreted
LOC391073	LOC391073	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase pseudogene
GNE	GNE	glucosamine (UDP-N-acetyl)-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase
RPA1	RPA1	replication protein A1, 70kDa
IFI30	IFI30	interferon, gamma-inducible protein 30
COPZ2	COPZ2	coatomer protein complex, subunit zeta 2
C14orf132	C14orf132	chromosome 14 open reading frame 132
C1orf56	C1orf56	chromosome 1 open reading frame 56
C17orf101	C17orf101	chromosome 17 open reading frame 101
CLCN4	CLCN4	chloride channel, voltage-sensitive 4
THRB	THRB	thyroid hormone receptor, beta
DCLK1	DCLK1	doublecortin-like kinase 1
APOD	APOD	apolipoprotein D
LOC339988	LOC339988	uncharacterized LOC339988
PNLDC1	PNLDC1	poly(A)-specific ribonuclease (PARN)-like domain containing 1
LARS	LARS	leucyl-tRNA synthetase
FAM154A	FAM154A	family with sequence similarity 154, member A
CDC42BPA	CDC42BPA	CDC42 binding protein kinase alpha

		(DMPK-like)
KATNA1	KATNA1	katanin p60 (ATPase containing) subunit A 1
LDB2	LDB2	LIM domain binding 2
TOM1L1	TOM1L1	target of myb1 (chicken)-like 1
TBX2	TBX2	T-box 2
PVALB	PVALB	parvalbumin
FOXD3	FOXD3	forkhead box D3
POGZ	POGZ	pogo transposable element with ZNF domain
WDR72	WDR72	WD repeat domain 72
STARD4	STARD4	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 4
PARP10	PARP10	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 10
CHD3	CHD3	chromodomain helicase DNA binding protein 3
ANKRD50	ANKRD50	ankyrin repeat domain 50
PKD1L1	PKD1L1	polycystic kidney disease 1 like 1
LPCAT4	LPCAT4	lysophosphatidylcholine acyltransferase 4
GNPDA2	GNPDA2	glucosamine-6-phosphate deaminase 2
FNDC8	FNDC8	fibronectin type III domain containing 8
ESRRA	ESRRA	estrogen-related receptor alpha
DGAT2	DGAT2	diacylglycerol O-acyltransferase 2
GPR19	GPR19	G protein-coupled receptor 19
RNASEL	RNASEL	ribonuclease L (2',5'-oligoisoadenylate synthetase-dependent)
LOC254028	LOC254028	uncharacterized LOC254028
GBP6	GBP6	guanylate binding protein family, member 6
C10orf108	C10orf108	chromosome 10 open reading frame 108
NCOR1	NCOR1	nuclear receptor corepressor 1
CLP1	CLP1	CLP1, cleavage and polyadenylation factor I subunit, homolog (S. cerevisiae)
ZNF81	ZNF81	zinc finger protein 81
MAP2K7	MAP2K7	mitogen-activated protein kinase kinase 7
SLC30A1	SLC30A1	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1
SENP7	SENP7	SUMO1/sentrin specific peptidase 7
DBF4B	DBF4B	DBF4 homolog B (S. cerevisiae)
MBD5	MBD5	methyl-CpG binding domain protein 5
HAUS6	HAUS6	HAUS augmin-like complex, subunit 6
PHLDA1	PHLDA1	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1
CAPS2	CAPS2	calcyphosine 2
CCDC108	CCDC108	coiled-coil domain containing 108
BNIP2	BNIP2	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 2
NRP2	NRP2	neuropilin 2

MRPS31	MRPS31	mitochondrial ribosomal protein S31
USP33	USP33	ubiquitin specific peptidase 33
ZNF319	ZNF319	zinc finger protein 319
ITGA1	ITGA1	integrin, alpha 1
CCDC83	CCDC83	coiled-coil domain containing 83
AGT	AGT	angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)
SLC22A14	SLC22A14	solute carrier family 22, member 14
OTUD6A	OTUD6A	OTU domain containing 6A
HAL	HAL	histidine ammonia-lyase
FLJ39739	FLJ39739	uncharacterized FLJ39739
C1orf129	C1orf129	chromosome 1 open reading frame 129
GNG12	GNG12	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 12
NOP14	NOP14	NOP14 nucleolar protein homolog (yeast)
GPR22	GPR22	G protein-coupled receptor 22
APLN	APLN	apelin
GSPT1	GSPT1	G1 to S phase transition 1
WDR5B	WDR5B	WD repeat domain 5B
ARPC1B	ARPC1B	actin related protein 2/3 complex, subunit 1B, 41kDa
ACTRT1	ACTRT1	actin-related protein T1
ANKK1	ANKK1	ankyrin repeat and kinase domain containing 1
GPR146	GPR146	G protein-coupled receptor 146
SORD	SORD	sorbitol dehydrogenase
CHI3L1	CHI3L1	chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)
EXTL3	EXTL3	exostoses (multiple)-like 3
HRH1	HRH1	histamine receptor H1
PRDM4	PRDM4	PR domain containing 4
ISL2	ISL2	ISL LIM homeobox 2
GAS2L2	GAS2L2	growth arrest-specific 2 like 2
TRIM44	TRIM44	tripartite motif containing 44
ST6GAL2	ST6GAL2	ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltranferase 2
ARL2BP	ARL2BP	ADP-ribosylation factor-like 2 binding protein
FAM46D	FAM46D	family with sequence similarity 46, member D
C9orf173	C9orf173	chromosome 9 open reading frame 173
PDE6B	PDE6B	phosphodiesterase 6B, cGMP-specific, rod, beta
PARL	PARL	presenilin associated, rhomboid-like
CBR4	CBR4	carbonyl reductase 4
PAX8	PAX8	paired box 8
OPN1LW	OPN1LW	opsin 1 (cone pigments), long-wave-sensitive
NT5C	NT5C	5', 3'-nucleotidase, cytosolic

SMC1A	SMC1A	structural maintenance of chromosomes 1A
LGALS9C	LGALS9C	lectin, galactoside-binding, soluble, 9C
SLC45A4	SLC45A4	solute carrier family 45, member 4
LYSMD2	LYSMD2	LysM, putative peptidoglycan-binding, domain containing 2
LOC100130899	LOC100130899	uncharacterized LOC100130899
WWC3	WWC3	WWC family member 3
LOC100129449	LOC100129449	PRO2055
FBXL17	FBXL17	F-box and leucine-rich repeat protein 17
SLC6A18	SLC6A18	solute carrier family 6, member 18
LYL1	LYL1	lymphoblastic leukemia derived sequence 1
SPRY2	SPRY2	sprouty homolog 2 (Drosophila)
RPL13P5	RPL13P5	ribosomal protein L13 pseudogene 5
CASD1	CASD1	CAS1 domain containing 1
OXER1	OXER1	oxoeicosanoid (OXE) receptor 1
RAB34	RAB34	RAB34, member RAS oncogene family
CARS	CARS	cysteinyl-tRNA synthetase
CDHR5	CDHR5	cadherin-related family member 5
FGF5	FGF5	fibroblast growth factor 5
ALDH1A2	ALDH1A2	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2
ZNF688	ZNF688	zinc finger protein 688
AHCY	AHCY	adenosylhomocysteinase
CHMP7	CHMP7	charged multivesicular body protein 7
NSMCE1	NSMCE1	non-SMC element 1 homolog (S. cerevisiae)
DNHD1	DNHD1	dynein heavy chain domain 1
KCTD5	KCTD5	potassium channel tetramerisation domain containing 5
ZNF543	ZNF543	zinc finger protein 543
SF3A3	SF3A3	splicing factor 3a, subunit 3, 60kDa
EN2	EN2	engrailed homeobox 2
WIPF3	WIPF3	WAS/WASL interacting protein family, member 3
EPB41L1	EPB41L1	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 1
NCR2	NCR2	natural cytotoxicity triggering receptor 2
ABHD15	ABHD15	abhydrolase domain containing 15
AHNAK	AHNAK	AHNAK nucleoprotein
PTGER1	PTGER1	prostaglandin E receptor 1 (subtype EP1), 42kDa
MRGPRE	MRGPRE	MAS-related GPR, member E
SETD1B	SETD1B	SET domain containing 1B
CLCN3	CLCN3	chloride channel, voltage-sensitive 3
TAAR3	TAAR3	trace amine associated receptor 3 (gene/pseudogene)
IL17C	IL17C	interleukin 17C
SNRNP35	SNRNP35	small nuclear ribonucleoprotein 35kDa

		(U11/U12)
RSU1	RSU1	Ras suppressor protein 1
JMJD1C	JMJD1C	jumonji domain containing 1C
GPR12	GPR12	G protein-coupled receptor 12
TIMELESS	TIMELESS	timeless homolog (Drosophila)
SYTL1	SYTL1	synaptotagmin-like 1
MYOZ3	MYOZ3	myozenin 3
MTMR2	MTMR2	myotubularin related protein 2
SLC25A36	SLC25A36	solute carrier family 25 (pyrimidine nucleotide carrier), member 36
GGA1	GGA1	golgi-associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 1
NAA16	NAA16	N(alpha)-acetyltransferase 16, NatA auxiliary subunit
ATP10A	ATP10A	ATPase, class V, type 10A
BRE	BRE	brain and reproductive organ-expressed (TNFRSF1A modulator)
SLC35E2	SLC35E2	solute carrier family 35, member E2
ELFN1	ELFN1	extracellular leucine-rich repeat and fibronectin type III domain containing 1
MAFB	MAFB	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)
GLIPR1L2	GLIPR1L2	GLI pathogenesis-related 1 like 2
RFX6	RFX6	regulatory factor X, 6
ZNF275	ZNF275	zinc finger protein 275
UBQLN2	UBQLN2	ubiquilin 2
SH2D2A	SH2D2A	SH2 domain containing 2A
RDH14	RDH14	retinol dehydrogenase 14 (all-trans/9-cis/11-cis)
ACVR2A	ACVR2A	activin A receptor, type IIA
ABCD2	ABCD2	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 2
NEK7	NEK7	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 7
GPRASP1	GPRASP1	G protein-coupled receptor associated sorting protein 1
MECOM	MECOM	MDS1 and EVI1 complex locus
KLKB1	KLKB1	kallikrein B, plasma (Fletcher factor) 1
RBBP6	RBBP6	retinoblastoma binding protein 6
PHTF1	PHTF1	putative homeodomain transcription factor 1
LOC90834	LOC90834	uncharacterized protein BC001742
SYTL5	SYTL5	synaptotagmin-like 5
CLYBL	CLYBL	citrate lyase beta like
PFKL	PFKL	phosphofructokinase, liver
CHCHD7	CHCHD7	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 7

ECE1	ECE1	endothelin converting enzyme 1
ZC3H6	ZC3H6	zinc finger CCCH-type containing 6
B4GALT7	B4GALT7	xylosylprotein beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 7
CCL21	CCL21	chemokine (C-C motif) ligand 21
FNDC7	FNDC7	fibronectin type III domain containing 7
HOXD3	HOXD3	homeobox D3
MAN1B1	MAN1B1	mannosidase, alpha, class 1B, member 1
ZNF295	ZNF295	zinc finger protein 295
ADAMTS13	ADAMTS13	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 13
HEXIM2	HEXIM2	hexamethylene bis-acetamide inducible 2
MCM3	MCM3	minichromosome maintenance complex component 3
C20orf203	C20orf203	chromosome 20 open reading frame 203
NFYC	NFYC	nuclear transcription factor Y, gamma
ACVR2B	ACVR2B	activin A receptor, type IIB
PLSCR4	PLSCR4	phospholipid scramblase 4
PGBD1	PGBD1	piggyBac transposable element derived 1
HIST1H4I	HIST1H4I	histone cluster 1, H4i
AZIN1	AZIN1	antizyme inhibitor 1
CRIP1	CRIP1	cysteine-rich protein 1 (intestinal)
ZNF585B	ZNF585B	zinc finger protein 585B
CCT4	CCT4	chaperonin containing TCP1, subunit 4 (delta)
SPATA5	SPATA5	spermatogenesis associated 5
SLC25A22	SLC25A22	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier: glutamate), member 22
NDUFA13	NDUFA13	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 13
CYP19A1	CYP19A1	cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1
TRIM40	TRIM40	tripartite motif containing 40
EYA1	EYA1	eyes absent homolog 1 (Drosophila)
GGNBP2	GGNBP2	gametogenetin binding protein 2
HRH2	HRH2	histamine receptor H2
GJA4	GJA4	gap junction protein, alpha 4, 37kDa
GJB5	GJB5	gap junction protein, beta 5, 31.1kDa
PORCN	PORCN	porcupine homolog (Drosophila)
PITX1	PITX1	paired-like homeodomain 1
TMEM194A	TMEM194A	transmembrane protein 194A
PCDHGA11	PCDHGA11	protocadherin gamma subfamily A, 11
C17orf66	C17orf66	chromosome 17 open reading frame 66
STARD3	STARD3	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 3
C2CD4C	C2CD4C	C2 calcium-dependent domain containing 4C

ZNF568	ZNF568	zinc finger protein 568
SHANK2	SHANK2	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 2
TMEM41A	TMEM41A	transmembrane protein 41A
SMG6	SMG6	smg-6 homolog, nonsense mediated mRNA decay factor (C. elegans)
TNKS2	TNKS2	tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase 2
PRKAB2	PRKAB2	protein kinase, AMP-activated, beta 2 non-catalytic subunit
TTN	TTN	titin
SUB1	SUB1	SUB1 homolog (S. cerevisiae)
GLRB	GLRB	glycine receptor, beta
NT5C2	NT5C2	5'-nucleotidase, cytosolic II
MSLN	MSLN	mesothelin
NAA20	NAA20	N(alpha)-acetyltransferase 20, NatB catalytic subunit
PGM5P1	PGM5P1	phosphoglucomutase 5 pseudogene 1
IL23A	IL23A	interleukin 23, alpha subunit p19
ZFYVE21	ZFYVE21	zinc finger, FYVE domain containing 21
ATP8B4	ATP8B4	ATPase, class I, type 8B, member 4
GPRC6A	GPRC6A	G protein-coupled receptor, family C, group 6, member A
CRYBB3	CRYBB3	crystallin, beta B3
LOC100128840	LOC100128840	uncharacterized LOC100128840
PGC	PGC	progastricsin (pepsinogen C)
GXYLT1	GXYLT1	glucoside xylosyltransferase 1
ATP6V0A1	ATP6V0A1	ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit a1
LOC286467	LOC286467	family with sequence similarity 195, member A pseudogene
ZNF496	ZNF496	zinc finger protein 496
NCK1	NCK1	NCK adaptor protein 1
SIRPB1	SIRPB1	signal-regulatory protein beta 1
PPFIA1	PPFIA1	protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein (liprin), alpha 1
RBM26	RBM26	RNA binding motif protein 26
LOC439950	LOC439950	uncharacterized LOC439950
DCDC2B	DCDC2B	doublecortin domain containing 2B
RPS6KA1	RPS6KA1	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 1
LOC728769	LOC728769	uncharacterized LOC728769
KCNG4	KCNG4	potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 4
HMMR	HMMR	hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)

TTC12	TTC12	tetratricopeptide repeat domain 12
TCF7L2	TCF7L2	transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box)
KIAA0319	KIAA0319	KIAA0319
WARS	WARS	tryptophanyl-tRNA synthetase
TMEM57	TMEM57	transmembrane protein 57
C6orf106	C6orf106	chromosome 6 open reading frame 106
ETV3L	ETV3L	ets variant 3-like
FAM168A	FAM168A	family with sequence similarity 168, member A
JAK1	JAK1	Janus kinase 1
GABRG2	GABRG2	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, gamma 2
CAMKV	CAMKV	CaM kinase-like vesicle-associated
SETD7	SETD7	SET domain containing (lysine methyltransferase) 7
AP1M2	AP1M2	adaptor-related protein complex 1, mu 2 subunit
XKR9	XKR9	XK, Kell blood group complex subunit-related family, member 9
SPR	SPR	sepiapterin reductase (7,8-dihydrobiopterin:NADP+ oxidoreductase)
FAM190A	FAM190A	family with sequence similarity 190, member A
CSF3	CSF3	colony stimulating factor 3 (granulocyte)
AK5	AK5	adenylate kinase 5
ACSL6	ACSL6	acyl-CoA synthetase long-chain family member 6
GPATCH4	GPATCH4	G patch domain containing 4
NTN4	NTN4	netrin 4
MGC15885	MGC15885	uncharacterized protein MGC15885
ASCL2	ASCL2	achaete-scute complex homolog 2 (Drosophila)
HLA-A	HLA-A	major histocompatibility complex, class I, A
HIST1H4H	HIST1H4H	histone cluster 1, H4h
TMEM133	TMEM133	transmembrane protein 133
SHARPIN	SHARPIN	SHANK-associated RH domain interactor
RFNG	RFNG	RFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase
LOC645769	LOC645769	uncharacterized LOC645769
PTPN3	PTPN3	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 3
SIRPG	SIRPG	signal-regulatory protein gamma
AGPAT5	AGPAT5	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 5 (lysophosphatidic acid acyltransferase, epsilon)

SCAMP2	SCAMP2	secretory carrier membrane protein 2
DMD	DMD	dystrophin
ZNF668	ZNF668	zinc finger protein 668
STAMBP	STAMBP	STAM binding protein
PDILT	PDILT	protein disulfide isomerase-like, testis expressed
LOC284080	LOC284080	uncharacterized LOC284080
ANKRD30A	ANKRD30A	ankyrin repeat domain 30A
GTPBP5	GTPBP5	GTP binding protein 5 (putative)
DKFZP564C152	DKFZP564C152	DKFZP564C152 protein
PEX7	PEX7	peroxisomal biogenesis factor 7
LYSMD1	LYSMD1	LysM, putative peptidoglycan-binding, domain containing 1
CD47	CD47	CD47 molecule
C6orf25	C6orf25	chromosome 6 open reading frame 25
C18orf1	C18orf1	chromosome 18 open reading frame 1
MYLK4	MYLK4	myosin light chain kinase family, member 4
ABCB11	ABCB11	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 11
SLC22A12	SLC22A12	solute carrier family 22 (organic anion/urate transporter), member 12
LOC100129550	LOC100129550	uncharacterized LOC100129550
NMT1	NMT1	N-myristoyltransferase 1
DNAJA1	DNAJA1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1
SOCS5	SOCS5	suppressor of cytokine signaling 5
FAM115A	FAM115A	family with sequence similarity 115, member A
AHSG	AHSG	alpha-2-HS-glycoprotein
C1QTNF7	C1QTNF7	C1q and tumor necrosis factor related protein 7
NF1	NF1	neurofibromin 1
ASCC2	ASCC2	activating signal cointegrator 1 complex subunit 2
CNP	CNP	2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase
YAP1	YAP1	Yes-associated protein 1
DAGLB	DAGLB	diacylglycerol lipase, beta
RNASE9	RNASE9	ribonuclease, RNase A family, 9 (non-active)
INSM2	INSM2	insulinoma-associated 2
ST8SIA2	ST8SIA2	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 2
CYB561D2	CYB561D2	cytochrome b-561 domain containing 2
IRAK3	IRAK3	interleukin-1 receptor-associated kinase 3
SLC5A2	SLC5A2	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 2
SCRT2	SCRT2	scratch homolog 2, zinc finger protein

		(Drosophila)
SLC45A2	SLC45A2	solute carrier family 45, member 2
C15orf38	C15orf38	chromosome 15 open reading frame 38
UBE2J1	UBE2J1	ubiquitin-conjugating enzyme E2, J1
GCM1	GCM1	glial cells missing homolog 1 (Drosophila)
GFRA1	GFRA1	GDNF family receptor alpha 1
REPS2	REPS2	RALBP1 associated Eps domain containing 2
BCL6B	BCL6B	B-cell CLL/lymphoma 6, member B
GCFC1	GCFC1	GC-rich sequence DNA-binding factor 1
NOX4	NOX4	NADPH oxidase 4
FAM46C	FAM46C	family with sequence similarity 46, member C
CDC42	CDC42	cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)
FCAR	FCAR	Fc fragment of IgA, receptor for
NAA10	NAA10	N(alpha)-acetyltransferase 10, NatA catalytic subunit
LPCAT3	LPCAT3	lysophosphatidylcholine acyltransferase 3
SP8	SP8	Sp8 transcription factor
RNF151	RNF151	ring finger protein 151
GCGR	GCGR	glucagon receptor
UPF3B	UPF3B	UPF3 regulator of nonsense transcripts homolog B (yeast)
NKAP	NKAP	NFKB activating protein
WIPF1	WIPF1	WAS/WASL interacting protein family, member 1
OR11A1	OR11A1	olfactory receptor, family 11, subfamily A, member 1
ATP8A2	ATP8A2	ATPase, aminophospholipid transporter, class I, type 8A, member 2
ADAMTS10	ADAMTS10	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 10
LOC221946	LOC221946	uncharacterized LOC221946
PDCD1LG2	PDCD1LG2	programmed cell death 1 ligand 2
PDCD6IP	PDCD6IP	programmed cell death 6 interacting protein
AGAP4	AGAP4	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 4
SLC30A7	SLC30A7	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 7
STMN4	STMN4	stathmin-like 4
MEGF9	MEGF9	multiple EGF-like-domains 9
ZBTB7A	ZBTB7A	zinc finger and BTB domain containing 7A
AGBL5	AGBL5	ATP/GTP binding protein-like 5
SKIL	SKIL	SKI-like oncogene
PTPLAD2	PTPLAD2	protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 2
RASL11A	RASL11A	RAS-like, family 11, member A

CLDN10	CLDN10	claudin 10
SLC24A3	SLC24A3	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 3
SLCO1B1	SLCO1B1	solute carrier organic anion transporter family, member 1B1
CCNDBP1	CCNDBP1	cyclin D-type binding-protein 1
HNRNPUL1	HNRNPUL1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 1
PIGU	PIGU	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class U
C20orf141	C20orf141	chromosome 20 open reading frame 141
NCAN	NCAN	neurocan
LOC441461	LOC441461	uncharacterized LOC441461
TCF15	TCF15	transcription factor 15 (basic helix-loop-helix)
SPARC	SPARC	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
KCTD12	KCTD12	potassium channel tetramerisation domain containing 12
PRMT1	PRMT1	protein arginine methyltransferase 1
CD79B	CD79B	CD79b molecule, immunoglobulin-associated beta
FZD1	FZD1	frizzled family receptor 1
TAF15	TAF15	TAF15 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 68kDa
ARHGAP24	ARHGAP24	Rho GTPase activating protein 24
RIMKLB	RIMKLB	ribosomal modification protein rimK-like family member B
IGFN1	IGFN1	immunoglobulin-like and fibronectin type III domain containing 1
GALNT7	GALNT7	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 7 (GalNAc-T7)
ISG20L2	ISG20L2	interferon stimulated exonuclease gene 20kDa-like 2
PRSS36	PRSS36	protease, serine, 36
LOC152578	LOC152578	uncharacterized LOC152578
KCNAB1	KCNAB1	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 1
MXRA5	MXRA5	matrix-remodelling associated 5
TNS1	TNS1	tensin 1
FUK	FUK	fucokinase
KRT74	KRT74	keratin 74
OR6S1	OR6S1	olfactory receptor, family 6, subfamily S,

		member 1
MDM1	MDM1	Mdm1 nuclear protein homolog (mouse)
TRPC4	TRPC4	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4
DLAT	DLAT	dihydrolipoamide S-acetyltransferase
ADCK2	ADCK2	aarF domain containing kinase 2
CSE1L	CSE1L	CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)
BSDC1	BSDC1	BSD domain containing 1
LOC645434	LOC645434	uncharacterized LOC645434
RALGDS	RALGDS	ral guanine nucleotide dissociation stimulator
SCN10A	SCN10A	sodium channel, voltage-gated, type X, alpha subunit
PAPD4	PAPD4	PAP associated domain containing 4
HAUS3	HAUS3	HAUS augmin-like complex, subunit 3
TTPA	TTPA	tocopherol (alpha) transfer protein
C2orf88	C2orf88	chromosome 2 open reading frame 88
CTHRC1	CTHRC1	collagen triple helix repeat containing 1
MDH2	MDH2	malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial)
DHCR7	DHCR7	7-dehydrocholesterol reductase
OR3A1	OR3A1	olfactory receptor, family 3, subfamily A, member 1
NXF1	NXF1	nuclear RNA export factor 1
CRAT	CRAT	carnitine O-acetyltransferase
SNED1	SNED1	sushi, nidogen and EGF-like domains 1
VEGFA	VEGFA	vascular endothelial growth factor A
RRP1B	RRP1B	ribosomal RNA processing 1 homolog B (S. cerevisiae)
COMMD9	COMMD9	COMM domain containing 9
CBLC	CBLC	Cbl proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase C
DNAJC24	DNAJC24	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 24
P2RX7	P2RX7	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 7
WNK1	WNK1	WNK lysine deficient protein kinase 1
ANKRD24	ANKRD24	ankyrin repeat domain 24
TMLHE	TMLHE	trimethyllysine hydroxylase, epsilon
KLK11	KLK11	kallikrein-related peptidase 11
UXT	UXT	ubiquitously-expressed, prefoldin-like chaperone
DLX1	DLX1	distal-less homeobox 1
DNAJB14	DNAJB14	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 14
SEC24A	SEC24A	SEC24 family, member A (S. cerevisiae)
C3orf36	C3orf36	chromosome 3 open reading frame 36

C2orf69	C2orf69	chromosome 2 open reading frame 69
PAX2	PAX2	paired box 2
TTLL5	TTLL5	tubulin tyrosine ligase-like family, member 5
EPC1	EPC1	enhancer of polycomb homolog 1 (Drosophila)
OR7E5P	OR7E5P	olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 5 pseudogene
CLEC10A	CLEC10A	C-type lectin domain family 10, member A
CASP2	CASP2	caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase
TRMT2B	TRMT2B	tRNA methyltransferase 2 homolog B (S. cerevisiae)
C1orf185	C1orf185	chromosome 1 open reading frame 185
RANBP2	RANBP2	RAN binding protein 2
NR4A3	NR4A3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3
ATG16L1	ATG16L1	autophagy related 16-like 1 (S. cerevisiae)
PCNXL2	PCNXL2	pecanex-like 2 (Drosophila)
TTC9	TTC9	tetratricopeptide repeat domain 9
DKFZp451B082	DKFZp451B082	uncharacterized LOC401282
ASB9	ASB9	ankyrin repeat and SOCS box containing 9
NTRK3	NTRK3	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3
SOX15	SOX15	SRY (sex determining region Y)-box 15
LOC100289361	LOC100289361	uncharacterized LOC100289361
LOC729088	LOC729088	uncharacterized LOC729088
SYNM	SYNM	synemin, intermediate filament protein
MYO1D	MYO1D	myosin ID
FSD1L	FSD1L	fibronectin type III and SPRY domain containing 1-like
HAP1	HAP1	huntingtin-associated protein 1
VWA3A	VWA3A	von Willebrand factor A domain containing 3A
RBM43	RBM43	RNA binding motif protein 43
PTDSS2	PTDSS2	phosphatidylserine synthase 2
UGT8	UGT8	UDP glycosyltransferase 8
MYH7B	MYH7B	myosin, heavy chain 7B, cardiac muscle, beta
RPLP2	RPLP2	ribosomal protein, large, P2
C3orf38	C3orf38	chromosome 3 open reading frame 38
TAS2R50	TAS2R50	taste receptor, type 2, member 50
SFXN5	SFXN5	sideroflexin 5
SCGB2A1	SCGB2A1	secretoglobin, family 2A, member 1
MRPL9	MRPL9	mitochondrial ribosomal protein L9
FAM132B	FAM132B	family with sequence similarity 132, member B
SLC35A1	SLC35A1	solute carrier family 35 (CMP-sialic acid transporter), member A1

LAMA3	LAMA3	laminin, alpha 3
PHTF2	PHTF2	putative homeodomain transcription factor 2
FAM92A1	FAM92A1	family with sequence similarity 92, member A1
ATG16L2	ATG16L2	autophagy related 16-like 2 (S. cerevisiae)
MAP7D1	MAP7D1	MAP7 domain containing 1
PRNT	PRNT	prion protein (testis specific)
SH3GL1	SH3GL1	SH3-domain GRB2-like 1
GOLGA4	GOLGA4	golgin A4
SKIV2L	SKIV2L	superkiller viralicidic activity 2-like (S. cerevisiae)
SEH1L	SEH1L	SEH1-like (S. cerevisiae)
LOC100272228	LOC100272228	uncharacterized LOC100272228
PRB3	PRB3	proline-rich protein BstNI subfamily 3
CTCF	CTCF	CCCTC-binding factor (zinc finger protein)
NDUFV2	NDUFV2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2, 24kDa
FKBP1A	FKBP1A	FK506 binding protein 1A, 12kDa
CYP24A1	CYP24A1	cytochrome P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1
C9orf135	C9orf135	chromosome 9 open reading frame 135
ANO6	ANO6	anoctamin 6
ZNF776	ZNF776	zinc finger protein 776
PSMC1	PSMC1	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 1
NPC1	NPC1	Niemann-Pick disease, type C1
NUFIP1	NUFIP1	nuclear fragile X mental retardation protein interacting protein 1
CCDC115	CCDC115	coiled-coil domain containing 115
C11orf70	C11orf70	chromosome 11 open reading frame 70
INPP5A	INPP5A	inositol polyphosphate-5-phosphatase, 40kDa
CPNE7	CPNE7	copine VII
ANKRD31	ANKRD31	ankyrin repeat domain 31
SRF	SRF	serum response factor (c-fos serum response element-binding transcription factor)
LOC644990	LOC644990	uncharacterized LOC644990
KRTAP19-3	KRTAP19-3	keratin associated protein 19-3
MYBPC2	MYBPC2	myosin binding protein C, fast type
BEND5	BEND5	BEN domain containing 5
PVRL2	PVRL2	poliovirus receptor-related 2 (herpesvirus entry mediator B)
GALNT4	GALNT4	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 4 (GalNAc-T4)

SAR1B	SAR1B	SAR1 homolog B (S. cerevisiae)
FBXL2	FBXL2	F-box and leucine-rich repeat protein 2
C8orf59	C8orf59	chromosome 8 open reading frame 59
TMEM176B	TMEM176B	transmembrane protein 176B
SMYD1	SMYD1	SET and MYND domain containing 1
C18orf21	C18orf21	chromosome 18 open reading frame 21
GUCA2A	GUCA2A	guanylate cyclase activator 2A (guanylin)
RPS6KA3	RPS6KA3	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3
NXPH2	NXPH2	neurexophilin 2
RPP38	RPP38	ribonuclease P/MRP 38kDa subunit
POLR2D	POLR2D	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide D
FOXK1	FOXK1	forkhead box K1
IGF2BP1	IGF2BP1	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1
KCNQ1	KCNQ1	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1
C1orf43	C1orf43	chromosome 1 open reading frame 43
EIF4G1	EIF4G1	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1
C16orf53	C16orf53	chromosome 16 open reading frame 53
UQCRC2	UQCRC2	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II
PPIP5K1	PPIP5K1	diphosphoinositol pentakisphosphate kinase 1
WBSCR16	WBSCR16	Williams-Beuren syndrome chromosome region 16
USP3	USP3	ubiquitin specific peptidase 3
ACER3	ACER3	alkaline ceramidase 3
AP1AR	AP1AR	adaptor-related protein complex 1 associated regulatory protein
TMEM63A	TMEM63A	transmembrane protein 63A
PLSCR3	PLSCR3	phospholipid scramblase 3
CREB5	CREB5	cAMP responsive element binding protein 5
ST6GALNAC1	ST6GALNAC1	ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 1
ANGPT2	ANGPT2	angiopoietin 2
TBC1D16	TBC1D16	TBC1 domain family, member 16
PDE3B	PDE3B	phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited
CSF2	CSF2	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
MOCS1	MOCS1	molybdenum cofactor synthesis 1
TPRA1	TPRA1	transmembrane protein, adipocyte asscociated 1

LOC286189	LOC286189	uncharacterized LOC286189
GRIN3A	GRIN3A	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate 3A
SYN2	SYN2	synapsin II
RPS27	RPS27	ribosomal protein S27
KCTD20	KCTD20	potassium channel tetramerisation domain containing 20

ΜΕΡΟΣ Ι

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

***Nash**: In competitive behavior someone always loses.*

***Charles**: Well, my niece knows that, John, and she's about this high.*

***Nash**: See if I derive Equilibrium where prevalence is a non-singular event where nobody loses, can you imagine the effect that would have on conflict scenarios, arm negotiations...*

***Charles**: When did you last eat?*

***Nash**: ...currency exchange?*

***Charles**: When did you last eat? You know, food.*

***Nash**: You have no respect for cognitive reverie, you know that?*

***Charles**: Yes. But pizza - now, pizza I have enormous respect for. And of course beer.*

[leaves]

***Nash**: [throws stuff down and follows] I have respect for beer. I have respect for beer!*

Russel Crow (στο ρόλο του John Nash στην ταινία A Beautiful Mind)

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΧΟΛΙΑ

Τόσο στη βασική όσο και στην εφαρμοσμένη έρευνα, μεγάλο μέρος των μελετών εστιάζεται στην ανεύρεση δεικτών και μάλιστα πρώιμων στις ανθρώπινες νεοπλασίες. Ειδικότερα δε σε αυτές των όγκων του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) (Freije, Castro-Vargas et al. 2004; Mischel, Cloughesy et al. 2004). Μέρος των μελετών και μάλιστα το μεγαλύτερο επικεντρώνεται είτε στην ανεύρεση δεικτών που αφορούν στην προδιάθεση μιας νεοπλασίας για αντίσταση στους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (Deb, Sharma et al. 2006; Weller, Berger et al. 2007; Stankovic and Marston 2008) είτε ειδικών δεικτών για κάθε νεοπλασία ως θεραπευτικών στόχων. Η ανεύρεση πρώιμων δεικτών για τη διάγνωση ή καλύτερα (Moolgavkar and Knudson 1981) για την πρόγνωση των νεοπλασματικών παθήσεων προκαλεί μεγάλο ενδιαφέρον στην έρευνα (Sanson, Thillet et al. 2004; Belda-Iniesta, de Castro Carpeno et al. 2006; Rutkowski 2006). Η αναζήτηση δεικτών (biomarkers) δεν είναι απόλυτα επιτυχής μέχρι σήμερα λόγω ακριβώς του ότι η βιολογία του ευκαρυωτικού κυττάρου είναι τόσο περίπλοκη που δεν επιτρέπει την ταυτοποίηση ή ομαδοποίηση τέτοιων δεικτών.

Μια κεντρική τάση που υπάρχει ειδικά για τις νεοπλασίες είναι η ασθενο-κεντρική (patient-specific) θεραπεία του καρκίνου, είναι τόση η ποικιλομορφία μεταξύ των ασθενών, που πρέπει τόσο η διάγνωση όσο και η θεραπεία να επικεντρώνεται στον κάθε ασθενή ξεχωριστά παρακάμπτοντας το μέχρι σήμερα γνωστό μοντέλο της ολιστικής προσέγγισης της θεραπείας (Shai, Reichardt et al. 2008). Επί παραδείγματι, αναφέρονται οι προσπάθειες που γίνονται για την ταυτοποίηση και κατηγοριοποίηση των υποομάδων της λευχαιμίας, όχι μόνο ανάμεσα στους διαφορετικούς τύπους της ανάλογα με την προέλευση του κυττάρου, (Β- ή Τ-) αλλά σε μεγαλύτερο βάθος προς αναζήτηση κατηγοριών σε λευχαιμίες ίδιου κυτταρικού τύπου τόσο για την έκβαση της χημειοθεραπείας όσο και για την πρόγνωση της νόσου (Lopez-Terrada 2006; Haferlach, Kohlmann et al. 2007; Baldus and Bullinger 2008). Ένας εξαιρετικά χρήσιμος δείκτης για την ταυτοποίηση της Β- οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας είναι η ύπαρξη αναδιάταξης της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης (Taylor and Middleton 1991; Taylor, Rowe et al. 1991), η οποία λαμβάνει χώρα όμως στο ~80% των περιπτώσεων αυτού του τύπου λευχαιμίας. Τι συμβαίνει όμως με τον υπόλοιπο πληθυσμό που πάσχει από τον ίδιο τύπο λευχαιμίας αλλά δεν κατέχει αυτή την αναδιάταξη;

Επίσης μια πολύ καλά μελετημένη μορφή λευχαιμίας είναι αυτή της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας της οποίας η παθογένεια έχει ταυτοποιηθεί ή τουλάχιστον θεωρείται ότι έχει βρεθεί. Ο μηχανισμός αυτός αφορά στο σχηματισμό της χειμερικής πρωτεΐνης BCR/ABL, μέσω της μετάθεσης t(9:22), η οποία μετάθεση απεδείχθη ότι είναι η αιτία της εμφάνισης αυτού του τύπου λευχαιμίας (Jabbour, Cortes et al. 2008). Ο παράγοντας δυσκολίας αυξάνεται δραματικά στις νεοπλασίες του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ). Μια πρώτη σημαντική διαφορά είναι ότι και μόνο η λήψη δείγματος

είναι πολύ δυσκολότερη σε αυτές τις νεοπλασίες συγκριτικά με άλλες. Αυτό τις κάνει πολύ δυσκολότερες στο να μελετηθούν. Επίσης η νευροβιολογία του ΚΝΣ μαζί με την αναπτυξιακή βιολογία των ζώντων οργανισμών αποτελούν από μόνα τους μια από τις μεγαλύτερες προκλήσεις στη σύγχρονη έρευνα. Αντίστοιχα με τη λευχαιμία υπάρχουν δείκτες για τις νεοπλασίες του ΚΝΣ. Χαρακτηριστικά αναφέρουμε τους παράγοντες EGFR, MYC, HER2 κ.α. Η αδυναμία λήψης βιοψίας από τέτοιου είδους νεοπλασίες σε συνδυασμό με το γεγονός ότι ακόμα και με δεδομένη τη λήψη βιοψίας αυτή γίνεται μόνο μετά τη διάγνωση και όχι κατά την πορεία της νόσου, την καθιστούν μια από τις μεγαλύτερες προκλήσεις για την έρευνα. Ως βιολογικό δείκτη λοιπόν ορίζουμε κάθε μόριο το οποίο α) συμμετέχει σε σηματοδοτικές οδούς και παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη ή θάνατο ενός κυττάρου, β) μόρια που συμμετέχουν σε εξωκυττάριες σηματοδοτικές οδούς και γ) νουκλεοτίδια (π.χ. RNAs) που συμμετέχουν στις παραπάνω διαδικασίες και η σίγαση/αδρανοποίησή τους επιφέρει αντίθετα ή ενισχυμένα αποτελέσματα.

Στο σημείο αυτό όμως είναι πολύ σημαντικό να αναφερθούμε σε κάποια φαινόμενα, που παίζουν ρόλο στη μελέτη των νεοπλασιών. Σε προηγούμενη παράγραφο αναφερθήκαμε στο θέμα της μερικής αποτυχίας των επιστημονικών προσεγγίσεων όσον αφορά την πρόγνωση και ταυτοποίηση των τύπων των νεοπλασμάτων. Η γενική ιδέα ήταν ότι με τη βοήθεια μεθοδολογιών, που θα ευνοούσαν τη μαζική και ταυτόχρονη έκφραση του γονιδιακού προφίλ, παραδείγματος χάριν, θα ήμασταν σε θέση να δημιουργήσουμε προφίλ για κάθε τύπο και υπότυπο νόσου. Αυτό δεν επετεύχθη. Ο λόγος ήταν ότι πάντα και σχεδόν σε κάθε περίπτωση τα αναγνωριζόμενα προφίλ αντιστοιχούσαν πάντα σε ποσοστό ασθενών, δηλαδή δειγμάτων. Παραδείγματος χάριν, μια ομάδα γονιδίων ανευρίσκεται να υπερεκφράζεται σε έναν τύπο νεοπλασίας του ΚΝΣ ενώ δεν συνέβαινε το ίδιο στα δείγματα ελέγχου. Η υπερέκφραση αυτή όμως βρισκόταν σε κάποιο ποσοστό και όχι σε όλους. Αυτομάτως αυτό το γεγονός μας δίνει την πρώτη ένδειξη ότι τα ευρήματα αυτά δεν αποτελούν την αιτία της παθογένειας ή του τύπου του ιστού. Ένα βασικό συστηματικό λάθος που κατά τη γνώμη μας έγινε ήταν η θεώρηση ότι η παρατηρούμενη μέτρηση παραγόντων κατά τη δειγματοληψία αφορούσε στην πραγματική εικόνα του παράγοντα αυτού. Τα βιολογικά συστήματα είναι δυναμικά, δηλαδή η κατάστασή τους αλλάζει σε σχέση με το χρόνο και τις συνθήκες. Επίσης ένα μεγάλο τμήμα της πληροφορίας που μας δίνει μια μέτρηση παρακάμφθηκε διότι αγνοούσαμε το γεγονός ότι τα βιολογικά συστήματα είναι ταυτοχρόνως και φυσικά συστήματα, υπακούν δηλαδή στους νόμους της φυσικής ήτοι της θερμοδυναμικής, της αρχής διατήρησης της ενέργειας και της μάζας και ακόμα και της μηχανικής[1]. Επίσης, ένα πιθανό λάθος στις θεωρήσεις αυτές ήταν ότι η ανάλυση παραγόντων σε μια δεδομένη στιγμή δεν σήμαινε ότι αυτή θα συνεχιζόταν να υφίσταται σε όλες τις καταστάσεις

[1] Σε πρόσφατη επίσης εργασία μας είχαμε τη δυνατότητα να δείξουμε μια προσομοίωση των ασκούμενων δυνάμεων πάνω στον κυτταροσκελετό.

ενός συστήματος. Άρα, η θεώρηση αυτής της ιδέας είχε ως βασικό μειονέκτημα ότι θεωρούσε ένα σύστημα που ήταν δυναμικό ως στατικό.

Στο σημείο αυτό σε πρόσφατη μελέτη μας, στην οποία θα αναφερθούμε και παρακάτω, θέσαμε το εξής ερώτημα: αν υποθέσουμε ότι έχουμε έναν πληθυσμό ασθενών, στον οποίο για κάθε έναν έχουμε έναν αριθμό από παρατηρήσεις ήτοι μετρήσεις γονιδιακής έκφρασης. Αν ο αριθμός των ασθενών είναι μεγάλος και αντιπροσωπευτικός για διαφορετικές εθνικές ομάδες ποια είναι η πιθανότητα, αν κάνουμε μετρήσεις σε ένα νέο ασθενή, να βρούμε τιμές που θα βρίσκονται μέσα σε ένα εύρος που έχουμε ήδη παρατηρήσει; Με λίγα λόγια αυτό που προσπαθούμε να πούμε δεν είναι τίποτε παραπάνω από το γεγονός ότι οι τιμές που λαμβάναμε από τις μετρήσεις παραδείγματος χάριν των επιπέδων έκφρασης του RNA, δεν ήταν οι σταθερές τιμές αλλά *οι πιθανές τιμές που μπορούσε να λάβει η έκφραση του εκάστοτε γονιδίου* στη δεδομένη χρονική στιγμή. Η θεώρηση αυτή και δυσκολεύει τα πράγματα αλλά και τους δίνει μια άλλη οπτική.

Η συστημική θεώρηση των δεδομένων που παράγονται από την έρευνα και πιο συγκεκριμένα από τέτοιου είδους έρευνα βρίσκει την απαρχή της ήδη στις αρχές του 19ου αιώνα μέσα από τα λόγια του γνωστού μαθηματικού *Henri Poincaré*:

"…*life is a relationship among molecules and not a property of any molecule*…"

"…Science is built up of facts, as a house is with stones. But a collection of facts is no more a science, than a heap of stones is a house…"

Η ωρίμανση όμως τέτοιων προσεγγίσεων ξεκίνησε από τις αρχές του 21ου αιώνα. Σήμερα στην πρώτη δεκαετία αυτής της επιστημονικής ειδίκευσης όπου έχουν φανεί ήδη τα πρώτα αποτελέσματα στο επίπεδο της φαρμακευτικής βιομηχανίας, χρησιμοποιούνται ευρέως οι συστημικές θεωρήσεις για την ανακάλυψη φαρμάκων.

Στο πνεύμα αυτό κινήθηκε και η παρούσα εργασία. Η ανάλυση που έγινε στα δεδομένα ήταν με βάση αυτό το σκεπτικό. Εδώ θα πρέπει να τονίσουμε το γεγονός ότι στην Κλινική από το 2004 περίπου θεωρούσαμε ότι η θεώρηση των βιολογικών φαινομένων μπορούσε να ολοκληρωθεί και να ωριμάσει μέσα από τη ζεύξη των βιοεπιστημών με κλασσικές θετικές επιστήμες, όπως η φυσική και τα μαθηματικά. Η ιδέα δεν είναι νέα αλλά ουσιαστικά στις αρχές του 2000 άρχισε μια συστηματική τάση προς την κατεύθυνση αυτή. Προς ενημέρωση αναφέρουμε δύο χρόνια αργότερα στο πανεπιστήμιο Harvard των Ηνωμένων Πολιτειών ξεκίνησε ακριβώς η ίδια προσπάθεια από ομάδα επιστημόνων. Για ακαδημαϊκή ενημέρωση παραθέτουμε την ιστοσελίδα της πρωτοβουλίας αυτής: http://www.physicalbiology.fas.harvard.edu/. Πολύ ενδιαφέρουσα είναι η αναφορά της πρωτοβουλίας του Harvard στο γεγονός ότι θεωρούν ότι αυτό είναι το μέλλον των βιοεπιστημών και μάλιστα ξεκίνησαν αυτό το πρόγραμμα ώστε να διαμορφώσουν το μέλλον της λεγόμενης *Φυσικής Βιολογίας* και εν γένει το μέλλον των βιοεπιστημών. Επίσης σε μια πρόσφατη αναφορά έγινε προσπάθεια, και μάλιστα επιτυχής, για προσομοίωση ενός ολόκληρου οργανισμού και συγκεκριμένα

του *Mycoplasma genitalium*. Η προσομοίωση αυτή κατάφερε να δημιουργήσει ένα πλήρως ψηφιακό μοντέλο του οργανισμού ανοίγοντας το δρόμο σε νέες μεθοδολογίες και προβλέψεις για τα βιολογικά συστήματα (Karr, Sanghvi et al. 2012).

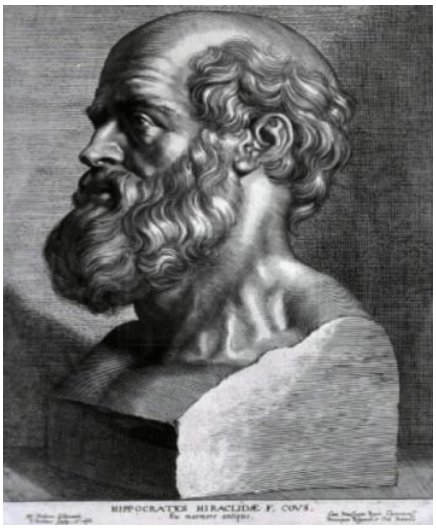
Τέλος, πρέπει να αναφέρουμε ότι όλα τα διαγράμματα, απεικονίσεις και θεωρητικές μελέτες που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία είναι προϊόν του εργαστηρίου και δεν έχουν παρθεί από το διαδίκτυο, βιβλία ή άλλες πηγές. Προσπαθήσαμε, στο μέτρο του δυνατού, να αναπαράγουμε πρωτογενώς όλα τα διαγράμματα που χρειάστηκαν και θεωρήθηκαν αναγκαία για την υποστήριξη του θεωρητικού υποβάθρου της παρούσας διατριβής. Όπου έχει γίνει αναπαραγωγή από άλλες πηγές, τις αναφέρουμε και η προσπάθεια μας ήταν, αυτό να γίνει στο ελάχιστο δυνατό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Η μελέτη του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ), η νευροβιολογία και ειδικότερα η νευροβιολογία των νεοπλασιών, θεωρούνται σύγχρονες ειδικότητες και σχετικά σε νεανική ηλικία σε σχέση με άλλους τομείς των επιστημών υγείας και ζωής. Για το λόγο αυτό, είναι ιδιαιτέρα ενδιαφέρον το θέμα της γνώσης του ΚΝΣ. Για αυτό αφιερώνουμε ένα μικρό μέρος στην ιστορική αναδρομή της μελέτης του και στην πορεία που ακολουθήθηκε από την αρχαιότητα μέχρι το σήμερα.

Η ιστορία μας δείχνει ότι οι πρώτες αναφορές είχαν ήδη γίνει από τον Ιπποκράτη[2] (*Ιπποκράτης, 460 π.χ.-370 π.χ.*) (**Εικόνα 1**), πριν 2500 χρόνια, όπου ο τελευταίος θεωρούσε τον ανθρώπινο εγκέφαλο ως το κέντρο της σκέψεως, των συναισθημάτων και της εφυϊας. Τη σκέψη αυτή κληρονόμησε και διετήρησε αργότερα ο *Γαληνός* (**Εικόνα 3**) (*Γαληνός, Σεπτέμβριος 129 μ.χ.-199/217 μΧ.*). Ειδικότερα ο Ιπποκράτης άφησε γραπτές παρατηρήσεις για τη συσχέτιση μεταξύ του ασθενούς και του υγειούς εγκεφάλου. Χρησιμοποιώντας τα λόγια του ιδίου: «*Ο άνθρωπος πρέπει να γνωρίζει ότι η λογική προέρχεται από τον νου και μόνον από αυτόν. Η ευχαρίστηση, η χαρά, η ιλαρότητα και η αστειότητα αλλά και η θλίψη, το πείσμα, αλλά το καλό και το κακό και τα δάκρυα προέρχονται από αυτό το όργανο. Επίσης μόνο μέσω αυτού εκπορεύονται ο φόβος και ο τρόμος, η αϋπνία, τα λάθη, η αγωνία και η ανεπιθύμητη συμπεριφορά εκπορεύονται από τον εγκέφαλο*…» (μ.τ.σ).



Εικόνα 1. Ιπποκράτης (έργο του *Peter Paul Rubbens,* 1638)**.**
(*Πηγή:* http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%91%CF%81%CF%87%CE%B5%CE%AF%CE%BF:Hippocrates_rubens.jpg)

[2] Πολλές από τις ιδέες του Ιπποκράτη βρίσκουν εφαρμογή και θεωρούνται αληθείς μέχρι σήμερα. Ειδικότερα δε ορισμένα από τα φαρμακευτικά σκευάσματα που χρησιμοποιούσε χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα και ως παράδειγμα αναφέρουμε την κηραλοιφή, ένα μίγμα από λάδι και κερήθρα μέλισσας που μέχρι σήμερα χρησιμοποιείται και παρασκευάζεται στα πλαίσια μιας παράδοσης που έχει μεταφερθεί μέσα από τους αιώνες, από στόμα σε στόμα.

Εικόνα 2. Το «Ασκληπιείο» της Κω.

Εικόνα 3. Γαληνός. Λιθογραφία του *Pierre Roche Vigneron*. (Παρίσι: *Lith de Gregoire et Deneux*, ca. 1865).
(Πηγή: http://en.wikipedia.org/wiki/Galen).

Από τον Γαληνό και μέχρι την Αναγέννηση διατηρήθηκε η σκέψη και θεωρία ότι ο εγκέφαλος λειτουργούσε ως αδένας. Την ίδια αντίληψη για τη λειτουργία του εγκεφάλου διατήρησαν και οι Ρωμαίοι και αυτό δεν άλλαξε παρά μόνον μετά από 1500 χρόνια μετά, όταν ο ανατόμος *Vesalius*[3] (*Andreas Vesalius, 31 Δεκεμβρίου 1514 - †15Οκτωβρίου 1564*) (**Εικόνα 4**) παρουσίασε τη μακροσκοπική δομή του εγκεφάλου εδραιώνοντας την ανατομική μελέτη.

Περίπου 1300 χρόνια αργότερα ο ανατόμος *Vesalius* μελέτησε τη μορφολογία και ανατομία του εγκεφάλου δημιουργώντας μάλιστα τους πρώτους χάρτες της ανατομίας του. Σχεδόν επί τρεις αιώνες, δεν υπήρξε περαιτέρω μελέτη πάνω στις εργασίες του *Vesalius* για τη λειτουργία του εγκεφάλου. Το έτος 1543, ο *Vesalius* μαζί με τον *Johannes Oporinus* εξέδωσαν ένα επτάτομο έργο για την ανθρώπινη ανατομία με τον τίτλο *De humani corporis fabrica* (*On the fabric of the human body, Περί της Κατασκευής του Ανθρωπίνου Σώματος*) (**Εικόνα 5**). Ένα βασικό και θεμελιώδες έργο πάνω στην ανθρώπινη ανατομία, το οποίο και αφιέρωσαν στον βασιλιά *Κάρολο Ε'* (*Karl V*).

[3] Ο Vesalius κυνηγήθηκε για τις θέσεις και ανακαλύψεις του, αφού θεωρήθηκαν ως αιρετικές.

Εικόνα 5. Το έργο του *Vesalius's*, "*Fabrica*", περιείχε πολλές αξιοπρόσεκτες απεικονίσεις, οι οποίες μάλιστα βρισκόντουσαν σε αλληγορικές παραστάσεις (αριστερά). Η βάση του εγκεφάλου, όπου για πρώτη φορά απεικονίζονται το *Οπτικό Χίασμα*, η Παρεγκεφαλίδα και τα οπτικά νεύρα (δεξιά) (πηγή: www.wikipedia.org).

Το έργο του *Vesalius* επεκτάθηκε σε ολόκληρη την ανατομική του ανθρώπου περιλαμβάνοντας το καρδιαγγειακό, το κυκλοφορικό σύστημα και τις καρδιακές βαλβίδες. Ο *Vesalius* διετύπωσε για πρώτη φορά ότι η καρδιά δεν αποτελεί το κέντρο του νευρικού συστήματος, όπως υποστήριζε ο Αριστοτέλης, και ήταν γενικά αποδεκτό μέχρι την εποχή του, αλλά ο εγκέφαλος. Το έργο του *Vesalius* ήταν ιδιαίτερα σημαντικό για την πρόοδο στο θέμα του ΚΝΣ αφού μελέτησε εκτενώς τη μορφολογία του εγκεφάλου και παρουσίασε για πρώτη φορά νέες δομές, όπως το *Μεσολόβιο* (*Corpus Callosum*), ο *Θάλαμος* (*Thalamus*), ο *Κερκοφόρος Πυρήνας* (*Nucleus Caudatus*), ο *Πυρήνας Φακοειδούς Αγκύλης* (*Nucleus Lenticularis*), η *Ωχρά Σφαίρα* (*Globus Pallidus*), το εγκεφαλικό *Κέλυφος* (*Putamen*), οι *Πυρήνες Προσκεφάλου* (*Nuclei Pulvinares*), το *Penduculus Cerebri* και άλλα.

Η πρόοδος στην έρευνα του ΚΝΣ, ακολουθούσε αργά βήματα. Οι λειτουργικές και φυσιολογικές λειτουργίες του άρχισαν να διερευνούνται 300 χρόνια μετά το έργο του *Vesalius*.

Η πρώτη προσπάθεια της λειτουργικής του εγκεφάλου έγινε από τον *Johann Ludwig Wilhelm Thudichum* (27 Αυγούστου 1829-†7 Σεπτεμβρίου 1901) (**Εικόνα 7**). Ο *Thudichum* θεωρείται ένας από τους πρωτοπόρους των νευροεπιστημών και ειδικότερα της νευροχημείας. Μέρος του έργου του αφορούσε στη χημική ανάλυση περισσοτέρων από χίλιους εγκεφάλους τόσο ανθρώπινης όσο και ζωικής προέλευσης. Ειδικότερα μελέτησε την παθολογική χημεία του εγκεφάλου. Ήταν ο πρώτος που ταυτοποίησε χημικά συστατικά του εγκεφάλου όπως η *Εγκεφαλίνη* (*Encephalin*), η *Σφιγγομυελίνη*

Εικόνα 7. *Johann Ludwig Wilhelm Thudichum* (Πηγή: http://de.wikipedia.org/wiki/Johann_Ludwig_Wilhelm_Thudichum)

(*Sphingomyelin*), η *Γαλακτόζη*, το *Γαλακτικό Οξύ* και άλλα. Το 1884 παρουσίασε το ερευνητικό του έργο με μια δημοσίευση με τίτλο "*A Treatise on the Chemical Constitution of the Brain*". Το έργο αυτό δέχθηκε αυστηρότατες κριτικές από τον τότε επιστημονικό κόσμο και απερρίφθη από τους συναδέλφους του. Μετά τον θάνατό του, το 1901, οι εργασίες του αποτέλεσαν αντικείμενο επανεξέτασης και αναγνωρίσθηκαν ως εξόχως σημαντικές για την επιστήμη. Συνολικά ο *Thudichum* είχε δημοσιεύσει περισσότερες από 80 εργασίες.

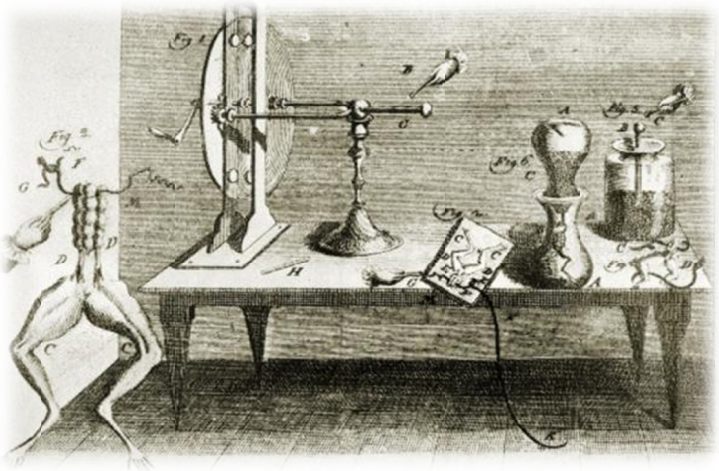
Μια από τις σημαντικότερες μορφές στον τομέα των νευροεπιστημών ήταν ο *Paul Broca* (28 Ιουνίου 1824 – †9 Ιουλίου 1880) (**Εικόνα 6**) (Androutsos and Diamantis 2007). Γεννήθηκε στο *Sainte-Foy-la-Grande* της Γαλλίας και έγινε γνωστός για το έργο του στη μελέτη του πρόσθιου ή μετωπιαίου λοβού (*Lobus Frontalis*) του εγκεφάλου. Το 1861 για πρώτη φορά περιέγραψε τη μορφολογία του μεσολόβιου τμήματος του εγκεφάλου (*limbic system*, *Corpus Callosum*), που σήμερα είναι γνωστό ως *μεσολόβιο σύστημα*. Το *Κέντρο του Broca*, όπως ονομάστηκε, αφορούσε στο τμήμα του μετωπιαίου λοβού που ελέγχει τις κινητικές λειτουργίες και τον λόγο. Ο *Broca* διετέλεσε μέλος της Ανθρωπολογικής, Εθνολογικής και Προϊστορικής Εταιρείας του Βερολίνου. Αξίζει να σημειωθεί ότι περί τα 1860 ο *Paul Broca* κούραρε έναν ασθενή ονόματι *Monsieur Tan*. Η λέξη „*Tan*" ήταν η μοναδική φράση που μπορούσε ο εν λόγω ασθενής να ψελλίσει, παρότι η κατανόηση του λόγου ήταν φυσιολογική. Μετά το θάνατο του κυρίου *Tan* η νεκροψία που έγινε έδειξε ότι ο εγκέφαλος παρουσίαζε μορφολογικές ανωμαλίες όπως κακώσεις στο μετωπιαίο λοβό. Στην **Εικόνα 9** μπορούμε να δούμε τη μορφολογία των κακώσεων αυτών. Το εύρημα αυτό οδήγησε τον *Broca* να διατυπώσει τη θεωρία ότι η συγκεκριμένη ανατομική θέση του εγκεφάλου ήταν άμεσα συνδεδεμένη με το κέντρο του λόγου στον άνθρωπο. Αυτή η παρατήρηση ήταν η πρώτη που συνέδεσε μορφολογικές-ανατομικές ανωμαλίες με νευρολογικές διαταραχές. Πάρα ταύτα, οι λειτουργικές ιδιότητες του εγκεφάλου ήταν παντελώς άγνωστες. Για έναν ολόκληρο αιώνα είχε δοθεί μεγαλύτερη προσοχή στη μορφολογική και ανατομική μελέτη του εγκεφάλου και λιγότερο στη λειτουργική.

Εικόνα 6. *Paul Broca*. (Πηγή: http://de.wikipedia.org/wiki/Paul_Broca).

Εικόνα 9. Ο εγκέφαλος του *κου Tan,* όπου φαίνονται οι μορφολογικές αλλοιώσεις των μετωπιαίων λοβών, στους οποίους οφείλετο η γλωσσική διαταραχή. Με τη μελέτη αυτή ήταν η πρώτη φορά που συνδέθηκαν οι μορφολογικές εγκεφαλικές κακώσεις με νευρικές δυσλειτουργίες.
(πηγή: http://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Monsieur_tan_gehirn.jpeg).

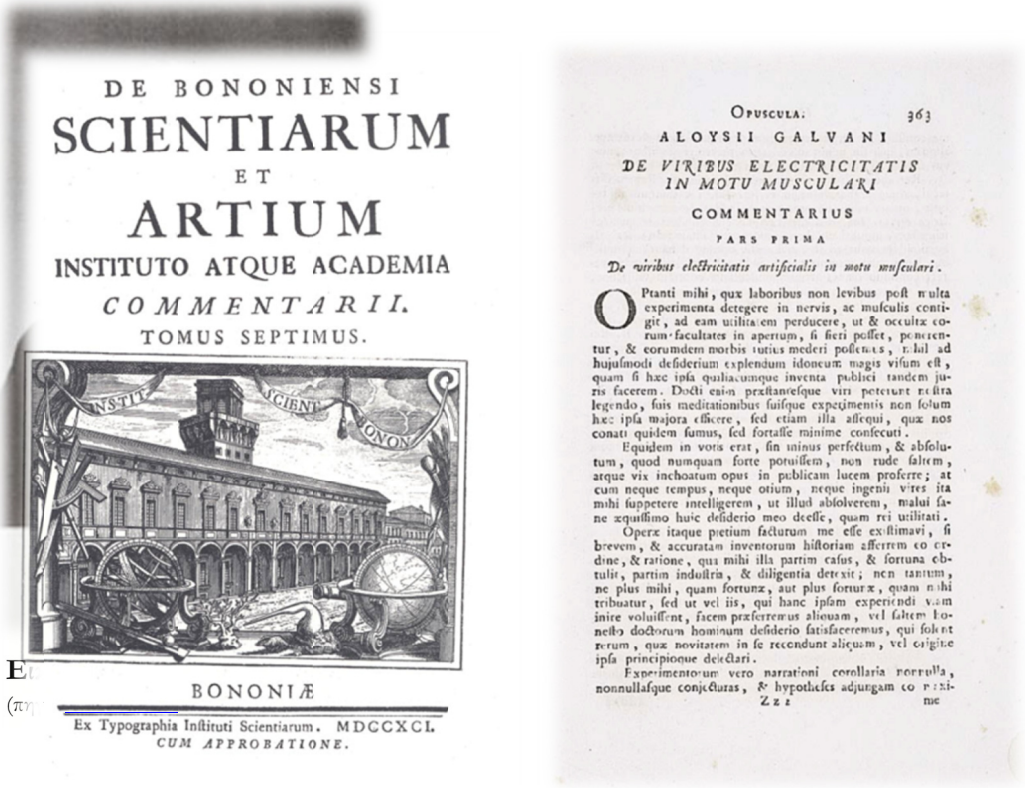
Αρκετά χρόνια όμως πριν τον *Broca* ένας άλλος επιστήμονας ο Ιταλός ιατρός, ανατόμος και βιοφυσικός *Galvani Luigi* (*Luigi Galvani* 9 Σεπτεμβρίου 1737, Bologna - †4 Δεκεμβρίου 1798) (**Εικόνα 8**), είχε διατυπώσει ήδη τις πρώτες θεωρίες για την ηλεκτρική φύση της μετάδοσης σήματος στους νευρώνες. Ο *Galvani* είχε σπουδάσει αρχικά θεολογία και αργότερα μελέτησε ιατρική στην Bologna και το 1775 ασχολήθηκε με την πρακτική ανατομία. Από τα πρώτα έργα του ήταν το *De renibus atque urethris volatilium* (*Περί των Νεφρών και Ουρικών Οδών των Πτηνών μ.τ.σ.*), όπου ασχολήθηκε με τη φυσιολογία των πτηνών. Στις 6 Νοεμβρίου του 1780, ενώ προσπαθούσε να αποδείξει ότι οι όρχεις των βατράχων βρίσκονται στα πόδια τους, ανακάλυψε ένα φαινόμενο που αργότερα ονομάστηκε *Γαλβανισμός*. Ο *Galvani* απέδειξε πειραματικά ότι οι συσπάσεις των μυών σχετίζονται με ηλεκτρικά φορτία. Ειδικότερα παρατήρησε ότι οι μυς του βατράχου συσπώνται όταν έρθουν σε επαφή με ένα χάλκινο και ένα σιδερένιο ηλεκτρόδιο (**Εικόνα 10**). Ο *Galvani* δεν γνώριζε τότε τη σημασία των ευρημάτων του ούτε γνώριζε το μηχανισμό μέσω του οποίου η διάταξή του λειτουργούσε, όπως λειτουργούσε. Πάρα ταύτα, είχε θέσει τις βάσεις για τη δημιουργία της πρώτης *ηλεκτροχημικής κυψέλης* που αναπτύχθηκε αργότερα από τον *Alessandro Volta.*

Εικόνα 8. Luigi Galvani (πηγή: www.wikipedia.org).



Εικόνα 10. Η πειραματική διάταξη του Galvani με τους μυς βατράχων, όπως δημοσιεύθηκε στο έργο του *De viribus electricitatis in motu musculari* (πηγή: www.wikipedia.org).

Το έργο αυτό το δημοσίευσε το 1791 στη Bologna με τον τίτλο *De viribus electricitatis in motu musculari* (*Περί των Ηλεκτρικών Δυνάμεων στην Κίνηση των Μυών*) (**Εικόνα 11**). Μέσα από τα πειράματά του ο *Galvani* παρατήρησε ότι οι μυς του βατράχου συσπώντουσαν όταν ερχόντουσαν σε επαφή με τη μεταλλική λεπίδα ενός μαχαιριού και θεώρησε ότι το φαινόμενο αυτό ήταν παρόμοιο με τον σπινθήρα που παραγόταν από τη συσκευή παραγωγής στατικού ηλεκτρισμού. Ήταν πεπεισμένος ότι και η έκκληση κεραυνών (με βάση το έργο του *Benjamin Franklin*)προήρχετο από το ίδιο φαινόμενο μόνο που ήταν σε μεγαλύτερη κλίμακα. Με τις σκέψεις αυτές έθετε ουσιαστικά τις βάσεις για την ανεύρεση της διαφοράς δυναμικού. Για να το αποδείξει αυτό πραγματοποίησε ένα πείραμα όπου συνέδεσε ένα μονωμένο καλώδιο από την οροφή ενός σπιτιού στους μύες του βατράχου και από εκεί ένα δεύτερο καλώδιο οδηγούσε σε μια πηγή. Όταν υπήρχε κεραυνός δηλαδή ηλεκτρική εκκένωση στην ατμόσφαιρα, οι μύες του βατράχου συσπώντουσαν και μάλιστα παρατήρησε ότι αυτό συνέβαινε πριν τη βροντή που ακολουθούσε τον κεραυνό. Με το πείραμα αυτό, έθεσε τις βάσεις για τη θεωρία του ηλεκτρικού πεδίου και απέδειξε περαιτέρω την ηλεκτρική φύση των μυϊκών συσπάσεων.



DE BONONIENSI
SCIENTIARUM
ET
ARTIUM
INSTITUTO ATQUE ACADEMIA
COMMENTARII.
TOMUS SEPTIMUS.

BONONIÆ

Ex Typographia Instituti Scientiarum. MDCCXCI.
CUM APPROBATIONE.

Opuscula. 363

ALOYSII GALVANI

DE VIRIBUS ELECTRICITATIS IN MOTU MUSCULARI

COMMENTARIUS

PARS PRIMA

De viribus electricitatis artificialis in motu musculari.

Optanti mihi, quæ laboribus non levibus post multa experimenta detegere in nervis, ac musculis contigit, ad eam utilitatem perducere, ut & occultæ eorum facultates in apertum, si fieri posset, penetrentur, & eorumdem morbis iuvis mederi possemus, nihil ad hujusmodi desiderium explendum idoneum magis visum est, quam si hæc ipsa quæcumque inventa publici tandem juris facerem. Docti enim præstantesque viri peterent recta legendo, suis meditationibus suisque experimentis non solum hæc ipsa majora efficere, sed etiam illa assequi, quæ nos conati quidem sumus, sed fortasse minime consecuti.

Equidem in vobis erat, sin minus perfectum, & absolutum, quod numquam forte potuissem, non rude saltem, atque vix inchoatum opus in publicam lucem proferre; at cum neque tempus, neque otium, neque ingenii vires ita mihi suppetere intelligerem, ut illud absolverem, malui sane æquissimo huic desiderio meo deesse, quam rei utilitati.

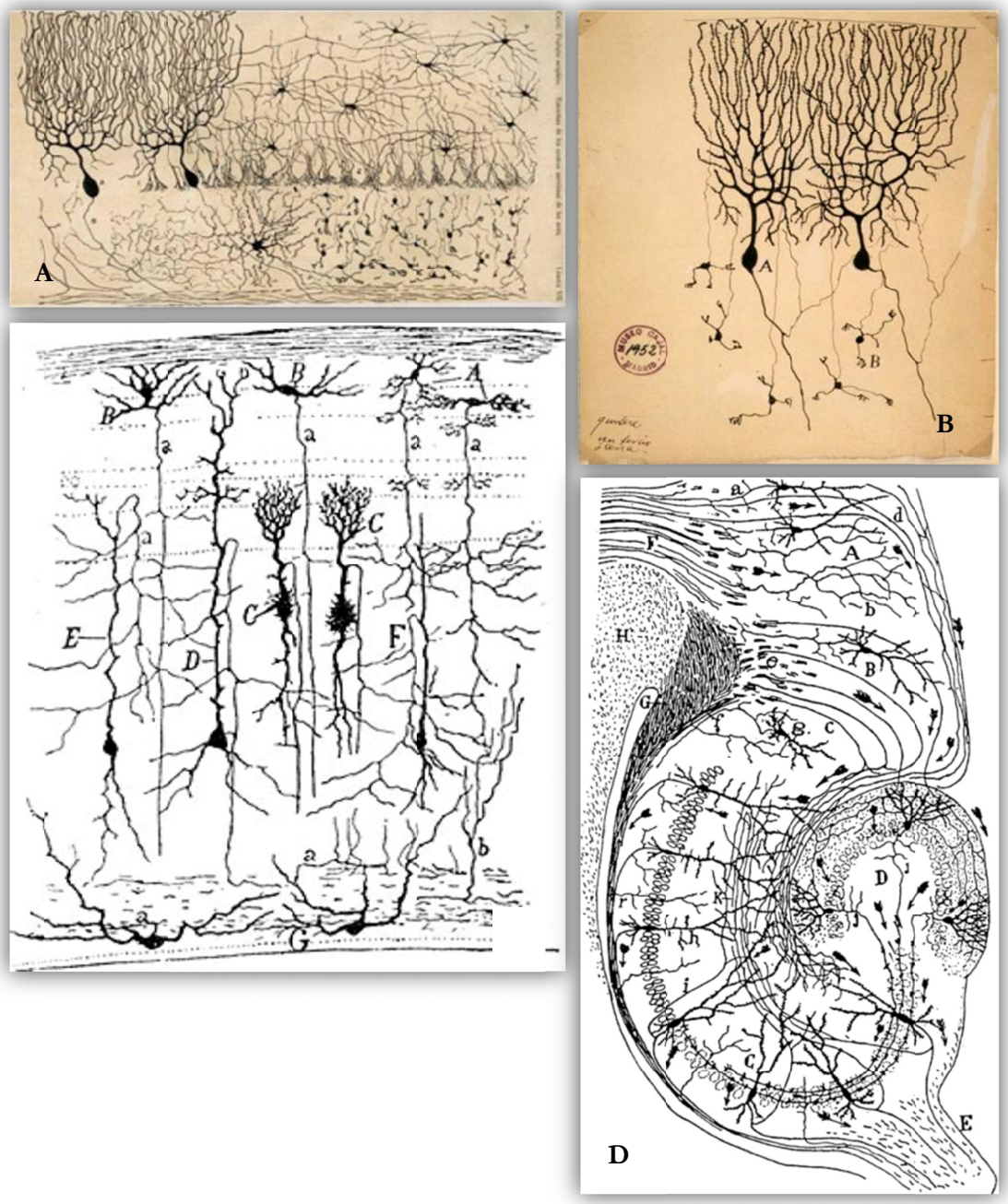
Operæ itaque pretium facturum me esse existimavi, si brevem, & accuratam inventorum historiam afferrem eo ordine, & ratione, qua mihi illa partim casus, & fortuna obtulit, partim industria, & diligentia detexit; non tantum, ne plus mihi, quam fortunæ, aut plus fortunæ, quam mihi tribuatur, sed ut vel iis, qui hanc ipsam experiendi viam inire voluissent, facem præferremus aliquam, vel saltem honesto doctorum hominum desiderio satisfaceremus, qui solent rerum, quæ novitatem in se recondunt aliquam, vel exigitæ ipsa principioque delectari.

Experimentorum vero narrationi corollaria nonnulla, nonnullasque conjecturas, & hypotheses adjungam eo præsi-

Zzz me

Εικόνα 11. Το έργο του Galvani, όπως τυπώθηκε στην επιθεώρηση του πανεπιστημίου της *Bologna* το 1791 με τον τίτλο *De Bononiensi Scientiarum et Artium*. Το έργο του ήταν στη σελίδα 363 με τη μορφή *Opuscula*, δηλαδή *Σύντομη Ανασκόπηση* και τον τίτλο *De Viribus Electricitatis In Motu Musculari* (πηγή: www.wikipedia.org).

Αργότερα, αρχές του 20ου αιώνα ο Ισπανός ανατόμος *Ramón y Cajal* (1 Μαΐου 1852, Petilla de Aragón, Navarra, Ισπανία-†18 Οκτωβρίου 1934, Madrid) (**Εικόνα 12**), ο οποίος το 1906 μοιράστηκε το βραβείο Νόμπελ Ιατρικής με τον ιατρό και φυσιολόγο, *Camillo Golgi*, για το έργο του επί της δομής του νευρικού συστήματος. Ο *Ramón y Cajal* εργάσθηκε προ πάντων στη δομή και αναλυτική μορφολογία των νευρώνων και ειδικότερα αυτών του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού. Η εργασία του *Ramón y Cajals* περιελάμβανε την ιστολογική χρώση των νευρώνων και ο διαχωρισμός τους με λεπτομέρεια. Ήταν η πρώτη φορά που διατυπώθηκε η θεωρία ότι ο εγκέφαλος αποτελείται από εκατομμύρια νευρώνες και ότι οι νευρώνες αυτοί συνδέονται με ειδικές απολήξεις, που τις ονόμασε *συνάψεις* (**Εικόνα 13**). Μάλιστα, διατυπώθηκε η θεωρία ότι στους νευρώνες υπήρχε διαφορά δυναμικού. Η έννοια της «σύναψης» είχε πρώτα διατυπωθεί από τον *Charles Scott Sherrington* το 1897. Η υπόθεση αυτή, ότι δηλαδή οι νευρώνες είναι συνδεδεμένοι μεταξύ τους και ειδικότερα ότι η βασική μονάδα του εγκεφάλου και του ΚΝΣ εν γένει είναι ο νευρώνας, ήταν μια επανάσταση για την εποχή εκείνη. Αυτό μάλιστα που είχε ανακαλυφθεί με τα απλά μέσα της εποχής αργότερα απεδείχθη με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας.



Εικόνα 13. Απεικόνιση των νευρώνων του ημισφαιρίου του εγκεφάλου όρνιθας. Από το έργο του Cayal "Estructura de los centros nerviosos de las aves", (Madrid, 1905) (**A**). Απεικόνιση των κυττάρων *Purkinje* του ημισφαιρίου του εγκεφάλου του περιστεριού, του Ramón y Cajal, από δημοσίευση του 1899 (*Instituto Santiago Ramón y Cajal*, Μαδρίτη, Ισπανία) (**B**). Απεικόνιση του οπτικού χιάσματος του σπουργίτη από το έργο του *Ramón y Cajal* "*Estructura de los centros nerviosos de las aves*", (Μαδρίτη, 1905) (**C**). Απεικόνιση των νευρωνικών συνδέσεων του ιππόκαμπου τρωκτικού, από το έργο του *Ramón y Cajal*, "*Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertebretes*", Vol. 1 και 2. *A. Maloine,* Paris 1911 (**D**) (πηγή: www.wikipedia.org).

Σε συνέχεια της εργασίας του ο *Ramón y Cajal* διετύπωσε την κυτταρική μορφολογική δομή του νευρώνα το *αξώνιο* (*Axon*), το κενό μεταξύ των συνάψεων (*gap junctions*) και το ότι οι νευρώνες μπορούσαν να αυξηθούν και να κινηθούν προς την κατεύθυνση χημικών διαβιβαστών, γνωστών αργότερα ως *νευροδιαβιβαστές*, με τη διαδικασία της χημειοταξίας (*Chemotaxis*). Ο *Ramón y Cajal* εργάσθηκε επίσης στις διαφορές του εγκεφάλου μεταξύ του ανθρώπινου εγκεφάλου και αυτού των ζώων. Έτσι, διετύπωσε τη θεωρία του με τα εξής λόγια «*Η λειτουργική ανωτερότης του ανθρώπινου εγκεφάλου έγκειται στο γεγονός ότι έχει ασυνήθιστα μεγαλύτερη και περιπλοκότερη δομή νευρώνων από αυτή των ζώων…*» (μ.τ.σ.).

Εικόνα 14. *Jaroslav Heyrovský (Πηγή: http://en.wikipedia.org/wiki/Jaroslav_Heyrovsky).*

Η γνώση που αποκτείτο επί των θεμάτων των νευροεπιστημών ήταν εντυπωσιακή μέσα στους αιώνες μελέτης τους. Πάρα ταύτα, πάντα υπήρχε ένα πρόβλημα στην περαιτέρω ανακάλυψη των μυστικών του νευρικού συστήματος, που ήταν η έλλειψη κατάλληλης μεθοδολογίας. Στα μέσα του 20ου αιώνα δόθηκε ένα «όπλο» στις νευροεπιστήμες και αυτό ήταν η *Πολαρογραφία*. Η μέθοδος αυτή ανακαλύφθηκε από τον *Jaroslav Heyrovský* (20 Δεκεμβρίου 1890, Πράγα - † 27 Μαρτίου 1967, Πράγα) (**Εικόνα 14**). Ο *Jaroslav Heyrovský* ήταν ένας Τσέχος Φυσικοχημικός. Η μεγάλη του συνεισφορά ήταν στην ανάπτυξη της μεθόδου της Πολαρογραφίας. Για την ανακάλυψη αυτή έλαβε το βραβείο Νόμπελ Χημείας το 1959 (Elving 1967). Ο *Jaroslav Heyrovský* σπούδασε το 1909 φυσική, μαθηματικά και χημεία στο Πανεπιστήμιο της Πράγας. Μέχρι το 1950 διετέλεσε διευθυντής του νέου ινστιτούτου πολαρογραφίας στο Πανεπιστήμιο του Καρόλου.

Η βασική του ανακάλυψη αφορούσε στη χρήση υδραργύρου ως ηλεκτρόδιο για την ανίχνευση χημικών ενώσεων, που μπορούσαν να οξειδωθούν. Ουσιαστικά, η ανακάλυψη αυτή ήταν η συνέχεια των ανακαλύψεων του *Galvani* και του *Volta*, που είχαν θέσει τις βάσεις της ηλεκτροχημείας. Μάλιστα η ιδιαιτερότητα της ανακάλυψης του *Heyrovský* έγκειτο στο γεγονός ότι ήταν πρώτα από όλα ποσοτική και κατά δεύτερον μπορούσε κανείς να καταγράψει τις τιμές. Το 1921 ήταν ουσιαστικά η χρονιά, όπου ο *Heyrovský* εφάρμοσε τη μέθοδο της ηλεκτροχημείας, για να μετρήσει την οξειδοαναγωγή από τις χημικές ενώσεις μέσα σε μια κυψέλη (Barnes, Belcher et al. 1967). Η μέθοδος αυτή, κατέστησε δυνατή την ανίχνευση ιόντων μετάλλων σε ποσότητες της τάξεως των μικρογραμμαρίων (10... 100 μmol/lt). Ο *Heyrovský* το 1924 ανέπτυξε μαζί με το συνεργάτη του *Shikato* τον ηλεκτρομηχανικό πολαρογράφο. Η συσκευή αυτή, μπορούσε αυτόματα να μετρήσει τις

τιμές των οξειδωμένων χημικών ενώσεων και ιόντων κάνοντας εύκολη την αυτοματοποιημένη μέτρηση και πειραματισμό (Barnes, Belcher et al. 1967). Η χρήση της ανακάλυψης του *Heyrovský* βρήκε εφαρμογή στις βιολογικές επιστήμες και νευροεπιστήμες με την ανάπτυξη της *βολταμετρίας*. Η μέθοδος αυτή, μπορούσε να μετρήσει βιολογικές χημικές ενώσεις, που μπορούσαν να υποστούν οξειδοαναγωγή. Η βασική ιδέα, βασιζόταν στην κύρια ιδέα της πολαρογραφίας, που ήταν ότι όταν ένα ηλεκτρικό φορτίο δηλαδή ρεύμα διαπερνά ένα διάλυμα, τότε ενώσεις που μπορούν να χάσουν ή να κερδίσουν ηλεκτρόνια οξειδώνονται ή ανάγονται και με τη σειρά τους παράγουν μια διαφορά δυναμικού και αυτή είναι μετρήσιμη. Η διαδικασία αυτή είναι η μοναδική που επέτρεψε τη μέτρηση των νευροδιαβιβαστών και μάλιστα σε πραγματικό χρόνο.

Ερχόμενοι στο σήμερα, οι μέθοδοι και η πρόοδος που έχει επιτευχθεί μας έχει δώσει τη δυνατότητα να μπορούμε να μελετήσουμε πλέον τη βιολογία των νευρώνων σε τέτοια λεπτομέρεια ώστε να είμαστε σε θέση να εξετάσουμε όλο το γονιδίωμα σε ένα μόνο πείραμα. Πάρα ταύτα, οι γνώσεις μας για τους μηχανισμούς των νευρώνων παραμένουν λιγοστές και χρήζουν περαιτέρω μελέτης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΟΓΚΟΙ ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Η μελέτη των νεοπλασιών εν γένει, έχει σύντομη ιστορία όσον αφορά στη συστηματική μελέτη τους. Επί παραδείγματι, η πρώτη περιγραφή της λευχαιμίας ως ξεχωριστής κλινικής οντότητας έγινε το 1845, από τον *John Hughes Bennett* (1812-1875), παθολόγο του *Royal Infirmary Edinburgh*, στο άρθρο του με τίτλο, "*Case of hypertrophy of the spleen and liver in which death took place from suppuration of the blood*", που δημοσιεύθηκε στο *Edinburgh Medical and Surgical Journal*, τον Οκτώβριο του 1845 (Bennet 1845). Σήμερα, σύμφωνα με την κατάταξη της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (ΠΟΥ), η νόσος ορίζεται ως η παρουσία λεμφοβλαστών σε ποσοστό πάνω από 20% στο μυελό των οστών ή το περιφερικό αίμα. (Harris, Jaffe et al. 1999). Η Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία, (ΟΛΛ) είναι νόσος του γονιδιώματος του κυττάρου, με διαταραχή στον πολλαπλασιασμό, στη διαφοροποίηση και στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση), με αποτέλεσμα τη δημιουργία μονοκλωνικού πληθυσμού, έκπτωση της λειτουργίας του μυελού των οστών και μοιραία έκβαση αν αφεθεί χωρίς θεραπεία (Τζωρτζάτου-Σταθοπούλου 1994). Η ΟΛΛ, παραμένει η πιο συχνή κακοήθεια στα παιδιά. Αποτελεί το 25% όλων των νεοπλασιών της παιδικής ηλικίας και το 75% όλων των περιπτώσεων της παιδικής λευχαιμίας. Περίπου 4.900 παιδιά διαγιγνώσκονται με ΟΛΛ κάθε χρόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, (ΗΠΑ), με επίπτωση τρεις με τέσσερεις περιπτώσεις ανά 100.000 σε καυκάσια φυλή. (Jemal, Tiwari et al. 2004). Η μέγιστη επίπτωση της ΟΛΛ συμβαίνει μεταξύ των δύο και πέντε χρόνων και τείνει να κατευθύνεται προς μικρότερες ηλικίες στις δυτικές χώρες (McNally, Rowland et al. 1997), είναι πιο συχνή στη λευκή φυλή και στα άρρενα. (Pui, et al., 1999; Reiter, et al., 1994) (Κουλτούκη 2011).

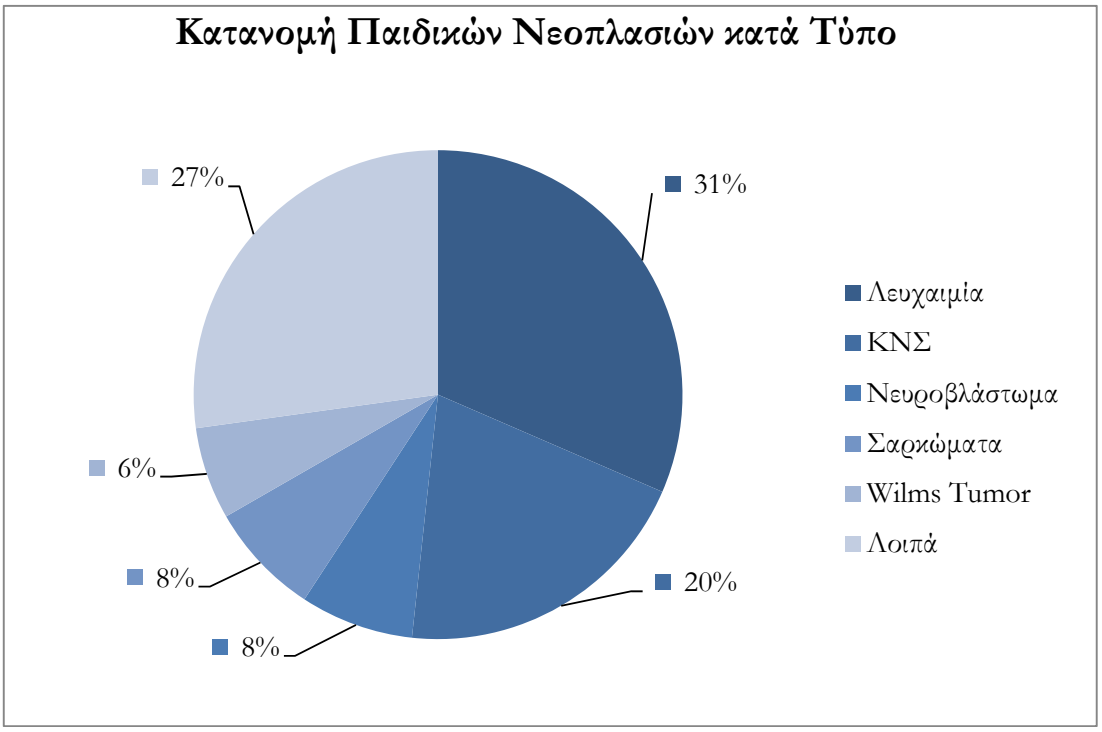
Αντίστοιχα με τη μελέτη του ΚΝΣ, εν γένει, και της περιγραφής της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας, ένα δύσκολο πεδίο έρευνας αποτέλεσε η μελέτη των όγκων του ΚΝΣ. Οι νεοπλασίες αυτές αποτελούν μια ειδική περίπτωση κακοηθειών, όχι μόνο λόγω της κακής πρόγνωσης αλλά της δυσκολίας κατανόησης της βιολογίας και της δυσκολίας θεραπείας τους. Ειδικότερα, οι νεοπλασίες αυτές παίρνουν ιδιαίτερα βαρύνουσα σημασία στα παιδιά. Ακόμα και σε περιπτώσεις ιάσεως των νεοπλασιών αυτών, οι παρενέργειες από τη θεραπεία είναι τέτοιες ώστε έχουν επιπτώσεις στην ποιότητα ζωής του ασθενούς. Άρα, η μελέτη αυτών των νεοπλασιών αποτελεί ιδιαίτερα κρίσιμο τομέα της έρευνας.

ΜΕΡΙΚΑ ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Η ιστορία των νεοπλασιών του ΚΝΣ πιθανόν να συνδέεται με τις πρώτες προσπάθειες για θεραπεία μέσω της χειρουργικής οδού. Αποτελεί ένα πολύ δύσκολο πεδίο έρευνας η αναζήτηση ιστορικών στοιχείων για τις πρώτες περιπτώσεις διάγνωσης και θεραπείας των νεοπλασιών του ΚΝΣ. Είναι πάντως βέβαιο ότι ήταν γνωστές τουλάχιστον από τις αρχές του 19ου αιώνα μιας και στα τέλη του 19ου (1879) έγινε η πρώτη επιτυχημένη επέμβαση αφαίρεσης ενός όγκου (πιθανολογείται ότι ήταν αφαίρεση μηνιγγειώματος) από νεαρή γυναίκα (Preul 2005). Δεν υπάρχουν πολλά στοιχεία για τη διάγνωση και θεραπεία των όγκων του ΚΝΣ από ιστορική σκοπιά. Ο λόγος πιθανόν είναι ότι δεν ήταν αρκετά γνωστές οι νεοπλασίες αυτές μέχρι και τις αρχές του 20ου αιώνα, όπου και ξεκινάνε οι πρώτες συστηματικές θεραπείες για την αντιμετώπισή τους. Μαζί με τη χειρουργική πρακτική στα τέλη του 19ου αιώνα έρχεται η ακτινογραφία να προσθέσει ένα ακόμα όπλο στη μάχη κατά αυτών των νεοπλασιών, και αυτό στις αρχές του 20ου αιώνα όπου και εμφανίζονται και τα πρώτα συγγράμματα για τη χρήση των ακτίνων-Χ στη διάγνωση των όγκων του ΚΝΣ. Από την εποχή εκείνη μέχρι σήμερα έχει γίνει τεράστια πρόοδος τόσο στο επίπεδο της διαφορικής διάγνωσης όσο και στο επίπεδο της θεραπείας με το 5-ετές προσδόκιμο ζωής να ανεβαίνει σταθερά και μάλιστα με μια σημαντική αύξηση από το 57% το 1975 στο 74% το 2003 (**Πίνακας 1** και **Εικόνα 15**). Εξακολουθεί, πάρα ταύτα να αποτελεί μία πρωτογενή απειλή κινδύνου όταν εμφανισθεί (Αναστασίου 2012).

Κατανομή Παιδικών Νεοπλασιών κατά Τύπο	
Λευχαιμία	31.50%
ΚΝΣ	20.20%
Νευροβλάστωμα	7.50%
Σαρκώματα	7.50%
Wilms Tumor	6.10%
Λοιπά	27.20%
Πηγή: American Cancer Society "Facts and Figures 2001"	

Πίνακας 1. Κατανομή Παιδικών Νεοπλασιών κατά Τύπο.



Εικόνα 15. Κατανομή Παιδικών Νεοπλασιών κατά Τύπο (Πηγή: American Cancer Society "Facts and Figures 2001") (προσαρμοσμένο από (Αναστασίου 2012)).

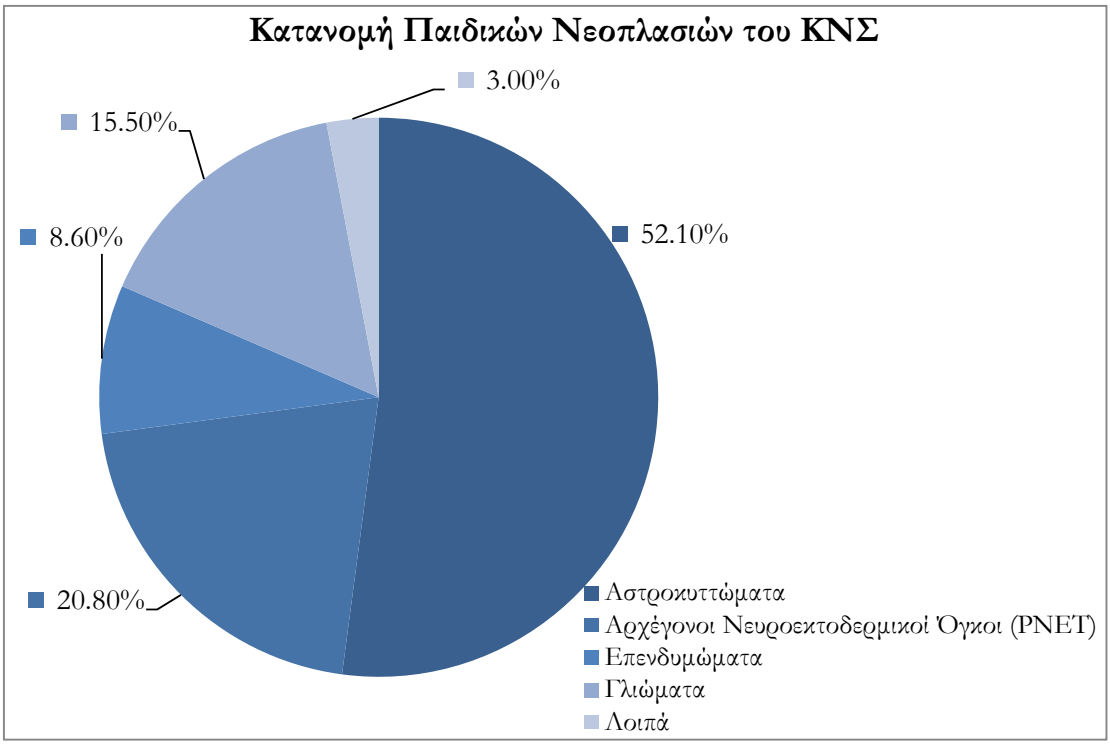
ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Κατά προσέγγιση 2200 άτομα διαγιγνώσκονται με νεοπλασίες του ΚΝΣ κάθε χρόνο στις Η.Π.Α. Στα παιδιά οι νεοπλασίες του ΚΝΣ αποτελούν την πρωταρχική αιτία θανάτων και τη δεύτερη σε συχνότητα τύπο νεοπλασίας (Baldwin and Preston-Martin 2004). Ο γενικός επιπολασμός των παιδικών νεοπλασιών δίνεται στον **Πίνακα 2** όπου φαίνεται ότι, με πρώτη τη λευχαιμία, ακολουθούν οι νεοπλασίες του ΚΝΣ με ποσοστό περί του 20% (**Πίνακας 1** και **Εικόνα 15**). Παρά την μεγάλη πρόοδο που έχει γίνει στο επίπεδο της θεραπείας η πρόγνωση των νεοπλασιών του ΚΝΣ εξακολουθεί να είναι δυσμενής (**Πίνακας 2**).

Τάση στο 5-ετές προσδόκιμο ζωής (%) σε παιδιά κάτω των 15 ετών, Ηνωμένες Πολιτείες, 1975-2003								
Έτος Πρόγνωσης	**1975 έως 1977**	**1978 έως 1980**	**1981 έως 1983**	**1984 έως 1986**	**1987 έως 1989**	**1990 έως 1992**	**1993 έως 1995**	**1996 έως 2003**
Θέση εμφάνισης νεοπλασίας	58	63	67	68	71	76	77	80
Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία	58	66	71	73	78	83	84	87
Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία	19	26	27	31	37	41	42	54
Οστά και αρθρώσεις	51	49	57	59	67	67	74	72
Κεντρικό Νευρικό Σύστημα	57	58	56	62	64	64	70	74
Λέμφωμα Hodgkin	81	88	88	91	87	97	95	95
Νευροβλάστωμα	52	57	57	52	62	76	67	69
Λέμφωμα Non-Hodgkin	43	53	53	70	71	76	81	87
Νεοπλασίες μαλακού ιστού	61	75	75	74	65	80	77	72
Wilms Tumor	73	79	79	91	92	92	92	92

Πίνακας 2. Τάση στο 5-ετές προσδόκιμο ζωής (%) σε παιδιά κάτω των 15 ετών, Ηνωμένες Πολιτείες, 1975-2003.

Η περαιτέρω κατηγοριοποίηση των νεοπλασιών του ΚΝΣ με βάση τη συχνότητα επιπολασμού ανά υποκατηγορία παρουσιάζεται στον **Πίνακας 3**. Το μεγαλύτερο μέρος των νεοπλασιών αυτών συγκεντρώνεται στα Αστροκυττώματα. Ακολουθούν οι Αρχέγονοι Όγκοι Νευροεκτοδερμικής Προελεύσεως (PNET) και κατόπιν τα Επενδυμώματα. Η κατανομή αυτή παρουσιάζεται καλύτερα σχηματικά στην **Εικόνα 16** (Αναστασίου 2012).



Εικόνα 16. Κατανομή των παιδικών νεοπλασιών του ΚΝΣ με βάση τη συχνότητά τους κατά την πρώτη διάγνωση (Πηγή: SEER Pediatric Monograph , 1975-1996, Bethesda, 1999) (προσαρμοσμένο από (Αναστασίου 2012)).

Κατανομή Παιδικών Νεοπλασιών του ΚΝΣ	
Αστροκυττώματα	52.10%
Αρχέγονοι Νευροεκτοδερμικοί Όγκοι (PNET)	20.80%
Επενδυμώματα	8.60%
Γλοιώματα	15.50%
Λοιπά	3.00%

Πίνακας 3. Κατανομή των παιδικών νεοπλασιών του ΚΝΣ με βάση τη συχνότητά τους κατά την πρώτη διάγνωση (Πηγή: SEER Pediatric Monograph , 1975-1996, Bethesda, 1999).

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Η ταξινόμηση των νεοπλασιών του ΚΝΣ αποτελεί από μόνη της μια περίπλοκη εργασία. Η ποικιλομορφία των όγκων αυτών τους κάνει δύσκολους στη σωστή ταξινόμησή τους. Ο κυριότερος παγκόσμιος οργανισμός που έχει εμπεριστατωμένα ασχοληθεί με την ταξινόμηση των νεοπλασιών του ΚΝΣ είναι ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (Π.Ο.Υ) (World Health Organization-WHO). Αρχικά η πρώτη προσπάθεια καταγραφής των ανθρώπινων νεοπλασιών άρχισε το 1956. Χωρίς να επισέλθουμε σε λεπτομέρειες για την ταξινόμηση των νεοπλασιών αυτών, αξίζει να αναφερθούμε στις κυριότερες κατηγορίες νεοπλασιών όπως αυτές ορίζονται από τον Π.Ο.Υ. Στον **Πίνακας 4** παρουσιάζονται οι κυριότεροι τύποι νεοπλασιών του ΚΝΣ (Αναστασίου 2012).

ΟΓΚΟΙ ΤΟΥ ΝΕΥΡΟΕΠΙΘΗΛΙΟΥ
Αστροκυττώματα
Ολιγοδενδριώματα
Ολιγοαστροκυττώματα
Επενδυμώματα
Χωριοϊδείς όγκοι
Λοιποί όγκοι του Νευροεπιθηλίου
Νευρωνικοί και μικτοί γλιακοί όγκοι
Όγκοι της υπόφυσης
Εμβρυονικοί όγκοι
ΟΓΚΟΙ ΤΩΝ ΚΡΑΝΙΑΚΩΝ ΚΑΙ ΣΠΟΝΔΥΛΙΚΩΝ ΝΕΥΡΩΝ
Σβάννωμα (Schwannoma)
Νευροινωμάτωμα
Περινευρίωμα
Κακόηθες περιφερειακό μυέλωμα (Malignant peripheral nerve sheath tumor)
ΟΓΚΟΙ ΤΩΝ ΜΗΝΙΓΓΩΝ
Μηνιγγοθηλιακοί όγκοι
Μεσεγχυματικοί όγκοι
Πρωτογενή μελανοκυτταρικά ογκίδια
Λοιποί όγκοι σχετιζόμενοι με τις μήνιγγες
ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΟΙ ΟΓΚΟΙ
ΚΡΑΝΙΟΦΑΡΥΓΓΙΩΜΑΤΑ
ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟΙ ΟΓΚΟΙ ΤΟΥ ΚΝΣ

Πίνακας 4. Κατηγοριοποίηση των κυριότερων νεοπλασιών του ΚΝΣ βάση της ταξινόμησης κατά Π.Ο.Υ. (Louis, Ohgaki et al. 2007).

Δεν θα επισέλθουμε περαιτέρω στην ταξινόμηση των νεοπλασιών του ΚΝΣ μιας και δεν είναι το αντικείμενο της παρούσης εργασίας. Εντούτοις θα αναφερθούμε στο γεγονός ότι η ταξινόμηση που

περιγράψαμε αφορά στις κυριότερες κατηγορίες των νεοπλασιών αυτών και όχι λεπτομερώς στους επιμέρους τύπους και υπότυπους που χωρίζεται η κάθε μια από αυτές.

ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ

Η παθογένεση των όγκων του ΚΝΣ είναι στο μεγαλύτερο μέρος της άγνωστη. Παρά τη μεγάλη πρόοδο που έχει γίνει στο επίπεδο της διάγνωσης και της θεραπείας, οι μηχανισμοί στους οποίους οφείλονται οι νεοπλασίες αυτού του τύπου είναι αδιευκρίνιστοι. Οι πρώτοι παράγοντες που εξετάζονται πάντα σε όλες τις νεοπλασίες είναι οι περιβαλλοντικοί. Σε πολλές περιπτώσεις νεοπλασιών υπάρχουν επιδημιολογικές μελέτες που συνδέουν περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως χρήση εντομοκτόνων ή χημικών, με την εμφάνιση νεοπλασιών και ειδικότερα παιδικών όπως παραδείγματος χάριν η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία και οι όγκοι του ΚΝΣ, το μυελοβλάστωμα είναι ένας τύπος νεοπλασίας που ανήκει στην οικογένεια των αρχέγονων νευροεκτοδερμικών όγκων και αποτελεί τη συχνότερη μορφή νεοπλασίας του ΚΝΣ στα παιδιά (Rossi, Caracciolo et al. 2008). Για την ογκογένεση των όγκων του ΚΝΣ έχουν αναφερθεί πολλαπλές αιτίες. Μια εξ αυτών αφορά στην παρουσία ιϊκού φορτίου του ιού της πολιομυελίτιδας και ειδικότερα του ιού JC (Pietsch, Taylor et al. 2004). Η παρουσία του ιού αυτού αφορά στην ογκογένεση του μυελοβλαστώματος (Khalili, Krynska et al. 1999). Ένας σημαντικός παράγοντας που έχει μελετηθεί αρκετά στην ογκογένεση του ΚΝΣ αφορά στο ρόλο της οικογένειας των γονιδίων MYC. Ειδικότερα, τα γονίδια CMYC και NMYC έχουν φανεί ότι είναι μεταλλαγμένα σε ένα ποσοστό των όγκων του ΚΝΣ (Badiali, Pession et al. 1991; Tomlinson, Jenkins et al. 1994). Ο ρόλος των γονιδίων αυτών και ειδικότερα του NMYC, φάνηκε να διαδραματίζεται όχι μόνο λόγω της παρουσίας μεταλλάξεων αλλά και λόγω της παρουσίας πολλαπλών αντιγράφων του γονιδίου αυτού (Badiali, Pession et al. 1991). Τέλος, έχει δειχθεί ότι τα γονίδια MYC έχουν προγνωστική αξία για τους όγκους του ΚΝΣ και ειδικότερα τους παιδιατρικούς όγκους (Herms, Neidt et al. 2000).

Ενδιαφέρον έχει πάντως το γεγονός ότι ενώ παρουσιάζονται σε όλους τους τύπους νεοπλασιών, αυτές εμφανίζονται σε ένα ποσοστό. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι δεν είναι οι τελικοί ογκογενετικοί μηχανισμοί αλλά τυχαία γεγονότα που προκαλούνται από τα αίτια της ογκογένεσης. Δεν υπάρχουν πολλές μελέτες επί του θέματος της ογκογένεσης στο ΚΝΣ και ως εκ τούτου, αποτελεί ένα πεδίο έντονης έρευνας μιας και πολλά ερωτήματα παραμένουν αναπάντητα (Αναστασίου 2012).

ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ

Έχει μελετηθεί μέχρι σήμερα ότι πιθανόν να υπάρχουν γενετικοί δείκτες, οι οποίοι να προσδιορίζουν την προδιάθεση προς την ανάπτυξη νεοπλασίας στην παιδική ηλικία. Μάλιστα, ο κατάλογος των υποψήφιων γονιδίων και αντίστοιχων μεταλλαγών έχει αυξηθεί (Ullrich 2008). Στον

Πίνακας 5 παρουσιάζονται μερικά από τα σημαντικότερα γονίδια με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις που δημιουργούν προδιάθεση σε νεοπλασίες (Αναστασίου 2012).

Σύνδρομα που δημιουργούν προδιάθεση για νεοπλασίες			
Νεοπλασματικό Σύνδρομο	**Γνωστή γονιδιακή μετάλλαξη**	**Ταξινόμηση γονιδίου**	**Προκαλούμενη νεοπλασία**
Li-Fraumeni	TP53	Tumor Suppressor	Soft tissue and bone sarcoma, leukemia, breast carcinoma, brain tumor, adrenocortical carcinoma
Familial retinoblastoma	Rb	Tumor suppressor	Retinoblastoma, osteosarcoma, pineal tumors
Wilms'tumor syndromes WAGR syndrome Denys Drash syndrome Frasier syndrome	WT-1	Tumor suppressor	Wilm's tumor
Neurofibromatosis type 1	NF1	Tumor suppressor	Neurofibromas, optic pathway tumors, other brain tumors, leukemia, malignant peripheral nerve sheath tumors
Neurofibromatosis type 2	NF2	Tumor suppressor	Vestibular schwannoma, schwannoma, meningioma
Von Hippel-Lindau	VHL	Tumor suppressor	Renal cell carcinoma, vascular tumors, retinal and central nervous system hemangioblastoma, pheochromocytoma
Tuberous sclerosis	TSC1, TSC2	Tumor suppressor	SEGA, cortical tubers, hamartomas, renal and extrarenal angiomyolipoma, renal cell carcinoma, cardiac rhabdomyomas
Familial breast and ovarian cancer syndrome	BRCA-1	Tumor suppressor	Breast carcinoma, ovarian carcinoma
Familial breast cancer syndrome	BRCA-2	Tumor suppressor	Breast carcinoma, Fanconi anemia, brain tumor
Familial adenomatous polyposis	APC	Tumor suppressor	Colorectal carcinoma, hepatoblastoma, brain tumors (typically medulloblastoma)
Familial melanoma	P16	Tumor	Melanoma

		suppressor	
Nevoid basal cell carcinoma/Gorlin's syndrome	PTCH	Tumor suppressor	Basal cell carcinoma, medulloblastoma, cardiac and ovarian fibroma
Cowden syndrome	PTEN1	Tumor suppressor	Breast cancer, hamartoma
Multiple endocrine (MEN) neoplasia type 2	RET	Oncogene	Thyroid and parathyroid carcinomas, pheochromocytoma
Ataxia telangiectasia	ATM	DNA repair	Leukemia, lymphoma
Nijmegen breakage syndrome	NBS1	DNA repair	Lymphoma, medulloblastoma, glioma, rhabdomyosarcoma
Rhabdoid predisposition syndrome	SNF5/INI1	Growth arrest, DNA repair	Rhabdoid tumors of kidney and brain, choroids plexus tumor

Πίνακας 5. Γνωστά σύνδρομα που προκαλούνται από μεταλλάξεις σε γονίδια, κυρίως tumor suppressor genes, και προδιαθέτουν για την εμφάνιση νεοπλασιών (Ullrich 2008).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΚΑΙ ΝΕΟΠΛΑΣΙΕΣ

Μετά από πολλά έτη έρευνας, η ικανότητα μας να διαγιγνώσκουμε τον καρκίνο, να τον θεραπεύουμε και να αποτρέπουμε τη μετάσταση είναι ακόμα περιορισμένη. Είναι πολύ πιθανό είτε να μας λείπουν ακόμα πολύ βασικές γνώσεις για τη βιολογία του είτε να κοιτάμε προς τη λάθος κατεύθυνση. Όπως θα δούμε και στις επόμενες ενότητες, υπάρχουν θέματα στην ανάλυση και κατανόηση των πειραματικών δεδομένων, τα οποία ενώ λαμβάνονται ως δεδομένα, δεν είναι. Επί παραδείγματι, πρέπει να αναφέρουμε ότι ενώ στις νεοπλασίες ο κυτταρικός πληθυσμός θεωρείτο ομοιογενής, αποδεικνύεται ότι τελικά δεν είναι. Όχι μόνο δεν είναι αλλά στην πορεία απεδείχθη ότι υπάρχουν μικρότερες οικογένειες κυττάρων, τα βλαστικά καρκινικά κύτταρα, τα οποία φαίνεται να υποκινούν τον καρκινικό πολλαπλασιασμό. Πηγαίνοντας ένα βήμα πιο πέρα, δείχθηκε σε πρόσφατη εργασία ότι και αυτά ακόμα τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα δεν είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη μιας νεοπλασίας (Kelly, Dakic et al. 2007). Ένα από αυτά, τα οποία ελαμβάνοντο ως δεδομένα ήταν και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Αναφερόμενοι σε αυτό το φαινόμενο δεν εννοούμε τον κυτταρικό κύκλο, ο οποίος είναι ένα πολύ δύσκολο και περίπλοκο φαινόμενο, αλλά μιλάμε για τη διαίρεση των κυττάρων και την αύξηση του πληθυσμού τους. Το γεγονός, ότι μακροσκοπικά ένας κυτταρικός πληθυσμός αυξάνεται ή μειώνεται θεωρείτο ως κάτι δεδομένο. Έχει δειχθεί όμως ότι η δυναμική που παρουσιάζει ένας πολλαπλασιαζόμενος πληθυσμός μπορεί να γίνει πολύ περίπλοκη και όπως θα δούμε και στις επόμενες ενότητες περιγράφεται και κατανοείται μόνο με τη βοήθεια της χαοτικής μηχανικής.

Έτσι, η αδυναμία μας να προβλέψουμε την πορεία της νεοπλασίας έγκειται στο γεγονός ότι είναι ένα περίπλοκο και πολυπαραγοντικό φαινόμενο που αποτελείται από παράγοντες όπως απόπτωση, εξωκυττάριες σηματοδοτικές οδοί καθώς και ενδοκυττάριες, μεταλλάξεις, μικροπεριβαλλοντικοί παράγοντες, προτεάσες, φλεγμονή, επιγενετικοί παράγοντες και διαφορικός κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Ειδικά, στο τελευταίο είναι αυτό το οποίο θα εστιάσουμε.

Υπάρχουν πολλές θεωρίες, επί παραδείγματι, για τους λόγους τους οποίους οι καλοήθεις όγκοι δεν κάνουν μεταστάσεις. Ο χαμηλός ρυθμός πολλαπλασιασμού, η αδυναμία των κυττάρων αυτών να επιβιώσουν μέσα στον περιβάλλοντα ιστό και εκτός του δικού τους μικροπεριβάλλοντος είναι από τους λόγους που έχουν προταθεί για την ιδιότητα αυτή των κυττάρων. Στον αντίποδα, τα κακοήθη κύτταρα έχουν όλες τις ιδιότητες που λείπουν από τους καλοήθεις όγκους και μάλιστα έχουν τη δυνατότητα του πολλαπλασιασμού σε περιβάλλοντα ακόμα και εχθρικά σε αυτά (Quaranta, Weaver

et al. 2005). Την τελευταία δεκαετία διάφορα μοντέλα κυτταρικού πολλαπλασιασμού και δυναμικής έχουν παρουσιασθεί, τόσο σε συνάρτηση με το χρόνο μόνο όσο και χωρο-χρονικά.

Στο σημείο αυτό πρέπει να ξεχωρίσουμε δύο σημαντικά γεγονότα. Το πρώτο είναι η απαρχή της νεοπλασίας δηλαδή η καρκινογένεση και οι μηχανισμοί της και το δεύτερο είναι, αφού η καρκινογένεση έχει λάβει χώρα, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων. Στην παρούσα εργασία θα ασχοληθούμε με το δεύτερο.

Από τη στιγμή της εμφάνισης του πρώτου κυττάρου (ή των πρώτων μιας και δεν είναι σαφές αν οι νεοπλασίες ξεκινούν από ένα ή περισσότερα κύτταρα) μέχρι το σημείο της διαγνώσεως υπάρχουν πολλά σημαντικά στάδια που πρέπει να γίνουν ώστε να αυξηθεί το νεόπλασμα. Μάλιστα, ο κρίσιμος παράγοντας εδώ είναι ότι ο όγκος δεν γίνεται αντιληπτός παρά μόνο μόλις φτάσει ένα συγκεκριμένο μέγεθος, το οποίο θα προκαλέσει και τα πρώτα συμπτώματα. Μόνο τότε είναι δυνατή η ταυτοποίηση του. Πριν του σημείου τούτου, καμία εικόνα ή γνώση δεν υπάρχει για τη νεοπλασία. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονίσουμε ότι ακόμα και αν υποθέσουμε ότι αυτό θα ήταν εφικτό σε κάποιες συμπαγείς νεοπλασίες, όπως της κοιλιακής χώρας ή του θώρακος, θα εξακολουθούσε να είναι αδύνατο για τις νεοπλασίες του ΚΝΣ, λόγω της ευαίσθητης φύσης του οργάνου αυτού, που αναπτύσσονται σε μια κλειστή κοιλότητα. Άρα χρειαζόμαστε άλλα εργαλεία και γνώση για να μπορέσουμε αποτελεσματικά να αντιμετωπίσουμε αυτού του είδους τις νεοπλασίες. Επί παραδείγματι, θα ήταν εξαιρετικά χρήσιμο να γνωρίζαμε αιματολογικούς δείκτες, οι οποίοι με απόλυτη βεβαιότητα θα έδειχναν την ύπαρξη μιας νεοπλασίας σε πρώιμα στάδια πριν τη διάγνωση, κάτι που όμως προϋποθέτει πολύ βαθιά γνώση των μηχανισμών του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Γενικότερα, θα χωρίζαμε τα μοντέλα κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Η πρώτη αφορά στα μοντέλα των αιματολογικών κακοηθειών και ειδικότερα αυτών που αφορούν στο μυελό των οστών. Η δεύτερη κατηγορία αφορά στους συμπαγείς όγκους, που εμφανίζονται ως μάζα κυττάρων με μια συγκεκριμένη ιστολογική μορφή. Ο διαχωρισμός αυτός είναι απαραίτητος διότι οι δύο αυτοί τύποι νεοπλασιών έχουν μια πολύ βασική διαφορά. Η πρώτη κατηγορία αυξάνεται εν είδη κυτταρικού εναιωρήματος ενώ η δεύτερη ως μια συμπαγής μάζα.

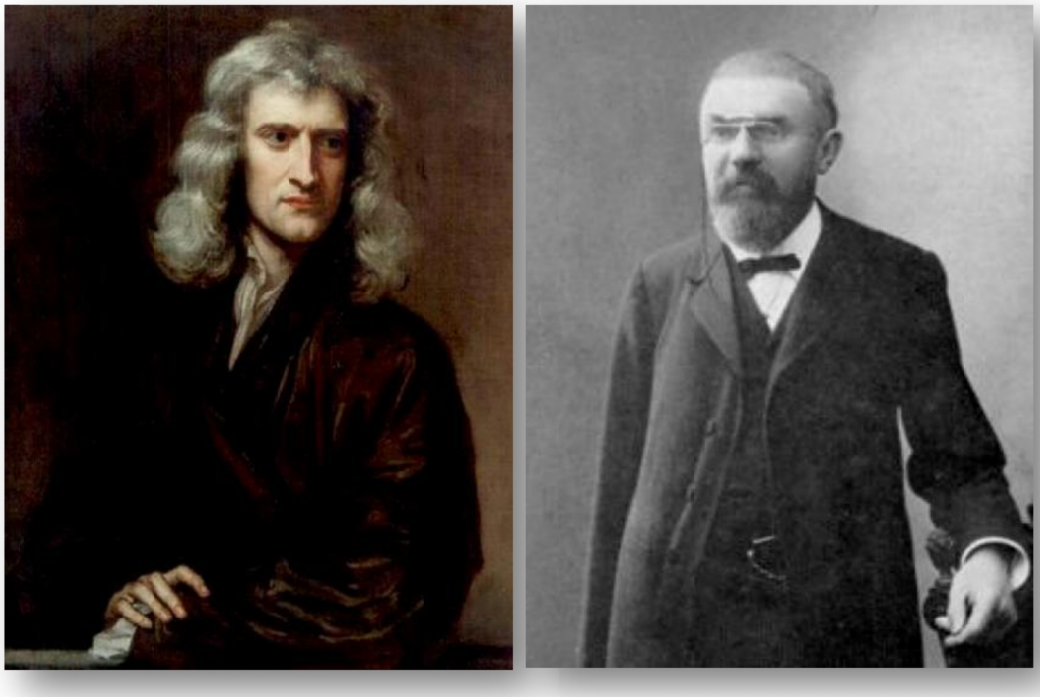
Στη δεύτερη κατηγορία ξεχωρίζουμε δύο μεγάλες υποκατηγορίες, την ανάπτυξη νεοπλάσματος με αγγειογένεση (vascular growth) και την ανάπτυξη άνευ αγγειογένεσης (avascular growth). Η διαφορά έγκειται στο ότι η πρώτη κατηγορία όγκων αυξάνεται με τη βοήθεια αγγειογένεσης και τη δημιουργία αγγείων μέσα στο σώμα του όγκου ενώ η δεύτερη αυξάνεται χωρίς αγγειογένεση.

Ουσιαστικά δεν πρόκειται για διαφορετικούς τρόπους ανάπτυξης αλλά για αλλαγή του μοντέλου πολλαπλασιασμού. Όλες οι συμπαγείς νεοπλασίες ξεκινούν την ανάπτυξή τους χωρίς τη δημιουργία αγγείων και επαφίενται για την τροφοδοσία τους σε θρεπτικά συστατικά από το μηχανισμό της διάχυσης. Όσο όμως ο όγκος μεγαλώνει, ο πυρήνας δηλαδή η κυτταρική μάζα που βρίσκεται προς το κέντρο του όγκου γίνεται νεκρωτική, μη μπορώντας να έχει πρόσβαση σε θρεπτικά συστατικά και

η επιφάνεια του όγκου παραμένει ζωντανή. Για να αντιμετωπίσει το πρόβλημα αυτό ο όγκος ξεκινάει τη διαδικασία της αγγειογένεσης, η οποία μπορεί πλέον να μεταφέρει συστατικά στο εσωτερικό του όγκου και με αυτό τον τρόπο να συνεχισθεί ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός.

Τα περισσότερα μοντέλα έχουν προταθεί για τους μη αγγειογενετικούς όγκους, μιας και αποτελούν το πιο εύκολο μοντέλο αλλά και το μόνο που μπορεί να μελετηθεί και πειραματικά *in vitro*. Έχουν προταθεί αρκετά μοντέλα για την περιγραφή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ξεκινώντας από τα γραμμικά, όπου ενδεικτικά αναφέρουμε την καμπύλη ανάπτυξης του *Gompertz*, το μοντέλο της ανάπτυξης πληθυσμών του *Verhulst* (Verhulst 1838), από το οποίο προήλθε το μοντέλο των *Lotka-Voltera,* στο οποίο θα αναφερθούμε αμέσως στη συνέχεια, καθώς και η σιγμοειδής καμπύλη (*logistic equation, sigmoid curve*) και άλλες. Η σιγμοειδής καμπύλη είχε ανακαλυφθεί αρχικά από τον *Verhulst*, παρέμεινε άγνωστη για μεγάλο διάστημα, ώσπου επανήλθε στην επιφάνεια από την εργασία των *Pearl* και *Reed* (1920) (Pearl and Reed 1920). Στα μοντέλα αυτά πρέπει να προσθέσουμε τις γραμμικές και μη-γραμμικές αναλύσεις που έχουν προταθεί (May 1974; Li and Yorke 1975; May 1976; Wolfrom, Chau et al. 2000).

Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφέρουμε ότι λέγοντας μη-γραμμικά συστήματα συμπεριλαμβάνουμε τη *Θεωρία του Χάους* ή αλλιώς *Χαοτική Μηχανική*. Πατέρας της χαοτικής μηχανικής μπορεί να θεωρηθεί ο *Jules Henri Poincaré* (29 Απριλίου 1854 – †17 Ιουλίου 1912) (**Εικόνα 17**), ο οποίος επέλυσε το πρόβλημα των τριών σωμάτων (Poincaré 1890). Το πρόβλημα αυτό αφορούσε στη μελέτη της κίνησης τριών σημειακών σωμάτων με συγκεκριμένη μάζα. Το πρόβλημα αυτό είχε αντιμετωπισθεί πρώτα από τον Νεύτωνα (25 Δεκεμβρίου 1642 – †20 Μαρτίου 1727) (**Εικόνα 17**), στο έργο του *Philosophiæ Naturalis Principia Mathematica* και είχε διατυπώσει, πως ο νόμος έλξης των μαζών μπορούσε να εφαρμοσθεί στην επίλυση αυτού του προβλήματος (Newton, Motte et al. 1729). Ο *Poincaré* βρήκε ότι τρία σώματα που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μπορεί να παρουσιάσουν μη-περιοδική ταλαντωτική συμπεριφορά, δηλαδή να μην συγκλίνουν ούτε να αποκλίνουν προς κάποιο σταθερό σημείο, σε αντίθεση με ότι ήταν γνωστό μέχρι τη στιγμή εκείνη. Πάρα ταύτα, μόλις στα μέσα του 20ου αιώνα διατυπώθηκε ο όρος χάος για να περιγράψει φαινόμενα, που παρουσίαζαν συμπεριφορά ασύμβατη με τα γνωστά γραμμικά συστήματα.



Εικόνα 17. *Ισαάκ Νεύτων* (αριστερά) έργο του *Godfrey Kneller* (Λονδίνο, 1689) και *Henri Poincare* (δεξιά) (πηγή: www.wikipedia.org).

Από τους διαμορφωτές της ιδέας του χάους, ως φυσικού και μαθηματικού φαινομένου, μπορεί να θεωρηθεί σήμερα ο *Edward Norton Lorenz* (23 Μαΐου 1917 – †16 Απριλίου 2008). Ήταν ο πρώτος που παρατήρησε το γεγονός ότι μικρά συμβάντα μπορεί να έχουν μακροσκοπικά αποτελέσματα. Από τις έρευνες του προέκυψε ο όρος *Παράξενοι Ελκυστές* (*Strange Attractors*) και ο όρος *Το Φαινόμενο της Πεταλούδας* (*The Butterfly Effect*) (Lorenz 1963). Πιο συγκεκριμένα, η μελέτη του αφορούσε στη μεταφορά θερμότητας στην ατμόσφαιρα και ως εκ τούτου, στη μη-περιοδική ρευστοδυναμική ανοικτών συστημάτων, όπως είναι οι ατμοσφαιρικές ροές. Περιέγραψε το σύστημα του με τρεις, σχετικά απλές, διαφορικές εξισώσεις, όπως φαίνεται παρακάτω:

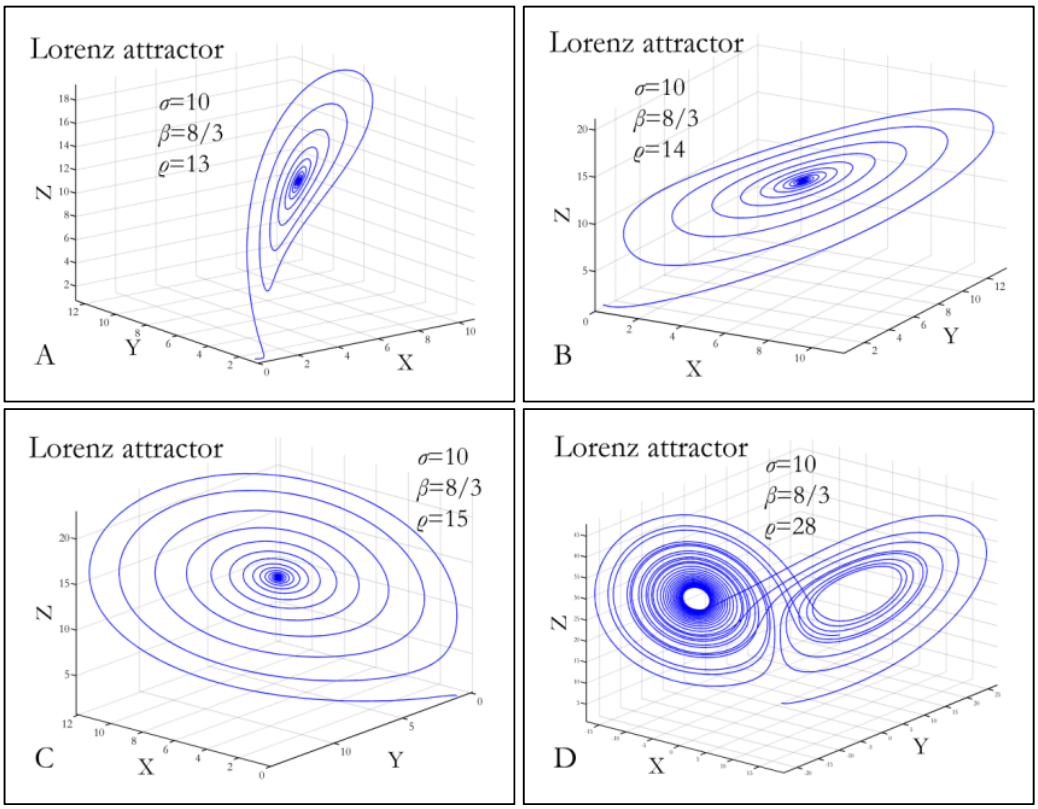
$$\frac{dx}{dt} = \sigma(y - x)$$

$$\frac{dy}{dt} = x(\rho - z) - y$$, **Εξίσωση 1.** Σύστημα εξισώσεων των ατμοσφαιρικών ροών του Lorenz.

$$\frac{dz}{dt} = xy - \beta z$$

Τα x, y, z περιγράφουν την κατάσταση του συστήματος για χρόνο t και τα σ, ρ, β είναι οι παράμετροι του συστήματος, όπου $\sigma, \rho, \beta > 0$. Έτσι, ο *Lorenz* αντικατέστησε τους όρους σ, ρ, β με τις τιμές σ=10, β=8/3, ρ=28 και το διάγραμμα που προέκυψε φαίνεται στην ακόλουθη εικόνα (**Εικόνα 18D**).

Αντιστοίχως φάνηκε ότι οι παράγοντες του συστήματος των διαφορικών εξισώσεων επηρεάζουν το σύστημα που μελετούσε ο *Lorenz*, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 18**.



Εικόνα 18. Ο Ελκυστής του Lorenz (*Lorenz attractor*). Μικρές αλλαγές στους παράγοντες του συστήματος επιφέρουν μεγαλύτερες αλλαγές στη συμπεριφορά του συστήματος. Εδώ παρουσιάζεται η επίδραση από τη μεταβολή του παράγοντα ρ για ρ=13 (**A**), ρ=14 (**B**), ρ=15 (**C**), ρ=28 (**D**).

Η θεωρία των μη-γραμμικών συστημάτων επεκτάθηκε και σε άλλα φαινόμενα, εκ των οποίων ένα ήταν η πληθυσμιακή αύξηση. Το απλούστερο μοντέλο ανάπτυξης ή συρρίκνωσης ουσιαστικά λέει ότι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού ενός συστήματος είναι ανάλογος προς το μέγεθος του ίδιου του πληθυσμού. Η μεγέθυνση ή συρρίκνωση ενός πληθυσμού είναι άμεση συνάρτηση του πολλαπλασιασμού του, δηλαδή των γεννήσεων ή θανάτων αν αναφερόμεθα σε ολόκληρους οργανισμούς ή της κυτταρικής διαίρεσης ή κυτταρικού θανάτου αν αναφερόμεθα σε κυτταρικά συστήματα.

Αυτή η συσχέτιση περιγράφεται μαθηματικά με την ακόλουθη συνάρτηση:

$\dot{y} = ky$, **Εξίσωση 2.** Βασική συνάρτηση πολλαπλασιασμού.

Όπου, ο συμβολισμός $\dot{y}$, υποδηλώνει την πρώτη παράγωγο του y ως προς το χρόνο. Αυτό, που όμως είναι σημαντικό, κάτι που θα δούμε και στις επόμενες ενότητες είναι ότι ο παράγοντας k είναι ο βασικός παίκτης στην πολλαπλασιαστική δυναμική. Είναι γνωστό ότι η λύση της $\dot{y} = ky$ **, Εξίσωση 2**, μπορεί να διατυπωθεί ως:

$y(t) = y(0)e^{kt}$, **Εξίσωση 3.** Επίλυση της Εξίσωσης 2.

Όπου *y(t)* είναι ο πληθυσμός στο σύστημα σε συνάρτηση με το χρόνο και *y(0)* είναι ο πληθυσμός κατά τη χρονική στιγμή 0, δηλαδή ο αρχικός πληθυσμός. Το απλό αυτό μοντέλο μπορεί να περιγράψει την αύξηση ενός πληθυσμού όταν δεν υπάρχουν περιορισμοί στο χώρο και τους πόρους. Όταν εισαγάγουμε τέτοιους περιορισμούς, η παραπάνω συνάρτηση γίνεται της μορφής:

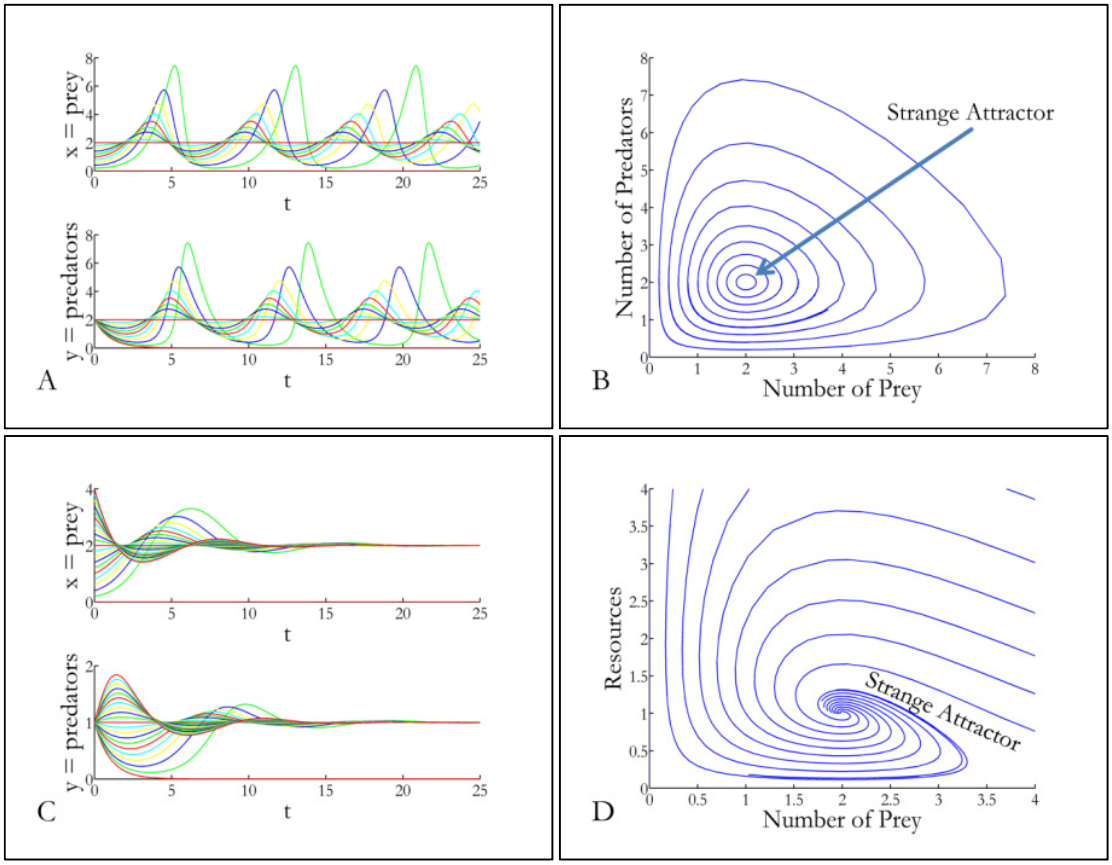
$\dot{y} = k\left(1 - \frac{y}{\mu}\right)y$, **Εξίσωση 4.** Η σιγμοειδής συνάρτηση (*logistic equation*).

Η συνάρτηση αυτή λέγεται *σιγμοειδής* (*logistic function*) και θα την εξετάσουμε με μεγαλύτερη λεπτομέρεια στην αμέσως επόμενη υπο-ενότητα, όπου θα διερευνήσουμε τις ιδιότητές της.
Ως εκ τούτου, ένα από τα πρώτα ζητήματα που μελετήθηκαν στην πληθυσμιακή αύξηση στα συστήματα βιολογίας ήταν το μοντέλο *Θύτη-Θύματος*. Το μοντέλο αυτό αφορούσε στη μελέτη της πληθυσμιακής αυξομείωσης σε ένα οικοσύστημα, περιγράφοντας τον τρόπο με τον οποίο τα ζώα-κυνηγοί και αυτά στη χαμηλότερη βαθμίδα της αλυσίδας αλληλεπιδρούσαν επηρεάζοντας το ένα τον πληθυσμό του άλλου (Lotka 1910; Lotka 1920; Volterra 1926). Το προτεινόμενο μοντέλο ήταν σχετικά απλό, αλλά όπως θα δούμε παρουσίαζε εξαιρετικά περίπλοκη δυναμική, δηλαδή ήταν της μορφής:

$$\frac{dy}{dt} = x(\alpha - \beta y)$$
$$\frac{dy}{dt} = -y(\gamma - \delta x)$$

, **Εξίσωση 5.** Σύστημα εξισώσεων Predator-Prey των Lotka-Volterra.

Φάνηκε ότι αυτό το απλό σύστημα παρουσίαζε μη-γραμμική δυναμική, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 19**.



Εικόνα 19. Η δυναμική δύο ειδών πληθυσμών συναρτήσει του χρόνου (**A**) και σε διάγραμμα phase-space, όπου φαίνεται η μη-γραμμική δυναμική τους και η εμφάνιση των ελκυστών που είχαν δειχθεί στα μοντέλα του Lorenz (**B**). Στο διάγραμμα (**A**) παρατηρούμε την ταλαντωτική μορφή που έχει ο πληθυσμός των ειδών που μελετώνται και η άμεση αλληλεπίδραση και αλληλεξάρτηση τους. Όταν μοντελοποιηθούν οι δύο πληθυσμοί ξεχωριστά ο ένας από τον άλλο αλλά με περιορισμούς στους πόρους (**C**) τότε οι δύο πληθυσμοί γίνονται ασυμπτωτικοί και πλησιάζουν ένα σταθερό σημείο ισορροπίας. Αντίστοιχα η διαγραμματική απεικόνιση ως phase-space, εμφανίζει πάλι ελκυστές κάτι το οποίο είναι σημάδι μη-γραμμικής συμπεριφοράς (**D**).

Αυτό που εύκολα μπορεί κανείς να παρατηρήσει είναι το γεγονός ότι δύο στοιχεία επικρατούν στα δυναμικά μη-γραμμικά συστήματα, το πρώτο είναι οι ταλαντώσεις και το δεύτερο είναι οι εμφάνιση ελκυστών ή αποθητών στη δυναμική τους. Στο θέμα αυτό θα αναφερθούμε εκτενέστερα στην αμέσως επόμενη υπο-ενότητα.

Πέραν όμως των θεωριών για τα μη-γραμμικά συστήματα, αρκετά πρόσφατα, διατυπώθηκαν και θεωρίες που χρησιμοποιούσαν τη *Θεωρία των Παιγνίων*. Η θεωρία αυτή είχε αρχικά διατυπωθεί από τους *von Neumann* και *Morgenstern* (1944) (von Neumann and Morgenstern 1944) και αργότερα επεκτάθηκε από τον *John Forbes Nash* (1950), ο οποίος προσέθεσε την έννοια της ισορροπίας στα παίγνια και ονομάστηκε έτσι και *Ισορροπία Nash* (Nash 1950; Nash 1950; Nash 1953).

Η θεωρία αυτή αρχικά διατυπώθηκε για να περιγράψει τις ισορροπίες που εμφανίζονται στα οικονομικά φαινόμενα και τις πολιτικές επιστήμες. Δεν είχε ληφθεί καθόλου τότε υπόψη ότι θα μπορούσε να βρει εφαρμογές και στη βιολογία και πόσο μάλλον στη βιολογία των νεοπλασιών. Είναι δε ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι πρώτες αναφορές στη *Θεωρία Παιγνίων* και στην *Εξελικτική Θεωρία Παιγνίων*, όπως ονομάστηκε αργότερα, για τον καρκίνο έγιναν το 1997 (Tomlinson 1997) και 2001 (Bach, Bentzen et al. 2001) αντίστοιχα.

Μόλις το 1973, ο John Maynard Smith, διετύπωσε την πρώτη συσχέτιση μεταξύ της θεωρίας των παιγνίων και των βιολογικών φαινομένων (Smith and Price 1973). Οι πρώτες αναφορές στην εξελικτική θεωρία παιγνίων άρχισε στη δεκαετία του '80 με τα πρώτα δείγματα να είναι αρκετά υποσχόμενα για τις δυνατότητες που είχε η θεωρία αυτή στην ερμηνεία των βιολογικών φαινομένων και ειδικότερα στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Άρα καταλαβαίνουμε ότι η εφαρμογή της θεωρίας αυτής έχει μια πολύ μικρή ιστορία πίσω της και αποτελεί αντικείμενο έντονης και πολλά υποσχόμενης έρευνας. Στην **Εικόνα 20** απεικονίζονται οι βασικοί πρωταγωνιστές της Θεωρίας των Παιγνίων.

Εικόνα 20. *John von Neumann* (**A**), *Oskar Morgenstern* (**B**), *John Forbes Nash* (**C**), *John Maynard-Smith* (**D**) (πηγή: www.wikipedia.org).

Τέλος δεν πρέπει να ξεχάσουμε να αναφέρουμε μια ακόμα θεωρία που ενώ είναι αρκετά παλαιά, έχει επηρεάσει σήμερα τη βιολογία. Η αναφορά γίνεται για τη θερμοδυναμική της οποίας ο πατέρας θεωρείται ο Γάλλος φυσικός *Nicolas Leonard Carnot* (1 Ιουνίου 1796 — †24 Αυγούστου 1832). Η πρόοδος όμως στον τομέα αυτό και ο τρόπος σύνδεσής τους με τα βιολογικά φαινόμενα μπορεί να αποδοθεί σε δύο μεγάλες μορφές της επιστήμης: τους *Max Karl Ernst Ludwig Planck* (23 Απριλίου 1858 – †4 Οκτωβρίου 1947), πατέρα της κβαντικής θεωρίας και τον *Erwin Rudolf Josef Alexander Schrödinger* (12 Αυγούστου 1887 – †4 Ιανουαρίου 1961) πατέρα της κβαντομηχανικής (**Εικόνα 21**).

Εικόνα 21. Max Planck (αριστερά) και Erwin Schrödinger (δεξιά) (πηγή: www.wikipedia.org).

Ειδικότερα, ο *Erwin Schrödinger*, με το έργο του "*What is life? The Physical Aspect of the Living Cell*"*συνέδεσε* τη φυσική με τη βιολογία. Για να δώσουμε καλύτερα το περιεχόμενο αυτής της σύνδεσης θεωρούμε απαραίτητο να αποδώσουμε ένα μικρό απόσπασμα από το βιβλίο αυτό, το οποίο ήταν βασισμένο σε μια σειρά διαλέξεων στο Δουβλίνο: "…*The reason for this was not that the subject was simple enough to be explained without mathematics, but rather that it was much too involved to be fully accessible to mathematics. Another feature which at least induced a semblance of popularity was the lecturer's intention to make clear the fundamental idea, which hovers between biology and physics, to both the physicist and the biologist. For actually, in spite of the variety of topics involved, the whole enterprise is intended to convey one idea only -one small comment on a large and important question. In order not to lose our way, it may be useful to outline the plan very briefly in advance. The large and important and very much discussed question is: How can the events in space and time which take place within the spatial boundary of a living organism be accounted for by physics and chemistry? The preliminary answer which this little book will endeavor to expound and establish can be summarized as follows: The obvious inability of present-day physics and chemistry to account for such events is no reason at all for doubting that they can be accounted for by those sciences*" (Schroedinger 1955) και συνεχίζει "*Was it absolutely essential for the biological question to dig up the deepest roots and found the picture on quantum mechanics? The conjecture that a gene is a molecule is today, I dare say, a commonplace. Few biologists, whether familiar with quantum theory or not, would disagree with it. On p. 47 we ventured to put it into the mouth of a pre-quantum physicist, as the only reasonable explanation of the observed permanence. The subsequent considerations about isomerism, threshold energy, the paramount role of the ratio W:kT in determining the probability of an isomeric transition -all that could very well be introduced to our purely empirical basis, at any*

rate without drawing on quantum theory. Why did I so strongly insist on the quantum-mechanical periods the point of view, though I could not really make it clear in this little book and may well have bored many a reader? Quantum mechanics is the first theoretical aspect which accounts from first principles for all kinds of aggregates of atoms actually encountered in Nature" (Schroedinger 1955). Μάλιστα ο Schrödinger, κάνει μια αναφορά στους αρχαίους Έλληνες λέγοντας χαρακτηριστικά "…*that Democritus of Abdera, not Max Planck, was the first quantum physicist*…" (Schroedinger 1946) (σελ. 43).

Με το έργο αυτό μπήκαν ουσιαστικά οι βάσεις για τη σύζευξη της βιολογίας και της φυσικής. Μάλιστα, γίνεται λόγος, για πρώτη φορά, η σχέση της θερμοδυναμικής και των βιολογικών συστημάτων με τέτοιο τρόπο ώστε να δείχνει ότι υπάρχει μια σαφής σύνδεση η οποία όμως δεν ήταν και δεν είναι ικανή να περιγραφεί με τους υπάρχοντες μαθηματικούς φορμαλισμούς.

ΓΡΑΜΜΙΚΑ ΚΑΙ ΜΗ-ΓΡΑΜΜΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ

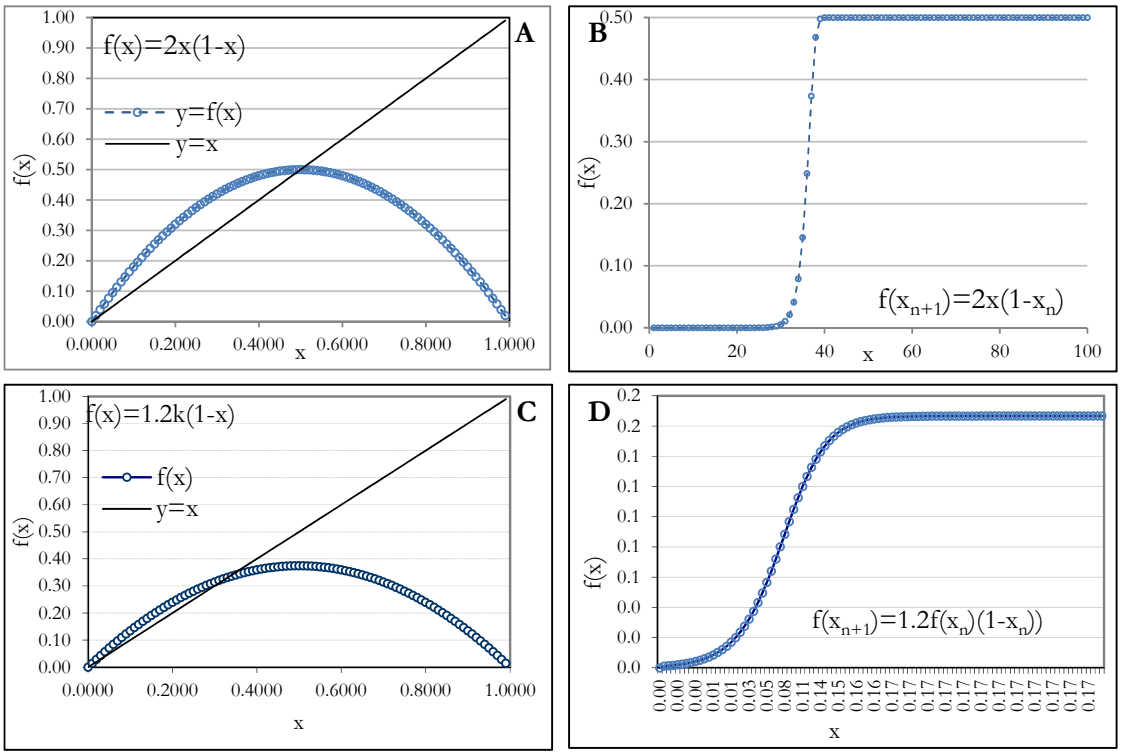
Όπως είδαμε στην προηγούμενη ενότητα του κεφαλαίου αυτού, οι βάσεις για τη μελέτη των μη-γραμμικών συστημάτων μπήκαν από τα τέλη του 19^{ου} αιώνα και ωρίμασαν στα μέσα του 20^{ου} αιώνα. Δηλαδή, δεν είναι μεγάλο το χρονικό διάστημα στο οποίο τέτοια φαινόμενα μελετώνται και υπάρχει ένα μεγάλο κενό στη μελέτη τους και στην εφαρμογή τους στα βιολογικά συστήματα. Γιατί όμως είναι απαραίτητο να δημιουργήσουμε μοντέλα για τη μελέτη των φυσικών και κατ' επέκταση των βιολογικών και επίσης βιοϊατρικών φαινομένων; Ο λόγος είναι η δυνατότητα για πρόβλεψη. Τα μοντέλα αποτελούν μια προσέγγιση του πως λειτουργεί ο φυσικός κόσμος. Όσο καλύτερα μπορούμε να περιγράψουμε ένα φαινόμενο, τόσο καλύτερα το έχουμε κατανοήσει. Το πρόβλημα όμως με τα βιολογικά φαινόμενα είναι ότι αποτελούν πολυδιάστατες οντότητες, που δεν μπορούν να περιγραφούν με τα συμβατικά μέσα που διαθέτουμε. Επί παραδείγματι, ο *Schrödinger* περιέγραψε το χρωμόσωμα ως μια μορφή ασύμμετρου κρυστάλλου, του οποίου τη δομή καλείτο να ανακαλύψει η φυσική (Schroedinger 1955). Ακόμα παραμένει ένα μυστήριο, ο τρόπος που ακόμα και αυτή η μεταγραφή λαμβάνει χώρα, αφού νέα ευρήματα δείχνουν πως στη διαδικασία αυτή σημαντικό ρόλο παίζει η τρισδιάστατη δομή της χρωματίνης. Άρα δεν έχουμε απλά έναν ασύμμετρο κρύσταλλο αλλά έναν ασύμμετρο κρύσταλλο, που αλλάζει δομή ανάλογα με τις συνθήκες, που προκύπτουν. Στο σημείο αυτό ενδεχομένως η θερμοδυναμική να μπορεί να δώσει κάποιες απαντήσεις αλλά αυτό δεν θα αποτελέσει αντικείμενο ενασχόλησης της παρούσας εργασίας.

Οι αρχικές υποθέσεις για την κυτταρική ανάπτυξη ήταν ότι ακολουθούσαν γραμμική πορεία. Μια από τις πλέον γνωστές και αρκετά μελετημένες συναρτήσεις της κυτταρικής ανάπτυξης είναι η σιγμοειδής συνάρτηση της μορφής:

$f(x)=kx(1-x)$, **Εξίσωση 6.** Απλοποιημένη μορφή της σιγμοειδούς συνάρτησης.

Παρά το γεγονός ότι η συνάρτηση αυτή παρουσιάζει εξαιρετικά απλή μορφή, έχει αποδειχθεί ότι είναι μη-γραμμικής φύσεως (Alligood, Sauer et al. 2000). Έχει δειχθεί ότι ο παράγοντας *k* είναι αυτός που καθορίζει τη διαφορά μεταξύ γραμμικότητας και μη γραμμικότητας. Στην **Εικόνα 22** (**A**, **C**) παρουσιάζεται το διάγραμμα της **Εξίσωσης 2** για *k=2* και *k=1.2*. Τι συμβαίνει όμως αν αναπαραστήσουμε την ίδια συνάρτηση ως αναδρομική; Δηλαδή αν εκφράσουμε τον κάθε όρο ως συνάρτηση του προηγούμενου; Το διάγραμμα τότε λαμβάνει μια σιγμοειδή μορφή, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 22** (**B**, **D**).

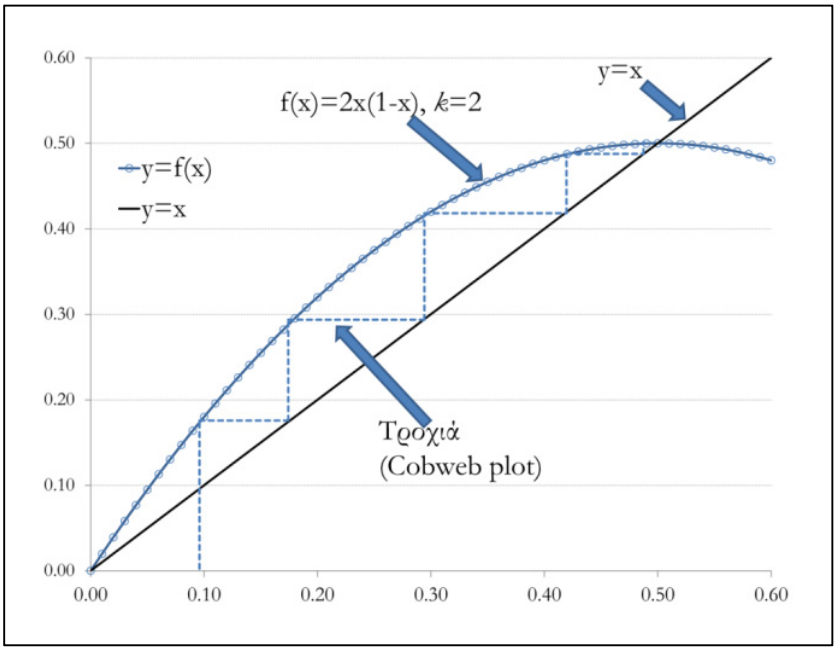
Η δυναμική που παρατηρείται φαίνεται σχετικά απλή. Ουσιαστικά τα διαγράμματα αυτά μας λένε τι συμβαίνει σε έναν πληθυσμό, ο οποίος διπλασιάζεται σε κάθε χρονική στιγμή και/ή πολλαπλασιάζεται κατά 1.2 φορές.



Εικόνα 22. Το διάγραμμα της σιγμοειδούς καμπύλης για *k*=2 και *k*=1.2. Η αναπαράσταση της συνάρτησης για k=2 (**A**) δείχνει ουσιαστικά την αύξηση ενός πληθυσμού και την μετέπειτα μείωσή του δεδομένων των περιορισμών χώρου (spatial) και πόρων (resources) και χωρίς την ανανέωσή του. Η αναπαράσταση της ίδιας συνάρτησης ως αναδρομικής για k=2 (**B**), αποδίδει τη σιγμοειδή μορφή, η οποία δείχνει ότι ένας πληθυσμός τείνει προς ένα ακρότατο όριο (εδώ το 0.5) το οποίο είναι το σημείο ισορροπίας μεταξύ «γεννήσεων» και «θανάτων». Αντιστοίχως παρουσιάζονται οι ίδιες καμπύλες για k=1.2 (**C**, **D**), όπου φαίνεται η αλλαγή της καμπύλης, δείγμα ότι ο παράγοντας αυτός (k) είναι καθοριστικός για διαμόρφωση του πληθυσμού.

Τι γίνεται όμως αν ένας πληθυσμός πολλαπλασιάζεται πέραν του διπλασιασμού. Πριν απαντήσουμε σε αυτό το ερώτημα, πρέπει να επεξηγήσουμε πρώτα το λόγο για τον οποίο σχεδιάσαμε μαζί με τη

συνάρτηση μας και την εξίσωση της ευθείας (δηλαδή $y=x$). Για να το εξηγήσουμε αυτό θα εισαγάγουμε μια νέα έννοια, αυτή της τροχιάς ή αλλιώς *cobweb plot*. Με την έννοια αυτή θα προσπαθήσουμε να βρούμε τις τιμές εκείνες για x και y και θα προσπαθήσουμε να δούμε αν παρουσιάζουν συγκλίνουσα ή αποκλίνουσα συμπεριφορά, ή μη-περιοδική συμπεριφορά. Για να το δούμε αυτό θα εξετάσουμε μια μεγέθυνση της **Εικόνας 22Α**.



Εικόνα 23. Μεγέθυνση της **Εικόνας 22Α**, όπου φαίνεται μέρος της σιγμοειδούς καμπύλης. Η διακεκομμένη γραμμή αναπαριστά την τροχιά των κοινών σημείων μεταξύ της σιγμοειδούς καμπύλης και της ευθείας $y=x$.

Η διακεκομμένη γραμμή, όπως φαίνεται από το σχήμα συγκλίνει προς το σημείο $(x,y)=(0.5,0.5)$. Τα σημεία, όπου η διακεκομμένη γραμμή τέμνει κάθετα τις δύο συναρτήσεις, αποτελούν κοινή λύση για αυτές. Τα σημεία, όπου η διακεκομμένη γραμμή τέμνει οριζόντια τις δύο συναρτήσεις, είναι τα σημεία τομής των πεδίων τιμών των συναρτήσεων, δηλαδή αν R_1 είναι το πεδίο ορισμού της συνάρτησης $y=f(x)=2x(1-x)$ και R_2 είναι το πεδίο ορισμού της $y=g(x)=x$, τότε ορίζουμε ένα νέο πεδίο ορισμού:

$R_3 : R_3 = R_1 \cap R_2, \forall x_1, x_2 : f(x_1) = g(x_2)$, **Εξίσωση 7.** Πεδίο ορισμού των λύσεων των f και g.

Αυτό, όμως που παρατηρούμε είναι ότι και οι δύο συναρτήσεις συγκλίνουν προς μια κοινή λύση, που είναι η 0.5. Το σημείο αυτό το ονομάζουμε σημείο σύγκλισης των συναρτήσεων (*sink*). Για να δώσουμε όμως μια πιο σωστή διατύπωση στα παραπάνω θα λέγαμε:

Ορισμός 1: Έστω ένας αριθμός $p \in \mathbb{R}$ και $\varepsilon>0$, τότε το ανοικτό διάστημα $(p-\varepsilon,p+\varepsilon)$ θα το λέμε περιοχή του p με κέντρο το p και ακτίνα ε.

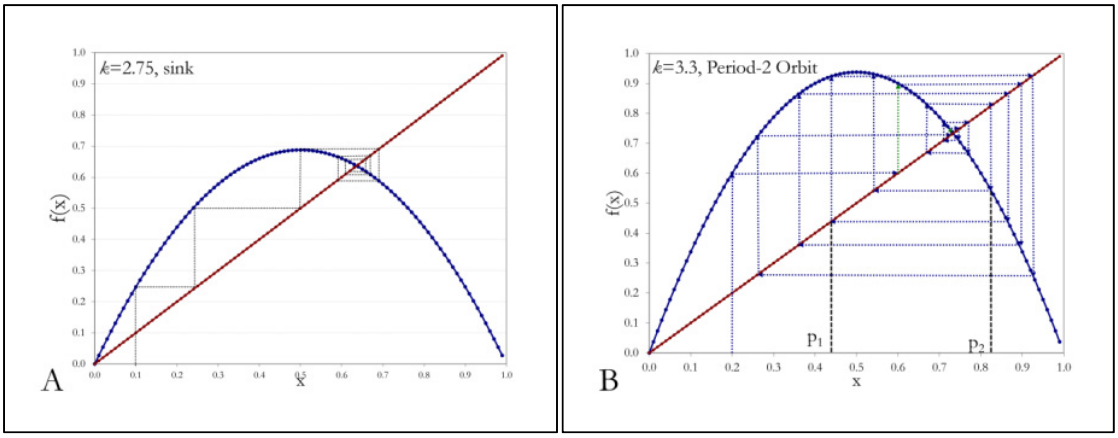
Ορισμός 2: Έστω δύο μη κοινά σύνολα A, B. Το τυχαίο στοιχείο του A το συμβολίζουμε με x και το τυχαίο στοιχείο του B με y. Έστω ότι κάθε στοιχείο x του A με κάποιο νόμο ή διαδικασία f αντιστοιχεί σε ένα μόνο στοιχείο y του B, τότε το νόμο f το λέμε *συνάρτηση* ή μονοσήμαντη απεικόνιση του A στο B. Για να δηλώσουμε ότι έχουμε μία συνάρτηση, απεικόνιση f του A στο B γράφουμε: έστω η συνάρτηση f του A στο B: $f: A \rightarrow B$. Στη συνάρτηση $f: A \rightarrow B$, αν το $x \in A$ έχει αντίστοιχο στοιχείο το $y \in B$, γράφουμε $y= f(x)$ και λέμε ότι ο x είναι αρχέτυπο του y και ότι ο y είναι εικόνα το x ή ότι το y είναι η τιμή της συνάρτησης y στο x.

Ορισμός 3. Έστω μια απεικόνιση f στο $\mathbb{R}$ και $p \in \mathbb{R}$ τέτοιο ώστε $f(p)=p$ και $\varepsilon>0$, ορίζεται το ανοικτό διάστημα $(p-\varepsilon,p+\varepsilon)$. Αν όλα τα σημεία στο διάστημα $(p-\varepsilon,p+\varepsilon)$ συγκλίνουν στο p, θα ονομάζουμε το *p συγκλίνων σημείο* (*sink*) ή *σταθερό ελκυστή* (*attracting fixed point*).

Από τους παραπάνω ορισμούς μπορούμε να διατυπώσουμε ένα θεώρημα:

Θεώρημα 1. Έστω f μια απεικόνιση στο $\mathbb{R}$, συνεχής και παραγωγήσιμη. Έστω ένα σημείο p: $p \in R(f)$, *θα λέμε ότι αν* $|f'(p)|<1$, τότε το p είναι *σταθερός ελκυστής (sink),* αν $|f'(p)|>1$, τότε το p είναι *σημείο απόκλισης* ή αλλιώς *πηγή (source).*

Η σιγμοειδής συνάρτηση (*logistic function*) που μελετήσαμε, αποτελεί μια ολόκληρη οικογένεια συναρτήσεων, όπου ο παράγοντας k που είδαμε στην **Εξίσωση 2**, αποτελεί το μη-γραμμικό παράγοντα. Ας εξετάσουμε λοιπόν τι συμβαίνει στη συνάρτηση αυτή για τιμές του k μεγαλύτερες του 2. Για τιμή του k=2.75, συνεχίζει να παρουσιάζει έναν σταθερό ελκυστή, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 24**, , αλλά η συμπεριφορά της συνάρτησης αλλάζει καθώς η τροχιά που παρουσιάσαμε διαγραμματικά στην **Εικόνα 23**, γίνεται πλέον περιοδική. Ειδικότερα ισχύει ότι για k=3.3 η συνάρτηση έχει περίοδο 2 (**Εικόνα 24Β**).



Εικόνα 24. Τα διαγράμματα της σιγμοειδούς συνάρτησης για k=2.75 (**A**) και k=3.3 (**B**). Στην πρώτη περίπτωση παρατηρούμε έναν σταθερό ελκυστή (sink) ενώ στη δεύτερη η συμπεριφορά της συνάρτησης αλλάζει και οι τροχιές γίνονται περιοδικές με περίοδο 2.

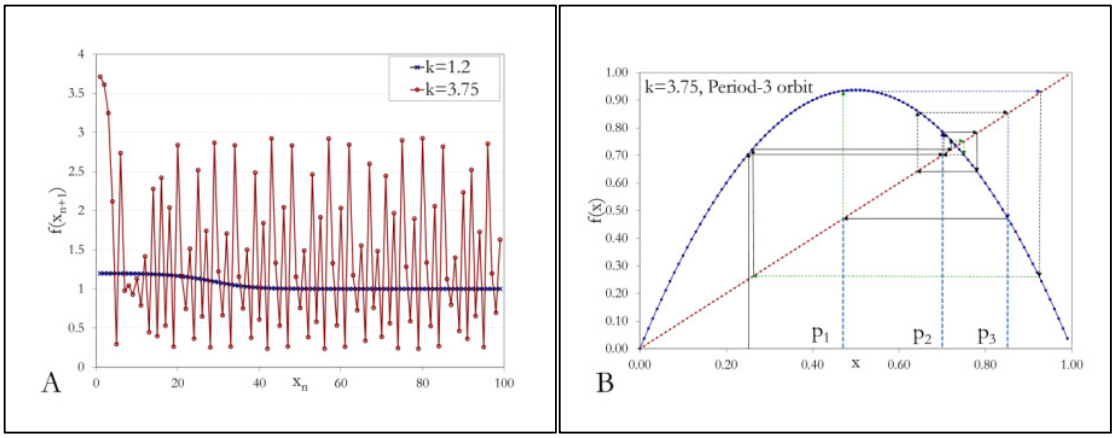
Για να ορίσουμε πιο σωστά την περιοδικότητα θα χρησιμοποιήσουμε τους παρακάτω ορισμούς:

Ορισμός 4. Έστω μια απεικόνιση f στο $\mathbb{R}$. Θα λέμε ότι το σημείο p είναι το σημείο περιόδου της f με περίοδο T, αν $f^k(p)=p$ και το T είναι ο μικρότερος ακέραιος αριθμός. Η τροχιά με αρχικό σημείο p ονομάζεται περιοδική τροχιά T-περιόδου.

Ορισμός 5. Έστω f μια απεικόνιση στο $\mathbb{R}$ και p ένα σημείο περιόδου T. Η τροχιά με περίοδο T του p θα ονομάζεται περιοδικό συγκλίνων σημείο (*periodic sink*)αν το p είναι συγκλίνων σημείο για την απεικόνιση f^k. Η τροχιά με περίοδο T του p θα ονομάζεται περιοδικό αποκλίνων σημείο (*periodic source*) αν το p είναι αποκλίνων σημείο για την απεικόνιση f^k.

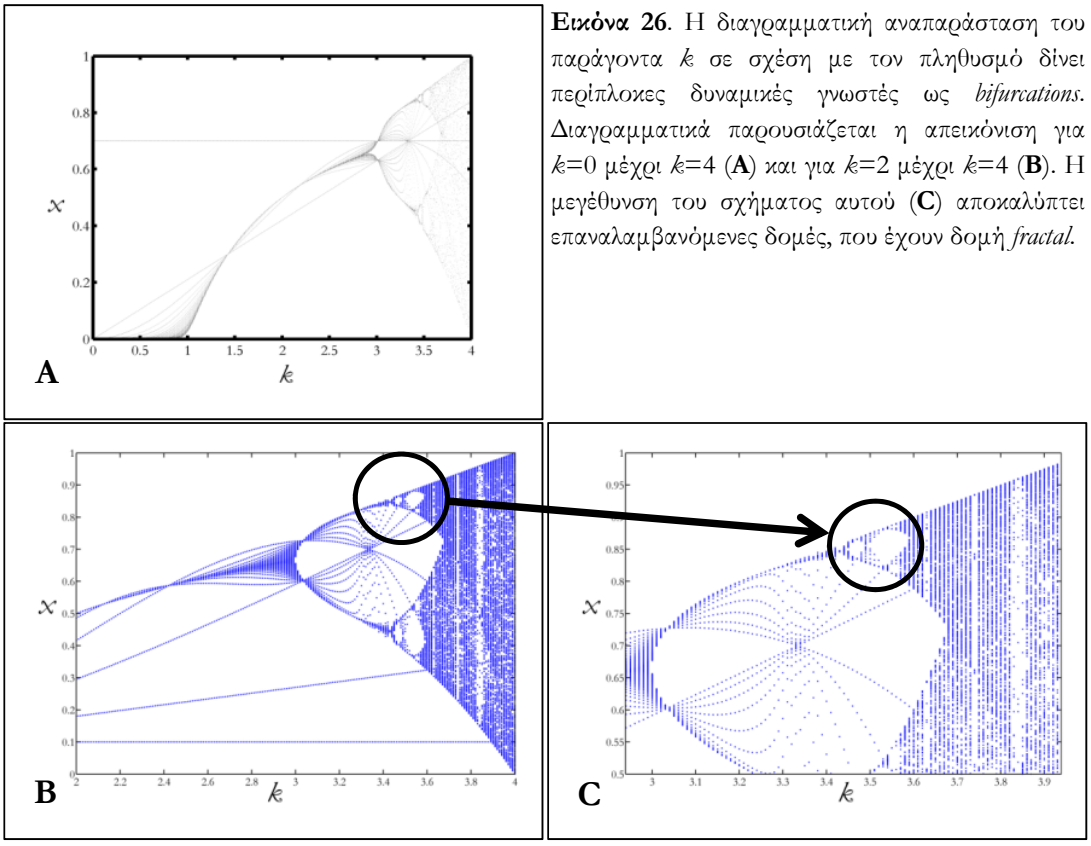
Είδαμε ότι η συνάρτηση στην οποία αναφερόμεθα παρουσιάζει διαφορετική και πιο περίπλοκη δυναμική για κάθε μεταβολή του παράγοντα k. Οι αλλαγές είναι ακόμα πιο ενδιαφέρουσες όταν ο παράγοντας k πάρει τιμές μεταξύ 3.75 και 4.0. Τότε η γραφική παράσταση της συνάρτησης γίνεται, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 25**.

Η διαφορά αυτή στη συμπεριφορά της συνάρτησης οφείλεται στη μη-γραμμική φύση της για τιμές του *k*>3.7. Το αποτέλεσμα, μάλιστα, στην **Εικόνα 25Α**, μπορεί να ερμηνευθεί και βιολογικά, αφού μπορεί να ερμηνευθεί ως η ανάπτυξη ενός πληθυσμού σε ισορροπίες, δηλαδή, αύξηση μέχρι ενός επιπέδου και δεδομένων των πόρων και του χώρου αρχίζει να φθίνει. Όταν μειωθεί κάτω από ένα όριο, όπου οι πόροι είναι επαρκείς αρχίζει πάλι να αυξάνεται. Η περιοδικότητα αυτής της πολλαπλασιαστικής δυναμικής είναι αυτή που κρύβει το μη-γραμμικό χαρακτήρα της και έχει χαοτικά χαρακτηριστικά. Το φαινόμενο αυτό ανακαλύφθηκε από τους *Li* και *Yorke* (1975), όπου διετύπωσαν τη θεωρία ότι τροχιές με περίοδο 3, έχουν χαοτικό χαρακτήρα, σε άρθρο τους με τον τίτλο "*Period Three Implies Chaos*" (Li and Yorke 1975). Η γραφική αναπαράσταση αυτού του φαινομένου, παρουσιάζεται στην **Εικόνα 25Β**. Αφού είδαμε υπο-περιπτώσεις της σιγμοειδούς καμπύλης, έχει ενδιαφέρον να δούμε τι θα παρουσιαζόταν αν αναπαριστούσαμε τις τιμές που μπορεί να πάρει ο παράγοντας *k* ως προς τις τιμές της *f(x)*. Το αποτέλεσμα ονομάζεται *διάγραμμα διακλάδωσης* (*bifurcation diagram*) και παρουσιάζει όλες τις καμπύλες που σχηματίζονται από τη σιγμοειδή συνάρτηση και τις τιμές που μπορεί να πάρει ο παράγοντας *k*. Ένα παράδειγμα τέτοιου διαγράμματος διακλάδωσης παρουσιάζεται στην **Εικόνα 26**.



Εικόνα 25. Η σιγμοειδής συνάρτηση αλλάζει δραστικά συμπεριφορά για *k*=3.75 (**Α**). Η αναδρομική της μορφή γίνεται ταλαντωτική, όπως αυτό φαίνεται σε αντιδιαστολή με την ίδια συνάρτηση όταν ο *k*=1.2 (μπλε καμπύλη στο **Α**). Ομοίως, η απεικόνιση της συνάρτησης και η απεικόνιση της τροχιάς που προαναφέραμε παρουσιάζει τρία σημεία περιόδου (περίοδο 3) (**Β**).

Η συνάρτηση της σιγμοειδούς καμπύλης έχει βρει εφαρμογές στην πολλαπλασιαστική δυναμική, όπου κάποιες ομάδες έχουν μελετήσει τις ιδιότητές της αναφορικά με κυτταρικούς πληθυσμούς (Buis and Luck 2006; Dyson, Villella-Bressan et al. 2007; Ghosh, Elankumaran et al. 2011). Έχει δειχθεί δε, ότι οι κυτταρικοί πληθυσμοί in vitro παρουσιάζουν μη-γραμμική και ταλαντωτική συμπεριφορά τόσο σε κύτταρα εναιωρήματος (Tomelleri, Milotti et al. 2008) όσο και σε επικολλώμενα κύτταρα (Wolfrom, Chau et al. 2000).



Εικόνα 26. Η διαγραμματική αναπαράσταση του παράγοντα *k* σε σχέση με τον πληθυσμό δίνει περίπλοκες δυναμικές γνωστές ως *bifurcations*. Διαγραμματικά παρουσιάζεται η απεικόνιση για *k*=0 μέχρι *k*=4 (**A**) και για *k*=2 μέχρι *k*=4 (**B**). Η μεγέθυνση του σχήματος αυτού (**C**) αποκαλύπτει επαναλαμβανόμενες δομές, που έχουν δομή *fractal*.

ΜΟΝΤΕΛΑ ΘΕΩΡΙΑΣ ΠΑΙΓΝΙΩΝ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ

Το γεγονός ότι στη φύση υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των οργανισμών, αποτέλεσε ένα από τα αντικείμενα μελέτης, σχεδόν όλων των επιστημών, τόσο των βιοϊατρικών όσο και άλλων όπως των οικονομικών. Η αλληλεπίδραση αυτή ονομάστηκε *Θεωρία Παιγνίων*, όπως προαναφέραμε, από τους *John von Neumann* και *Oskar Morgenstern*. Μερικά χρόνια αργότερα ο *Nash*, επέκτεινε τη θεωρία αυτή εισάγοντας τη έννοια της ισορροπίας, η οποία και ονομάσθηκε *ισορροπία Nash*. Η διατύπωση του *Nash* έλεγε: "*An equilibrium is reached as soon as no party can increase its profit by unilaterally deciding differently*", «*Ισορροπία επιτυγχάνεται όταν κανένα από τα εμπλεκόμενα μέρη δεν μπορεί να αυξήσει το κέρδος*

		Παίκτης 2		
		Πέτρα	**Ψαλίδι**	**Χαρτί**
Παίκτης 1	**Πέτρα**	(0,0)	(1,-1)	(-1,1)
	Ψαλίδι	(-1,1)	(0,0)	(1,-1)
	Χαρτί	(1,-1)	(-1,1)	(0,0)

Διάγραμμα 1. Παίγνιο μηδενικού αθροίσματος. Το άθροισμα κάθε ζεύγους αριθμών είναι ίσο με το μηδέν.

του αποφασίζοντας μονοσήμαντα» (μ.τ.σ) (Nash 1950). Τη δεκαετία του '70 ο *John Maynard Smith*, έκανε την πρώτη σύνδεση με τη βιολογία διατυπώνοντας τη σχέση μεταξύ της εξελικτικής βιολογίας και της θεωρίας των παιγνίων εισάγοντας τον όρο *Evolutionary Stable Strategies* (ESS), *Εξελικτικά Σταθερές Στρατηγικές*, τις οποίες από τούδε θα λέμε ESS, χάριν συντομίας.

Ο *Smith* διετύπωσε το ακόλουθο θεώρημα: "*A strategy is called evolutionary stable if a population of individuals homogenously playing this strategy is able to outperform and eliminate a small amount of any mutant strategy introduced into the population.*" «*Μια στρατηγική θα λέγεται Εξελικτικά σταθερή* (*ESS*) *αν τα μέρη ενός πληθυσμού που απαρτίζουν το εξελικτικό παίγνιο, μπορούν να ξεπεράσουν και εξαλείψουν μικρές αλλαγές στη στρατηγική του παιγνίου που προέρχονται από μεταλλάξεις μέσα στον ίδιο τον πληθυσμό.*» (μ.τ.σ) (Smith and Price 1973).

Θα προσπαθήσουμε να εξηγήσουμε τη θεωρία των παιγνίων με δύο πολύ απλά παραδείγματα ώστε στη συνέχεια να κάνουμε την απαραίτητη σύνδεση με τα βιολογικά συστήματα του ενδιαφέροντός μας. Το πρώτο παιχνίδι είναι το γνωστό παιδικό παιχνίδι *πέτρα-ψαλίδι-χαρτί*. Στο παιχνίδι αυτό, δύο παίκτες κινούν τα χέρια τους χρησιμοποιώντας συμβολισμούς για να περιγράψουν μια πέτρα, ένα ψαλίδι και χαρτί. Κάθε παίκτης δεν γνωρίζει τι θα επιλέξει ο άλλος, αλλά είναι γνωστό και στους δύο ότι υπάρχουν κάποιοι κανόνες. Το ψαλίδι νικάει το χαρτί, η πέτρα νικάει το ψαλίδι και το χαρτί νικάει την πέτρα. Άρα θα μπορούσαμε να αναπαραστήσουμε το παιχνίδι αυτό με τη μορφή ενός διαγράμματος, όπως φαίνεται ακολούθως στο **Διάγραμμα 1**.

Στο παίγνιο αυτό συμβολίζουμε με *-1* τον παίκτη που χάνει αυτόν δηλαδή με επιζήμια στρατηγική, με *1* τον παίκτη που κερδίζει, αυτόν δηλαδή που επιλέγει επικερδή στρατηγική και με *0* συμβολίζουμε την ισορροπία, όπου και οι δύο παίκτες επέλεξαν την ίδια στρατηγική.

Το παίγνιο αυτό λέγεται *Παίγνιο Μηδενικού Αθροίσματος*. Ο λόγος, που ονομάζεται έτσι, είναι προφανής. Αν αθροίσουμε τους αριθμούς σε κάθε ζεύγος μέσα στις παρενθέσεις μας δίνει πάντα άθροισμα μηδέν.

Υπάρχουν και παίγνια, τα οποία δεν είναι μηδενικού αθροίσματος. Ένα από αυτά λέγεται το *Δίλημμα του Φυλακισμένου* (*Prisoner's Dilemma*), που διατυπώθηκε από τον *Tucker* (1950) και επεδίωκε να περιγράψει με απλό τρόπο την έννοια του παιγνίου και πως αυτή μπορεί να βρει εφαρμογή στα πεδία της αλληλεπίδρασης (Tucker 1950). Το δίλημμα αυτό λοιπόν έλεγε το εξής, το οποίο έχουμε ελαφρώς παραλλάξει: Δύο άνδρες συλλαμβάνονται από την αστυνομία, η οποία όμως δεν έχει στοιχεία για να δικάσει και να καταδικάσει τους δύο άνδρες. Ο μόνος τρόπος για να τους καταδικάσει είναι να ομολογήσουν για τις πράξεις τους. Έτσι, για να τους αποσυντονίσουν, τους βάζουν σε ξεχωριστά κελιά, όπου και ανακρίνονται. Η αστυνομία προσφέρει και στους δύο τις ίδιες

επιλογές: αν καταδώσουν το συνεργάτη τους θα ελευθερωθούν, αν σιωπήσουν θα καταδικαστούν σε φυλάκιση ενός έτους. Επίσης, η αστυνομία, ξέρει ότι αν και οι δύο ομολογήσουν τότε θα καταδικαστούν και οι δύο σε φυλάκιση ενός έτους, ενώ αν σιωπήσουν και οι δύο, θα τους φυλακίσουν για ένα μήνα έκαστον. Ο κάθε ένας εκ των δύο φυλακισμένων δεν ξέρει τι θα κάνει ο σύντροφός του, αλλά γνωρίζει ότι του έχουν δοθεί οι ίδιες επιλογές.

Ας εξετάσουμε διαγραμματικά τις πιθανότητες σε αυτό το παίγνιο (**Διάγραμμα 2**).

		Φυλακισμένος 2	
		Σιωπά	**Καταδίδει**
Φυλακισμένος 1	**Σιωπά**	Καταδίκη ενός μήνα έκαστος	Ο φυλακισμένος 1 καταδικάζεται σε φυλάκιση ενός έτους Ο φυλακισμένος 2 φεύγει ελεύθερος
	Καταδίδει	Ο φυλακισμένος 1 φεύγει ελεύθερος Ο φυλακισμένος 2 καταδικάζεται σε φυλάκιση ενός έτους	Ο φυλακισμένος 1 καταδικάζεται σε φυλάκιση ενός έτους Ο φυλακισμένος 2 καταδικάζεται σε φυλάκιση ενός έτους

Διάγραμμα 2. Το *Δίλημμα του Φυλακισμένου*.

Όπως είναι διαμορφωμένοι οι κανόνες του παιχνιδιού, φαίνεται εκ πρώτης ότι η συμφέρουσα στρατηγική είναι να καταδώσουν ο ένας τον άλλο, αφού θα αφεθούν ελεύθεροι, αλλά βλέπουμε ότι το αποτέλεσμα της αμοιβαίας κατάδοσης είναι η φυλάκιση και των δύο. Άρα η πιο συμφέρουσα στρατηγική θα ήταν να παραμείνουν και οι δύο σιωπηλοί.

Άρα καταλαβαίνουμε ότι το αποτέλεσμα ενός παιγνίου προέρχεται από την *απόφαση* (*decision*) που λαμβάνουν τα εμπλεκόμενα μέρη και ειδικότερα μια *ορθολογική απόφαση* (*rational decision*). Με τη σειρά τους οι αποφάσεις προκαλούν *συγκρούσεις* (*conflicts*) ή *συνέργειες* (*cooperation, synergy*).

Ορισμός 6. Ως *απόφαση* ορίζουμε την επιλογή ενός εμπλεκόμενου μέρους σε ένα παίγνιο, δεδομένων των νόμων και των συνθηκών του παιγνίου.

Ορισμός 7. Ως *ορθολογική απόφαση* ορίζουμε την επιλογή του εμπλεκόμενου μέρους σε ένα παίγνιο δεδομένων των νόμων και των συνθηκών του παιγνίου, το οποίο θα φέρει άριστο αποτέλεσμα για τον εμπλεκόμενο.

Ορισμός 8. Ως *ορθολογικό παίκτη* ορίζουμε τον εμπλεκόμενο σε ένα παίγνιο, του οποίου οι αποφάσεις έχουν ως στόχο τη μεγιστοποίηση των οφελών του από το παίγνιο.

Αφού ορίσαμε με απλό τρόπο την έννοια των παιγνίων, πρέπει να εξετάσουμε πως αυτά συνδέονται με την πολλαπλασιαστική δυναμική. Όπως προαναφέραμε ο πρώτος που διετύπωσε μια τέτοια συσχέτιση ήταν ο *J.M. Smith*, όπου διετύπωσε την εφαρμογή της θεωρίας των παιγνίων στην εξέλιξη των οργανισμών. Οι μελέτες επί του θέματος αυτού, συνεχίστηκαν και επεκτάθηκαν στον τομέα της

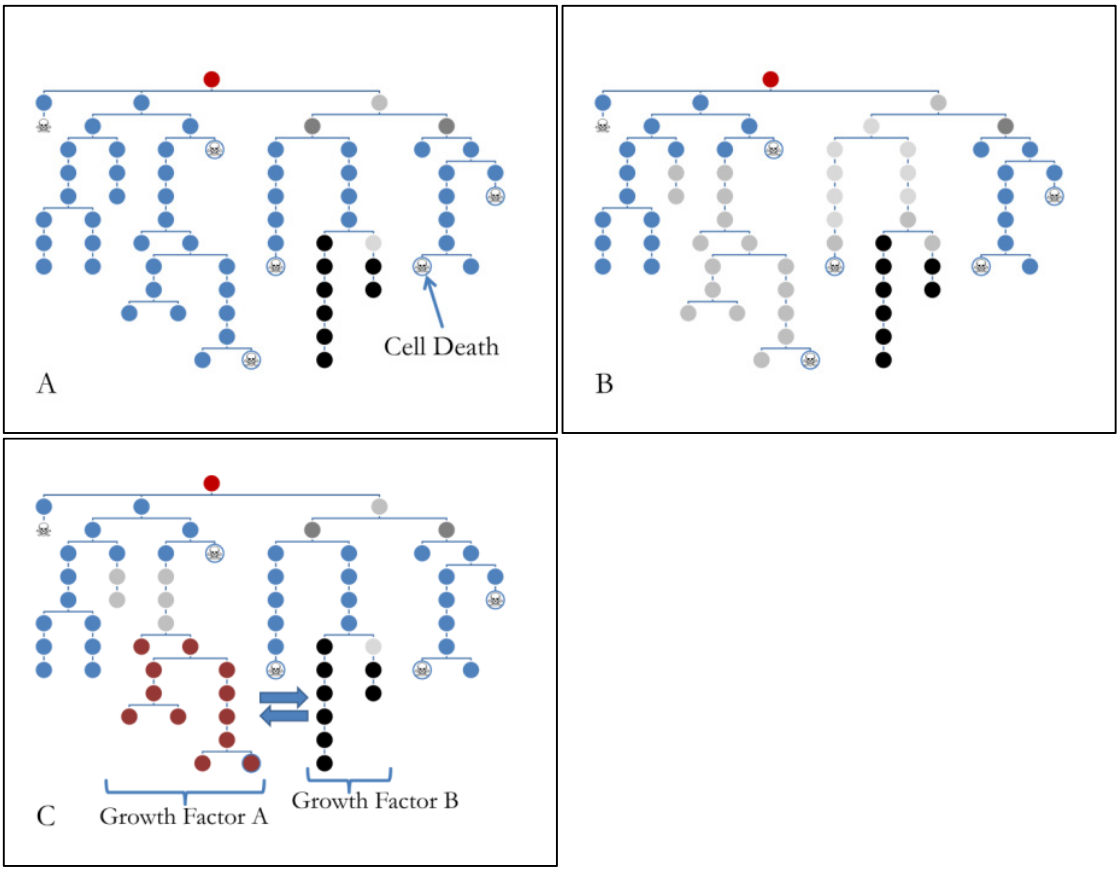
ογκογένεσης. Ως εκ τούτου, προτάθηκαν κάποια μοντέλα, τα οποία προσπάθησαν να επεξηγήσουν τα αίτια της ογκογένεσης μέσα από το πρίσμα της θεωρίας παιγνίων. Η κεντρική ιδέα στην επεξήγηση της ογκογένεσης με τη θεωρία παιγνίων αφορά στη μελέτη του πληθυσμού που προκύπτει, ο οποίος προσπαθεί να παραγκωνίσει τον αρχικό πληθυσμό, ήτοι τα καρκινικά κύτταρα, που φέρουν νέες μεταλλάξεις ή εν γένει γενοτυπικές ιδιότητες και προσπαθούν να αυξηθούν εις βάρος των φυσιολογικών (Gatenby and Vincent 2003). Σε πιο πρόσφατη αναφορά παρουσιάσθηκε ένα πιο ολοκληρωμένο μοντέλο ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων που περιείχε τη θεωρία παιγνίων και τη συνάρτηση ανταγωνισμού των *Lotka-Volterra* (Vincent and Gatenby 2008). Στο μοντέλο αυτό ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων, χωρίζεται σε τρία μέρη: *έναρξη* (*initiation*), *προαγωγή* (*promotion*) και *ανάπτυξη* (*progression*). Στην παρούσα εργασία θα ασχοληθούμε κυρίως με τα στάδια της προαγωγής και ανάπτυξης. Βέβαια, εδώ πρέπει να σημειώσουμε ότι στο μοντέλο που πρόκειται να αναπτύξουμε στην ενότητα των «*Αποτελεσμάτων*» δεν κάνουμε διαχωρισμό μεταξύ των δύο φάσεων μιας και η τρίτη φάση αφορά στο μηχανισμό της μετάστασης, που δεν είναι αντικείμενο της παρούσας εργασίας. Η πολλαπλασιαστική δυναμική των κυττάρων, αφορά το χρονικό περιθώριο από τη στιγμή που εμφανίζεται ο πρώτος νεοπλασματικός κλώνος μέχρι τη στιγμή που φτάνει έναν ικανό κυτταρικό όγκο που μπορεί να διαγνωσθεί. Μέχρι του σημείου της διάγνωσης, είναι πιθανό να υπάρχει ήδη εστία μεταστάσεως ή όχι. Μάλιστα, έχει φανεί ότι η μετάσταση δεν οφείλεται πιθανότατα σε γενετικές αλλαγές αλλά σε προσαρμογή των καρκινικών κυττάρων στο μικροπεριβάλλον και μετέπειτα αλλαγή στρατηγικής στον τρόπο πολλαπλασιασμού. Με απλά λόγια, ο όγκος αναγνωρίζει, ενδεχομένως, από το περιβάλλον που βρίσκεται ότι δεν μπορεί να αναπτυχθεί άλλο, έχει φτάσει δηλαδή σε κάποιο όριο χωρικής (spatial) διάταξης και μέσω του κυκλοφορικού συστήματος στέλνει «αγγελιοφόρους» σε άλλα σημεία του σώματος (Liu and Liu 2012). Έτσι, είναι πλέον γενικώς αποδεκτό ότι αφού τα καρκινικά κύτταρα ανταγωνίζονται για τους πόρους, ισχύουν οι θεωρίες παιγνίων (Liu and Liu 2012). Τα βασικά μοντέλα που αναφέραμε συνοψίζονται στην **Εικόνα 27**.

Τέλος, σε μια πρόσφατη αναφορά έγινε η προσπάθεια συνένωσης των δύο θεωριών που αναφέραμε, δηλαδή της πολλαπλασιαστικής δυναμικής και της θεωρίας των παιγνίων (Hauert, Holmes et al. 2006). Πιο συγκεκριμένα, μετέτρεψαν το πρόβλημα του παιγνίου με N παίκτες σε μια νέα μαθηματική διατύπωση, όπου χρησιμοποίησαν την ανάπτυξη ενός πληθυσμού μέσα από τις αλληλεπιδράσεις τους. Ακριβέστερα, έστω ότι x είναι ο αριθμός των παικτών που συνεργάζονται y είναι ο αριθμός των παικτών που δεν συνεργάζονται και z ο αριθμός των απαθών παικτών. Με αυτούς τους ορισμούς ισχύει:

$$\dot{x} = x(zf_C - d)$$
$$\dot{y} = y(zf_D - d)$$
$$\dot{z} = -\dot{x} - \dot{y} = (x + y)d - z(xf_C + yf_D)$$

, **Εξίσωση 8.** Συνάρτηση των *Hauert και συνεργάτες* (2006).

Όπου, f_C και f_D είναι τα οφέλη των παικτών για αυτούς που συνεργάζονται και αυτούς που δεν συνεργάζονται αντίστοιχα. Μέσα από αυτή τη σχέση διατυπώνουν οι μελετητές αυτοί ότι σε ένα σύστημα αν δεν υπάρχει συνέργια μεταξύ των παικτών, ακόμα και αν αυτό δεν έχει για όλους θετικά αποτελέσματα δηλαδή δεν μεγιστοποιούν όλοι τα οφέλη τους, ο πληθυσμός τείνει να φθίνει ασχέτως του αν οι πόροι παραμένουν σε επάρκεια. Αντίθετα, σε περιπτώσεις συνεργασίας μεταξύ των παικτών υπάρχει πληθυσμιακή αύξηση. Ένα άλλο σημαντικό στοιχείο, που διετύπωσε η παραπάνω ομάδα ήταν η ύπαρξη και πρόβλεψη των *μονήρων* (*loners*). Είναι οι παίκτες που δεν επιθυμούν να μεγιστοποιήσουν τα οφέλη τους, άρα δεν είναι ορθολογικοί παίκτες όπως ορίσαμε παραπάνω, αλλά αρκούνται σε μια μικρή αλλά σταθερή αμοιβή από τις αποφάσεις τους (Hauert, Holmes et al. 2006). Αυτό είναι ένα θέμα, που επίσης παρατηρήσαμε και συμπεριλάβαμε στο μοντέλο μας κάτι που παρατηρήθηκε από τα πειραματικά δεδομένα κυττάρων i*n vitro*. Όπως θα αναφέρουμε και στην ενότητα των «*Αποτελεσμάτων*» η ύπαρξη τέτοιων πληθυσμών αφορούσε σε σταθερά κύτταρα, που παρέμεναν στη G_1 φάση του κυτταρικού κύκλου, ενδεχομένως χρησιμοποιώντας ελάχιστα ποσά από τους ενεργειακούς πόρους αλλά διατηρούσαν τον πληθυσμό τους κατά τη διάρκεια της συνολικής ανάπτυξης του κυτταρικού συστήματος.



Εικόνα 27. Διαγραμματική αναπαράσταση των βασικών μοντέλων παιγνίων για την πολλαπλασιαστική δυναμική των νεοπλασματικών κυττάρων. Η κλασσική θεώρηση για την αύξηση ενός όγκου: Τα γενετικώς μετασχηματισμένα κύτταρα (μαύρο χρώμα) πολλαπλασιάζονται. Σε αυτή τη διαδικασία ο κυτταρικός θάνατος λαμβάνει χώρα λόγω του ανταγωνισμού για πόρους (**A**). Μια από τις βασικές υποθέσεις για την αύξηση των νεοπλασματικών κυττάρων αναφέρεται στη συνεργασία. Τα αρχικά κύτταρα (γαλάζιο χρώμα) διαιρούνται σε νέους πληθυσμούς (γκρι χρώμα), τα οποία με τη σειρά τους συνεργάζονται για να παράξουν έναν τρίτο πληθυσμό (μαύρο χρώμα) εξελικτικά πιο βέλτιστο και ικανό να συνεχίσει την προαγωγή του όγκου (**B**). Τελική υπόθεση για την αύξηση των νεοπλασματικών κυττάρων, όπου τα αρχικά κύτταρα (γαλάζιο χρώμα) γεννούν δύο νέους πληθυσμούς (κόκκινο χρώμα και μαύρο χρώμα) ικανούς να συνεχίσουν τη νεοπλασία αλλά μόνο σε συνεργασία, παράγωντας π.χ. αυξητικούς παράγοντες (Growth Factors A, B) απαραίτητους για τον κάθε πληθυσμό χωρίς τους οποίους κανείς δεν μπορεί να προχωρήσει παρά μόνο σε συνέργεια (**C**) (Σχήμα προσαρμοσμένο από (Axelrod, Axelrod et al. 2006)).

ΜΟΝΤΕΛΑ ΘΕΡΜΟΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ

Για να κλείσουμε το κεφάλαιο αυτό, θεωρούμε απαραίτητο να κάνουμε μια σύντομη αναφορά στο θέμα της θερμοδυναμικής ισορροπίας και η σχέση του με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Δεν αποτελεί αντικείμενο της παρούσας εργασίας αλλά είναι εξαιρετικά σημαντική η μνεία του. Ο λόγος γίνεται για τη συσχέτιση της θερμοδυναμικής με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και κατά συνέπεια την πολλαπλασιαστική δυναμική.

Όπως είναι γνωστό, τα βιολογικά συστήματα ανταγωνίζονται για τους πόρους. Αυτό το αναφέραμε ήδη στην προηγούμενη υποενότητα, και εδώ το εξειδικεύουμε περαιτέρω αναφερόμενοι στον ανταγωνισμό για τους ενεργειακούς πόρους. Επίσης είναι γνωστό ότι τα βιολογικά συστήματα είναι ανοικτά, δηλαδή ανταλλάσουν ενέργεια και μάζα με το περιβάλλον τους. Ένα άλλο δεδομένο που γνωρίζουμε σίγουρα είναι ότι λειτουργούν εκτός θερμοδυναμικής ισορροπίας. Για να το θέσουμε πολύ απλά, τα κύτταρα των ευκαρυωτικών οργανισμών λειτουργούν σε μια θερμοκρασία υψηλότερη του περιβάλλοντος (π.χ. σε μια δροσερή βραδιά της άνοιξης) που απαρτίζουν αλλά πολλές φορές και πολύ χαμηλότερη (π.χ. μέσα σε μια σάουνα). Στις δύο περιπτώσεις αυτές υπάρχει ο τρόπος τα κύτταρα να διατηρούν σταθερή τη θερμοκρασία του σώματος και να μην ισορροπούν με το περιβάλλον τους. Αυτό είναι ένα παράδειγμα λειτουργίας εκτός θερμοδυναμικής ισορροπίας. Ένα άλλο παράδειγμα είναι η λειτουργία των ενζύμων που υποβοηθούν αντιδράσεις, ως καταλύτες, που δεν θα ήταν δυνατό να λάβουν χώρα σε κάθε άλλη περίπτωση. Άρα, θα μπορούσαμε να πούμε ότι τα βιολογικά συστήματα έχουν τρεις ιδιότητες: ανταλλάσουν ενέργεια και μάζα με το περιβάλλον τους, ανταγωνίζονται για αυτά και ως εκ τούτου πολλαπλασιάζονται και μάλιστα όχι ατάκτως αλλά συντονισμένα. Τα τρία αυτά φαινόμενα ενδεχομένως να μπορούν να διατυπωθούν ως ένα θεώρημα αλλά δεν θα αποτελέσει αυτό αντικείμενο της παρούσας ανάλυσης. Πρέπει βέβαια να αναφέρουμε ότι το θέμα αυτό το έχουμε μελετήσει σε μια εργασία μας προς δημοσίευση με τίτλο "*Non-Equilibrium Thermodynamic Transitions on Metabolism and Proliferation of Glucocorticoid-Treated Acute Leukemia Cells*", όπου μελετάμε πειραματικά την ύπαρξη θερμοδυναμικών μεταβάσεων σε ένα λευχαιμικό σύστημα υπό την επίδραση γλυκοκορτικοειδών. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το σύστημα αυτό συμπεριφέρεται εκτός θερμοδυναμικής ισορροπίας και μάλιστα χρησιμοποιεί τους *παίκτες* που αναφέραμε προηγουμένως, τους *μονήρεις* (*loners*) για να επιβιώσει. Στην παρούσα εργασία στα πλαίσια ενός case study κάναμε μετρήσεις μεταβολιτών με στόχο να λάβουμε μια πιο εις βάθος εικόνα του μηχανισμού πολλαπλασιασμού των κυτταρικών μοντέλων που αναπτύξαμε. Οι μετρήσεις αυτές αναφέρονται με μεγαλύτερη λεπτομέρεια στην ενότητα «ΜΕΡΟΣ ΙΙ – ΥΛΙΚΟ ΜΕΘΟΔΟΙ».

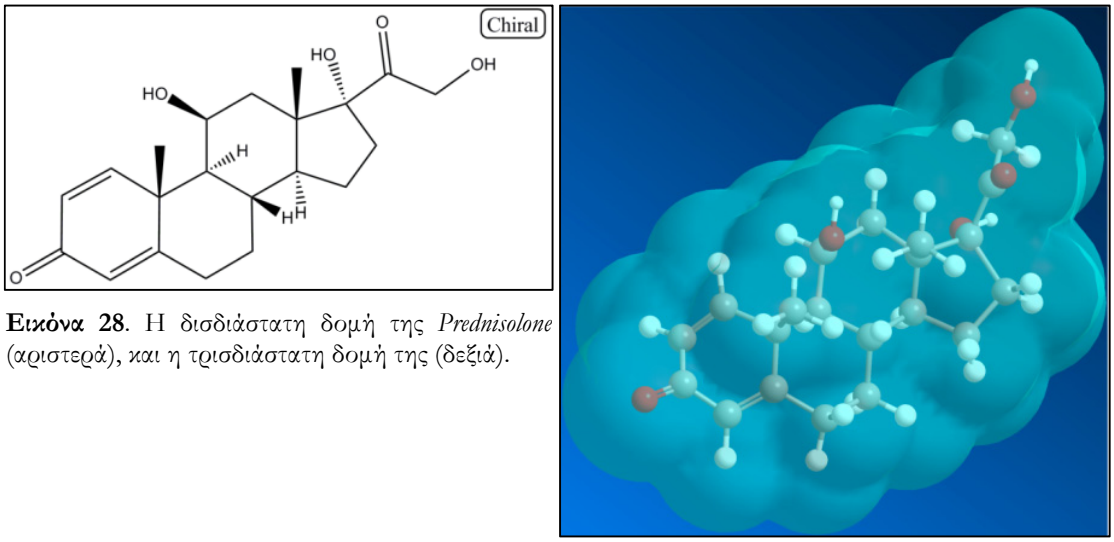
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ

Η λεπτομερής εκτίμηση κατά τη διάγνωση της νόσου, με κυτταρογενετικές, ανοσοφαινοτυπικές και μοριακές πληροφορίες, αλλάζει τη σύνθεση και την ένταση της χημειοθεραπείας για τους όγκους του ΚΝΣ, η οποία στηρίζεται σε συνδυασμό χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Τα σύγχρονα μοντέλα χημειοθεραπείας διακρίνουν τέσσερις φάσεις: θεραπεία εισαγωγής στην ύφεση, σταθεροποίησης της ύφεσης, προληπτική θεραπεία του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) και θεραπεία συντήρησης. Τα κλασσικά χημειοθεραπευτικά αποτελούν ακόμα τα όπλα πρώτης γραμμής για τη θεραπεία των νεοπλασιών του ΚΝΣ. Κάποια από αυτά είναι η Vincristine, η Μεθοτρεξάτη, η Aracytine, η Cyclophosphamide, η Ετοποσίδη, η Καρβοπλατίνη κ.α. Ένας ακόμα παράγοντας που χορηγείται αλλά όχι για θεραπευτικούς σκοπούς είναι τα γλυκοκορτικοειδή. Τα γλυκοκορτικοειδή χορηγούνται στη λευχαιμία ως κύριος παράγοντας θεραπείας αλλά στις νεοπλασίες του ΚΝΣ χορηγούνται για να ελέγξουν τη δημιουργία οιδήματος που προκαλείται από τη νεοπλασία. Οι παράγοντες αυτοί είναι οι περισσότερο χρησιμοποιούμενοι, ωστόσο ο τρόπος δράσης τους αποτελεί αντικείμενο συνεχούς μελέτης, αφού δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Σήμερα υπάρχουν και φάρμακα νέας γενιάς, που χρησιμοποιούν ως όπλο τους την υπερέκφραση ή μετάλλαξη παραγόντων των νεοπλασματικών κυττάρων, όπως π.χ. ο παράγοντας EGFR, για τον οποίο έχουν αναπτυχθεί αναστολείς όπως το *Erlotinib* και το *Gefitinib* (*N-(3-chloro-4-fluorophenyl)-7-methoxy-6-(3-(4-morpholinyl)propoxy)-4-quinazolinamide* **CAS Nr.** 184475-35-2). Πέραν, όμως των θεραπευτικών παραγόντων που χορηγούνται υπάρχει και μια άλλη κατηγορία χημειοθεραπευτικών που αφορά στους αναστολείς. Οι αναστολείς είναι μόρια, τα οποία έχουν ως χαρακτηριστικό τους το γεγονός ότι αναστέλλουν ειδικά τη λειτουργία σηματοδοτικών οδών του κυττάρου και με τον τρόπο αυτό το οδηγούν σε απόπτωση ή κυτταρική στάση, δηλαδή άρση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Πολλοί από αυτούς τους αναστολείς έχουν ήδη δοκιμασθεί για τη χρήση τους ως χημειοθεραπευτικά και κάποια χρησιμοποιούνται ήδη σαν θεραπευτικοί παράγοντες.

ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ

Ως γνωστόν τα γλυκοκορτικοειδή χρησιμοποιούνται ως παράγοντες καταστολής του ανοσοποιητικού συστήματος και ως εκ τούτου δίνονται στη λευχαιμία. Η αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή θεωρείται μείζονος σημασίας για την έκβαση και πρόγνωση της λευχαιμίας (Lauten, Stanulla et al. 2001; Den Boer, Harms et al. 2003; Cario, Fetz et al. 2008). Στους όγκους του ΚΝΣ τα γλυκοκορτικοειδή χορηγούνται για την αποτροπή οιδήματος, το οποίο προκαλείται από τον όγκο (Piette, Deprez et al. 2009). Έχουν δηλαδή ρόλο παρηγορητικής θεραπείας. Πάρα ταύτα, έχει δειχθεί ότι διαδραματίζουν και άλλους ρόλους πέραν αυτού της αντι-φλεγμονής. Πιο συγκεκριμένα έχει φανεί ότι παίζουν ρόλο στην αναστολή σηματοδοτικών οδών, όπως αυτή του *Sonic Hedgehog* μέσω της αποσταθεροποίησης της γονιδίου NMYC (Heine, Priller et al. 2010). Επίσης έχει αναφερθεί ότι τα γλυκοκορτικοειδή έχουν επίδραση στην κυτταρική μεμβράνη, αλλάζοντας τη διαπερατότητα της και έτσι μεταβάλλοντας την αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας (Hinkerohe, Wolfkuhler et al. 2011). Τέλος, έχει αποτελέσει πολύ ενδιαφέρον εύρημα ότι τα γλυκοκορτικοειδή διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα αποτελέσματα έχουν υπάρξει αντιφατικά, αφού κάποιες αναφορές μιλάνε για ενίσχυση του πολλαπλασιασμού (McLean, Frame et al. 1986; Langeveld, van Waas et al. 1992; Piette, Munaut et al. 2006) και άλλες μιλάνε για αναστολή του πολλαπλασιασμού (Gibelli, Zibera et al. 1989; Kaup, Schindler et al. 2001; Piette, Munaut et al. 2006). Παρά το γεγονός ότι τα γλυκοκορτικοειδή είναι από τα παλαιότερα και καλύτερα γνωστά φάρμακα, δεν υπάρχουν πολλές μελέτες για τη δράση τους στους όγκους του ΚΝΣ. Ακόμα περισσότερο η επίδραση που έχουν στη βιολογία των κυττάρων του ΚΝΣ είναι άγνωστη και η χρήση τους ως θεραπευτικών έχει μελετηθεί ακόμα λιγότερο (Κουλτούκη 2011).



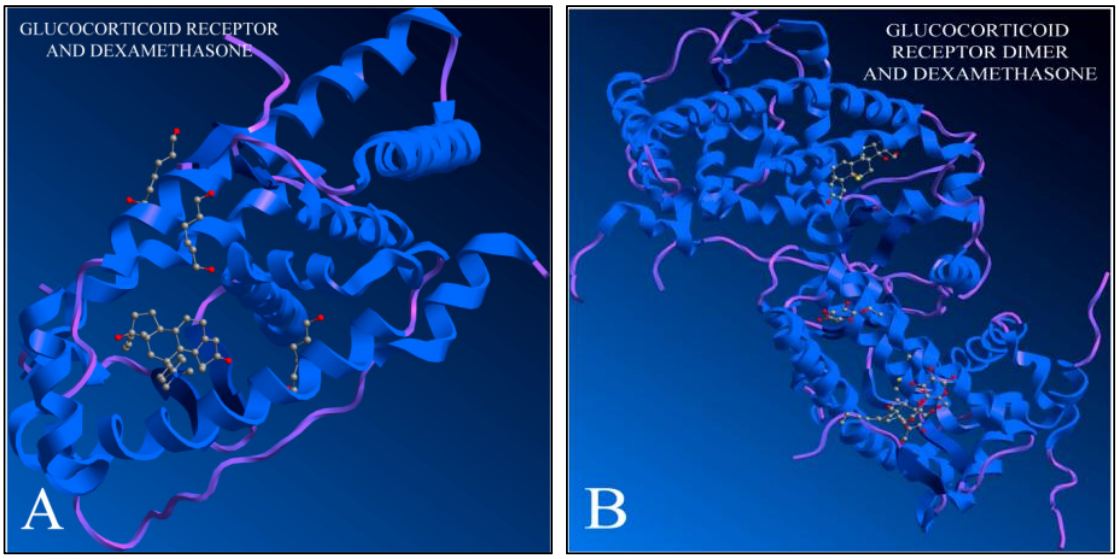
Εικόνα 28. Η δισδιάστατη δομή της *Prednisolone* (αριστερά), και η τρισδιάστατη δομή της (δεξιά).

Η *Prednisone,* η *Prednisolone* (*Prednisolone,* $C_{21}H_{28}O_5$, **CAS Nr**. 50-24-8) και η *Dexamethasone* (*Dexamethasone*, $C_{22}H_{29}FO_5$, **CAS Nr.** 50-02-2) (**Εικόνα 28**) είναι τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα γλυκοκορτικοειδή (GC) με υψηλή προσδεσιμότητα για τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) και λιγότερο για τον υποδοχέα των μινεραλοκορτικοειδών (*mineralocorticoid receptor*).

Τα γλυκοκορτικοειδή δρουν στα κύτταρα-στόχους μέσω της αλληλεπίδρασής τους με εξειδικευμένο υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, ο οποίος βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Το σύμπλοκο στεροειδούς - υποδοχέα μεταφέρεται στη συνέχεια στον πυρήνα του κυττάρου. Τα γλυκοκορτικοειδή και τα παράγωγά τους μπορούν να προκαλέσουν ποικιλία δράσεων σε κύτταρα και οργανισμούς, ανάλογα βέβαια με τον τύπο και τη συγκέντρωσή τους, το ενδοκυττάριο και εξωκυττάριο περιβάλλον κλπ. Αυτές οι δράσεις περιλαμβάνουν σημαντικές μεταβολές στο μεταβολισμό, που οδηγούν κυρίως στον καταβολισμό πρωτεϊνών, λιπιδίων και υδατανθράκων. Τα GC αυξάνουν τα επίπεδα γλυκόζης του αίματος, προκαλούν οστεοπόρωση και παίζουν σημαντικό ρόλο στο στρες. Επιπλέον καταστέλλουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, σε συγκεκριμένα συστήματα, συμπεριλαμβανομένης της ΟΛΛ (Κουλτούκη 2011).

Τα GC μπορεί να προκαλούν το θάνατο των κυττάρων μέσω διαφορετικών διαδρομών, με αποτέλεσμα αποπτωτικά ή νεκρωτικά ευρήματα, ανάλογα με τη διαθεσιμότητα και ανταποκρισιμότητα των μηχανισμών. Στην πρώτη περίπτωση μπορεί να είναι το αποτέλεσμα ρύθμισης γονιδίων τυπικών για απόπτωση, όπως μέλη της BCL2 οικογένειας, ενώ στη δεύτερη περίπτωση από καταστροφική επίδραση των GC σε απαραίτητες κυτταρικές λειτουργίες, πιθανά συντηρούμενες από αυτό-επαγωγή του υποδοχέα GC. Η ανοχή στα GC, μπορεί συχνά να οφείλεται σε ελαττωματική έκφραση του υποδοχέα των GC, που πιθανά είναι ο πιο αποτελεσματικός τρόπος στη στόχευση των πολλαπλών αντιλευχαιμικών δράσεων των GC (Gaynon and Carrel 1999; Renner, Ausserlechner et al. 2003; Ausserlechner, Obexer et al. 2004). Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται ένα τμήμα των σηματοδοτικών οδών που είναι γνωστά ότι συμμετέχουν στην

αποπτωτική δράση των γλυκοκορτικοειδών. Η πρόσδεση του υποδοχέα με το υπόστρωμα γίνεται μέσω της *Ligand Binding Domain* (LBD) περιοχής. Στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 29**) παρουσιάζεται η τρισδιάστατη μορφή του υποδοχέα ως μονομερές (**A**) και διμερές (**B**) σε πρόσδεση με το γλυκοκορτικοειδές *Dexamethasone*.

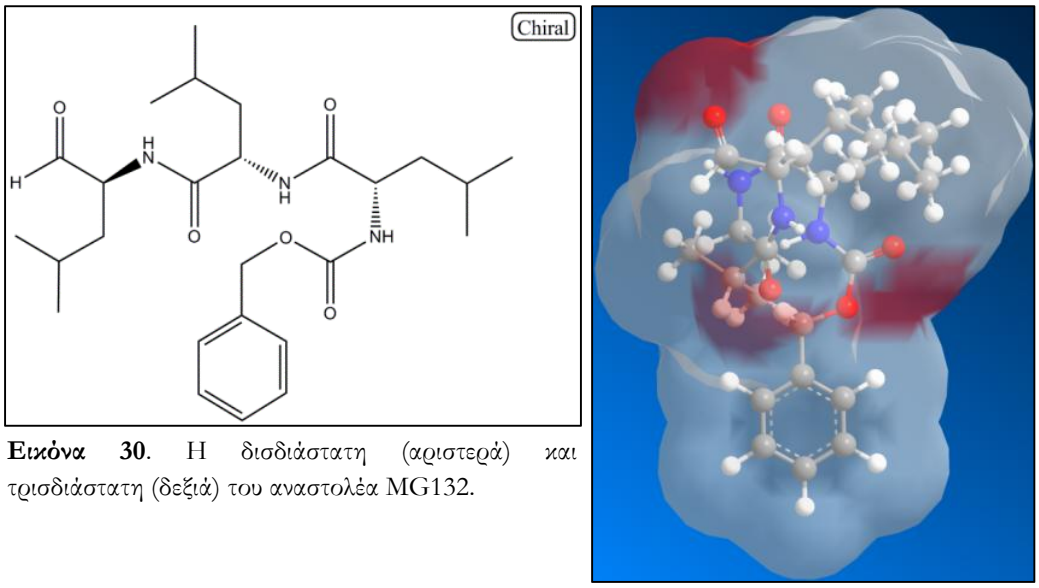


Εικόνα 29. Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών ως μονομερές (A) και ως διμερές (B) αντίστοιχα σε πρόσδεση με τη δεξαμεθαζόνη.

Η *Prednisolone*, ως σκεύασμα όταν δίνεται από του στόματος απορροφάται σε ποσοστό 50-90%, συνδέεται με πρωτεΐνες σε ποσοστό 65-91% και μεταβολίζεται στο ήπαρ από πρεδνιζόνη (μη δραστικό μόριο) σε *Prednisolone* (δραστικό μόριο). Σε φυσιολογική νεφρική λειτουργία έχει χρόνο ημιζωής ≈ 3.5 ώρες και αποβάλλεται από τα ούρα. Στην περίπτωση της ενδοφλέβιας χορήγησης τα γλυκοκορτικοειδή έχουν βιοδιαθεσιμότητα της τάξης του 90% κάτι που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία ως η σταθερά για τη χορήγηση της *Prednisolone* στα κυτταρικά συστήματα που μελετήθηκαν (Κουλτούκη 2011).

MG132 (PROTEASOME INHIBITOR)

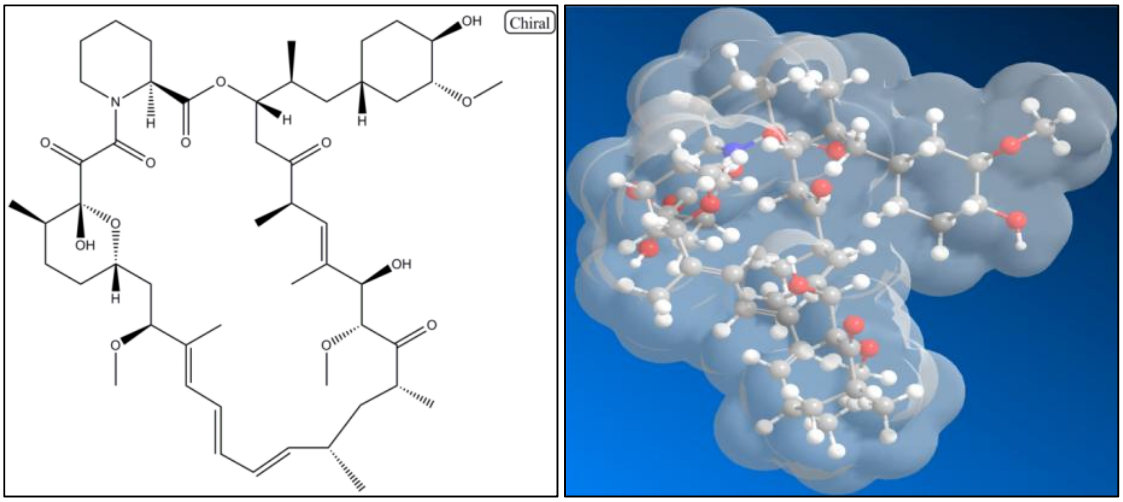
Ο MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al, $C_{26}H_{41}N_3O_5$, CAS Number 133407-82-6) είναι ένας συνθετικός αναστολέας, με εξαιρετική ικανότητα διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης και ως βασική γνωστή λειτουργία την αναστολή του πρωτεασώματος. Μια από τις βασικές λειτουργίες του αναστολέα είναι η παρεμπόδιση της αποδόμησης των πρωτεϊνών που έχουν σχηματίσει σύμπλοκο με την ουβικουιτίνη (ubiquitin). Ταυτοχρόνως όμως έχει δειχθεί ότι αναστέλλει επίσης την ενεργοποίηση του παράγοντα NFκB, και ενεργοποιεί την κινάση JNK1 (Lambrou, Papadimitriou et al. 2012). Στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 30**) παρουσιάζονται οι δισδιάστατη και τρισδιάστατη δομή του αναστολέα.



Εικόνα 30. Η δισδιάστατη (αριστερά) και τρισδιάστατη (δεξιά) του αναστολέα MG132.

RAPAMYCIN (mTOR INHIBITOR)

Η *Rapamycin* (*Rapamycin*, $C_{51}H_{79}NO_{13}$ **CAS Nr.** 53123-88-9) (**Εικόνα 31**) ή αλλιώς *Sirolimus* (INN/USAN), είναι ένας ανοσοκατασταλτικός παράγοντας, που αναστέλλει την ενεργοποίηση των Τ- και Β-λεμφοκυττάρων μέσω της *interleukin-2* (IL2). Ο παράγοντας αυτός είχε ανακαλυφθεί αρχικά ως παράγωγο του βακτηρίου *Streptomyces hygroscopicus*, που είχε αρχικά βρεθεί στα εδάφη των *Νήσων του Πάσχα*. Το 1999, πήρε έγκριση από τον FDA για κλινική χρήση από την εταιρεία Pfizer.



Εικόνα 31. Η δισδιάστατη δομή της *Rapamycin* (αριστερά) και η τρισδιάστατη (δεξιά).

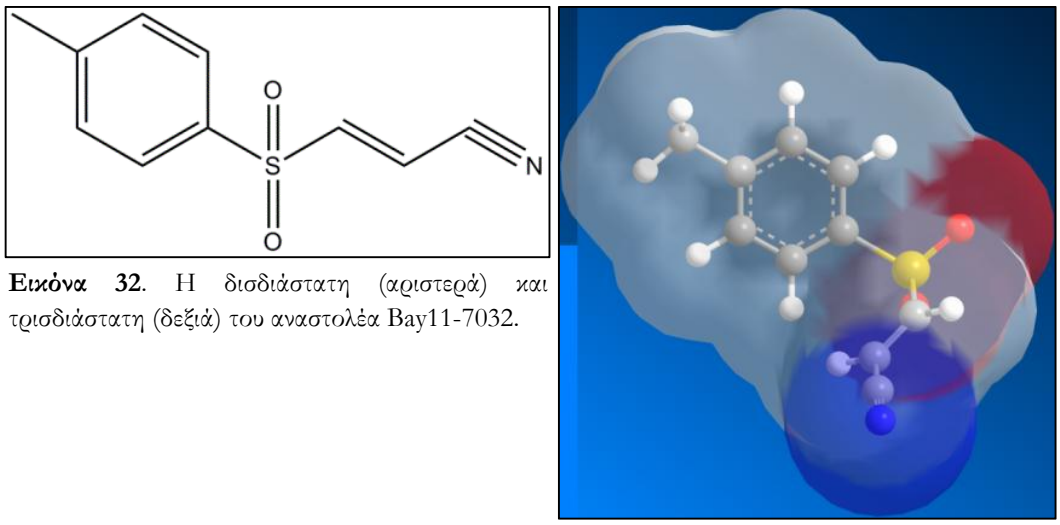
Η αρχική σύλληψη ήταν να χρησιμοποιηθεί ο παράγοντας αυτός ως αντι-μηκυτησιακός παράγων, αλλά εγκαταλείφθηκε αμέσως όταν φάνηκε ότι έχει ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες. Πάρα ταύτα, οι μελέτες συνεχίσθηκαν για τη χρήση του ως αντικαρκινικού παράγοντα. Η δράση της *Rapamycin*, έγκειται στην πρόσδεσή της με την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη *FK-binding protein 12* (FKBP12). Με τον τρόπο αυτό, το σύμπλοκο *Rapamycin-FKBP12* αναστέλλει τη σηματοδοτική οδό *mTOR Complex1* (mTORC1). Η οδός mTOR (mammalian Target of Rapamycin), είναι γνωστή και ως FRAP (FKBP-rapamycin associated protein), RAFT (rapamycin and FKBP target), RAPT1, και SEP. Σήμερα, ο κυρίαρχος όρος αυτής της σηματοδοτικής οδού είναι mTOR.

Η ιδιότητα αυτή του παράγοντα, η αναστολή δηλαδή της οδού mTOR οδήγησε σε διερεύνηση των πιθανών εφαρμογών του για τη θεραπεία του καρκίνου. Η ταυτόχρονη χορήγησή του με Doxorubicin έχει δώσει αρκετά καλά αποτελέσματα σε λεμφώματα και όγκους του ΚΝΣ. Η *Rapamycin* έχει φανεί ότι αναστέλλει τη λειτουργία της AKT κινάσης με αποτέλεσμα να ευαισθητοποιεί τα κύτταρα στους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (Chan 2004; Wendel, De Stanchina et al. 2004; Sun, Rosenberg et al. 2005). Ειδικότερα όμως για τους όγκους του ΚΝΣ δεν υπάρχουν πολλές αναφορές για το ρόλο της *Rapamycin* σε αυτούς. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι η *Rapamycin* είναι ένας γνωστός ενισχυτής της αυτοφαγίας και ανταγωνιστής ως εκ

τούτου της *Chloroquinone*, που είναι γνωστός αναστολέας της διαδικασίας αυτής (Levy and Thorburn 2012). Η συσχέτιση της ανάπτυξης ενός όγκου με τη διαδικασία της αυτοφαγίας είναι γνωστή και θεωρείται ότι αποτελεί ένα μηχανισμό κυτταρικού θανάτου. Πρέπει να σημειώσουμε όμως ότι υπάρχουν ενδείξεις ότι η διαδικασία αυτή μπορεί να είναι και μηχανισμός επιβίωσης. Η παρατήρηση αυτή προέκυψε από την παρατήρηση ότι λευχαιμικά κύτταρα ανθεκτικά στα γλυκοκορτικοειδή ήταν ευαίσθητα σε αναστολείς του πρωτεασώματος και ενδεχομένως ο μηχανισμός να οφείλεται στην αναστολή του αυτοφαγικού μηχανισμού (Lambrou, Papadimitriou et al. 2012). Άρα ο συνειρμός που μπορεί να γίνει είναι ότι ενδεχομένως να υπάρχει μια κοινή αντίδραση στις νεοπλασίες αναφορικά με την επιβίωση απέναντι στους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Η απόδειξη, όμως, αυτού του γεγονότος αποτελεί αντικείμενο περαιτέρω μελέτης.

BAY11 (IKB INHIBITOR)

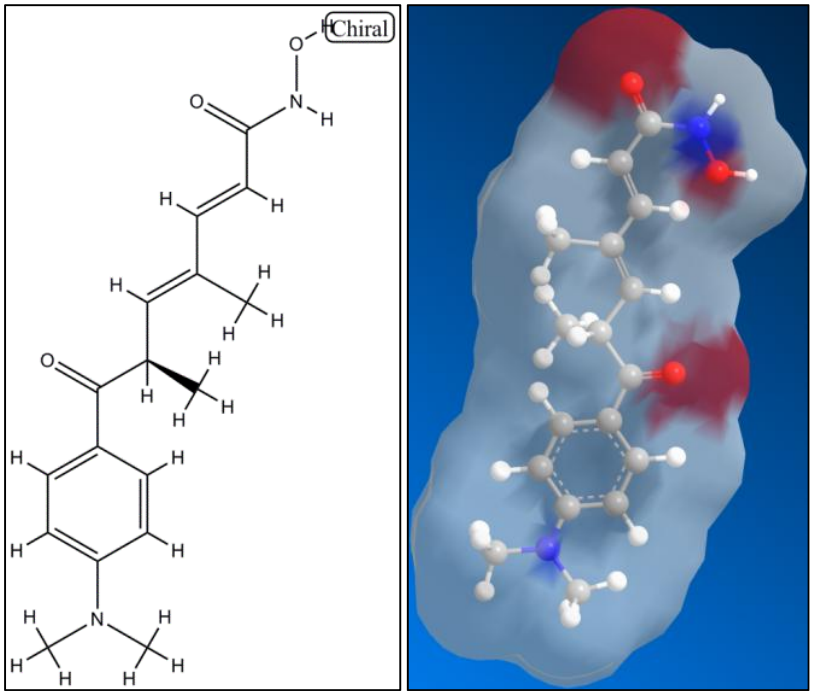
Το μόριο Bay11 (*3-[(4-methylphenyl)sulfonyl]-(2E)-propenenitrile*, $C_{10}H_9NO_2S$ **CAS Nr.** 19542-67-7) είναι ένας ειδικός αναστολέας της κινάσης ΙκΒ. Η κινάση αυτή διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά τη φλεγμονή και τη σηματοδότηση της κυτταρικής αντίδρασης από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα (Pahl 1999). Σχηματίζει σύμπλοκο με τον παράγοντα NFκB και σε μια επικείμενη εξωκυττάρια σηματοδότηση (π.χ. από κυτοκίνες όπως ο παράγοντας TNFA) φωσφορυλιώνεται, μόρια ουβικουιτίνης προσκολλώνται σε αυτόν και οδηγείται προς αποδόμηση στο πρωτεάσωμα (Gilmore 1999). Λόγω αυτής της διαδικασίας, απελευθερώνεται ο παράγοντας NFκB, ο οποίος περνάει στον πυρήνα για να σηματοδοτήσει τη μεταγραφή γονιδίων (Karin 1999; Karin 1999). Ο αναστολέας Bay11 αναστέλλει αυτήν ακριβώς τη λειτουργία. Δεν επιτρέπει την φωσφορυλίωση του ΙκΒ, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται και ο παράγοντας NFκB να εισέλθει στον πυρήνα και να μεταγράψει γονίδια. Πρόσφατες αναφορές έχουν δείξει ότι ο παράγοντας αυτός έχει αντικαρκινικές ιδιότητες σε κύτταρα καρκίνου του μαστού και αιματολογικές νεοπλασίες (Lambrou, Papadimitriou et al. 2012; Li, Li et al. 2012; Viola, Kopf et al. 2012). Στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 32**) παρουσιάζονται οι δομές του αναστολέα Bay11-7032.



Εικόνα 32. Η δισδιάστατη (αριστερά) και τρισδιάστατη (δεξιά) του αναστολέα Bay11-7032.

TRICHOSTATIN (HISTONE DEACETYLASE INHIBITOR)

Η Τριχοστατίνη (Trichostatin A, TSA, *7-[4-(dimethylamino)phenyl]-N-hydroxy-4,6-dimethyl-7-oxohepta-2,4-dienamide*, $C_{17}H_{22}N_2O_3$, **CAS Nr.** 58880-19-6) είναι ένα οργανικό μόριο με αντι-μικροβιακές και αντι-μυκητισιακές ιδιότητες. Είναι επιλεκτικός αναστολέας του ενζύμου Histone Deacetylase class I και II (Vanhaecke, Papeleu et al. 2004). Επίσης η τριχοστατίνη αποτελεί αναστολέα του κυτταρικού κύκλου κατά την έναρξη της G_2 φάσης. Ως εκ τούτου, έχει ήδη αναφερθεί ότι η τριχοστατίνη αποτελεί έναν πιθανό αντι-καρκινικό παράγοντα, αφού ενεργοποιεί γονίδια που σχετίζονται με την απόπτωση (Drummond, Noble et al. 2005; Shankar and Srivastava 2008). Στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 33**) παρουσιάζονται οι δομές του αναστολέα Trichostatin A.

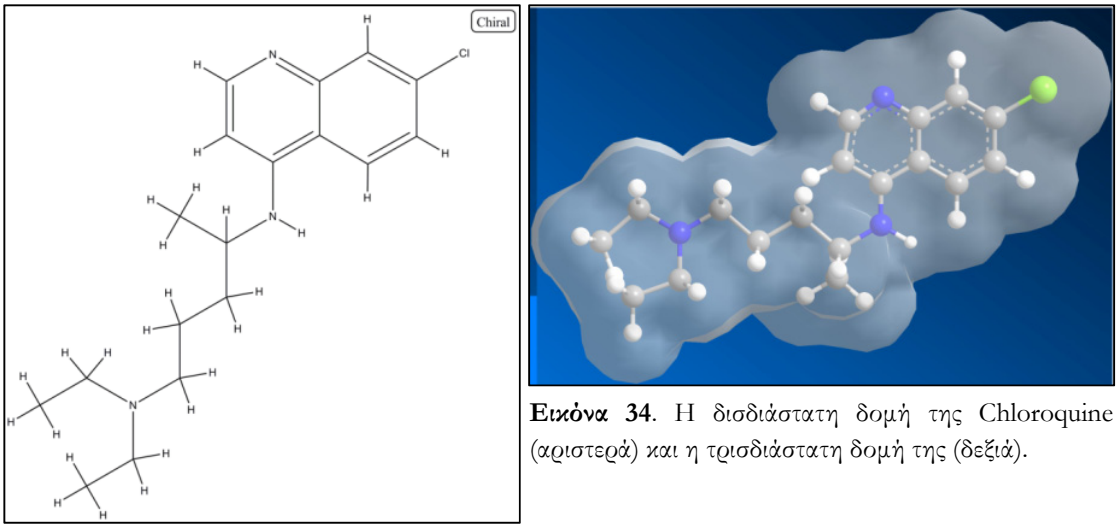


Εικόνα 33. Η δισδιάστατη (αριστερά) και τρισδιάστατη (δεξιά) του αναστολέα Trichostatin A (TSA).

CHLOROQUINE

Η *Chloroquine* (*Chloroquine*, $C_{18}H_{26}ClN_3$, **CAS Nr.** 54-05-7) (**Εικόνα 34**) ανακαλύφθηκε το 1934 από τον *Hans Andersag και συνεργάτες* στα εργαστήρια της εταιρίας *Bayer* και ονομάσθηκε *Resochin* (Krafts, Hempelmann et al. 2012). Μετά την ανακάλυψη της, εγκαταλείφθηκε λόγω της μεγάλης τοξικότητας που θεωρήθηκε ότι είχε στον άνθρωπο. Πάρα ταύτα, κατά τη διάρκεια του Β' Παγκοσμίου Πολέμου, ξεκίνησαν πάλι οι δοκιμές για τη χρήση του φαρμάκου αυτού ως παράγοντα καταπολέμησης της ελονοσίας (Plowe 2005).

Η *Chloroquine* διαχέεται εύκολα μέσα στο σώμα και ειδικά στο λιπώδη ιστό. Ενδιαφέρον αποτελεί το εύρημα ότι η *Chloroquine* συγκεντρώνεται στα λυσοσώματα και ως εκ τούτου θεωρείται παράγοντας αναστολής της αυτοφαγίας (Chen, Gombart et al. 2011). Αυτή του η ιδιότητα θεωρείται ότι είναι ο μηχανισμός κατά της ελονοσίας αλλά και από ότι έχει φανεί και σε άλλα νοσήματα όπως ο καρκίνος. Ειδικότερα, έχει δειχθεί ότι η *Chloroquine* ενεργοποιεί τη σηματοδοτική οδό της TP53 και ενισχύει τον αποπτωτικό μηχανισμό σε κύτταρα γλοιωβλαστώματος (Kim, Wustenberg et al. 2010).

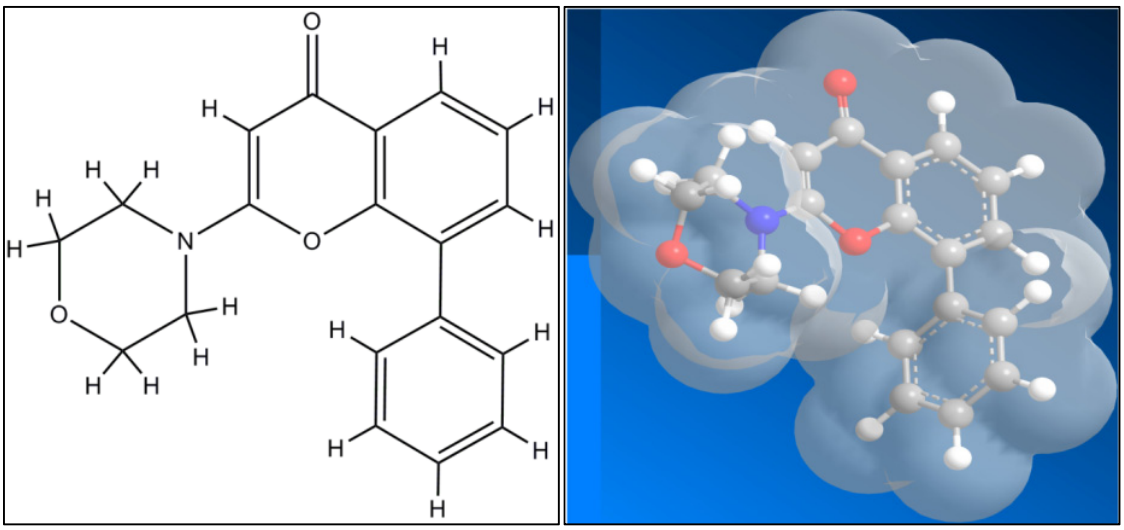


Εικόνα 34. Η δισδιάστατη δομή της Chloroquine (αριστερά) και η τρισδιάστατη δομή της (δεξιά).

PI3K INHIBITOR

Οι αναστολείς της Phosphoinositide 3-kinase (PI3K inhibitor LY294002, C19H17NO3, CAS Nr. 154447-36-6) (**Εικόνα 35**) αποτελούν πιθανούς θεραπευτικούς παράγοντες μιας και λειτουργούν μέσω της αναστολής του ενζύμου *Phosphoinositide 3-kinase*, που είναι τμήμα της μεγαλύτερης σηματοδοτικής οδού PI3K/AKT/mTOR. Οι αναστολείς της οδού αυτής είναι συνθετικοί και για πρώτη φορά δημιουργήθηκαν το 1994 (Vlahos, Matter et al. 1994). Η σηματοδοτική αυτή οδός έχει ήδη μελετηθεί για το ρόλο της στον καρκίνο και αποτελεί μια μελλοντική και πολλά υποσχόμενη θεραπευτική κατεύθυνση (Neri, Borgatti et al. 2003; Lasithiotakis, Sinnberg et al. 2008).

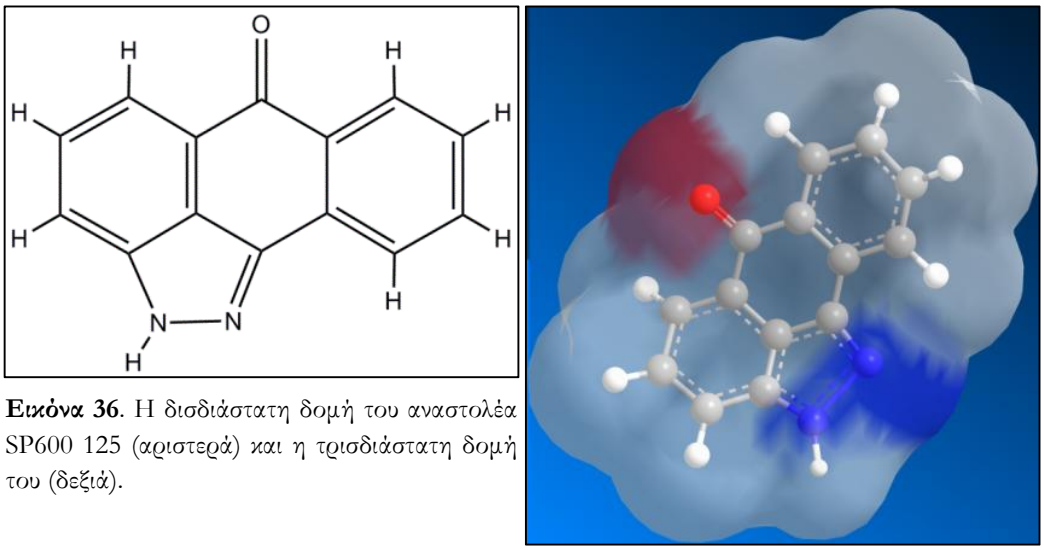
Οι πρώτες διαπιστώσεις για το ρόλο της κινάσης PI3K προήλθαν από τη σύνδεσή της με την AKT κινάση, όπου είχε δειχθεί ότι η κινάση αυτή αλληλεπιδρά με την PI3K μέσω της οικογένειας γονιδίων RAS (Sakata, Kato et al. 2002). Επίσης έχει δειχθεί ότι η PI3K είναι υπερεκφραζόμενη σε όγκους του ΚΝΣ, σε συνδυασμό με την απουσία του PTEN, που είναι αναστολέας της PI3K (Choe, Horvath et al. 2003; Su, Mayo et al. 2003). Έτσι, έχει γίνει αναφορά στις θεραπευτικές ιδιότητες που πιθανόν να έχουν οι αναστολείς της κινάσης αυτής με επίσης πιθανά αποτελέσματα στην αγγειογένεση και μετάσταση (Newton 2004). Οι αναστολείς αυτοί έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί σε συγχορήγηση με άλλους κλασσικούς θεραπευτικούς παράγοντες, όπως η πλατίνα, η Doxorubicin και άλλοι. Γενικά τα αποτελέσματα από τη χρήση των αναστολέων της PI3K είναι λίγα αλλά δείχνουν να έχουν επιτυχία στα πρώτα κυτταρικά μοντέλα. Επίσης, όλες οι μελέτες έχουν γίνει σε γλοιώματα, είτε σε *in vitro*, είτε σε *in vivo* μοντέλα (Chen, Zhou et al. 2012; Wang, Wang et al. 2012).



Εικόνα 35. Η δισδιάστατη δομή του αναστολέα της PI3K *LY294002* (αριστερά) και η τρισδιάστατη δομή του (δεξιά).

SP600 (JNK II INHIBITOR)

Ο αναστολέας SP600 125 (1,9-Pyrazoloanthrone, $C_{14}H_8N_2O$, **CAS Nr**. 129-56-6). Είναι οργανική συνθετική ένωση παράγωγο της ανθρόνης (κυκλική αρωματική κετόνη). Έχει δειχθεί ότι αποτελεί αναστολέα των κινασών JNK και έναν ελκυστικό παράγοντα αντι-καρκινικής εφαρμογής (Okuno, Saito et al. 2004). Δεν είναι πολλά γνωστά για τον αναστολέα αυτό. Έχουν γίνει μελέτες σε τροφοβλάστες, όπου έχει δειχθεί η αναστολή της οδού MAPK και ενεργοποίηση των πρωτεασών MMP (Cohen, Meisser et al. 2006). Ταυτοχρόνως έχει δειχθεί ότι ο αναστολέας SP600 δεν προκαλεί απόπτωση ή αναστολή του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα από ασκήτη αρθρώσεως με χρόνια ρευματοειδή αρθρίτιδα δηλαδή στη χρόνια φλεγμονή (Zhang, Dong et al. 2012). Στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 36**) παρουσιάζεται η δομή του αναστολέα SP600 125.



Εικόνα 36. Η δισδιάστατη δομή του αναστολέα SP600 125 (αριστερά) και η τρισδιάστατη δομή του (δεξιά).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΟΔΟΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Ο κυτταρικός θάνατος θα μπορούσε να ορισθεί ως η μη αναστρέψιμη καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης (Kroemer, Galluzzi et al. 2009). Η ισχύουσα κατηγοριοποίηση των μορφών κυτταρικού θανάτου ξεχωρίζει τρεις κύριες κατηγορίες. Η πρώτη ονομάζεται *Κυτταρικός Θάνατος Τύπου Ι,* γνωστός ως απόπτωση. Ο τύπος αυτός θανάτου χαρακτηρίζεται από μεταβολές στον πυρήνα του κυττάρου με συρρίκνωση του γενετικού υλικού (*πύκνωση*) και κατάτμηση αυτού (*καρυόρηξις*) (Golstein and Kroemer 2007). Η δεύτερη ονομάζεται *Κυτταρικός Θάνατος Τύπου ΙΙ,* είναι γνωστός ως *αυτοφαγία* και χαρακτηρίζεται ως η συγκέντρωση μεμβρανών δύο στοιβάδων στο κυτταρόπλασμα, γνωστών ως αυτοφαγικών σωματίων. Τέλος, η τελευταία μορφή ονομάζεται *Κυτταρικός Θάνατος Τύπου ΙΙΙ* και είναι γνωστός ως *νέκρωση*. Η νέκρωση διαφέρει από τους δύο άλλους τύπους στο ότι λαμβάνει χώρα οξεία καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης και διόγκωση των κυτταρικών οργανιδίων. Ο κυτταρικός θάνατος αποτελεί βασικό μηχανισμό ανάπτυξης των νεοπλασιών. Υπάρχει μια λεπτή ισορροπία μεταξύ των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων και αυτών που προχωρούν σε απόπτωση ή νέκρωση (Κουλτούκη 2011).

ΑΠΟΠΤΩΣΗ (APOPTOSIS)

Ως απόπτωση ορίζεται ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος που προκαλείται όταν το κύτταρο δεν μπορεί να επιβιώσει πλέον. Είναι ένας φυσιολογικός μηχανισμός, ο οποίος είναι πολύ καλά ρυθμισμένος και τυχόν δυσλειτουργίες ή αποτυχίες λειτουργίας του οδηγούν σε παθήσεις, μεταξύ των οποίων και οι νεοπλασίες. Περιλαμβάνει μία σειρά βιοχημικών γεγονότων που οδηγούν σε μορφολογικές αλλαγές και αποδομή του κυττάρου, με προσεκτική απομάκρυνση των συστατικών μέσω φαγοκύτωσης. Βασικό μορφολογικό χαρακτηριστικό των κυττάρων είναι η κατάτμηση του DNA σε μικρά σωμάτια, τα οποία είναι γνωστά ως *αποπτωτικά σωμάτια.*

Σε αντίθεση με τη νέκρωση, που είναι το αποτέλεσμα οξείας κυτταρικής βλάβης, η απόπτωση είναι απαραίτητη φυσιολογική λειτουργία στη ζωή ενός οργανισμού, συμμετέχοντας στις λειτουργίες της ομοιόστασης, της ανάπτυξης, της αλληλεπίδρασης των λεμφοκυττάρων και στην εμβρυογένεση (Holleman, Cheok et al. 2004; Holleman, den Boer et al. 2006).

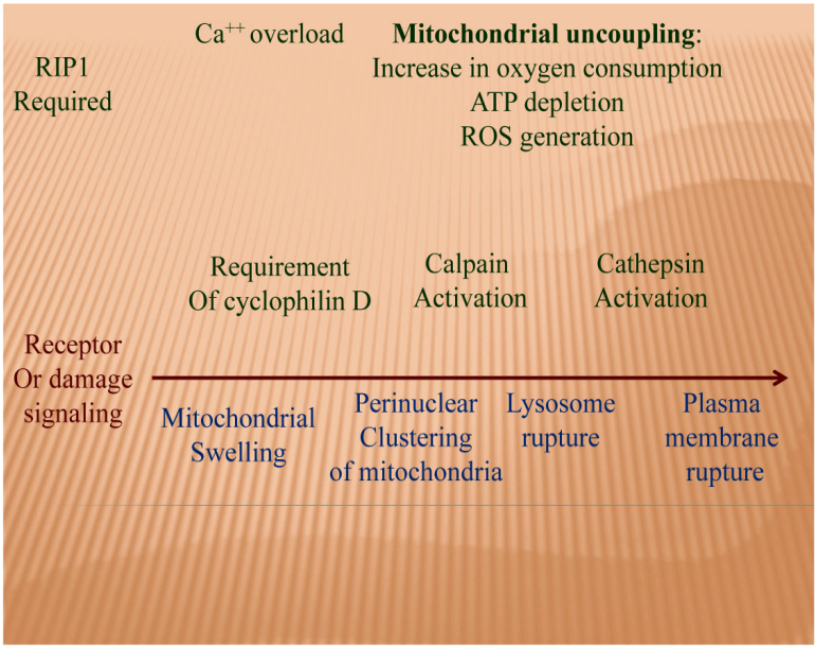
Ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος αποτελεί μία απόλυτα φυσιολογική διαδικασία και περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1842 από τον Γερμανό επιστήμονα *Carl Vogt*, ωστόσο περισσότερες λεπτομέρειες αναπτύχθηκαν στη δεκαετία του 1960-70.

Οι κύριες πρωτεΐνες που είναι και οι «εκτελεστές» της απόπτωσης είναι οι κασήσες (caspases). Είναι πρωτεολυτικά ένζυμα ειδικά για τη λύση των πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού (Κουλτούκη 2011).

ΝΕΚΡΩΣΗ (NECROSIS)

Η νέκρωση αποτελεί μια μορφή κυτταρικού θανάτου διαφορετική από την απόπτωση (Golstein and Kroemer 2007). Ενώ στην απόπτωση ενεργοποιείται ένας μηχανισμός, ο οποίος απαιτεί τη μεταγραφή γονιδίων και κατά συνέπεια την παραγωγή πρωτεϊνών, στη νέκρωση ο κυτταρικός θάνατος είναι ακαριαίος. Η νέκρωση ενεργοποιεί αντιφλεγμονώδεις μηχανισμούς, πιθανόν λόγω της απελευθέρωσης κυτταρικών συστατικών που ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα. Επίσης, ενώ τα αποπτωτικά κύτταρα συρρικνώνονται και φαγοκυττώνονται από τα μακροφάγα, τα νεκρωτικά κύτταρα διογκώνονται και μόνο μέρη τους φαγοκυττώνονται (Savill and Fadok 2000; Krysko, Denecker et al. 2006).

Στις περιπτώσεις καταστροφής της κυτταρικής μεμβράνης λόγω της επαφής της με ισχυρές αποδιατακτικές (όπως τα απορρυπαντικά) ουσίες ή από απότομη ψύξη ή απόψυξη, η καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης είναι άμεση και χωρίς κάποιο καθορισμένο μηχανισμό, επειδή ακολουθούνται προφανώς οι νόμοι της θερμοδυναμικής. Σε κάθε άλλη όμως περίπτωση, όπως η δράση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, ο μηχανισμός της νέκρωσης είναι ρυθμιζόμενος και απαιτείται γονιδιακή ρύθμιση (Golstein and Kroemer 2007). Στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 37**) παρουσιάζονται τα βήματα που ακολουθεί το κύτταρο ώστε να εισέλθει σε νεκρωτικό θάνατο (Chautan, Chazal et al. 1999).



Εικόνα 37. Βήματα στη σηματοδότηση προς τον νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο (προσαρμοσμένο από τους *Golstein and Kroemer* 2007). RIP1: receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1 (RIPK1), ROS:Reactive Oxygen Species

Έχει αναφερθεί επίσης η νέκρωση ως μηχανισμός διαφοροποίησης, όπως επί παραδείγματι στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων, όπου ελέγχεται με αυτόν τον τρόπο η επιμήκυνση των οστών (Roach and Clarke 2000), και στη ρύθμιση της ομοιόστασης παραδείγματος χάριν στην αναζωογόνηση των επιθηλιακών κυττάρων του παχέος εντέρου (Barkla and Gibson 1999). Ο προγραμματισμένος νεκρωτικός θάνατος έχει παρατηρηθεί όταν πραγματοποιείται αναστολή της αυτοφαγικής οδού. Ειδικότερα αυτό έχει παρατηρηθεί στις περιπτώσεις υποξίας όπου τα κύτταρα αναγκάζονται να εισέλθουν σε οδό κυτταρικού θανάτου (Degenhardt, Mathew et al. 2006). Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων πραγματοποιείται ο νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος είναι πολλαπλοί. Ένας εκ των μηχανισμών αυτών είναι η αναστολή των κασπασών, πρωτεϊνών που αποτελούν τους «εκτελεστές» του κυττάρου. Αυτό έχει παρατηρηθεί στις περιπτώσεις της εμβρυϊκής ανάπτυξης όπου η νέκρωση ουσιαστικά αντικαθιστά την αποτυχία της απόπτωσης στα κύτταρα. Ένας άλλος μηχανισμός που μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρική νέκρωση είναι η έλλειψη σε ATP, η οποία αποτυγχάνει να οδηγήσει τα κύτταρα σε ενεργοποίηση των κασπασών και κατά συνέπεια σε αποπτωτικό θάνατο (Vercammen, Beyaert et al. 1998). Επιπροσθέτως, το μονοξείδιο του αζώτου (NO), ένα σηματοδοτικό μόριο, έχει αναφερθεί ότι αναστέλλει τη λειτουργία των κασπασών με ομοιοπολική πρόσδεση στην ομάδα κυστεΐνης που διαθέτουν οι κασπάσες και αλλάζει την τροχιά του κυττάρου από τον αποπτωτικό στον νεκρωτικό θάνατο (Nicotera, Bernassola et al. 1999). Φαίνεται λοιπόν ότι ο νεκρωτικός θάνατος, ενώ θεωρείται ένα τυχαίο γεγονός, είναι ένα συμβάν στην πορεία του κυττάρου που είναι ρυθμιζόμενο (Κουλτούκη 2011).

ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ (AUTOPHAGY)

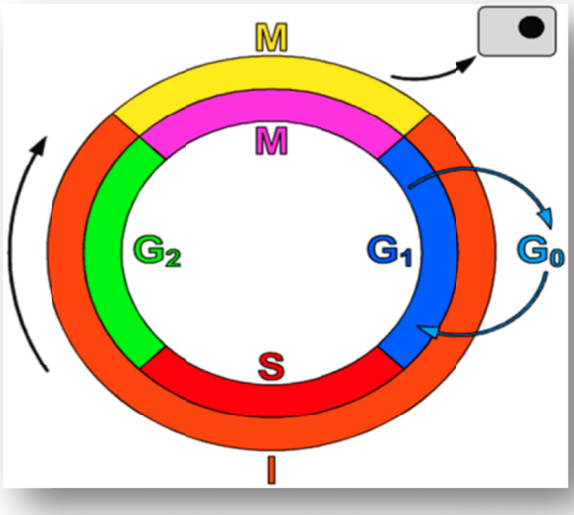
Στην κυτταρική βιολογία, αυτοφαγία ή αυτοφαγοκύττωση, είναι μία καταβολική διαδικασία που αφορά την αποδόμηση των συστατικών του κυττάρου μέσω λυσοσωμικού μηχανισμού. Είναι αυστηρά ελεγχόμενη διαδικασία που παίζει φυσιολογικό ρόλο στην ανάπτυξη του κυττάρου, την εξέλιξη και την ομοιόσταση, βοηθώντας στο να διατηρηθεί ισορροπία μεταξύ της σύνθεσης, της αποδόμησης και της επακόλουθης ανακύκλωσης των κυτταρικών προϊόντων. Αποτελεί βασικό μηχανισμό με τον οποίο ένα κύτταρο που βρίσκεται σε ένδεια θρεπτικού υλικού, μπορεί να αλλάξει την κατανομή των θρεπτικών συστατικών από μη απαραίτητες λειτουργίες σε πιο αναγκαίες για τη ζωή του κυττάρου (Rabinowitz and White 2010).

Υπάρχει ποικιλία αυτοφαγικών διαδικασιών, σε όλες όμως είναι κοινή η αποδόμηση των ενδοκυττάριων συστατικών μέσω του λυσοσώματος. Ο πιο γνωστός μηχανισμός αυτοφαγίας περιλαμβάνει το σχηματισμό μεμβράνης γύρω από μία στοχευόμενη περιοχή του κυττάρου, που απομονώνει το περιεχόμενο αυτό από το υπόλοιπο κυτταρόπλασμα. Το κυστίδιο που σχηματίζεται ενώνεται με ένα λυσόσωμα και γίνεται η αποδόμηση των συστατικών. Περιγράφηκε πρώτη φορά το 1960 (Stromhaug and Klionsky 2001; Kundu and Thompson 2008), αλλά ακόμη οι ακριβείς

διαδικασίες και μηχανισμοί βρίσκονται υπό έρευνα. Διερευνάται ο ρόλος της στις ασθένειες: μπορεί να βοηθά στην πρόληψη ή και τη διακοπή της εξέλιξης μερικών ασθενειών, όπως μερικοί τύποι νευροεκφυλιστικών νοσημάτων ή καρκίνου (Mizushima and Klionsky 2007) και μπορεί να παίζει προστατευτικό ρόλο στις λοιμώξεις από ενδοκυττάρια παθογόνα, ωστόσο σε μερικές περιπτώσεις μπορεί και να συμβάλλει στην ανάπτυξη μιας νόσου (Κουλτούκη 2011).

ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Ο κυτταρικός κύκλος των ευκαρυωτικών κυττάρων είναι πολύπλοκο φαινόμενο και ένα από τα πιο μελετημένα θέματα στην έρευνα, αφού η διαταραχή του οδηγεί σε καρκίνο. Ο κυτταρικός κύκλος, ή ο κύκλος της κυτταρικής διαίρεσης, αποτελεί μία σειρά γεγονότων που λαμβάνουν χώρα στο κύτταρο, οδηγώντας στη διαίρεση και το διπλασιασμό (την αναπαραγωγή του). Σε κύτταρα με πυρήνα, τα ευκαρυωτικά, ο κυτταρικός κύκλος μπορεί να χωριστεί σε δύο περιόδους: τη *μεσόφαση*, κατά την οποία το κύτταρο αυξάνεται, συσσωρεύοντας τα θρεπτικά συστατικά που χρειάζονται για τη μίτωση και διπλασιάζουν το DNA, και τη φάση της *μίτωσης*, *φάση* ***M***, κατά την οποία το κύτταρο διαιρείται σε δύο διαφορετικά κύτταρα, τα θυγατρικά. Ο κύκλος της κυτταρικής διαίρεσης αποτελεί ζωτική διαδικασία με την οποία μονοκύτταρα γονιμοποιημένα ωά αναπτύσσονται σε ώριμο οργανισμό, όπως και η διαδικασία με την οποία ανανεώνονται οι τρίχες, το δέρμα, τα κύτταρα του αίματος και μερικά εσωτερικά όργανα (Κουλτούκη 2011).



Εικόνα 38. Διαγραμματική αναπαράσταση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου, όπου φαίνονται οι μεταβάσεις από το ένα σημείο του κυτταρικού κύκλου στο επόμενο.
(πηγή: http://en.wikipedia.org/wiki/Cell_cycle)

ΦΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Ο κυτταρικός κύκλος αποτελείται από πέντε διακριτές φάσεις: τη φάση **G_1** (**G** από τη λέξη gap: κενό), φάση **S** (***S****ynthesis*), φάση **G_2** (*μεσόφαση*) και φάση **M** (***M****itosis*). Η φάση ***M***, αποτελείται από δύο αλληλένδετες διαδικασίες: τη μίτωση, στην οποία τα χρωμοσώματα του κυττάρου χωρίζονται σε δύο θυγατρικά κύτταρα και την κυτοκίνηση (*cytokinesis*), στην οποία το κυτταρόπλασμα διαιρείται, δημιουργώντας έτσι δύο διακριτά κύτταρα. Η ενεργοποίηση μίας φάσης εξαρτάται από τη σωστή εξέλιξη και ολοκλήρωση της προηγούμενης. Κύτταρα που διαιρούνται σπάνια ή και καθόλου, εισέρχονται στη φάση G_0 (Gap 0), μία φάση ηρεμίας, η οποία είναι είτε ένα στάδιο διαφορετικό από τη μεσόφαση είτε μία εκτεταμένη G_1 φάση.

Μετά την κυτταρική διαίρεση, κάθε θυγατρικό κύτταρο εισέρχεται στη μεσόφαση του νέου κύκλου, η οποία είναι φάση προετοιμασίας για την επόμενη κυτταρική διαίρεση (Smith and Martin 1973; Κουλτούκη 2011) (**Εικόνα 38**).

ΦΑΣΗ ΗΡΕΜΙΑΣ G_0

Ευκαρυωτικά κύτταρα πολυκύτταρων οργανισμών που δεν αναπαράγονται, εισέρχονται μετά τη φάση G_1, στη φάση ηρεμίας G_0 και μπορεί να παραμείνουν εκεί για μεγάλες περιόδους. Αυτό συμβαίνει συνήθως σε κύτταρα πλήρως διαφοροποιημένα. Η είσοδος του κυττάρου σε ηρεμία, μπορεί να είναι και η ανταπόκριση του κυττάρου σε βλάβη ή αποδομή του DNA, η οποία θα έκανε τα θυγατρικά κύτταρα μη βιώσιμα. Συχνά, είναι επίσης η βιοχημική εναλλακτική στην αυτό-αποδόμηση ενός κυττάρου με τέτοια βλάβη, μέσω της απόπτωσης.

ΜΕΣΟΦΑΣΗ, ΦΑΣΗ G_1

Η πρώτη φάση της μεσόφασης, που ξεκινά από το τέλος της προηγούμενης φάσης M μέχρι την έναρξη της σύνθεσης DNA, ονομάζεται G_1. Σ' αυτή τη φάση, οι βιοσυνθετικές διεργασίες του κυττάρου που κατά τη διάρκεια της μίτωσης είχαν επιβραδυνθεί, επιταχύνονται. Συντίθενται ένζυμα που απαιτούνται για τη φάση S, ιδίως αυτά που απαιτούνται για τη σύνθεση DNA. Η διάρκεια αυτής της φάσης ποικίλλει χρονικά, ακόμη και για διαφορετικά κύτταρα μέσα στο ίδιο είδος (Smith and Martin 1973).

ΜΕΣΟΦΑΣΗ, ΦΑΣΗ *S*

Η φάση S αρχίζει με τη σύνθεση DNA και όταν ολοκληρωθεί, όλα τα χρωμοσώματα έχουν αντιγραφεί: κάθε χρωμόσωμα έχει από δύο χρωματίδες. Σ' αυτή τη φάση η μεταγραφή RNA και η πρωτεϊνοσύνθεση διατηρούνται σε χαμηλά επίπεδα, εκτός από την παραγωγή ιστονών, που κατεξοχήν παράγονται σ' αυτή τη φάση (Nelson, Ye et al. 2002).

ΜΕΣΟΦΑΣΗ, ΦΑΣΗ G_2

Σ' αυτή τη φάση συντίθενται αρκετές πρωτεΐνες, κυρίως αυτές που συμμετέχουν στη δημιουργία των μικροσωληνίσκων, που απαιτούνται στη διαδικασία της μίτωσης. Αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης σ' αυτό το στάδιο έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή της μίτωσης.

ΜΙΤΩΣΗ, ΦΑΣΗ *M*

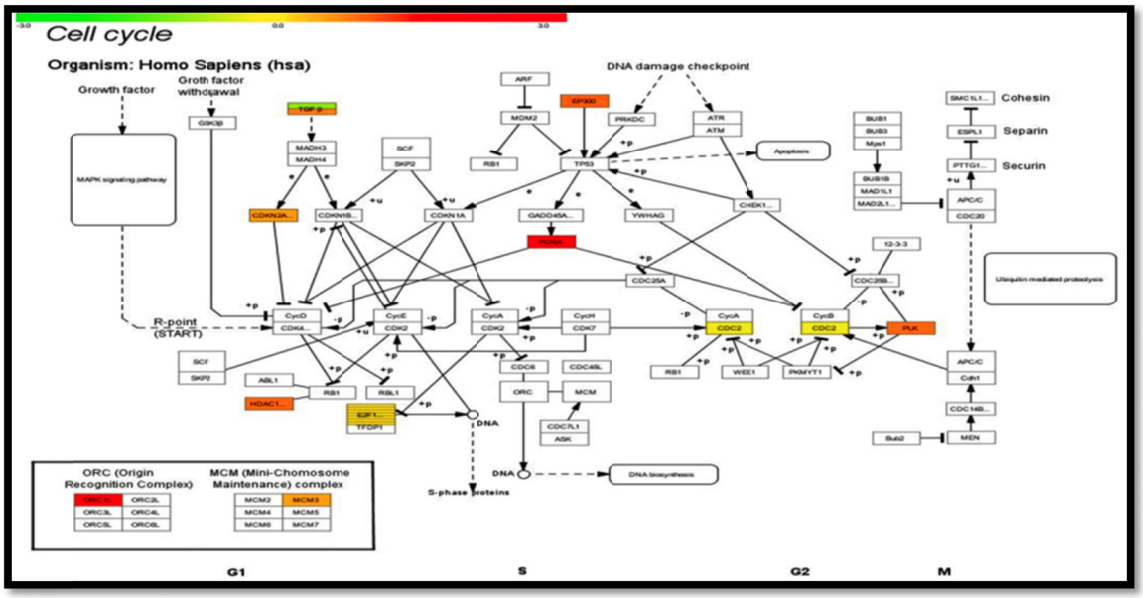
Η σχετικά σύντομη φάση Μ, συνίσταται στη διαίρεση του πυρήνα (καρυοκίνηση) και τη διαίρεση του κυτταροπλάσματος (κυτταροκίνηση). Η φάση Μ χωρίζεται περαιτέρω στις εξής διακριτές φάσεις, την πρόφαση, προμετάφαση, μετάφαση, ανάφαση και τελόφαση. Μετά τη μίτωση και την κυτταροκίνηση, το μητρικό κύτταρο έχει διαιρεθεί σε δύο θυγατρικά, γενετικά όμοια μεταξύ τους αλλά και με το μητρικό κύτταρο. Η μίτωση απαντάται μόνο σε ευκαρυωτικά κύτταρα.

Η διαδικασία της μίτωσης είναι πολύπλοκη και δέχεται ρυθμίσεις με λεπτομερείς μηχανισμούς, ώστε να υπάρχει αλληλουχία των γεγονότων και με το τέλος της μίας φάσης να αρχίζει η επόμενη. Διαταραχές αυτής της λειτουργίας μπορούν είτε να οδηγήσουν αυτό το κύτταρο σε θάνατο μέσω απόπτωσης ή να προκαλέσουν μεταλλάξεις που οδηγούν σε καρκίνο (Κουλτούκη 2011).

ΓΟΝΙΔΙΑ ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Δύο ομάδες γονιδίων, η cip/kip και η INK4a/ARF (*InhibitorofKinase 4/ AlternativeReadingFrame*), δρουν ανασταλτικά στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Επειδή η δράση τους είναι κυρίαρχη στην πρόληψη σχηματισμού όγκων, τα γονίδια αυτά είναι γνωστά ως ογκοκατασταλτικά. Η οικογένεια cip/kip περιλαμβάνει τα γονίδια p21, p27 και p57. Σταματούν τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G_1, μέσω της σύνδεσης και απενεργοποίησης των συμπλόκων κυκλινών- CDKs. Το p21 ενεργοποιείται από το γονίδιο p53, το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιείται από βλάβη του DNA πχ λόγω ακτινοβολίας, από υποξία ή από παρεκκλίνουσα αναπαραγωγή των κυττάρων. Το p27 ενεργοποιείται από τον Transforming Growth Factor β (TGF β), έναν αναστολέα της αύξησης.

Η οικογένεια INK4a/ARF περιλαμβάνει το p161NK4a που σταματά τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G_1 και το p14arf που αναστέλλει την αποδόμηση του p53 (**Εικόνα 39**).



Εικόνα 39. Διαγραμματική παρουσίαση των σηματοδοτικών οδών του κυτταρικού κύκλου (πηγή: KEGG Database, http://www.genome.jp/kegg/pathway/hsa/hsa04110.html).

Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου περιλαμβάνει διαδικασίες σημαντικές για την επιβίωση του κυττάρου, όπως την ανίχνευση και επιδιόρθωση βλαβών στο γενετικό υλικό, αλλά και την πρόληψη της ανεξέλεγκτης κυτταρικής διαίρεσης. Τα μοριακά γεγονότα που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο έχουν συγκεκριμένη αλληλουχία αλλά και κατεύθυνση, δηλαδή η κάθε διαδικασία πρέπει να τελειώσει για να αρχίσει η επόμενη και είναι αδύνατο να «αναστραφεί» ο κύκλος.

Η ομαλή πορεία του κυττάρου στα στάδια του κυτταρικού κύκλου, εξαρτάται από δύο τάξεις ρυθμιστικών μορίων, τις κυκλίνες (*cyclines*) και τις κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (*cyclin-dependent kinases, CDKs*).

Οι κυκλίνες με τις CDKs, σχηματίζουν ένα ενεργό ετεροδιμερές, ωστόσο ούτε οι κυκλίνες ούτε οι CDKs είναι ενεργές μεμονωμένα. Οι CDKs μέσα στο ενεργό ετεροδιμερές μπορούν να προκαλέσουν φωσφορυλίωση, η οποία ενεργοποιεί ή απενεργοποιεί πρωτεΐνες στόχους, ρυθμίζοντας τη μετάβαση του κυττάρου στην επόμενη φάση του κυτταρικού κύκλου. Οι CDKs εκφράζονται σταθερά στα κύτταρα, ενώ οι κυκλίνες συντίθενται σε συγκεκριμένα στάδια του κυτταρικού κύκλου, ως απάντηση σε διάφορα μοριακά σήματα.

Μετά τη λήψη εξωκυτταρικού προ-μιτωτικού σήματος, ενεργοποιούνται τα συμπλέγματα των G_1 κυκλινών-CDK ώστε να προετοιμάσουν το κύτταρο για τη φάση S, προωθώντας την έκφραση παραγόντων μεταγραφής, που με τη σειρά τους προωθούν την έκφραση των S κυκλινών και των ενζύμων που χρειάζονται για την αντιγραφή του DNA. Τα συμπλέγματα των G_1 κυκλινών-*CDK*, προωθούν επίσης την αποδόμηση των μορίων που δρουν ως αναστολείς της φάσης S, με το να τα

στοχεύουν για ουβικουϊτινοποίηση (*ubiquitination*). Με την ουβικουϊτινοποίησή τους οι πρωτεΐνες γίνονται στόχος για την πρωτεολυτική αποδόμηση από το πρωτεάσωμα.

Η *Cyclin D*, είναι το πρώτο μόριο που παράγεται στον κυτταρικό κύκλο ως ανταπόκριση σε εξωκυττάρια σήματα (π.χ. αυξητικοί παράγοντες). Η *Cyclin D* προσδένεται στην *CDK4*, σχηματίζοντας το ενεργό σύμπλοκο *cyclin D-CDK4*. Το σύμπλοκο αυτό, φωσφορυλιώνει την *Retinoblastoma Susceptibility Protein* (*Rb*). Η υπερ-φωσφορυλιωμένη Rb πρωτεΐνη αποδεσμεύεται από το σύμπλοκο *E2F/DP1/Rb* και ενεργοποιεί τον παράγοντα *E2F*. Το σύμπλοκο αυτό βρίσκεται προσδεμένο στα E2F ρυθμιζόμενα γονίδια εμποδίζοντας την έκφρασή τους. Κατά συνέπεια η ενεργοποίηση του *E2F* έχει ως αποτέλεσμα τη μεταγραφή γονιδίων όπως τα *cyclin E*, *Cyclin A*, *DNA Polymerase*, *Thymidine Kinase* και τα λοιπά. Η παραγόμενη *Cyclin E* προσδένεται στην πρωτεΐνη *CDK2* σχηματίζοντας το σύμπλοκο *CyclinE/CDK2*. Το σύμπλοκο αυτό ωθεί τα κύτταρα από την G_1φάση προς την S φάση του κυτταρικού κύκλου. Ταυτοχρόνως η CyclinB μαζί με την πρωτεΐνη CDC2 σχηματίζουν το σύμπλοκο CyclinB/CDC2, το οποίο ενεργοποιεί τη μετάβαση προς τη G_2/M φάση του κυτταρικού κύκλου. Το σύμπλοκο αυτό επίσης προκαλεί τη ρήξη της πυρηνικής μεμβράνης και οδηγεί το κύτταρο στην πρόφαση και κατά συνέπεια η απενεργοποίησή του οδηγεί το κύτταρο στην έξοδο από τη μίτωση (Κουλτούκη 2011).

ΣΗΜΕΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Το κύτταρο χρησιμοποιεί συγκεκριμένα σημεία ελέγχου για την παρακολούθηση και ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Δεν μπορεί να γίνει μετάβαση από τη μία στην επόμενη φάση του κύκλου, μέχρι να πληρωθούν συγκεκριμένα κριτήρια σ' αυτά τα σημεία ελέγχου. Στόχος αυτού του ελέγχου είναι να επιδιορθωθούν βλάβες στο DNA, ώστε να μη λάβουν τα θυγατρικά κύτταρα ελαττωματικό γενετικό υλικό. Δύο κύρια σημεία ελέγχου υπάρχουν: το G_1/S και το G_2/M. Το p53 παίζει ιδιαίτερο ρόλο τόσο στο G_1/S όσο και στο G_2/M σημείο ελέγχου (Elledge 1996).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ (MICROARRAYS)

ΣΥΝΤΟΜΗ ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών DNA στηρίχθηκε πάνω στη βασική ιδιότητα των νουκλεϊκών οξέων, δηλαδή την εκλεκτική επανασύνδεση δύο συμπληρωματικών μονόκλωνων αλληλουχιών. Όμως, αν και η βασική ιδέα της τεχνολογίας – δηλαδή η αξιοποίηση της ιδιότητας αυτής των νουκλεϊκών οξέων με σκοπό την ανίχνευση συγκεκριμένων αλληλουχιών – προϋπήρχε αρκετά χρόνια πριν (Gillespie and Spiegelman 1965; Southern 1975), εντούτοις αυτό που έδωσε μεγάλη ώθηση στην εξέλιξη της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών DNA ήταν η παράλληλη πρόοδος που σημειώθηκε σε άλλους τομείς, όπως της αποκωδικοποίησης του γονιδιώματος των οργανισμών, της σμίκρυνσης (miniaturization), και της υψηλής πυκνότητας σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων πάνω σε στερεό υπόστρωμα (Causton and Game 2003).

Με τη σημερινή της μορφή, η θεμελίωση της τεχνολογία των μικροσυστοιχιών DNA έγινε τη δεκαετία του '90 με δύο ξεχωριστές μελέτες. Η πρώτη μελέτη – φέρνοντας την επανάσταση στο χώρο της μοριακής βιολογίας δημιουργώντας την πρώτη μικροσυστοιχία – πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο του Stanford από την ερευνητική ομάδα του *Patrick Brown* (Schena, Shalon et al. 1995). Η ομάδα του δημιούργησε την πρώτη μικροσυστοιχία DNA χρησιμοποιώντας ένα ρομποτικό όργανο για την εκτύπωση κλώνων cDNA πάνω σε υαλώδες υπόστρωμα. Έτσι, γεννήθηκε η τυπωμένη μικροσυστοιχία DNA, μια πλατφόρμα που μπορεί να κατασκευασθεί σε ανεξάρτητα εργαστήρια με τον κατάλληλο εξοπλισμό, και που αποτελεί μια προσιτή λύση για υψηλού ρυθμού παραγωγής μετρήσεις της γονιδιακής έκφρασης. Παράλληλα, και μετά από μελέτες στην εταιρεία Affymetrix (Affymetrix, Inc., USA), η επιτόπια, υψηλής πυκνότητας, σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων πάνω σε υαλώδες υπόστρωμα αποδείχθηκε ότι δύναται να παρέχει αξιόπιστες μετρήσεις της γονιδιακής έκφρασης (Fodor, Read et al. 1991; Lockhart, Dong et al. 1996). Η τεχνολογία αυτή έθεσε τις βάσεις για την ανάπτυξη των σημερινών υπέρ-υψηλής πυκνότητας μικροσυστοιχιών DNA. Οι μικροσυστοιχίες DNA εφαρμόστηκαν πρώτη φορά για ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο γονιδιώματος οργανισμού το 1997 (DeRisi, Iyer et al. 1997; Κουλτούκη 2011).

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ

Σε γενικές γραμμές, μια μικροσυστοιχία DNA είναι μια συστοιχία από – συγκεκριμένης διάταξης – ακινητοποιημένα νουκλεϊκά οξέα, γνωστά ως ανιχνευτές (probes) ή – με την ορολογία του προτύπου MIAME – ως *αναφορές*[4] (reporters), τα οποία έχουν κατασκευασθεί είτε με εναπόθεση είτε επιτόπια πάνω σε ένα επίπεδο, στερεό υπόστρωμα, συνήθως από γυαλί ή πυρίτιο. Οι ακριβείς θέσεις των αναφορών πάνω στη μικροσυστοιχία αναφέρονται – κατά MIAME – ως χαρακτηριστικά (features). Η μικροσυστοιχία χρησιμοποιείται συνήθως για να τη μέτρηση της ποσότητας mRNA που βρίσκεται στο υπό μελέτη βιολογικό δείγμα μέσω ενός πειράματος υβριδοποίησης (Scherer, Gwinner et al. 2009). Το διάλυμα με την επισημασμένη ποσότητα mRNA του υπό μελέτη δείγματος, που χρησιμοποιείται για την υβριδοποίηση της μικροσυστοιχίας, αποκαλείται – κατά MIAME – ως εκχύλισμα προς υβριδοποίηση (Σηφάκης 2012).

Μέχρι σήμερα έχουν κατασκευασθεί μικροσυστοιχίες DNA με χρήση διαφόρων τεχνολογιών, οι οποίες δύναται να κατηγοριοποιηθούν με βάση διαφορετικά κριτήρια. Έτσι, οι μικροσυστοιχίες μπορούν γενικότερα να διαχωριστούν με βάση τουλάχιστον τρία κριτήρια: (α) το μήκος των αναφορών (π.χ. εάν χρησιμοποιηθούν αναφορές cDNA, με μήκος εκατοντάδων ή χιλιάδων νουκλεοτιδίων, ή αναφορές ολιγονουκλεοτιδίων, με μήκος κάποιων δεκάδων νουκλεοτιδίων), (β) τη μέθοδο κατασκευής (π.χ. εάν η μικροσυστοιχία κατασκευασθεί με εναπόθεση των αναφορών στο υπόστρωμα ή με επιτόπια σύνθεσή τους), και (γ) τον αριθμό τον βιολογικών δειγμάτων, που υβριδοποιούνται ταυτόχρονα πάνω σε μια μικροσυστοιχία (π.χ. οι μονοχρωματικές εξετάζουν ένα δείγμα τη φορά, ενώ οι διχρωματικές μικροσυστοιχίες εξετάζουν ταυτόχρονα δύο δείγματα[5]). Επίσης, μια μικροσυστοιχία DNA δύναται είτε να κατασκευασθεί σε ένα εργαστήριο με ιδιόκτητο τεχνολογικό εξοπλισμό (in-house), είτε να προμηθευτεί από το εμπόριο (Σηφάκης 2012).

Στην παρούσα εργασία οι διάφορες μικροσυστοιχίες DNA διαχωρίζονται με βάση την τεχνολογία κατασκευής τους. Έτσι, κατηγοριοποιούνται γενικότερα (α) σε εκείνες που κατασκευάζονται με εναπόθεση των αναφορών τους, οι οποίες έχουν προηγουμένως συντεθεί, πάνω στο στερεό υπόστρωμα, όπως είναι οι *τυπωμένες μικροσυστοιχίες* (spotted microarrays) και οι *μικροσυστοιχίες με χρήση σφαιριδίων*, και (β) σε αυτές που οι αναφορές τους συντίθενται επιτόπου πάνω στο υπόστρωμα, οι επονομαζόμενες *επιτόπιας σύνθεσης μικροσυστοιχίες* (in-situ microarrays) (Σηφάκης 2012).

---

[4] Στη βιβλιογραφία, οι έννοιες των νουκλεϊκών οξέων πάνω στη μικροσυστοιχία και των επισημασμένων νουκλεϊκών οξέων μέσα στο διάλυμα προς υβριδοποίηση, συναντώνται ως ανιχνευτές (probes) και στόχος (target), αντίστοιχα, εφόσον ακολουθείται η ορολογία της αποτύπωσης κατά Southern. Εντούτοις, πολλοί ερευνητές χρησιμοποιούν την πρώτη έννοια στη θέση της δεύτερης, και αντίστροφα. Για λόγους αποφυγής σύγχυσης, καθώς και για συμμόρφωση με το πρότυπο MIAME, στην παρούσα εργασία ακολουθούνται οι έννοιες κατά MIAME.

[5] Επίσης έχουν κατασκευασθεί και μονοχρωματικές μικροσυστοιχίες πολλαπλών θαλάμων υβριδοποίησης (multi-assay/multi-chamber microarrays), που εξετάζουν περισσότερα του ενός δείγματα, με παράλληλη υβριδοποίηση κάθε δείγματος χωριστά σε κάθε έναν από τους επιμέρους θαλάμους.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΚΑΙ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ

Κάθε πείραμα μικροσυστοιχιών DNA περιλαμβάνει μια ακολουθία από διαφορετικά στάδια ή επιμέρους βήματα. Γενικότερα, ένα οποιοδήποτε υψηλού ρυθμού παραγωγής πείραμα δύναται να χωριστεί σε δύο βασικά μέρη: (α) το εργαστηριακό μέρος (κατεργασία των υλικών και συλλογή δεδομένων), και (β) το μέρος της επεξεργασίας και ανάλυσης των παραγόμενων δεδομένων (Causton and Game 2003). Ειδικότερα, για ένα πείραμα μικροσυστοιχιών DNA, καθένα απ' τα δύο αυτά βασικά μέρη δύναται να χωριστεί περαιτέρω σε επιμέρους στάδια ή βήματα. Έτσι, εμπλουτίζοντας το βασικό διαχωρισμό, το εργαστηριακό μέρος αποτελείται συνήθως από τα εξής βήματα:

- Συλλογή δειγμάτων και απομόνωση RNA.
- Παραγωγή εκχυλίσματος προς υβριδοποίηση.
- Υβριδοποίηση.
- Απόκτηση ψηφιακής εικόνας.

Το δεύτερο μέρος δύναται να χωριστεί στα παρακάτω διακριτά στάδια:

- Επεξεργασία της εικόνας (εφαρμογή πλέγματος, κατάτμηση, εξαγωγή δεδομένων έντασης).
- Προεπεξεργασία των δεδομένων (π.χ. διόρθωση υποβάθρου, κανονικοποίηση, κ.α.).
- Ανάλυση των δεδομένων (π.χ. εύρεση των διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων, συσταδοποίηση γονιδίων με βάση την έκφρασή τους, κ.α., η οποία συνοδεύεται συνήθως από κάποια μέθοδο στατιστικής επικύρωσης (Lee, Kohane et al. 2003).
- Δημιουργία νέων υποθέσεων σχετικών με τις βιολογικές διεργασίες (οι οποίες συνήθως επικυρώνονται βιολογικά με χρήση άλλων τεχνικών, όπως π.χ. της real-time qRT-PCR.

Να σημειωθεί ότι οι παραπάνω επιμέρους διεργασίες δεν είναι δεσμευτικές, ούτε απόλυτες. Ενώ η πλειονότητα των επιμέρους διεργασιών είναι απαραίτητες και αναντικατάστατες για τη διεξαγωγή ενός πειράματος μικροσυστοιχιών DNA, κάποιες άλλες δεν είναι, ή ακόμα η ακολουθία των διεργασιών δεν είναι εξαντλητική. Έτσι, για παράδειγμα, στο πρώτο μέρος υπάρχουν κάποια επιπρόσθετα ενδιάμεσα βήματα, που δύναται να ακολουθηθούν και τα οποία παρουσιάζονται αναλυτικότερα παρακάτω (Σηφάκης 2012).

Είναι αξιοσημείωτο να αναφερθεί ότι όλες οι παραπάνω διεργασίες ενός πειράματος μικροσυστοιχιών DNA απαιτούν αρχικά (α) ένα αποσαφηνισμένο ορισμό του βιολογικού ερωτήματος (ή ένα αντικειμενικό σκοπό), και κατ' επέκταση (β) έναν άρτιο σχεδιασμό του όλου πειράματος, ο οποίος να προσπαθεί να δώσει απάντηση στο υπό εξέταση ερώτημα με – όσο το δυνατό – λιγότερο κόστος (κυρίως σε χρόνο και αναλώσιμα, καθώς και σε ποσότητα βιολογικών

δειγμάτων, που συνήθως είναι περιορισμένη). Επιπλέον, λόγω του διεπιστημονικού χαρακτήρα της όλης διαδικασίας, είναι απαραίτητο μεμονωμένα κάθε διεργασία να πραγματοποιείται από το αντίστοιχο εξειδικευμένο και άρτια εκπαιδευμένο προσωπικό, μιας και ενδεχόμενη παράλειψη ή σφάλμα σε κάποια εξ αυτών, δύναται να επηρεάσει ολόκληρη τη διαδικασία, οδηγώντας ακόμη και στην αποτυχία του πειράματος (Σηφάκης 2012).

Ο διεθνής μη κερδοσκοπικός οργανισμός επιστημόνων MGED[6] θέσπισε – μεταξύ άλλων – το 2001 ένα πρότυπο για τα πειράματα μικροσυστοιχιών (MIAME: Minimum Information About a Microarray Experiment) (Brazma, Hingamp et al. 2001). Το πρότυπο αυτό θέτει τις ελάχιστες απαιτήσεις για τη διεξαγωγή και την περιγραφή ενός πειράματος μικροσυστοιχιών κατά τη δημοσίευσή του, ούτως ώστε (α) τα αποτελέσματά του να δύναται να ερμηνευτούν με τρόπο σαφή, και (β) το πείραμα να δύναται να επαναληφθεί.

Στα πλαίσια ενός πειράματος μικροσυστοιχιών, υπάρχουν δύο βασικές κατηγορίες: οι μονοχρωματικές μικροσυστοιχίες, οι οποίες εξετάζουν ένα δείγμα τη φορά και οι διχρωματικές μικροσυστοιχίες, οι οποίες εξετάζουν την ανταγωνιστική υβριδοποίηση ανάμεσα σε δύο δείγματα τη φορά. Το σκεπτικό αναφορικά με το διχρωματικό πειραματικό σχεδιασμό ήταν αρχικά η μείωση της μεταβλητότητας, που εισάγονταν λόγω κατασκευαστικών σφαλμάτων. Σήμερα, λόγω της σημαντικής εξέλιξης της τεχνολογίας κατασκευής και των διαθέσιμων υψηλής ποιότητας μικροσυστοιχιών του εμπορίου, τα σφάλματα αυτά έχουν μειωθεί σημαντικά[7]. Εντούτοις, ο σχεδιασμός αυτός επιτρέπει την άμεση σύγκριση ανάμεσα στα δύο δείγματα, ελαχιστοποιώντας τη μεταβλητότητα που δύναται να προκύψει από τη διεκπεραίωση περισσότερων μικροσυστοιχιών ανά κατάσταση (Patterson, Lobenhofer et al. 2006).

Όσον αφορά τις μονοχρωματικές μικροσυστοιχίες τα κύρια πλεονεκτήματά τους έγκεινται στην απλότητα και την ευελιξία τους κατά τον πειραματικό σχεδιασμό. Έτσι, η υβριδοποίηση ενός δείγματος ανά μικροσυστοιχία διευκολύνει την σύγκριση ανάμεσα στις μικροσυστοιχίες και τα δείγματα, ενώ ενδεχόμενη ασυνέπεια των παραγόμενων δεδομένων δύναται να μειωθεί με τη διεξαγωγή ενός επαρκή αριθμού βιολογικών και τεχνικών αντιγράφων. Διατηρείται η λογική του υβριδισμού με δύο χρωστικές, αλλά επιτρέπει να γίνουν συγκρίσεις ανάμεσα σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων, χωρίς να απαιτείται διενέργεια σύγκρισης για κάθε ζεύγος δειγμάτων που μπορεί να σχηματισθεί. Συνήθως αυτός ο τύπος προτιμάται σε πειράματα που αφορούν μελέτη δεδομένων κατά την εξέλιξη του χρόνου, όπου χρονικές στιγμές συγκρίνονται με κάποια αρχική χρονική στιγμή.

---

[6] http://www.mged.org/

[7] Επίσης, είναι δυνατό να υφίστανται και άλλα προβλήματα στις διχρωματικές μικροσυστοιχίες, όπως π.χ. πιθανής εμφάνιση μεροληψίας λόγω διαφορετικής απόδοσης ενσωμάτωσης των δύο χρωστικών, τα οποία όμως δύναται να αντιμετωπισθούν καταλλήλως (όπως παρουσιάστηκαν στο εδάφιο της πειραματικής διαδικασίας).

Δηλαδή, αφού η ποσότητα του υπό μελέτη γονιδίου σε κάθε χρονική στιγμή συγκρίνεται με ένα σταθερό σημείο αναφοράς, (την αρχή του πειράματος), μπορεί να μελετηθεί η συμπεριφορά του κατά την πάροδο του χρόνου (DeRisi, Penland et al. 1996).

Αρκετές μελέτες συγκεκριμένα πάνω στη σύγκριση των δύο αυτών κατηγοριών έχουν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν, όπως από (Bammler, Beyer et al. 2005; de Reynies, Geromin et al. 2006; Wang, Barbacioru et al. 2006). Εντούτοις, η πιο εμπεριστατωμένη εξ αυτών πραγματοποιήθηκε από τον *Patterson* και συνεργάτες (Patterson, Lobenhofer et al. 2006). Η μελέτη αυτή – η οποία και αυτή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του MAQC project – ξεχωρίζει κυρίως λόγω του ότι χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες πλατφόρμες μικροσυστοιχιών (συνεπώς και οι ίδιες αναφορές), τα ίδια πρωτόκολλα επισήμανσης, και ίδιες τεχνολογίες ανίχνευσης τόσο για τις διχρωματικές, όσο και για τις μονοχρωματικές προσεγγίσεις. Τα αποτελέσματα της μελέτης καταδεικνύουν ισοδυναμία ως προς την ποιότητα των παραγόμενων δεδομένων ανάμεσα στις δύο προσεγγίσεις[8]. Επιπλέον, συνίσταται η παράμετρος αυτή σε καμία περίπτωση να μην παίζει ιδιαίτερο ρόλο, τουναντίον η απόφαση ανάμεσα στις μονοχρωματικές και στις διχρωματικές προσεγγίσεις να καθορίζεται από άλλους παράγοντες όπως π.χ. (α) το κόστος, (β) ο γενικότερος πειραματικός σχεδιασμός, και (γ) η προσωπική προτίμηση (Σηφάκης 2012).

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ

Παρόλο που δεν υπάρχει παγκόσμια ομοφωνία ως προς τα πρωτόκολλα για την ανάλυση των δεδομένων από πειράματα με DNA μικροσυστοιχίες, δύο αποδεκτοί τρόποι ανάλυσης των δεδομένων γονιδιακής έκφρασης είναι:

- Με τον αλγόριθμο μηχανικής μάθησης χωρίς επιτήρηση που οδηγεί στη δημιουργία συσταδοποιήσεων (*unsupervised learning*)**,** που περιλαμβάνει τη συσσώρευση ενός ετερογενούς συνόλου δεδομένων σε αθροίσματα, βασιζόμενο σε διαφορετικά χαρακτηριστικά σε ένα σύνολο δεδομένων. Για παράδειγμα, θα μπορούσαν να συλλεχθούν στοιχεία σχετικά με διάφορα εκφραζόμενα γονίδια σε μερικά δείγματα καρκινικού ιστού και μετά να συσσωρευτούν τα δείγματα όσο γίνεται καλύτερα σε ομάδες, με βάση την ομοιότητα της συνάθροισης των προφίλ έκφρασης. Εναλλακτικά, θα μπορούσε να γίνει ομαδοποίηση των γονιδίων ανάμεσα σε όλα τα δείγματα, για να εντοπισθούν τα γονίδια που παρουσιάζουν παρόμοια μοτίβα έκφρασης σε διάφορα βιολογικά δείγματα. Το πλεονέκτημα αυτού του τρόπου ανάλυσης είναι ότι είναι αντικειμενική και επιτρέπει τη σκιαγράφηση ενός πολύπλοκου σετ δεδομένων, χωρίς να έχουν γίνει *a priori* υποθέσεις. Ωστόσο, επειδή μπορεί

[8] Εντούτοις, διευκρινίζεται ότι τα αποτελέσματα αυτά δύναται να μην ισχύουν σε περιπτώσεις μικροσυστοιχιών με υψηλή μεταβλητότητα στην ποιότητα κατασκευής τους, όπως π.χ. σε τυπωμένες μικροσυστοιχίες από ιδιόκτητο εξοπλισμό, χωρίς εφαρμογή επαρκή ποιοτικού ελέγχου.

να είναι ποικίλες οι συσχετίσεις μέσα σε ένα σετ δεδομένων, τα αποτελέσματα μ' αυτό τον τρόπο ανάλυσης δεν ανταποκρίνονται αναγκαία σε ενδιαφέρουσες κλινικές ή βιολογικές διαφοροποιήσεις (Ramaswamy and Golub 2002).

- Με τον αλγόριθμο μηχανικής μάθησης με επιτήρηση (*supervised learning)*, που χρησιμοποιεί την πληροφορία μιας γνωστής τάξης δεδομένων για να κάνει ενδιαφέρουσες διακρίσεις. Για παράδειγμα θα μπορούσε μία υποομάδα εκφραζόμενων γονιδίων, που είναι σε θέση να διακρίνουν δύο τύπους καρκίνων, να χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο για την κατηγοριοποίηση μιας άγνωστης, ανεξάρτητης ομάδας γονιδίων σε σχέση με τους δύο τύπους καρκίνων. Ωστόσο, αυτός ο τύπος μελέτης εξαρτάται από την ακρίβεια των δειγμάτων, το οποίο μπορεί να είναι πρόβλημα, δεδομένων των περιορισμών των ιστοπαθολογικών διαγνώσεων στους καρκίνους (Ramaswamy and Golub 2002).

Ενίοτε τα αποτελέσματα από διαφορετικούς αλγορίθμους, μπορεί να αλληλεπικαλύπτονται, αλλά αυτό δε χρειάζεται να γίνεται πάντα.

Σημαντικό θέμα είναι η στατιστική σημασία των συσχετισμών που προκύπτουν. Με δεδομένο ότι ένα τυπικό πείραμα με cDNA μικροσυστοιχίες μελετά χιλιάδες γονίδια σε ένα μικρό αριθμό δειγμάτων, συσχετισμοί ανάμεσα στις τάξεις γονιδίων μπορούν να προκύψουν και μόνο από τύχη. Αυτό το πρόβλημα θα μπορούσε να λυθεί με τη μελέτη περισσότερων δειγμάτων, κάτι όμως αρκετά δύσκολο όταν πρόκειται για κλινικά δείγματα καρκίνου. Μία άλλη προσέγγιση θα ήταν η εφαρμογή ανάλυσης-ανακάλυψης δεδομένων σε μία αρχική ομάδα γονιδίων και στη συνέχεια η σύγκριση των ευρημάτων με ανεξάρτητη ομάδα. Αυτή η μέθοδος θα ελαχιστοποιούσε τις τυχαίες συσχετίσεις. Μία τρίτη μέθοδος ανάλυσης με τυχαία μετάθεση ομάδων γονιδίων και ανάλυσή τους, θα μπορούσε να αποδώσει αποτελέσματα στατιστικώς αποδεκτά, όταν οι συσχετίσεις που παρατηρούνται ανάμεσα στις ομάδες γονιδίων είναι ισχυρότερες από αυτές που προκύπτουν από τη τυχαία μετάθεση δεδομένων (Ramaswamy and Golub 2002).

Αν και η επιλογή ανάμεσα στις διαφορετικές πλατφόρμες μικροσυστοιχιών ή στους τύπους αναφορών ίσως να φαίνεται αποθαρρυντική, ωστόσο εάν ακολουθηθούν στιβαρά και δοκιμασμένα πρωτόκολλα σε όλα τα στάδια – από την κατασκευή της μικροσυστοιχίας έως την προεπεξεργασία των παραγόμενων δεδομένων – τότε τα τελικά αποτελέσματα από τις διαφορετικές πλατφόρμες πιθανότατα να είναι παρόμοια. Έτσι, ο ενδιαφερόμενος δύναται είτε (α) να επενδύσει σε χρόνο και πόρους με σκοπό την οργάνωση ενός αυτοδύναμου εργαστηρίου κατασκευής μικροσυστοιχιών, είτε (β) να ζητήσει τη βοήθεια μιας εταιρείας κατασκευής, η οποία κατά παραγγελία θα σχεδιάσει και εν τέλει θα κατασκευάσει τις επιθυμητές μικροσυστοιχίες, ή (γ) να προμηθευτεί κάποια από τις – άμεσα διαθέσιμες – τυποποιημένες μικροσυστοιχίες του εμπορίου, ενώ η επιλογή έγκειται κυρίως στις εκάστοτε ανάγκες του (Κουλτούκη 2011).

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ

Οι cDNA μικροσυστοιχίες, αποτελούν μία σχετικά νέα εφαρμογή στην έρευνα, κατά την οποία, όπως είδαμε, συμπληρωματικό DNA (cDNA) ως προς RNA που προκύπτει από πειραματικά δεδομένα και δείγματα αναφοράς, σημαίνεται με διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές, και η διαφορική έκφραση των γονιδίων εκφράζεται ως αναλογία μεταξύ των τιμών φθορισμού (Ramaswamy and Golub 2002). Αποτελούν στην ουσία επέκταση τεχνικών υβριδισμού, που χρησιμοποιήθηκαν στην ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση νουκλεϊκών οξέων σε βιολογικά δείγματα (πχ. Southern –Northern blots etc.) (Eisen and Brown 1999). Οι cDNA μικροσυστοιχίες έχουν το πλεονέκτημα ότι μπορούν να γίνουν από μεμονωμένους ερευνητές και είναι εύχρηστες.

Κάθε κύτταρο στον ανθρώπινο οργανισμό εκφράζει ένα συγκεκριμένο σύνολο γονιδίων, σύμφωνα με ένα αυστηρά ελεγχόμενο πρόγραμμα, που δίνει σε αυτό τις ιδιαίτερες δομικές και λειτουργικές του ικανότητες. Επιπλέον τα κύτταρα χρησιμοποιούν συστήματα αγωγής σημάτων για να συλλέγουν πληροφορίες σχετικά με την κατάστασή τους, συμπεριλαμβανομένων της ύπαρξης φλεγμονής, στρες, φαρμάκων, τραυματισμού, αυξητικών παραγόντων ή ορμονών, και να μετατρέπουν αυτά τα σήματα σε αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων. Επομένως τα μοτίβα γονιδιακής έκφρασης αντανακλούν την ενδογενή κατάσταση του κυττάρου και το μικροπεριβάλλον του, δημιουργώντας μία μοριακή εικόνα για την κατάσταση του κυττάρου. Οι DNA μικροσυστοιχίες ανιχνεύουν μοτίβα γονιδιακής έκφρασης, επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάγνωση τέτοιων εικόνων και για την επαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την κατάσταση των κυττάρων (Diehn, Alizadeh et al. 2000).

Οι cDNA μικροσυστοιχίες έχουν χρησιμοποιηθεί για ποικιλία πειραμάτων: ουσιαστικά οποιαδήποτε ιδιότητα μιας DNA αλληλουχίας που μπορεί πειραματικά να τροποποιηθεί, μπορεί στη συνέχεια να διαπιστωθεί η διαφορική της έκφραση κι αυτό να γίνει για χιλιάδες αλληλουχίες ταυτόχρονα. Έτσι έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες χαρτογράφησης γονιδίων (Comparative Genomic Hybridization, CGH microarrays), στην ανάλυση μεταλλάξεων και στην παρακολούθηση αλλαγών στην γονιδιακή έκφραση του γονιδιώματος (Eisen and Brown 1999).

Τα ερευνητικά ερωτήματα που μπορούν να απαντηθούν με DNA μικροσυστοιχίες σχετίζονται με διερεύνηση της γονιδιακής έκφρασης. Μπορούν να συγκρίνουν τη σχετική αφθονία mRNA που αντιστοιχεί σε κάθε γονίδιο που μελετάται, ανάμεσα σε δύο διαφορετικά κύτταρα ή δείγματα ιστού. Για παράδειγμα, ένα πείραμα θα μπορούσε να συγκρίνει κύτταρα πριν και μετά μία πειραματική παρέμβαση, ή σε διαδοχικές στιγμές μίας συγκεκριμένης διαδικασίας, ή μεταξύ σταδίων διαφοροποίησης ή του mRNA όπως αυτό εκφράζεται σε ένα μεταλλαγμένο κύτταρο σε σχέση με αυτό του άγριου τύπου. Αυτό θα ήταν το απλούστερο είδος πειράματος. Επίσης μπορεί να εκτιμηθεί ο ρυθμός μετάφρασης κάθε γονιδίου, με συγκριτικό υβριδισμό πολυσωμικού RNA και ολικού mRNA σε μικροσυστοιχίες (Κουλτούκη 2011).

Συγκεκριμένα:

- Έχουν εφαρμοσθεί στη διάγνωση του καρκίνου (Golub, Slonim et al. 1999; Armstrong, Staunton et al. 2002).
- Έχουν χρησιμοποιηθεί στη διερεύνηση της υπόθεσης ότι η μοριακή ταξινόμηση των καρκίνων μπορεί να βασίζεται στο γονιδιακό εκφραστικό προφίλ παρά στην ιστοπαθολογική εικόνα (Ramaswamy and Golub 2002). Η τεχνική αυτή φαίνεται να μπορεί να βοηθήσει στην πρόβλεψη «καρκινικών τάξεων» ή υποτύπων καρκίνων, ανεξάρτητα από προηγούμενη γνώση της βιολογίας των καρκίνων (Kees, Ford et al. 2003).
- Έχουν δώσει την ευκαιρία να μελετηθεί η δυνατότητα συσχέτισης της έκφρασης των γονιδίων του όγκου με την πρόβλεψη της έκβασης της νόσου. Η πρώτη μελέτη που επιχείρησε να συσχετίσει την έκβαση με έκφραση γονιδίων πριν τη θεραπεία ήταν των *Alizadeh* και *Eisen* (2000). Παρόμοιες μελέτες έχουν γίνει για τον καρκίνο του προστάτη, το παιδικό μυελοβλάστωμα και για το μεταστατικό και μη μεταστατικό μυελοβλάστωμα (Dhanasekaran, Barrette et al. 2001; MacDonald, Brown et al. 2001; Pomeroy, Tamayo et al. 2002).
- Χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση του γονοτύπου πολυμορφισμών που επηρεάζουν την προδιάθεση ενός οργανισμού σε ασθένεια (Hacia, Brody et al. 1996; Hacia 1999).
- Χρησιμοποιούνται στην ταυτοποίηση γενετικών ανωμαλιών σε κακοήθειες (Pinkel, Segraves et al. 1998; Pollack, Perou et al. 1999; Alizadeh and Staudt 2000).
- Ανέδειξαν μηχανισμούς που συμμετέχουν στην παθοφυσιολογία νοσημάτων σε κυτταρικό επίπεδο και οδήγησαν στην ανάπτυξη φαρμακευτικών παραγόντων (Wilson, DeRisi et al. 1999). Στην πιο απλή περίπτωση, γονίδια που υπερεκφράζονται σε ασθενούντα κύτταρα (πχ *Her-2/Neu* στον καρκίνο του μαστού) μπορούν να αποτελέσουν στόχο των φαρμάκων. Επιπλέον, γνωστά φάρμακα με άγνωστο μηχανισμό δράσης, θα μπορούσαν να μελετηθούν με DNA μικροσυστοιχίες. Η επίδρασή τους στο προφίλ γονιδιακής έκφρασης θα μπορούσε να αποκαλύψει αυτό το μηχανισμό και να δώσει στοιχεία για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων με παρόμοια δράση. Η φαρμακογενομική, μπορεί να χρησιμοποιήσει επίσης cDNA μικροσυστοιχίες, στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων, με τον παραπάνω τρόπο (Diehn, Alizadeh et al. 2000).
- Παρέχουν έναν έμμεσο αλλά πολύτιμο τρόπο για την εκτίμηση της παραγωγής πρωτεϊνών από κάθε γονίδιο. Θα μπορούσαμε λοιπόν να ανακαλύψουμε τις βιολογικές ιδιότητες των πρωτεϊνών σε γονιδιακό επίπεδο-στα πλαίσια μελετών πρωτεομικής (Diehn, Alizadeh et al. 2000).

Έτσι, η κυρίαρχη εφαρμογή αποτελεί αδιαμφισβήτητα ο προσδιορισμός του προφίλ γονιδιακής έκφρασης, λόγω της εγγενούς ικανότητάς της να παρέχει ένα στιγμιότυπο του συνόλου των μεταγράφων – του μεταγραφώματος – ενός (φυσιολογικού ή μη) δείγματος για μια δεδομένη

χρονική στιγμή. Η πληροφορία αυτή είναι ιδιαιτέρως χρήσιμη, μιας και, για παράδειγμα, δύναται να αποκαλύψει εκείνες τις οικογένειες γονιδίων που επηρεάζονται (ή όχι) σε μια παθολογική κατάσταση, ή να βοηθήσει σε υποθέσεις για την – άγνωστη μέχρι στιγμής – λειτουργία ενός γονιδίου, μέσω της σύγκρισης του προφίλ του με αυτό γονιδίων γνωστής λειτουργίας (Κουλτούκη 2011; Σηφάκης 2012). Επίσης, έχουν εφαρμοστεί ευρέως σε διαφορετικά πεδία, όπως αυτό της ιατρικής διάγνωσης, της φαρμακογονιδιωματικής, και της τοξικογονιδιωματικής (Wick and Hardiman 2005). Επιπροσθέτως, τα τελευταία χρόνια έδωσαν μεγάλη ώθηση σε έρευνες τόσο για την πιστοποίηση φαρμακευτικών στόχων, όσο και για την ανακάλυψη βιοενεργών ουσιών (νέων φαρμάκων) (Wick and Hardiman 2005). Για το πεδίο της ανακάλυψης νέων φαρμάκων συγκεκριμένα, οι *Petricoin* και συνεργάτες (2002) είχαν προβλέψει αρκετές βασικές εφαρμογές των μικροσυστοιχιών DNA στα επί μέρους στάδια της διαδικασίας, πολλές εκ των οποίων αποτελούν σήμερα πραγματικότητα (Petricoin, Hackett et al. 2002).

Στο χώρο της ιατρικής ειδικότερα, μπορούν να διακριθούν τρείς βασικές κατηγορίες εφαρμογών των μικροσυστοιχιών DNA, σύμφωνα με τον *Tarca* και συνεργάτες (2002): (α) η σύγκριση τάξεων (class comparison), η οποία αφορά στην εύρεση διαφορών στα επίπεδα έκφρασης ανάμεσα σε δύο ή περισσότερα δείγματα, (β) η πρόβλεψη τάξεων (class prediction), που αφορά στην εύρεση της τάξης στην οποία ανήκει ένα δείγμα, με βάση το προφίλ της γονιδιακής του έκφρασης, και (γ) η ανακάλυψη τάξεων (class discovery), όπου ένα σύνολο από προφίλ γονιδιακής έκφρασης αναλύεται με σκοπό την ανακάλυψη υποσυνόλων με κοινά χαρακτηριστικά (Tarca, Romero et al. 2006). Για παράδειγμα, τα δεδομένα μικροσυστοιχιών DNA δύναται να πληροφορήσουν για το στάδιο μιας νόσου, ιδιαίτερα στον τομέα της ογκολογίας, όπου η έγκυρη και έγκαιρη διάγνωση παίζει καθοριστικό ρόλο. Επιπροσθέτως, οι μικροσυστοιχίες DNA δύναται όχι μόνο να χρησιμοποιηθούν για τη διαφορική διάγνωση των καρκινικών όγκων, και τον καθορισμό νέων τύπων καρκινικών όγκων που είναι αδύνατο να διακριθούν ιστολογικά, αλλά και να πληροφορήσουν για το προγνωστικό αποτέλεσμα (Causton and Game 2003; Κουλτούκη 2011).

Όπως έγινε φανερό από τα παραπάνω, οι μικροσυστοιχίες DNA έχουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών σε διάφορα επιστημονικά πεδία, το οποίο δεν εξαντλείται στο παρόν εδάφιο. Η απήχησή τους μελλοντικά θα συνεχίσει να διευρύνεται ολοένα και περισσότερο και σε άλλους τομείς, καθώς θα σημειώνεται (α) αρτιότερη τυποποίησή της εφαρμογής τους, (β) μεγαλύτερη εξοικείωση με την τεχνολογία, (γ) πληρέστερη εκμετάλλευση των δυνατοτήτων τους, κ.α. Στην αναφορά των *Hoheisel* και συνεργάτες (2006) παρουσιάζονται αναλυτικά τόσο οι υπό ανάπτυξη εφαρμογές, όσο και οι εφαρμογές της τεχνολογίας σε νέα πεδία, όπως για παράδειγμα στην επιγονιδιωματική ανάλυση (genome-wide epigenetic analysis) (Hoheisel 2006). Επίσης, όπως σημειώνεται από τον Shiu (2008), η εφαρμογή των μικροσυστοιχιών DNA προβλέπεται να δώσει περαιτέρω ώθηση στις

επιστήμες της οικολογίας και της εξελικτικής βιολογίας, μέσω της εξέτασης ατόμων, πληθυσμών, συγγενών ειδών, κ.α. (Hoheisel 2006).

ΜΟΝΑΔΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΑΙ ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΟ ΜΕΛΛΟΝ

Για πρώτη φορά με αυτή την τεχνική, μπορεί να διερευνηθεί η έκφραση χιλιάδων γονιδίων κάτω από χιλιάδες διαφορετικές συνθήκες. Για οργανισμούς στους οποίους όλο το γονιδίωμα είναι γνωστό (π.χ. *Saccharomyces cerevisiae*), η τεχνολογία αυτή κάνει δυνατή τη μελέτη της έκφρασης όλων των γονιδίων ταυτόχρονα. Για τον άνθρωπο ο περιορισμός είναι ότι ο αριθμός των γνωστών γονιδίων είναι περιορισμένος (Eisen and Brown 1999).

Οι μελλοντικές μελέτες στην κατηγοριοποίηση του καρκίνου με βάση την γονιδιακή έκφραση, θα πρέπει να συσχετίζονται με κλινικά σημαντικά ζητήματα, όπως η επιβίωση. Προοπτικές μελέτες χρειάζονται για να διερευνηθεί η δυνατότητα όλοι οι καρκίνοι να κατηγοριοποιηθούν σε μοριακούς υποτύπους, με τη χρήση των προφίλ έκφρασης των γονιδίων, που θα δίνουν πληροφορίες για τη φυσική ιστορία της νόσου και την ανταπόκριση στη θεραπεία. Στις περισσότερες μελέτες, το πρόβλημα είναι ο μικρός αριθμός δειγμάτων, οπότε συνεργασία διαφορετικών κέντρων θα μπορούσε να δημιουργήσει δεξαμενή δεδομένων. Περαιτέρω συσχέτιση των ευρημάτων με πρωτεϊνικά δεδομένα θα ήταν ιδανική. Προτείνεται ακόμη μελέτη των αλληλουχιών των γονιδίων και μεταξύ διαφόρων ειδών, που θα διευρύνουν τη βάση δεδομένων. Χρειάζεται ακόμη προσαρμογή και επανεξέταση των στατιστικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται. Επίσης, προς το παρόν τα διάφορα κέντρα χρησιμοποιούν δικά τους πρότυπα και η αναπαραγωγή των αποτελεσμάτων δεν είναι πάντα εφικτή. Αν ήταν γνωστές οι συσχετίσεις γονιδιακών προφίλ έκφρασης με την ευαισθησία στα φάρμακα, οι κλινικές μελέτες για την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου θα απαιτούσαν μικρότερο αριθμό ασθενών και θα ήταν και πιο ακριβείς. Οι cDNA μικροσυστοιχίες θα μπορούσαν στο μέλλον να χρησιμοποιηθούν στην κλινική, δίνοντας έτσι και την ευκαιρία για την ανάπτυξη νέας βάσης δεδομένων, ευρύτερης, που θα μπορούσε να αναθεωρήσει τη μέχρι τώρα γνώση μας για τον καρκίνο (Κουλτούκη 2011).

Επομένως, οι cDNA μικροσυστοιχίες, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάγνωση, την παθογενετική περιγραφή ενός όγκου, να δώσουν πληροφορίες για τη φυσική του ιστορία και την χημειοευαισθησία του. Επίσης, η ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών παραγόντων και η αξιολόγησή τους, θα επιταχυνθεί, τόσο μέσα από την ταυτοποίηση μοριακών στόχων όσο και μέσω της διαλογής ασθενών για κλινικές μελέτες με συγκεκριμένο εκφραστικό προφίλ. Αν και πολλές προκλήσεις πρέπει ακόμη να αντιμετωπισθούν, η μελέτη ολοκλήρου του γονιδιώματος, μπορεί να αλλάξει κατά πολύ την κλινική ογκολογία (Ramaswamy and Golub 2002).

ΟΙ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ ΣΤΟΥΣ ΟΓΚΟΥΣ ΤΟΥ ΚΝΣ

Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης σε περιπτώσεις όγκων του ΚΝΣ στην παιδική ηλικία, αποτελεί πολλά υποσχόμενη μέθοδο στη διάγνωση και τη διάκριση του βαθμού κινδύνου της νόσου. Δεν έχουν γίνει όμως αρκετές μελέτες προς την κατεύθυνση αυτή. Ένας από τους λόγους είναι ότι οι νεοπλασίες αυτές είναι σχετικά σπάνιες και πολλές φορές ακόμα και η λήψη δείγματος δεν είναι τόσο απλή διαδικασία, τόσο πρακτικά αλλά πολλές φορές και ηθικά. Χαρακτηριστικά αναφέρουμε εργασίες πάνω στους όγκους του ΚΝΣ με τη χρήση μικροσυστοιχιών, που χρησιμοποίησαν τη μεθοδολογία αυτή για την ανεύρεση γονιδιακών στόχων στους παιδιατρικούς όγκους του ΚΝΣ (Paugh, Qu et al. 2010; Fiaschetti, Castelletti et al. 2011; Kool, Korshunov et al. 2012).

Προς το παρόν η χρήση των μικροσυστοιχιών περιορίζεται στην έρευνα, παρόλο που δίνει υποσχέσεις για την κλινική εφαρμογή στη διάγνωση, πρόγνωση και καθορισμό της θεραπείας.

ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΚΑΙ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ

Μελέτες για τη δυναμική των κυττάρων κατά τον πολλαπλασιασμό και πιο συγκεκριμένα για τη μεταγραφική δυναμική, δεν έχουν γίνει πολλές. Σε μια πρόσφατη εργασία, μελετήθηκε η επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας σε συνάρτηση με το χρόνο, όπου φάνηκε ότι η γονιδιακή μεταγραφή οδηγείται σε ένα σταθερό σημείο ή αλλιώς σε ένα σημείο ισορροπίας (steady-state) (Huang, Shu et al. 2011). Από την μελέτη αυτού του φαινομένου φάνηκε ότι η γονιδιακή έκφραση ακολουθεί μια ασυμπτωτική, ταλαντωτική πορεία, όπου η έκφραση γονιδίων αυξομειώνεται σε συνάρτηση με το χρόνο. Σε μια επίσης πρόσφατη εργασία είχαμε παρουσιάσει ότι η γονιδιακή έκφραση αποτελούσε κοινό υπόβαθρο ογκογένεσης για δύο διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους. Τα κύτταρα αυτά, λευχαιμικά και μυελοβλαστώματος έδειξαν ότι χρησιμοποιούσαν κοινές οδούς γονιδιακής έκφρασης και μάλιστα φάνηκε ότι υπήρχαν γονίδια των οποίων η υπερ-έκφραση οδηγούσε τα κύτταρα από κοινού σε πολλαπλασιασμό. Παράδειγμα αυτών των γονιδίων ήταν το STAT3, JAK, PIAS2 and η οικογένεια των CDK γονιδίων (Lambrou, Zaravinos et al. 2012). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι ενώ είναι γενικά αποδεκτό ότι οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες καθώς και οι γονιδιακές μεταλλάξεις είναι κυρίως υπεύθυνες για την ογκογένεση, από την παραπάνω αναφορά φάνηκε ότι ο ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός μπορεί να προκληθεί και από τη μη-κανονική γονιδιακή έκφραση (Lambrou, Zaravinos et al. 2012). Το πεδίο αυτό παραμένει σχετικά ανεξερεύνητο και υπάρχει μεγάλο πεδίο για έρευνα στον τομέα αυτό. Στο μέτρο που γνωρίζουμε, η παρούσα εργασία είναι η

πρώτη που επιδιώκει την προσομοίωση των όγκων του ΚΝΣ, τόσο σε επίπεδο κυτταρικής πολλαπλασιαστικής όσο και γονιδιακής έκφρασης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΠΕΡΙ ΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΧΟΛΙΑ

Προ 100 περίπου έτη η βιοχημική μελέτη των μοριακών αλληλεπιδράσεων ήταν η επικρατούσα άποψη για την επεξήγηση των βιολογικών φαινομένων. Η προσέγγιση αυτή ήταν πολύ ορθή μιας και έπρεπε να κατανοηθούν πρωτίστως οι μοριακοί μηχανισμοί μέσα από τους οποίους προάγεται η ζωή. Συνέπεια αυτού του γεγονότος, ήταν η χρήση της γνώσης αυτής από τη φαρμακευτική βιομηχανία για την παραγωγή νέων φαρμάκων. Αυτή η προσέγγιση, ενώ ήταν σωστή απεδείχθη ότι δεν ήταν ολοκληρωμένη. Τα βιολογικά συστήματα παρουσιάζουν μια ιδιαιτερότητα, δεν υπακούν πλήρως σε νόμους ή για να εκφρασθούμε ορθότερα δεν μπορούμε εμείς να περιγράψουμε τους νόμους με τους οποίους λειτουργούν αυτά. Άρα γίνεται αυτόματα κατανοητό ότι υπάρχει ένα έλλειμμα στη γνώση μας σχετικά με την κατανόηση και ερμηνεία των βιοσυστημάτων, από το ευκαρυωτικό[9] κύτταρο, τον οργανισμό των θηλαστικών, τον άνθρωπο και τέλος το οικοσύστημα. Η παράμετρος που απουσιάζει πιθανότατα είναι αυτό που αναφέραμε στην εισαγωγή της παρούσης εργασίας, δηλαδή η παράλειψη του απλού γεγονότος ότι όλα τα βιοσυστήματα είναι και φυσικά συστήματα. Υπάρχουν λοιπόν μια πληθώρα νόμων που αγνοούμε στη μελέτη των συστημάτων αυτών. Ως εκ τούτου, από τις πρώτες αναφορές ήταν αυτή του Schrodinger που θεωρούμε ότι ήταν η πρώτη ολοκληρωμένη αντίληψη ότι φυσικοί νόμοι και ζωή πάνε μαζί. Επί παραδείγματι, είναι πλέον γνωστό ότι τα κύτταρα έχουν ηλεκτρομαγνητικές ιδιότητες μερικές εκ των οποίων είναι η αντίσταση (*R*), εμπέδηση (*Z*), ηλεκτρική χωρητικότητα (*C*), αγωγιμότητα (*D*), η διηλεκτρική σταθερά (*ε*) και φυσικά μηχανικές ιδιότητες. Αν σκεφτούμε για παράδειγμα τις μεταβολές που πρέπει να περιέλθει ένα καρκινικό κύτταρο για να περάσει το ενδοθήλιο ενός ιστού και να περιέλθει στο κυκλοφορικό ώστε να προκαλέσει μετάσταση. Ο κυτταροσκελετός, έχει κάποια όρια ελαστικότητας, δηλαδή δεν μπορεί να σμικρυνθεί ή να επιμηκυνθεί στο άπειρο, η ελαστικότητα αυτή αφορά στις μηχανικές ιδιότητες του κυττάρου. Δεν είναι τυχαίο ότι από τα βασικά γονίδια που φαίνονται να υπερεκφράζονται σε καρκινικά κύτταρα είναι του κυτταροσκελετού. Εκ πρώτης όψεως είναι πολύ μεγάλου ενδιαφέροντος για τις βιοϊατρικές επιστήμες η επίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας[10] μιας και είναι

[9] Το οποίο είναι ήδη μια πολύ περίπλοκη μορφή ζωής, μιας και η έλλειψη γνώσης ξεκινάει από τους ιούς, τα βακτήρια και εν γένει πολύ πιο απλούς οργανισμούς από ότι το ευκαρυωτικό κύτταρο.

[10] Εννοώντας όλο το φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας.

γνωστό ότι κάποια είδη αυτής είναι επιζήμια, όπως η υπεριώδης, οι ακτίνες Rontgen και η γ-ακτινοβολία. Από την άλλη όμως έχει σημασία να γνωρίζουμε και τις ιδιότητες των κυττάρων που αφορούν στον ηλεκτρομαγνητισμό. Δύο πολύ στοιχειώδη παραδείγματα είναι η διαφορά δυναμικού που παρατηρείται στην κυτταρική μεμβράνη με την παρουσία ιόντων Na^+ και K^+, η παρουσία διαφοράς δυναμικού στη μεμβράνη του μιτοχονδρίου με την παρουσία ιόντων (πρωτονίων) H^+ και τέλος η μετάδοση σήματος στους νευρώνες, που κατά ένα μέρος του οφείλεται στις αλλαγές στη διαφορά δυναμικού κατά μήκος των αξονίων.

Η ΔΙΗΛΕΚΤΡΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΑ

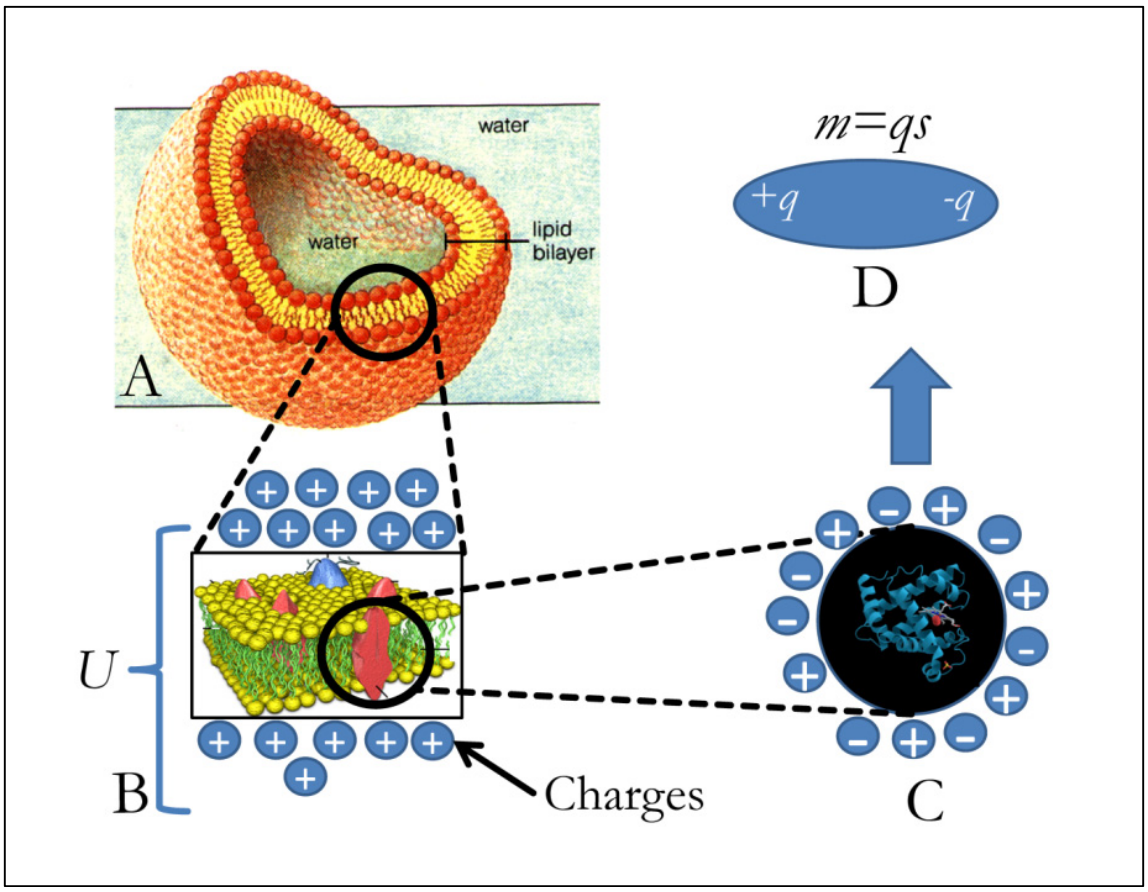
Η πρώτη θεωρία που διατυπώθηκε για τη διηλεκτρική σταθερά των διαλυμάτων και συγκεκριμένα των μη-ομογενών διαλυμάτων ήταν από τον *Maxwell* (*James Clerck Maxwell*) στο έργο του "*A Treatise on Electricity and Magnetism*" (Maxwell 1873) και αργότερα από τον *K.W. Wagner* (1914) (Wagner 1914). Η μέτρηση των ηλεκτρομαγνητικών ιδιοτήτων των κυττάρων έχει αποτελέσει αντικείμενο μερικών μελετών, δεν έχει λάβει όμως την έκταση, που έχουν λάβει οι μοριακές μελέτες (Stoy, Foster et al. 1982; Asami, Takahashi et al. 1989; Egot-Lemaire, Pijanka et al. 2009). Οι πρώτες μελέτες ξεκίνησαν στις αρχές του $20^{ου}$ αιώνα με πρώτες τις μετρήσεις σε διαλύματα με σφαιρίδια μια στιβάδας (*single-shell spheroids*) (Pauly and Schwan 1959). Η βασική ιδέα ήταν να μετρηθεί η διηλεκτρική σταθερά και η εμπέδηση σε διαλύματα με σφαιροειδή και πως αυτό μπορούσε να επεκταθεί σε βιολογικά διαλύματα, όπου τα σφαιροειδή ήταν κύτταρα (π.χ. ερυθρά αιμοσφαίρια). Στη συνέχεια, αναπτύχθηκαν μεθοδολογίες που προσπαθούσαν να μετρήσουν τη διηλεκτρική σταθερά διαλυμάτων με σφαιροειδή πολλαπλών στοιβάδων, σφαιροειδών δηλαδή που πλησίαζαν ακόμα περισσότερο το ευκαρυωτικό κύτταρο (Irimajiri, Hanai et al. 1979).

Το ενδιαφέρον όμως είναι ότι έχουν αναπτυχθεί μεθοδολογίες, που εκμεταλλεύονται τις ηλεκτρομαγνητικές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων. Αρκετές μεθοδολογίες έχουν αναπτυχθεί για τη διάγνωση καρκινικών ιστών και μάλιστα είναι μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος (Egot-Lemaire, Pijanka et al. 2009). Η βασική ιδέα της χρήσης ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων πέραν των ήδη γνωστών και παρεμβατικών[11], όπως είναι οι ακτίνες-Χ και η γ-ακτινοβολία, είναι ότι ο καρκινικός ιστός έχει διαφορετικές διηλεκτρικές ιδιότητες και διαφορετικές ηλεκτρομαγνητικές ιδιότητες εν γένει από τον φυσιολογικό ιστό. Για να γίνει αυτό περισσότερο κατανοητό, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε ως παράδειγμα την ανάπτυξη του υπερηχογραφήματος. Η μέθοδος αυτή στηρίχθηκε ακριβώς στην ιδιότητα των κυττάρων να αντανακλούν διαφορετικά τον ήχο αναλόγως της συχνότητάς του και αναλόγως της σύστασης του ιστού. Μπορούμε δηλαδή εύκολα να φανταστούμε ότι αντιστοίχως, ένας ιστός θα έχει διαφορετική διαπερατότητα σε ηλεκτρικά φορτία αναλόγως της σύστασής του και της συχνότητας του ρεύματος που τον διαπερνά. Τέτοιες

[11] Ως παρεμβατική ακτινοβολία εννοούμε την ιοντίζουσα ακτινοβολία, που είναι γνωστό ότι προκαλεί αλλαγές στο γενετικό υλικό. Τέτοιες είναι π.χ. η υπεριώδης ακτινοβολία, οι ακτίνες-Χ και η γ-ακτινοβολία.

μεθοδολογίες είναι ακόμα στην αρχή της ανάπτυξής τους. Υπάρχουν πολλά ακόμα που πρέπει να μελετηθούν για τη φύση των κυττάρων και τις ιδιότητες τους αναφορικά με τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα. Τέλος, σε μια πρόσφατη πολύ ενδιαφέρουσα μελέτη έγινε η σύνδεση μεταξύ των μη-γραμμικών ιδιοτήτων των κυττάρων και της ηλεκτρικής χωρητικότητας των κυττάρων (*C*). Στη μελέτη αυτή αποδείχθηκε η ύπαρξη και υπολογίστηκε η διάσταση *fractal* της κυτταρικής μεμβράνης, όπου δείχθηκε ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ των δύο, δηλαδή όσο αυξάνεται η περιπλοκότητα (άρα η διάσταση *fractal*) της κυτταρικής μεμβράνης, τόσο αυξάνεται η ηλεκτρική χωρητικότητα (Wang, Becker et al. 2010).

Με βάση τα παραπάνω, θα μπορούσαμε να πούμε ότι είναι δυνατόν να μετρηθεί η διηλεκτρική σταθερά σε ετερογενή διαλύματα, στα οποία η σταθερά μεταβάλλεται με το χρόνο. Πιο συγκεκριμένα μπορούμε να θεωρήσουμε ένα διάλυμα αποτελούμενο από βιομόρια ήτοι πρωτεΐνες, ιόντα, υδατάνθρακες, λιπίδια κτλ ως ένα ετερογενές διάλυμα αποτελούμενο από σφαιρίδια μονο-στοιβαδικά, των οποίων η συγκέντρωση μπορεί να υπολογισθεί σε σχέση με ένα διάλυμα ελέγχου (σχετική ποσοτικοποίηση) στο οποίο δεν συντελούνται οποιεσδήποτε αλλαγές. Ένα μοντέλο της ηλεκτρικής λειτουργίας παρουσιάζεται απλοποιημένο διαγραμματικά στην **Εικόνα 40**.



Εικόνα 40. Το ευκαρυωτικό κύτταρο (**A**) έχει στατικές ηλεκτρικές ιδιότητες και ειδικότερα η κυτταρική μεμβράνη (**B**), λόγω της μεταφοράς ιόντων ένθεν και ένθεν αυτής. Σε συνέχεια οι πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης αλλά και αυτές του εξωκυττάριου χώρου λειτουργούν ως φορτισμένα σφαιροειδή φορτία (τα οποία μπορούμε να θεωρήσουμε ως ομογενή) (**C**), οι οποίες με τη σειρά τους μπορούν να θεωρηθούν ως ηλεκτρικά δίπολα (**D**) με ηλεκτρική ροπή ίση (m) με το εσωτερικό γινόμενο των φορτίων (q) επί τη μεταξύ τους απόσταση (s).

Με βάση τις εργασίες των *Maxwell* (1873) (*James Clerk Maxwell*, 13 Ιουνίου 1831 – †5 Νοεμβρίου 1879), *Pauly* (1959) και *Debye* (1929) (*Peter Joseph William Debye*, 24 Μαρτίου 1884 –†2 Νοεμβρίου 1966) (Maxwell 1873; Debye 1929; Pauly and Schwan 1959) θα ορίσουμε ως διηλεκτρική σταθερά (ε) την ηλεκτρική χωρητικότητα ανά μονάδα όγκου. Η διηλεκτρική σταθερά δίνεται από τη γενική σχέση:

$\varepsilon_r(\omega) = \frac{\varepsilon(\omega)}{\varepsilon_0}$, **Εξίσωση 9.** Γενική συνάρτηση της διηλεκτρικής σταθεράς.

Όπου ο παράγοντας $\varepsilon(\omega)$ είναι η μιγαδική συνάρτηση της απόλυτης ηλεκτρικής διαπερατότητας σε σχέση με τη συχνότητα και ε_0 είναι η διαπερατότητα του κενού. Για να μετρηθεί η διηλεκτρική σταθερά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ηλεκτρική χωρητικότητα ενός συστήματος ως:

$\varepsilon_r = \frac{C_x}{C_0}$, **Εξίσωση 10.** Εξίσωση μέτρησης της διηλεκτρικής σταθεράς.

Όπου C_x είναι η ηλεκτρική χωρητικότητα του συστήματος και C_0 είναι η χωρητικότητα του συστήματος στο κενό. Έτσι, η διηλεκτρική σταθερά μπορεί να εκφρασθεί, με βάση τον *Debye* (1929) ως:

$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty)}{(1 + i\omega t)}$, **Εξίσωση 11.** Εξίσωση διηλεκτρικής του *Debye*.

Όπου ε_∞ είναι η διηλεκτρική σταθερά μετρημένη σε συχνότητες ηλεκτρομαγνητικού κύματος *απείρως*[12] μεγαλύτερες από την εφαρμοσμένη συχνότητα, i είναι ο φανταστικός αριθμός για τον οποίο ισχύει $i^2 = -1$, ω είναι η γωνιακή ταχύτητα της συχνότητας του ηλεκτρομαγνητικού κύματος και t ο χρόνος. Για να κατανοήσουμε την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου σε ένα δίπολο μπορούμε να ορίσουμε την στροφορμή τ του διπόλου σε ένα διάλυμα με ιξώδες ξ και μοριακό συντελεστή τριβής χ ως:

$\tau = \frac{\chi}{2kT}$, **Εξίσωση 12.** Στροφορμή ηλεκτρικού διπόλου.

Όπου, k είναι η σταθερά του *Boltzman* και T είναι η απόλυτη θερμοκρασία. Εάν υποθέσουμε (όπως είναι στην περίπτωση της μελέτης μας) ότι το δίπολο είναι μια τέλεια ομογενής σφαίρα με ακτίνα a σε διάλυμα με ιξώδες ξ ισχύει η Νευτώνια ρευστοδυναμική, όπου η σχέση των *Stokes-Einstein*[13] (*Albert Einstein*, 14 Μαρτίου 1879 – †18 Απριλίου 1955 και *Sir George Gabriel Stokes*, *1st Baronet*, 13 August 1819 – †1 February 1903) (Einstein 1905; von Smoluchowski 1906) μας δίνει:

---

[12] Η έννοια του *απείρως μεγαλύτερη* έχει την έννοια μιας μέτρησης σε μια συχνότητα στην οποία το σφαιρίδιο ή το δίπολο ή το φορτίο στο οποίο εφαρμόζεται δεν ανταποκρίνεται.

[13] Η σχέση αυτή προκύπτει από τη συνάρτηση των *Stokes-Einstein*, η οποία περιγράφει τη διάχυση σωματιδίων *Stokes* που λαμβάνουν μέρος σε κίνηση *Brown*, σε ένα ρευστό με ιξώδες. Ο νόμος του *Stokes* αφορούσε την κίνηση σωματιδίων σε ένα συνεχές ρευστό και τις δυνάμεις που ασκούνται σε αυτά ως: $F_d = 6\pi\mu R v_s$. Η αρχική μελέτη αφορούσε στην ανάλυση της κίνησης *Brown*, η οποία διατυπώθηκε από τους *Einstein* και *Smoluchowski* και εξέφραζε τη διάχυση ως: $D = \frac{k_B T}{6\pi\xi\alpha}$. Στην περίπτωση φορτισμένων σωματίων ισχύει $D = \frac{\mu_q k_B T}{q}$. Για σφαιρικά σωμάτια ο νόμος του Stokes δίνει: $\chi = 6\pi\xi r$, και έτσι η εξίσωση *Einstein* και *Smoluchowski* γίνεται $D = \frac{k_B T}{6\pi\xi\alpha}$. Στην περίπτωση περιστροφικής διάχυσης (όπως για παράδειγμα σε σφαιρίδιαμόρια σε βιολογικό διάλυμα) η μοριακή τριβή γίνεται $\zeta_r = 8\pi\xi r^3$ και η αντίστοιχη περιστροφική διάχυση γίνεται $D_r = \frac{k_B T}{8\pi\xi r^3}$.

$\chi = 8\pi\xi\alpha$, **Εξίσωση 13.** Στροφορμή ομογενούς σφαίρας σε ρευστό Ι.

Τελικώς η στροφορμή, με βάση τα παραπάνω, γίνεται:

$\tau = \frac{4\pi\theta a^3}{kT}$, **Εξίσωση 14.** Στροφορμή ομογενούς σφαίρας σε ρευστό ΙΙ.

ΗΛΕΚΤΡΙΚΑ ΔΙΠΟΛΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

Για να μπορέσουμε να αναλύσουμε καλύτερα τις μετρήσεις των βιολογικών υγρών υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου πρέπει να κατανοήσουμε τις βασικές ιδιότητες των βιομορίων που αναμένονται να βρεθούν σε ένα τέτοιο διάλυμα. Έτσι, οι βασικές κατηγορίες μορίων που αναμένεται να έχουμε είναι οι πρωτεΐνες και αμινοξέα, τα νουκλεοτίδια (ελεύθερα στο διάλυμα λόγω της κυτταρικής λύσης), λιπίδια και τα παράγωγά τους και ηλεκτρολύτες.

ΑΜΙΝΟΞΕΑ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Τα αμινοξέα έχουν τον γενικό τύπο:

R-C_x(H)(NH_3^+)-COO^-, **Χημική Ένωση 1.** Γενικός τύπος αμινοξέων.

Οι πρωτεΐνες αποτελούν πολυμερή αυτού του χημικού τύπου. Όπως παρατηρούμε τα αμινοξέα έχουν ιδιότητα διπόλου, λόγω των ριζών -NH_3^+ και COO^- (που προκύπτει από το καρβοξύλιο COOH). Η διηλεκτρική συμπεριφορά των αμινοξέων μπορεί να δοθεί από τη σχέση:

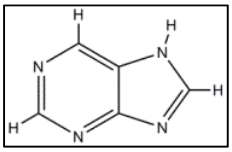
$\varepsilon' = \varepsilon_s' + \delta C$, **Εξίσωση 15.** Διηλεκτρική σταθερά διαλύματος αμινοξέων.

Όπου *ε'* είναι η διηλεκτρική σταθερά του διαλύματος, ε_s είναι η διηλεκτρική σταθερά του διαλύτη, *δ* είναι η σταθερά του διαλύματος και *C* είναι η συγκέντρωση των αμινοξέων (Pethig and Kell 1987).

ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ

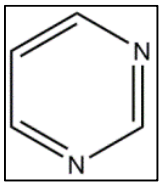
Το επόμενο πολύ σημαντικό μόριο που συναντάται στα βιολογικά διαλύματα είναι τα νουκλεοτίδια και κατά συνέπεια η ύπαρξη πολυμερών νουκλεοτιδίων με συγκεκριμένο μήκος.

Τα νουκλεοτίδια αποτελούνται από μια πεντόζη, μια φωσφορική ομάδα και μια βάση. Οι βάσεις με τη σειρά τους διαχωρίζονται σε δύο ομάδες: στις πουρίνες (*purines*) και τις πυριμιδίνες (*pyrimidines*). Ο γενικός τύπος των πουρινών είναι:

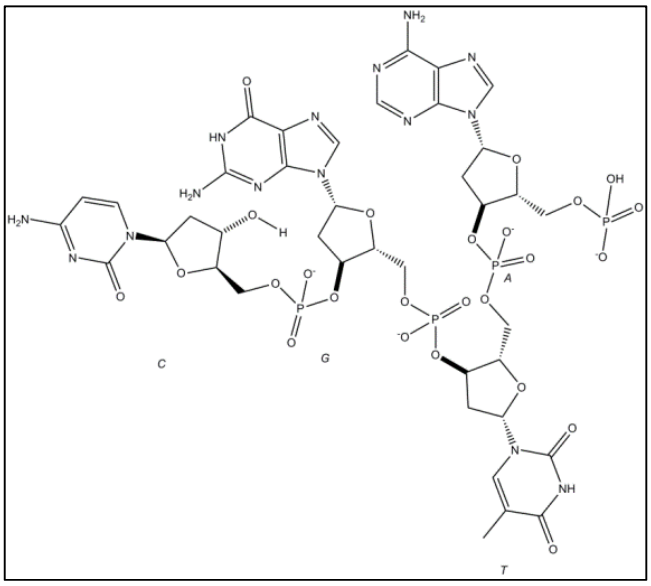


Χημική Ένωση 2. ($C_5H_4N_4$)Γενικός τύπος των πουρινών.

Αντίστοιχα ο γενικός τύπος των πυριμιδινών είναι:



Χημική Ένωση 3. ($C_4H_4N_2$) Γενικός τύπος των πυριμιδινών.



Η ζεύξη αυτών των οικογενειών μορίων ήτοι ο πολυμερισμός τους δίνει τις αλυσίδες των νουκλεοτιδίων. Ένας ενδεικτικός τύπος των νουκλεοτιδίων παρουσιάζεται στην παρακάτω χημική ένωση (**Χημική Ένωση 4**), όπου παρουσιάζεται η σύνδεση μιας αδενίνης (*A*), θυμίνης (*T*), γουανίνης (*G*) και κυτοσίνης (*C*).

Χημική Ένωση 4. Ενδεικτική δομή της σύνδεσης αδενίνης, θυμίνης, γουανίνης και κυτοσίνης. Παρουσιάζεται μια μικρή αλυσίδα νουκλεοτιδίων, με σειρά ATGC.

Τα νουκλεοτίδια και κατά συνέπεια το μόριο του DNA σχηματίζει μια δομή, την έλικα, η οποία έχει αντι-παράλληλη ελικοειδή μορφή. Ως εκ τούτου, μπορεί να θεωρηθεί ότι έχει τη δομή μιας ράβδου και μάλιστα με ιδιότητες έντονου ηλεκτρικού διπόλου. Το φαινόμενο αυτό, δεν ήταν αναμενόμενο μιας και η αντι-παράλληλη δομή έπρεπε να ακυρώνει τις όποιες ιδιότητες διπόλου αλλά πάρα ταύτα δείχθηκε ότι το ηλεκτρικό δίπολο υπάρχει ακριβώς *κατά μήκος* της αλύσου. Έτσι σε συνέχεια των προηγούμενων η στροφορμή του διπόλου που σχηματίζει μια άλυσος DNA, παίρνει τη μορφή:

$\tau = \frac{\pi \varepsilon_{se} L^2}{2uzq^2}$, **Εξίσωση 16.** Στροφορμή ηλεκτρικού διπόλου μορίου DNA, μήκους L, διηλεκτρικής σταθεράς του περιβάλλοντος διαλύματος ε_{se}, αποτελούμενο από z ιόντα και φορτίο q.

Παρά το γεγονός ότι έχει διατυπωθεί ένα θεωρητικό υπόβαθρο για τις ιδιότητες μορίων DNA σε διάλυμα, η πραγματική μέτρηση των διηλεκτρικών μπορεί να γίνει μόνο με πειραματικές μεθόδους.

ΛΙΠΙΔΙΑ

Η επόμενη κατηγορία μορίων που παρευρίσκονται σε ένα βιολογικό διάλυμα αφορά στα λιπίδια. Τα λιπίδια είναι μια μεγάλη οικογένεια μορίων που περιλαμβάνει τα λιπαρά οξέα, τα γλυκερίδια (που χωρίζονται περαιτέρω στα μονο-γλυκερίδια, δυ-γλυκερίδια και τρι-γλυκερίδια), τα φωσφολιπίδια, η χολεστερόλες και τα παράγωγά τους τα στεροειδή. Τα μόρια αυτά είναι υδρόφοβα και ως εκ τούτου, δεν είναι μόρια που αναμένεται να έχουν ιδιότητες ηλεκτρικού διπόλου. Άρα είναι αναμενόμενο ότι θα πρέπει να συμβάλλουν στην αύξηση της ηλεκτρικής χωρητικότητας, λειτουργώντας ως μονωτές μέσα σε ένα βιολογικό διάλυμα.

ΗΛΕΚΤΡΟΛΥΤΕΣ

Τελευταία κατηγορία μορίων (χωρίς να σημαίνει ότι δεν υπάρχουν άλλα μόρια σε ένα βιολογικό διάλυμα) στα οποία θα αναφερθούμε είναι οι ηλεκτρολύτες. Πριν προχωρήσουμε πρέπει να αναφερθούμε σύντομα στους ηλεκτρολύτες και σε ορισμένες εκ των δυνατοτήτων τους.

Έτσι λοιπόν, ηλεκτρολύτες είναι οι ενώσεις , που όταν διαλυθούν στο νερό διίστανται. Ηλεκτρολύτες είναι τα Οξέα, οι Βάσεις και τα Άλατα. Ηλεκτρολυτικό διάλυμα είναι ένα διάλυμα ηλεκτρολυτών και ειδικότερα τα βιολογικά διαλύματα είναι κατά κόρον ηλεκτρολυτικά. Η διάσταση στις βάσεις και τα άλατα, που είναι ενώσεις ετεροπολικής φύσεως προκαλείται από τη λύση των δυνάμεων *Coulomb* (*Charles-Augustin de Coulomb*, 14 Ιουνίου 1736 – †23 Αυγούστου 1806) ως ακολούθως:

$F_{H_2O} = \frac{1}{4\pi \varepsilon_{H_2O} \varepsilon_0} \frac{Q_1 Q_2}{r^2}$, **Εξίσωση 17.** Δυνάμεις *Coulomb*

Κατά τη διάλυση των ετεροπολικών ενώσεων στο νερό , λόγω της μεγάλης διηλεκτρικής σταθεράς του επέρχεται ελάττωση της δύναμης *Coulomb*. Σε τέτοιο βαθμό που είναι ανίκανη να συγκρατήσει τα ιόντα . Έτσι έχω πλήρη καταστροφή του κρυσταλλικού πλέγματος και απελευθέρωση των ιόντων που προϋπάρχουν στο πλέγμα , αλλά δεν μπορούσαν να κινηθούν ελεύθερα.

Στις περιπτώσεις των ενώσεων ομοιοπολικής φύσεως, όπως είναι τα οξέα, η διάσταση οφείλεται σε αντίδραση του οξέος με το νερό , προς δημιουργία ιόντος οξωνίου με βάση την ακόλουθη ενδεικτική αντίδραση:

$HCl+H_2O \rightarrow H_3O^+ + Cl^-$, **Χημική Αντίδραση 1.** Σχηματισμός μορίου οξωνίου σε διάλυμα οξέως.

Η οποία γράφεται χάριν απλότητας,

$HCl \rightarrow H^+ + Cl^-$**, Χημική Αντίδραση 2**.

Η αντίδραση αυτή έχει ισχύ μόνο πρακτική και όχι θεωρητική.

Διακρίνουμε δύο είδη διάστασης, την πλήρη και την ασθενή. Στην πλήρη διάσταση όλα τα μόρια γίνονται ιόντα, ενώ στη μερική διάσταση έχουμε συνύπαρξη ιόντων και μορίων. Έτσι, οι ηλεκτρολύτες διακρίνονται σε: α) Ισχυρούς ηλεκτρολύτες, ήτοι αυτοί που διαιρούνται πλήρως (μονόδρομοι αντίδραση) και β) στους ασθενείς ηλεκτρολύτες, ήτοι αυτοί που δεν διίστανται πλήρως , αλλά μερικώς (αμφίδρομη αντίδραση).

Στους ισχυρούς ηλεκτρολύτες ανήκουν όλες οι βάσεις και τα άλατα και τμήμα των οξέων (HCl, HBr, HJ, HNO_3, $HClO_4$, H_2SO_4). Στους ασθενείς ηλεκτρολύτες ανήκουν όλα άλλα οξέα (HF, HCN, H_2J, H_3PO_4, H_2CO_3, όλα τα – ώδη) και όλα τα οργανικά.

Μια και μόνη βάση αποτελεί την εξαίρεση στην ισχύ διάστασης και είναι η αμμωνία, η οποία διίσταται ως ακολούθως:

$NH_3 + HOH \leftrightarrow NH_4^+ + OH^-$, **Χημική Αντίδραση 3**. Αμμωνία, η μοναδική ασθενής βάση.

Ως εκ τούτου, προκύπτει ο ορισμός της ισχύς των ηλεκτρολυτών, που είναι η ικανότητα των ηλεκτρολυτών να διίστανται. Υπάρχουν μέτρα ισχύος για να μετρηθεί η ιδιότητα αυτή.

Πρώτο μέτρο ισχύος είναι η *Σταθερά Ιονισμού* (διάστασης) $K_{a,b}$ (a: acid, b:base).

Έστω ότι σ' ένα διάλυμα ηλεκτρολύτη , π.χ. HCN έχει αντικατασταθεί η ιοντική ισορροπία και άρα γράφουμε:

$HCN+H_2O \leftrightarrow H_3O^+ + CN^-$, **Χημική Αντίδραση 4**.

Τότε ισχύει $K_a = \frac{C_{H_3O^+} C_{CN^-}}{C_{HCN} C_{H_2O}}$. Ο παράγοντας αυτός εξαρτάται από τη Θερμοκρασία (Τ) και τη Φύση του ηλεκτρολύτη. Η σταθερά Κ μας λέει ουσιαστικά ότι όσο πιο μεγάλη είναι τόσο ισχυρότερος είναι ο ηλεκτρολύτης και αντιστρόφως. Γνωρίζουμε ότι για πολύ αραιά διαλύματα ισχύει: d=1gr/lt. Επειδή, 1lt διαλύματος=1lt H_2O=1000 ml και 1000ml $H_2O \rightarrow$1000 gr H_2O ή 1000/18=55,5 mol H_2O τότε θεωρούμε τη συγκέντρωση του νερού ως σταθερά και δεν τη χρησιμοποιούμε στον υπολογισμό της σταθεράς διάστασης. Το δεύτερο μέτρο ισχύος είναι *βαθμός διάστασης* (α), που τον ορίζουμε ως το κλάσμα του 1 mole που διίσταται, δηλαδή,

Βαθμός διάστασης=(τα moles που διίστανται/ τα moles που έβαλα αρχικά) 100 % .

Ο βαθμός διάστασης εξαρτάται από τη θερμοκρασία (Τ), τη φύση του ηλεκτρολύτη, τη συγκέντρωση (C) του διαλύματος και την επίδραση του κοινού ιόντος. Ας εξετάσουμε συνοπτικά, πως ο βαθμός διάστασης εξαρτάται από τους παράγοντες που προαναφέραμε:

Πως Εξαρτάται ο Β.Δ. (Βαθμός Διάστασης) από τη Συγκέντρωση (C) του Διαλύματος.

Έστω διάλυμα ασθενούς ηλεκτρολύτη HCN , που έχει αποκατασταθεί η Ι.Ι. (ιοντική ισορροπία)

Άρα με βάση όσα προείπαμε:

$HCN+HOH \leftrightarrow H_3O^+ + CN^-$

ΑΡΧ.	C mol / lt	-	-
ΔΙΣΤΑΝ.	α C	α C grions / lt	α C grions / lt
ΤΕΛ.	(1 – α) C	α C	α C

Τότε, $K_a = C_{H3O+} C_{CN}/C_{HCN} \rightarrow K_a = a^2 C^2/(1-a)C$

Αν έχω πολύ ασθενείς ηλεκτρολύτες ισχύει, $\alpha << 1 \rightarrow (1-\alpha) \approx 1$ και $K_a = a^2 C$ ή $a = \sqrt{K_a}/C$

Από αυτά προκύπτει ο *Νόμος Αραίωσης του OSWALD*: Όταν αραιώνω ένα διάλυμα, μειώνεται η C της διαλυμένης ουσίας και τότε αυξάνει ο Β.Δ. του ηλεκτρολύτη.

Πως Εξαρτάται ο Βαθμός Διάστασης από την Επίδραση Κοινού Ιόντος.

Έστω ένα διάλυμα ασθενούς ηλεκτρολύτη π.χ. HCN με βαθμό διάστασης a_1 , εάν σ' αυτό προσθέσω ΙΣΧΥΡΟ ΔΙΑΛΥΤΗ με κοινό ιόν π.χ. HCl, KCN τότε αυξάνω τη C του κοινού ιόντος. Άρα καταστρέφω την ισορροπία αυτής της αντίδρασης που σύμφωνα με την αρχή *Le Chatellie-Van't Hoff* θα στραφεί αριστερά . Αυτό σημαίνει ότι παράγονται αδιάστατα μόρια εις βάρος των διισταμένων άρα μικραίνει ο βαθμός διάστασης του ασθενούς ηλεκτρολύτη και γίνεται a_2 , όπου $a_2 < a_1$.

Συμπέρασμα : Όσο αυξάνει η C κοινού ιόντος , τόσο ελαττώνεται ο Β.Δ. του ασθενούς.

Πως Γίνεται η Διάσταση των Ασθενών Πολυβασικών Οξέων και των Ασθενών Πολυόξινων Βάσεων.

Η διάσταση των ασθενών πολύ-οξέων ή βάσεων γίνεται ΚΑΤΑ ΣΤΑΔΙΑ , δηλαδή ΔΙΣΤΑΝΤΑΙ ένα-ένα τα H_2 ή τα OH^-.

Έτσι επί παραδείγματι, ας πάρουμε το υδρόθειο:

$H_2S+H_2O\leftrightarrow H_3O^++HS^-$, **Χημική Αντίδραση 5**. 1^o στάδιο διάστασης πολυόξινου οξέος.

Προκύπτει δε ότι για βαθμό διάστασης (α_1), ισχύει $K_a=\frac{C_{H_3O^+}C_{HS^-}}{C_{H_2S}}$.

$HS+H_2O\leftrightarrow H_3O^++S^{-2}$, **Χημική Αντίδραση 6**. 2^o στάδιο διάστασης πολυόξινου οξέος.

Προκύπτει δε ότι για (α_2), ισχύει, $K_a=\frac{C_{H_3O^+}C_{S^{-2}}}{C_{HS}}$.

Είναι πολύ σημαντικό να σημειώσουμε ότι κάθε στάδιο διάστασης έχει δική του σταθερά ιονισμού. Τόσο η σταθερά ιονισμού , όσο και ο βαθμός διάστασης του πρώτου σταδίου έχουν τη μεγαλύτερη τιμή , των δε υπολοίπων συνεχώς ελαττώνονται, όπου $K_1>K_2>K_3>\ldots>K_\nu$ και $\alpha_1>\alpha_2>\alpha_3>\ldots>\alpha_\nu$. Εξ ορισμού, η ολική σταθερά ιονισμού ($K_{total,a,b}$) ενός οξέος ή μιας βάσης είναι:

$K_{total,a,b}=K_1K_2\cdot\ldots\cdot K_n$, **Εξίσωση 18.** Σταθερά διάστασης σε πολύ-όξινα οξέα ή πολύ-βασικές βάσεις.

Ρυθμιστικά Διαλύματα

Ρυθμιστικό διάλυμα ορίζω το διάλυμα που περιέχει ασθενές οξύ και το αντίστοιχο αλάτι του π.χ. ($HCl+NaCl$, $CH_3COOH+CH_3COONa$) ή ασθενή βάση και το αντίστοιχο αλάτι της ($NH_3+NH_4Cl/NH_3+NH_4NO_3$).

Τα ρυθμιστικά διαλύματα, χρήζουν μνείας στην παρούσα υποενότητα, διότι τα περισσότερα βιολογικά διαλύματα είναι ρυθμιστικά. Τα ρυθμιστικά διαλύματα έχουν τις εξής ιδιότητες: 1) με αραίωση ή συμπύκνωση το pH μένει σταθερό (όχι όμως με άπειρη αραίωση) και 2) με προσθήκη μικρής ποσότητας ισχυρού οξέος ή βάσης pH μεταβάλλεται τόσο λίγο ώστε το δέχομαι πρακτικά σταθερό.

Γινόμενο Διαλυτότητας

Ανάλογα με τη διάλυση των ενώσεων στο νερό έχω δύο ειδών ενώσεις: α) ευδιάλυτες και β) δυσδιάλυτες. Δηλαδή, θεωρητικά δεν υπάρχει ένωση αδιάλυτη στο νερό. Εν γένει θεωρούμε τις δυσδιάλυτες ουσίες ως πρακτικά αδιάλυτες και τις ονομάζουμε ιζήματα, εκτός από τις περιπτώσεις που μελετάμε το γινόμενο διαλυτότητας, όπου ενδιαφερόμαστε για το πανελάχιστο ποσοστό της ουσίας που βρίσκεται διαλυμένο. Έστω λοιπόν ότι διαλύω στο νερό μια δυσδιάλυτη ένωση π.χ. AgCl σχεδόν όλη η ποσότητα θα καταβυθιστεί σαν ίζημα (αδιάλυτη μορφή), ενώ ένα πανελάχιστο ποσό θα διαλυθεί (διαλυμένη μορφή). *Το ποσό της διαλυμένης μορφής είναι η διαλυτότητα.*

Η μεν αδιάλυτη μορφή είναι σε μορφή κρυσταλλικού πλέγματος η δε διαλυμένη βρίσκεται σε μορφή ιόντων αφού σαν αλάτι είναι ισχυρός ηλεκτρολύτης . Μεταξύ της διαλυμένης και της αδιάλυτης μορφής έχω δυναμική ισορροπία:

$AgCl(s) \leftrightarrow Ag^{+}+Cl^{-}$, **Χημική Αντίδραση 7.** Διάσταση Χλωριούχου Αργύρου.

και ισχύει $K=C_{Ag+}C_{Cl-}/C_{AgCl(s)} \rightarrow KC_{AgCl(s)}=C_{Ag+}C_{Cl-} \rightarrow K_{sp}=KC_{AgCl(s)}=C_{Ag+}C_{Cl-}$
και τελικά αποδεικνύεται ότι ισχύει:

$K_{sp}=C_{Ag+}\ C_{Cl-}$, **Εξίσωση 19.** Το γινόμενο διαλυτότητας.

Έτσι γενικά, μπορούμε να γράψουμε για κάθε ένωση:

$A_X^{+\Psi}\ B_\Psi^{-X} \leftrightarrow XA^{+\Psi}+\Psi B^{-X}$, **Χημική Αντίδραση 8.** Γενική αντίδραση διάστασης.

$K_{sp}=C^{X}_{A+\Psi}C^{\Psi}_{B-X}$, **Εξίσωση 20.** Γενική εξίσωση γινομένου διαλυτότητας.

Έτσι, εξ ορισμού, μπορούμε να πούμε ότι το γινόμενο διαλυτότητας είναι το γινόμενο των μαζών των ιόντων της διαλυμένης μορφής ενός δυσδιάλυτου σώματος . Σε ΚΟΡΕΣΜΕΝΟ ΔΙΑΛΥΜΑ είναι σταθερό για σταθερή θερμοκρασία (*T*).

Υδρόλυση

Έστω ότι διαλύω στο νερό ένα αλάτι τύπου $A^{+}B^{-}$. Επειδή είναι ισχυρός ηλεκτρολύτης διίσταται πλήρως . Άρα στο διάλυμα θα έχω ιόντα A^{+} και ιόντα B^{-}: $AB \rightarrow A^{+}+B^{-}$
Όπως προαναφέραμε, το μόριο του νερού είναι δίπολο. Έτσι τα ιόντα A^{+} και B^{-} έλκουν τα δίπολα μόρια του νερού και ενυδατώνονται επειδή η ελκτική δύναμη είναι δύναμη *Coulomb*. Δηλαδή, εν συντομία ισχύει:
$F_c=K_c(Q_1Q_2/r^2)$, όπου Q_1=φορτίο A^{+}, Q_2=φορτίο OH^{-} , r=ακτίνα A^{+}

Ο αριθμός των μορίων νερού, που έλκει κάθε ιόν εξαρτάται :

1) από το φορτίο του ιόντος

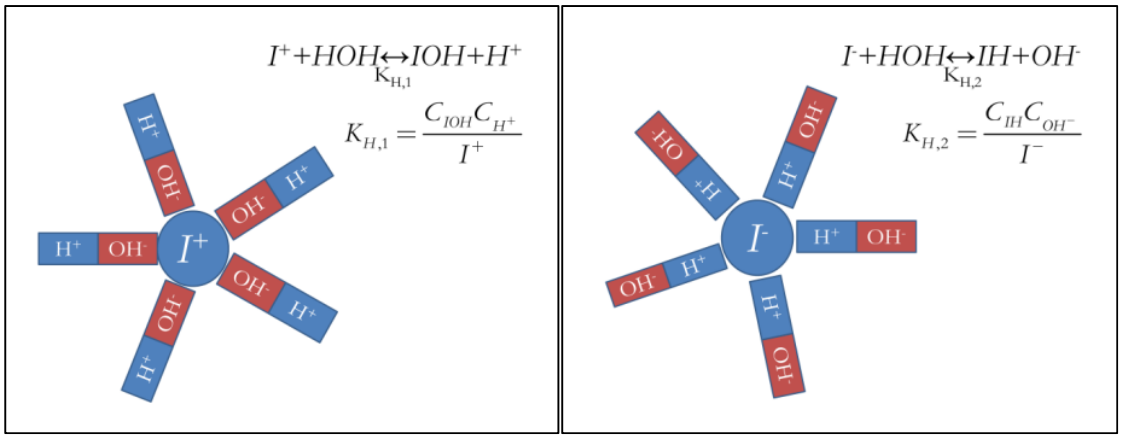
2) από το μέγεθος.

Άρα μέσα στο νερό δεν έχω ιόντα του A^+ αλλά ένα σύμπλοκο της μορφής:

$[A^+(H_2O)^0\lambda]^+$ (όπου λ, ο αριθμός μορίων που έχει γύρω του το ιόν) (**Εικόνα 41**).

Ταυτοχρόνως, όμως γνωρίζουμε ότι το νερό διίσταται και μάλιστα πολύ λίγο (ελάχιστα). Άρα μέσα στο διάλυμα θα υπάρχει και μια δεύτερη μορφή $[A^+(H_2O)^0(\lambda - 1)OH^-]^0$.

Οι δύο αυτές μορφές των ενυδατωμένων ιόντων βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία ως ακολούθως: $[A^+(H_2O)^0\lambda]^+ \leftrightarrow [A^+(H_2O)^0(\lambda-1)OH^-]^0$**, Χημική Αντίδραση 9.** Δυναμική ισορροπία υδρολυημένων ιόντων.



Εικόνα 41. Τα σύμπλοκα της μορφής $[A^+(H_2O)^0\lambda]^+$ και $[B^-(H_2O)^0\mu]^-$ (όπου λ και μ, ο αριθμός μορίων που έχουν γύρω τους τα ιόντα). Τα ιόντα (I) του διισταμένου άλατος, δημιουργούν σύμπλοκα με το νερό.

Συμπερασματικά λοιπόν, το φαινόμενο της ενυδάτωσης των ιόντων λέγεται υδρόλυση και γράφεται:

Για το ιόν A^+:

$[A^+(H_2O)^0\lambda]^+ \leftrightarrow [A^+(H_2O)^0(\lambda-1)OH^-]^0 + H^+$, **Χημική Αντίδραση 10.** Αντίδραση υδρόλυσης κατιόντων.

Όμοια για το B^-

$[B^-(H_2O)^0\mu]^+ \leftrightarrow [B^-(H_2O)^0(\mu-1)OH^-]^0 + OH^-$, **Χημική Αντίδραση 11.** Αντίδραση υδρόλυσης ανιόντων.

Πιο απλά οι δύο παραπάνω αντιδράσεις γίνονται:

$A^+ + HOH \leftrightarrow AOH + H^+$

$B^- + HOH \leftrightarrow HB + OH^-$

Πίνακας 6. Διηλεκτρικές σταθερές ηλεκτρολυτών (Pethig 1987)			
Κατιόν	**$\delta^+(\pm 1)$**	**Ανιόν**	**$\delta^-(\pm 1)$**
Na^+	-8	Cl^-	-3
K^+	-8	F^-	-5
Li^+	-11	I^-	-7
H^+	-17	SO^{2-}	-7
Mg^{2+}	-24	OH^-	-13

Πίνακας 6. Διηλεκτρικές σταθερές ηλεκτρολυτών (Pethig and Kell 1987).

Μπορούμε να πούμε λοιπόν συμπερασματικά ότι: 1) Η υδρόλυση των ιόντων, οδηγεί σε σχηματισμό ασθενούς βάσεως και οξέος και ουδέποτε ισχυρών, 2) υδρολύονται μόνο τα ιόντα που προέρχονται από ασθενείς ηλεκτρολύτες και δεν υδρολύονται τα ιόντα που προκύπτουν από ισχυρούς, 3) Η υδρόλυση των ιόντων έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία βασικού ή όξινου διαλύματος, 4) *η υδρόλυση είναι το αντίθετο της διάστασης*.

Όπως και στις προηγούμενες υποενότητες έτσι και στην περίπτωση των ηλεκτρολυτών, μπορούμε να ορίσουμε τη διηλεκτρική σταθερά. Έστω ότι ε'_γ είναι η διηλεκτρική του νερού και ε' είναι η διηλεκτρική διαλύματος ηλεκτρολυτών συγκέντρωσης C και αθροίσματος διπόλων δ. Τότε ισχύει:

$\varepsilon' = \varepsilon'_\gamma - \delta C$, **Εξίσωση 21.** Διηλεκτρική διαλύματος ηλεκτρολυτών.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι διηλεκτρικές σταθερές μερικών βασικών ιόντων (**Πίνακας 6**).

Ως εκ τούτου, η μέτρηση των ηλεκτροχημικών και φυσικοχημικών ιδιοτήτων των βιολογικών διαλυμάτων είναι πολύ περίπλοκες αλλά αποτελούν αντικείμενο έρευνας, με αποτελέσματα που ενδεχομένως να οδηγήσουν στη δημιουργία νέων προγνωστικών ή διαγνωστικών μεθόδων, εφαρμοζόμενα στη βιολογία των νεοπλασιών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Όλα τα παραπάνω που προαναφέραμε, συνηγορούν στο ότι είναι απαραίτητη η δημιουργία μοντέλων, τουλάχιστον *in vitro*, που να προσομοιώνουν τις νεοπλασίες του ΚΝΣ και ιδανικά *in vivo* σε άλλα θηλαστικά που ομοίως να προσομοιώνουν τέτοιου είδους νεοπλασίες. Επίσης καθίσταται σαφές ότι ειδικά για αυτού του είδους τις νεοπλασίες είναι απαραίτητη η πρόγνωση και όχι μόνο η θεραπεία. Ο λόγος για αυτό είναι διότι ακόμα και αν η θεραπεία επιτευχθεί, λόγω της ζωτικότητας του οργάνου του εγκεφάλου, η ζημία που θα προκληθεί είτε από τη νόσο αυτή καθ' εαυτή και/ή από τη θεραπεία είναι πολλές φορές ανεπανόρθωτη. Στην παρούσα εργασία γίνεται προσπάθεια μιας ολιστικής προσέγγισης των νεοπλασιών του ΚΝΣ με σκοπό την ανεύρεση κοινών δεικτών/σηματοδοτικών οδών μεταξύ διαφορετικών νεοπλασιών. Στην προσέγγιση αυτή υπάρχουν δύο κύριοι τρόποι αναζήτησης δεικτών, οιουδήποτε είδους: μέσω μελέτης του μεταγραφώματος ή/και του πρωτεώματος. Η παρούσα μελέτη επικεντρώνεται στη διερεύνηση του παραπάνω ερωτήματος στο επίπεδο του μεταγραφώματος χρησιμοποιώντας τη μεθοδολογία των μικροσυστοιχιών (microarrays). Η χρήση των μικροσυστοιχιών έφερε την επανάσταση για τη μελέτη του μεταγραφώματος δίνοντας τη δυνατότητα μελέτης δεκάδων χιλιάδων γονιδίων ταυτοχρόνως. Το θέμα των μεθοδολογικών προσεγγίσεων για την ανάλυση των μικροσυστοιχιών έχει αποτελέσει αντικείμενο εκτενούς μελέτης στη διεθνή βιβλιογραφία (Quackenbush 2001; Tseng, Oh et al. 2001; Yang and Speed 2002; Eckel, Gennings et al. 2005). Η μέθοδος των μικροσυστοιχιών αποτελεί μια εξαιρετική μέθοδο για τη μελέτη των βιολογικών συστημάτων.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι κατά πρώτον η ανεύρεση κοινών γονιδιακών οδών των νεοπλασιών του ΚΝΣ προς κατανόηση μιας πιθανής κοινής προέλευσης αυτών καθώς επίσης η κατανόηση των κοινών μηχανισμών που χρησιμοποιούν κατά την ανάπτυξή τους. Η γνώση αυτών των μηχανισμών έχει ως προέκταση την ταυτοποίηση δεικτών κρίσιμων για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αναπτυξιακή δυναμική των παραπάνω βιολογικών συστημάτων. Αναλυτικότερα η προσπάθεια επικεντρώνεται στην κατανόηση των κοινών μηχανισμών της πολλαπλασιαστικής δυναμικής (proliferation dynamics) των κυτταρικών συστημάτων *in vitro,* εφόσον αυτοί υφίστανται, και σύγκρισή τους με *ex vivo* βιοψίες νεοπλασιών του ΚΝΣ. Κατά δεύτερον, η *in vitro* μελέτη της δράσης χημειοθεραπευτικών παραγόντων στα υπό μελέτη κυτταρικά συστήματα. Και στις δύο αυτές ενότητες θα γίνει προσπάθεια κατανόησης τόσο των ενδοκυττάριων όσο και των εξωκυττάριων μηχανισμών σηματοδότησης. Ειδικά οι τελευταίοι αποτελούν και την πιθανή σύνδεση των μηχανισμών αυτών με αιματολογικούς δείκτες. Αναμένεται τέλος η παραπάνω μελέτη να

οδηγήσει στην ταυτοποίηση και αναγνώριση δεικτών στις παραπάνω νεοπλασίες που θα βοηθούσαν στην έγκαιρη πρόγνωση και κατά συνέπεια διάγνωση.

Η κύρια ιδέα της παρούσης εργασίας είναι σχετικά απλή. Ο μόνος τρόπος που έχουμε για να μελετήσουμε μια νεοπλασία του ΚΝΣ είναι κατά το στάδιο της παρουσίασης, ήτοι της διάγνωσης. Στο σημείο αυτό, η νεοπλασία έχει φτάσει πια σε τέτοιο σημείο που είναι πιθανότατα αργά για τον ασθενή. Καταλαβαίνουμε λοιπόν ότι δεν έχουμε καμία εικόνα της νόσου από τη στιγμή της εμφάνισης της νόσου μέχρι του σημείου της διάγνωσης και ακόμα περισσότερο δεν έχουμε καμία εικόνα για το χρονικό διάστημα από τη διαμόρφωση του φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό. Ο μόνος τρόπος για να λάβουμε πληροφορίες για το στάδιο της ανάπτυξης λοιπόν είναι μόνο μέσω της προσομοίωσης της πολλαπλασιαστικής δυναμικής των νεοπλασιών. Επίσης, ως συνέπεια αυτής της προσομοίωσης θα είναι η ταυτοποίηση, στο μέτρο του δυνατού, δεικτών που παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη των νεοπλασιών του ΚΝΣ.

Για την επίτευξη των παραπάνω η παρούσα μελέτη κινείται σε τρεις κεντρικούς άξονες:

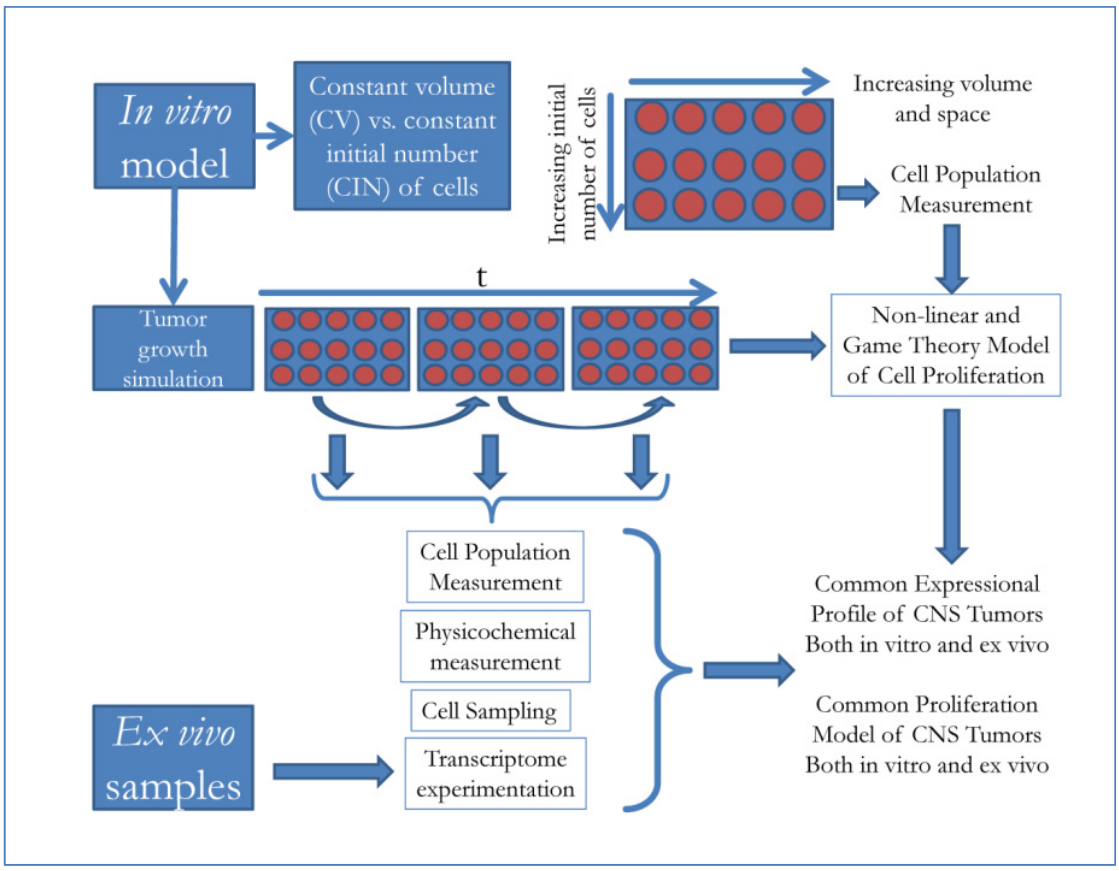
α) Μελέτη των όγκων του ΚΝΣ *in vitro* και προσπάθεια εξομοίωσης των όγκων αυτών (Mansury, Kimura et al. 2002): Μεθοδολογικά ο άξονας αυτός περιλαμβάνει την ανάπτυξη κυτταρικών σειρών νεοπλασιών του ΚΝΣ , μεθοδολογία μικροσυστοιχιών, κυτταρομετρία ροής και μεθόδους εξομοίωσης της ανάπτυξης των όγκων. Από τα αποτελέσματα αυτής της φάσης θα εξαχθούν τα εξής συμπεράσματα: Πρώτον, θα διατυπωθεί μια υπόθεση για την πορεία των νεοπλασιών *in vitro* και θα γίνει συσχέτιση με την ανάπτυξη των όγκων *ex vivo* (βιοψίες νεοπλασιών του ΚΝΣ). Δεύτερον θα βρεθούν οι κοινές οδοί (εφόσον υπάρχουν) στην προώθηση της ογκογένεσης διαφορετικών μορφών νεοπλασιών του ΚΝΣ. Τρίτον, θα βρεθεί το εκφραστικό προφίλ σε διάφορες φάσεις των υπό μελέτη νεοπλασιών και θα προβλεφθούν εξωκυττάρια σηματοδοτικά μόρια. Τέταρτον και τελευταίο, θα αναπαραχθεί ένα μοντέλο συμπεριφοράς των νεοπλασιών όσον αφορά στην πολλαπλασιαστική δυναμική τους. Το μοντέλο αυτό, λόγω της περιπλοκότητας θα περιορισθεί σε δύο σημεία. Το πρώτο είναι η προσομοίωση της ανάπτυξης ενός όγκου *in vitro* με σκοπό την προσπάθεια ερμηνείας της ανάπτυξης των νεοπλασιών του ΚΝΣ *in vivo* (Moolgavkar and Knudson 1981; Knudson 2001). Το δεύτερο σημείο θα περιορισθεί στην δημιουργία ενός απλού υπολογιστικού μοντέλου για τη συμπεριφορά του εξωκυττάριου συστήματος μεταγωγής σήματος σε ένα κλειστό *in vitro* σύστημα, β) *in vitro* χημειοθεραπεία και κυτταροτοξικότητα χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Μεθοδολογικά θα ακολουθηθεί η ίδια οδός όπως και στον άξονα (α). Από αυτό το σκέλος αναμένεται να βρεθούν μηχανισμοί δράσεως των χημειοθεραπευτικών στα υπό μελέτη συστήματα καθώς και να ταυτοποιηθούν οι μηχανισμοί πολλαπλασιασμού υπό την επίδραση χημειοθεραπευτικών παραγόντων, γ) Περισυλλογή δειγμάτων βιολογικών υγρών των κυτταρικών σειρών. Ως βάση θα χρησιμοποιηθούν τα αποτελέσματα των πειραμάτων με μικροσυστοιχίες, τα οποία θα δώσουν μια πρώτη θεωρητική εικόνα των μορίων που συμμετέχουν σε εξωκυττάριες οδούς

στα υπό μελέτη μοντέλα. Μεθοδολογικά το πρόβλημα αυτό θα προσεγγισθεί με ηλεκτροχημικές και φυσικοχημικές μεθόδους. Η κύρια υπόθεση που θα διερευνηθεί είναι ότι αλλαγές που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των νεοπλασιών, επιφέρουν αλλαγές στο μικροπεριβάλλον του, που πρέπει με τη σειρά τους να επιφέρουν αλλαγές στις φυσικοχημικές ιδιότητες του μικροπεριβάλλοντος. Μια από αυτές τις παραμέτρους που ενδέχεται να αλλάζει είναι η διηλεκτρική σταθερά των βιολογικών διαλυμάτων. Επίσης, αλλαγές πρέπει να παρατηρηθούν και σε άλλες παραμέτρους όπως η αγωγιμότητα, η διαφορά δυναμικού, η ηλεκτρική χωρητικότητα κ.α. Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών θα εξαχθούν συμπεράσματα για την ταυτοσημότητα των ευρημάτων από τους άξονες (α) και (β).

Η ωρίμανση τέτοιων προσεγγίσεων, δηλαδή ολιστικών προσεγγίσεων, ξεκίνησε από τις αρχές του 21^{ου} αιώνα και μάλιστα με δειλά βήματα. Σήμερα στην πρώτη δεκαετία αυτής της επιστημονικής ειδίκευσης τα βήματα έχουν γίνει πολύ μεγάλα. Ήδη τα πρώτα αποτελέσματα έχουν φανεί και μάλιστα στο επίπεδο της φαρμακευτικής βιομηχανίας όπου έχουν χρησιμοποιηθεί και συνεχίζουν να χρησιμοποιούνται ευρέως οι συστημικές θεωρήσεις για την ανακάλυψη φαρμάκων.

Θα πρέπει εδώ να σημειώσουμε ότι η παρούσα εργασία κινείται πιθανότατα στον αντίποδα της σημερινής τάσης. Δηλαδή, ενώ υπάρχει γενικότερα μια τάση προς την περίφημη προσωποποιημένη ιατρική, δηλαδή η παροχή αγωγής να συσχετίζεται με το προσωπικό προφίλ του ασθενούς, κάτι το οποίο εγείρει μια σειρά από ηθικά, δεοντολογικά και φιλοσοφικά ερωτήματα και προβλήματα, η παρούσα εργασία προσπαθεί να ταυτοποιήσει κοινές οδούς στις νεοπλασίες και ως εκ τούτου να βρει κοινές θεραπευτικές προσεγγίσεις στις νεοπλασίες του ΚΝΣ. Σ' αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν υπολογιστικά εργαλεία που δίνουν πρόσβαση σε μαζικό αριθμό δεδομένων και νέες μεθοδολογίες που επιτρέπουν την ανάλυση τέτοιων δεδομένων ώστε να μπορέσει κανείς να εξάγει συμπεράσματα από τη μαζικότητα και την πληθώρα των αποτελεσμάτων.

Συνοπτικά, παρουσιάζεται διαγραμματικά η λογική και ο τρόπος μελέτης της παρούσης εργασίας στο παρακάτω διάγραμμα.



Διάγραμμα 3. Συνοπτική και συγκεντρωτική παρουσίαση των πειραματικών διαδικασιών για τη μελέτη των νεοπλασιών του ΚΝΣ.

ΜΕΡΟΣ ΙΙ

ΥΛΙΚΟ- ΜΕΘΟΔΟΙ

"Out of confusion comes chaos.

Out of chaos comes confusion and fear…

…Then comes lunch."

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

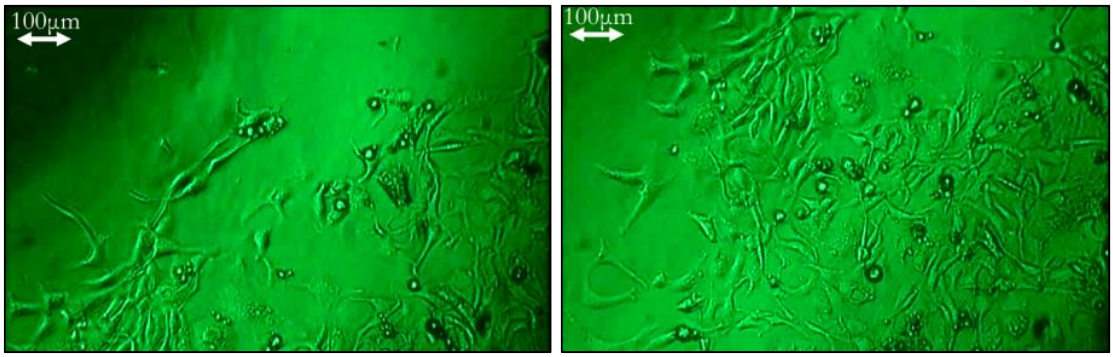
IN VITRO ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ: ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές από αθανατοποιημένα κύτταρα νεοπλασιών του ΚΝΣ. Πιο συγκεκριμένα οι σειρές αυτές ήταν οι: TE671, A172, 1321N1, DBTRG.05MG, SK-PN-DW, SH-SY-5Y, A673, IPTP98, RD και BE(2)M17. Επίσης συμπληρωματικά σε ορισμένα πειράματα πολλαπλασιασμού χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά CCRF-CEM (Τ-κυτταρική λευχαιμία). Όλες οι σειρές προέρχονται από τον οίκο European Collection of Cell Cultures (ECACC).

Η ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ TE671

Η κυτταρική σειρά TE671 είναι κύτταρα που έχουν ληφθεί από βιοψία μυελοβλαστώματος παρεγκεφαλίδος. Η αρχική σειρά που απομονώθηκε είχε θεωρηθεί ότι είναι μυελοβλαστωματικά κύτταρα (McAllister, Isaacs et al. 1977) αλλά μετά από κυτταρογενετικές μελέτες από τους *Stratton et al* (1989) και *Chen et al* (1989) δείχθηκε ότι ήταν κύτταρα ραβδομυοσαρκώματος (Chen, Dorotinsky et al. 1989; Stratton, Darling et al. 1989). Η σειρά αυτή έχει την ικανότητα σχηματισμού αποικιών σε καλλιέργεια μαλακού άγαρ. Έχει επίσης ενεργούς νικοτινικούς ακετυλοχολινικούς υποδοχείς (Syapin, Salvaterra et al. 1982). Ενδιαφέρον επίσης είναι το εύρημα ότι τα κύτταρα αυτά έχουν ένα ενεργό αντίγραφο του γονιδίου NRAS (Stratton, Darling et al. 1989).

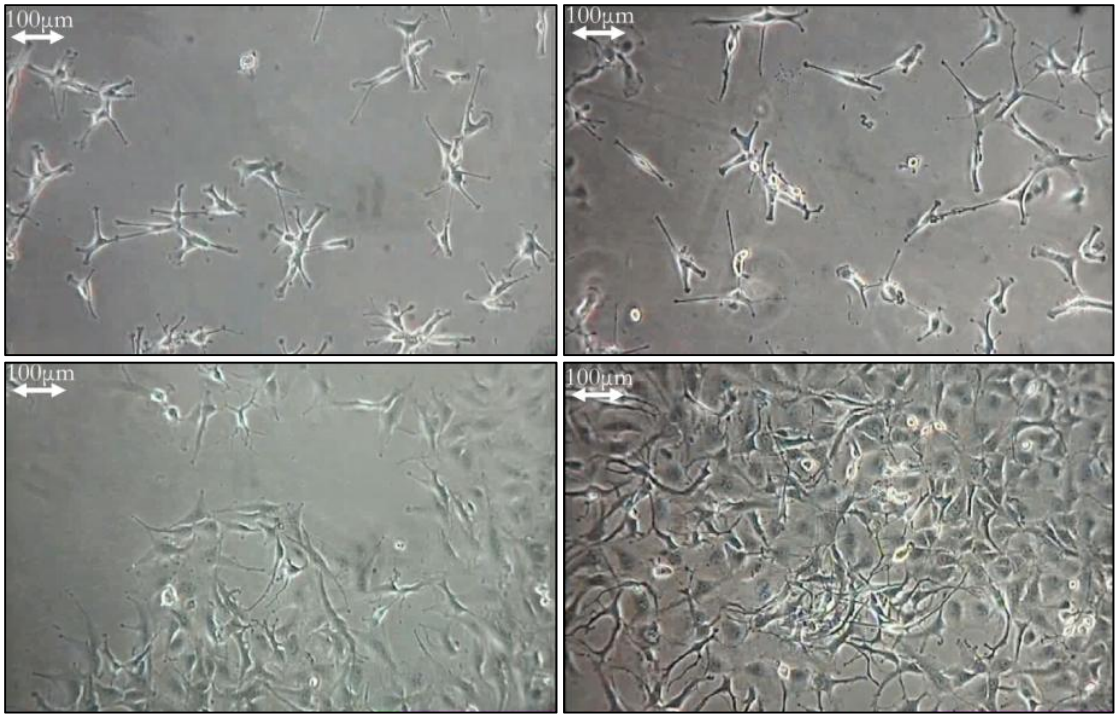
Η μορφολογία τους από τις πειραματικές διατάξεις της παρούσης μελέτης παρουσιάζεται στην **Εικόνα 42**.



Εικόνα 42. Μικροσκοπική λήψη των κυττάρων TE671. Η λήψη έγινε με ανάστροφο μικροσκόπιο, φίλτρο πολωμένου φωτός και αντιστροφή φάσης (μεγέθυνση ×100).

Η ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ A172

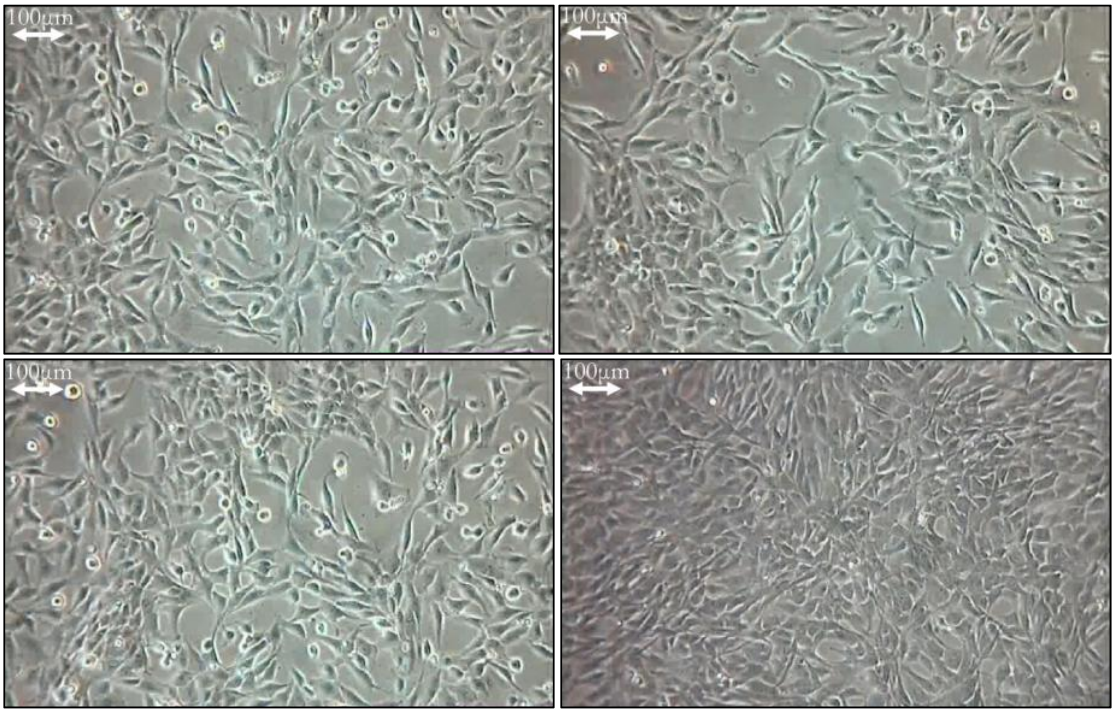
Η κυτταρική σειρά A172 είναι κύτταρα γλοιοβλαστώματος. Έχει φυσιολογικό αριθμό χρωμοσωμάτων (46XY), αλλά η κυτταρική σειρά αυτή έχει απολέσει το γονίδιο IFN καθώς και ενδεχομένως τα γονίδια, IFNAI, IFNA8, IFNW2 και IFNW19 (Olopade, Jenkins et al. 1992). Σχηματίζουν αποικίες σε καλλιέργεια μαλακού άγαρ αλλά δεν είναι ογκογενετικά σε *in vivo* ενοφθαλμισμό σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια. Στην **Εικόνα 43**, παρουσιάζεται η μορφολογία τους από ενδεικτική πειραματική διάταξη της παρούσης μελέτης.



Εικόνα 43. Μικροσκοπική φωτογράφηση των κυττάρων A172. Η λήψη έγινε με ανάστροφο μικροσκόπιο και αντιστροφή φάσης σε πλάκα 96 πηγαδιών (μεγέθυνση ×100).

Η ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ 1321N1

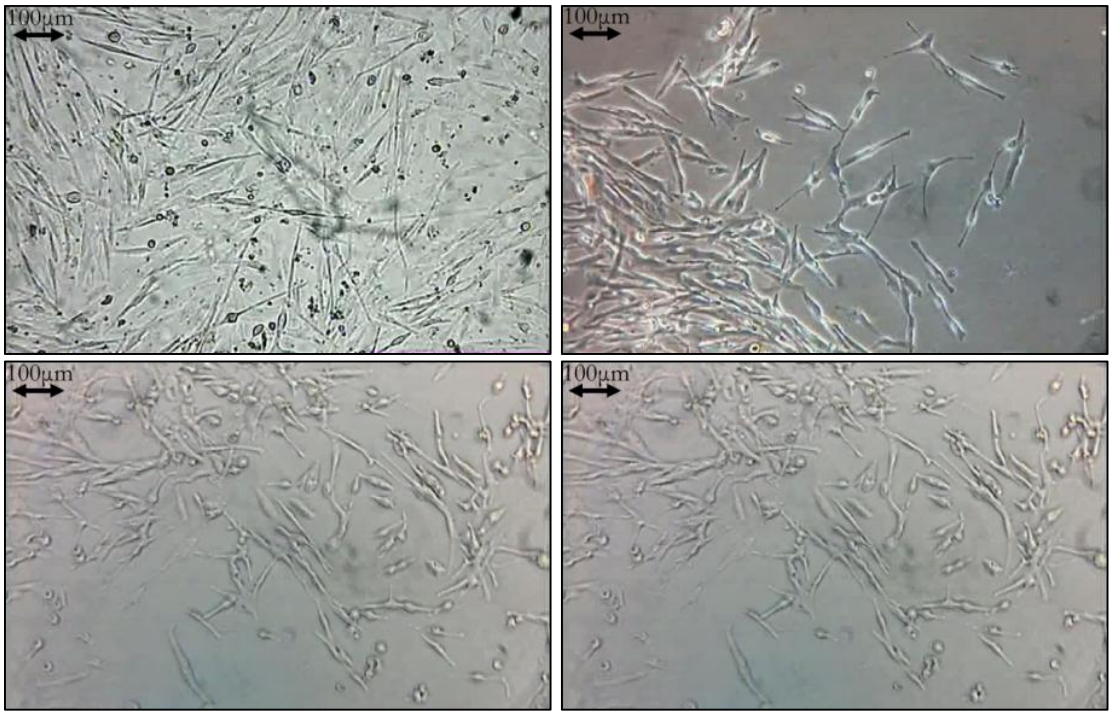
Η κυτταρική σειρά 1321N1 είναι κύτταρα αστροκυττώματος. Η σειρά αυτή εκφράζει μεταλλαγμένη πρωτεΐνη TP53 καθώς και το ογκογονίδιο CMYC (Showe, Ballantine et al. 1985; Bhatia, Goldschmidts et al. 1993). Επίσης έχει μια μετάθεση την t(8;14) καθώς και έχει πολύ υψηλά επίπεδα έκφρασης του πρώτου εξονίου του γονιδίου CMYC (Croce, Erikson et al. 1984). Είναι ογκογενετική σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια και κάνει αποικίες σε μαλακό άγαρ. Η κυτταρική σειρά αυτή έχει χρησιμοποιηθεί σε μελέτες της έκφρασης και μετάθεσης του γονιδίου CMYC. Στην **Εικόνα 44**, παρουσιάζεται η μορφολογία των κυττάρων από ενδεικτικές πειραματικές διατάξεις της παρούσης μελέτης.



Εικόνα 44. Μορφολογία των κυττάρων 1321N1. Η λήψη έγινε με ανάστροφο μικροσκόπιο και αντιστροφή φάσης (μεγέθυνση ×100).

Η ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ DBTRG.05MG

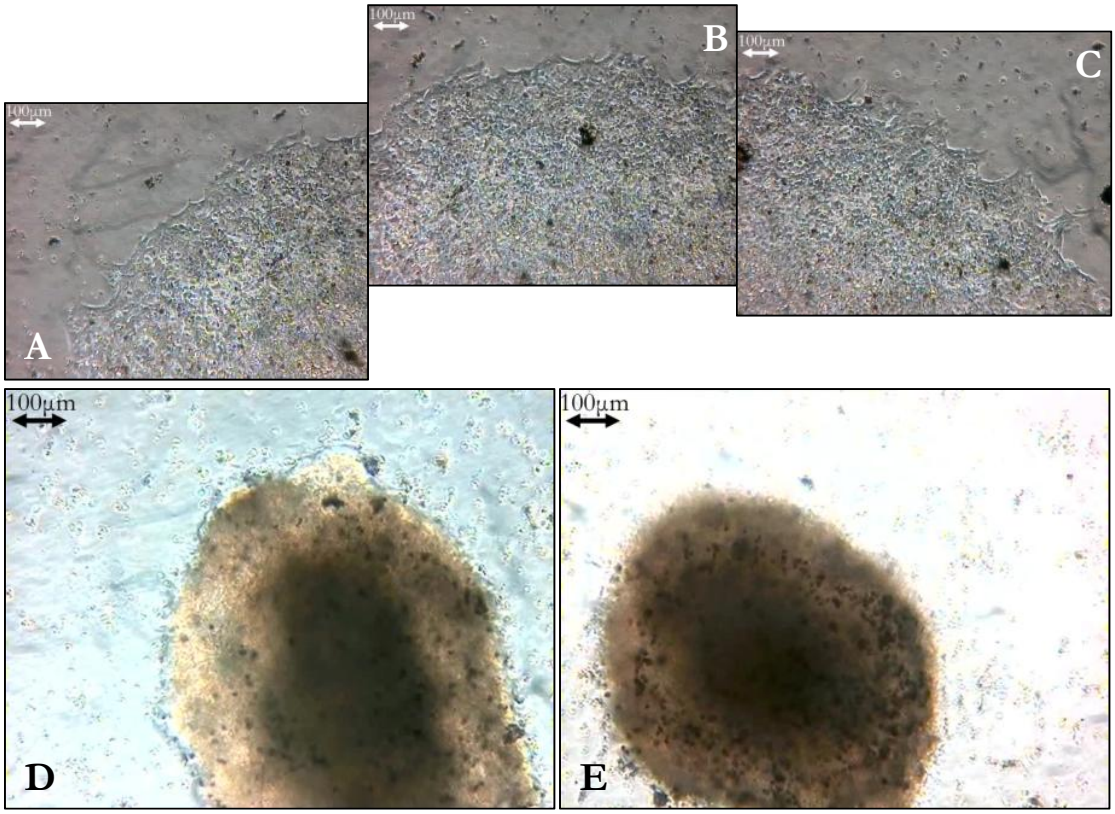
Η κυτταρική σειρά DBTRG.05MG, είναι μια σειρά γλοιοβλαστώματος. Έχει ληφθεί από μια γυναίκα η οποία είχε διαγνωσθεί με *glioblastoma multiforme* και είχε λάβει τοπική ραδιοθεραπεία και ευρύ σχήμα χημειοθεραπείας. Τα κύτταρα αυτά είχαν ευρεθεί ότι είναι θετικά κατά 100% στον παράγοντα MHC Class I. Ο καρυότυπος είναι υπο-τετραπλοειδικός με 87-91 χρωμοσώματα καθώς επίσης εκφράζει τον υποδοχέα EGFR. Έχει επίσης φανεί ότι δεν εκφράζει τον παράγοντα PDGF, δεν εκφράζει τον παράγοντα GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) και τον παράγοντα NCAM (*neuronal cell adhesion molecule*) (Kruse, Mitchell et al. 1992). Στην **Εικόνα 45**, παρουσιάζεται η μορφολογία των κυττάρων αυτών από ενδεικτικές πειραματικές διατάξεις της παρούσης εργασίας.



Εικόνα 45. Η μορφολογία των κυττάρων DBTRG.05MG. Η λήψη έγινε με ανάστροφο μικροσκόπιο και αντιστροφή φάσης (μεγέθυνση ×100).

Η ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ SK-PN-DW

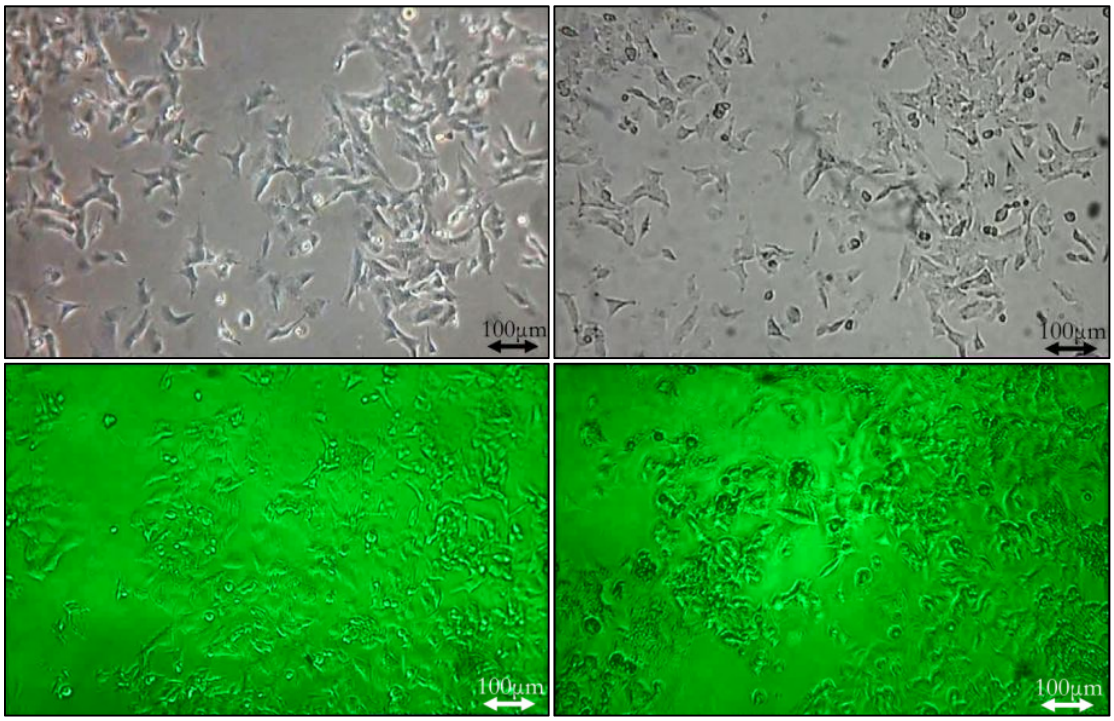
Η σειρά SK-PN-DW, είναι μια σειρά αρχέγονου νευροεκτοδερμικού όγκου (primitive neuroectodermal tumor PNET). Τα κύτταρα αυτά εκφράζουν *cholecystokinin* (CCK) καθώς εκφράζουν σημαντικά επίπεδα της pro-CCK. Η SK-PN-DW έχει τη δυνατότητα να μεταβολίζει την προ-ορμόνη της *cholecystokinin* (Schneider, Helson et al. 1989). Τα κύτταρα αυτά είναι επικολλώμενα, αλλά πολλές φορές έχουν την τάση να ανεβαίνουν στο υπερκείμενο εναιώρημα κάνοντας δύσκολη πολλές φορές τη δειγματοληψία. Στη μορφή του εναιωρήματος τα κύτταρα αυτά έχουν την ιδιότητα να σχηματίζουν συσσωματώματα, τόσο μεγάλα που πολλές φορές είναι ορατά με το γυμνό μάτι. Έχει καρυότυπο υποτετραπλοειδή 82XXY, με τρισωμία XXY. Εκφράζει αντιγόνα παρόμοια με το μελάνωμα, το νευροβλάστωμα και τον ανθρώπινο εμβρυϊκό εγκέφαλο (Helson, Weinberger et al. 1984). Στην **Εικόνα 46**, παρουσιάζεται η μορφολογία των κυττάρων αυτών από ενδεικτικές πειραματικές διατάξεις της παρούσης εργασίας.



Εικόνα 46. Παρουσιάζεται η μορφολογία των κυττάρων SK-PN-DW σε επικολλώμενη κατάσταση (**A**-**C**) και σε κατάσταση εναιωρήματος (**D**, **E**). Τα κύτταρα αυτά και στους δύο σχηματισμούς δημιουργούν συσσωματώματα. Ως επί το πλείστον έχουν την ιδιότητα να αυξάνονται σε εναιώρημα. Η λήψη έγινε με ανάστροφο μικροσκόπιο και αντιστροφή φάσης (μεγέθυνση ×100). Οι εικόνες **A**-**C** αποτελούν επικόλληση συνεχόμενων λήψεων βίντεο συνολικού μήκους 3mm.

Η ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ BE(2)M17

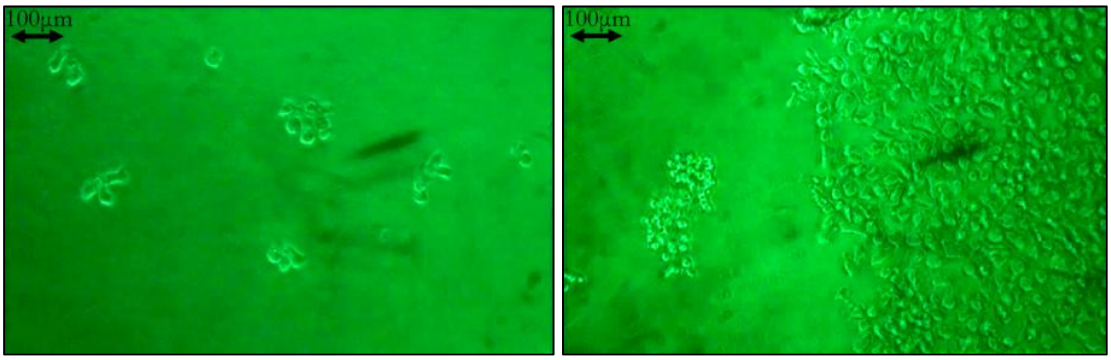
Η κυτταρική σειρά BE(2)M17 είναι σειρά νευροβλαστώματος. Είναι θυγατρική σειρά της SK-N-BE(2). Τα κύτταρα αυτά έχουν τη δυνατότητα να μεγαλώνουν σε πολλαπλά επίπεδα, σχηματίζοντας συσσωματώματα και περνάν στο υπερκείμενο της καλλιέργειας, όπου συνεχίζουν να αυξάνονται. Τα κύτταρα αυτά έχουν ιδιότητες νευρο-αδρενεργικών νευρώνων καθώς και παρουσιάζουν έκφραση και λειτουργία των ενζύμων tyrosine hydroxylase και dopamine beta hydroxylase (Ciccarone, Spengler et al. 1989). Επίσης έχει δειχθεί ότι έχουν υποδοχείς νορεπινεφρίνης την οποία και μπορούν να προσλαμβάνουν. Επίσης εκφράζουν τα μόρια *enolase* και *vimentin* (Hanada, Krajewski et al. 1993). Τέλος, είναι ογκογενετικά σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια και σχηματίζουν αποικίες σε καλλιέργεια μαλακού άγαρ. Στην **Εικόνα 47**, παρουσιάζεται η μορφολογία των κυττάρων αυτών από ενδεικτικές πειραματικές διατάξεις της παρούσης εργασίας.



Εικόνα 47. Η μορφολογία των κυττάρων BE(2)M17. Η λήψη έγινε με ανάστροφο μικροσκόπιο και αντιστροφή φάσης και φίλτρο πολωμένου φωτός (μεγέθυνση ×100).

Η ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ CCRF-CEM

Η κυτταρική σειρά (CCRF-CEM) εκφράζει τα αντιγόνα $CD4^+$ (Miranda, Wolf et al. 1996) και $CD34^+$ (Naujokat, Sezer et al. 2000). Αρχικά είχε απομονωθεί από ένα καυκάσιο κορίτσι δύο ετών με καρυότυπο 46, XX. Η αρχική διάγνωση ήταν λεμφοσάρκωμα, το οποίο εξελίχθηκε αργότερα σε οξεία λευχαιμία (Foley, Lazarus et al. 1965). Η λήψη των κυττάρων και η μετέπειτα κατεργασία, έγινε μετά τη χορήγηση των θεραπευτικών σχημάτων (Foley, Lazarus et al. 1965). Σε μελέτες που έγιναν στην κυτταρική αυτή σειρά έδειξαν ότι η παρατεταμένη καλλιέργειά τους επέφερε μικρές αλλαγές στη μορφολογία και φαινότυπο με εξαίρεση την εμφάνιση μικρών σωματίων στον πυρηνίσκο (Uzman, Foley et al. 1966). Επίσης η CCRF-CEM έχει φανεί να παρουσιάζει δραστηριότητα έκκρισης καταλάσης, κάτι το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι χρησιμοποιείται μηχανισμός αυτοκρινούς σηματοδότησης με συμμετοχή στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Sandstrom and Buttke 1993). Στην **Εικόνα 48**, παρουσιάζεται η μορφολογία των κυττάρων αυτών από ενδεικτικές πειραματικές διατάξεις της παρούσης εργασίας.



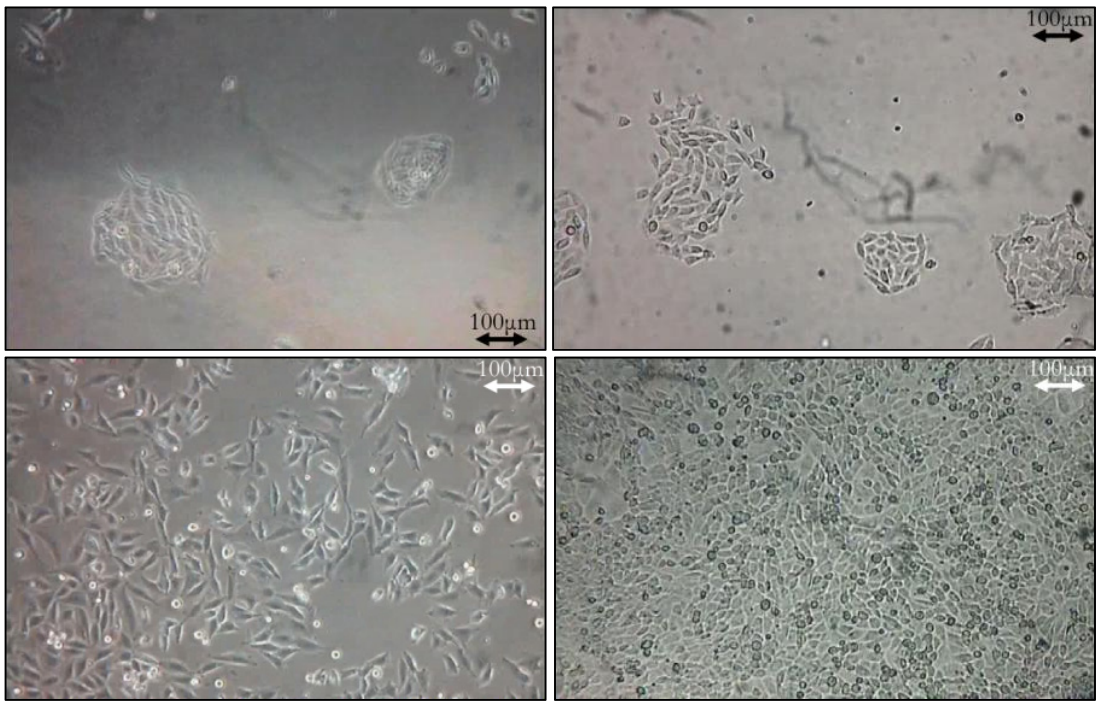
Εικόνα 48. Η μορφολογία των κυττάρων CCRF-CEM. Η λήψη έγινε με ανάστροφο μικροσκόπιο και αντιστροφή φάσης και φίλτρο πολωμένου φωτός (μεγέθυνση ×100).

Η ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ A673

Η κυτταρική σειρά A673 είχε ληφθεί από βιοψία ραβδομυοσαρκώματος από νεαρό κορίτσι 15 ετών (Giard, Aaronson et al. 1973). Τα κύτταρα αυτά είχαν ληφθεί από την εστία του νεοπλάσματος στους μυς. Είναι επικολλούμενα κύτταρα και παρουσιάζουν μορφολογία ινοβλαστών. Η κυτταρική σειρά αυτή συνθέτει και εκκρίνει τον παράγοντα IGFBP2 καθώς επίσης εκκρίνει και τον παράγοντα TGFb, πολύ σημαντικό για την ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων κατά τα στάδια οντογένεσης των νεοπλασμάτων (McCune, Patterson et al. 1993). Το ραβδομυοσάρκωμα, όπως και το νευροβλάστωμα ανήκουν στην κατηγορία των κυκλικών μικροκυτταρικών όγκων πολλές φορές με παρόμοιες ιδιότητες στις δομές ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού. Επίσης είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι τα κύτταρα αυτά έχουν χαρακτηρισθεί ως κύτταρα περιφερειακού νευροεπιθηλιώματος παρά το γεγονός ότι αρχικά είχαν αναφερθεί ως ραβδομυοσαρκωματικά κύτταρα (Stam, Stewart et al. 1995). Ακόμα πιο ενδιαφέρον όμως είναι το γεγονός ότι η σειρά αυτή παράγει κυτοκίνες που αποτελούν αναστολείς της κυτταρικής αύξησης και ως εκ τούτου αυτό σημαίνει ότι έχουν αυτοκρινή δράση που προωθεί τον πολλαπλασιασμό τους όταν η δράση αυτή αναστέλλει την ανάπτυξη άλλων κυτταρικών τύπων (Stam, Stewart et al. 1995; Martinez-Ramirez, Rodriguez-Perales et al. 2003).

Η ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ IPTP98 (RAT)

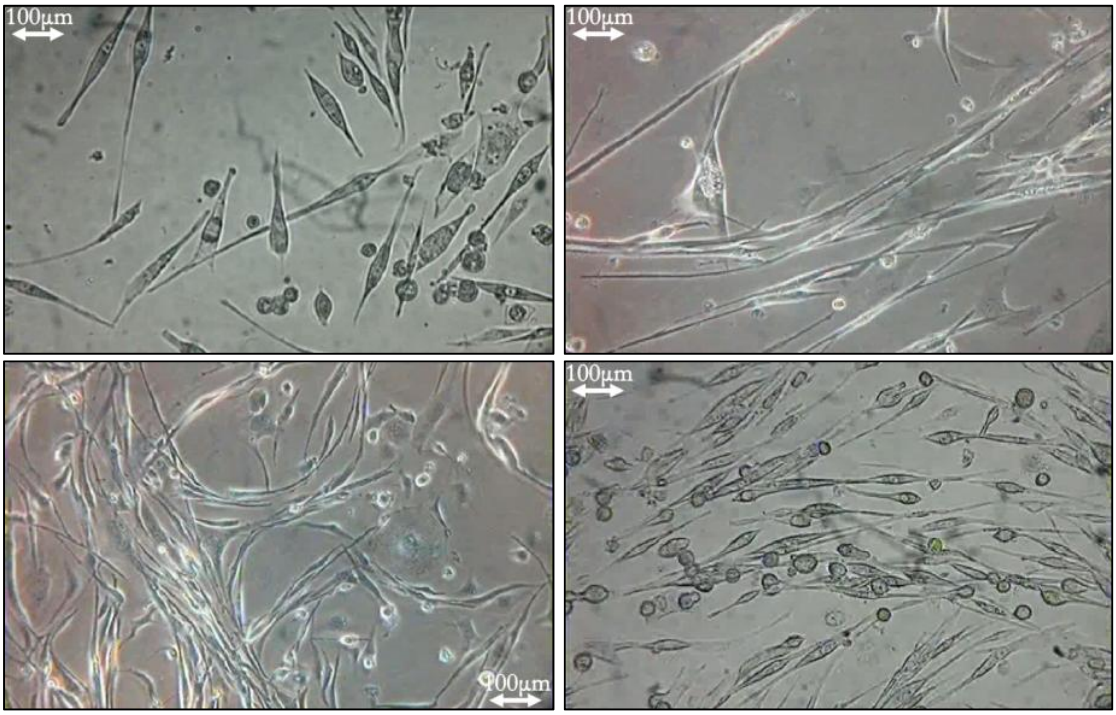
Η κυτταρική σειρά αυτή είχε αρχικά χαρακτηρισθεί ως κύτταρα ανθρώπινου γλιοβλαστώματος. Από μελέτες ισοενζύμων όμως απεδείχθη ότι ήταν κύτταρα αρουραίου χωρίς να είναι δυνατή η περαιτέρω ταυτοποίησή τους. Το πρόβλημα αυτό έχει προκύψει με πάρα πολλές κυτταρικές σειρές και μάλιστα κάποια στιγμή είχε τραβήξει και την προσοχή των MME με βάση το γεγονός ότι πολλά από τα πειράματα που έχουν γίνει ήταν σπατάλη χρόνου και πόρων (Higgins, Steingrimsdottir et al. 2010). Ενδεικτικά παρουσιάζουμε μικροσκοπικές λήψεις των κυττάρων αυτών από πειράματα ελέγχου (**Εικόνα 49**). Τα κύτταρα αυτά ελήφθησαν από την ECACC (UK) με βάση την αρχική τους περιγραφή ήτοι κύτταρα γλιοβλαστώματος. Η σειρά αυτή δεν χρησιμοποιήθηκε περαιτέρω σε άλλες πειραματικές διατάξεις.



Εικόνα 49. Η μορφολογία των κυττάρων IPTP/98 (αρουραίος). Η λήψη έγινε με ανάστροφο μικροσκόπιο και αντιστροφή φάσης και φίλτρο πολωμένου φωτός (μεγέθυνση ×100).

Η ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ RD

Τα κύτταρα αυτά είναι κύτταρα ραβδομυοσαρκώματος και έχουν ληφθεί από κοριτσάκι επτά ετών από την περιοχή της λεκάνης. Είναι εμβρυϊκής προέλευσης και η συνολική ονομασία των κυττάρων είναι εμβρυϊκό ραβδομυοσάρκωμα (McAllister, Melnyk et al. 1969). Παράγει το ένζυμο G6PD και είναι επικολλούμενα κύτταρα. Έχουν ατρακτοειδή μορφολογία καθώς και σχηματίζουν μεγάλα κύτταρα με πολλαπλούς πυρήνες. Έχει επίσης αναφερθεί ότι τα κύτταρα αυτά είναι όμοια προς τα TE671 κύτταρα αλλά υπάρχει μεγάλη συζήτηση ως προς αυτό. Ένα εύρημα μας δείχνει ότι από μορφολογικής άποψης οι δύο σειρές είναι διαφορετικές και έδειξαν να έχουν διαφορετικά αποτελέσματα στην πολλαπλασιαστική δυναμική τους. Στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 50**) παρουσιάζεται η μορφολογία των κυττάρων RD.



Εικόνα 50. Η μορφολογία των κυττάρων RD. Η λήψη έγινε με ανάστροφο μικροσκόπιο και αντιστροφή φάσης και φίλτρο πολωμένου φωτός (μεγέθυνση ×100).

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ *IN VITRO* ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Η καλλιέργεια κυττάρων σε *in vitro* συνθήκες απαιτεί τη χρήση υλικών που προσομοιάζουν το περιβάλλον των κυττάρων *in vivo*. Το βασικότερο θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται είναι το ανόργανο υπόστρωμα, αποτελούμενο από ρυθμιστικά διαλύματα, ανόργανα άλατα και νερό. Το ανόργανο υπόστρωμα των καλλιεργητικών υλικών αποτελείται από: ανόργανα άλατα, υδατάνθρακες, αμινοξέα, βιταμίνες, λιπίδια και πρωτεΐνες/πεπτίδια. Στα υγρά καλλιέργειας ανήκει και ο *εμβρυϊκός ορός (Fetal Serum)* ο οποίος αποτελεί ίσως το βασικότερο συστατικό των κυτταροκαλλιεργειών. Οι εμβρυϊκοί οροί μπορεί να προέρχονται από διαφορετικά είδη ζώων όπως βους (FBS), χοίρος (FPS) ή άλογο (FHS).

Βασικό συστατικό των υγρών καλλιέργειας είναι η δυνατότητα να ρυθμίζουν το pH του συστήματος. Τα όρια που απαιτούνται για το pH είναι πολύ στενά και βρίσκονται μεταξύ pH 7.2 και 7.4. Στη ρύθμιση του pH συμμετέχουν δύο μηχανισμοί: η συγκέντρωση CO_2 που είναι ένας εξωγενής παράγοντας ο οποίος παρέχεται από τον κλίβανο καλλιέργειας (συνήθως στα επίπεδα του 5%) και ενδογενής παράγοντας που ρυθμίζεται από χημικά στο καλλιεργητικό υπόστρωμα όπως είναι το *HEPES* ($C_8H_{18}N_2O_4S$) [*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid*, **CAS Nr**. 7365-45-9].

Οι υδατάνθρακες αποτελούν την κυριότερη μορφή τροφής για τα κύτταρα. Οι δύο βασικότεροι υδατάνθρακες είναι τα σάκχαρα και πιο συγκεκριμένα η γλυκόζη (*glucose*) και η γαλακτόζη (*galactose*), ενώ πολλά καλλιεργητικά υλικά περιέχουν μαλτόζη (*maltose*) ή φρουκτόζη (*fructose*).

Δύο ακόμη βασικά συστατικά του κυτταρικού περιβάλλοντος είναι η γλουταμίνη (*L-Glutamine*) και οι αντιμικροβιακές προληπτικές προσθήκες. Για την αντι-βακτηριδιακή προστασία και την αντι-μυκητησιακή προστασία χρησιμοποιήθηκαν η καναμυκίνη (*kanamycin*), η στρεπτομυκίνη και η πενικιλλίνη (*streptomycin/penicillin*) για τα βακτήρια και η αμφοτερικίνη (*amphotericin*) για τους μύκητες.

Έτσι τα κύτταρα αναπτύχθηκαν, σύμφωνα με τις προδιαγραφές ως εξής: Οι κυτταρικές σειρές TE671, A172, 1321N1 και SK-PN-DW αναπτύχθηκαν σε μέσο DMEM (Gibco, Invitrogen Inc.), που αποτελεί το ανόργανο υπόστρωμα, ενισχυμένο με 2mM-Glutamine, Streptomycin 100μg/ml και Penicillin 100 U/ml (Gibco), 10% FBS (Gibco) στους 37 ^oC, 5% CO_2 και 100% υγρασία. Ειδικά για την κυτταρική σειρά SK-PN-DW, προστέθηκε στο μίγμα 1% κ.ο. διάλυμα μη-απαραίτητων αμινοξέων (non-essential amino acids) (Gibco, Invitrogen Inc.). Τα κύτταρα SH-SY-5Y και BE(2)M17 αναπτύχθηκαν σε μίγμα υποστρωμάτων EMEM και F12 σε αναλογία 1:1 ενισχυμένο με 2mM-Glutamine, Streptomycin 100μg/ml και Penicillin 100 U/ml (Gibco), 10% FBS (Gibco) στους 37 ^oC, 5% CO_2 και 100% υγρασία, με προσθήκη 1% κ.ο. διάλυμα μη-απαραίτητων αμινοξέων (non-essential amino acids) (Gibco, Invitrogen Inc.). Τα κύτταρα DBTRG.05MG και CCRF-CEM M17 αναπτύχθηκαν σε υλικό RPMI-1640, ενισχυμένο με 2mM-Glutamine, Streptomycin 100μg/ml και Penicillin 100 U/ml (Gibco), 10% FBS (Gibco) στους 37

^{o}C, 5% CO_2 και 100% υγρασία. Ειδικά για τη σειρά DBTRG.05MG χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 1% κ.ο. διάλυμα μη-απαραίτητων αμινοξέων (non-essential amino acids) (Gibco, Invitrogen Inc.) καθώς και διάλυμα HT supplement (αρχική συγκέντρωση 100x HT) σε τελική συγκέντρωση 1% κ.ο. Το συμπλήρωμα αυτό είναι ένα μίγμα υποξανθινικού νατρίου (*sodium hypoxanthine*) και θυμιδίνης (*thymidine*). Το συμπλήρωμα αυτό δίνει τις πρώτες ύλες, ήτοι τις απαραίτητες πουρίνες και πυριμιδίνες, για τη σύνθεση νουκλεοτιδίων, όταν τα κύτταρα τα ίδια δεν μπορούν να ξεκινήσουν *de novo* τη σύνθεση των νουκλεοτιδίων που χρειάζονται. Για τις πειραματικές ανάγκες όλα τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 6, 12, 24 και 96 πηγαδιών καθώς και φλάσκες επιφάνειας 25cm^2 και 75cm^2. Γίνονταν ανανέωση του μέσου καλλιέργειας ανά 3 μέρες, ή σε κάθε άλλη περίπτωση η ανανέωση εξαρτάτο από τις απαιτήσεις της πειραματικής διαδικασίας. Τα κύτταρα αφήνονταν να μεγαλώσουν από την αρχική συγκέντρωση των ~500 × 10^{3}cells/ul, για τα πειράματα συλλογής δείγματος για εκχύλιση και από χαμηλότερους πληθυσμούς για τα πειράματα πολλαπλασιαστικής δυναμικής. Στην ενότητα των μεθόδων της πολλαπλασιαστικής δυναμικής θα περιγράψουμε με ακρίβεια τους αρχικούς αριθμούς των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πείραμα. Σε μερικές περιπτώσεις τα κύτταρα αφέθηκαν να αναπτυχθούν από μεγάλους αρχικούς αριθμούς με σκοπό να γίνουν πειράματα μελέτης της επίδρασης του υπερπληθυσμού. Στα Παραρτήματα Ι και ΙΙ αναφέρονται συγκεντρωτικά όλα τα χημικά καθώς και το πρωτόκολλο καλλιέργειας των κυττάρων.

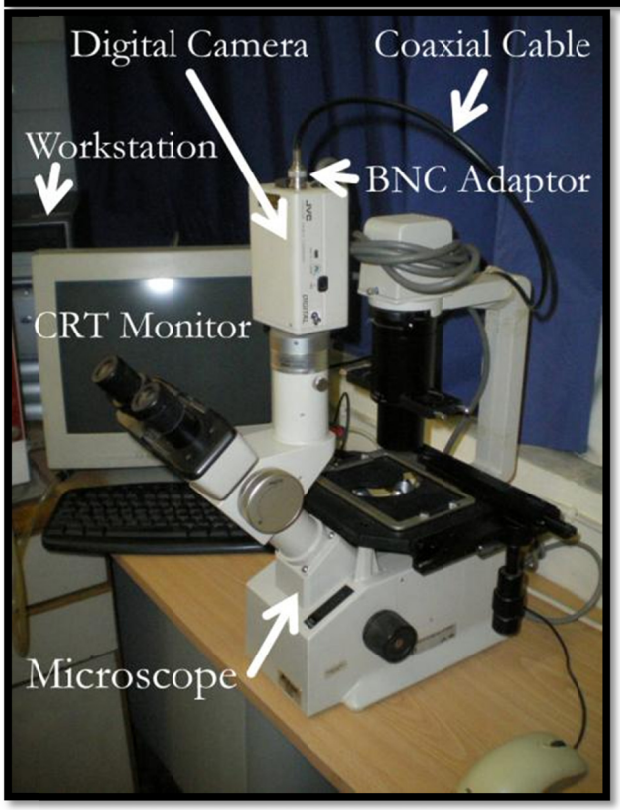
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΜΕΤΡΙΑ

Εφόσον τα κυτταρικά συστήματα ήταν επικολλώμενα, ή τουλάχιστον τα περισσότερα από αυτά απαιτείτο η μικροσκοπική παρακολούθησή τους και επίσης η καταγραφή τους κατά τις φάσεις της καλλιέργειας. Για το σκοπό αυτό χρειαζόταν ένα σύστημα μικροσκοπίας όχι μόνο για την παρατήρηση αλλά και για τη λήψη εικόνας ή βίντεο κατά τη διάρκεια των πειραματικών διατάξεων. Για τις ανάγκες τις παρούσης εργασίας κατασκευάσαμε ένα τέτοιο σύστημα και το συνδέσαμε με υπολογιστική μονάδα ώστε να είναι δυνατή η λήψη εικόνων. Το σύστημα μας αυτό αποτελείτο από το μικροσκόπιο, ένα *Nikon* TMS ανάστροφης φάσης που διέθετε και πυκνωτή και τρεις φακούς 10×, 20× και 40×, μια κάμερα CCTV τύπου *JVC* Digital Camera TK-421C-EG, μια υπολογιστική μονάδα HP με επεξεργαστή Intel Celleron και 256MB μνήμης RAM. Η σύνδεση μεταξύ της κάμερας και του υπολογιστή επετεύχθη με τη χρήση μιας κάρτας τηλεόρασης τύπου WinTV PVR-250 του οίκου *Hauppauge* Γαλλίας. Η σύνδεση έγινε με καλώδιο ομοαξονικό προσαρμογέων τύπου BNC και προσαρμογέα τύπου composite για τη σύνδεση με την κάρτα εικόνας. Η διάταξη της συνδεσμολογίας παρουσιάζεται στις παρακάτω εικόνες. Στο Παράρτημα V παρουσιάζονται αναλυτικά τα τεχνικά χαρακτηριστικά του συναρμολογημένου συστήματος για τις ανάγκες της παρούσης εργασίας.

Στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 51**) φαίνεται η διάταξη του συστήματος και η συνδεσμολογία.

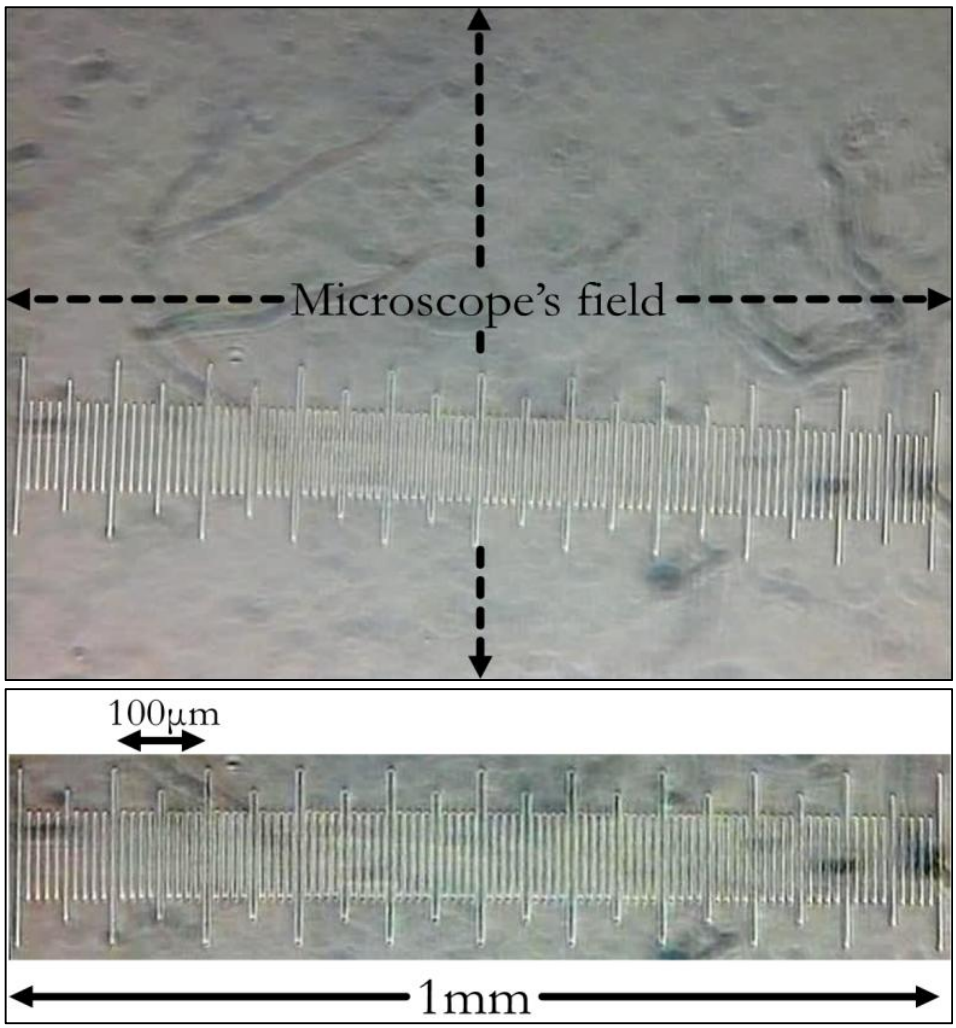
Κατά την παρακολούθηση των κυττάρων μικροσκοπικά, χρησιμοποιήθηκε και η τεχνική της χρώσης των κυττάρων με τη χρωστική Giemsa με σκοπό την ανεύρεση περαιτέρω μορφολογικών χαρακτηριστικών ιδιαίτερα κατά τις τελευταίες φάσεις μιας πειραματικής διαδικασίας. Η ακριβής διαδικασία χρώσης των κυττάρων με Giemsa περιγράφεται στο Παράρτημα ΙΙ.



Εικόνα 51. Πανοραμική διάταξη του συστήματος μικροσκοπίας και ανάλυσης εικόνας (**A**) και επεξηγηματική παρουσίαση (**B**).

Εικόνα 51 (συνέχεια). Το σύστημα μικροσκοπίας και ανάλυσης εικόνας σε λειτουργία.

Για τις ανάγκες της παρούσης μελέτης έγινε προσπάθεια για τη μέτρηση των κυττάρων τουλάχιστον στο βαθμό του εφικτού, χρησιμοποιώντας μικρόμετρο μικροσκοπίας (**Εικόνα 52**). Το μικρόμετρο αυτό βρίσκεται σε μορφή αντικειμενοφόρου πλάκας και έχει χαραγμένο στο κέντρο της κλίμακα 1mm σε διαβάθμιση 0.01mm ήτοι 100μm. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για τη μέτρηση και τοποθέτηση των κυττάρων σε κλίμακα ήταν η εξής: Το μικροσκόπιο που χρησιμοποιήθηκε είχε εύρος πεδίο 1mm σε μεγέθυνση 100×. Έτσι, λήφθηκε πρώτα η εικόνα του μικρόμετρου και τροποποιήθηκε σε εικόνα διαστάσεων 20 × 24 (πλάτος × μήκος). Από την εικόνα που προέκυψε δημιουργήθηκαν δύο εικονικές κλίμακες , μια 1mm και μια 100μm, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 52**. Κατόπιν όσες μικροσκοπικές λήψεις γινόντουσαν τροποποιούντο ακριβώς στις ίδιες διαστάσεις ώστε να υπάρχει συγκρισιμότητα μεταξύ της εικόνας και της κλίμακας. Με τον τρόπο αυτό ήταν δυνατό να έχουμε μια ένδειξη του κυτταρικού μεγέθους κατά τις πειραματικές διατάξεις, κάτι που ήταν ιδιαίτερα χρήσιμο στην περίπτωση της εφαρμογής των αναστολέων.



Εικόνα 52. Μικρόμετρο Nikon τύπου MBM 11100 (stage micrometer type A), συνολικού μήκους 1mm και διαβάθμιση 0.01mm (=100μm). Παρουσιάζονται, το συνολικό οπτικό πεδίο του μικροσκοπίου σε μεγέθυνση ×100 συμπεριλαμβανομένης της κλίμακας (**A**) και η κλίμακα με διόρθωση γωνίας 1ο μοίρας (**B**).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11

EX VIVO ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Η παρούσα εργασία περιελάμβανε τη δειγματοληψία βιοψιών από όγκους του ΚΝΣ. Τα δείγματα αφορούσαν σε τομές από χειρουργικές επεμβάσεις σε όγκους του ΚΝΣ, των οποίων η λήψη έγινε στη νευροχειρουργική κλινική του Νοσοκομείου Παίδων «Αγία Σοφία». Συνήθως η μάζα της βιοψίας που χρησιμοποιούσαμε ήταν της τάξεως των 2-5mm^3.

Μετά τη λήψη της βιοψίας ακολουθούσαμε δύο διαδικασίες: Η πρώτη περιλάμβανε τη φύλαξη των δειγμάτων σε διάλυμα RNAlater και την επώασή τους για μια νύχτα στους +4^oC και κατόπιν τούτου στους -20^oC μέχρι την τελική επεξεργασία τους, ήτοι την εκχύλιση RNA. Η δεύτερη διαδικασία, περιελάμβανε την τοποθέτηση του δείγματος σε διάλυμα Trizol και την άμεση ομογενοποίησή του με μηχανικό ομογενοποιητή (με μηχανισμό λεπιδιών). Όλα τα δείγματα, τελικά υπέστησαν επεξεργασία με Trizol για την τελική εκχύλιση νουκλεοτιδίων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12

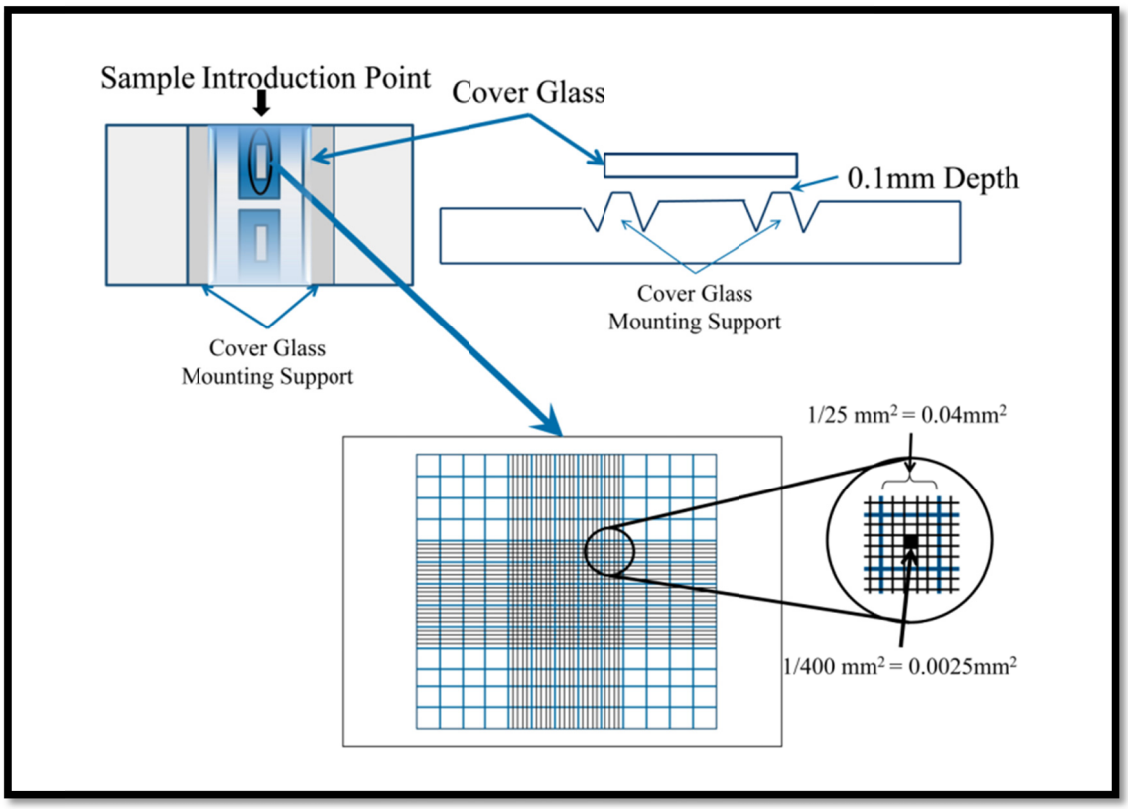
ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ Ι: ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΑΡΧΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ

Για τη μέτρηση κυτταρικών πληθυσμών τόσο επικολλώμενων όσο και σε εναιώρημα, υπάρχουν τρεις επικρατούσες μέθοδοι. Η πρώτη είναι μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με πλάκα *Neubauer*. Η δεύτερη μέθοδος είναι η μέτρηση πληθυσμών με τη μέθοδο *Coulter*. Η τρίτη μέθοδος αφορούσε στη χρήση χρωστικών για τη μέτρηση του πληθυσμού με φωταύγεια. Ειδικότερα, κύτταρα που επωάζονταν και αφήνονταν να μεγαλώσουν σε πλάκες (well-plates) με συγκεκριμένο αριθμό (π.χ. 6-well, 12-well, 24-well, 96-well) πηγαδιών περισυλλεγόντουσαν ανάλογα με την επακολουθούμενη μεθοδολογία και σκοπό και μετρούνταν με την ανάλογη μέθοδο.

ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΗΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΠΛΑΚΑ *NEUBAUER*

Η πρώτη μέθοδος χρησιμοποιεί τη μικροσκοπική θεώρηση των κυττάρων σε συνδυασμό με μια χρώση ώστε να κάνει τα κύτταρα εμφανή στο οπτικό φάσμα. Ταυτοχρόνως, μικρό εναιώρημα κυττάρων τοποθετείται σε ειδική μικροσκοπική πλάκα, γνωστή ως *Neubauer*, η οποία είναι βαθμονομημένη και ταξινομημένη όπως φαίνεται στην **Εικόνα 53**. Στην πρώτη μεγέθυνση η περιοχή που εμφανίζεται σκιασμένη και κατατετμημένη σε μικρότερα τετράγωνα είναι συνολικού εμβαδού $1mm^2$. Η πλάκα Neubauer έχει εννέα τέτοιες περιοχές, η κάθε μια με την ίδια κατάτμηση. Κάθε τετράγωνο διαστάσεων 1×1mm (=$1mm^2$) χωρίζεται περαιτέρω σε 16 μικρότερα τετράγωνα εμβαδού $0.0625mm^2$ το καθένα και αυτά με τη σειρά τους χωρίζονται σε 25 μικρότερες περιοχές των $0.0025mm^2$. Δεδομένου ότι η απόσταση της καλυπτρίδας από το σημείο εστίασης είναι 0.1mm, αντιστοιχούν σε όγκους $0.1mm^3$, $0.00625mm^3$ και $0.00025mm^3$ αντιστοίχως. Οι όγκοι αυτοί αντιστοιχούν σε 0.004ul και 0.00025ul. Η μέτρηση κυττάρων υπακούει και αυτή στους στατιστικούς νόμους και κατά συνέπεια πρέπει να μετρηθούν κύτταρα σε πολλαπλά τετράγωνα εμβαδού 0.0625 mm^2 της μικροσκοπικής πλάκας. Έτσι για παράδειγμα αν γίνει μέτρηση κυττάρων μικροσκοπικά και βρεθούν σε σύνολο πέντε τετραγώνων $0.0625mm^2$ 187 κύτταρα τότε η συγκέντρωση των κυττάρων θα είναι 187 κύτταρα σε 0.031/ul ήτοι 6.032 κύτταρα/ul. Κατά συνέπεια 6.032.000 κύτταρα/ml. Όπως προαναφέραμε η πλάκα έχει δύο περιοχές, όπως φαίνεται και στο παραπάνω διάγραμμα. Ο

λόγος για την ύπαρξη των δύο αυτών περιοχών είναι ώστε να πάρει ο ερευνητής δύο μετρήσεις και έτσι να μπορεί να αυξήσει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος. Ο τρόπος που γίνεται αυτό είναι παίρνοντας το μέσο όρο από τις δύο μετρήσεις και υπολογίζοντας αυτόν ως τον τελικό αριθμό κυττάρων. Η απόκλιση μεταξύ των δύο μετρήσεων δίνει τη στατιστική σημαντικότητα της μέτρησης του κυτταρικού αριθμού. Οι αριθμοί των κυττάρων μετρήθηκαν με πλάκα *Neubauer*, όπως περιγράφεται στο Παράρτημα ΙΙ.

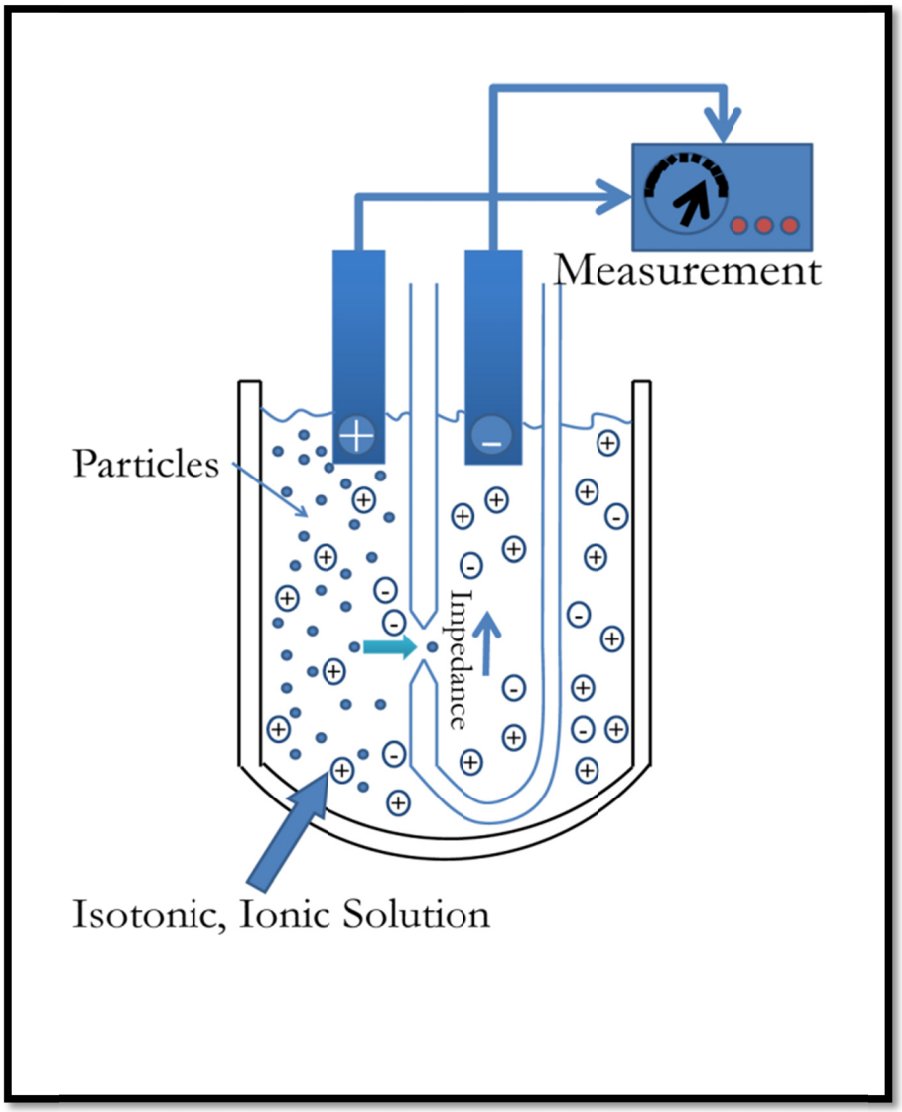


Εικόνα 53. Διάγραμμα της πλάκας *Neubauer*, με επιμέρους μεγεθύνσεις των σημείων όπου γίνεται η μέτρηση των κυττάρων. Η πλάκα *Neubauer* έχει εννέα τετράγωνα εμβαδού 1mm² όπως φαίνεται στην πρώτη μεγέθυνση. Τα τετράγωνα αυτά χωρίζονται περαιτέρω σε 16 μικρότερα τετράγωνα εμβαδού 0.0625 mm², τα οποία με τη σειρά τους χωρίζονται σε 25 μικρότερα τετράγωνα εμβαδού 0.0025 mm². Εφόσον η απόσταση μεταξύ καλυπτρίδας και εστιακού σημείου είναι 0.1mm τότε οι όγκοι που δημιουργούνται στο χώρο μεταξύ καλυπτρίδας και κυττάρων είναι 0.1mm³, 0.00625mm³ και 0.00025mm³ αντίστοιχα.

ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΗΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ *COULTER*

Η μέθοδος Coulter, αποτέλεσε μια επανάσταση στον τρόπο μέτρησης κυττάρων και σωματιδίων σε ένα διάλυμα. Η αναφορά γίνεται για τον *Wallace Coulter*, μηχανικό από τις Ηνωμένες Πολιτείες, ο οποίος στο υπόγειο του σπιτιού του, μαζί με τον αδερφό του *Joseph*, ανέπτυξε τη θεωρία για την αλλαγή σε ηλεκτρικό πεδίο λόγω της διέλευσης σωματιδίων από αυτό. Η αρχή και η πρώτη συσκευή αναπτύχθηκαν στα έτη 1947-49. Ειδικά στον τομέα της αιματολογίας η ανακάλυψη αυτή αποτέλεσε σημείο αναφοράς (Coulter 1956). Ο λόγος ήταν ότι μέχρι τότε η μέτρηση κυττάρων γινόταν οπτικά με τη βοήθεια μικροσκοπίου, π.χ. με τη χρήση πλάκας *Neubauer*, και χρειαζόταν περίπου μισή ώρα για μια τέτοια μέτρηση, όταν ο πρώτος αναλυτής έκανε το ίδιο σε λιγότερο από δέκα λεπτά. Η βασική ιδέα ήταν ότι όταν ένα σωμάτιο περάσει μέσα από ένα ηλεκτρικό πεδίο τότε η εμπέδηση (*Z*) αλλάζει και μάλιστα κατά τέτοιο τρόπο που είναι ανάλογη του μεγέθους του σωματίου. Η αρχή της μεθόδου αυτής παρουσιάζεται στην **Εικόνα 54**. Στο Παράρτημα ΙΙ περιγράφεται συνοπτικά η διαδικασία μέτρησης του κυτταρικού πληθυσμού με τη μέθοδο αυτή. Για τις μετρήσεις με τον αιματολογικό/Coulter αναλυτή, χρησιμοποιούνταν το κυτταρικό διάλυμα, το οποίο προέκυπτε από τη διάλυση του πληθυσμού των επικολλώμενων κυττάρων σε 1ml θρεπτικού υλικού και το οποίο θέτονταν κατευθείαν στον αναλυτή. Στην περίπτωση των κυττάρων σε εναιώρημα 200ul από την πειραματική διάταξη τοποθετούνταν κατευθείαν στον αναλυτή προς μέτρηση. Τα αποτελέσματα καταγράφονταν χειρόγραφα είτε ηλεκτρονικά μέσω συστήματος και λογισμικού καταγραφής των αποτελεσμάτων. Η καταγραφή των πληθυσμών γινόταν ανά τα στάδια της μετάβασης στο μοντέλο προσομοίωσης της αύξησης της νεοπλασίας. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η συσκευή *CellTaq A* του οίκου *Nihon Kohden* Ιαπωνίας.

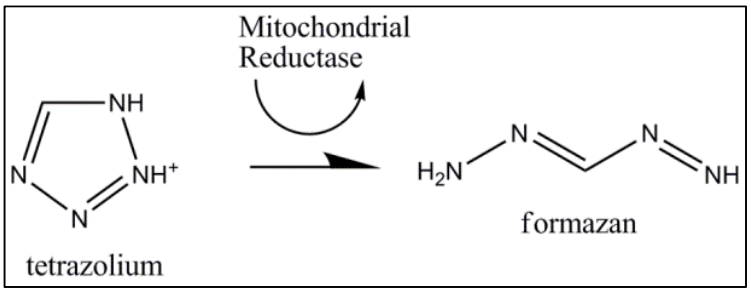
Οι αριθμοί των κυττάρων μετρήθηκαν με τη μέθοδο *Coulter*, όπως περιγράφεται στο Παράρτημα ΙΙ.



Εικόνα 54. Η αρχή της μεθόδου Coulter, για τη μέτρηση κυττάρων. Τα κύτταρα βρίσκονται σε ισότονο, ηλεκτρολυτικό διάλυμα. Η οπή που σχηματίζεται αποτελεί το σημείο εισόδου στο ηλεκτρικό πεδίο. Όταν περνάει ένα κύτταρο, μετατοπίζει το διάλυμα και αλλάζει την εμπέδηση του ηλεκτρικού πεδίου στο σημείο εισόδου. Η διαφορά στην εμπέδηση είναι μετρήσιμη και είναι ανάλογη του μεγέθους του κυττάρου. Μάλιστα κατά αυτόν τον τρόπο είναι εφικτό να διαχωριστούν και άλλοι υποπληθυσμοί μέσα στο ίδιο εναιώρημα. Επίσης ο αριθμός των «χτυπημάτων» *(bits)* του ρυθμού δηλαδή που θα διέρχονται κύτταρα μέσα από την οπή είναι ανάλογος του αριθμού των κυττάρων. Αν είναι γνωστό πόσος όγκος εναιωρήματος πέρασε, τότε είναι δυνατή η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων ανά μονάδα όγκου.

ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΗΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΜΕ ΦΩΤΑΥΓΕΙΑ

Με τον όρο φωταύγεια εννοούμε την ιδιότητα που έχουν ορισμένες χημικές ενώσεις να απορροφούν και να εκπέμπουν την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, ήτοι το φως στο πλείστον των περιπτώσεων, σε συγκεκριμένα μήκη κύματος και χωρίς αυτό να οφείλεται σε θερμότητα. Η φωταύγεια είναι συνώνυμη με τον φθορισμό με τη διαφορά ότι στην περίπτωση της φωταύγειας η χημική ένωση που απορροφά και εκπέμπει φως δεν είναι απαραίτητα φθορίζουσα αλλά μπορεί να είναι και χρωματική. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για τη μέτρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, του κυτταρικού θανάτου που εκμεταλλεύονται την ιδιότητα αυτή των χημικών ενώσεων να απορροφούν φως ή γενικότερα ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Τέτοια παραδείγματα είναι το MTT (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*), το οποίο ανάγεται σε *Formazan*, όπως φαίνεται στη ακόλουθη αντίδραση (



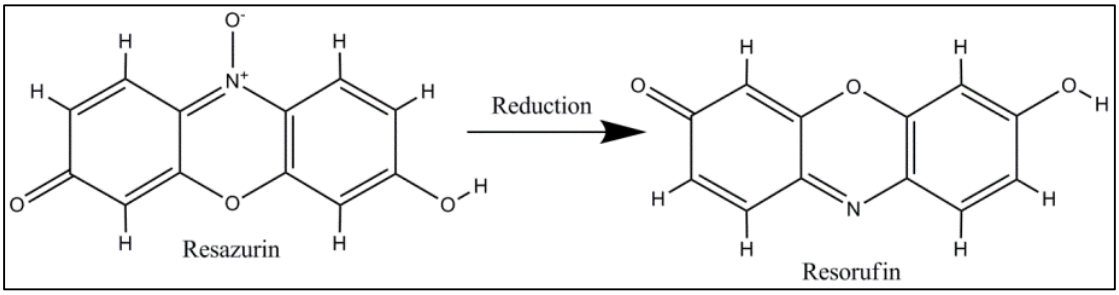
Χημική Αντίδραση 12):

Χημική Αντίδραση 12. Η αναγωγή του MTT, που είναι άλας της χημικής ομάδας *tetrazolium*, σε *formazan*.

Το *Formazan* έχει μια μωβ απόχρωση και απορροφάει το φως μεταξύ των 500 και 600 nm. Έτσι όσα περισσότερα κύτταρα είναι ζωντανά, τόσο περισσότερο τα μιτοχόνδρια πραγματοποιούν την αναγωγή που περιγράψαμε και κατά συνέπεια τόσο περισσότερο απορροφάει φως στο προαναφερθέν μήκος κύματος. Το MTT έχει ένα μειονέκτημα, είναι τοξικό για τα κύτταρα και για να μετρηθούν απαιτείται η λύση τους.

Μια άλλη αντίστοιχη χημική ένωση, η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι η χρωστική *Alamar Blue* (Invitrogen Inc.) ή αλλιώς *Resazurin* (*7-hydroxy-10-oxidophenoxazin-10-ium-3-one*, **CAS Nr.** 550-82-3). Η ένωση αυτή είναι μη-τοξική για τα κύτταρα και κατά συνέπεια μπορούν να καλλιεργούνται και να μετρούνται για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα χωρίς να είναι απαραίτητη η λύση τους ή ο τερματισμός της πειραματικής διαδικασίας.

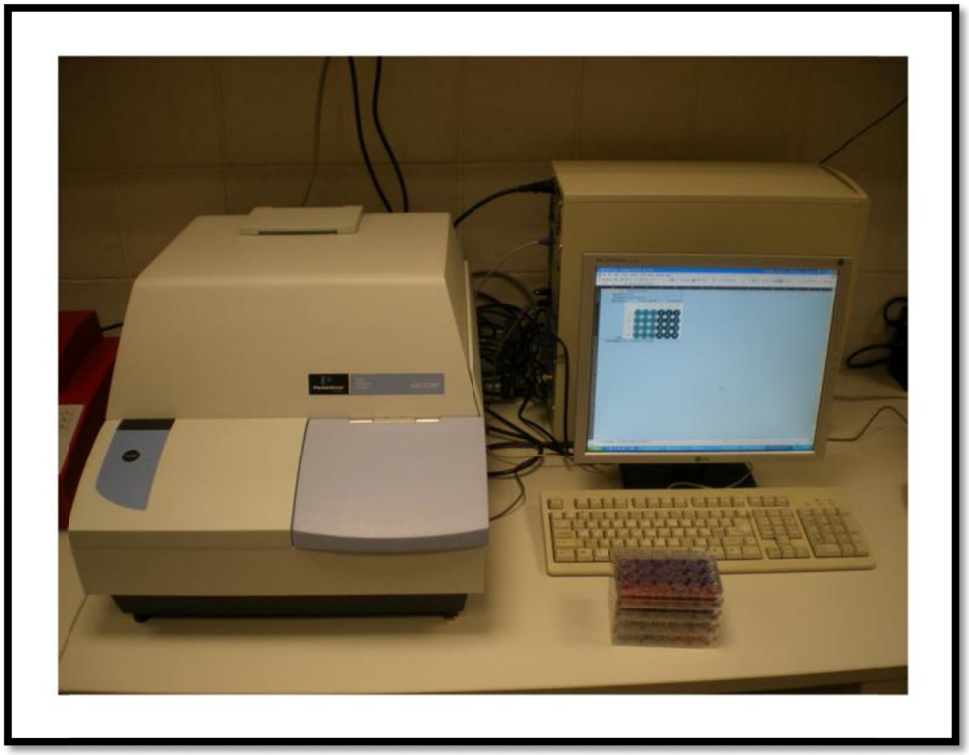
Η ένωση αυτή στην οξειδωμένη κατάσταση (φυσική κατάσταση) είναι χρώματος μπλε και εκπέμπει φως στα 570nm. Στην αναγόμενη κατάσταση γίνεται κόκκινη και εκπέμπει στα 600nm. Η αναγόμενη ένωση, παράγωγο της *Resazurin*, ονομάζεται *Resofurin*. Η αντίδραση παρουσιάζεται παρακάτω (**Χημική Αντίδραση 13**).



Χημική Αντίδραση 13. Η αναγωγή της Resazurin σε Resorufin.

Η αναγωγή αυτή λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια και κατά συνέπεια όσο περισσότερα κύτταρα είναι ζωντανά τόσο περισσότερη *Resazurin* ανάγεται και τόσο περισσότερο αλλάζει το χρώμα της κυτταρικής διάταξης. Η μέθοδος αυτή έχει ένα πολύ βασικό πλεονέκτημα, δεν είναι τοξική για τα κύτταρα και κατά συνέπεια μπορούν τα κύτταρα να αφεθούν να αυξηθούν έως και 11 ημέρες σε καλλιέργεια. Αυτό κάνει τη χρωστική ιδανική για μελέτες κινητικής, όπως συμβαίνει στην παρούσα εργασία. Επίσης ένα άλλο πλεονέκτημα αυτής της χρωστικής είναι ότι πέραν της φωτομετρικής απορρόφησης και εκπομπής έχει και ιδιότητες φθορισμού. Έτσι, είναι γνωστό ότι απορροφάει φως στα 540nm και εκπέμπει στα 590nm.

Έχουν όμως αναφερθεί και μειονεκτήματα της χρωστικής αυτής αφού σε πρόσφατη μελέτη έχει δειχθεί ότι η *Resazurin* προκαλεί σε λευχαιμικά κύτταρα τόσο *in vitro* όσο και *ex vivo* αυτοφαγία, κυτταρικό θάνατο και μιτοχονδριακή δυσλειτουργία (Erikstein, Hagland et al. 2010). Σε άλλες όμως αναφορές έχει δειχθεί ότι η χρωστική αυτή δεν έχει αποπτωτικά αποτελέσματα σε επικολλώμενα κύτταρα και επιβεβαιώνεται η γραμμική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των κυττάρων και της αναγωγής της *Resazurin* (O'Brien, Wilson et al. 2000). Οι μετρήσεις φωτομετρίας και φθορισμού έγιναν με το σύστημα VICTOR^3 του οίκου Perkin Elmer (Perkin Elmer Inc. CA, USA), το οποίο παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 55**).



Εικόνα 55. Το σύστημα VICTOR3 (Perkin Elmer, CA USA).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13

ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΙΙ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ

Για να μπορέσουμε να μελετήσουμε την πολλαπλασιαστική δυναμική των κυττάρων αναπτύξαμε μοντέλα πολλαπλασιασμού, τα οποία προσομοιώνουν (στο μέτρο του δυνατού) την οντογένεση μιας νεοπλασίας από τα αρχικά στάδια εμφάνισής της μέχρι το στάδιο του κορεσμού. Για το σκοπό αυτό δημιουργήσαμε τέσσερα προσομοιωτικά μοντέλα. Το πρώτο αφορά στη διερεύνηση του ελάχιστου απαραίτητου αριθμού κυττάρων ικανού να υποστήριξη την κυτταρική ανάπτυξη. Το δεύτερο αφορούσε στην αύξηση του πληθυσμού κάτω από μεταβλητές συνθήκες πόρων, δηλαδή τροφής, χώρου και όγκου αλλά και μεταβλητού αρχικού αριθμού κυττάρων. Το τρίτο αφορούσε στην ανάπτυξη ενός σταθερού αρχικού αριθμού κυττάρων αλλά με μεταβλητούς πόρους ήτοι τροφή και χώρος ανάπτυξης και μεταβλητό αριθμό κυττάρων από τη μια φάση στην επόμενη. Τέλος το τέταρτο αφορούσε στη δημιουργία χρονοσειρών (time series) όπου τα κύτταρα αφήνονταν να αναπτυχθούν από συγκεκριμένο αρχικό αριθμό και σε συγκεκριμένο περιβάλλον, δηλαδή τροφή, χώρο και όγκο. Το πρώτο μοντέλο το ονομάσαμε *Πείραμα Ελάχιστης Ανάπτυξης* (Minimum Growth Experiment [MinGr]), το δεύτερο μοντέλο το ονομάσαμε *Constant Volume vs. Constant Initial Number* (CV/CIN), το τρίτο ονομάστηκε *Variable Initial Number vs. Variable Volume* (VV/VIN) και το τέταρτο *Πείραμα Χρονοσειρών* (Time Series [TS]). Ταυτοχρόνως δεν πρέπει να παραλείψουμε να πούμε ότι έγιναν και πειράματα ελέγχου (Control Experiments) και τυποποίησης (Calibration Experiments) για να ταυτοποιηθεί η χρήση των χρωστικών και για να συνδεθεί η μέτρηση της φωταύγειας ή του φθορισμού με τον απόλυτο αριθμό κυττάρων. Στις επόμενες ενότητες ακολουθεί η λεπτομερής περιγραφή των πολλαπλασιαστικών μοντέλων.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ (CONTROL EXPERIMENTS)

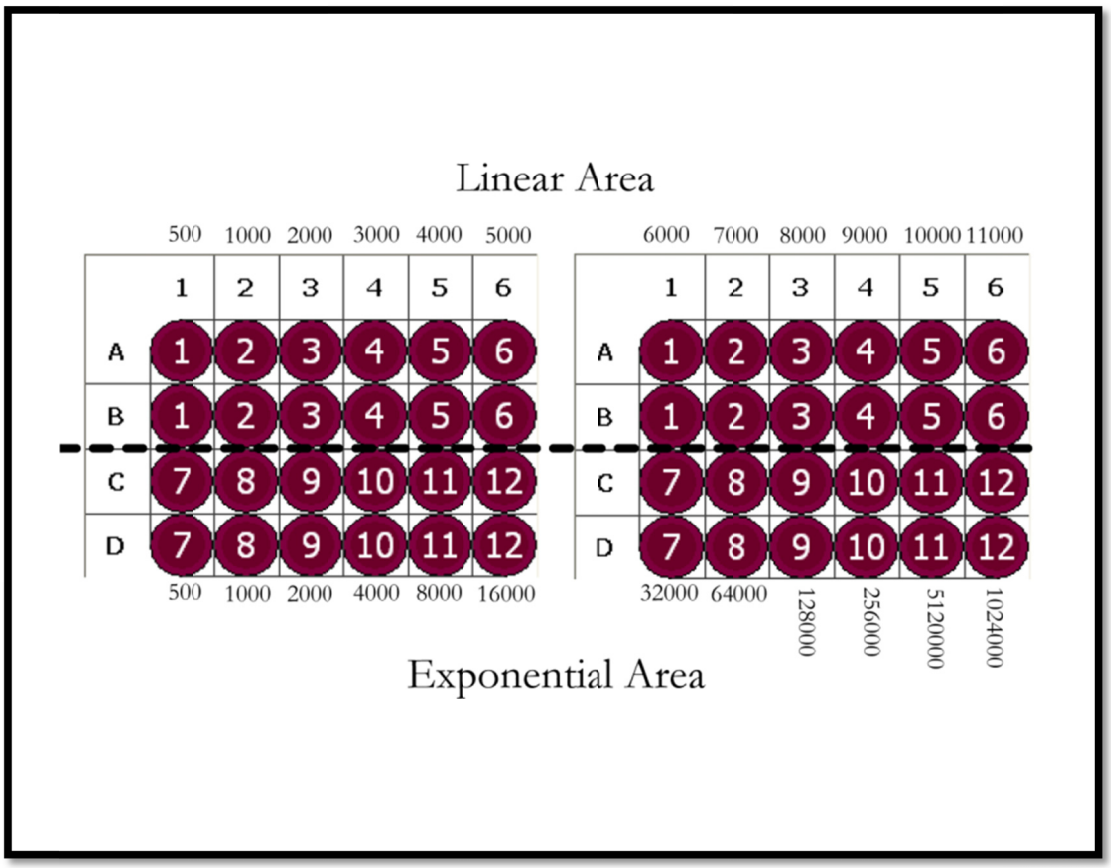
Τα πειράματα ελέγχου αφορούσαν στη χρήση της χρωστικής Alamar Blue και τη συμπεριφορά των κυττάρων με αυτή καθώς και τη χρήση του μετρητή Coulter για τον προσδιορισμό του απόλυτου αριθμού κυττάρων. Χρησιμοποιήθηκαν όλες οι κυτταρικές σειρές που αναφέρθηκαν σε προηγούμενη ενότητα και πιο συγκεκριμένα, με Alamar Blue χρησιμοποιήθηκαν οι σειρές 1321N1 (αστροκύττωμα), A172 (γλιοβλάστωμα), TE671 (ραβδομυοσάρκωμα/βιοψία παρεγκεφαλίδος) και SKPNDW (Αρχέγονος Νευροεκτοδερμικός Όγκος) ενώ με τη μέθοδο Coulter μετρήθηκαν όλες οι

κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν σε αυτή την εργασία. Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων παρουσιάζονται αναλυτικά στην ενότητα των αποτελεσμάτων.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ (CALIBRATION EXPERIMENTS)

Τα πειράματα τυποποίησης αφορούσαν στην ταυτοποίηση της ευαισθησίας των μεθοδολογιών και στην ικανότητα ανίχνευσης του κυτταρικού πληθυσμού. Συγκεκριμένα έγιναν πειράματα τυποποίησης τόσο με τη χρωστική Alamar Blue και τη συσχέτιση της απορρόφησης της χρωστικής με τον απόλυτο αριθμό κυττάρων όσο και στην ευαισθησία της μέτρησης Coulter, όπου με διαδοχικές αραιώσεις έγινε προσπάθεια ταυτοποίησης των κυτταρικών πληθυσμών. Ειδικά για τις μετρήσεις με τη μέθοδο Coulter χρησιμοποιήθηκαν αρχικά διαλύματα σφαιριδίων (fluorospheres) γνωστής αρχικής συγκέντρωσης και διαμέτρου ~10μm του οίκου DAKO Δανίας, σε διαδοχικές αραιώσεις ώστε να διαπιστωθεί τόσο η ακρίβεια όσο και η ευαισθησία της συσκευής Coulter. Επίσης, λόγω της διαφορετικής μορφολογίας και μεγέθους που είχαν οι διάφοροι τύποι κυττάρων που χρησιμοποιήσαμε πραγματοποιήσαμε μετρήσεις με τη μέθοδο Coulter τυποποιώντας την ευαισθησία και το «κατώφλι» (threshold) μέτρησης για κάθε τύπο κυττάρου που χρησιμοποιήσαμε. Ειδικότερα για την περίπτωση των σειρών 1321N1, A172, TE671 και SKPNDW καλλιεργήθηκαν σε γνωστούς αρχικούς αριθμούς που είχαν εύρος από ~500 συνολικά κύτταρα μέχρι ~1000000 κύτταρα. Τα κύτταρα λήφθησαν από φλάσκα καλλιέργειας 75cm^2 και μετρήθηκαν με τη μέθοδο Coulter. Για να επιτευχθούν οι μικροί κυτταρικοί πληθυσμοί χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις του αρχικού μίγματος κυττάρων. Τα πορίσματα των πειραμάτων αυτών αναφέρονται στην ενότητα των αποτελεσμάτων. Στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 56**) παρουσιάζεται διαγραμματικά η πειραματική διάταξη για την τυποποίηση, η οποία ακολουθήθηκε σε όλους τους τύπους κυττάρων που μελετήθηκαν με τη χρωστική Alamar Blue.

Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν πλάκες τιτλοποίησης 24 πηγαδιών (24-well plates), ο όγκος θρεπτικού υλικού που χρησιμοποιείτο ήταν 1ml και το Alamar Blue προστίθετο σε τελική 10% επί του συνολικού όγκου δηλαδή 100μl διαλύματος Alamar Blue αρχικής συγκέντρωσης 10× για κάθε 1 ml θρεπτικού υλικού.

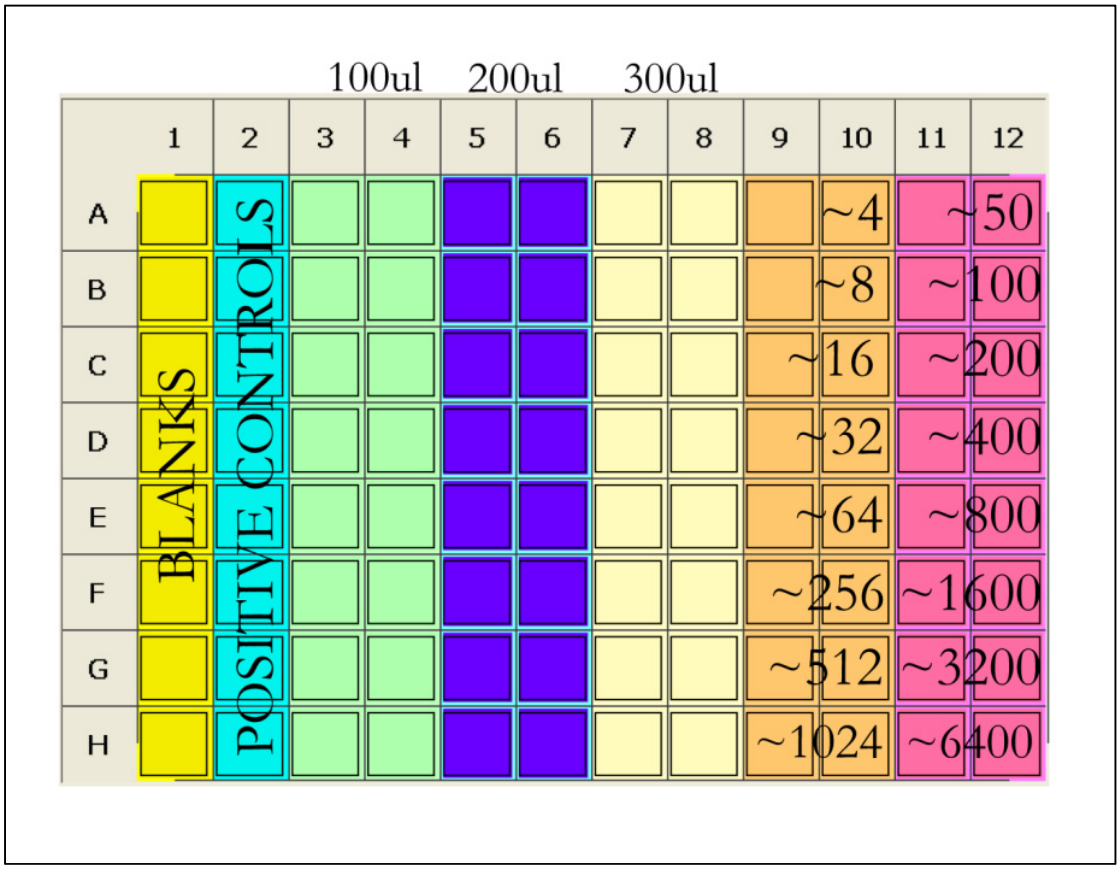


Εικόνα 56. Η πειραματική διάταξη τυποποίησης (calibration) για επικολλώμενα κύτταρα και χρώση με Alamar Blue.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ (MINIMUM GROWTH EXPERIMENTS [MINGR])

Στον τύπο αυτών πειραμάτων η βασική ιδέα ήταν να διερευνηθεί ποιος ήταν ο ελάχιστος αριθμός κυττάρων ανά κυτταρικό τύπο, που ήταν απαραίτητος ώστε να υπάρξει ανάπτυξη. Αλλιώς θα μπορούσαμε να το διατυπώσουμε ως, ποια είναι η κρίσιμη μάζα κυττάρων για να μπορέσουν τα κύτταρα να πολλαπλασιασθούν. Θέτοντας αυτό το ερώτημα σε *in vivo* συνθήκες τότε το ερώτημα θα μπορούσε να γίνει, ποια είναι η κρίσιμη μάζα καρκινικών κυττάρων που απαιτείται ώστε να ξεκινήσει η νεοπλασματική οντογένεση. Για τη διεξαγωγή αυτών των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν πλάκες τιτλοποίησης 96 πηγαδιών (96-well plates) και χρησιμοποιήθηκαν αριθμοί, ανάλογα με την κυτταρική σειρά, από ~4 κύτταρα έως ~7000 κύτταρα. Στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 57**) παρουσιάζεται η γενικευμένη δομή αυτών των πειραματικών διατάξεων. Όπως φαίνεται αναλόγως του κυτταρικού τύπου χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί αρχικοί αριθμοί κυττάρων και σε πολλές περιπτώσεις διαφορετικοί όγκοι θρεπτικού υλικού. Στόχος των πειραμάτων αυτών δεν ήταν τόσο η παρακολούθηση του πολλαπλασιασμού όσο η ταυτοποίηση του ιδανικού αριθμού κυττάρων ώστε

μέσα σε ένα εύλογο χρονικό διάστημα να μπορούσε να αναπτυχθεί ικανοποιητικός κυτταρικός πληθυσμός, που να μπορεί να μελετηθεί περαιτέρω. Το εύλογο χρονικό διάστημα οριζόταν από κάποιους περιορισμούς. Πρώτος περιορισμός ήταν η διάθεση των πόρων. Ήταν δηλαδή δυνατό ένας μικρός αριθμός κυττάρων να μην προχωρούσε σε κυτταρική διαίρεση, να παρέμενε ζωντανός, να κατανάλωνε πόρους και ως εκ τούτου όταν θα έφθανε σε μια κρίσιμη μάζα πολλαπλασιασμού να μην υπήρχαν πλέον οι απαραίτητοι πόροι για αυτό. Επίσης ένας μεγάλος κίνδυνος για τις κυτταρικές καλλιέργειες είναι οι μολύνσεις. Η μακροχρόνια παραμονή στο θρεπτικό υλικό κάνει τα κύτταρα ευάλωτα σε μολύνσεις τόσο βακτηριακής όσο και μυκητησιακής προέλευσης. Παρά το γεγονός ότι χρησιμοποιούσαμε αντιβιοτικά και αντι-μηκυτησιακούς παράγοντες υπήρχε ο κίνδυνος αυτός.
Ο μέγιστος χρόνος που μπορούσαν τα κύτταρα να παραμείνουν στην καλλιέργεια με το ίδιο θρεπτικό υλικό ήταν ~12 ημέρες.



Εικόνα 57. Παρουσιάζεται μια γενική δομή των πειραμάτων ελάχιστης ανάπτυξης, όπου αναλόγως του κυτταρικού τύπου χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί αρχικοί αριθμοί κυττάρων (π.χ. όπως φαίνεται στα έγχρωμα πεδία δεξιά) και σε πολλές περιπτώσεις διαφορετικοί όγκοι καλλιεργητικού υλικού (επάνω κέντρο).

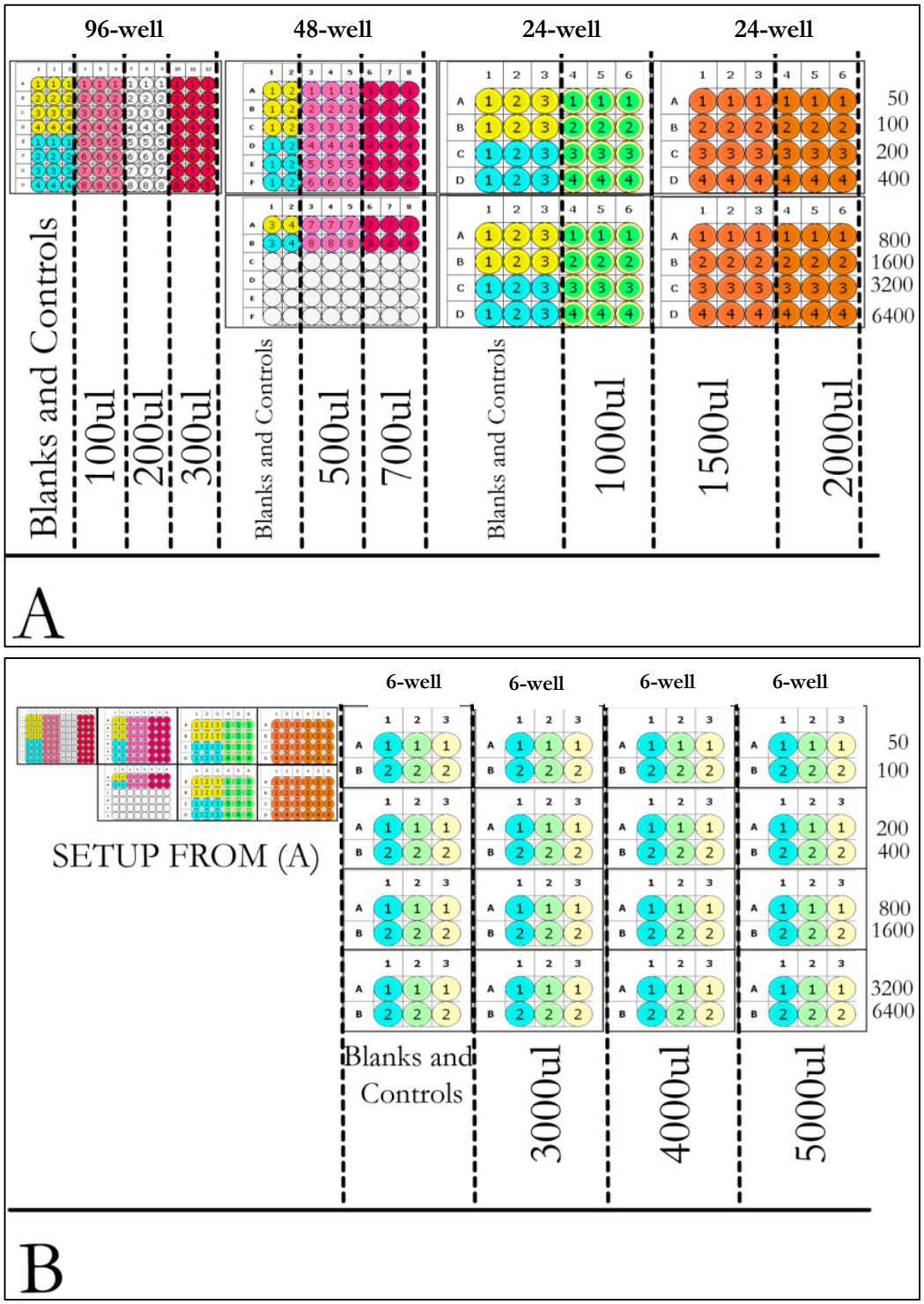
Παρά το γεγονός ότι στο παραπάνω σχήμα φαίνεται σαν να έγιναν οι μετρήσεις σε διπλές επαναλήψεις, τα περισσότερα πειράματα έγιναν σε τρεις ή τέσσερις επαναλήψεις. Επίσης στην κατηγορία αυτή των πειραμάτων ακολουθήθηκε η ίδια διάταξη είτε επρόκειτο για επικολλώμενα είτε

για κύτταρα σε εναιώρημα. Στον τρόπο μέτρησης όμως υπήρχε διαφορά μιας και τα επικολλώμενα κύτταρα μετρήθηκαν με φωταύγεια και αξιολογήθηκαν μικροσκοπικά, ενώ τα κύτταρα σε εναιώρημα μετρήθηκαν με τη μέθοδο Coulter και αξιολογήθηκαν και μικροσκοπικά.

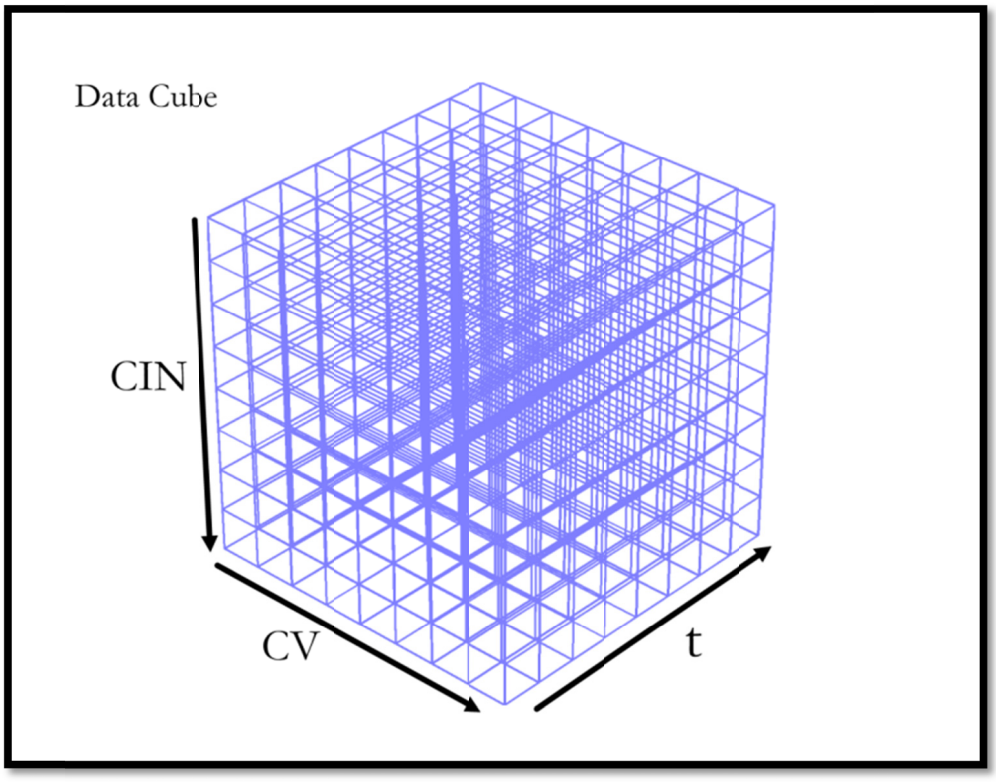
ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ CONSTANT VOLUME VS. CONSTANT INITIAL NUMBER (CV/CIN)

Τα πειράματα αυτά αποτελούν μια βασική κατηγορία για την κατανόηση του μηχανισμού του κυτταρικού πληθυσμού. Η βασική ιδέα ήταν να καλλιεργηθούν κύτταρα σε διαφορετικούς όγκους θρεπτικών αλλά και από διαφορετικούς αρχικούς αριθμούς. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε πλάκες τιτλοποίησης από 96-πηγαδιών έως 24-πηγαδιών για τα επικολλώμενα κύτταρα και έως 6-πηγαδιών για τα κύτταρα σε εναιώρημα. Επιπροσθέτως, για τα κύτταρα σε εναιώρημα χρησιμοποιήθηκαν και φλάσκες των $25cm^2$ και $75cm^2$. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν στις πλάκες σε συγκεκριμένους αρχικούς αριθμούς κατά στήλες με αύξουσα σειρά από πάνω προς τα κάτω και μεταβαλλόμενο όγκο θρεπτικού υλικού από τα αριστερά προς τα δεξιά, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 58**. Το σύστημα αυτό μετρήθηκε σε ίσα χρονικά διαστήματα ήτοι κάθε 12 ώρες. Όπως γίνεται κατανοητό για κάθε μέτρηση προέκυπταν πίνακες $m \times n$ δύο διαστάσεων. Προσθέτοντας όμως και τον παράγοντα χρόνο οι μετρήσεις έγινα πλέον τριών διαστάσεων. Έτσι προκύπτει ένα γεωμετρικό σχήμα το οποίο ονομάσαμε «κύβο» και παρουσιάζεται στην **Εικόνα 59**. Η ιδιαιτερότητα του πειράματος αυτού έγκειται στο γεγονός ότι οι κυτταρικοί πληθυσμοί μεταβάλλονται ως προς την αρχική τους καλλιέργεια καθώς και ο όγκος (δηλαδή η ποσότητα των πόρων που έχουν διαθέσιμα τα κύτταρα για να αυξηθούν) αλλά αφήνονται να αυξηθούν με βάση τη δυναμική, που προκύπτει από τις αρχικές συνθήκες. Μέσα από την πειραματική αυτή διάταξη αναμέναμε να βρούμε ενδείξεις για την εφαρμογή «παιγνίων» στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όπως τα περιγράψαμε στην εισαγωγή της παρούσης εργασίας. Επίσης, αναμένετε να παρατηρήσουμε πιθανές μη-γραμμικές συμπεριφορές στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επιπροσθέτως τα πειράματα αυτά χωρίσθηκαν σε δύο φάσεις, στην πρώτη φάση τα κύτταρα αφέθηκαν να μεγαλώσουν για 12 ημέρες και ο κυτταρικός πληθυσμός μετριόταν κάθε 12 ώρες. Στο τέλος της διαδικασίας αυτής το θρεπτικό υλικό απομακρυνόταν και νέο θρεπτικό προστίθετο στα πηγάδια. Τα κύτταρα αφήνονταν να αναπτυχθούν για αντίστοιχο διάστημα με επίσης 12ωρες μετρήσεις. Πρέπει εδώ να σημειώσουμε ότι με τον τρόπο αυτό εξυπηρετήθηκαν δύο παρατηρήσεις. Η πρώτη είναι οι μετρήσεις της πολλαπλασιαστικής δυναμικής κι η δεύτερη ήταν η συμπεριφορά των κυτταρικών συστημάτων σε συνθήκες στρες. Τα κύτταρα μετά από μια μεγάλη παραμονή στην κυτταρική καλλιέργεια είχαν παράξει σηματοδοτικά μόρια, τα οποία βοηθούσαν στον πολλαπλασιασμό τους ενώ ταυτοχρόνως από κάποιο σημείο και μετά οι πόροι πλέον ήταν ελάχιστοι και ο ανταγωνισμός για αυτούς πιο έντονος. Αφαιρώντας το θρεπτικό υλικό και προσθέτοντας νέο, ουσιαστικά μελετούσαμε τρεις παράγοντες. Ο πρώτος ήταν η αντίδραση στο

στρες που είχε προηγηθεί, ο δεύτερος ήταν η ενδεχόμενη «μνήμη» των κυττάρων και ο τρίτος η ικανή και απαραίτητη ανάγκη για εξωκυττάρια σηματοδότηση. Επί παραδείγματι, αν τα εξωκυττάρια μόρια είναι άκρως απαραίτητα για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τότε έπρεπε να παρατηρηθεί ο ίδιος πολλαπλασιαστικός μηχανισμός όπως κατά την πρώτη εναπόθεση των κυττάρων στην καλλιέργεια. Αν πάλι, υπήρχε κάποιου είδους «μνήμη» για τα κύτταρα τότε έπρεπε να παρατηρήσουμε μια άλλη πολλαπλασιαστική δυναμική. Το φαινόμενο αυτό θα συζητηθεί εκτενώς στις ενότητες των αποτελεσμάτων και συμπερασμάτων.



Εικόνα 58. Η πειραματική διάταξη CV/CIN. Για λεπτομερή περιγραφή βλ. κείμενο.

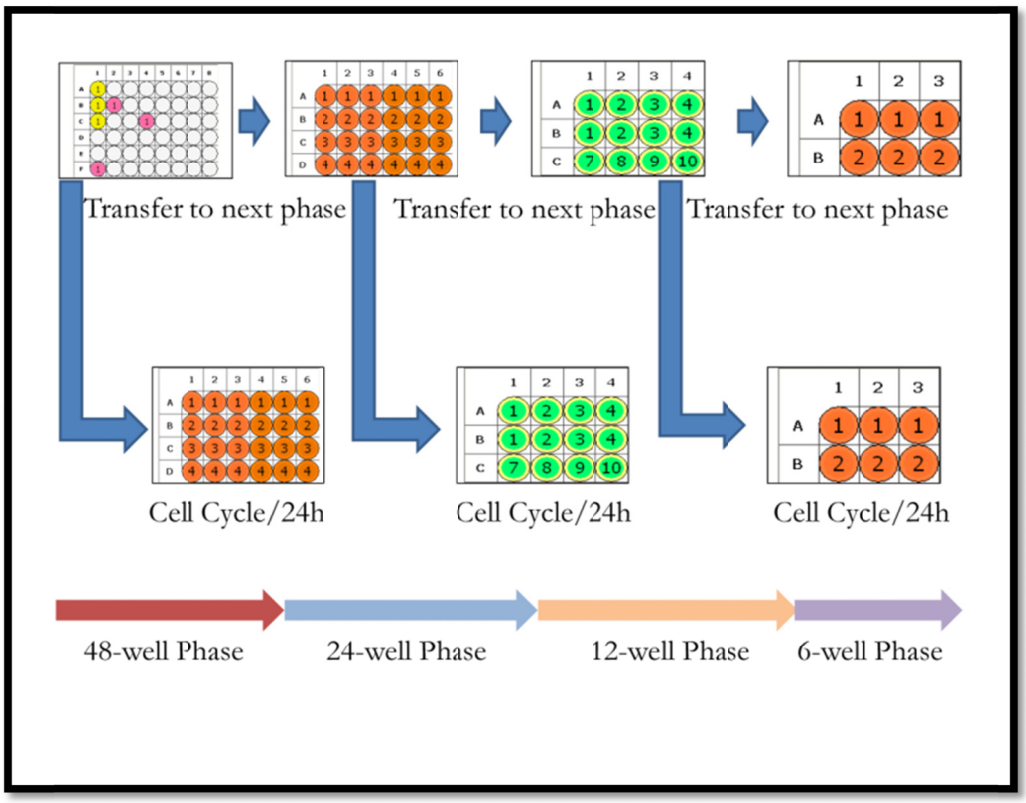


Εικόνα 59. «Κύβος» δεδομένων της πειραματικής διαδικασίας CV/CIN στον άξονα X είναι η μεταβολή του όγκου, στον άξονα Υ είναι οι αρχικοί αριθμοί καθώς στον άξονα Z βρίσκεται ο χρόνος. Η ανάλυση των δεδομένων αυτών βασίζεται στη διανυσματική ανάλυση και γραμμική άλγεβρα, μιας και κάθε στοιχείο του σχήματος αυτού μπορεί να αναπαρασταθεί με ένα διάνυσμα.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ VARIABLE INITIAL NUMBER VS VARIABLE VOLUME (VV/VIN)

Στην κατηγορία αυτή των πειραμάτων τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν από έναν συγκεκριμένο αριθμό αφέθηκαν να μεγαλώσουν αλλά κάθε φορά που έφταναν σε κορεσμό μεταφερόντουσαν σε νέα πλάκα τιτλοποίησης μεγαλύτερου όγκου και επιφανείας. Κατά συνέπεια σε κάθε μεταφορά από τη μια πλάκα στην άλλη τα κύτταρα ξεκινούν από νέο αρχικό αριθμό και σε νέο περιβάλλον. Τα πειράματα αυτά αναμέναμε να μας δώσουν μια εικόνα της συμπεριφοράς των κυττάρων συναρτήσει του χρόνου αλλά και του μεταβαλλόμενου περιβάλλοντος. Είναι ουσιαστικά μια προσομοίωση της *in vivo* καταστάσεως, δεχόμενοι ότι μια νεοπλασία, από τη στιγμή που θα ξεκινήσει μέχρι το σημείο κλινικής παρουσίασης, περνάει μέσα από στάδια πολλαπλασιασμού, τα οποία όμως δεν είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε. Με το συγκεκριμένο μοντέλο, κατά συνέπεια, αυτή ακριβώς την εικόνα επιδιώκουμε να πάρουμε. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η κατανομή του κυτταρικού κύκλου σε 24ωρη βάση καθώς και κύτταρα από τη μια μετάβαση στην άλλη κρατήθηκαν και μελετήθηκαν με

μικροσυστοιχίες. Στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 60**) παρουσιάζεται η πειραματική διάταξη διαγραμματικά.

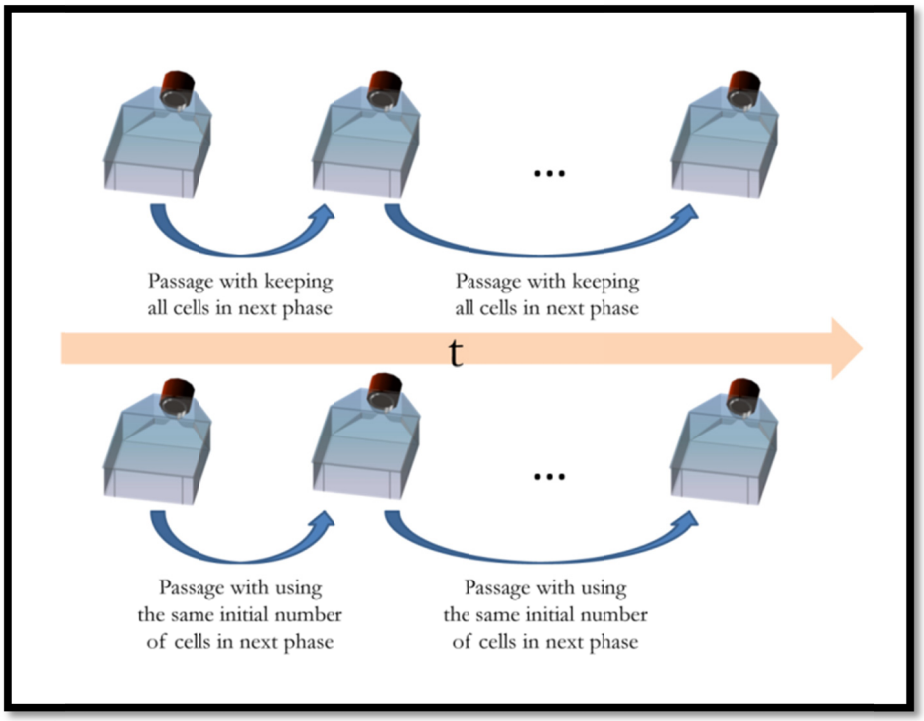


Εικόνα 60. Διαγραμματική αναπαράσταση της πειραματικής διάταξης VV/VIN. Η πρώτη διάταξη ξεκίνησε από πλάκα 48 θέσεων, μόλις έφταναν σε κορεσμό (confluence) μεταφερόντουσαν στην επόμενη φάση ήτοι 24 θέσεις, 12 θέσεις και 6 θέσεις. Τα κύτταρα μελετήθηκαν ως προς την κατανομή του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση. Κατά τη μεταφορά από τη μια φάση στην επόμενη κύτταρα κρατήθηκαν για μελέτη με μικροσυστοιχίες.

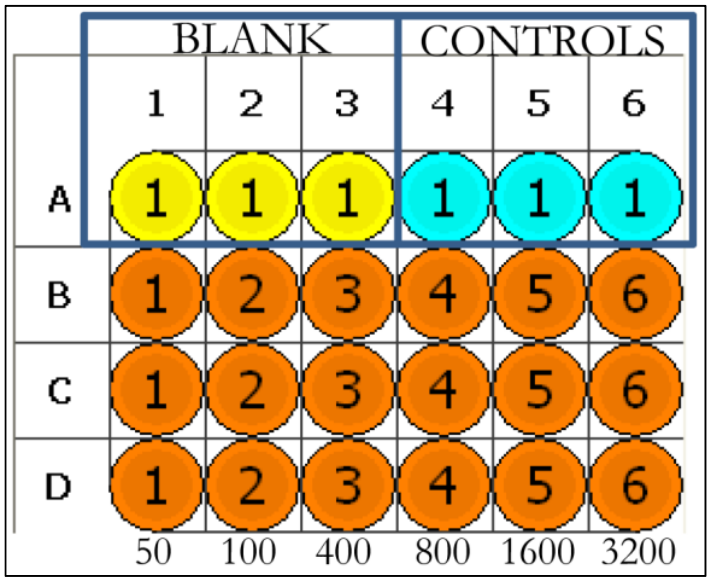
ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΧΡΟΝΟΣΕΙΡΩΝ (TIME SERIES EXPERIMENTS)

Τα πειράματα χρονοσειρών είναι αυτό που ακριβώς υποδηλώνει η ονομασία τους. Αφορούν στη μέτρηση παραμέτρων συναρτήσει του χρόνου. Στην περίπτωση αυτής της εργασίας οι μετρήσεις αφορούσαν στον κυτταρικό πληθυσμό. Στην περίπτωση των κυττάρων σε εναιώρημα (CCRFCEM) έγιναν δύο κατηγορίες πειραμάτων. Στην πρώτη κατηγορία τα κύτταρα αφέθηκαν να αυξηθούν σε φλάσκες των 25cm2 και 75cm2 και δείγμα λαμβανόταν καθημερινά, το οποίο χρησιμοποιείτο για μέτρηση του πληθυσμού με τη μέθοδο *Coulter*. Το θρεπτικό υλικό αλλαζόταν σε 3-ήμερη ή πενθήμερη βάση και μετά την επαναδιάλυση όλος ο αριθμός των κυττάρων χρησιμοποιείτο στην επόμενη φάση (μετά την αλλαγή θρεπτικού υλικού). Στη δεύτερη κατηγορία τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν με παρόμοιο τρόπο όπως και προηγουμένως με τη διαφορά ότι σε κάθε αλλαγή φάσης τοποθετείτο στη φλάσκα ο πρώτος, αρχικός αριθμός κυττάρων. Οι αλλαγές φάσεων γινόντουσαν ανά τρεις, πέντε και επτά ημέρες. Η πειραματική διάταξη παρουσιάζεται διαγραμματικά στην **Εικόνα 61**.

Στην περίπτωση των επικολλώμενων κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν πλάκες τιτλοποίησης 24 θέσεων (24-well plates) στις οποίες τοποθετήθηκαν κύτταρα σε συγκεκριμένο αρχικό αριθμό και αυτά αφέθηκαν να μεγαλώσουν κάνοντας ταυτοχρόνως 12-ωρες μετρήσεις. Η πειραματική διάταξη παρουσιάζεται διαγραμματικά στην **Εικόνα 62**.



Εικόνα 61. Διαγραμματική παρουσίαση της πειραματικής διάταξης των χρονοσειρών για κύτταρα σε εναιώρημα.



Εικόνα 62. Διαγραμματική παρουσίαση της πειραματικής διάταξης χρονοσειρών για επικολλούμενα κύτταρα. Στο κάτω μέρος παρουσιάζονται οι αρχικοί αριθμοί από τους οποίους ξεκίνησε η πειραματική διαδικασία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 14

ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ

Πέραν των παραπάνω παραγόντων που αναφέρθηκαν, έγινε προσπάθεια να ταυτοποιηθούν και κάποιοι περαιτέρω παράγοντες. Αυτό έγινε κυρίως στα πλαίσια μιας διερεύνησης ως μελέτες περίπτωσης λόγω του εύρους και της περιπλοκότητας που έχουν. Ως εκ τούτου, με βάση αυτά που προαναφέραμε στην εισαγωγή μας δημιουργήθηκε το ερώτημα για τη θερμοδυναμική δυναμική των πολλαπλασιαστικών μοντέλων που αναπτύξαμε. Για να μπορέσει αυτό να διερευνηθεί έπρεπε να βρεθούν τρόποι μελέτης μεταβολικών παραγόντων αλλά με δεδομένους τους περιορισμούς στην τεχνική διαχείριση των πειραμάτων. Δηλαδή, πως μπορούμε να μελετήσουμε ένα σύστημα το οποίο μεγαλώνει σε ένα μικροπεριβάλλον 100-300μl και πρέπει σε αυτό να γίνουν λήψεις καθημερινές ώστε να διερευνηθεί η κατανάλωση της γλυκόζης, που είναι ο βασικός παράγων και πηγή ενέργειας στα κυτταρικά συστήματα που μελετήσαμε. Την απάντηση σε αυτά τα προβλήματα την έδωσε η φωτομετρία και οι ιδιότητες φθορισμού των βιομορίων. Συνοψίζοντας, κάναμε τριών ειδών μετρήσεις που αφορούσαν σε μεταβολικούς και μιτοχονριακούς παράγοντες και μια σειρά μετρήσεων, που αφορούσε στο περιεχόμενο της χρωματίνης κατά τα στάδια των πειραμάτων καθώς και στη θέση που ελάμβαναν τα κύτταρα κατά τα στάδια αύξησης τους. Οι παράγοντες που μελετήθηκαν και θα αναπτύξουμε περισσότερο αμέσως μετά ήταν το μόριο NADH/NADPH, το ηλεκτροχημικό δυναμικό των μιτοχονδρίων (ΔΨ) με τη χρήση των μορίων Calcein AM και $COCl_2$, επίσης το ηλεκτροχημικό δυναμικό των μιτοχονδρίων με τη χρήση των χρωστικών $DiOC_2(3)$ (*3,3'-diethyloxacarbocyanine iodide*) και CCCP (*carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone*) και τέλος την κατανομή των κυττάρων στην επιφάνεια της κυτταροκαλλιέργειας και το περιεχόμενο τους σε χρωματίνη με τη χρήση της χρωστικής PI (Propidium Iodide).

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ NADP ΚΑΙ NADPH

Το μόριο Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD^+) είναι ένα συνένζυμο που συμμετέχει σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής στον κυτταρικό μεταβολισμό. Το μόριο NAD^+, αποτελεί τον οξειδωτικό παράγοντα δεχόμενο ηλεκτρόνια από άλλα μόρια, και με αυτόν τον τρόπο ανάγεται και τα οποία ηλεκτρόνια μεταφέρει σε ακόλουθες αντιδράσεις. Η γενική αντίδραση της οξειδοαναγωγής του μορίου NAD^+ είναι:

$RH_2 + NAD^+ \rightarrow NADH + H^+ + R$, **Χημική Αντίδραση 14**.

Όπου RH είναι ο αντιδρών υδατάνθρακας.

Επίσης ισχύει:

NAD^++ lactate → (catalyzed by lactate dehydrogenase) NADH+pyruvate, **Χημική Αντίδραση 15**.

NADH + resazurin → (catalyzed by diaphorase) NAD^+ + resorufin, **Χημική Αντίδραση 16**.

Μπορούμε να συνοψίσουμε τις αντιδράσεις **15** και **16** σε μια ως:

NAD^++ lactate↔(catalyzed by LDH) NADH+pyruvate+ resazurin→ (catalyzed by diaphorase) NAD^+ + resorufin, **Χημική Αντίδραση 17**.

Επίσης τα δύο μόρια NAD^+ και NADH έχουν άλλη μια πολύ βασική ιδιότητα. Το μόριο NADH όταν διεγερθεί στα 360nm εκπέμπει φθορισμό στα 460nm ενώ το μόριο NAD^+ δεν έχει αυτή την ιδιότητα. Έχει ήδη αναφερθεί ότι η ιδιότητα αυτή των δύο μορίων προσδίδει αυτοφθορισμό στα κυτταρικά συστήματα και μάλιστα η ποσότητα NADH είναι γραμμικά ανάλογη με την απορρόφηση στα προαναφερθέντα μήκη κύματος (Pickup, Hussain et al. 2005). Για να κατανοήσουμε καλύτερα το σκεπτικό αυτό ας δούμε συνοπτικά τα στάδια παραγωγής ενέργειας στο κύτταρο.

Η γενική αντίδραση μπορεί να γραφεί ως:

$C_6H_{12}O_6+6O_2 \rightarrow 6CO_2+6H_2O+38ATP$, **Χημική Αντίδραση 18**.

Το πρώτο στάδιο είναι η γλυκόλυση και η οποία μπορεί να γραφεί:

$Glucose+2NAD^+ +2P_i+2ADP \rightarrow 2pyruvate+2NADH+2ATP+2H^+ +2H_2O$, **Χημική Αντίδραση 19**.

Στην αντίδραση αυτή παίρνουμε δύο mole NADH για κάθε mole γλυκόζης.

Στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 7**) παρουσιάζουμε τις βασικές αντιδράσεις της γλυκόλυσης μαζί με τις τιμές ελεύθερης ενέργειας για κάθε μια από αυτές.

Change in free energy for each step of glycolysis (Garrett and Charles M Grisham 2012)			
Step	**Reaction**	**$\Delta G^{o'}$ / (kJ/mol)**	**ΔG / (kJ/mol)**
1	glucose + ATP^{4-} → glucose-6-$phosphate^{2-}$ + ADP^{3-} + H^+	-16.7	-34
2	glucose-6-$phosphate^{2-}$ → fructose-6-$phosphate^{2-}$	1.67	-2.9
3	fructose-6-$phosphate^{2-}$ + ATP^{4-} → fructose-1,6-$bisphosphate^{4-}$ + ADP^{3-} + H^+	-14.2	-19
4	fructose-1,6-$bisphosphate^{4-}$ → dihydroxyacetone $phosphate^{2-}$ + glyceraldehyde-3-$phosphate^{2-}$	23.9	-0.23
5	dihydroxyacetone $phosphate^{2-}$ → glyceraldehyde-3-$phosphate^{2-}$	7.56	2.4
6	glyceraldehyde-3-$phosphate^{2-}$ + P_i^{2-} + NAD^+ → 1,3-$bisphosphoglycerate^{4-}$ + NADH + H^+	6.30	-1.29
7	1,3-$bisphosphoglycerate^{4-}$ + ADP^{3-} → 3-$phosphoglycerate^{3-}$ + ATP^{4-}	-18.9	0.09
8	3-$phosphoglycerate^{3-}$ → 2-$phosphoglycerate^{3-}$	4.4	0.83
9	2-$phosphoglycerate^{3-}$ → $phosphoenolpyruvate^{3-}$ + H_2O	1.8	1.1
10	$phosphoenolpyruvate^{3-}$ + ADP^{3-} + H^+ → $pyruvate^-$ + ATP^{4-}	-31.7	-23.0

Πίνακας 7. Αλλαγές στην ελεύθερη ενέργεια των βημάτων της γλυκόλυσης (Garrett and Charles M Grisham 2012).

Κατόπιν το πυρουβικό που παράγεται μετατρέπεται σε οξικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα με βάση την παρακάτω αντίδραση:

pyruvic acid→acetic acid+CO_2+ $NADH^+$, **Χημική Αντίδραση 20**.

acetic acid +co-enzyme A→acetylCoA, **Χημική Αντίδραση 21**.

Τέλος το acetylCoA εισέρχεται στο μιτοχόνδριο, όπου θα περάσει στον κύκλο του κιτρικού οξέος και αυτό για τις περιπτώσεις όπου έχουμε αερόβιο μεταβολισμό. Η γενική αντίδραση φαίνεται παρακάτω:

Pyruvic acid+NAD^++ coenzyme A + H_2O→acetyl coenzyme A +NADH+ H^++CO_2+2ATP, **Χημική Αντίδραση 22**.

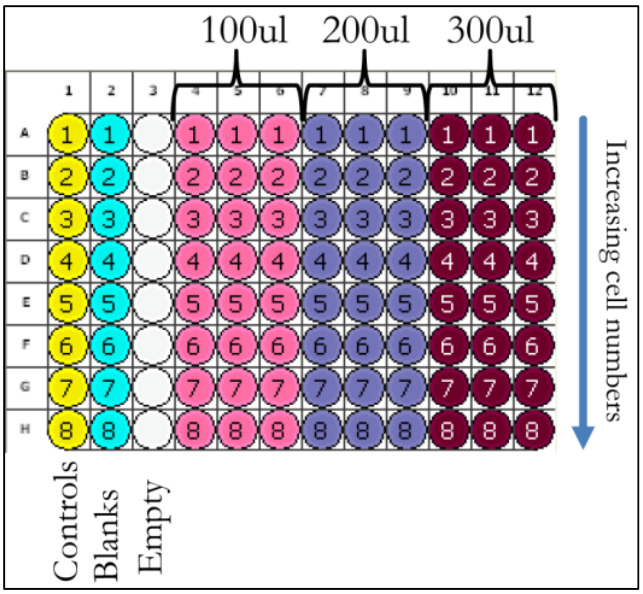
Συνολικά το ενεργειακό ισοζύγιο αυτού του κύκλου είναι 2 μόρια ATP και 6 μόρια NADH.

Αυτές, όμως οι αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα στην περίπτωση της αερόβιας μεταβολικής πορείας της γλυκόζης. Υπάρχει και το ενδεχόμενο, πολύ συχνό στα καρκινικά κύτταρα, ο μεταβολισμός να ακολουθεί την αναερόβια οδό και το πυρουβικό να οδηγείται σε γαλακτικό με τη δράση του ενζύμου LDH, που είδαμε στη **Χημική Αντίδραση 15**.

Η σύνοψη της αντίδρασης αυτής παρουσιάζεται παρακάτω:

$C_6H_{12}O_6 + 2\ ADP + 2\ P_i + 2\ NAD^+ \rightarrow 2\ CH_3COCOO^- + 2\ ATP + 2\ NADH + 2\ H_2O + 2H^+$, **Χημική Αντίδραση 23**.

Με βάση τις αντιδράσεις που περιγράψαμε και πιο συγκεκριμένα τις **Χημικές Αντιδράσεις 16**, **19**, **22** μπορούμε να υπολογίσουμε το ποσό NADH που παράγεται από τη διαδικασία της γλυκόλυσης και άρα εμμέσως να υπολογίσουμε τη γλυκόζη που καταναλώθηκε από μια χρονική στιγμή μέχρι μια άλλη και ταυτοχρόνως μπορούμε να το διασταυρώσουμε αυτό με τις μετρήσεις φωτομετρίας και τα ποσά resorufin που παράχθηκαν. Άρα είναι δυνατό να συσχετίσουμε την πολλαπλασιαστική δυναμική με την κατανάλωση ενέργειας και να ερευνήσουμε το φαινόμενο και θερμοδυναμικά. Η πειραματική διάταξη μέτρησης του αυτοφθορισμού των κυττάρων, για επικολλώμενα κύτταρα, παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 63**). Οι μετρήσεις έγιναν συναρτήσει του χρόνου.



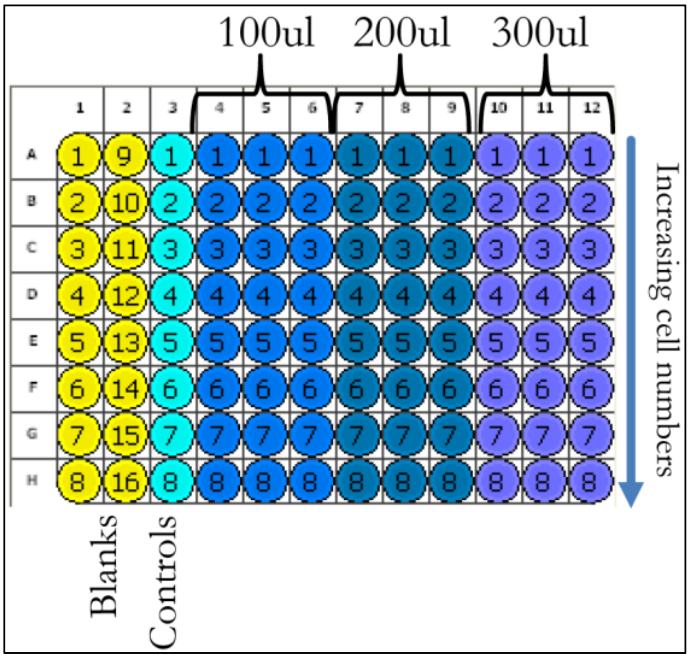
Εικόνα 63. Διαγραμματική παρουσίαση της πειραματικής διάταξης μέτρησης του κυτταρικού αυτοφθορισμού/NADH.

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΜΕ CALCEIN AM

Για τη διερεύνηση του ηλεκτρικού δυναμικού στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων είχαν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι. Οι περισσότερες από αυτές όμως ήταν παρεμβατικές και επηρέαζαν το τελικό αποτέλεσμα. Ως εναλλακτική λύση ήλθε η χρήση χρωστικών, που περνούν ελεύθερα την κυτταρική μεμβράνη και μένουν εκεί με βάση τη διαφορά δυναμικού που σχηματίζεται κατά μήκος της μεμβράνης, είτε του κυτταροπλάσματος είτε του μιτοχονδρίου. Το μόριο Calcein AM είναι ένα άχρωμο και μη φθορίζων μόριο, το οποίο αποτελεί υπόστρωμα για τις εστεράσες. Η χρωστική αυτή περνάει παθητικά την κυτταρική μεμβράνη και συσσωρεύεται στο εσωτερικό των μεμβρανών, της

κυτταροπλασματικής και της μιτοχονδριακής, όπου και καταλύεται από τις εστεράσες. Με την κατάλυση του εκλύεται το μόριο calcein, το οποίο είναι φθορίζων. Η Calcein διεγείρεται στα 494nm και εκπέμπει στα 517nm. Η προσθήκη ενός δεύτερου μορίου του $CoCl_2$ μειώνει το φθορισμό στο κυτταρόπλασμα ενώ παραμένει στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατό να μελετήσει κανείς αλλαγές στο δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης με βάση τις συνθήκες στις οποίες φαίνονται τα κύτταρα. Η μέθοδος αυτή έχει σχεδιασθεί για τη χρήση της με κυτταρομετρία ροής, αλλά εμείς την τροποποιήσαμε για χρήση σε φλουορόμετρο, όπως και εκτελέσαμε. Οι μετρήσεις έγιναν με το κιτ *MitoProbe™ Transition Pore Assay Kit (**Cat Nr.** M34153)* (Molecular Probes, Invitrogen Inc. CA) (Petronilli, Miotto et al. 1998; Petronilli, Miotto et al. 1999; Kowaltowski, Smaili et al. 2000).

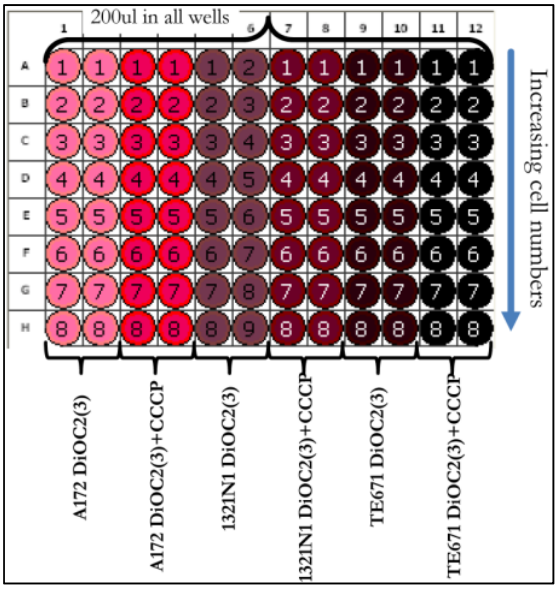
Στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 64**) παρουσιάζεται διαγραμματικά η πειραματική διάταξη μέτρησης του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης με CalceinAM. Οι μετρήσεις έγιναν συναρτήσει του χρόνου.



Εικόνα 64. Διαγραμματική παρουσίαση της πειραματικής διάταξης μέτρησης του ηλεκτρικού δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης με CalceinAM.

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΜΕ (*3,3'-DIETHYLOXACARBOCYANINE IODIDE* ($DIOC_2(3)$) ΚΑΙ *CARBONYL CYANIDE 3-CHLOROPHENYLHYDRAZONE* (CCCP)

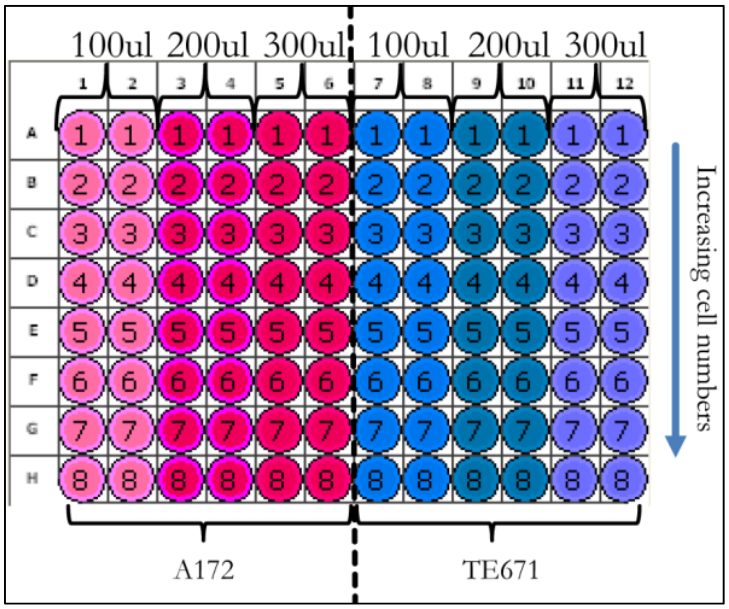
Όπως και στην προηγούμενη πειραματική διάταξη που περιγράψαμε, έτσι και σε αυτή την περίπτωση μετρήσαμε το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης με μια δεύτερη χρωστική. Η χρωστική αυτή ονομάζεται 3,3'-diethyloxacarbocyanine iodide ($DiOC_2(3)$)και έχει την ιδιότητα να συσσωρεύεται στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων. Όταν υπάρχει φυσιολογική λειτουργία των μιτοχονδρίων τότε η χρωστική παραμένει σε αυτά και σε αντίθετη περίπτωση διαφεύγει εκτός της μεμβράνης με αποτέλεσμα τη μείωση του φθορισμού. Π.χ. αυτό συμβαίνει όταν το κύτταρο εισέρχεται σε αποπτωτική φάση ή διαταράσσεται η ισορροπία της μιτοχονδριακής μεμβράνης (Shapiro, Natale et al. 1979; Novo, Perlmutter et al. 1999; Pickup, Hussain et al. 2005). Η χρωστική αυτή διεγείρεται στα 482nm και εκπέμπει στα 535nm. Οι μετρήσεις έγιναν με το κιτ *MitoProbe™ DiOC2(3) Assay Kit for Flow Cytometry* (Molecular Probes, Invitrogen Inc. **Cat Nr.** M34150). Στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 65**) παρουσιάζεται διαγραμματικά η πειραματική διάταξη μέτρησης του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης με $DiOC_2(3)$.



Εικόνα 65. Διαγραμματική παρουσίαση της πειραματικής διάταξης μέτρησης του ηλεκτρικού δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης με $DiOC_2(3)$.

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΜΕ PROPIDIUM IODIDE

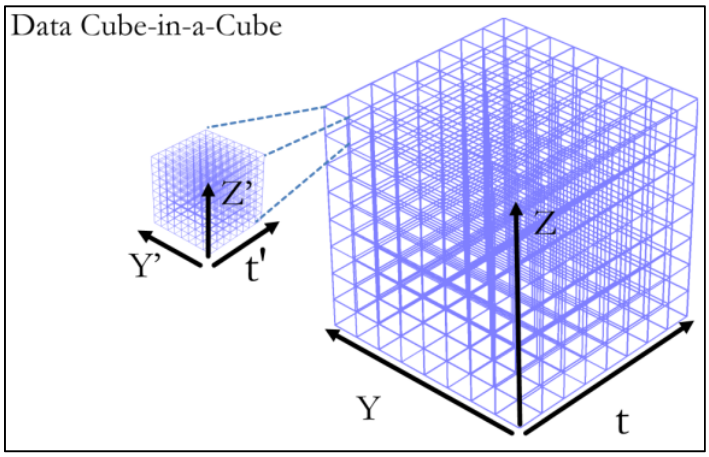
Η χρωστική PI έχει την ιδιότητα να προσκολλάται στη χρωματίνη και λόγω του φθορισμού που αποδίδει όταν διεγερθεί έχει αποτελέσει ένα εξαιρετικό εργαλείο, απλό και αποτελεσματικό, για την ανίχνευση και μελέτη του κυτταρικού κύκλου. Στην πειραματική διάταξη που την χρησιμοποιήσαμε, ο στόχος ήταν να βρούμε τη θέση των κυττάρων στην επιφάνεια καλλιέργειας με στόχο να βρούμε κοινά προφίλ δυναμικής, αλλά και να ελέγξουμε αν το περιεχόμενο σε DNA των κυτταρικών πληθυσμών, ήταν ανάλογο με τον αριθμό των κυττάρων υπό καλλιέργεια και ποια η συσχέτισή τους. Δεδομένων δε και των προηγούμενων μεταβολικών και λειτουργικών μετρήσεων θα μπορούσε ενδεχομένως να γίνει μια συσχέτιση των ενεργειακών αναγκών των κυττάρων και του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους από τη σκοπιά της σύνθεσης DNA. Η χρωστική PI διεγείρεται στα 535nm και εκπέμπει στα 617nm. Στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 66**) παρουσιάζεται η τυπική πειραματική διάταξη για τη διερεύνηση των παραγόντων που προαναφέραμε κατά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Οι μετρήσεις έγιναν συναρτήσει του χρόνου.



Εικόνα 66. Διαγραμματική παρουσίαση της πειραματικής διάταξης μέτρησης της κατανομής των κυτταρικών πληθυσμών και του περιεχομένου DNA κατά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

ΣΥΝΤΟΜΗ ΑΝΑΦΟΡΑ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΚΑΙ ΛΟΙΠΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ (ΜΕΡΟΣ Ι)

Όπως στην περίπτωση των μετρήσεων των κυτταρικών πληθυσμών, έτσι και εδώ οι περισσότερες των μετρήσεων έγιναν συναρτήσει του χρόνου. Όπως επίσης αναφέραμε προηγουμένως, για να αναλύσουμε τα δεδομένα του πολλαπλασιασμού χρησιμοποιήσαμε μια δομή που την ονομάσαμε «κύβο». Η δομή αυτή είναι δανεισμένη από τη γραμμική άλγεβρα και κατόπιν από τη θεωρία των βάσεων δεδομένων. Για τις μεταβολικές μετρήσεις προσθέσαμε μια ακόμα διάσταση και έτσι έχουμε ένα σύστημα τεσσάρων διαστάσεων, που το ονομάσαμε «κύβο μέσα σε κύβο» (cube-in-a-cube). Κάθε μέτρηση πηγαδιού πλάκας τιτλοποίησης αποτελείται από πολλαπλές μετρήσεις, διότι δεν θέλαμε μόνο να πάρουμε τη μέση τιμή για τον κάθε παράγοντα που ερευνούσαμε αλλά θέλαμε να δούμε αν υπήρχαν επιμέρους διαφορές από κύτταρο σε κύτταρο μέσα στο ίδιο πηγάδι (well). Στη μεθοδολογία αυτή θα επανέλθουμε παρακάτω, όπου θα αναλύσουμε τους τρόπους ανάλυσης τέτοιου τύπου δεδομένων. Η αναλυτική προσέγγισή μας παρουσιάζεται διαγραμματικά στην επόμενη εικόνα (**Εικόνα 67**).



Εικόνα 67. Η δομή ανάλυσης των δεδομένων των μεταβολικών και λοιπών μετρήσεων. Την ονομάσαμε "cube-in-a-cube".

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 15

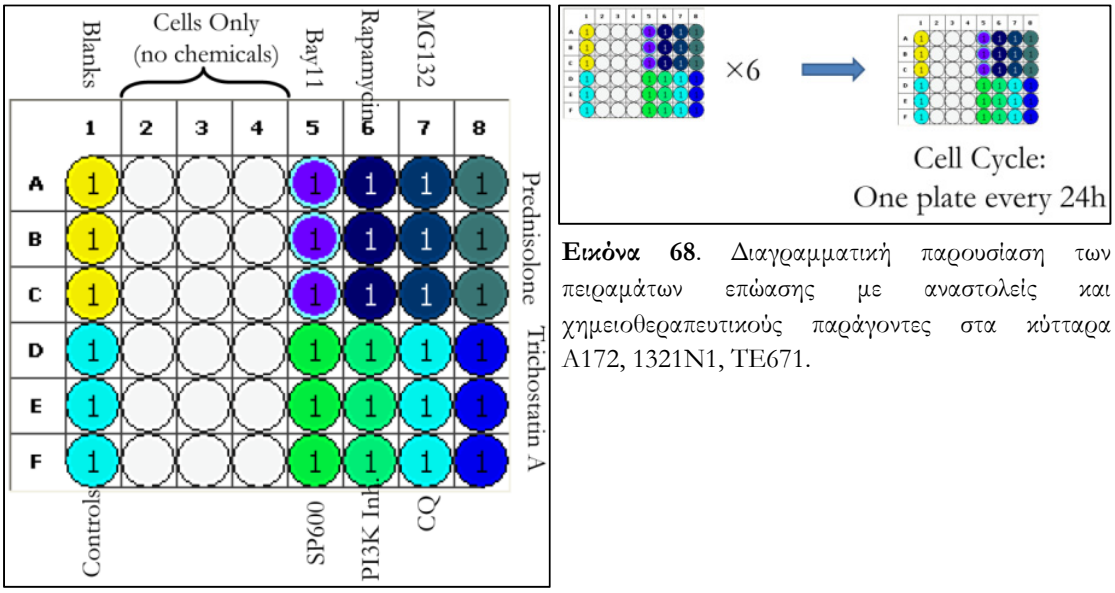
ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ/ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ

Με βάση όσα προαναφέραμε στην εισαγωγή, έγιναν στα κυτταρικά συστήματα δοκιμασίες με αναστολείς/χημειοθεραπευτικά. Ο στόχος ήταν διπλός. Πρώτον θέλαμε να ανιχνεύσουμε παράγοντες στους οποίους τα κύτταρα που μελετήσαμε ήταν ανθεκτικά ή ευαίσθητα στους διάφορους παράγοντες. Δεύτερον, θέλαμε να διερευνήσουμε (αφού πολλά από τα χημικά που χρησιμοποιήσαμε ήταν αναστολείς) ποιες σηματοδοτικές οδοί είναι κρίσιμοι, ή τουλάχιστον ποιες εξ αυτών που μελετήσαμε/αναστείλαμε ήταν κρίσιμες για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επιβίωση. Συνοψίζοντας τους παράγοντες που χρησιμοποιήσαμε και τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις τους ήταν οι εξής: Prednisolone 1uM, MG132 2uM, Rapamycin 100nM, Bay11 10uM, Trichostatin A 400nM, Chloroquine (CQ) 250uM, PI3K Inhibitor 100nM και SP600/125 100nM. Τα πειράματα αναστολείς των σηματοδοτικών οδών χωρίσθηκαν σε δύο φάσεις: στην πρώτη φάση τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν και επωάσθηκαν με τους παραπάνω παράγοντες. Το πείραμα διήρκεσε 120 ώρες και δειγματοληψίες γινόντουσαν κάθε 24 ώρες αρχίζοντας από την ώρα 0, που ήταν η χρονική στιγμή που μπήκαν οι αναστολείς. Οι δειγματοληψίες έγιναν για να μελετηθούν τα κύτταρα ως προς την κατανομή του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση. Ταυτοχρόνως ένα πείραμα με τους ίδιους παράγοντες χρησιμοποιείτο για τη μέτρηση του κυτταρικού πληθυσμού με τη χρήση της χρωστικής Alamar Blue. Μετά το πέρας των 120 ωρών, αλλάξαμε το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα αφέθηκαν να συνεχίσουν να μεγαλώνουν χωρίς την επίδραση χημειοθεραπευτικών παραγόντων.

Από τις δύο αυτές φάσεις του πειράματος, αναμένετο να βρεθούν οι κρίσιμες σηματοδοτικές οδοί για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αλλά μετά το πέρας των επωάσεων ποια μονοπάτια ήταν κρίσιμα για την περαιτέρω ανάπτυξή τους. Τα κύτταρα διήλθαν από δύο σημαντικούς παράγοντες στρες. Ο πρώτος ήταν η επίδραση του αναστολέα ή φαρμάκου και ο δεύτερος ήταν η παραμονή στην καλλιέργεια υπό περιορισμό πόρων. Στις δύο αυτές περιπτώσεις εφόσον τα κύτταρα χρησιμοποιούν σηματοδότηση για τη λειτουργία τους και επιβίωση αναμέναμε να ανιχνεύσουμε ποιες εξ αυτών που αναστείλαμε ήταν κρίσιμες ή μη για τους μηχανισμούς τους. Τα πειράματα με αναστολείς και χημειοθεραπευτικά έγιναν με τα κύτταρα, A172, 1321N1, TE671. Οι υπολογισμοί των τελικών συγκεντρώσεων των φαρμάκων/αναστολέων έγιναν με τη χρήση του νόμου των αραιώσεων, όπως διατυπώνεται στην παρακάτω συνάρτηση:

$C_1V_1 = C_2V_2$, **Εξίσωση 22**.

Στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 68**) παρουσιάζεται διαγραμματικά η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήσαμε.



Εικόνα 68. Διαγραμματική παρουσίαση των πειραμάτων επώασης με αναστολείς και χημειοθεραπευτικούς παράγοντες στα κύτταρα A172, 1321N1, TE671.

Επίσης στην **Εικόνα 69**, παρουσιάζεται η εικόνα δύο ενδεικτικών πειραμάτων, όπως αυτά είχαν σχεδιασθεί και υλοποιηθεί.

Εικόνα 69. Ενδεικτικά πειράματα επώασης κυττάρων με αναστολείς και χημειοθεραπευτικούς παράγοντες στα κύτταρα 1321N1 και TE671. Εδώ παρουσιάζονται πειράματα σε πλάκες μικροτιτλοποίησης 48-πηγαδιών (48-well plates).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 16

ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Από κάθε πειραματική διαδικασία, τόσο δοσοεξαρτώμενα όσο και χρονοεξαρτώμενα διατηρήθηκαν δείγματα για περαιτέρω επεξεργασία και μελέτη τους. Τα δείγματα χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες. Η πρώτη αφορά στα δείγματα για κυτταρομετρία ροής και η δεύτερη στα δείγματα για εκχύλιση νουκλεϊνικών οξέων. Τα δείγματα για την κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση απόπτωσης και νέκρωσης και για τη μελέτη του κυτταρικού κύκλου Τα δείγματα για εκχύλιση νουκλεϊνικών οξέων χωρίζονται σε αυτά που προορίζονταν για εκχύλιση RNA και σε αυτά που προορίζονταν για εκχύλιση DNA.

ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Η δειγματοληψία για τη μελέτη της απόπτωσης και της νέκρωσης με κυτταρομετρία ροής αφορούσε σε ζωντανά κυτταρικά στοιχεία. Αντίθετα τα δείγματα για τη μελέτη του κυτταρικού κύκλου, φυλάσσονταν σε αιθανόλη 75% κ.ο. και διατηρούνταν στους -20^{o}C μέχρι την ημέρα της μέτρησης. Στο Παράρτημα ΙΙ περιγράφεται συνοπτικά η διαδικασία δειγματοληψίας και φύλαξης των κυττάρων.

ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΓΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Τα δείγματα για RNA φυλάσσονταν σε ειδικό διάλυμα υπέρτονο, με άλατα μη τοξικά, το RNALater. Το διάλυμα αυτό είχε την ιδιότητα να εισέρχεται στα κύτταρα και να σταματάει όλες τις κυτταρικές διαδικασίες. Κάθε δειγματοληψία δηλαδή αποτελούσε μια εικόνα της κατάστασης των κυττάρων στη συγκεκριμένη στιγμή.

Χρησιμοποιήθηκε και μια δεύτερη μέθοδος φύλαξης των κυττάρων με διάλυμα *Trizol*. Το διάλυμα αυτό αποτελείται από φαινόλη και ένα χαοτροπικό σκεύασμα που λύει τα κύτταρα και ταυτοχρόνως δεν επιτρέπει σε ένζυμα, εξαιρετικά σταθερά και ανθεκτικά, όπως είναι οι RNases να κατατμήσουν (digest) τα μόρια RNA. Το *Trizol* είναι εξαιρετικά τοξικό και η χρήση του γινόταν πάντα σε θάλαμο νηματικής ροής. Η διαδικασία δειγματοληψίας για RNA περιγράφεται και συνοπτικά στο Παράρτημα ΙΙ.

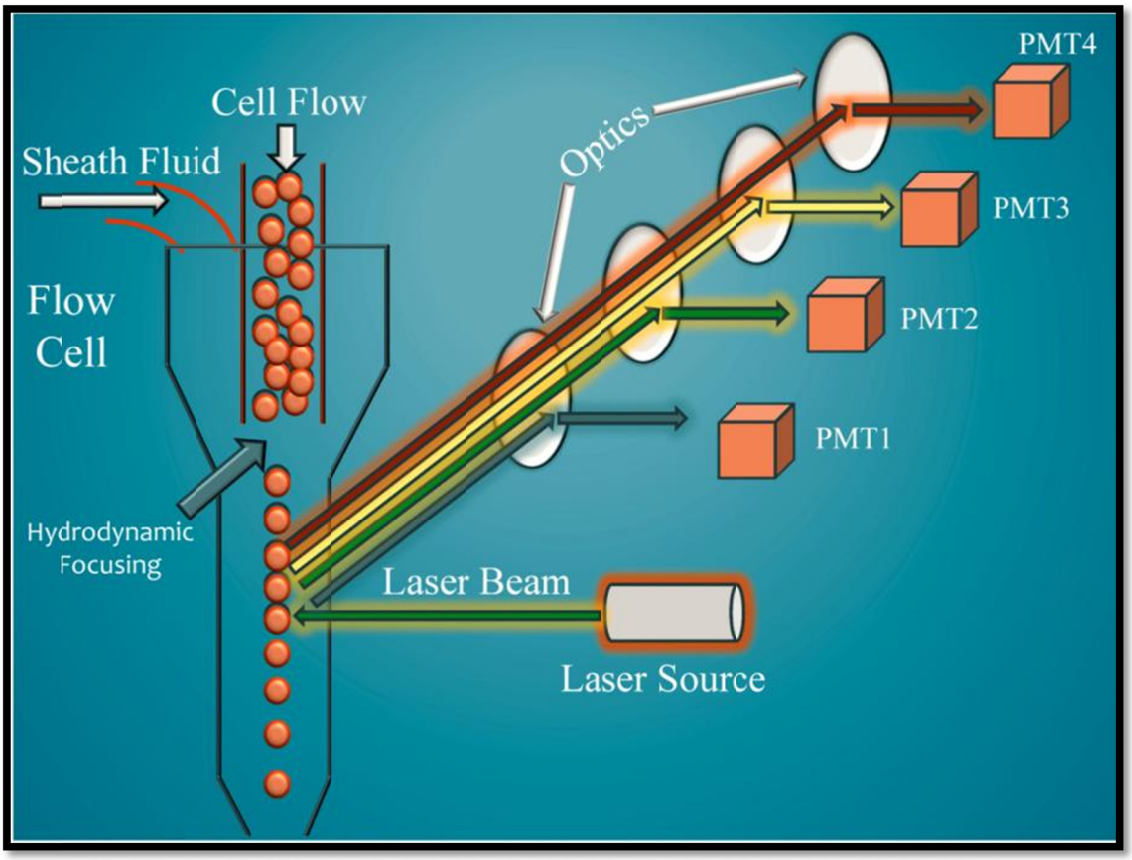
Τέλος η δειγματοληψία για DNA ήταν η απλούστερη όλων αφού μετά τη φυγοκέντρηση για απομάκρυνση του υπερκείμενου διαλύματος, το ίζημα φυλασσόταν κατευθείαν στους -80^{o}C.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 17

ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ (FLOW CYTOMETRY) - ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ, ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ

Η κυτταρομετρία ροής έχει κύριο σκοπό τον κυτταροδιαχωρισμό, στον οποίο οφείλει και το όνομα *FACS* (*Fluoresence Activated Cell Sorter*). (Moldavan 1934; Crosland-Taylor 1953; Fulwyler 1965; Kamentsky, Melamed et al. 1965; Kamentsky and Melamed 1967; Dittrich and Gohde 1969; Hulett, Bonner et al. 1969; Van Dilla, Trujillo et al. 1969; Herzenberg, Sweet et al. 1976). Αποτελεί διαγνωστικό εργαλείο στα κλινικά εργαστήρια, στην τυποποίηση της οξείας λευχαιμίας και λεμφοϋπερπλαστικών συνδρόμων και μυελωμάτων, στην ανίχνευση ελαχίστης υπολειμματικής νόσου, στη μελέτη ιστοσυμβατότητας στις μεταμοσχεύσεις οργάνων, στον έλεγχο απόπτωσης, στο διαχωρισμό υποπληθυσμών λεμφοκυττάρων και άλλες εφαρμογές. Η κυτταρομετρία ροής δίνει τη δυνατότητα μορφολογικής ανάλυσης σε επίπεδο μεγέθους του κυττάρου και κοκκίωσης. Το υπό εξέταση δείγμα θα πρέπει να βρίσκεται υπό μορφή κυτταρικού εναιωρήματος. Τα κύτταρα χρώνυνται με συγκεκριμένες χρωστικές που αναδεικνύουν τη νέκρωση ή την απόπτωση, ή επεξεργάζονται με μονοκλωνικά αντισώματα που έχουν σημανθεί με τις κατάλληλες φθορίζουσες τεχνικές.

Στην **Εικόνα 70** παρουσιάζεται διαγραμματικά η αρχή λειτουργίας ενός κυτταρομετρητή ροής.



Εικόνα 70. Απλουστευμένη διαγραμματική παρουσίαση της αρχής της κυτταρομετρίας ροής. Το βασικότερο σημείο είναι η υδροδυναμική εστίαση της ροής των κυττάρων που προκύπτει από το διαφορετικό ιξώδες των δύο υγρών δηλαδή του ισότονου *Sheath Fluid* και του μίγματος κυττάρων/διαλύτη.

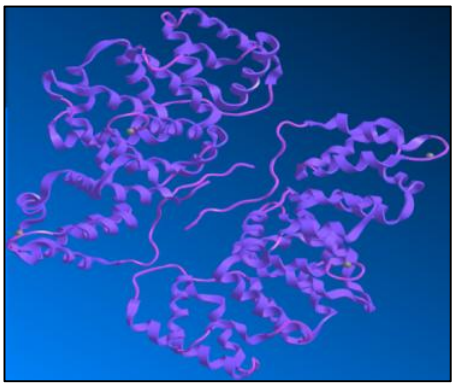
Καθώς τα κύτταρα στη ροή του δείγματος περνούν από την περιοχή ανίχνευσης, η ελλειπτική δέσμη laser τα φωτίζει. Τα κύτταρα σκεδάζουν το laser και εκπέμπουν φθορίζον φως από τις φθορίζουσες χρωστικές που είναι συνδεδεμένες πάνω τους. Η ποσότητα του laser που σκεδάζεται σε μικρές γωνίες από τον άξονα της δέσμης του laser καλείται πρόσθια σκέδαση (Forward Scatter, FS). Η τιμή της πρόσθιας σκέδασης είναι ανάλογη του μεγέθους του κυττάρου. Η ποσότητα του laser που σκεδάζεται σε γωνία περίπου 90^o από τον άξονα της δέσμης laser, λέγεται πλάγια σκέδαση (*Side Scatter, SS*) και είναι ανάλογη της κοκκίωσης του κυττάρου που σκέδασε τη δέσμη. Έτσι η *SS* χρησιμοποιείται στη διάκριση λεμφοκυττάρων, μονοκυττάρων και κοκκιοκυττάρων. Εκτός από την SS, τα κύτταρα εκπέμπουν φθορίζον φως (*Fluorescent Light, FL*) σε όλες τις γωνίες ως προς τον άξονα της δέσμης. Η ποσότητα του *FL* δίνει τη δυνατότητα στο μηχάνημα να μετρήσει χαρακτηριστικά των κυττάρων, ανάλογα με τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται, για παράδειγμα επιφανειακά αντιγόνα.

Τα *FS*, *SS* και *FL* συλλέγονται από αντίστοιχους αισθητήρες, τους φωτοπολλαπλασιαστές (*PMTs*) και μετατρέπονται σε σήματα τάσης. Το κυτταρόμετρο επεξεργάζεται αυτά τα σήματα δημιουργώντας παλμό που καταγράφεται.

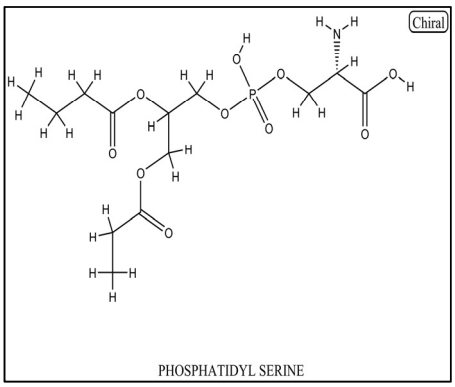
ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΚΑΙ ΝΕΚΡΩΣΗΣ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Στα υπό μελέτη κύτταρα έγινε χρώση με φθορίζουσες χρωστικές με σκοπό τη μελέτη της επαγωγής απόπτωσης και νέκρωσης. Οι δύο βασικές χρωστικές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η *Alexa Fluor 488* και το *Propidium Iodide* (**CAS Nr.** 25535-16-4). Η Alexa αποτελεί μια μεγάλη οικογένεια από χρωστικές που έχουν ένα εύρος εκπομπής φωτός από το ορατό φάσμα μέχρι το υπέρυθρο.

Η χρωστική που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία εκπέμπει φως στο φάσμα του κυανο-πράσινου ή αλλιώς στα 519nm. Αντιστοίχως η χρωστική Propidium Iodide διεγείρεται στα 488nm και εκπέμπει στα 562-588nm. Στα υπό μελέτη κύτταρα, έγινε χρώση με τις δύο αυτές φθορίζουσες χρωστικές. Χρησιμοποιήθηκε το *Vybrant Apoptosis Assay Kit* (Dead Cell Apoptosis Kit with AnnexinV Alexa Fluor 488 and Propidium Iodide for Flow Cytometry, Molecular Probes-Invitrogen Inc.**Cat**. **Nr**. V13241), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Με τον τρόπο αυτό μελετήθηκε ο βαθμός απόπτωσης/νέκρωσης των λευχαιμικών κυττάρων, τόσο για κύτταρα καλλιέργειας που δεν είχαν υποστεί καμία εξεργασία όσο και για κύτταρα καλλιεργειών που είχαν υποστεί την εφαρμογή χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Πιο συγκεκριμένα η χρωστική Alexa 488, είναι συνδεδεμένη με το μόριο AnnexinV (AnnexinA5, UniProtID P08758) (**Εικόνα 72**). Οι Ανεξίνες είναι ομάδες ενδοκυττάριων πρωτεϊνών που όμως μπορούν να βρεθούν και στην κυτταρική μεμβράνη, στο εξωκυττάριο χώρο και στο αίμα. Βρίσκονται σε όλους τους οργανισμούς εκτός από τα βακτήρια.



Εικόνα 72. Annexin A5



Εικόνα 71. Phosphatidyl Serine

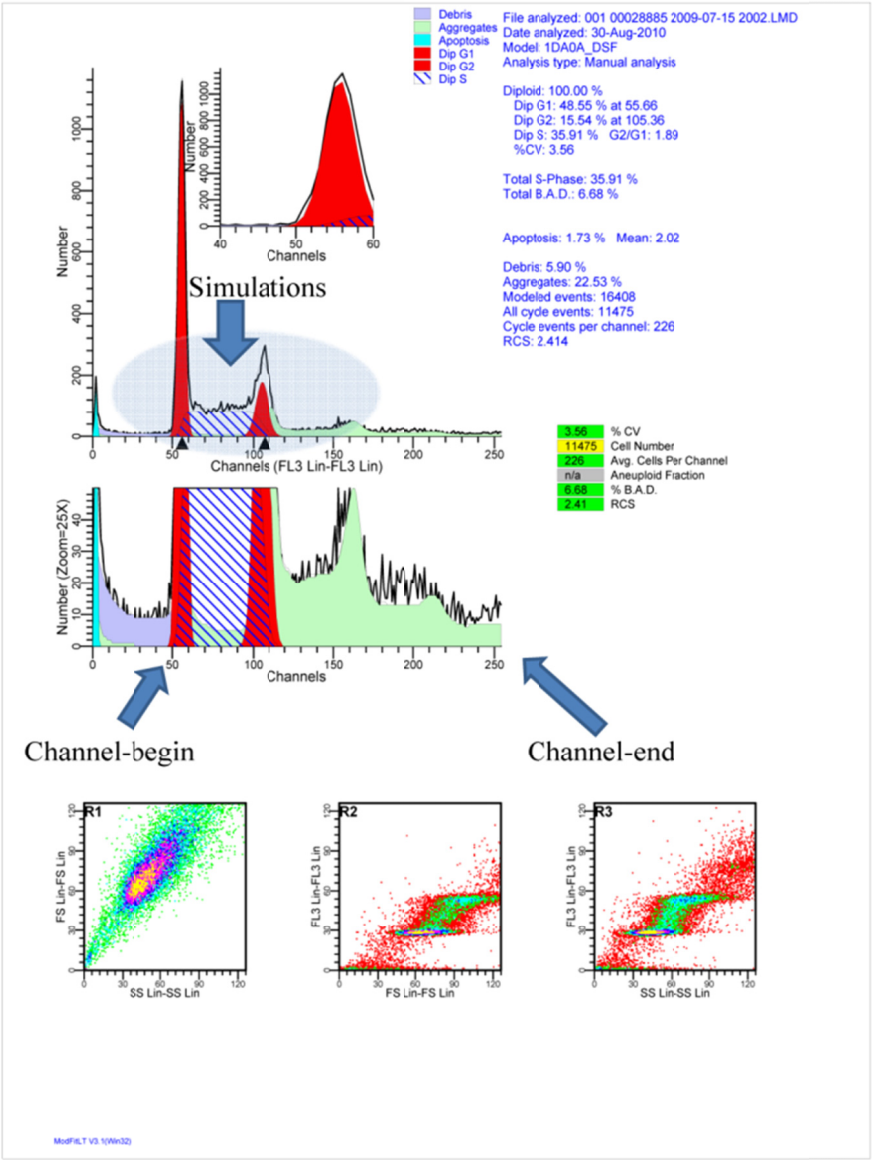
Η λειτουργία τους έχει συνδεθεί με την ινωδόλυση, την πήξη, τη φλεγμονή και την απόπτωση (van Genderen, Kenis et al. 2008). Ο ρόλος της AnnexinV δεν είναι σαφώς καθορισμένος, φαίνεται όμως ότι παίζει ρόλο στην αναστολή της πήξης, ανταγωνιζόμενη τους υποδοχείς φωσφατιδυλσερίνης (*Phosphatidyl Serine-PS*) (**CAS Nr**. 8002-43-5). Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση κυττάρων που εκφράζουν φωσφατιδυλσερίνη (*Phosphatidyl Serine-PS*) (**Εικόνα 71**) στην κυτταρική επιφάνεια, χαρακτηριστικό που αναγνωρίζεται σε κύτταρα που έχουν εισέλθει σε απόπτωση, όπως και άλλες μορφές κυτταρικού θανάτου (Koopman, Reutelingsperger et al. 1994; Vermes, Haanen et al. 1995). Αντιστοίχως, τα κύτταρα που έχουν θανατοποιηθεί με νέκρωση, είναι διαπερατά στο Propidium Iodide το οποίο όπως αναφέρθηκε είναι ένας παράγοντας που εισέρχεται στο DNA μεταξύ των βάσεων (intercalating agent) και χρώνει τα κύτταρα αυτά.

ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ DNA ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Η κατανομή του κυτταρικού κύκλου και η περιεκτικότητα των κυττάρων σε DNA, μετρήθηκε με χρώση Propidium Iodide, PI (Invitrogen Inc).

Το ιωδιούχο προπίδιο (*Propidium iodide*, *PI*) είναι ένας από τους παράγοντες που παρεμβάλλεται χημικά στη νουκλεοτιδική έλικα, ένα φθορίζον μόριο με μοριακό βάρος 668.4 Da, που διεγείρεται από laser στα 488 nm και μπορεί να ανιχνευθεί η σκέδασή του με φίλτρο 562-588 nm (τα ακριβή στοιχεία διέγερσης και εκπομπής τα αναφέραμε παραπάνω και είναι 535nm και 617nm αντίστοιχα). Χρησιμοποιείται ευρέως στη χρώση DNA, για την εκτίμηση της βιωσιμότητας του κυττάρου ή την περιεκτικότητά του σε DNA κατά την ανάλυση κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη διαφοροποίηση νεκρωτικών, αποπτωτικών και φυσιολογικών κυττάρων και στην ποσοτική αξιολόγηση της περιεκτικότητας του κυττάρου σε DNA (Suzuki, Fujikura et al. 1997; Moore, Donahue et al. 1998; Lecoeur 2002). Το PI συνδέεται παρεμβαίνοντας ανάμεσα στις βάσεις του DNA, περίπου ανά 4-5 ζευγάρια βάσεων, αλλά συνδέεται και στο RNA, με αποτέλεσμα να χρειάζεται επώαση με νουκλεάσες για τη διάκριση DNA από RNA στο δείγμα υπό μελέτη.

Στην **Εικόνα 73**, παρουσιάζεται μια ενδεικτική προσομοίωση του κυτταρικού κύκλου από δεδομένα που παράχθηκαν σε αυτή την εργασία.



Εικόνα 73. Χαρακτηριστική προσομοίωση του κυτταρικού κύκλου όπως αυτός προκύπτει από την κυτταρομετρία ροής. Οι σκιασμένες περιοχές αντιστοιχούν σε περιοχές του κυτταρικού κύκλου, όπως φαίνεται και στη λεζάντα μέσα στο διάγραμμα, οι οποίες έχουν προκύψει από τη μαθηματική ανάλυση των δεδομένων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 18

ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ-ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΑΙ ΥΠΟΣΤΗΡΙΚΤΙΚΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ

Το βασικότερο διάλυμα που έχει χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση των νουκλεϊνικών οξέων είναι το Trizol®. Στο Παράρτημα ΙΙ παρουσιάζεται συνοπτικά η διαδικασία της εκχύλισης RNA από κύτταρα καλλιέργειας.

ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Με τη φωτομέτρηση γίνεται η ποσοτική ανάλυση του δείγματος RNA που εκχυλίστηκε. Η φωτομετρία έγκειται στην ιδιότητα των χημικών ουσιών να απορροφούν συγκεκριμένα μήκη κύματος του πολωμένου φωτός.

Με βάση αυτή την ιδιότητα των χημικών ουσιών μπορεί να ταυτοποιηθεί η περιεκτικότητα ενός διαλύματος σε μια ουσία, αρκεί να είναι γνωστό σε πιο μήκος κύματος αυτή απορροφά το φως ή γενικότερα κάποιο φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας.

Στην περίπτωση των νουκλεϊνικών οξέων είναι γνωστό ότι απορροφούν ηλεκτρομαγνητικά κύματα στα 260nm και η μέτρηση συμβολίζεται ως A_{260}. Ταυτοχρόνως μια δεύτερη μέτρηση λαμβάνει χώρα και αυτή είναι στα 280nm και συμβολίζεται ως A_{280}. Σε αυτό το μήκος κύματος, απορροφούν οι πρωτεΐνες γενικότερα και το ποσό απορρόφησης αποτελεί ένα ποιοτικό στοιχείο για το μείγμα νουκλεοτιδίων που μετράται. Η μέτρηση γίνεται σε δύο μήκη κύματος: στο A_{260} μετρώνται νουκλεοτίδια ελεύθερα ή συνδεδεμένα σε αλυσίδες, ενώ στο A_{280}, μετρώνται πρωτεΐνες. Η φωτομέτρηση δίνει αποτελέσματα για την καθαρότητα και τη συγκέντρωση RNA, ενώ ο λόγος A_{260}/A_{280} θεωρείται κατά κανόνα ικανοποιητικός για μελέτη των δειγμάτων RNA με άλλες μεθόδους (*down-stream analysis*) όταν κυμαίνεται μεταξύ 1,8 με 2. Ο λόγος (λ) της καθαρότητας του RNA δίνεται από τη σχέση:

$$\lambda = \frac{(A_{260} - A_{260,blank})}{A_{280}}$$ **, Εξίσωση 23**

Η συγκέντρωση (C_{RNA}) του RNA, με βάση τον παραπάνω νόμο των *Beer-Lambert-Bouguer* δίνεται από τη σχέση:

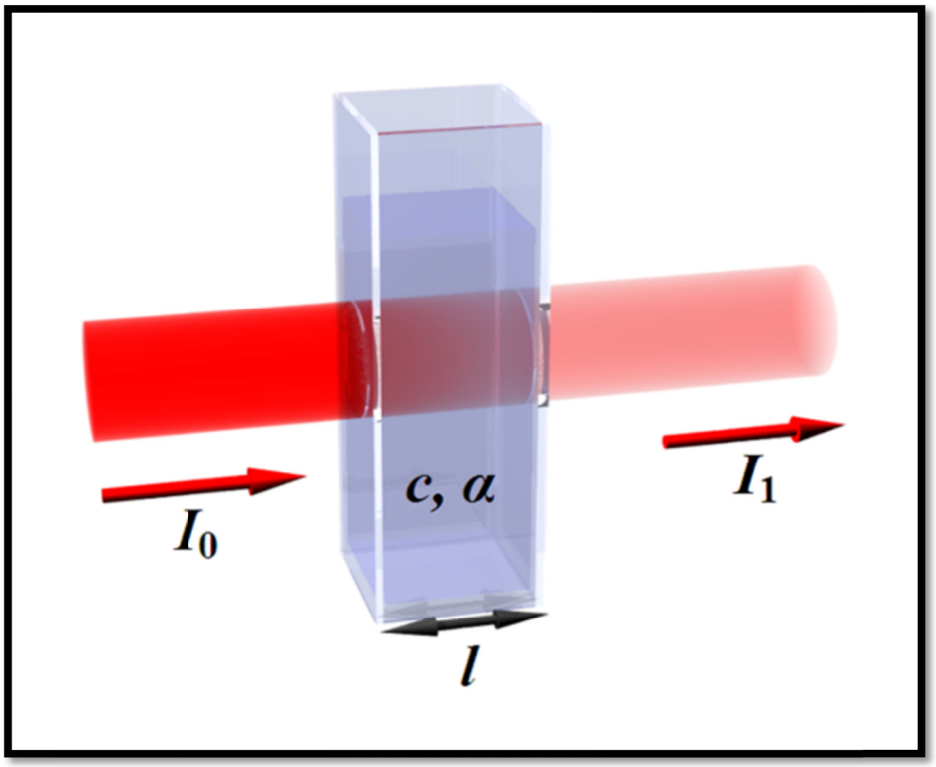
$$C_{RNA} = \frac{(A_{260} - A_{260,blank})}{\varepsilon l}$$ **, Εξίσωση 24**

Όπου, *ε* είναι η σταθερά απορρόφησης (για το RNA είναι 40ug/ml) και *l* η διαδρομή που κάνει το φως μέσα από το δείγμα, όπου για τα φωτόμετρα με κυβέτα είναι συνήθως 1cm και για τα φωτόμετρα που μετρούν απευθείας στο δείγμα είναι 1mm. Στην περίπτωση που έχει προηγηθεί και αραίωση του δείγματος τότε η **Εξίσωση 23**, γίνεται:

$$C_{RNA} = \frac{(A_{260} - A_{260,blank})}{\varepsilon l} \cdot dilution_factor$$ **, Εξίσωση 25**

Συνήθως η διάλυση των δειγμάτων RNAγίνεται σε 1:50 ή 1:100.

Στο Παράρτημα ΙΙ, παρουσιάζεται συνοπτικά η διαδικασία φωτομέτρησης των δειγμάτων.



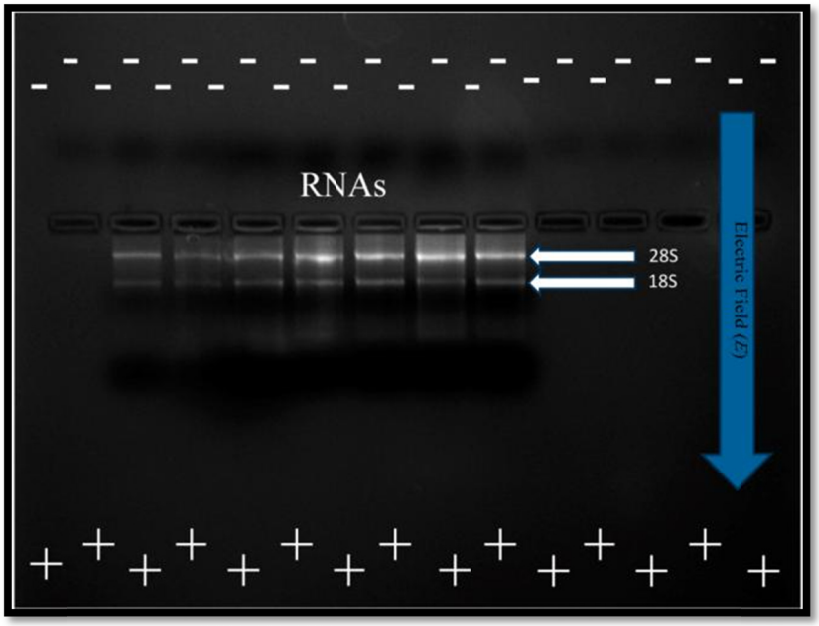
Εικόνα 74. Απλοποιημένη αναπαράσταση του νόμου των *Beer-Lambert*. Παρουσιάζει τη βασική αρχή της φωτομέτρησης (πηγή: **http://en.wikipedia.org/wiki/Beer-Lambert_law**).

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΕ ΓΕΛΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Για τη διερεύνηση της ποιότητας του RNA (*integrity*) απαιτείται ηλεκτροφόρηση νουκλεοτιδίων σε γέλη αγαρόζης. Η βασική αρχή που χρησιμοποιείται κατά την ηλεκτροφόρηση είναι η κίνηση φορτισμένου σωματιδίου σε ηλεκτρικό πεδίο. Τα νουκλεοτίδια έχουν αρνητικό καθαρό φορτίο. Έτσι αν βρεθούν σε ηλεκτρικό πεδίο έχουν την ιδιότητα να κινούνται προς τα θετικά φορτία του πεδίου. Μια χαρακτηριστική εικόνα ηλεκτροφόρησης παρουσιάζεται στην **Εικόνα 75**.

Για την εφαρμογή της μεθόδου αυτής απαιτείται ένα υλικό, πορώδες, που θα επιτρέψει την κίνηση των μορίων RNA ή DNA να «ταξιδέψουν» σε αυτό, ένα ρυθμιστικό/ηλεκτρολυτικό διάλυμα που θα επιτρέψει τη μεταφορά φορτίων από τον ένα πόλο στον άλλο και μια χρωστική ουσία που θα δίνει εικόνα της πορείας των νουκλεοτιδίων.

Τα νουκλεοτίδια (RNA) φορτώνονται σε πηγάδια στη γέλη αγαρόζης, μαζί με μια χρωστική ώστε να φαίνεται η πορεία τους κατά την ηλεκτροφόρηση. Γίνεται σήμανση των μορίων με χρωστική ώστε να είναι δυνατή η οπτικοποίησή τους μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης. Τέτοιες χρωστικές είναι αυτές που έχουν την ιδιότητα να προσδένονται σε μόρια DNA ή RNA και αν διεγερθούν να δίνουν κάποιο φθορισμό. Παραδείγματα τέτοιων χρωστικών είναι το βρωμιούχο εθίδιο (*Ethidium Bromide*) το οποίο είναι και εξαιρετικά τοξικό και τερατογόνο ή άλλες χρωστικές, μη τοξικές, όπως είναι η χρωστική *Gel Star*. Οι χρωστικές αυτές διεγείρονται από υπεριώδες φως στο εύρος των 300-360nm και κάνουν δυνατή την οπτικοποίηση των μορίων DNA ή RNA που μελετώνται, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 75**. Στο Παράρτημα ΙΙ, παρουσιάζεται συνοπτικά η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 75. Παρουσιάζεται εικόνα ηλεκτροφόρησης RNA, όπου φαίνονται τα φορτία, η κατεύθυνση του ηλεκτρικού πεδίου και οι ζώνες 28S και 18S του RNA.

ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟ ΚΑΙ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ DNA

Μια ακόμα απαραίτητη κατεργασία των δειγμάτων, είναι η επώαση με περιοριστικά ένζυμα και συγκεκριμένα με το ένζυμο DNase. Το ένζυμο αυτό είναι ειδικό για τον περιορισμό (*κόψιμο*) αλυσίδων DNA, τόσο του μονόκλωνου όσο και του δίκλωνου μορίου DNA. Παρουσία Mg^{+2}το ένζυμο κόβει το DNA ξεχωριστά ανά άλυσο και τα σημεία κοπής είναι τυχαία. Παρουσία Mn^{+2} το ένζυμο κόβει τις αλύσους του DNA στα ίδια σημεία και παράγει τμήματα μήκους ενός ή δύο νουκλεοτιδίων. Στο Παράρτημα ΙΙ παρουσιάζεται συνοπτικά η διαδικασία κατεργασίας του RNA με περιοριστικό ένζυμο DNase I.

ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ RNA ΚΑΙ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΤΟΥ DNA ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΙΠΩΝ DNASE

Για τη χρήση μεθοδολογιών όπως οι μικροσυστοιχίες, είναι απαραίτητη η απομάκρυνση κάθε ίχνους ξένων ουσιών και η τελική εναπόθεση καθαρού RNA. Για το σκοπό αυτό ακολουθούμε πρωτόκολλα καθαρισμού του RNA. Αυτό μπορεί να γίνει με δύο τρόπους: ο πρώτος τρόπος είναι με την κλασική μέθοδο φαινόλης / χλωροφορμίου ή με έτοιμο kit για τον καθαρισμό RNA.

Στο Παράρτημα ΙΙ παρουσιάζεται συνοπτικά η διαδικασία και για τις δύο μεθοδολογίες καθαρισμού του RNA.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 19

ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ (MICROARRAYS)-ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ

Για την ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων, απομονώνονται από τα κύτταρα RNA μετάγραφα, σημαίνονται με φθορίζουσα χρωστική και υβριδίζονται σε μία DNA μικροσυστοιχία. Κατά τη διάρκεια αυτού του υβριδισμού, οι DNA αλληλουχίες των σταθεροποιημένων στοιχείων καταλαμβάνουν-συγκρατούν τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο μίγμα των φθοριζόντων κλώνων. Το φθορίζον σήμα στο σημείο- κηλίδα της συστοιχίας, που αντιπροσωπεύει κάθε γονίδιο χωριστά, παρέχει μία ποσοτική μέτρηση του επιπέδου έκφρασης αυτού του γονιδίου στο δείγμα (Eisen and Brown 1999). Αυτή η απλή διαδικασία παρέχει μία συστηματική, ποσοτική μέθοδο για την παρακολούθηση της έκφρασης δεκάδων χιλιάδων γονιδίων ταυτόχρονα (Diehn, Alizadeh et al. 2000). Στο Παράρτημα ΙΙ παρουσιάζεται η διαδικασία του πειραματισμού των μικροσυστοιχιών.

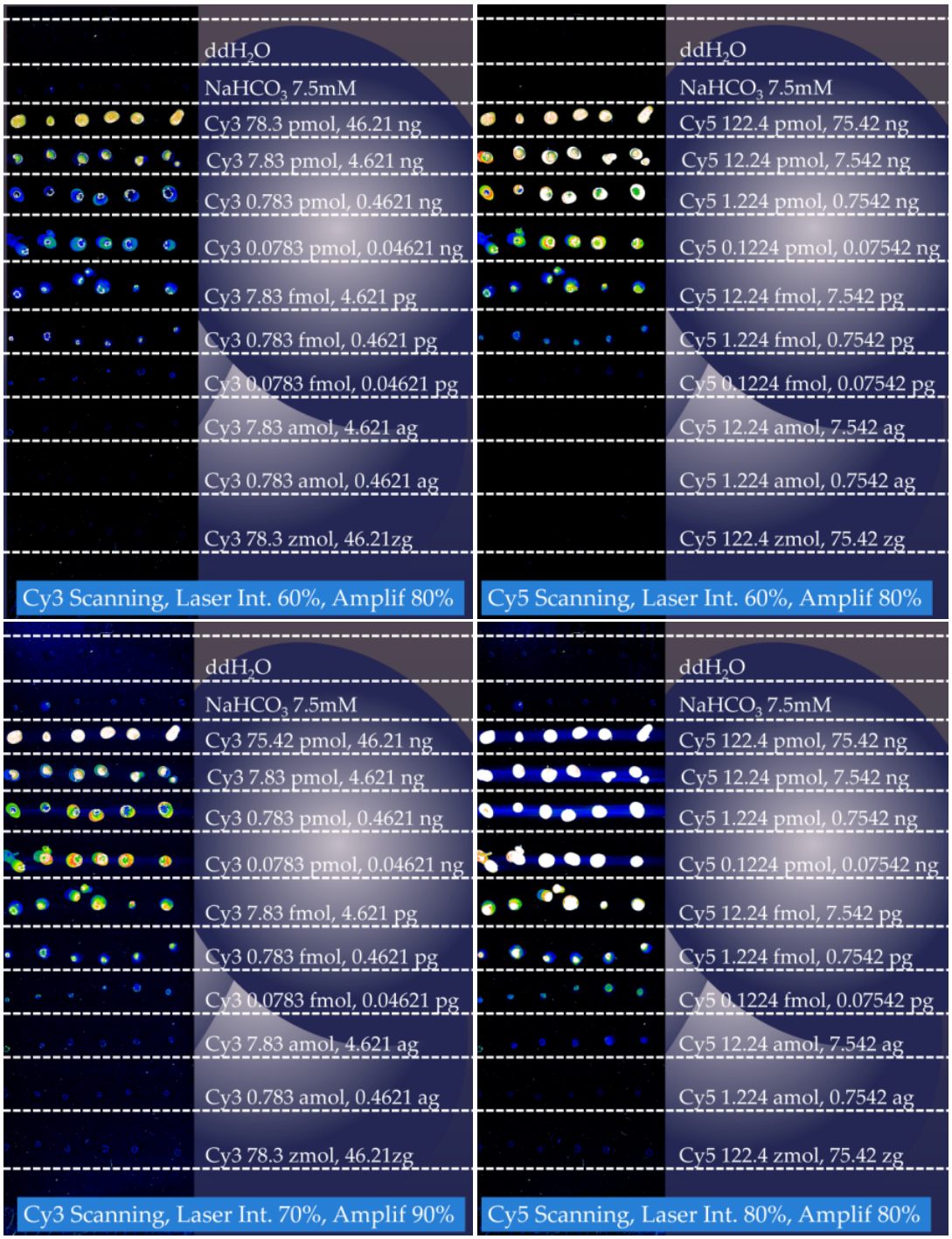
ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΧΟΛΙΑ

Αυτό που διαφοροποιεί τις μικροσυστοιχίες DNA από τις άλλες, συγγενείς τεχνικές, είναι η ικανότητα εκτίμησης της έκφρασης δεκάδων χιλιάδων γονιδίων τη φορά, δηλαδή η ικανότητά της να παρέχει ένα *προφίλ γονιδιακής έκφρασης*[14] ή – όπως αποκαλείται εναλλακτικά – *προφίλ μεταγραφής*. Αυτή η ποσοτική αλλαγή στην κλίμακα των επιπέδων έκφρασης οδήγησε – και συνεχίζει να οδηγεί – σε μια ποιοτική αλλαγή του δυναμικού για την κατανόηση και αποκρυπτογράφηση των ρυθμιστικών διεργασιών σε κυτταρικό επίπεδο. Έτσι, στις μέρες μας οι μικροσυστοιχίες DNA αποτελούν τη μέθοδο επιλογής για την πλειοψηφία των υψηλού ρυθμού παραγωγής εφαρμογών (Σηφάκης 2012).

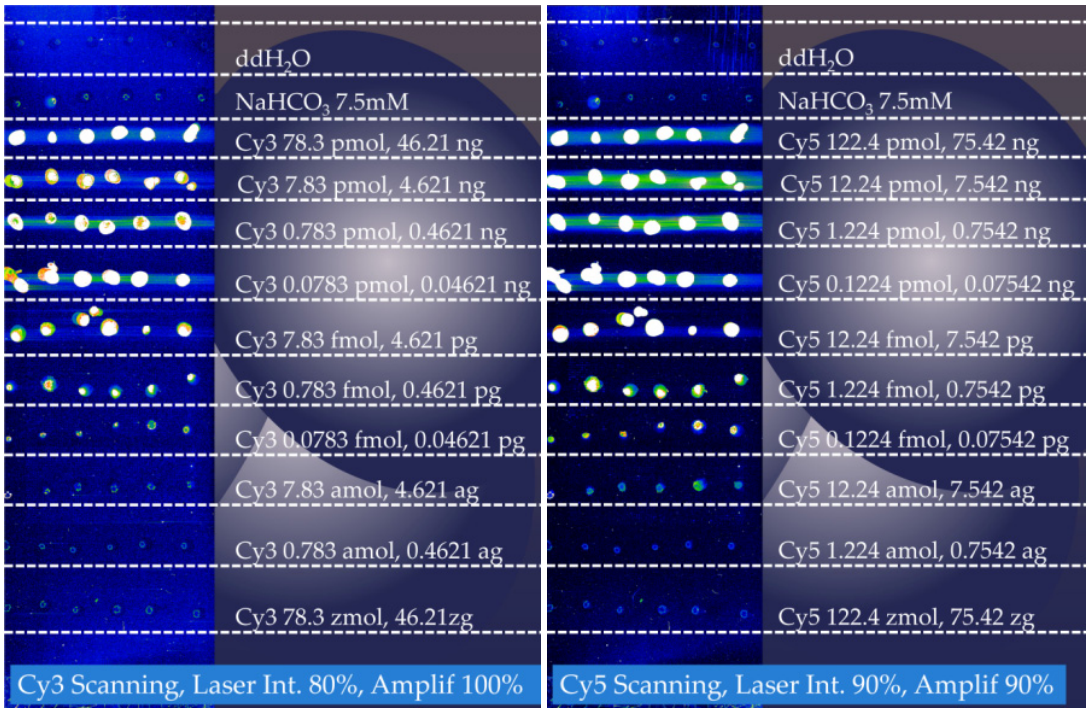
Στις μικροσυστοιχίες cDNA η *ευαισθησία* συχνά ορίζεται ως το ελάχιστο ανιχνεύσιμο σήμα φθορισμού, που μπορεί να αναπαραχθεί, για ένα συγκεκριμένο σύστημα σάρωσης, εντούτοις δύναται να ορισθεί διαφορετικά, όπως π.χ. ως η ελάχιστη συγκέντρωση γνωστής σχετικής έκφρασης, που μπορεί να ανιχνευθεί κατ' εξακολούθηση (Kane, Jatkoe et al. 2000). Ιδανικά, το ανιχνεύσιμο σήμα φθορισμού μιας συγκεκριμένης αναφοράς θα αποτελούσε ένα άμεσο μέτρο της ποσότητας της υπό μελέτη αλληλουχίας στο δείγμα. Γενικότερα, όπως και με την ειδικότητα, οι μεγαλύτερες σε μήκος αναφορές παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία γεγονός, που εν μέρει δικαιολογείται από τη θεώρηση ότι όσο περισσότερες είναι οι – διαθέσιμες προς υβριδοποίηση – βάσεις, τόσο ισχυρότερο θα είναι και το παραγόμενο σήμα φθορισμού (Russell, Meadows et al. 2009). Εντούτοις, εν αντιθέσει με την ειδικότητα, η οποία δύναται να ελεγχθεί καθορίζοντας την αλληλουχία της αναφοράς, η

[14] Ως προφίλ γονιδιακής έκφρασης ορίζεται επίσης και η έκφραση ενός μεμονωμένου γονιδίου για έναν αριθμό διαφορετικών συνθηκών.

ευαισθησία είναι πιο πολύπλοκη και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως (α) τις θερμοδυναμικές ιδιότητες της αναφοράς, (β) την «προσβασιμότητα» της υπό εξέταση αλληλουχίας κατά την υβριδοποίηση, (γ) την επιφανειακή χημεία του υποστρώματος, και (δ) την απόλυτη συγκέντρωση της αναφοράς στο αντίστοιχο χαρακτηριστικό της μικροσυστοιχίας (Draghici, Khatri et al. 2006). Στα πλαίσια των πειραματικών μας διαδικασιών κάναμε ορισμένα δικά μας τεστ ευαισθησίας της τεχνικής των μικροσυστοιχιών και του εξοπλισμού που χρησιμοποιήσαμε. Για το σκοπό αυτό, δημιουργήσαμε μόνη μας ένα υποτυπώδες πλακάκι με τυπωμένες χρωστικές γνωστών συγκεντρώσεων και αραιώσεων και μετρήσαμε στο όργανο μικροσυστοιχιών (microarray scanner) ScanArray 4000XL (Perkin Elmer Inc., CA former GSI Lumonics Inc.). Πάνω σε μια γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετήσαμε γνωστή ποσότητα ενός μίγματος χρωστικών Cy3 και Cy5. Η διάταξη και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 76**. Χαρακτηριστικά πρέπει να αναφέρουμε ότι η μεθοδολογία μας παρουσίασε δυνατότητα ανίχνευσης μέχρι τα 7.83-12.2 atto moles (1amole=10^{-18} moles) πάνω από τα επίπεδα του θορύβου ή 4.62-7.54agr για τις χρωστικές Cy3 και Cy5 αντίστοιχα.



Εικόνα 76. Στάθμιση της ευαισθησίας των χρωστικών Cy3 και Cy5 με το όργανο μέτρησης ScanArray 4000XL (Perkin Elmer Inc.). Παρουσιάζονται συγκεντρώσεις της χρωστικής Cy3 από 75pmol-7zmol και της χρωστικής Cy5 από 122pmol-122zmol.



Εικόνα 76 (συνέχεια). Στάθμιση της ευαισθησίας των χρωστικών Cy3 και Cy5 με το όργανο μέτρησης ScanArray 4000XL (Perkin Elmer Inc.). Παρουσιάζονται συγκεντρώσεις της χρωστικής Cy3 από 75pmol-7zmol και της χρωστικής Cy5 από 122pmol-122zmol.

Ως *θόρυβος* (background) ορίζεται η τυχαία διακύμανση του σήματος φθορισμού ενός συγκεκριμένου ζεύγους υβριδοποίησης, και γενικότερα μπορεί να μετρηθεί ως ο συντελεστής μεταβλητότητας ενός συνόλου επαναλαμβανόμενων μετρήσεων (Kreil, Russell et al. 2006). Έχει βρεθεί, ότι ο θόρυβος μειώνεται καθώς αυξάνεται το μήκος των αναφορών (Chou, Chen et al. 2004). Έτσι, στην περίπτωση χρήσης μικρού μήκους αναφορών μια λύση αντιμετώπισης του θορύβου είναι η χρήση πολλαπλών ανεξάρτητων αναφορών, που εξετάζουν την ίδια αλληλουχία. Την προσέγγιση αυτή εφαρμόζει και η εταιρεία Affymetrix για το σχεδιασμό των GeneChip® (Russell, Meadows et al. 2009).

Τέλος, η *μεροληψία*, η συστηματική απόκλιση μιας μέτρησης από το πραγματικό σήμα φθορισμού λόγω φαινομένων, που σχετίζονται με την αναφορά, ή άλλων διαφόρων τεχνικών περιορισμών, είναι αναγκαίο επίσης να μειωθεί. Με την τωρινή γνώση στο πεδίο η μεροληψία ενδεχομένως είναι δύσκολο να εξαλειφθεί εντελώς, εντούτοις δύναται να ελαττωθεί με διάφορους τρόπους, όπως για παράδειγμα με την μέτρησή της για κάθε αναφορά πειραματικά και εν συνεχεία τη διόρθωσή της κατά την περαιτέρω ανάλυση (Russell, Meadows et al. 2009; Σηφάκης 2012).

Κατά την επιλογή των αναφορών είναι απαραίτητη η εξισορρόπηση όλων των παραπάνω παραγόντων, η οποία, όπως γίνεται αντιληπτό, καθίσταται ιδιαιτέρως δύσκολη και απαιτεί συμβιβασμούς ανάμεσά τους.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ

Ο σκοπός κάθε πειράματος μικροσυστοιχιών DNA αποτελεί η μέτρηση των ποσοτήτων των μορίων RNA σε ένα βιολογικό δείγμα μιας συγκεκριμένης κατάστασης. Επομένως, αποτελεί μείζονος σημασίας σε κάθε βήμα της εργαστηριακής διαδικασίας να εισάγεται όσο το δυνατό λιγότερος θόρυβος, και οι μετρήσεις των επιπέδων έκφρασης να αποκλίνουν όσο το δυνατό λιγότερο από τις πραγματικές. Έτσι, εάν για παράδειγμα το εκχύλισμα προς υβριδοποίηση δεν αντιπροσωπεύει τις αρχικές ποσότητες RNA, τότε τα δεδομένα, που θα παραχθούν, θα είναι μικρής ή άνευ αξίας (Scherer, Gwinner et al. 2009).

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ

Ένας εκτενής και λεπτομερείς σχεδιασμός θα πρέπει να προηγείται κάθε πειράματος μικροσυστοιχιών DNA, ώστε τα υπό διερεύνηση βιολογικά ερωτήματα να δύναται να απαντηθούν επαρκώς. Ο σχεδιασμός του πειράματος αποσκοπεί σε μια μελέτη με όσο το δυνατό οικονομικότερο τρόπο, η οποία ταυτόχρονα να εκμεταλλεύεται πλήρως την εγγενή πληροφορία των πειραματικών δεδομένων (Scherer, Gwinner et al. 2009). Με άλλα λόγια, ένας σωστός αρχικός σχεδιασμός διασφαλίζει μέγιστη ποσότητα πληροφορίας με ελάχιστη προσπάθεια, η οποία μεταφράζεται σε χρόνο και χρήμα. Στο αντίθετο άκρο βρίσκεται ένας κακός πειραματικός σχεδιασμός, ο οποίος αντιστοιχεί στην παραγωγή δεδομένων, τα οποία είναι αδύνατο να αναλυθούν (Stekel 2003).

Οι παράγοντες, που θα πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά το σχεδιασμό του πειράματος, είναι αρκετοί και ποικίλουν. Έτσι, από επιστημονικής πλευράς είναι απαραίτητο να ληφθούν υπόψη (α) ο σκοπός της πειραματικής διαδικασίας, (β) τα υπό μελέτη βιολογικά ερωτήματα διατυπωμένα με σαφήνεια, καθώς και η σειρά προτεραιότητάς τους, και (γ) ο τρόπος με τον οποίο θα απαντηθούν αυτά (Yang and Speed 2002). Επιπροσθέτως, από πρακτικής σκοπιάς – και ιδιαιτέρως όταν χρησιμοποιηθούν διχρωματικές μικροσυστοιχίες – είναι αναγκαίο να ληφθούν υπόψη (α) τα διαφορετικά δείγματα mRNA, π.χ. το δείγμα αναφοράς, τα δείγματα δοκιμής, κ.α., (β) οι αρχικές ποσότητες από το κάθε δείγμα, και (γ) ο αριθμός και ο τύπος των διαθέσιμων μικροσυστοιχιών για το πείραμα, καθώς και ενδεχομένως ο ενυπάρχων εργαστηριακός εξοπλισμός. Για παράδειγμα, στις απλές μονοχρωματικές μικροσυστοιχίες υβριδοποιείται ένα δείγμα, σε αντίθεση με τις διχρωματικές, όπου υβριδοποιούνται ταυτόχρονα δύο δείγματα πάνω σε κάθε μικροσυστοιχία (ανταγωνιστική υβριδοποίηση) (Σηφάκης 2012).

Στα πλαίσια ενός σωστού σχεδιασμού, όπως και σε κάθε άλλου είδους πειραματικής διαδικασίας, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη και ένας ελάχιστος αριθμός αντιγράφων (replicates), ο οποίος ελαττώνει τη μεταβλητότητα, και επιτρέπει τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων (Quackenbush 2001; Yang and Speed 2002). Τα αντίγραφα δύναται να είναι είτε τεχνικά, είτε βιολογικά. Ως τεχνικά αντίγραφα

(technical replicates) αναφέρονται συνήθως είτε οι επαναλήψεις των ίδιων αναφορών πάνω σε ένα πλακίδιο, ή οι διαφορετικές αναφορές, που όμως εξετάζουν το ίδιο γονίδιο, είτε οι επαναλήψεις της υβριδοποίησης σε διαφορετικά πλακίδια με το ίδιο βιολογικό δείγμα και κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Τα τεχνικά αντίγραφα πληροφορούν σχετικά με την εγγενή και συστηματική μεταβλητότητα, που λαμβάνει χώρα κατά τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας (Quackenbush 2002). Αντιθέτως, τα βιολογικά αντίγραφα (biological replicates) αναφέρονται συνήθως σε επαναλήψεις της υβριδοποίησης με RNA, που έχει προκύψει από διαφορετικό βιολογικό δείγμα, ενώ παρέχουν ένα μέτρο τόσο για την εγγενή βιολογική μεταβλητότητα, που υπάρχει στο υπό μελέτη βιολογικό σύστημα, όσο και για την όποια τυχαία διακύμανση κατά την προετοιμασία του δείγματος (Quackenbush 2002).

Αρκετοί τυποποιημένοι σχεδιασμοί έχουν καθιερωθεί στα πειράματα μικροσυστοιχιών, όπως επίσης έχουν προταθεί στη βιβλιογραφία και ορισμένοι καινοφανείς, ενώ έχουν προταθεί και ορισμένες υπολογιστικές προσεγγίσεις με σκοπό την ελαχιστοποίηση των πόρων, που αυτά απαιτούν, όπως έχουμε αναφέρει προηγούμενα (Lambrou, Sifakis et al. 2009). Έτσι, όσο αφορά κυρίως στα πειράματα με διχρωματικές μικροσυστοιχίες, συνήθεις επιλογές αποτελούν ο σχεδιασμός αναφοράς (reference design), ο σχεδιασμός βρόχου (loop design) (Kerr and Churchill 2001; Kerr and Churchill 2001), ο σχεδιασμός εναλλαγής χρωστικών (dye-swap design), κ.α. Ο σχεδιασμός των πειραμάτων με μικροσυστοιχίες έχει αναφερθεί πολλάκις και έχει γίνει εκτενής μελέτη αυτών (Churchill 2002; Yang and Speed 2002).

ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA

Το στάδιο αυτό αποτελεί το πρώτο βήμα της εργαστηριακής διαδικασίας και περιλαμβάνει – βάσει του πειραματικού σχεδιασμού – την επιλογή του κατάλληλου ιστού από τον οργανισμό (ή την κυτταρική σειρά) ενδιαφέροντος, καθώς και των κατάλληλων συνθηκών κάτω από τις οποίες θα ληφθεί αυτός, και εν συνεχεία την απομόνωση του RNA. Οι επιλογές του κατάλληλου ιστού (ή κυτταρικής σειράς) και των συνθηκών του δεν αποτελούν πάντοτε εύκολη υπόθεση, και δύναται να επηρεάσουν σημαντικά τα τελικά αποτελέσματα του πειράματος, ενδεχομένως και να οδηγήσουν στην αποτυχία του στην περίπτωση, που δε δοθεί η απαραίτητη προσοχή (Kohane, Kho et al. 2003).

Από την απομόνωση του RNA από τον υπό μελέτη ιστό (ή την κυτταρική σειρά) εξαρτάται σημαντικά η ποιότητα των τελικών δεδομένων των μικροσυστοιχιών, μιας και οι μετρήσεις της γονιδιακής έκφρασης βασίζονται στην υπόθεση ότι το υπό μελέτη απομονωμένο δείγμα RNA είναι παρόμοιο με τα *in vivo* επίπεδα έκφρασης. Η διαδικασία της απομόνωσης του RNA απαιτεί ταχεία κατεργασία και προσεκτικό χειρισμό, ώστε να μειωθεί στο ελάχιστο η αποδόμησή του (λόγω δράσης της ριβονουκλεάσης) (Russell, Meadows et al. 2009).

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι απομόνωσης του RNA, ενώ η μέθοδος επιλογής εξαρτάται τόσο από το μέγεθος όσο και από τον τύπο του υπό μελέτη ιστού (ή την κυτταρική σειρά). Η τυπική μέθοδος βασίζεται στην τεχνική, που αναπτύχθηκε από τους *Chomczynski* και *Sacchi* (1987) (Chomczynski and Sacchi 1987). Επίσης, διατίθενται και στο εμπόριο τυποποιημένες συσκευασίες (kit) για την απομόνωση του RNA. Εντούτοις, λόγω του ότι ορισμένοι τύποι ιστών απαιτούν ειδικές προσαρμογές των βασικών πρωτοκόλλων, προτείνεται οι ερευνητές να καταφεύγουν στη βιβλιογραφία για την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου απομόνωσης RNA για το συγκεκριμένο υπό μελέτη ιστό και οργανισμό. Μετά το πέρας του βήματος αυτού προτείνεται να ακολουθείται και αποτίμηση της ποιότητας του απομονωμένου RNA (Russell, Meadows et al. 2009). Έχουμε αναφερθεί εκτενώς στο θέμα της εκχύλισης νουκλεοτιδίων σε προηγούμενο κεφάλαιο της ενότητας «Υλικό και Μέθοδοι».

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΠΡΟΣ ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ

Μετά την απομόνωση (και την ποιοτική αποτίμηση) του RNA ακολουθεί το βήμα παραγωγής του επισημασμένου εκχυλίσματος προς υβριδοποίηση. Το βήμα αυτό – σχεδόν στο σύνολο των πειραμάτων μικροσυστοιχιών – έχει ως σκοπό τη μετατροπή του RNA σε μια επισημασμένη μορφή κατάλληλη για υβριδοποίηση (Russell, Meadows et al. 2009), ενώ εξαρτάται από την τεχνολογία κατασκευής της χρησιμοποιούμενης μικροσυστοιχίας. Έτσι, περιλαμβάνει συνήθως τη μετατροπή του απομονωμένου RNA σε cDNA ή σε συμπληρωματικό RNA (complementary RNA – cRNA), και την επισήμανση αυτού.

Αν και στο παρελθόν γίνονταν χρήση ραδιενεργών ιχνηθετών για την επισήμανση, εντούτοις στις μέρες μας προτιμάται η χρήση φθοριζουσών χρωστικών. Οι πιο δημοφιλείς φθορίζουσες χρωστικές για χρήση στις διχρωματικές μικροσυστοιχίες DNA, είναι η Cyanine-3 (Cy3) και η Cyanine-5 (Cy5), η ονοματοθεσία των οποίων έγινε από (Ernst, Gupta et al. 1989; Mujumdar, Ernst et al. 1989; Lee, Kohane et al. 2003; Stekel 2003; Russell, Meadows et al. 2009). Η Cy3 έχει μέγιστα απορρόφησης και εκπομπής στα 550nm και στα 570nm, αντίστοιχα, και διεγείρεται από πράσινο λέιζερ, ενώ η Cy5 έχει μέγιστα απορρόφησης και εκπομπής στα 649nm και στα 670nm, αντίστοιχα, και διεγείρεται από κόκκινο λέιζερ. Ένας από τους βασικούς λόγους χρήσης των συγκεκριμένων φθοριζουσών χρωστικών – ιδιαίτερα στις διχρωματικές μικροσυστοιχίες – είναι η μη σημαντική αλληλοεπικάλυψη των φασμάτων απορρόφησης και εκπομπής μεταξύ τους (Σηφάκης 2012). Επιπροσθέτως, είναι και οι δύο υψηλά φθορίζουσες και υδατοδιαλυτές. Εντούτοις, είναι αναγκαίο να ληφθεί υπόψη το ότι η Cy5 είναι δυνητικώς πιο ασταθής – και συγκεκριμένα πιο ευαίσθητη στην οξείδωση από το περιβαλλοντικό όζον (Fare, Coffey et al. 2003), εν συγκρίσει με τη Cy3. Έτσι, ενδεχομένως θα πρέπει να ληφθούν κάποια μέτρα ρύθμισης των επιπέδων του όζοντος. Εναλλακτικά, χρησιμοποιούνται επίσης οι φθορίζουσες χρωστικές Alexa555 και Alexa647, που αποτελούν τα

«φασματικά ανάλογα» των Cy3 και Cy5, αντίστοιχα. Υπάρχει μια μεγάλη πληθώρα διαθέσιμων μεθόδων επισήμανσης, οι οποίες αναπτύσσονται διεξοδικά στη βιβλιογραφία (Russell, Meadows et al. 2009). Οι τρεις περισσότερο εφαρμοζόμενες είναι (α) η άμεση επισήμανση (direct labeling), (β) η έμμεση επισήμανση (indirect labeling), και – μια ξεχωριστή κατηγορία – (γ) η *in vitro* μεταγραφής επισήμανση (*In Vitro* Transcription labeling – IVT labeling). Η τελευταία κατηγορία μεθόδων αποτελεί συνήθως την κύρια επιλογή σε πειράματα με επιτόπιας σύνθεσης μικροσυστοιχίες, χωρίς όμως αυτό να είναι δεσμευτικό. Έτσι, η επιλογή του πρωτοκόλλου επισήμανσης σε ένα πείραμα μικροσυστοιχιών DNA – και επομένως η παραγωγή του εκχυλίσματος προς υβριδοποίηση γενικότερα – είναι απαραίτητο να συμβαδίζει με τις αναφορές της μικροσυστοιχίας ως προς τη συμπληρωματικότητα, όπως επίσης και με τη διαθεσιμότητα της αρχικής ποσότητας RNA, όπως αναλύεται παρακάτω (Σηφάκης 2012).

ΆΜΕΣΗ ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΗ

Η άμεση επισήμανση αποτελεί την πιο απλή μέθοδο επισήμανσης και αφορά στην απευθείας ενσωμάτωση της φθορίζουσας χρωστικής στα μόρια cDNA κατά την αντίστροφη μεταγραφή του RNA (Schena, Shalon et al. 1995). Πιο συγκεκριμένα, κατά την αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε cDNA με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση, και πέραν των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυριβοζονουκλεοσιδίων (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), προστίθεται και ένα ποσοστό dCTP (ή ορισμένες φορές εναλλακτικά και dUTP) στο οποίο έχει συνδεθεί μέσω ομοιοπολικού δεσμού ένα μόριο της φθορίζουσας χρωστικής, όπως π.χ. της Cy3 ή της Cy5, δηλαδή προστίθεται ένα μέρος Cy3-dCTP ή Cy5-dCTP (γενικά Cy-dCTP). Εν τέλει προκύπτει cDNA στο οποίο ένα ποσοστό των C βάσεών του φέρει τη φθορίζουσα χρωστική (Stekel 2003). Η ποσότητα της φθορίζουσας χρωστικής που θα ενσωματωθεί, καθώς και το μέγεθος του προκύπτον cDNA, εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες, όπως από (α) το λόγο του επισημασμένου προς το μη επισημασμένο dCTP, (β) τη θερμοκρασία, και (γ) τη διάρκεια της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής (Russell, Meadows et al. 2009).

Τα κύρια πλεονεκτήματα των πρωτοκόλλων άμεσης επισήμανσης είναι η ταχεία και η εύκολη διεξαγωγή τους, απαιτώντας σχετικά λίγα βήματα. Αυτό τα καθιστά εύκολα για εφαρμογές υψηλού ρυθμού παραγωγής δεδομένων. Εντούτοις, εμφανίζουν και ορισμένα μειονεκτήματα. Έτσι, απαιτούν σχετικά μεγάλη ποσότητα αρχικού RNA (ολικού RNA ή mRNA) γεγονός, που τις καθιστά απαγορευτικές όταν τα υπό μελέτη δείγματα προέρχονται από περιορισμένες πηγές. Επίσης, μιας και τα προστιθέμενα μόρια Cy-dCTP είναι ογκώδη, η απόδοση ενσωμάτωσής τους από την αντίστροφη μεταγραφάση είναι μειωμένη. Επιπροσθέτως αυτού – και μεγαλύτερης σημασίας – είναι το γεγονός ότι η χρωστική Cy5 αποτελεί μεγαλύτερο μόριο από τη Cy3, και συνεπώς το Cy5-dCTP ενσωματώνεται με μικρότερη απόδοση εν συγκρίσει με το Cy3-dCTP. Ως αποτέλεσμα αυτού είναι η

πιθανή εμφάνιση μεροληψίας στις διχρωματικές μικροσυστοιχίες, όπου τα επισημασμένα cDNA δεν είναι ισοδύναμα για τις δύο χρωστικές[15] (Russell, Meadows et al. 2009).

ΈΜΜΕΣΗ ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΗ

Η έμμεση επισήμανση αποτελεί μια εναλλακτική της άμεσης επισήμανσης, η οποία προσπαθεί να αντιμετωπίσει το πρόβλημα της τελευταίας ως προς τη διαφορά στην απόδοση ενσωμάτωσης των τροποποιημένων με φθορίζουσα χρωστική νουκλεοτιδίων (Σηφάκης 2012). Στη μέθοδο αυτή, η οποία ολοκληρώνεται σε δύο βήματα, τα ογκώδη και διαφορετικών μεγεθών τροποποιημένα με φθορίζουσα χρωστική νουκλεοτίδια αντικαθίστανται από τροποποιημένα με αμινο-αλλυλική ομάδα νουκλεοτίδια (aminoallyl-dNTP), τα οποία είναι κατά πολύ μικρότερα σε μέγεθος. Στο πρώτο βήμα, κατά την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής, προστίθενται τα αμινο-αλλυλο-dNTP, ώστε να παραχθεί μονόκλωνο cDNA. Στο δεύτερο βήμα, το cDNA αντιδρά με ένα δραστικό εστέρα της φθορίζουσας χρωστικής, ώστε ο τελευταίος να συνδεθεί με τα αμινο-αλλυλο-dNTP, επισημαίνοντάς το cDNA (Stekel 2003; Russell, Meadows et al. 2009).

Τα κύρια πλεονεκτήματα των πρωτοκόλλων έμμεσης επισήμανσης – εν συγκρίσει με την άμεση επισήμανση – είναι τόσο η μεγαλύτερη απόδοση ενσωμάτωσης, όσο και ο κοινός ρυθμός ενσωμάτωσης των δύο χρωστικών, και επομένως η αποφυγή πιθανής μεροληψίας στις διχρωματικές μικροσυστοιχίες. Επιπροσθέτως, τα πρωτόκολλα έμμεσης επισήμανσης είναι περισσότερο ευαίσθητα σε σχέση με αυτά της άμεσης επισήμανσης, και κατά συνέπεια απαιτούν – περίπου πέντε φορές – λιγότερο αρχικό RNA. Εντούτοις, τα μειονεκτήματά τους αφορούν στο ότι απαιτούν περισσότερα βήματα γεγονός, που αυξάνει την πιθανότητα διακυμάνσεων, και έχουν ελαφρώς μεγαλύτερο συνολικό κόστος, λόγω των επιπλέον βημάτων καθαρισμού[16] (Stekel 2003; Russell, Meadows et al. 2009).

IN VITRO ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΗ

Ένα σημαντικό μειονέκτημα των παραπάνω μεθόδων επισήμανσης είναι ότι προϋποθέτουν σχετικά μεγάλη ποσότητα αρχικού RNA, καθιστώντας τες ακατάλληλες για πειράματα με περιορισμένες

---

[15] Το πρόβλημα αυτό δύναται να αντιμετωπιστεί στο βήμα του πειραματικού σχεδιασμού, συμπεριλαμβάνοντας τον σχεδιασμό εναλλαγής χρωστικών Σηφάκης, Ε. (2012). Ανάπτυξη Μεθοδολογιών Υπολογιστικής Νοημοσύνης για την Επεξεργασία και Ανάλυση Δεδομένων Γονιδιακής Έκφρασης Μικροσυστοιχιών cDNA. Εργαστήριο Βιοϊατρικής Τεχνολογίας. Αθήνα, Εθνικό Μστσόβειο Πολυτεχνείο. **Διπλωματούχος Μηχανικός**..#

[16] Αν και τα τροποποιημένα με φθορίζουσα χρωστική νουκλεοτίδια, που χρησιμοποιούνται στην άμεση επισήμανση, είναι ακριβότερα από τα τροποποιημένα με αμινο-αλλυλική ομάδα νουκλεοτίδια και τις δραστικές φθορίζουσες χρωστικές μαζί, που χρησιμοποιούνται στην έμμεση επισήμανση, το κόστος των επιπλέον βημάτων καθαρισμού (ένα μετά τη σύνθεση του cDNA και ένα μετά τη σύνδεση των χρωστικών) καθιστούν την έμμεση επισήμανση ελαφρώς ακριβότερη.

ποσότητες βιολογικών δειγμάτων. Για το λόγο αυτό, έχει αναπτυχθεί μια ξεχωριστή κατηγορία μεθόδων επισήμανσης, οι οποίες περιλαμβάνουν αρχικά ένα βήμα ενίσχυσης του RNA, κατά το οποίο είναι απαραίτητο να διατηρούνται οι σχετικές ποσότητες των μεταγράφων του αρχικού δείγματος. Η ενίσχυση, που ακολουθείται, δύναται να είναι είτε γραμμική είτε εκθετική (βασιζόμενη στην PCR), αναλόγως εάν είναι διαθέσιμα κάποιες χιλιάδες ή ένας πολύ μικρός αριθμός κυττάρων, αντίστοιχα.

Το βασικό πρωτόκολλο ενίσχυσης του RNA, πάνω στο οποίο στηρίζονται πολλές μεταγενέστερες τεχνικές, είναι ευρύτερα γνωστό ως πρωτόκολλο του Eberwine (Van Gelder, von Zastrow et al. 1990), και ακολουθεί γραμμική ενίσχυση. Η βασική αρχή του περιλαμβάνει την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής με χρήση ενός τροποποιημένου εκκινητή με θέση πρόσδεσης για την T7 RNA πολυμεράση. Εν συνεχεία, το μονόκλωνο cDNA μετατρέπεται σε δίκλωνο cDNA, το οποίο με τη σειρά του χρησιμοποιείται ως μήτρα για την αντίδραση της *in vitro* μεταγραφής (*In Vitro* Transcription – IVT). Κατά την αντίδραση αυτή, η T7 RNA πολυμεράση προσδένεται στη θέση πρόσδεσής της και μεταγράφει πολλά αντίγραφα συμπληρωματικού RNA (complementary RNA – cRNA ή antisense RNA – aRNA). Για την επισήμανση του παραγόμενου cRNA, μια δυνατή επιλογή αποτελεί η ενσωμάτωση κατά την IVT τροποποιημένων με αμινο-αλλυλική ομάδα νουκλεοτιδίων, και εν συνεχεία σύνδεση με τη φθορίζουσα χρωστική, όπως στην περίπτωση της έμμεσης επισήμανσης (Russell, Meadows et al. 2009).

Ένα τέτοιο βήμα ενίσχυσης αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι για τις μεθόδους προετοιμασίας του εκχυλίσματος προς υβριδοποίηση, που χρησιμοποιούνται για το GeneChip® της Affymetrix. Σύμφωνα με το βασικό πρωτόκολλο της εταιρείας, γίνεται χρήση τροποποιημένων με βιοτίνη νουκλεοτιδίων κατά την αντίδραση IVT, ώστε να παραχθεί βιοτινυλιωμένο cRNA. Εν συνεχεία, το βιοτινυλιωμένο cRNA καθαρίζεται και κατακερματίζεται σε μικρότερα και περίπου ισομήκη κλάσματα. Η επισήμανση λαμβάνει χώρα μετά το πέρας της υβριδοποίησης του εκχυλίσματος στη μικροσυστοιχία, όπου τροποποιημένα με στρεπταβιδίνη μόρια φυκοερυθρίνης προσδένονται στη βιοτίνη (Russell, Meadows et al. 2009). Η συγκεκριμένη μεθοδολογία είναι αυτή που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.

ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ

Μετά την παραγωγή του επισημασμένου εκχυλίσματος προς υβριδοποίηση από το κάθε βιολογικό δείγμα ακολουθεί το στάδιο της υβριδοποίησης. Το στάδιο αυτό περιλαμβάνει συνήθως αρκετά ενδιάμεσα βήματα, όπως (α) την αναστολή (blocking), μια κατάλληλη κατεργασία της μικροσυστοιχίας με σκοπό την ελαχιστοποίηση του σήματος θορύβου, (β) την προσθήκη του επισημασμένου εκχυλίσματος προς υβριδοποίηση στη μικροσυστοιχία κάτω από μια συγκεκριμένη θερμοκρασία, ώστε να επιτραπεί η αναδιάταξη των συμπληρωματικών αλληλουχιών, και (γ) την

έκπλυση, για την απομάκρυνση των ελεύθερων ή των ασθενώς υβριδοποιημένων στελεχών (Russell, Meadows et al. 2009).

ΑΝΑΣΤΟΛΗ

Πριν την υβριδοποίηση πραγματοποιείται μια κατάλληλη κατεργασία στη μικροσυστοιχία προκειμένου να ανασταλεί η μη ειδική υβριδοποίηση ανάμεσα στο επισημασμένο εκχύλισμα και στην επιφάνεια του πλακιδίου. Η αναστολή παρεμποδίζει τις περιοχές εκείνες στην επιφάνεια της μικροσυστοιχίας, οι οποίες παραμένουν δραστικές μετά την κατασκευή της, ούτως ώστε να περιοριστεί ο φθορισμός υποβάθρου. Γενικά υπάρχουν αρκετές μέθοδοι αναστολής καθεμία εκ των οποίων εξαρτάται από τη χημεία της επίστρωσης του πλακιδίου (Russell, Meadows et al. 2009).

ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ

Η υβριδοποίηση, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αφορά στο φαινόμενο όπου οι αναφορές της μικροσυστοιχίας και οι αλληλουχίες του επισημασμένου εκχυλίσματος υβριδοποίησης συνδέονται σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητα των *Watson-Crick*. Το φαινόμενο της υβριδοποίησης αποτελεί μια σύνθετη διεργασία, η οποία δεν έχει πλήρως αποσαφηνισθεί και εξαρτάται από μια πληθώρα παραγόντων, όπως (α) τη θερμοκρασία, (β) την υγρασία, (γ) τις συγκεντρώσεις αλάτων, (δ) τη συγκέντρωση φορμαμιδίου, (ε) τον όγκο του εκχυλίσματος προς υβριδοποίηση, και (στ) τον ανθρώπινο παράγοντα (Stekel 2003). Έτσι, για παράδειγμα εάν η θερμοκρασία είναι πολύ χαμηλή, τότε θα λάβει χώρα μη ειδική υβριδοποίηση (μείωση της ειδικότητας). Αντιθέτως, εάν η θερμοκρασία είναι πολύ υψηλή, τότε η επιθυμητή, ειδική υβριδοποίηση θα μειωθεί, έχοντας ως επακόλουθο την απώλεια σήματος (μείωση της ευαισθησίας). Επιπροσθέτως, ο χρόνος αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα, μιας και τα πραγματικά επίπεδα RNA ενός δείγματος δύναται να μετρηθούν μόνο όταν η αντίδραση υβριδοποίησης φτάσει σε χημική ισορροπία (Dorris, Nguyen et al. 2003), ενώ καθορίζεται από τη συγκέντρωση των υπό μελέτη αλληλουχιών του εκχυλίσματος προς υβριδοποίηση (Russell, Meadows et al. 2009). Στην πράξη, η υβριδοποίηση συνήθως λαμβάνει χώρα από 12 έως 24 ώρες, ώστε να διασφαλισθεί ότι η αντίδραση προσεγγίζει την κατάσταση χημικής ισορροπίας.

Υπάρχουν δύο βασικές μέθοδοι πραγματοποίησης της υβριδοποίησης: (α) η χειροκίνητη και (β) η αυτοματοποιημένη. Η χειροκίνητη μέθοδος περιλαμβάνει συνήθως την τοποθέτηση της μικροσυστοιχίας σε ένα θάλαμο υβριδοποίησης, την έγχυση από τον ερευνητή μιας σταγόνας εκχυλίσματος προς υβριδοποίηση πάνω στη μικροσυστοιχία, και το ερμητικό κλείσιμο του θαλάμου υβριδοποίησης με μια καλυπτρίδα. Εν συνεχεία, ο θάλαμος τοποθετείται σε επωαστήρα, ο οποίος διατηρεί τη μικροσυστοιχία στην επιθυμητή θερμοκρασία (Stekel 2003). Αν και η μέθοδος αυτή αποτελεί την πιο απλή και πιο οικονομική επιλογή, εντούτοις παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα.

Έτσι, είναι επιρρεπής στην εμφάνιση μεταβλητότητας τόσο μέσα στο ίδιο το πλακίδιο, όσο ανάμεσα και στα διαφορετικά πλακίδια, ενώ δύναται να επηρεαστεί αρκετά από τον ανθρώπινο παράγοντα. Επίσης, πέραν του ότι αποτελεί μια ιδιαιτέρως απαιτητική εργαστηριακή διαδικασία, δε συνίσταται όταν ο αριθμός των μικροσυστοιχιών, που πρέπει να κατεργασθούν παράλληλα, είναι αρκετά μεγάλος. Ακόμα, δύο αδυναμίες της χειροκίνητης μεθόδου αποτελούν η πιθανή εξάτμιση του δείγματος και η τάση σχετικά μειωμένης διάχυσης του δείγματος στο μικρό χώρο ανάμεσα στο πλακίδιο και στην καλυπτρίδα. Η τελευταία δύναται να αντιμετωπιστεί ακολουθώντας διάφορες τεχνολογίες ανάδευσης, όπως π.χ. με χρήση περιστρεφόμενων θαλάμων, όπως των (Vanderhoeven, Pappaert et al. 2005; Vanderhoeven, Pappaert et al. 2005).

Εναλλακτικά, η υβριδοποίηση δύναται να πραγματοποιηθεί με αυτοματοποιημένο τρόπο με χρήση ενός ρομποτικού σταθμού υβριδοποίησης, ο οποίος – μεταξύ άλλων – εφαρμόζει τεχνικές βελτίωσης της διάχυσης, συνήθως μέσω ανάδευσης. Στο εμπόριο διατίθενται αρκετά τέτοια συστήματα με διαφορετικές προδιαγραφές κυρίως ως προς τον αριθμό των πλακιδίων, που μπορούν να κατεργασθούν ταυτόχρονα, και την εφαρμοζόμενη τεχνολογία. Όμως, όλα τα αυτοματοποιημένα συστήματα έχουν ως γενικότερο στόχο τη σταθερότητα και αναπαραγωγισιμότητα των αποτελεσμάτων υβριδοποίησης, η οποία επιτυγχάνεται με ακριβή έλεγχο της θερμοκρασίας, περιορισμένη εξάτμιση του δείγματος, κάποιας μορφής ανάδευση για βελτίωση της διάχυσης. Έτσι, η αυτοματοποιημένη υβριδοποίηση ελαχιστοποιεί τον ανθρώπινο παράγοντα, τόσο ως προς το χρόνο απασχόλησης όσο και ως προς τη μεταβλητότητα, που τυχόν εισαγάγει, ενώ αποτελεί ένα σημαντικό βήμα για την μείωση της γενικότερης μεταβλητότητας και την τυποποίηση των πειραμάτων μικροσυστοιχιών (Yauk, Berndt et al. 2005). Εν κατακλείδι, και σύμφωνα με, τα δυνητικά οφέλη από τη χρήση του αυτοματοποιημένου συστήματος έναντι της χειροκίνητης μεθόδου, ιδιαίτερα όταν ο αριθμός των προς υβριδοποίηση μικροσυστοιχιών είναι μεγάλος, συνηγορούν υπέρ μιας τέτοιας επένδυσης (Σηφάκης 2012).

ΈΚΠΛΥΣΗ

Μετά το πέρας της αντίδρασης υβριδοποίησης ακολουθείται η έκπλυση. Το βήμα αυτό ακολουθείται για δύο κυρίως λόγους. Ο πρώτος αφορά την απομάκρυνση της περίσσειας του επισημασμένου εκχυλίσματος προς υβριδοποίηση από τη μικροσυστοιχία γεγονός, που διασφαλίζει ότι οι μόνες επισημασμένες αλληλουχίες πάνω στο πλακίδιο είναι οι υβριδοποιημένες με τις αναφορές αλληλουχίες. Ο δεύτερος αφορά την απομάκρυνση όσο το δυνατόν περισσότερων μερικώς υβριδοποιημένων αλληλουχιών, δηλαδή μειώνοντας την αλληλο-υβριδοποίηση.

Η έκπλυση, αντίθετα με την υβριδοποίηση, είναι αποτελεσματικότερη με χρήση μεγάλου όγκου διαλύματος (έκπλυσης), μιας και απομακρύνονται αποτελεσματικότερα οι ανεπιθύμητες προσμίξεις, οι οποίες δύναται να συνεισφέρουν στο σήμα υποβάθρου. Εντούτοις, τόσο η υβριδοποίηση όσο και η

έκπλυση είναι απαραίτητο να λαμβάνουν χώρα ομοιογενώς σε όλη την επιφάνεια της μικροσυστοιχίας, καθώς επίσης και να ακολουθεί ομοιόμορφη ξήρανσή της πριν τη σάρωση. Οποιαδήποτε ανομοιογένεια στην επιφάνειά της είναι πιθανό να οδηγήσει σε υψηλό και ετερογενές υπόβαθρο. Οι περισσότεροι σταθμοί υβριδοποίησης προσφέρουν και ένα κύκλο έκπλυσης ως μέρος της όλης αυτοματοποιημένης διαδικασίας (Σηφάκης 2012).

ΑΠΟΚΤΗΣΗ ΨΗΦΙΑΚΗΣ ΕΙΚΟΝΑΣ

Το τελευταίο βήμα της εργαστηριακής διαδικασίας αποτελεί η απόκτηση μιας ψηφιακής εικόνας της επιφάνειας της υβριδοποιημένης μικροσυστοιχίας. Η εικόνα αυτή λαμβάνεται με την τοποθέτηση του πλακιδίου μέσα σε ένα σαρωτή μικροσυστοιχιών, ο οποίος χρησιμοποιώντας μια πηγή φωτός στο κατάλληλο μήκος κύματος, ώστε να διεγερθεί η φθορίζουσα χρωστική των υβριδοποιημένων αλληλουχιών του δείγματος, ανιχνεύει την εκπεμπόμενη φθορίζουσα ακτινοβολία. Ο αντικειμενικός σκοπός του βήματος αυτού αποτελεί η μέτρηση της ποσότητας των επισημασμένων αλληλουχιών του δείγματος, οι οποίες έχουν υβριδοποιηθεί με τις αναφορές της μικροσυστοιχίας, κάνοντας την εύλογη παραδοχή ότι η ποσότητα αυτή εξαρτάται από την ένταση φθορισμού.

Η έξοδος του σαρωτή μικροσυστοιχιών, δηλαδή το αποτέλεσμα από τη σάρωση της επιφάνειας του πλακιδίου, είναι μια μονόχρωμη ψηφιακή εικόνα, όπου κάθε εικονοστοιχείο της (pixel) αναπαριστά την ένταση φθορισμού της αντίστοιχης περιοχής στην επιφάνεια του πλακιδίου. Τέτοιες εικόνες είναι συνήθως 16-bit μορφής TIFF (Tagged Image File Format), ενώ παράγεται μια για κάθε διαφορετικό μήκος κύματος σάρωσης[17]. Έτσι, στην περίπτωση των διχρωματικών μικροσυστοιχιών η έξοδος του σαρωτή αποτελείται συνήθως από δύο μονόχρωμες εικόνες, μία για το κάθε μήκος κύματος σάρωσης (ή κανάλι). Αυτές οι δύο εικόνες, αφού προστεθεί ψευδόχρωμα (κόκκινο και πράσινο για τις χρωστικές Cy5 και Cy3, αντίστοιχα) και ευθυγραμμιστούν, συνδυάζονται σε μια νέα εικόνα, τη γνώριμη σε όλους εικόνα των διχρωματικών μικροσυστοιχιών.

Οι σαρωτές μικροσυστοιχιών του εμπορίου δύναται να χωριστούν σε δύο γενικές κατηγορίες με βάση την πηγή διέγερσης και την τεχνολογίας ανίχνευσης: (α) τους σαρωτές LASER, και (β) τους σαρωτές CCD. Τα συστήματα της πρώτης κατηγορίας χρησιμοποιούν δέσμη LASER διαμέτρου μερικών μικρομέτρων (μm) για τη διέγερση των υβριδοποιημένων αλληλουχιών του δείγματος, και ένα φωτοπολλαπλασιαστή (PhotoMultiplier Tube – PMT) ως ανιχνευτή των παραγόμενων φωτονίων. Η δέσμη LASER σαρώνει όλη την επιφάνεια του πλακιδίου διεγείροντας κάθε φορά μια περιοχή μεγέθους ίση προς τη διάμετρό της (οπτική ανάλυση), ενώ το βήμα της αντιστοιχεί σε ένα εικονοστοιχείο και καθορίζει την ανάλυση εικονοστοιχείων της παραγόμενης εικόνας[18]. Η σάρωση

[17] Αυτό σημαίνει ότι η ένταση σε κάθε εικονοστοιχείο (και κάθε κανάλι) ποσοτικοποιείται ως ένας αριθμός16-bit, δηλαδή λαμβάνει τιμές από 0 έως 65.535.

[18] Έτσι, π.χ. για μια δέσμη LASER διαμέτρου 10 μm, η χρήση ανάλυσης εικονοστοιχείων χαμηλότερης των

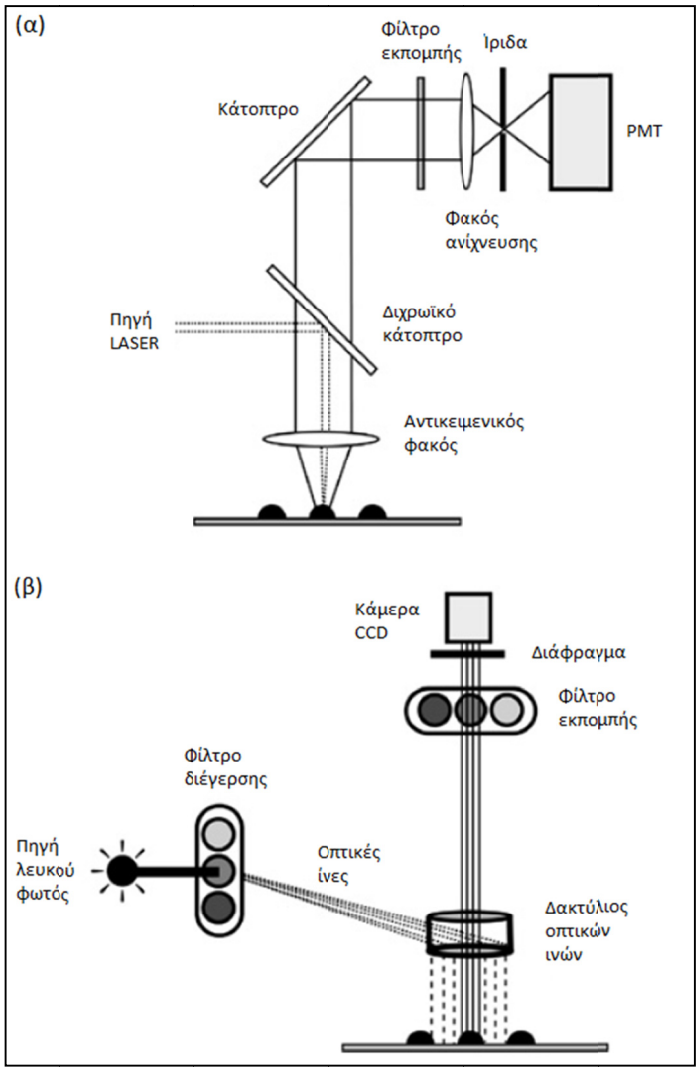
αυτή πραγματοποιείται είτε μετακινώντας το πλακίδιο, είτε το σύστημα των οπτικών. Στην περίπτωση των διχρωματικών μικροσυστοιχιών, η πλειοψηφία αυτού του τύπου των σαρωτών χρησιμοποιεί δύο διαφορετικά LASER. Τα συστήματα της δεύτερης κατηγορίας χρησιμοποιούν μια πηγή λευκού φωτός ευρέος φάσματος, όπως π.χ. ένα λαμπτήρα ατμών υδραργύρου, ως πηγή διέγερσης, και για ανιχνευτή μια κάμερα διάταξης συζευγμένου φορτίου (Charge-Coupled Device – CCD). Το επιθυμητό φάσμα διέγερσης, το οποίο επιλέγεται με τη βοήθεια κατάλληλων φίλτρων, διεγείρει μια μεγάλη περιοχή της μικροσυστοιχίας, και ο εκπεμπόμενος φθορισμός συλλέγεται μέσω διαφράγματος από τη κάμερα CCD [19]. Ο συνηθέστερος τύπος σαρωτών μικροσυστοιχιών είναι οι σαρωτές LASER (Σηφάκης 2012).

Η αγορά των σαρωτών μικροσυστοιχιών διαφοροποιείται διαρκώς, και σχεδόν ταυτόχρονα με την εξέλιξη των μικροσυστοιχιών DNA, ειδικά με τη διάθεση των τελευταίας γενιάς υπέρ-υψηλής πυκνότητας μικροσυστοιχιών. Έτσι, σήμερα υπάρχουν πολλά τέτοια διαθέσιμα συστήματα, η επιλογή ανάμεσα στα οποία θα πρέπει να βασίζεται και σε ορισμένα άλλα κριτήρια πέραν του κόστους, που αποτελεί το σημαντικότερο ίσως παράγοντα. Ανάμεσα τους – σύμφωνα με – είναι (α) η δυνατότητα αναβάθμισής του, (β) η επαρκής συντήρηση και υποστήριξή του από την αρμόδια εταιρεία, (γ) η μέγιστη δυνατή επιφάνεια σάρωσης, (δ) η ευαισθησία και ανάλυσή του, (ε) το παρεχόμενο λογισμικό, το οποίο θα πρέπει να είναι ευέλικτο και φιλικό προς το χρήστη, (στ) η δυνατότητα αυτόματης τροφοδοσίας πλακιδίων και αναγνώστη γραμμωτού κώδικα, σε περιπτώσεις υψηλού ρυθμού παραγωγής δεδομένων, (ζ) ο χρόνος σάρωσης, κ.α (Σηφάκης 2012).

---

10 μm τείνει να εξομαλύνει την εικόνα και να συγκαλύπτει τυχόν μικρές ανομοιογένειες των χαρακτηριστικών, χωρίς να προσφέρει επιπλέον πραγματική πληροφορία. Εντούτοις, γενικότερα θα πρέπει να επιλέγεται μια αρκετά μεγάλη ανάλυση εικονοστοιχείων προκειμένου να αντιστοιχεί ένας επαρκής αριθμός εικονοστοιχείων σε κάθε χαρακτηριστικό της μικροσυστοιχίας (τουλάχιστον ίσος με 50 εικονοστοιχεία).

[19] Η κάμερα CCD είναι μια διάταξη ημιαγωγών, που αντιστοιχούν σε εικονοστοιχεία, οι οποίοι αποθηκεύουν ένα ηλεκτρικό φορτίο, το οποίο παράγεται από το προσπίπτον φώς και είναι ανάλογο της έντασής του.

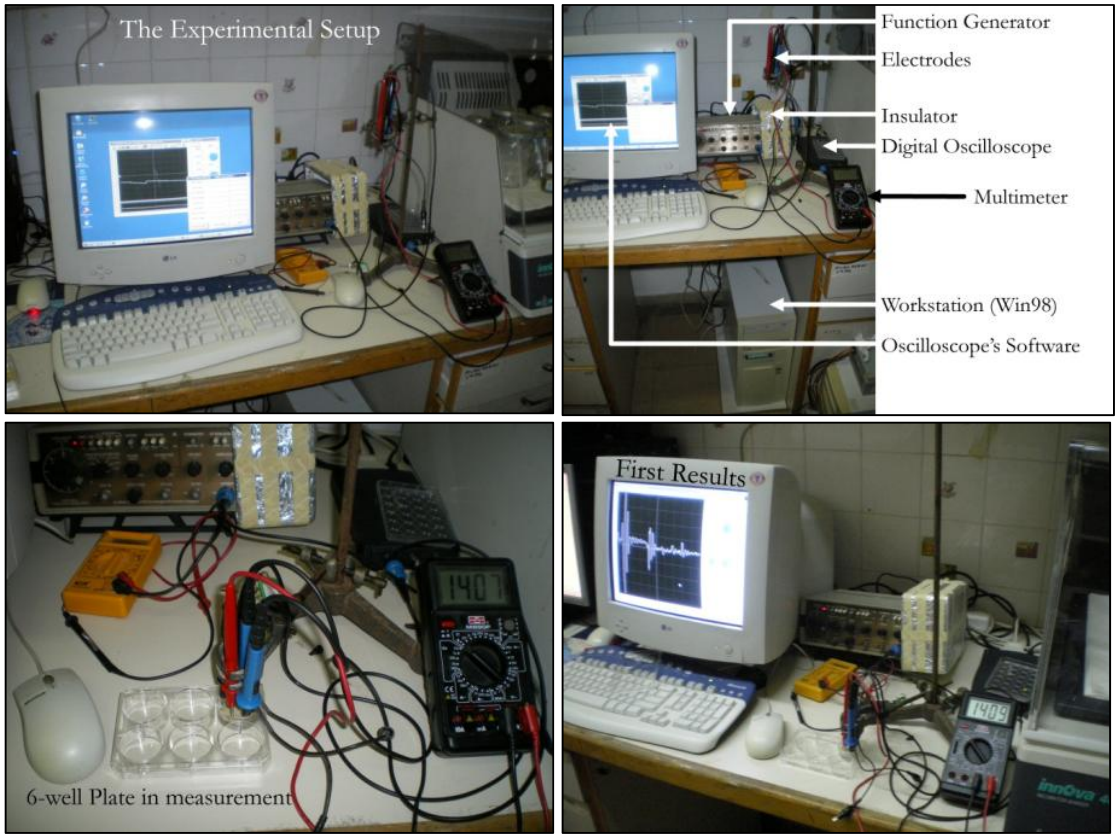


Εικόνα 77. Τύποι σαρωτών για μικροσυστοιχίες DNA. (α) Σαρωτής LASER. Η ακτίνα LASER ανακλάται από το διχρωϊκό κάτοπτρο (διακεκομμένες γραμμές), και περνώντας μέσα από τον αντικειμενικό φακό εστιάζεται στην επιφάνεια της μικροσυστοιχίας. Η εκπεμπόμενη φθορίζουσα ακτινοβολία (συνεχείς γραμμές) ανακλάται από το κάτοπτρο και περνά μέσα από κατάλληλο φίλτρο εκπομπής, το φακό ανίχνευσης, και την ίριδα για να καταλήξει στο φωτοπολλαπλασιαστή (PMT). (β) Σαρωτής CCD. Λευκό φώς υψηλής έντασης (διακεκομμένες γραμμές) διέρχεται μέσω κατάλληλου φίλτρου διέγερσης, ώστε να παραχθεί φώς στο επιθυμητό μήκος κύματος, το οποίο εν συνεχεία οδηγείται μέσω κατάλληλης διάταξης οπτικών ινών σε μια μεγάλη περιοχή της επιφάνειας του πλακιδίου, την οποία και διεγείρει. Η εκπεμπόμενη ακτινοβολία (συνεχείς γραμμές) διερχόμενη μέσω του φίλτρου εκπομπής και του διαφράγματος συλλέγεται από την κάμερα CCD. Το διάφραγμα ελέγχει τη διέλευση του φωτός στην κάμερα (Russell, Meadows et al. 2009)(Προσαρμοσμένο από (Σηφάκης 2012)).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 20

ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΣΧΕΤΙΚΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ

Η μετρήσεις ηλεκτροχημικών και φυσικοχημικών παραγόντων σε βιολογικά δείγματα είναι μια ιδέα, η οποία έχει ξεκινήσει ήδη από την εποχή των *Alessandro Volta* και *Luigi Galvani*, όπως περιγράψαμε στην εισαγωγή της παρούσης εργασίας. Από τον 20ο αιώνα, αυτού του είδους οι μετρήσεις επεκτάθηκαν σε διαφορετικά είδη βιολογικών δειγμάτων και περιελάμβαναν δείγματα από βιολογικά υγρά μέχρι ολόκληρο το ανθρώπινο σώμα. Ένα κλασσικό παράδειγμα είναι το ηλέκτρο-καρδιογράφημα (ΗΚΓ) του οποίου οι απαρχές βρίσκονται στο τέλος του 19ου αιώνα (Waller 1887) ή το ηλέκτρο-εγκεφαλογράφημα (ΗΕΓ) που αναπτύχθηκε από τον *Hans Berger* το 1929 (Berger 1933). Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε τις ηλεκτροχημικές και φυσικοχημικές ιδιότητες των καλλιεργητικών υγρών κατά τα στάδια της πολλαπλασιαστικής δυναμικής των κυττάρων. Υπάρχουν ήδη κάποιες συσκευές στο εμπόριο, που μπορούν να κάνουν τέτοιου είδους μετρήσεις αλλά το κόστος τους ήταν απαγορευτικό. Για το σκοπό αυτό συναρμολογήσαμε μόνοι μας μια πειραματική διάταξη με την οποία προσπαθήσαμε να ταυτοποιήσουμε τις αλλαγές σε δύο κυρίως παράγοντες: τη διηλεκτρική σταθερά των υγρών καλλιέργειας και την εμπέδηση. Τα δύο αυτά μεγέθη αναμενόταν ότι αλλάζουν ανάλογα με τις φάσεις από τις οποίες διερχόντουσαν τα κύτταρα. Οι μετρήσεις έγιναν με βάση το πολλαπλασιαστικό μοντέλο των χρονοσειρών. Δείγμα από τα κύτταρα σε καλλιέργεια λαμβανόταν σε 12ωρη βάση και μετράτο για τις φυσικοχημικές και ηλεκτροχημικές του ιδιότητες. Πιο συγκεκριμένα, μετρήσαμε την αντίσταση (*R*), τη χωρητικότητα (*C*), τη διαφορά δυναμικού (*V*) και την ένταση του ρεύματος (*I*). Επιπροσθέτως, έγινε προσπάθεια μέτρησης της τάσεως σε συνάρτηση με το χρόνο με τη χρήση γεννήτριας αρμονικών συναρτήσεων και παλμογράφου. Πιο συγκεκριμένα η διαδικασία ήταν: κύτταρα αφέθηκαν να μεγαλώσουν σε πλάκες τιτλοποίησης 6 πηγαδιών (6-well plates) και σε 24-ωρη βάση μετρούσαμε τις φυσικοχημικές παραμέτρους, που προαναφέραμε, στο θρεπτικό υλικό της κυτταρικής καλλιέργειας, από 0 ώρες έως 120 ώρες. Ως πείραμα ελέγχου χρησιμοποιήσαμε θρεπτικό υλικό το οποίο αφέθηκε στην καλλιέργεια, χωρίς κύτταρα και στις ίδιες πλάκες τιτλοποίησης και για ίσο χρονικό διάστημα με τα πειράματα. Τα πειράματα αυτά έγιναν σε εξαπλές επαναλήψεις. Ο λόγος που κάναμε τόσες επαναλήψεις ήταν η ύπαρξη μεγάλου θορύβου, λόγω των οργάνων μέτρησης. Στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 78**) παρουσιάζεται η πειραματική διάταξη που συναρμολογήσαμε και χρησιμοποιήσαμε.



Εικόνα 78. Η πειραματική διάταξη μέτρησης φυσικοχημικών και ηλεκτροχημικών παραγόντων. Η διάταξη αποτελείται από την υπολογιστική μονάδα, μια γεννήτρια συναρτήσεων (5MHz Function Generator 2005, Global Specialties Electronics, USA), έναν ψηφιακό παλμογράφο (DSO2100, Hung Chang Industries, China), ένα πολύμετρο (M890F, MASTECH, PRECISION MASTECH ENTERPRISES (HONG KONG) LIMITED) και ένα πολύμετρο για τις μετρήσεις του σήματος εξόδου (CM2400, TELE, Aspropyrgos, Hellas).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 21

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ, ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΑ ΕΡΓΑΛΕΙΑ ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ

Έγινε προσπάθεια προσομοίωσης των δεδομένων και εφαρμογής τους πάνω σε ένα γενικότερο πλαίσιο μαθηματικής διατύπωσης. Τα δεδομένα ταξινομήθηκαν με το πρόγραμμα Microsoft Ecxel® (Microsoft Corporation) και όλες οι αναλύσεις και διαγράμματα, εικόνες έγιναν με το υπολογιστικό περιβάλλον MATLAB (The Mathworks Inc. Natick MA) με τη δημιουργία κώδικα.

ΒΑΣΙΚΟΙ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΟΙ ΟΡΙΣΜΟΙ

Στην υποενότητα αυτή θα αναφερθούμε στις βασικές μαθηματικές έννοιες, πάνω στις οποίες στηρίχθηκαν όλα τα υπόλοιπα παρατιθέμενα στοιχεία και αναλύσεις. Θα αναφερθούμε σε βασικούς μαθηματικούς ορισμούς, θεωρήματα και προτάσεις.

Ορισμός 9. **Ορισμός της συνάρτησης *ένα-προς-ένα (1-1)***: $\underset{ορσ.}{\Leftrightarrow} \forall y \in \mathrm{R}(f)\ \exists\ x \in \mathrm{D}(f) : \mathrm{f}(x) = y\}$.

Ορισμός 10. **Ορισμός της συνάρτησης *ένα-προς-ένα (1-1)*** : {θα λέμε ότι η f είναι (1-1)} $\underset{ορσ.}{\Leftrightarrow}$ $\{\forall x_1, x_2\, D(f) με\, x_1 \neq x_2 \Rightarrow f(x_1) \neq f(x_2)\}$.

Ορισμός 11. Ορισμός της συνάρτησης *ένα-προς-ένα (1-1)* : {θα λέμε ότι η f είναι (1-1)}: $\underset{ορσ.}{\Leftrightarrow}$ $\{\forall x_1, x_2 \in D(f) με\, f(x_1) = f(x_2) \Rightarrow x_1, x_2\, x_1 = x_2\}$.

Ορισμός 12. **Η έννοια της συνάρτησης γενικά**: Έστω δύο μη κοινά σύνολα ***A***, ***B***. Το τυχαίο στοιχείο του ***A*** το συμβολίζουμε με x και το τυχαίο στοιχείο του ***B*** με y. Έστω ότι κάθε στοιχείο x του ***A*** με κάποιο νόμο ή διαδικασία f αντιστοιχεί σε ένα μόνο στοιχείο y του ***B***, τότε το νόμο f το λέμε <u>συνάρτηση</u> (ή μονοσήμαντη απεικόνιση) του ***A*** στο ***B***. Για να δηλώσουμε ότι έχουμε μία συνάρτηση f του ***A*** στο ***B*** γράφουμε: <u>έστω η συνάρτηση f του ***A*** στο ***B***: f: ***A→B***</u>. Στη συνάρτηση f: ***A→ B***, αν το x , έχει αντίστοιχο στοιχείο το $y \in$ ***B*** το γράφουμε $y=f(x)$ και λέμε ότι ο x είναι αρχέτυπο του y και ότι ο y είναι εικόνα το x ή ότι το y είναι η τιμή της συνάρτησης y στο x.

Παρατηρούμε ότι από τον ορισμό της συνάρτησης *f:* $A\rightarrow B$, εννοούμε ότι: Είναι δυνατό περισσότερα από ένα στοιχεία του ***A*** να έχουν την ίδια εικόνα στο ***B***. Επίσης, είναι δυνατό να υπάρχει στοιχείο του ***B*** που να μην είναι τιμή της συνάρτησης.

Ορισμός 13. **Πεδίο ορισμού συνάρτησης**: Έστω η συνάρτηση *y:****A****→****B***. Το σύνολο ***A*** το λέμε πεδίο ορισμού και το συμβολίζουμε με το *D(f)*. Το ***B*** το λέμε σύνολο άφιξης. Το σύνολο των στοιχείων του ***B*** που είναι τιμές της *f*, το λέμε πεδίο τιμών της *f* και το συμβολίζουμε με *f(****A****)* ή με *R(f)*, δηλαδή $\{R(f) = \{y \in B : \exists x \in A \,\mu\varepsilon\, f(x) = y\}$ και ισχύει $R(f) \subseteq B$. Αν συμβαίνει να είναι *R(f)*=***B***, τότε τη συνάρτηση τη λέμε του ***A*** *επί του* ***B***.

Ορισμός 14. **Γράφημα – Γραφική Παράσταση Συνάρτησης**: Έστω η συνάρτηση *y* το σύνολο των διαταγμένων ζευγών: πρότυπο – εικόνα δηλαδή το σύνολο $\{x,f(x),\ \forall x \in D(f)\}$. Το συμβολίζουμε S_f και το λέμε γράφημα της συνάρτησης *f*.

Παρατήρηση: Είναι γνωστό, όμως, ότι κάθε ζευγάρι πραγματικών αριθμών παριστάνεται γεωμετρικά στο καρτεσιανό σύστημα συντεταγμένων $x\times y$ με ένα σημείο. Άρα, το γράφημα S_f παριστάνει γεωμετρικά ένα σύνολο σημείων όπου το κάθε ένα έχει τετμημένη $x \in D(f)$ και τεταγμένη την αντίστοιχη τιμή της *f* στην θέση *x*, δηλαδή το *f(x)*, που το λέμε ***γραφική παράσταση*** της *y* ή διάγραμμα της *f*.

Ορισμός 15. **Πραγματική Συνάρτηση – Πραγματικές Μεταβλητές**: Τις συναρτήσεις *f:* ***A****→****B***, όπου $\boldsymbol{A} \subseteq R$ και $\boldsymbol{B} \subseteq R$, θα τις λέμε πραγματικές συναρτήσεις πραγματικών μεταβλητών.

Στη συνέχεια, με τον όρο συνάρτηση θα εννοούμε τη πραγματική συνάρτηση πραγματικών μεταβλητών με τις οποίες θα ασχοληθούμε. Τις συναρτήσεις αυτές θα τις ορίσουμε με μία παράσταση $f_{(x)}$ του *x*.

Ορισμός 16. **Μονοτονία συνάρτησης**: θα λέω ότι η *f* είναι γνησίως αύξουσα στο $\boldsymbol{A} \subseteq D(f)$ $\underset{ορσ.}{\Leftrightarrow}$
$\{\forall x_1, x_2 \in A \,\mu\varepsilon\, x_1 < x_2 \Rightarrow f(x_{1)} < f(x_2)\}$.

Ορισμός 17. **Μονοτονία συνάρτησης**: θα λέω ότι η *f* είναι γνησίως φθίνουσα στο $\boldsymbol{A} \subseteq D(f)$ $\underset{ορσ.}{\Leftrightarrow}$
$\{\forall x_1, x_2 \in A \,\mu\varepsilon\, x_1 > x_2 \Rightarrow f(x_{1)} > f(x_2)\}$.

Ορισμός 18. **Άρτια Συνάρτηση**: θα λέμε ότι η f είναι άρτια $\underset{ορσ.}{\Leftrightarrow}$
$$\left\{\forall x \in D(f) \,\iota\sigma\chi\acute{\upsilon}ουν \begin{matrix} \alpha\cdot(-x) \in D(f) \\ \beta\cdot f(-x) = f(x) \end{matrix}\right\}.$$

Ορισμός 19. **Περιττή Συνάρτηση**: θα λέμε ότι η f είναι περιττή $\underset{ορσ.}{\Leftrightarrow}$ $\forall x\in D(f)\iota\sigma\chi\acute{υ}ουν \begin{matrix}\alpha.(-x)\in D(f)\\ \beta.f(-x)=-f(x)\end{matrix}$.

Ορισμός 20. **Περιοδική Συνάρτηση**: θα λέμε ότι η f είναι περιοδική $\underset{ορσ.}{\Leftrightarrow}$ $\exists\tau\in R^{*}:\forall x\in D(f)\nu\alpha\iota\sigma\chi\acute{υ}ουν:\begin{cases}\alpha\cdot(x+\tau)\in D(f)\\ \beta\cdot f(x+\tau)=f(x)\end{cases}$. Το τ το λέμε περίοδο της f.

Π.χ. είναι γνωστό ότι το $ημ(x+2\pi)=ημx$ για όλη τη συνάρτηση $f(x)=ημx$. Ισχύει λοιπόν $f(x+2\pi)=f(x)$, άρα είναι περιοδική και μία περίοδος της είναι το 2π.

Παρατήρηση: Από τον **Ορισμός 20** μπορεί να δειχθεί ότι αν έστω η f μια περιοδική συνάρτηση και τ μία περίοδος της. Οι αριθμοί ν, τ $\forall x\in\mathbb{Z}^{*}$ είναι επίσης περίοδοι, (δηλαδή αν μία συνάρτηση έχει περίοδο, τότε έχει άπειρες περιόδους). Την πιο μικρή από τις θετικές περιόδους (αν υπάρχει) τη λέμε *βασική* περίοδο.

Ορισμός 21. Σύνθεση Συναρτήσεων: Έστω οι συναρτήσεις $g\wedge f$. Ο τύπος $f(g(x))$ έχει νόημα για τα x εκείνα για τα οποία είναι $x\in D(g)\mu\varepsilon\, g(x)\in D(f)$. Αν λοιπόν, το σύνολο $A=\mathrm{x}\in D(g):g(x)\in D(f)\varepsilon\acute{ι}\nu\alpha\iota\neq\varnothing$ τότε ο τύπος $f(g(x))$ ορίζει τη συνάρτηση, $\forall x\in A$, που τη συμβολίζουμε $h=f\circ g$ και τη λέμε *Σύνθεση των g και f*.

Ορισμός 22. **Συνέχεια συνάρτησης σε σημείο**: Θα λέμε ότι η f είναι συνεχής στο $\mathrm{x}_0\in\mathrm{D(f)}$ $\underset{ορσ.}{\Leftrightarrow}$ $\left\{\lim_{\mathrm{x}\longrightarrow\mathrm{x}_0}\mathrm{f(x)}=\mathrm{f}(\mathrm{x}_0)\right\}$.

Ορισμός 23. **Συνέχεια συνάρτησης σε όλο το πεδίο ορισμού**: Θα λέμε ότι η f είναι συνεχής η f $\underset{ορσ.}{\Leftrightarrow}$ είναι συνεχής σε κάθε σημείο του $D(f)$.

Ορισμός 24. **Πλευρική συνέχεια**: Θα λέμε ότι η f είναι συνεχής αριστερά στο $\mathrm{x}_0\in\mathrm{D}(f)$ $\underset{ορσ.}{\Leftrightarrow}$ $\left\{\lim_{\mathrm{x}\longrightarrow\mathrm{x}_0^{-}}\mathrm{f(x)}=\mathrm{f}(\mathrm{x}_0)\right\}$.

Ορισμός 25. **Πλευρική συνέχεια**: Θα λέμε ότι η f είναι συνεχής από δεξιά στο $\mathrm{x}_0 \in \mathrm{D}(f) \underset{\text{ορσ.}}{\Leftrightarrow} \left\{ \lim_{\mathrm{x} \longrightarrow \mathrm{x}_0^+} \mathrm{f}(\mathrm{x}) = \mathrm{f}(\mathrm{x}_0) \right\}$.

Ορισμός 26. **Λόγος Μεταβολής**: Έστω μια συνάρτηση *f* και $x_0 \in D(f)$. Θεωρώ μια νέα συνάρτηση με τύπο $\frac{f(x)-f(x_0)}{x-x_0} \forall x \in D(f) - \{x_0\}$. Τη συνάρτηση αυτή την ονομάζουμε *λ(χ)* και τη λέμε λόγο μεταβολής της *f* μεταξύ των x_0 και x ή πηλίκο διαφόρων της *f* στο x_0 δηλαδή $\lambda(x) = \frac{f(x)-f(x_0)}{x-x_0}, x \in D(f) - \{x_0\}$.

Ορισμός 27. Παράγωγος: Έστω η *f*, $x_0 \in D(f)$ *Θα λέμε ότι η f είναι παραγωγίσιμη στο x0* $\underset{\text{ορσ.}}{\Leftrightarrow} \left\{ \exists \sigma\tau o\ \mathbb{R} \tau o \lim_{x \to x_0} \lambda(x) \right\}$. $\lim_{x \to x_0} \lambda(x) = f'(x_0)$ και το λέμε παράγωγο της *f* στο x_0 δηλαδή $f'(x_0) = \lim_{x \to x_0} \frac{f(x)-f(x_0)}{x-x_0} \in \mathbb{R}$.

Ορισμός 28. **Συνάρτηση Πρώτης, Δεύτερης κ.λ.π. Νιοστής Παραγώγου**: Έστω η *f* ΠΑΡΑΓΩΓΙΣΙΜΗ. Ορίζουμε μία νέα συνάρτηση ως εξής: Κάθε $x_0 \in D(f) \rightarrow \mathrm{f}'(\mathrm{x}_0) = \lim_{\mathrm{x} \to \mathrm{x}_0} \frac{\mathrm{f}(\mathrm{x}) - \mathrm{f}(\mathrm{x}_0)}{\mathrm{x} - \mathrm{x}_0}$. Τη νέα συνάρτηση την ονομάζουμε συνάρτηση πρώτης παραγώγου *f* και τη συμβολίζουμε *f'(x)* ή $f^{(1)}$ ή $\frac{\mathrm{df(x)}}{\mathrm{dx}}$. Προφανώς *D(f')=D(f)*. Αν η *f* ήταν παραγωγίσιμη σε ένα πεδίο $\Delta \subseteq D(f)$, τότε πάλι ορίζεται η συνάρτηση *f'(x)* αλλά $D(f')=\Delta$. Θεωρούμε τώρα τη συνάρτηση *g(x)=f'(x)*. Δέχομαι ότι η *g* είναι παραγωγίσιμη, οπότε ορίζω όπως και προηγουμένως τη συνάρτηση *g'(x)*, που τη συμβολίζω *f''(x)* ή $f^{(2)}(x)$ ή $\frac{d^2 f(x)}{d^2 x}$ και τη λέω *συνάρτηση δεύτερης παραγώγου* της *f*. Οπότε, επαγωγικά μπορώ να ορίσω τη συνάρτηση νιοστής παραγώγου της συνάρτησης *f*, που τη συμβολίζουμε $f^{(n)}(x)$ ή $\frac{d^n f(x)}{d^n x}$.

Ορισμός 29. $\alpha_1 + \alpha_2 + \cdots + \alpha_\nu = \sum_{\kappa-1}^{\nu} \alpha_\kappa$.

Ορισμός 30. $\sum_{\kappa-1}^{\nu}(\lambda\alpha_{\kappa})=\lambda\sum_{\kappa-1}^{\nu}\alpha_{\kappa}$.

Ορισμός 31. $\sum_{\kappa-1}^{\nu}(\alpha_{\kappa}\pm\beta_{\kappa})=\sum_{\kappa-1}^{\nu}\alpha_{\kappa}\pm\sum_{\kappa-1}^{\nu}\beta_{\kappa}$.

Ορισμός 32. Έστω το διάστημα *[a,β]* και το x_0, x_1, x_2,…,x_n στοιχεία του τέτοια ώστε $\left\{\begin{array}{c}\alpha\cdot x_0=a\cdot x_{\nu}=\beta\\ \beta\cdot x_0<x_1<x_2\cdots<x_{\nu}\end{array}\right\}$, τότε το σύνολο $\delta=\{x_0,x_1,x_2,\ldots x_n\}$ το λέμε μια διαμέριση του *[a,β]*. Ορίζουμε το θετικό αριθμό $x_k-x_{k-1}=\delta x_k\ \forall\kappa=1,2,...,n$. Το μέγιστο (max) του συνόλου {*δx1, δx2,…,δxn*} το συμβολίζουμε $\varpi(\sigma)$ και το λέμε πλάτος της διαμέρισης.

Ορισμός 33. Έστω η *f* συνεχής στο [α, β] και $\delta=\{x_0,x_1,x_2,\ldots x_n\}$ μία διαμέριση του [α, β]: $\left\{\begin{array}{l}Έστω\,\xi_1\,τυχαίο\ του\ [x_0,x_1]\\ Έστω\,\xi_2\,τυχαίο\ του\ [x_1,x_2]\\ Έστω\,\xi_{\nu}\,τυχαίο\ του\ [x_{\nu-1},x_{\nu}]\end{array}\right\}$,

δηλαδή έχω ξ_{κ} τυχαίο των $_{[xk-1,\ xk]}$, *k=1,2,3,…,n.* Σχηματίζω το άθροισμα $f(\xi_1)\delta x_1+f(\xi_2)\delta x_2+...+f(\xi_{\nu})\delta x_{\nu}=\sum_{\kappa=1}^{\nu}f(\xi_{\kappa})\delta x_{\kappa}$. Δηλαδή έχω τη διαμέριση *δ* με πλάτος $\varpi(\sigma)$ και τον αριθμό $\sum_{\kappa=1}^{n}f(\xi_{\kappa})\delta x_{\kappa}$ με ξ_n τυχαίο του $[x_{k-1},x_k]$. Θεωρώ ότι αντιστοιχεί στην ακολουθία πλατών $\varpi(\delta_n)$ και στην ακολουθία $\sum_{\kappa=1}^{\nu}f(\xi_{\kappa})\delta x_{\kappa},\nu\in\mathbb{N}^*$, όπου ξ_k τυχαίο του $[x_{k-1},x_k]$. Αν για την ακολουθία δ_n συμβαίνει η ακολουθία $\varpi(\delta_n)$ να είναι μηδενική, τότε αποδεικνύεται ότι η ακολουθία $\sum_{\kappa=1}^{\nu}f(\xi_{\kappa})\delta x_{\kappa},\nu\in\mathbb{N}^*$ συγκλίνει στο $\mathbb{R}$ και το $lim\sum_{\kappa=1}^{\nu}f(\xi_{\kappa})\delta x_{\kappa}\underline{\underline{συμβ.}}\int_{\alpha}^{\beta}f(x)dx$ και το λέμε ολοκλήρωμα ή άθροισμα *f* από *a* έως *β*, δηλαδή $\int_a^b f(x)dx=\lim\sum_{k=1}^{n}(\xi_k)\delta x_k,\xi_k\in[x_{k-1},x_k]$.

Ορισμός 34. $\int_{\alpha}^{\beta}=\int_{\alpha}^{\gamma_1}+\int_{\gamma_1}^{\gamma_2}+\int_{\gamma_2}^{\gamma_3}+\cdots+\int_{\gamma_{\kappa}}^{\beta}$, όπου $\gamma_1,\gamma_2,\ldots,\gamma_{\nu}\in[\alpha,\beta]$ τυχαίοι.

Ορισμός 35. $\int_{\alpha}^{\beta} F'(x)\, g(x)dx = [F(x)]_{\alpha}^{\beta} - \int_{\alpha}^{\beta} F(x)\, g(x)dx$. Η *F(x)* λέγεται *παράγουσα συνάρτηση* της *f(x)*.

#

Ορισμός 36. Εμβαδό: Έστω η *f* συνεχής στο [α, β] με $f(x) \geq 0, \forall x \in [a,\beta]$. Αν *E* είναι το εμβαδό που περικλείεται από το γράφημα της *f*, του *xx'* και τις ευθείες με εξισώσεις *x=a* και *x=β*, τότε αποδεικνύεται ότι $\mathrm{E} = \int_{\alpha}^{\beta} f(x)\, dx$.

ΠΟΛΥΩΝΥΜΙΚΕΣ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙΣ

Η πρώτη κατηγορία προσομοιώσεων που χρησιμοποιήθηκε αφορούσε στην προσπάθεια προσέγγισης των κυτταρομετρικών και πολλαπλασιαστικών δεδομένων. Έγινε δηλαδή προσπάθεια περιγραφής ενός φαινομένου με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι δυνατή μια γενικευμένη περιγραφή του, τουλάχιστον στο βαθμό που επιτρέπει το εύρος των δεδομένων. Έτσι λοιπόν, για τα χρονικά όρια και συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν η καταλληλότερη μέθοδος παρουσιάστηκε να είναι η πολυωνυμική.

Οι πολυωνυμικές συναρτήσεις ακολουθούν το γενικό τύπο:

$y = a_n x^n + a_{n-1} x^{n-1} + \ldots + a_1 x + a_0$, **Εξίσωση 26**

Πιο συγκεκριμένα, για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν πολυωνυμικές συναρτήσεις 3ου βαθμού ή αλλιώς της μορφής:

$y = a_3 x^3 + a_2 x^2 + a_1 x + a_0$, **Εξίσωση 27**

Με τον τρόπο αυτό έγιναν γενικευμένα μοντέλα της συμπεριφοράς των κυττάρων *in vitro*.

ΕΚΘΕΤΙΚΕΣ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙΣ

Οι εκθετικές συναρτήσεις αποτελούν ένα πολύ σημαντικό εργαλείο στη μελέτη των βιολογικών συστημάτων. Ένα από τα πρώτα μοντέλα πληθυσμιακής αύξησης ήταν το γνωστό *Μαλθουσιανό* μοντέλο, από τον *Thomas Robert Malthus* (Malthus and Jesus 1826). Το μοντέλο αυτό στηριζόταν στις εκθετικές συναρτήσεις και ήταν της μορφής:

$p(t) = p_0 e^{rt}$, **Εξίσωση 28**

Όπου *p(t)* ο πληθυσμός συναρτήσει του χρόνου, p_0 ο αρχικός πληθυσμός, *r* ο ρυθμός ανάπτυξης του πληθυσμού και *t* ο χρόνος.

ΣΙΓΜΟΕΙΔΕΙΣ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙΣ

Η οικογένεια των σιγμοειδών συναρτήσεων, όπως τις περιγράψαμε και στην εισαγωγή της παρούσης εργασίας, αποτελεί μια πολύ απλή και αρκετά μελετημένη οικογένεια συναρτήσεων. Ένα από τα βασικά πλεονεκτήματά της είναι ότι , σε αντίθεση με τις εκθετικές συναρτήσεις, η σιγμοειδής λαμβάνει υπόψη της τον περιορισμό των πόρων ήτοι, τροφής, χώρου και λοιπών παραγόντων.

Η βασική δομή της συνάρτησης αυτής είναι:

f(x)=kx(1-x)

όπως την περιγράψαμε στις προηγούμενες ενότητες.

Και στην πιο ανεπτυγμένη μορφή της γίνεται:

$f(x_{n+1})=kx_n(1-x_n)$, **Εξίσωση 29**

και

$\dot{x} = kx_n(1-x_n)$, **Εξίσωση 30**

Όπου ο παράγοντας $\dot{x}$, είναι η πρώτη παράγωγος του πληθυσμού ως προς το χρόνο.

Όπως αναφερθήκαμε και στην εισαγωγή, η συνάρτηση αυτή μπορεί να παρουσιάσει πολύ περίπλοκη συμπεριφορά για διάφορες τιμές του *k*. Είναι μια από τις συναρτήσεις που προσομοιάζουν αρκετά την πολλαπλασιαστική δυναμική των κυττάρων και δείχνουν την ύπαρξη μη-γραμμικών φαινομένων (ήτοι χαοτικών) στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Με τον τρόπο αυτό προσπαθούμε να προσεγγίσουμε ένα από τα κύρια ερωτήματα της παρούσης εργασίας, που είναι η ύπαρξη μη-γραμμικών, χαοτικών μοντέλων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

ΣΥΝΑΡΤΗΣΗ ΚΑΙ ΕΚΘΕΤΗΣ *LYAPUNOV*

Η συνάρτηση και εκθέτης *Lyapunov* ονομάστηκαν από τον εμπνευστή τους μαθηματικό *Aleksandr Mikhailovich Lyapunov*. Η συνάρτηση αυτή χρησιμοποιείται ως κριτήριο ισορροπίας στις διαφορικές εξισώσεις. Τέτοιο παράδειγμα είναι και η σιγμοειδής συνάρτηση. Μια συνάρτηση *Lyapunov* ορίζεται ως:

Ορισμός 37. Έστω μια απεικόνιση $V:\mathbb{R}^n \to \mathbb{R}$, συνεχής και παραγωγίσιμη στο $\mathbb{R}$, θα λέμε ότι η απεικόνιση V είναι μια συνάρτηση *Lyapunov* όταν $V(0)=0$ και $V(x)>0, \forall x \in U$, όπου U είναι μια περιοχή στο $\mathbb{R}$, όπου $\exists \varepsilon : N_\varepsilon(p) = \{x \in \mathbb{R} : |x-p| < \varepsilon\}$.

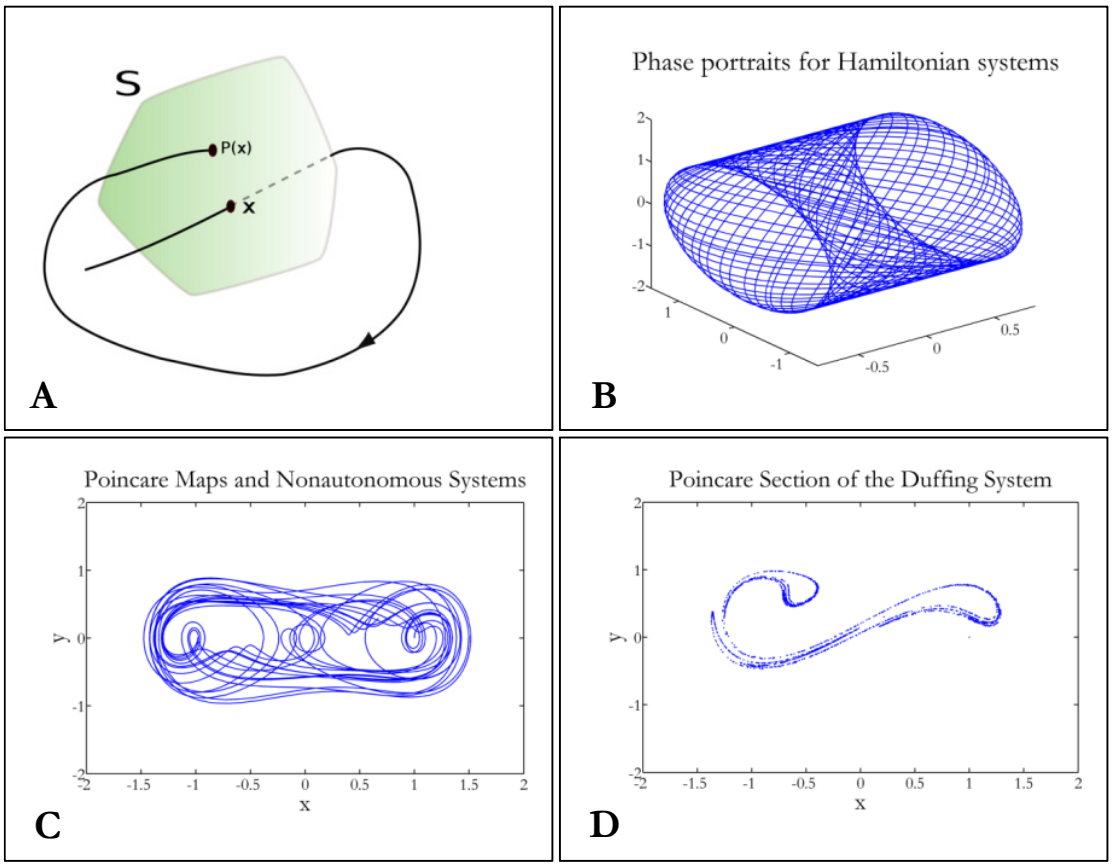
Αντίστοιχα ο αριθμός και εκθέτης *Lyapunov* ορίζονται ως:

Ορισμός 38. Έστω *f* μια συνεχής συνάρτηση στο $\mathbb{R}$. Ο αριθμός *Lyapunov L(x1)* για το γράφημα $\{x_1,x_2,\ldots,x_n\}$ ορίζεται ως $L(x_1) = \lim_{n\to\infty}\left(|f'(x_1)|\ldots|f'(x_n)|\right)^{\frac{1}{n}}$, αν υπάρχει το όριο αυτό. Κατά συνέπεια ο εκθέτης *Lyapunov* ορίζεται ως $h(x_1) = \lim_{n\to\infty}\frac{1}{n}\left(\ln|f'(x_1)| + \ldots + \ln|f'(x_n)|\right)$.

Η συνάρτηση και ο εκθέτης *Lyapunov* χρησιμοποιήθηκαν ως διερευνητικοί παράγοντες για την ύπαρξη μη-γραμμικών φαινομένων στα πειραματικά αποτελέσματα.

ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΕΙΣ *POINCARE*

Οι απεικονίσεις Poincare, πήραν το όνομά τους από τον εμπνευστή τους Henri Poincare, στον οποίο αναφερθήκαμε στην εισαγωγή της παρούσης εργασίας. Η βασική ιδιότητα της απεικόνισης αυτής είναι ότι δίνει μια διαφορετική οπτική σε συνεχείς περίπλοκες συναρτήσεις, των οποίων οι τροχιές δηλαδή τα γραφήματα είναι περίπλοκα για να μελετηθούν. Έτσι, αυτό που ειπώθηκε ήταν ότι αντί κανείς να μελετήσει ολόκληρη την τροχιά/γράφημα που διαγράφει μια συνάρτηση αρκεί να βρει τα σημεία τομής ή διέλευσης του γραφήματος από ένα επίπεδο δύο διαστάσεων. Έστω λοιπόν ότι το γράφημα S_f της συνάρτησης *f* τέμνει το επίπεδο σε δύο σημεία ***A*** και ***B***. Αν το ***A*** είναι η *κ* φορά που τέμνει το επίπεδο και ***B*** είναι η *κ+1* φορά που η συνάρτηση τέμνει το επίπεδο, τότε αποδεικνύεται ότι υπάρχει μια απεικόνιση *G:G(A)=B*. Με τον τρόπο αυτό ένα δυναμικό σύστημα *n* διαστάσεων μετασχηματίζεται σε *n-1* διαστάσεις. Παραθέτουμε στην επόμενη εικόνα (**Εικόνα 79**) μερικά πολύ ενδιαφέροντα παραδείγματα καθώς και την τομή Poincare διαγραμματικά.



Εικόνα 79. Παραδείγματα των τομών *Poincare*. Ένα γράφημα (P(x)) τέμνει μια επιφάνεια σε δύο σημεία όπου ισχύει *x=P(x)* (**A**). Το γράφημα μιας *Χαμιλτονιανής* συνάρτησης (**B**) με την αντίστοιχη τομή *Poincare* (**C**). Απεικόνιση Poincare για ένα σύστημα *Duffing*, φθινουσών ταλαντώσεων (**D**).

ΙΔΙΟΔΙΑΝΥΣΜΑΤΑ (*EIGENVECTORS*), ΙΔΙΟΤΙΜΕΣ (*EIGENVALUES*) ΚΑΙ ΙΔΙΟΧΩΡΟΙ (*EIGENSPACES*)

Ως ιδιοτιμή (*eigenvalue*) ορίζουμε κάθε τιμή για την οποία ισχύει:

$A\vec{v} = \lambda\vec{v}$, όπου λ είναι η ιδιοτιμή του διανύσματος **v** και **A** είναι ένας πίνακας $n \times n$.

Αντίστοιχα, το διάνυσμα v ονομάζεται ιδιοδιάνυσμα (*eigenvector*) και αποδεικνύεται ότι:

$\vec{v}_{n+1} = A\vec{v}_n$, **Εξίσωση 31**.

Αντίστοιχα, ένας ιδιοχώρος (*eigenspace*) είναι το σύνολο όλων των ιδιοδιανυσμάτων με την ίδια ιδιοτιμή.

Οι ορισμοί αυτοί (και ταυτόχρονα εργαλεία ανάλυσης) είναι εξαιρετικά χρήσιμα στους μετασχηματισμούς πινάκων. Δεδομένου ότι η ανάλυση των μικροσυστοιχιών απαρτίζεται κυρίως από

πίνακες δεδομένων, οι ορισμοί αυτοί αποτελούν ένα εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο για την ανάλυση και κατανόηση των βιολογικών φαινομένων που μελετώνται με μικροσυστοιχίες.

Πιο συγκεκριμένα, ο ιδιοτιμές και ιδιοδιανύσματα χρησιμοποιούνται από τη μέθοδο *Principal Component Analysis* (PCA) που χρησιμοποιείται στις μικροσυστοιχίες για την ανεύρεση εκφρασιακών προφίλ.

Κοιτώντας λίγο πιο προσεκτικά την $\vec{v}_{n+1} = A\vec{v}_n$, **Εξίσωση 31** παρατηρούμε ότι θυμίζει αρκετά την αναδρομική συνάρτηση που αναφέραμε σε προηγούμενη υποενότητα. Κατά συνέπεια βλέπουμε ότι στην πολλαπλασιαστική δυναμική οι μεταβολές του πληθυσμού είναι δυνατό να έχουν ιδιοτιμές ή ιδιοδιανύσματα.

ΣΥΝΤΟΜΗ ΑΝΑΦΟΡΑ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΚΑΙ ΛΟΙΠΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ (ΜΕΡΟΣ ΙΙ)

Στο σημείο αυτό επανερχόμαστε στην ανάλυση των δεδομένων των μεταβολικών και μιτοχονδριακών παραγόντων για να κάνουμε τη σωστή διατύπωσή τους. Η δομή που περιγράψαμε στην **Εικόνα 67** είναι μια εξαιρετικά περίπλοκη δομή, όπου έχουμε έναν πίνακα του οποίου τα στοιχεία αποτελούνται από ορίζουσες. Η ανάλυση αυτής της δομής δεν είναι καθόλου απλή και στην παρούσα εργασία τη χρησιμοποιήσαμε στην πλέον απλουστευμένη μορφή της. Πρέπει όμως να δώσουμε τη σωστή, τυπική διατύπωση για τέτοιου είδους δομές τους *σύνθετους πίνακες* (*compound matrices*). Ο ορισμός που παραθέτουμε είναι από την εργασία των *Κραββαρίτη και Μητρούλη* (2009) (Kravvaritis and Mitrouli 2009).

Έστω **A** ένας πίνακας $\in C^{m\times n}$. Για τα υποσύνολα $a=\{1,\ldots,m\}$ και $\beta=\{1,\ldots n\}$ θα ονομάζουμε ως $A(\alpha|\beta)$ τον υποπίνακα του **A**, του οποίου οι γραμμές είναι ίσες με a και οι στήλες είναι ίσες με β στη φυσική τους σειρά. Έστω τώρα k ένας θετικός ακέραιος αριθμός τέτοιος ώστε $k\leq min\{m,n\}$. Θα συμβολίζουμε ως $C_k(A)$ το k^{th} στοιχείο του πίνακα **A** τέτοιο ώστε ο πίνακας $\binom{m}{k}\times\binom{n}{k}$ αποτελεί τα ελάχιστα της ορίζουσας $\det A(\alpha|\beta)$ για όλα τα $a,\beta\subseteq\{1,\ldots,n\}$, $|a|=|\beta|=k$. Για παράδειγμα αν $A\in\mathbb{R}^{3\times3}$ τότε $C_2(A)=\begin{pmatrix}\det(\{1,2\}|\{1,2\}) & \det(\{1,2\}|\{1,3\}) & \det(\{1,2\}|\{2,3\})\\ \det(\{1,3\}|\{1,2\}) & \det(\{1,3\}|\{1,3\}) & \det(\{1,3\}|\{2,3\})\\ \det(\{2,3\}|\{1,2\}) & \det(\{2,3\}|\{1,3\}) & \det(\{2,3\}|\{2,3\})\end{pmatrix}$.

Στην περίπτωσή μας ο πίνακας που επεξεργαζόμαστε (που προκύπτει από την ανάλυση των μεταβολικών δεδομένων) έχει διαστάσεις $A \in \mathbb{R}^{m \times n \times t}$ μιας και ανήκει στους σύνθετους πίνακες τριών διαστάσεων.

ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗ ΘΕΩΡΙΑ ΠΑΙΓΝΙΩΝ

Στην παρούσα εργασία θέτουμε δύο βασικά ερωτήματα για την πολλαπλασιαστική δυναμική των κυττάρων. Το πρώτο είναι ότι οι κυτταρικοί πληθυσμοί ακολουθούν μη-γραμμικά μοντέλα ανάπτυξης και το δεύτερο αφορά στο ότι η ανάπτυξη των κυττάρων στηρίζεται σε παίγνιο που λαμβάνει χώρα κατά την ανάπτυξή τους. Ας επανέλθουμε για λίγο στην έννοια των παιγνίων όπως αναφερθήκαμε σε αυτά στην εισαγωγή. Ένα πολύ γνωστό παίγνιο είναι το *Bach or Stravinsky*. Ένα ζευγάρι, θέλει να παρακολουθήσει ένα κονσέρτο. Ο άνδρας θέλει να πάει να ακούσει *Bach* και η γυναίκα θέλει να παρακολουθήσει ένα κονσέρτο του *Stravinsky*. Βλέποντας τις επιλογές τους βλέπουμε ότι αν και οι δύο εμμείνουν στις αρχικές επιλογές τους τότε κανείς δεν θα πάει στο κονσέρτο με τον άλλον και άρα θα έχουν μηδενικό όφελος. Αν πάνε να ακούσουν *Bach* τότε και οι δύο θα πάνε σε κονσέρτο αλλά ο άνδρας θα έχει μεγαλύτερο όφελος από τη γυναίκα, ενώ αν πάνε να ακούσουν *Stravinsky*, και οι δύο θα πάνε σε κονσέρτο αλλά η γυναίκα θα έχει μεγαλύτερο όφελος[20]. Αυτό είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα παιγνίου. Ας προσπαθήσουμε να φέρουμε το θέμα αυτό (των παιγνίων δηλαδή) στα κυτταρικά συστήματα και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Υπάρχουν διάφορες στρατηγικές που μπορούν τα κύτταρα να ακολουθήσουν. Η μελέτη των πληθυσμιακών παιγνίων έχει μελετηθεί από αρκετές ομάδες με κυριότερη αυτή των *Taylor* και *Jonker* (1978) (Taylor and Jonker 1978) καθώς και των *Hofbauer* και *Sigmund* (1998), *Nowak* και *Sigmund* (2004), *Hofbauer* και *Sigmund* (2003) και *Imhof* (2005) (Imhof 2005). Μια από τις βασικές παραδοχές που γίνεται στη θεωρία παιγνίων είναι η ισορροπία. Στην ισορροπία *Nash*, ορίζουμε ότι είναι το σημείο όπου κανείς από τους παίκτες δεν θέλει να αλλάξει τη στρατηγική του διότι δεν υπάρχει κανένα όφελος από αυτό. Υπάρχουν διάφορα είδη παιγνίων, όπως είναι το *συνεργικό παίγνιο* (*Coordination game*), *το δίλημμα του φυλακισμένου* (*Prisoner's dilemma*), *παίγνιο δικτυακών κόμβων* (*Network traffic*) και *ανταγωνιστικά παίγνια* (*Competition game*).

Πρώτα ας διατυπώσουμε το πρόβλημα. Υπάρχουν N παίκτες (κύτταρα), οι οποίοι με δεδομένους τους πόρους του περιβάλλοντος (χώρος και τροφή) θέλουν όλοι να πολλαπλασιαστούν. Αυτό αυτομάτως μας τοποθετεί σε μια κατάσταση ανταγωνισμού διότι η κατανάλωση πόρων από μια ομάδα παικτών σημαίνει αυτόματα λιγότερους πόρους για τους υπόλοιπους. Κατά συνέπεια

[20] Βέβαια στην πραγματικότητα, ξέρουμε ότι θα πάνε να ακούσουν Stravinsky!

θεωρούμε ως καταλληλότερο μοντέλο περιγραφής το ανταγωνιστικό παίγνιο. Στο παίγνιο αυτό στα κύτταρα, ορίζουμε ότι έχουν τις εξής στρατηγικές επιλογές:

i. Να παραμείνουν όλα ανενεργά ήτοι στη G_1/G_0 φάση, να μην πολλαπλασιαστούν και να περιμένουν απλά μέχρι να τελειώσει ο πόρος-τροφή. Εναλλακτικά μια ακριβώς ισοδύναμη στρατηγική θα ήταν να αποφασίσουν να περάσουν όλοι στο μηχανισμό της απόπτωσης (*cell death CD*), όπου κανείς δεν θα πολλαπλασιασθεί εις βάρος ενός άλλου. Στις περιπτώσεις αυτές, <u>και μόνο σε αυτές</u>, έχουμε μια **καθαρή ισορροπία *Nash***, μιας και κανείς από τους παίκτες δεν έχει όφελος ή ζημία περισσότερο από τον άλλο. Εδώ μπαίνει και ένας νέος παράγοντας. Η στρατηγική αυτή δεν είναι μόνο μια ισορροπία Nash αλλά είναι και η **ενεργειακά πιο συμφέρουσα επιλογή**, μιας και απαιτούνται οι λιγότεροι πόροι για τη διατήρησή της. Αυτομάτως ερχόμαστε στο θέμα της θερμοδυναμικής ισορροπίας στην οποία βρίσκεται το σύστημα πόροι-παίκτες. Επίσης αν τα κύτταρα επιλέξουν την παραμονή στην G_1/G_0 φάση έχουν τη χαμηλότερη εντροπία στη ζωντανή κατάσταση, ενώ αν επιλέξουν την απόπτωση η εντροπία τείνει στο μηδέν. Άρα καταλαβαίνουμε ότι έχουμε την πρώτη ζεύξη μεταξύ των ισορροπιών *Nash* και της θερμοδυναμικής ισορροπίας. Δεν θα αναλύσουμε περαιτέρω το συγκεκριμένο ζήτημα μιας και αποτελεί από μόνο του μια αυτόνομη εργασία, αρκετά περίπλοκη για να ξεδιπλωθεί σε μια υποενότητα.

ii. Μέρος από αυτά να περάσουν στη σύνθεση χρωματίνης, ήτοι στην *S* φάση, που είναι ο προθάλαμος του πολλαπλασιασμού και να καταναλώσουν περισσότερους πόρους από τους υπόλοιπους (οι υπόλοιποι παίκτες παραμένουν στην G_1/G_0).

iii. Μέρος από αυτά να περάσουν στη G_2 φάση, ήτοι στον προθάλαμο της μίτωσης και κατά συνέπεια στον πολλαπλασιασμό, και να καταναλώσουν περισσότερους πόρους από τους υπόλοιπους.

iv. Μέρος εξ αυτών να προχωρήσουν στο μηχανισμό της απόπτωσης (*CD*), αφήνοντας περισσότερους πόρους για τους υπόλοιπους και

v. Να περάσουν όλοι οι παίκτες (τα κύτταρα) σε διαδικασία πολλαπλασιασμού, ήτοι στην *S* φάση και μετέπειτα στη G_2 φάση, φτάνοντας γρηγορότερα σε εξάλειψη των πόρων. Στην περίπτωση αυτή, αν υποθέταμε ότι οι πόροι είναι ανεξάντλητοι (όπως π.χ. σε μια in vivo κατάσταση) τότε και εδώ έχουμε **ισορροπία *Nash***, αφού όλοι οι παίκτες έχουν το ίδιο όφελος.

Ας διατυπώσουμε τα παραπάνω με πιο συστηματικό τρόπο:

Έστω σ οι διαθέσιμες στρατηγικές, όπου $\sigma=\{1,2,\ldots,n\}$. Έστω p_{jk} το όφελος (*payoff*) για τον παίκτη που επιλέγει τη στρατηγική *j* έναντι εκείνου που επιλέγει τη στρατηγική *k* ($j,k\in\sigma$). Έστω επίσης N_j, ο πληθυσμός που επιλέγει τη στρατηγική j δηλαδή είναι $N_j(t)$ και 1- $N_j(t)$ είναι ο πληθυσμός που

επιλέγει τη στρατηγική *k*. Ορίζουμε ως όφελος ή αμοιβή το βαθμό προσαρμογής στο περιβάλλον και το υπολογίζουμε ως τον αριθμό νέων κυττάρων ανά μονάδα χρόνου. Οπότε ισχύει:

$$\frac{dN_j(t)}{dt} = N_j(t)p_{jk}$$, **Εξίσωση 32**

Τα πράγματα γίνονται πιο ενδιαφέροντα όταν παρατηρήσουμε ότι η παραπάνω συνάρτηση προσομοιάζει μια τροποποιημένη μορφή της συνάρτησης *Lotka-Voltera*, την οποία έχουμε αναφέρει και αναλύσει σε προηγούμενες αναφορές μας (Lambrou, Chatziioannou et al. 2009; Lambrou, Zaravinos et al. 2012).

Ως αποτέλεσμα των παραπάνω παρατηρήσεων μπορούμε να διατυπώσουμε μια σχέση μεταξύ της θερμοδυναμικής κατάστασης στο κυτταρικό σύστημ και της ισορροπίας Nash:

Θεώρημα: *Μια ισορροπία Nash, είναι ανεξάρτητη της εντροπίας του συστήματος και της θερμοδυναμικής του ισορροπίας.*

ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΙ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Χρησιμοποιήθηκαν αλγόριθμοι για την ταξινόμηση μεγάλου όγκου δεδομένων, όπως είναι τα δεδομένα από μικροσυστοιχίες. Μέχρι σήμερα έχουν αναπτυχθεί πολλοί αλγόριθμοι τόσο για την κανονικοποίηση όσο και για την ταξινόμηση των δεδομένων, όπως *Global Median*, *Lowess*, *Loess*, *Robust Loess*, *Rank Invariant*, *Procrustes* και άλλοι. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι αλγόριθμοι *Global Median* και *Robust Loess*, ο οποίος στηρίζεται στην αρχή ότι τα γονίδια κατά το μεγαλύτερο μέρος τους δεν παρουσιάζουν σημαντικές αλλαγές και μόνο μια μικρή υποομάδα είναι αυτή που είναι διαφορικώς εκφραζόμενη. Ο αλγόριθμος αυτός διαιρεί την ένταση κάθε κηλίδας (spot) με τη διάμεσο όλων των γονιδίων που έχουν υβριδισθεί. Με τον τρόπο αυτό αφαιρείται το συστηματικό λάθος (*bias*) από τη μέτρηση.

Αφού γίνει η κανονικοποίηση των γονιδίων, το επόμενο βήμα περιλαμβάνει την ταξινόμησή τους σε ομάδες, τέτοιες που να αποδίδουν κάποια λειτουργία ή νόημα στα δεδομένα. Έτσι λοιπόν, υπάρχουν αρκετές τέτοιες μέθοδοι, όπως είναι οι *Hierarchical Clustering with Eucledian Distance*, *Principal Component Analysis*, *k-means clustering* και άλλοι. Ειδικότερα για τον αλγόριθμο PCA, έχει ενδιαφέρον να θυμίσουμε ότι αφορά άμεσα στα ιδιοδιανύσματα και ιδιοτιμές. Στην ανάλυση αυτή τα principal components αντιστοιχούν στα ιδιοδιανύσματα κάθε πίνακα που απαρτίζουν τα δεδομένα και η *επεξηγούμενη διακύμανση* (*variance explained*) αντιστοιχεί στις ιδιοτιμές του συστήματος. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο από αυτούς τους αλγόριθμους δηλαδή η ιεραρχική ταξινόμηση

(*Hierarchical Clustering*) και ο *k-means* clustering αλγόριθμος.

Οι δύο αυτοί αλγόριθμοι υπολογίζουν τη σχετική απόσταση μεταξύ δύο γονιδίων και κατόπιν ομαδοποιούν τα γονίδια που βρίσκονται πλησιέστερα. Ο όρος απόσταση δεν έχει φυσική έννοια παρά μόνο αλγεβρική. Στην περίπτωση της ιεραρχικής ταξινόμησης, η οποία εξετάσθηκε πρώτη, γίνεται η υπόθεση ότι δύο γονίδια έχουν επίπεδα έκφρασης *a* και *β* αντίστοιχα και τότε η απόσταση μεταξύ τους ορίζεται ως:

$$\|\alpha - \beta\|_2 = \sqrt{\sum_i (\alpha_i - \beta_i)^2}$$, **Εξίσωση 33**.

Σε συνέχεια αυτού, η συσχέτιση μεταξύ των εκφράσεων των γονιδίων γίνεται με τον λεγόμενο *Pearson's Correlation Coefficient* (*r*). Ο δείκτης αυτός διερευνά αν δύο σειρές δεδομένων έχουν γραμμική συσχέτιση ή όχι. Για να ορισθεί αυτό πιο σωστά, ο παράγοντας *r* ορίζεται ως:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}\sqrt{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \bar{y})^2}}$$, **Εξίσωση 34**.

Σε συνέχεια των αλγορίθμων, ο επόμενος που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο αλγόριθμος *k-means*. Η ιδιαιτερότητα του αλγόριθμου αυτού, έγκειται στο γεγονός ότι προσπαθεί να προσομοιώσει ένα πλήθος παρατηρήσεων σε ένα άλλο πλήθος υποομάδων (clusters). Για να διατυπωθεί αυτό πιο ορθά: Έστω ένα πλήθος παρατηρήσεων που ανήκει σε ένα σύνολο **X**, τέτοιο ώστε $X=(x_1, x_2, x_3,\ldots,x_n)$, όπου κάθε παρατήρηση είναι ένα διάνυσμα *d* διαστάσεων. Ο αλγόριθμος k-means, προσπαθεί να προσομοιώσει τις παρατηρήσεις σε ένα νέο σύνολο ομάδων **S**, πλήθους *k*, τέτοιο ώστε $S=\{s_1, s_2, s_3,\ldots,s_k\}$ ($k<n$). Ο τρόπος με τον οποίο γίνεται η ταξινόμηση αυτή και κατά συνέπεια απαραίτητη συνθήκη για να μπουν τα στοιχεία του **X** σε μια ίδια υποομάδα είναι να πληρούν το κριτήριο του *ελάχιστου αθροίσματος των τετραγώνων* (*minimum sum of squares*). Για να διατυπωθεί πιο ορθά:

$$\arg_s \min \sum_{i=1}^{k} \sum_{x_j \in S_i} \|x_j - \mu_i\|^2$$, **Εξίσωση 35**.

ΔΙΑΝΥΣΜΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΕΩΜΕΤΡΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ

Έχουν προταθεί πολλές μεθοδολογίες ανάλυσης για τις μικροσυστοιχίες. Σε αυτή την υποενότητα θα αναφερθούμε σε μια προσέγγιση που προέκυψε μέσα από την παρούσα μελέτη. Η μεθοδολογία αυτή αφορούσε στη διανυσματική και γεωμετρική προσέγγιση στα δεδομένα των μικροσυστοιχιών. Πιο συγκεκριμένα, ενώ είναι γενικά διαδεδομένο ότι ο λόγος μεταξύ δύο πειραμάτων μικροσυστοιχιών λαμβάνεται ως η σχετική έκφραση ενός γονιδίου, παρατηρήσαμε ότι αυτό θα μπορούσε να αναπαρασταθεί με τη βοήθεια ενός καρτεσιανού συστήματος συντεταγμένων και την εφαπτομένη της γωνίας που σχηματίζεται μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων (Lambrou, Chatziioannou et al. 2009). Για να γίνουμε όμως πιο σαφείς, έστω ότι η τιμή ενός γονιδίου από ένα πείραμα μικροσυστοιχιών λαμβάνει μια τιμή για το δείγμα Χ και μια δεύτερη τιμή στο δείγμα Υ. Θα μπορούσαν οι τιμές αυτές να αναπαρασταθούν σε ένα σύστημα αξόνων όπου η τιμή της μιας θα τοποθετείτο στον άξονα των Χ και η τιμή της δεύτερης στον άξονα των Υ. Η όλη ιδέα ξεκίνησε από την ανάλυση των περίφημων πειραμάτων κατά το σχεδιασμό *loop-design*, όπου δείγματα συγκρίνονται μεταξύ τους σε όλους τους πιθανούς συνδυασμούς (**Εικόνα 80Α**). Ως εκ τούτου, υποθέσαμε ότι είναι πιθανό να μπορούν να περιγραφούν τα δεδομένα των μικροσυστοιχιών με άλλη μέθοδο λαμβάνοντας υπόψη τις επιμέρους τιμές των εντάσεων φθορισμού των δειγμάτων. Ο λογάριθμος δίνει μια προσέγγιση στις τιμές του φθορισμού μιας και δεν λαμβάνει υπόψη την πληροφορία που περιέχεται στον επιμέρους φθορισμό των γονιδίων/δειγμάτων. Για το λόγο αυτό υποθέσαμε ότι μια καλύτερη μέθοδος θα ήταν να συμπεριλάβουμε στην ανάλυση των δεδομένων των μικροσυστοιχιών το διάνυσμα της έντασης του φθορισμού (Lambrou, Chatziioannou et al. 2009).

Κάθε πείραμα μικροσυστοιχιών αποτελείται από δύο δείγματα, είτε πρόκειται για δικάναλες μικροσυστοιχίες, όπου έχουμε την συνύπαρξη δύο χρωστικών πάνω σε ένα πλακάκι είτε για μονοκάναλες μικροσυστοιχίες όπου κάθε δείγμα εξετάζεται ξεχωριστά. Οι τιμές αυτές μπορούν να αναπαρασταθούν σε ένα καρτεσιανό σύστημα συντεταγμένων ως ένα διάνυσμα **v** με μέτρο $|\mathbf{v}|$ και διεύθυνση θ (για να είμαστε πιο συγκεκριμένοι $tan\theta$ *[εφθ]*), όπως φαίνεται στην (**Εικόνα 80C** για τρία ανεξάρτητα πειράματα, που αφορούν στο ίδιο γονίδιο. Έτσι για να επεκτείνουμε την ανάλυσή μας θέσαμε το εξής ερώτημα: Δίνονται δύο διανύσματα $\mathbf{v}_1$ και $\mathbf{v}_2$ είναι δυνατό να υπολογισθεί ένα τρίτο διάνυσμα $\mathbf{v}_3$ ως συνάρτηση των δύο πρώτων; Γνωρίζοντας ότι τα τρία διανύσματα συνδέονται. Για να το επιλύσουμε ορίζουμε τρία νέα διανύσματα $\mathbf{c}_1$, $\mathbf{c}_2$, $\mathbf{c}_3$ όπως φαίνεται στην (**Εικόνα 80C**). Έτσι, κάθε από τα διανύσματα αυτά $\mathbf{c}_1$, $\mathbf{c}_2$, and $\mathbf{c}_3$ μπορεί να περιγραφεί (Lambrou, Chatziioannou et al. 2009):

$$\| \ c_1^{\ 2} \ \| = (G_2 - G_1)^2 + (R_1 - R_2)^2$$
$$\| \ c_2^{\ 2} \ \| = (R_3 - R_2)^2 + (G_3 - G_2)^2 \text{ , } \textbf{Εξίσωση 36}$$
$$\| \ c_3^{\ 2} \ \| = (G_3 - G_1)^2 + (R_3 - R_1)^2$$

Η επίλυσή του μπορεί εύκολα να βρεθεί από το Πυθαγόρειο τρίγωνο που σχηματίζουν τα διανύσματα c_1, c_2, c_3 και τις συντεταγμένες των διανυσμάτων v_1, v_2, and v_3. Για να μπορέσουμε να το επιλύσουμε εκμεταλλευτήκαμε τις γεωμετρικές ιδιότητες των τριγώνων $\Delta v_3 v_2 c_2$, $\Delta v_1 v_3 c_3$ and $\Delta v_2 v_1 c_1$ και από τα οποία απορρέει:

$$c_1^2 = v_1^2 + v_2^2 - 2\| \ v_1 \ \|\| \ v_2 \ \|\cos\omega_1$$
$$c_2^2 = v_2^2 + v_3^2 - 2\| \ v_2 \ \|\| \ v_3 \ \|\cos(\omega_2 + \omega_1) \text{ , } \textbf{Εξίσωση 37}$$
$$c_3^2 = v_1^2 + v_3^2 - 2\| \ v_1 \ \|\| \ v_3 \ \|\cos\omega_2$$

Επίσης ισχύει:

$$\omega_1 = |\theta_2 - \theta_1|$$
$$\omega_2 = |\theta_1 - \theta_3| \quad \text{ , } \textbf{Εξίσωση 38}$$
$$\omega_1 + \omega_2 = |\theta_2 - \theta_3|$$

από όπου τα ω_1 και ω_2 προκύπτουν πολύ εύκολα από τις τιμές των συντεταγμένων R_1, G_1, R_2, G_2 (**Εικόνα 80C**), όπου επίσης ισχύει:

$$R_2 = G_1$$
$$R_3 = G_2 \text{ , } \textbf{Εξίσωση 39}$$
$$R_1 = G_3$$

Από τις παραπάνω εξισώσεις (**Εξίσωση 35**-**Εξίσωση 38**) μπορούμε να υπολογίσουμε και να προσεγγίσουμε το τρίτο πείραμα, το διάνυσμα δηλαδή $\boldsymbol{v_3}$, όπως επίσης μπορούμε να ελαχιστοποιήσουμε το πειραματικό συστηματικό λάθος.

Στις παραπάνω διατυπώσεις μας δεν λάβαμε υπόψη την πιθανότητα των πολλαπλών επαναλήψεων ενός πειράματος και την αντίστοιχη διακύμανση τους. Όλες οι παραπάνω διατυπώσεις βασίζονται στην υπόθεση ότι οι εντάσεις φθορισμού των χρωστικών στο πείραμα των μικροσυστοιχιών είναι όμοιες (ή τουλάχιστον εγγίζουν την ομοιότητα). Αυτό φυσικά δεν ισχύει σε πραγματικές συνθήκες οπότε πρέπει να βρεθεί τρόπος να συνυπολογισθεί η διακύμανση στην ανάλυση. Μια γεωμετρική ερμηνεία της διακύμανσης παρουσιάζεται στην (**Εικόνα 80B**, **D**) και μπορεί να διατυπωθεί ως εξής:

Έστω, $\boldsymbol{w_{1,i,j}}$, $\boldsymbol{w_{2,i,j}}$, $\boldsymbol{w_{3,i,j}}$ τα διανύσματα που περιγράφουν τις εντάσεις του i^{th} γονιδίου στο j^{th} πείραμα (επανάληψη), όπου $\boldsymbol{w_{1,i,j}}(x_{1,i,j},y_{1,i,j})$, $\boldsymbol{w_{2,i,j}}(x_{2,i,j},y_{2,i,j})$, $\boldsymbol{w_{3,i,j}}(x_{3,i,j},y_{3,i,j})$. Μπορούμε τότε να ορίσουμε τρία νέα διανύσματα ως $\boldsymbol{V_1}(R_1,G_1)$, $\boldsymbol{V_2}(R_2,G_2)$, $\boldsymbol{V_3}(R_3,G_3)$, όπου R και G είναι οι συντεταγμένες για κάθε κεντροειδές που σχηματίζεται από τα διανύσματα $\boldsymbol{w_{1,i,j}}$, $\boldsymbol{w_{2,i,j}}$, $\boldsymbol{w_{3,i,j}}$. Πιο συγκεκριμένα τα τρία διανύσματα $\boldsymbol{V_1}$, $\boldsymbol{V_2}$, $\boldsymbol{V_3}$ορίζονται ως:

$$V_1\left(\frac{x_{1,i,1}+x_{2,i,1}+x_{3,i,1}}{3},\frac{y_{1,i,1}+y_{2,i,1}+y_{3,i,1}}{3}\right)=V_1(R_1,G_1)$$
$$V_2\left(\frac{x_{1,i,2}+x_{2,i,2}+x_{3,i,2}}{3},\frac{y_{1,i,2}+y_{2,i,2}+y_{3,i,2}}{3}\right)=V_2(R_2,G_2)\text{, }\textbf{Εξίσωση 40}$$
$$V_3\left(\frac{x_{1,i,3}+x_{2,i,3}+x_{3,i,3}}{3},\frac{y_{1,i,3}+y_{2,i,3}+y_{3,i,3}}{3}\right)=V_3(R_3,G_3)$$

Με άλλα λόγια όσο η επιφάνεια S των τριγώνων που σχηματίζονται από $\boldsymbol{w_{1,i,j}}(x_{1,i,j},y_{1,i,j})$, $\boldsymbol{w_{2,i,j}}(x_{2,i,j},y_{2,i,j})$, $\boldsymbol{w_{3,i,j}}(x_{3,i,j},y_{3,i,j})$ πλησιάζει τα αντίστοιχα κεντροειδή η διακύμανση σ πλησιάζει το μηδέν.

Επεκτείνοντας την παραπάνω ανάλυση μπορούμε να επιλύσουμε προβλήματα, που έχουν να κάνουν με περισσότερα των τριών πειράματα. Στην **Εικόνα 80Ε**, παρουσιάζουμε τη γεωμετρική ερμηνεία αυτού του προβλήματος.

Από όλα τα παραπάνω μπορούμε να εξάγουμε μια γενικευμένη διατύπωση του προβλήματος για περισσότερους από τρεις κόμβους σε ένα πείραμα μικροσυστοιχιών με σχεδιασμό *"loop"*. Πιο συγκεκριμένα:

$$\left\| \ c_n^2 \ \right\| = (G_{n+1}-G_n)^2+(R_n-R_{n+1})^2\text{, }\textbf{Εξίσωση 41}$$

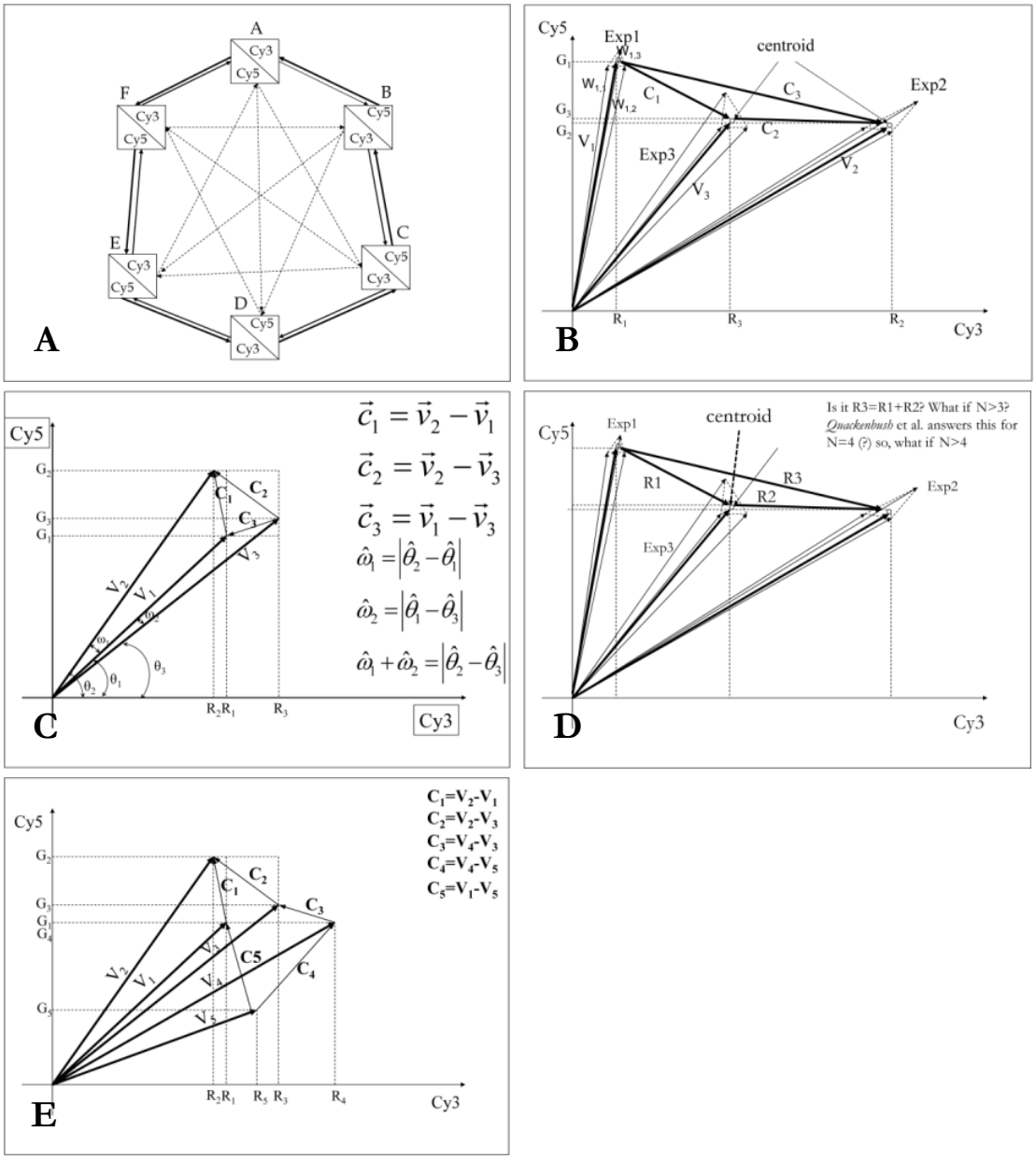
$$c_n^2 = v_n^2+v_{n+1}^2-2\left\| \ v_n \ \right\| \left\| \ v_{n+1} \ \right\| \cos(\omega_n)$$
$$c_{n+1}^2 = v_{n+1}^2+v_{n+2}^2-2\left\| \ v_{n+1} \ \right\| \left\| \ v_{n+2} \ \right\| \cos(\omega_n+\omega_{n+1})\text{, }\textbf{Εξίσωση 42}$$
$$c_{n+2}^2 = v_n^2+v_{n+2}^2-2\left\| \ v_n \ \right\| \left\| \ v_{n+2} \ \right\| \cos(\omega_{n+1})$$

Και

$$R_i = G_{i-1} \text{ για } i=1,\ldots,n \text{ και } R_1 = G_n\text{, }\textbf{Εξίσωση 43}$$

$$c_n^2 = v_n^2+v_{n+1}^2-2v_nv_{n+1}\cos(\omega_n)$$
$$c_{n+1}^2 = v_{n+1}^2+v_{n+2}^2-2v_{n+1}v_{n+2}\cos(\omega_n+\omega_{n+1})\text{, }\textbf{Εξίσωση 44}$$
$$c_{n+2}^2 = v_n^2+v_{n+2}^2-2v_nv_{n+2}\cos(\omega_{n+1})$$

Όπου παίρνουμε τη γενικευμένη μορφή του n^{th} διανύσματος ως συνάρτηση των προηγούμενων δύο.



Εικόνα 80. Το διάγραμμα του *Loop* microarray design (Kerr and Churchill 2001) (**A**).Γεωμετρική ερμηνεία τριών πειραμάτων, όπου τα διανύσματα, το καθένα σε τρεις επαναλήψεις, όπου τα διανύσματα V_1, V_2, V_3 είναι ο μέσος των διανυσμάτων $w_{1,i,j}$, $w_{2,i,j}$ and $w_{3,i,j}$ του i^{th} γονιδίου στο j^{th} πείραμα και με συντεταγμένες $x_1(0.0)$ έως $x_2(x_n, y_n)$, όπου x_n, y_n είναι οι συντεταγμένες του κεντροειδούς των τριών επαναλήψεων (**B**, **D**). Κάθε διάνυσμα v_1, v_2, v_3 με διευθύνσεις θ_1, θ_2, θ_3 αντίστοιχα αναπαριστούν την έκφραση του ίδιου γονιδίου σε τρία ανεξάρτητα πειράματα (επαναλήψεις). Ορίζουμε τρία νέα διανύσματα c_1, c_2, c_3 , τα οποία αποτελούν τη διαφορά μεταξύ των ζευγών των πειραμάτων (**C**). Παράδειγμα ενός *"loop" design* με πέντε πειραματικές διατάξεις με βάση τη γεωμετρική μας ερμηνεία (**E**).

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΑ ΕΡΓΑΛΕΙΑ ΤΩΝ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ

Στις ηλεκτροχημικές και φυσικοχημικές μετρήσεις που πραγματοποιήσαμε για τον υπολογισμό των παραμέτρων χρησιμοποιήσαμε γνωστούς νόμους της φυσικής. Οι παράγοντες που μετρήθηκαν ήταν η ένταση του ρεύματος (I), η διαφορά δυναμικού (V) και η αντίσταση (R). Ταυτοχρόνως, εφαρμόζοντας εναλλασσόμενο ρεύμα στο σύστημά μας μετρήσαμε την εμπέδηση (Z) ως το λόγο της διαφοράς δυναμικού προς την ένταση του διερχόμενου ρεύματος. Ισχύει:

$$I = \frac{V}{R}, \textbf{ Εξίσωση 45}$$

$$I = \frac{dQ}{dt}, \textbf{ Εξίσωση 46}$$

$$Z = |Z| e^{j\vartheta}, \textbf{ Εξίσωση 47}$$

$$V = IZ = I|Z|e^{j\vartheta}, \textbf{ Εξίσωση 48}$$

$$\varepsilon_r = \frac{C_x}{C_0}, \textbf{ Εξίσωση 49}$$

Όπου C_x είναι η χωρητικότητα του διηλεκτρικού μέσου και C_0 η διηλεκτρική σταθερά του κενού. Καθώς επίσης ισχύει:

$$C = \frac{Q}{V}, \textbf{ Εξίσωση 50}$$

Όπου Q είναι το φορτίο που μετακινείται στο ηλεκτρικό πεδίο υπό διαφορά δυναμικού V.

Επίσης στο σύστημά μας εφαρμόσαμε, ως είσοδο, αρμονικές ημιτονοειδείς συναρτήσεις συχνότητας ν σε ένα εύρος από 10^6 MHz έως 5×10^6 MHz και στην έξοδο έγιναν μετρήσεις με ψηφιακό παλμογράφο. Η πειραματική διάταξη έχει περιγραφεί παραπάνω στο Κεφάλαιο 19.

Η ανάλυση των μετρήσεων με παλμογράφο έγινε με τη χρήση μετασχηματισμών Fourrier (Fast Fourrier Transformation) με τη χρήση του υπολογιστικού περιβάλλοντος MATLAB (The Mathworks Inc. Natick MA).

Εν συντομία, ο μετασχηματισμός Fourrier περιγράφεται:

$$X_k = \sum_{n=0}^{N-1} x_n e^{-i2\pi k \frac{n}{N}}, k = 0, \ldots N-1, \textbf{ Εξίσωση 51}$$

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ

Έγινε χρήση στατιστικών εργαλείων για την ανάλυση των δεδομένων. Μεταξύ άλλων, χρησιμοποιήθηκαν οι εξής μεθοδολογίες:

Υπολογισμός της μέσης τιμής: $\bar{x} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} x_i$ **Εξίσωση 52**.

Υπολογισμός σταθεράς απόκλισης (standard deviation): $\sigma = \sqrt{\int_x (x-\mu)^2 \, p(x)dx}$ **Εξίσωση 53**.

One-sample (A) και *two-sample* (B) T-test:

$$t = \frac{\bar{x} - \mu_0}{s/\sqrt{n}}, (A)$$

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S_{x_1 x_2}\sqrt{\frac{2}{n}}}, (B)$$ **Εξίσωση 54**.

Ομοίως, χρησιμοποιήθηκε και το Z τεστ όπως παρουσιάζεται παρακάτω:

$Z = \frac{M - \mu}{\sigma}$, Εξίσωση 55**.**

ΛΟΓΙΣΜΙΚΟ, ΣΥΓΓΡΑΦΗ ΚΩΔΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Όλες οι αναλύσεις στην παρούσα εργασία έγιναν με το υπολογιστικό περιβάλλον MATLAB (The Mathworks Inc. Natick MA). Το περιβάλλον αυτό είναι ένα εξαιρετικά ευέλικτο και ισχυρό εργαλείο για την ανάλυση πάσης φύσεως δεδομένων. Είναι στην ουσία μια γλώσσα προγραμματισμού ειδικευμένη στη διαχείριση πινάκων και μαθηματικών προβλημάτων. Η κύρια διαδικασία που ακολουθήθηκε για όλων των τύπων τα δεδομένα αφορούσε στην αρχική ταξινόμηση τους με το Microsoft Excel ® (Microsoft Corporation) και τη μετέπειτα εισαγωγή τους στο περιβάλλον MATLAB. Η ανάλυση των δεδομένων στο περιβάλλον MATLAB έγινε με τη συγγραφή κώδικα. Σε κάποιες ειδικές περιπτώσεις χρησιμοποίηθηκαν και άλλα λογισμικά, όπως για την ανάλυση εικόνας χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα *ImageJ* (Schneider, Rasband et al. 2012) (http://rsbweb.nih.gov/ij/). Για την ανάλυση των οντολογιών των γονιδίων (*Gene Ontology*), τη συμμετοχή τους σε σηματοδοτικές οδούς (Pathway Analysis) και τη χρωμοσωμική κατανομή των γονιδίων (*Chromosomal Expression*) χρησιμοποιήθηκε η διαδικτυακή πλατφόρμα *WebGestalt* (Zhang, Kirov et al. 2005) (http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/).

ΜΕΡΟΣ ΙΙΙ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

"…life is a relationship among molecules and not a property of any molecule…"

"…Science is built up of facts, as a house is with stones. But a collection of facts is no more a science, than a heap of stones is a house…"

Henri Poincaré

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ

Πρώτος σταθμός στην παρουσίαση των αποτελεσμάτων μας είναι τα δεδομένα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και η μεταξύ τους σύγκριση.

Τα πειράματα πολλαπλασιασμού διαχωριζόντουσαν στα πειράματα ελέγχου, στα πειράματα τυποποίησης, στα πειράματα ελάχιστης ανάπτυξης (MinGr), στα πειράματα Constant Volume vs. Constant Initial Number (CV/CIN), στα πειράματα Variable Volume vs. Variable Initial Number (VV/VIN) και στα πειράματα χρονοσειρών (Time Series).

Δεύτερο μέρος της ανάλυσης αποτέλεσε η εφαρμογή αναστολέων στα κυτταρικά συστήματα προς διερεύνηση των σηματοδοτικών οδών που είναι σημαντικές για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Σε συνέχεια των πειραμάτων πολλαπλασιαστικής δυναμικής προέκυψε ένα σημαντικό ερώτημα για τη λειτουργία των ενεργειακών διαδικασιών στο φαινόμενο αυτό.

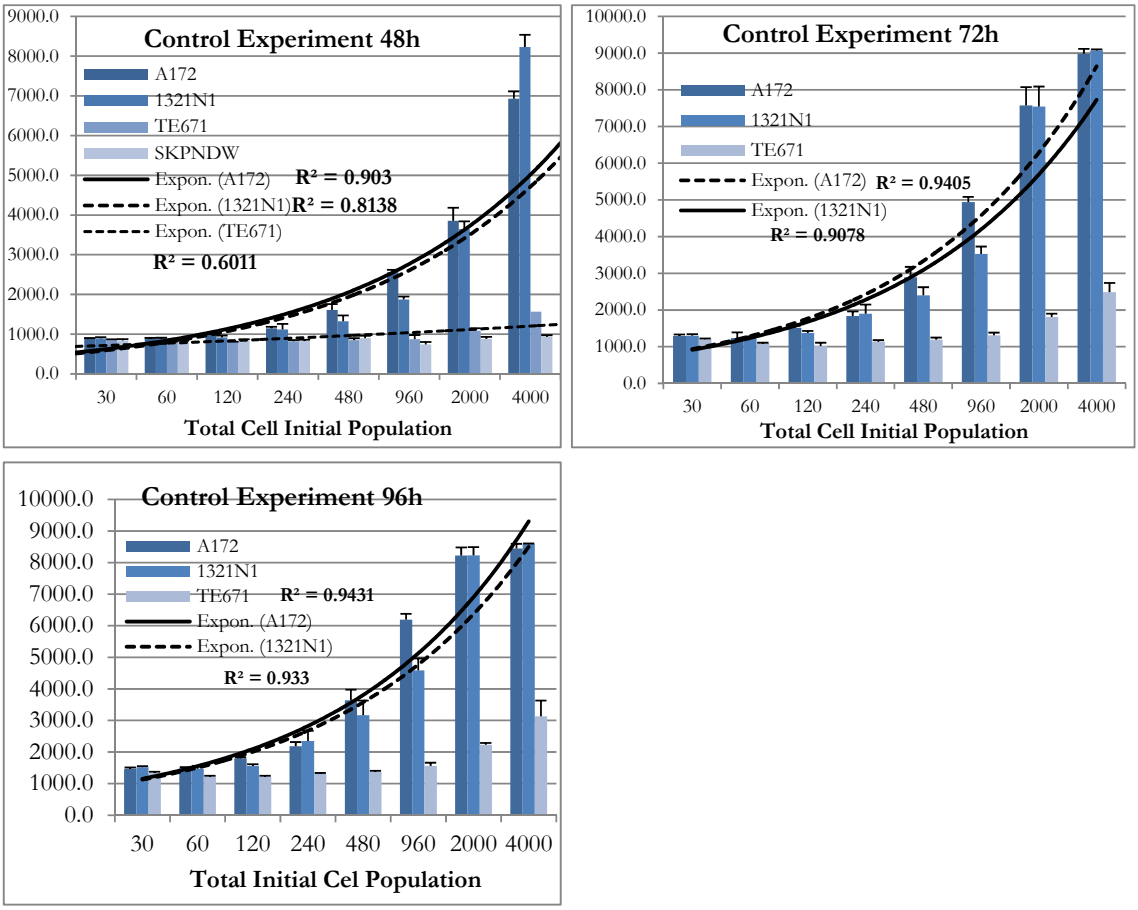
Επίσης παρουσιάζουμε τα αποτελέσματα των ηλεκτροφυσικών μετρήσεων κατά τα στάδια του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και συναρτήσει του χρόνου.

Το τελευταίο στάδιο της ανάλυσης αφορούσε στη διερεύνηση των γονιδιακών μηχανισμών που λειτουργούν κατά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 22

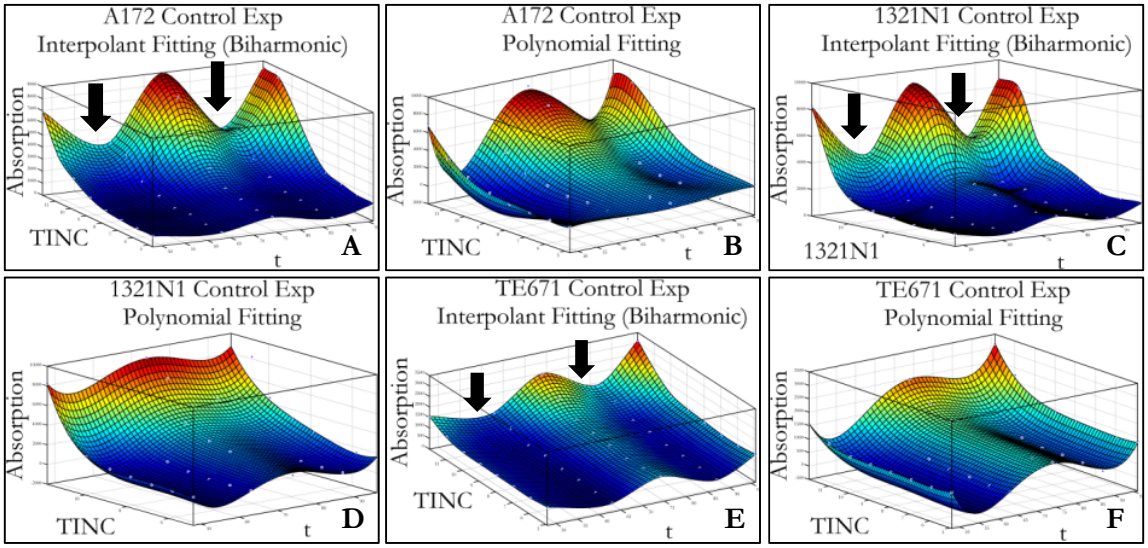
IN VITRO ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ-ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ

Τα πειράματα ελέγχου ήταν πολύ απλά στην εφαρμογή και σύλληψή τους. Ο μόνος σκοπός ήταν να ελεγχθεί η εν γένει δυνατότητα των κυττάρων για πολλαπλασιασμό. Τα κύτταρα αφέθηκαν να μεγαλώσουν σε φλάσκες και έγιναν σποραδικές μετρήσεις με τη μέθοδο Coulter, καθώς και μικροσκοπικός έλεγχος για να βεβαιωθεί η δυνατότητα πολλαπλασιασμού. Όλες οι κυτταρικές σειρές ελέγχθηκαν για τη δυνατότητα τους για πολλαπλασιασμό και όλες είχαν αυτή την ιδιότητα. Υπήρχαν μεταβολές στο ρυθμό πολλαπλασιασμού, μιας και κάποιες σειρές μεγάλωναν γρηγορότερα από άλλες, από τις οποίες διαπιστώθηκαν οι χρόνοι διπλασιασμού των κυτταρικών σειρών. Ενδεικτικά αναφέρουμε ότι η σειρά CCRFCEM, είχε χρόνο διπλασιασμού 24-36 ώρες. Οι κυτταρικές σειρές TE671, 1321N1 και A172 36-48 ώρες. Η κυτταρική σειρά BE(2)M17 είχε 72 ώρες χρόνο διπλασιασμού. Ενδεικτικά πρέπει να πούμε ότι η κυτταρική σειρά SKPNDW ήταν αυτή με το μεγαλύτερο χρόνο διπλασιασμού, που έφθασε σε κάποιες μετρήσεις τις 120 ώρες. Ήταν η δυσκολότερη σειρά τόσο στο χειρισμό της όσο και στη μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Επίσης έγιναν πειράματα ελέγχου και με τη μέθοδο της φωτομετρίας/φλουορομετρίας με στόχο τη βελτιστοποίηση της μεθοδολογίας αυτής. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές A172, 1321N1, TE671 και SKPNDW με τη χρωστική Alamar Blue. Στην **Εικόνα 81**, παρουσιάζουμε ένα χαρακτηριστικό διάγραμμα των μετρήσεων των πειραμάτων ελέγχου.



Εικόνα 81. Διαγραμματική παρουσίαση των πειραμάτων ελέγχου για τα κύτταρα TE671, 1321N1, A172 και SKPNDW. Τα SKPNDW δεν έδειξαν να αυξάνονται μέσα στο χρονικό περιθώριο που έγινε το πείραμα ελέγχου. Οι υπόλοιπες κυτταρικές σειρές αυξήθηκαν και μάλιστα ακολουθώντας το εκθετικό μοντέλο με βάση το οποίο είχαν αρχικά καλλιεργηθεί.

Αντίστοιχα μπορούμε να αναπαραστήσουμε τα παραπάνω δεδομένα σε τρεις διαστάσεις μιας και έχουμε τρεις βασικές μεταβλητές: τον αρχικό αριθμό των κυττάρων, το χρόνο και την απορρόφηση της χρωστικής με την οποία μελετήθηκαν τα κύτταρα. Το διάγραμμα αυτό παρουσιάζεται στην **Εικόνα 82**. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι «κοιλάδες» που παρατηρούνται στις χρονικές στιγμές 63 και 86 ώρες στους υψηλότερους αρχικούς αριθμούς κυττάρων. Αυτό ήταν μια πρώτη ένδειξη για τη μη γραμμική συμπεριφορά του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Οι «κοιλάδες» αυτές εξομαλύνονται όσο μικραίνει ο αρχικός αριθμός των κυττάρων, από όπου δηλαδή τα κύτταρα ξεκίνησαν να πολλαπλασιάζονται. Οι αρχικοί αριθμοί φαίνονται στην **Εικόνα 81**.



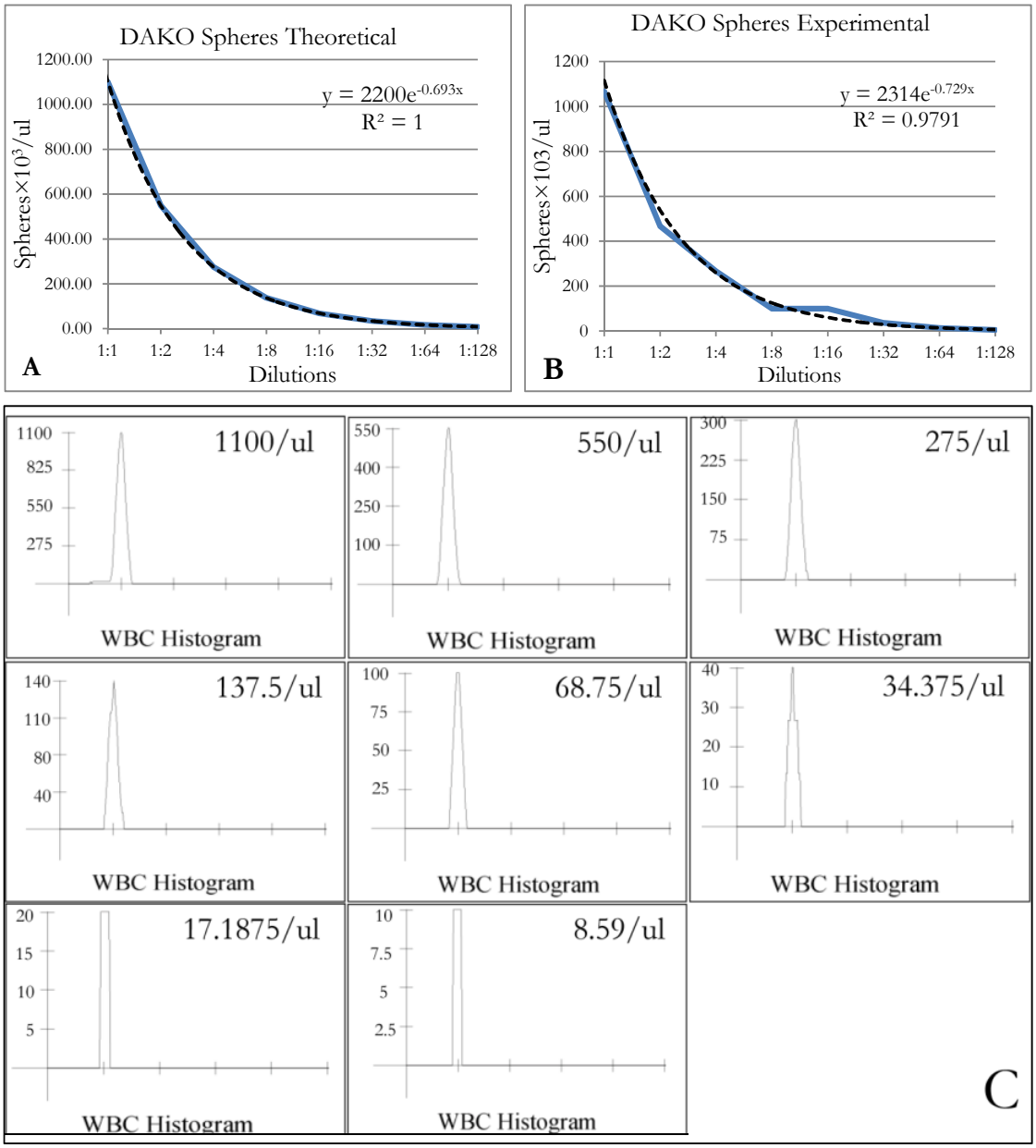
Εικόνα 82. Τρισδιάστατες απεικονίσεις των πειραμάτων τυποποίησης για τα κύτταρα A172 (**A**,**B**), 1321N1 (**C**,**D**) και TE671 (**E**,**F**). Παρουσιάζονται δύο τύποι παλινδρόμησης η *Interpolant* και η *πολυωνυμική*. Ο δείκτης R^2 (adjusted R^2) ήταν αντίστοιχα για κάθε παλινδρόμηση: **A**: R^2=1, **B**: R^2=0.97, **C**:R^2=1, **D**: R^2=0.88, **E**: R^2=1, **F**: R^2=0.95. Οι άξονες αντιπροσωπεύουν, X: time (t), Y: log_2 of TINC (Total Initial Number of Cells), Z: Absorption. Έχει ενδιαφέρον να παρατηρήσουμε τις «κοιλάδες» που σχηματίζονται κατά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (μαύρα βέλη).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 23

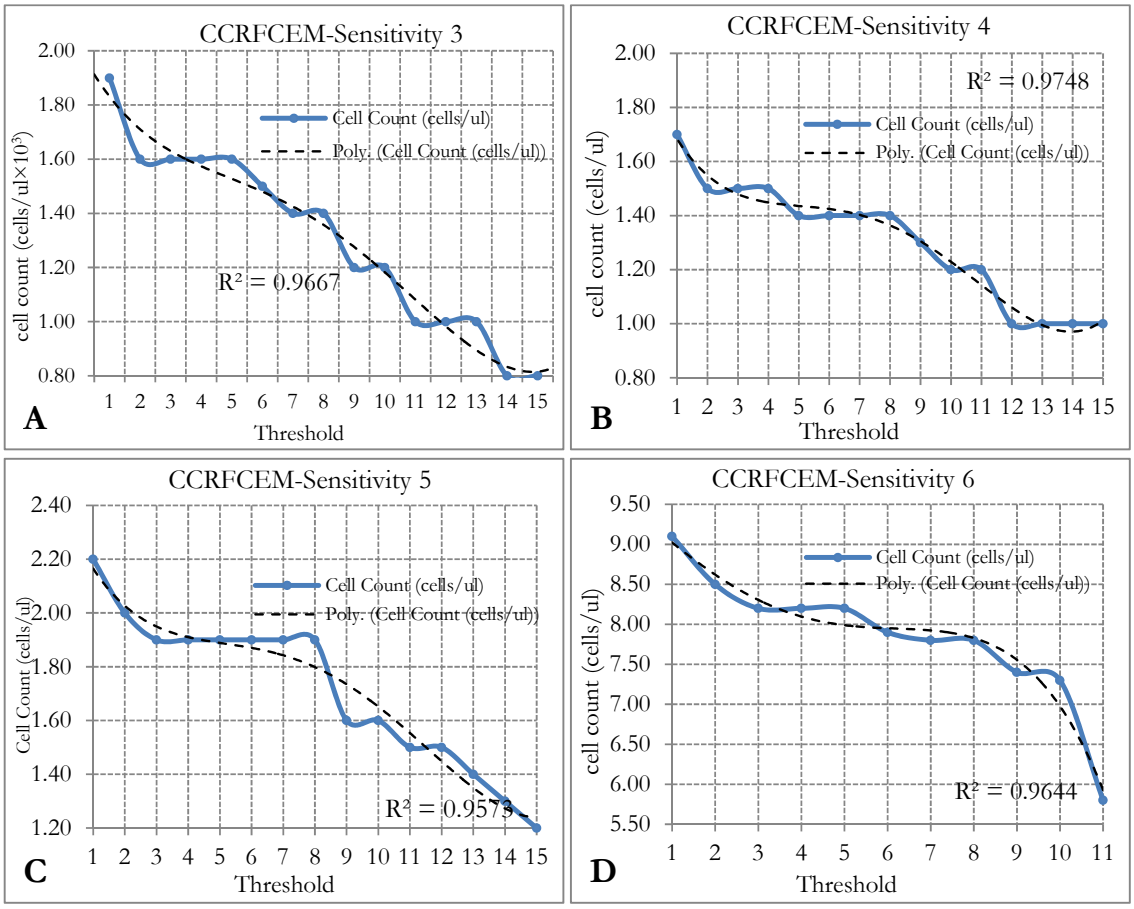
IN VITRO ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ-ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ

Τα πειράματα τυποποίησης (calibration) είχαν ως στόχο τη ρύθμιση των παραμέτρων για τη μελέτη της πολλαπλασιαστικής δυναμικής των κυττάρων. Ξεχωρίζουμε δύο ειδών τυποποίησης, το πρώτο είναι η τυποποίηση των οργάνων μέτρησης και το δεύτερο είναι η δημιουργία καμπύλων ανάπτυξης από γνωστούς αριθμούς κυττάρων ώστε να συσχετισθεί η ένταση της φωτομετρίας/φλουορομετρίας με τον απόλυτο αριθμό κυττάρων. Ειδικά το δεύτερο είδος αφορούσε στα πειράματα σε προσκολλώμενα κύτταρα. Η πρώτη ανάλυση αφορούσε στην τυποποίηση του μετρητή Coulter και στην ακρίβεια των μετρήσεών του. Αυτό το στάδιο ήταν εξαιρετικά κρίσιμο, μιας και όλες οι περαιτέρω αναλύσεις βασίσθηκαν πάνω στην ακρίβεια αυτού του οργάνου. Στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 83**) παρουσιάζονται οι μετρήσεις με σφαιρίδια DAKO. Οι μετρήσεις αυτές δεν έδωσαν μόνο μια βεβαιότητα για την ακρίβεια του μετρητή αλλά έδωσαν και μια πολύ σαφή εικόνα για την κατάλληλη κατανομή των πληθυσμών των κυττάρων και σε ποια θέση στο διάγραμμα του κυτταρομετρητή έπρεπε να εμφανίζονται (η σωστή και ιδανική θέση της κατανομής εμφανίζεται με βέλος στην **Εικόνα 83C**).

Σε συνέχεια αυτών των πειραμάτων έγινε δοκιμή των παραμέτρων του ίδιου του οργάνου, η οποία περιελάμβανε τη ρύθμιση της ευαισθησίας (sensitivity) και κατωφλίου (threshold) για τους βασικούς κυτταρικούς τύπους. Στην **Εικόνα 84**, παρουσιάζονται, ενδεικτικά, οι ρυθμίσεις αυτές για την κυτταρική σειρά CCRFCEM. Με βάση το εύρημα που δείχθηκε στην **Εικόνα 83** για την κυτταρική σειρά CCRFCEM ως κατάλληλος συνδυασμός ευαισθησίας και κατωφλίου επιλέχθηκαν οι παράμετροι 4 και 5 αντίστοιχα.

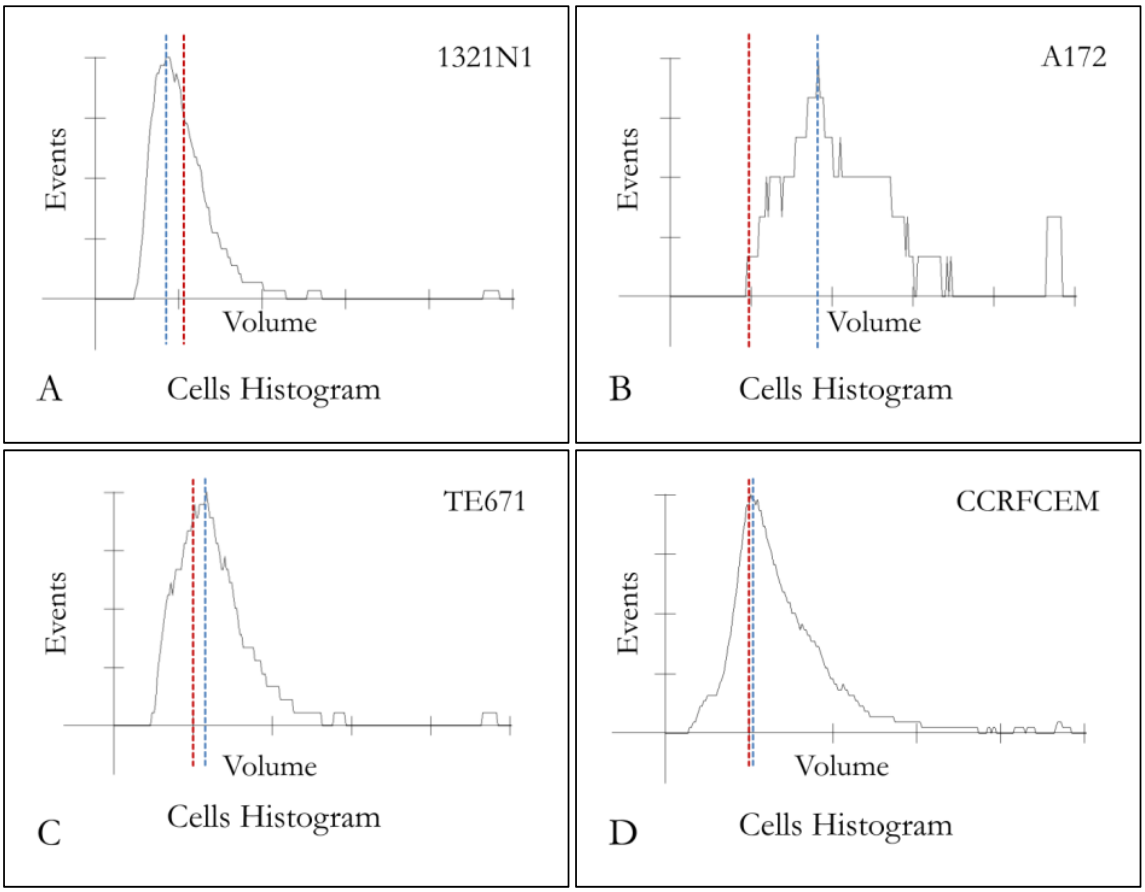


Εικόνα 83. Διαγραμματική παρουσίαση των αποτελεσμάτων τυποποίησης του μετρητή Coulter με σφαιρίδια. Παρουσιάζεται ο αριθμός των σφαιριδίων όπως υπολογίσθηκε από τις αραιώσεις που έγιναν (**A**), καθώς και οι μετρήσεις από το μετρητή Coulter (**B**). Φαίνεται από τις μετρήσεις ότι υπήρξε πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ του πειραματικού και θεωρητικού μοντέλου (R^2=0.9791). Επίσης παρουσιάζονται τα διαγράμματα για κάθε μέτρηση όπως αυτά παρουσιάζονται από το μετρητή Coulter (**C**).



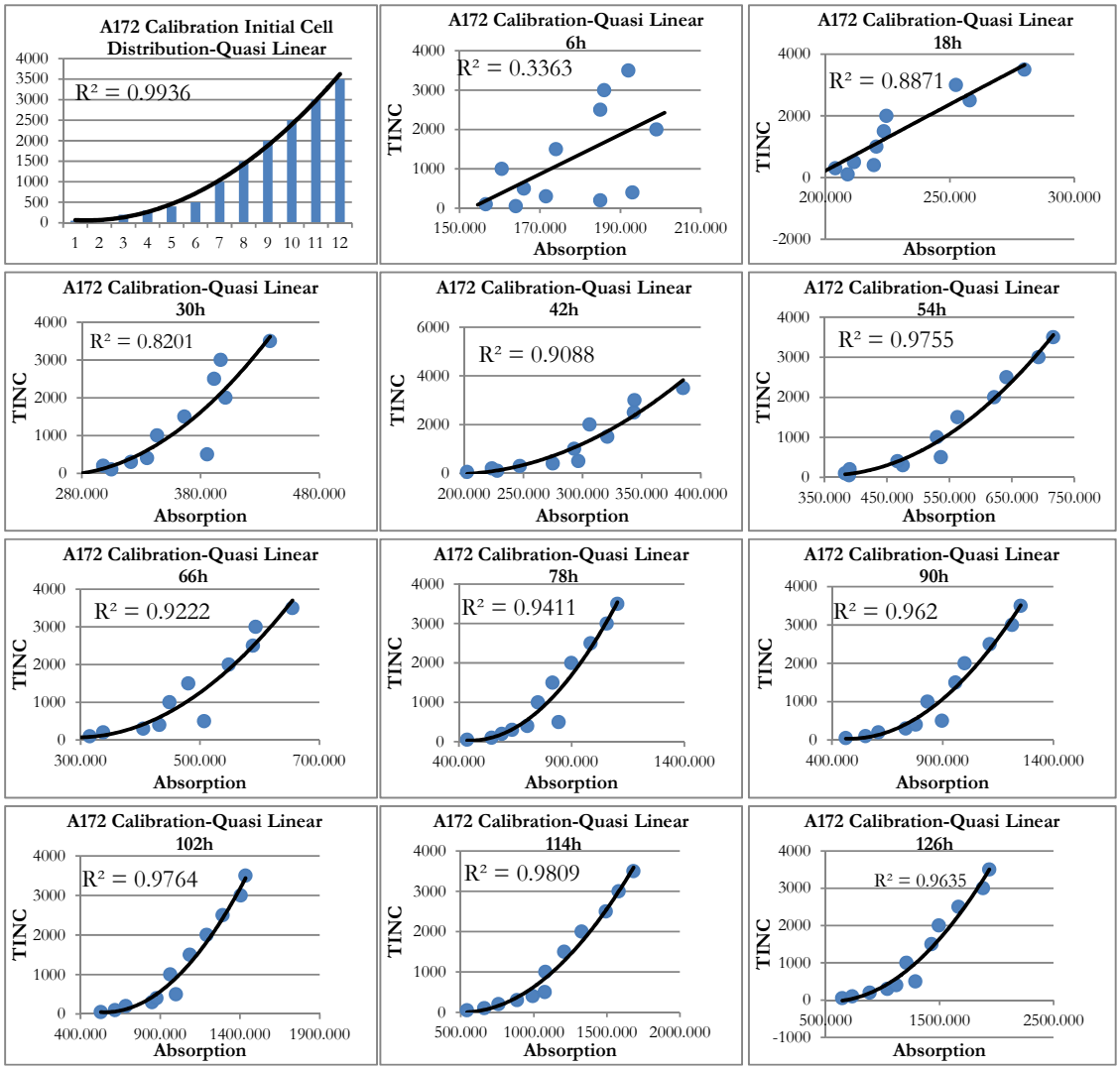
Εικόνα 84. Μετρήσεις ευαισθησίας και «κατωφλίου» στον μετρητή Coulter. Παρουσιάζονται οι μετρήσεις για όλα τα thresholds και για ευαισθησία 3 (**A**), 4 (**B**), 5 (**C**), 6 (**D**).

Παρόμοιες μετρήσεις έγιναν και για προσκολλώμενα κύτταρα, όπου τελικά επιλέχθηκαν οι παράμετροι 1 και 1 για την ευαισθησία και «κατώφλι» αντίστοιχα. Στην **Εικόνα 85** παρουσιάζονται οι ενδεικτικές μετρήσεις από τις κυτταρικές σειρές 1321N1, A172, TE671 και CCRFCEM. Πρέπει να παρατηρήσουμε ότι τα κύτταρα CCRFCEM έχουν την καλύτερη απόδοση μεταξύ της προσδοκώμενης και μετρούμενης κατανομής. Αυτό είναι απόλυτα αναμενόμενο, μιας και ο μετρητής Coulter έχει σχεδιασθεί για τη μέτρηση λευκών αιμοσφαιρίων, των οποίων τη δομή έχουν τα κύτταρα CCRFCEM, και όχι για άλλους τύπους. Μέσα από τη μελέτη αυτή μετατρέψαμε το μετρητή, μέσω των πειραμάτων τυποποίησης, ώστε να μπορεί να μετράει και διαλύματα άλλων κυτταρικών τύπων.



Εικόνα 85. Χαρακτηριστικά ιστογράμματα για τα κύτταρα 1321N1 (**A**), A172 (**B**), TE671 (**C**) και CCRFCEM (**D**). Η μπλε γραμμή υποδηλώνει το σημείο όπου σημειώνεται το μέγιστο της κατανομής του κάθε κυτταρικού τύπου, ενώ η κόκκινη διακεκομμένη γραμμή υποδηλώνει το σημείο, όπου θα έπρεπε να εμφανίζεται ιδανικά. Παρεκκλίσεις είναι αναμενόμενες μιας και η ιδανική κατανομή προερχόταν από τέλεια διαμορφωμένα σφαιρίδια.

Πάνω στις παραπάνω μετρήσεις στηρίχθηκαν όλες οι υπόλοιπες πειραματικές διατάξεις, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που αφορούσαν στη μέτρηση του πληθυσμού προσκολλώμενων κυττάρων αλλά όχι πλέον σε διάλυμα αλλά στο περιβάλλον καλλιέργειας. Ο αρχικός σχεδιασμός αφορούσε στη μέτρηση ενός κυτταρικού διαλύματος και στις μετέπειτα αραιώσεις ώστε να φτάσουμε στους επιθυμητούς κυτταρικούς αριθμούς για κάθε τύπο κυττάρου που μελετήσαμε. Ως εκ τούτου, έγιναν πειράματα τυποποίησης με τη χρήση φωτομετρίας και τη χρωστική Alamar Blue στις σειρές A172, 1321N1 και TE671. Στην επόμενη εικόνα (**Εικόνα 86**) παρουσιάζονται οι καμπύλες τυποποίησης συναρτήσει του χρόνου για τα κύτταρα A172.

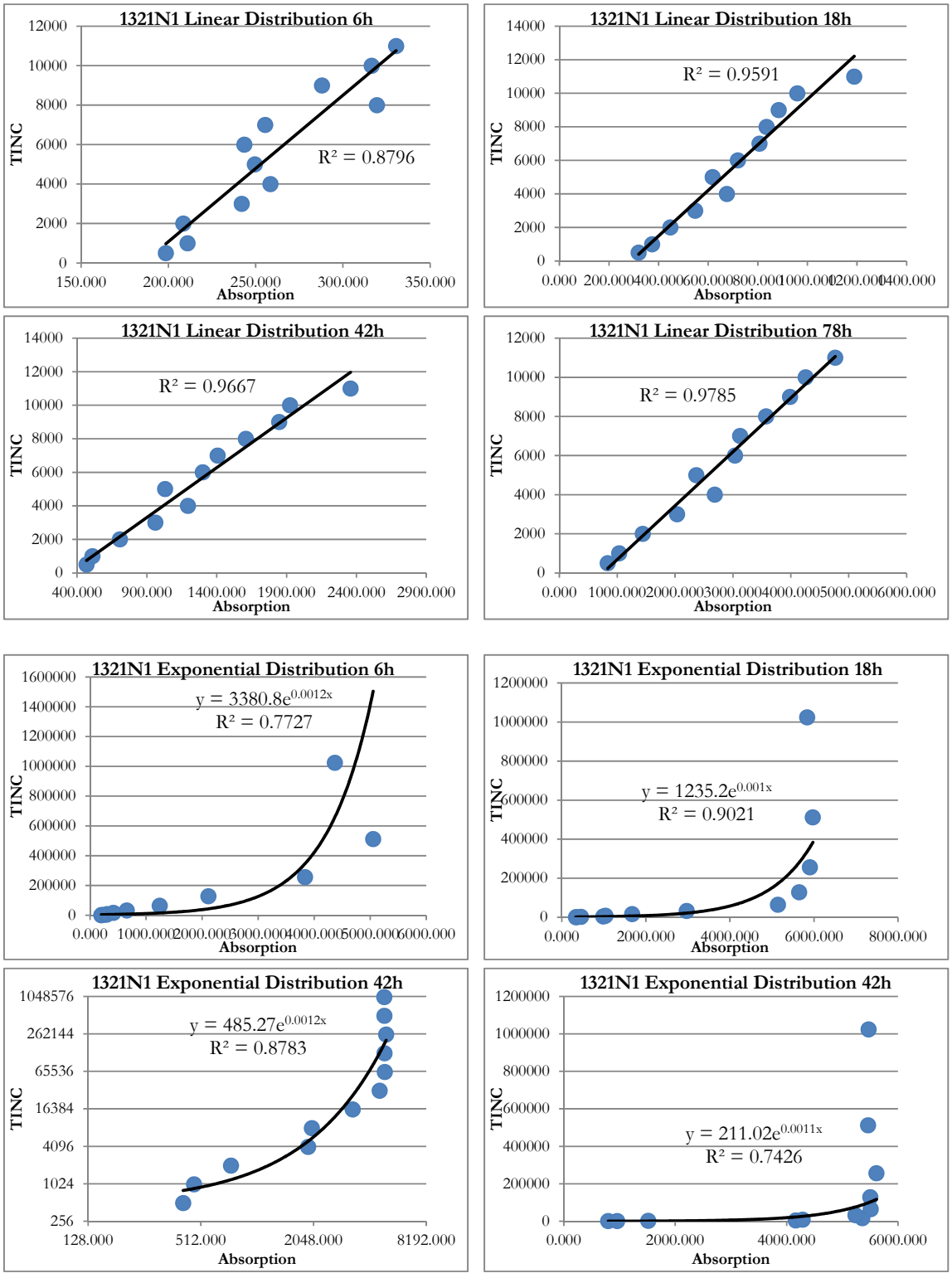


Εικόνα 86. Διάγραμμα των καμπυλών τυποποίησης (calibration) για τα κύτταρα A172 συναρτήσει του χρόνου και με ημι-γραμμική (quasi-linear) αρχική κατανομή πληθυσμού (**TINC**: Total Initial Cell Number).

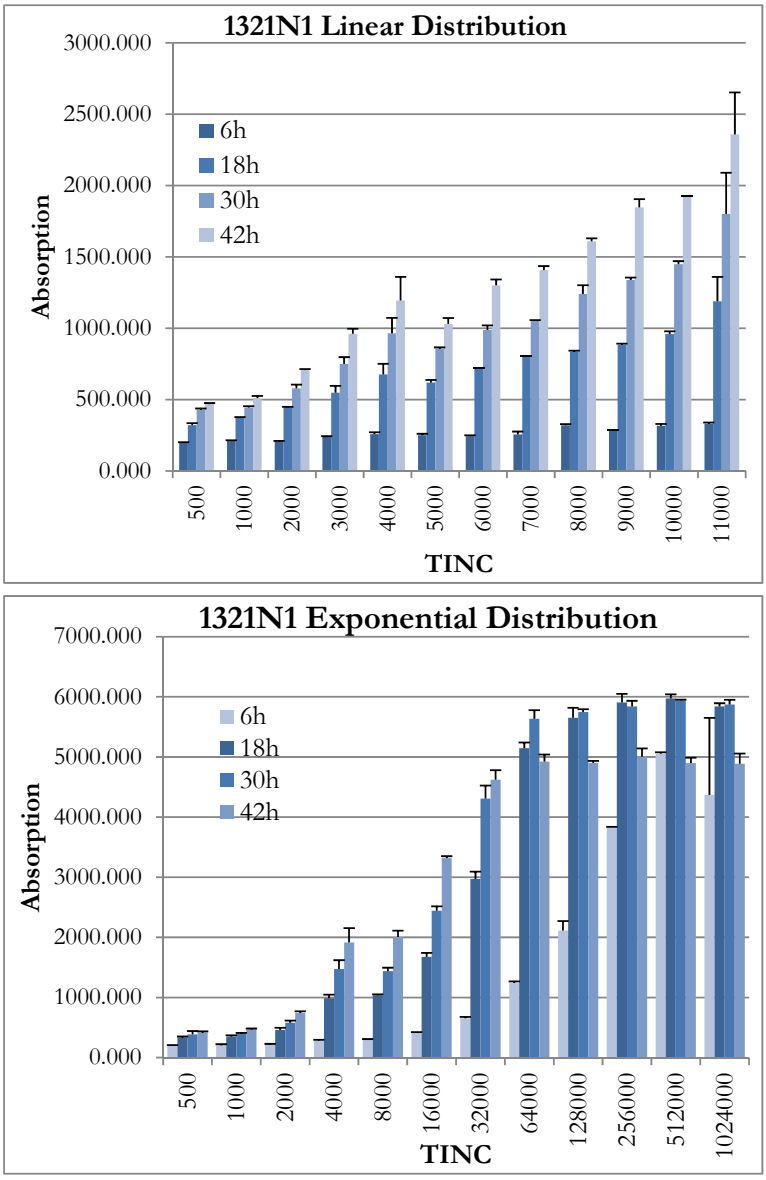
Το μοντέλο προσομοίωσης ήταν πολυωνυμικό 2ου βαθμού. Παρατηρούμε ότι όσο ο χρόνος αυξάνεται βελτιώνεται σταδιακά η σημαντικότητα της παλινδρόμησης. Είναι επίσης ενδιαφέρον ότι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός μπορεί να προσομοιωθεί με τον ίδιο τύπο συναρτήσεων.

Παρομοίως στην επόμενη εικόνα (**Εικόνα 87**) παρουσιάζουμε ενδεικτικές παλινδρομήσεις για τα κύτταρα 1321N1, για διαφορετικές χρονικές στιγμές. Στην περίπτωση των κυττάρων αυτών παρουσιάζουμε τόσο τη γραμμική αρχική κατανομή, με την οποία τα κύτταρα τοποθετήθηκαν στο πείραμα όσο και την εκθετική. Στο γραμμικό μοντέλο (linear distribution), τα κύτταρα συνέχιζαν να αναπτύσσονται κατά τον ίδιο τρόπο σε όλες τις χρονικές στιγμές ενώ στο εκθετικό μοντέλο (exponential distribution) μετά τις 18 ώρες υπάρχει μια αντιστροφή της ανάπτυξης στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις κυττάρων λόγω του κορεσμού που επήλθε πολύ γρήγορα και την έναρξη κυτταρικού θανάτου. Αυτό φαίνεται πολύ καλά στην **Εικόνα 88**, όπου παρατηρούμε ότι στις υψηλότερες

συγκεντρώσεις των κυττάρων υπήρξε γρήγορη αναστροφή της ανάπτυξης και μείωση της απορρόφησης της χρωστικής ως αποτέλεσμα του γεγονότος ότι τα κύτταρα άρχισαν να περνάνε σε απόπτωση λόγω της έλλειψης πόρων ήτοι τροφής και χώρου.



Εικόνα 87. Ενδεικτικές παλινδρομήσεις του πειράματος τυποποίησης για τα κύτταρα 1321N1 (TINC: Total; Initial Number of Cells).



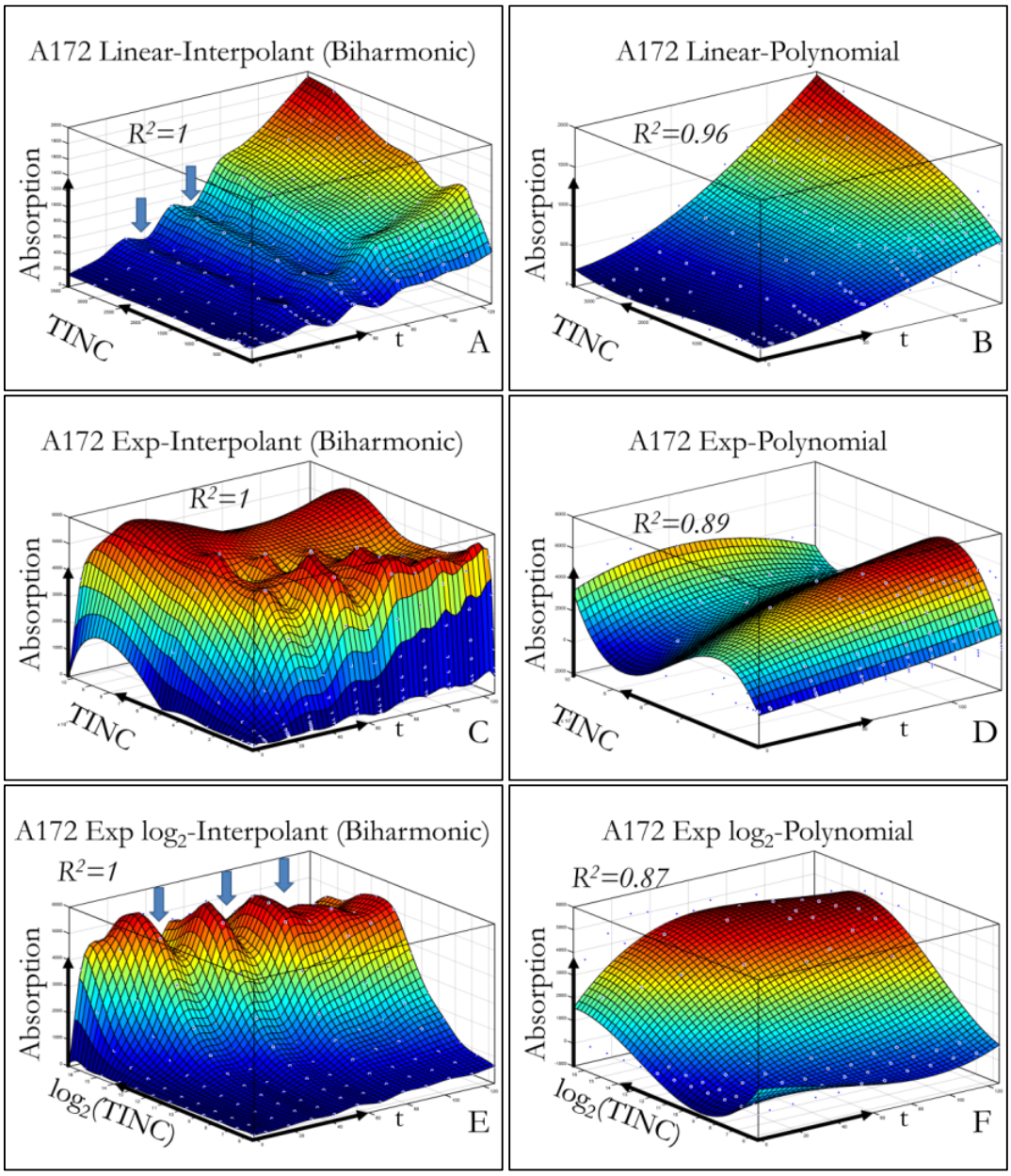
Εικόνα 88. Ιστόγραμμα της κυτταρικής ανάπτυξης συναρτήσει του χρόνου, όπου παρουσιάζονται ενδεικτικές χρονικές στιγμές για τη γραμμική κατανομή (επάνω) και την εκθετική κατανομή (κάτω).

Είναι προφανές ότι στους μεγάλους αρχικούς κυτταρικούς πληθυσμούς το πολλαπλασιαστικό μοντέλο δεν ίσχυε πλέον, αφού όπως είπαμε ενεπλάκησαν περαιτέρω φαινόμενα όπως η απόπτωση. Το φαινόμενο αυτό ελήφθει υπόψη στις μετέπειτα πειραματικές διατάξεις και μελετήθηκε.

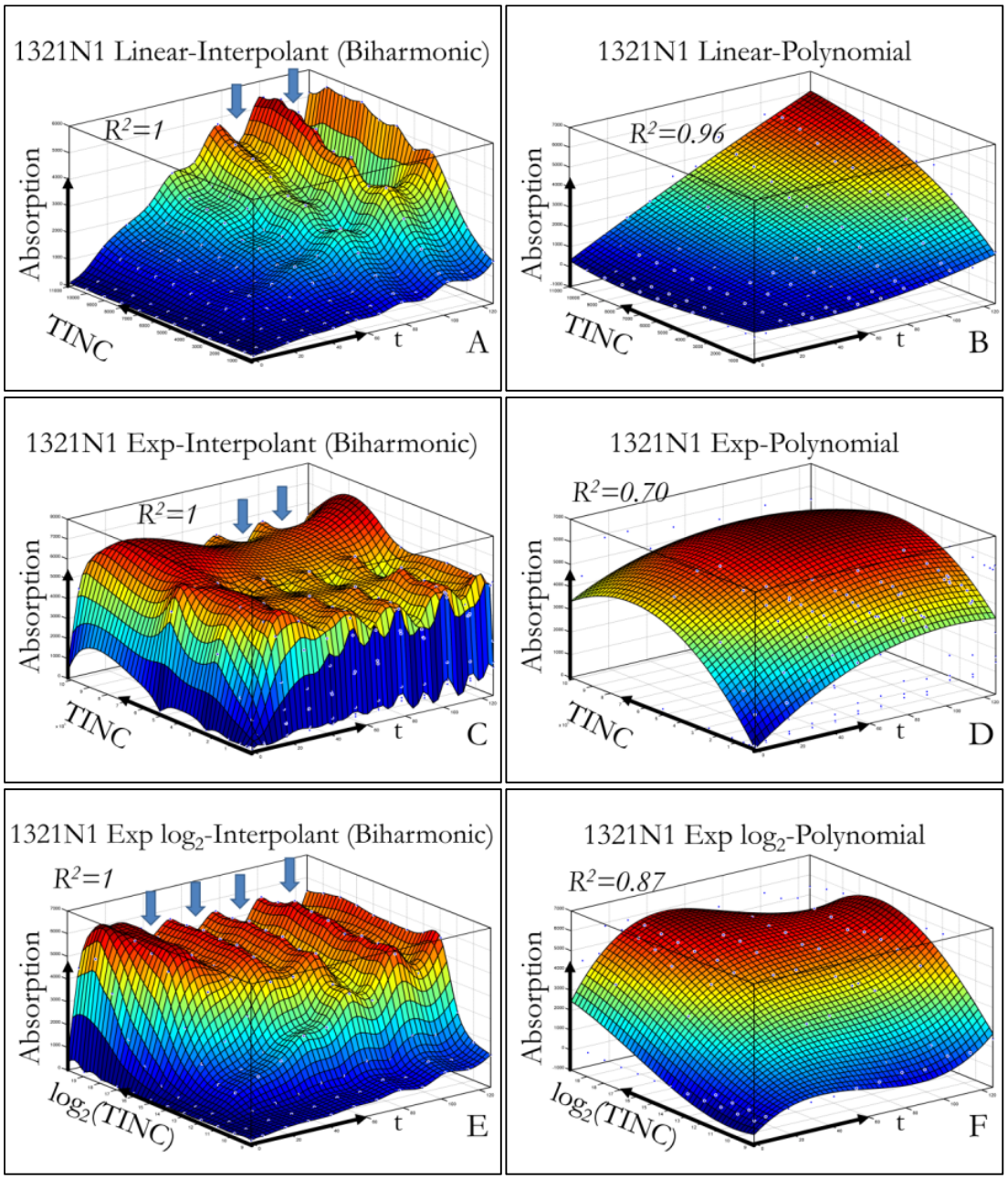
Επειδή όμως τα δεδομένα αυτά είναι πολυδιάστατα και κατά συνέπεια περίπλοκα, ένα πολύ καλό εργαλείο για την αναπαράστασή τους είναι οι τρισδιάστατες διαγραμματικές απεικονίσεις. Στην **Εικόνα 89**, παρουσιάζουμε τα αποτελέσματα από το πείραμα τυποποίησης για τα κύτταρα A172. Στα διαγράμματα αυτά παρουσιάζονται τα δεδομένα από τις μετρήσεις φωτομετρίας. Επίσης εμφανίζονται όλες οι κατανομές ήτοι η γραμμική και η εκθετική, καθώς για την εκθετική

παρουσιάζονται δύο εκδοχές η αυτούσια, όπως δηλαδή τοποθετήθηκαν τα κύτταρα στην πειραματική διάταξη αλλά και η λογαριθμική με βάση το 2 (log_2). Να θυμίσουμε ότι, όπως αναφέραμε στην ενότητα «Υλικό και Μέθοδοι» η γραμμική κατανομή αφορούσε στην τοποθέτηση κυττάρων κατά τρόπο γραμμικό π.χ. 10, 20, 30, 40, 50, κύτταρα κτλ. Αντίστοιχα η εκθετική κατανομή αφορούσε στην τοποθέτηση κυττάρων κατά τρόπο εκθετικό π.χ. 10, 20, 40, 80, 160 κτλ. Σε κάθε διάγραμμα υπάρχει μια τρισδιάστατη παλινδρόμηση και έχουν χρησιμοποιηθεί δύο μορφές. Η *Interpolant*, η οποία χρησιμοποιεί τη μέθοδο προσέγγισης των *spline interpolation* και η πολυωνιμική παλινδρόμηση, όπου γίνεται προσπάθεια προσέγγισης των σημείων των δεδομένων με πολυωνιμικές συναρτήσεις. Στην περίπτωση της πρώτης μεθοδολογίας, η προσέγγιση από το ένα σημείο στο άλλο γίνεται μέσα από τη χρήση πολυωνύμων μικρού βαθμού και η επιλογή αυτού, που προσεγγίζει καλύτερα το επόμενο σημείο. Η μέθοδος αυτή μας δίνει μια πολύ καλή αναπαράσταση της συνολικής συμπεριφοράς της καμπύλης σε όλο το πεδίο ορισμού και τιμών της. Έτσι έχει ενδιαφέρον να παρατηρήσουμε ότι και στην περίπτωση των κυττάρων A172, σχηματίζονται «κοιλάδες» στις μετρήσεις και αναπαρίστανται με βέλη στο διάγραμμα. Αυτό το φαινόμενο το είχαμε παρατηρήσει από τα πειράματα ελέγχου και η αρχική θεώρηση ήταν ότι επρόκειτο για υπολογιστικό, μεθοδολογικό λάθος. Όταν όμως επαναλήφθηκε και στα πειράματα τυποποίησης φάνηκε ότι ίσως να αποτελεί ένα φαινόμενο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Μια πιθανή ερμηνεία θα ήταν (κάτι που περιγράψουμε και στη συνέχεια) ότι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός δεν ακολουθεί γραμμική, αλλά ταλαντωτική πορεία και ως εκ τούτου μη-γραμμική. Κατά συνέπεια, αυτή ήταν μια από τις πρώτες ενδείξεις ότι έχουμε την εμφάνιση μη-γραμμικών φαινομένων στην κυτταρική δυναμική.

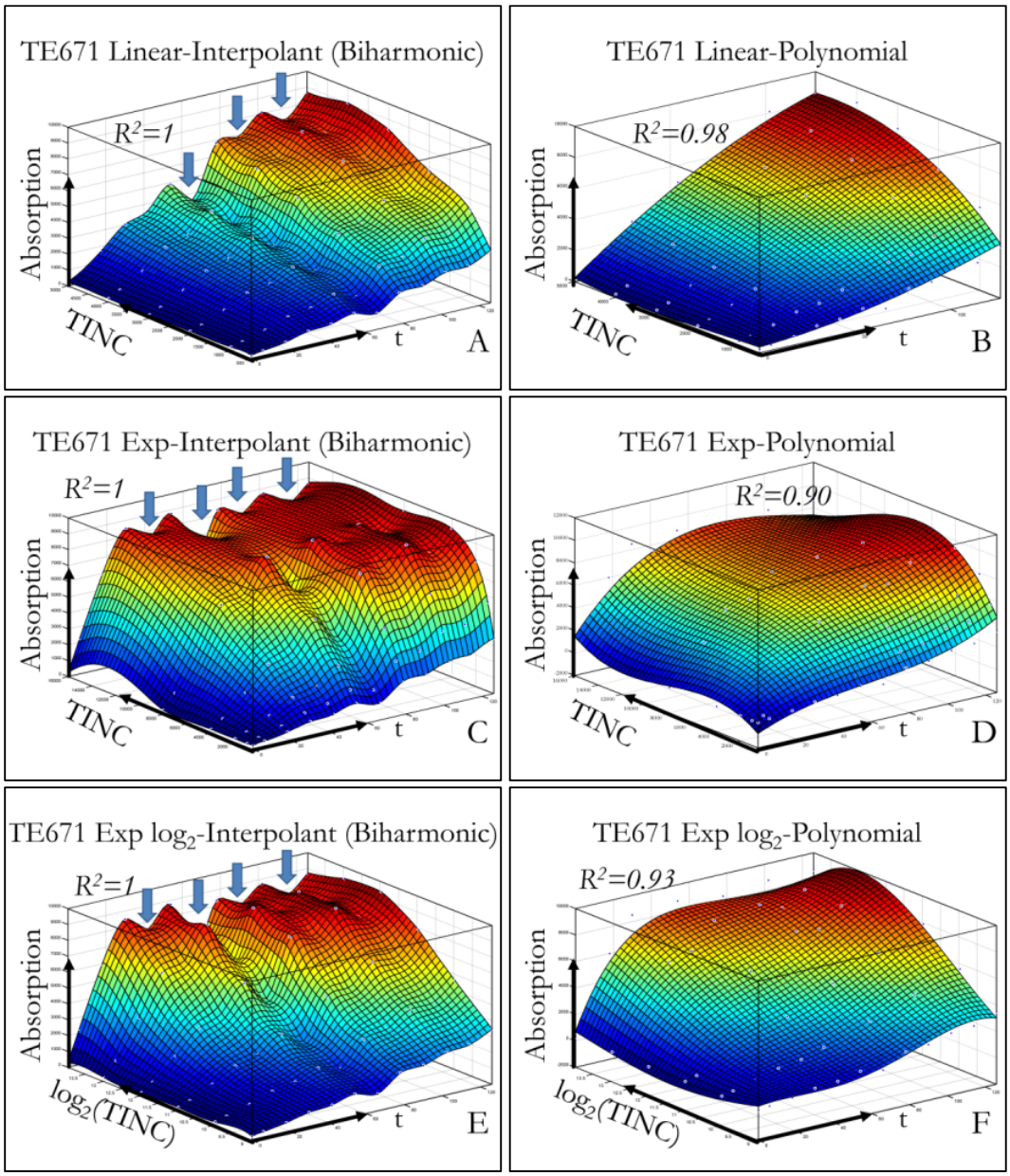
Παρόμοια διαγράμματα δημιουργήθηκαν για τα κύτταρα 1321N1 (**Εικόνα 90**) και TE671 (**Εικόνα 91**), που παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες.



Εικόνα 89. Τρισδιάστατα διαγράμματα των πειραμάτων τυποποίησης των κυττάρων A172. Παρουσιάζονται όλες οι μεταβλητές του πειράματος. Στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t), στον άξονα των Y είναι ο αρχικός αριθμός των κυττάρων (TINC: Total Initial Number of Cells) τόσο τη γραμμική κατανομή (linear) όσο και για την εκθετική (exponential). Ειδικά για την εκθετική κατανομή χρησιμοποιήθηκε τόσο η αυτούσια κατανομή όσο και η λογαριθμισμένη (log_2(TINC)). Τα μαύρα βέλη στους άξονες δείχνουν την αύξουσα φορά των τιμών. Σε κάθε διάγραμμα αναφέρετε και ο δείκτης παλινδρόμησης (R^2) και αφορά στην τιμή *Adjusted* R^2. Τα μπλε βέλη υποδεικνύουν τα σημεία, όπου η καμπύλη σχηματίζει «κοιλάδες».



Εικόνα 90. Τρισδιάστατα διαγράμματα των πειραμάτων τυποποίησης των κυττάρων 1321N1. Παρουσιάζονται όλες οι μεταβλητές του πειράματος. Στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t), στον άξονα των Y είναι ο αρχικός αριθμός των κυττάρων (TINC: Total Initial Number of Cells) τόσο τη γραμμική κατανομή (linear) όσο και για την εκθετική (exponential). Ειδικά για την εκθετική κατανομή χρησιμοποιήθηκε τόσο η αυτούσια κατανομή όσο και η λογαριθμισμένη (log_2(TINC)). Τα μαύρα βέλη στους άξονες δείχνουν την αύξουσα φορά των τιμών. Σε κάθε διάγραμμα αναφέρεται και ο δείκτης παλινδρόμησης (R^2) και αφορά στην τιμή *Adjusted* R^2. Τα μπλε βέλη υποδεικνύουν τα σημεία, όπου η καμπύλη σχηματίζει «κοιλάδες».

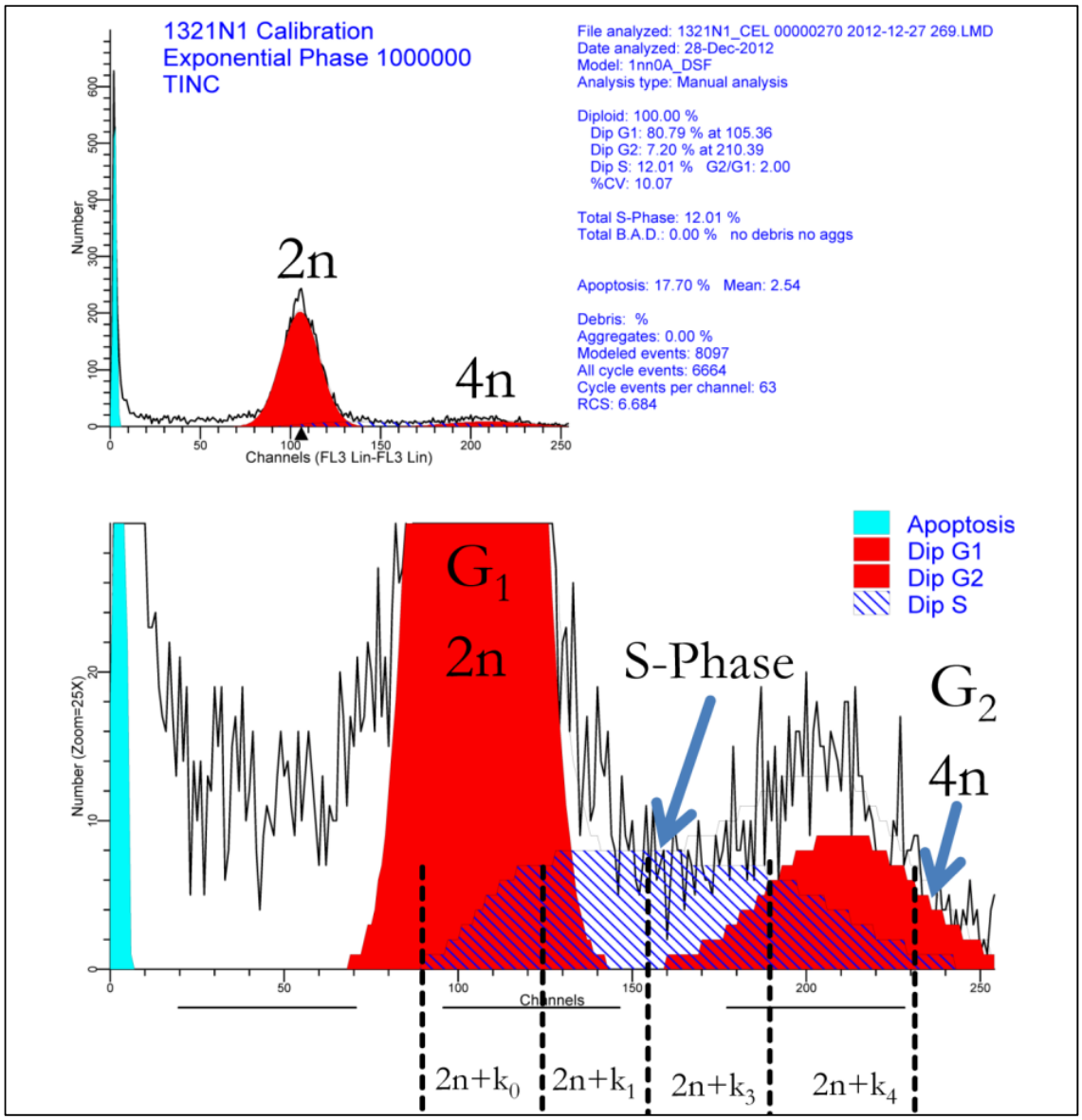


Εικόνα 91. Τρισδιάστατα διαγράμματα των πειραμάτων τυποποίησης των κυττάρων TE671. Παρουσιάζονται όλες οι μεταβλητές του πειράματος. Στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t), στον άξονα των Y είναι ο αρχικός αριθμός των κυττάρων (TINC: Total Initial Number of Cells) τόσο τη γραμμική κατανομή (linear) όσο και για την εκθετική (exponential). Ειδικά για την εκθετική κατανομή χρησιμοποιήθηκε τόσο η αυτούσια κατανομή όσο και η λογαριθμιμένη ($\log_2$(TINC)). Τα μαύρα βέλη στους άξονες δείχνουν την αύξουσα φορά των τιμών. Σε κάθε διάγραμμα αναφέρετε και ο δείκτης παλινδρόμησης (R^2) και αφορά στην τιμή *Adjusted* R^2. Τα μπλε βέλη υποδεικνύουν τα σημεία, όπου η καμπύλη σχηματίζει «κοιλάδες».

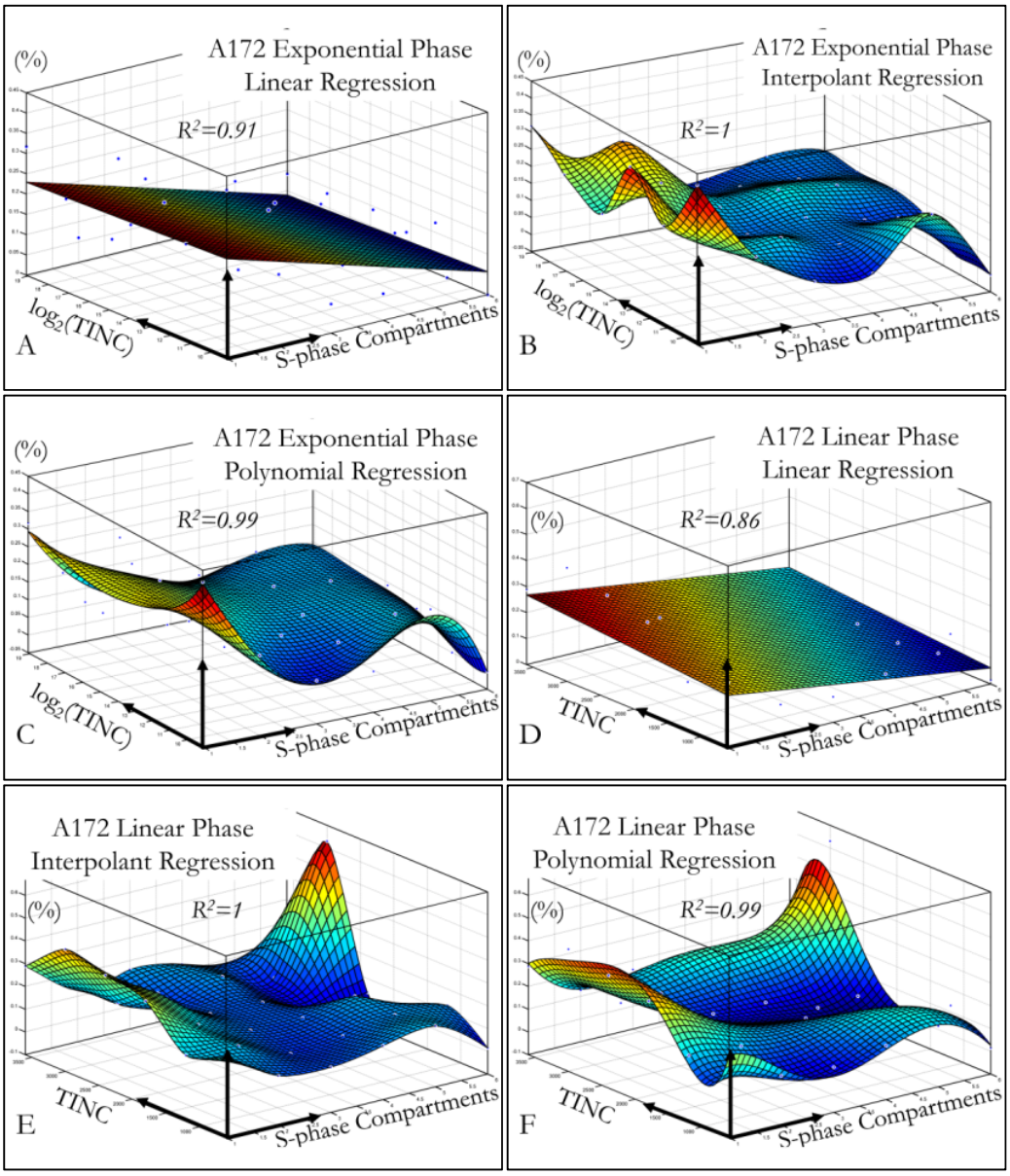
Ενδεικτικά αναφέρουμε ότι στην τελευταία φάση (~120 ώρες καλλιέργειας στα πειράματα βαθμονόμησης) μελετήσαμε τα κύτταρα με κυτταρομετρία ροής ως προς την κατανομή του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση. Επίσης μια σημαντική παράμετρος του κυτταρικού κύκλου είναι η τμηματοποίηση της S φάσης (S-phase compartments). Η τμηματοποίηση αυτή μπορεί να υπολογισθεί μέσω προσομοιώσεων αλλά έχει και μια σημαντική βιολογική σημασία. Στα

διαγράμματα του κυτταρικού κύκλου, η S-φάση εμφανίζεται ως μια ζώνη, η οποία υποδεικνύει τα κύτταρα που έχουν περάσει στη σύνθεση νέας χρωματίνης. Το εύλογο ερώτημα και παρατήρηση ταυτόχρονα είναι ότι δεν έχουν συνθέσει όλα τα κύτταρα την ίδια ποσότητα χρωματίνης στον ίδιο χρόνο αλλά υπάρχουν διαφορετικοί πληθυσμοί με διαφορετικά επίπεδα σύνθεσης χρωματίνης. Ως εκ τούτου, είναι δυνατό να υπολογισθεί με προσέγγιση και ποσοστιαία ο πληθυσμός των κυττάρων που βρίσκονται στα διάφορα επίπεδα χρωματίνης. Η λογική αυτή παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 92**).

Από τις προσομοιώσεις αυτές μπορούμε να κάνουμε κάποιες παρατηρήσεις. Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 93 A**, **D** η γραμμική παλινδρόμηση μας δείχνει ότι η μετάβαση από το ένα τμήμα της S-φάσης στο επόμενο γίνεται με σταθερά μειούμενο ρυθμό. Το ενδιαφέρον είναι μάλιστα ότι το φαινόμενο αυτό παραμένει σχετικά σταθερό ανεξαρτήτων του αρχικού αριθμού από τον οποίο ξεκίνησαν τα κύτταρα. Επίσης ενδιαφέρον έχει η παρατήρηση ότι η κλίση της επιφάνειας γίνεται μεγαλύτερη στα κύτταρα που τέθηκαν εκθετικά στην αρχική καλλιέργεια σε σχέση με αυτά που τέθηκαν με γραμμική κατανομή. Θυμίζουμε ότι όλα τα κύτταρα περισυλλέχθηκαν και μετρήθηκαν στις 120 ώρες καλλιέργειας κατά συνέπεια το φαινόμενο αυτό έχει μελετηθεί κατά τον ίδιο τρόπο σε όλους τους πειραματικούς συνδυασμούς.

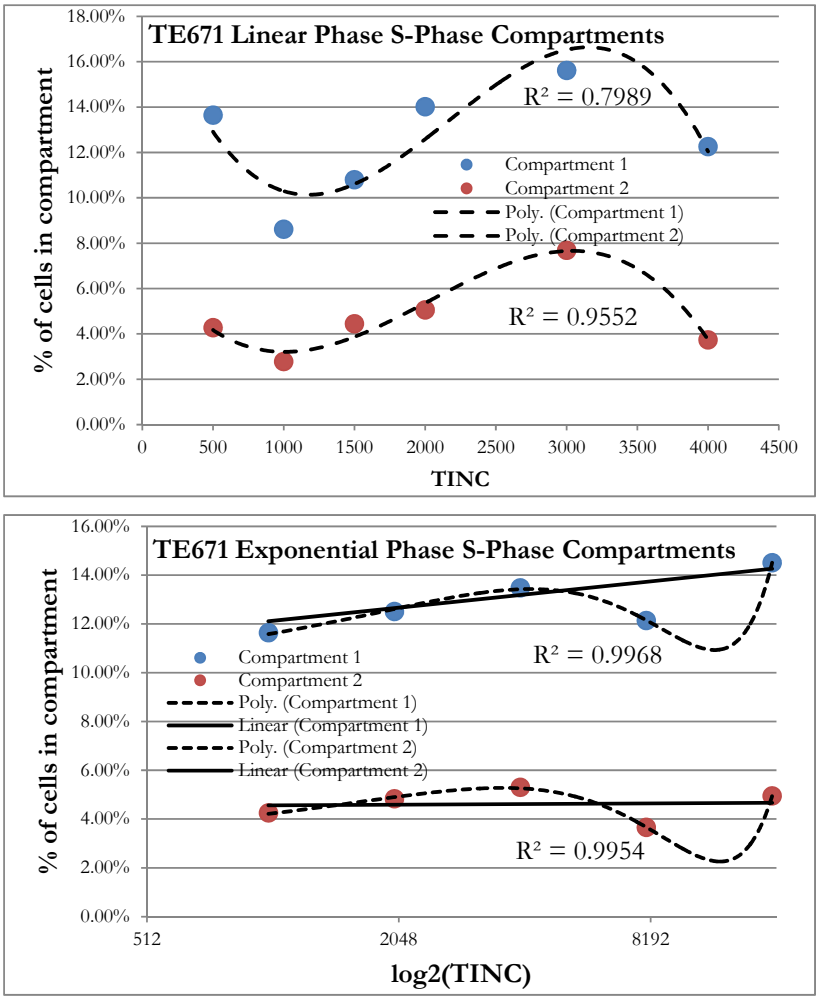


Εικόνα 92. Παράδειγμα κυτταρικού κύκλου από πειραματική διάταξη βαθμονόμησης. Στο κάτω μέρος παρουσιάζεται η μεγέθυνση του κυτταρικού κύκλου, όπου με σκιασμένο τρόπο παρουσιάζεται η S-φάση. Η φάση αυτή μπορεί να χωρισθεί περαιτέρω σε μικρότερες υπο-ομάδες, που η κάθε μια αντιστοιχεί σε έναν πληθυσμό κυττάρων με διαφορετικό επίπεδο σύνθεσης χρωματίνης. Ως εκ τούτου, αν τα κύτταρα έχουν περιεχόμενο DNA *2n* στη G_1 φάση, τότε μέχρι τη G_2 παρεμβάλλονται x πληθυσμοί, όπου $x=\{k_0,k_1,\ldots k_n\}$ και όπου k ένας ασύμμετρος παράγοντας και όπου ισχύει $k_0+k_1+\ldots+k_n \approx 2n$.



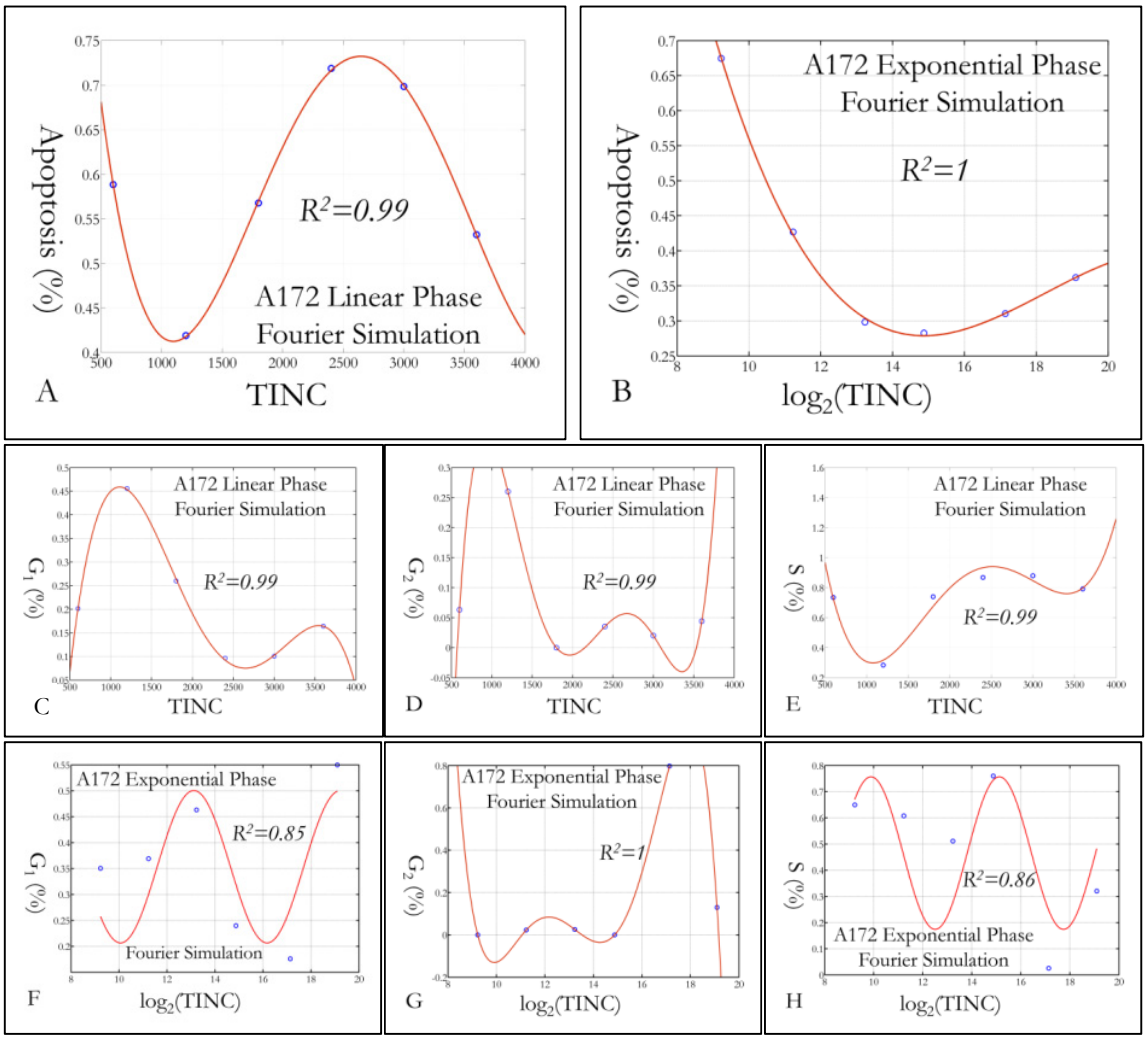
Εικόνα 93. Προσομοιώσεις των δεδομένων του κυτταρικού κύκλου από τα πειράματα βαθμονόμησης. Η S-φάση διαχωρίστηκε σε τμήματα (compartments), τα οποία αντιπροσωπεύουν τους κυτταρικούς πληθυσμούς που εισέρχονται σε σύνθεση χρωματίνης συναρτήσει του χρόνου. Από τη γραμμική παλινδρόμηση (**A**) για τα κύτταρα σε καλλιέργεια εκθετικών πληθυσμών φάνηκε ότι υπήρχε πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ των τμημάτων της S-φάσης και του αρχικού αριθμού των κυττάρων. Το αποτέλεσμα αυτό φαίνεται και πολύ ωραία στην Interpolant παλινδρόμηση (**B**) καθώς και την πολυωνιμική (**C**). Αντίστοιχα στα πειράματα βαθμονόμησης, όπου οι αρχικοί πληθυσμοί ακολουθούσαν γραμμική κατανομή παρουσίασαν παρόμοια αποτελέσματα για τη γραμμική (**D**), interpolant (**E**) και πολυωνιμική παλινδρόμηση (**F**) αντίστοιχα (TINC: Total Initial Number of Cells).

Στα παραπάνω πειράματα δείχθηκε ότι ο υπολογισμός των τμημάτων της S-φάσης απέδωσε έξι συνολικά τμήματα. Αυτό δεν είναι παγιωμένο μιας και είναι πιθανό να υπολογισθούν περισσότερα ή ακόμα και λιγότερα τμήματα της S-φάσης. Μια τέτοια περίπτωση εμφανίσθηκε στην κυτταρική σειρά TE671. Τα κύτταρα αυτά είχαν δύο τμήματα στην S-φάση γεγονός που υποδείκνυε ότι από τη G_1 εισερχόντουσαν σε σύνθεση χρωματίνης και από εκεί ταχύτατα σε διπλασιασμό της και στη G_2-φάση. Ο καταμερισμός των ποσοστών στα τμήματα της S-φάσης παρουσιάζεται στην **Εικόνα 94**. Ενδιαφέρον έχει η παρατήρηση ότι οι καμπύλες στα δύο τμήματα της S-φάσης έχουν σχεδόν ακριβώς την ίδια κατανομή και μάλιστα και στις δύο περιπτώσεις αρχικού πληθυσμού των κυττάρων ήτοι στη γραμμική τοποθέτηση και στην εκθετική. Παρατηρούμε επίσης ότι στη γραμμική κατανομή των κυττάρων υπάρχει μια ταλαντωτική συμπεριφορά των κυττάρων που εισέρχονται στη σύνθεση χρωματίνης με τοπικά ακρότατα στην ταλάντωση αυτή στα 1000 κύτταρα αρχικού πληθυσμού (τοπικό ελάχιστο) και στα 3000 κύτταρα (τοπικό μέγιστο). Αντίστοιχα στην εκθετική κατανομή έχουμε τοπικό ελάχιστο στα 1000 κύτταρα και τοπικό μέγιστο στα 560000 κύτταρα. Παρατηρούμε πως συνάδουν τα τοπικά ελάχιστα για τις δύο πειραματικές διατάξεις. Πρέπει στο σημείο αυτό να θυμίσουμε ότι οι μετρήσεις αυτές έγιναν στο τέλος της πειραματικής διάταξης και η συσχέτιση έγινε με τους αρχικούς πληθυσμούς από τους οποίους ξεκίνησαν τα κύτταρα. Το γεγονός ότι υπάρχει τρόπος να συσχετισθούν αυτά τα δύο αποτελεί ένα σημαντικό εύρημα μιας και όπως είπαμε στην εισαγωγή της παρούσης εργασίας, ένας από τους παράγοντες που μας είναι άγνωστος μέχρι σήμερα είναι η πορεία που ακολουθεί η νεοπλασία από τη στιγμή που θα εμφανισθεί μέχρι του σημείου της διάγνωσης. Καταλαβαίνουμε λοιπόν ότι πρέπει να ανευρεθούν τρόποι ώστε να συσχετισθούν οι τελικοί πληθυσμοί με τα χαρακτηριστικά τους με τους αρχικούς πληθυσμούς. Τα ευρήματα αυτά είναι επίσης αρκετά ενδιαφέροντα διότι φαίνεται ότι η πορεία ενός κυτταρικού πληθυσμού είναι εξαρτώμενη της αρχικής του κατάστασης. Επίσης η ύπαρξη εξάρτησης από τις αρχικές συνθήκες είναι ένας δείκτης μη-γραμμικότητας δηλαδή χαοτικής συμπεριφοράς σε ένα σύστημα κάτι που φάνηκε ήδη από τα ευρήματα των πειραμάτων βαθμονόμησης.



Εικόνα 94. Παλινδρομήσεις των τμημάτων της S-φάσης στα κύτταρα TE671 στις πειραματικές διατάξεις βαθμονόμησης στη γραμμική αρχική κατανομή (επάνω) και στην εκθετική αρχική κατανομή (κάτω).

Αντίστοιχες παλινδρομήσεις έγιναν και για τα δεδομένα του κυτταρικού κύκλου και έγινε προσπάθεια να ανευρεθούν συσχετίσεις μεταξύ των μετρήσεων στο τέλος των πειραματικών διατάξεων και του αρχικού αριθμού των κυττάρων. Στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 95**) παρουσιάζονται τα ενδεικτικά αποτελέσματα για τη σειρά A172.



Εικόνα 95. Παλινδρόμηση των δεδομένων του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης στα πειράματα βαθμονόμησης με την κυτταρική σειρά A172. Παρουσιάζονται οι παλινδρομήσεις για την απόπτωση στη γραμμική κατανομή (**A**), την απόπτωση στην εκθετική κατανομή (**B**), τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου στη γραμμική κατανομή (**C**-**E**) τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου στην εκθετική κατανομή (**F**-**H**).

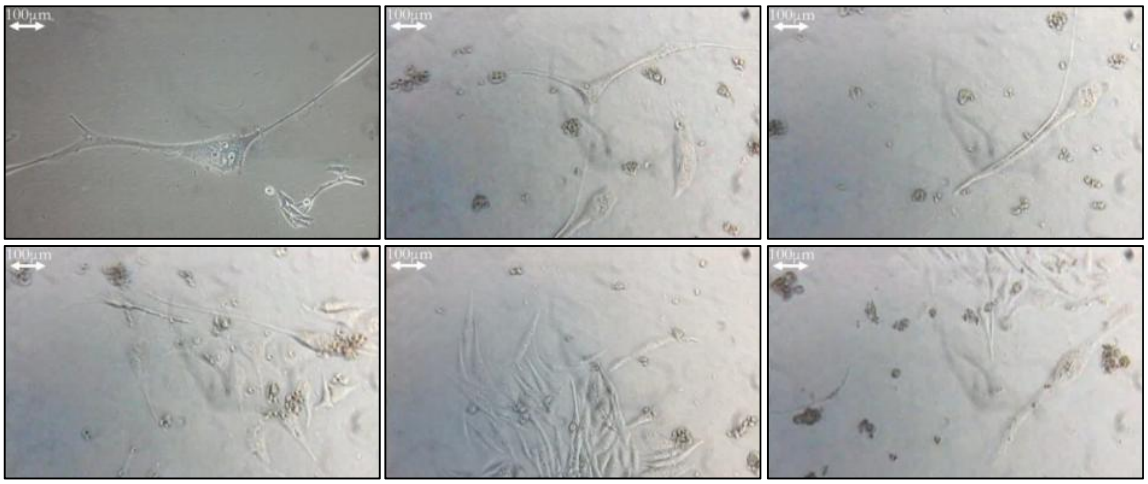
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εδώ παρουσιάζει η απόπτωση, η οποία στη γραμμική κατανομή δείχνει να έχει και αυτή καμπύλη ταλάντωσης. Θα ήταν αναμενόμενο αυξανομένου του αριθμού των κυττάρων να αυξάνεται και η απόπτωση, λόγω του περιορισμού στους πόρους ήτοι τροφή και χώρος. Φαίνεται όμως από τα προκαταρκτικά αυτά αποτελέσματα ότι οι δύο αυτοί παράγοντες δεν είναι οι μόνοι που παίζουν ρόλο αλλά υπάρχουν και άλλοι παράγοντες στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Παρατηρούμε πως η απόπτωση έχει ένα τοπικό ελάχιστο στα 1200 κύτταρα (**Εικόνα 95Α**) και αντίστοιχα στην εκθετική κατανομή παρατηρούμε τοπικό ελάχιστο στα 8000 κύτταρα (**Εικόνα 95Β**). Μέσα από αυτά τα αποτελέσματα προέκυψαν περαιτέρω ερωτήματα σχετικά με τη φύση των μηχανισμών που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ποιος είναι ο λόγος που ο αρχικός αριθμός των κυττάρων δεν έχει ανάλογα αποτελέσματα στις τελικές του φάσεις; Θα περίμενε κανείς ότι μια γραμμική κατανομή θα είχε ως αποτέλεσμα τη γραμμικότητα σε παράγοντες όπως η απόπτωση ή ο κυτταρικός κύκλος κάτι που όμως δεν είναι το αποτέλεσμα. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός λαμβάνει χώρα ασσύμετρα και τελικώς μη-γραμμικά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 24

IN VITRO ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ-ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ (MINIMUM GROWTH EXPERIMENTS)

Σκοπός αυτών των πειραμάτων ήταν η διαπίστωση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων από πολύ μικρούς αριθμούς. Λέγοντας μικρούς αριθμούς εννοούμε πληθυσμό κυττάρων που ξεκινούσε από τα 2-6 κύτταρα σε ένα πηγάδι πλάκας μικροτιτλοποίησης μέχρι τα ~5000 κύτταρα. Το βασικό εργαλείο για την παρακολούθηση αυτών των πειραμάτων ήταν η μικροσκοπία, αφού καμία μέθοδος από τις υπόλοιπες που αναφέρθηκαν δεν έχει την ικανότητα να ανιχνεύσει κύτταρα σε τόσο μικρούς αριθμούς. Η πιο ευαίσθητη μέθοδος που υπάρχει μέχρι σήμερα, είναι η φωτομετρική ταυτοποίηση με διάφορες χρωστικές στις οποίες έχουμε ήδη αναφερθεί και η οποία μπορεί να ανιχνεύσει 50-100 κύτταρα σε ένα πηγάδι πλάκας τιτλοποίησης 96 θέσεων (96-well plate). Σε κάποιες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν και μεγαλύτεροι κυτταρικοί πληθυσμοί στους οποίους έγιναν μετρήσεις με φωτομετρικές μεθόδους.

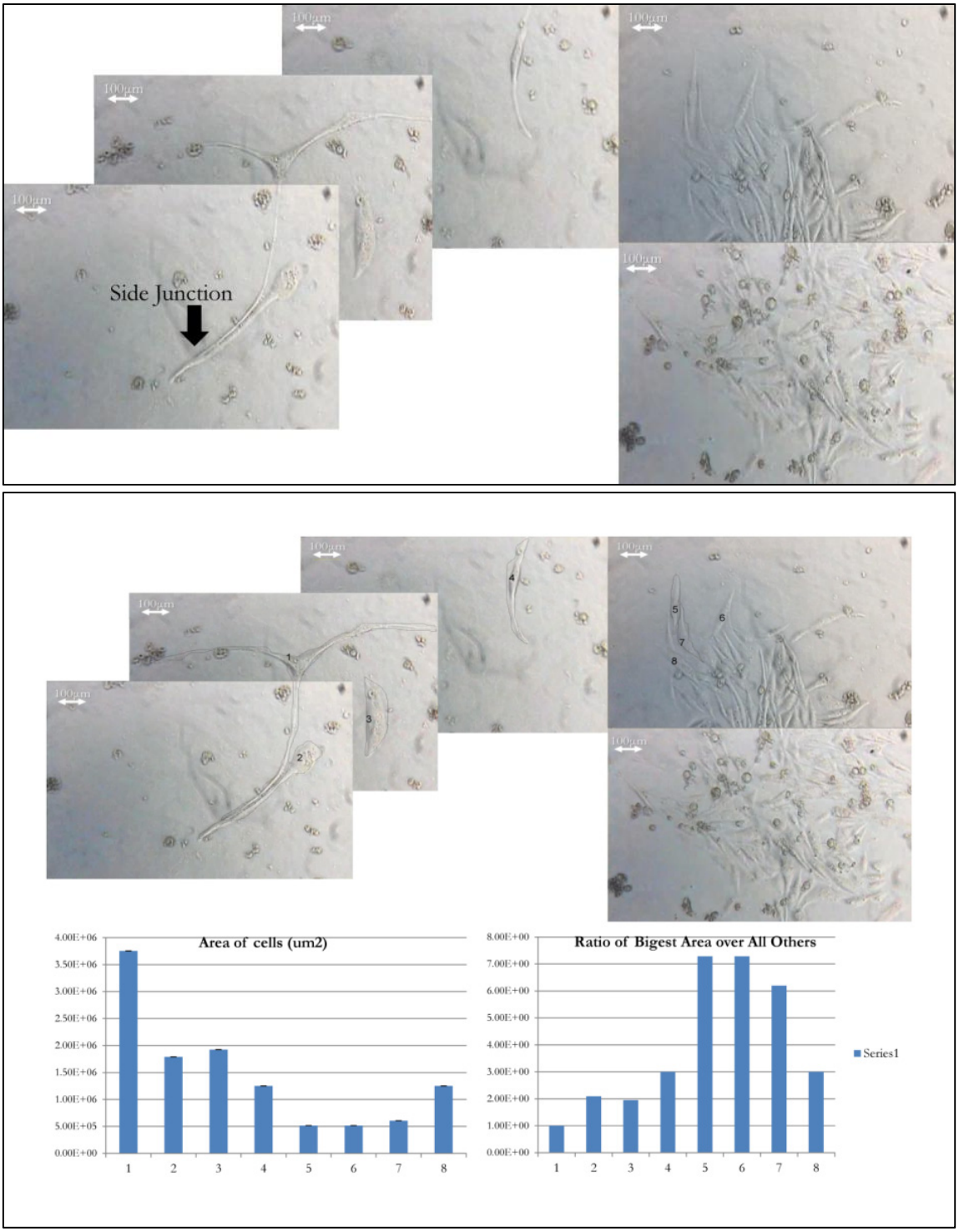
Για τα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν πλάκες μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων στις οποίες καλλιεργήθηκαν κύτταρα σε διάφορες αρχικές συγκεντρώσεις. Η κύρια λογική ήταν όμως να εξετασθεί το ερώτημα αν υπήρχε ένας ελάχιστος αριθμός κυττάρων που ήταν απαραίτητος για να επιτευχθεί πολλαπλασιασμός σε ένα εύλογο χρονικό διάστημα. Τα πρώτα πειράματα έγιναν με τη λευχαιμική σειρά CCRFCEM, την οποία θα αναφέρουμε στο τέλος του κεφαλαίου. Ακολούθησαν πειράματα με την κυτταρική σειρά RD. Στα πειράματα αυτά έγινε η πρώτη παρατήρηση της εμφάνισης κυττάρων των οποίων η μορφολογία ήταν πολύ διαφορετική από αυτή των κυττάρων που είχαμε παρατηρήσει στα πειράματα ελέγχου. Στην **Εικόνα 96**, παρουσιάζουμε λήψεις μικροσκοπίας από πείραμα ελάχιστης ανάπτυξης στα κύτταρα RD από αρχικό αριθμό 256 κυττάρων και μετά από επτά ημέρες στην καλλιέργεια.



Εικόνα 96. Λήψεις μικροσκοπίας των κυττάρων RD σε πείραμα ελάχιστης ανάπτυξης. Φαίνονται ευδιάκριτα διαφορετικές μορφολογίες των κυττάρων ειδικά μεταξύ αυτών που βρέθηκαν απομονωμένα και αυτών που μεγάλωσαν κοντά σε άλλα.

Για να μπορέσουμε να κατανοήσουμε καλύτερα τις παραπάνω λήψεις προσπαθήσαμε να κάνουμε ένα μωσαϊκό καθώς και χρησιμοποιώντας μεθόδους μικρομετρίας ποσοτικοποιήσαμε ορισμένα από τα μικροσκοπικά δεδομένα. Το αποτέλεσμα αυτό παρουσιάζεται στην **Εικόνα 97**.

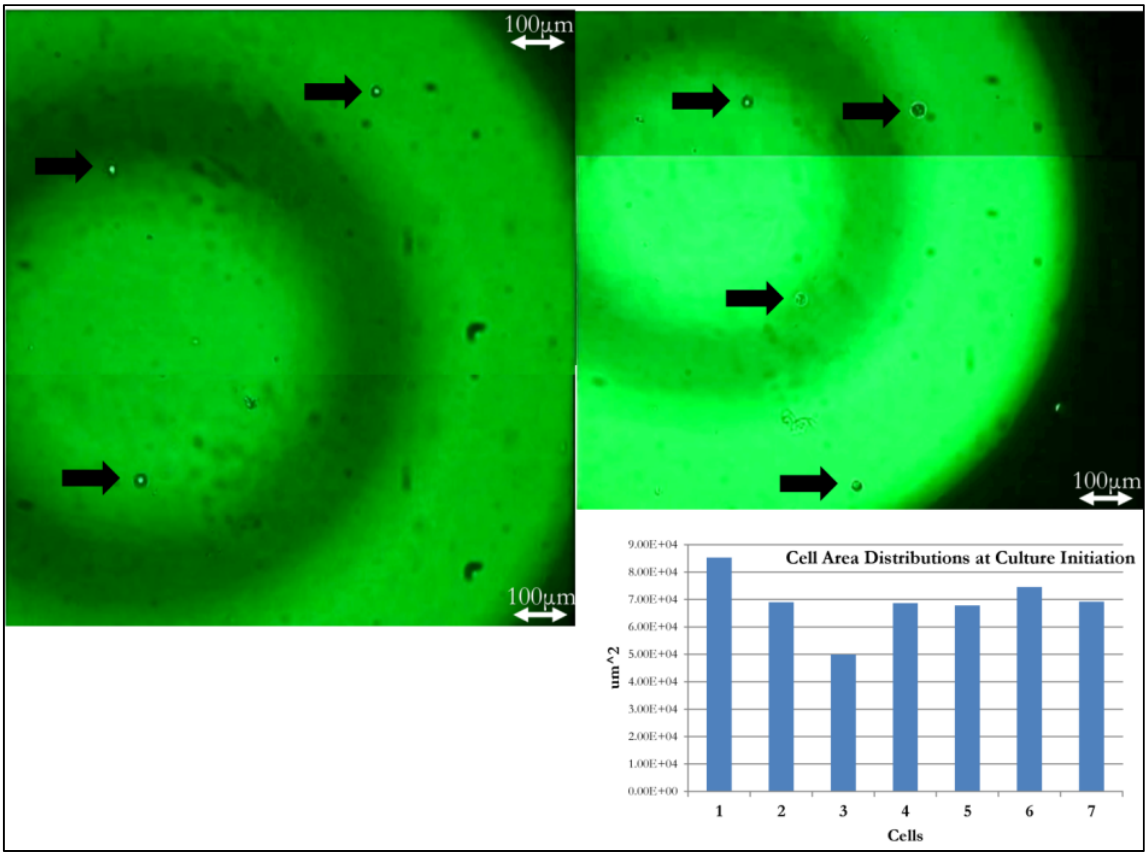
Ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι ο μικροσκοπικός φακός «συνέλαβε» την πλευρική σύζευξη δύο κυττάρων. Παρατηρούμε ότι τα κύτταρα που βρέθηκαν απομονωμένα άλλαξαν μορφολογία αναπτύσσοντας δομές που ενδεχομένως εξυπηρετούσαν στην αναζήτηση άλλων κυττάρων, όπως είναι τα ψευδο-αξόνια που παρατηρούμε στα μεγαλύτερα κύτταρα. Ποσοτικοποιώντας τα αποτελέσματα αυτά, φάνηκε ότι ορισμένα από τα κύτταρα αυτά είχαν μέγεθος έως και επτά φορές μεγαλύτερο από τα κύτταρα που αυξήθηκαν μέσω γειτνίασης, δηλαδή αυτά που είχαν την αναμενόμενη ατρακτοειδή μορφολογία.



Εικόνα 97. Μωσαϊκό των εικόνων της **Εικόνα 96**. Φαίνεται η σύζευξη δύο κυττάρων (επάνω). Η μορφολογία των κυττάρων που βρέθηκαν κοντά είναι ατρακτοειδής ενώ αυτών που ήταν πιο απομακρυσμένα είχαν τελείως διαφορετική μορφολογία από τα υπόλοιπα. Ενδιαφέρον επίσης είναι το γεγονός ότι η επιφάνεια του μεγαλύτερου κυττάρου (υπ. Αριθμ. 1 κάτω) ήταν μέχρι και επτά φορές μεγαλύτερη από τα άλλα κύτταρα, όπως φαίνεται στο ιστόγραμμα.

Αντίστοιχα πειράματα έγιναν και σε άλλες κυτταρικές σειρές. Ενδιαφέρον παράδειγμα αποτελεί η κυτταρική σειρά A172. Η σειρά αυτή καλλιεργήθηκε σε πλάκες μικροτιτλοποίησης 96 πηγαδιών με αρχικούς πληθυσμούς που κυμαίνονταν από τέσσερα (4) κύτταρα ανά πηγάδι έως 4096 κύτταρα. Τα κύτταρα αφέθηκαν να μεγαλώσουν και ανά περιοδικά χρονικά διαστήματα γινόταν μικροσκοπικός έλεγχος για να διαπιστωθεί αν έχουν πολλαπλασιασθεί. Ένα πολύ σημαντικό πρόβλημα σε αυτού του τύπου τα πειράματα ήταν το γεγονός ότι έπρεπε να τοποθετηθούν σε καλλιέργεια αριθμοί κυττάρων που ξεπερνούσαν τις δυνατότητες των οργάνων μέτρησης, ακόμα και αυτών των αυτομάτων πιπεττών. Δεν ήταν καθόλου απλή διαδικασία να τοποθετήσει κανείς τέσσερα κύτταρα σε ένα πηγάδι και ταυτοχρόνως να μπορέσει να επιβεβαιώσει ότι τοποθετήθηκαν τέσσερα και όχι π.χ. δεκαέξι κύτταρα. Τα προβλήματα αυτά επιλύθηκαν με δύο τρόπους. Ο πρώτος ήταν η δημιουργία διαλυμάτων κυττάρων με αραιώσεις και η μέτρηση των αραιώσεων με τον κυτταρομετρικό αναλυτή. Στο σημείο αυτό να θυμίσουμε ότι είχαμε επιμείνει στο γεγονός της βαθμονόμησης του αναλυτή διότι όπως προείπαμε, με βάση την ακρίβειά του λείφθησαν όλες οι υπόλοιπες αποφάσεις για τη διενέργεια των πειραμάτων καθώς και όλες οι παραμετροποιήσεις έγιναν με βάση αυτά τα δεδομένα (δηλαδή της βαθμονόμησης του αναλυτή). Ο δεύτερος τρόπος αφορούσε στην ταυτοποίηση του αριθμού των κυττάρων που τοποθετούντο για καλλιέργεια. Για να το επιτύχαμε αυτό, από διάλυμα που είχε την τελική επιθυμητή συγκέντρωση κυττάρων λαμβάναμε ένα σταγονίδιο το οποίο βάζαμε στο πηγάδι μικροτιτλοποίησης και εξεταζόταν στη συνέχεια για την ύπαρξη κυττάρων. Δεδομένου ότι το σταγονίδιο ήταν μικρής διαμέτρου είχαμε τη δυνατότητα να το εξετάσουμε ολόκληρο και έτσι μπορούσαμε να είμαστε βέβαιοι για τον αρχικό αριθμό κυττάρων που βάζαμε προς πολλαπλασιασμό. Ένα ενδεικτικό αποτέλεσμα παρουσιάζεται στην **Εικόνα 98**.

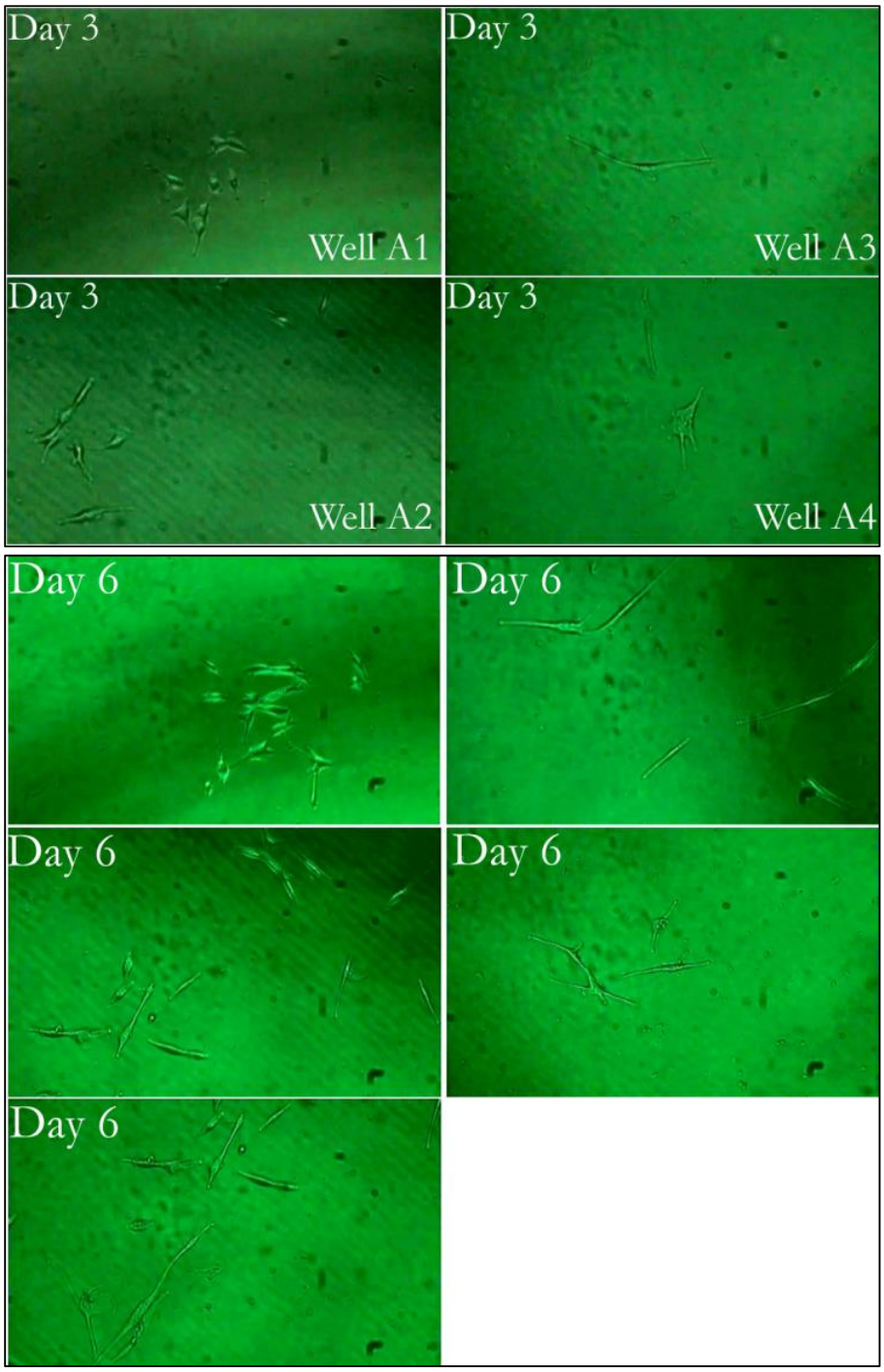
Πρέπει να αναφέρουμε ότι χρησιμοποιήσαμε και τεχνικές αναρρόφησης μεμονωμένων κυττάρων με τη χρήση πιπέττας Pasteur κατευθείαν από ένα διάλυμα κυττάρων και τοποθέτησή τους ένα προς ένα στο νέο θρεπτικό υλικό. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται στην τεχνητή γονιμοποίηση για την απομόνωση μεμονωμένων σπερματοζωαρίων για την ενδο-κυτταροπλασματική έγχυση (Intra-Cytoplasmatic Sperm Injection-ICSI) αλλά αυτή η τεχνική απαιτεί την ύπαρξη στείρου αέρα περιβάλλοντος και έτσι εγκαταλείφθηκε. Πάρα ταύτα, τα αποτελέσματα των τεχνικών που τελικά χρησιμοποιήσαμε είχαν ικανοποιητικά αποτελέσματα.



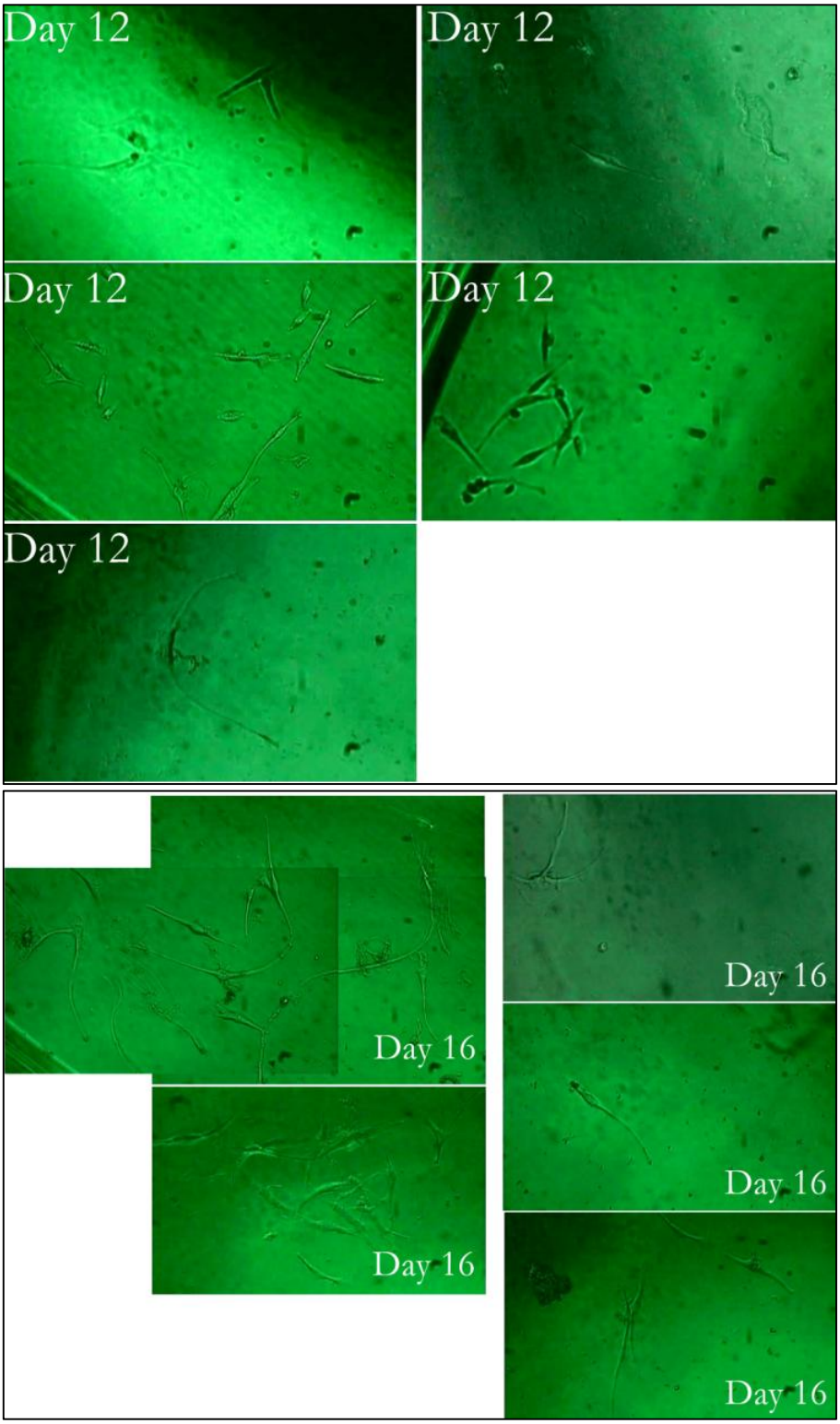
Εικόνα 98. Μικροσκοπικές λήψεις της αρχικής καλλιέργειας των κυττάρων A172. Παρουσιάζεται το αρχικό σταγονίδιο που τοποθετείτο στα πηγάδια των πλακών μικροτιτλοποίησης. Τα πηγάδια που παρουσιάζονται εδώ ήταν τα A1 και A2 με θεωρητικό αρχικό αριθμό κυττάρων 4.

Το πείραμα αυτό το παρακολουθούσαμε σε τακτά χρονικά διαστήματα για να διαπιστώσουμε αν υπήρξε κυτταρικός πολλαπλασιασμός ή όχι και σε ποια επίπεδα αρχικού αριθμού κυττάρων υπήρχε ανάπτυξη σε εύλογο χρονικό διάστημα.

Στην ακόλουθη εικόνα (**Εικόνα 99**) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του πειράματος για τα κύτταρα A172, για τις ημέρες όπου έγινε μικροσκοπική εξέταση ήτοι τρεις, έξι, δώδεκα και δεκαέξι ημέρες αντίστοιχα.

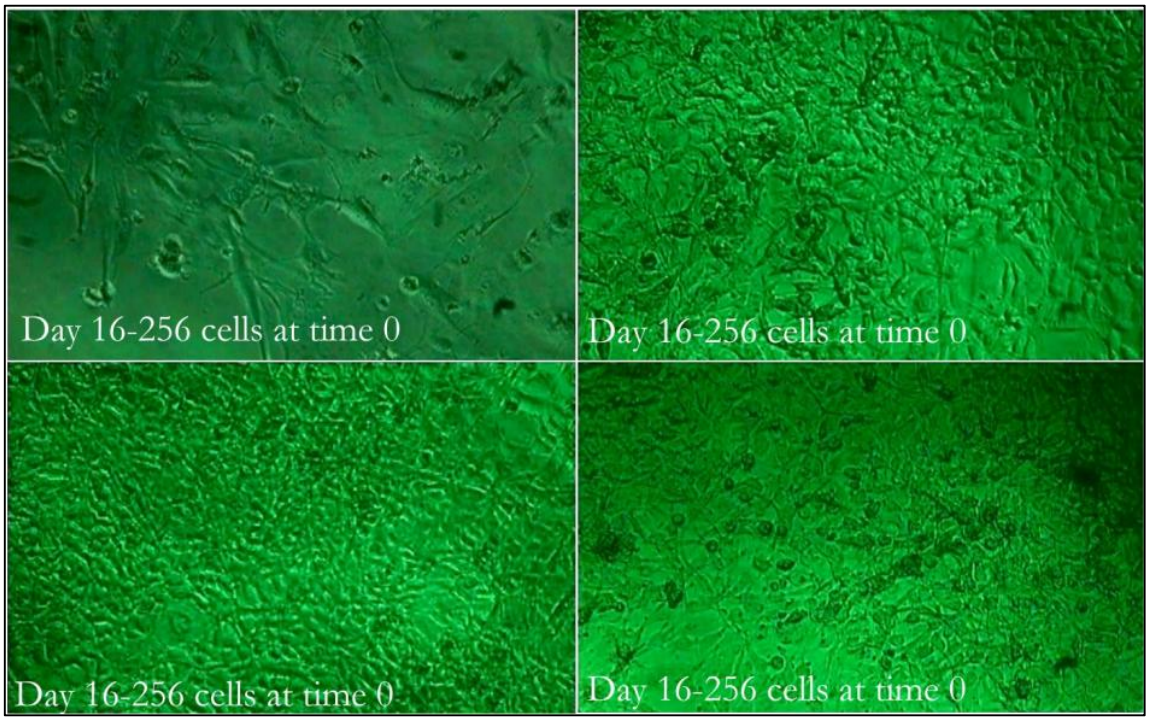


Εικόνα 99. Μικροσκοπικές λήψεις του πειράματος ελάχιστης ανάπτυξης στα κύτταρα A172. Παρουσιάζονται τα κύτταρα στην τρίτη και έκτη ημέρα αντίστοιχα.



Εικόνα 99 (Συνέχεια). Μικροσκοπικές λήψεις του πειράματος ελάχιστης ανάπτυξης στα κύτταρα A172. Παρουσιάζονται τα κύτταρα στη δωδέκατη και δέκατη έκτη ημέρα αντίστοιχα.

Το πείραμα αυτό έδωσε μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση. Τα κύτταρα που ξεκίνησαν από τα τέσσερα αρχικά, έδειξαν να προσκολλώνται στο υπόστρωμα της καλλιέργειας και μέχρι ενός σημείου να πολλαπλασιάζονται. Φτάνοντας όμως στις δεκαέξι ημέρες η εικόνα των κυττάρων παρέμεινε η ίδια. Δεκαέξι ημέρες σε καλλιέργεια είναι μεγάλο χρονικό διάστημα και δεν θεωρείται εύλογο χρονικό διάστημα ώστε να πούμε ότι υπήρχε κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Για να το κατανοήσουμε αυτό καλύτερα πρέπει να δούμε μια άλλη πειραματική διάταξη και πιο συγκεκριμένα για τα κύτταρα που ξεκίνησαν από αρχικό 256 κυττάρων. Το αποτέλεσμα αυτό παρουσιάζεται στην **Εικόνα 100**.



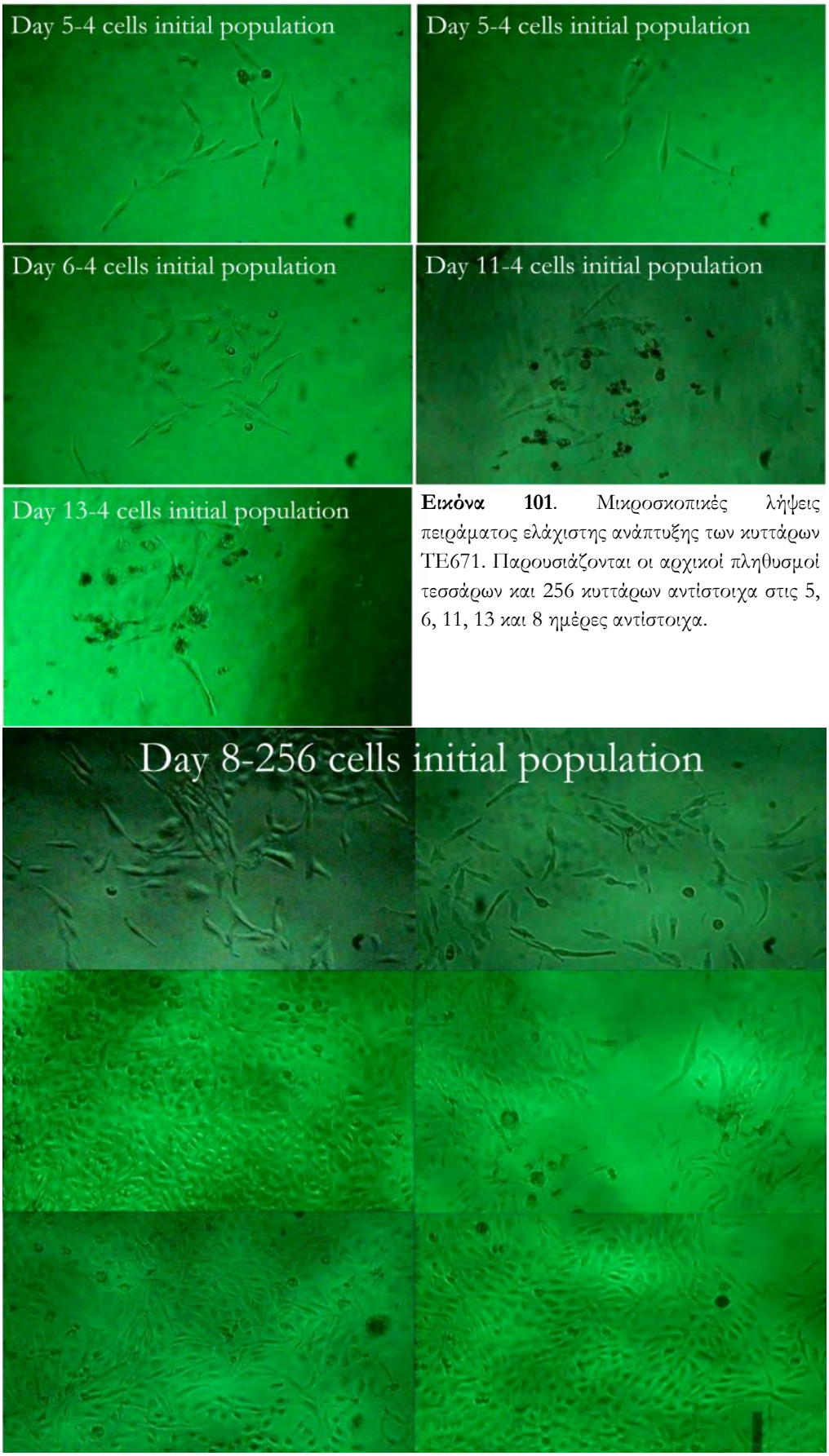
Εικόνα 100. Μικροσκοπικές λήψεις του πειράματος ελάχιστης ανάπτυξης των κυττάρων A172. Παρουσιάζονται διάφορα πηγάδια στις 16 ημέρες καλλιέργειας και από 256 κύτταρα αρχικό κυτταρικό πληθυσμό.

Συγκρίνοντας τις δύο εικόνες (**Εικόνα 99** και **Εικόνα 100**) βλέπουμε αμέσως τη διαφορά αφού στο πείραμα όπου τοποθετήσαμε τέσσερα κύτταρα δεν έχουμε κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε μεγάλη έκταση, ενώ αντιθέτως στο πείραμα όπου τοποθετήσαμε 256 κύτταρα έχουμε φτάσει σχεδόν σε κορεσμό στο ίδιο χρονικό διάστημα. Μπορούμε με βάση αυτά τα ευρήματα να υπολογίσουμε προσεγγιστικά το «κατώφλι» εκείνο, τον αρχικό πληθυσμό των κυττάρων δηλαδή, κάτω από το οποίο τα κύτταρα ενώ προσκολλώνται δεν μπαίνουν σε διαδικασία συνεχούς πολλαπλασιασμού και πάνω από το οποίο έχουμε ανάπτυξη των κυττάρων. Για τα κύτταρα A172 το «κατώφλι» αυτό βρίσκεται μεταξύ των 128 και 256 κυττάρων.

Ανάλογα πειράματα έγιναν και για την κυτταρική σειρά TE671 όπου παρατηρήσαμε παρόμοια αποτελέσματα όσον αφορά τουλάχιστον την ανάπτυξη των κυττάρων από τα τέσσερα κύτταρα. Αντίθετα όμως με τα A172, τα TE671 έφτασαν πολύ πιο σύντομα σε κορεσμό για τα κύτταρα που

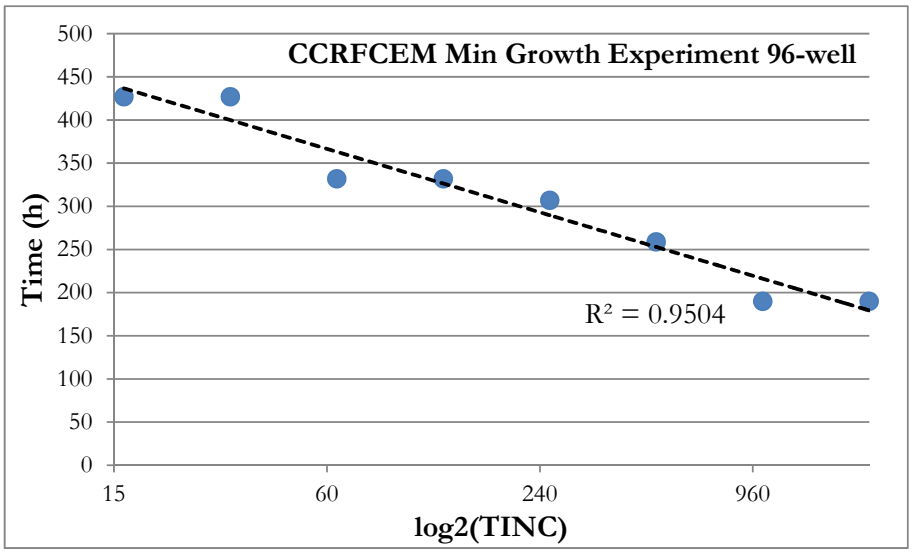
ξεκίνησαν από τα 256. Συγκεκριμένα χρειάστηκαν οκτώ ημέρες για να επιτύχουν σχεδόν κάλυψη του χώρου ενώ τα A172 είχαν χρειαστεί 16 ημέρες. Το αποτέλεσμα του πειράματος παρουσιάζεται ενδεικτικά στην **Εικόνα 101**. Το ενδιαφέρον πάντως είναι ότι και στην περίπτωση αυτών των κυττάρων σε χαμηλούς αρχικούς αριθμούς λειτούργησε ο μηχανισμός επικόλλησης στο υπόστρωμα της καλλιέργειας αλλά η απόφαση για πολλαπλασιασμό δεν ελήφθει, τουλάχιστον μέσα σε εύλογο χρονικό διάστημα. Με παρόμοιο τρόπο αυτό που υπολογίσαμε ήταν το αντίστοιχο «κατώφλι» πολλαπλασιασμού και για τα κύτταρα TE671 ήταν τα 16 κύτταρα.

Παρόμοιας έκτασης πειράματα έγιναν και για την κυτταρική σειρά 1321N1, όπου παρατηρήθηκε ο ίδιος μηχανισμός και αντίστοιχα υπολογίσθηκε το «κατώφλι» πολλαπλασιασμού και βρέθηκε να κυμαίνεται ανάμεσα στα 16 και 32 κύτταρα αρχικό πληθυσμό.



Εικόνα 101. Μικροσκοπικές λήψεις πειράματος ελάχιστης ανάπτυξης των κυττάρων TE671. Παρουσιάζονται οι αρχικοί πληθυσμοί τεσσάρων και 256 κυττάρων αντίστοιχα στις 5, 6, 11, 13 και 8 ημέρες αντίστοιχα.

Τελευταία στη μελέτη ελάχιστης ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά CCRFCEM. Το μοντέλο αυτό κυττάρων είχε μια σημαντική διαφορά με τα υπόλοιπα κύτταρα, μεγαλώνει σε εναιώρημα και όχι σε προσκολλώμενη μορφή. Κατά συνέπεια βρίσκεται πιο κοντά στις *in vivo* συνθήκες αφού μεγαλώνει σε τρισδιάστατο περιβάλλον και όχι δυσδιάστατο όπως τα προσκολλώμενα κύτταρα. Στα πειράματα αυτά έγινε μικροσκοπική παρακολούθηση αλλά λόγω της φύσης των κυττάρων ορίσαμε ως σημείο ανάπτυξης τη χρονική στιγμή, όπου ο πληθυσμός των κυττάρων θα ήταν ανιχνεύσιμος από τον κυτταρομετρητή ήτοι θα είχε μια ελάχιστη συγκέντρωση 100 κυττάρων/μl. Στα κύτταρα αυτά έγιναν δύο τύποι πειραμάτων: σε πλάκες 96 θέσεων και σε φλάσκα 75cm^2. Στον πρώτο τύπο πειράματος ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία όπως και στα άλλα κύτταρα. Τα λευχαιμικά κύτταρα καλλιεργήθηκαν από τα 16 κύτταρα έως τα 2048 κύτταρα σε τελικό όγκο θρεπτικού 300μl. Μετρήθηκε ο πληθυσμός τους και ο χρόνος τον οποίο χρειάστηκαν να έρθουν στα επίπεδα που είχαμε καθορίσει ως το σημείο λήξης του πειράματος. Οι μετρήσεις αυτές παρουσιάζονται στην επόμενη εικόνα (**Εικόνα 102**).



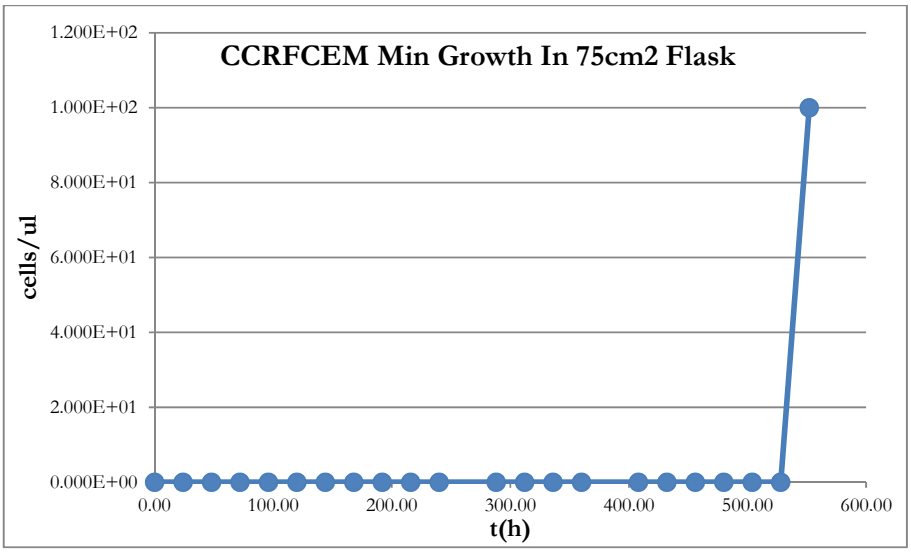
Εικόνα 102. Διαγραμματική αναπαράσταση του χρόνου επίτευξης συγκεκριμένου αριθμού κυττάρων συναρτήσει του αρχικού αριθμού κυττάρων στα κύτταρα CCRFCEM, σε πείραμα ελάχιστης ανάπτυξης και σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων (TINC: Total Initial Number of Cells).

Όπως φαίνεται από το παραπάνω αποτέλεσμα υπάρχει πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ του αρχικού αριθμού κυττάρων και του χρόνου επίτευξης ενός συγκεκριμένου πληθυσμού. Επίσης από τα πειράματα με τα κύτταρα CCRFCEM φάνηκε ότι δεν έχουν κατώφλι ανάπτυξης. Δεν υπήρχε δηλαδή ένας ελάχιστος απαραίτητος αριθμός κυττάρων ώστε να αυξηθούν μέσα σε ένα εύλογο χρονικό διάστημα. Για να διασταυρώσουμε αν ο μηχανισμός των κυττάρων αυτών είναι αυτοκρινής αποκλειστικά και ανεξάρτητος του περιβάλλοντος κάναμε ένα νέο περισσότερο ανορθόδοξο

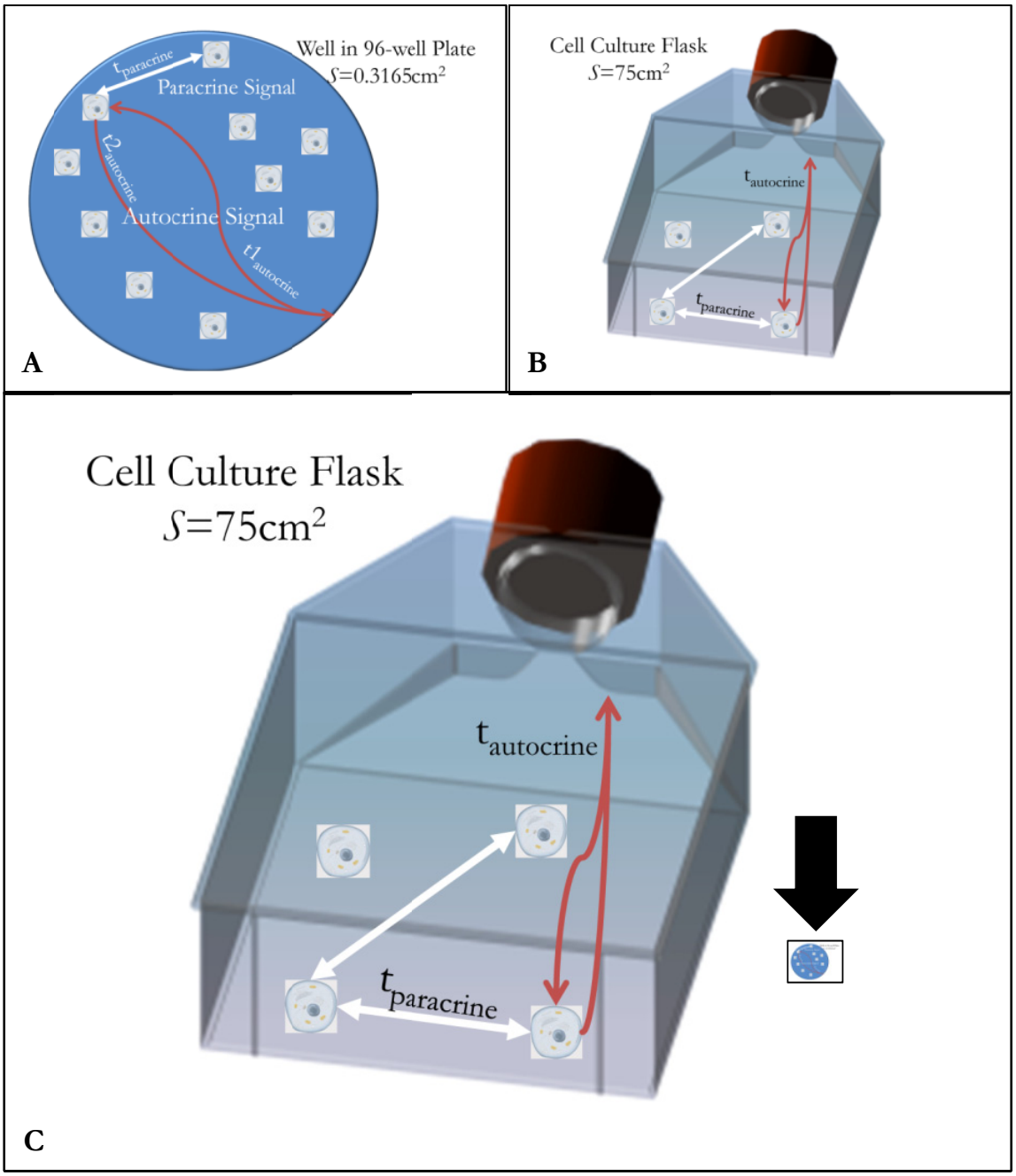
πείραμα. Βάλαμε το μικρότερο αριθμό κυττάρων που είχαμε χρησιμοποιήσει στη πλάκες 96 θέσεων σε φλάσκα 75cm^2 και 25ml συνολικό όγκο θρεπτικού υλικού. Από τη στιγμή που δεν παρατηρήθηκε ένας ελάχιστος αριθμός κυττάρων απαραίτητος για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό υποθέσαμε ότι ο παράγοντας, που έπαιζε ρόλο ήταν ο χώρος. Όπως αναφέραμε στην ενότητα «Υλικό και Μέθοδος» τα κύτταρα αυτά είναι γνωστό ότι έχουν αυτοκρινή δράση και κατά συνέπεια σε όσο μικρότερο χώρο βρίσκονται τόσο ευκολότερα θα μπορεί το εξωκυττάριο σήμα να μεταφερθεί στα ίδια τα κύτταρα. Έτσι δεδομένου αυτού του γεγονότος, μεγαλώνοντας το χώρο διαβίωσης θα έπρεπε να παρατηρήσουμε καθυστέρηση στην ανάπτυξη των κυττάρων ή ενδεχομένως καθόλου ανάπτυξη. Το αποτέλεσμα ήταν αρκετά ενδιαφέρον και παρουσιάζεται στην **Εικόνα 103**. Όπως προκύπτει από την **Εικόνα 102**, τα 16 κύτταρα έδωσαν μέτρηση 100 κυττάρων/μl στις 427 ώρες ήτοι έφθασαν σε συνολικό πληθυσμό ~30000 κυττάρων στο χρόνο αυτό. Στην **Εικόνα 103**, παρατηρούμε ότι ο ίδιος αριθμός κυττάρων έδωσε μέτρηση 100 κυττάρων/μl στις 552 ώρες δηλαδή προκύπτει μια διαφορά 125 ωρών που ισούται με πέντε ημέρες. Δηλαδή τα κύτταρα στη φλάσκα (25ml) μεγάλωσαν 1.2 φορές πιο αργά από τα κύτταρα στα 300μl όταν η αναλογία όγκου στον οποίο μεγάλωσαν ήταν 84:1. Αν η ανάπτυξη ήταν ανάλογη του χώρου διαβίωσης τότε έπρεπε να παρατηρήσουμε μια καθυστέρηση περίπου 84 φορές μεγαλύτερη σε χρόνο. Η πειραματική διάταξη αυτή παρουσιάζεται στην **Εικόνα 104**, όπου φαίνεται εμφανώς η διαφορά στο χώρο που είχαν διαθέσιμα τα κύτταρα για να αναπτυχθούν ανά περίπτωση (**Εικόνα 104C**).

Από το πείραμα αυτό προέκυψαν ορισμένα ερωτήματα και διαπιστώσεις. Πρώτον φάνηκε ότι για τον κυτταρικό αυτό τύπο ο χώρος ανάπτυξης δεν ήταν σημαντικός ή τουλάχιστον καθοριστικός για το αν θα πολλαπλασιαστούν ή όχι. Κατά συνέπεια προκύπτει το ερώτημα αν ήταν μια τυχαία παρατήρηση η οποία έπρεπε να διερευνηθεί περαιτέρω και επίσης αν το ίδιο φαινόμενο δηλαδή αυτό της επιρροής του χώρου μπορούσε να παρατηρηθεί και σε άλλους κυτταρικούς τύπους.

Αυτά τα ερωτήματα και διαπιστώσεις μας οδήγησαν ουσιαστικά στην επόμενη φάση πειραμάτων, που θα αναλύσουμε στο αμέσως επόμενο κεφάλαιο, όπου μελετήθηκαν ταυτοχρόνως οι παράγοντες της τροφής, του χρόνου και του χώρου σε ένα πείραμα.

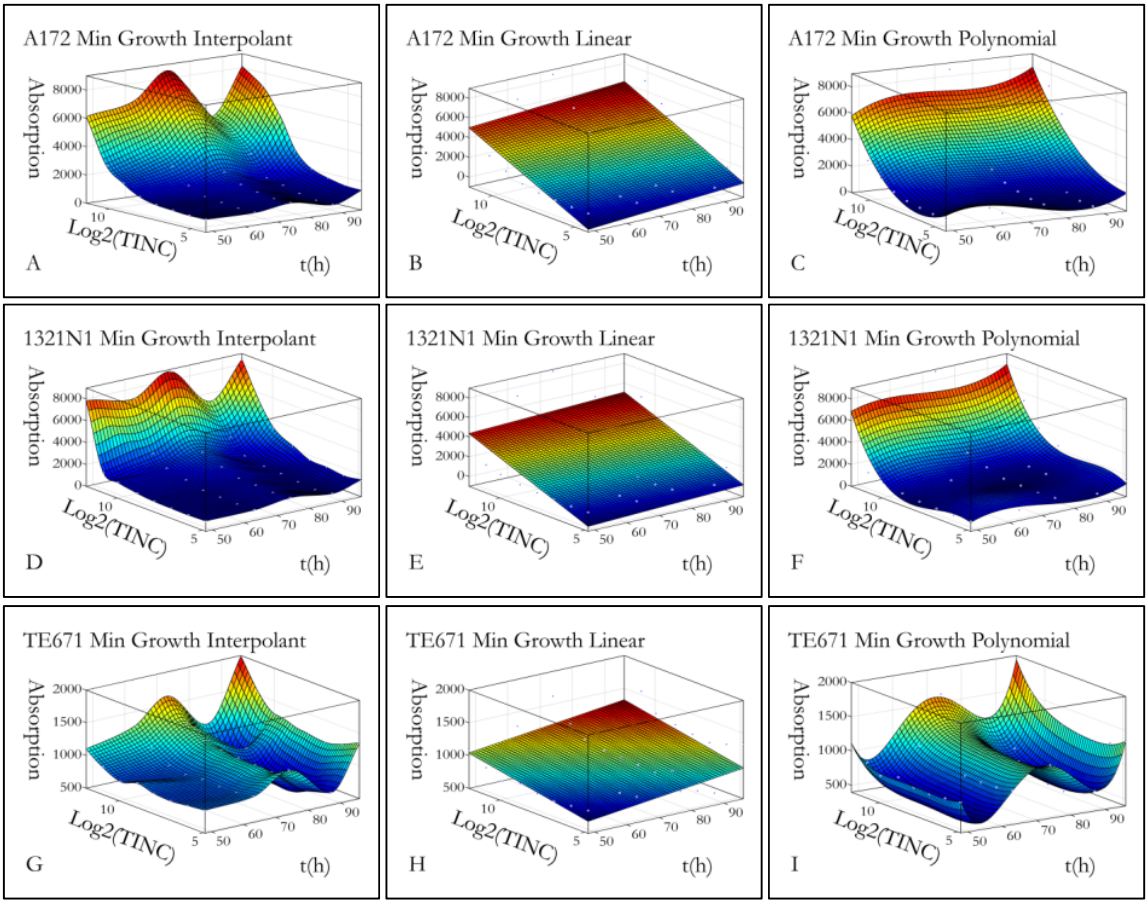


Εικόνα 103. Η καμπύλη ανάπτυξης των κυττάρων CCRFCEM σε πείραμα ελάχιστης ανάπτυξης σε φλάσκα επιφάνειας 75cm².



Εικόνα 104. Σχηματική αναπαράσταση του πειράματος ελάχιστης ανάπτυξης των κυττάρων CCRFCEM. Τα κύτταρα αφέθηκαν να μεγαλώσουν σε πηγάδι εμβαδού 0.3165cm2 (**A**) και σε φλάσκα καλλιέργειας 75cm2 (**B**). Παρουσιάζονται τα αυτοκρινή και παρακρινή μοντέλα μετάδοσης σήματος. Η αναλογία μεγέθους των δύο μέσων καλλιέργειας φαίνεται στο τμήμα (**C**) της εικόνας (σηματοδοτείται από το μαύρο βέλος), όπου είναι εμφανής η διαφορά στο χώρο που ήταν διαθέσιμος για τα κύτταρα.

Σε συνέχεια των παραπάνω πειραμάτων συνεχίσαμε με την εκτέλεση πειραμάτων που θα μας έδιναν μια συσχέτιση χρονική και πιο ποσοτική αναφορικά με τον αρχικό αριθμό των κυττάρων και το χρονοεξαρτώμενο πολλαπλασιασμό τους. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε τις κυτταρικές σειρές A172, 1321N1 και TE671. Χρησιμοποιήθηκαν αρχικοί αριθμοί κυττάρων από ~50 κύτταρα συνολικό πληθυσμό έως ~6400 κύτταρα σε πλάκες μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων και τελικό όγκο θρεπτικού υλικού 300μl. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στην **Εικόνα 105**.



Εικόνα 105. Διαγραμματικές αναπαραστάσεις της προσομοίωσης του πολλαπλασιασμού των κυττάρων A172 (**A**-**C**), 1321N1 (**D**-**F**) και TE671 (**G**-**I**). Παρουσιάζονται και οι τρεις τύποι παλινδρόμησης ο Interpolant, ο γραμμικός και ο πολυωνιμικός.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 25

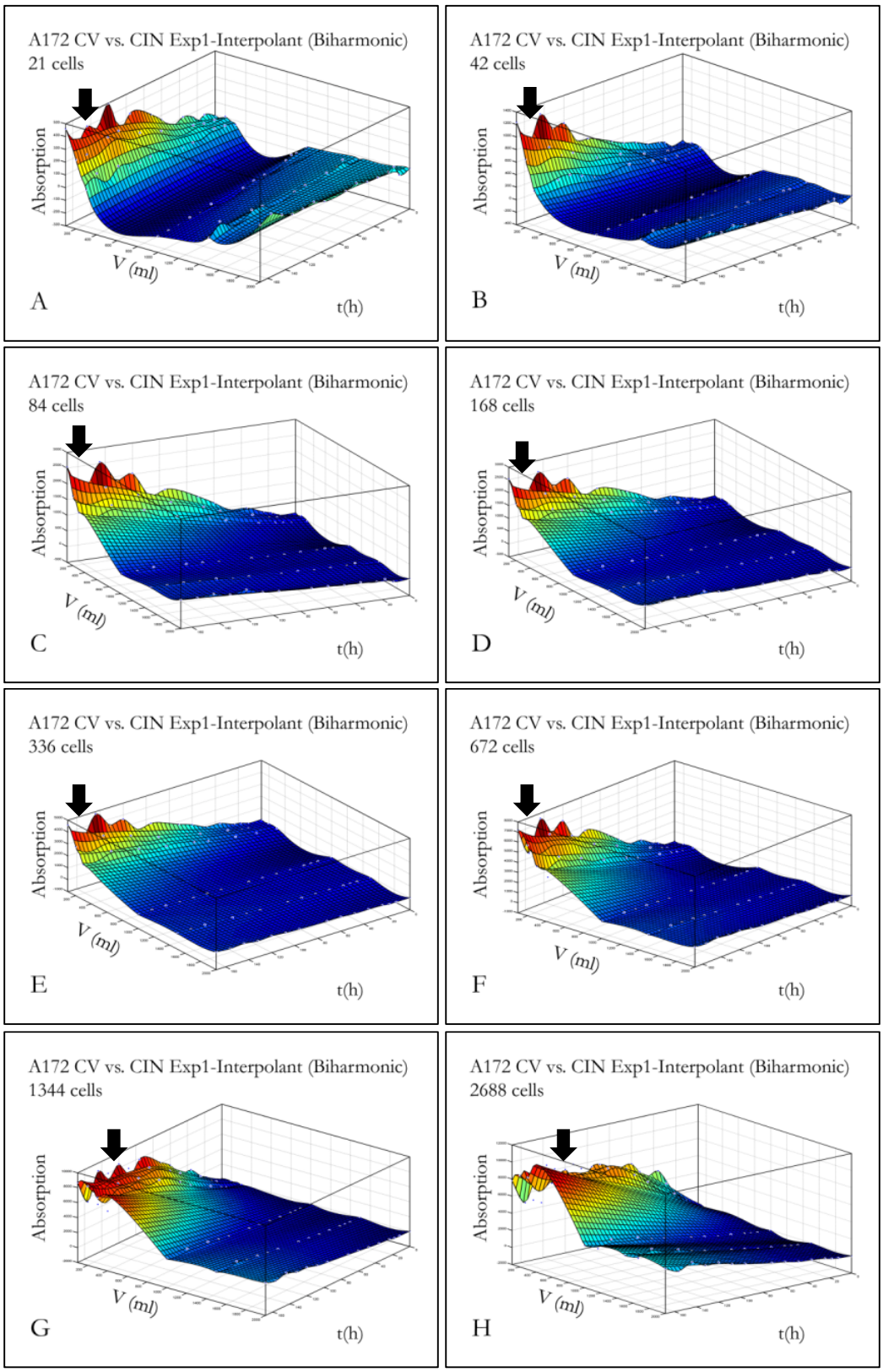
IN VITRO ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ-ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ CONSTANT VOLUME VS. CONSTANT INITIAL NUMBER (CV/CIN EXPERIMENTS)

Σε αυτή την κατηγορία πειραμάτων προσπαθήσαμε να αναπτύξουμε τις ιδιότητες που διέπουν τα κύτταρα κατά τον πολλαπλασιασμό τους. Μελετήθηκαν, τα κύτταρα, συναρτήσει τεσσάρων μεταβλητών: ο χώρος ανάπτυξης ήτοι το εμβαδό το οποίο είχαν στη διάθεσή τους για να μεγαλώσουν, ο όγκος θρεπτικού υλικού, που ήταν συνυφασμένο με τη διαθέσιμη τροφή που ήταν κυρίως η γλυκόζη και τέλος ο αρχικός αριθμός των κυττάρων. Στα πλαίσια των πειραμάτων αυτών, εργασθήκαμε με τέσσερις κυτταρικές σειρές. Τις A172, 1321N1, TE671 και CCRFCEM. Για να συνεχίσουμε την ανάλυση των αποτελεσμάτων είναι σημαντικό να φέρουμε στην μνήμη την πειραματική διάταξη που περιγράψαμε στην ενότητα «Υλικό και Μέθοδος». Με βάση αυτή την πειραματική διάταξη αναμέναμε να δούμε την επίδραση όλων αυτών των παραγόντων αλλά κυρίως των συνδυασμών τους, μιας και γινόταν ταυτόχρονη μέτρηση όλων των πιθανών συνδυασμών των μεταβλητών που μελετήσαμε. Επίσης πρέπει να αναφέρουμε ότι οι τρεις πρώτες σειρές που μελετήθηκαν ήταν προσκολλώμενες ενώ η τρίτη είναι σειρά που αυξάνεται σε εναιώρημα. Θυμίζουμε επίσης ότι η ειδοποιός διαφορά είναι ότι οι πρώτες μεγαλώνουν πρακτικά σε δύο διαστάσεις ενώ η δεύτερη σε τρεις διαστάσεις. Όπως θα δούμε αυτή η διαφορά έχει συνέπειες στον τρόπο που τα κύτταρα μεγαλώνουν.

Τα πρώτα αποτελέσματα είναι από τη σειρά A172, η οποία καλλιεργήθηκε στο πρώτο πείραμα για 160 ώρες συνολικό χρόνο. Φάνηκε ότι τα κύτταρα ακολούθησαν εκθετικό τρόπο αύξησης ειδικότερα στους μικρότερους όγκους και σε όλους τους αρχικούς αριθμούς (**Εικόνα 106**). Στο σημείο αυτό πρέπει να κάνουμε μια παρατήρηση. Δεδομένου ότι ο αρχικός αριθμός των κυττάρων είναι ίδιος ανά όγκο θρεπτικού, πάρα ταύτα η ανάπτυξη φάνηκε να είναι μεγαλύτερη στους μικρούς όγκους σε σχέση με τους μεγαλύτερους (σηματοδοτείται με μαύρο βέλος στην **Εικόνα 106**). Επίσης όπως φαίνεται στη **Εικόνα 106G** και **H** στο σημείο όπου σηματοδοτείται από το βέλος έχουμε μια αναστροφή της πορείας της καμπύλης, που αποτελεί σημείο κορεσμού. Δηλαδή, τα κύτταρα έφτασαν σε πληρότητα μέσα στο χώρο τους και ξεκίνησε ο κυτταρικός θάνατος, με αποτέλεσμα την αναστροφή αυτή στον πολλαπλασιασμό.

Στο σημείο αυτό συναντάμε ένα παράδοξο. Είναι γενικά αποδεκτό ότι παρουσία περισσότερων πόρων ένα κυτταρικό σύστημα θα προχωρήσει σε πολλαπλασιασμό αν όχι γρηγορότερα, τουλάχιστον μεγαλύτερο σε αριθμούς κυττάρων. Πως εξηγείται λοιπόν το γεγονός αυτό, ότι με λιγότερους πόρους, τόσο σε χώρο όσο και σε τροφή, τα κύτταρα επεδίωξαν μεγαλύτερο πολλαπλασιασμό;

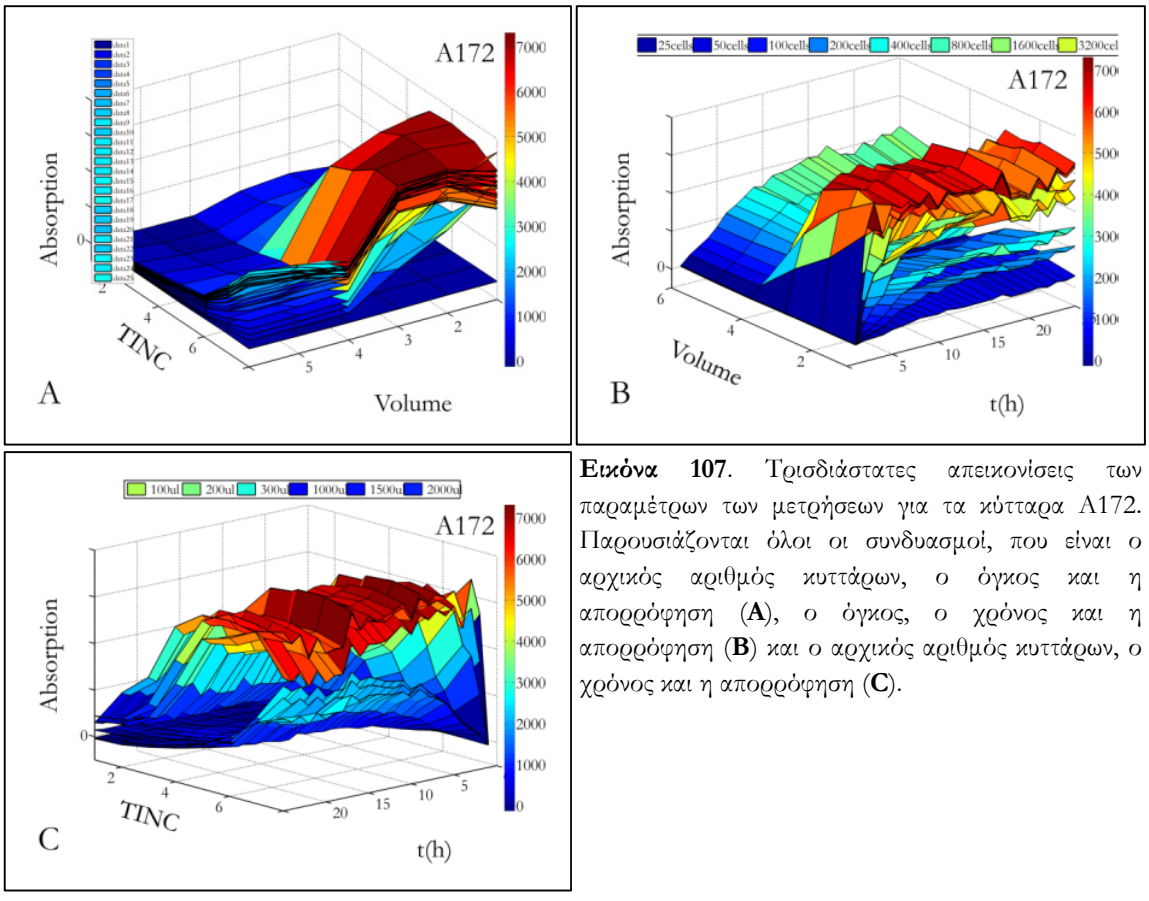
Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε και στα υπόλοιπα πειράματα που θα παρουσιάσουμε σε λίγο και η ερμηνεία του αποδείχθηκε περισσότερο περίπλοκη από ότι φαινόταν αρχικά.



Εικόνα 106. Παλινδρομήσεις του αρχικού αριθμού των κυττάρων συναρτήσει του όγκου του θρεπτικού υλικού και του χρόνου. Σε κάθε εικόνα αναπαρίσταται ο αρχικός αριθμός των κυττάρων.

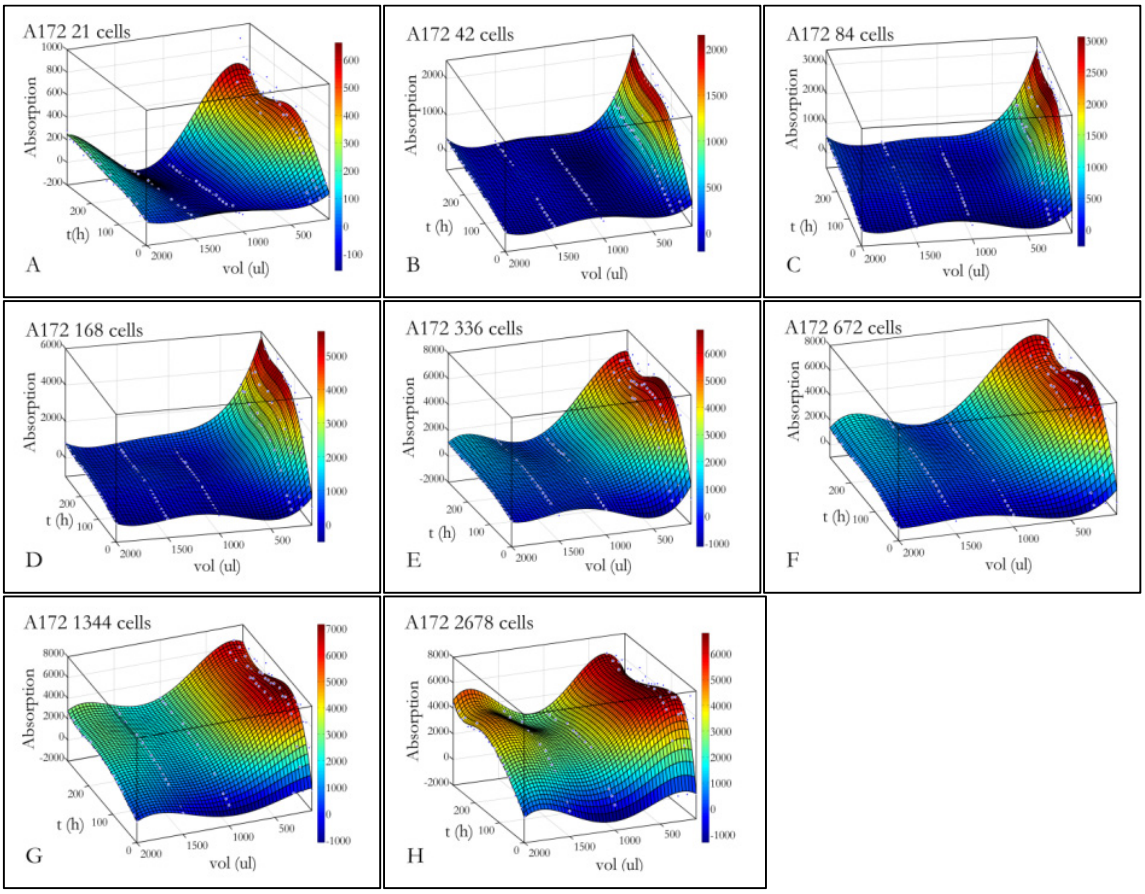
Εκτελέσαμε και ένα δεύτερο πείραμα με την ίδια κυτταρική σειρά, όπου αλλάξαμε το χρόνο καλλιέργειας και τον επεκτείναμε στις 288 ώρες. Με τον τρόπο αυτό είχαμε μεγαλύτερη δυνατότητα παρακολούθησης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού καθώς και αυξήσαμε ένα σημαντικό παράγοντα, που ήταν το στρες υπό συνθήκες ανταγωνισμού για πόρους. Η ανάλυση τέτοιου είδους δεδομένων είναι εξαιρετικά περίπλοκη. Για την ερμηνεία ή αξιολόγηση τέτοιων δεδομένων απαιτούνται συνήθως και ειδικοί τρόποι διαχείρισης ήτοι ειδικές αλγοριθμικές προσεγγίσεις. Για να γίνουν πιο κατανοητά τα δεδομένα αυτά, ξεκινήσαμε την ανάλυσή μας με την υπερ-εναπόθεση (superimposed) όλων των τρισδιάστατων καμπυλών που προέκυψαν από τις μετρήσεις μας. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στην **Εικόνα 107**.

Η πρώτη παρατήρηση που μπορούμε να κάνουμε ότι όλες οι καμπύλες ακολουθούν μια κοινή πορεία εκτός των καμπυλών στην **Εικόνα 107C**, όπου παρατηρούμε μια αναστροφή στη μονοτονία ορισμένων καμπυλών, που υποδεικνύει την ύπαρξη του κορεσμού στον κυτταρικό πληθυσμό και την έναρξη του κυτταρικού θανάτου.



Εικόνα 107. Τρισδιάστατες απεικονίσεις των παραμέτρων των μετρήσεων για τα κύτταρα A172. Παρουσιάζονται όλοι οι συνδυασμοί, που είναι ο αρχικός αριθμός κυττάρων, ο όγκος και η απορρόφηση (**A**), ο όγκος, ο χρόνος και η απορρόφηση (**B**) και ο αρχικός αριθμός κυττάρων, ο χρόνος και η απορρόφηση (**C**).

Αντίστοιχα με το προηγούμενο πείραμα αναπαραστήσαμε σε τρεις διαστάσεις τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό συναρτήσει του χρόνου και του όγκου του θρεπτικού υλικού. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στην **Εικόνα 108**.



Εικόνα 108. Παλινδρομήσεις του δεύτερου πειράματος CV/CIN των κυττάρων A172. Αναπαρίστανται όλοι οι αρχικοί κυτταρικοί αριθμοί συναρτήσει του όγκου θρεπτικού υλικού και του χρόνου.

Αυτό που αμέσως γίνεται προφανές από τα παραπάνω διαγράμματα είναι ότι τα κύτταρα ακολουθούν σε όλες τις περιπτώσεις αύξουσα πορεία. Επίσης παρατηρούμε ότι αυτό που αλλάζει από τη μια καμπύλη στην άλλη είναι το σημείο όπου έχουμε την πρώτη αλλαγή στην κυρτότητα της επιφάνειας. Έτσι αν παρατηρήσουμε στην περίπτωση των 21 κυττάρων στην καλλιέργεια, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός αυξάνεται ραγδαία για όγκους κάτω των 1000μl. Παρόμοια εικόνα έχουμε και στην περίπτωση των 336 ή 672 κυττάρων.

Η παρατήρηση αυτή μας φέρνει ένα βασικό ερώτημα. Ποιος είναι ο παράγοντας που προκαλεί αυτή την αλλαγή στο ρυθμό πολλαπλασιασμού; Για να το απαντήσουμε αυτό χρειάστηκε να δανεισθούμε εργαλεία από τη γραμμική άλγεβρα και τους πίνακες. Πρέπει να θυμίσουμε τη δομή του κύβου που εισαγάγαμε στην ενότητα «Υλικό και Μέθοδος». Όλα τα δεδομένα μας είναι δομημένα στη μορφή ενός κύβου. Άρα έχουμε τρεις όψεις των μεταβλητών και κατά συνέπεια κάθε μεταβλητή μπορεί να εκφρασθεί συναρτήσει των άλλων δύο. Ένας βασικός παράγοντας στον οποίο δεν αναφερθήκαμε μέχρι τώρα είναι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού. Για να ορίσουμε το ρυθμό αυτό στα δεδομένα αυτά, ορίζουμε ως παράγοντα $\boldsymbol{K}$ έναν πίνακα $m \times n$ τέτοιον ώστε να ισχύει:

$P_t \circ K = P_{t+1}$, **Εξίσωση 56**

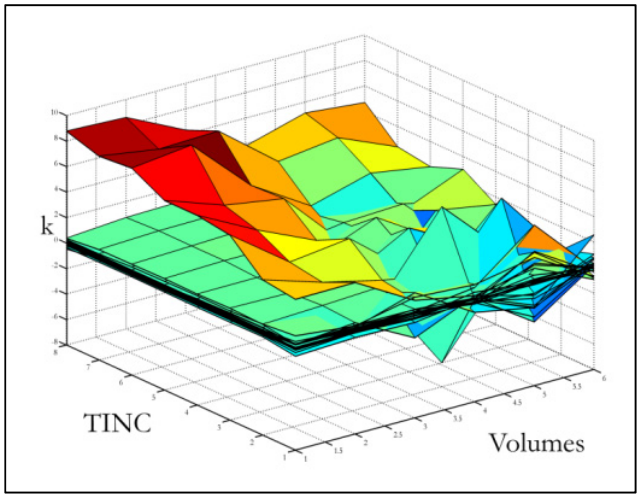
Όπου P_t είναι ο πίνακας σε χρόνο *t* και P_{t+1} είναι ο πίνακας σε χρόνο *t+1*.

Το σύμβολο «∘» υποδηλώνει το γινόμενο *Hadamard*, για το οποίο ισχύει

$(P_t \circ P_{t+1})_{i,j} = (P_t)_{i,j} \cdot (P_{t+1})_{i,j}$, **Εξίσωση 57**

Καταλαβαίνουμε ότι η μετάβαση από τη μια χρονική στιγμή στην επόμενη εξαρτάται από τον παράγοντα K, ο οποίος μάλιστα είναι μη-γραμμικός. Επίσης καταλαβαίνουμε ότι από όλα τον κύβο δεδομένων μας προκύπτει ένας νέος κύβος διαστάσεων *m×n×p-1*, όπου *m*, *n*, *p* είναι οι διαστάσεις του αρχικού κύβου. Κάθε στοιχείο του K αντιστοιχεί σε έναν αρχικό κυτταρικό πληθυσμό σε έναν αρχικό συνδυασμό πόρων ήτοι χώρου και θρεπτικού υλικού.

Ο παράγοντας αυτός αναπαρίσταται γραφικά στην **Εικόνα 109**, για όλες τις χρονικές στιγμές συναρτήσει των αρχικών αριθμών κυττάρων και τους όγκους του θρεπτικού υλικού και χώρου. Παρατηρούμε ότι μεγάλο μέρος των επιφανειών δείχνει να μην μεταβάλλεται. Αυτό όμως δεν ισχύει διότι στον άξονα των ***z*** που αντιστοιχεί στον παράγοντα ***k*** η μεταβολή του έχει πολύ μεγάλο εύρος μιας και ξεκινάει από αριθμούς κοντά στο 0 και φθάνει μέχρι και το 10. Η ερμηνεία αυτού του διαγράμματος είναι αρκετά δύσκολη και για την ανάλυσή της απαιτήθηκε η δημιουργία ειδικού αλγόριθμου και υποθέσεων που κάναμε. Θα επανέλθουμε σε λίγο σε αυτό το θέμα αφού πρώτα εξετάσουμε δύο παράγοντες που είναι η ταχύτητα και η επιτάχυνση του πολλαπλασιασμού.



Εικόνα 109. Γραφική αναπαράσταση των μη-γραμμικών παραγόντων πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Κάθε επιφάνεια αντιστοιχεί σε μια χρονική στιγμή.

Όπως είδαμε στην **Εικόνα 108**, κάθε αρχικός αριθμός κυττάρων έχει μια μοναδική επιφάνεια πολλαπλασιασμού, στην οποία μπορούμε να ορίσουμε την πρώτη παράγωγο για κάθε σημείο της και να βρούμε την κλίση της επιφάνειας επίσης σε κάθε σημείο της (gradient). Η κλίση της επιφάνειας σε

κάθε σημείο της (υποθέτουμε ότι η συνάρτηση που περιγράφει την επιφάνεια είναι παραγωγίσιμη σε όλο το πεδίο ορισμού της) ορίζεται ως:

$$\nabla F = \frac{\partial F}{\partial x}\hat{i} + \frac{\partial F}{\partial y}\hat{j}\text{, }\textbf{Εξίσωση 58}$$

Θα μπορούσαμε να πούμε ότι η κλίση της επιφάνειας σε κάθε σημείο της χαρακτηρίζει την ταχύτητα με την οποία το σύστημα μας προχωράει ή καλύτερα, το ρυθμό μεταβολής. Αφού μπορούμε να υπολογίσουμε την ταχύτητα του συστήματος άρα μπορούμε να ορίσουμε και την επιτάχυνση ή επιβράδυνση αντίστοιχα του συστήματος, για την οποία ισχύει:

$$\nabla^2 F = \frac{\partial^2 F}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 F}{\partial y^2}\text{, }\textbf{Εξίσωση 59}$$

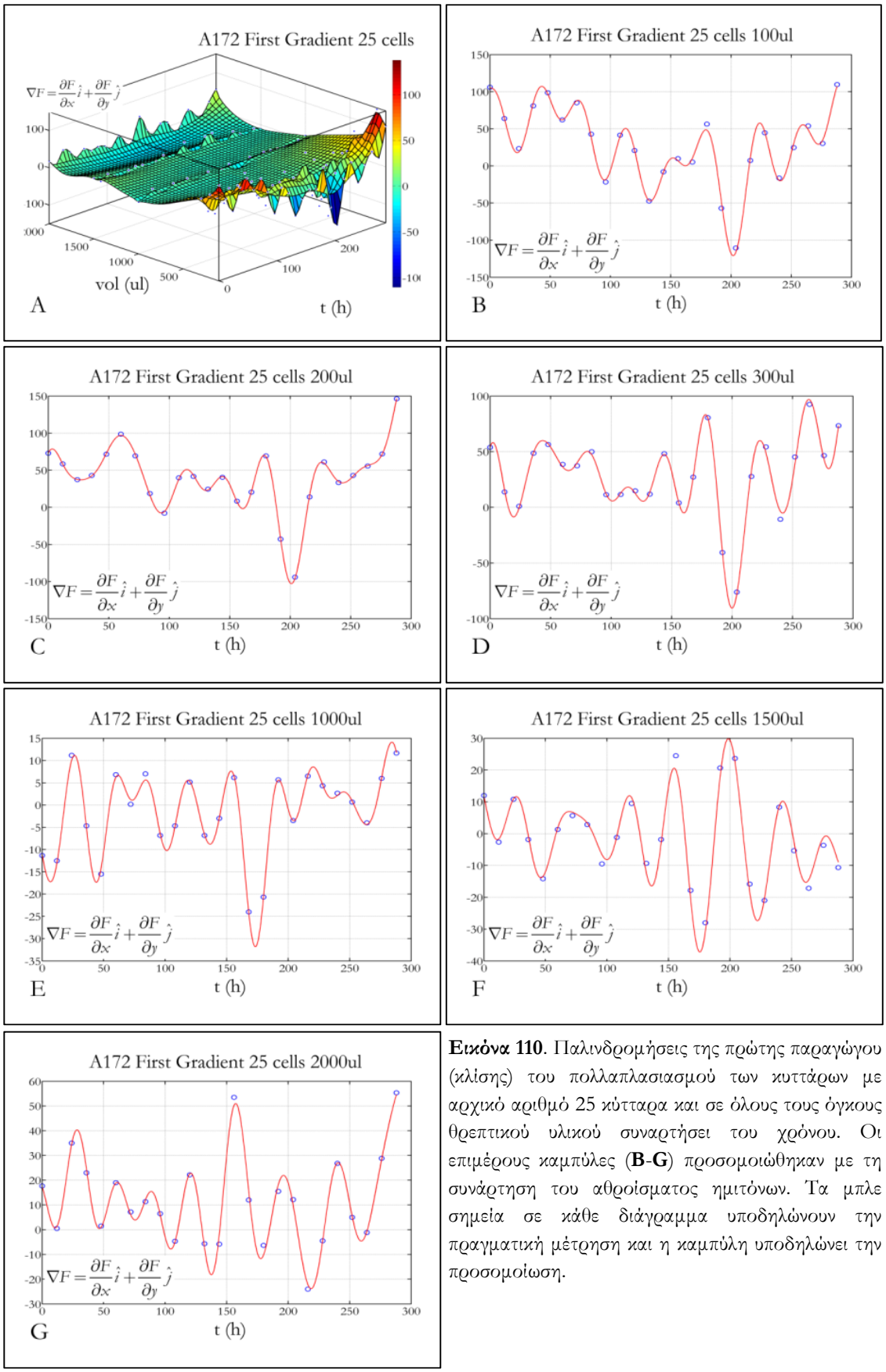
Πρακτικά οι παραπάνω ορισμοί σημαίνουν, πρώτον πόσο γρήγορα προχωράει το σύστημα από τη μια φάση στην επόμενη δηλαδή ένας πληθυσμός κυττάρων, πως πολλαπλασιάζεται και δεύτερον αν αυτή η μετάβαση γίνεται με επιταχυνόμενο ή επιβραδυνόμενο ρυθμό. Για να μπορέσουμε να απαντήσουμε τα ερωτήματα αυτά διαπιστώσαμε υπολογιστικά τους δύο παράγοντες, δηλαδή την ταχύτητα και επιτάχυνση του συστήματος και τα προσομοιώσαμε.

Στις επόμενες εικόνες (**Εικόνα 110**-**Εικόνα 112**) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των παλινδρομήσεων των καμπυλών της πρώτης μερικής παραγώγου των καμπυλών ρυθμού μεταβολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Από τους αρχικούς αριθμούς που μελετήσαμε χάριν συντομίας, επιλέξαμε να παρουσιάζουμε τρεις τιμές. Δύο ακραίες, δηλαδή τη μικρότερη και τη μεγαλύτερη και μια ενδιάμεση ήτοι 25 κύτταρα, 3000 κύτταρα και 400 κύτταρα (οι αριθμοί έχουν στρογγυλοποιηθεί χάριν συντομίας). Κάθε τρισδιάστατη εικόνα αναλύθηκε στους επιμέρους παράγοντες που την απαρτίζουν.

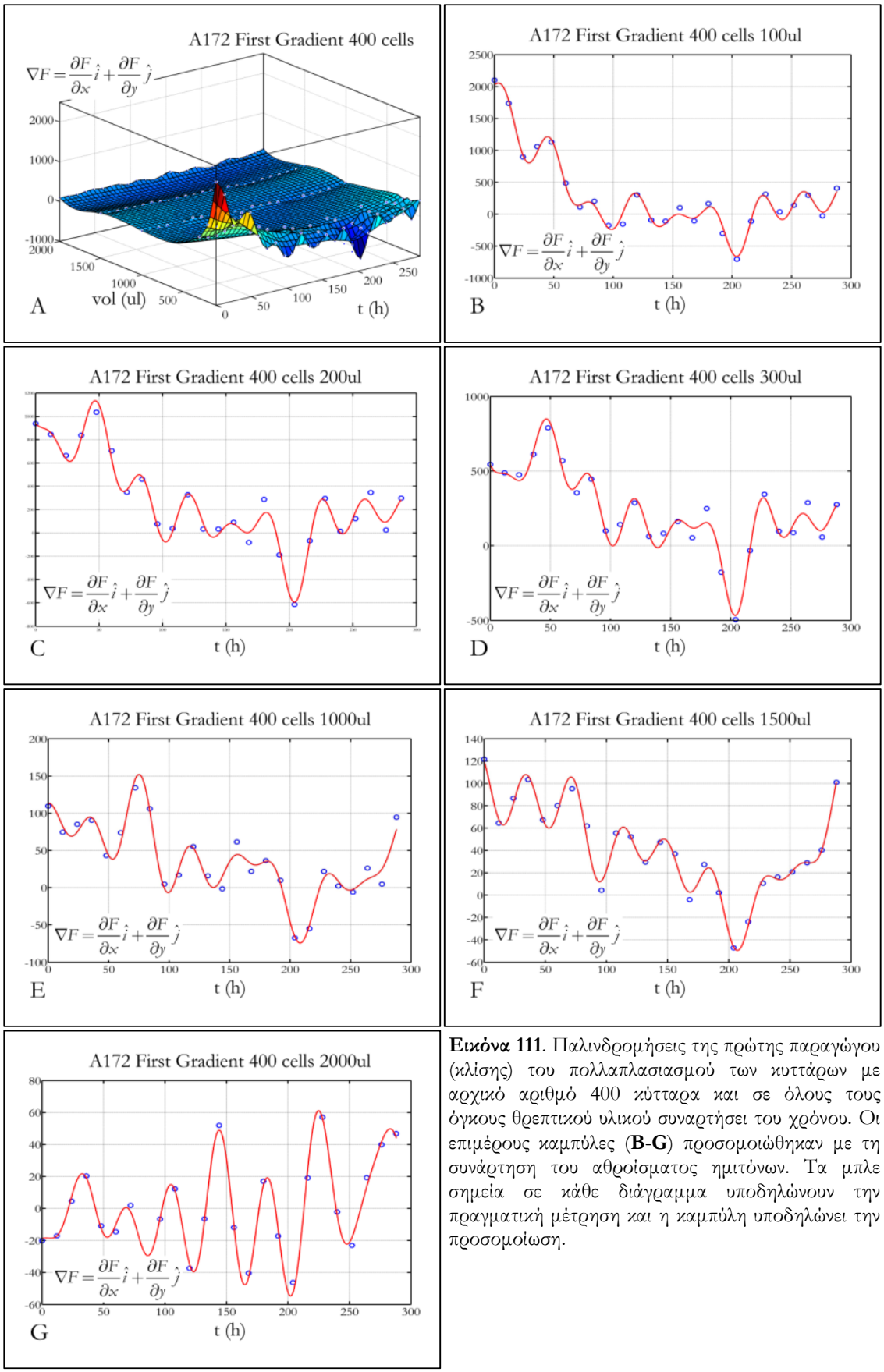
Στις επόμενες εικόνες παρουσιάζουμε την τρισδιάστατη αναπαράσταση και την προσομοίωση των καμπυλών που απαρτίζουν την επιφάνεια πολλαπλασιασμού. Η μοντελοποίηση των καμπυλών έγινε με τη χρήση συναρτήσεων αθροίσματος ημιτόνων (Sum of Sine), που ορίζονται ως:

$$f(x) = \sum_{i=1}^{n} a_i \sin(b_i x + c_i)\text{, }\textbf{Εξίσωση 60}$$

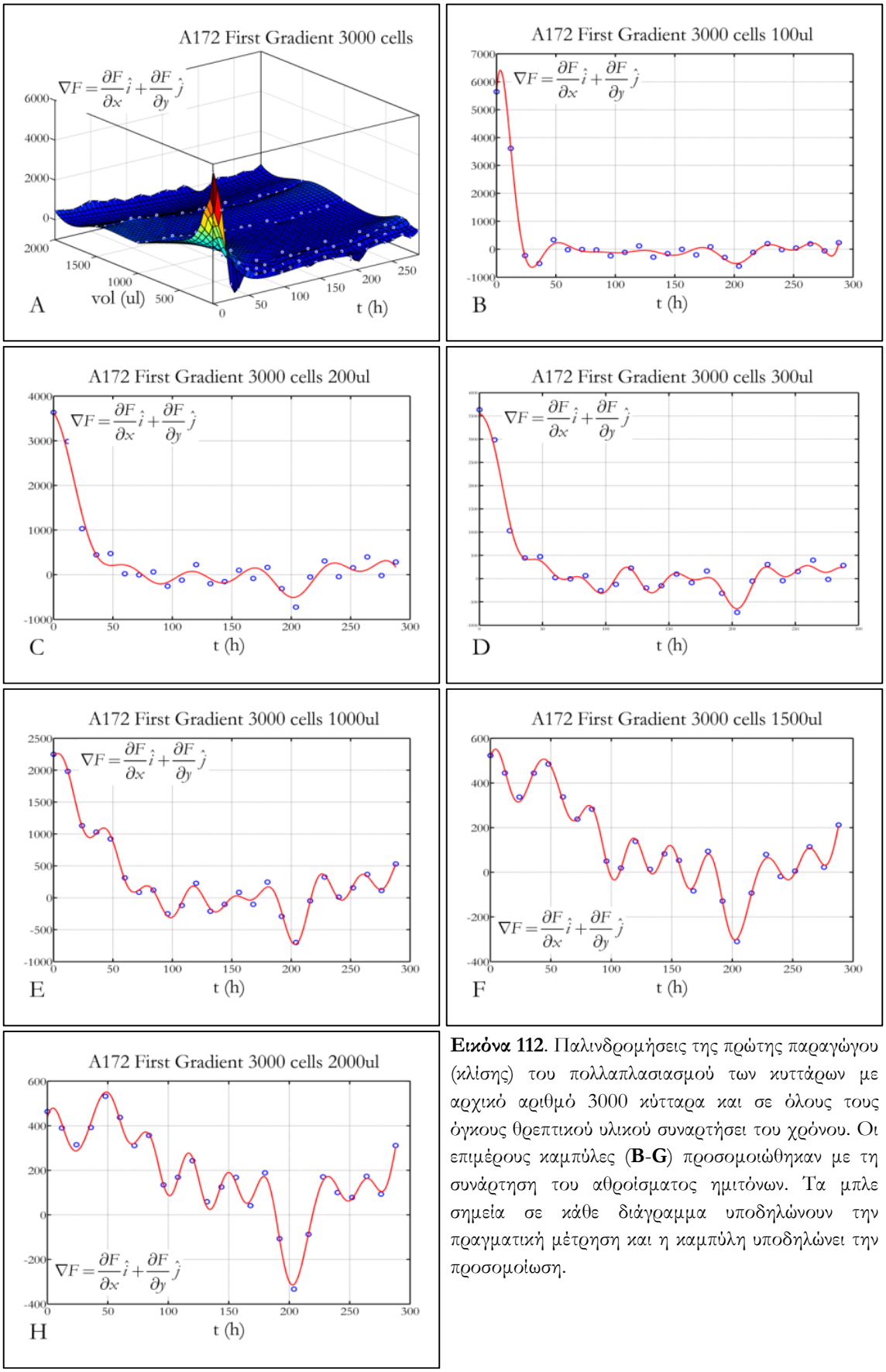
Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η πρώτη παρατήρηση που κάνουμε αφορά στη μορφή των γραφημάτων που παρουσιάζονται και προσομοιάζουν ταλαντώσεις.



Εικόνα 110. Παλινδρομήσεις της πρώτης παραγώγου (κλίσης) του πολλαπλασιασμού των κυττάρων με αρχικό αριθμό 25 κύτταρα και σε όλους τους όγκους θρεπτικού υλικού συναρτήσει του χρόνου. Οι επιμέρους καμπύλες (**B**-**G**) προσομοιώθηκαν με τη συνάρτηση του αθροίσματος ημιτόνων. Τα μπλε σημεία σε κάθε διάγραμμα υποδηλώνουν την πραγματική μέτρηση και η καμπύλη υποδηλώνει την προσομοίωση.



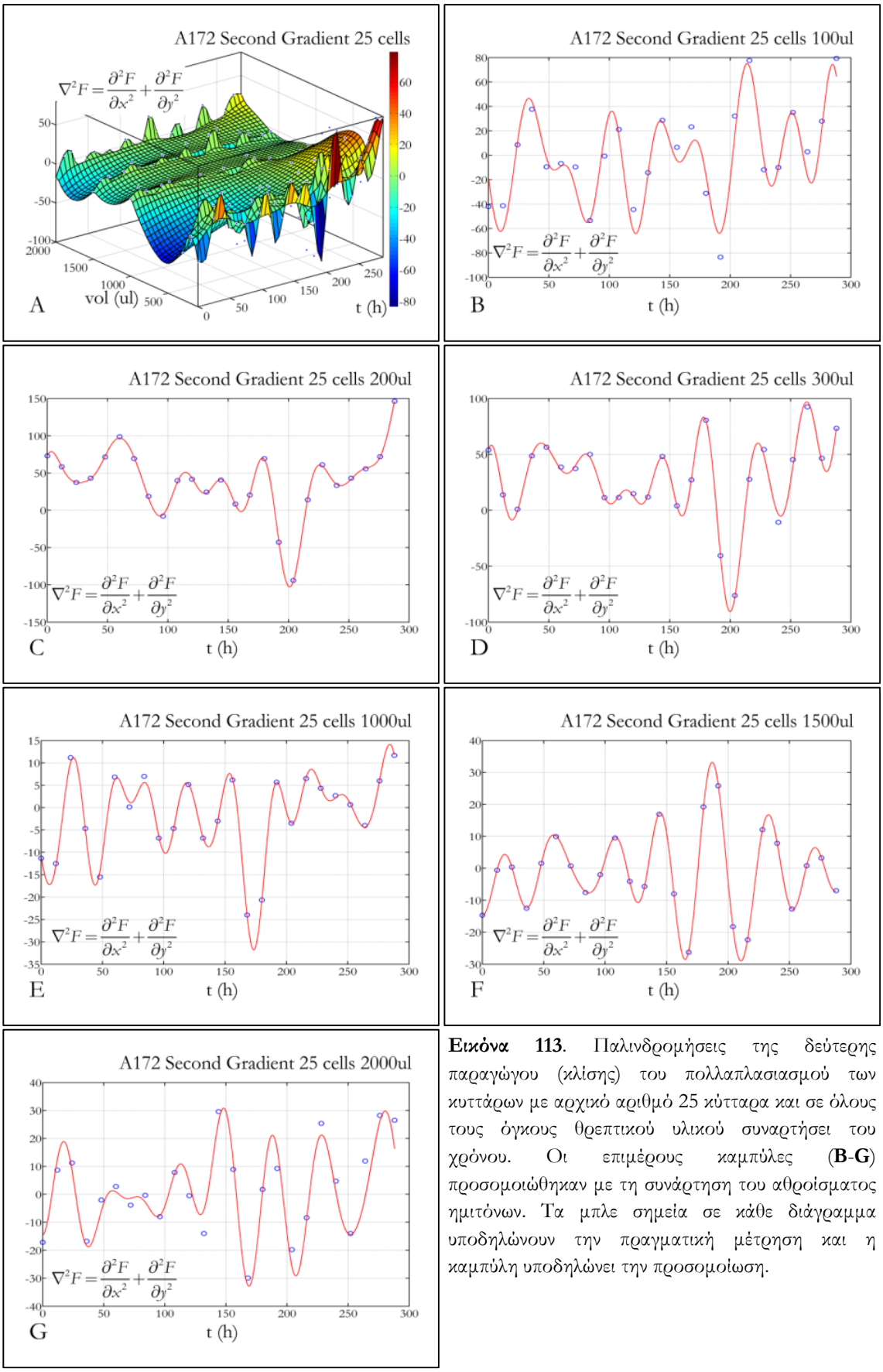
Εικόνα 111. Παλινδρομήσεις της πρώτης παραγώγου (κλίσης) του πολλαπλασιασμού των κυττάρων με αρχικό αριθμό 400 κύτταρα και σε όλους τους όγκους θρεπτικού υλικού συναρτήσει του χρόνου. Οι επιμέρους καμπύλες (**B**-**G**) προσομοιώθηκαν με τη συνάρτηση του αθροίσματος ημιτόνων. Τα μπλε σημεία σε κάθε διάγραμμα υποδηλώνουν την πραγματική μέτρηση και η καμπύλη υποδηλώνει την προσομοίωση.



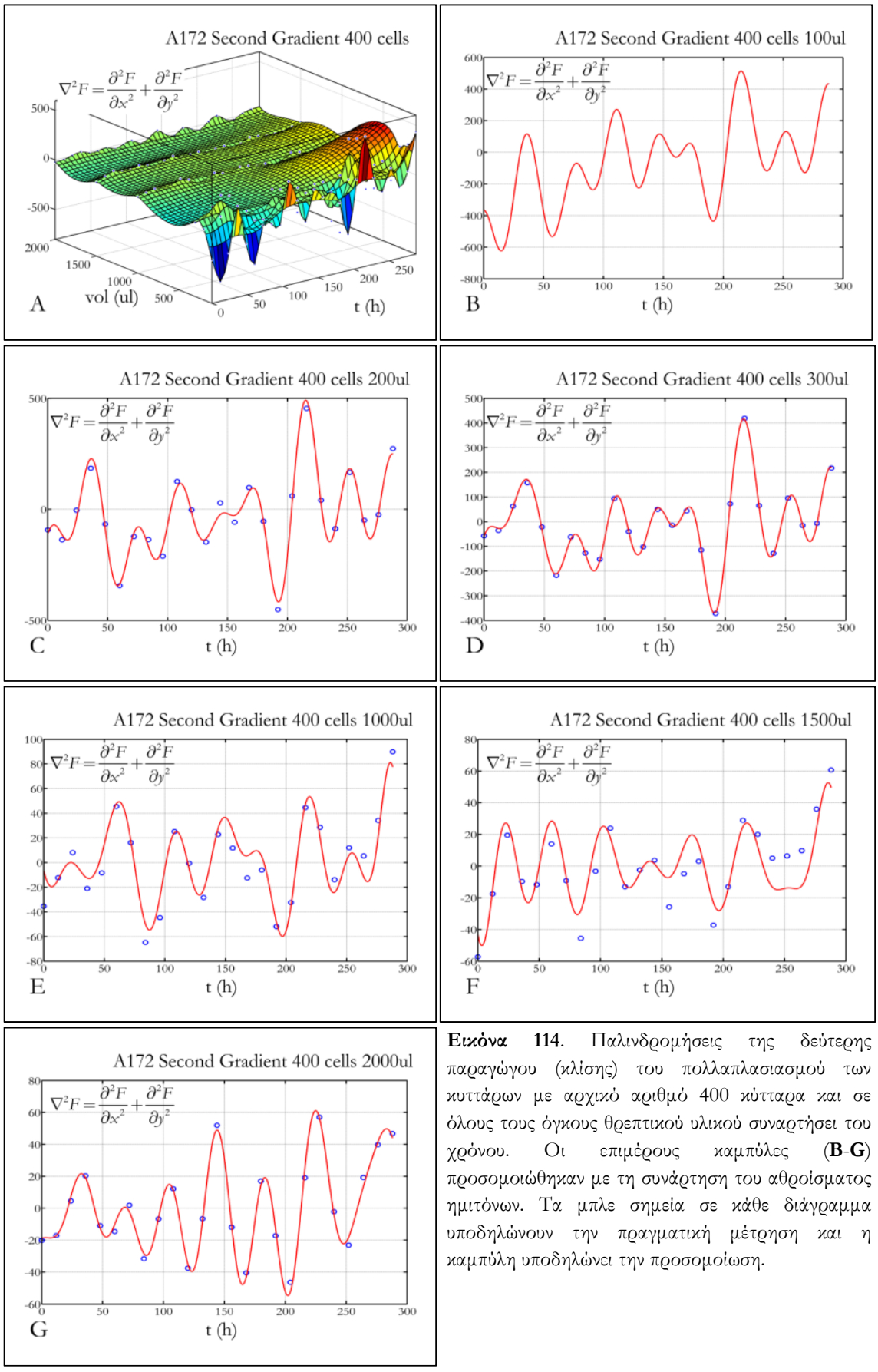
Εικόνα 112. Παλινδρομήσεις της πρώτης παραγώγου (κλίσης) του πολλαπλασιασμού των κυττάρων με αρχικό αριθμό 3000 κύτταρα και σε όλους τους όγκους θρεπτικού υλικού συναρτήσει του χρόνου. Οι επιμέρους καμπύλες (**B**-**G**) προσομοιώθηκαν με τη συνάρτηση του αθροίσματος ημιτόνων. Τα μπλε σημεία σε κάθε διάγραμμα υποδηλώνουν την πραγματική μέτρηση και η καμπύλη υποδηλώνει την προσομοίωση.

Η πρώτη ενδιαφέρουσα παρατήρηση που μπορούμε να κάνουμε αφορά στον τρόπο μεταβολής των ταλαντώσεων δηλαδή της ταχύτητας πολλαπλασιασμού. Βλέπουμε ότι οι τρεις καταστάσεις που αφορούν σε δύο ακραίες τιμές αρχικού αριθμού κυττάρων και μιας ενδιάμεσης, η τελευταία φαίνεται σαν να είναι μεταβατική μεταξύ των δύο ακραίων. Ας πάρουμε ως παράδειγμα την ταλάντωση που παρατηρούμε στα 25 κύτταρα και 100μl όγκου (**Εικόνα 110Β**). Παρατηρούμε ότι τα κύτταρα ακολουθούν μια σταθερή ταλαντωτική πορεία με αυξομειούμενο ρυθμό πολλαπλασιασμού. Αντίστοιχα όμως όταν πάμε στα 3000 κύτταρα αρχικού πληθυσμού (**Εικόνα 112Β**), βλέπουμε μια απότομα μειούμενη ταλαντωτική συμπεριφορά, η οποία μάλιστα παραπέμπει στην ιδέα της αντίληψης του χώρου από τον κυτταρικό πληθυσμό και την αντίστοιχη μείωση της ταχύτητας τους. Βλέποντας την διαμόρφωση της καμπύλης στα 400 (**Εικόνα 111Β**)και 100μl παρατηρούμε μια μειούμενη ταλαντωτική συμπεριφορά αλλά σε μικρότερο βαθμό από αυτήν στα 3000 κύτταρα.

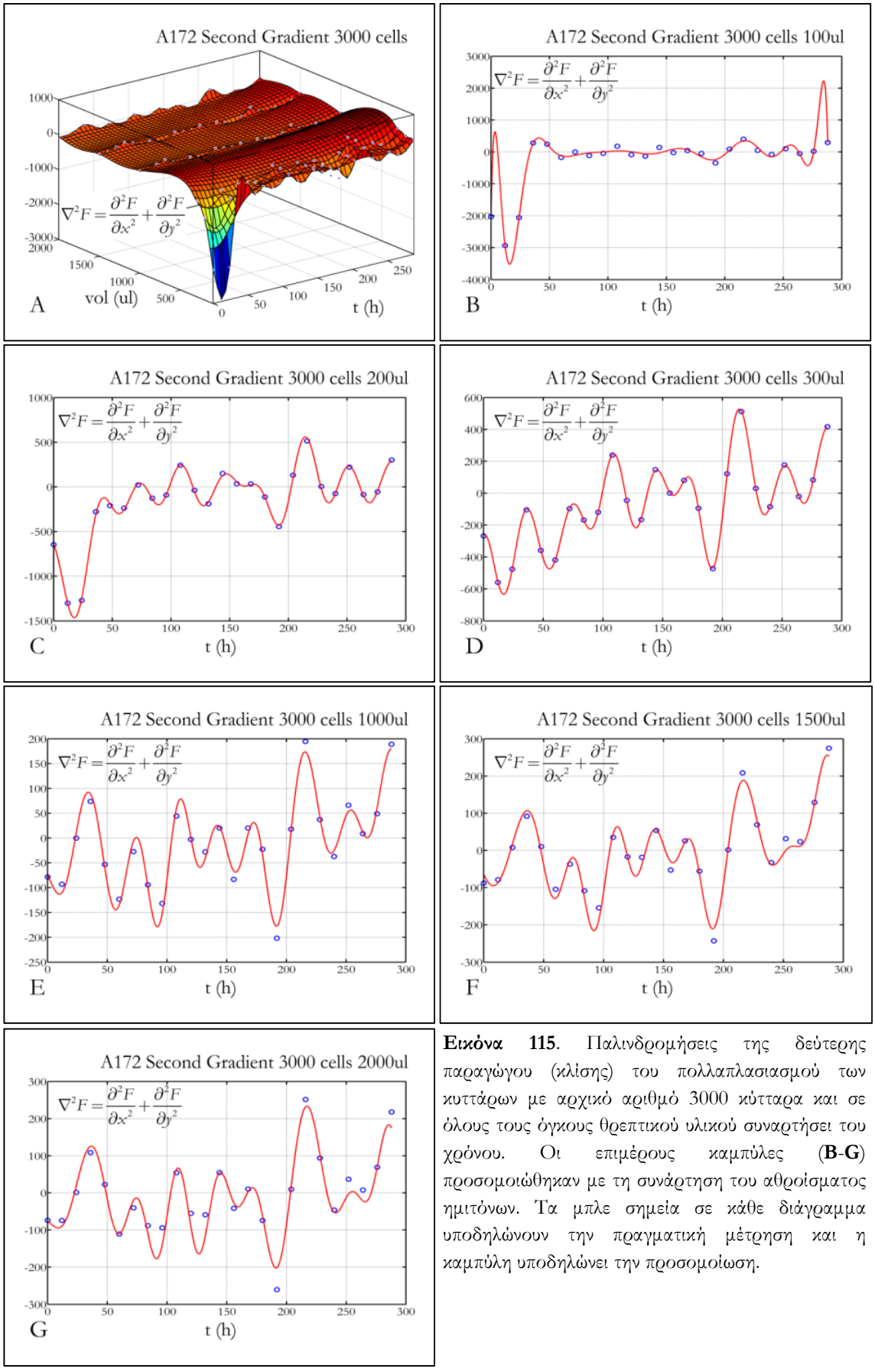
Συνεχίζοντας την ανάλυση σε αυτούς τους παράγοντες προχωρήσαμε στον υπολογισμό της δεύτερης μερικής παραγώγου της ταχύτητας πολλαπλασιασμού, η οποία αντιστοιχεί στην επιτάχυνση ή επιβράδυνση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφέρουμε ότι θα μιλάμε μόνο για επιτάχυνση της οποίας το πρόσημο θα ορίζει αν πρόκειται για επιτάχυνση ή επιβράδυνση. Δηλαδή, αν είναι θετική τότε έχουμε επιτάχυνση αν είναι αρνητική τότε έχουμε επιβράδυνση. Στις επόμενες εικόνες (**Εικόνα 113-Εικόνα 115**) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων.



Εικόνα 113. Παλινδρομήσεις της δεύτερης παραγώγου (κλίσης) του πολλαπλασιασμού των κυττάρων με αρχικό αριθμό 25 κύτταρα και σε όλους τους όγκους θρεπτικού υλικού συναρτήσει του χρόνου. Οι επιμέρους καμπύλες (**B**-**G**) προσομοιώθηκαν με τη συνάρτηση του αθροίσματος ημιτόνων. Τα μπλε σημεία σε κάθε διάγραμμα υποδηλώνουν την πραγματική μέτρηση και η καμπύλη υποδηλώνει την προσομοίωση.



Εικόνα 114. Παλινδρομήσεις της δεύτερης παραγώγου (κλίσης) του πολλαπλασιασμού των κυττάρων με αρχικό αριθμό 400 κύτταρα και σε όλους τους όγκους θρεπτικού υλικού συναρτήσει του χρόνου. Οι επιμέρους καμπύλες (**B**-**G**) προσομοιώθηκαν με τη συνάρτηση του αθροίσματος ημιτόνων. Τα μπλε σημεία σε κάθε διάγραμμα υποδηλώνουν την πραγματική μέτρηση και η καμπύλη υποδηλώνει την προσομοίωση.

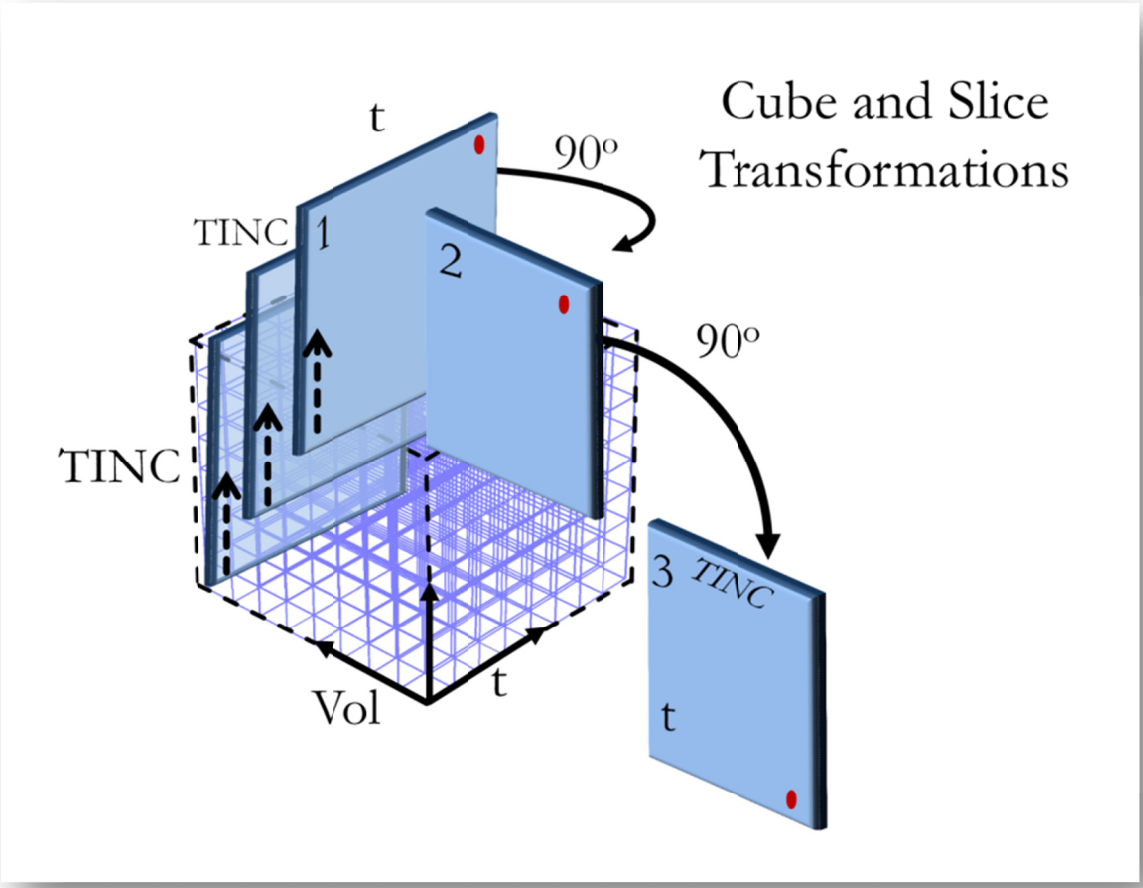


Εικόνα 115. Παλινδρομήσεις της δεύτερης παραγώγου (κλίσης) του πολλαπλασιασμού των κυττάρων με αρχικό αριθμό 3000 κύτταρα και σε όλους τους όγκους θρεπτικού υλικού συναρτήσει του χρόνου. Οι επιμέρους καμπύλες (**B**-**G**) προσομοιώθηκαν με τη συνάρτηση του αθροίσματος ημιτόνων. Τα μπλε σημεία σε κάθε διάγραμμα υποδηλώνουν την πραγματική μέτρηση και η καμπύλη υποδηλώνει την προσομοίωση.

Από τις παραπάνω παρατηρήσεις προέκυψαν ορισμένα ενδιαφέροντα ερωτήματα. Πρώτον παρατηρήσαμε ότι σε όλες τις περιπτώσεις τόσο για την ταχύτητα του πολλαπλασιασμού όσο και για την επιτάχυνση τα γραφήματα που περιγράφουν αυτά τα μεγέθη είναι ταλαντωτικά. Ως εκ τούτου, καταλαβαίνουμε ότι μπορούν ενδεχομένως να περιγραφούν με παρόμοιο τρόπο φαινόμενα όπως ο πολλαπλασιασμός, εφόσον υπάρχει κάποια κοινή ταλαντωτική πορεία, η οποία να περιγράφει όλους τους αρχικούς αριθμούς συναρτήσει του χρόνου. Άρα το νέο ερώτημα που προέκυπτε ήταν αν για κάθε αρχικό αριθμό κυττάρων ανεξαρτήτως του όγκου θρεπτικού στο οποίο μεγάλωσε, υπάρχει κάποια κοινή συνάρτηση που να περιγράφει τη μεταβολή τους.

Για να το διερευνήσουμε αυτό έπρεπε να μετασχηματίσουμε τα δεδομένα με τέτοιο τρόπο ώστε να περιγράψουμε τα δεδομένα μας συναρτήσει του χρόνου και του αρχικού αριθμού. Για το σκοπό αυτό δημιουργήσαμε ένα μετασχηματισμό κάνοντας μια βασική υπόθεση. Αν η πορεία του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ακολουθεί ταλαντώσεις, τότε μήπως σε όλο το φάσμα του πολλαπλασιασμού των κυττάρων υπάρχει περιοδικότητα ή ημι-περιοδικότητα; Δηλαδή αν λάβουμε το χρόνο ως μια συνεχή μεταβλητή ανεξαρτήτως του χώρου και τον κυτταρικό πληθυσμό ως τη δεύτερη μεταβλητή, τότε υπάρχει κάποια συνάρτηση που να περιγράφει το φαινόμενο αυτό; Καταλαβαίνουμε ότι αν η υπόθεση αυτή είναι αληθής τότε πρέπει σε όλους τους πληθυσμούς και σε όλες τις χρονικές στιγμές να παρατηρείται μια περιοδικότητα ή ημι-περιοδικότητα. Στην **Εικόνα 116**, παρουσιάζουμε σχηματικά τον τρόπο με τον οποίο αλλάξαμε τη δομή του αρχικού μας κύβου.

Με τον τρόπο αυτό δημιουργήσαμε έξι χρονοσειρές (μια για κάθε αρχικό όγκο θρεπτικού και χώρου ανάπτυξης των κυττάρων), οι οποίες αποτελούνται από όλους τους αρχικούς αριθμούς κυττάρων και σε όλους τους χρόνους που μελετήσαμε. Καταλαβαίνουμε ότι προκύπτει ένας νέος κύβος δεδομένων με νέες διαστάσεις και μεταβλητές, όπου στον άξονα των **x** θα είναι πλέον ο αρχικός αριθμός των κυττάρων (TINC) και στον άξονα των **y** ο χρόνος (*t*).



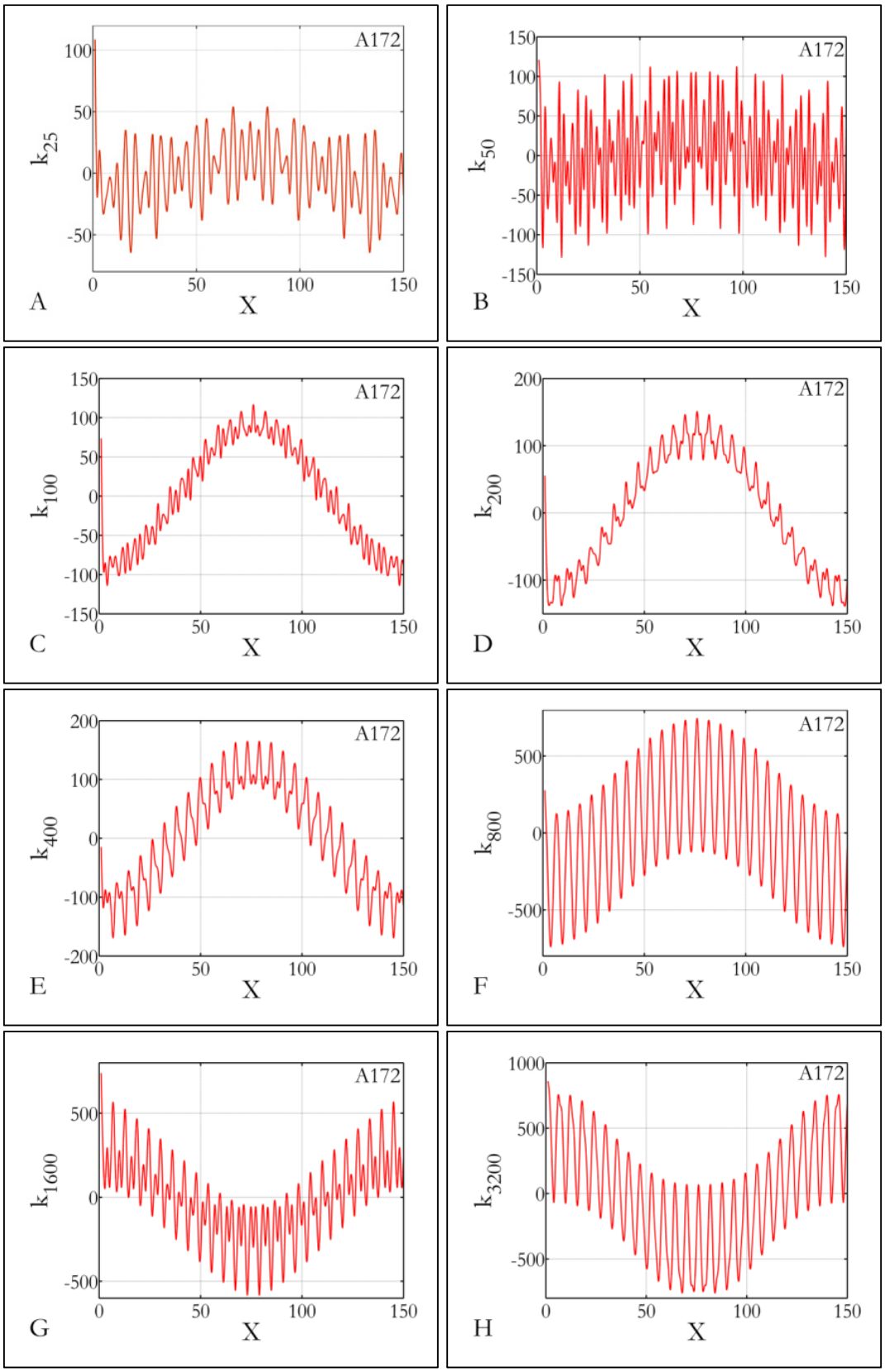
Εικόνα 116. Σχηματική αναπαράσταση των μετασχηματισμών του αρχικού κύβου ώστε να προκύψει ένας νέος κύβος δεδομένων, όπου στον άξονα των *x* θα είναι πλέον ο αρχικός αριθμός των κυττάρων (TINC) και στον άξονα των *y* ο χρόνος (t). Τα βέλη δείχνουν την πορεία που ακολουθείται για το μετασχηματισμό και η κόκκινη τελεία δείχνει την πορεία που ακολουθούν τα «φύλλα» του κύβου.

Ένα βασικό ερώτημα που προέκυψε είναι αν οι νέες αυτές χρονοσειρές έχουν κάποια συσχέτιση μεταξύ τους και πως αυτό θα μπορούσε να αναπαρασταθεί. Δεδομένου ότι θέσαμε προηγουμένως το ερώτημα της περιοδικότητας, τότε πρέπει να μπορούμε να διερευνήσουμε τις χρονοσειρές αυτές με εργαλεία που θα μας απαντήσουν το ερώτημά μας. Ξεκινήσαμε την ανάλυσή μας εξετάζοντας κάθε αρχικό αριθμό ξεχωριστά. Ο έλεγχος για ύπαρξη περιοδικών φαινομένων έγινε με μια αλγοριθμική προσέγγιση που δανειστήκαμε από τη μεθοδολογία χρονοσειρών και από την επεξεργασία σήματος. Ο αλγόριθμος που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο μετασχηματισμός Fourier (Fast Fourier Transformation-FFT).

Στην **Εικόνα 117**, παρουσιάζεται το αποτέλεσμα των μετασχηματισμών. Παρατηρούμε ότι ο μετασχηματισμός αποκάλυψε συναρτήσεις σε όλους τους αρχικούς αριθμούς, που παρουσιάζουν ταλαντώσεις και σε όλες τις περιπτώσεις περιοδικότητα. Παρατηρούμε όμως ότι σε κάθε γράφημα, έχουμε τελικά δύο περιοδικότητες, η μια είναι η τροχιά που ακολουθούν τα επιμέρους σημεία της

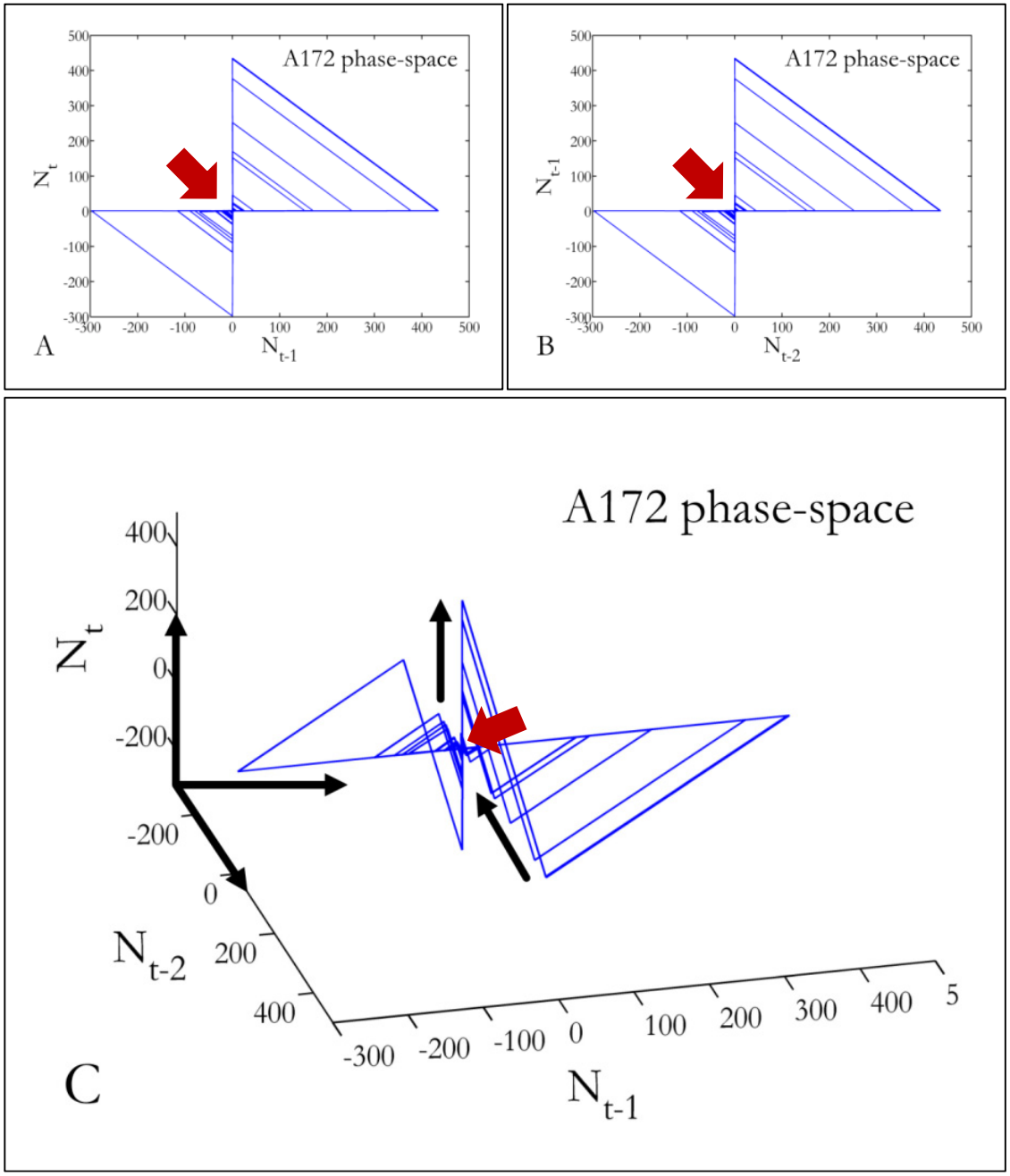
καμπύλης και η δεύτερη αφορά στη μέση τιμή, που περνά από το μέσο περίπου των καμπυλών των ταλαντώσεων. Επίσης είναι ενδιαφέρουσα η μορφή που έχουν οι καμπύλες αυτές όπου για πληθυσμούς έως και τα ~800 κύτταρα έχουν τα κοίλα προς τα πάνω και το προφίλ αυτό αντιστρέφεται όταν περνάμε στα ~1600 κύτταρα. Αντίστοιχα η ένδειξη για δύο περιοδικότητες μέσα στην ίδια συνάρτηση μας δημιούργησε το ερώτημα αν υπάρχει περιοδική συνάρτηση σε όλο το φάσμα του πολλαπλασιασμού ανεξαρτήτως πλέον χώρου, όγκου και αρχικού αριθμού κυττάρων. Υπάρχει δηλαδή τρόπος να περιγράψουμε το φαινόμενο που μελετάμε θεωρώντας το ως ένα ενιαίο, ως μια ενιαία χρονοσειρά;

Για να διερευνήσουμε το ερώτημα αυτό επεκτείναμε τον προηγούμενο συλλογισμό μας, που αφορούσε στο μετασχηματισμό του αρχικού κύβου δεδομένων, και δημιουργήσαμε μια νέα χρονοσειρά με μια μεταβλητή που ήταν πλέον ο πληθυσμός ανεξάρτητα από όλους τους άλλους παράγοντες.



Εικόνα 117. Μετασχηματισμοί Fourier των χρονοσειρών για κάθε αρχικό πληθυσμό κυττάρων (άξονας των ***y***).

Πρώτη ανάλυση σε αυτή την ενιαία χρονοσειρά ήταν να την εξετάσουμε για συσχετίσεις μεταξύ των πληθυσμών σε χρόνους *t*, (που εδώ συμβολίζουμε με N_t), σε χρόνο *t-1* (N_{t-1}) και σε χρόνο *t-2* (N_{t-2}). Δηλαδή αναπαραστήσαμε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (σε χρόνο t) συναρτήσει των δύο προηγούμενων σημείων του (*t-1* και *t-2*). Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στην **Εικόνα 118**.

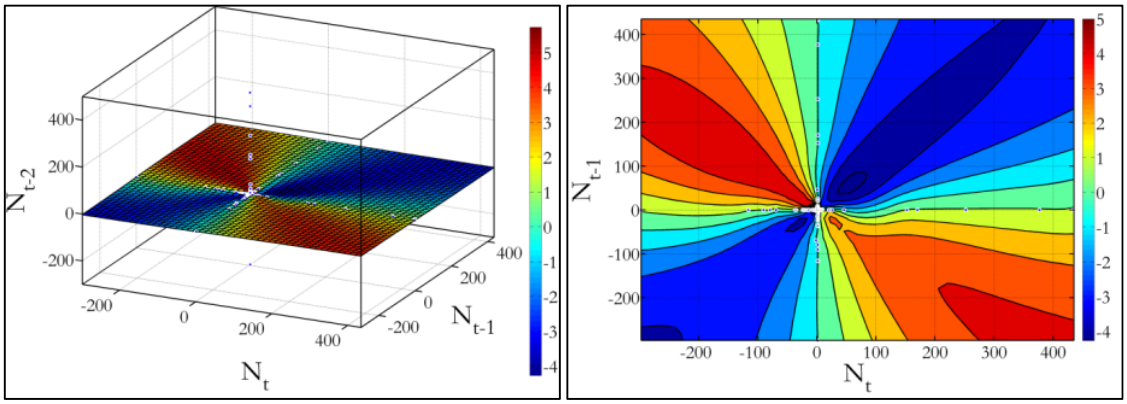


Εικόνα 118. Phase-space γράφημα των παραγόντων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού συναρτήσει του πληθυσμού σε χρόνο *t*, σε χρόνο *t-1* και χρόνο *t-2*. Τα γραφήματα αυτά έδειξαν ότι οι μεταβλητές αυτές παρουσιάζουν σημεία σύγκλισης (sinks, attractors) που είναι ένα σημαντικό εύρημα για την ύπαρξη χάους στο φαινόμενο του πολλαπλασιασμού (σηματοδοτούνται με τα κόκκινα βέλη).

Το γράφημα αυτό (**Εικόνα 118**) έδειξε ένα πολύ σημαντικό εύρημα. Έδωσε εξαιρετικά συμμετρικά διαγράμματα και έδωσε μια βασική εικόνα για την ύπαρξη μη-γραμμικότητας ήτοι χάους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα γραφήματα έδειξαν την ύπαρξη ασυμπτωτικών συγκλινουσών τροχιών (sinks, attractors). Για να εξετάσουμε περαιτέρω το εύρημα αυτό, υπολογίσαμε τους εκθέτες Lyapunov (*[h(x)]*

lyap) για τις χρονοσειρές και βρέθηκε ότι ήταν 9.9725, 3.251 και -2.7520 για κάθε χρονοσειρά. Με λίγα λόγια, ο ρυθμός πολλαπλασιασμού σε χρόνο *t* και σε χρόνο *t-1* παρουσιάζει χαοτικές τροχιές.

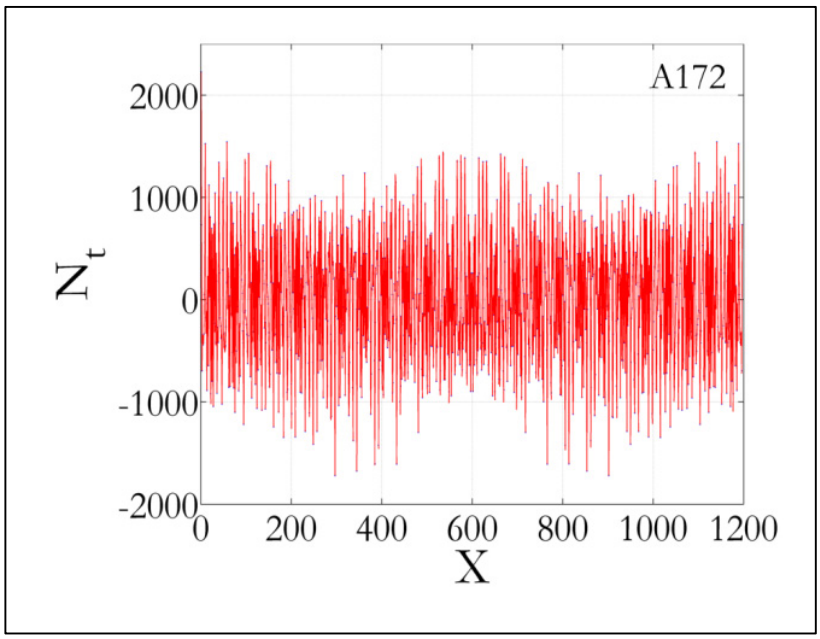
Επίσης αναπαραστήσαμε τις ίδιες μεταβλητές σε τρεις διαστάσεις μαζί με ένα διάγραμμα *θερμότητας* (*heat-map*), όπου φαίνεται η συμμετρία του αρχικού γραφήματος. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στην **Εικόνα 119**. Έχει ιδιαίτερη σημασία να προσέξουμε ότι το διάγραμμα αυτό δεν είναι απόλυτα συμμετρικό αλλά ημι-συμμετρικό, ένα γεγονός που είναι σημάδι μη-γραμμικότητας.



Εικόνα 119. Διαγραμματική αναπαράσταση σε τρεις διαστάσεις με τη μορφή επιφάνειας μαζί με το γράφημα *θερμότητας (heat-map)* (αριστερά).

Σε συνέχεια της προηγούμενης ανάλυσης, εκτελέσαμε και σε αυτά τα δεδομένα μετασχηματισμό Fourier και το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στην **Εικόνα 120**.

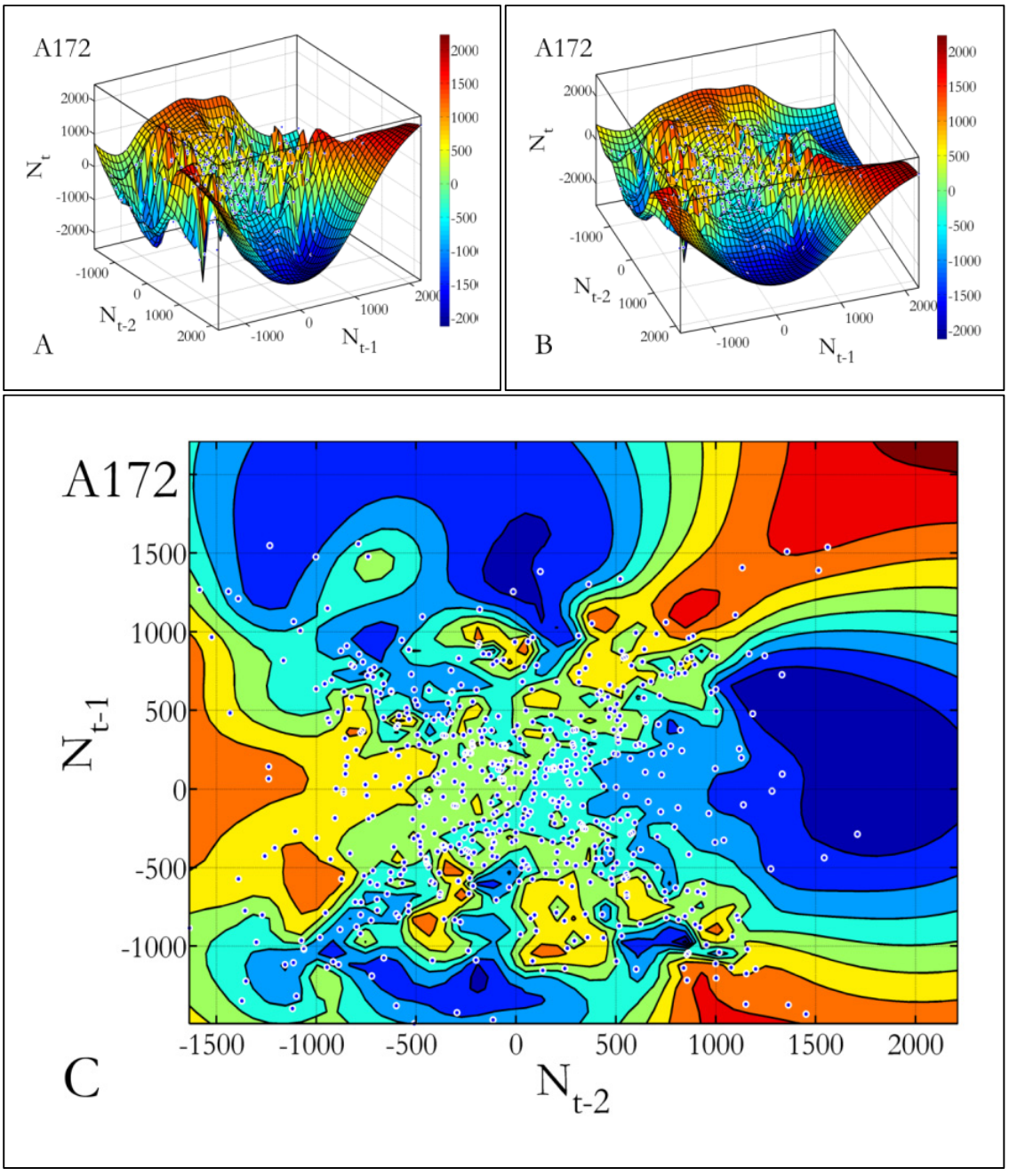
Το αποτέλεσμα ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέρον, μιας και υποδήλωνε ότι μπορούμε να εκφράσουμε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με τη μορφή μιας περιοδικής συνάρτησης.



Εικόνα 120. Γράφημα του μετασχηματισμού Fourier για όλο το χρονικό φάσμα ανεξαρτήτως αρχικού πληθυσμού και όγκου θρεπτικού υλικού ή χώρου.

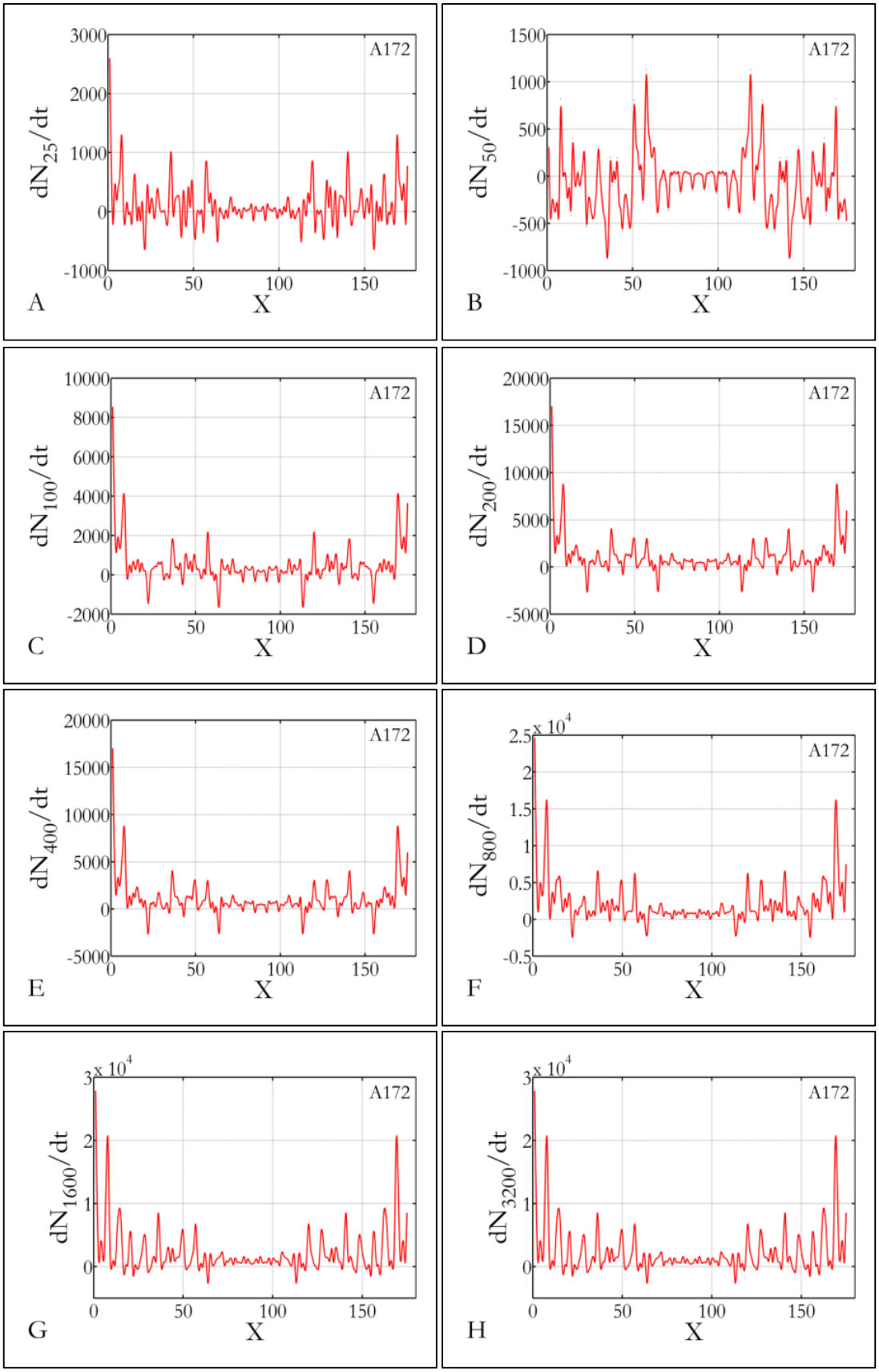
Αντίστοιχα και εδώ δημιουργήσαμε ένα διάγραμμα επιφάνειας, στο οποίο αναπαραστήσαμε τη μετασχηματισμένη χρονοσειρά συναρτήσει των τριών χρονικών πεδίων, ήτοι *t*, *t-1* και *t-2*. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στην **Εικόνα 121**.

Έχει ενδιαφέρον το γεγονός ότι παρουσιάζονται και σε αυτήν την περίπτωση, στο διάγραμμα *θερμότητας* (*heat-map*) η ημι-περιοδικότητα/ημι-συμμετρία της επιφάνειας.



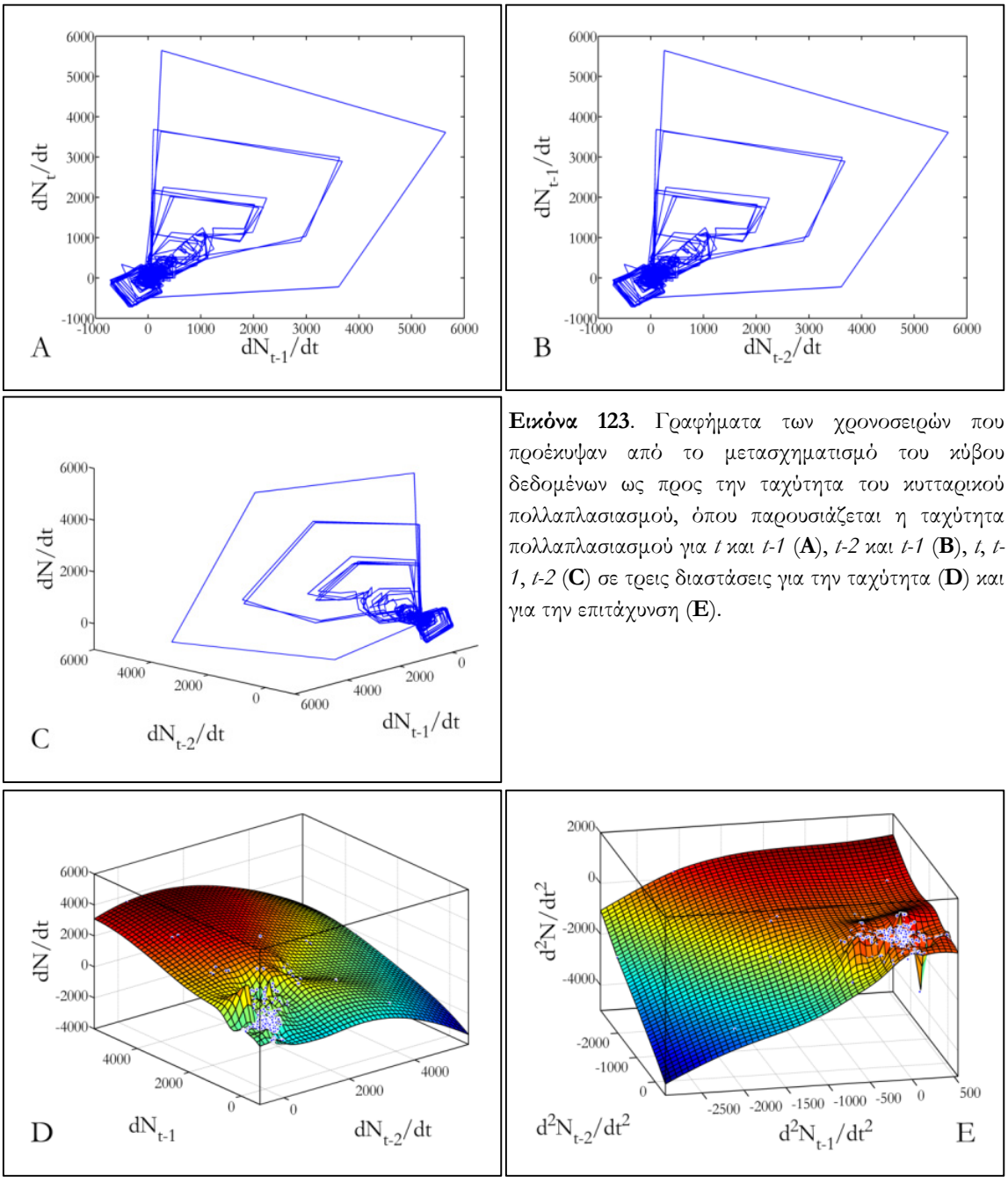
Εικόνα 121. Διαγραμματική αναπαράσταση των μετασχηματισμών Fourier για κάθε χρονοσειρά για χρόνο *t*, *t-1* και *t-2*. Παρουσιάζονται δύο διαφορετικές οπτικές γωνίες της επιφάνειας που σχηματίζεται από τα δεδομένα (**A**, **B**), όπου φαίνεται η ημι-συμμετρικότητα του γραφήματος. Αυτό παρουσιάζεται ακόμα καλύτερα στο γράφημα *θερμότητας* (*Heat-map*) (**C**).

Ως φυσικό επακόλουθο και αφού μελετήσαμε το ρυθμό πολλαπλασιασμού, επεκτείναμε τη μελέτη μας στην ταχύτητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων ξεκινώντας από τη μελέτη των αρχικών πληθυσμών με μετασχηματισμούς Fourier. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στην **Εικόνα 122**.



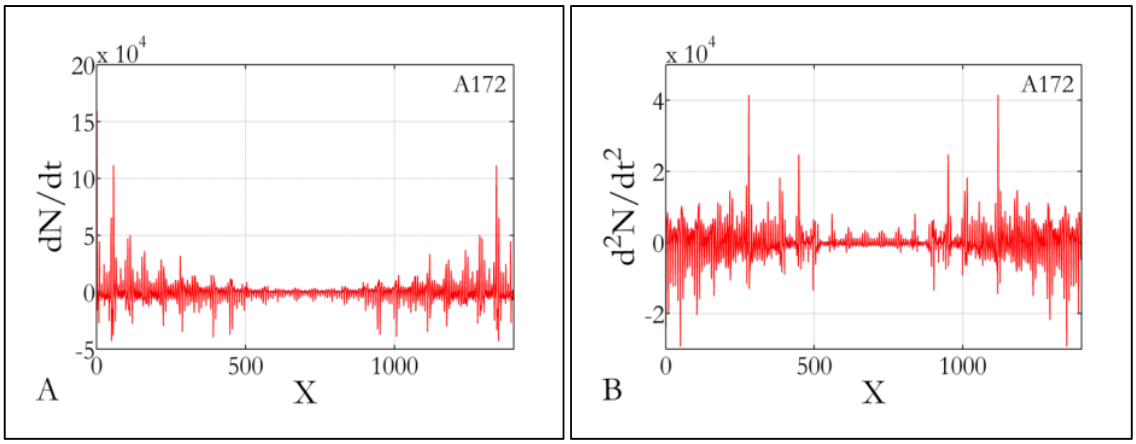
Εικόνα 122. Γραφήματα μετασχηματισμών Fourier της ταχύτητας του πολλαπλασιασμού των κυττάρων σε όλους τους αρχικούς αριθμούς.

Το αποτέλεσμα ήταν παρόμοιο με αυτό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού που είδαμε προηγουμένως. Σε συνέχεια αυτού, μετασχηματίσαμε την ταχύτητα πολλαπλασιασμού αλλά και την επιτάχυνση του πολλαπλασιασμού όπως περιγράψαμε προηγουμένως και αναπαραστήσαμε τις χρονοσειρές συναρτήσει των τριών χρονικών συνόλων ήτοι *t*, *t-1* και *t-2*. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στην **Εικόνα 123**.



Εικόνα 123. Γραφήματα των χρονοσειρών που προέκυψαν από το μετασχηματισμό του κύβου δεδομένων ως προς την ταχύτητα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπου παρουσιάζεται η ταχύτητα πολλαπλασιασμού για *t* και *t-1* (**A**), *t-2* και *t-1* (**B**), *t*, *t-1*, *t-2* (**C**) σε τρεις διαστάσεις για την ταχύτητα (**D**) και για την επιτάχυνση (**E**).

Αντίστοιχα και σε αυτή την ανάλυση μελετήσαμε την ταχύτητα και επιτάχυνση πολλαπλασιασμού με μετασχηματισμούς και βρέθηκε παρόμοια συμπεριφορά κοινής περιοδικότητας και στα δύο μεγέθη. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στην **Εικόνα 124**.



Εικόνα 124. Γράφημα του μετασχηματισμού Fourier, της ταχύτητας πολλαπλασιασμού (**A**) και της επιτάχυνσης (**B**). Παρατηρείται η ίδια ταλαντωτική συμπεριφορά όπως και στην περίπτωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού.

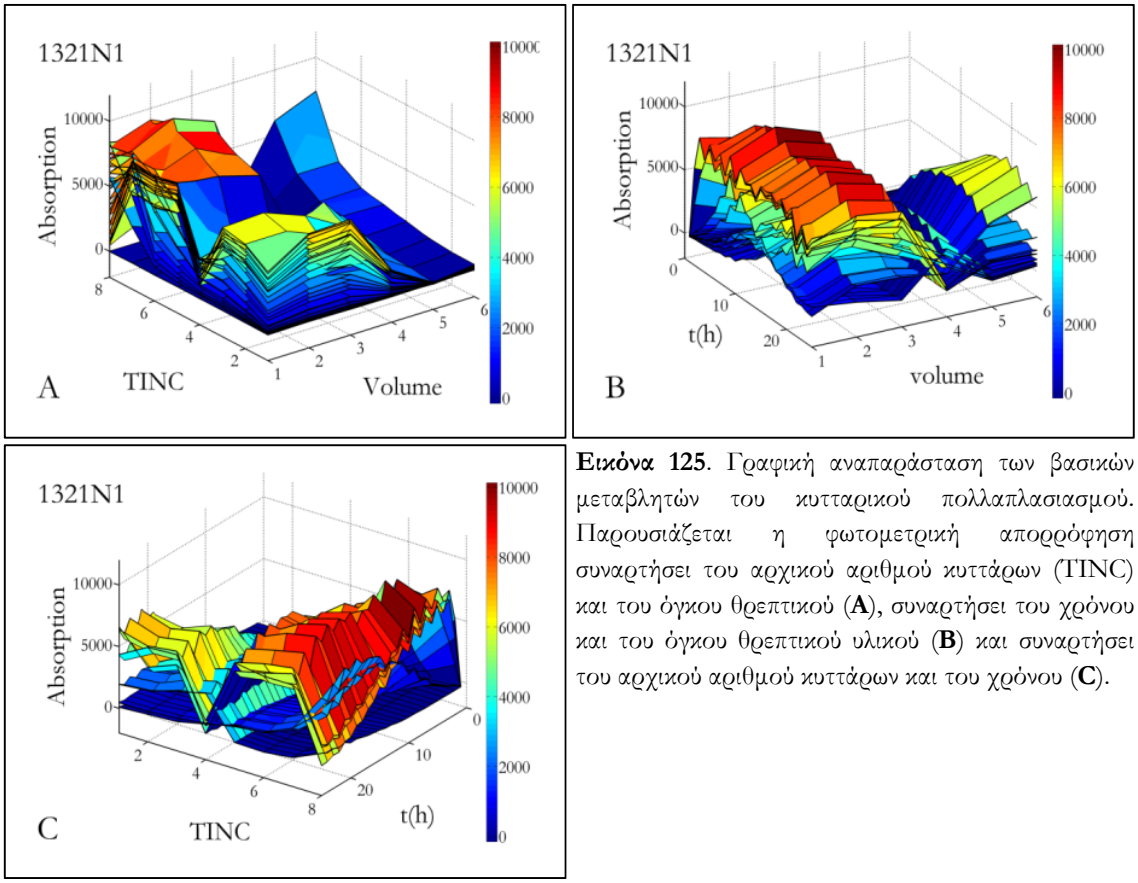
Οι παραπάνω παρατηρήσεις έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, μιας και αποτελούν ένδειξη ότι πρώτον υπάρχει ένα κοινό προφίλ ανάπτυξης σε όλες τις συνθήκες και δεύτερον ότι μπορεί να περιγραφεί ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός με έναν κοινό τρόπο ήτοι μια περιοδική συνάρτηση. Για να επιβεβαιώσουμε αλλά και να ελέγξουμε αν τα αποτελέσματα αυτά ήταν αληθή και για άλλους κυτταρικούς τύπους μελετήσαμε με τον ίδιο τρόπο τα κύτταρα 1321N1 και TE671 καθώς και τα CCRFCEM.

Στα κύτταρα 1321N1 και TE671 ακολουθήσαμε ακριβώς την ίδια πειραματική διάταξη όπως και στην περίπτωση των A172, με μια όμως νέα προσθήκη. Το πείραμα δεν σταμάτησε στις 288 ώρες αλλά αφαιρέσαμε το θρεπτικό υλικό στο οποίο βρισκόντουσαν και προσθέσαμε νέο θρεπτικό υλικό στους ίδιους ακριβώς όγκους. Τα πειράματα αυτά τα ονομάσαμε Φάση I (phase I) και Φάση II (phase II).

Με την αναζωογόνηση αυτή θέλαμε να εξετάσουμε αν τα κύτταρα μπόρεσαν να ξεπεράσουν το στρες την έλλειψης τροφής των τοξινών που παρήχθησαν αλλά να ελέγξουμε αν υπήρχε ένα είδους «μνήμης» για το χώρο και τον τρόπο που μέχρι του σημείου εκείνου είχαν βρεθεί και πολλαπλασιασθεί. Για να γίνουμε πιο συγκεκριμένοι, αν τα κύτταρα δεν έχουν την ανάγκη τους αυξητικούς παράγοντες που αφορούν στο θρεπτικό υλικό αλλά μόρια που παράγονται από τα ίδια τα κύτταρα μέσω των οποίων επικοινωνούν τότε θα έπρεπε με την αφαίρεση του θρεπτικού να παρατηρηθεί ο ίδιος ρυθμός και τρόπος πολλαπλασιασμού όπως όταν πρωτοτοποθετήθηκαν στην καλλιέργεια. Αν από την άλλη τα κύτταρα έχουν ένα είδος «μνήμης» για τις συνθήκες στις οποίες

βρέθηκαν τότε στη δεύτερη φάση θα έπρεπε να γίνουν περισσότερο «οικονόμοι» μιας και θα γνώριζαν ότι οι πόροι είναι περιορισμένοι και γρήγορα εξαντλούνται.

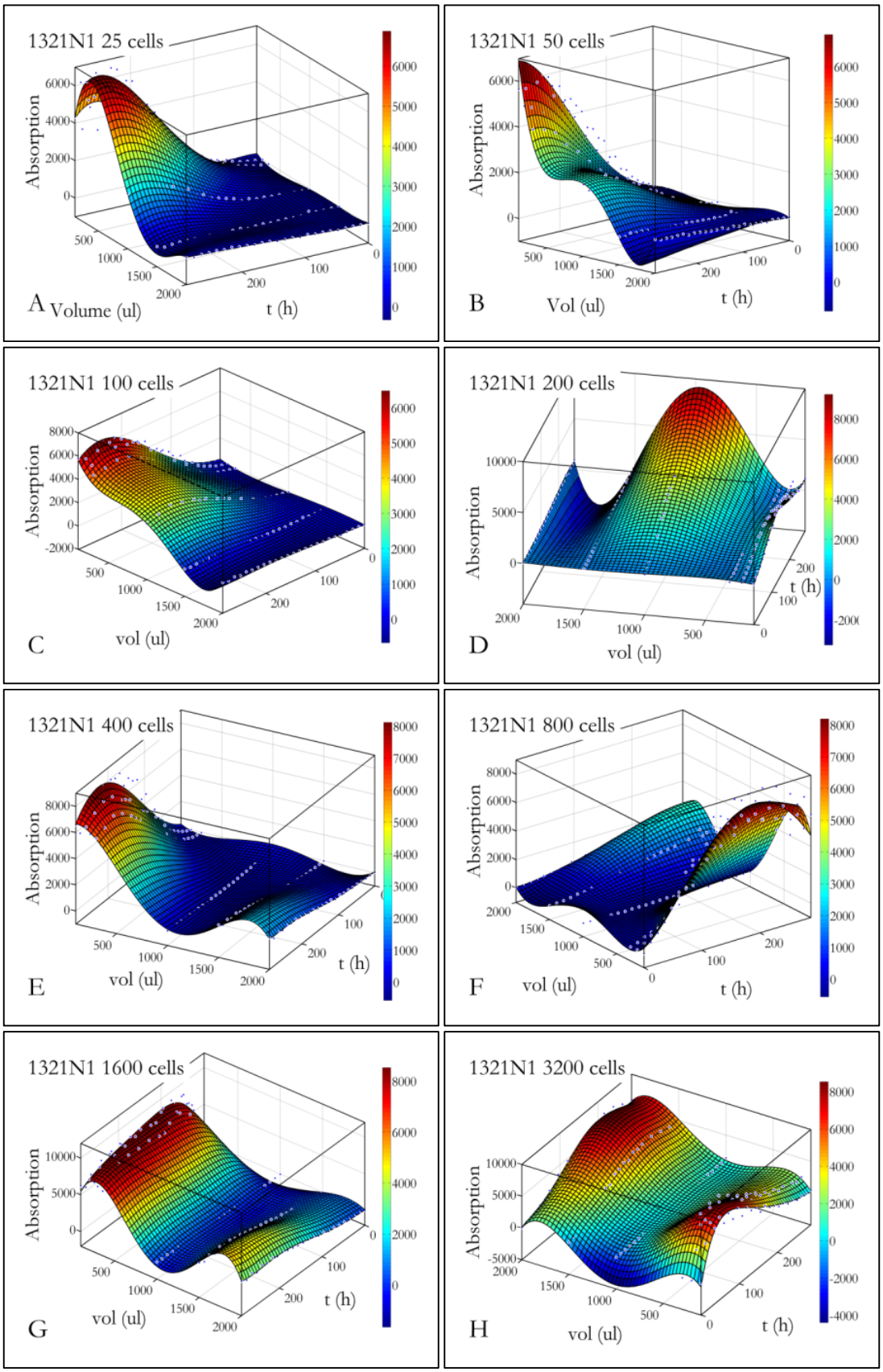
Σε συνέχεια των προηγούμενων αναλύσεων, προχωρούμε με τα αποτελέσματα για τα κύτταρα 1321N1. Πρώτα παρουσιάζουμε το σύνολο των γραφημάτων για τις τρισδιάστατες παραστάσεις των παραγόντων μέτρησης συναρτήσει της φωτομετρικής απορρόφησης. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στην **Εικόνα 125**.



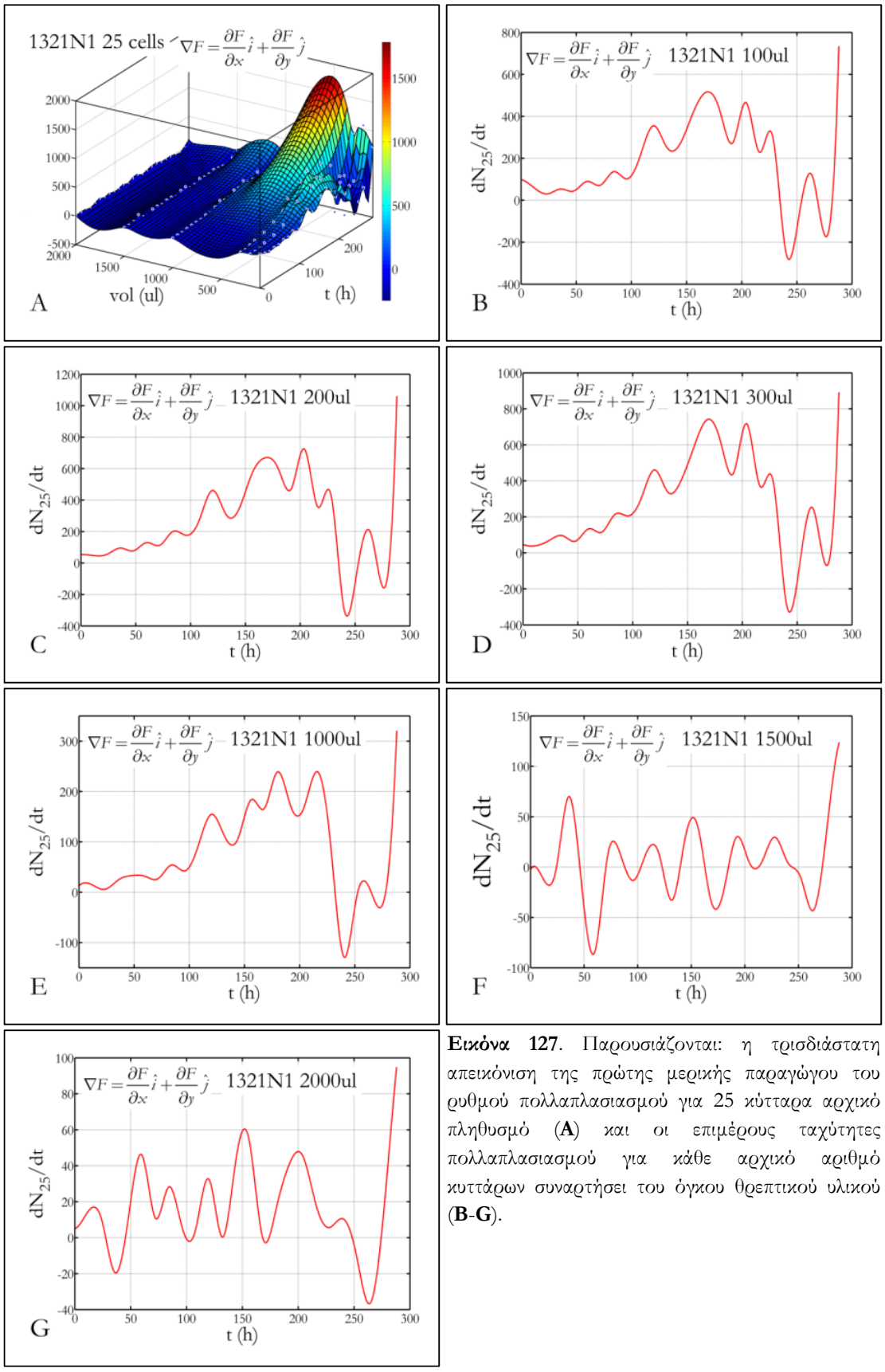
Εικόνα 125. Γραφική αναπαράσταση των βασικών μεταβλητών του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Παρουσιάζεται η φωτομετρική απορρόφηση συναρτήσει του αρχικού αριθμού κυττάρων (TINC) και του όγκου θρεπτικού (**A**), συναρτήσει του χρόνου και του όγκου θρεπτικού υλικού (**B**) και συναρτήσει του αρχικού αριθμού κυττάρων και του χρόνου (**C**).

Σε συνέχεια αυτής της ανάλυσης παρουσιάζουμε τις καμπύλες επιφανείας για κάθε αρχικό αριθμό, σε συνάρτηση με την απορρόφηση, το χρόνο και τον όγκο θρεπτικού υλικού. Παρατηρούμε παρόμοια συμπεριφορά των κυττάρων σχετικά με αυτή των κυττάρων A172. Εξαίρεση σε αυτό βλέπουμε στα 200 κύτταρα αρχικό αριθμό, όπου έχουμε μια κορυφή στα 1000μl. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στην **Εικόνα 126**.

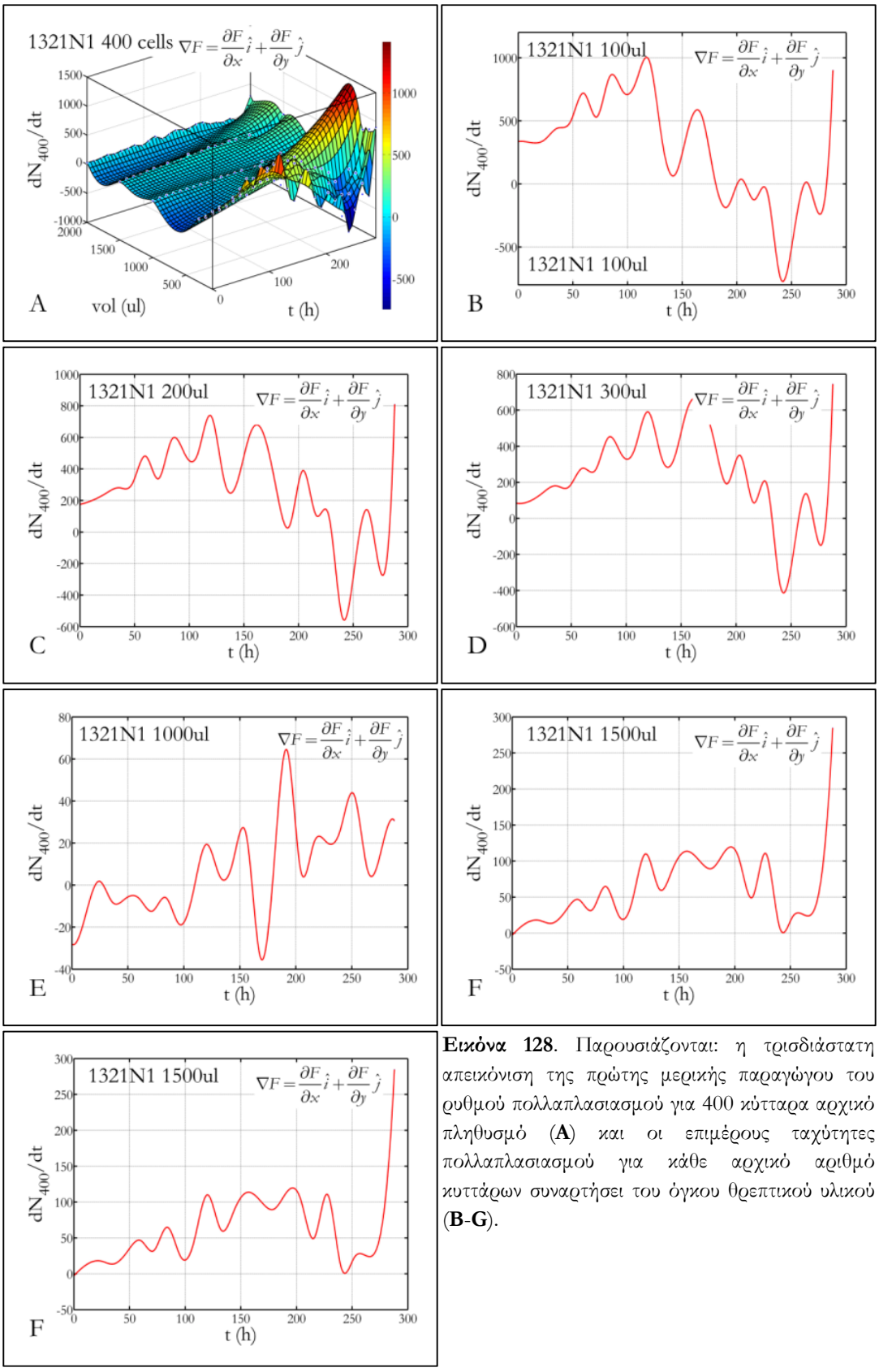
Ακριβώς όπως και στην προηγούμενη κυτταρική σειρά, έτσι και εδώ υπολογίσαμε την πρώτη μερική παράγωγο (κλίση επιφάνειας) ώστε να βρούμε την ταχύτητα του συστήματος. Ενδεικτικά παρουσιάζουμε τα αποτελέσματα για αρχικούς αριθμούς κυττάρων 25, 400 και 3000. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στις ακόλουθες εικόνες (**Εικόνα 127**-**Εικόνα 129**).



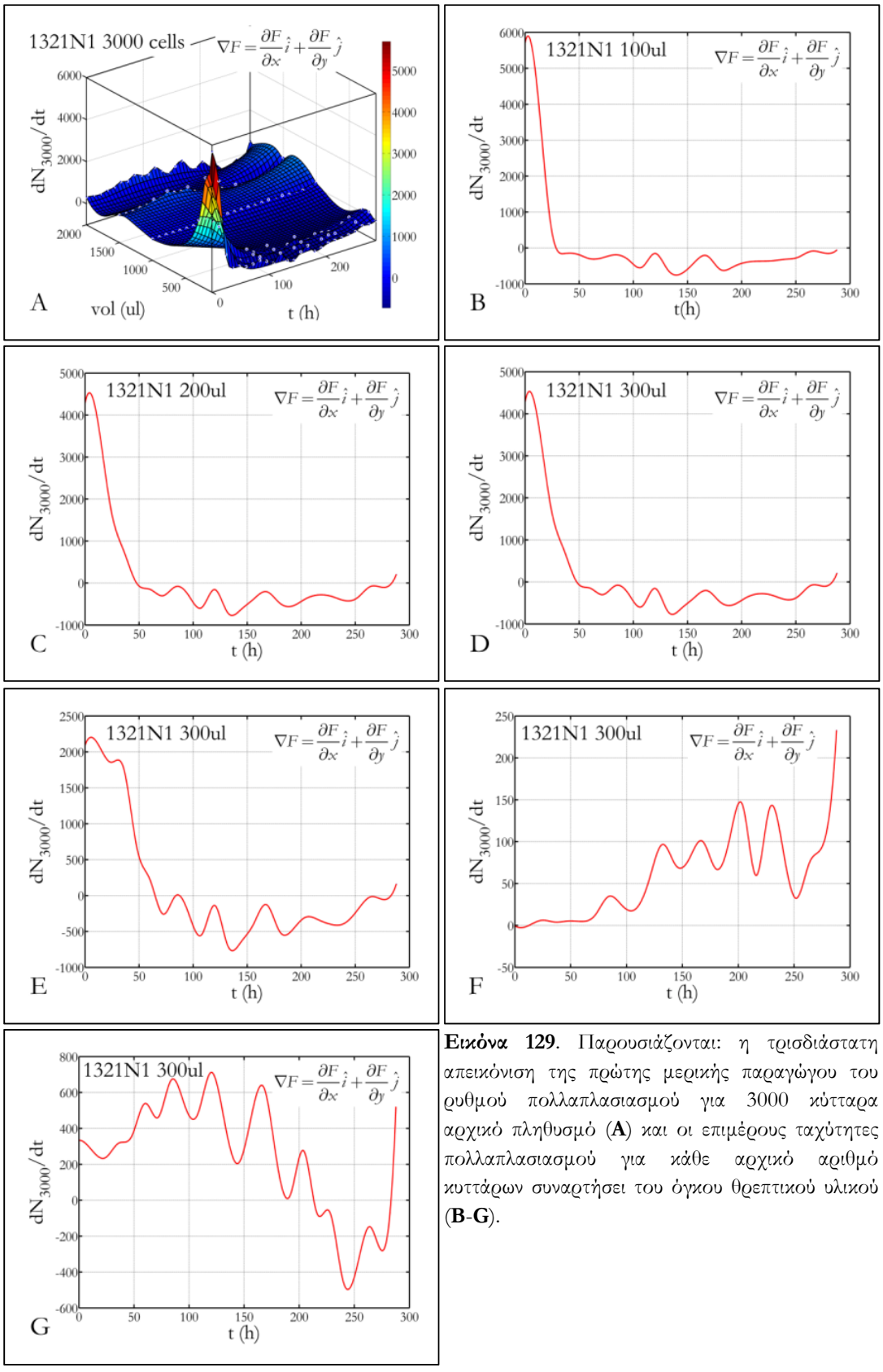
Εικόνα 126. Τρισδιάστατα γραφήματα της φωτομετρικής απορρόφησης συναρτήσει του όγκου θρεπτικού και του χρόνου καλλιέργειας για κάθε αρχικό αριθμό κυττάρων.



Εικόνα 127. Παρουσιάζονται: η τρισδιάστατη απεικόνιση της πρώτης μερικής παραγώγου του ρυθμού πολλαπλασιασμού για 25 κύτταρα αρχικό πληθυσμό (**A**) και οι επιμέρους ταχύτητες πολλαπλασιασμού για κάθε αρχικό αριθμό κυττάρων συναρτήσει του όγκου θρεπτικού υλικού (**B**-**G**).



Εικόνα 128. Παρουσιάζονται: η τρισδιάστατη απεικόνιση της πρώτης μερικής παραγώγου του ρυθμού πολλαπλασιασμού για 400 κύτταρα αρχικό πληθυσμό (**A**) και οι επιμέρους ταχύτητες πολλαπλασιασμού για κάθε αρχικό αριθμό κυττάρων συναρτήσει του όγκου θρεπτικού υλικού (**B**-**G**).

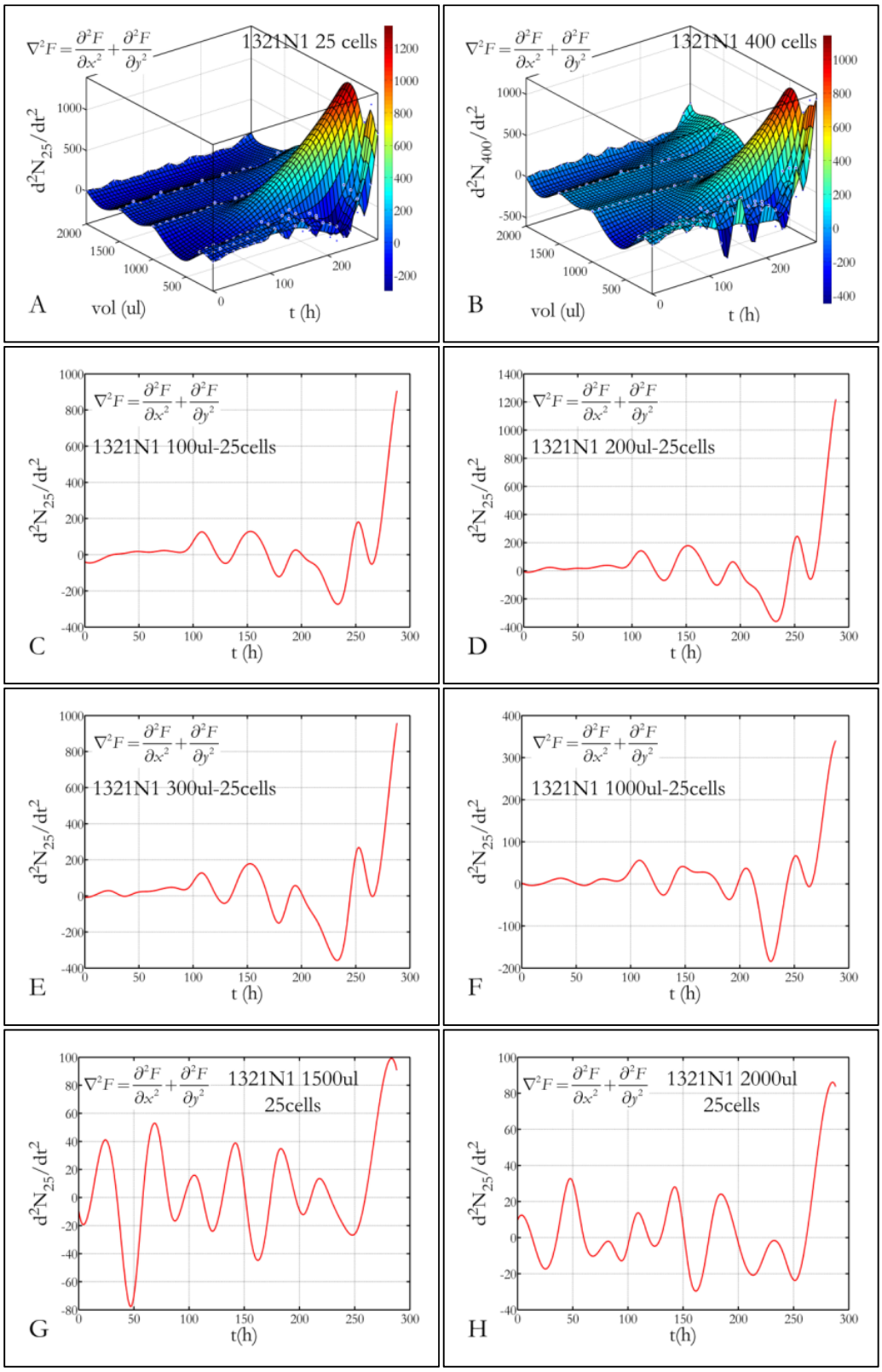


Εικόνα 129. Παρουσιάζονται: η τρισδιάστατη απεικόνιση της πρώτης μερικής παραγώγου του ρυθμού πολλαπλασιασμού για 3000 κύτταρα αρχικό πληθυσμό (**A**) και οι επιμέρους ταχύτητες πολλαπλασιασμού για κάθε αρχικό αριθμό κυττάρων συναρτήσει του όγκου θρεπτικού υλικού (**B**-**G**).

Έχει ενδιαφέρον να παρατηρήσουμε ότι στην ταχύτητα πολλαπλασιασμού, παρατηρούμε σημαντικές ομοιότητες μεταξύ των κυτταρικών σειρών A172 και 1321N1. Παρατηρούμε μια αύξουσα ταλαντωτική δομή στις μικρές συγκεντρώσεις κυττάρων και απότομα μειούμενη στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Το εύρημα αυτό επαναλαμβανόμενο είναι ένα τεκμήριο για την ανάγκη επικοινωνίας των κυττάρων, ή πιθανότατα η επικοινωνία αυτή δεν είναι ανάγκη αλλά εγγενής μηχανισμός με βάση τον οποίο ρυθμίζεται ο πολλαπλασιασμός. Αντίστοιχα όμως και εδώ βλέπουμε ότι αυτή η ιδιότητα είναι και συνάρτηση του χώρου που μεγαλώνουν τα κύτταρα.

Μια ερμηνεία που θα μπορούσαμε να δώσουμε σε αυτό το φαινόμενο είναι ότι πρόκειται για χημειοτακτικό μηχανισμό, ο οποίος ενεργοποιεί κυτταρικούς υποδοχείς ανάλογα με τη συγκέντρωσή του.

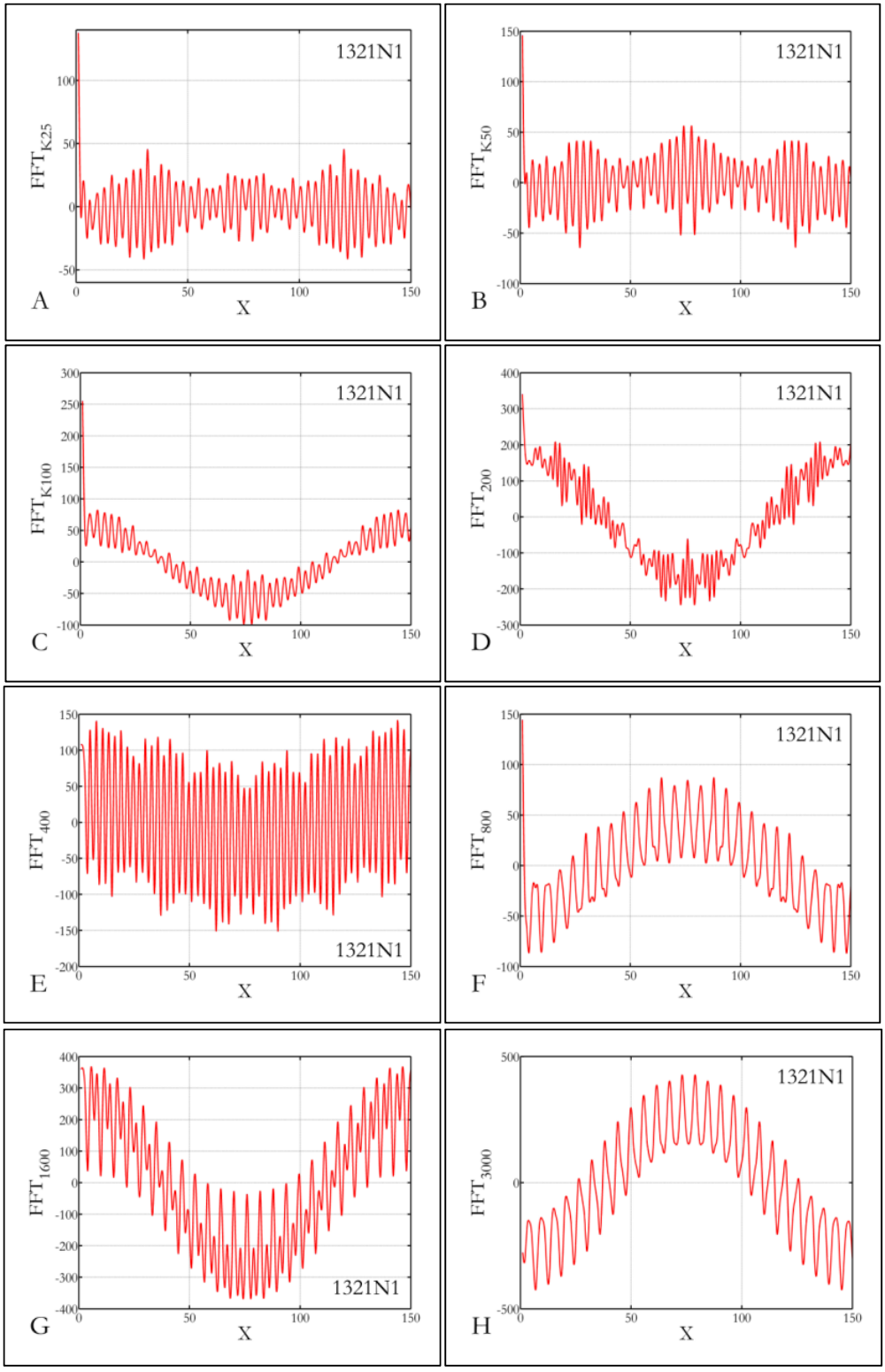
Σε αναλογία, κάναμε μια ανάλογη ανάλυση και για την επιτάχυνση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στην **Εικόνα 130**.



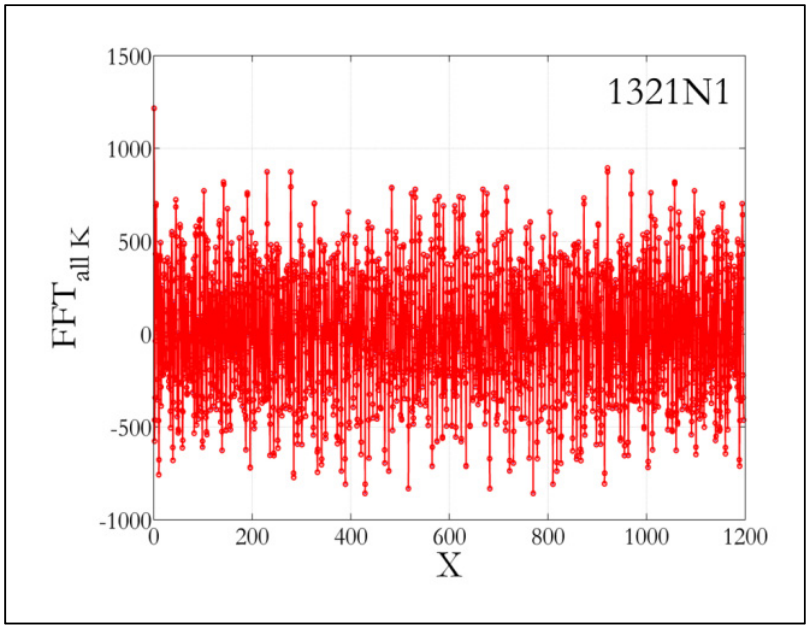
Εικόνα 130. Παρουσιάζονται η τρισδιάστατη απεικόνιση της δεύτερης μερικής παραγώγου του ρυθμού πολλαπλασιασμού για 25 (**A**) και 400 (**B**) κύτταρα αρχικό πληθυσμό και οι επιμέρους ταχύτητες πολλαπλασιασμού για αρχικό αριθμό 25 κυττάρων συναρτήσει του όγκου θρεπτικού υλικού (**C**-**H**).

Επίσης κάναμε και σε αυτή την περίπτωση ανάλυση *Fourier*, για να βρούμε πιθανές περιοδικότητες στην ταχύτητα πολλαπλασιασμού. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στην **Εικόνα 131**. Παρατηρούμε και εδώ αλλαγή της δομής της περιοδικής συνάρτησης, όπου για τα ~800 και ~3000 παρατηρούμε ότι η συναρτήσεις στρέφουν τα κοίλα προς τα επάνω ενώ οι υπόλοιπες συναρτήσεις έχουν τα κοίλα προς τα κάτω. Ένα φαινόμενο που παρατηρήσαμε και στα κύτταρα A172.

Επίσης παρατηρούμε ότι η ταχύτητα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού συμπεριφέρεται σαν έχει δύο περιόδους, όπως και στον προηγούμενο κυτταρικό τύπο. Σε συνέχεια της ανάλυσης αυτής, εκτελέσαμε τον ίδιο μετασχηματισμό σε ολόκληρο το φάσμα της χρονοσειράς, όπως το περιγράψαμε προηγουμένως σε αυτό το κεφάλαιο και το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στην **Εικόνα 132**.

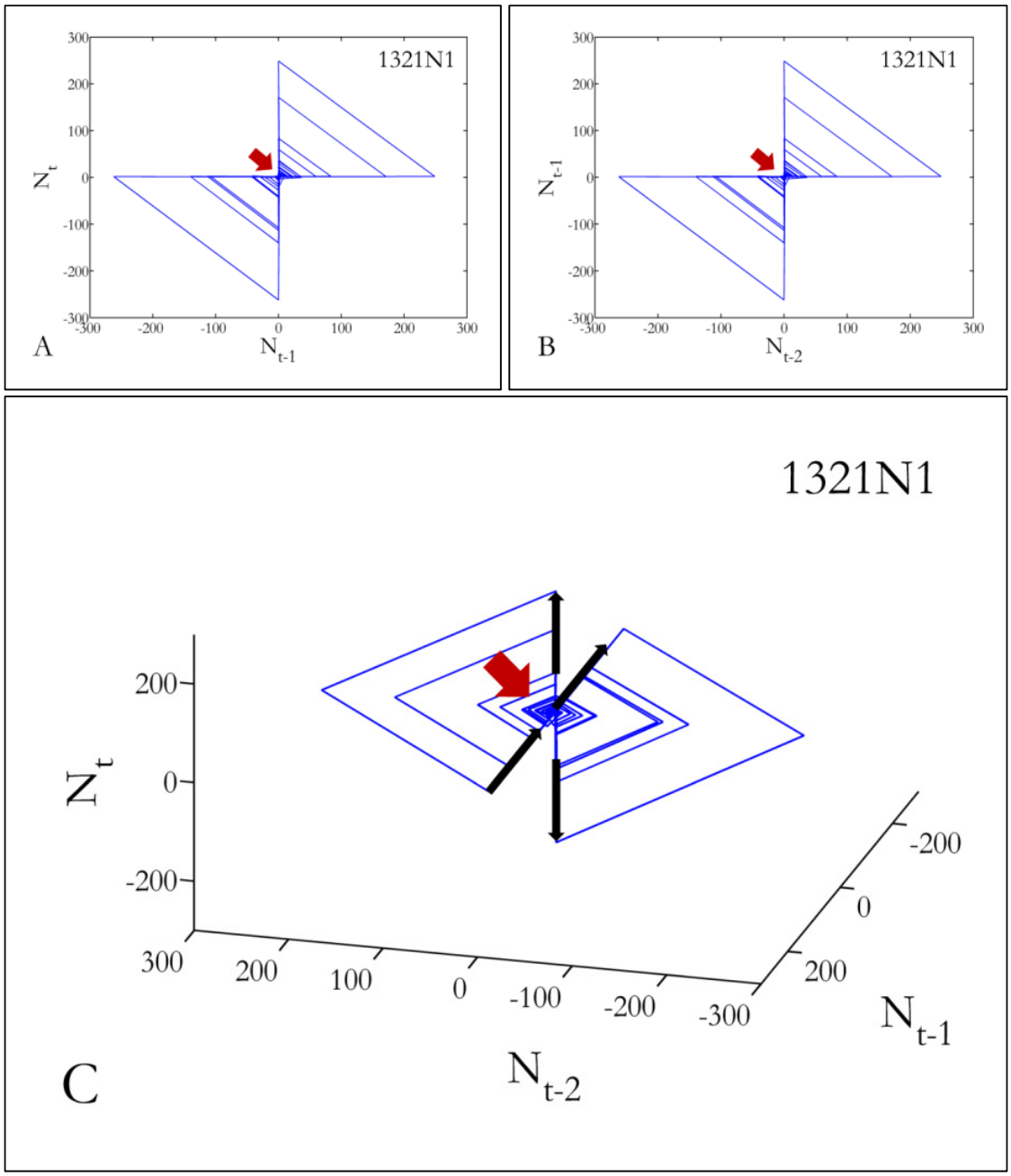


Εικόνα 131. Μετασχηματισμοί Fourier των χρονοσειρών για κάθε αρχικό πληθυσμό κυττάρων (άξονας των ***x***).



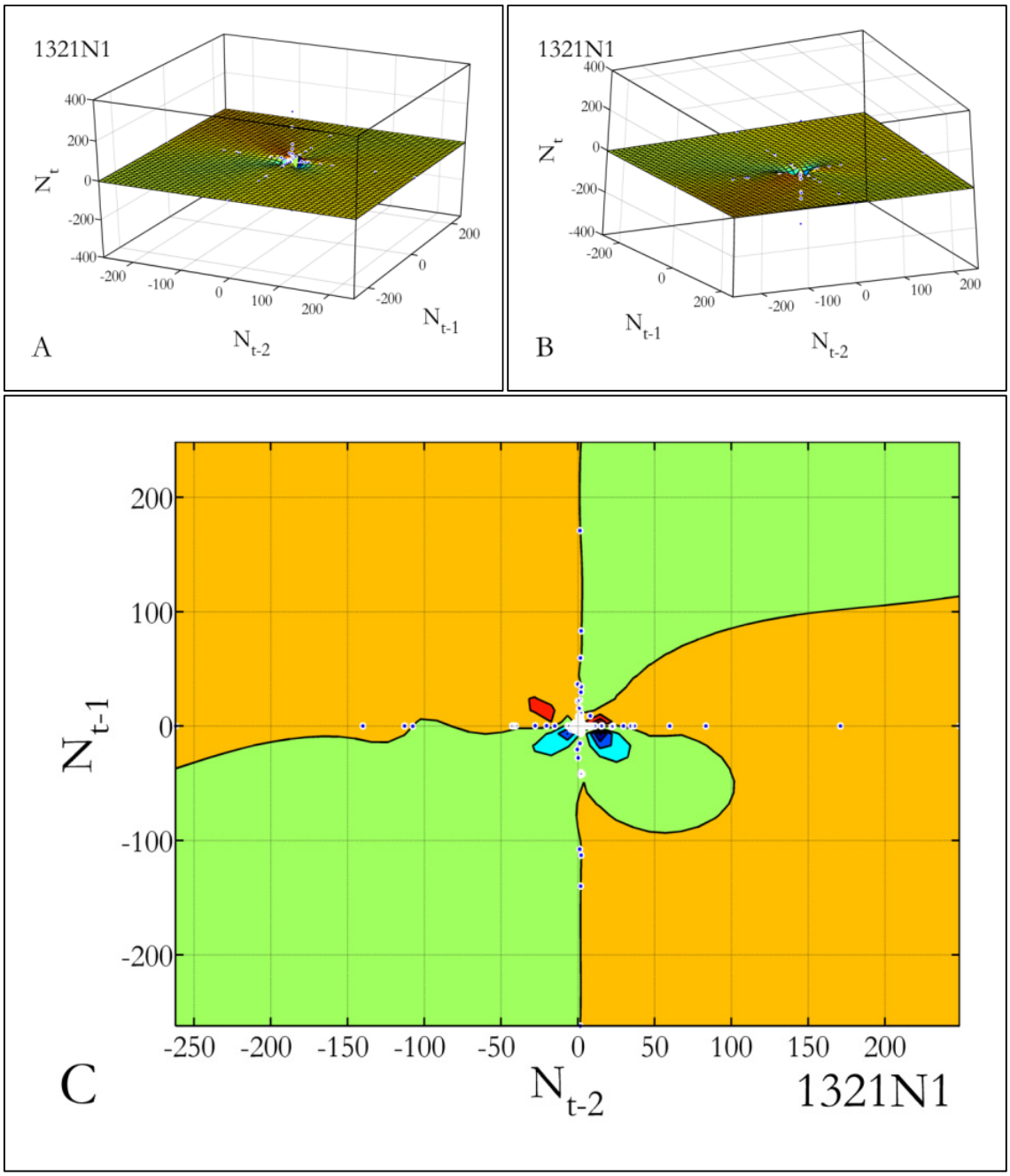
Εικόνα 132. Γράφημα του μετασχηματισμού Fourier για όλο το χρονικό φάσμα ανεξαρτήτως αρχικού πληθυσμού και όγκου θρεπτικού υλικού ή χώρου.

Ως εκ τούτου, προκύπτει το ερώτημα πως συμπεριφέρεται ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων όταν τον μετατρέψουμε, για αυτή την κυτταρική σειρά, σε μια χρονοσειρά ανεξάρτητα από τον αρχικό αριθμό και τον όγκο ή χώρο που αυξήθηκαν τα κύτταρα. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στην **Εικόνα 133**, όπου παρατηρούμε, όπως και στην προηγούμενη κυτταρική σειρά, το σχηματισμό ελκυστών, ένα σημείο μη-γραμμικότητας.



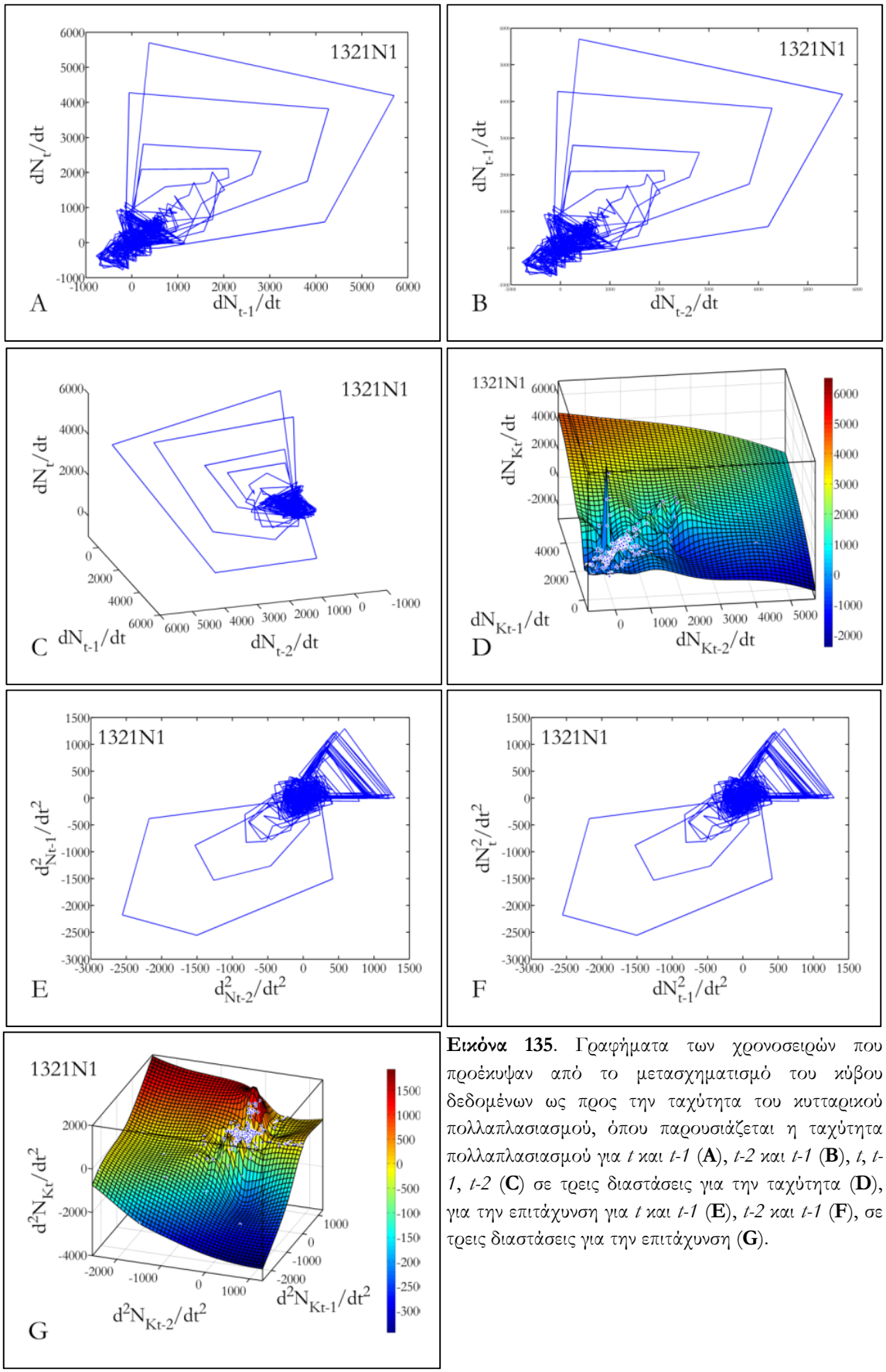
Εικόνα 133. Phase-space γράφημα των παραγόντων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού συναρτήσει του πληθυσμού σε χρόνο *t*, σε χρόνο *t-1* και χρόνο *t-2*. Τα γραφήματα αυτά έδειξαν ότι οι μεταβλητές αυτές παρουσιάζουν σημεία σύγκλισης (sinks, attractors) που είναι ένα σημαντικό εύρημα για την ύπαρξη χάους στο φαινόμενο του πολλαπλασιασμού (σηματοδοτούνται με τα κόκκινα βέλη).

Το διάγραμμα αυτό παρουσιάζεται καλύτερα στην επόμενη εικόνα (**Εικόνα 134**), όπου φαίνονται πολύ ωραία και τα σημεία ημι-συμμετρίας.



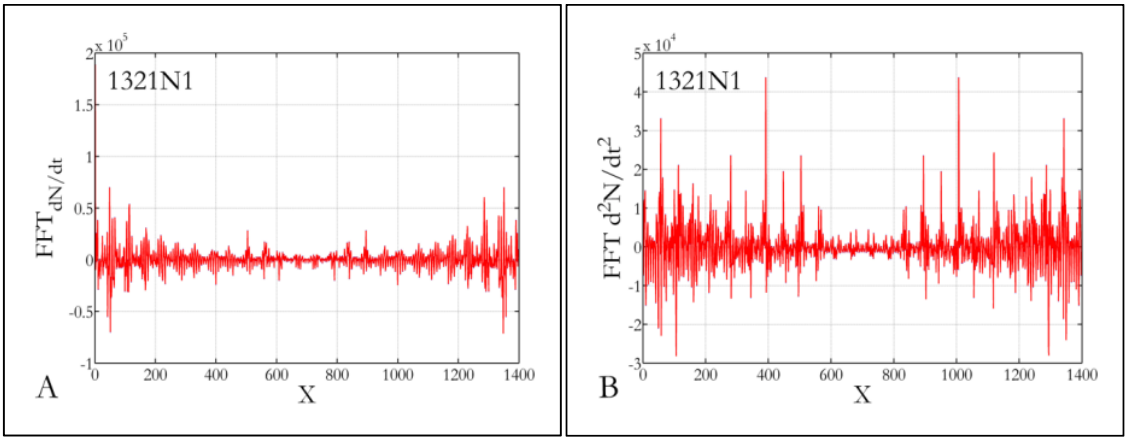
Εικόνα 134. Διαγραμματική αναπαράσταση σε τρεις διαστάσεις με τη μορφή επιφάνειας από δύο οπτικές γωνίες: από πάνω (**A**) και από κάτω (**B**), μαζί με το γράφημα *θερμότητας (heat-map)* (**C**).

Η ίδια ανάλυση παρουσιάζεται στην επόμενη εικόνα (**Εικόνα 135**) όπου μελετάμε τις ιδιότητες της ταχύτητας πολλαπλασιασμού.



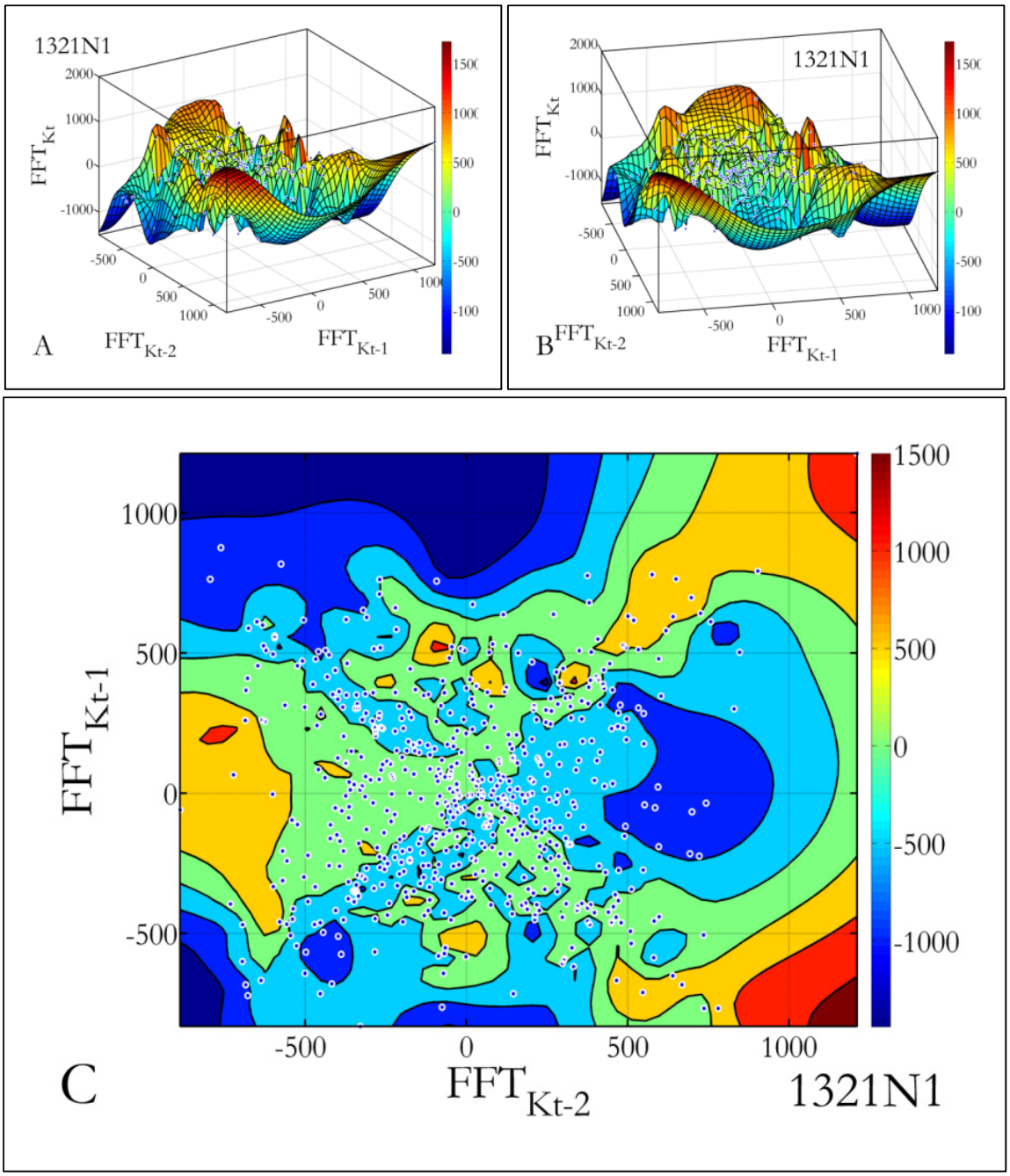
Εικόνα 135. Γραφήματα των χρονοσειρών που προέκυψαν από το μετασχηματισμό του κύβου δεδομένων ως προς την ταχύτητα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπου παρουσιάζεται η ταχύτητα πολλαπλασιασμού για *t* και *t-1* (**A**), *t-2* και *t-1* (**B**), *t*, *t-1*, *t-2* (**C**) σε τρεις διαστάσεις για την ταχύτητα (**D**), για την επιτάχυνση για *t* και *t-1* (**E**), *t-2* και *t-1* (**F**), σε τρεις διαστάσεις για την επιτάχυνση (**G**).

Στην επόμενη εικόνα (**Εικόνα 136**) αναπαριστούμε το μετασχηματισμό Fourier για όλο το φάσμα τόσο της ταχύτητας πολλαπλασιασμού όσο και για την επιτάχυνση. Η εικόνα αυτή είναι αρκετά όμοια αυτής των κυττάρων A172. Παρατηρούμε επίσης ότι τόσο η ταχύτητα όσο και η επιτάχυνση παρουσιάζουν κάτι κοινό. Ταλαντώσεις στην αρχή και το τέλος της συνάρτησης με μεγαλύτερο πλάτος καθώς και στις δύο το πλάτος της συνάρτησης μειώνεται, υποδηλώνοντας την έκρηξη του πολλαπλασιασμού, τον κορεσμό και την επανεκκίνηση του.



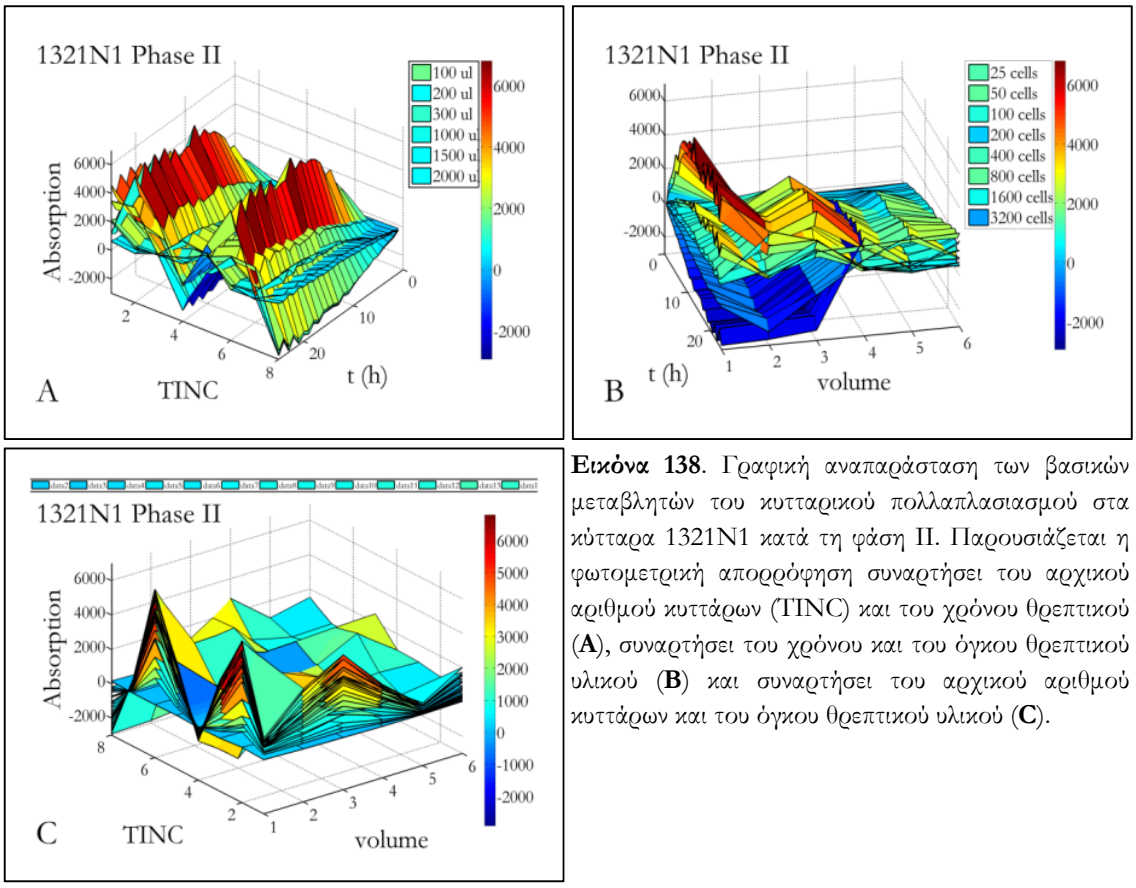
Εικόνα 136. Γράφημα του μετασχηματισμού Fourier, της ταχύτητας πολλαπλασιασμού (**A**) και της επιτάχυνσης (**B**). Παρατηρείται η ίδια ταλαντωτική συμπεριφορά όπως και στην περίπτωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού.

Στο επόμενο διάγραμμα (**Εικόνα 137**)παρουσιάζουμε το μετασχηματισμό για όλο το φάσμα των μετρήσεων σε τρεις διαστάσεις ως προς τη χρονοσειρά σε τρεις χρόνους *t*, *t-1* και *t-2*.



Εικόνα 137. Διαγραμματική αναπαράσταση των μετασχηματισμών Fourier για κάθε χρονοσειρά για χρόνο *t*, *t-1* και *t-2*. Παρουσιάζονται δύο διαφορετικές οπτικές γωνίες της επιφάνειας που σχηματίζεται από τα δεδομένα (**A**, **B**), όπου φαίνεται η ημι-συμμετρικότητα του γραφήματος. Αυτό παρουσιάζεται ακόμα καλύτερα στο γράφημα *θερμότητας* (*Heat-map*) (**C**).

Αφού μελετήσαμε τις μεταβολές του κυτταρικού πολλαπλασιασμού περνάμε στη δεύτερη φάση της πειραματικής διάταξης που αφορούσε στην απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού και πρόσθεση νέου. Στην **Εικόνα 138**, παρουσιάζονται οι βασικές μεταβλητές της νέας πειραματικής διάταξης.

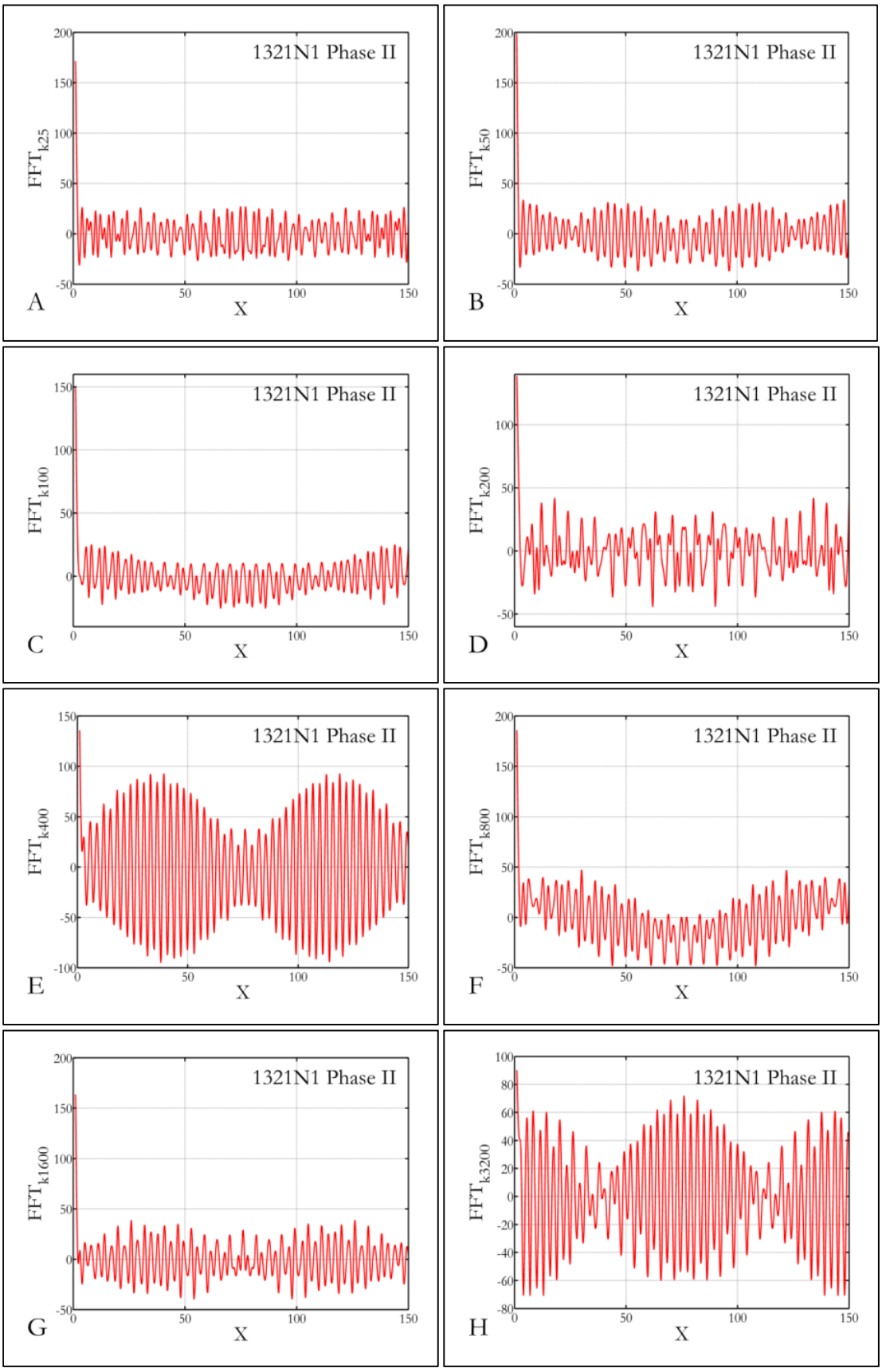


Εικόνα 138. Γραφική αναπαράσταση των βασικών μεταβλητών του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα κύτταρα 1321N1 κατά τη φάση ΙΙ. Παρουσιάζεται η φωτομετρική απορρόφηση συναρτήσει του αρχικού αριθμού κυττάρων (TINC) και του χρόνου θρεπτικού (**A**), συναρτήσει του χρόνου και του όγκου θρεπτικού υλικού (**B**) και συναρτήσει του αρχικού αριθμού κυττάρων και του όγκου θρεπτικού υλικού (**C**).

Στα διαγράμματα αυτά φαίνονται ήδη οι πρώτες επιδράσεις του στρες που προκαλέσαμε. Πρέπει στο σημείο αυτό να θυμίσουμε ότι η παραμονή των κυττάρων στο ίδιο θρεπτικό υλικό για μεγάλο χρονικό διάστημα προκαλεί μια σειρά από στρες στα κύτταρα. Ένα από τα βασικά στρες είναι η έλλειψη τροφής. Ήδη πριν από το τέλος της πειραματικής διάταξης στη φάση Ι, κάποιες κυψέλες (wells) είχαν φτάσει σε κορεσμό και είχε ξεκινήσει ο κυτταρικός θάνατος. Περνώντας στη φάση ΙΙ, όσα κύτταρα είχαν επιβιώσει ήταν αυτά που άντεξαν στο υποβαλλόμενο στρες και πλέον τούτου, ο πολλαπλασιασμός τους αναμενόταν να παρουσιάζει διαφορές. Σε συνέχεια της ανάλυσης στην επόμενη εικόνα (**Εικόνα 139**), παρουσιάζονται οι αναλύσεις Fourier για τους επιμέρους αρχικούς αριθμούς κυττάρων.

Μια πρώτη πολύ ενδιαφέρουσα παρατήρηση που μπορούμε να κάνουμε είναι η απώλεια της δεύτερης περιόδου στη σχηματιζόμενη συνάρτηση. Σε όλους τους αρχικούς αριθμούς με εξαίρεση τα 800 κύτταρα, όπου βλέπουμε μια αμυδρή δεύτερη περίοδο, παρατηρείται μια συνάρτηση. Το φαινόμενο αυτό δείχνει ότι η ύπαρξη δύο συναρτήσεων, ήτοι περιόδων, μέσα στις χρονοσειρές που

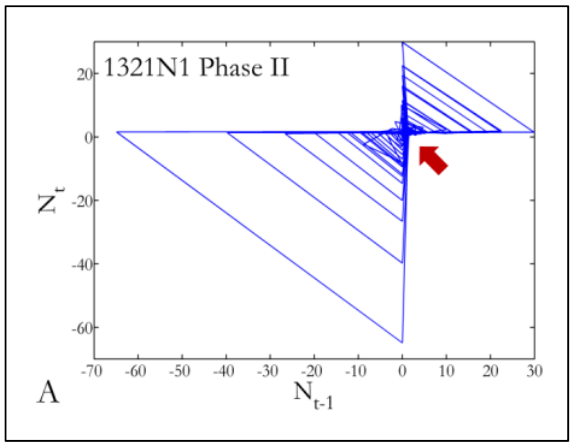
είδαμε στην Φάση Ι των κυττάρων 1321N1, δεν ήταν τυχαίο και μάλιστα είχε βιολογική σημασία. Στη Φάση ΙΙ φαίνεται ότι τα κύτταρα χάνουν μια ιδιότητα στον τρόπο που πολλαπλασιάζονται.

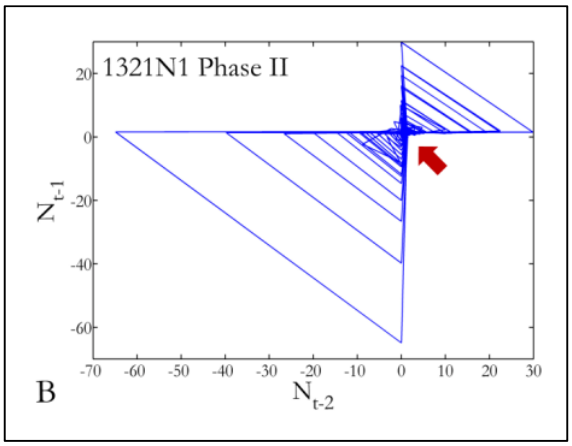


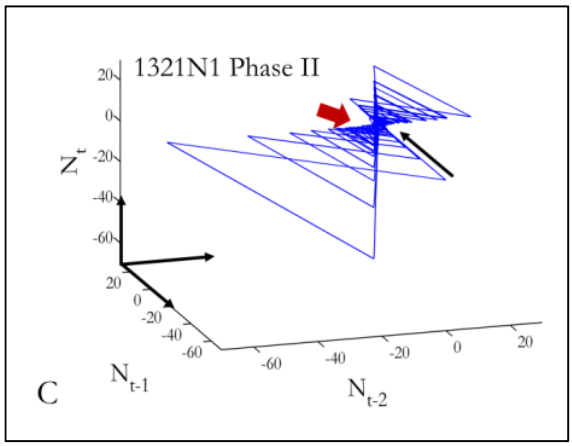
Εικόνα 139. Μετασχηματισμοί Fourier των χρονοσειρών για κάθε αρχικό πληθυσμό κυττάρων (άξονας των *x*) στα κύτταρα 1321N1 Φάση II.

Παρόμοιες αλλαγές παρατηρούμε όταν εξετάζουμε το διάγραμμα αναπαράστασης των τριών μεταβλητών του ρυθμού πολλαπλασιασμού με τη μορφή μετασχηματιζόμενων χρονοσειρών. Παρατηρείται μια μετατόπιση του ελκυστή που εμφανιζόταν και στην πειραματική διάταξη κατά τη Φάση Ι. Επίσης σημαντική αλλαγή παρατηρείται στην ημι-συμμετρία που φαίνεται πολύ ωραία στο τρισδιάστατο γράφημα. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στην **Εικόνα 140**.

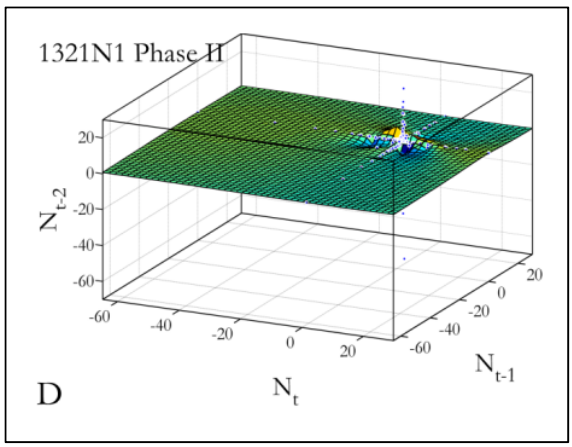
Αντίστοιχα γραφήματα έγιναν για την ταχύτητα του πολλαπλασιασμού και την επιτάχυνση κατά τη Φάση ΙΙ του πειράματος στα κύτταρα 1321N1. Το αποτέλεσμα αυτό παρουσιάζεται στην **Εικόνα 141**.

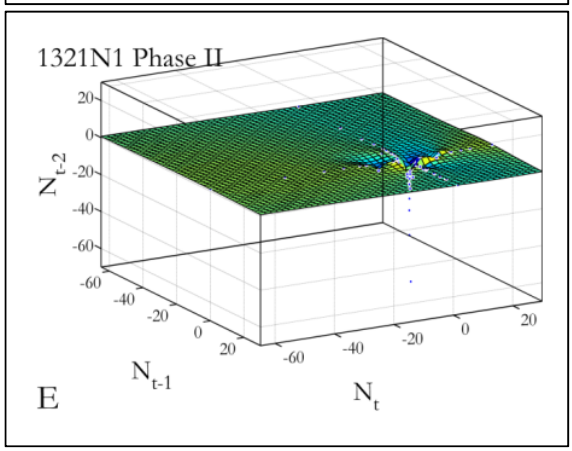


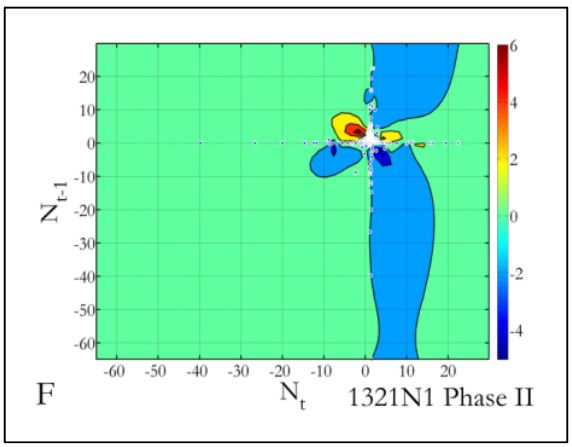


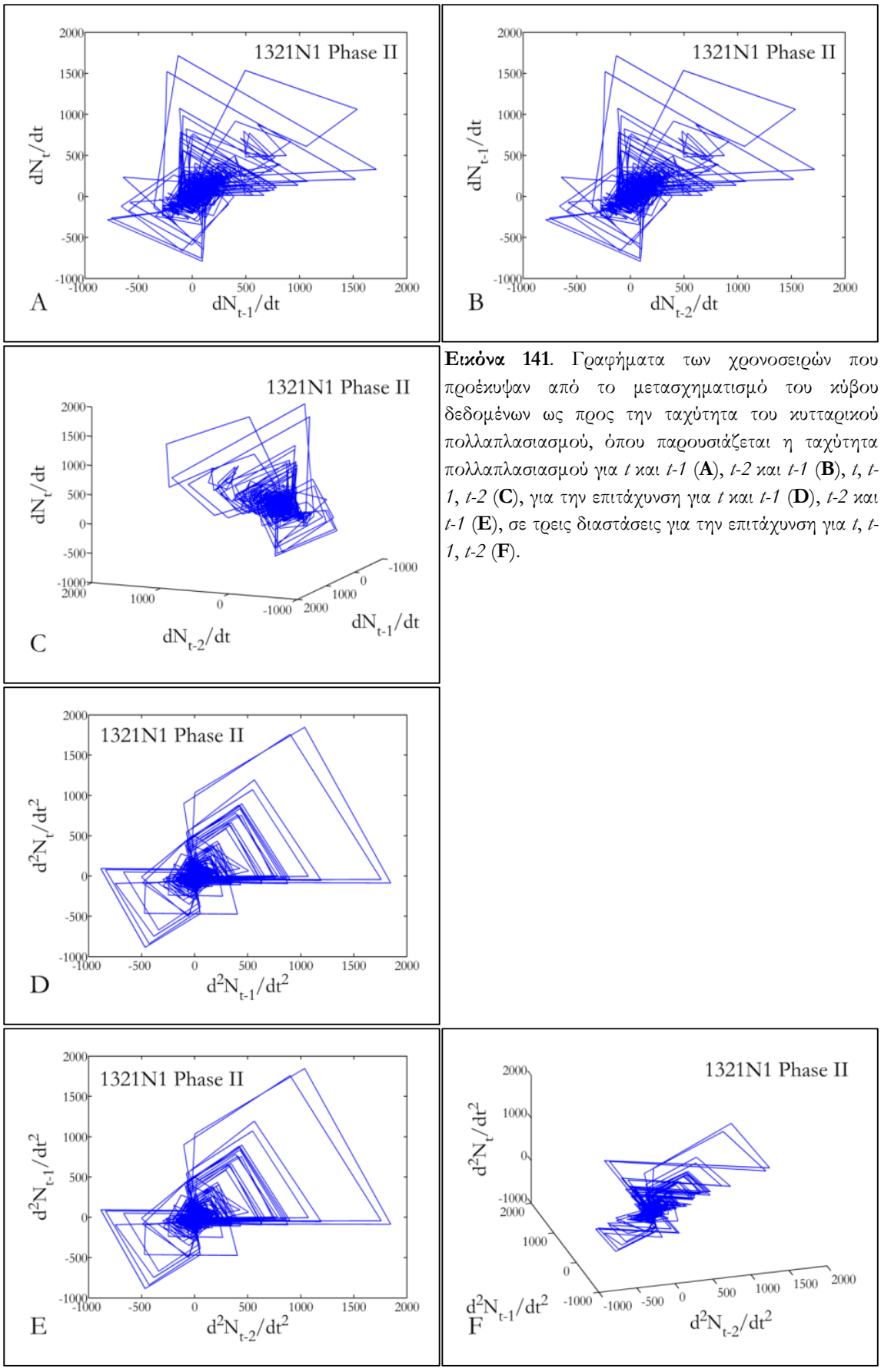


Εικόνα 140. Phase-space γράφημα των παραγόντων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού συναρτήσει του πληθυσμού σε χρόνο *t*, σε χρόνο *t-1* και χρόνο *t-2*. Τα γραφήματα αυτά έδειξαν ότι οι μεταβλητές αυτές παρουσιάζουν σημεία σύγκλισης (sinks, attractors) που είναι ένα σημαντικό εύρημα για την ύπαρξη χάους στο φαινόμενο του πολλαπλασιασμού (σηματοδοτούνται με τα κόκκινα βέλη). Επίσης φαίνεται πολύ καθαρά η μετατόπιση του ελκυστή σε σχέση με τα κύτταρα στη Φάση Ι του πειράματος (**A**-**C**). Αντίστοιχα αυτό φαίνεται πολύ ωραία στη διαγραμματική αναπαράσταση σε τρεις διαστάσεις με τη μορφή επιφάνειας από δύο οπτικές γωνίες: από πάνω (**D**) και από κάτω (**E**), μαζί με το γράφημα *θερμότητας (heat-map)* (**F**). Φαίνεται η μετατόπιση της ημι-συμμετρίας σε σχέση με τα ίδια κύτταρα στη Φάση Ι.



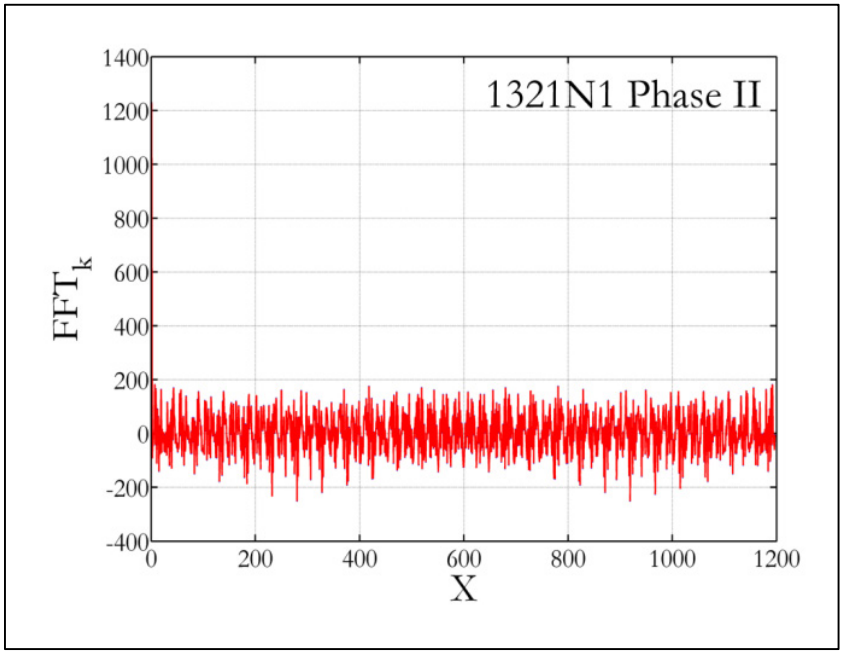






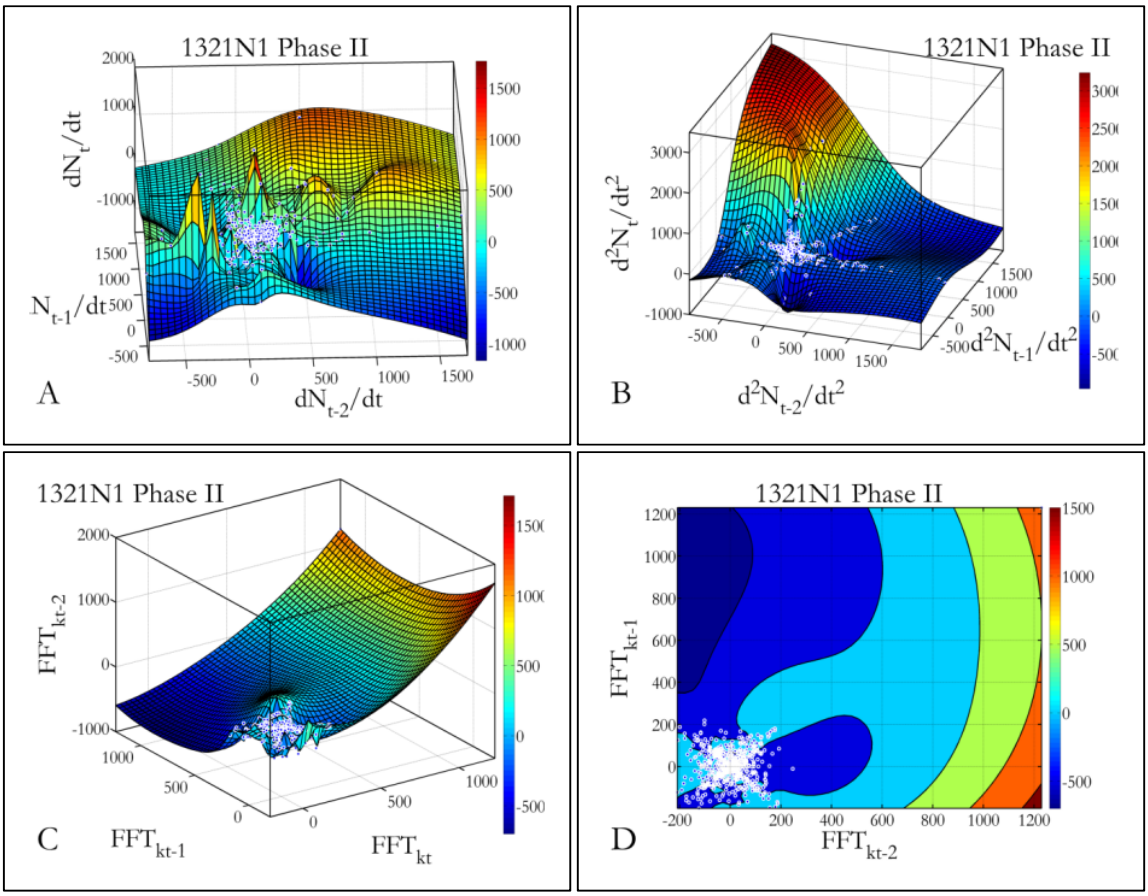
Εικόνα 141. Γραφήματα των χρονοσειρών που προέκυψαν από το μετασχηματισμό του κύβου δεδομένων ως προς την ταχύτητα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπου παρουσιάζεται η ταχύτητα πολλαπλασιασμού για *t* και *t-1* (**A**), *t-2* και *t-1* (**B**), *t*, *t-1*, *t-2* (**C**), για την επιτάχυνση για *t* και *t-1* (**D**), *t-2* και *t-1* (**E**), σε τρεις διαστάσεις για την επιτάχυνση για *t*, *t-1*, *t-2* (**F**).

Παρόμοια ανάλυση με μετασχηματισμό Fourier, έδωσε μια κυματομορφή η οποία σε σύγκριση με τις προηγούμενες αναλύσεις αποτελείτο από μια περίοδο. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στην **Εικόνα 142**. Αν συγκρίνουμε τις δύο συναρτήσεις από τη φάση I και τη φάση II της πειραματικής διάταξης βλέπουμε την αλλαγή στην κυματομορφή. Η αλλαγή αυτή δείχνει ότι στη δεύτερη φάση τα κύτταρα χάνουν μια ιδιότητα πολλαπλασιασμού.



Εικόνα 142. Γράφημα του μετασχηματισμού Fourier για όλο το χρονικό φάσμα ανεξαρτήτως αρχικού πληθυσμού και όγκου θρεπτικού υλικού ή χώρου στα κύτταρα 1321N1 στη Φάση II της πειραματικής διάταξης.

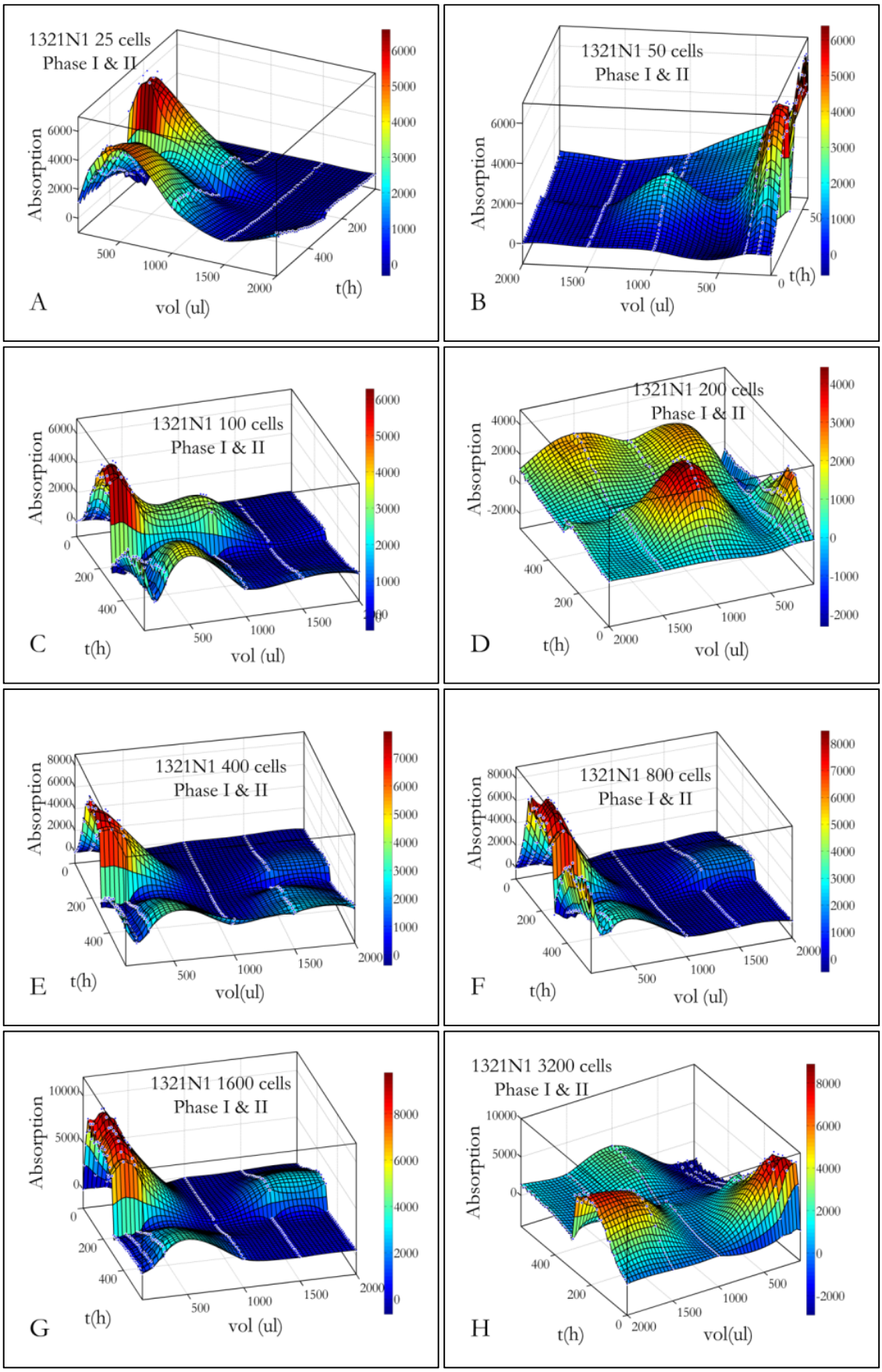
Επίσης στην **Εικόνα 143**, παρουσιάζονται τρισδιάστατες αναπαραστάσεις της ταχύτητας πολλαπλασιασμού και της επιτάχυνσης των χρονοσειρών που χρησιμοποιήθηκαν για τους μετασχηματισμούς Fourier, συναρτήσει των χρόνων *t*, *t-1* και *t-2*.



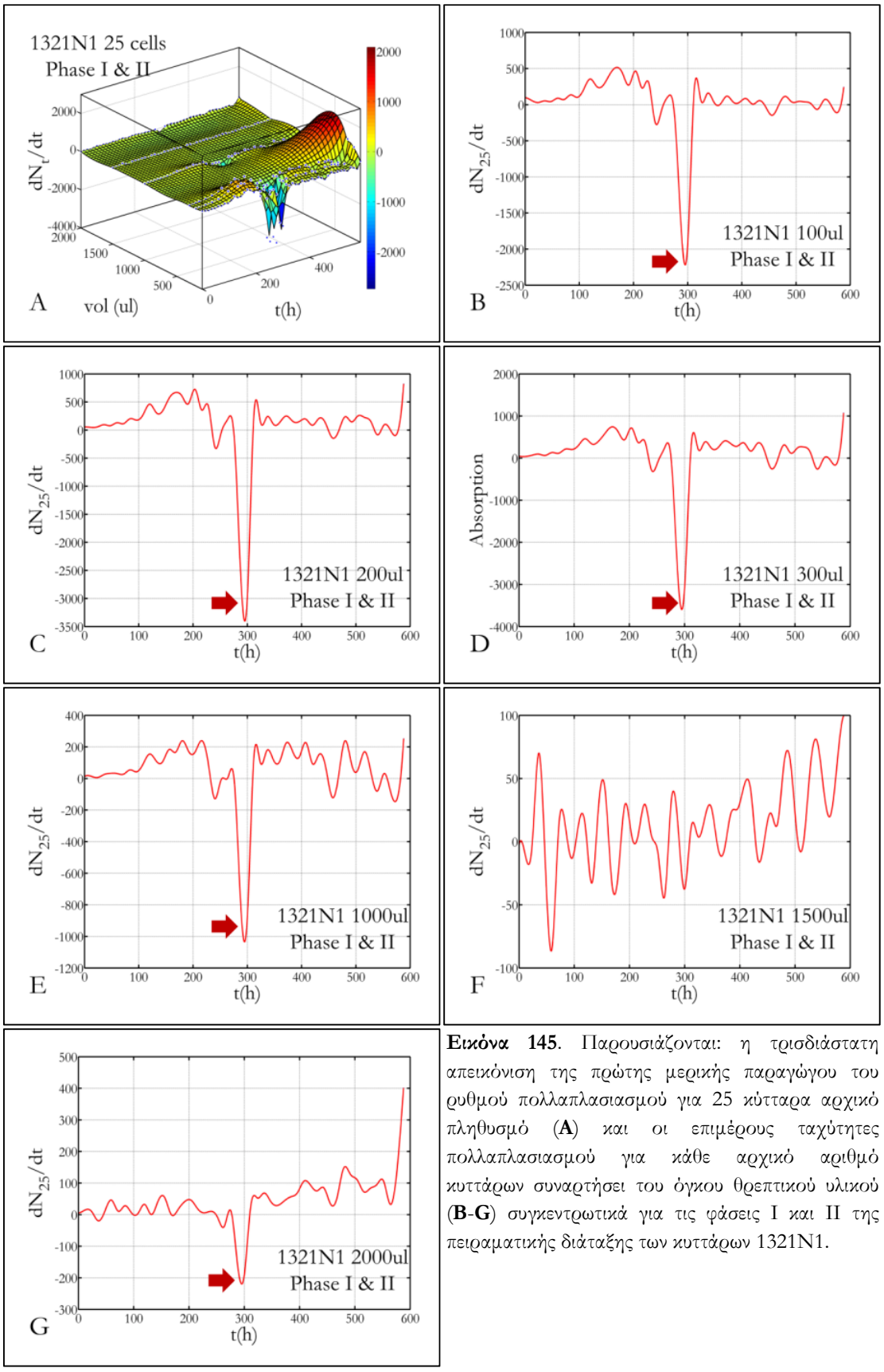
Εικόνα 143. Τρισδιάστατες αναπαραστάσεις της μετασχηματισμένης χρονοσειράς όσον αφορά την ταχύτητα πολλαπλασιασμού (**A**), την επιτάχυνση (**B**), των μετασχηματισμένων σειρών με Fourier (**C**) και διάγραμμα *θερμότητας* (heat-map) των χρονοσειρών Fourier (**D**).

Ως φυσική συνέπεια των αναλύσεων μας είναι η εξέταση των δύο φάσεων της πειραματικής διάταξης για τα κύτταρα 1321N1 σε συνδυασμό. Η σύγκριση δηλαδή των παραγόντων που είδαμε μέχρι τώρα για κάθε φάση μεμονωμένα.

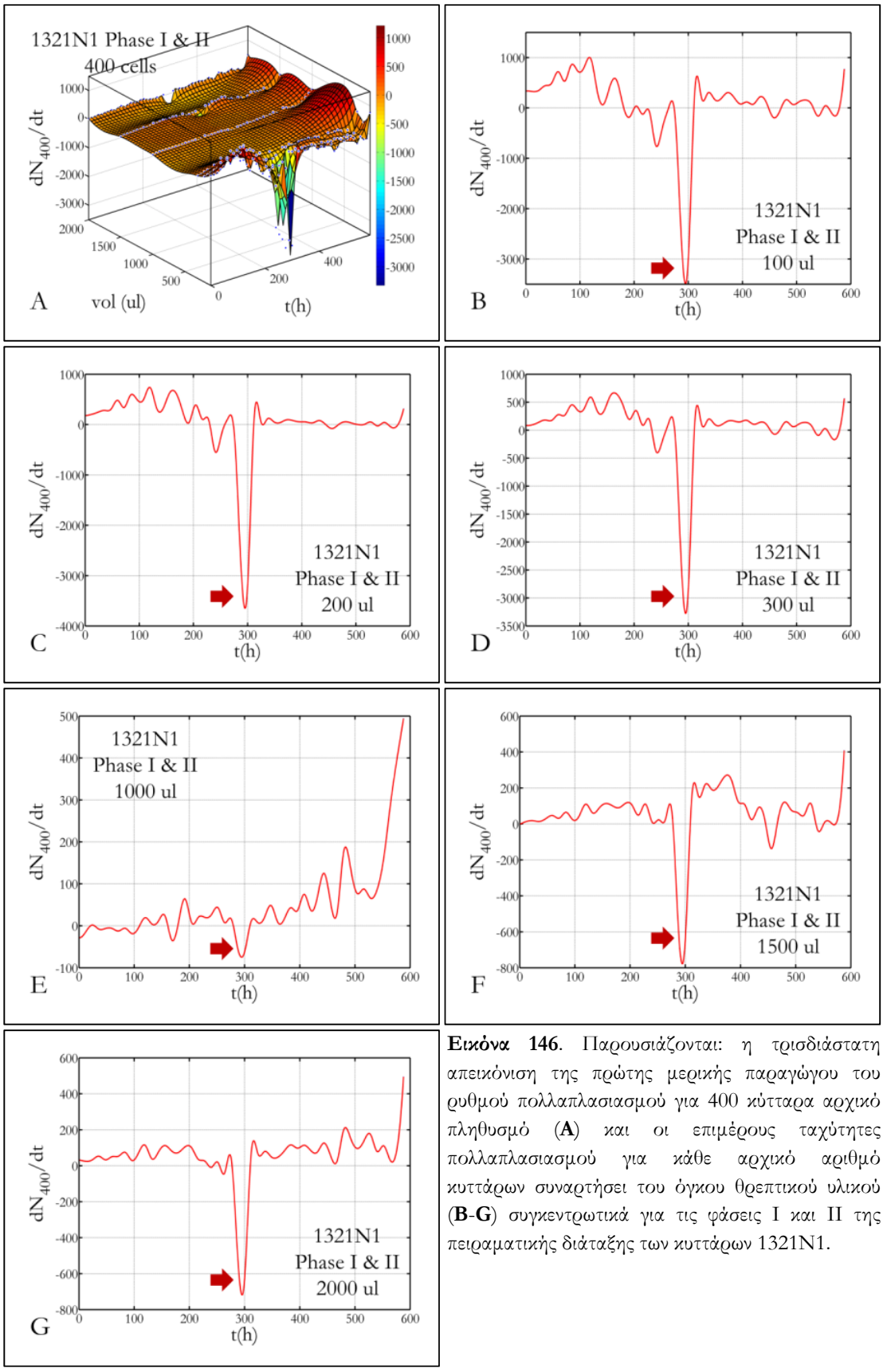
Στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 144**), παρουσιάζονται τα τρισδιάστατα γραφήματα των βασικών μεταβλητών συναρτήσει του αρχικού αριθμού κυττάρων. Στις επόμενες εικόνες (**Εικόνα 145**-**Εικόνα 147**) παρουσιάζεται ο ρυθμός πολλαπλασιασμού για αρχικούς αριθμούς κυττάρων 25, 400 και 3000 κύτταρα συναρτήσει του όγκου θρεπτικού. Ενδιαφέρον έχει η ταυτοποίηση, της αλλαγής φάσης. Με βέλος σηματοδοτείται η μετάβαση από τη μια φάση στην άλλη.



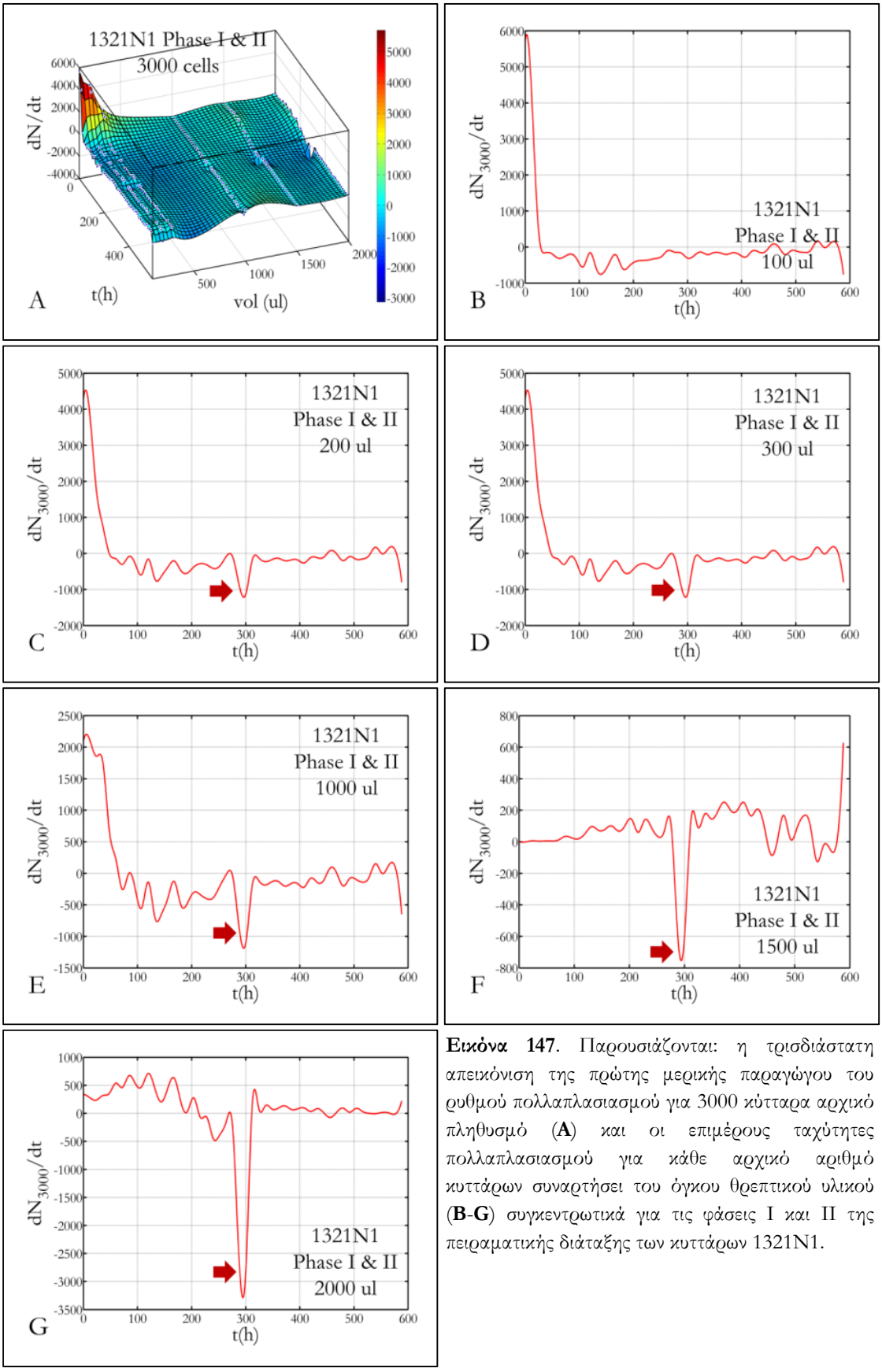
Εικόνα 144. Τρισδιάστατες αναπαραστάσεις των βασικών μεταβλητών για τη Φάση I & II.



Εικόνα 145. Παρουσιάζονται: η τρισδιάστατη απεικόνιση της πρώτης μερικής παραγώγου του ρυθμού πολλαπλασιασμού για 25 κύτταρα αρχικό πληθυσμό (**A**) και οι επιμέρους ταχύτητες πολλαπλασιασμού για κάθε αρχικό αριθμό κυττάρων συναρτήσει του όγκου θρεπτικού υλικού (**B**-**G**) συγκεντρωτικά για τις φάσεις I και II της πειραματικής διάταξης των κυττάρων 1321N1.



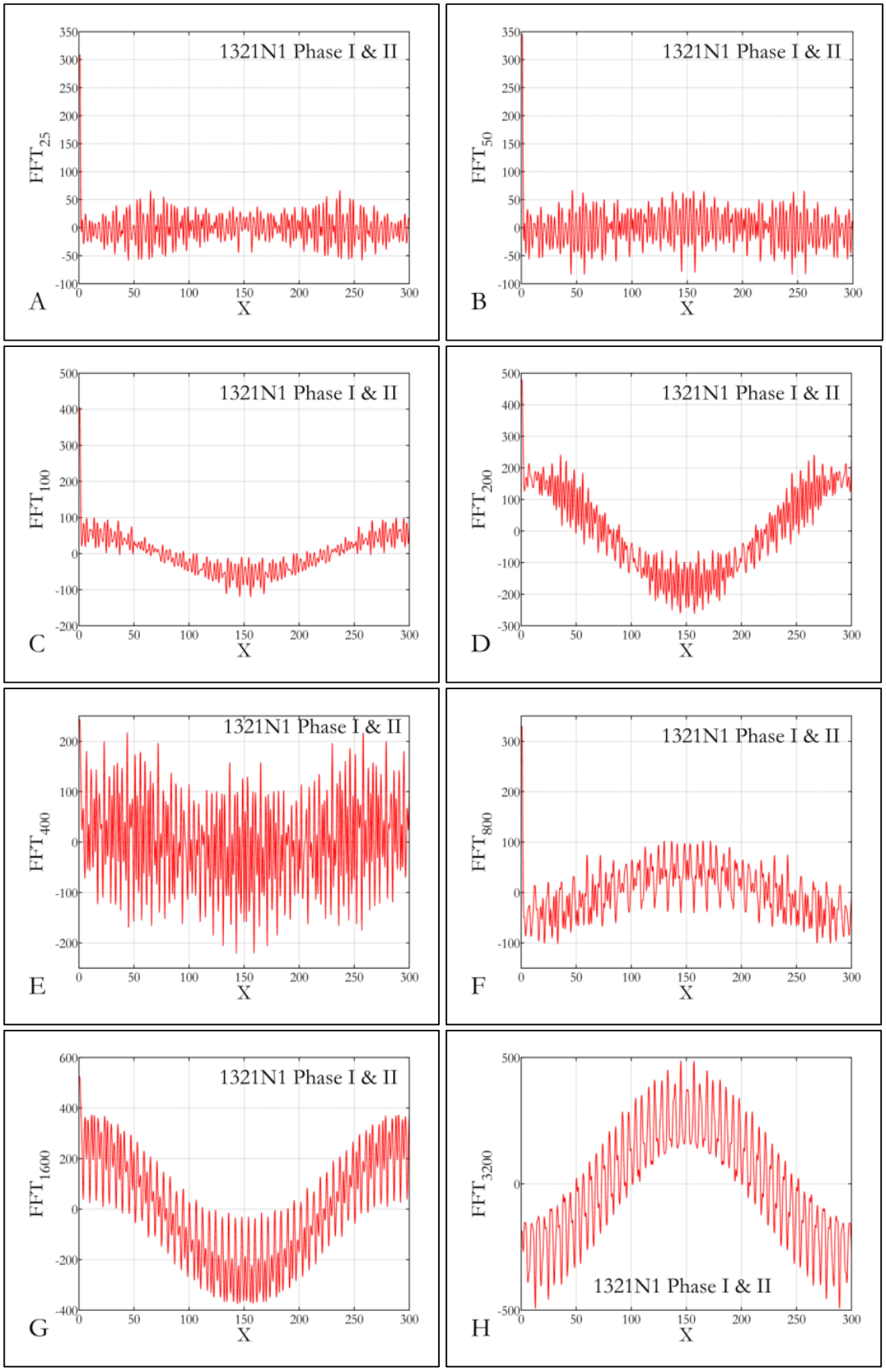
Εικόνα 146. Παρουσιάζονται: η τρισδιάστατη απεικόνιση της πρώτης μερικής παραγώγου του ρυθμού πολλαπλασιασμού για 400 κύτταρα αρχικό πληθυσμό (**A**) και οι επιμέρους ταχύτητες πολλαπλασιασμού για κάθε αρχικό αριθμό κυττάρων συναρτήσει του όγκου θρεπτικού υλικού (**B**-**G**) συγκεντρωτικά για τις φάσεις I και II της πειραματικής διάταξης των κυττάρων 1321N1.



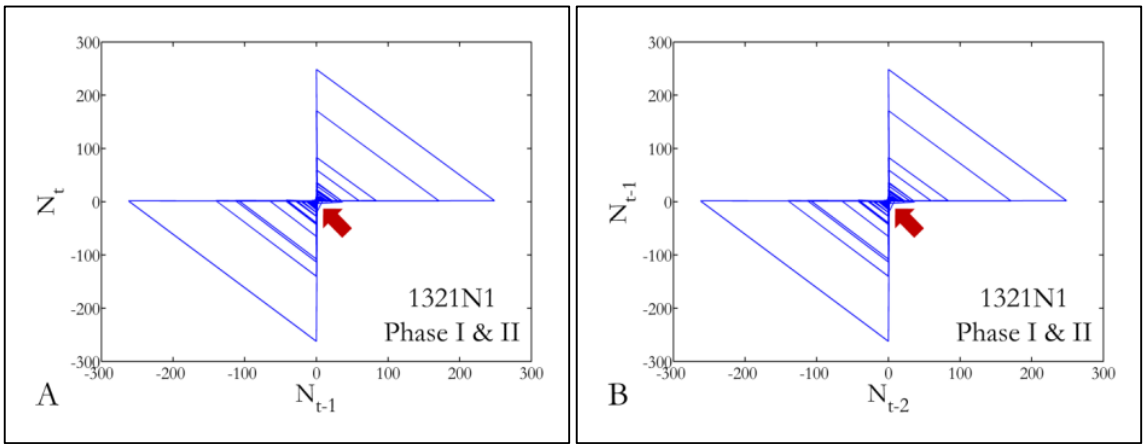
Εικόνα 147. Παρουσιάζονται: η τρισδιάστατη απεικόνιση της πρώτης μερικής παραγώγου του ρυθμού πολλαπλασιασμού για 3000 κύτταρα αρχικό πληθυσμό (**A**) και οι επιμέρους ταχύτητες πολλαπλασιασμού για κάθε αρχικό αριθμό κυττάρων συναρτήσει του όγκου θρεπτικού υλικού (**B**-**G**) συγκεντρωτικά για τις φάσεις I και II της πειραματικής διάταξης των κυττάρων 1321N1.

Στην **Εικόνα 148**, παρουσιάζονται οι μετασχητισμοί Fourier, για τη σύζευξη των δύο φάσεων της πειραματικής διάταξης των κυττάρων 1321N1. Έχει ενδιαφέρον το ότι ο μετασχηματισμός δείχνει τη μετάβαση από τη μια φάση στην άλλη, αν παρατηρήσουμε ακριβώς στο μέσο των μετρήσεων (σημείο 150 στον άξονα των ***X***) την αλλαγή της συνάρτησης της ταλάντωσης.

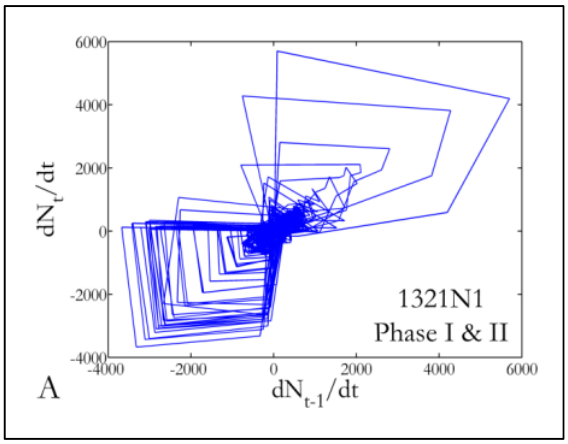
Παρόμοια αλλαγή παρατηρούμε στη συμμετρία του διαγράμματος των χρονοσειρών συναρτήσει του χρόνου *t-2*, *t-1* και *t* (**Εικόνα 149**) αλλά και της ταχύτητας πολλαπλασιασμού (**Εικόνα 150**).

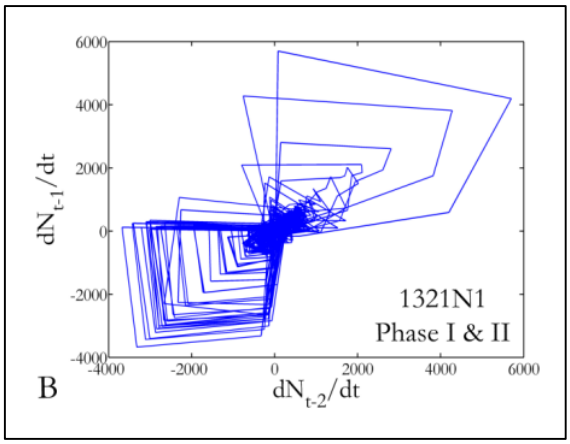


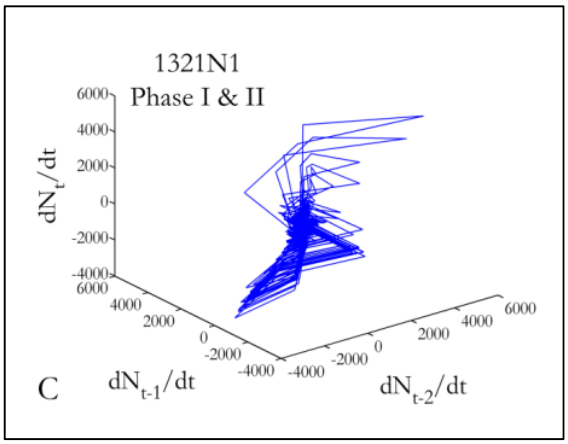
Εικόνα 148. Μετασχηματισμοί Fourier των χρονοσειρών για κάθε αρχικό πληθυσμό κυττάρων (άξονας των *x*) στα κύτταρα 1321N1 Φάση I & II.



Εικόνα 149. Γραφήματα των χρονοσειρών που προέκυψαν από το μετασχηματισμό του κύβου δεδομένων ως προς την ταχύτητα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπου παρουσιάζεται η ταχύτητα πολλαπλασιασμού για *t* και *t-1* (**A**), *t-2* και *t-1* (**B**), *t*, *t-1*, *t-2* (**C**), για την επιτάχυνση για *t* και *t-1* (**D**), *t-2* και *t-1* (**E**), σε τρεις διαστάσεις για την επιτάχυνση για *t*, *t-1*, *t-2* (**F**). Οι αναπαραστάσεις αυτές αφορούν στη ζεύξη των δύο φάσεων (I και II) της πειραματικής διάταξης για τα κύτταρα 1321N1.Ενδιαφέρον έχει η αλλαγή της συμμετρίας σε σχέση με τη φάση II του πειράματος (**A**, **B**).

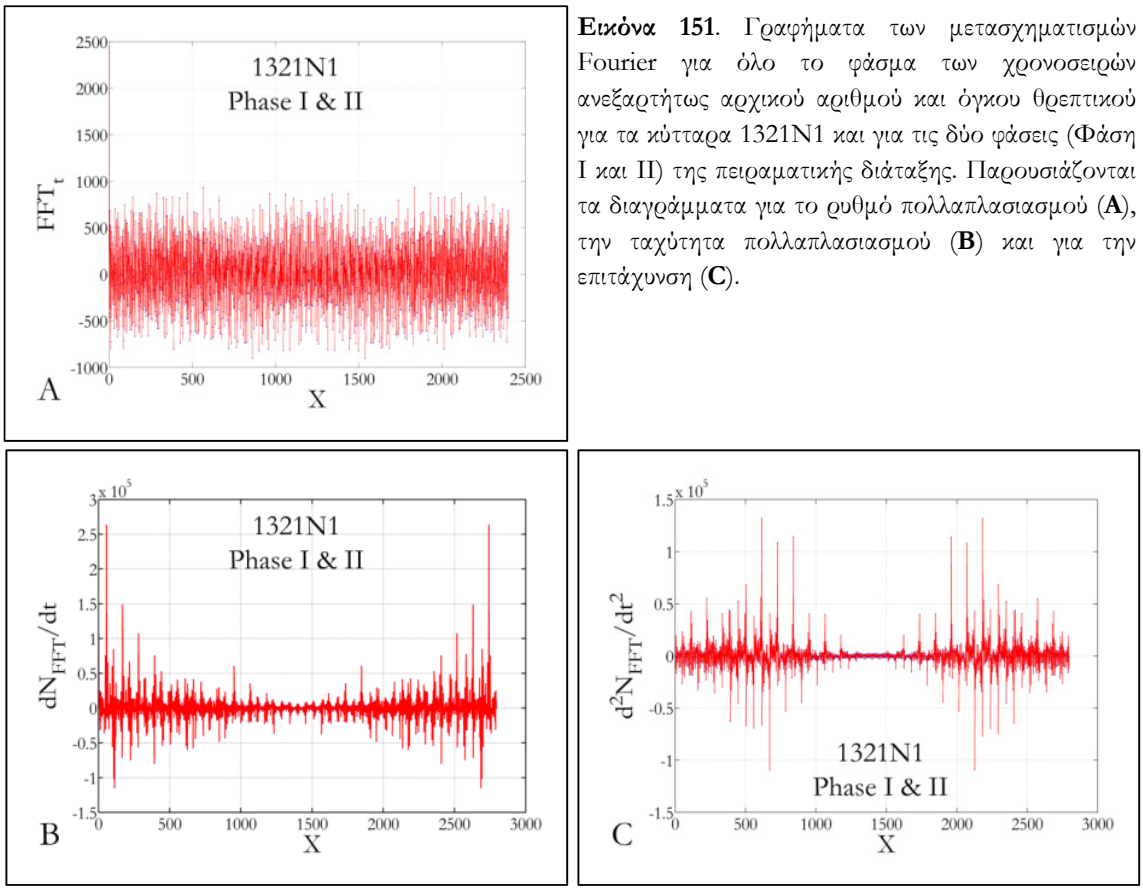






Εικόνα 150. Γραφήματα των χρονοσειρών που προέκυψαν από το μετασχηματισμό του κύβου δεδομένων ως προς την ταχύτητα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπου παρουσιάζεται η ταχύτητα πολλαπλασιασμού για *t* και *t-1* (**A**), *t-2* και *t-1* (**B**), *t*, *t-1*, *t-2* (**C**).

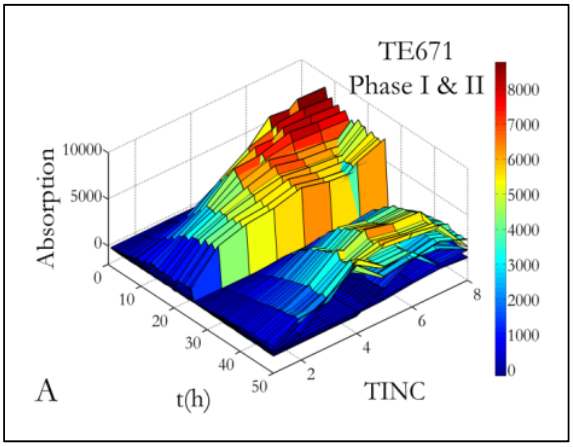
Τέλος, η συνάρτηση που παράγεται από το μετασχηματισμό για όλο το φάσμα της χρονοσειράς παρουσιάζεται στην **Εικόνα 151**.

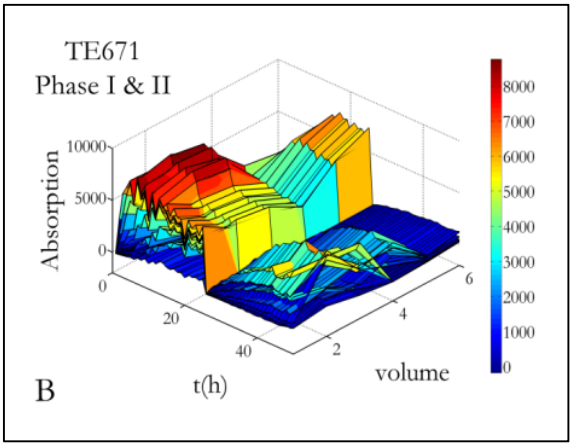


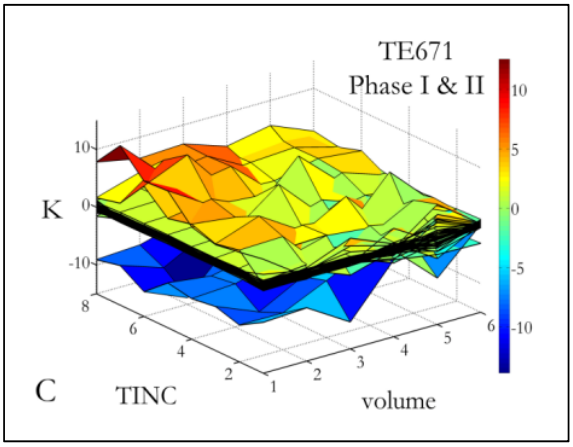
Εικόνα 151. Γραφήματα των μετασχηματισμών Fourier για όλο το φάσμα των χρονοσειρών ανεξαρτήτως αρχικού αριθμού και όγκου θρεπτικού για τα κύτταρα 1321N1 και για τις δύο φάσεις (Φάση I και II) της πειραματικής διάταξης. Παρουσιάζονται τα διαγράμματα για το ρυθμό πολλαπλασιασμού (**A**), την ταχύτητα πολλαπλασιασμού (**B**) και για την επιτάχυνση (**C**).

Μελετήσαμε επίσης τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων TE671. Έχει ενδιαφέρον να θυμίσουμε ότι τα κύτταρα αυτά είναι κύτταρα που ελήφθησαν από βιοψία παρεγκεφαλίδος αλλά στην πορεία περιγράφηκαν ως ραβδομυοσάρκωμα. Οι προηγούμενες δύο σειρές που εξετάσαμε ήταν και οι δύο αμιγώς ταυτοποιημένες ότι ήταν του ΚΝΣ. Η τρίτη σειρά, η TE671, όντας διαφορετικού κυτταρικού τύπου θα είχε ενδιαφέρον να δούμε αν παρατηρούνται αλλαγές στον τρόπο πολλαπλασιασμού.

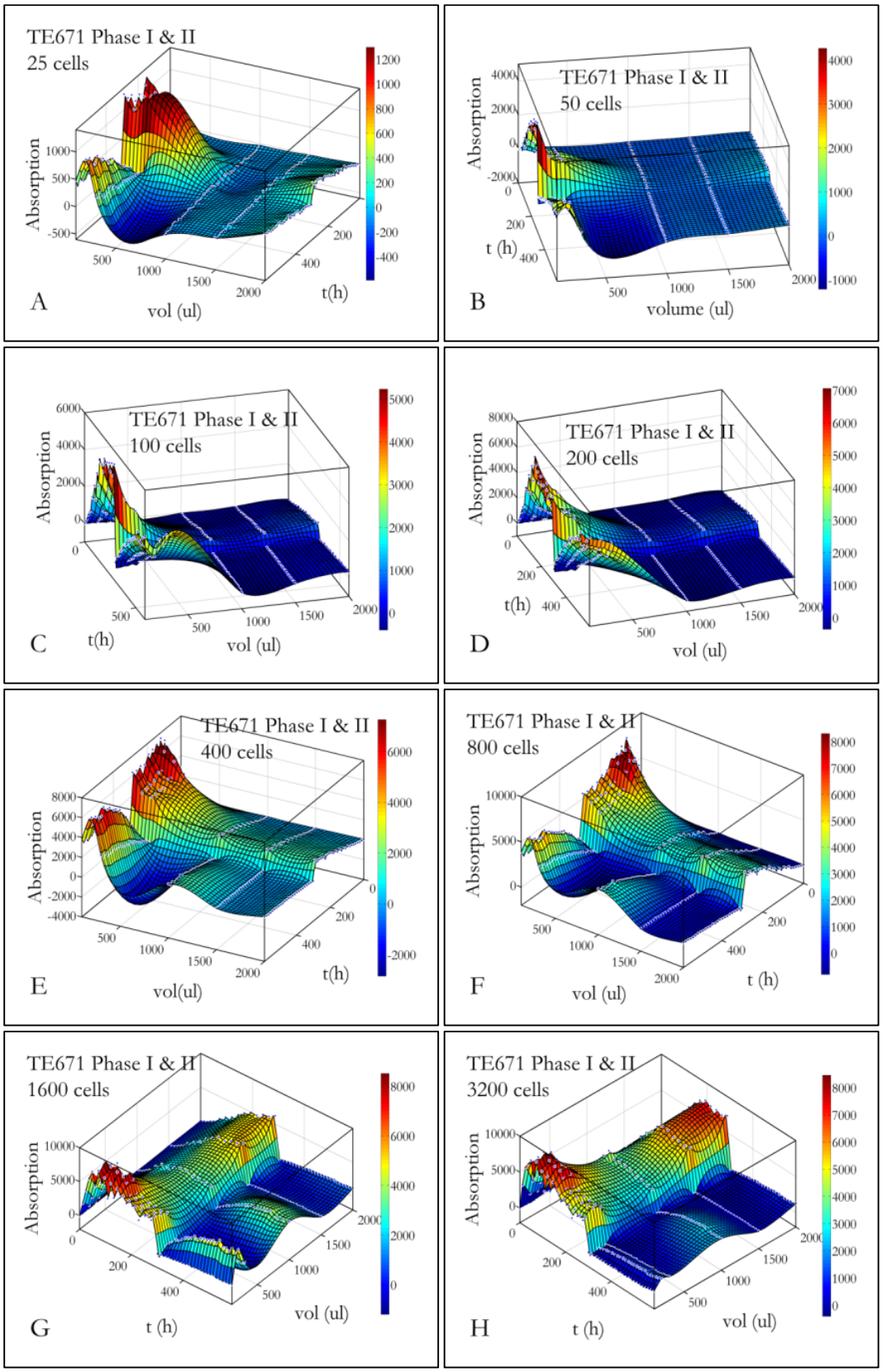
Στην **Εικόνα 152**, παρουσιάζονται οι βασικές παράμετροι των μετρήσεων ως διαγράμματα επιφάνειας. Καθώς επίσης στην **Εικόνα 153**, παρουσιάζονται τα διαγράμματα επιφάνειας για όλους αρχικούς αριθμούς κυττάρων συναρτήσει του χρόνου και του όγκου θρεπτικού υλικού.





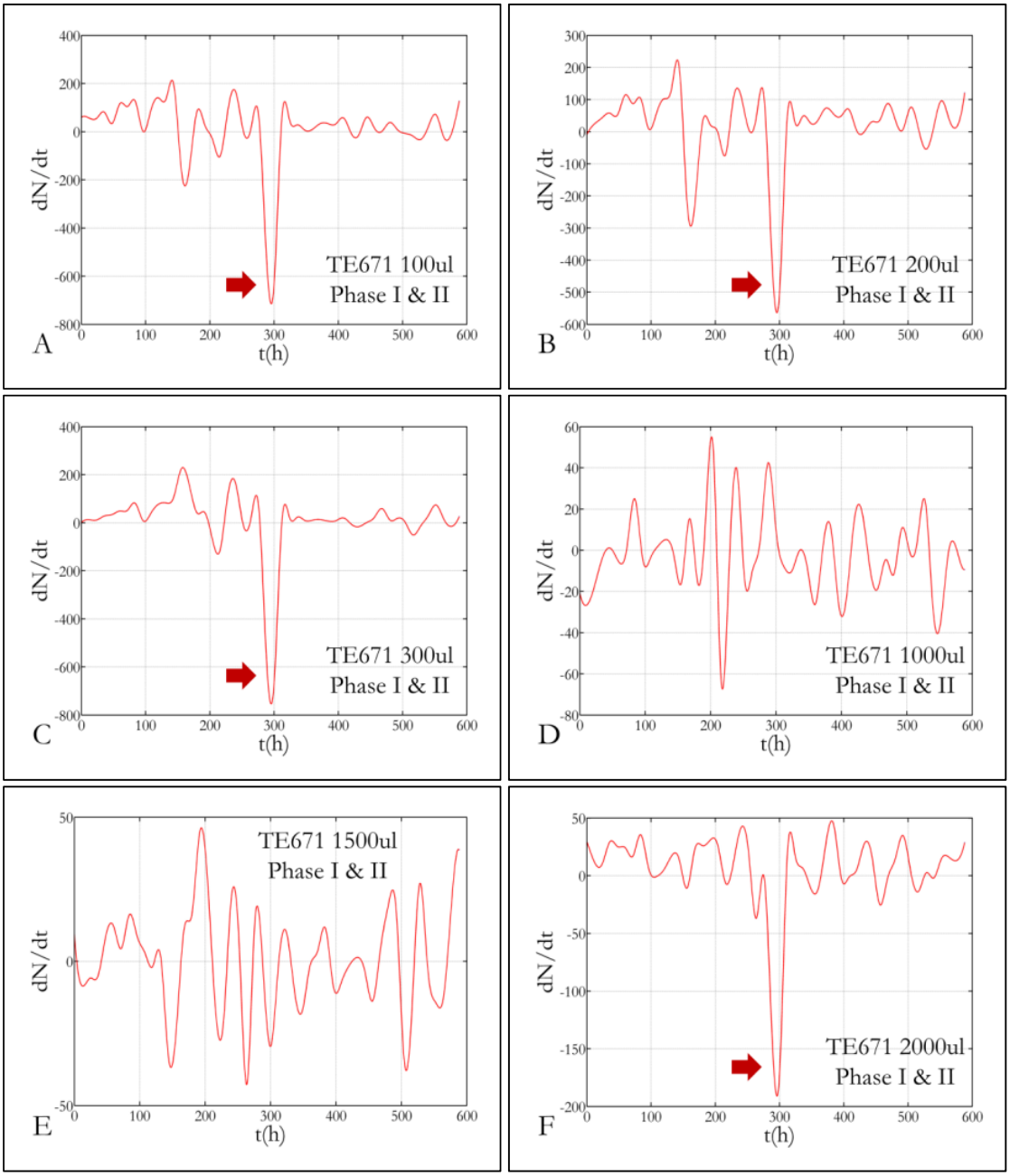


Εικόνα 152. Γραφική αναπαράσταση των βασικών μεταβλητών του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Παρουσιάζεται η φωτομετρική απορρόφηση συναρτήσει του αρχικού αριθμού κυττάρων (TINC) και του χρόνου (**A**), συναρτήσει του χρόνου και του όγκου θρεπτικού υλικού (**B**) και ο ρυθμός πολλαπλασιασμού *k* συναρτήσει του αρχικού αριθμού κυττάρων και του χρόνου (**C**).

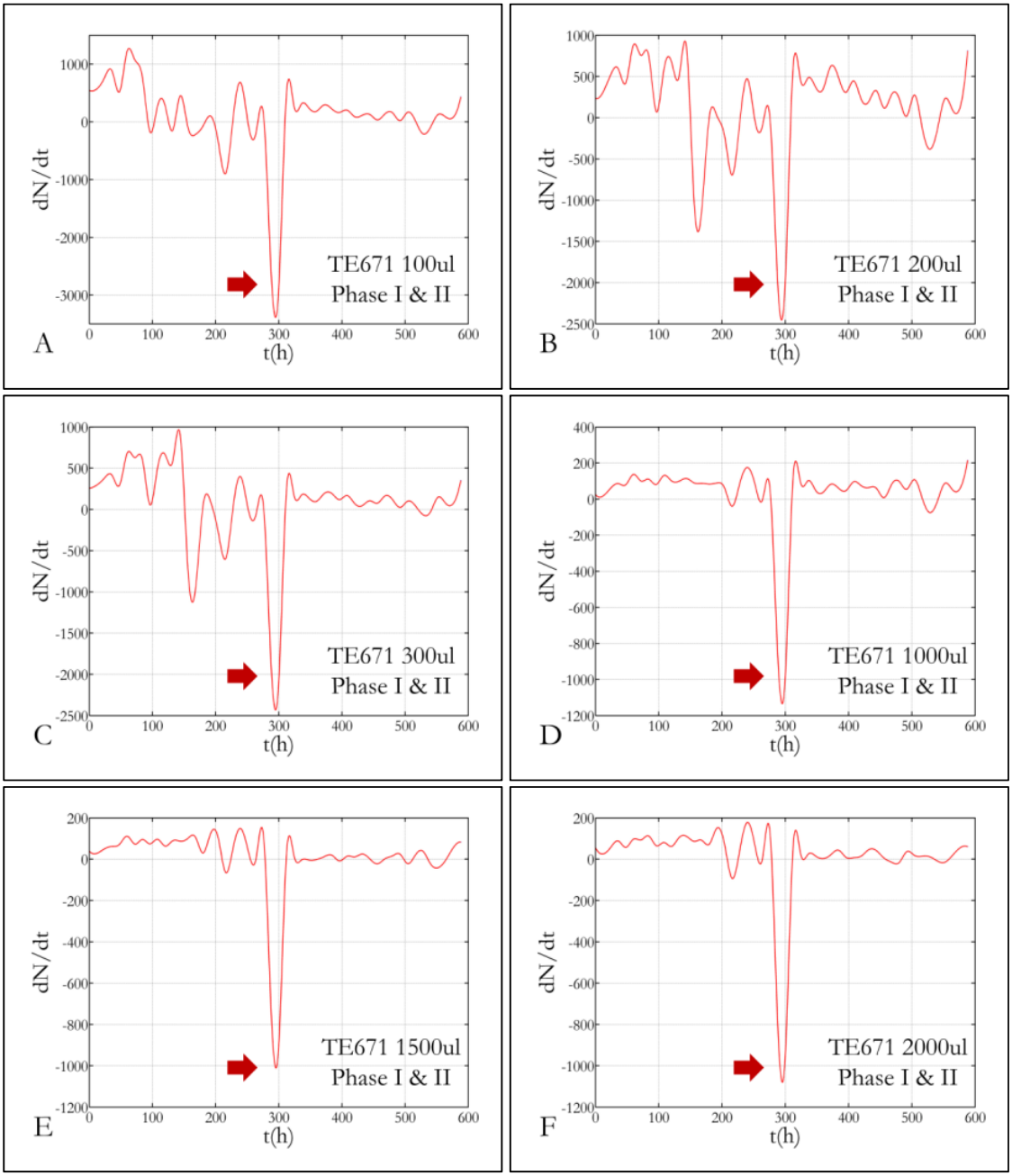


Εικόνα 153. Τρισδιάστατα γραφήματα της φωτομετρικής απορρόφησης συναρτήσει του όγκου θρεπτικού και του χρόνου καλλιέργειας για κάθε αρχικό αριθμό κυττάρων.

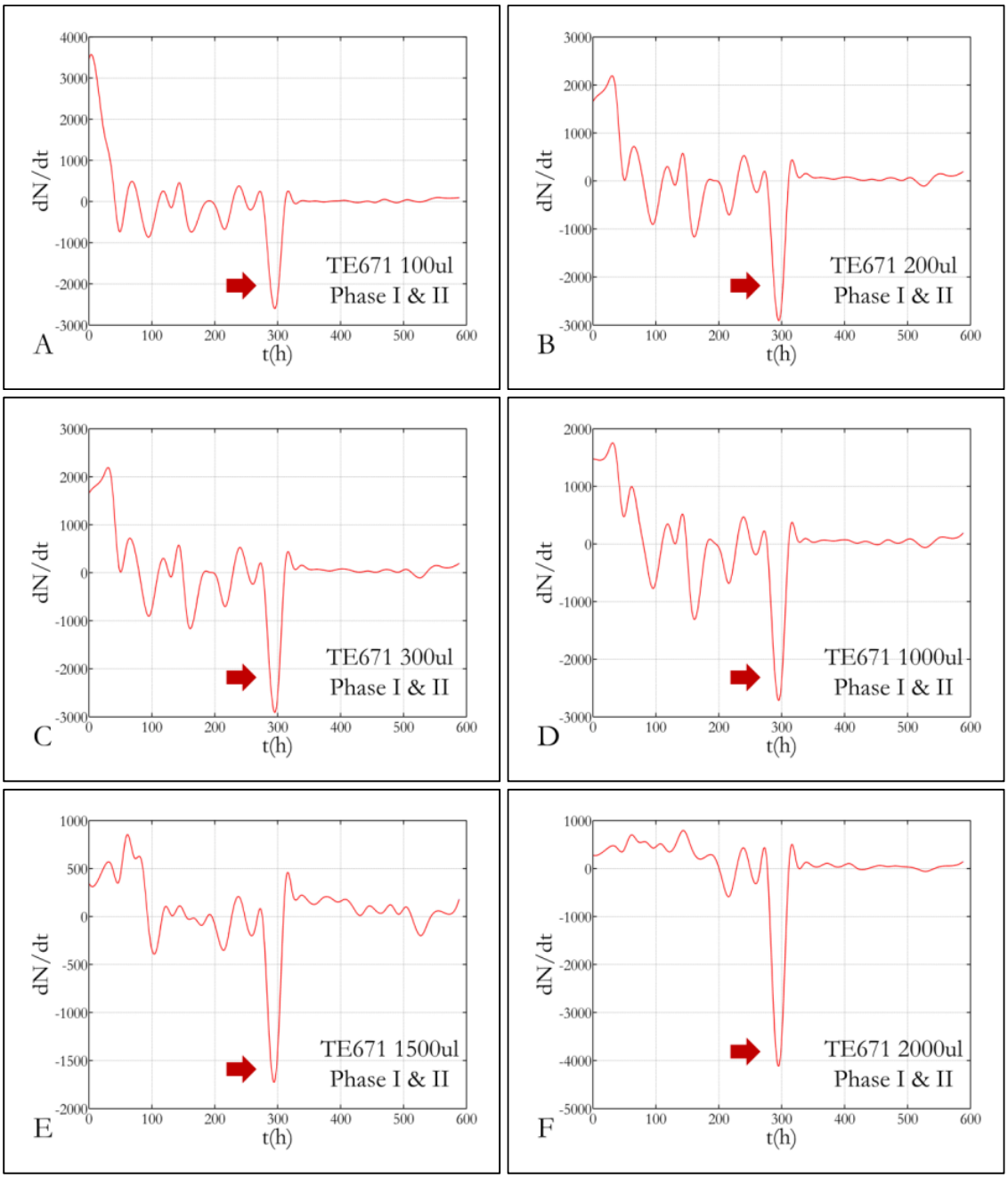
Στις παρακάτω εικόνες (**Εικόνα 154**-**Εικόνα 156**), παρουσιάζεται η μελέτη της ταχύτητας πολλαπλασιασμού για τα κύτταρα TE671. Παρατηρούμε ότι σε όλα τα διαγράμματα υπάρχει μια διαχωριστική γραμμή μεταξύ της Φάσης Ι και της Φάσης ΙΙ της πειραματική διάταξης. Εξαίρεση αποτελούν τα κύτταρα που μεγάλωσαν στα 1000 και 1500μl. Είναι ενδιαφέρον ότι μετά το σημείο αλλαγής παρατηρούμε μια αλλαγή και στο ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Επίσης βλέπουμε ότι στα 1000 και 1500μl ο ρυθμός πολλαπλασιασμού συνεχίζεται χωρίς να έχει προηγηθεί κάποιο σημείο καμπής. Ενδεχομένως στα σημεία αυτά βρήκαμε τον ιδανικό συνδυασμό κυττάρων και όγκου θρεπτικού με βάση το οποίο τα κύτταρα είναι σε θέση να πολλαπλασιάζονται χωρίς να περάσουν από το στρες της έλλειψης πόρων. Αντίθετα τα κύτταρα που πέρασαν από αυτό το στρες άλλαξαν τον τρόπο και ρυθμό πολλαπλασιασμού τους. Το ίδιο όμως φαινόμενο παρουσιάσαμε και για τις άλλες δύο κυτταρικές σειρές, σημείο που είναι μια σοβαρή ένδειξη για την ύπαρξη κοινού μηχανισμού πολλαπλασιασμού στους κυτταρικούς αυτούς τύπους.



Εικόνα 154. Παρουσιάζονται τα διαγράμματα της πρώτης μερικής παραγώγου του ρυθμού πολλαπλασιασμού για 25 κύτταρα αρχικό πληθυσμό και οι επιμέρους ταχύτητες πολλαπλασιασμού συναρτήσει του όγκου θρεπτικού υλικού.

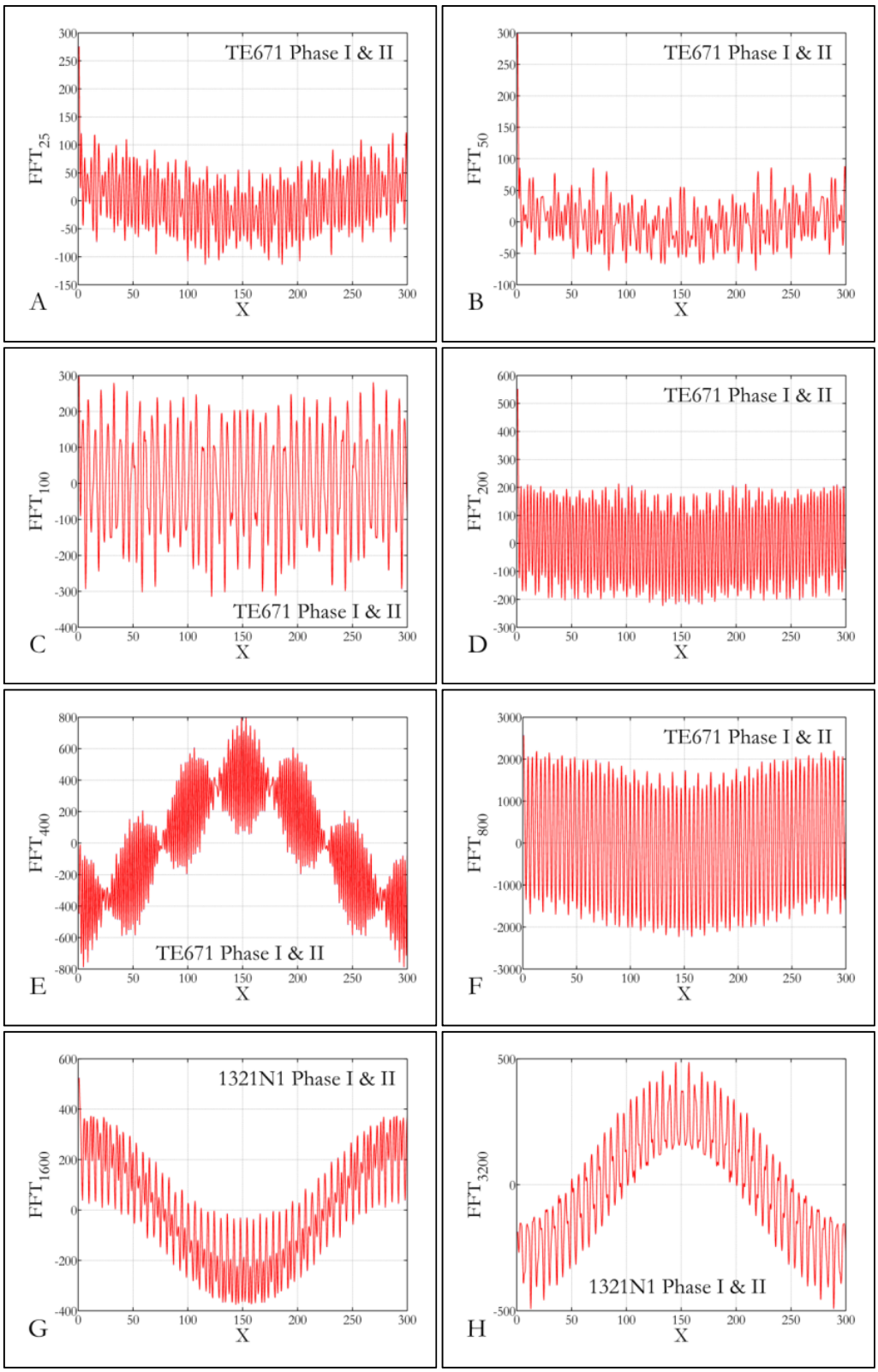


Εικόνα 155. Παρουσιάζονται τα διαγράμματα της πρώτης μερικής παραγώγου του ρυθμού πολλαπλασιασμού για 400 κύτταρα αρχικό πληθυσμό και οι επιμέρους ταχύτητες πολλαπλασιασμού συναρτήσει του όγκου θρεπτικού υλικού.



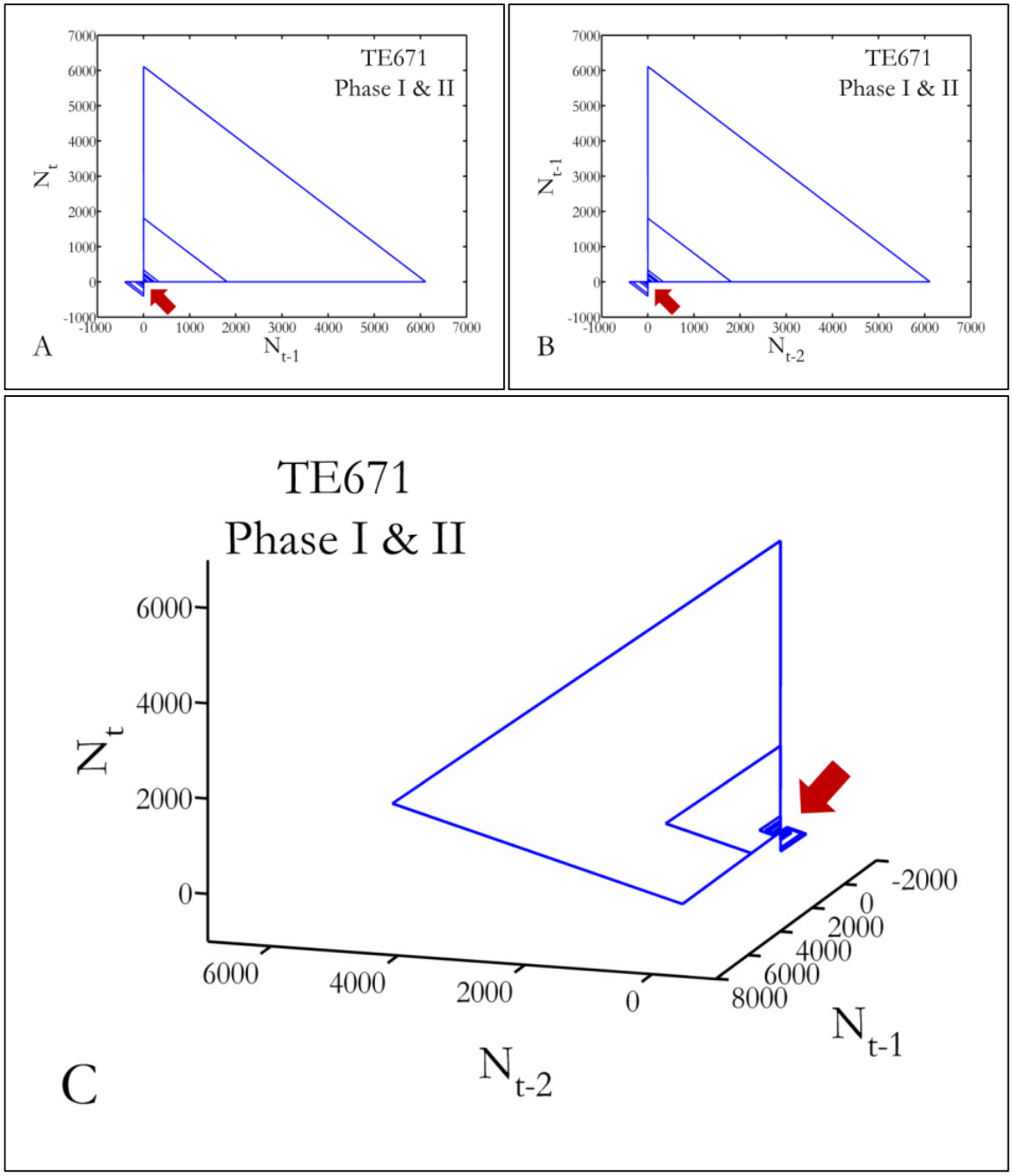
Εικόνα 156. Παρουσιάζονται τα διαγράμματα της πρώτης μερικής παραγώγου του ρυθμού πολλαπλασιασμού για 3000 κύτταρα αρχικό πληθυσμό και οι επιμέρους ταχύτητες πολλαπλασιασμού συναρτήσει του όγκου θρεπτικού υλικού.

Στην **Εικόνα 157**, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετασχηματισμών Fourier για κάθε αρχικό αριθμό κυττάρων και για τις δύο φάσεις της πειραματικής διάταξης για τα κύτταρα TE671.



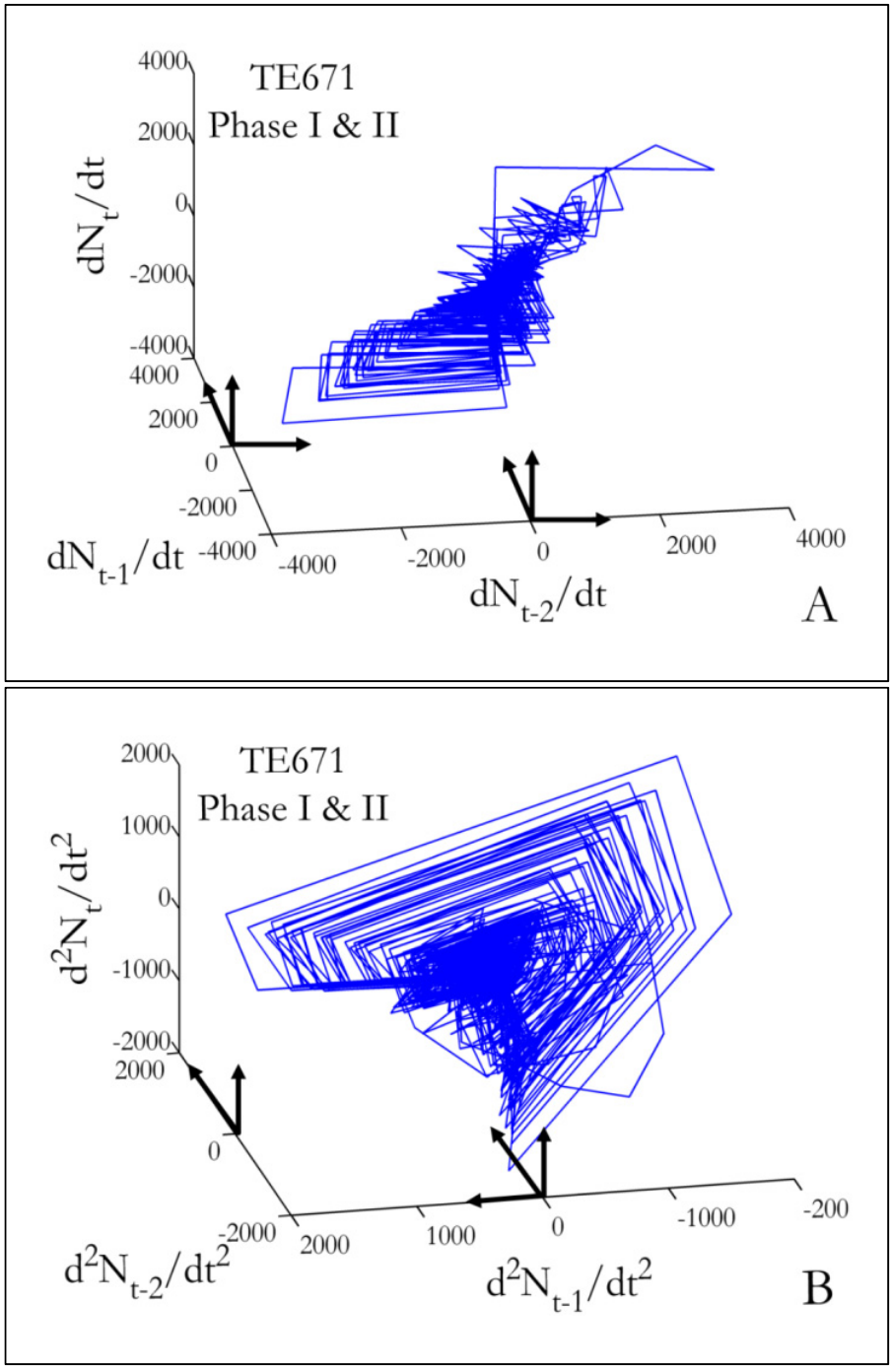
Εικόνα 157. Μετασχηματισμοί Fourier των χρονοσειρών για κάθε αρχικό πληθυσμό κυττάρων (άξονας των ***x***) στα κύτταρα TE671 Φάση I & II.

Διαγράφοντας τις χρονοσειρές συναρτήσει των διαφορετικών χρονικών στιγμών, παρατηρούμε παρόμοια συμπεριφορά όπως και τις προηγούμενες κυτταρικές σειρές. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στην **Εικόνα 158**.



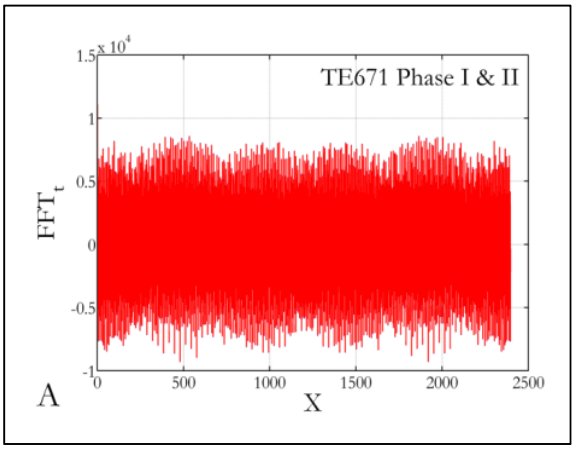
Εικόνα 158. Γραφήματα των χρονοσειρών που προέκυψαν από το μετασχηματισμό του κύβου δεδομένων ως προς την ταχύτητα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπου παρουσιάζεται η ταχύτητα πολλαπλασιασμού για *t* και *t-1* (**A**), *t-2* και *t-1* (**B**), *t*, *t-1*, *t-2* (**C**). Οι αναπαραστάσεις αυτές αφορούν στη ζεύξη των δύο φάσεων (I και II) της πειραματικής διάταξης για τα κύτταρα TE671.

Παρόμοια αποτελέσματα έχουμε και από τη διαγραμματική αναπαράσταση της ταχύτητας πολλαπλασιασμού και της επιτάχυνσης (**Εικόνα 159**).

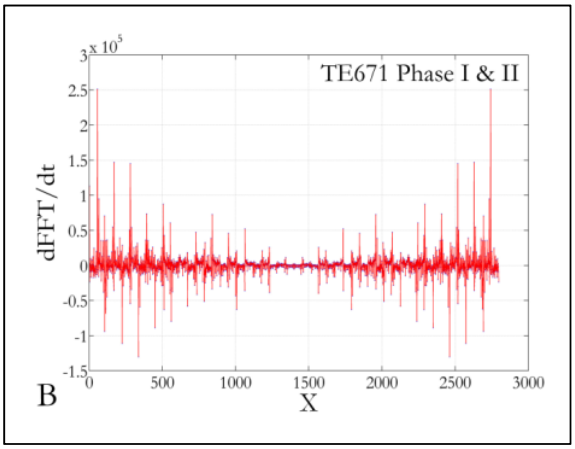


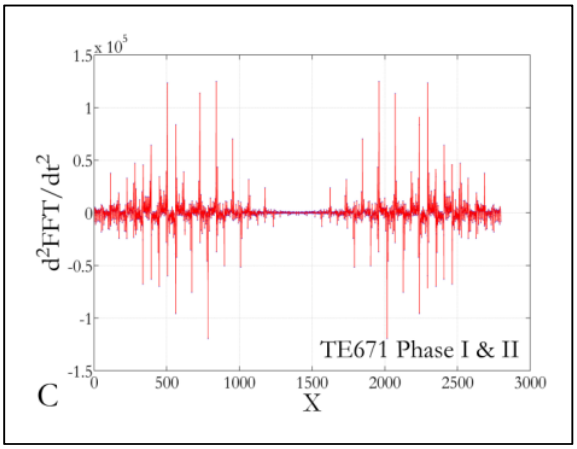
Εικόνα 159. Γραφήματα των χρονοσειρών που προέκυψαν από το μετασχηματισμό του κύβου δεδομένων ως προς την ταχύτητα (**A**) και την επιτάχυνση (**B**) του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπου παρουσιάζεται η ταχύτητα πολλαπλασιασμού για *t*, *t-1*, *t-2*. Τα διαγράμματα αφορούν στα κύτταρα TE671 και στις δύο φάσεις της πειραματικής διάταξης.

Τέλος στην **Εικόνα 160**, παρουσιάζονται οι μετασχηματισμοί Fourier για όλο το φάσμα των χρονοσειρών για το ρυθμό πολλαπλασιασμού, την ταχύτητα και την επιτάχυνση πολλαπλασιασμού.



Εικόνα 160. Παρουσιάζονται οι μετασχηματισμοί Fourier για όλο το φάσμα των χρονοσειρών για το ρυθμό πολλαπλασιασμού (**A**), για την ταχύτητα πολλαπλασιασμού (**B**) και για την επιτάχυνση (**C**).





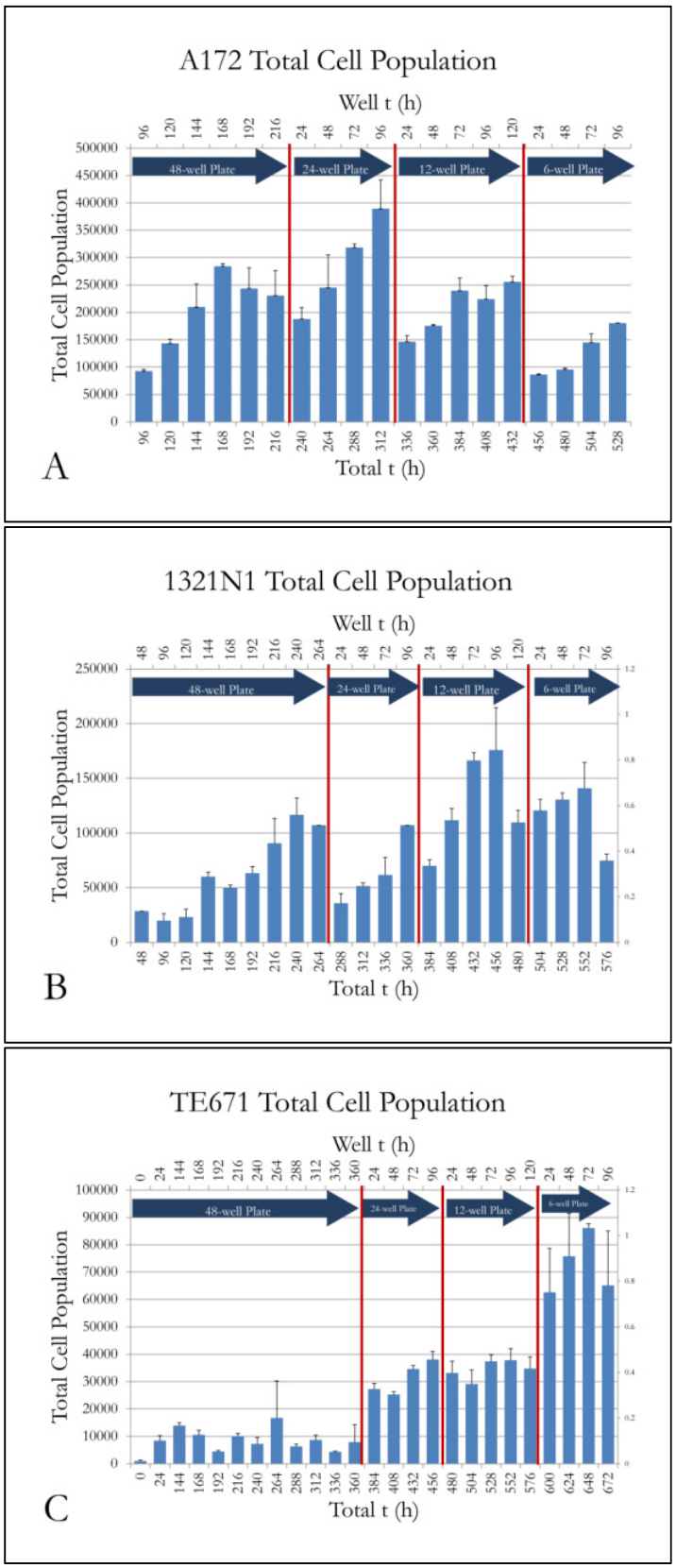
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 26

IN VITRO ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ-ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ VARIABLE VOLUME VS. VARIABLE INITIAL NUMBER (VV/VIN EXPERIMENTS)

Πριν προχωρήσουμε στην περιγραφή των αποτελεσμάτων αυτής της πειραματικής διάταξης, είναι σκόπιμο να θυμίσουμε τη σκοπιμότητα και το σχεδιασμό της. Ο βασικό άξονας αυτών των πειραμάτων ήταν η καλλιέργεια κυττάρων από ένα συγκεκριμένο αρχικό αριθμό και η μετάβασή του χρονικά σε μεγαλύτερο χώρο πολλαπλασιασμού και πλεονάσματος τροφής. Κατά συνέπεια ενώ τα κύτταρα ξεκίνησαν από ένα σταθερό συγκεκριμένο αριθμό, η μετάβαση του ίδιου κυτταρικού συστήματος έκανε ουσιαστικά τον αριθμό αυτό μεταβλητό. Τα κύτταρα ξεκίνησαν από πλάκα μικροτιτλοποίησης 48 θέσεων και αναπτύχθηκαν μέχρι πλάκας 6 θέσεων. Το κριτήριο της μετάβασης από τη μια διάταξη στην επόμενη ήταν η αύξηση των κυττάρων να μην αγγίξει τον κορεσμό, δηλαδή τα κύτταρα μεταφέρονταν στην επόμενη μεγαλύτερη πλάκα τιτλοποίησης αμέσως μόλις πλησίαζαν πληθυσμιακό κορεσμό ~90%.

Επίσης μια βασική υπόθεση αυτής της διάταξης ήταν ότι επεδίωκε να προσομοίωση την ανάπτυξη μιας νεοπλασίας, όπου ο χώρος είναι διαστελλόμενος και η τροφή βρίσκεται σε πλεόνασμα. Κατά συνέπεια, δεν υπήρχε ουσιαστικά λόγος για τα κύτταρα να ανταγωνισθούν για τους δύο βασικούς πόρους, που ήταν ο χώρος και η τροφή.

Στην **Εικόνα 161**, παρουσιάζουμε τις μετρήσεις του πληθυσμού και πιο συγκεκριμένα του συνολικού πληθυσμού από τη μια φάση στην επόμενη. Στην εικόνα αυτή, οι κόκκινες γραμμές υποδηλώνουν τα χρονικά όρια της μετάβασης από τη μια πλάκα μικροτιτλοποίησης στην επόμενη.

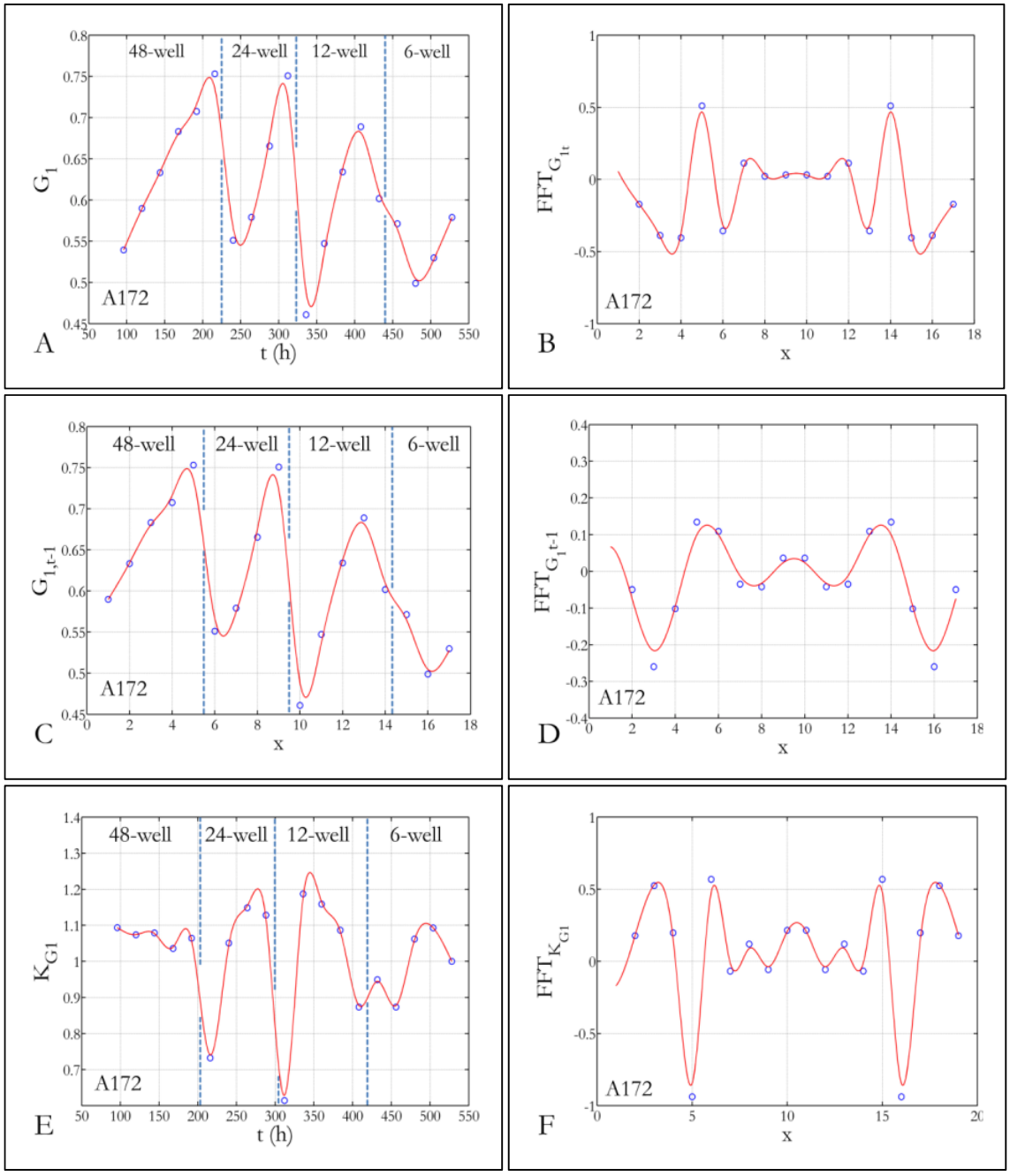


Εικόνα 161. Μετρήσεις του συνολικού πληθυσμού κυττάρων κατά την πειραματική διάταξη VN/VIN σε όλους τους κυτταρικούς τύπους ήτοι για τα A172 (**A**), 1321N1 (**B**) και TE671 (**C**).

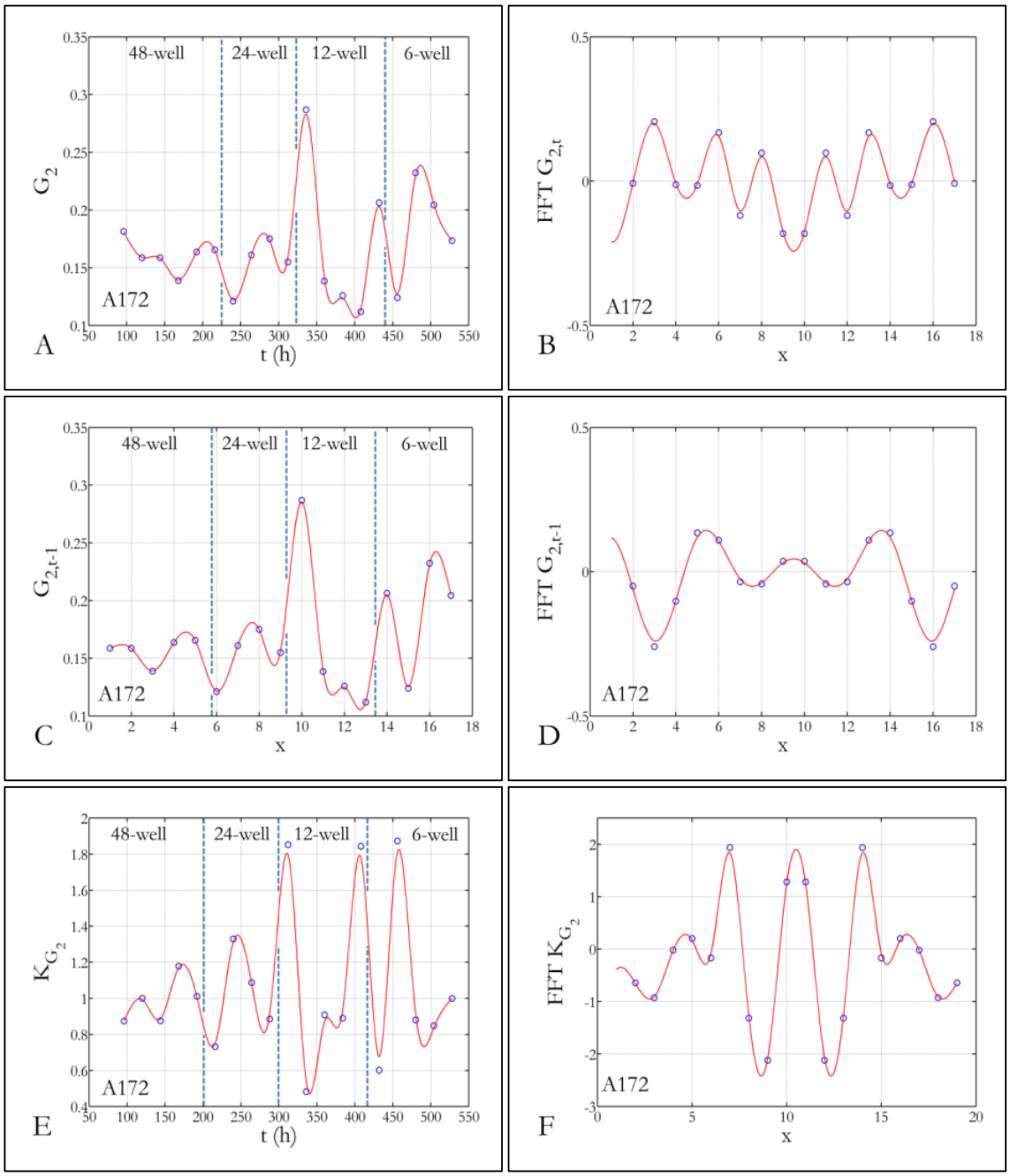
Πέραν του κυτταρικού πληθυσμού, μελετήσαμε τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα, για τις κυτταρικές σειρές A172, 1321N1 και TE671 παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες (**Εικόνα 162**-**Εικόνα 173**).

Συγκεκριμένα παρουσιάζεται η ίδια ανάλυση για κάθε κυτταρική σειρά ξεχωριστά που αφορά στα αποτελέσματα της μέτρησης του ποσοστού των κυττάρων στη G1 φάση, του ποσοστού των κυττάρων στη G2 φάση, του ποσοστού των κυττάρων στην S φάση και τέλος του ποσοστού των κυττάρων σε απόπτωση για τη σειρά A172 (**Εικόνα 162**-**Εικόνα 165**), για τη σειρά 1321N1 (**Εικόνα 166**-**Εικόνα 169**) και για τη σειρά TE671 (**Εικόνα 170**-**Εικόνα 173**).

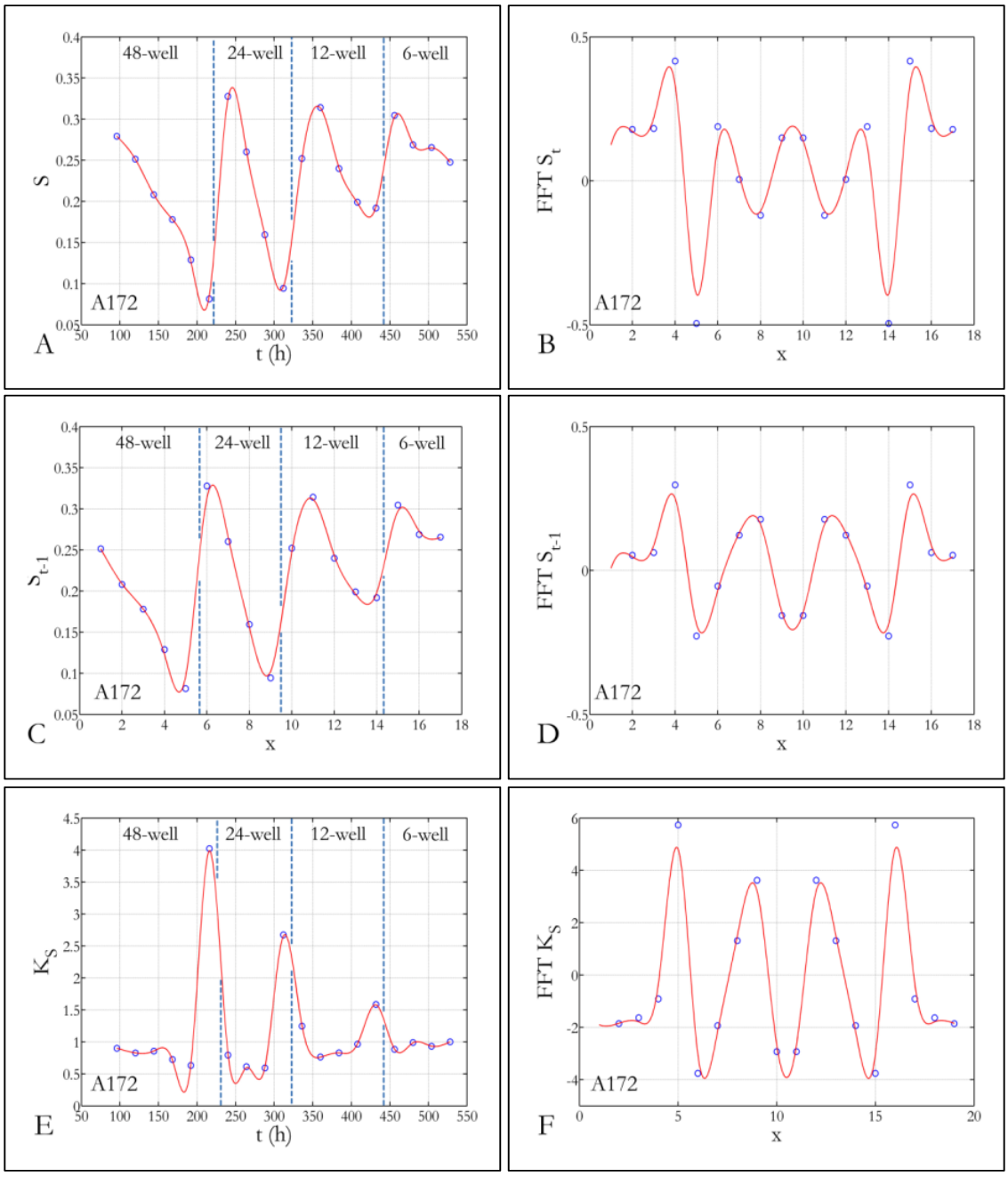
Κάθε εικόνα αποτελείται από τρία μέρη. Στις υπο-εικόνες **A**, **B** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της G_1, G_2, S φάσης ή απόπτωσης αντίστοιχα μαζί με το μετασχηματιζόμενο κατά Fourier σήμα και για χρόνο t, Στις υπο-εικόνες **C**, **D** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της G_1, G_2, S φάσης ή απόπτωσης αντίστοιχα μαζί με το μετασχηματιζόμενο κατά Fourier σήμα και για χρόνο *t-1* και στις υπο-εικόνες **E**, **F** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μέτρησης του ρυθμού μεταβολής των εκάστοτε φάσεων (k) μαζί με το μετασχηματιζόμενο κατά *Fourier* σήμα.



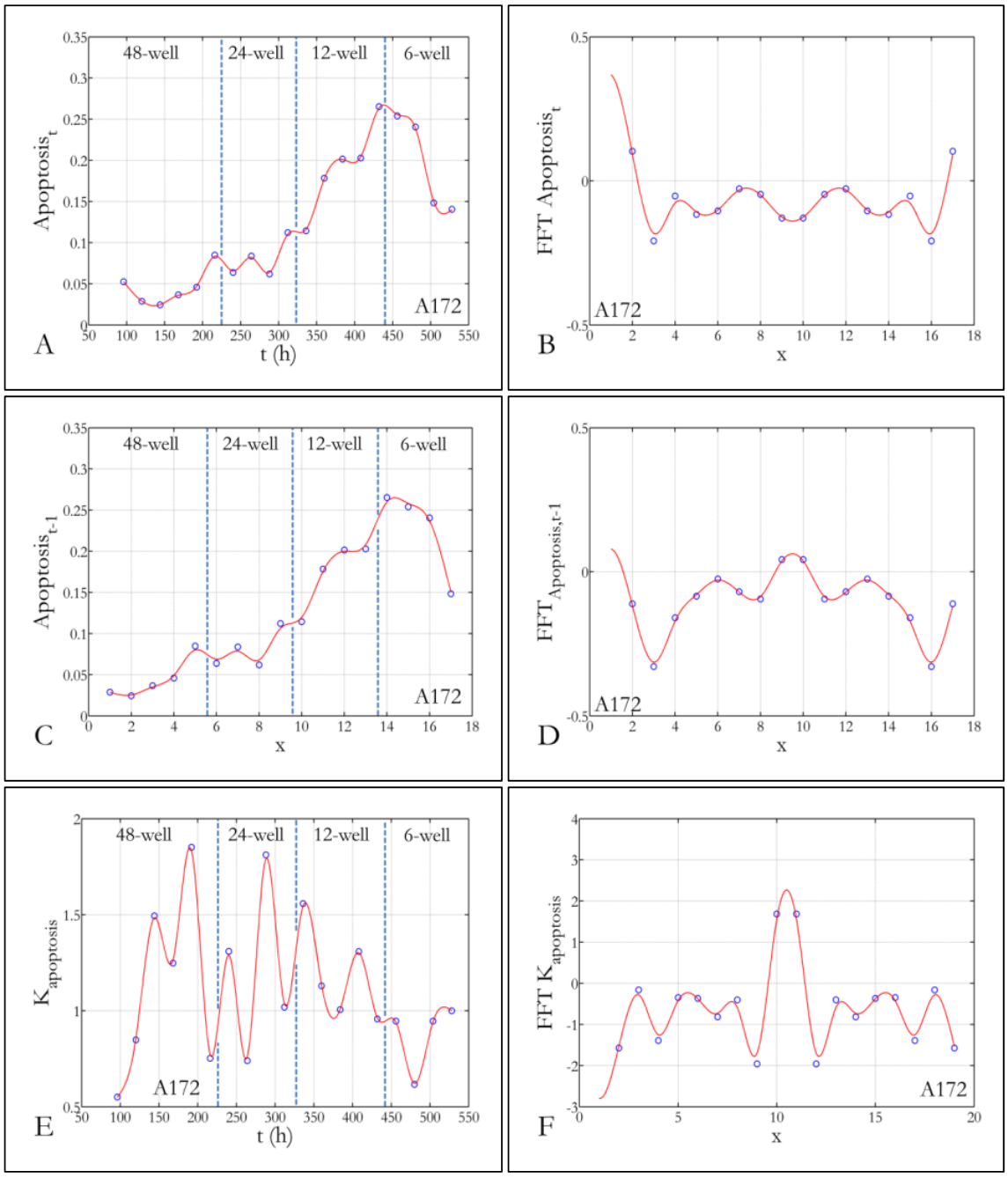
Εικόνα 162. Γραφική αναπαράσταση των μετρήσεων του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα A172 και συγκεκριμένα της G_1 φάσης, όπου φαίνονται οι μετρήσεις του ποσοστού των κυττάρων σε G_1 φάση σε χρόνο t (**A**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**B**), το ποσοστό των κυττάρων στη G_1 φάση αλλά σε χρόνο t-1 σε σχέση με το διάγραμμα (**A**) (**C**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**D**), και ο ρυθμός μεταβολής (k) των κυττάρων σε G_1 φάση (**E**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**F**).



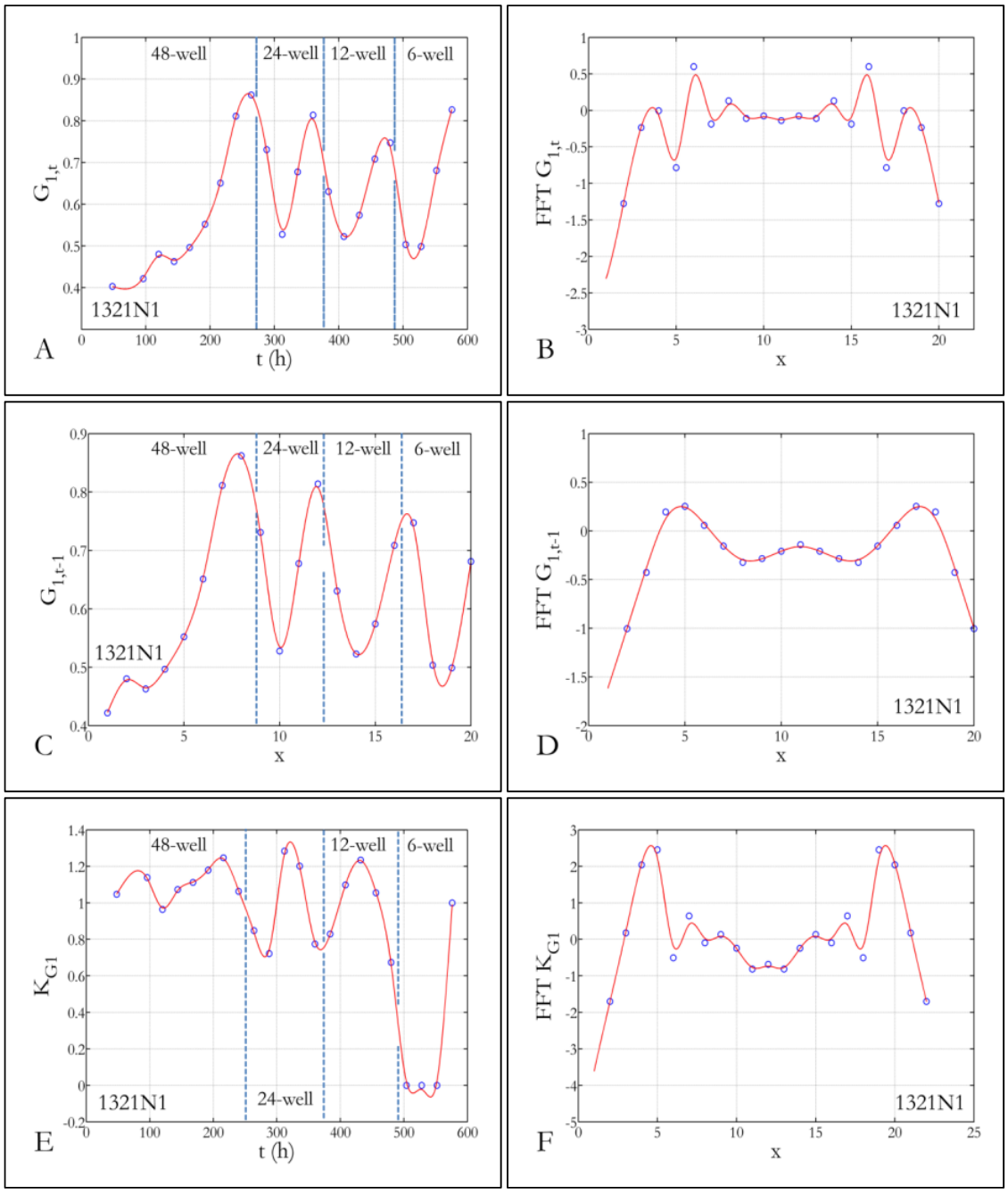
Εικόνα 163. Γραφική αναπαράσταση των μετρήσεων του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα A172 και συγκεκριμένα της G_2 φάσης, όπου φαίνονται οι μετρήσεις του ποσοστού των κυττάρων σε G_2 φάση σε χρόνο t (**A**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**B**), το ποσοστό των κυττάρων στη G_2 φάση αλλά σε χρόνο t-1 σε σχέση με το διάγραμμα (**A**) (**C**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**D**), και ο ρυθμός μεταβολής (k) των κυττάρων σε G_2 φάση (**E**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**F**).



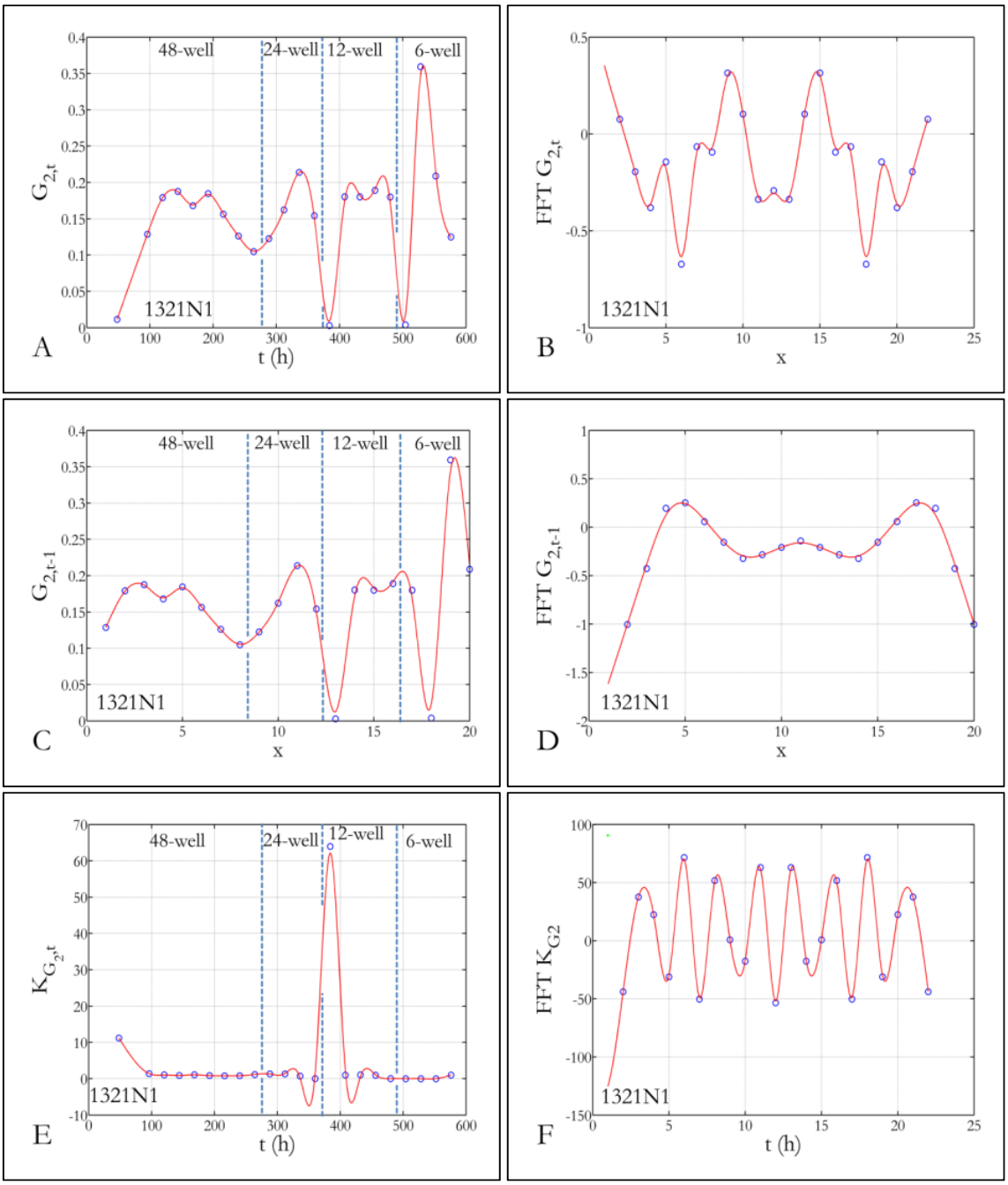
Εικόνα 164. Γραφική αναπαράσταση των μετρήσεων του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα A172 και συγκεκριμένα της G_2 φάσης, όπου φαίνονται οι μετρήσεις του ποσοστού των κυττάρων σε *S* φάση σε χρόνο *t* (**A**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**B**), το ποσοστό των κυττάρων στη *S* φάση αλλά σε χρόνο *t-1* σε σχέση με το διάγραμμα (**A**) (**C**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**D**), και ο ρυθμός μεταβολής (k_S) των κυττάρων σε *S* φάση (**E**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**F**).



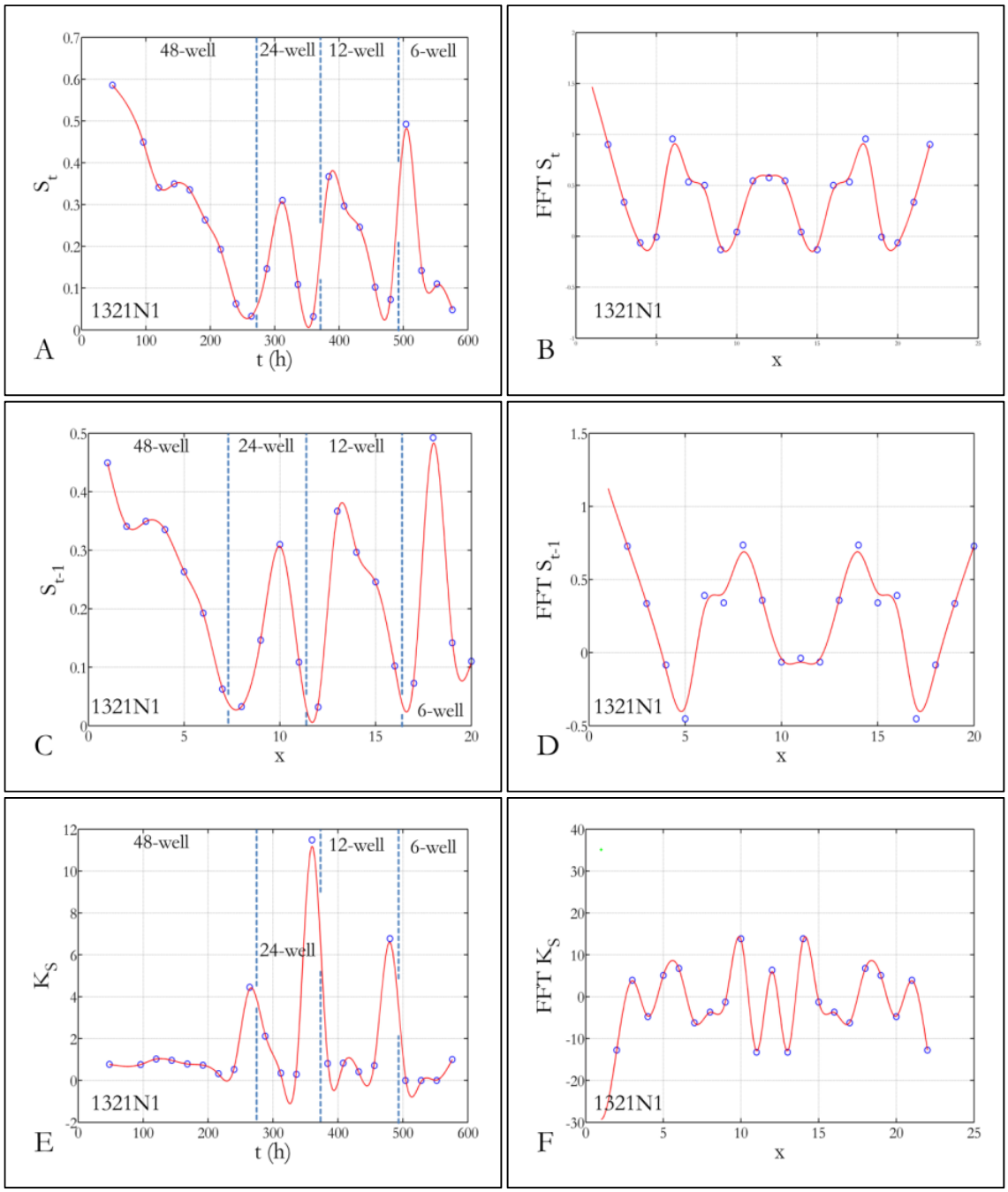
Εικόνα 165. Γραφική αναπαράσταση των μετρήσεων του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα A172 και συγκεκριμένα της απόπτωσης, όπου φαίνονται οι μετρήσεις του ποσοστού των κυττάρων σε απόπτωση σε χρόνο *t* (**A**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**B**), το ποσοστό των κυττάρων σε απόπτωση αλλά σε χρόνο *t-1* σε σχέση με το διάγραμμα (**A**) (**C**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**D**), και ο ρυθμός μεταβολής (*k*) των κυττάρων σε απόπτωση (**E**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**F**).



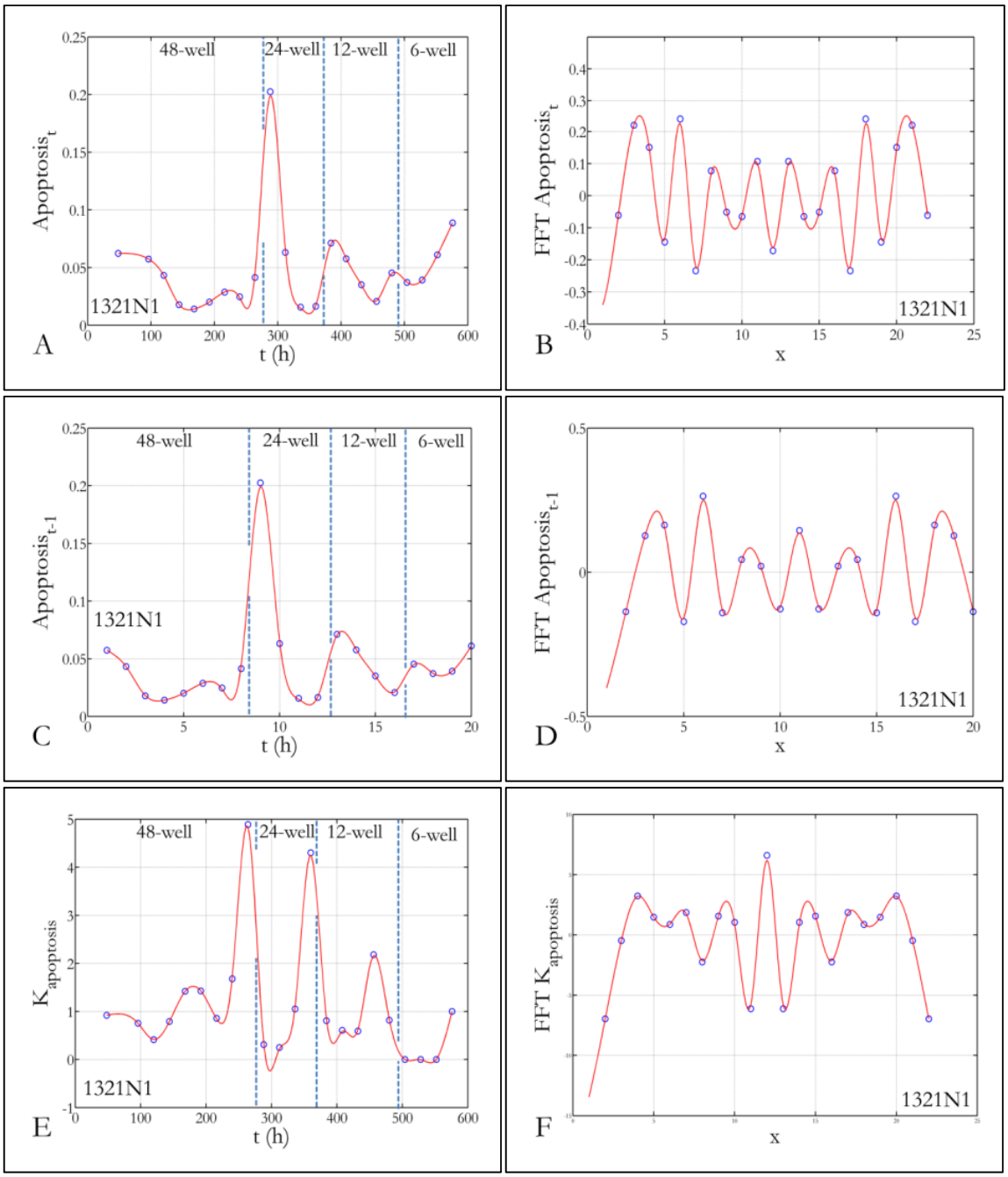
Εικόνα 166. Γραφική αναπαράσταση των μετρήσεων του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα 1321N1 και συγκεκριμένα της G_1 φάσης, όπου φαίνονται οι μετρήσεις του ποσοστού των κυττάρων σε G_1 φάση σε χρόνο *t* (**A**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**B**), το ποσοστό των κυττάρων στη G_1 φάση αλλά σε χρόνο *t-1* σε σχέση με το διάγραμμα (**A**) (**C**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**D**), και ο ρυθμός μεταβολής (*k*) των κυττάρων σε G_1 φάση (**E**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**F**).



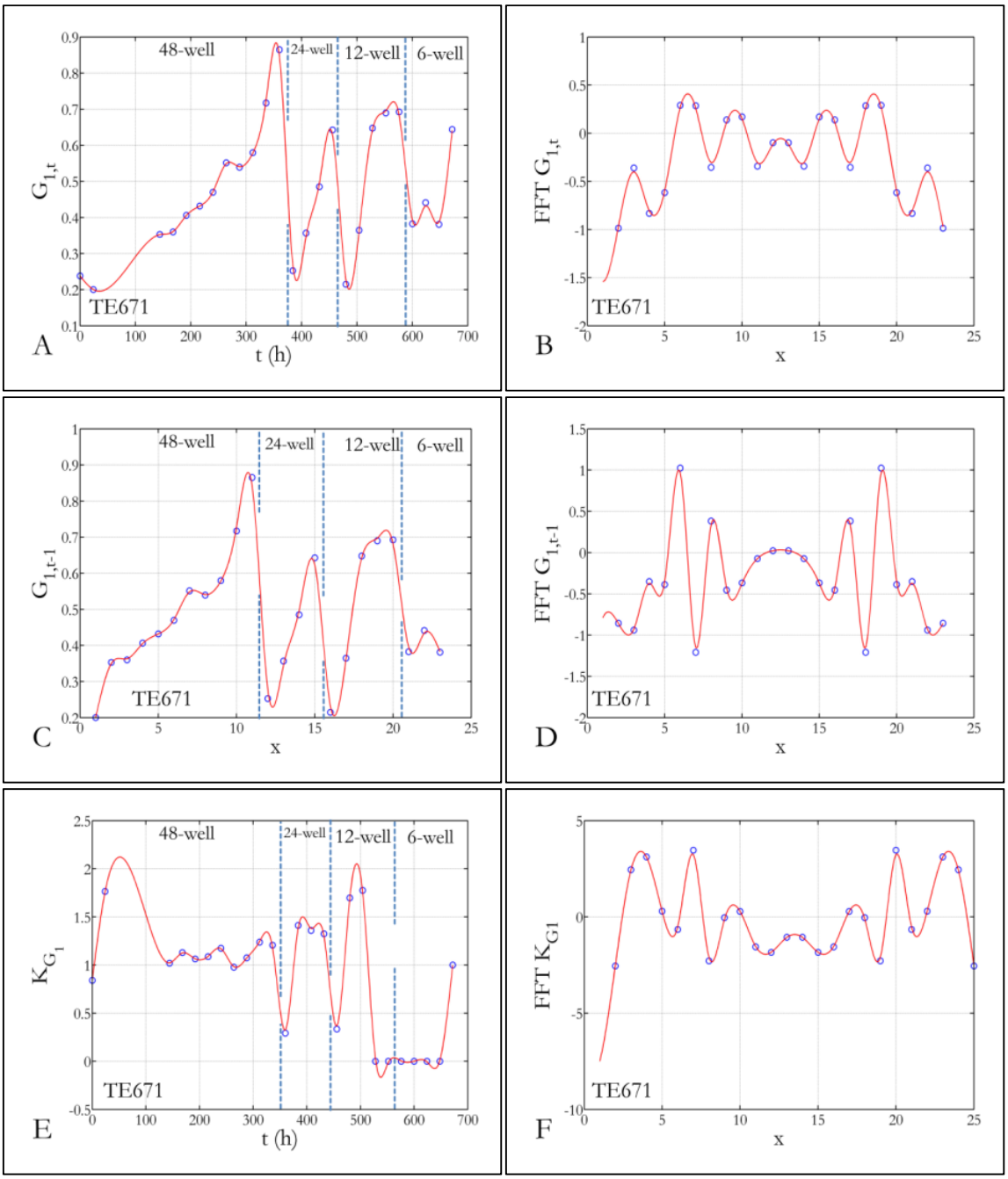
Εικόνα 167. Γραφική αναπαράσταση των μετρήσεων του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα 1321N1 και συγκεκριμένα της G_2 φάσης, όπου φαίνονται οι μετρήσεις του ποσοστού των κυττάρων σε G_2 φάση σε χρόνο *t* (**A**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**B**), το ποσοστό των κυττάρων στη G_2 φάση αλλά σε χρόνο *t-1* σε σχέση με το διάγραμμα (**A**) (**C**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**D**), και ο ρυθμός μεταβολής (*k*) των κυττάρων σε G_2 φάση (**E**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**F**).



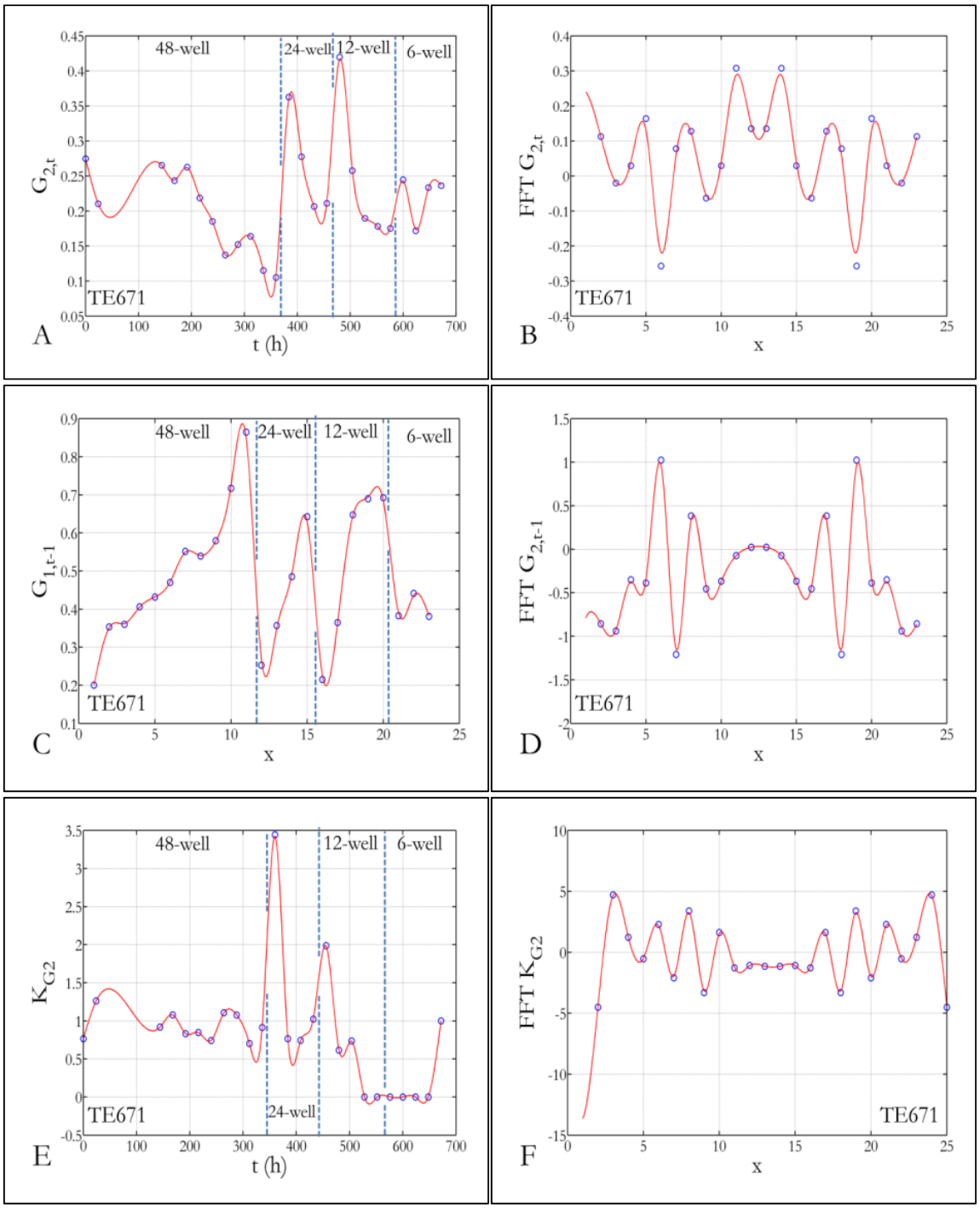
Εικόνα 168. Γραφική αναπαράσταση των μετρήσεων του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα 1321N1 και συγκεκριμένα της *S* φάσης, όπου φαίνονται οι μετρήσεις του ποσοστού των κυττάρων σε *S* φάση σε χρόνο *t* (**A**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**B**), το ποσοστό των κυττάρων στη *S* φάση αλλά σε χρόνο *t-1* σε σχέση με το διάγραμμα (**A**) (**C**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**D**), και ο ρυθμός μεταβολής (*k*) των κυττάρων σε *S* φάση (**E**) μαζί με τα μετασχηματισμένο σήμα (**F**).



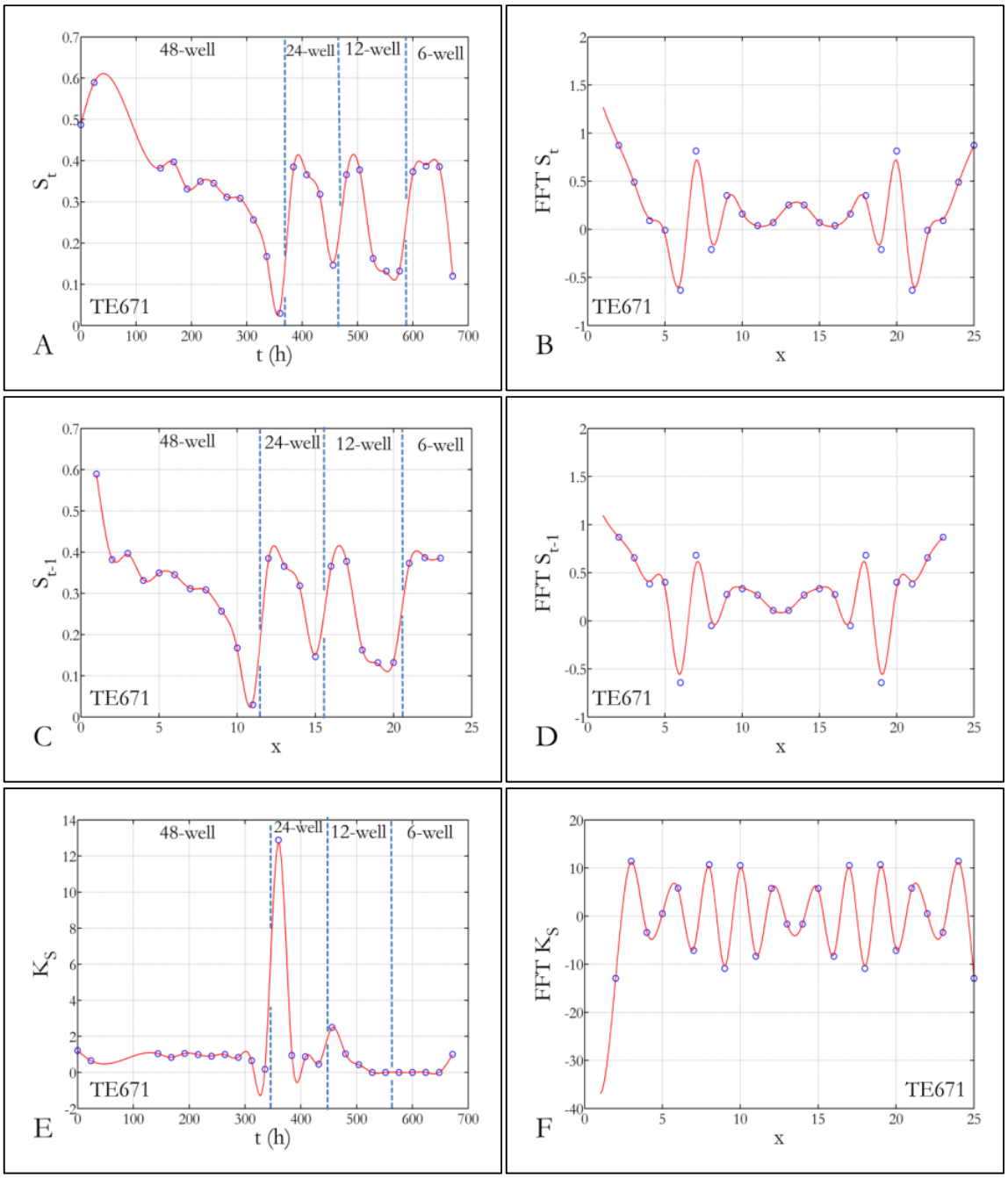
Εικόνα 169. Γραφική αναπαράσταση των μετρήσεων του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα 1321N1 και συγκεκριμένα της απόπτωσης, όπου φαίνονται οι μετρήσεις του ποσοστού των κυττάρων σε απόπτωση σε χρόνο *t* (**A**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**B**), το ποσοστό των κυττάρων σε απόπτωση αλλά σε χρόνο *t-1* σε σχέση με το διάγραμμα (**A**) (**C**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**D**), και ο ρυθμός μεταβολής (*k*) των κυττάρων σε απόπτωση (**E**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**F**).



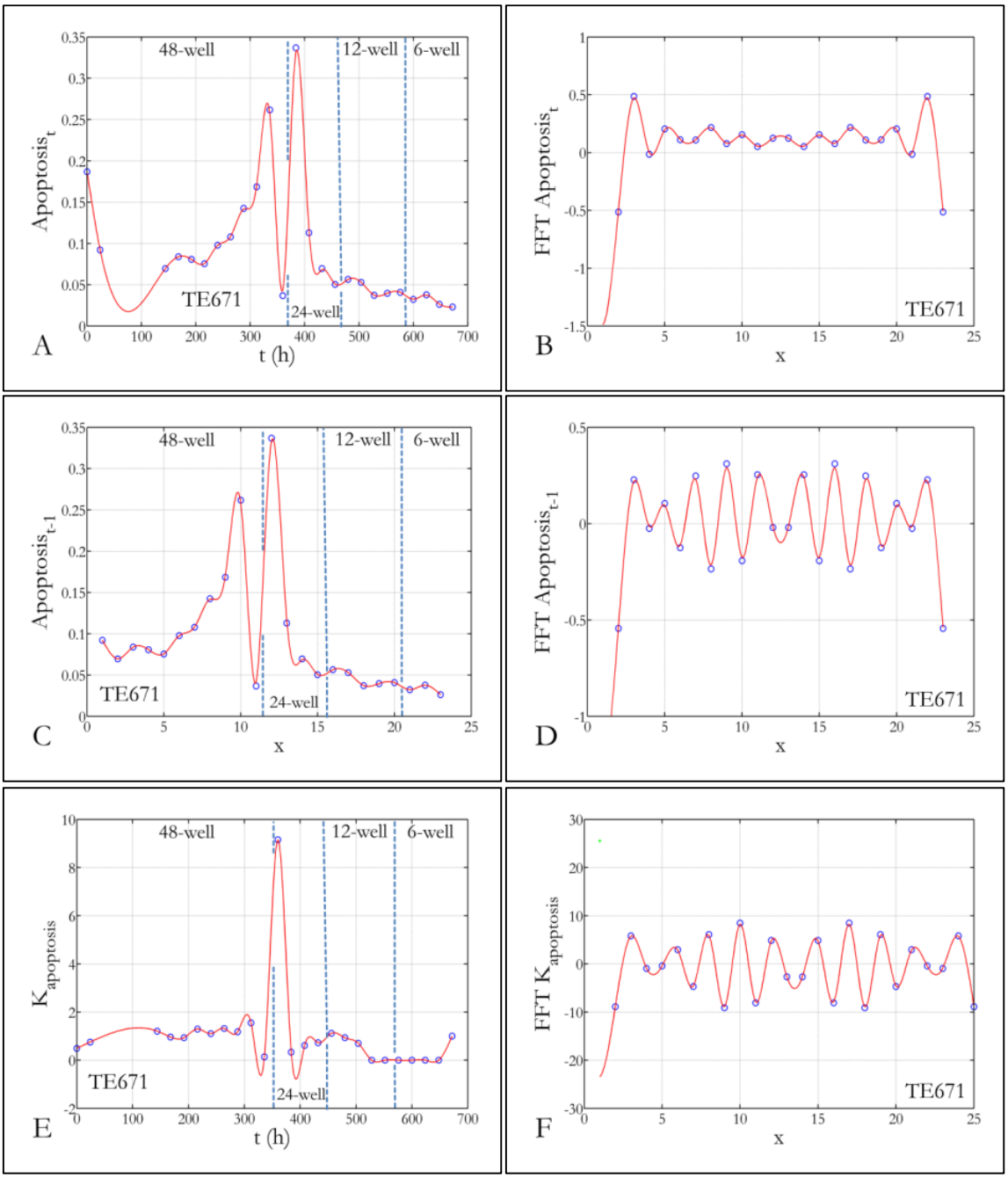
Εικόνα 170. Γραφική αναπαράσταση των μετρήσεων του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα TE671 και συγκεκριμένα της G_1 φάσης, όπου φαίνονται οι μετρήσεις του ποσοστού των κυττάρων σε G_1 φάση σε χρόνο *t* (**A**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**B**), το ποσοστό των κυττάρων στη G_1 φάση αλλά σε χρόνο *t-1* σε σχέση με το διάγραμμα (**A**) (**C**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**D**), και ο ρυθμός μεταβολής (*k*) των κυττάρων σε G_1 φάση (**E**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**F**).



Εικόνα 171. Γραφική αναπαράσταση των μετρήσεων του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα TE671 και συγκεκριμένα της G_2 φάσης, όπου φαίνονται οι μετρήσεις του ποσοστού των κυττάρων σε G_2 φάση σε χρόνο *t* (**A**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**B**), το ποσοστό των κυττάρων στη G_2 φάση αλλά σε χρόνο *t-1* σε σχέση με το διάγραμμα (**A**) (**C**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**D**), και ο ρυθμός μεταβολής (*k*) των κυττάρων σε G_2 φάση (**E**) μαζί με τα μετασχηματισμένο σήμα (**F**).



Εικόνα 172. Γραφική αναπαράσταση των μετρήσεων του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα TE671 και συγκεκριμένα της *S* φάσης, όπου φαίνονται οι μετρήσεις του ποσοστού των κυττάρων σε *S* φάση σε χρόνο *t* (**A**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**B**), το ποσοστό των κυττάρων στη *S* φάση αλλά σε χρόνο *t-1* σε σχέση με το διάγραμμα (**A**) (**C**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**D**), και ο ρυθμός μεταβολής (*k*) των κυττάρων σε *S* φάση (**E**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**F**).



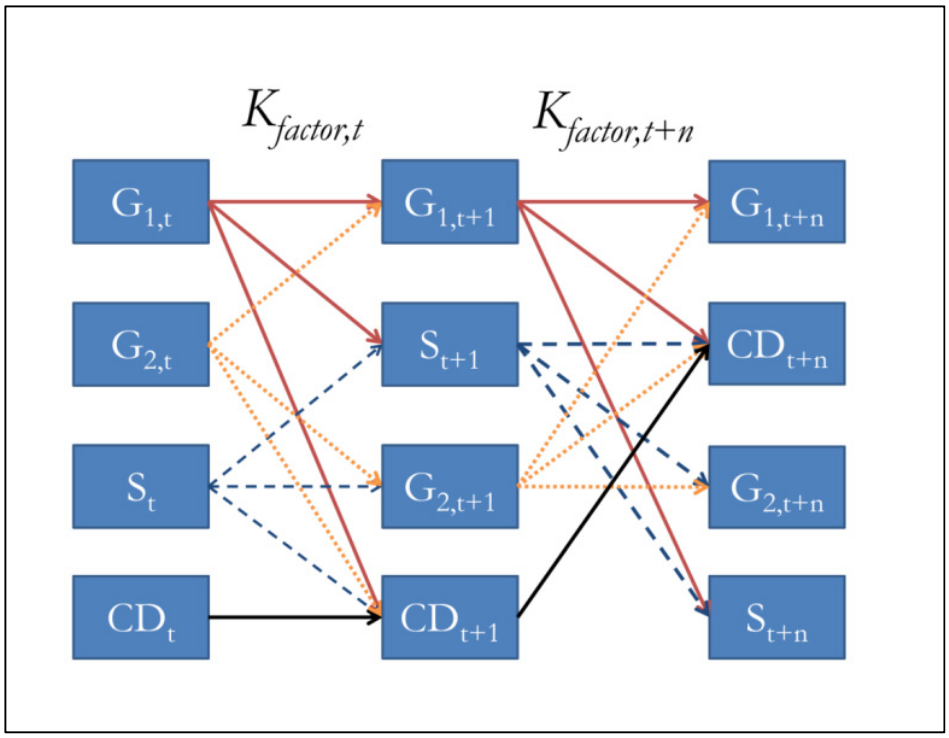
Εικόνα 173. Γραφική αναπαράσταση των μετρήσεων του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα TE671 και συγκεκριμένα της απόπτωσης, όπου φαίνονται οι μετρήσεις του ποσοστού των κυττάρων σε απόπτωση σε χρόνο *t* (**A**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**B**), το ποσοστό των κυττάρων σε απόπτωση αλλά σε χρόνο *t-1* σε σχέση με το διάγραμμα (**A**) (**C**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**D**), και ο ρυθμός μεταβολής (*k*) των κυττάρων σε απόπτωση (**E**) μαζί με το μετασχηματισμένο σήμα (**F**).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούμε εύκολα να διακρίνουμε ότι όλοι οι κυτταρικοί υποπληθυσμοί μεταβάλλονται με ταλαντωτική συμπεριφορά. Ιδιαίτερα για την περίπτωση της απόπτωσης παρατηρούμε μια μειούμενη τάση όσο προχωράμε από τα μικρότερα πηγάδια στις πλάκες μικροτιτλοποίησης στα μεγαλύτερα. Σε αντίθεση με τα πειράματα σταθερού όγκου και σταθερού αρχικού αριθμού (CV/CIN) τα κύτταρα σε αυτό το μοντέλο δεν έχουν ανάγκη για ανταγωνισμό μιας και οι πόροι είναι πλεονάζοντες. Τόσο από πλευράς χώρου όσο και από πλευράς τροφής υπάρχει περίσσια και ως εκ τούτου, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός αναμενόταν να είναι γραμμικός. Πάρα ταύτα, τα κύτταρα εξακολουθούν να ακολουθούν τις ταλαντώσεις που είδαμε και στα προηγούμενα κυτταρικά μοντέλα. Μάλιστα παρατηρούμε ότι με τις αλλαγές από τη μια φάση στην επόμενη τα κύτταρα αντιδρούν στο ερέθισμα παρουσιάζοντας τοπικά μέγιστα στο ρυθμό μεταβολής των υποπληθυσμών τους, όπως για παράδειγμα παρουσιάζεται σε όλες τις πειραματικές διατάξεις.

Επίσης πρέπει να αναφέρουμε ότι από την άποψη των παιγνίων, στο μοντέλο αυτό έχουμε μια αντίθετη περίπτωση σε σύγκριση με την πειραματική διάταξη CV/CIN. Στη δεύτερη διάταξη τα κύτταρα είχαν την ανάγκη να ανταγωνιστούν για τους πόρους ενώ στην πρώτη περίπτωση αυτά ήταν σε περίσσεια.

Από τα πειραματικά δεδομένα επιδιώξαμε να διατυπώσουμε ένα γενικευμένο θεώρημα για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Ως εκ τούτου, αν υποθέσουμε ότι σε χρόνο t έχουμε N κύτταρα τότε αυτά αποτελούνται από υποπληθυσμούς σε διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου ή σε στάδιο απόπτωσης. Στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 174**) παρουσιάζεται διαγραμματικά το μοντέλο μετάβασης από τη μια χρονική στιγμή στην επόμενη.



Εικόνα 174. Διαγραμματική αναπαράσταση του μοντέλου μετάβασης των κυτταρικών πληθυσμών από τη μια χρονική στιγμή στην επόμενη. Διαχωρίζονται τέσσερις πληθυσμοί, τα κύτταρα σε φάση G_1, τα κύτταρα σε φάση G_2, τα κύτταρα στη φάση S και τα αποπτωτικά κύτταρα ή γενικότερα ο κυτταρικός θάνατος (Cell Death - CD).

Το μοντέλο αυτό παρουσιάζει τις πιθανές καταστάσεις στη μετάβαση των κυτταρικών πληθυσμών από τη χρονική στιγμή *t* στη χρονική στιγμή *t+1* και ακολούθως σε χρόνο *t+n*. Έστω ότι $G_{1,t}$, $G_{1,t+1}$, $G_{1,t+n}$ είναι το ποσοστό των κυττάρων στη φάση G_1 σε χρόνο *t*, *t+1* και *t+n* αντίστοιχα. Επίσης έστω ότι S_t, S_{t+1}, S_{t+n} είναι το ποσοστό των κυττάρων σε φάση *S* σε χρόνο *t*, *t+1*, *t+n* αντίστοιχα και $G_{2,t}$, $G_{2,t+1}$, $G_{2,t+n}$ είναι το ποσοστό των κυττάρων σε φάση G_2 και χρόνο *t*, *t+1*, *t+n* αντίστοιχα. Τέλος έστω ότι CD_t, CD_{t+1}, CD_{t+n} είναι το ποσοστό των κυττάρων σε αποπτωτική φάση και σε χρόνο *t*, *t+1*, *t+n* αντίστοιχα. Τα βέλη υποδεικνύουν τη μετάβαση από τον ένα υποπληθυσμό στον επόμενο. Έτσι για παράδειγμα κύτταρα σε φάση G_1 έχουν τρεις πιθανότητες: να παραμείνουν στη φάση G_1, να μεταβούν στη φάση *S* ή να περάσουν σε αποπτωτική οδό (*CD*). Άρα καταλαβαίνουμε ότι κάθε πληθυσμός μπορεί να προκύψει από τη μετάβαση δύο προηγούμενων πληθυσμών με εξαίρεση τον κυτταρικό θάνατο.

Ένας πολύ σημαντικός παράγοντας που προκύπτει από το μοντέλο και μελετήσαμε στις πειραματικές διατάξεις είναι ο παράγοντας *k* ($K_{factor,t}$), ο οποίος υποδηλώνει το ρυθμό μεταβολής από τη μια χρονική στιγμή στην επόμενη. Έτσι, οι παράγοντες που παίζουν ρόλο μπορούν να περιγραφούν ως ακολούθως:

$G_{1,t} \rightarrow G_{1,t+1}$: k_1,

$G_{1,t} \rightarrow S_{t+1}$: k_2

$G_{1,t} \rightarrow CD_{t+1}$: k_3,

$S_t \rightarrow S_{t+1}$: k_4,

$S_t \rightarrow G_{2,t+1}$: k_5,

$S_t \rightarrow CD_{t+1}$: k_6,

$G_{2,t} \rightarrow G_{2,t+1}$: k_7,

$G_{2,t} \rightarrow G_{1,t+1}$: k_8,

$G_{2,t} \rightarrow CD_{t+1}$: k_9

$CD_t \rightarrow CD_{t+1}$: k_{10}

Από τους ορισμούς αυτούς μπορούμε να ορίσουμε τις βασικές συναρτήσεις μετάβασης από τη μια χρονική στιγμή στην επόμενη ως ακολούθως:

$$\begin{aligned} N_{G_{1,t+1}} &= N_{G_{1,t}} \cdot k_1 + N_{G_{2,t}} \cdot k_8 \\ N_{S_{t+1}} &= N_{S_t} \cdot k_4 + N_{G_{1,t}} \cdot k_2 \\ N_{G_{2,t+1}} &= N_{G_{2,t}} \cdot k_7 + N_{S_t} \cdot k_5 \\ N_{CD_{t+1}} &= N_{CD_t} + N_{G_{1,t}} \cdot k_3 + N_{G_{2,t}} \cdot k_9 + N_{S_t} \cdot k_6 \end{aligned}$$, **Εξίσωση 61**

Όπου N είναι ο αντίστοιχος κυτταρικός πληθυσμός σε χρόνο *t*. Οι συναρτήσεις αυτές μπορούν να διατυπωθούν με μια γενικευμένη μορφή και να συνδέσουν το χρόνο *t* και *t+1* ως ακολούθως:

$$N_{p_x,t+1} = N_{p_y,t} k_y + N_{p_z,t} k_z$$, **Εξίσωση 62**

Βλέπουμε ότι εκφράσαμε τον κάθε πληθυσμό σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή συναρτήσει των προηγούμενων πληθυσμών, όπου $N_{px,t+1}$ είναι ο πληθυσμός των κυττάρων σε χρόνο *t+1* και $N_{py,t}$, $N_{px,t}$ είναι οι πληθυσμοί οι οποίοι μεταβαίνουν στην επόμενη φάση (η υποδιαστολή *p* χαρακτηρίζει το είδος του πληθυσμού ήτοι κύτταρα που είναι στη φάση G_1, G_2 ή *S*).

Ένας πολύ σημαντικός παράγοντας που περιλαμβάνεται σε αυτές τις συναρτήσεις ο παράγοντας *k*. Μπορεί να ταυτοποιηθεί μόνο πειραματικά και όπως είδαμε στις πειραματικές μας διατάξεις είναι μη-γραμμικός μιας και εξαρτάται απόλυτα από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και τον κυτταρικό τύπο.

Όπως διατυπώσαμε και προηγούμενα, ο παράγοντας *k* μπορεί να προσομοιωθεί με σειρές Fourier και πιο συγκεκριμένα της μορφής:

$$f(x,y) = a_0 + a_1\cos(xy) + a_2\sin(xy)$$, **Εξίσωση 63**

Έτσι, αντικαθιστώντας την Εξίσωση 63 στους ορισμούς των παραγόντων k, μπορούμε να διατυπώσουμε τα ακόλουθα:

$$\begin{aligned}
k_1 &= a_{0,1} + a_{1,1}\cos(N_{G_{1,t}} \cdot N_{G_{1,t+1}}) + a_{2,1}\sin(N_{G_{1,t}} \cdot N_{G_{1,t+1}}) \\
k_2 &= a_{0,2} + a_{1,2}\cos(N_{G_{1,t}} \cdot N_{S_{t+1}}) + a_{2,2}\sin(N_{G_{1,t}} \cdot N_{S_{t+1}}) \\
k_3 &= a_{0,3} + a_{1,3}\cos(N_{G_{1,t}} \cdot N_{CD_{t+1}}) + a_{2,3}\sin(N_{G_{1,t}} \cdot N_{CD_{t+1}}) \\
k_4 &= a_{0,4} + a_{1,4}\cos(N_{S_t} \cdot N_{S_{t+1}}) + a_{2,4}\sin(N_{S_t} \cdot N_{S_{t+1}}) \\
k_5 &= a_{0,5} + a_{1,5}\cos(N_{S_t} \cdot N_{G_{2,t+1}}) + a_{2,5}\sin(N_{S_t} \cdot N_{G_{2,t+1}}) \\
k_6 &= a_{0,6} + a_{1,6}\cos(N_{S_t} \cdot N_{CD_{t+1}}) + a_{2,6}\sin(N_{S_t} \cdot N_{CD_{t+1}}) \\
k_7 &= a_{0,7} + a_{1,7}\cos(N_{G_{2,t}} \cdot N_{G_{2,t+1}}) + a_{2,7}\sin(N_{G_{2,t}} \cdot N_{G_{2,t+1}}) \\
k_8 &= a_{0,8} + a_{1,8}\cos(N_{G_{2,t}} \cdot N_{G_{1,t+1}}) + a_{2,8}\sin(N_{G_{2,t}} \cdot N_{G_{1,t+1}}) \\
k_9 &= a_{0,9} + a_{1,9}\cos(N_{G_{2,t}} \cdot N_{CD_{t+1}}) + a_{2,6}\sin(N_{G_{2,t}} \cdot N_{CD_{t+1}}) \\
k_{10} &= 1
\end{aligned}$$, **Εξίσωση 64**

Το σύστημα της **Εξίσωσης 64**, μπορεί να γραφεί σε γενική μορφή πιο απλά:

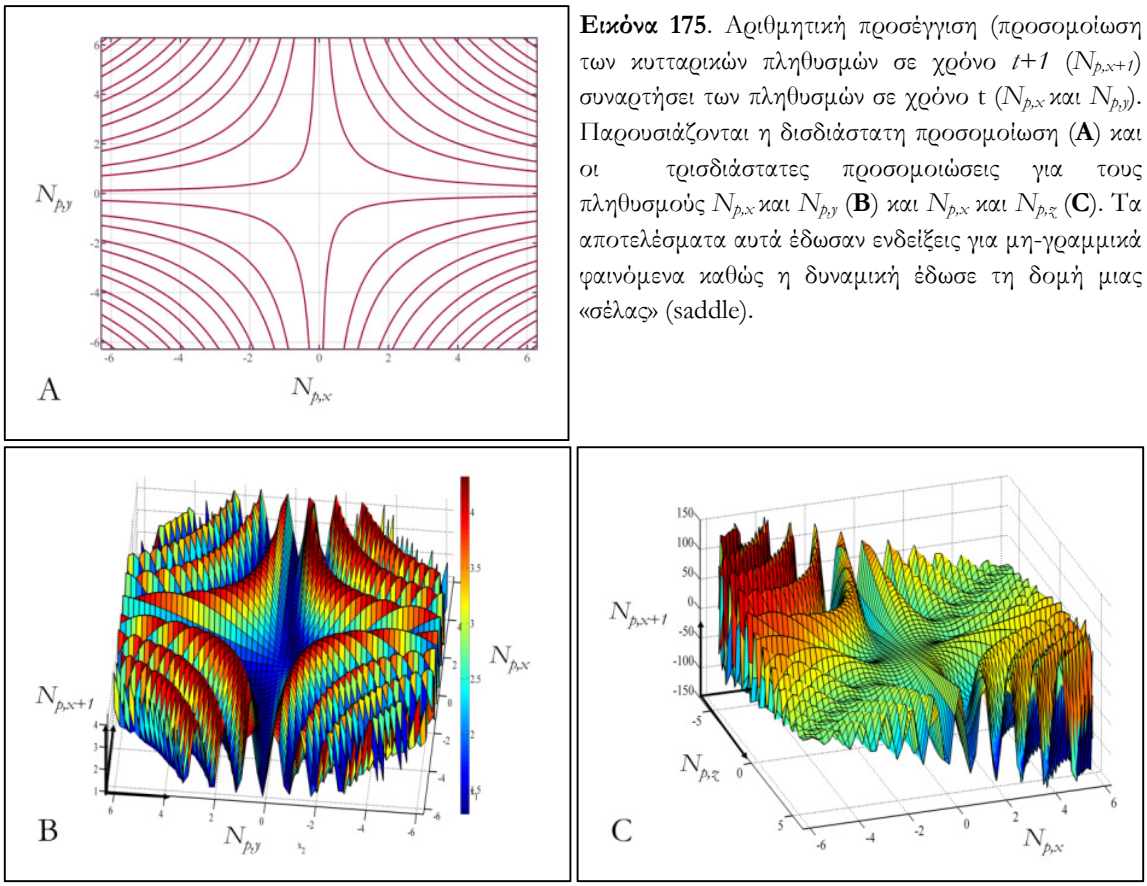
$$k = a_0 + a_1\cos(N_{p_{y,z},t}N_{p_x,t+1}) + a_2\sin(N_{p_{y,z},t}N_{p_x,t+1})$$, **Εξίσωση 65**

Όπου, *k* είναι ο ρυθμός μεταβολής από τη μια χρονική στιγμή στην επόμενη του εκάστοτε κυτταρικού υποπληθυσμού, $a_{0,1,2}$ είναι σταθερές, $N_{p1,t}$ and $N_{p2,t+1}$ είναι οι πληθυσμοί που συμμετέχουν στη μετάβαση από το χρόνο *t* στο χρόνο *t+1* αντίστοιχα. Αντικαθιστώντας την **Εξίσωση 65** στην **Εξίσωση 62** ισχύει η γενική διατύπωση για κάθε κυτταρικό πληθυσμό $N_{p,t+1}$:

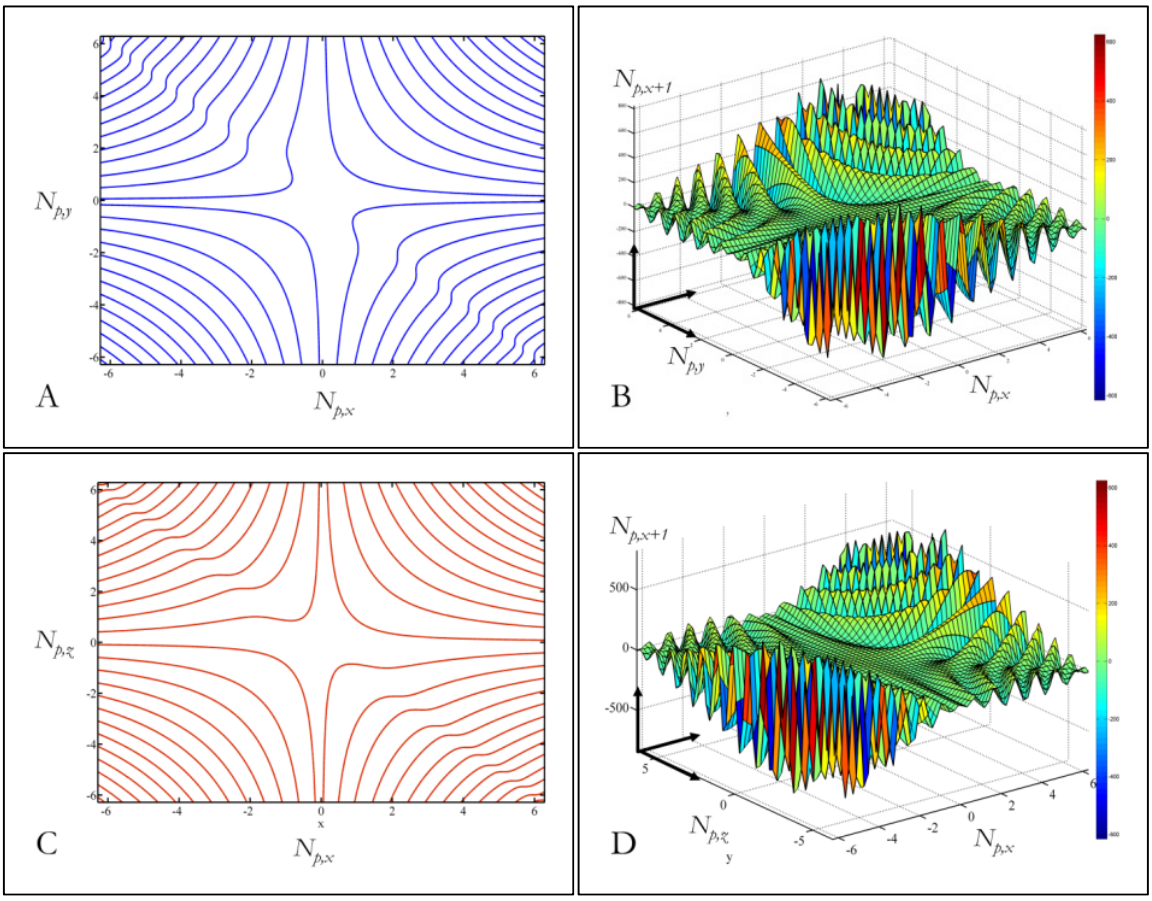
$$\begin{aligned}
N_{p_{x,t+1}} &= N_{p_{y,t}}\left[a_0 + a_1\cos\left(N_{p_{y,t}}N_{p_{x,t+1}}\right) + a_2\sin\left(N_{p_{y,t}}N_{p_{x,t+1}}\right)\right] \\
&+ N_{p_{y,t}}\left[a_0 + a_1\cos\left(N_{p_{z,t}}N_{p_{x,t+1}}\right) + a_2\sin\left(N_{p_{z,t}}N_{p_{x,t+1}}\right)\right]
\end{aligned}$$, **Εξίσωση 66**

Η συνάρτηση αυτή ενδεχομένως δεν μπορεί να λυθεί αναλυτικά αλλά μόνο με αριθμητικές μεθόδους, προσομοιώσεις. Έχει ενδιαφέρον διότι δείχνει ότι οι μελλοντικοί πληθυσμοί (N_x) εξαρτώνται από τις προηγούμενες καταστάσεις του συστήματος αλλά και από τις μελλοντικές καταστάσεις των άλλων κυτταρικών υποπληθυσμών ($N_{y,z}$).

Στις επόμενες εικόνες παρουσιάζεται η προσομοίωση των πληθυσμών $N_{p,x}$, $N_{p,y}$ και $N_{p,z}$ τόσο για την **Εξίσωση 62** και **Εξίσωση 66** όσο και για την πρώτη μερική παράγωγο των συναρτήσεων αυτών (**Εικόνα 175** και **Εικόνα 176**).



Εικόνα 175. Αριθμητική προσέγγιση (προσομοίωση των κυτταρικών πληθυσμών σε χρόνο *t+1* ($N_{p,x+1}$) συναρτήσει των πληθυσμών σε χρόνο t ($N_{p,x}$ και $N_{p,y}$). Παρουσιάζονται η δισδιάστατη προσομοίωση (**A**) και οι τρισδιάστατες προσομοιώσεις για τους πληθυσμούς $N_{p,x}$ και $N_{p,y}$ (**B**) και $N_{p,x}$ και $N_{p,z}$ (**C**). Τα αποτελέσματα αυτά έδωσαν ενδείξεις για μη-γραμμικά φαινόμενα καθώς η δυναμική έδωσε τη δομή μιας «σέλας» (saddle).



Εικόνα 176. Γραφική αναπαράσταση της πρώτης μερικής παραγώγου των κυτταρικών πληθυσμών, που υποδεικνύει την ταχύτητα μετάβασης του συστήματος από το ένα στάδιο στο επόμενο, όπως διατυπώθηκαν στον μοντέλο μετάβασης από τη μια χρονική στιγμή στην επόμενη. Παρουσιάζεται ο πληθυσμός $N_{p,x+1}$ συναρτήσει των πληθυσμών $N_{p,x}$ και $N_{p,y}$ (**A**, **B**) και $N_{p,x+1}$ συναρτήσει των πληθυσμών $N_{p,x}$ και $N_{p,z}$ (**C**, **D**).

Οι παραπάνω διατυπώσεις έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον διότι χαρακτηρίζουν το μη-γραμμικό χαρακτήρα όχι μόνο του κυτταρικού πληθυσμού αλλά δείχνουν ότι και οι επιμέρους υπο-πληθυσμοί χαρακτηρίζονται από μη-γραμμικά φαινόμενα. Επίσης έχει ενδιαφέρον να διατυπώσουμε ότι η **Εξίσωση 62**, ισχύει για κάθε πληθυσμό και σε οποιεσδήποτε συνθήκες, είτε αυτές αποτελούν φυσιολογική ανάπτυξη κυττάρων είτε υπό την επίδραση στρες όπως χημειοθεραπεία ή άλλο περιβαλλοντικό στρες.

Η δυναμική των υποπληθυσμών δείχνει επίσης ότι υπάρχουν μη-γραμμικά φαινόμενα τόσο για τον πληθυσμό αυτό καθ' εαυτό όσο και για την ταχύτητα μετάβασης του (**Εικόνα 175**, **Εικόνα 176**).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 27

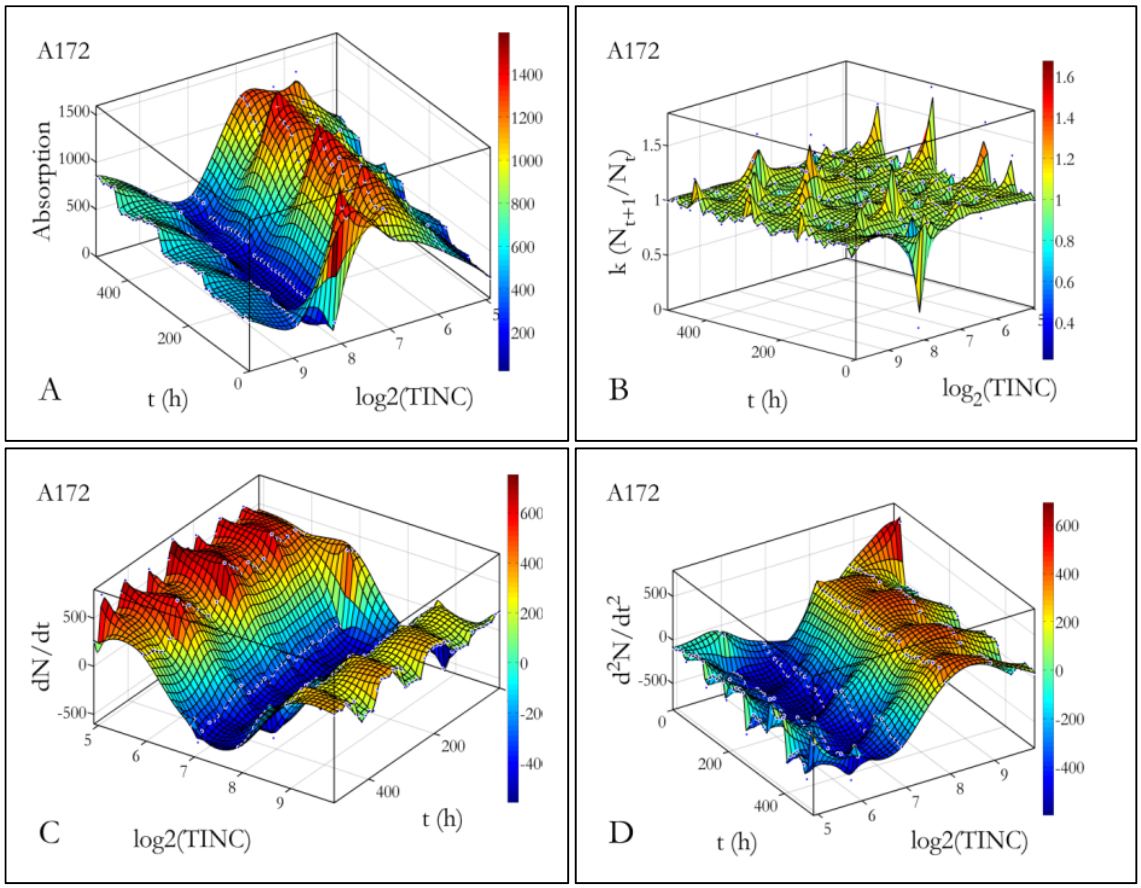
IN VITRO ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ-ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΧΡΟΝΟΣΕΙΡΩΝ (TIME-SERIES EXPERIMENTS)

Τα πειράματα χρονοσειρών αποτελούν την τελευταία μορφή ανάλυσης της πολλαπλασιαστικής δυναμικής. Όπως υποδηλώνει και το όνομά τους αφορούν σε μετρήσεις κυτταρικών πληθυσμών σε συνάρτηση με το χρόνο. Οι χρονοσειρές χρησιμοποιούνται σε μεγάλο φάσμα εφαρμογών που περιλαμβάνει από την επεξεργασία σήματος μέχρι τη βιολογία και τη μακροοικονομική και χρηματοοικονομική. Στα πειράματα που έγιναν για τη μελέτη των κυτταρικών πληθυσμών, κύτταρα αφέθηκαν να αυξηθούν σε σταθερές συνθήκες τροφής, χώρου και συγκεκριμένους αρχικούς αριθμούς. Οι μετρήσεις ακολούθησαν 12-ωρο ρυθμό εκτός των κυττάρων σε εναιώρημα (CCRFCEM) που ακολουθήθηκε 24-ωρη μέτρηση. Για τα κύτταρα σε επικολλώμενη μορφή (A172, 1321N1, TE671) χρησιμοποιήθηκαν έξι αρχικοί κυτταρικοί πληθυσμοί ήτοι 30, 60, 120, 240, 480 και 960 κύτταρα ενώ για τα κύτταρα σε εναιώρημα (CCRFCEM) χρησιμοποιήθηκαν οι αρχικοί πληθυσμοί 20 και 200 κυττάρων αντίστοιχα. Μετρήθηκαν και υπολογίσθηκαν διάφορες μεταβλητές, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η ταχύτητα πολλαπλασιασμού, η επιτάχυνση πολλαπλασιασμού καθώς και ο ρυθμός πολλαπλασιασμού.

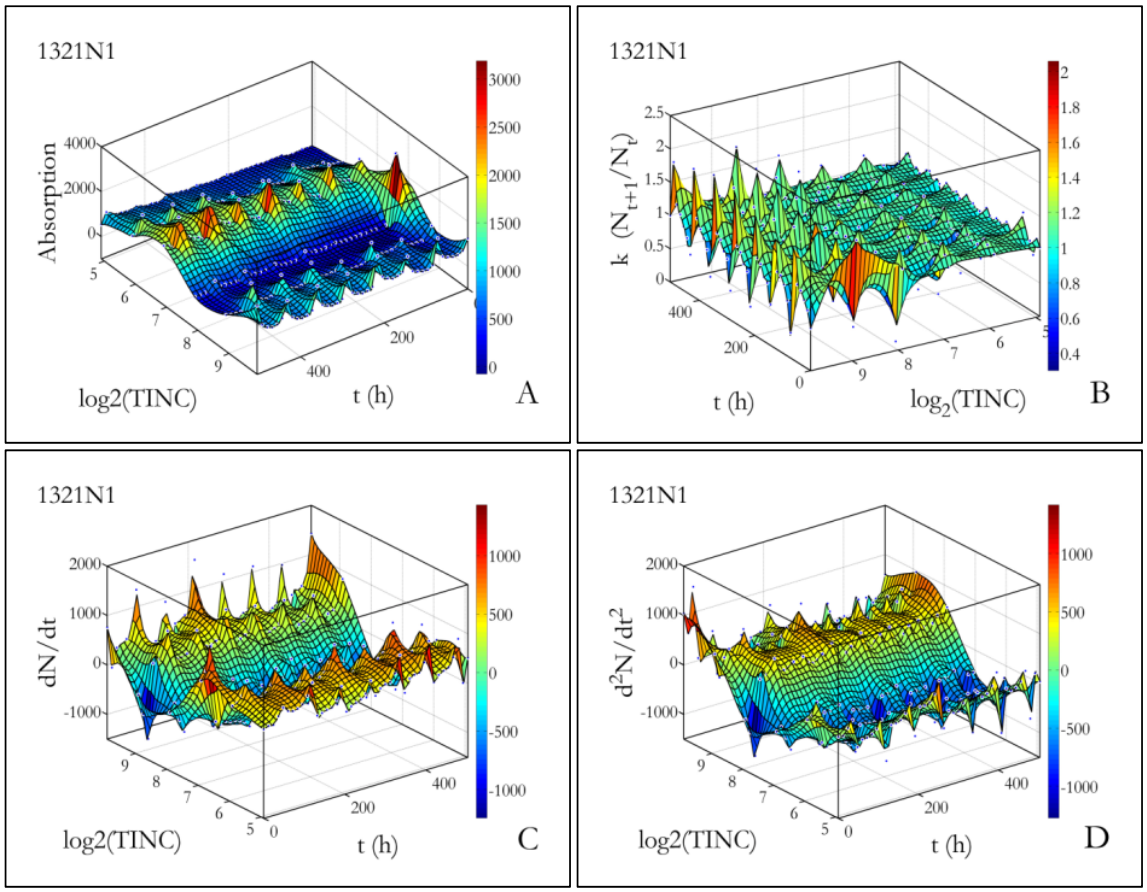
Στο σημείο αυτό θα ήταν χρήσιμο να υπενθυμίσουμε τη σημασία των μεταβλητών που υπολογίσθηκαν καθώς και τις διαφορές τους. Μια εύλογη ερώτηση θα ήταν, ποια είναι η διαφορά μεταξύ του ρυθμού πολλαπλασιασμού και της ταχύτητας πολλαπλασιασμού. Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού, όπως τον περιγράψαμε και στο προηγούμενο κεφάλαιο αφορά στον τρόπο που μεταβαίνουν τα κύτταρα από τη μια χρονική στιγμή στην επόμενη. Δεν περιλαμβάνει απαραίτητα την έννοια του χρόνου αλλά συσχετίζει δύο καταστάσεις (states) ενός συστήματος και είναι εξαρτώμενη από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, εν προκειμένω η τροφή και ο χώρος. Ανάλογα η ταχύτητα πολλαπλασιασμού (αλλά και η επιτάχυνση) αφορά στη μεταβολή του πληθυσμού σε άμεση συνάρτηση με το χρόνο. Στην πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήσαμε ορίσαμε την ταχύτητα ως την πρώτη παράγωγο της μεταβολής του πληθυσμού σε κάθε σημείο της καμπύλης πολλαπλασιασμού που προέκυψε από τις χρονικές μετρήσεις, ήτοι τη χρονοσειρά για κάθε κυτταρική σειρά. Έτσι, ενώ ο ρυθμός πολλαπλασιασμού k περιγράφει το πώς μεταβάλλεται ο κυτταρικός πληθυσμός, η ταχύτητα πολλαπλασιασμού dN/dt (όπου N είναι ο κυτταρικός πληθυσμός) περιγράφει πόσο γρήγορα γίνεται αυτό. Αντίστοιχα η επιτάχυνση, περιγράφει πόσο γρήγορα μεταβάλλεται η ταχύτητα του πολλαπλασιασμού. Εδώ υπάρχει μια παρατήρηση, τόσο η

ταχύτητα όσο και η επιτάχυνση δεν είναι συνεχή μεγέθη (τουλάχιστον για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό) αλλά διακριτά. Αυτό σημαίνει, και εύλογα, δεν μπορούν τα φυσικά αυτά μεγέθη να πάρουν τιμές 1.5, 2.34 ή 5.575 διότι δεν έχει κανένα βιολογικό νόημα. Τα κύτταρα μπορούμε να τα μετρήσουμε με ακέραιους αριθμούς δηλαδή μπορούμε να έχουμε πληθυσμό, 1, 4, 100, 1000, 10000 και ούτω καθεξής.

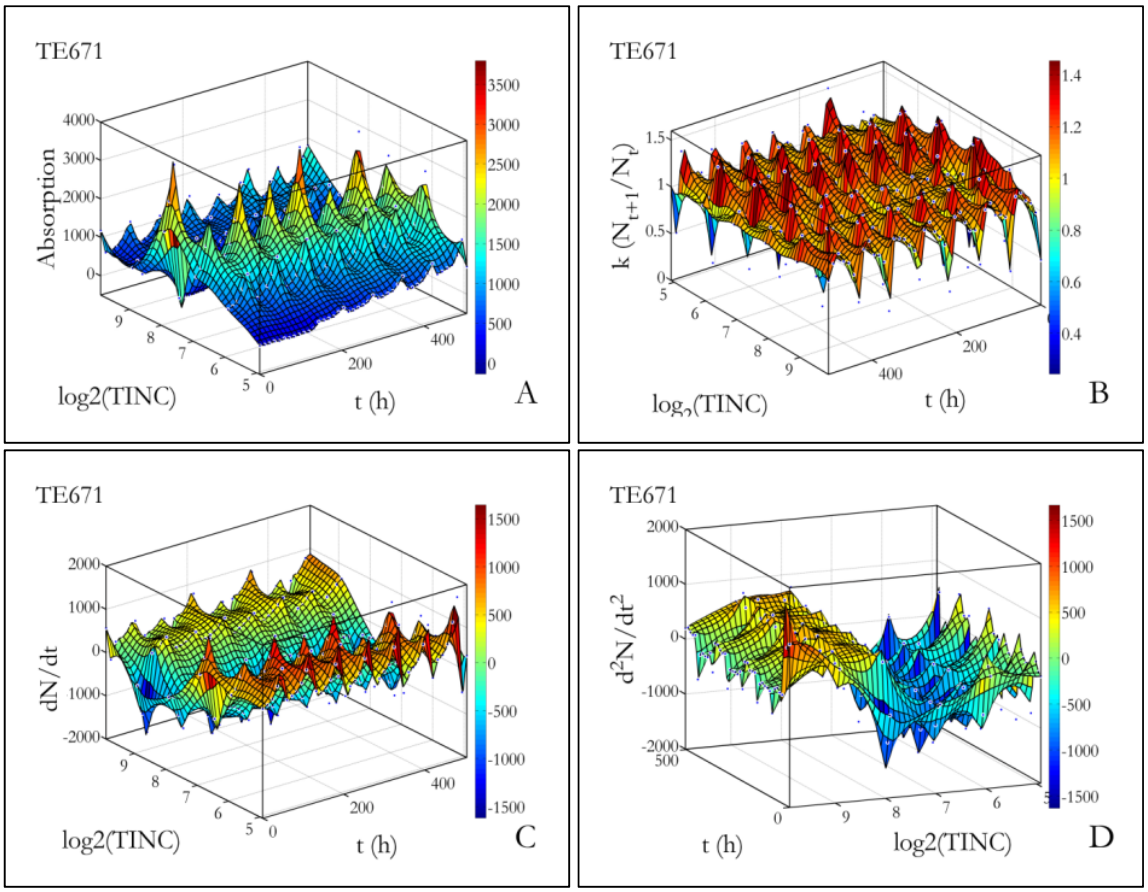
Ως εκ τούτου, στις παρακάτω εικόνες (**Εικόνα 177**-**Εικόνα 179**) παρουσιάζονται οι τρισδιάστατες απεικονίσεις των παραγόντων που αναφέραμε ήτοι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η ταχύτητα πολλαπλασιασμού, η επιτάχυνση και ο ρυθμός πολλαπλασιασμού.



Εικόνα 177. Διαγραμματική αναπαράσταση της χρονοσειράς των κυττάρων A172. Παρουσιάζονται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός (**A**), όπου στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t), στον άξονα των Y είναι ο λογάριθμος του αρχικού αριθμού κυττάρων (TINC) και στον άξονα των Z είναι ο φωτομετρική απορρόφηση. Ο παράγοντας πολλαπλασιασμού ήτοι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού (**B**), όπου στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t), στον άξονα των Y είναι ο λογάριθμος του αρχικού αριθμού κυττάρων (TINC) και στον άξονα των Z είναι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού εκφραζόμενος ως N_{t+1}/N_t. Η ταχύτητα πολλαπλασιασμού (**C**), όπου στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t), στον άξονα των Y είναι ο λογάριθμος του αρχικού αριθμού κυττάρων (TINC) και στον άξονα των Z είναι η ταχύτητα πολλαπλασιασμού εκφραζόμενη ως dN/dt. Τέλος, η επιτάχυνση πολλαπλασιασμού (**D**), όπου στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t), στον άξονα των Y είναι ο λογάριθμος του αρχικού αριθμού κυττάρων (TINC) και στον άξονα των Z είναι η επιτάχυνση πολλαπλασιασμού εκφραζόμενη ως d^2N/dt^2.

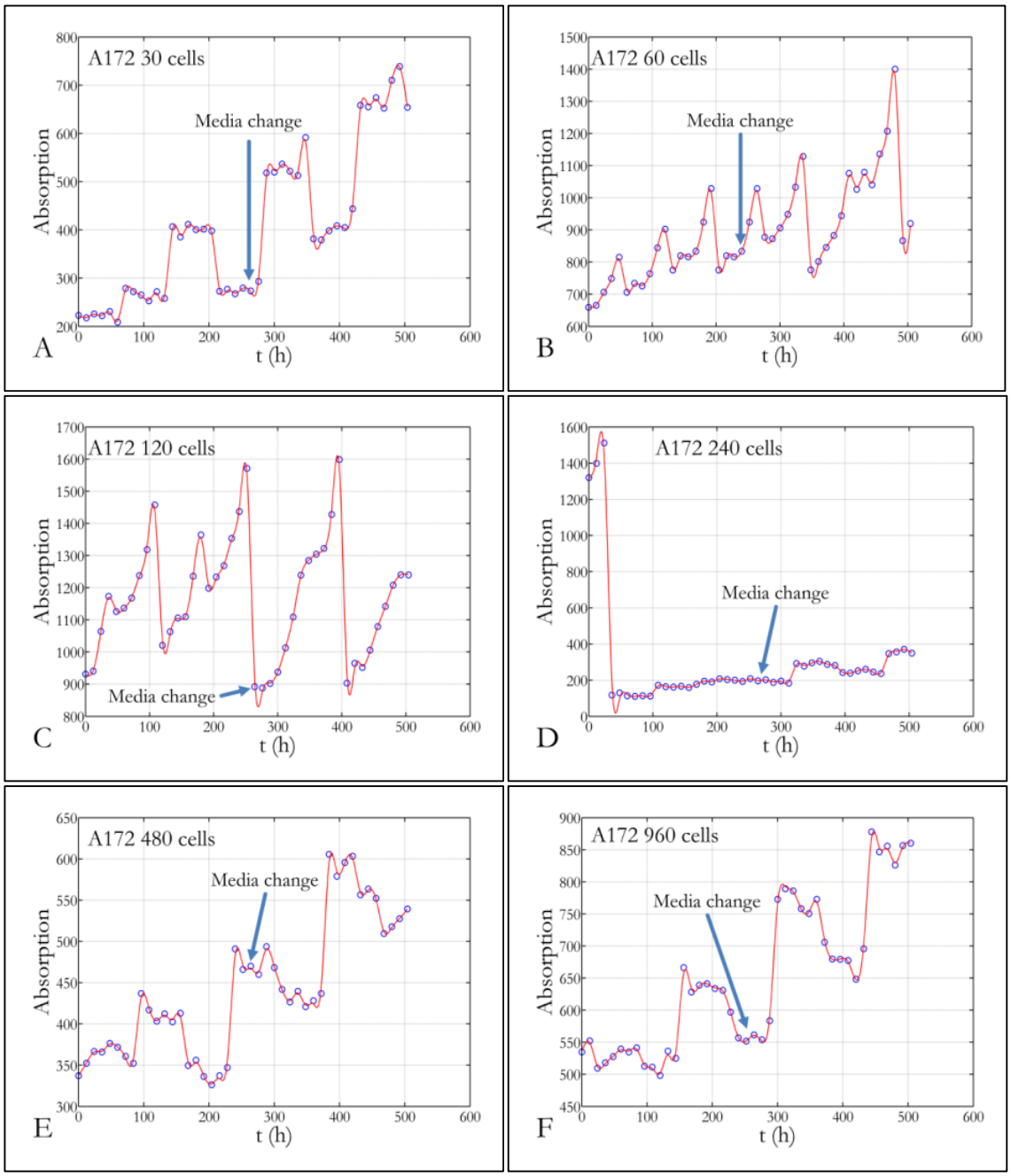


Εικόνα 178. Διαγραμματική αναπαράσταση της χρονοσειράς των κυττάρων 1321N1. Παρουσιάζονται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός (**A**), όπου στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t), στον άξονα των Y είναι ο λογάριθμος του αρχικού αριθμού κυττάρων (TINC) και στον άξονα των Z είναι ο φωτομετρική απορρόφηση. Ο παράγοντας πολλαπλασιασμού ήτοι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού (**B**), όπου στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t), στον άξονα των Y είναι ο λογάριθμος του αρχικού αριθμού κυττάρων (TINC) και στον άξονα των Z είναι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού εκφραζόμενος ως N_{t+1}/N_t. Η ταχύτητα πολλαπλασιασμού (**C**), όπου στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t), στον άξονα των Y είναι ο λογάριθμος του αρχικού αριθμού κυττάρων (TINC) και στον άξονα των Z είναι η ταχύτητα πολλαπλασιασμού εκφραζόμενη ως dN/dt. Τέλος, η επιτάχυνση πολλαπλασιασμού (**D**), όπου στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t), στον άξονα των Y είναι ο λογάριθμος του αρχικού αριθμού κυττάρων (TINC) και στον άξονα των Z είναι η επιτάχυνση πολλαπλασιασμού εκφραζόμενη ως d^2N/dt^2.

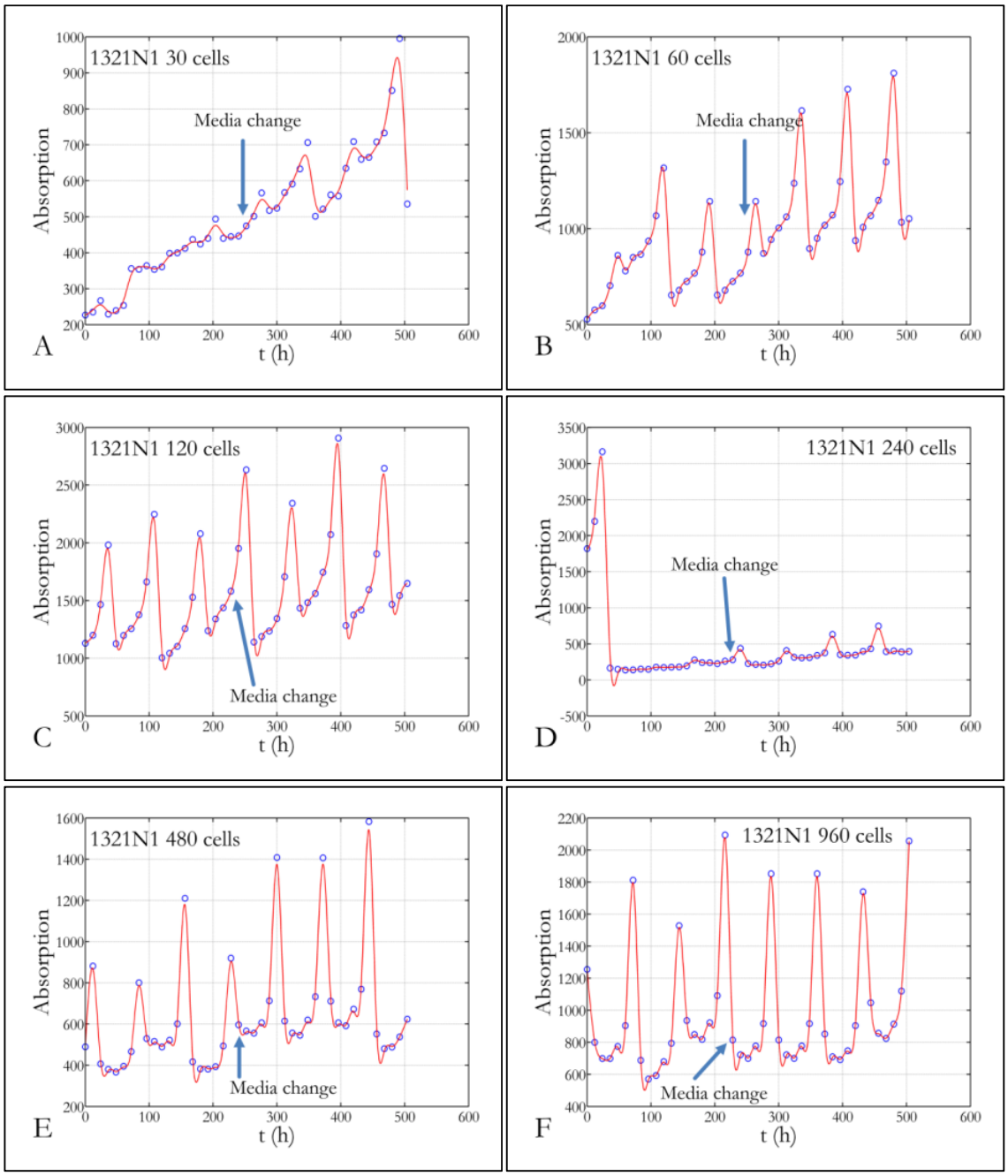


Εικόνα 179. Διαγραμματική αναπαράσταση της χρονοσειράς των κυττάρων TE671. Παρουσιάζονται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός (**A**), όπου στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t), στον άξονα των Y είναι ο λογάριθμος του αρχικού αριθμού κυττάρων (TINC) και στον άξονα των Z είναι ο φωτομετρική απορρόφηση. Ο παράγοντας πολλαπλασιασμού ήτοι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού (**B**), όπου στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t), στον άξονα των Y είναι ο λογάριθμος του αρχικού αριθμού κυττάρων (TINC) και στον άξονα των Z είναι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού εκφραζόμενος ως N_{t+1}/N_t. Η ταχύτητα πολλαπλασιασμού (**C**), όπου στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t), στον άξονα των Y είναι ο λογάριθμος του αρχικού αριθμού κυττάρων (TINC) και στον άξονα των Z είναι η ταχύτητα πολλαπλασιασμού εκφραζόμενη ως dN/dt. Τέλος, η επιτάχυνση πολλαπλασιασμού (**D**), όπου στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t), στον άξονα των Y είναι ο λογάριθμος του αρχικού αριθμού κυττάρων (TINC) και στον άξονα των Z είναι η επιτάχυνση πολλαπλασιασμού εκφραζόμενη ως d^2N/dt^2.

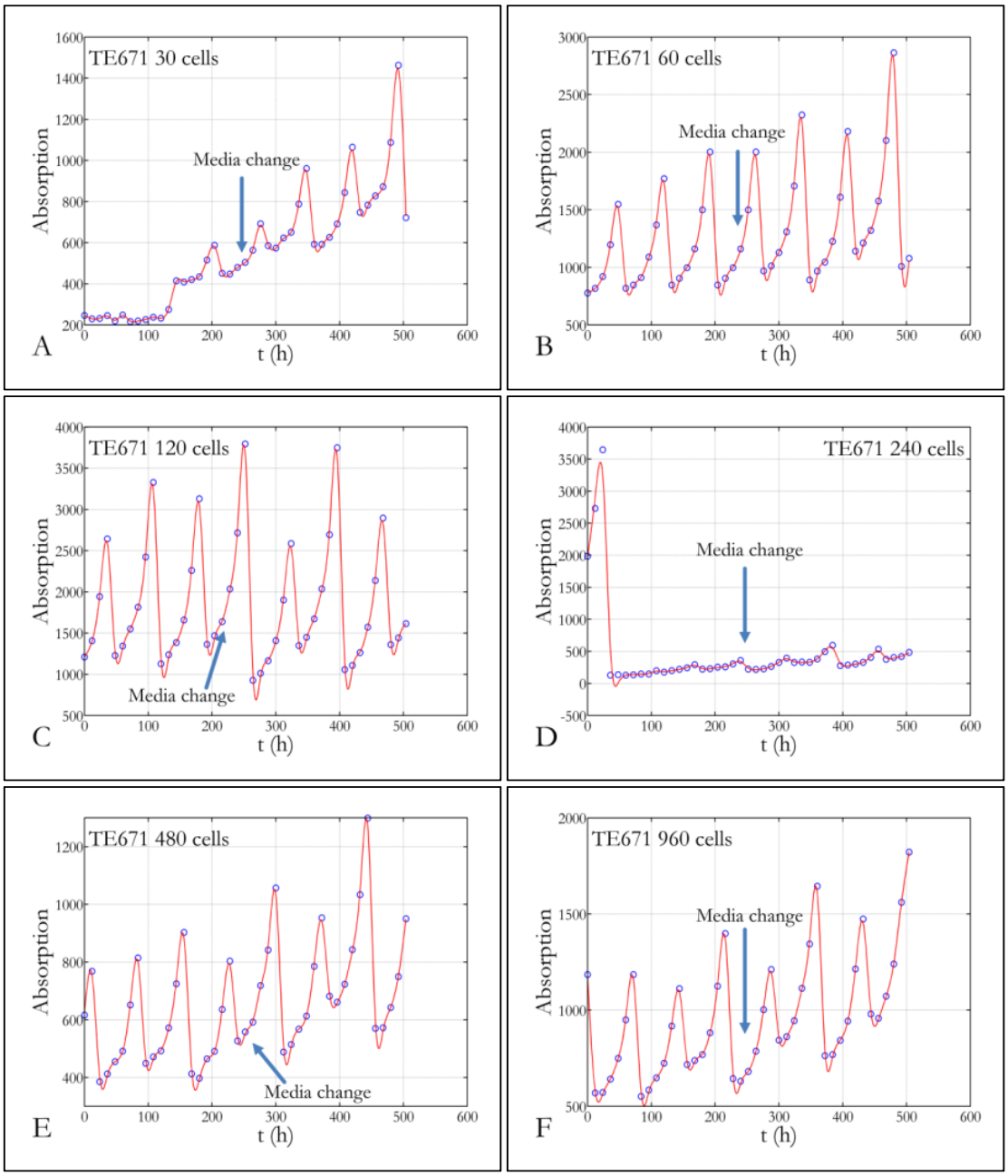
Αντίστοιχα για να έχουμε μια καλύτερη εικόνα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού διαχωρίσαμε τις επιμέρους καμπύλες πολλαπλασιασμού και τις παρουσιάζουμε στις παρακάτω εικόνες (**Εικόνα 180**-**Εικόνα 183**), όπου περιλαμβάνουμε και την κυτταρική σειρά CCRFCEM.



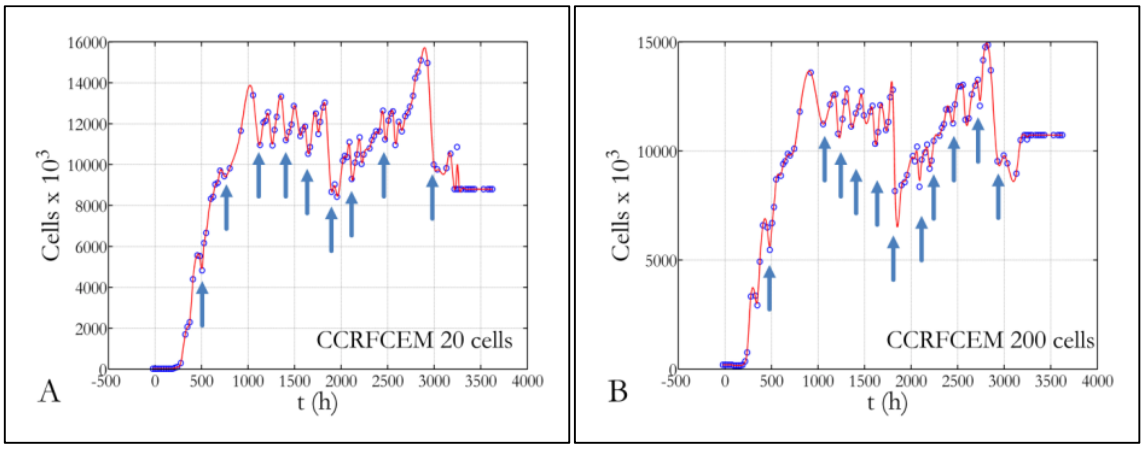
Εικόνα 180. Διαγραμματική παρουσίαση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ανά αρχικό αριθμό κυττάρων για τα κύτταρα A172. Στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t) και στον άξονα των Y είναι η φωτομετρική απορρόφηση.



Εικόνα 181. Διαγραμματική παρουσίαση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ανά αρχικό αριθμό κυττάρων για τα κύτταρα 1321N1. Στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t) και στον άξονα των Y είναι η φωτομετρική απορρόφηση.



Εικόνα 182. Διαγραμματική παρουσίαση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ανά αρχικό αριθμό κυττάρων για τα κύτταρα TE671. Στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t) και στον άξονα των Y είναι η φωτομετρική απορρόφηση.



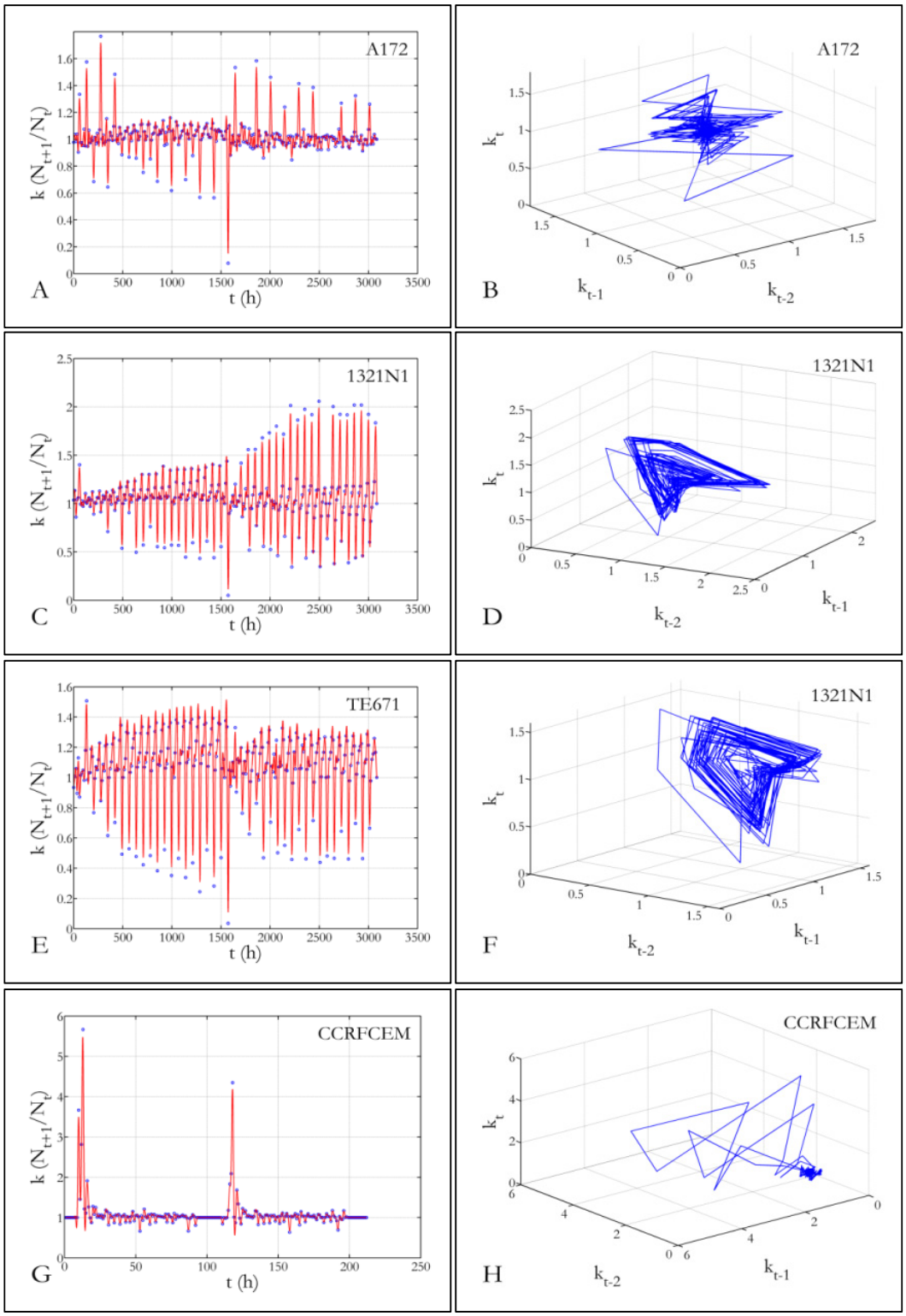
Εικόνα 183. Διαγραμματική παρουσίαση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ανά αρχικό αριθμό κυττάρων για τα κύτταρα CCRFCEM. Στον άξονα των X είναι ο χρόνος (t) και στον άξονα των Y είναι ο κυτταρικός πληθυσμός σε κύτταρα ανά μl. Τα βέλη υποδεικνύουν τα χρονικά σημεία, όπου υπήρχε αλλαγή του θρεπτικού υλικού.

Ειδικά για τα κύτταρα CCRFCEM, η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήσαμε είναι η μεγαλύτερη σε διάρκεια στη μέχρι σήμερα γνωστή σε εμάς βιβλιογραφία και η μοναδική στο είδος της. Έχει γίνει μια εργασία από άλλη ομάδα των *Wolfrom et al.* (2000), στην οποία μελετήθηκαν προσκολλώμενα κύτταρα σε εβδομαδιαίες μετρήσεις. Η μελέτη μας όμως είναι η μεγαλύτερη σε συνεχή μελέτη κυττάρων ως προς τον πληθυσμό. Η διάταξη μας έδειξε τη μη-γραμμικότητα των κυτταρικών πληθυσμών για τα CCRFCEM, όπως έχουμε αναφερθεί σε προηγούμενη εργασία μας.

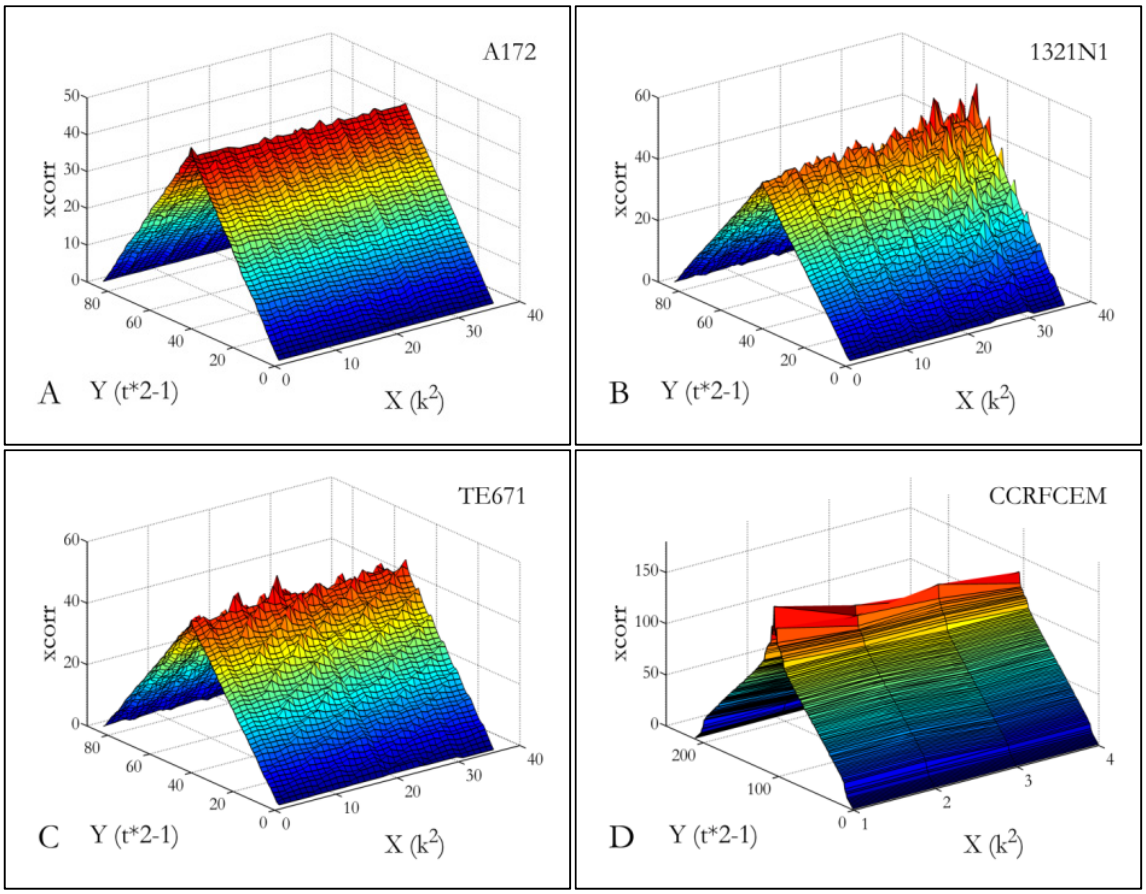
Αφού αναφερθήκαμε στον παράγοντα του ρυθμού πολλαπλασιασμού, για να μπορέσουμε να αποκτήσουμε μια καλύτερη εποπτική εικόνα αυτού του παράγοντα, χρησιμοποιήσαμε μια τεχνική οπτικοποίησης του επικολλώντας τους επιμέρους ρυθμούς πολλαπλασιασμού με αύξουσα σειρά από το μικρότερο αρχικό πληθυσμό κυττάρων προς το μεγαλύτερο. Αυτό μπορούσε να γίνει διότι όλοι οι παράγοντες ανά κυτταρική σειρά θεωρούντο σταθεροί, δηλαδή η τροφή και ο χώρος ήταν τα ίδια για όλες τις πειραματικές μας διατάξεις. Τοποθετώντας τους ρυθμούς πολλαπλασιασμού σε σειριακή μορφή, είδαμε μια πολύ ενδιαφέρουσα διάταξη και αλλαγή του k καθώς μεταβάλλεται ο αρχικός αριθμός των κυττάρων. Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι, όπως και στα προηγούμενα κεφάλαια, ο παράγοντας *k* συμπεριφέρεται με ημι-περιοδικό, ταλαντωτικό τρόπο, κάτι που παρουσιάζεται πολύ ωραία στην **Εικόνα 184** για όλους τους κυτταρικούς τύπους. Στο μετασχηματισμό αυτό υπολογίσαμε τους εκθέτες *Lyapunov* και βρέθηκαν σε όλους του ρυθμούς πολλαπλασιασμού μεγαλύτεροι του μηδενός ($h(x_1)>0$). Υπάρχει λοιπόν σημαντική ένδειξη για τη μη-γραμμικότητα του φαινομένου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπως φάνηκε και από τα προηγούμενα αποτελέσματα.

Όπως φαίνεται από την **Εικόνα 184**, η μεταβολή του ρυθμού πολλαπλασιασμού, παρά το γεγονός ότι αφορά σε διαφορετικούς αρχικούς αριθμούς δίνει την εικόνα ότι έχει μια συνέχεια και μάλιστα

δείχνει σαν να είναι συνεχής. Από την παρατήρηση αυτή προκύπτει ότι όπως επιβεβαιώθηκε και σε προηγούμενα πειράματα που παρουσιάσαμε, οι ταλαντώσεις και η συνάρτηση μεταβολής του κυτταρικού πληθυσμού είναι άμεσα εξαρτώμενες του αρχικού αριθμού κυττάρων. Επίσης προκύπτει ένα βασικό ερώτημα. Αν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των ρυθμών πολλαπλασιασμού τότε πρέπει αντίστοιχα να προκύπτει μια διαφορά από τον ένα ρυθμό στον επόμενο καθώς προχωρούμε από τους μικρότερους αρχικούς αριθμούς στους μεγαλύτερους. Για να απαντήσουμε το ερώτημα αυτό χρησιμοποιήσαμε μια τεχνική που εφαρμόζεται στην αναζήτηση συσχετίσεων σε χρονοσειρές και πιο συγκεκριμένα σε χρονοσειρές σημάτων. Ο αλγόριθμος που χρησιμοποιήσαμε συνέκρινε τους ρυθμούς πολλαπλασιασμού ανά ζεύγη υπολογίζοντας το αποτέλεσμα της ζεύξης τους και πιο σήμα προκύπτει από αυτή. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στην **Εικόνα 185**.



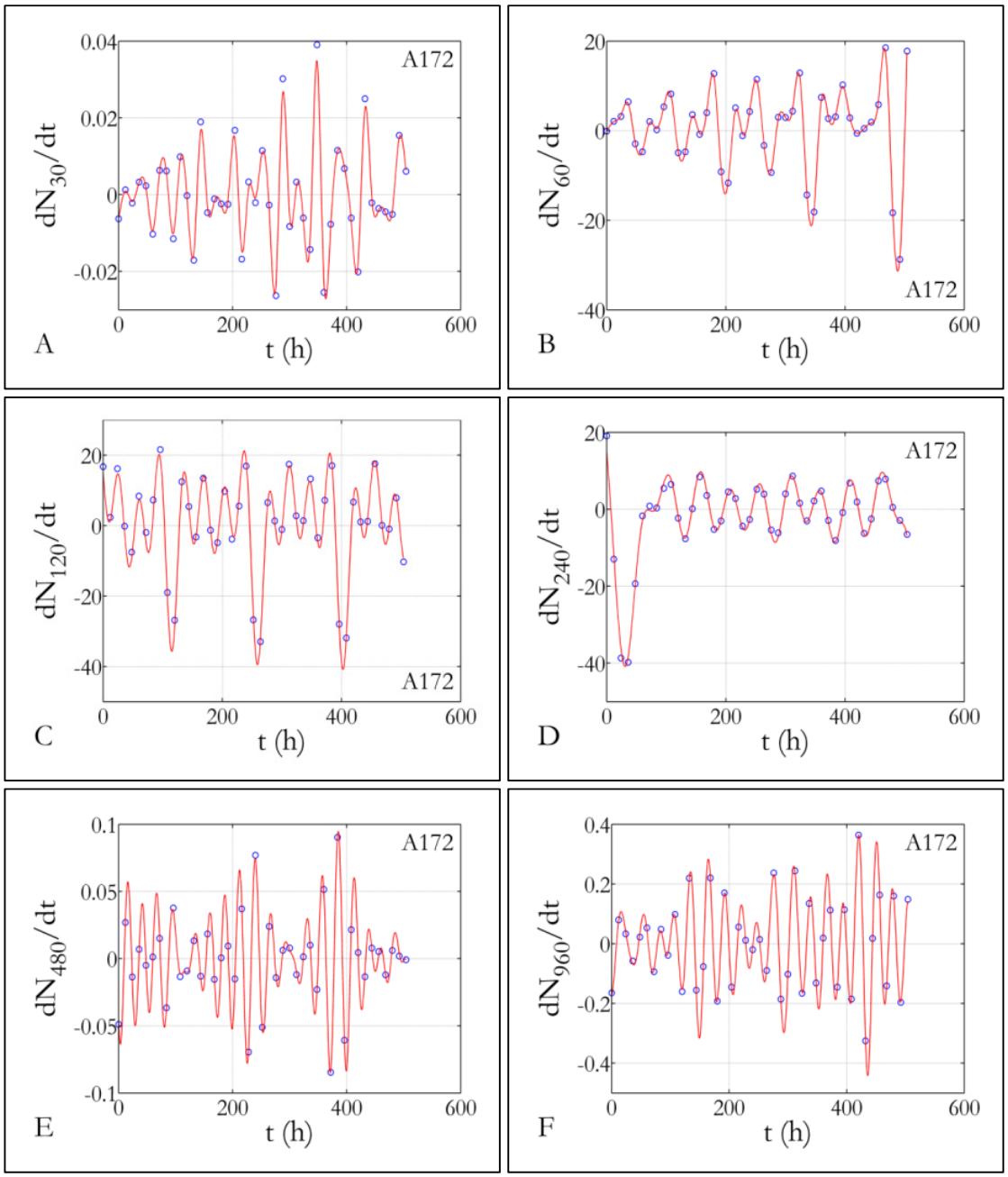
Εικόνα 184. Γραφική αναπαράσταση του ρυθμού πολλαπλασιασμού όλων των κυττάρων A172 (**A**, **B**), 1321N1 (**C**, **D**), TE671 (**E**, **F**) και CCRFCEM (**G**, **H**), όπου παρουσιάζεται ο ρυθμός πολλαπλασιασμού σε μορφή ενιαίας χρονοσειράς (αριστερή στήλη για κάθε κυτταρικό τύπο αντίστοιχα) και phase-space διαγράμματα του ρυθμού πολλαπλασιασμού σε συνάρτηση με τις χρονικές στιγμές t-2 και t-1 (δεξιά στήλη για κάθε κυτταρικό τύπο αντίστοιχα).



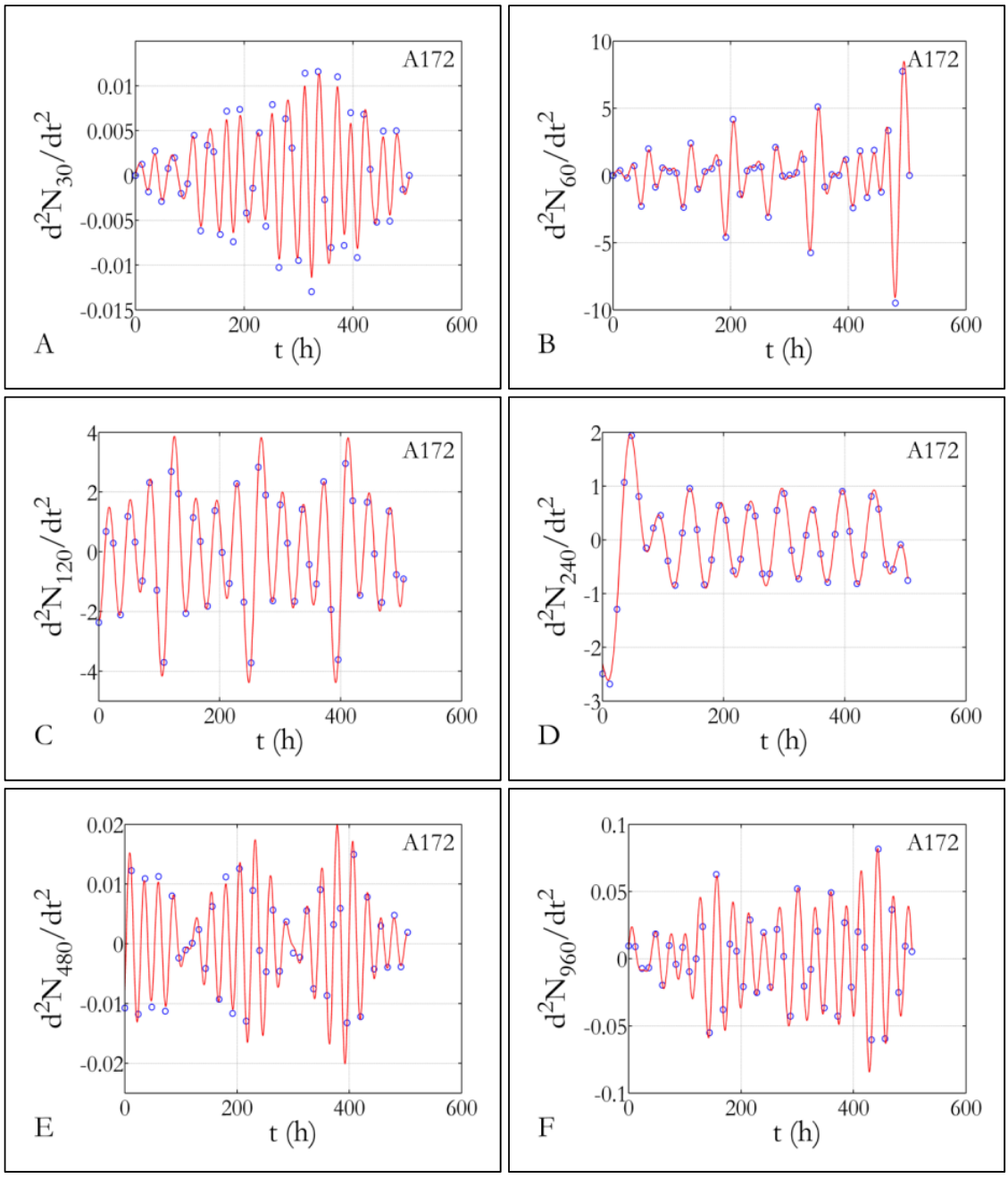
Εικόνα 185. Συσχέτιση (cross-correlation) του ρυθμού πολλαπλασιασμού (k) για κάθε αρχικό αριθμό κυττάρων και κάθε κυτταρικό τύπο ήτοι για τα κύτταρα A172 (**A**), 1321N1 (**B**), TE671 (**C**), CCRFCEM (**D**). Για τη συσχέτιση χρησιμοποιήθηκαν όλοι οι ρυθμοί πολλαπλασιασμού σε μορφή ενός πίνακα διαστάσεων *m*×*n* (στο παράδειγμα αυτό 45×6)Στον άξονα των X βρίσκονται όλοι οι συνδυασμοί των επιμέρους αρχικών πληθυσμών και ισούται με *πλήθος(k)²=n²* (στο συγκεκριμένο παράδειγμα ο αρχικός αριθμός των κυττάρων είχε έξι παραλλαγές, από 30 έως 960 κύτταρα, οπότε ο άξονας των X αποτελείται από 36 σημεία), στον άξονα των Y είναι το πλήθος των χρονικών στιγμών, όπως έχει μετασχηματισθεί από τον αλγόριθμο συσχέτισης (είναι ίσο με το *πλήθος των χρονικών στιγμών*2 μείον 1*, ήτοι *m*2-1=94*) και στον άξονα των Z βρίσκεται η τιμή της συσχέτισης.

Το σχήμα που προκύπτει από την ανάλυση της συσχέτισης έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον μιας και έδωσε το σχήμα μιας «στέγης». Παρατηρούμε στην **Εικόνα 185B** και **Εικόνα 185C**, την εμφάνιση κάποιων κορυφών οι οποίες εμφανίζονται σε όλο το μήκος του σχήματος. Η τριγωνική αυτή μορφή που παρουσιάσθηκε από την συσχέτιση των παραγόντων k είναι παρόμοια με το σήμα που παίρνει κανείς αν συσχέτιση δύο ορθογώνια σήματα. Τόσο το αποτέλεσμα στην **Εικόνα 184** όσο και στην **Εικόνα 185**, μας έδωσε μια ένδειξη για μια άλλη ιδιότητα το κυτταρικού πολλαπλασιασμού, που αφορά στην αυτό-ομοιότητα ή αλλιώς σε πιο τεχνικούς όρους τη διάσταση *fractal*. Θα αναφερθούμε σε αυτή την ανάλυση στο τέλος του κεφαλαίου αυτού ως μια μελέτη περίπτωσης.

Σε συνέχεια αυτών των αναλύσεων μελετήσαμε τις ιδιότητες της ταχύτητας και επιτάχυνσης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στις κυτταρικές σειρές. Τα αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέροντα μιας και έδειξαν ότι τόσο η ταχύτητα όσο και η επιτάχυνση ακολουθούν ημιτονοειδής καμπύλες, οι οποίες μπορούσαν να προσομοιωθούν άριστα με αθροίσματα ημιτόνων. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται ενδεικτικά στις παρακάτω εικόνες (**Εικόνα 186**-**Εικόνα 187**), όπου φαίνονται η ταχύτητα και επιτάχυνση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού για τα κύτταρα A172 και για όλους τους επιμέρους αρχικούς αριθμούς κυττάρων. Είναι εξαιρετικά ενδιαφέρον πόσο μεταβάλλονται τα φυσικά μεγέθη που περιγράψαμε συναρτήσει του αρχικού πληθυσμού κυττάρων. Ως εύλογο ερώτημα θα μπορούσε να πει κανείς ότι είναι αναμενόμενο να συμβαίνει κάτι τέτοιο. Δεν είναι όμως έτσι. Αν υποθέσουμε ότι τα κύτταρα ανεξαρτήτως αρχικού πληθυσμού διπλασιάζονται κάθε 24 ώρες, τότε τα κύτταρα που θα ξεκινούσαν από τα 30 κύτταρα το επόμενο 24-ωρο θα γινόντουσαν 60. Διαιρώντας με τη διαφορά του χρόνου θα υπολογίζαμε ότι η ταχύτητα πολλαπλασιασμού θα ήταν 30/24 κύτταρα/24h. Αντίστοιχα αν έχουμε 60 κύτταρα τότε σε 24 ώρες θα είχαμε 120 κύτταρα και άρα 60/24 κύτταρα/24h. Ακριβώς το διπλάσιο δηλαδή. Βλέπουμε ότι αυτό δεν ισχύει στα πειραματικά δεδομένα και ο λόγος είναι η μη-γραμμική φύση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Επίσης έχει ενδιαφέρον να σημειώσουμε ότι αν υπολογίσουμε το ρυθμό πολλαπλασιασμού στα δύο παραδείγματα μας, τότε θα δούμε ότι ο παράγοντας k ισούται και στις δύο περιπτώσεις με 2.

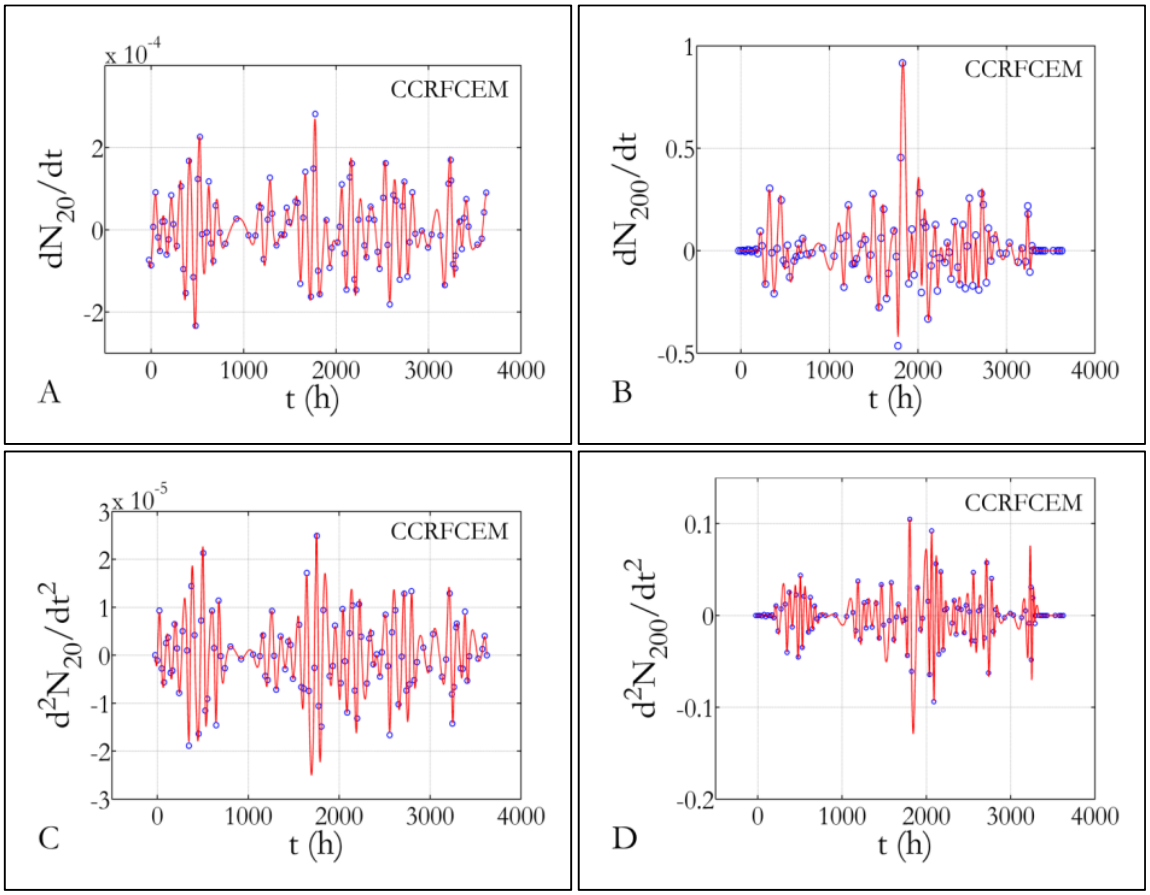


Εικόνα 186. Διαγραμματική αναπαράσταση της ταχύτητας πολλαπλασιασμού των κυττάρων A172, για κάθε αρχικό πληθυσμό κυττάρων από 30 έως 960 κύτταρα (**A**-**F**). Στον άξονα των X παρουσιάζεται ο χρόνος (t) και στον άξονα των Y παρουσιάζεται η ταχύτητα ως η πρώτη παράγωγος της καμπύλης πολλαπλασιασμού, που παρουσιάσθηκε στην **Εικόνα 180**.



Εικόνα 187. Διαγραμματική αναπαράσταση της επιτάχυνσης των κυττάρων A172, για κάθε αρχικό πληθυσμό κυττάρων από 30 έως 960 κύτταρα (**A**-**F**). Στον άξονα των X παρουσιάζεται ο χρόνος (t) και στον άξονα των Y παρουσιάζεται η ταχύτητα ως η δεύτερη παράγωγος της καμπύλης πολλαπλασιασμού, που παρουσιάσθηκε στην **Εικόνα 180**.

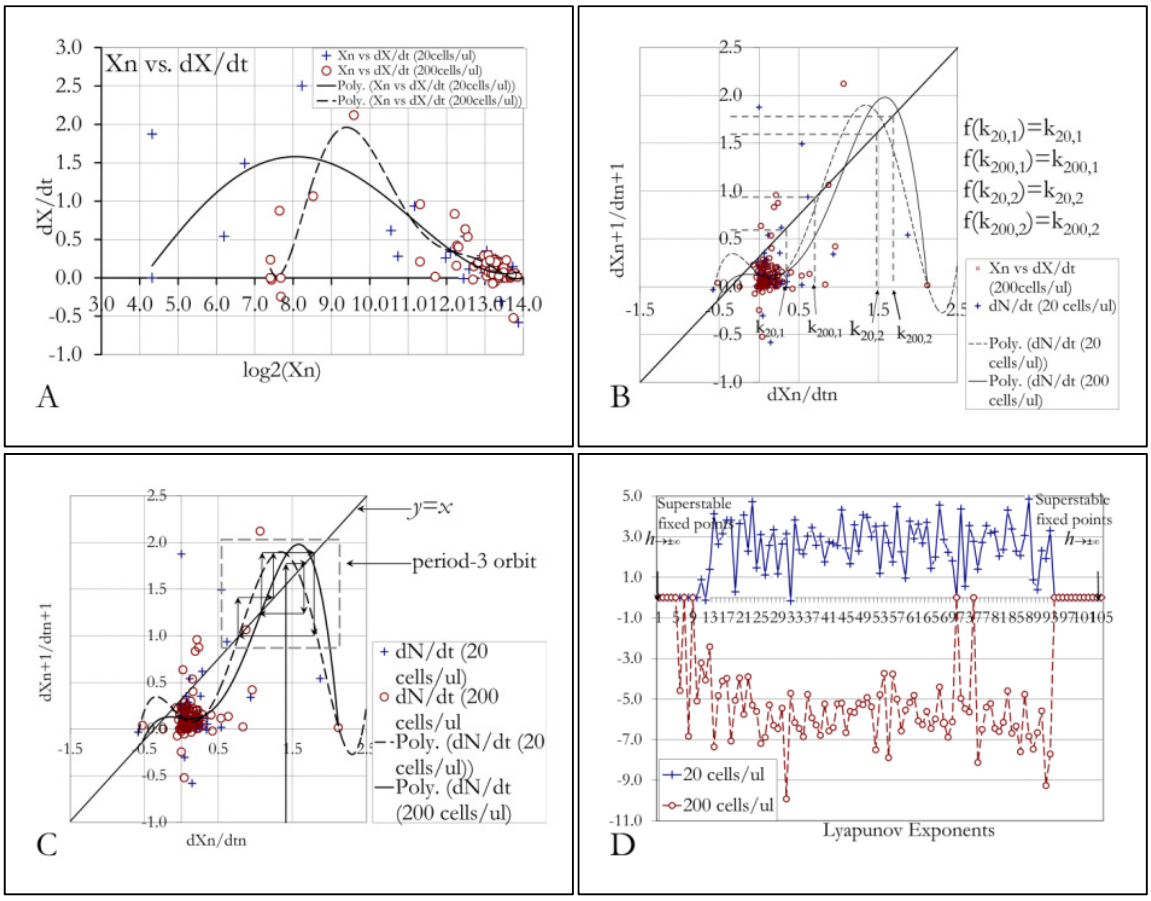
Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήσαμε και στην περίπτωση των κυττάρων σε εναιώρημα, CCRFCEM. Παρατηρούμε πως η ταχύτητα και επιτάχυνση κινούνται με παρόμοιο τρόπο και στους δύο αρχικούς αριθμούς που μελετήσαμε αλλά με μια σημαντική διαφορά. Το πλάτος της ταλάντωσης, όπως και στα προσκολλώμενα κύτταρα, είναι διαφορετικό. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στην **Εικόνα 188**.



Εικόνα 188. Διαγραμματική αναπαράσταση της ταχύτητας (**A**, **B**) και επιτάχυνσης τ(**C**, **D**) των κυττάρων CCRFCEM, για κάθε αρχικό πληθυσμό κυττάρων ήτοι 20 και 200 κύτταρα (**A**-**D**). Στον άξονα των X παρουσιάζεται ο χρόνος (t) και στον άξονα των Y παρουσιάζεται η ταχύτητα ως η δεύτερη παράγωγος της καμπύλης πολλαπλασιασμού, που παρουσιάσθηκε στην **Εικόνα 183**.

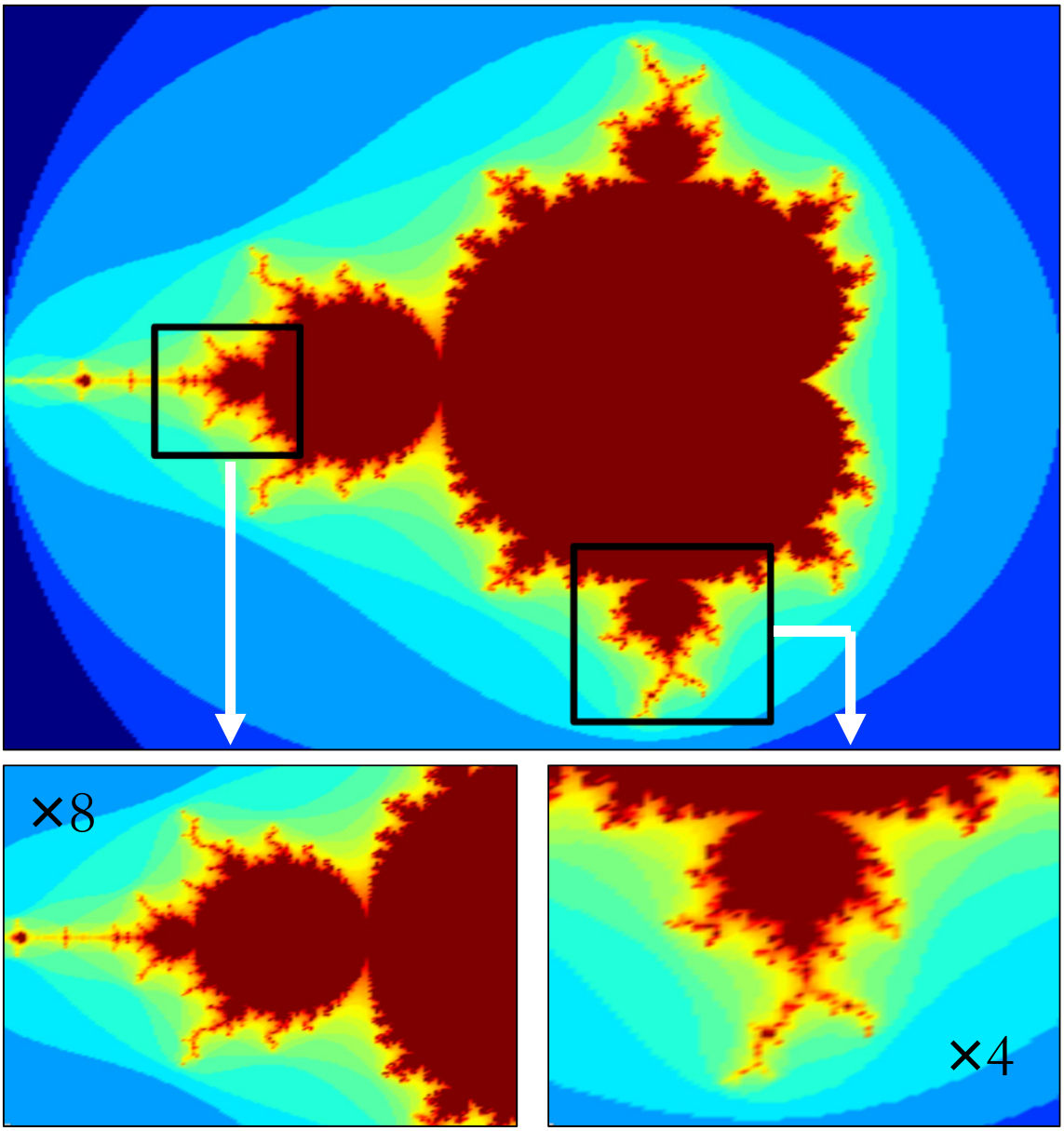
Τα κύτταρα CCRFCEM, αποτέλεσαν μια ιδιαίτερη περίπτωση αφού η δυναμική τους έδειξε αρκετά ενδιαφέροντα ευρήματα. Φάνηκε ότι το σύστημα αυτό προσεγγίζει ένα σημείο ισορροπίας, αφού ο πολλαπλασιασμός συγκλίνει σε έναν ελκυστή. Αν θυμηθούμε τη σιγμοειδή καμπύλη που περιγράψαμε στην εισαγωγή της εργασίας, ένας κυτταρικός πληθυσμός τείνει σε ένα σημείο ισορροπίας αφού οι πόροι είναι περιορισμένοι. Στο μοντέλο μας όμως υπήρχε περίσσεια πόρων, τόσο τροφής όσο και χώρου. Αυτό επιβεβαίωσε την αρχική σκέψη ότι η μη-γραμμικότητα (τόσο στα εναιωρούμενα κύτταρα όσο και στα προσκολλώμενα) προέρχεται από τον παράγοντα *k*. Ως εκ τούτου, αν διαγράψουμε τον κυτταρικό πληθυσμό για χρόνους t_n και t_{n+1} αντίστοιχα ως προς την

ταχύτητα πολλαπλασιασμού, (που όπως είπαμε είναι η πρώτη παράγωγος της καμπύλης πολλαπλασιασμού) παρατηρούμε τη σύγκλιση του πληθυσμού προς έναν ελκυστή (**Εικόνα 189A**). Έτσι, αν πάρουμε τις τροχιές των καμπυλών πολλαπλασιασμού ήτοι της ταχύτητας πολλαπλασιασμού, θα έχουμε: Έστω, $k_n=\{f'(x_0), f'(x_1),\ldots,f'(x_n)\}$ και $k_{n+1}=\{f'(x_1), f'(x_2),\ldots,f'(x_{n+1})\}$, όπου k είναι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού, και η ταχύτητα πολλαπλασιασμού που γράφεται $\frac{dX_n}{dt_n}$ και $\frac{dX_{n+1}}{dt_{n+1}}$ για χρόνους t και $t+1$ αντίστοιχα, τότε λαμβάνουμε το διάγραμμα που φαίνεται στην **Εικόνα 189B**, **C**. Το διάγραμμα αυτό μας έδειξε ότι οι μεταβλητές του πολλαπλασιασμού ακολουθούν τροχιά με περιοδικότητα 3, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα (**Εικόνα 189C**). Όπως είπαμε και στην εισαγωγή της παρούσης εργασίας, η περίοδος-3 δείχνει την ύπαρξη χαοτικών τροχιών.



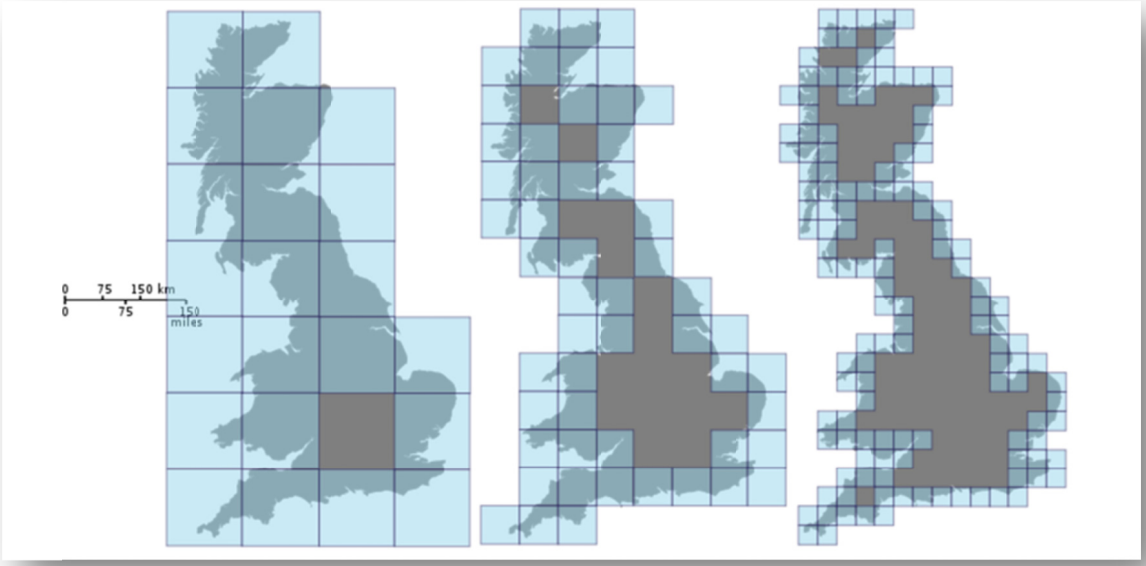
Εικόνα 189. Διαγραμματική παρουσίαση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων CCRFCEM. Η εξίσωση πολλαπλασιασμού δίνεται από $\dot{x}_n = kx_n(1-x_n)$, και διαγράφοντας τον πληθυσμό συναρτήσει της ταχύτητας πολλαπλασιασμού παρατηρούμε ότι και για τους δύο αρχικούς αριθμούς οι καμπύλες καταλήγουν σε ένα σταθερό σημείο/ελκυστή (**A**) Οι συνεχείς καμπύλες είναι η προσομοίωση για κάθε αρχικό αριθμό κυττάρων (συνεχής γραμμή για 200 κύτταρα και διακεκομμένη καμπύλη για 20 κύτταρα αρχικό αριθμό αντίστοιχα). Όταν διαγράφουμε την ταχύτητα σε χρόνο t και σε χρόνο t+1, ήτοι $\left(\frac{dx_{n+1}}{dt_{n+1}}\right)$ και $\left(\frac{dx_n}{dt_n}\right)$ αντίστοιχα λαμβάνουμε δύο καμπανοειδείς καμπύλες, όπου φαίνονται δύο ελκυστές και περιοδική τροχιά με περίοδο 3 (**B**,**C**), η διαγώνιος που διασχίζει τα διαγράμματα B, C είναι η συνάρτηση y=x. Τέλος, υπολογίζοντας τους εκθέτες *Lyapunov* για τις καμπύλες ανάπτυξης των κυττάρων βλέπουμε ότι τα κύτταρα με αρχικό αριθμό 20 έχουν θετικούς εκθέτες και κατά συνέπεια ενδεχομένως ακολουθούν χαοτικές τροχιές (**D**).

Στο σημείο αυτό μπορούμε να επανέλθουμε στο θέμα που αφήσαμε προηγουμένως σε εκκρεμότητα, που αφορούσε στις δομές *fractal*. Οι δομές αυτές αφορούν στη λεγόμενη αυτο-ομοιότητα ενός τοπολογικού σχήματος. Με πιο απλά λόγια σημαίνει ότι το ίδιο σχήμα επαναλαμβάνεται μέσα στον εαυτό του με βάση κάποιο συντελεστή. Οι δομές αυτές είναι γνωστές για τα εντυπωσιακά σχήματα που αποδίδουν. Στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 190**) παρουσιάζουμε το πλέον γνωστό *fractal*, που είναι ο *Χιονάνθρωπος του Mandelbort*, το οποίο αναπαράγαμε με κώδικα μέσα από το περιβάλλον MATLAB.



Εικόνα 190. Ο χιονάνθρωπος του *Mandelbrot*. Ένα από τα κλασσικά παραδείγματα δομών *fractal*. Επάνω παρουσιάζεται ολόκληρος ο χιονάνθρωπος και στις κάτω εικόνες παρουσιάζονται δύο μεγεθύνσεις ×8 και ×4 αντίστοιχα. Η αυτο-ομοιότητα έγκειται στο γεγονός ότι όσο και μεγεθυνθεί το αρχικό σχήμα παραμένει το ίδιο.

Για να μετρηθεί ο βαθμός ομοιότητας ενός σχήματος ή διαγράμματος με τον εαυτό του (*self-similarity*) υπάρχουν διάφορα κριτήρια ένα εκ των οποίων είναι η *διάσταση Minkowski-Bouligand* ή αλλιως γνωστή ως *διάσταση Kolmogorov*. Ο τρόπος που είδαμε την κατανομή των δεδομένων για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό τόσο σε αυτό το κεφάλαιο όσο και στα προηγούμενα μας δημιούργησε το ερώτημα αν οι μεταβλητές του κυτταρικού πολλαπλασιασμού παρουσιάζουν κάποιου είδους αυτο-ομοιότητας. Για να ταυτοποιήσουμε αυτή την ιδιότητα χρησιμοποιήσαμε αριθμητικές προσεγγίσεις. Πιο συγκεκριμένα, ο αλγόριθμος που χρησιμοποιήθηκε προσπαθεί να προσομοιώσει το εξεταζόμενο σχήμα με τετράγωνα, των οποίων το μέγεθος και ο αριθμός δείχνει την πιθανή αυτο-ομοιότητα. Για να γίνει αυτό πιο κατανοητό παραθέτουμε ένα παράδειγμα, με βάση το οποίο υπολογίζεται η διάσταση των ακτών της Βρετανίας (**Εικόνα 191**).

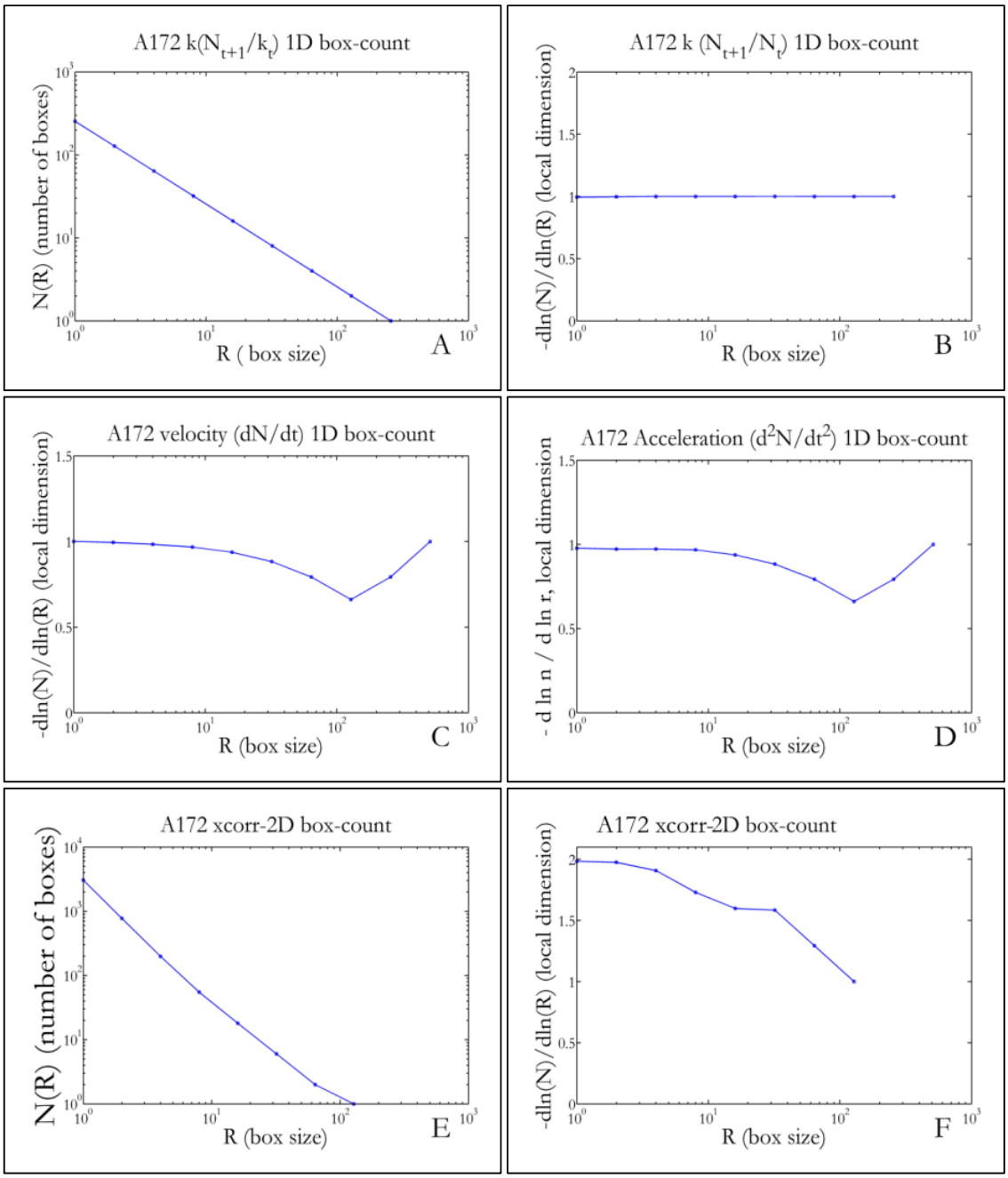


Εικόνα 191. Διαγραμματική παρουσίαση του αλγόριθμου υπολογισμού της διάστασης Kolmogorov, χρησιμοποιώντας ως παράδειγμα τον υπολογισμό της διάστασης των ακτών της Βρετανίας. Τετράγωνα τοποθετούνται στο σχήμα και το μέγεθός τους σε συνάρτηση με τον αριθμό τους σχηματίζουν τη διάσταση του σχήματος.

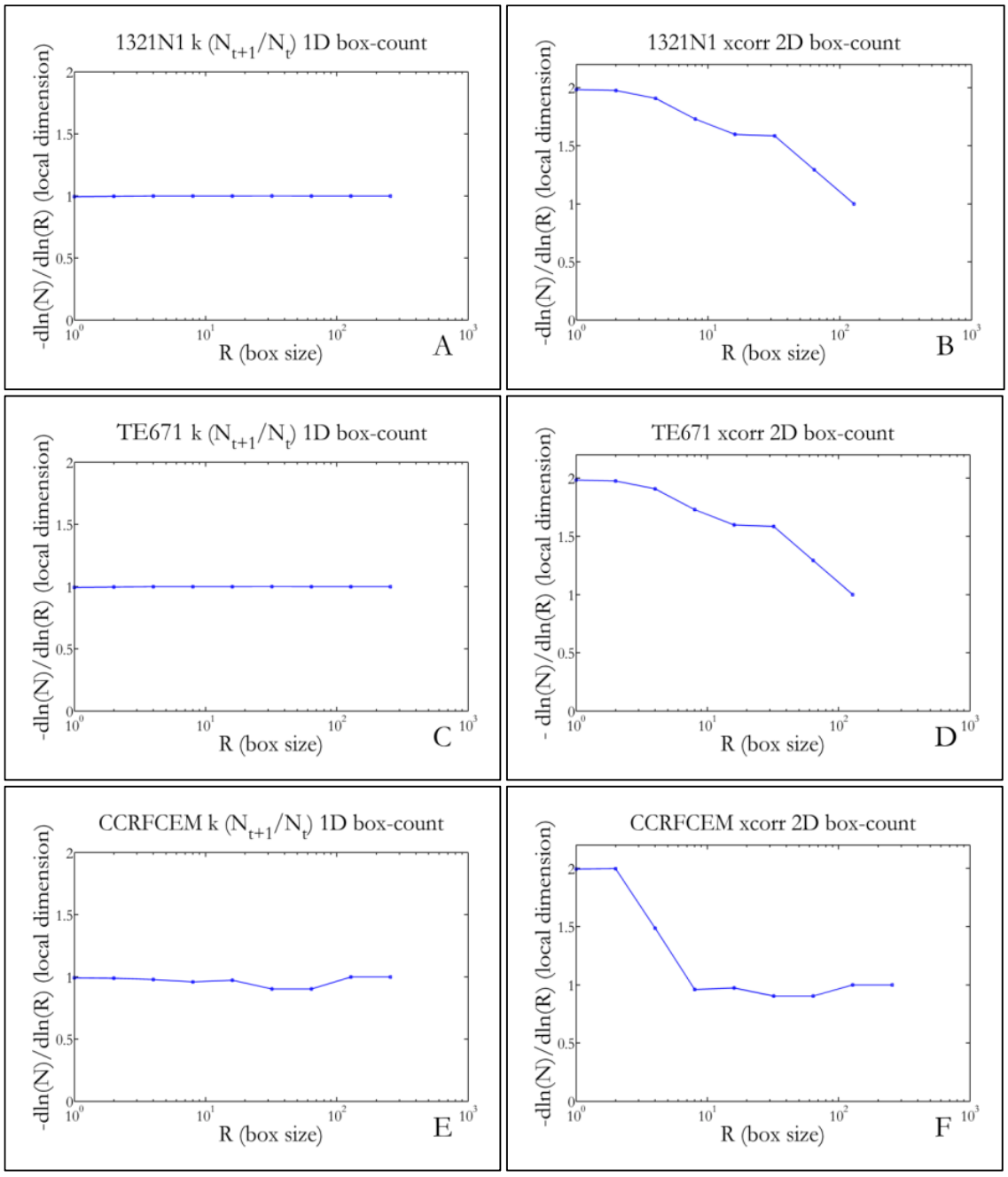
Επιστρέφοντας στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, κάναμε ανάλογη ανάλυση στις μεταβλητές του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Το αποτέλεσμα ήταν εντυπωσιακό μιας και επιβεβαίωσε όλες τις αρχικές μας προβλέψεις για μια συνεχιζόμενη αναπαραγωγή των μεταβλητών αυτών. Δηλαδή, τα κύτταρα ακολουθούν σε κάποιο βαθμό παρόμοια τακτική πολλαπλασιασμού ανεξαρτήτως του αρχικού αριθμού των κυττάρων.

Στις επόμενες εικόνες (**Εικόνα 192**, **Εικόνα 193**) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τους υπολογισμούς για τη διάσταση fractal, του ρυθμού πολλαπλασιασμού (k), της ταχύτητας πολλαπλασιασμού (dN/dt) και επιτάχυνσης πολλαπλασιασμού (d^2N/dt^2).

Η διάσταση των διανυσμάτων των μεταβλητών του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, μετράται με βάση τον αριθμό των τετραγώνων (*N*) και το μέγεθός (*R*) τους που απαιτείται για να συμπληρωθεί το σχήμα τους. Εξ' ορισμού αν η πρώτη παράγωγος του νεπέριου λογάριθμου $dlnN/dlnR$, παραμένει σταθερή για ένα διάστημα του *R*, τότε αυτή είναι η διάσταση *fractal* του διανύσματος υπό εξέταση. Έχει εξαιρετικό ενδιαφέρον να παρατηρήσουμε ότι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού και η ταχύτητα παραμένουν σταθερά για μεγάλο διάστημα του *R*. Το αποτέλεσμα αυτό έχει εξαιρετικό ενδιαφέρον, μιας και υποδηλώνει ότι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός είναι ένα φαινόμενο ρυθμιζόμενο, εξαρτώμενο από τις αρχικές συνθήκες αλλά ταυτοχρόνως, τα κύτταρα ακολουθούν μέχρι κάποιου βαθμού μια κοινή στρατηγική για το πώς θα αναπτυχθούν και μάλιστα αν θυμηθούμε ότι τα διανύσματα που εξετάζουμε στην **Εικόνα 192** και **Εικόνα 193** είναι τα μετασχηματισμένα, όπου οι μεταβλητές είχαν τοποθετηθεί σειριακά με αύξουσα σειρά του αρχικού πληθυσμού κυττάρων. Τέλος, υπολογίζοντας τη διάσταση fractal για τα διανύσματα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, βρέθηκε ότι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού ήταν 1 ενώ για την ταχύτητα και επιτάχυνση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ήταν 0.80888. Τα μεγέθη αυτά συναντώνται σε άλλα γνωστά σχήματα, όπως είναι το *σύνολο Cantor*, που έχει διάσταση ακριβώς *1* και ο *Απολλώνιος Δίσκος* (που πήρε το όνομα του από τον Έλληνα μαθηματικό *Απολλώνιο τον Περγαίο*) (**Εικόνα 194**).

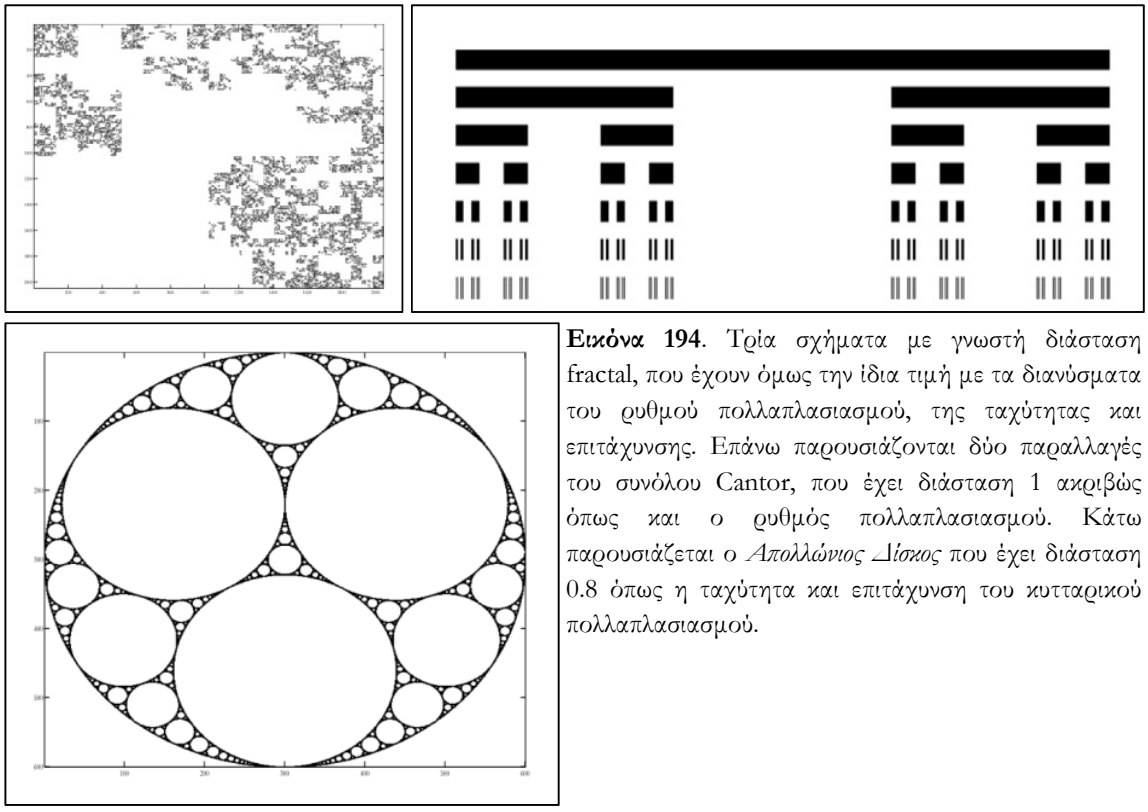


Εικόνα 192. Διαγραμματική παρουσίαση των παραγόντων του συντελεστή fractal για τα κύτταρα A172. Ενδεικτικά παρουσιάζεται η σχέση του αριθμού των τετραγώνων (*N*) που απαιτούνται για να προσομοιωθεί το διάνυσμα του ρυθμού πολλαπλασιασμού (*k*) συναρτήσει του μεγέθους των τετραγώνων (*R*) (**A**). Επίσης παρουσιάζεται η πρώτη παράγωγος του αριθμού *N* ως προς το μέγεθος *R* συναρτήσει του μεγέθους των τετραγώνων (**B**). Πρακτικά, όσο παραμένει η παράγωγος *dln*N/*dln*R σταθερή κατά μήκος του μεγέθους των τετραγώνων αυτή είναι η διάσταση fractal του διανύσματος. Αντίστοιχα διαγράμματα παρουσιάζονται για την ταχύτητα πολλαπλασιασμού (**C**), την επιτάχυνση (**D**), και τέλος την επιφάνεια συσχέτισης (*cross-correlation*) που παρουσιάσαμε στην **Εικόνα 185** (**E**, **F**).



Εικόνα 193. Διαγραμματική παρουσίαση των παραγόντων του συντελεστή fractal για τα κύτταρα 1321N1, TE671 και CCRFCEM. Ενδεικτικά παρουσιάζεται η πρώτη παράγωγος του αριθμού *N* ως προς το μέγεθος *R* συναρτήσει του μεγέθους των τετραγώνων για τα κύτταρα 1321N1 (**A**) και την επιφάνεια συσχέτισης (*cross-correlation*) που παρουσιάσαμε στην **Εικόνα 185** για τα ίδια κύτταρα (**B**). Η πρώτη παράγωγος του αριθμού *N* ως προς το μέγεθος *R* συναρτήσει του μεγέθους των τετραγώνων για τα κύτταρα TE671 (**C**) και την επιφάνεια συσχέτισης (*cross-correlation*) που παρουσιάσαμε στην **Εικόνα 185** για τα ίδια κύτταρα (**D**). Η πρώτη παράγωγος του αριθμού *N* ως προς το μέγεθος *R* συναρτήσει του μεγέθους των τετραγώνων για τα κύτταρα CCRFCEM (**E**) και την επιφάνεια συσχέτισης (*cross-correlation*) που παρουσιάσαμε στην **Εικόνα 185** για τα ίδια κύτταρα (**F**).

Για να μπορέσουμε να οπτικοποιήσουμε καλύτερα τα παραπάνω αποτελέσματα θα δείξουμε ανάλογα σχήματα, τα οποία προσομοιάζουν τη διάσταση fractal των διανυσμάτων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Ως εκ τούτου, για να προκαλέσουμε το ενδιαφέρον στην **Εικόνα 194**, παρουσιάζουμε σχήματα με διάσταση *fractal* όμοια με τα διανύσματα των μεταβλητών του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.



Εικόνα 194. Τρία σχήματα με γνωστή διάσταση fractal, που έχουν όμως την ίδια τιμή με τα διανύσματα του ρυθμού πολλαπλασιασμού, της ταχύτητας και επιτάχυνσης. Επάνω παρουσιάζονται δύο παραλλαγές του συνόλου Cantor, που έχει διάσταση 1 ακριβώς όπως και ο ρυθμός πολλαπλασιασμού. Κάτω παρουσιάζεται ο *Απολλώνιος Δίσκος* που έχει διάσταση 0.8 όπως η ταχύτητα και επιτάχυνση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 28

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ *IN VITRO* ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ

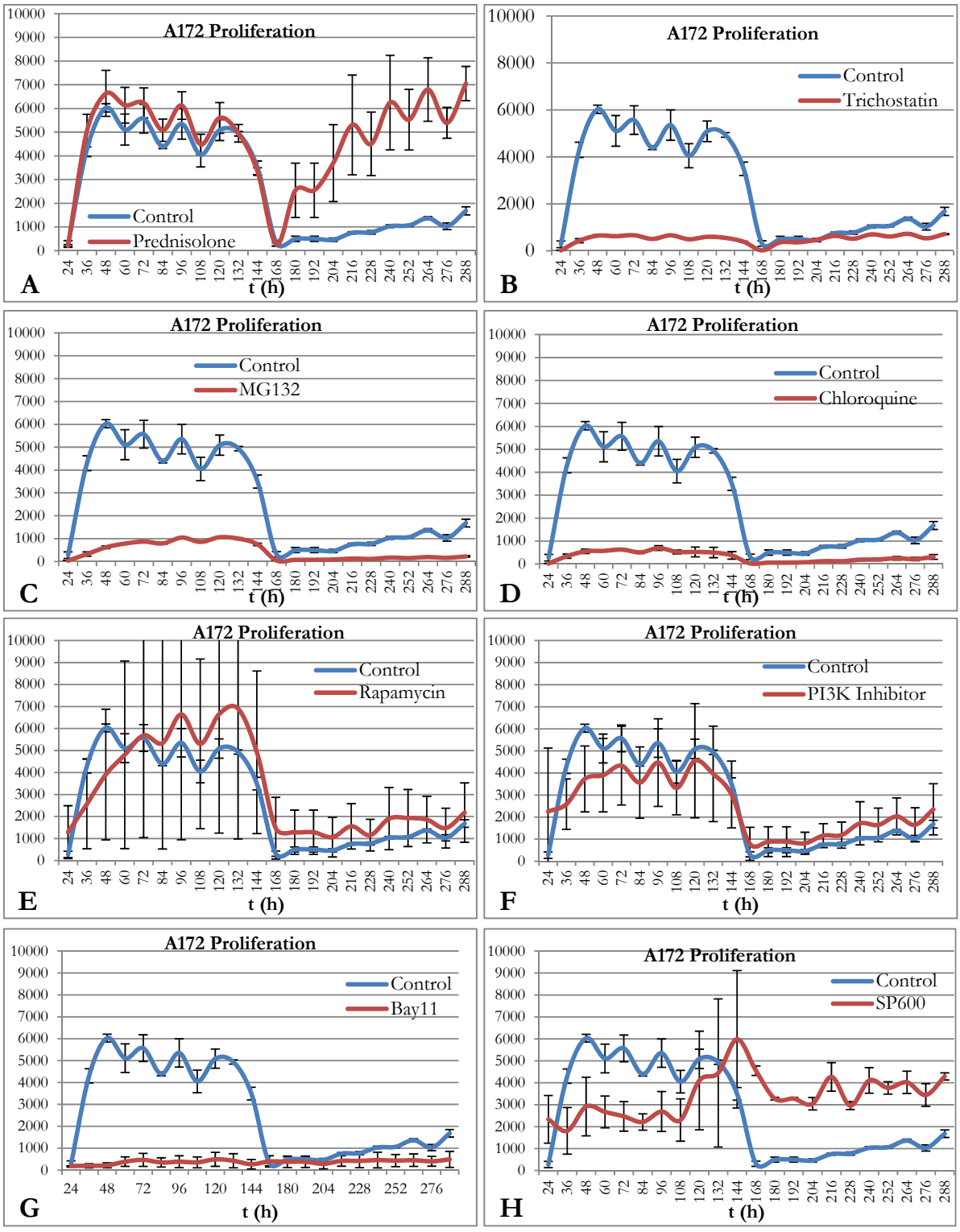
Ως φυσική συνέχεια της μελέτης της πολλαπλασιαστικής δυναμικής είναι η διερεύνηση των ενδεχόμενων μηχανισμών που την κατευθύνουν. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός είναι σαφώς κατευθυνόμενος από τη γονιδιακή έκφραση και την ενδεχόμενη ρύθμισή του. Από αυτή τη γνώση προκύπτουν τα ερωτήματα, ποιες σηματοδοτικές οδοί είναι κρίσιμες για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, και ποιες σηματοδοτικές οδοί είναι κρίσιμες για την ανταπόκριση των κυττάρων σε συνθήκες στρες; Για να απαντήσουμε τα ερωτήματα αυτά, όπως περιγράψαμε και στην ενότητα «Υλικό και Μέθοδος», σχεδιάσαμε και υλοποιήσαμε μια πειραματική διάταξη βάση της οποίας, κύτταρα αφέθηκαν να αναπτυχθούν χωρίς και με την παρουσία αναστολέων και σε χρόνους που τα οδήγησαν σε δύο ειδών στρες. Το πρώτο ερέθισμα στρες προήρχετο από την παρουσία του αναστολέα ενώ το δεύτερο από τη σταδιακή έλλειψη πόρων. Στο σημείο αυτό έχουμε δύο περαιτέρω παραλλαγές. Αν ο εφαρμοζόμενος αναστολέας οδηγούσε τα κύτταρα στην απόπτωση ή στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, οι πόροι δεν θα εξαντλούντο με τον ίδιο ρυθμό όπως στα κύτταρα που θα ακολουθούσαν κανονική πορεία πολλαπλασιασμού και άρα έχουμε να υπολογίσουμε την επίδραση ενός παράγοντα περιβαλλοντικού στρες. Αν αντίστοιχα ο αναστολέας δεν ήταν κρίσιμος για τον πολλαπλασιασμό τότε τα κύτταρα θα είχαν δύο είδη στρες, ένα από την παρουσία και παρεμβολή του αναστολέα και ένα δεύτερο από την επερχόμενη έλλειψη πόρων (τροφή και χώρος). Μελετήθηκαν τρεις κυτταρικές σειρές προσκολλώμενων κυττάρων ήτοι τα κύτταρα A172, 1321N1 και TE671. Υπενθυμίζουμε επίσης ότι οι αναστολείς και φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα Prednisolone ανταγωνιστής του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR), Trichostatin A (TSA) αναστολέας των ενζύμων Histone Deacetylase I και II, MG132 αναστολέας του πρωτεασώματος, Chloroquine (CQ) αναστολέας των λυσοσωμάτων, Rapamycin αναστολέας της σηματοδοτικής οδού mTOR, PI3K Inhibitor (*LY294002*) αναστολέας της PI3K κινάσης, Bay11 αναστολέας του IκB που αποτελεί τμήμα της σηματοδοτικής οδού IκB/NFκB και τέλος ο παράγοντας SP600, που είναι αναστολέας της JNK κινάσης.

Μελετήθηκαν τρεις παράμετροι, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός ως συνάρτηση της φωτομετρικής απορρόφησης της χρωστικής Alamar Blue, ο κυτταρικός θάνατος ως συνάρτηση της κατάτμησης του DNA, το οποίο ταυτοποιήθηκε κυτταρομετρικά και τέλος η κατανομή του κυτταρικού κύκλου επίσης με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής, όπως περιγράψαμε στην ενότητα «Υλικό και Μέθοδος»

και στο Παράρτημα ΙΙ. Πρώτος σταθμός αποτελεί η μελέτη των κυττάρων A172, όπου ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός έδωσε ορισμένα ενδιαφέροντα αποτελέσματα, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 195**. Τα κύτταρα υπό την επίδραση γλυκοκορτικοειδούς ακολούθησαν την ανάπτυξη των κυττάρων στο πείραμα ελέγχου αλλά μετά τις 168 ώρες συνολικής παραμονής στην καλλιέργεια, το πείραμα ελέγχου δεν ανέκαμψε πλήρως από το στρες της έλλειψης πόρων, ενώ αντιθέτως τα κύτταρα με prednisolone, όχι μόνο ανέκαμψαν αλλά έφτασαν τα επίπεδα πολλαπλασιασμού από τις 24 ώρες μέχρι τις 120 ώρες επώασης (**Εικόνα 195A**). Ενώ στην πρώτη φάση του πειράματος (24-144 ώρες) φαίνεται να μην υπάρχει διαφορά στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, η επίδραση του γλυκοκορτικοειδούς φαίνεται στη δεύτερη φάση όπου έχει αφαιρεθεί το αρχικό θρεπτικό υλικό τοποθετήθηκε νέο και κατά παράδοξο τρόπο τα κύτταρα επηρεάστηκαν από την παρουσία της prednisolone. Αντίστοιχο φαινόμενο παρατηρούμε και στην επίδραση της αναστολής της JNK κινάσης με τη διαφορά ότι η αρχική αντίδραση στην παρουσία του SP600 ήταν μια καθυστέρηση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Αυτό υποδηλώνει ότι η οδός του c-Jun είναι απαραίτητη για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αλλά τα κύτταρα βρίσκουν νέο τρόπο για να υπερπηδήσουν το εμπόδιο αυτό και να συνεχίσουν να πολλαπλασιάζονται (**Εικόνα 195H**). Επίσης ενδιαφέρον αποτέλεσμα έχουμε στην επίδραση των αναστολέων Rapamycin και PI3K, όπου οι δύο αυτοί αναστολείς δεν έχουν καμία επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ούτε επιδρούν στον τρόπο που τα κύτταρα αντιδρούν στο στρες της έλλειψης τροφής και χώρου. Άρα συμπεραίνουμε ότι οι οδοί mTOR και PI3K/AKT/mTOR δεν είναι απαραίτητη ή τουλάχιστον μείζωνος σημασίας για τον πολλαπλασιασμό (**Εικόνα 195E, F**).

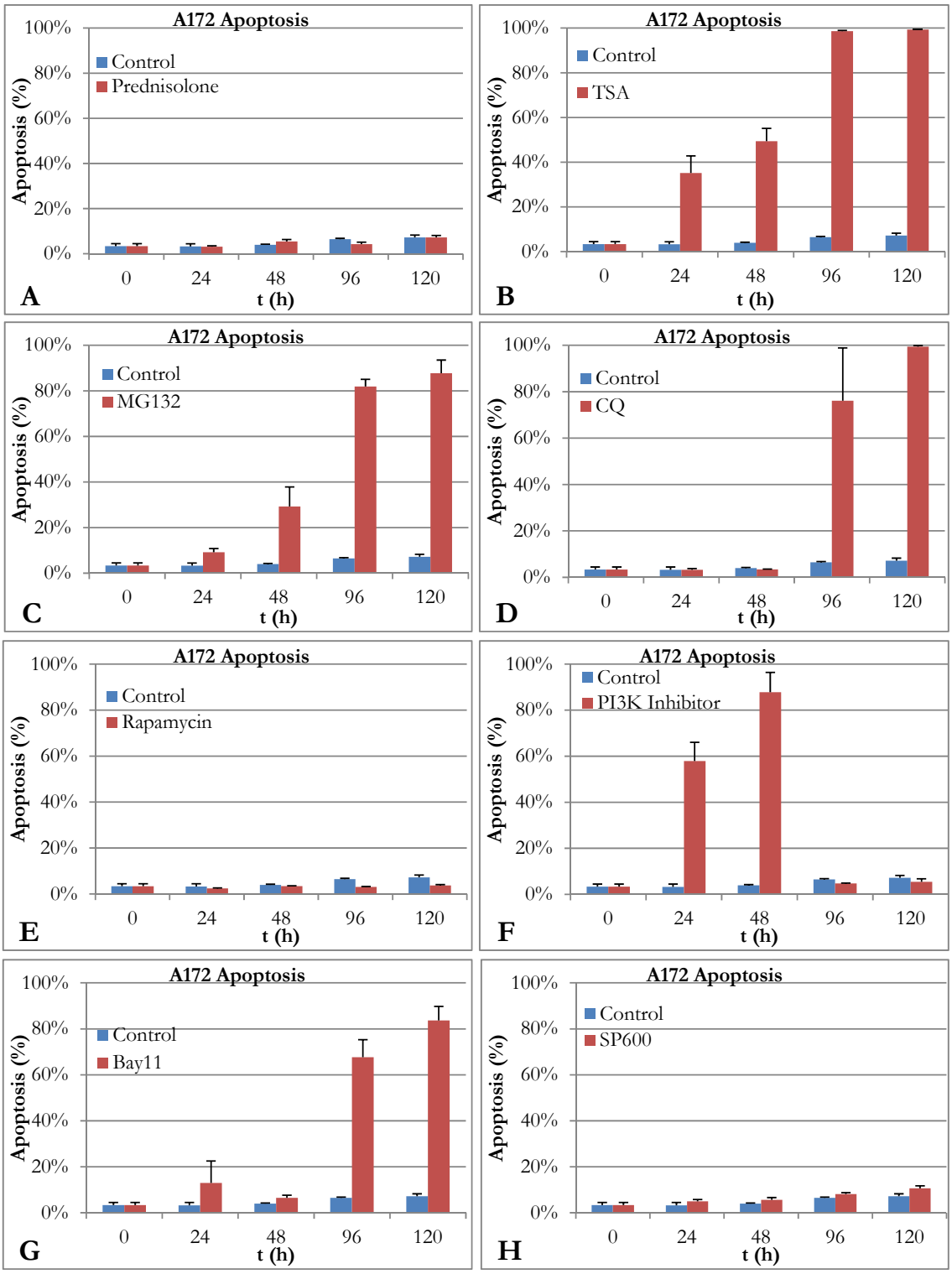
Από την ανάλυσή μας προέκυψε και μια τρίτη κατηγορία, που αφορούσε στους αναστολείς που ανέστειλαν πλήρως ή σχεδόν πλήρως τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Πρέπει να ξαναθυμήσουμε ότι στη δεύτερη φάση της πειραματικής αυτής διάταξης μετά τις 144 ώρες δηλαδή συνολικής παραμονής στην κυτταρική καλλιέργεια τα κύτταρα δεν τελούσαν υπό την επίδραση των φαρμάκων ή των αναστολέων μιας και το νέο θρεπτικό που τοποθετήθηκε δεν περιείχε κανένα αναστολέα.

Οι αναστολείς που επέδρασαν ανασταλτικά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ήταν οι TSA, CQ, MG132 και Bay11 (**Εικόνα 195B**, **C**, **D**, **G**). Ειδικότερα, ο παράγοντας Bay11 έδειξε ότι τα κύτταρα ανέκαμψαν, παρά την ισχυρή αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, έστω και αμυδρά σε σχέση με το πείραμα ελέγχου. Αντίθετα τα κύτταρα υπό την επίδραση του TSA, CQ και MG132 δεν έδωσαν ίχνη επιβίωσης. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η οδός του IκB/NFκB ενώ είναι ικανή συνθήκη για την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού δεν είναι αναγκαία μιας και τα κύτταρα ανακάμπτουν, έστω και ελάχιστα μέσα στα χρονικά πλαίσια που μελετήσαμε το φαινόμενο. Αντίθετα οι οδοί της ακετυλίωσης, της αυτοφαγίας μέσω της λειτουργίας των λυσοσωμάτων και του πρωτεασώματος αποτελούν ικανές και αναγκαίες συνθήκες της κυτταρικής επιβίωσης.



Εικόνα 195. Πολλαπλασιασμός των κυττάρων A172 υπό την επιδραση αναστολέων. Σε κάθε υπο-εικόνα παρουσιάζονται ο πολλαπλασιασμός του πειράματος ελέγχου σε σύγκριση με το πείραμα του αναστολέα.

Αν εξετάσουμε τον κυτταρικό θάνατο, θα δούμε ότι επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (**Εικόνα 196**). Μια εξαίρεση αποτελεί η δράση του αναστολέα PI3K, όπου βλέπουμε μια έξαρση του κυτταρικού θανάτου στις 24 και 48 ώρες επώασης και την μετέπειτα δραπέτευση των κυττάρων από αυτόν (**Εικόνα 196F**). Το αποτέλεσμα αυτό μας δίνει την εικόνα ότι η οδός PI3K αποτελεί ενδεχομένως κάποιο σημαντικό στάδιο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αλλά τα κύτταρα γρήγορα παρέρχονται του στρες και είτε παρακάμπτουν την οδό αυτή είτε την επιδιορθώνουν και μπορούν να συνεχίσουν τον πολλαπλασιασμό τους. Τα κύτταρα υπό την επίδραση TSA, CQ και MG132 παρουσιάζουν κυτταρικό θάνατο που ξεπερνάει το 90%. Στην επίδραση της TSA και MG132 δείχνουν μια σταδιακή αύξηση της απόπτωσης πράγμα που σημαίνει ότι οι αναστολείς αυτοί δρουν χρονοεξαρτώμενα (**Εικόνα 196B**, **C**), ενώ αντίθετα στην περίπτωση της CQ και Bay11 παρατηρούμε μια απότομη αύξηση της απόπτωσης στους τελευταίους χρόνους επώασης (**Εικόνα 196D**, **G**). Στην περίπτωση των αναστολέων CQ και Bay11 φαίνεται ότι τα κύτταρα ανθίστανται στην επίδραση των αναστολέων και σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα στην **Εικόνα 195**, στην μεν περίπτωση του Bay11 τα κύτταρα καταφέρνουν να διαφύγουν τελικά του κυτταρικού θανάτου, ενώ στην περίπτωση της CQ η βλάβες είναι μόνιμες.

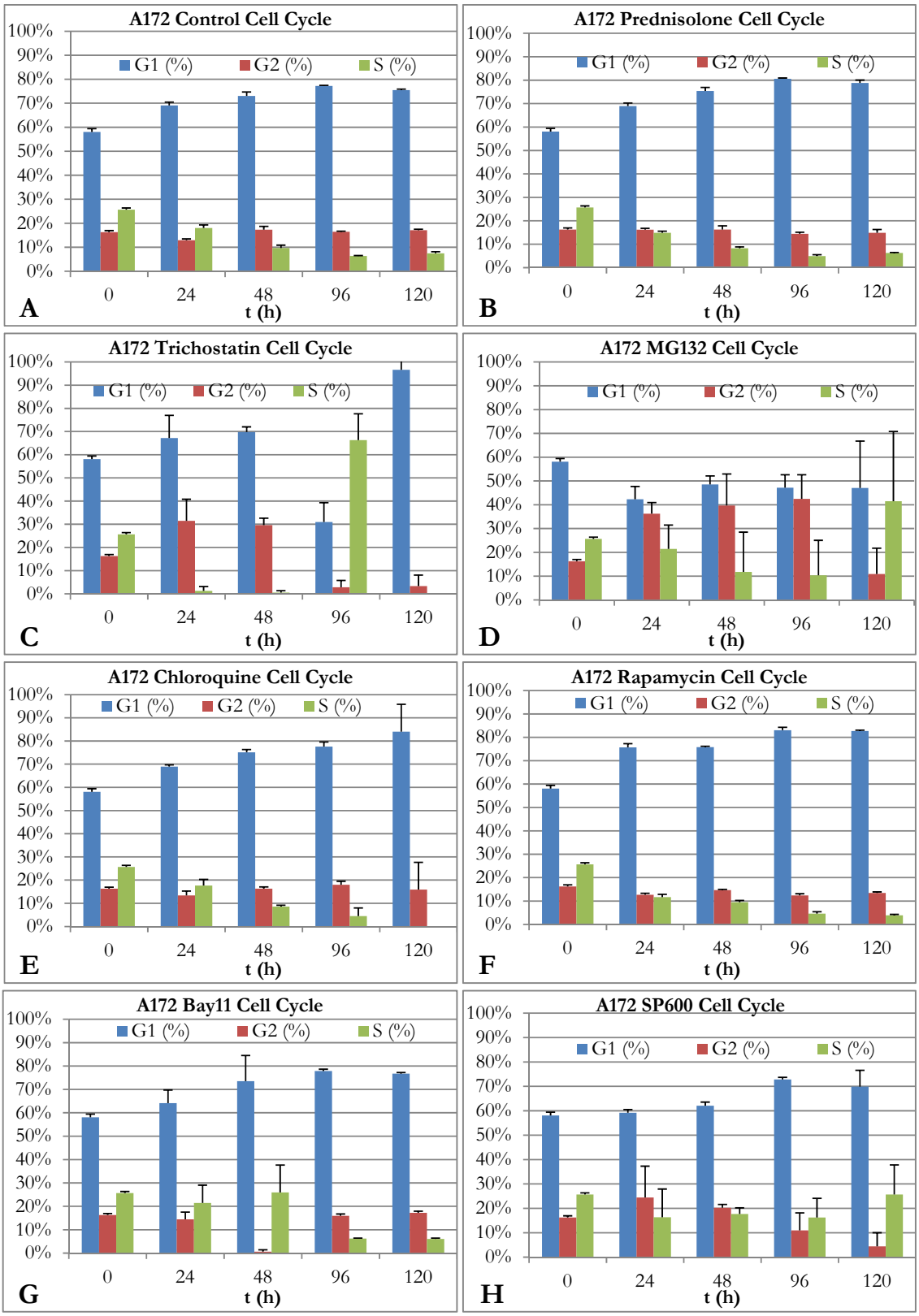


Εικόνα 196. Διαγραμματική παρουσίαση του αποπτωτικού θανάτου των κυττάρων A172 υπό την επιδραση αναστολέων. Σε κάθε υπο-εικόνα παρουσιάζονται η απόπτωση του πειράματος ελέγχου σε σύγκριση με το πείραμα του αναστολέα.

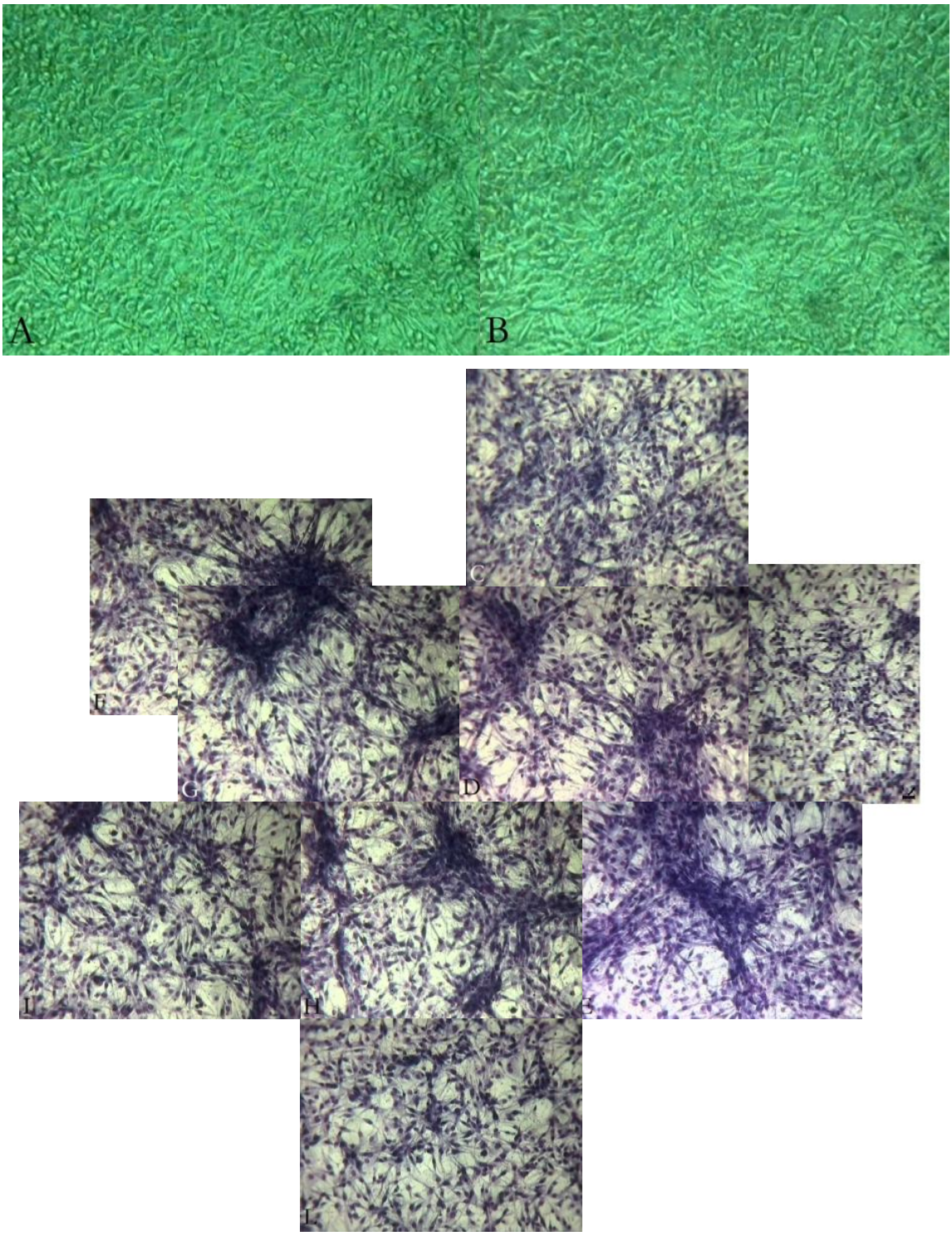
Όταν εξετάσουμε τον κυτταρικό κύκλο (**Εικόνα 197**), παρατηρούμε ότι τα κύτταρα υπό την επίδραση της Prednisolone, Rapamycin και SP600 ακολουθούν την πορεία του πειράματος ελέγχου, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Μάλιστα δείχνουν να ακολουθούν τους κυτταρικούς κύκλους χωρίς να φαίνεται κάποια επίδραση από τους αναστολείς. Αντίθετα τα κύτταρα υπό την επίδραση TSA, CQ, MG132 παρουσιάζουν διαταραχές στον κυτταρικό κύκλο και ιδιαίτερα στις τελευταίες ώρες επώασης. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση της TSA, όπου τα κύτταρα έχουν περάσει σε σχεδόν πλήρη στασιμότητα αφού βρίσκονται στη G_1 φάση σχεδόν σε ποσοστό 100% (>90%) ενώ τα κύτταρα υπό την επίδραση του MG132, δείχνουν μια μεγαλύτερη διαταραχή στον κυτταρικό κύκλο, αφού στις τελευταίες ώρες τα κύτταρα κατανέμονται μεταξύ της G_1 και S φάσης. Επίσης στην TSA, παρατηρούμε κάτι ενδιαφέρον, ενδεχομένως τα κύτταρα οδηγήθηκαν σε *G_2-arrest* και αφού δεν διέφυγαν από αυτήν τότε οδηγήθηκαν σε απόπτωση.

Ενδεικτικά τα κύτταρα αυτά τα μελετήσαμε και μικροσκοπικά για να ελέγξουμε τα αποτελέσματα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης ήτοι της επιβίωσης των κυττάρων και του κυτταρικού κύκλου. Στις επόμενες εικόνες (**Εικόνα 198**-**Εικόνα 206**) παρουσιάζονται οι μικροσκοπικές παρατηρήσεις για όλους του αναστολείς και τα κύτταρα A172.

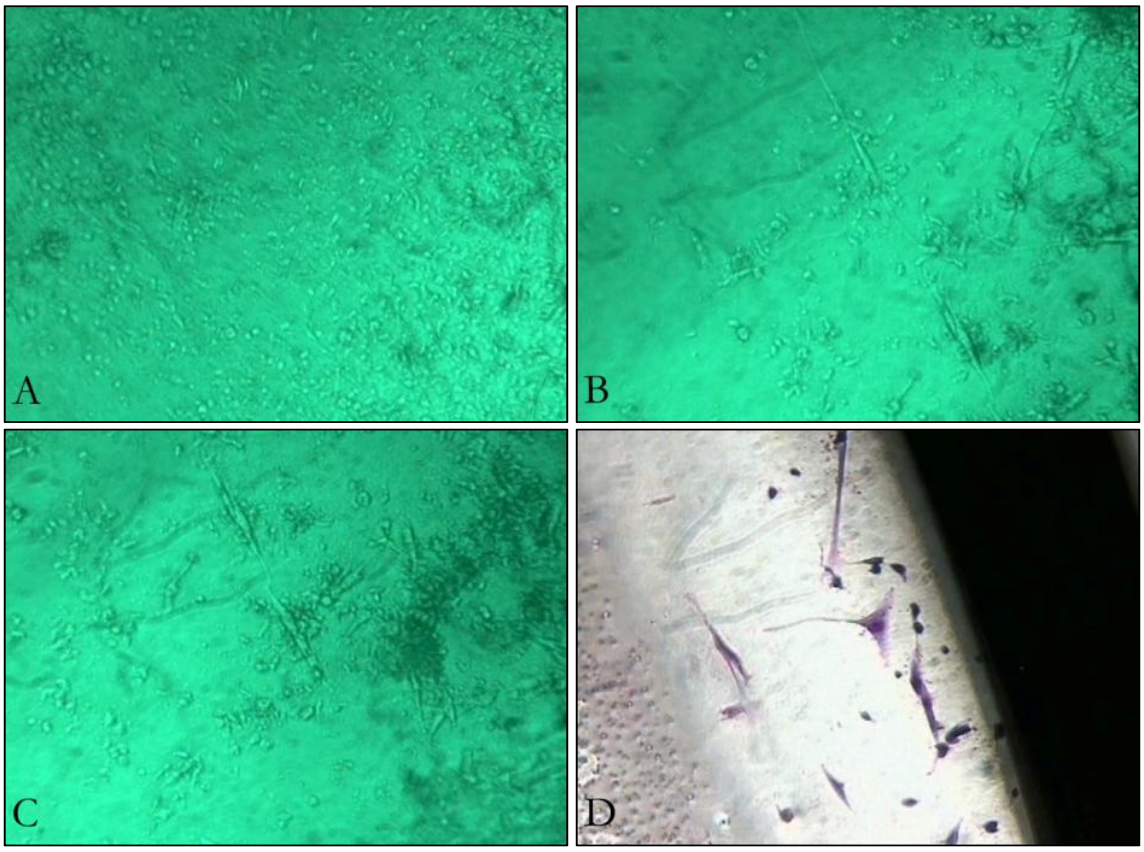
Έχει ενδιαφέρον να παρατηρήσουμε στο πείραμα ελέγχου, τις δομές που παρουσιάζονται μικροσκοπικά (**Εικόνα 198**). Τα κύτταρα δείχνουν σαν να έχουν δημιουργήσει ένα δίκτυο που προσομοιάζει ιστό. Παρατηρούμε επίσης ότι στα κύτταρα υπό επώαση TSA, CQ και MG132 μετά την έκπλυση της χρώσης Giemsa, τα εναπομείναντα ίχνη κυττάρων δεν ήταν τίποτε άλλο από κομμάτια μεμβρανών, γενετικού υλικού και γενικότερα θα τα ονομάζαμε «φαντάσματα» των κυττάρων. Άρα επιβεβαιώνεται η δράση των αναστολέων αυτών ότι είναι μόνιμη και όχι παροδική.



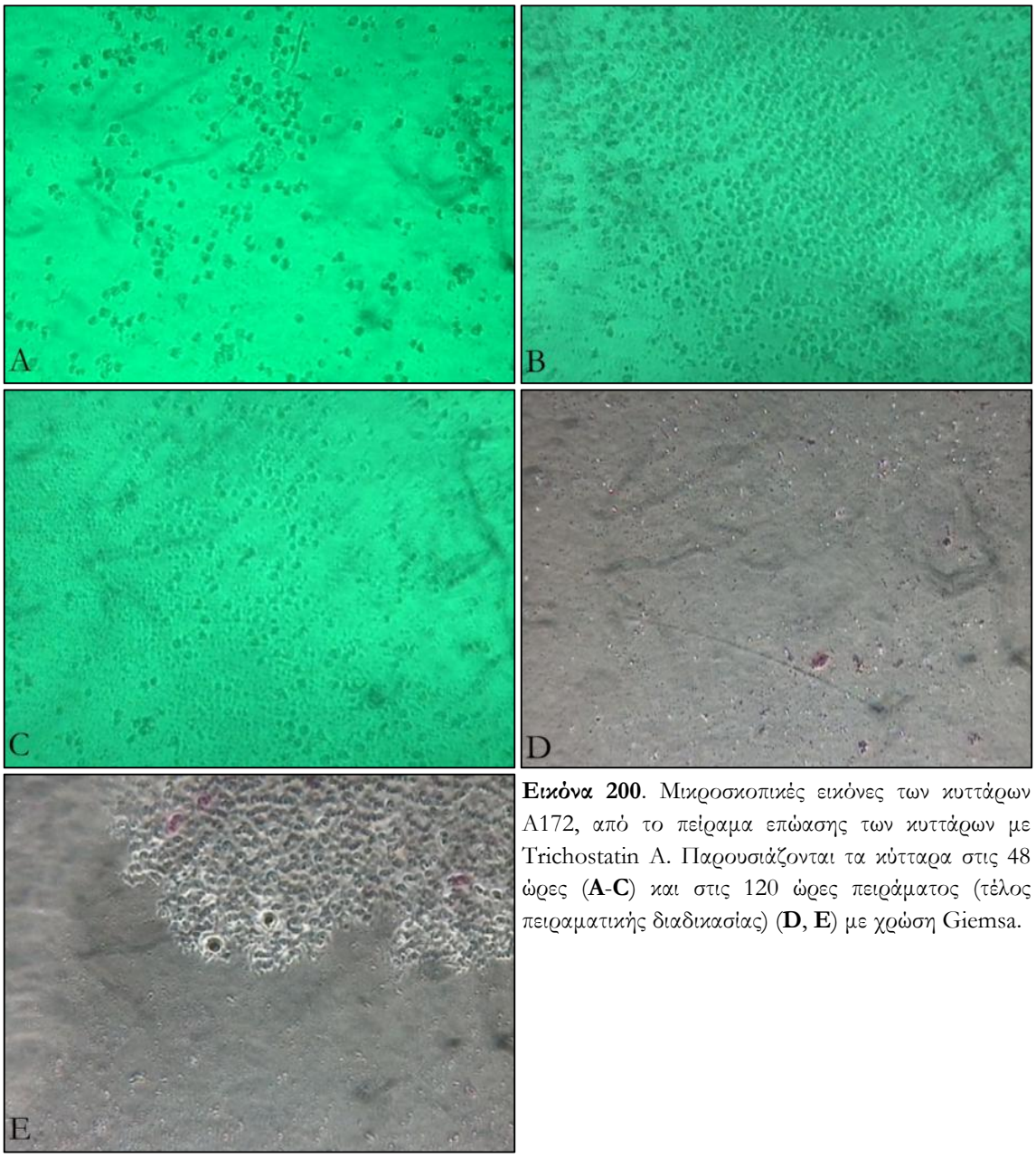
Εικόνα 197. Διαγραμματική παρουσίαση του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων A172 υπό την επίδραση αναστολέων. Το πείραμα ελέγχου και τα πειράματα των αναστολέων παρουσιάζονται ξεχωριστά.



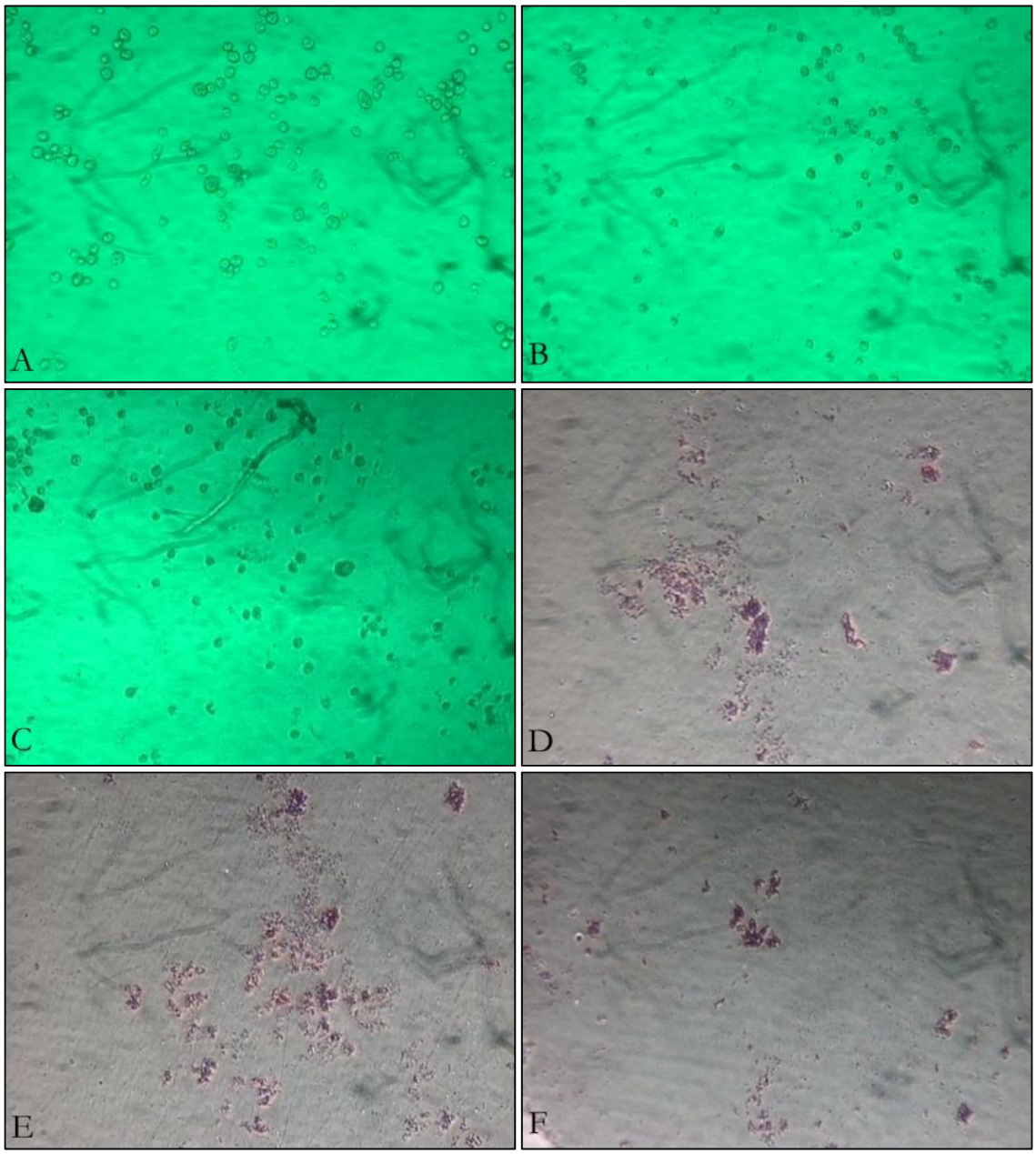
Εικόνα 198. Μικροσκοπικές εικόνες των κυττάρων A172, από το πείραμα ελέγχου της επώασης των κυττάρων με τους αναστολείς. Παρουσιάζονται τα κύτταρα στις 48 ώρες (**A**, **B**) και στις 120 ώρες πειράματος (τέλος πειραματικής διαδικασίας) με χρώση Giemsa. Η αναπαράσταση στις 120 ώρες αποτελεί συνένωση διαφορετικών καρέ από βίντεο που λήφθηκε κατά τη μελέτη του φαινομένου.



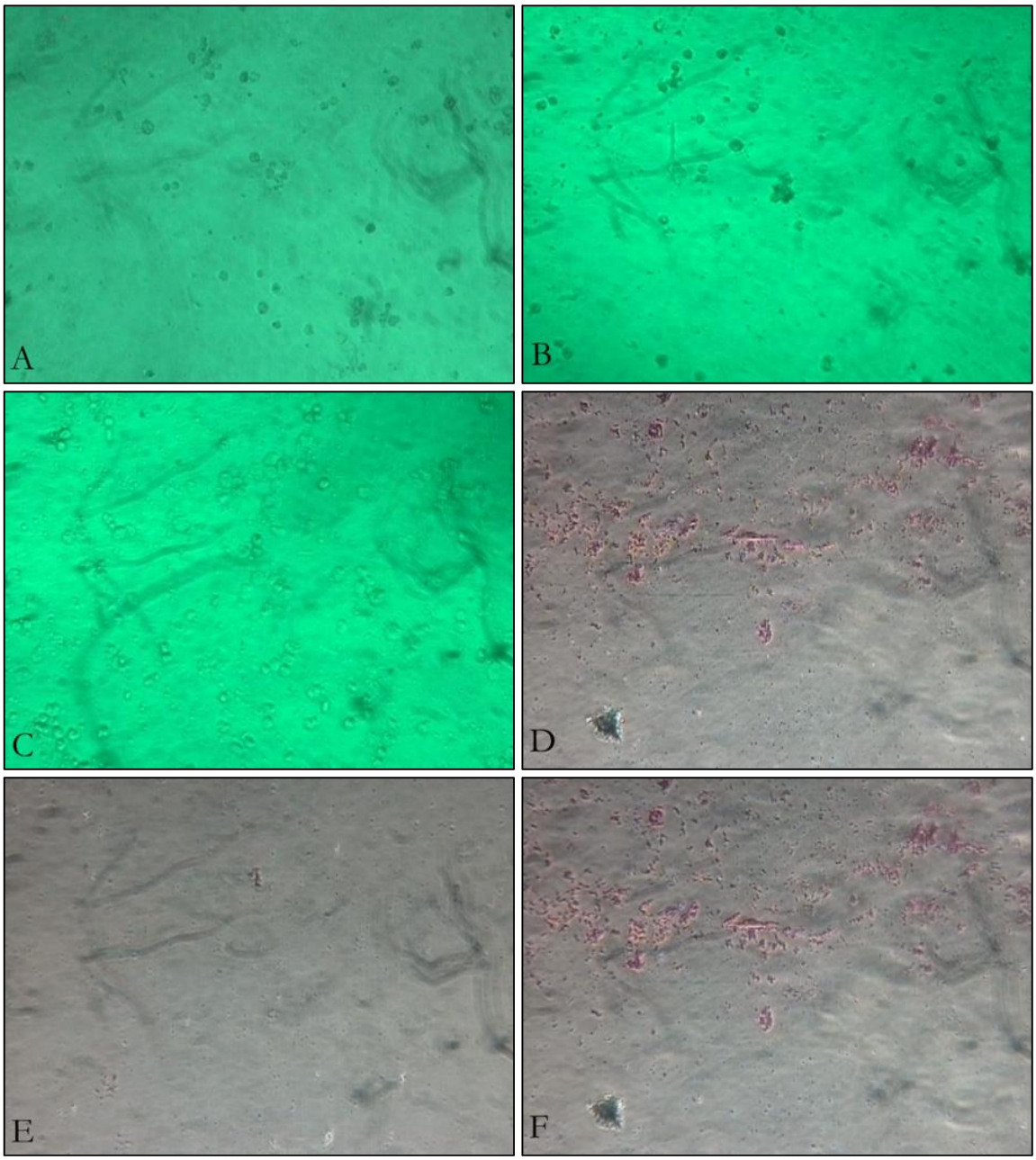
Εικόνα 199. Μικροσκοπικές εικόνες των κυττάρων A172, από το πείραμα επώασης των κυττάρων με Prednisolone. Παρουσιάζονται τα κύτταρα στις 48 ώρες (**A**-**C**) και στις 120 ώρες πειράματος (τέλος πειραματικής διαδικασίας) (**D**) με χρώση Giemsa. Η αναπαράσταση στις 120 ώρες αποτελεί συνένωση διαφορετικών καρέ από βίντεο που λήφθηκε κατά τη μελέτη του φαινομένου.



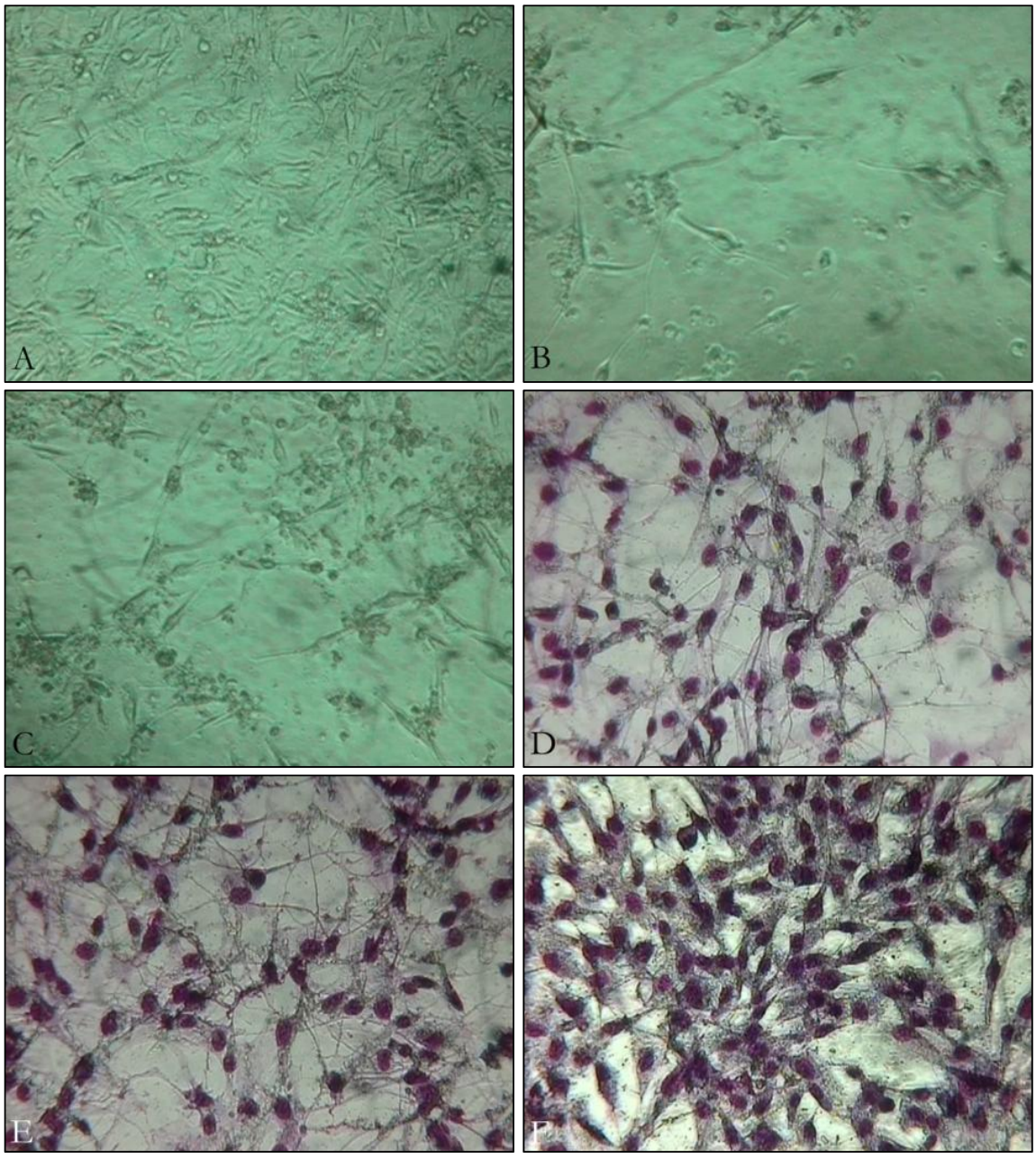
Εικόνα 200. Μικροσκοπικές εικόνες των κυττάρων A172, από το πείραμα επώασης των κυττάρων με Trichostatin A. Παρουσιάζονται τα κύτταρα στις 48 ώρες (**A**-**C**) και στις 120 ώρες πειράματος (τέλος πειραματικής διαδικασίας) (**D**, **E**) με χρώση Giemsa.



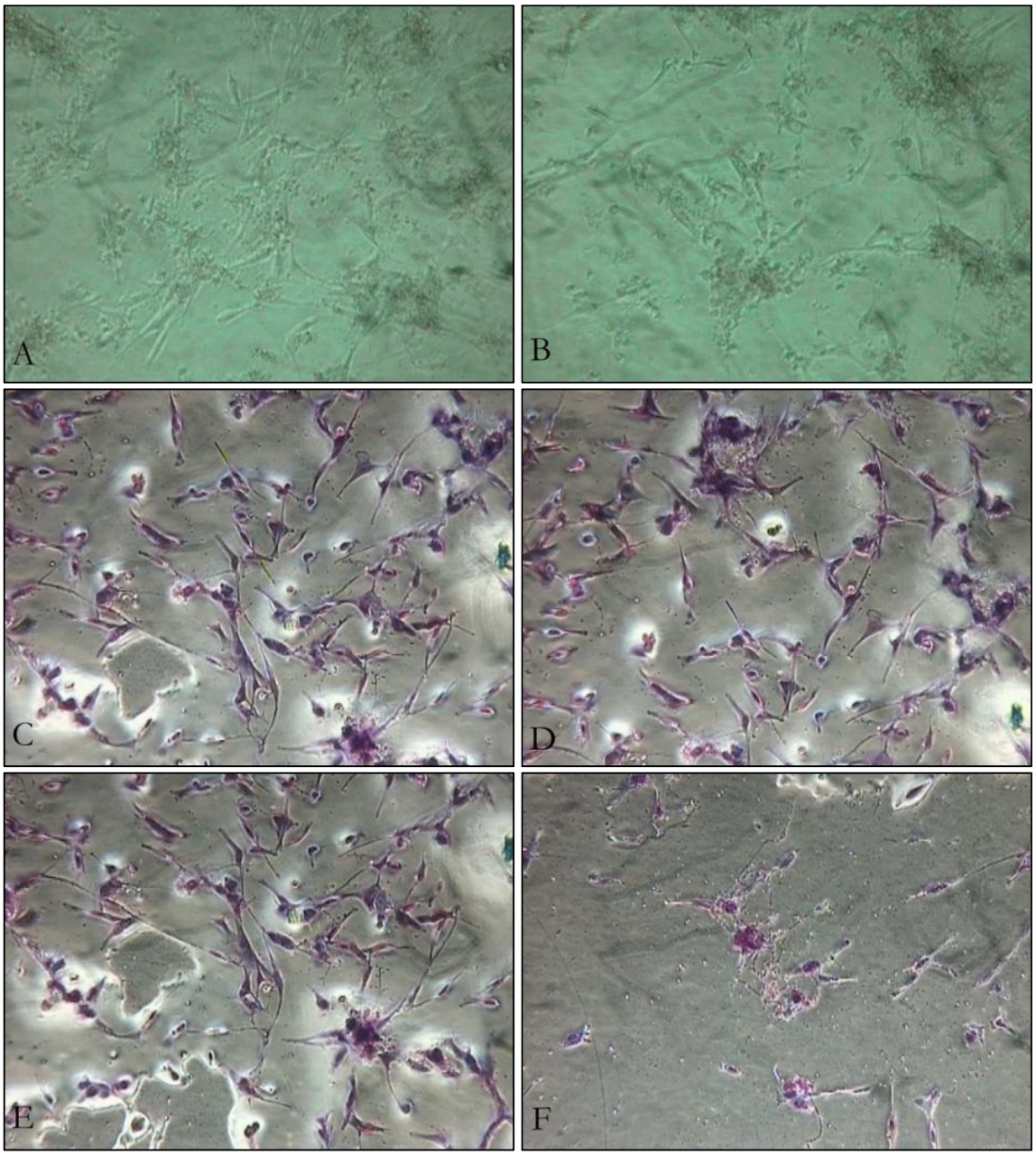
Εικόνα 201. Μικροσκοπικές εικόνες των κυττάρων A172, από το πείραμα επώασης των κυττάρων με MG132. Παρουσιάζονται τα κύτταρα στις 48 ώρες (**A**-**C**) και στις 120 ώρες πειράματος (τέλος πειραματικής διαδικασίας) (**D**-**F**) με χρώση Giemsa.



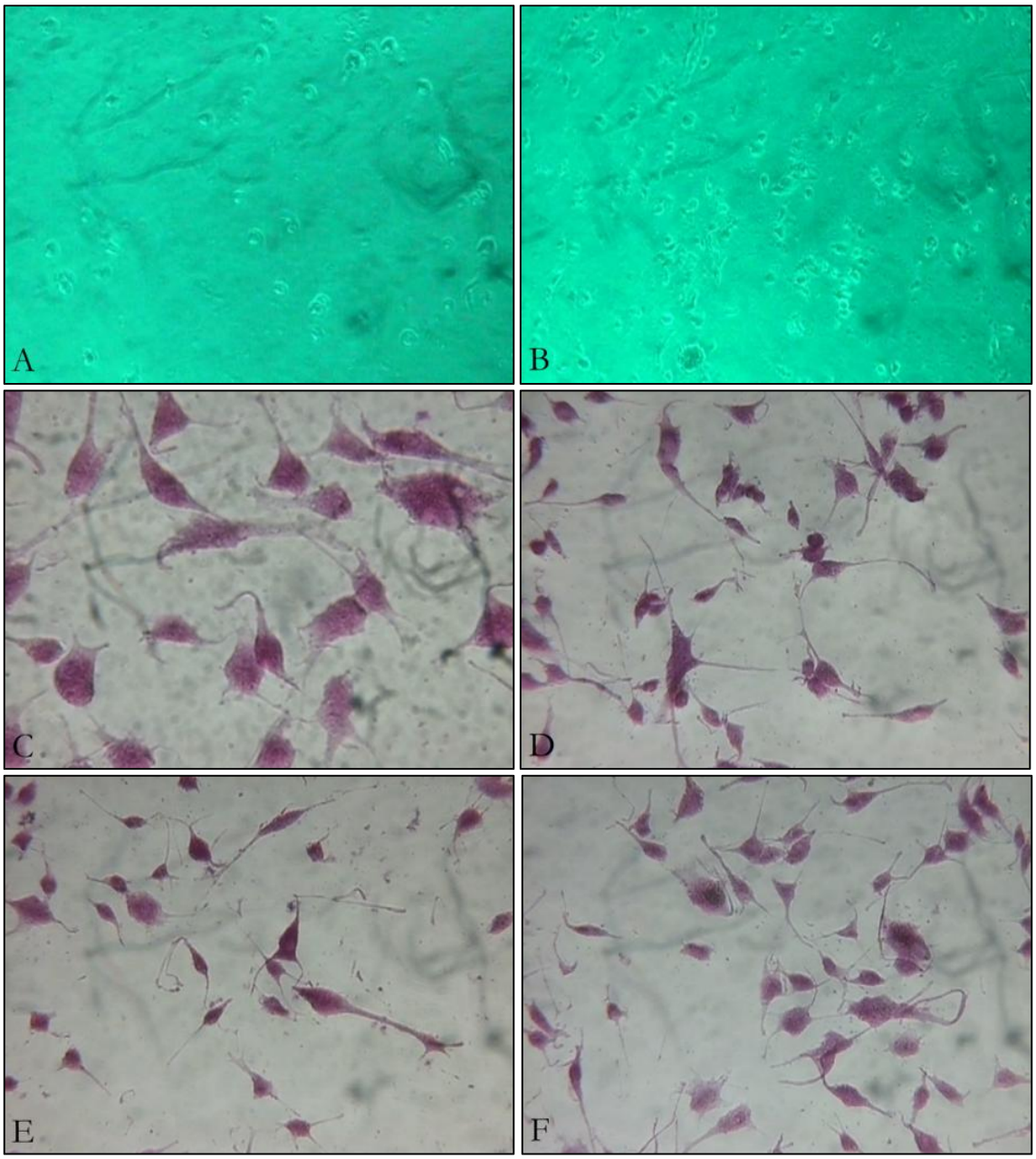
Εικόνα 202. Μικροσκοπικές εικόνες των κυττάρων A172, από το πείραμα επώασης των κυττάρων με Chloroquine. Παρουσιάζονται τα κύτταρα στις 48 ώρες (**A**-**C**) και στις 120 ώρες πειράματος (τέλος πειραματικής διαδικασίας) (**D**-**F**) με χρώση Giemsa.



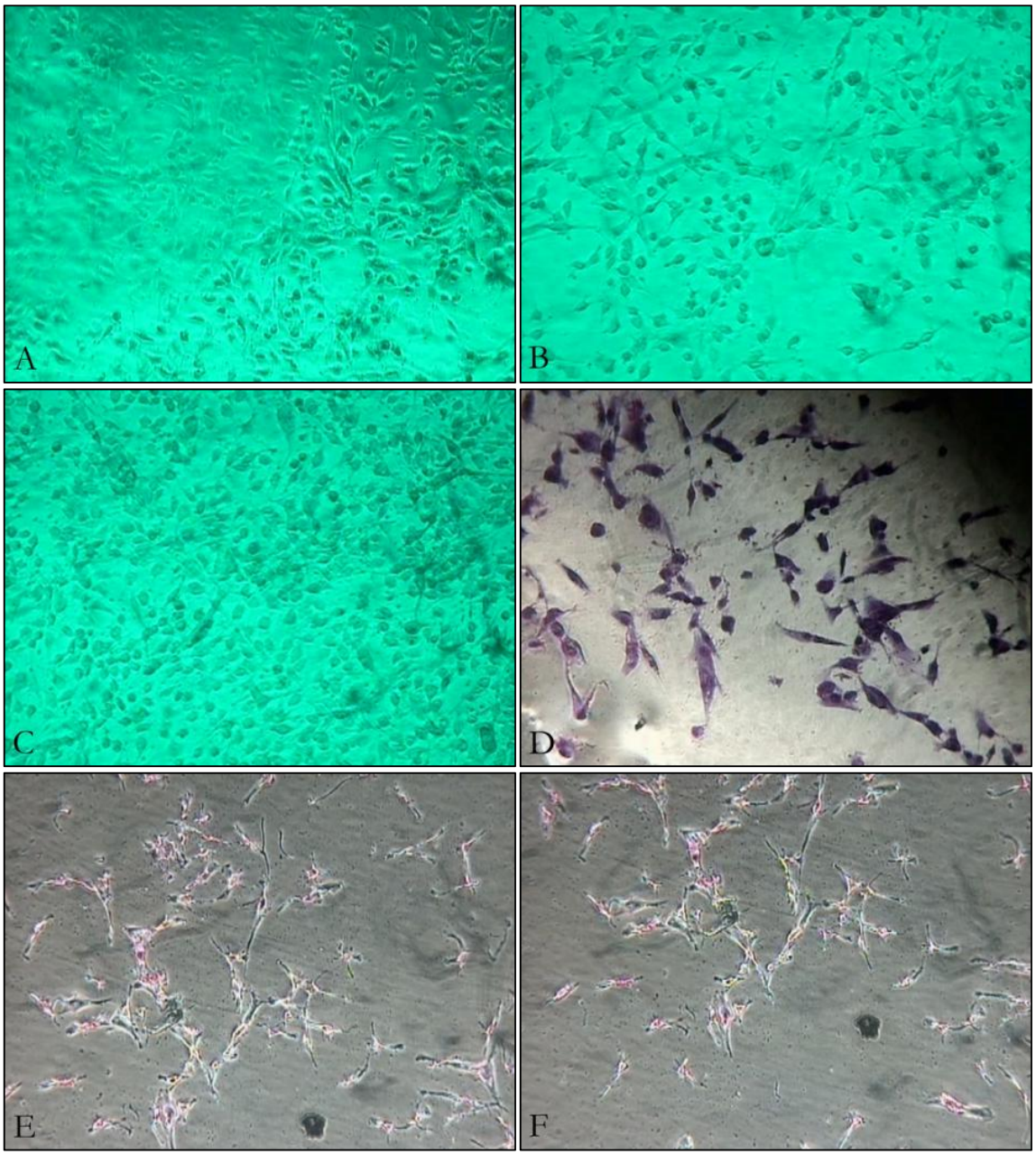
Εικόνα 203. Μικροσκοπικές εικόνες των κυττάρων A172, από το πείραμα επώασης των κυττάρων με Rapamycin. Παρουσιάζονται τα κύτταρα στις 48 ώρες (**A**-**C**) και στις 120 ώρες πειράματος (τέλος πειραματικής διαδικασίας) (**D**-**F**) με χρώση Giemsa.



Εικόνα 204. Μικροσκοπικές εικόνες των κυττάρων A172, από το πείραμα επώασης των κυττάρων με PI3K Inhibitor. Παρουσιάζονται τα κύτταρα στις 48 ώρες (**A**-**C**) και στις 120 ώρες πειράματος (τέλος πειραματικής διαδικασίας) (**D**-**F**) με χρώση Giemsa.



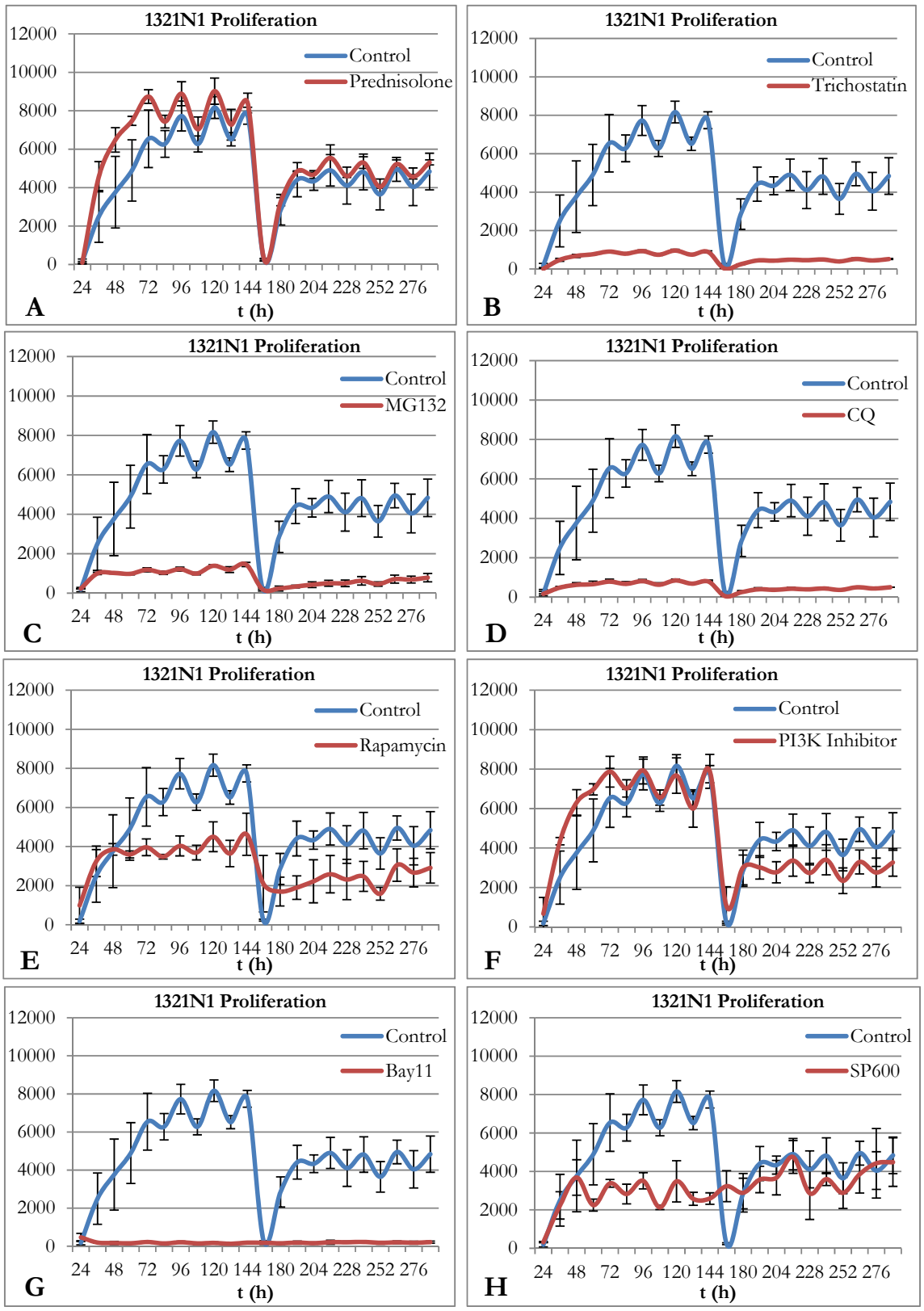
Εικόνα 205. Μικροσκοπικές εικόνες των κυττάρων A172, από το πείραμα επώασης των κυττάρων με Bay11. Παρουσιάζονται τα κύτταρα στις 48 ώρες (**A**, **B**) και στις 120 ώρες πειράματος (τέλος πειραματικής διαδικασίας) (**C**-**F**) με χρώση Giemsa.



Εικόνα 206. Μικροσκοπικές εικόνες των κυττάρων A172, από το πείραμα επώασης των κυττάρων με SP600 Inhibitor. Παρουσιάζονται τα κύτταρα στις 48 ώρες (**A**-**C**) και στις 120 ώρες πειράματος (τέλος πειραματικής διαδικασίας) (**D**-**F**) με χρώση Giemsa.

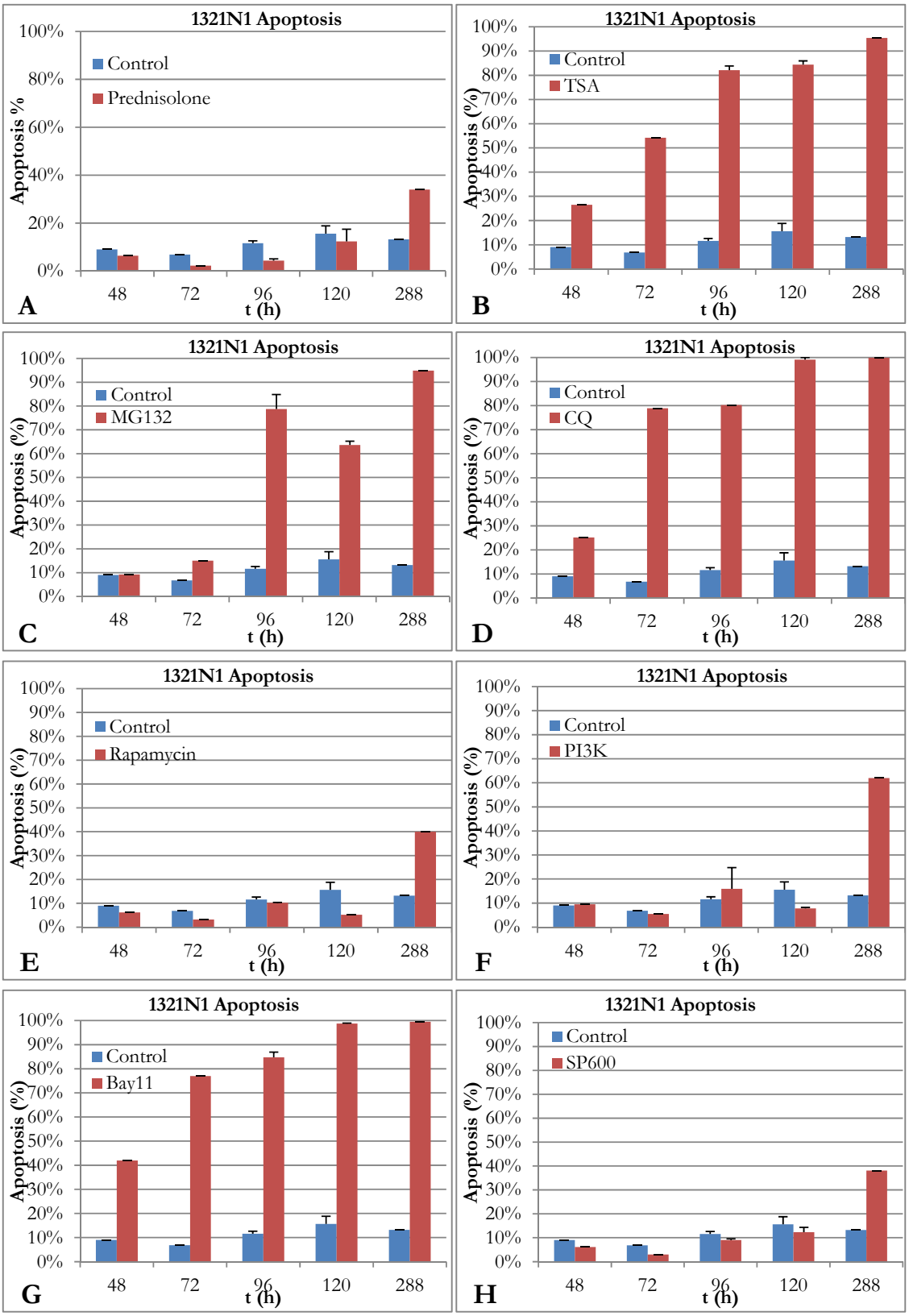
Αντίστοιχη ανάλυση πραγματοποιήσαμε στα κύτταρα 1321N1. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός έδωσε πανομοιότυπα αποτελέσματα με αυτά των κυττάρων A172. Η επίδραση της Prednisolone, και SP600 ήταν ακριβώς η ίδια με τα κύτταρα να επανακτούν την πολλαπλασιαστική τους δυναμική με την αλλαγή του θρεπτικού υλικού (**Εικόνα 207A**, **H**). Αυτό το αποτέλεσμα είναι ένα πολύ σημαντικό εύρημα για τη βασική μας υπόθεση ότι υπάρχουν κοινές γονιδιακές οδοί στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Αντίστοιχα στην επώαση με τους αναστολείς Rapamycin και PI3K τα κύτταρα βρίσκονται σε ταυτόσημα επίπεδα με το πείραμα ελέγχου, όπως συνέβαινε με τα κύτταρα A172 (**Εικόνα 207E**, **F**). Στην περίπτωση μάλιστα των 1321N1 φαίνεται τα κύτταρα αυτά να αντιδρούν καλύτερα στους αναστολείς αυτούς.

Η επώαση με τους αναστολείς TSA, MG132, CQ και Bay11, έδωσε παρόμοια αποτελέσματα με τα κύτταρα A172, αφού παρατηρήθηκε πλήρης αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού χωρίς τα κύτταρα να μπορούν να διαφύγουν από αυτή. Οπότε καταλαβαίνουμε ότι οι οδοί του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και του c-Jun ήτοι της JNK κινάσης, αποτελούν παραδείγματα σηματοδότησης που έχουν το αντίθετο αποτέλεσμα από το επιδιωκόμενο. Επίσης οι οδοί mTOR και PI3K/AKT/mTOR δεν είναι απαραίτητοι για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Αντίθετα οι οδοί της ακετυλίωσης, του πρωτεασώματος, της λειτουργίας των λυσοσωμάτων και του IκB/NFκB είναι μείζονος σημασίας για τα κύτταρα 1321N1.



Εικόνα 207. Πολλαπλασιασμός των κυττάρων 1321N1 υπό την επιδραση αναστολέων. Σε κάθε υπο-εικόνα παρουσιάζονται ο πολλαπλασιασμός του πειράματος ελέγχου σε σύγκριση με το πείραμα του αναστολέα.

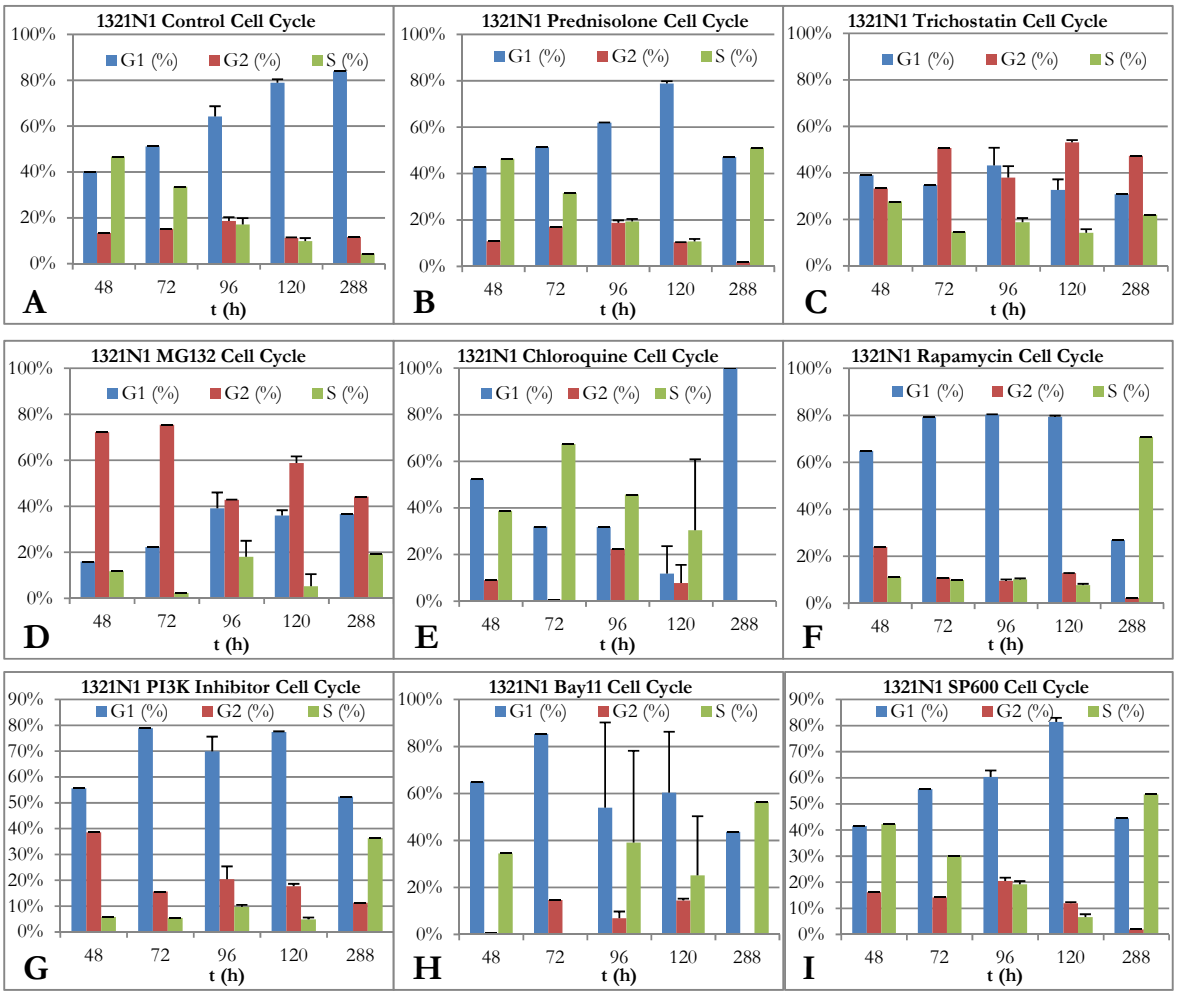
Στη μελέτη της απόπτωσης στα κύτταρα 1321N1, βλέπουμε παρόμοια αποτελέσματα με τα κύτταρα A172. Στη μελέτη των κυττάρων αυτών ακολουθήσαμε μια διαφορετική τακτική μέτρησης. Επιλέξαμε να εξετάσουμε για απόπτωση τόσο κατά τη διάρκεια της πειραματικής διάταξης από 0 ώρες έως 96 ώρες (που αντιστοιχεί σε 24 ώρες συνολικού χρόνου στην καλλιέργεια έως 120 ώρες) και στο τέλος της δεύτερης φάσης της πειραματικής διάταξης, ήτοι στις 288 ώρες (θυμίζουμε ότι η δεύτερη φάση του πειράματος περιελάμβανε την καλλιέργεια των κυττάρων με φρέσκα θρεπτικά υλικά και χωρίς αναστολείς). Ξεχωρίζουμε δύο κατηγορίες δράσεως: αναστολείς στους οποίους τα κύτταρα είναι ανθεκτικά και είναι Prednisolone, Rapamycin, PI3K inhibitor και SP600 (**Εικόνα 208A**, **E**, **F**, **H**) και αναστολείς στους οποίους τα κύτταρα είναι ευαίσθητα ήτοι TSA, CQ, MG132 και Bay11 (**Εικόνα 208B**, **C**, **D**, **G**). Στην περίπτωση του αναστολέα PI3K παρατηρούμε μια ενίσχυση της απόπτωσης στις 288 ώρες καλλιέργειας, που είναι και το μεγαλύτερο ποσοστό που παρατηρείται στα κύτταρα αυτά. Αντίθετα τα κύτταρα που είναι ευαίσθητα στους αναστολείς που προαναφέραμε παρουσίασαν απόπτωση, η οποία σε όλες τις περιπτώσεις ξεπερνούσε το 90%.



Εικόνα 208. Διαγραμματική παρουσίαση του αποπτωτικού θανάτου των κυττάρων 1321N1 υπό την επίδραση αναστολέων. Σε κάθε υπο-εικόνα παρουσιάζονται η απόπτωση του πειράματος ελέγχου σε σύγκριση με το πείραμα του αναστολέα.

Στη μελέτη του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων 1321N1, παρατηρούμε ότι το πείραμα ελέγχου κινείται ως αναμενόμενο και παρόμοιο με την προηγούμενη κυτταρική σειρά που μελετήσαμε (**Εικόνα 209A**). Στους αναστολείς παρατηρούμε ότι η prednisolone, ακολούθησε το πείραμα ελέγχου ενώ στις τελευταίες ώρες μεγάλο ποσοστό των κυττάρων πέρασε στη G_2 φάση, πράγμα που επιβεβαιώνει την ιδιαίτερη πολλαπλασιαστική δυναμική που έχουν αποκτήσει τα κύτταρα λόγω της επώασής τους με το γλυκοκορτικοειδές (**Εικόνα 209B**). Αντίστοιχα επίσης βλέπουμε ότι οι αναστολείς στους οποίους είναι ανθεκτικά τα κύτταρα στις 288 ώρες παρουσιάζουν αυξημένα ποσοστά στην G_2 φάση συνοδευόμενη από μικρή απόπτωση, πράγμα που υποδεικνύει την επιβεβαίωση του αυξημένου πολλαπλασιασμού (**Εικόνα 209F**, **G**, **I**).

Παρομοίως συναντάμε αυξημένα ποσοστά κυττάρων στη G_2 φάση αλλά συνοδευόμενη από αυξημένη απόπτωση στα ευαίσθητα κύτταρα στους αναστολείς (**Εικόνα 209C**, **D**, **E**, **G**). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται να επιβεβαιώσουν τα αποτελέσματα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

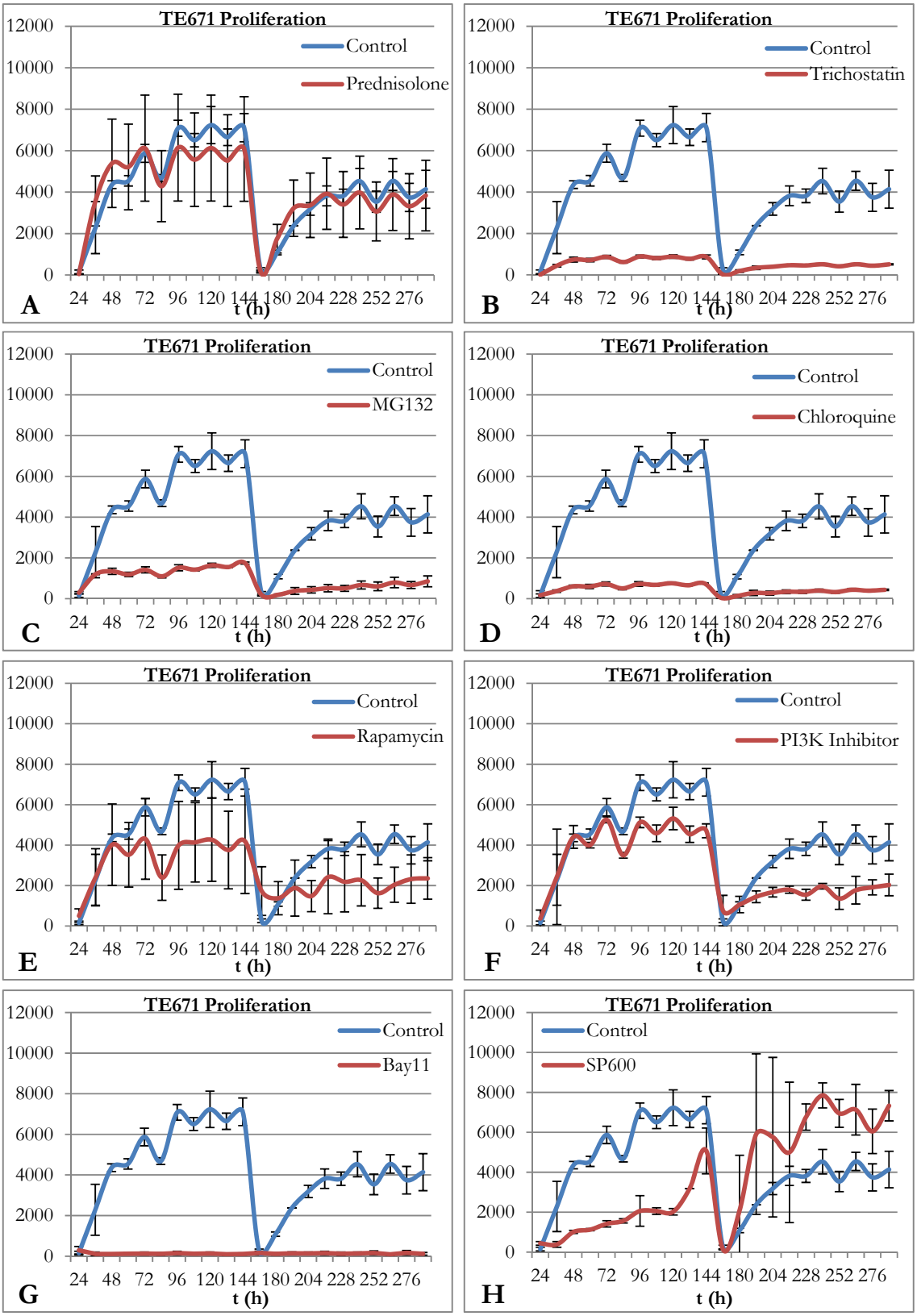


Εικόνα 209. Διαγραμματική παρουσίαση του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων 1321N1 υπό την επίδραση αναστολέων. Το πείραμα ελέγχου και τα πειράματα των αναστολέων παρουσιάζονται ξεχωριστά.

Η τελευταία κυτταρική σειρά που μελετήσαμε, η TE671, έχει ιδιαίτερη σημασία λόγω του ότι αποτελεί έναν διαφορετικό κυτταρικό τύπο. Όπως αναφέραμε στην εισαγωγή της παρούσης εργασίας, τα κύτταρα αυτά ελήφθησαν από όγκο παρεγκεφαλίδος αλλά φάνηκε τελικά ότι είχαν μορφολογία και δομή κυττάρων ραβδομυοσαρκώματος, μιας συμπαγούς δηλαδή νεοπλασίας, διαφορετικού τύπου από τις άλλες δύο κυτταρικές σειρές, πράγμα που θα παρέπεμπε στη διαφορετική αντίδραση σε αναστολείς σηματοδοτικών οδών. Τα αποτελέσματα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ήταν εξαιρετικά ενδιαφέροντα μιας και μας έδωσαν ενδείξεις παρόμοιας αντίδρασης με τους άλλους κυτταρικούς τύπους. Τόσο η prednisolone όσο και ο παράγοντας SP600 είχαν μιτωτική δράση στα κύτταρα αυτά όπως και στις προηγούμενες πειραματικές διατάξεις (**Εικόνα 210A**, **H**). Αντίστοιχα οι αναστολείς Rapamycin και PI3K έδειξαν να μην επηρεάζουν τα κύτταρα και ο πολλαπλασιασμός να βρίσκεται στα επίπεδα του πειράματος ελέγχου (**Εικόνα 210E**, **F**). Άρα καταλαβαίνουμε ότι η σηματοδότηση από τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, το c-Jun,

την οδό mTOR και την οδό PI3K/AKT/mTOR δεν είναι κρίσιμες για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Αντίθετα θα λέγαμε ότι η αναστολή των πρώτων δύο είχε τα αντίθετα αποτελέσματα ενώ η αναστολή των τελευταίων δύο δεν είχε καμία επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

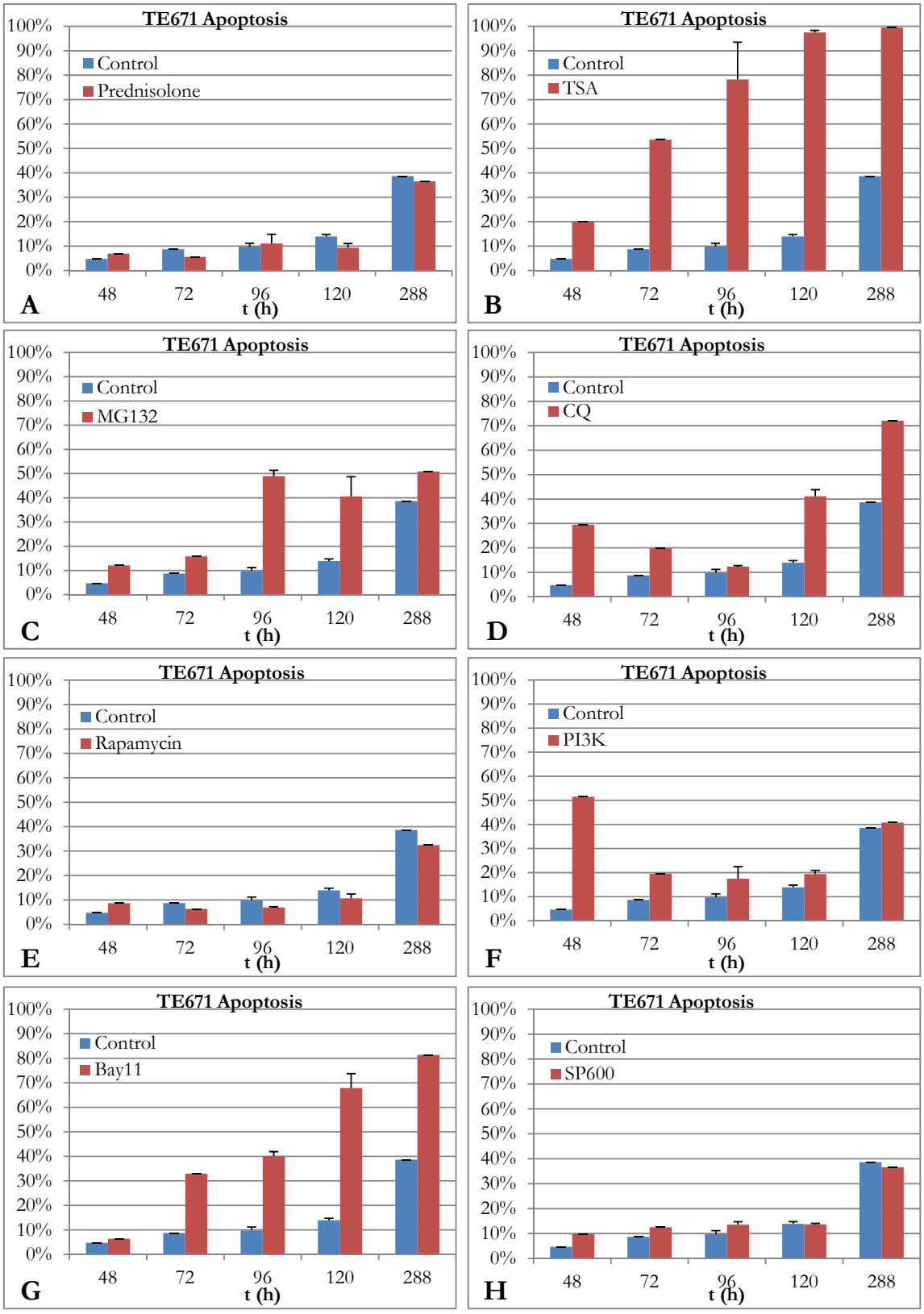
Σε αντιστοιχία, η χρήση των αναστολέων TSA, CQ, MG132 και Bay11, οδήγησε τα κύτταρα σε πλήρη αναστολή του πολλαπλασιασμού τους και μάλιστα δεν μπόρεσαν να ανακάμψουν από αυτό (**Εικόνα 210B**, **C**, **D**, **F**).



Εικόνα 210. Πολλαπλασιασμός των κυττάρων TE671 υπό την επιδραση αναστολέων. Σε κάθε υπο-εικόνα παρουσιάζονται ο πολλαπλασιασμός του πειράματος ελέγχου σε σύγκριση με το πείραμα του αναστολέα.

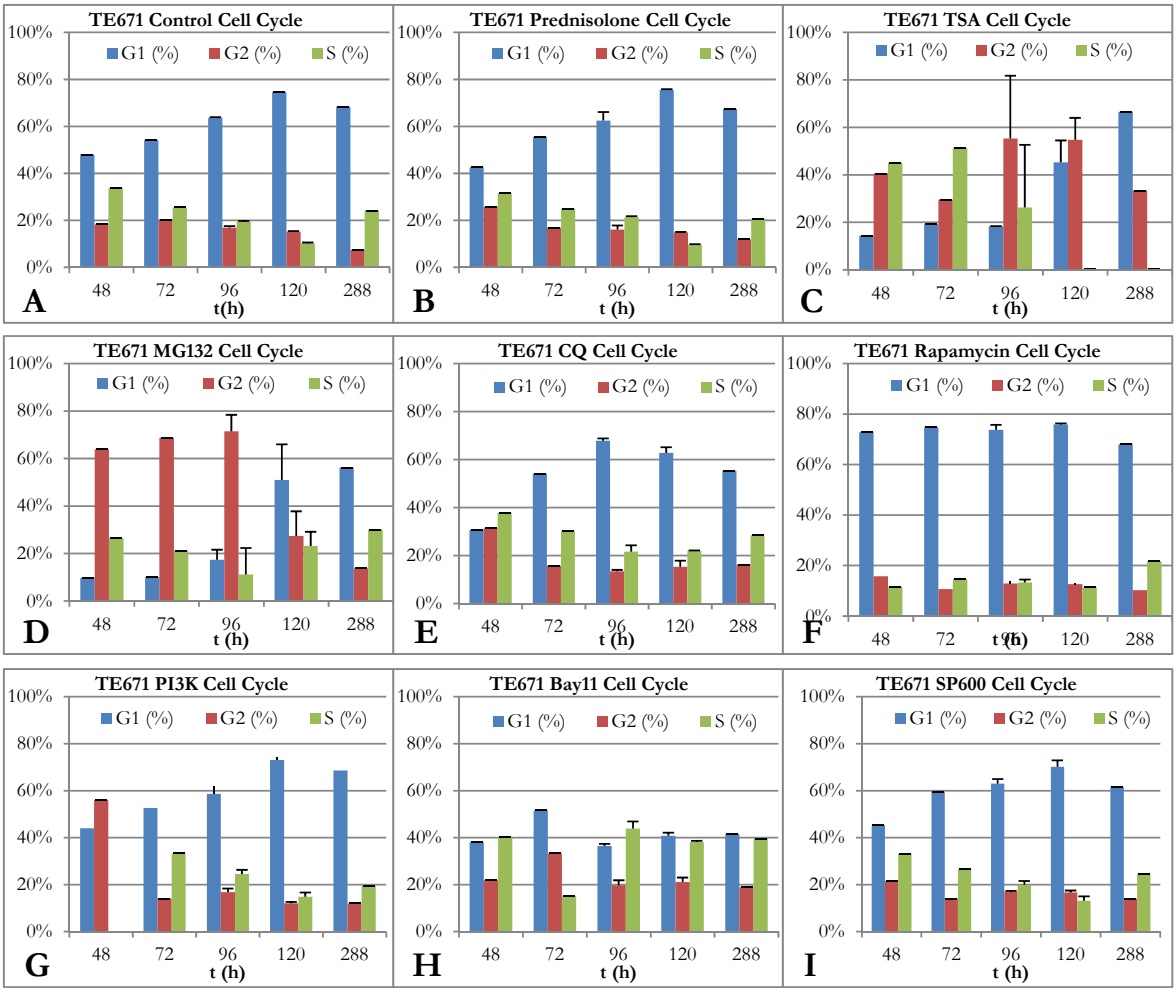
Όταν εξετάσουμε όμως την απόπτωση παρατηρούμε κάποιες διαφορές μεταξύ των κυττάρων αυτών και των άλλων κυτταρικών τύπων. Παρατηρούμε ότι τα κύτταρα είναι ευαίσθητα στην TSA ενώ δεν ιάζουν την ίδια ευαισθησία στους αναστολείς MG132 και CQ ενώ δείχνουν να έχουν παρόμοια ευαισθησία στον αναστολέα Bay11 (**Εικόνα 211B**, **C**, **D**, **H**). Παρά το γεγονός ότι δεν υπάρχει ανάκαμψη και πλήρης αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, δεν επέρχεται κυτταρικός θάνατος, πράγμα που υποδεικνύει ότι οι σηματοδοτικές αυτές οδοί δεν είναι κρίσιμες για την επιβίωση των κυττάρων αυτών. Η μόνη οδός που φαίνεται να είναι άκρως απαραίτητη για την επιβίωσή τους είναι η αναστολή της ακετυλίωσης μέσω του παράγοντα TSA.

Αντίστοιχα αποτελέσματα, με τις άλλες κυτταρικές σειρές, έχουμε για τους λοιπούς αναστολείς ήτοι prednisolone, Rapamycin, PI3K και SP600. Παρουσιάζεται η ίδια ανθεκτικότητα όπως και στις προηγούμενες σειρές.



Εικόνα 211. Διαγραμματική παρουσίαση του αποπτωτικού θανάτου των κυττάρων TE671υπό την επίδραση αναστολέων. Σε κάθε υπο-εικόνα παρουσιάζονται η απόπτωση του πειράματος ελέγχου σε σύγκριση με το περίραμα του αναστολέα.

Παρατηρώντας τον κυτταρικό κύκλο μπορούμε να δούμε ότι ο αναστολέας TSA οδηγεί τα κύτταρα σε στασιμότητα στις φάσεις G_1 και S, κάτι που φαίνεται από τις 120 ώρες επώασης μέχρι και τις τελευταίες ώρες της δεύτερης φάσης του πειράματος (288 ώρες) πράγμα που επιβεβαιώνει την αποπτωτική δράση του αναστολέα (**Εικόνα 212C**). Επίσης ενδιαφέρον παρουσιάζει η δράση του παράγοντα MG132, ο οποίος δείχνει να οδηγεί τα κύτταρα σε *G_2-arrest*, από την οποία όμως διαφεύγουν τελικά και περνούν σε κανονική πορεία κυτταρικού κύκλου. Η διαφυγή από *G_2-arrest* αποτελεί έναν κλασσικό μηχανισμό ανθεκτικότητας στα κύτταρα. Παρόμοια συμπεριφορά έχουμε αναφέρει στο παρελθόν με τα κύτταρα CCRFCEM, τα οποία είναι ανθεκτικά στην prednisolone, και αφού εισέρχονται σε φάση *G_2-arrest* τελικά διαφεύγουν συνεχίζοντας τον πολλαπλασιασμό τους.



Εικόνα 212. Διαγραμματική παρουσίαση του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων TE671 υπό την επίδραση αναστολέων. Το πείραμα ελέγχου και τα πειράματα των αναστολέων παρουσιάζονται ξεχωριστά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 29

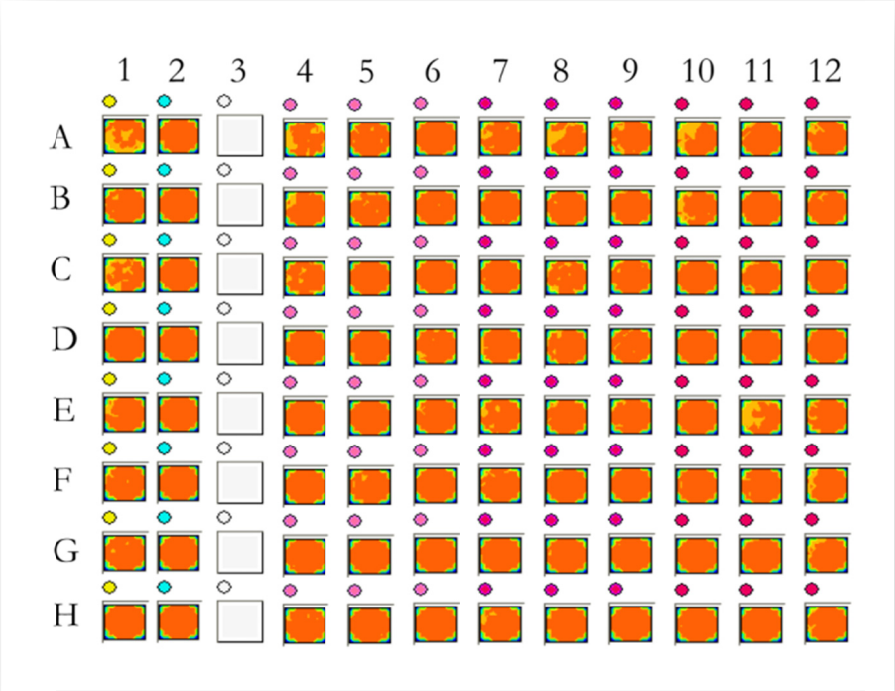
ΠΕΡΙ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ *IN VITRO* ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ

Το θέμα του μεταβολισμού και της ρύθμισής του αποτελεί ένα εξαιρετικά περίπλοκο φανόμενο, το οποίο αποτελεί από μόνο του μια πλήρη εργασία. Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε το φαινόμενο ως μια μελέτη περίπτωσης και ως τέτοια πρέπει να ληφθεί και ως εκ τούτου, δεν προχωρήσαμε σε βάθος στη μελέτη του. Η ανάγκη για τη διερεύνηση όμως προέκυψε από τις παρατηρήσεις στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Πρέπει να υπενθυμήσουμε ότι είδαμε τον πολλαπλασιασμό να είναι εντονότερος σε μικρότερους όγκους θρεπτικού σε σύγκριση με τα κύτταρα που μεγάλωσαν με μεγαλύτερη διαθεσιμότητα πόρων. Θα ήταν λοιπόν εύλογο να ρωτήσουμε αν την ίδια πορεία ακολούθησε και η κατανάλωση ενέργειας.

Πριν προχωρήσουμε στην παρουσίαση των αποτελεσμάτων πρέπει να θυμήσουμε ότι τα κυτταρικά συστήματα που μελετήσαμε, και γενικότερα τα βιολογικά συστήματα, είναι ανοιχτά. Δηλαδή, ανταλλάσουν ενέργεια και μάζα με το περιβάλλον τους. Αυτό αποτελεί θεμελιώδη νόμο είτε αναφερόμαστε σε φυσιολογικά είτε σε καρκινικά κύτταρα. Επίσης ας θυμηθούμε τις αρχικές διατυπώσεις της ενότητας της εισαγωγής, όπου είπαμε ότι και τα καρκινικά κύτταρα υπακούουν υποχρεωτικά στην αρχή διατήρησης της ενέργειας. Μια άλλη σημαντική παράμετρος των βιολογικών συστημάτων είναι ότι λειτουργούν εκτός θερμοδυναμικής ισορροπίας. Με απλά λόγια αυτό σημαίνει ότι όταν το περιβάλλον έχει μια θερμοκρασία T και η εντροπία τείνει προς το μηδέν στα βιολογικά συστήματα και ιδιαίτερα στα θηλαστικά διατηρείται μια θερμοκρασία T_m όπου $T_m > T$ και η εντροπία μεγιστοποιείται.

Τέλος, αν δούμε τη σύνοψη των ενεργειακών αντιδράσεων όπως τις περιγράψαμε στην ενότητα «Υλικό και Μέθοδος» φτάνουμε στο συμπέρασμα ότι για κάθε mole γλυκόζης παίρνουμε δύο mole NADH.

Με τη μεθοδολογία που περιγράψαμε στην ενότητα «Υλικό και Μέθοδος» μετρήσαμε την παραγωγή NADH, και ως εκ τούτου αυτό αντανακλά γραμμικά στην κατανάλωση γλυκόζης. Έγιναν δύο ειδών μετρήσεις, μια μέτρηση περιελάμβανε τη μέση τιμή του φθορισμού των μορίων NADH σε κάθε θέση της πλάκας μικροτιτλοποίησης, και η δεύτερη περιελάμβανε τη σάρωση κάθε πηγαδιού της πλάκας μικροτιτλοποίησης σε ίσα διαστήματα των 60μm και συνολικά 100 μετρήσεις. Στην **Εικόνα 213**, παρουσιάζεται μια ενδεικτική εικόνα από τη σάρωση ενός πειράματος με τα κύτταρα A172.

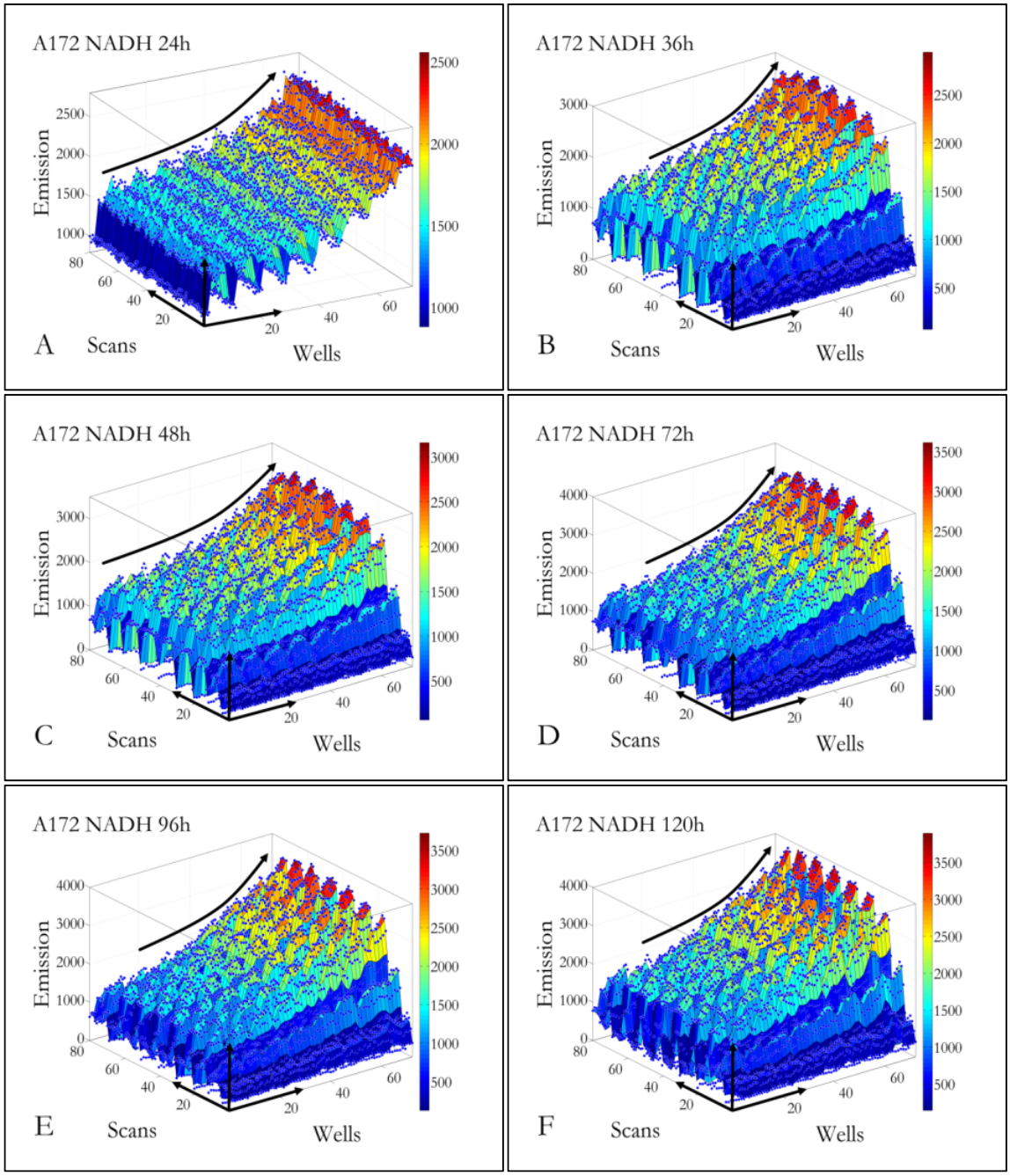


Εικόνα 213. Παρουσιάζεται μια ενδεικτική πειραματική διάταξη, ήτοι η πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων (πηγαδιών) και σε κάθε θέση φαίνεται το διάγραμμα πυκνότητας της σάρωσης. Το συγκεκριμένο διάγραμμα προέρχεται από πείραμα μέτρησης του NADH. Στις θέσεις A1-H1 βρίσκονται τα δείγματα κενού, θρεπτικό υλικό χωρίς κύτταρα, στις θέσεις A2-H2 βρίσκονται τα δείγματα ελέγχου, θρεπτικό υλικό με μεγάλο αριθμό κυττάρων ώστε να πιστοποιείται η θετική μέτρηση. Στις θέσεις A4-H6 βρίσκονται κύτταρα από 100 έως 12800 αρχικό αριθμό και 100μl θρεπτικού υλικού. Στις θέσεις A7-H9 βρίσκονται κύτταρα από 100 έως 12800 αρχικό αριθμό και 200μl θρεπτικού υλικού. Τέλος Στις θέσεις A10-H12 βρίσκονται κύτταρα από 100 έως 12800 αρχικό αριθμό και 300μl θρεπτικού υλικού.

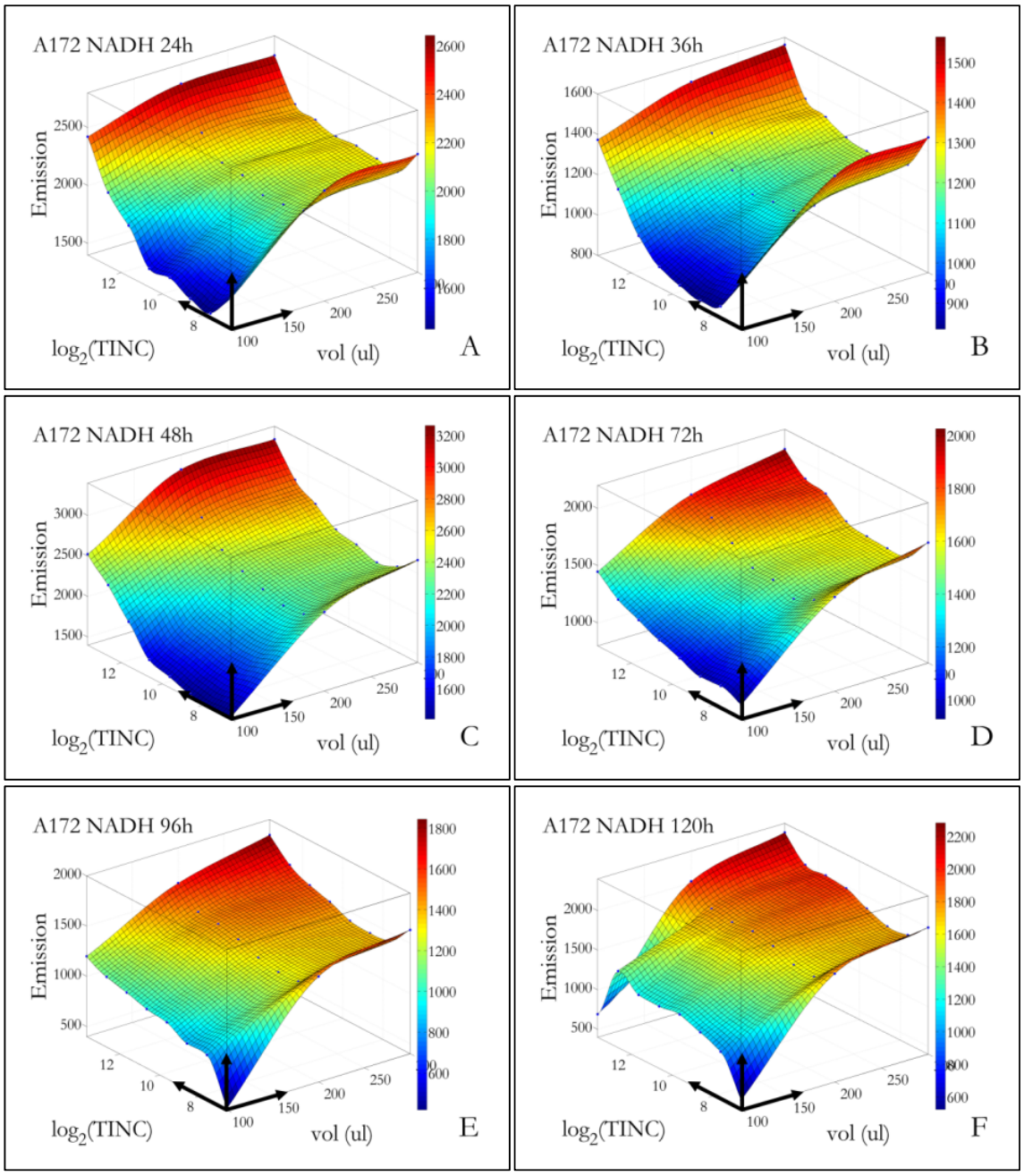
Έτσι για κάθε πηγάδι, λαμβάνουμε 100 μετρήσεις οι οποίες αντιστοιχούν στο φθορισμό των μορίων NADH στις αντίστοιχες θέσεις. Μπορούμε λοιπόν να αναπαραστήσουμε κάθε μέτρηση με μια σειριακή παράθεση των μετρήσεων και αυτό για κάθε θέση της πλάκας μικροτιτλοποίησης. Δεδομένου ότι υπάρχουν 96 θέσεις και αφαιρώντας τα πειράματα μηδενισμού (blanks) και τα πειράματα ελέγχου μένουν 72 θέσης με μετρήσεις κυττάρων. Το σχήμα αυτό μπορούμε να το αναπαραστήσουμε γραφικά και αυτό ως προς το χρόνο μας έδωσε ένα πολύ ενδιαφέρον αποτέλεσμα, το οποίο παρουσιάζεται στην **Εικόνα 214**. Στον άξονα των *X* παρουσιάζονται οι θέσεις της πλάκας μικροτιτλοποίησης, οι οποίες ακολουθούν σειριακή ταξινόμηση δηλαδή η πρώτη είναι η A1 και ακολουθούν οι A2, A3, A4, A5, A6, A7, A9, A10, A11, A12, B1, B2,… και ούτω καθεξής. Πρέπει επίσης να πούμε ότι ανά τρεις θέσεις μεταβάλλεται ο όγκος θρεπτικού. Έτσι παραδείγματος χάρην οι

θέσεις Α4, Α5, Α6 έχουν 100μl θρεπτικού οι θέσεις Α7, Α8, Α9 έχουν 200μl θρεπτικού, οι θέσεις Α10, Α11 και Α12 έχουν 300 μl θρεπτικού. Η ακριβής διάταξη αυτού του πειράματος παρουσιάζεται αναλυτικά στην **Εικόνα 63**. Συνεχίζοντας, στον άξονα των *Υ* είναι οι μετρήσεις σάρωσης επίσης σε σειριακή ταξινόμηση.

Αυτό που παρατηρούμε με την πρώτη ματιά είναι ότι ο φθορισμός αυξάνεται καθώς προχωράμε από τη θέση Α1 προς τις θέσεις Β1, C1 και τα λοιπά. Δηλαδή όσο αυξάνεται ο όγκος και ο αριθμός των κυττάρων τόσο αυξάνεται η κατανάλωση γλυκόζης. Αν όμως θυμηθούμε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, θα δούμε ότι δεν ίσχυε το ίδιο. *Άρα καταλαβαίνουμε ότι ο πολλαπλασιασμός και η κατανάλωση ενέργειας είναι αντίστροφα μεγέθη στο σύστημά μας*. Για να γίνει αυτό πιο κατανοητό αναπαραστήσαμε το ίδιο διάγραμμα αλλά αυτή τη φορά χρησιμοποιώντας τις μέσες τιμές από τις μετρήσεις της πλάκας μικροτιτλοποίησης. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στην **Εικόνα 215**, όπου φαίνεται πολύ ωραία η σχέση αριθμού κυττάρων και κατανάλωσης ενέργειας.

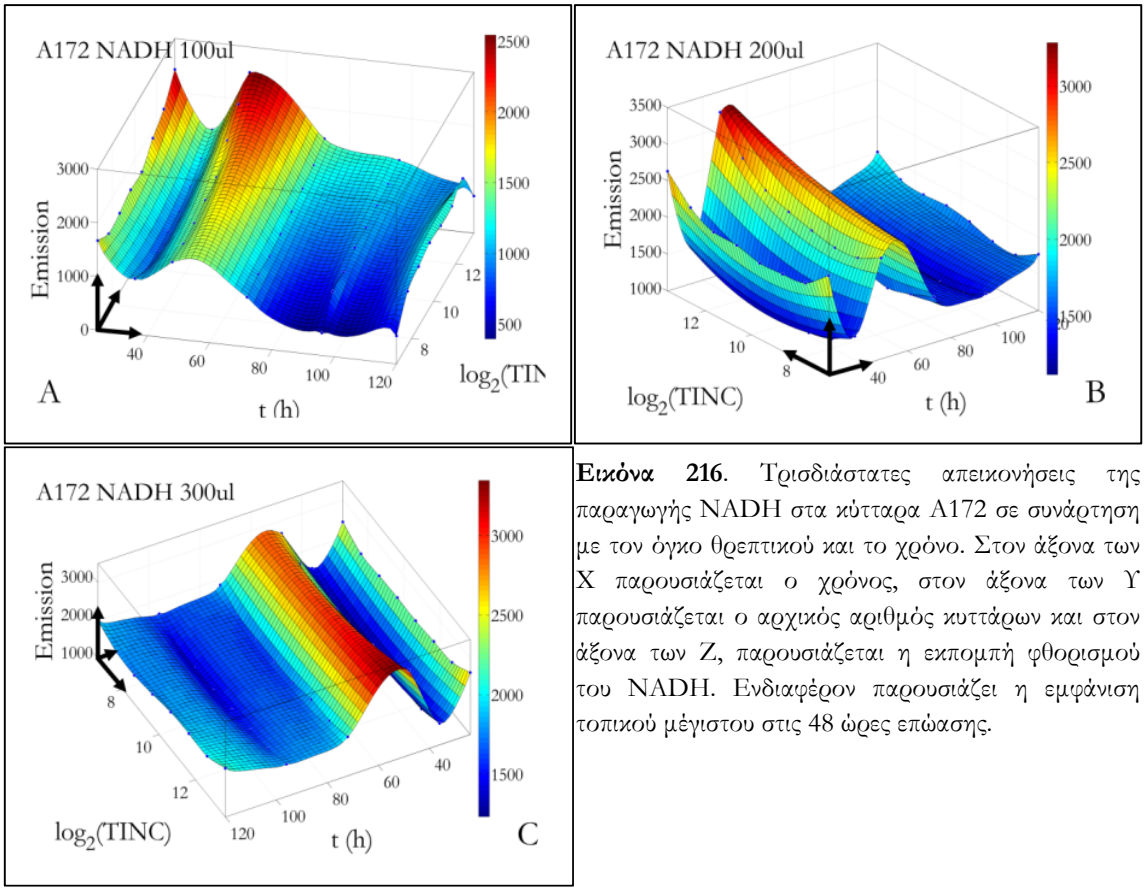


Εικόνα 214. Τρισδιάστατες απεικονήσεις της παραγωγής NADH στα κύτταρα A172 σε συνάρτηση με το χρόνο και τον όγκο θρεπτικού. Στον άξονα των X παρουσιάζονται τα πηγάδια της πλάκας μικροτιτλοποίησης, στον άξονα των Y παρουσιάζονται οι μετρήσεις από τη σάρωση του πηγαδιού και στον άξονα των Z, παρουσιάζεται η εκπομπή φθορισμού του NADH. Τα δεδομένα αυτά βρίσκονται στο χώρο $\mathbb{R}^{3\times3}$.



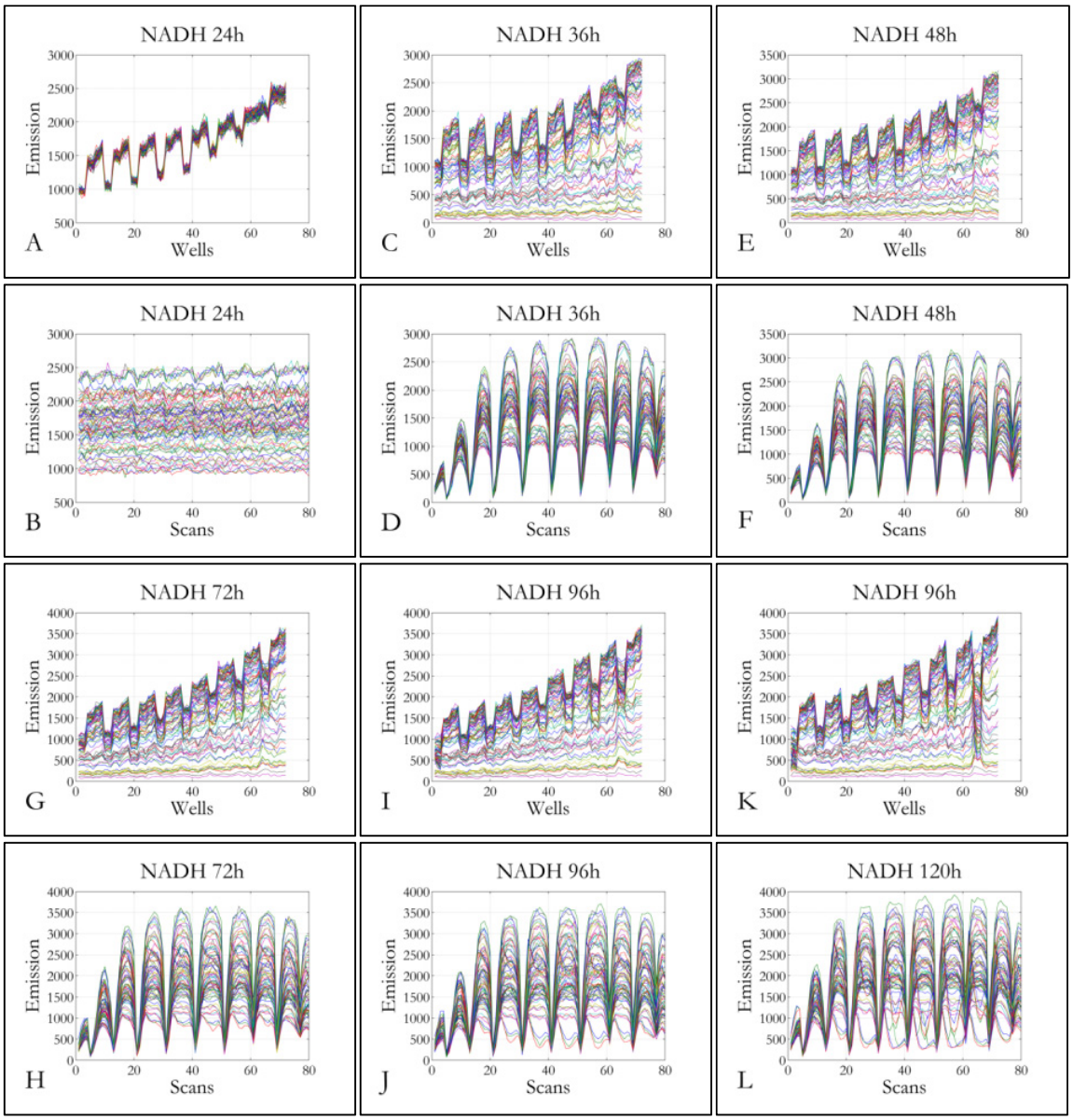
Εικόνα 215. Τρισδιάστατες απεικονήσεις της παραγωγής NADH στα κύτταρα A172 σε συνάρτηση με το χρόνο και τον όγκο θρεπτικού. Στον άξονα των X παρουσιάζεται ο όγκος θρεπτικού, στον άξονα των Y παρουσιάζεται ο αρχικός αριθμός κυττάρων και στον άξονα των Z, παρουσιάζεται η εκπομπή φθορισμού του NADH. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η σταδιακή άνοδος της κατανάλωσης γλυκόζης στα 100μl συναρτήσει του χρόνου.

Αντίστοιχο διάγραμμα παρουσιάζεται στην **Εικόνα 216**, όπου οι μεταβλητές που παρουσιάζονται είναι στον άξονα των X, ο χρόνος (t) στον άξονα των Y ο λογάριθμος του αρχικού αριθμού κυττάρων (*log_2(TINC)*) και στον άξονα των Z η εκπομπή φθορισμού των μορίων NADH.



Εικόνα 216. Τρισδιάστατες απεικονήσεις της παραγωγής NADH στα κύτταρα A172 σε συνάρτηση με τον όγκο θρεπτικού και το χρόνο. Στον άξονα των X παρουσιάζεται ο χρόνος, στον άξονα των Y παρουσιάζεται ο αρχικός αριθμός κυττάρων και στον άξονα των Z, παρουσιάζεται η εκπομπή φθορισμού του NADH. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η εμφάνιση τοπικού μέγιστου στις 48 ώρες επώασης.

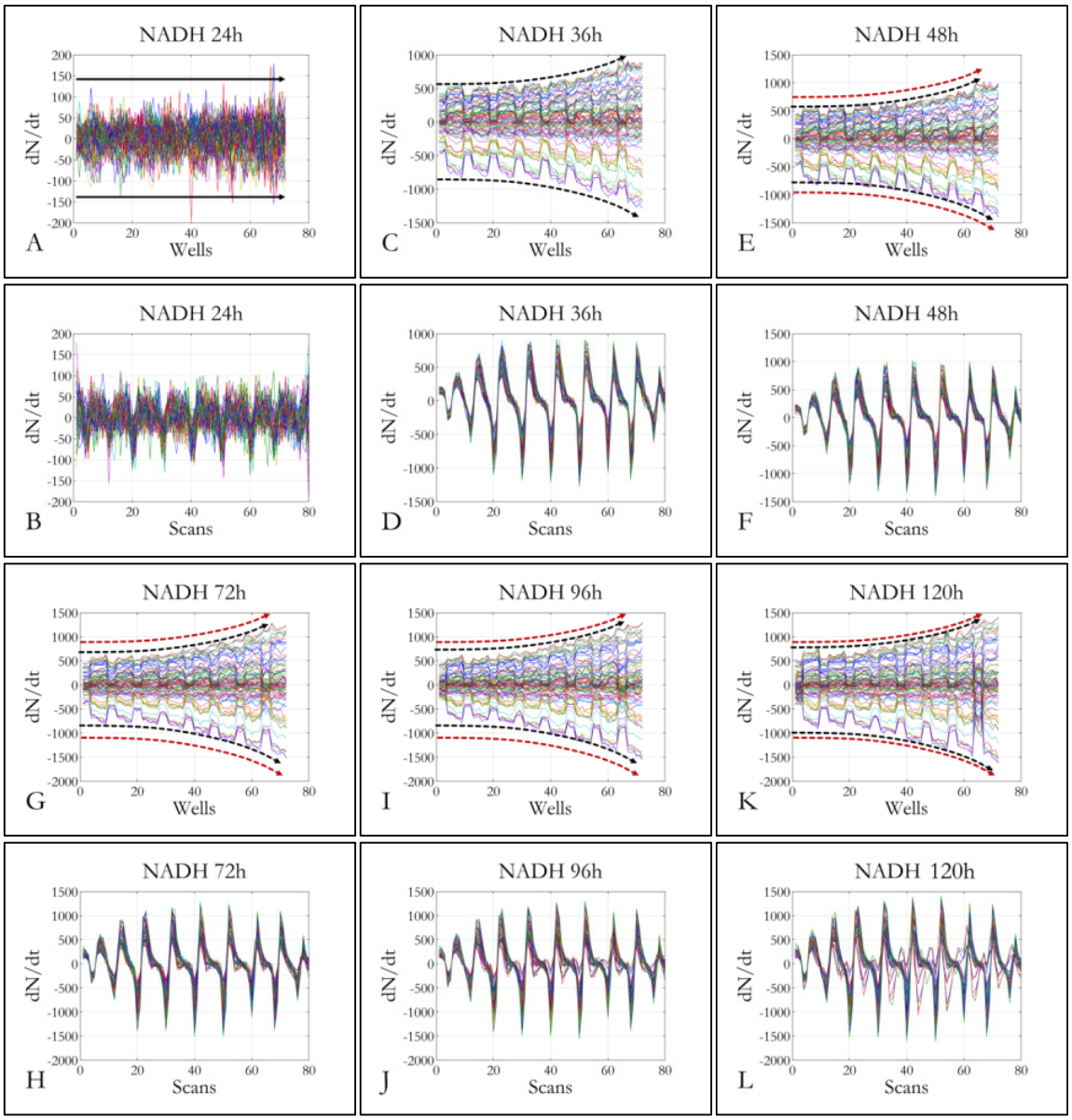
Για να επανέλθουμε στις μετρήσεις σάρωσης, δημιουργήσαμε μια αναπαράσταση όπου αντί των τρισδιάστατων σχημάτων χρησιμοποιήσαμε, τρόπον τινά, εγκάρσιες τομές των απεικονίσεων στην **Εικόνα 214**. Το αποτέλεσμα ήταν επίσης εξαιρετικά ενδιαφέρον και παρουσιάζεται στην **Εικόνα 217**.



Εικόνα 217. Προβολές των αξόνων των τρισδιάστατων αναπαραστάσεων της **Εικόνας 214**. Κάθε χρονική στιγμή αναπαρίσταται ως ζεύγος, όπου στο πρώτο σκέλος του ζεύγους παρουσιάζονται τα πηγάδια της πλάκας μικροτιτλοποίησης, ήτοι ο άξονας Χ της **Εικόνας 214** συναρτήσει της εκπομπής φθορισμού και στο δεύτερο σκέλος παρουσιάζονται οι μετρήσεις της σάρωσης ήτοι ο άξονας Υ της **Εικόνας 214** συναρτήσει της εκπομπής φθορισμού.

Παρόμοια ανάλυση κάναμε και για ένα ακόμα μέγεθος, που μελετήσαμε και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ήτοι ο ρυθμός μεταβολής της κατανάλωσης ενέργειας. Το αποτέλεσμα μας έδωσε πολύ ενδιαφέροντες δυναμικές και μάλιστα έχει ενδιαφέρον να παρατηρήσουμε ότι τις πρώτες 24 ώρες τα κύτταρα δείχνουν να βρίσκονται σε φάση προσαρμογής αφού δεν παρατηρούμε αλλαγές στη δυναμική της κατανάλωσης ενέργειας. Αντίθετα όταν περνάμε στις 36 ώρες και πέραν τούτων, η

δυναμική αλλάζει και παρατηρούμε μια πολύ ωραία ταλαντωτική συμπεριφορά στο ρυθμό μεταβολής της παραγωγής NADH. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στην **Εικόνα 218**.



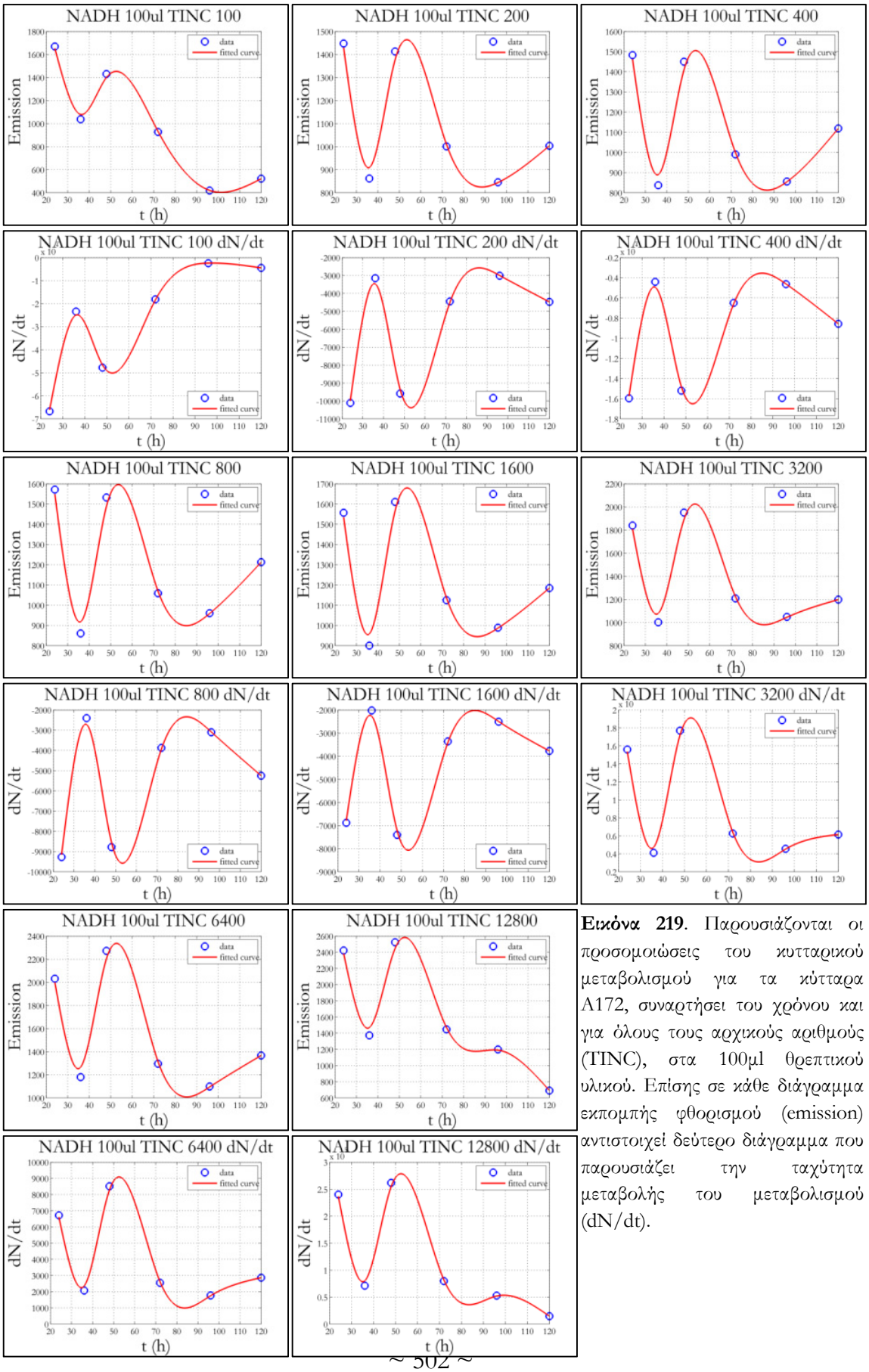
Εικόνα 218. Προβολές των αξόνων των τρισδιάστατων αναπαραστάσεων της πρώτης μερικής παραγώγου της ποσότητας του NADH. Το μέγεθος αυτό υποδεικνύει ουσιαστικά το ρυθμό με τον οποίο τα κύτταρα ακολουθούν το μεταβολισμό. Κάθε χρονική στιγμή αναπαρίσταται ως ζεύγος, όπου στο πρώτο σκέλος του ζεύγους παρουσιάζονται τα πηγάδια της πλάκας μικροτιτλοποίησης, ήτοι η προβολή τους, όπως αναφέρεται στην **Εικόνα 217**, συναρτήσει της εκπομπής φθορισμού και στο δεύτερο σκέλος παρουσιάζονται οι μετρήσεις της σάρωσης ήτοι η προβολή τους, όπως αναφέρεται στην **Εικόνα 217** συναρτήσει της εκπομπής φθορισμού. Όπου συναντώνται κόκκινες διακεκομένες γραμμές αυτές δείχνουν το πλάτος των μετρήσεων στις 36 ώρες και οι αντίστοιχες μαύρες διακεκομμένες γραμμές δείχνουν το πλάτος στη συγκεκριμένη χρονική στιγμή.

Θα εστιάσουμε την προσοχή μας στις επιμέρους μετρήσεις της κατανάλωσης ενέργειας και για το λόγο αυτό, εξετάσαμε τους αρχικούς αριθμούς κυττάρων για κάθε όγκο θρεπτικού ξεχωριστά. Τα

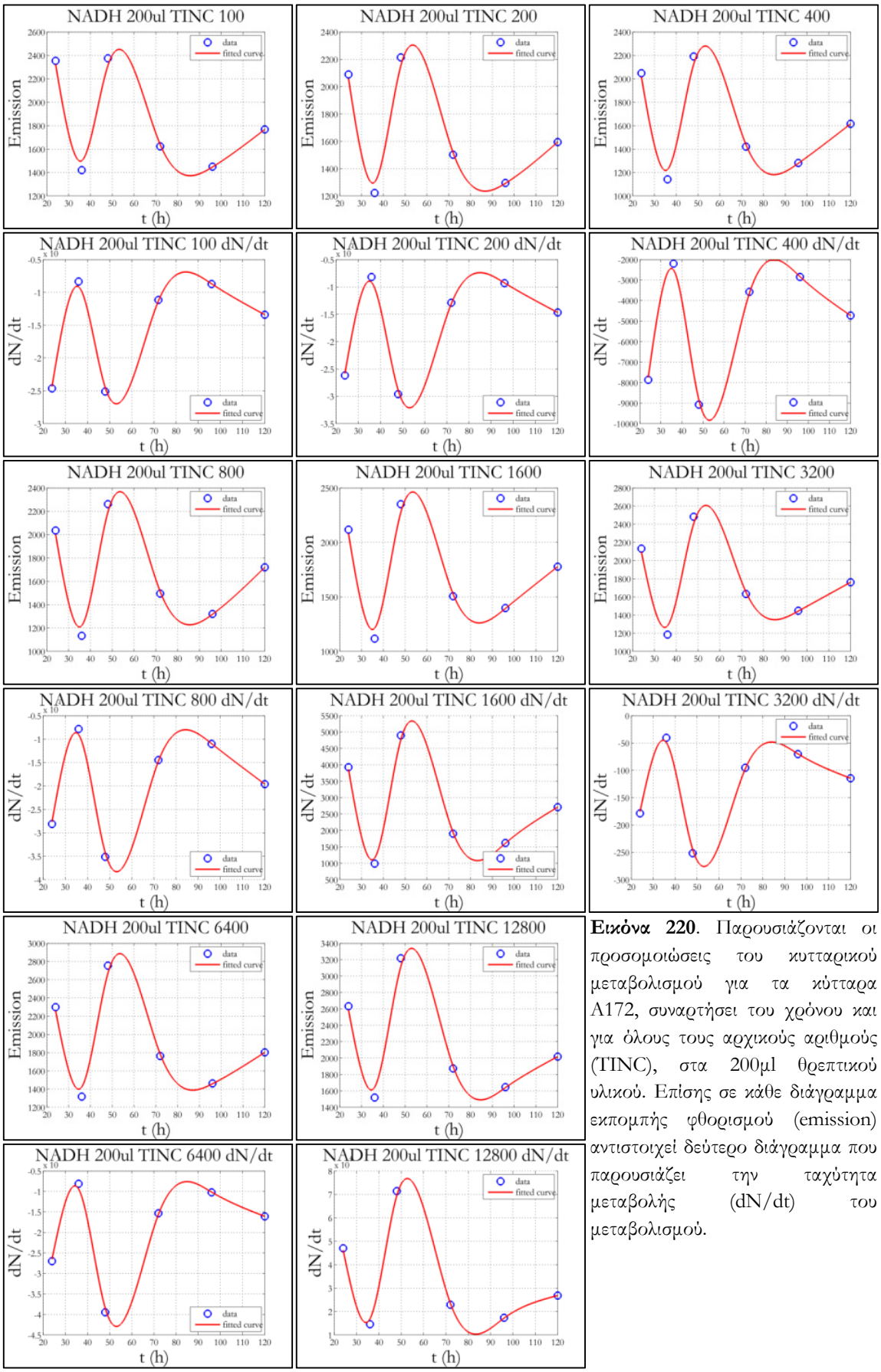
αποτελέσματα αυτών των αναλύσεων παρουσιάζονται στις επόμενες εικόνες (**Εικόνα 219**-**Εικόνα 221**).

Από τα διαγράμματα αυτά μπορούν να γίνουν δύο ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις. Η πρώτη αφορά στο προφίλ μεταβολής της κατανάλωσης γλυκόζης καθώς και στο προφίλ του ρυθμού μεταβολής (της ταχύτητας) της κατανάλωσης. Ακολουθεί την ίδια οδό σε όλες τις μετρήσεις ανεξαρτήτως όγκου θρεπτικού υλικού. Η δεύτερη παρατήρηση έχει να κάνει με το γεγονός ότι το προφίλ της ταχύτητας κατανάλωσης ενέργειας αντιστρέφεται στις υψηλότερες συγκεντώσεις κυττάρων και για όγκους θρεπτικού 100μl και 300μl. Στα 200μl θρεπτικού το προφίλ ταχύτητας παραμένει το ίδιο για όλους τους αρχικούς αριθμούς κυττάρων. Στο σημείο αυτό να θυμήσουμε ότι παρόμοια κοινή δυναμική είχαμε δει στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όπου είχαμε καταλήξει στο συμπέρασμα ότι υπάρχει μια κοινή οδός για τον τρόπο που πολλαπλασιάζονται τα κύτταρα ανεξάρτητα του αρχικού αριθμού τους. Πρέπει αυτή τη διαπίστωση να την εξειδικεύσουμε, μιας και μπορεί να δημιουργήσει ερωτήματα.

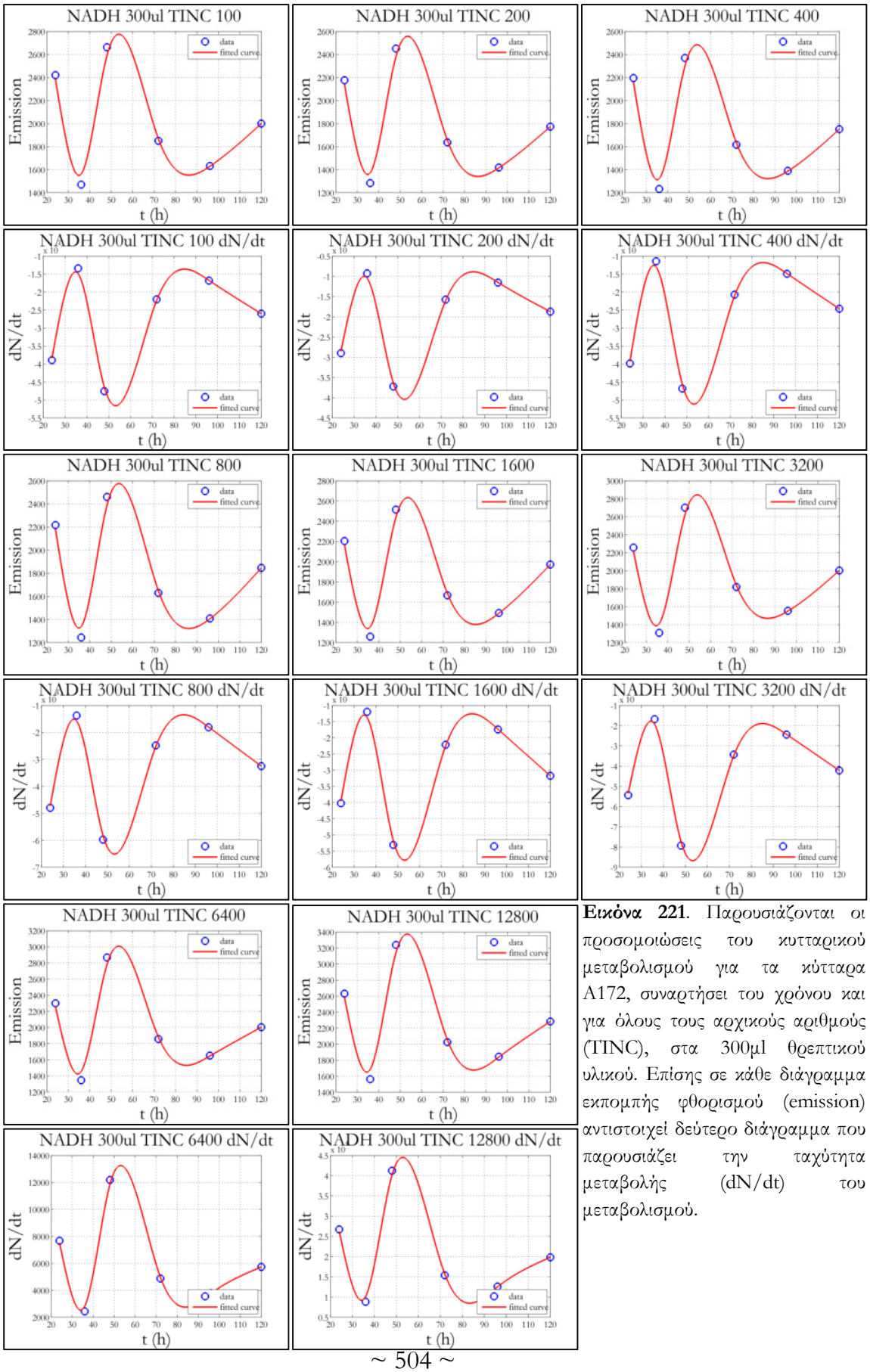
Είναι προφανές ότι ο επιμέρους πολλαπλασιασμός και κατανάλωση ενέργειας είναι διαφορετικά λόγω των διαφορετικών συνθηκών που επικρατούν στα κυτταρικά συστήματα. Κατά συνέπεια εύλογη ερώτηση είναι που βρίσκεται η ομοιότητα. Η απάντηση σε αυτό είναι ότι τα αποτελέσματά μας, μας δείχνουν ότι έχουμε ένα κοινό προφίλ ή για να το εκφράσουμε με πιο τεχνικούς όρους, έχουμε σοβαρές ενδείξεις ότι τα φαινόμενα που μελετήσαμε περιγράφονται από την ίδια συνάρτηση. Στη συνάρτηση αυτή όμως μεταβάλλονται οι συντελεστές της και οι οποίοι δίνουν τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά σε κάθε παραλλαγή των φαινομένων που μελετήσαμε. Αν θυμηθούμε τη σιγμοειδή συνάρτηση, θα ανακαλέσουμε ότι η ίδια συνάρτηση έδινε πολύ διαφορετικά αποτελέσματα ανάλογα με το συντελεστή k που περιείχε. Ακριβώς το ίδιο φαινόμενο έχουμε και στα φαινόμενα που μελετήσαμε. Όλα τα φαινόμενα που μελετήσαμε περιγράφονται από μια, ενδεχομένως, συνάρτηση στην οποία μεταβάλλουμε τους συντελεστές ανάλογα με τις αρχικές συνθήκες.



Εικόνα 219. Παρουσιάζονται οι προσομοιώσεις του κυτταρικού μεταβολισμού για τα κύτταρα A172, συναρτήσει του χρόνου και για όλους τους αρχικούς αριθμούς (TINC), στα 100μl θρεπτικού υλικού. Επίσης σε κάθε διάγραμμα εκπομπής φθορισμού (emission) αντιστοιχεί δεύτερο διάγραμμα που παρουσιάζει την ταχύτητα μεταβολής του μεταβολισμού (dN/dt).



Εικόνα 220. Παρουσιάζονται οι προσομοιώσεις του κυτταρικού μεταβολισμού για τα κύτταρα A172, συναρτήσει του χρόνου και για όλους τους αρχικούς αριθμούς (TINC), στα 200μl θρεπτικού υλικού. Επίσης σε κάθε διάγραμμα εκπομπής φθορισμού (emission) αντιστοιχεί δεύτερο διάγραμμα που παρουσιάζει την ταχύτητα μεταβολής (dN/dt) του μεταβολισμού.



Εικόνα 221. Παρουσιάζονται οι προσομοιώσεις του κυτταρικού μεταβολισμού για τα κύτταρα A172, συναρτήσει του χρόνου και για όλους τους αρχικούς αριθμούς (TINC), στα 300μl θρεπτικού υλικού. Επίσης σε κάθε διάγραμμα εκπομπής φθορισμού (emission) αντιστοιχεί δεύτερο διάγραμμα που παρουσιάζει την ταχύτητα μεταβολής (dN/dt) του μεταβολισμού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 30

ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΕΣ/ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΤΑ ΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ

Το κεφάλαιο αυτό, αποτελεί ίσως ένα από τα δυσκολότερα θέματα όχι μόνο στην παρούσα εργασία αλλά γενικότερα στη βιβλιογραφία. Στην εισαγωγή της εργασίας μας αναφερθήκαμε σε κάποιες βασικές αρχές που διέπουν τη φύση των ηλεκτροφυσικών και ηλεκτροχημικών μετρήσεων σε βιολογικά και γενικότερα ζώντα συστήματα. Δύο εφαρμογές ιδιαίτερα γνωστές είναι το καρδιογράφημα, και το εγκεφαλογράφημα. Επί της ουσίας και τα δύο είναι μετρήσεις της τάσεως, δηλαδή της διαφοράς δυναμικού, σε διαφορετικά μέρη του σώματος. Οι συσκευές που πραγματοποιούν αυτές τις μετρήσεις δεν είναι τίποτε άλλο από εξειδικευμένοι παλμογράφοι, ακριβώς όπως αυτός που χρησιμοποιήσαμε στην παρούσα μελέτη. Είναι επομένως κατανοητό ότι είναι δυνατό να μετρήσουμε βιολογικούς παράγοντες με μη-παρεμβατικές μεθόδους, ανώδυνα και με ακρίβεια. Η ιδέα αυτή είναι παλιά αλλά καθόλου απλή στην εφαρμογή της. Το πρόβλημα έγκειται στην ικανότητα διαχωρισμού ενός σήματος σε επιμέρους τμήματα. Για να γίνει αυτό πιο κατανοητό ας δώσουμε ένα παράδειγμα. Ας υποθέσουμε ότι θέλουμε να ταυτοποιήσουμε την ποσότητα σεροτονίνης σε ένα διάλυμα. Υπάρχουν διάφορες μεθοδολογίες για αυτό και μια από αυτές είναι η βολταμετρία, μια μέθοδος που επαφύεται στην ιδιότητα των μονοαμινών να οξειδώνονται. Τι γίνεται όμως αν στο ίδιο διάλυμα προσθέσουμε και ντοπαμίνη ή για να το κάνουμε ακόμα πιο δύσκολο προσθέδουμε αδρεναλίνη, νοραδρεναλίνη και 5-υδρόξυ-τρυπτοφάνη. Τότε αμέσως έχουμε ένα σύμπλεγμα ουσιών σε ένα διάλυμα και καλούμεθα να διαχωρίσουμε την κάθε μια ξεχωριστά. Μια ηλεκτροχημική μέτρηση θα μας δώσει ένα σήμα, του οποίου ο διαχωρισμός δεν είναι καθόλου απλή υπόθεση.

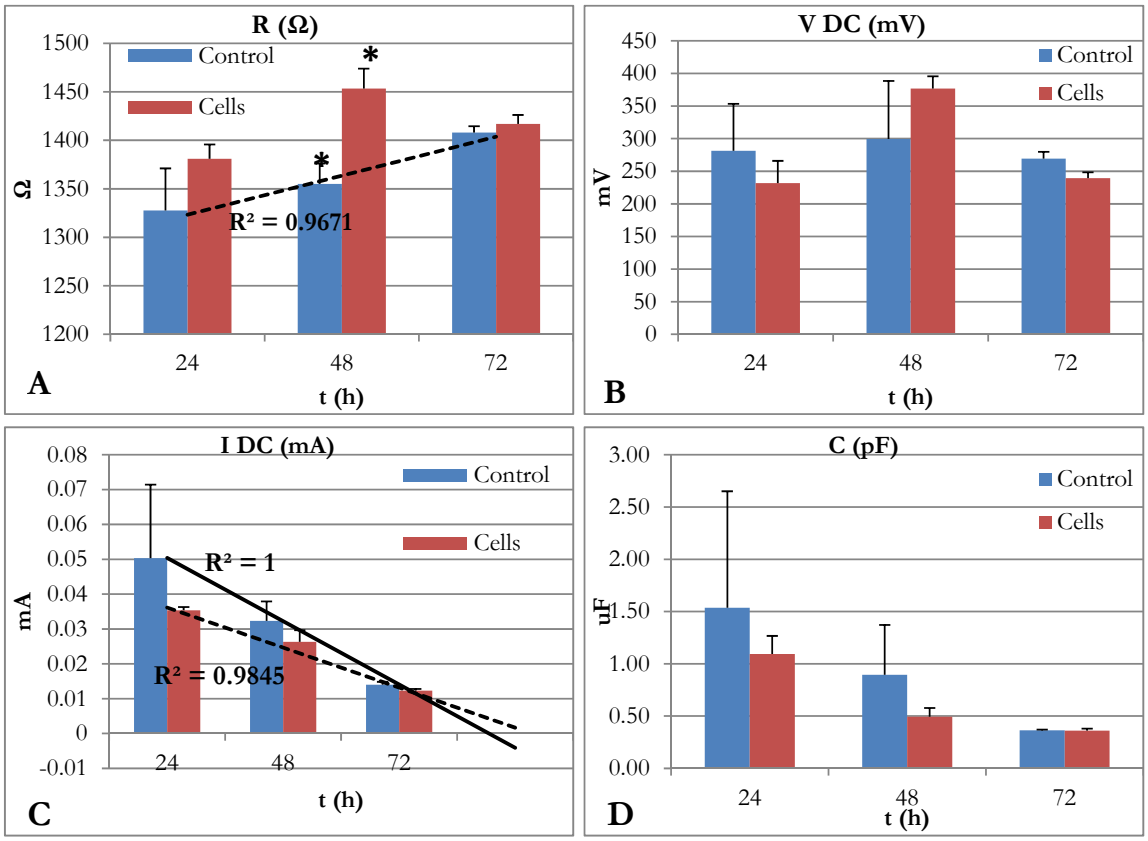
Ας φανταστούμε τώρα, ότι δεν έχουμε πλέον το διάλυμα αυτό αλλά μας δίνεται ένα μίγμα θρεπτικού υλικού καλλιέργειας, στο οποίο καλούμεθα να ταυτοποιήσουμε τα επιμέρους στοιχεία του με ηλεκτροφυσικές μετρήσεις. Ακόμα πιο δύσκολα γίνονται τα πράγματα όταν αντί των θρεπτικών υλικών περνάμε στον ορό και πλάσμα του αίματος και σε ολόκληρο το αίμα.

Η βασική ιδέα των μετρήσεων που κάναμε ήταν να διαπιστώσουμε, και να θέσουμε τις πρώτες βάσεις, αν υπάρχουν αλλαγές στις ιδιότητες των καλλιεργητικών υγρών υπό την παρουσία κυττάρων και *κυρίως, αν αυτές οι αλλαγές είναι μετρήσιμες.*

Για το σκοπό αυτό ακολουθήσαμε μια πειραματική διάταξη κατά την οποία κύτταρα αφέθηκαν να μεγαλώσουν σε πλάκες μικροτιτλοποίησης 6 θέσεων και αντίστοιχα θρεπτικό υλικό τοποθετήθηκε σε

διαφορετική πλάκα μικροτιτλοποίησης 6 θέσεων χωρίς την παρουσία κυττάρων ως πείραμα ελέγχου. Οι πειραματικές διατάξεις μετρήθηκαν από 24 έως 72 ώρες και ταυτοποιήθηκε η αντίσταση (*R*), η διαφορά δυναμικού (*V*) και η ένταση διερχόμενου ρεύματος (*I*). Οι μετρήσεις χρονομετρήθηκαν ώστε να είμαστε σε θέση να υπολογίσουμε το διερχόμενο φορτίο μέσα από το αγώγιμο υλικό. Ταυτόχρονα, χρησιμοποιήθηκε ο παλμογράφος που περιγράψαμε στην ενότητα «Υλικό και Μέθοδος» ώστε να ταυτοποιήσουμε τις μεταβολές εισερχόμενου σήματος. Το εισερχόμενο σήμα παράχθηκε από γεννήτρια συναρτήσεων και συγκεκριμένα αποτελείτο από ημιτονοειδή συνάρτηση, συχνότητας 10kHz και εφαρμοζόμενη τάση ~150mV. Από τις μετρήσεις αυτές επιχειρήσαμε να υπολογίσουμε την χωρητικότητα των διαλυμάτων μας (*C*), την εμπέδηση (*Z*) και τη σχετική διηλεκτρική ή αλλοιώς ηλεκτρική διαπερατότητα (ε_r) των διαλυμάτων μας. Για τη μέτρηση της χωρητικότητας απαιτείται ειδικός εξοπλισμός εξαιρετικής ακρίβειας. Λόγω της έλλειψής του προσπαθήσαμε να υπολογίσουμε τη χωρητικότα των διαλυμάτων με δεδομένο ότι το ποσοστό λάθους θα ήταν μεγάλο. Στην **Εικόνα 222**, παρουσιάζονται τα βασικά αποτελέσματα των μετρήσεων και ο υπολογισμός της χωρητικότητας των διαλυμάτων μας. Η πρώτη μας παρατήρηση είναι ότι στις μετρήσεις μεταξύ των πειραμάτων ελέγχου και των πειραματικών διατάξεων δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές. Πάρα ταύτα, η ανάλυση παλλινδρόμησης μας έδωσε σημαντικά αποτελέσματα στη μεταβολή της αντίστασης (R), και της έντασης του συνεχούς διερχόμενου ρεύματος (I). Παρατηρήσαμε μια αυξανόμενη τάση της αντίστασης σε σχέση με το χρόνο και μια μειούμενη τάση της έντασης του ρεύματος κάτι που επιβεβαιώνει και τις μετρήσεις μιας και τα μεγέθη της έντασης και της αντίστασης είναι αντιστρόφως ανάλογα (θυμίζουμε ότι ισχύει από το νόμο του *Ohm*: $I = \frac{V}{R}$

.

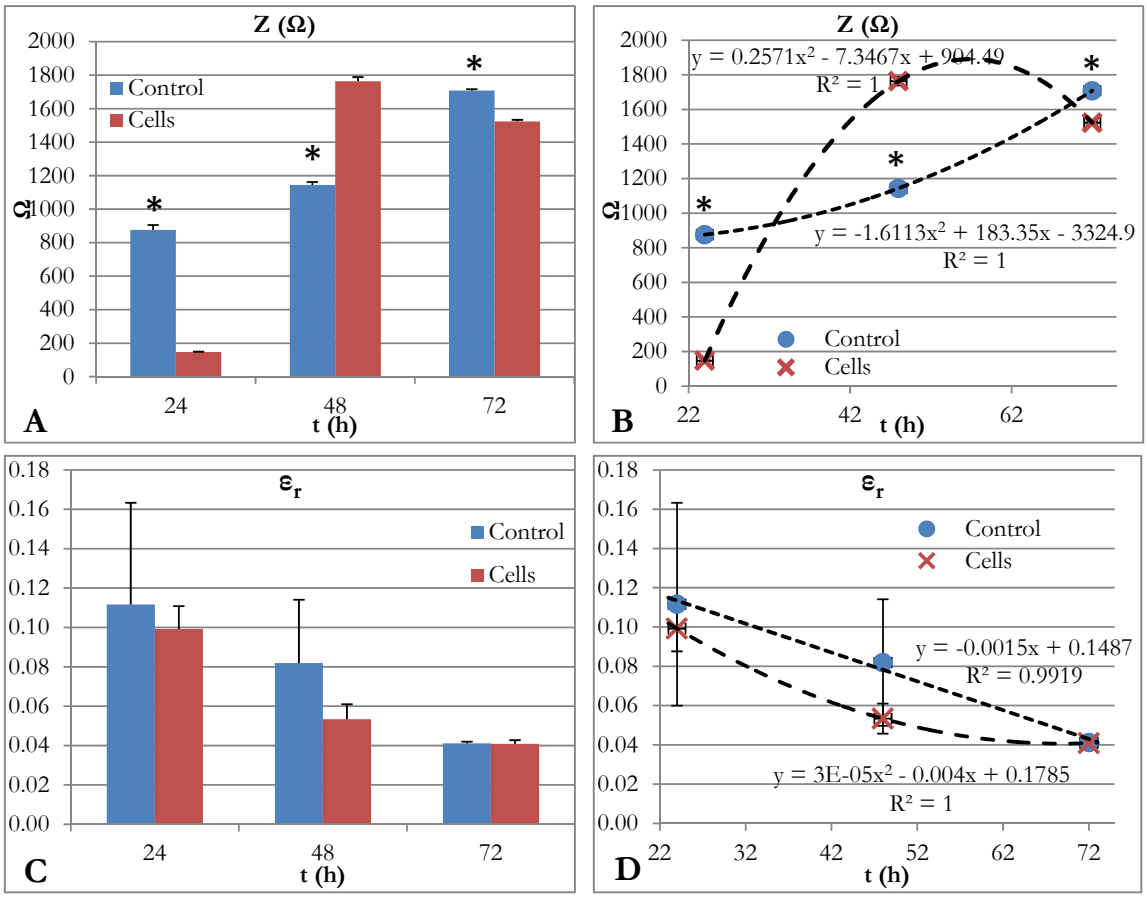


Εικόνα 222. Διαγραμματική παρουσίαση των βασικών ηλεκτροφυσικών ιδιοτήτων των κυτταρικών συστημάτων. Το πείραμα ελέγχου αφορά σε υγρά καλλιέργειας, που χωρίς κύτταρα και το πείραμα μέτρησης αφορούσε σε υγρά καλλιέργειας με κύττταρα σε μετρήσεις συναρτήσει του χρόνου (*$p<0.05$).

Αντίστοιχα από ττις μετρήσεις αυτές υπολογίσαμε την εμπέδηση και τη διηλεκτρική σταθερά. Πρέπει εδώ να αναφέρουμε ότι ο αριθμητικός υπολογισμός της διηλεκτρικής έγινε με βάση μια παραλλαγή του νόμου του *Kirchhoff* και διατυπώνεται ως εξής:

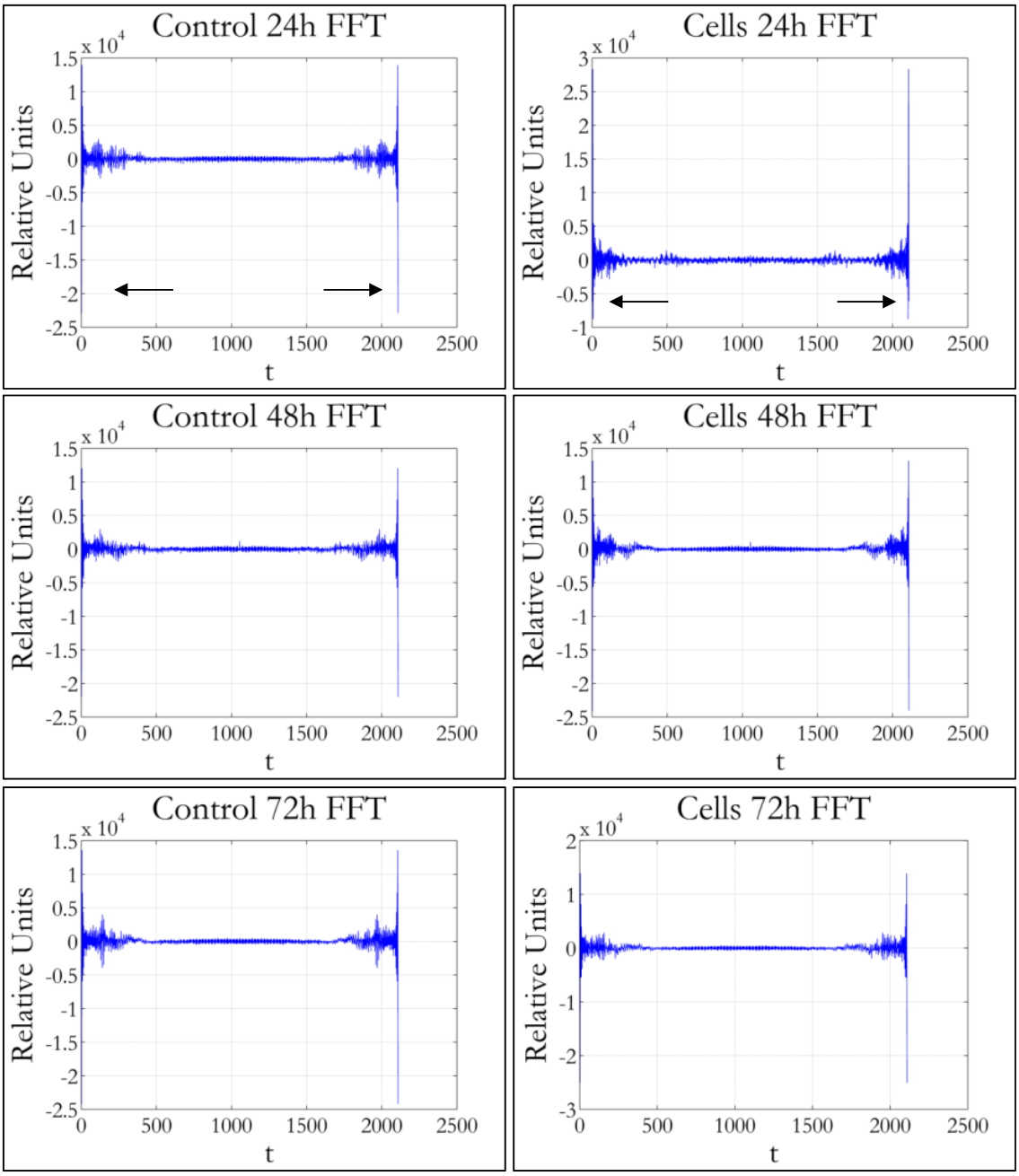
$$\varepsilon_r = \frac{1}{\frac{0.0885\pi r^2}{Cd} + \frac{0.0885r}{C}\left(\ln\left(\frac{16\pi r}{d}\right) - 1\right)}, \textbf{ Εξίσωση 67}.$$

Ως εκ τούτου, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 223**. Παρατηρούμε ότι η εμπέδηση παρουσιάζει σημαντικές διαφορές μεταξύ των πειραμάτων ελέγχου και των πειραματικών μετρήσεων σε όλες τις χρονικές στιγμές που το μελετήσαμε. Αντίθετα ο υπολογισμός της διηλεκτρικής σταθεράς δεν έδωσε σημαντικές διαφορές. Η παρατήρηση της διηλεκτρικής είναι εξαιρετικά ενδιαφέρουσα. Μια ερμηνεία του αποτελέσματος αυτού θα ήταν ότι πρώτον είτε πράγματι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά είτε δεύτερον η ακρίβεια των μετρήσεών μας δεν ήταν τέτοια ώστε να αναδείξει ενδεχόμενες διαφορές στις πειραματικές διατάξεις.

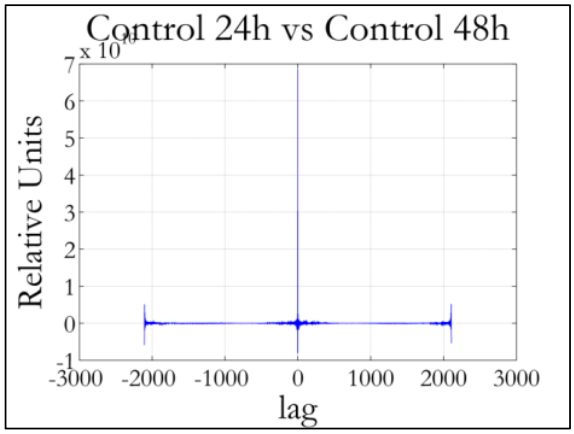


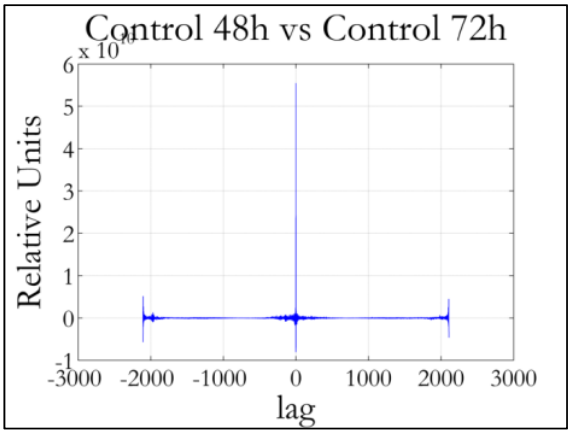
Εικόνα 223. Διαγραμματική παρουσίαση των υπολογισμών της εμπέδησης (*Z*) και της σχετικής διηλεκτρικής (ε_r) στα πειράματα ελέγχου και σε θρεπτικό υλικό με καλλιέργεια κυττάρων. Παρουσιάζονται τα ιστογράμματα της εμπέδησης και η παλινδρόμηση των μετρήσεων της εμπέδησης (**A**, **B**) καθώς και της σχετικής διηλεκτρικής σταθεράς (**C**, **D**) *(*p<0.05)*.

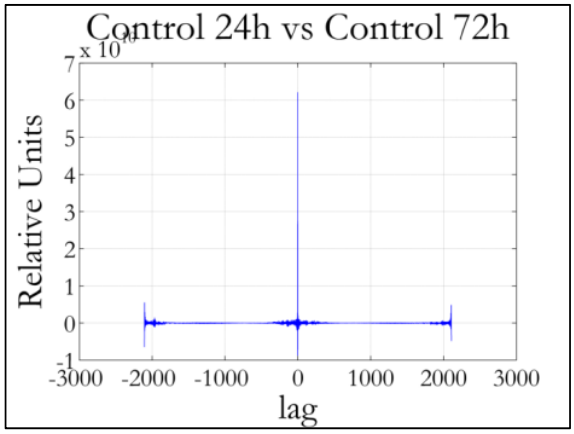
Η τελευταία σειρά πειραματικών διατάξεων αφορούσε στην ταυτοποίηση της μεταβολής εισερχομένου σήματος στο σύστημα της καλλιέργειας και μέτρησή του. Και στην περίπτωση αυτή δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές εκτός στην περίπτωση των 24 ωρών, όπου είχαμε μια διαφορά στο σήμα μεταξύ του πειράματος ελέγχου και του θρεπτικού παρουσία κυττάρων (**Εικόνα 224**). Μελετώντας τη διαφορά των σημάτων δηλαδή εξετάσαμε αν υπάρχει διαφορά φάσης στα σήματα ως προς το χρόνο, δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές. Η ερμηνεία και πάλι εδώ είναι πιθανόν ότι η διαφοροποίηση σήματος απαιτεί ακριβέστερο εξοπλισμό, ήτοι οι ενδεχόμενες διαφορές είναι πολύ μικρές για να ταυτοποιηθούν. Το αποτέλεσμα αυτό παρουσιάζεται στην **Εικόνα 225**.



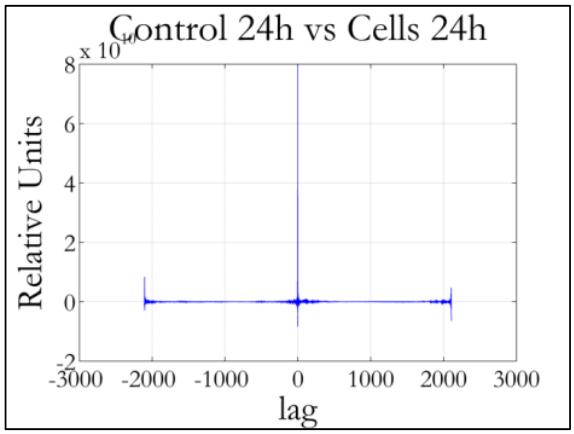
Εικόνα 224. Διαγραμματική αναπαράσταση των μετασχηματισμών Fourier του σήματος παλμογράφου σε πειράματα ελέγχου και κυτταρικά συστήματα των οποίων το θρεπτικό υλικό περιείχε κύτταρα. Οι μετρήσεις έγιναν συναρτήσει του χρόνου και παρουσιάζονται τα ζεύγη των μετρήσεων ελέγχου και των πειραματικών μετρήσεων. Δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές παρά μόνο στις 24 ώρες.

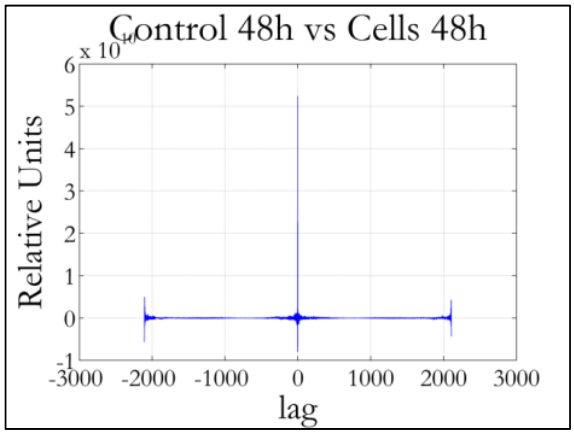


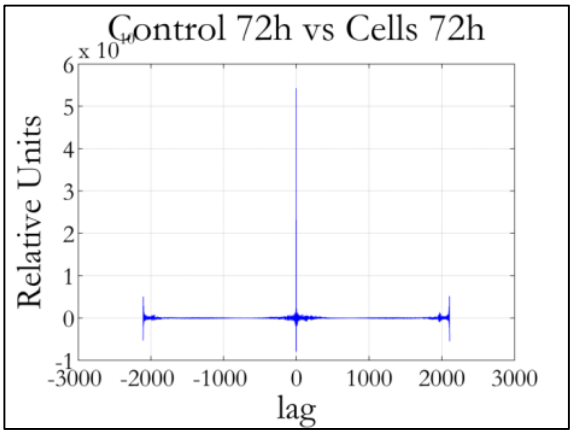




Εικόνα 225. Συσχέτιση των σημάτων των μετρήσεων σε πειράματα ελέγχου κα σε θρεπτικό υλικό που περιείχε κύτταρα. Παρουσιάζονται όλες οι συγκρίσεις για τα πειράματα ελέγχου ως προς το χρόνο καθώς και οι συγκρίσεις των πειραμάτων ελέγχου με τα πειράμαρα μετρήσεων σε αντίστοιχες χρονικές στιγμές. Δεν φάνηκε να υπάρχουν σημαντικές διαφορές, μιας και η διαφορά φάσης μεταξύ των σημάτων ήταν 0.





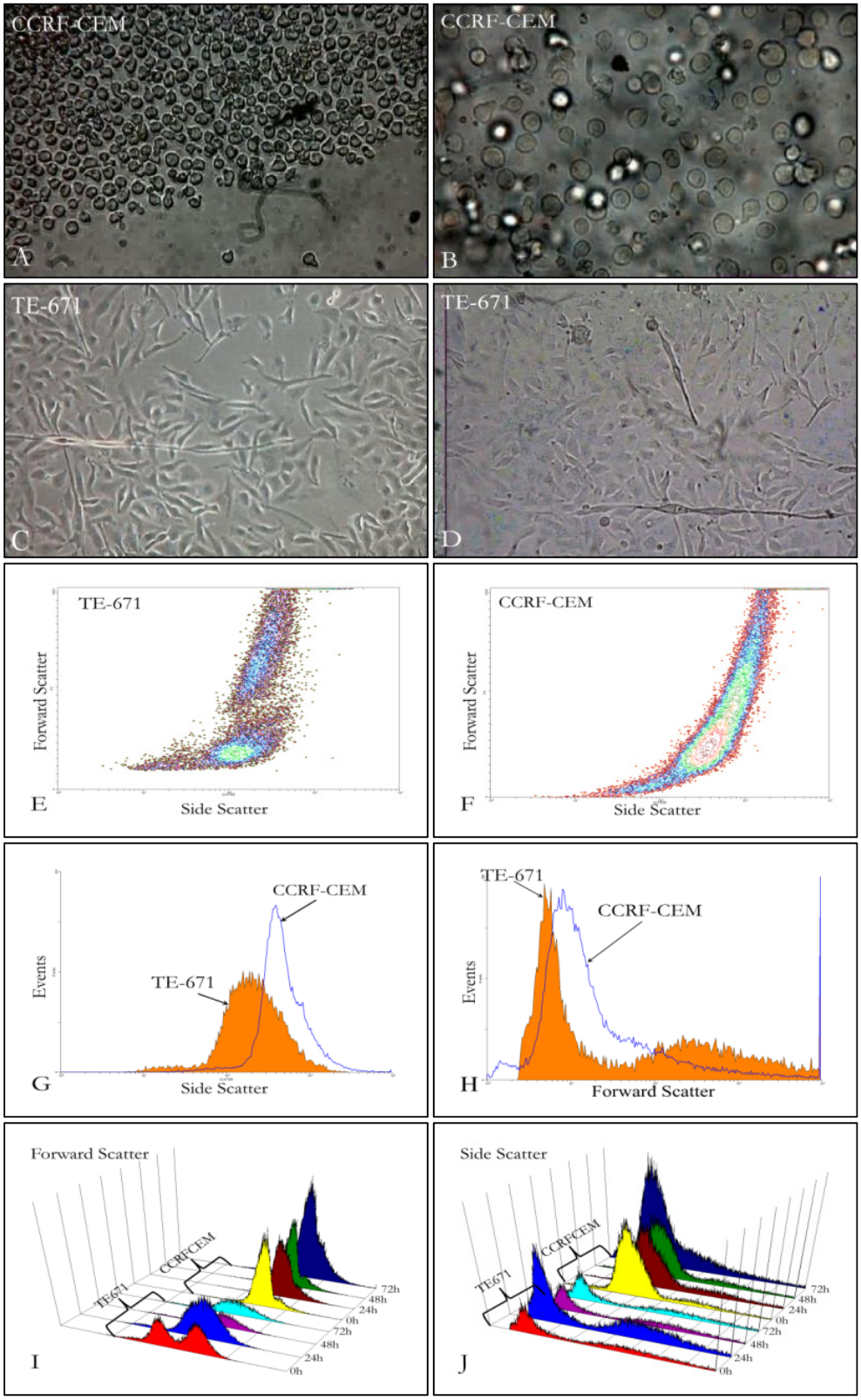


ΚΕΦΑΛΑΙΟ 31

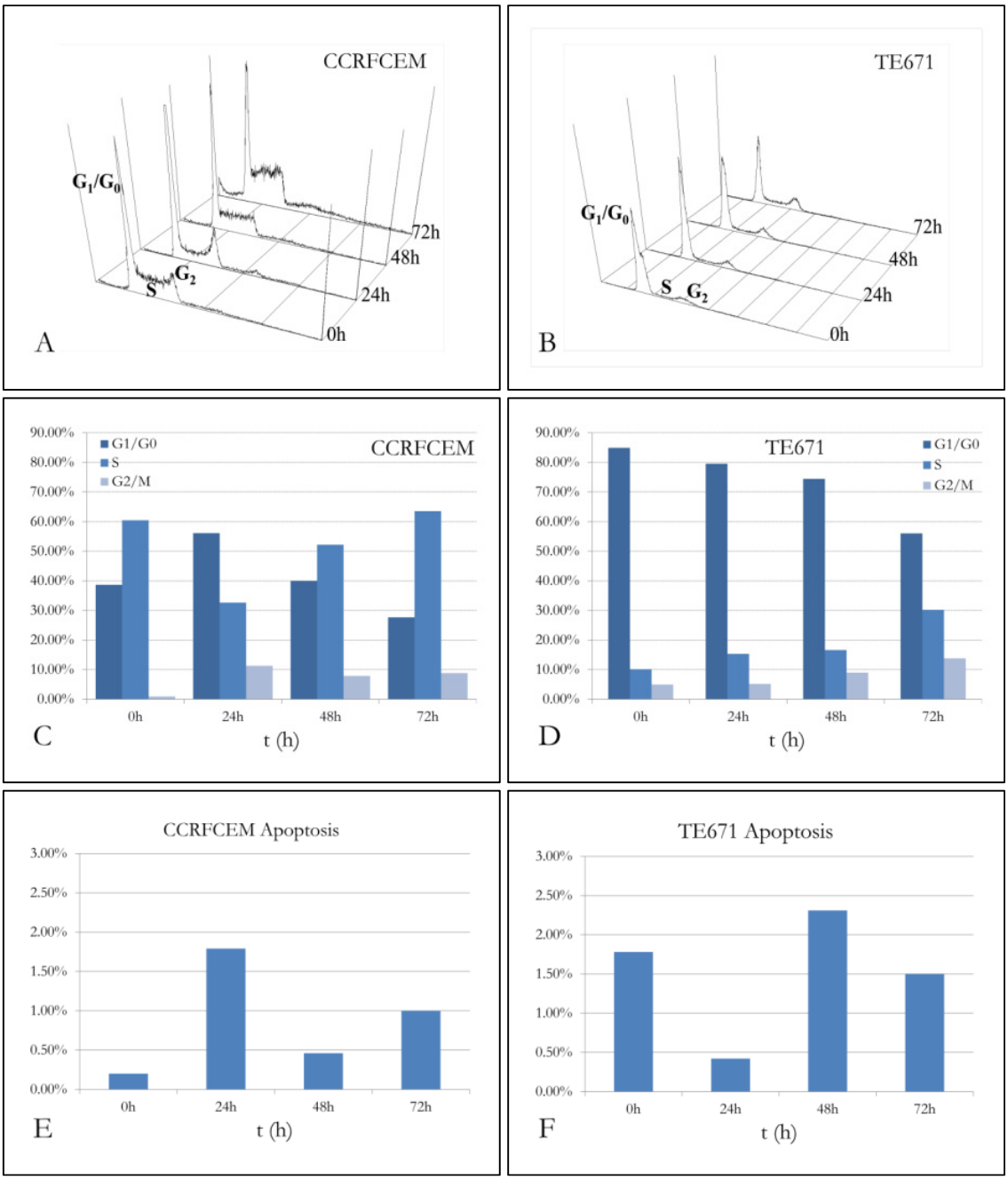
ΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ ΟΔΟΙ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ *IN VIVO* ΚΑΙ *EX VIVO*

Το κεφάλαιο αυτό αποτελεί την τελευταία υπο-ενότητα της ενότητας των αποτελεσμάτων καθώς αφορά στη διερεύνηση της γονιδιακής ρύθμισης κατά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διερεύνηση των κοινών γονιδιακών οδών σε διαφορετικά νεοπλάσματα του ΚΝΣ. Η πρώτη πιλοτική πειραματική διάταξη αφορούσε στη διερεύνηση των γονιδιακών οδών σε δύο διαφορετικές κυτταρικές σειρές μεταξύ τους, τη σειρά CCRFCEM και TE671. Θα αναφερθούμε με σχετική λεπτομέρεια στην ανάλυση αυτών των δεδομένων μιας και όλες οι άλλες αναλύσεις ακολουθούν το ίδιο μοτίβο και την ίδια λογική.

Οι δύο αυτοί κυτταρικοί τύποι αποτελούν νεοπλάσματα μεσοδερμικής προέλευσης από την οποία τα φυσιολογικά κύτταρα θα οδηγούντο στο σχηματισμό αιμοποιητικών και μυικών κυττάρων αντίστοιχα. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε αφορούσε στην ανάπτυξη των κυττάρων μέχρι τις 72 ώρες και χρονική μελέτη του μεγέθους, της κοκκίωσης, της κατανομής του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης με κυτταρομετρία ροής. Το αποτέλεσμα της κυτταρομετρικής μελέτης όσον αφορά το μέγεθος και κοκκίωση παρουσιάζεται στην **Εικόνα 226**. Τα κύτταρα αφέθηκαν να μεγαλώσουν φυσιολογικά χωρίς την παρουσία αναστολέων ή στρες όπως είναι ο ανταγωνισμός για τους πόρους, όπως περιγράψαμε σε προηγούμενα πειράματα. Η κατανομή του κυτταρικού κύκλου αντίστοιχα έδειξε ένα διαφορετικό τρόπο αύξησης των δύο κυτταρικών τύπων. Τα λευχαιμικά κύτταρα εισήλθαν στην S φάση αμέσως μετά από 24 ώρες στην καλλιέργεια και παρουσίασαν μια τυπική κατανομή του κυτταρικού κύκλου συναρτήσει του χρόνου (**Εικόνα 227A**, **C**). Από αυτό καταλαβαίνουμε ότι τα λευχαιμικά κύτταρα προχωρούν γρηγορότερα στις μεταβάσεις του κυτταρικού κύκλου από τα κύτταρα TE671. Τέλος, η απόπτωση και στις δύο σειρές παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα, όπως ήταν άλλωστε αναμενόμενο για πολλαπλασιασμό χωρίς την ύπαρξη στρες ή αναστολής (**Εικόνα 227E**, **F**).

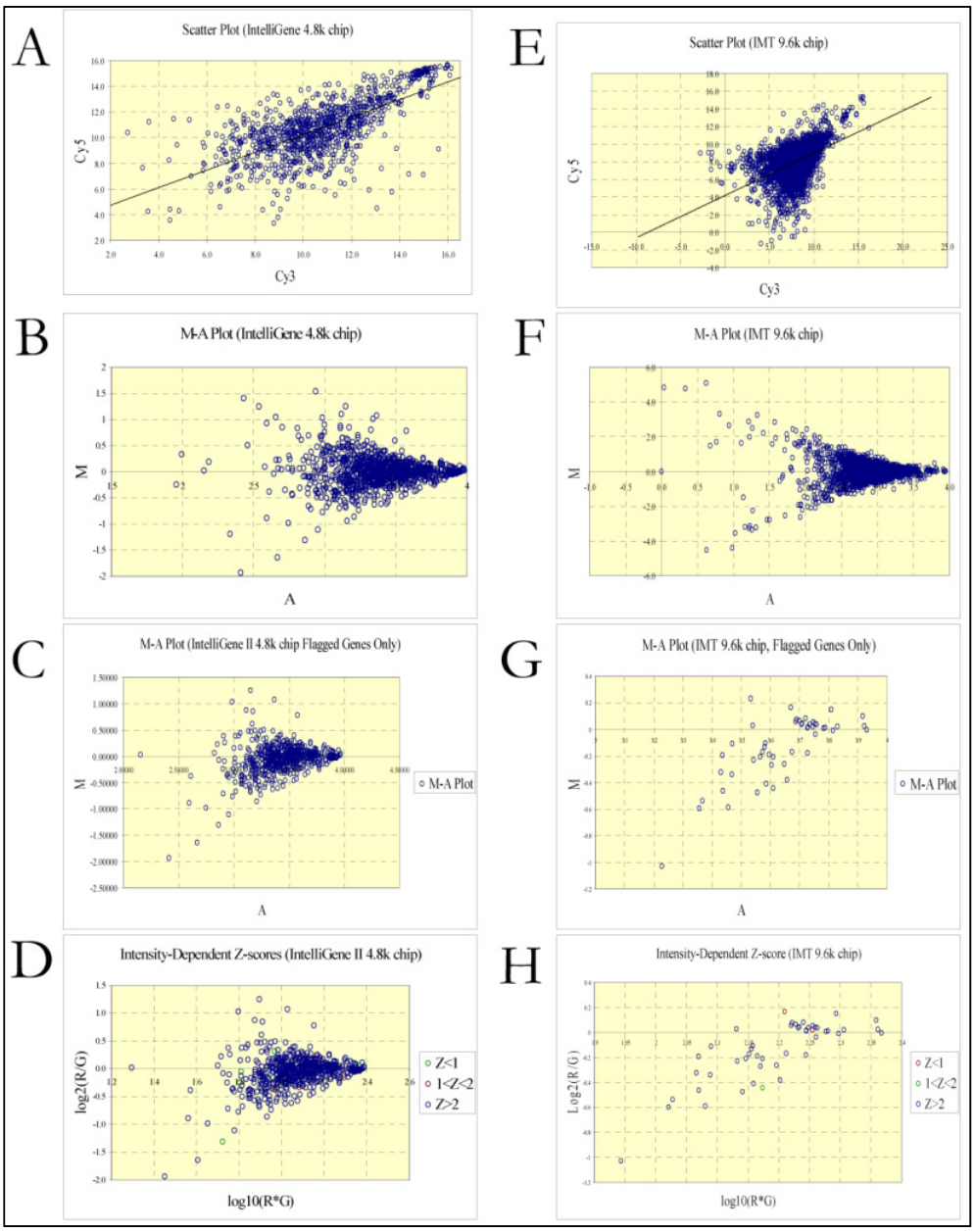


Εικόνα 226. Μικροσκοπική απεικόνιση των κυττάρων CCRFCEM (**A**, **B**) και των κυττάρων TE671 (**C**, **D**) στις 72 ώρες επώασης όπως αναφέραμε στην ενότητα «Υλικό και Μέθοδος». Τα κύτταρα αυτά μελετήθηκαν με κυτταρομετρία ροής ως προς το μέγεθος και κοκκίωσή τους (**E**-**J**) συναρτήσει του χρόνου.



Εικόνα 227. Κατανομή του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα CCRFCEM και TE671 (**A**-**D**) και η απόπτωση στα ίδια κύτταρα συναρτήσει του χρόνου (**E**, **F**).

Η πρώτες μελέτες της γονιδιακής έκφρασης έγιναν με δύο πλατφόρμες: μια αποτελείτο από 4800 μετάγραφα ήτοι cDNAs και η δεύτερη από 9600 μετάγραφα. Τα κύτταρα συλλέχθησαν στις 72 ώρες καλλιέργειας και ακολουθήθηκε η διαδικασία επεξεργασίας τους, όπως την περιγράφουμε στην ενότητα «Υλικό και Μέθοδος». Επίσης η διαδικασία ανάλυσης των δεδομένων μικροσυστοιχιών έχει αναφερθεί με λεπτομέρεια στην ενότητα «Υλικό και Μέθοδος». Τα διαφορικώς εκφραζόμενα γονίδια, σε αυτήν την πειραματική διάταξη ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση *z-test* και όσα είχαν *p-value* μικρότερη του 0.05 θεωρήθηκαν ως διαφορικώς εκφραζόμενα (DEGs). Όλα τα υπόλοιπα γονίδια θεωρήθηκαν ότι εκφράζονται το ίδιο και στους δύο κυτταρικούς τύπους. Στην **Εικόνα 228**, παρουσιάζουμε την αναπαράσταση των δεδομένων των μικροσυστοιχιών σε MA-Plots. Θυμίζουμε ότι τα διαγράμματα αυτά αφορούν στην αναπαράσταση των δεδομένων, όπου στον άξονα των Y βρίσκεται ο λογάριθμος του λόγου των χρωστικών που χρησιμοποιήθηκαν ήτοι, $A = \log_2\left(\frac{Cy3}{Cy5}\right)$ και στον άξονα των X βρίσκεται ο λογάριθμος του γινομένου των χρωστικών ήτοι, $A = \frac{1}{2}\log_2\left(Cy3 \cdot Cy5\right)$. Το αποτέλεσμα αυτό αφορά σε δεδομένα, που κανονικοποιήθηκαν (normalized) με τον αλγόριθμο *Lowess*.

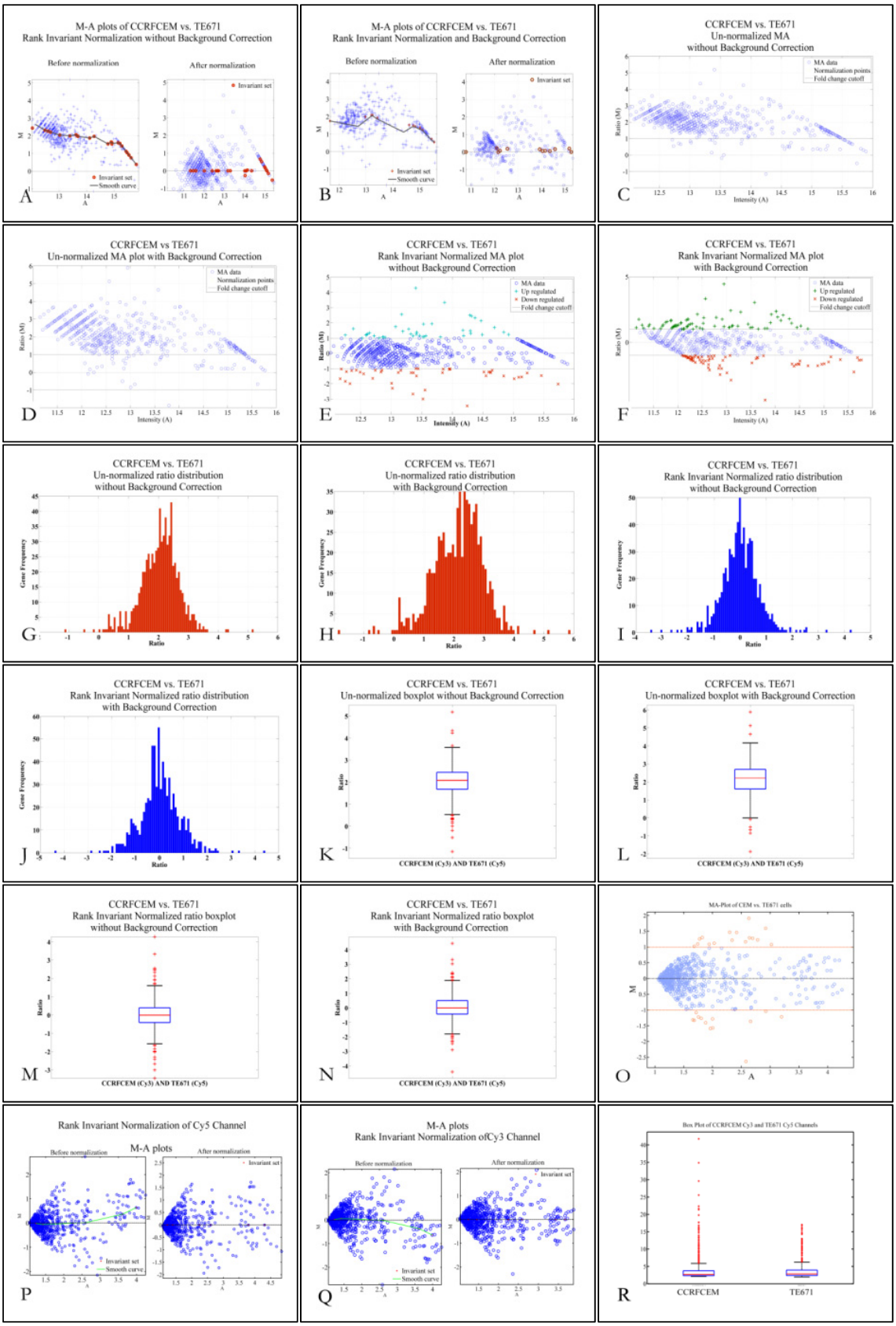


Εικόνα 228. Διαγράμματα διασποράς (MA-Plots) των πειραμάτων μικροσυστοιχιών των κυττάρων CCRFCEM και TE671. Χρησιμοποιήθηκαν δύο πλατφόρμες πλακιδίων οι IntelliGene (TAKARA Inc, Japan) και η IMT9.6k (IMT, Philipps-Universitaet, Marburg). Ο υβριδισμός αφορούσε σε δικάναλη χρώση και χρησιμοποιήθηκαν οι χρωστικές Cy3 και Cy5.

Αντίστοιχα με τη μέθοδο κανονικοποίησης *Lowess* χρησιμοποιήσαμε τον αλγόριθμο *Rank Invariant*. Ανάμεσα στους δύο αλγόριθμους υπάρχει μια βασική διαφορά. Ο πρώτος βασίζεται στην υπόθεση ότι όλα τα γονίδια βρίσκονται κατά την πλειοψηφία τους γύρω από τη μέση τιμή της γονιδιακής έκφρασης και ότι λίγα είναι τα γονίδια που εκφράζονται διαφορικά. Ο δεύτερος αλγόριθμος κάνει την ίδια υπόθεση με τη διαφορά όμως ότι για κάθε πειραματική διαδικασία υπολογίζει εκ νέου τη μέση τιμή των γονιδίων. Η προσέγγιση αυτή είναι βιολογικά και η πιο ορθή μιας και είναι πιθανό τα

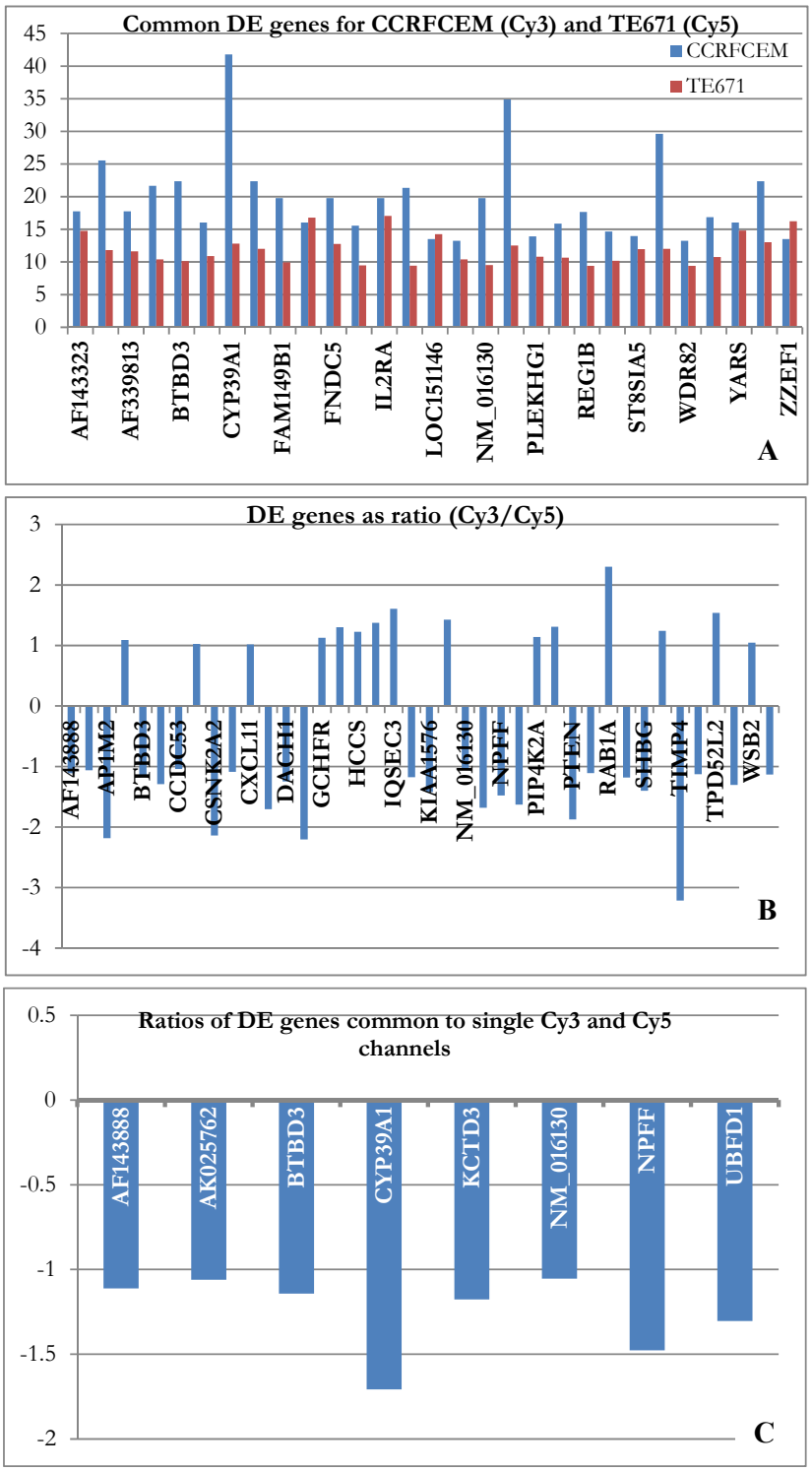
γονίδια να αλλάζουν τρόπο έκφρασης ακόμα και αυτά που θεωρούνται σταθερά. Στο σημείο αυτό έχει ενδιαφέρον να κάνουμε μια παρένθεση και να αναφερθούμε στα γονίδια ομοιοστασίας, που θεωρούντο σταθερά ανεξάρτητα από τις συνθήκες που βρίσκονταν τα κύτταρα. Έχει φανεί ότι η γονιδιακή ρύθμιση κάθε άλλο παρά σταθερή είναι. Σε πειραματικές διαδικασίες που έχουν γίνει σε μοντέλα καλλιεργειών καρκινογένεσης ποντικών, τα οποία δεν παράγαμε στο εργαστήριο αλλά πραγματοποιήσαμε την ανάλυσή τους, φάνηκε ότι ένα από τα βασικά μόρια που αλλάζουν είναι η ακτίνη ένα μόριο που θεωρείται σταθερό στην έκφρασή του ανεξαρτήτως των συνθηκών (μη παρουσιαζόμενα δεδομένα). Αντίστοιχα είδαμε ότι η παραγωγή του μορίου NADH αλλάζει συναρτήσει του όγκου θρεπτικού και μάλιστα όχι αναλογικά με τον πολλαπλασιασμό αλλά αντίστροφα προς αυτόν. Καταλαβαίνουμε λοιπόν ότι η γονιδιακή ρύθμιση είναι μια δυναμική διαδικασία κατά την οποία το σύνολο του γονιδιώματος αλλάζει με βάση τις περιβαλλοντικές συνθήκες.

Το αποτέλεσμα της κανονικοποίησης των δεδομένων με τον αλγόριθμο Rank Invariant παρουσιάζεται στην **Εικόνα 229**. Παρουσιάζονται τα μεταβλητά γονίδια (invariant genes) με και χωρίς διόρθωση θορύβου (background correction) (**Εικόνα 229A**, **B**) καθώς και τα κανονικοποιημένα δεδομένα με τις τιμές κατωφλίου (cutoff lines) της γονιδιακής έκφρασης (**Εικόνα 229D, E, F**). Επίσης παρουσιάζονται οι κατανομές συχνοτήτων της γονιδιακής έκφρασης (**Εικόνα 229G, H, I, J**) με τα αντίστοιχα ιστογράμματα διασποράς (**Εικόνα 229K-N**) και τέλος παρουσιάζονται τα τελικά αποτελέσματα της κανονικοποίησης (**Εικόνα 229O-R**).



Εικόνα 229. Μεθοδολογίες κανονικοποίησης των μικροσυστοιχιών. Για επεξήγηση βλέπε κείμενο.

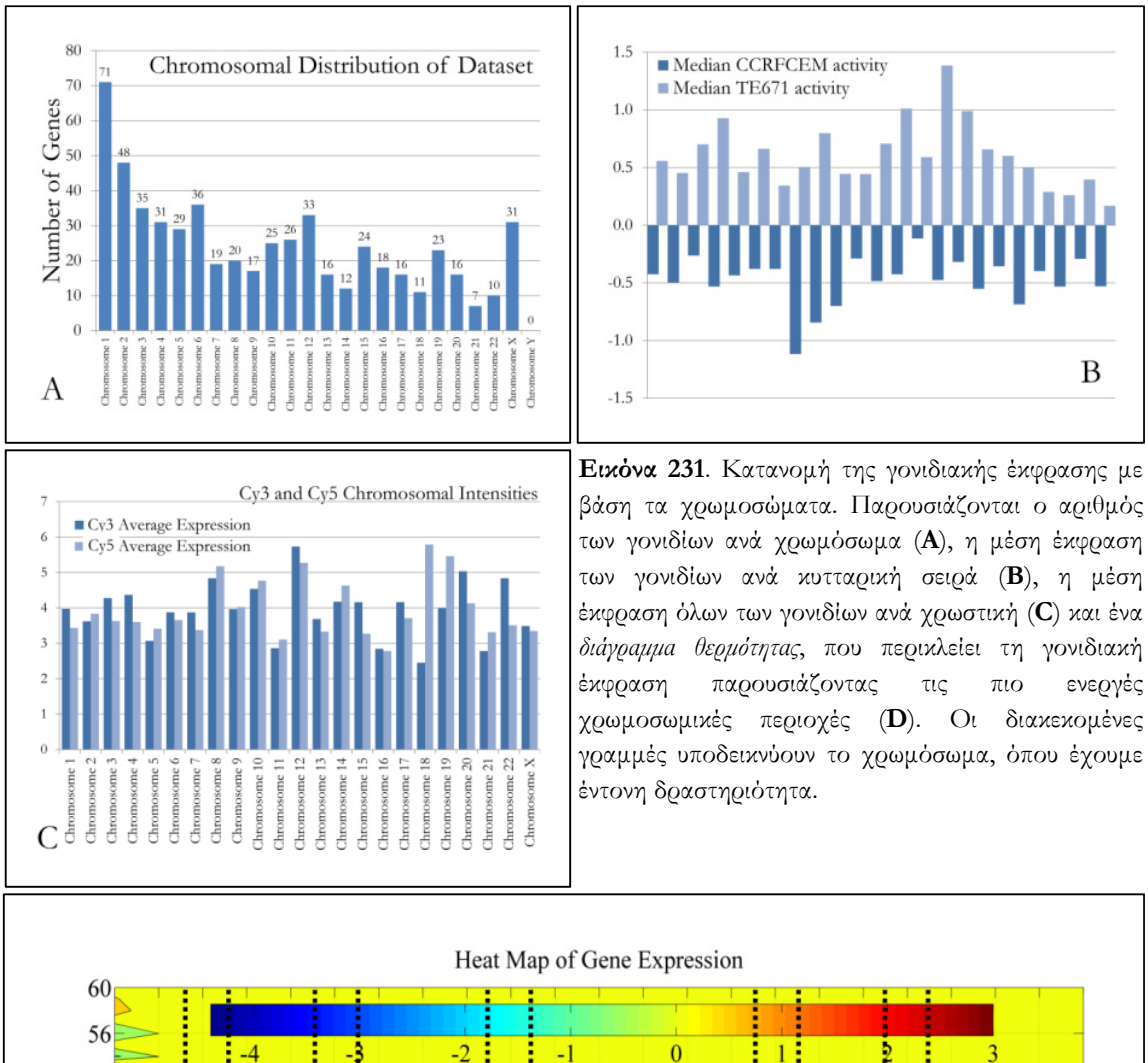
Η ανάλυση των μικροσυστοιχιών στις δύο πλατφόρμες (TAKARA και IMT) έδειξε συνολικά 660 και 45 διαφορικώς εκφραζόμενα γονίδια αντίστοιχα. Συνολικά από αυτά 228 γονίδια είχαν συσχέτιση με τη λευχαιμία και 78 ήταν συσχετιζόμενα με το ραβδομυοσάρκωμα, 76 ήταν άμεσα συσχετιζόμενα με τα κύτταρα CCRFCEM και 8 ήταν άμεσα συσχετιζόμενα με τα κύτταρα TE671. Στην **Εικόνα 230**, παρουσιάζονται τα διαφορικώς εκφραζόμενα γονίδια από την κάθε ανάλυση. Τα κοινά γονίδια που εκφράζονται και στις δύο κυτταρικές σειρές ήταν τα AF143888, AK025762, BTBD3, CYP39A1, KCTD3, NM_016130, NPFF, UBFD1. Η έκφραση των γονιδίων αυτών ήταν αντίθετη στους δύο κυτταρικούς τύπους. Δηλαδή ήταν υποεκφραζόμενα στα κύτταρα TE671 σε σχέση με την έκφρασή τους στα κύτταρα CCRFCEM. Είναι πιθανό τα γονίδια αυτά να διαχωρίζουν τους δύο κυταρικούς τύπους ήτοι να είναι ειδικά στην έκφρασή τους ως προς κάθε κυτταρικό τύπο.



Εικόνα 230. Διαγραμματική παρουσιάση των διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων από τη σύγκριση μεταξύ των κυτταρικών σειρών CCRFCEM και TE671. Παρουσιάζονται τα γονίδια με βάση την έκφρασή τους ανά κανάλι (**A**), με βάση το λόγο έκφρασης Cy3/Cy5 (**B**) και τα κοινά γονίδια και στα δύο κανάλια (**C**).

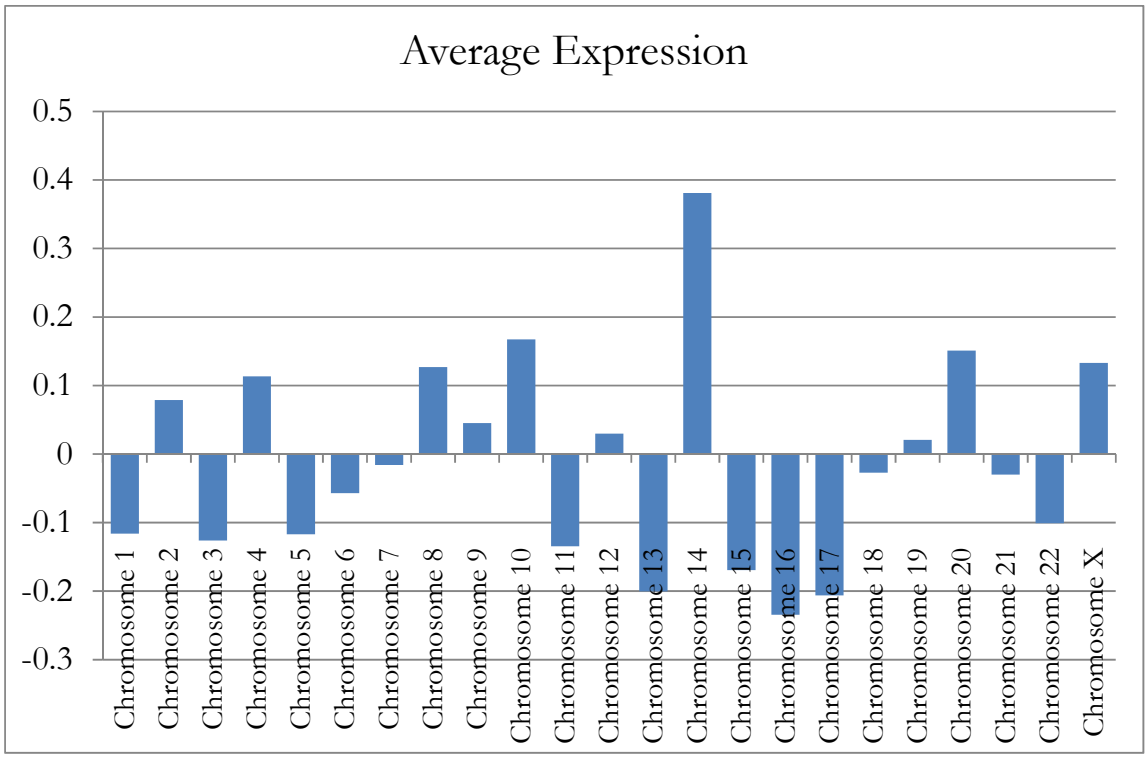
Σε συνέχεια της μελέτης της έκφρασης των γονιδίων πραγματοποιήσαμε μια χαρτογράφηση των γονιδίων με βάση τη χρωμοσωμική τους προέλευση. Η χαρτογράφηση αυτή περιελάμβανε όλα τα γονίδια μετά την κανονικοποίηση χρησιμοποιώντας τις επιμέρους τιμές της κάθε χρωστικής, το λόγο των κανονικοποιημένων γονιδίων, τα κοινά διαφορικώς εκφραζόμενα γονίδια και τα μη-διαφορικώς εκφραζόμενα γονίδια. Παρατηρήσαμε μια σχετικά ομοιόμορφη κατανομή των γονιδίων στα χρωμοσώματα με εξαίρεση το χρωμόσωμα 1 όπου χαρτογραφήθηκαν 71 γονίδια (10.66%). Το χρωμόσωμα 2 είχε 48 DEGs (7.21%), με επόμενο το χρωμόσωμα 6 με 36 DEGs (5.4%), τα χρωμοσώματα 4, 10 και 31 με 25 DEGs αντίστοιχα (~4.7%). Στα χρωμοσώματα χαρτογραφήθηκαν 3, 5, 11, 12, 15, 19 ~25 DEGs (~4%). Τέλος το χρωμόσωμα X είχε 31 DEGs (3.7%). Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στην **Εικόνα 231A**.

Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση που μπορούμε να κάνουμε από τα αποτελέσματα αυτά είναι ότι η έκφραση των χαρτογραφημένων γονιδίων δεν συσχετίζετο με το μέγεθος του χρωμοσώματος που ανήκαν. Δηλαδή τα μεγαλύτερα χρωμοσώματα δεν είχαν απαραίτητα και το μεγαλύτερο βαθμό έκφρασης. Έτσι τα χρωμοσώματα 12, 18 και 19 παρουσίασαν την υψηλότερη μέση έκφραση και όχι τα χρωμοσώματα 1 και 2, που είναι τα μεγαλύτερα. Η διάμεσος και η μέση έκφραση κάθε χρωμοσώματος παρουσιάζεται στην **Εικόνα 231B**, **C**, από όπου παρατηρούμε ότι η υψηλότερη γονιδιακή έκφραση ήταν στο χρωμόσωμα 12. Για να οπτικοποιήσουμε το φαινόμενο καλύτερα δημιουργήσαμε ένα διάγραμμα θερμότητας (chromosomal heat-map) για κάθε χρωμόσωμα, το οποίο παρουσιάζεται στην **Εικόνα 231D**. Στο βαθμό που γνωρίζουμε δεν υπάρχει αντίστοιχη μεθοδολογική απεικόνιση στη βιβλιογραφία.



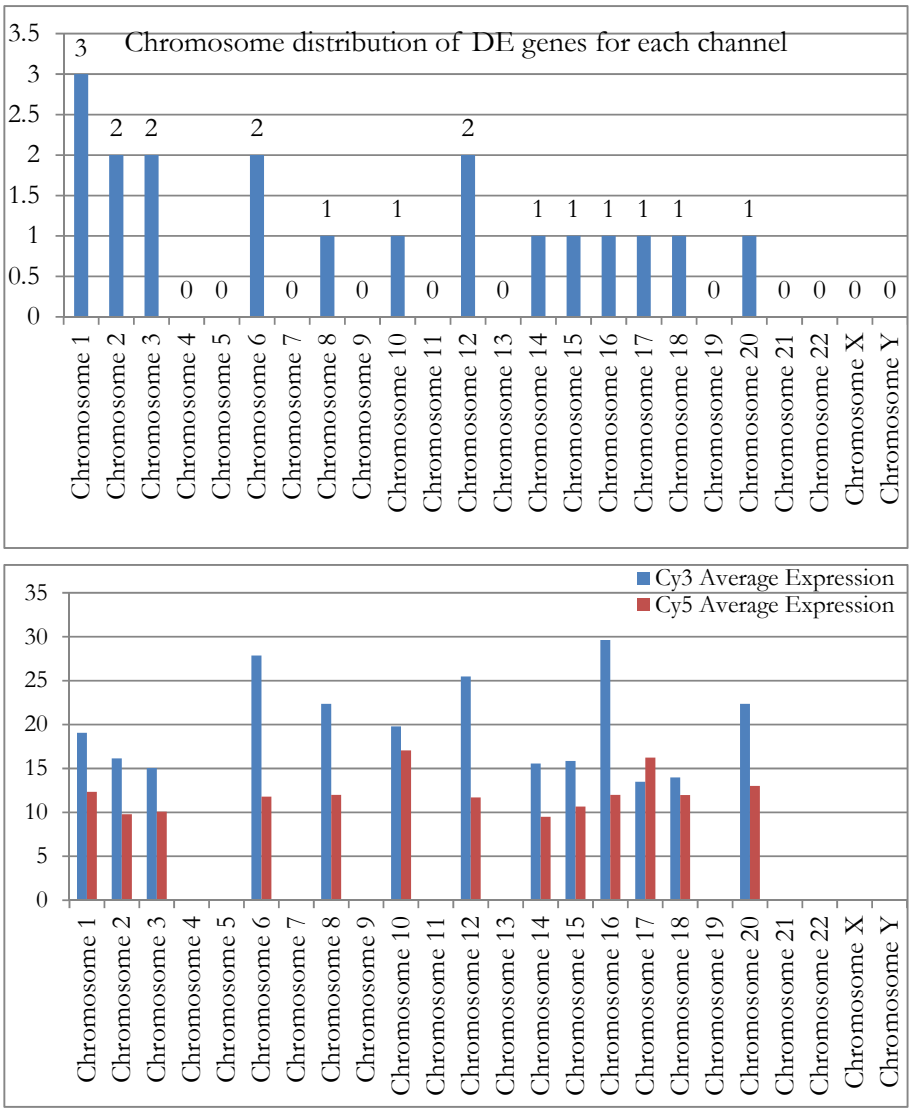
Εικόνα 231. Κατανομή της γονιδιακής έκφρασης με βάση τα χρωμοσώματα. Παρουσιάζονται ο αριθμός των γονιδίων ανά χρωμόσωμα (**A**), η μέση έκφραση των γονιδίων ανά κυτταρική σειρά (**B**), η μέση έκφραση όλων των γονιδίων ανά χρωστική (**C**) και ένα *διάγραμμα θερμότητας*, που περικλείει τη γονιδιακή έκφραση παρουσιάζοντας τις πιο ενεργές χρωμοσωμικές περιοχές (**D**). Οι διακεκομένες γραμμές υποδεικνύουν το χρωμόσωμα, όπου έχουμε έντονη δραστηριότητα.

Υπολογίζοντας το λόγο των γονιδιακών εκφράσεων παρατηρούμε ότι η υψηλότερη έκφραση παρατηρήθηκε στα χρωμοσώματα 14 (υπερέκφραση) και 16 (υποέκφραση) (**Εικόνα 232**).



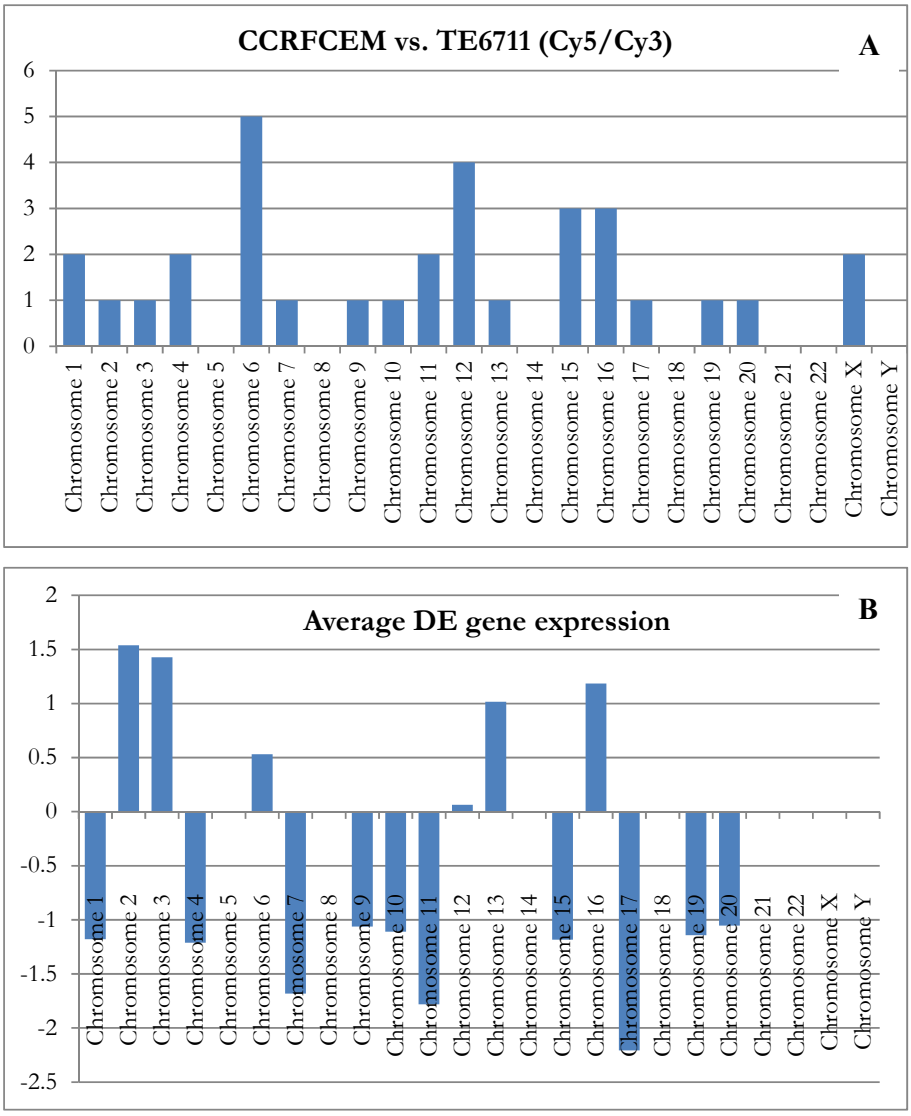
Εικόνα 232. Παρουσιάζεται η μέση έκφραση του λόγου Cy5/Cy3 με βάση τη χρωμοσωμική κατανομή.

Απομονώνοντας τα διαφορικώς εκφραζόμενα γονίδια παρατηρούμε ότι η υψηλότερη έκφραση των γονιδίων εμφανίσθηκε στα χρωμοσώματα 16 και 6. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στην **Εικόνα 233**.



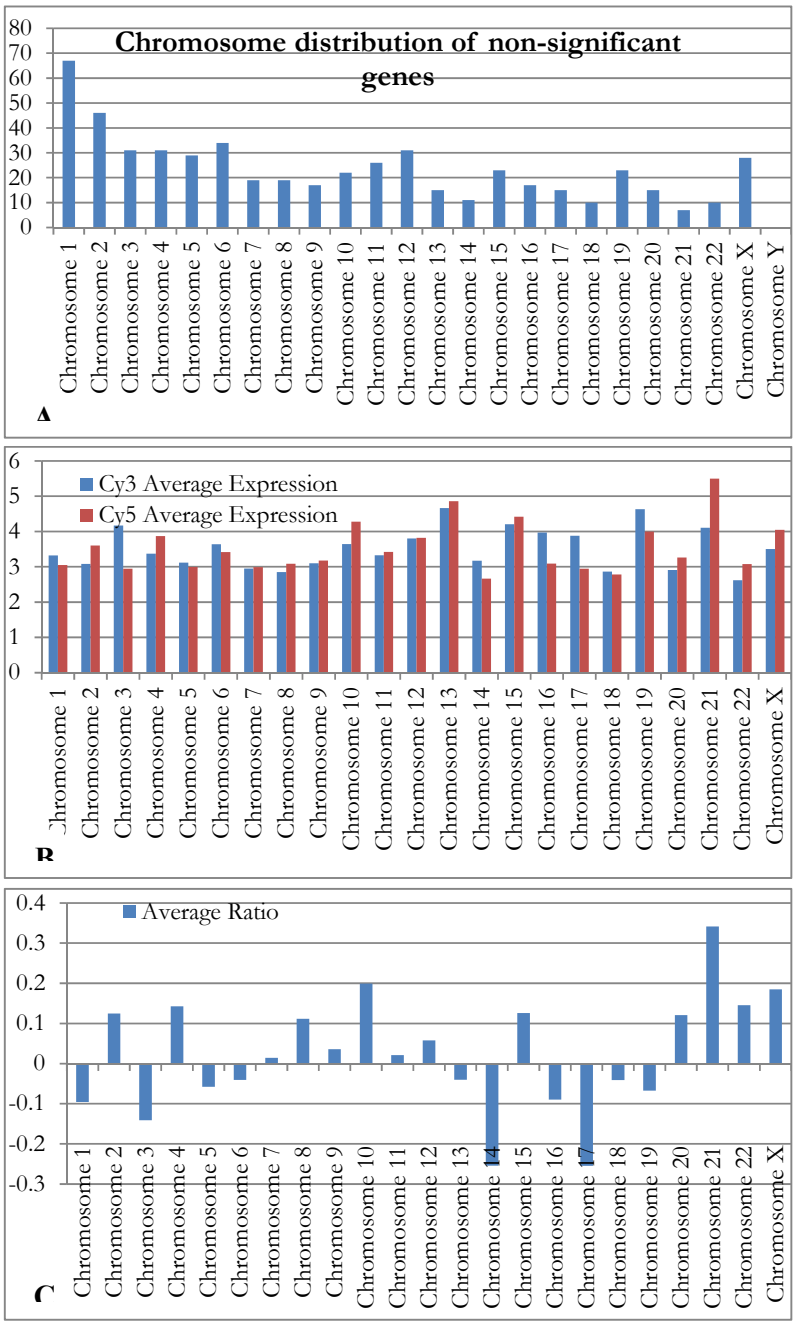
Εικόνα 233. Παρουσιάζονται τα ιστογράμματα των διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων με βάση τη χρωμοσωμική κατανομή τους. Παρουσιάζεται ο αριθμός γονιδίων ανά χρωμόσωμα (**A**) και η μέση έκφραση για κάθε κανάλι (χρωστική) Cy3 και Cy5 (**B**).

Αντίστοιχα η μέση έκφραση των γονιδίων και στα δύο δείγματα καθώς και ο λόγος έκφρασης παρουσιάζονται στην **Εικόνα 234**.



Εικόνα 234. Διαγραμματική παρουσίαση της μέσης έκφρασης των διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων (**A**) και του λόγου έκφρασης Cy3/Cy5 (**B**).

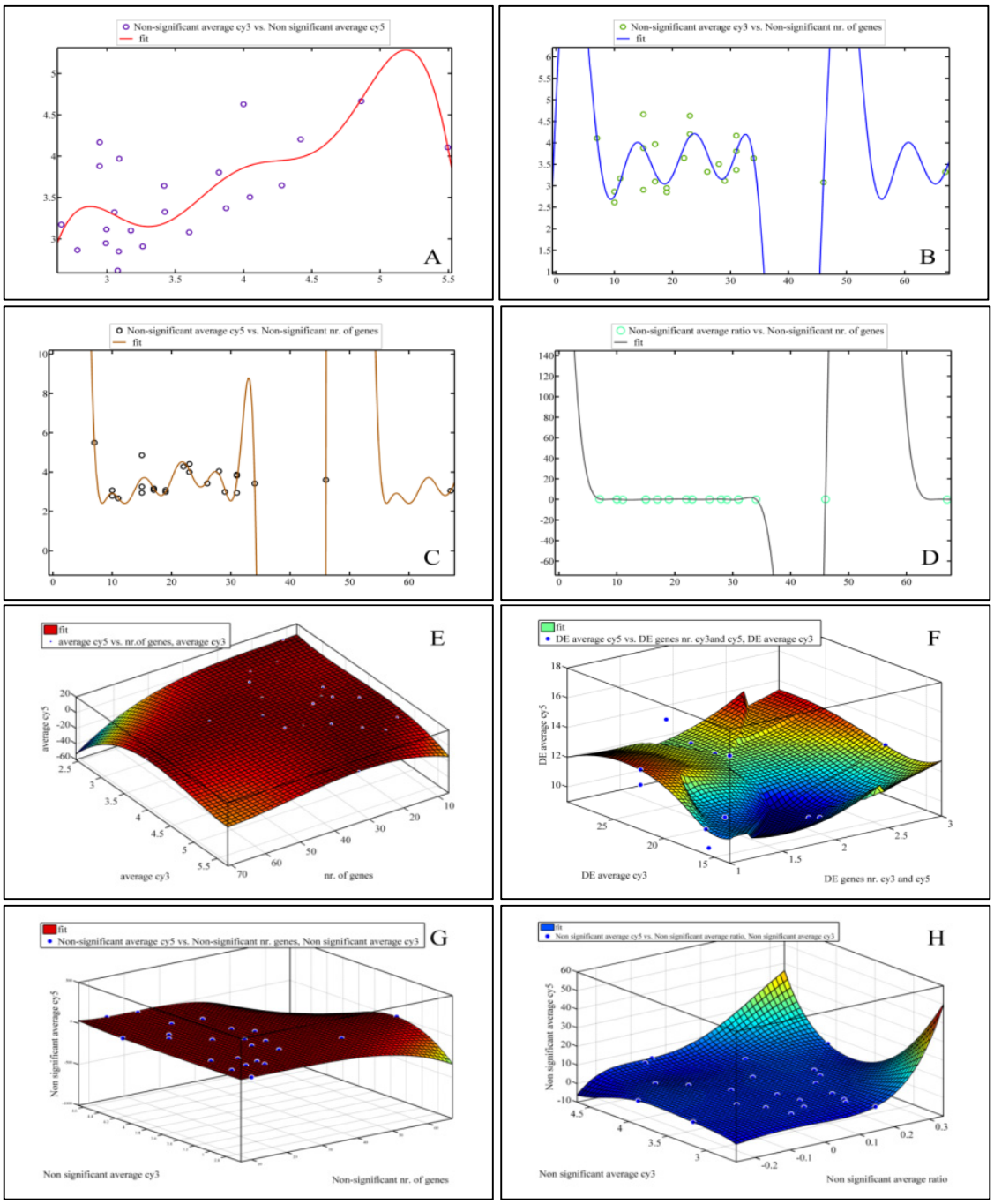
Σε αντιστοιχία με τα διαφορικώς εκφραζόμενα γονίδια έχει ενδιαφέρον να εξετάσουμε τα μη-διαφορικώς εκφραζόμενα γονίδια αφού αυτά αποτελούν τον κοινό τόπο έκφρασης των δύο κυτταρικών τύπων. Η χρωμοσωμική ανάλυση παρουσιάζεται στην **Εικόνα 235**.



Εικόνα 235. Διαγραμματική παρουσίαση της μέσης έκφρασης των μη-εκφραζόμενων γονιδίων (**A**), των επιμέρους τιμών των χρωστικών (**B**) και του λόγου των χρωστικών Cy3/Cy5 (**C**).

Η παρατήρηση ότι η έκφραση των γονιδίων δεν είναι ανάλογη του μεγέθους των χρωμοσωμάτων, μας οδήγησε σε αναζήτηση συσχετισμών στη γονιδιακή έκφραση βάση αυτών. Οι συσχετισμοί αυτοί είναι πιθανό να δείξουν τον τρόπο με τον οποίο ρυθμίζεται η γονιδιακή έκφραση ως προς τα χρωμοσώματα. Οι παλινδρομήσεις που εκτελέσαμε δεν έδωσαν σημαντικά αποτελέσματα αλλά οι παλινδρομήσεις επιφανείας έδωσαν σημαντικές προσομοιώσεις με R^2>0.9 και μεταβλητή λάθους

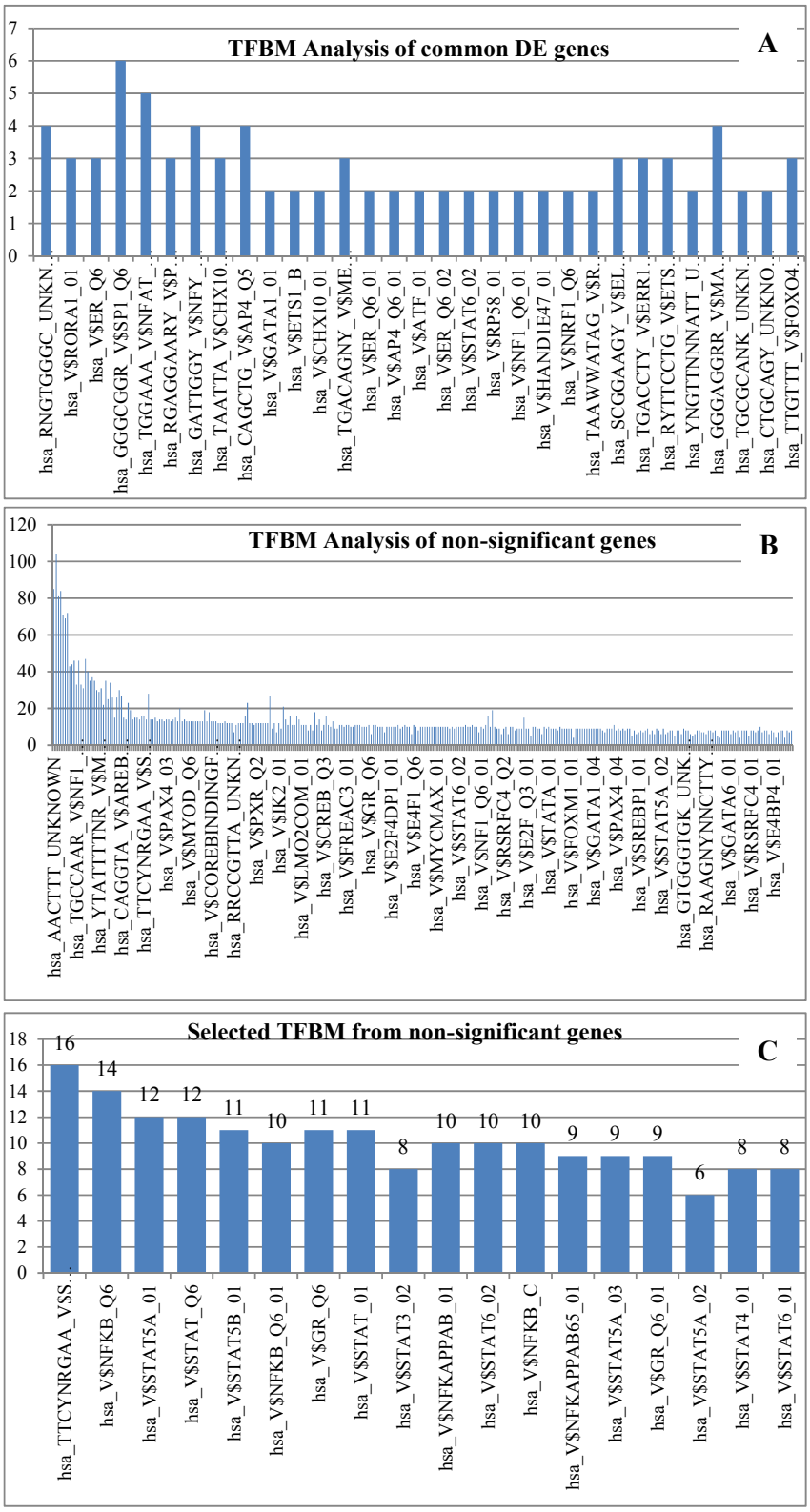
Root Mean Square Error (*RMSE*)<0.4. Τα αποτελέσματα των παλινδρομήσεων παρουσιάζονται στην **Εικόνα 236**.



Εικόνα 236. Παλινδρομήσεις των χρωμοσωμικών κατανομών της γονιδιακής έκφρασης. Παρουσιάζονται οι παλινδρομήσεις των μη-διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων με τη χρώση Cy3 ως προς τη χρώση Cy5 (**A**), των μη-διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων με τη χρώση Cy3 ως προς τον αριθμό των γονιδίων (**B**), των μη-διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων με τη χρώση Cy5 ως προς τον αριθμό των γονιδίων (**C**), του λόγου Cy3/Cy5 των μη-διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων ως προς τον αριθμό των γονιδίων (**D**), το διάγραμμα επιφάνειας της έντασης του φθορισμού των Cy3, Cy5 ως προς τον αριθμό όλων των γονιδίων (**E**), το διάγραμμα επιφάνειας της έντασης του φθορισμού των Cy3, Cy5 ως προς τον αριθμό των διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων (**F**), το διάγραμμα επιφάνειας της έντασης του φθορισμού των Cy3, Cy5 ως προς τον αριθμό των μη-διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων (**G**) και το διάγραμμα επιφάνειας της έντασης του φθορισμού των Cy3, Cy5 ως προς το λόγο των μη-διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων (**H**).

Μια από τις πολύ ενδιαφέρουσες αναλύσεις που μπορούν να γίνουν με τα δεδομένα των μικροσυστοιχιών είναι η αναζήτηση μεταγραφικών παραγόντων γνωστών για τη σχέση τους με τα ανευρισκόμενα γονίδια (Tanscription Factor Binding Motifs-TFBMs). Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων *Transcription Element Listening System Database* (TELiS) (www.telis.ucla.edu) και η βάση *WebGestalt web-tool* (Vanderbilt University, The Netherlands, http://bioinfo.vanderbilt.edu/gotm/).

Η αναζήτηση για μεταγραφικούς παράγοντες έγινε τόσο στα διαφορικώς εκφραζόμενα γονίδια όσο και στα μη-διαφορικώς εκφραζόμενα. Συνολικά βρέθηκαν 31 μεταγραφικοί παράγοντες (TFs) με FDR 4% για $p<0.01$ (**Εικόνα 237Α**). Ιδιαίτερα, ενδιαφέρον έχει η πρόβλεψη του παράγοντα STAT6, ο οποίος είναι γνωστό ότι ρυθμίζει τα γονίδια DLC1 και WNT5A. Από την άλλη μεριά η ανάλυση των μη-διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων έδειξε 329 TFs με $p<0.01$ και FDR<1% (**Εικόνα 237Β**). Η προσοχή μας εστιάσθηκε σε τρεις παράγοντες, τους STAT, GR and NFκB (**Εικόνα 237C**).



Εικόνα 237. TFBM ανάλυση των κοινών, διαφορικών εκφραζόμενων γονιδίων (**A**), των μη-διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων (**B**) και επιλεγμένων γονιδίων από τα μη-διαφορικώς εκφραζόμενα (**C**).

Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες ρυθμίζουν τα γονίδια-στόχους κατά παρόμοιο τρόπο, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 238**. Ειδικότερα ο παράγοντας STATαποτελεί μέρος της οδού JAK-STAT-MAP, η οποία θεωρείται εξαιρετικής σημασίας για το ρόλο της στην καρκινογένεση και πολλαπλασιασμό των νεοπλασμάτων. Από τους μεταγραφικούς παράγοντες που ανευρέθησαν κάποιοι εξ αυτών παρουσίασαν ενδιαφέρουσα συμπεριφορά μιας και ρύθμιζαν γονίδια με αυξανόμενη έκφραση. Τέτοιο παράδειγμα αποτελούν οι μεταγραφικοί παράγοτες RORA1, NFY και ERR1 (**Εικόνα 238**).

Εικόνα 238. Μεταγραφικοί παράγοντες των διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων Παρουσιάζονται ο παράγοντες RORA1, ERR1 και NFY, οι οποίοι έδειξαν ρύθμιση γονιδίων με αυξανόμενη έκφραση.

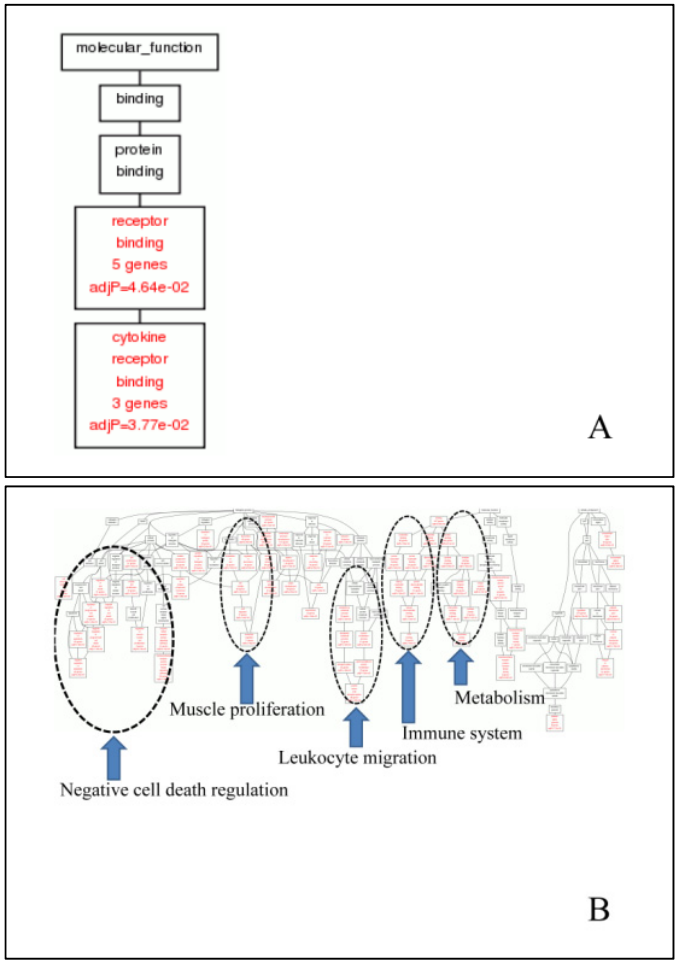
Εικόνα 238 (συνέχεια). Μεταγραφικοί παράγοντες των μη-διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων Παρουσιάζονται ο παράγοντες STAT, GR και NFkB, οι οποίοι έδειξαν ρύθμιση γονιδίων με αυξανόμενη έκφραση.

Ένα από τα βασικά ερωτήματα που προκύπτουν από την ανάλυση των μικροσυστοιχιών είναι για το ποια είναι η λειτουργία των γονιδίων που προκύπτουν από αυτήν. Στην αναζήτηση αυτή ένα βασικό εργαλείο είναι η βάσεις δεδομένων οντολογίας (Gene Ontology Databases). Στα πειραματικά δεδομένα που προέκυψαν πραγματοποιήσαμε τέτοιες αναλύσεις, οι οποίες μας έδωσαν μια εικόνα της λειτουργίας των γονιδίων των δύο κυτταρικών τύπων. Όπως και στα προηγούμενα παραδείγματα,

πραγματοποιήσαμε ανάλυση τόσο στα διαφορικώς εκφραζόμενα όσο και στα μη-διαφορικώς εκφραζόμενα γονίδια. Τα διαφορικώς εκφραζόμενα γονίδια έδειξαν να συμμετέχουν σε δύο κύριες λειτουργίες, πρόσδεση υποδοχέα και υποδοχείς κυτοκινών (Receptor binding, cytokine receptor binding) *p<0.01*. Από την άλλη μεριά τα μη-διαφορικώς εκφραζόμενα γονίδια συμμετείχαν σε λειτουργίες του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης εμβυονικής ανάπτυξης και εξωκυττάριας σηματοδότησης. Τα γονίδια αυτά τα χωρίσαμε σε δύο βασικές κατηγορίες: α) *secretion molecule* γονίδια: CGRRF1*,* IGFBP7*,* PDGFB*,* PRC1*,* TGFB3 και VEGFC, β) *receptor/receptor binding/cytokine activity* γονίδια: PDGFB*,* TGFB3*,* VEGFC*,* ADORA1*,* ALCAM*,* AVPR1A*,* CCRL1*,* CD40LG*,* CNR1*,* CSF3R, GABRA2, GLRA3, GPR44, HTR2B, IL2RA, IL9, LIFR, LRP1, MET, NPFF, PDYN, PTPN13, PTPN9, PTPRCAP, RXRB, SPRED2, TFRC, TLR3 και TRIP13, γ) *cell communication/cell-cell signaling* γονίδια: TGFB3, GABRA2, HTR2B, LIFR, NPFF, PDYN, SPRED2, ARHGAP6, CDC2, DDEF1, DDEF2, EFA6R, GNG12, KIAA0974, PLEKHG1, PSMA4, RAPGEF2, RUNDC3A, TIAM1 και TMEPAI, δ) *cell cycle* γονίδια, που περιελέμβαναν γονίδια της μίτωσης και προαγωγή του κυτταρικού κύκλου, όπως: CDC2, PRC1, AK021716, DLGAP5, H2AFV, PPAPDC1B and ZZEF1, ε) *cell proliferation* γονίδια: *CDC2,* GNL3 και PDGFB, στ) *cell differentiation/developmental/embryonic process* γονίδια: CDC2, VEGFC, CD40LG, IL2RA, ANXA4, BNIP3L, CD36, CFDP1, CUL7, FEM1B, FOXO1, MAB21L1, MBNL3, MMP2, NNAT, NP25, PDCD5, PDLIM7, PLAC1, RPS6KA3, RTTN, TCL1A, THBS4 και ZNF313, ζ) *stem cell/stem cell differentiation related* γονίδια: CDC2, VEGFC, CD40LG, IL2RA, ANXA4, CFDP1, CUL7, FOXO1, MMP2, NNAT, NP25, PDCD5, PDLIM7, TCL1A, PDGFB, PRC1, DLGAP5, TGFB3, GABRA2, HTR2B, LIFR, NPFF, ARHGAP6, DDEF2, ADORA1, CCRL1, CNR1, CSF3R, GPR44, IL9, LRP1, MET, PTPN13, PTPN9, PTPRCAP, RXRB, TFRC, TLR3, CGRRF1, IGFBP7, FOSB, SIRT5 και TCF4. Επίσης διερευνήσαμε την ύπαρξη ανασταλτικών ή ενισχυτικών μηχανισμών για τα εκφραζόμενα γονίδια και αυτά ήταν τα: ANXA4, CD36, FOSB, SIRT5 και TCF4 (ανασταλτικά γονίδια) και FEM1B (ενισχυτικά γονίδια), η) *negative cell death regulation*: IL7, ADAM17, ACVR1, TNFAIP3, ANXA4, DHCR24, LRP1, BNIP3L, SELS, CSF2, NAIP, GSTP1, HMOX1, BARD1, PRDX2, CDC2, XRCC5, FNTA, ADORA1, PTEN, CFDP1, TGFB3, IGF1, DAPK1, MSH2, NUP62, CDKN2D, KIT και LIFR, θ) *muscle proliferation*, που αποτελεί μια πολύ ενδιαφέρουσα κατηγορία γονιδίων μιας και τα χρησιμοποιούν και οι δύο κυτταρικοί τύποι και περιλαμβάνουν τα γονίδια IFNG, PTGS2, TGFBR3, ANG, FLT1, STAT1, IGF1, TGFB2, PDGFB, IL12B, ι) *leukocyte migration*, επίσης ιδιαίτερου ενδιαφέροντος μιας και χρησιμοποιούνται και από τις δύο κυτταρικές σειρές που είναι διαφορετικής υπόστασης και περιλαμβάνουν τα γονίδια: IFNG, ADAM17, ADORA1, SELP, ITGA6, IL8, TGFB2, CD34, HMOX1, PDGFB, ICAM1 και τέλος κ) λειτουργίες μεταβολισμού, που περιλαμβάνουν τα PTPRO, MTM1, ACVR1, PTPRA, NTRK3, NDUFAB1, PDGFB,

MAPK14, FLT3, BARD1, CDKN2C, RPS6KA2, TGFBR3, CDKL5, IGF1, EPHB6, MET, FGF23, MAP3K10, CDKN2D, GPD1L, KIT, IFNG, TNK2, PTPN9, TLK1, LRP1, KALRN, CDC2, ATP5F1, DCLK1, FLT1, MADD, STAT1, PPP1CB, MAPK13, MAPK10, PARD3, DYRK3, NDUFS1, TRIB2, TGFB2, INPP1, PIP4K2A, ADORA1, ANG, STK3, FLT4, PTEN, MSH2, DAPK1, TGFB3, SYNJ2, CSNK2A2, MORC3, VEGFC, PDGFC, ADAM17, PIK3C3, MAPKAPK3, PTPN13, CSF2, PRDX2, DOCK7, FGR, PGK1, TIE1, NUP62, STK25, CCL11, RPS6KA3, CSF1R.

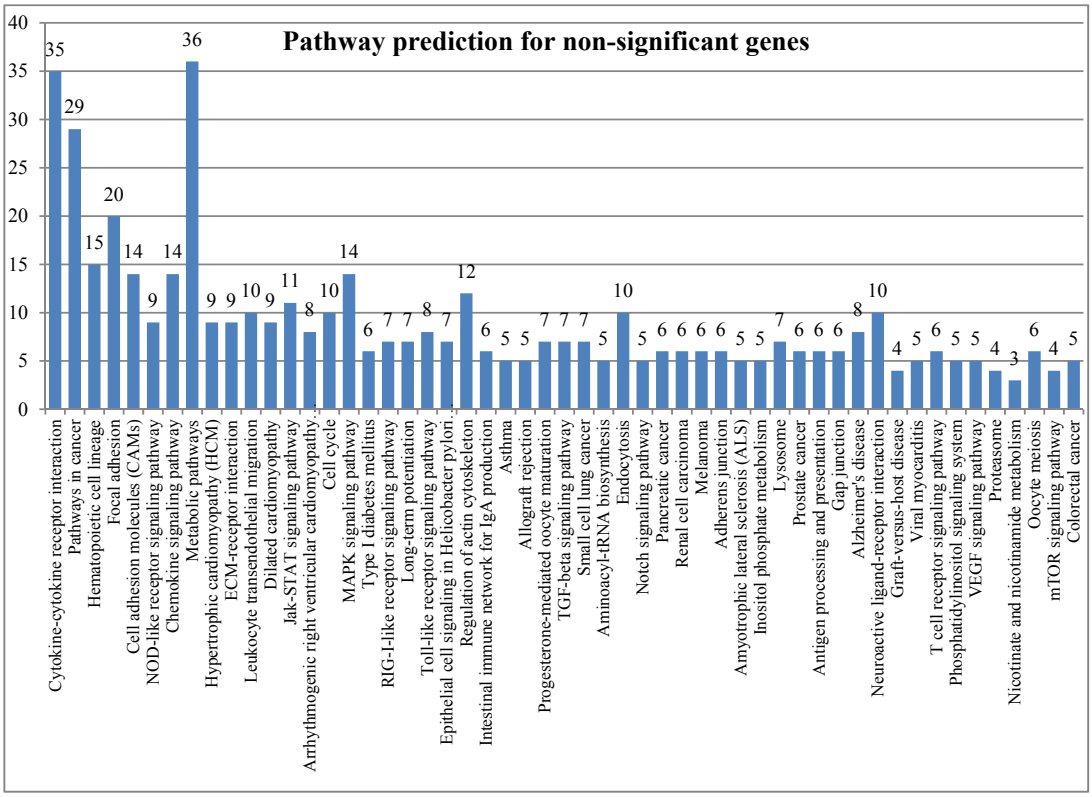
Το συγκεντρωτικό αποτέλεσμα των λειτουργιών παρουσιάζεται στην **Εικόνα 239**.



Εικόνα 239. Πρόβλεψη των λειτουργιών των γονιδίων για τα διαφορικώς εκφραζόμενα (**A**) και τα μη-διαφορικώς εκφραζόμενα (**B**).

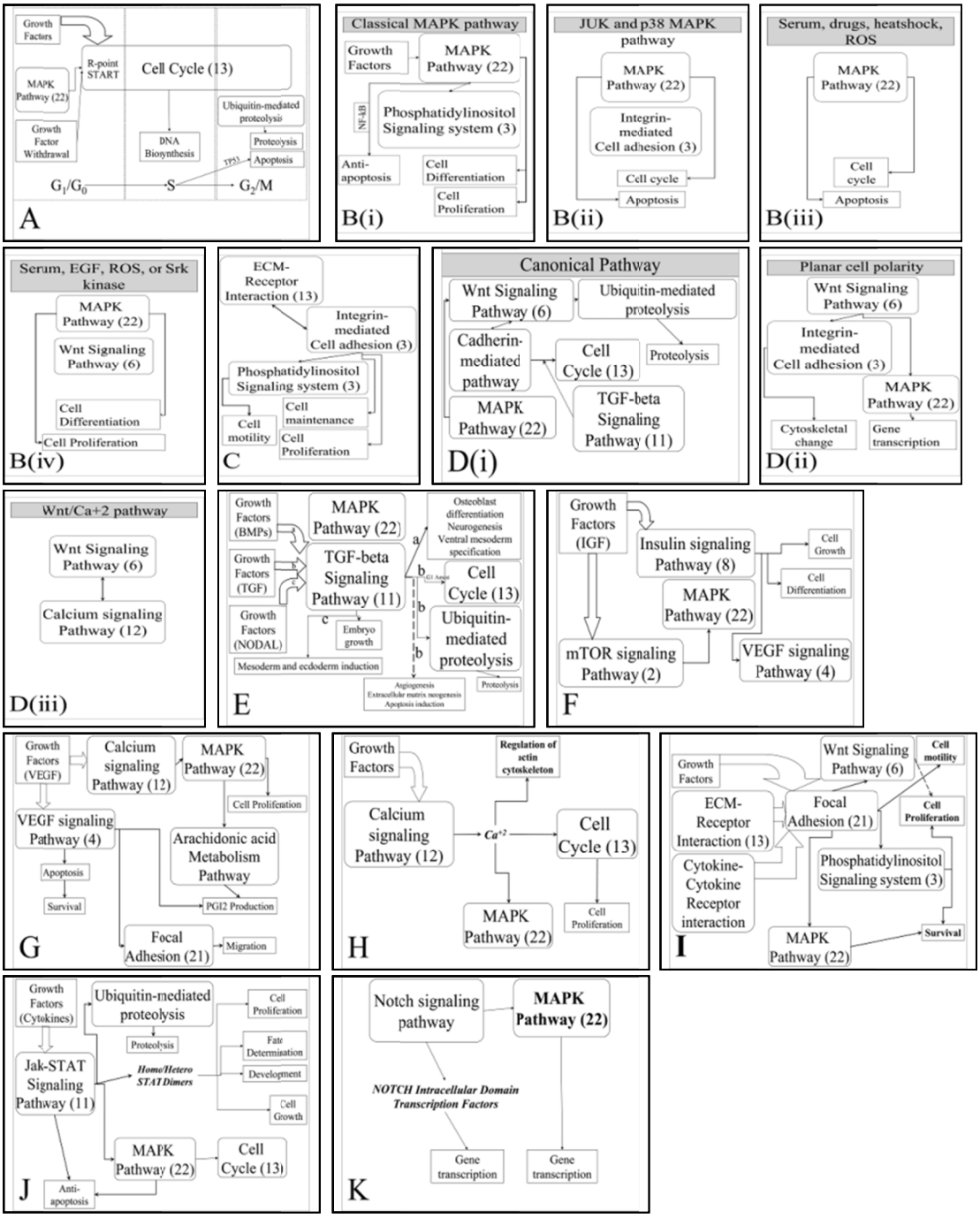
Τελευταίος σταθμός στην ανάλυση των δεδομένων των μικροσυστοιχιών αποτελεί η μελέτη και πρόβλεψη της συμμετοχής των γονιδίων σε σηματοδοτικές οδούς. Η προσέγγιση αυτή αποτελεί ένα εργαλείο για την κατανόηση των κοινών μηχανισμών των δύο κυτταρικών τύπων. Ο στόχος είναι να βρεθούν γονίδια που συμμετέχουν από κοινού σε σηματοδότηση και με ποιόν τρόπο αλληλεπιδρούν. Για να το επιτύχουμε αυτό, ακολουθήσαμε την εξής διαδικασία: Πρώτα διαχωρίσαμε τα γονίδια σε δύο κατηγορίες, στα διαφορικώς εκφραζόμενα γονίδια και στα μη-διαφορικώς εκφραζόμενα γονίδια. Δεύτερον μοντελοποιήσαμε την κάθε κατηγορία γονιδίων με τα βιοπληροφορικά εργαλεία που προαναφέραμε. Τα διαφορικώς εκφραζόμενα γονίδια έδειξαν τη συμμετοχή των γονιδίων σε ένα πολύ σημαντικό μονοπάτι, το JAK-STAT-MAPK pathway ($p<0.01$) με τα γονίδια SPRED2 και IL2RA να συμμετέχουν σε αυτό. Από την άλλη μεριά, τα μη-διαφορικώς εκφραζόμενα γονίδια συμμετείχαν σε περισσότερες σηματοδοτικές οδούς (αναμενόμενο μιας και ήταν περισσότερα). Μελετήσαμε επίσης την παρουσία εξωκυττάριων σηματοδοτικών μορίων και βρέθηκε ότι οι κυτταρικοί τύποι μοιράζονται τεσσάρων ειδών σηματοδότηση, α) ECM-receptor/focal adhesion/MAPK signal transduction, β) Cytokine-cytokine-receptor/MAPK/cell cycle signal transduction pathway, γ) cell death regulatory mechanisms και δ) Jak-STAT/MAPK pathway signal transduction. Όλες οι οδοί αυτοί συμμετέχουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση και αντι-απόπτωση. Επίσης ιδιαίτερα σημαντική ήταν η εμφάνιση δύο οδών, που αφορούσαν στο λυσόσωμα και το πρωτεάσωμα. Στις δύο αυτές οδούς συμμετέχουν τα γονίδια LAMP2, SCARB2, AP1M2, AP3S1, CTSO, CTSH, NAGA καθώς και τα IFNG, POMP, PSMA2 και PSME4.

Το αποτέλεσμα της συμμετοχής των γονιδίων σε σηματοδοτικές οδούς παρουσιάζεται στην **Εικόνα 240**.



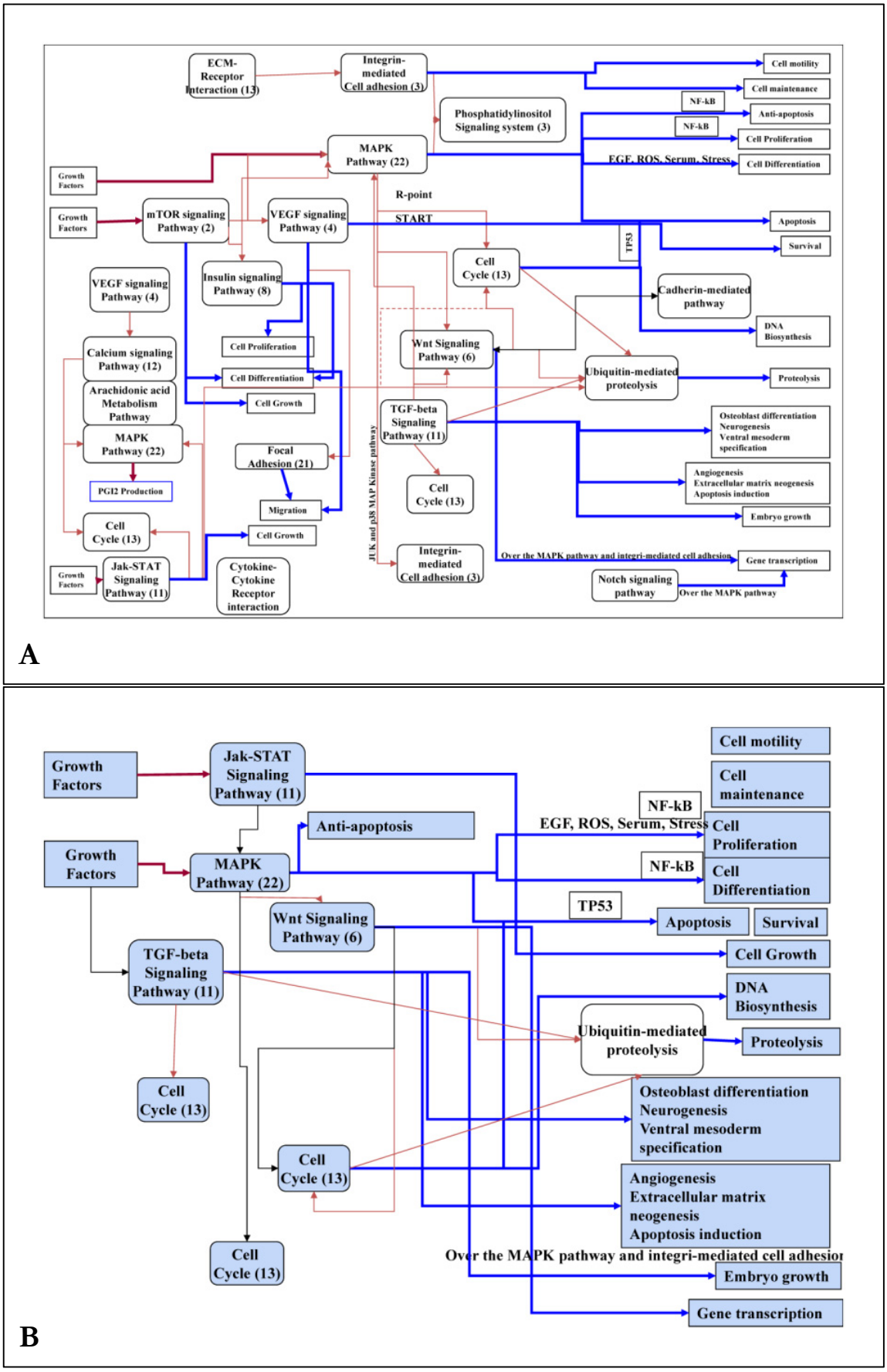
Εικόνα 240. Παρουσίαση των σηματοδοτικών οδών που συμμετέχουν τα μη-διαφορικώς εκφραζόμενα γονίδια. Οι αριθμοί πάνω από κάθε ιστόγραμμα αντιστοιχούν στον αριθμό των γονιδίων που συμμετέχει στη σηματοδοτική οδό.

Χρησιμοποιήσαμε τα δεδομένα που παράχθησαν από την παραπάνω μελέτη και δημιουργήσαμε ένα σύνολο από τις σηματοδοτικές οδούς στις οποίες συμμετείχαν τα γονίδια που βρήκαμε. Οι σηματοδοτικές οδοί παρουσιάζονται στην **Εικόνα 241**.

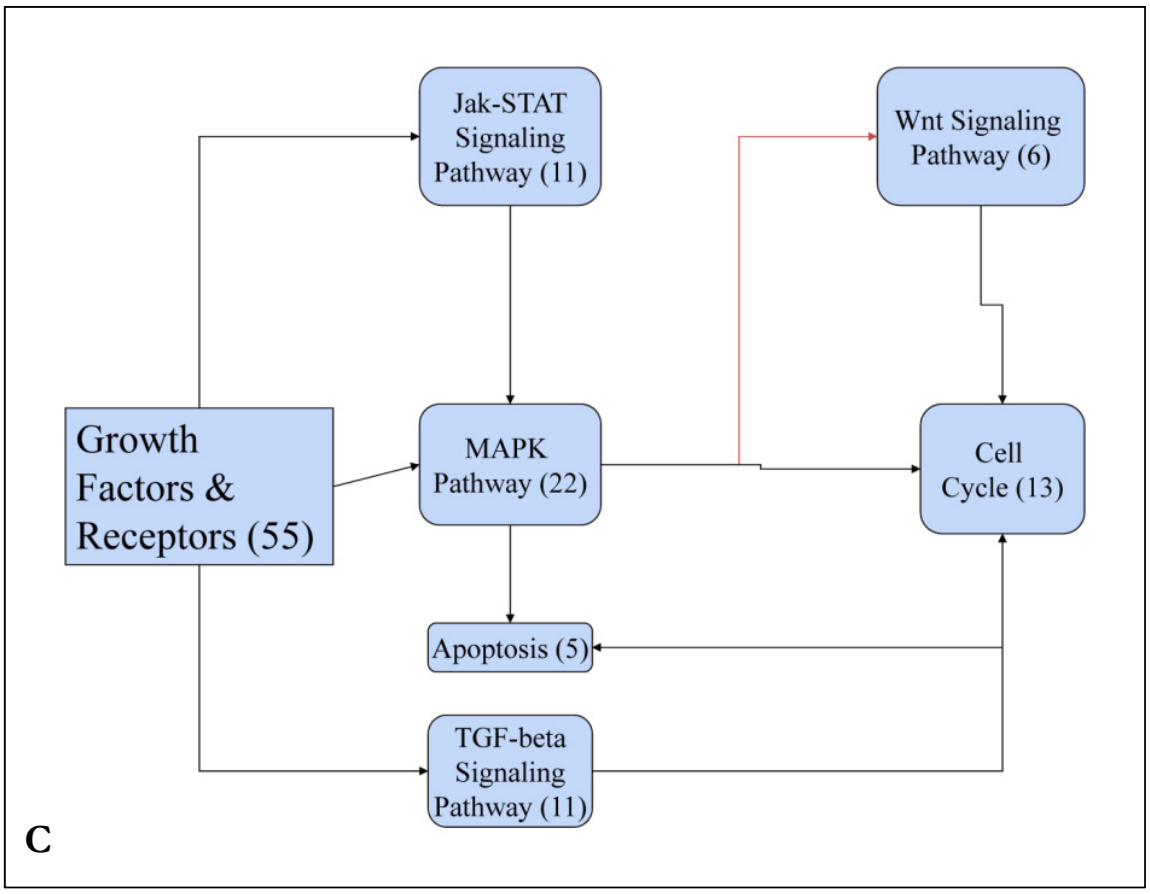


Εικόνα 241. Διαγραμματική παρουσίαση των κυριότερων αλληλεπιδράσεων μεταξύ σηματοδοτικών οδών που ανεβρέθηκαν με την ανάλυση των γονιδίων. Οι αριθμοί σε παρένθεση υποδεικνύουν τον αριθμό γονιδίων που συμμετέχουν σε κάθε σηματοδοτική οδό.Παρουσιάζονται οι σηματοδοτικές οδοί για *Cell Cycle* (**A**), *MAPK Signaling Pathway* (**B i-iv**), *Integrin-mediated Cell Adhesion* (**C**), *Wnt Signaling Pathway* (**D i-iii**), *TGF-beta Signaling Pathway* (**E**), *mTOR Signaling Pathway* (**F**), *VEGF Signaling Pathway* (**G**), *Calcium Signaling Pathway* (**H**), *Focal Adhesion Pathway* (**I**), *Jak-STAT Signaling Pathway* (**J**), *Notch Signaling Pathway* (**K**).

Οι σηματοδοτικοί οδοί που αναφέραμε παρουσιάζονται στα επόμενα διαγράμματα συγκεντρωτικά (**Εικόνα 242**).

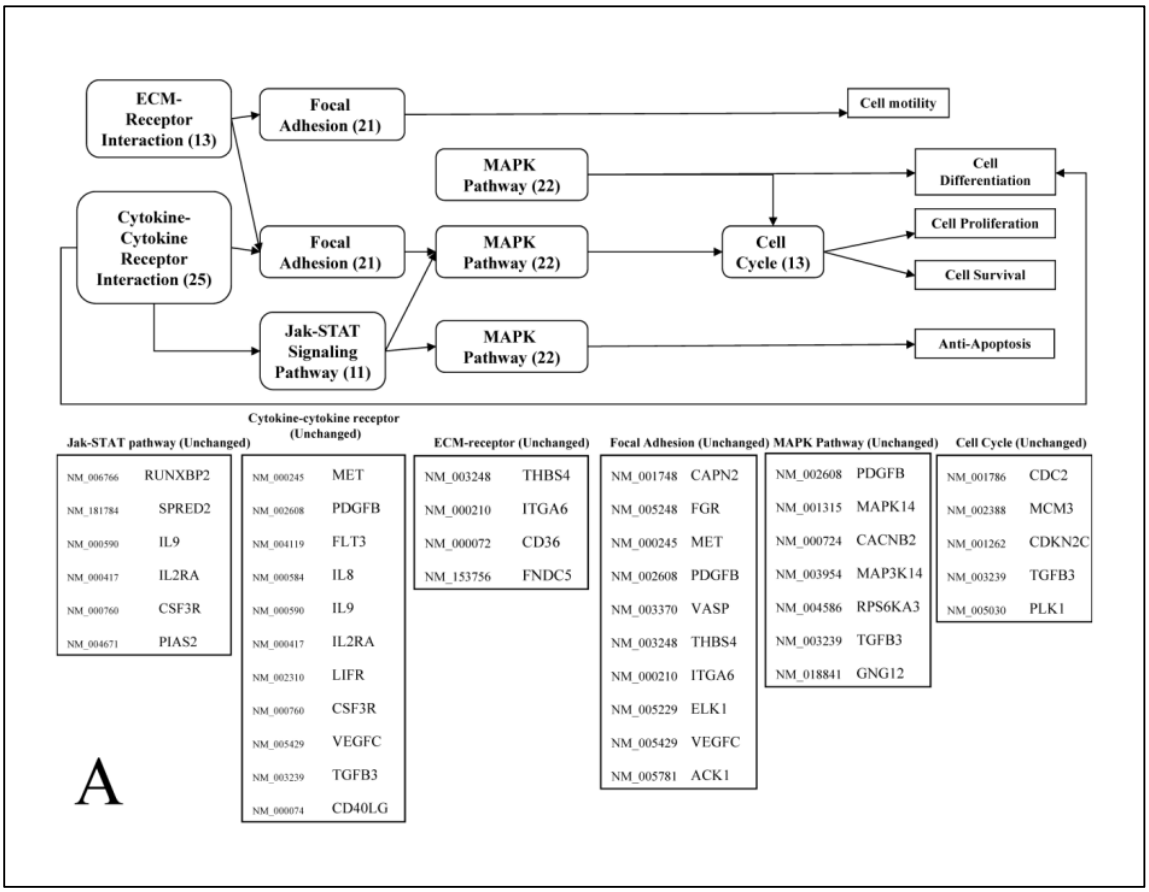


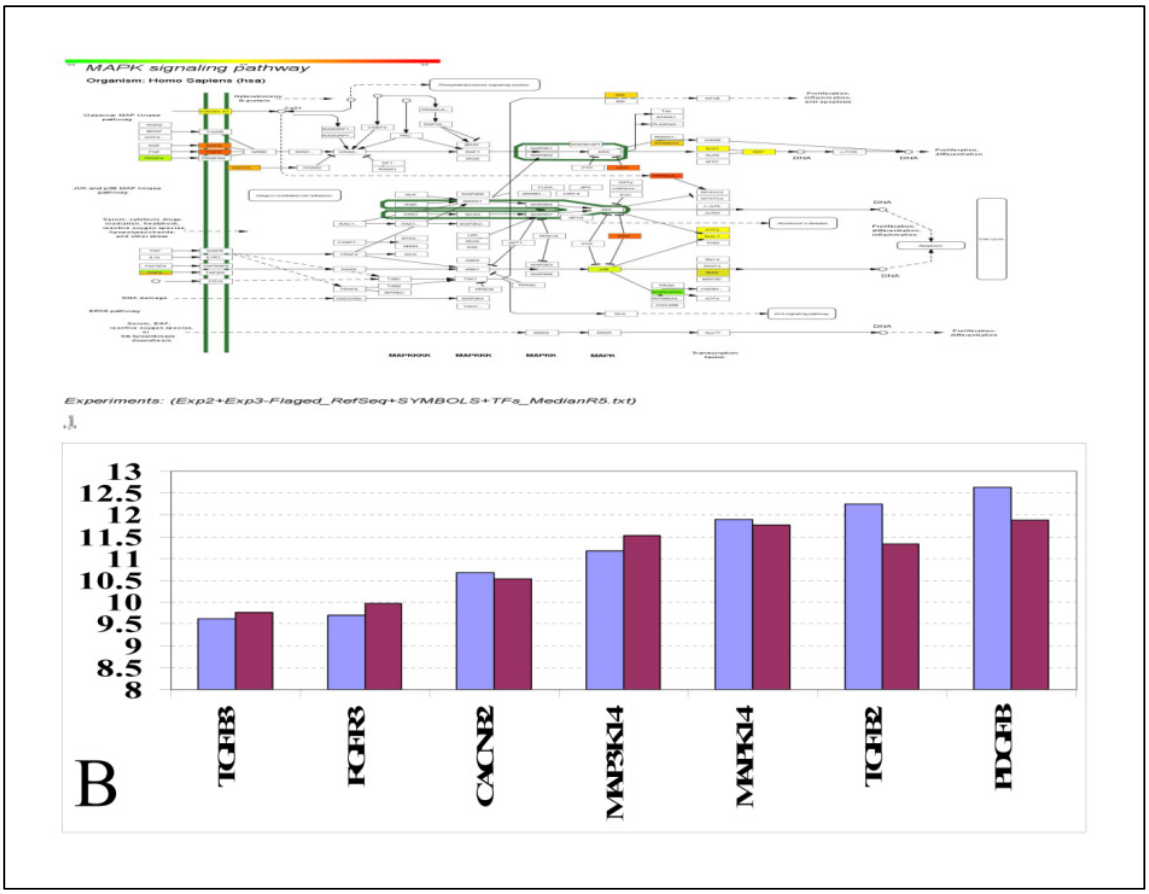
Εικόνα 242.



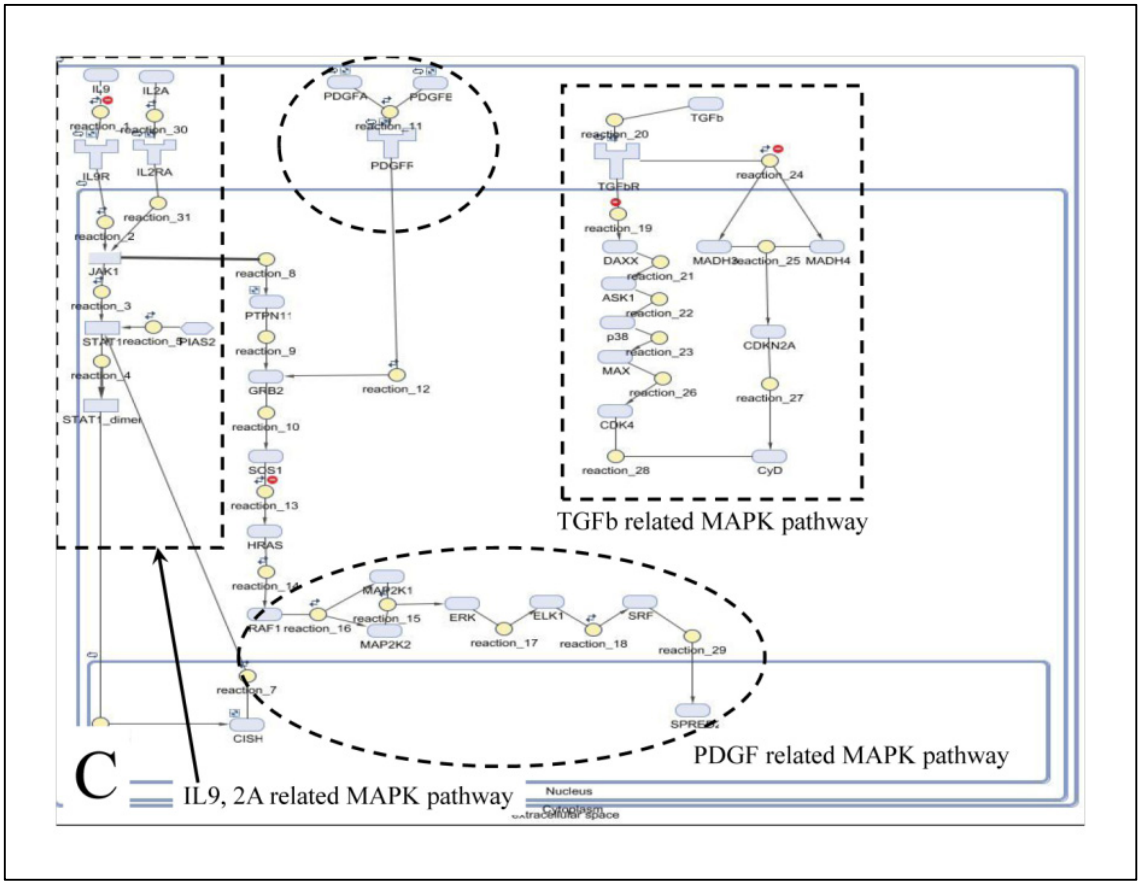
Εικόνα 242. Συνολική διαγραμματική παρουσίαση όλων των σηματοδοτικών οδών που βρέθηκαν από την παραπάνω ανάλυση (**A**), η διαγραμματική παρουσίαση των επιλεγμένων οδών JAK-STAT-MAPK (**B**, **C**).

Οι συσχετισμοί επίσης που περιγράψαμε παρουσιάζονται σε σχέση με τα γονίδια τα οποία εκφράζονται στους κυτταρικούς τύπους που μελετήσαμε. Το αποτέλεσμα των σημαντικότερων γονιδίων παρουσιάζεται στην **Εικόνα 243**.


ECM-Receptor Interaction (13)
Focal Adhesion (21)
Cell motility
MAPK Pathway (22)
Cell Differentiation
Cytokine-Cytokine Receptor Interaction (25)
Focal Adhesion (21)
MAPK Pathway (22)
Cell Cycle (13)
Cell Proliferation
Cell Survival
Jak-STAT Signaling Pathway (11)
MAPK Pathway (22)
Anti-Apoptosis
Jak-STAT pathway (Unchanged)
NM_006766 RUNXBP2
NM_181784 SPRED2
NM_000590 IL9
NM_000417 IL2RA
NM_000760 CSF3R
NM_004671 PIAS2
Cytokine-cytokine receptor (Unchanged)
NM_000245 MET
NM_002608 PDGFB
NM_004119 FLT3
NM_000584 IL8
NM_000590 IL9
NM_000417 IL2RA
NM_002310 LIFR
NM_000760 CSF3R
NM_005429 VEGFC
NM_003239 TGFB3
NM_000074 CD40LG
ECM-receptor (Unchanged)
NM_003248 THBS4
NM_000210 ITGA6
NM_000072 CD36
NM_153756 FNDC5
Focal Adhesion (Unchanged)
NM_001748 CAPN2
NM_005248 FGR
NM_000245 MET
NM_002608 PDGFB
NM_003370 VASP
NM_003248 THBS4
NM_000210 ITGA6
NM_005229 ELK1
NM_005429 VEGFC
NM_005781 ACK1
MAPK Pathway (Unchanged)
NM_002608 PDGFB
NM_001315 MAPK14
NM_000724 CACNB2
NM_003954 MAP3K14
NM_004586 RPS6KA3
NM_003239 TGFB3
NM_018841 GNG12
Cell Cycle (Unchanged)
NM_001786 CDC2
NM_002388 MCM3
NM_001262 CDKN2C
NM_003239 TGFB3
NM_005030 PLK1
A

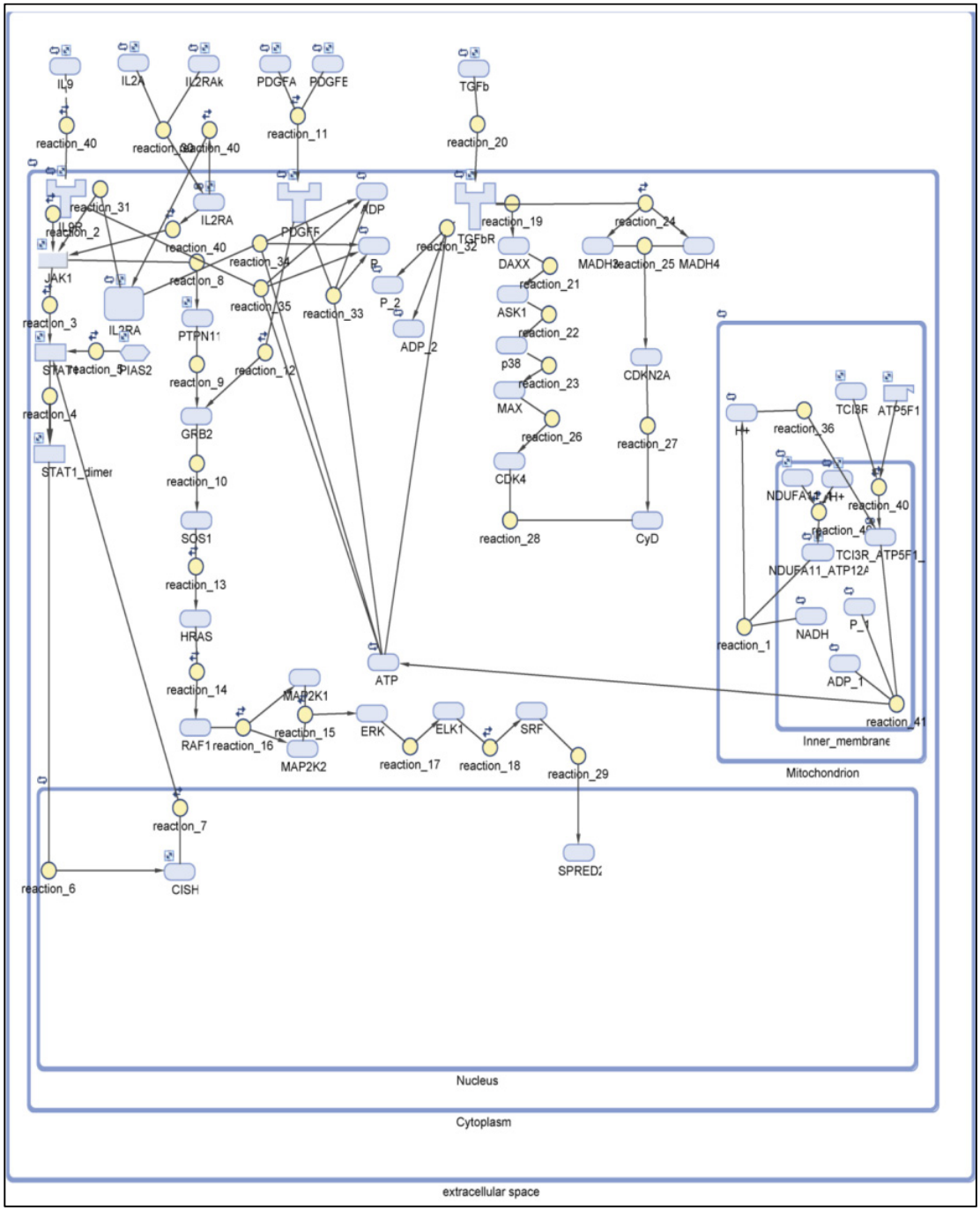

MAPK signaling pathway
Organism: Homo Sapiens (hsa)
Experiments: (Exp2+Exp3-Flaged_RefSeq+SYMBOLS+TFs_MedianR5.txt)
13
12.5
12
11.5
11
10.5
10
9.5
9
8.5
8
TGFB3
FGFR3
CACNB2
MAP3K14
MAPK14
TGFB2
PDGFB
B

Εικόνα 243.



Εικόνα 243 (Συνέχεια). Παρουσιάζονται οι σηματοδοτικές οδοί μαζί με τα σημαντικότερα γονίδια (αυτά με τη μεγαλύτερη έκφραση) ανά οδό (**A**, **B**). Προσομοιωτική αναπαράσταση των οδών TGFb-MAPK-PDGF (**C**).

Για να αποκτήσουμε καλύτερη εικόνα της λειτουργίας των οδών αυτών δημιουργήσαμε ένα προσομοιωτικό μοντέλο της οδού JAK-STAT, MAPK, TGFb και βασικών μεταβολικών οδών. Το μοντέλο αυτό παρουσιάζεται στην **Εικόνα 244**. Η προσομοίωση των οδών αυτών μας έδωσε ορισμένα πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Τέσσερα μόρια παρουσίασαν ταλαντωτικές συμπεριφορές. Τα γονίδια αυτά ήταν τα JAK, STAT1 και PIAS2 (μέρος του μονοπατιού JAK-STAT) και το CDK4 (μέρος του μονοπατιού TGFb). Επίσης φάνηκε ότι τα μόρια αυτά ακολουθούσαν πολύ γρήγορη ταλαντωτική δυναμική χωρίς την ύπαρξη ενός ανασταλτικού μηχανισμού. Μπορούμε να συμπεράνουμε από τα ευρήματα αυτά ότι τα γονίδια αποτελούν μέρος των πολλαπλασιαστικών οδηγών των κυτταρικών τύπων που μελετάμε.

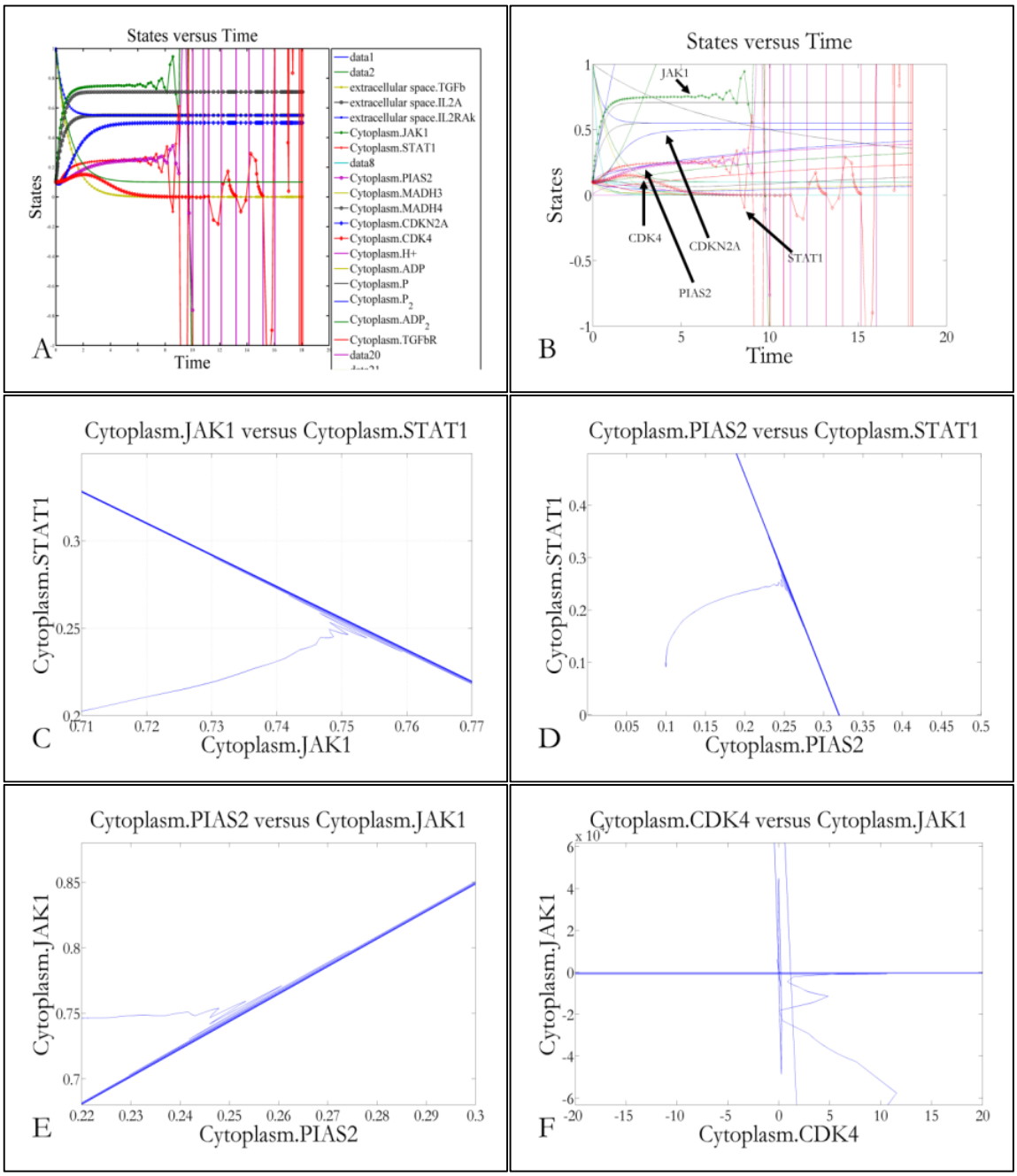


Εικόνα 244. Διαγραμματική αναπαράσταση προσομοιωμένων συνδεδεμένων σηματοδοτικών οδών.

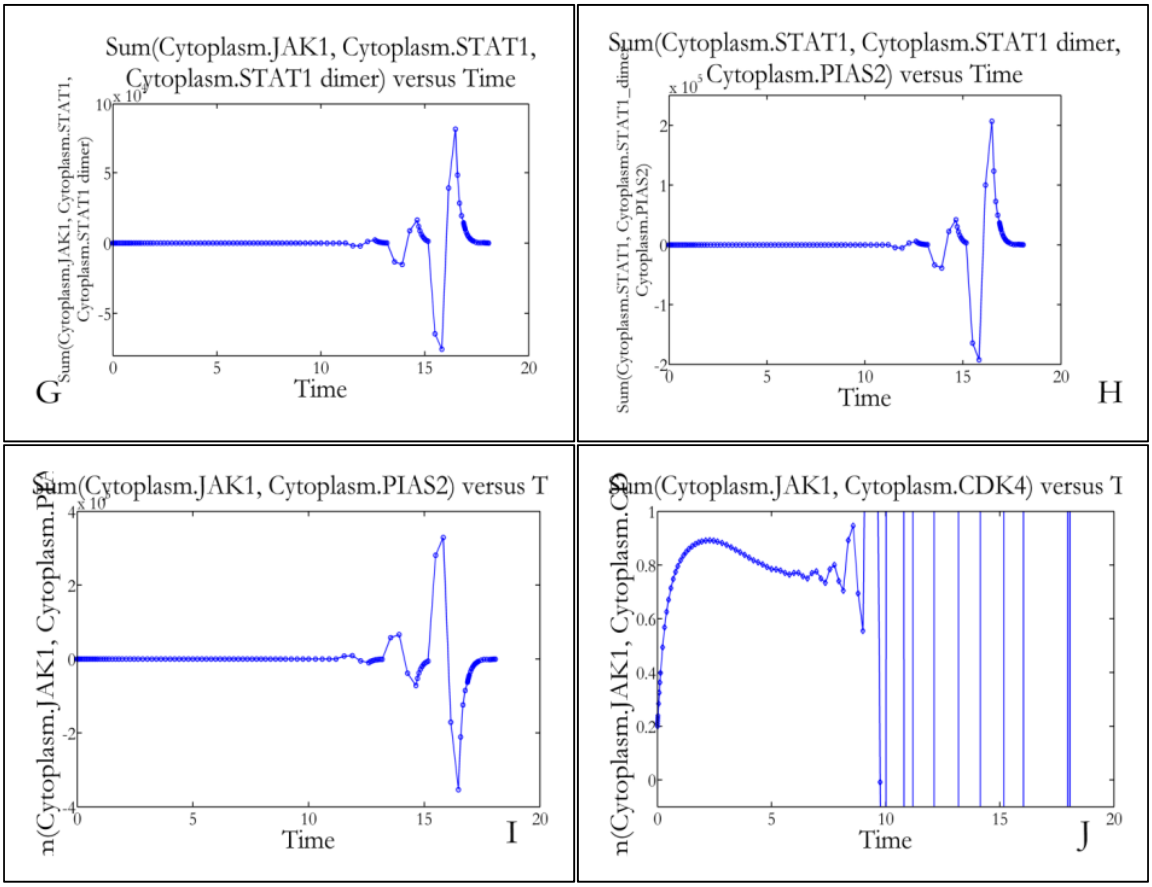
Δεδομένου ότι τα γονίδια αυτά συμμετέχουν και εκφράζονται με τον ίδιο τρόπο και στις δύο κυτταρικές σειρές τα κάνει πιθανούς στόχους για το ρόλο τους στην πολλαπλασιαστική δυναμική. Επίσης εξετάσαμε την έκφραση των γονιδίων ενδαφέροντος για την παρουσία μη-γραμμικών φαινομένων. Έτσι τέτοια φαινόμενα φάνηκαν να υπάρχουν από τα γονίδια αυτά όταν τα αναπαριστούμε διαγραμματικά (Error! Reference source not found.**A**, **B**). Πιο συγκεκριμένα η διαγραμματική παρουσίαση των JAK1 vs. STAT1 έδειξε ότι ακολουθούν περιπλοκη δυναμική αφού

έδωσαν την εικόνα μιας "πηγής» (repeller, "source") (Error! Reference source not found.**C**). Επίσης αντίστοιχο φαινόμενο έδειξε η αναπαράσταση των γονιδίων PIAS2 και STAT1 (Error! Reference source not found.**D**), PIAS2 και JAK1 (Error! Reference source not found.**E**). Τα γονίδια CDK4 και JAK1 παρουσίασαν μια διαφορετική δυναμική, αφού φάνηκε να έχουν δυναμική ελκυστή (*sink*) (Error! Reference source not found.**F**). Τα αποτελέσματα αυτά είναι ενδείξεις για την ύπαρξη μη-γραμμικών φαινομένων στη γονιδιακή ρύθμιση και έκφραση.

Προκειμένου να διερευνήσουμε συνεργικά φαινόμενα στη γονιδιακή έκφραση αναπαραστήσαμε διαγραμματικά αθροίσματα των γονιδίων που αναφέραμε σε σχέση με το χρόνο. Το άθροισμα STAT1/JAK1 (Εικόνα 245G) έδειξε παρόμοια συμπεριφορά με το άθροισμα των γονιδίων PIAS2/STAT1 (Εικόνα 245H), υποδεικνύοντας ότι τα μόρια αυτά αποτελούν σημεία κλειδιά στην πολλαπλασιαστική δυναμική. Ενδιαφέρον επίσης εύρημα αποτελεί το γεγονός ότι το άθροισμα των γονιδίων JAK1/CDK4 έδειξε ταλαντωτική συμπεριφορά που έτεινε στο άπειρο, υποδεικνύοντας ότι ο συνδυασμός αυτός των γονιδίων έβγαινε εκτός ελέγχου στα κυτταρικά μας συστήματα ή το ότι αποτελούν τον βασικό παράγοντα της πολλαπλασιαστικής δυναμικής.



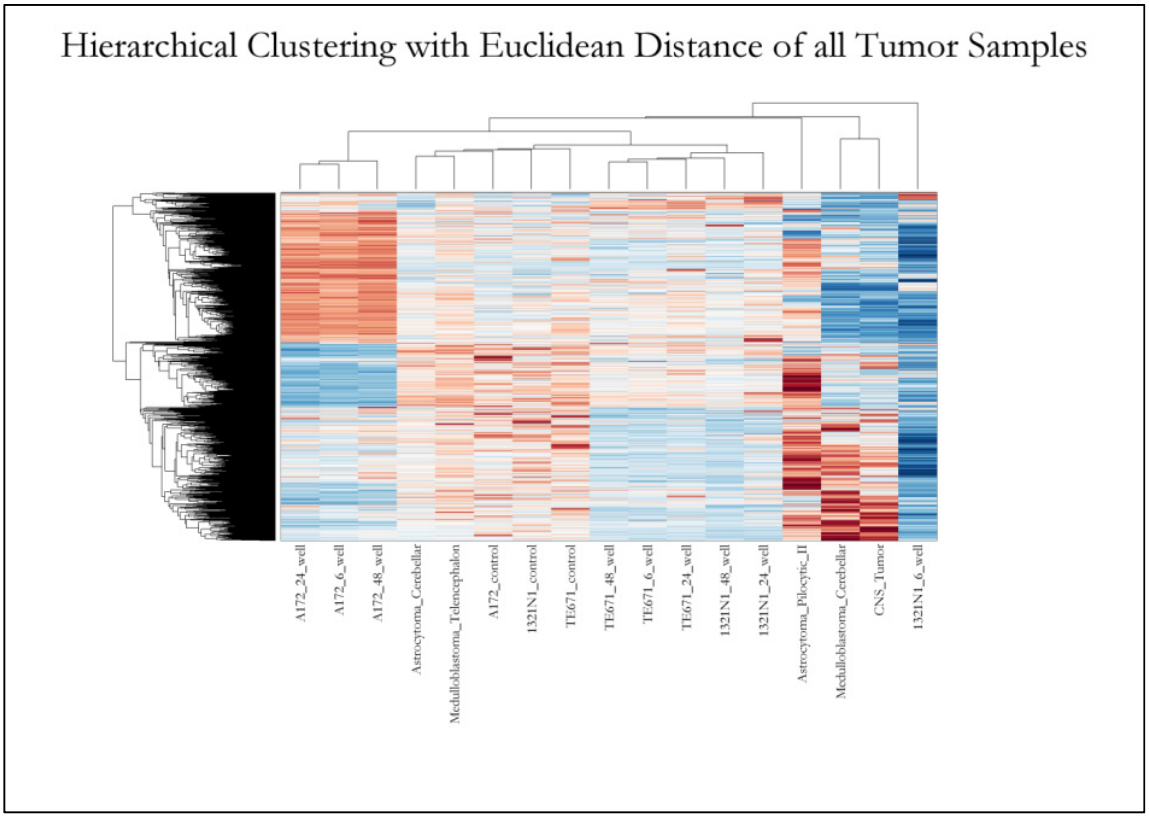
Εικόνα 245. Διαγραμματική παρουσίαση των προσομοιώσεων του μοντέλου των συζευγμένων σηματοδοτικών οδών που περιγράψαμε στην **Εικόνα 244**. Η προσομοίωση έδειξε ότι η συσχέτιση μεταξύ των γονιδίων JAK1/STAT1 παρουσίασε μη-γραμμική δυναμική και μάλιστα ασυμπτωτικά ταλαντωτική (**C**). Παρόμοιο φαινόμενο είχαμε με τα γονίδια PIAS2 και STAT1 (**D**), PIAS2 και JAK1 (**E**) και τέλος CDK4 και JAK1 (**F**).



Εικόνα 245 (Συνέχεια). Μελετώντας το αθροιστικό αποτέλεσμα των γονιδίων που προαναφέραμε συναρτήσει του χρόνου παρατηρούμε πολύ ενδιαφέρουσες δυναμικές στα αθροίσματα JAK1/STAT1 (**G**), στα αθροίσματα STAT1/STAT1 dimer/PIAS2 (**H**), στα αθροίσματα JAK1/PIAS2 (**I**) και στα αθροίσματα CDK4/JAK1 (**J**).

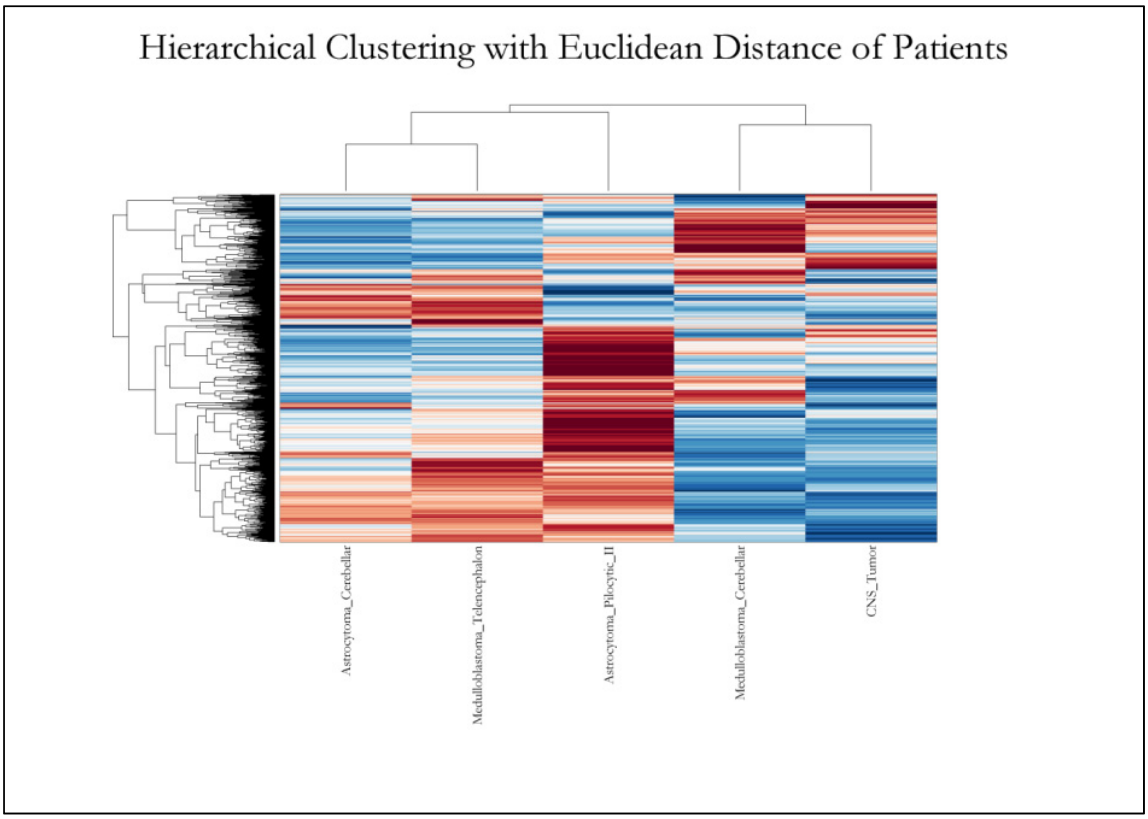
Τα πειράματα αυτά αποτέλεσαν την απαρχή μιας σειράς πειραμάτων με στόχο την ταυτοποίηση κοινών στόχων σε διαφορετικές νεοπλασίες. Ως φυσικό επακόλουθο θα ήταν να μελετήσουμε τη γονιδιακή έκφραση με βάση το πολλαπλασιαστικό μοντέλο που παρουσιάσαμε στις προηγούμενες ενότητες. Για να μελετηθεί το φαινόμενο αυτό ακολουθήσαμε το μοντέλο που VV/VIN, όπου κύτταρα λίγο πριν τον κορεσμό συλέγονταν και γινόταν κατεργασία τους για εκχύληση RNA και περαιτέρω μελέτη με μικροσυστοιχίες. Μελετήθηκαν τέσσερα στάδια πολλαπλασιασμού. Το πρώτο αφορούσε σε κύτταρα που συλλέχθηκαν στο τέλος της ανάπτυξης σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 48 θέσεων, το δεύτερο αφορούσε σε κύτταρα από πλάκα μικροτιτλοποίησης 24 θέσεων, το τρίτο αφορούσε σε κύτταρα που συλλέχθηκαν από πλάκα μικροτιτλοποίησης 6 θέσεων και τέλος από φλάσκα 75 cm^2 που αποτελεί και το τελευταίο στάδιο ανάπτυξης μιας και προσομοιάζει την αντίστοιχη κατάσταση *in vivo*, όπου έχουμε πλέον έναν αρκετά μεγάλο αριθμό κυττάρων ώστε είναι δυνατή και η διάγνωση. Το πρώτο βήμα στην ανάλυση των δεδομένων αποτελεί η παράθεση της

ιεραρχικής ταξινόμησης των δεδομένων. Στην Error! Reference source not found., παρουσιάζεται η ιεραρχική ταξινόμηση όλων των δειγμάτων που αναλύθηκαν.



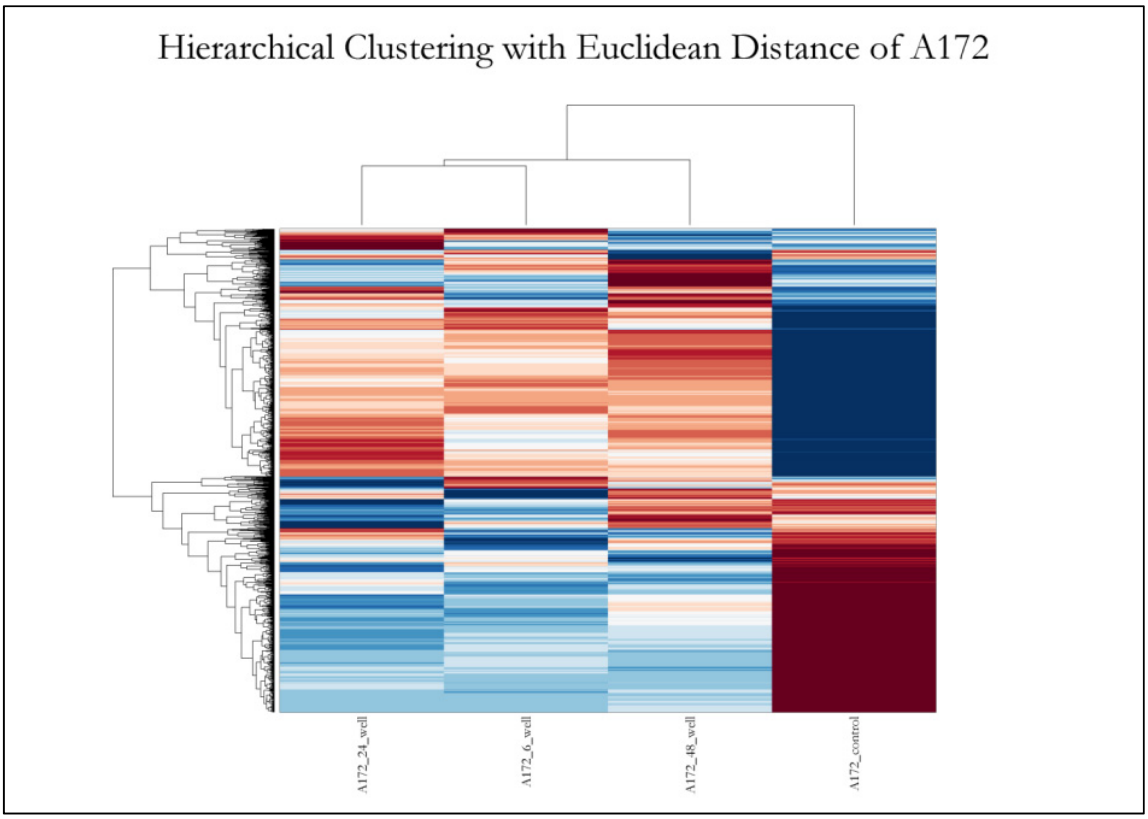
Εικόνα 246. Ιεραρχική ταξινόμηση (Hierarchical Clustering) όλων των δειγμάτων με Ευκλείδια απόσταση.

Παρόμοια παρουσιάζεται η ιεραρχική ταξινόμηση των δειγμάτων βιοψιών ασθενών διαφορετικών νεοπλασιών του ΚΝΣ. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στην Error! Reference source not found..



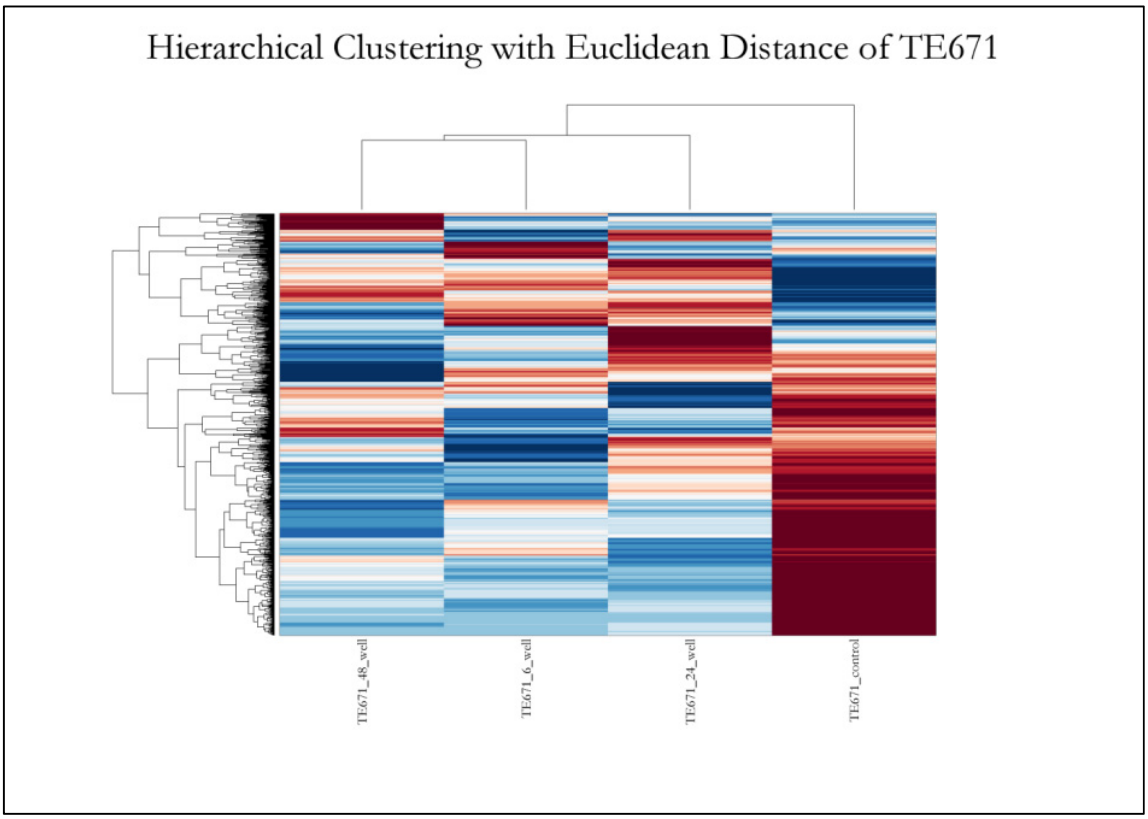
Εικόνα 247. Ιεραρχική ταξινόμηση (Hierarchical Clustering) των δειγμάτων *ex vivo* με Ευκλείδια απόσταση.

Η σημαντικότερη βέβαια προσέγγιση αφορά στη μελέτη του πολλαπλασιαστικού μοντέλου. Στην Error! Reference source not found., παρουσιάζεται η ιεραρχική ταξινόμηση των διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων στα κύτταρα A172 κατά τον πολλαπλασιασμό.

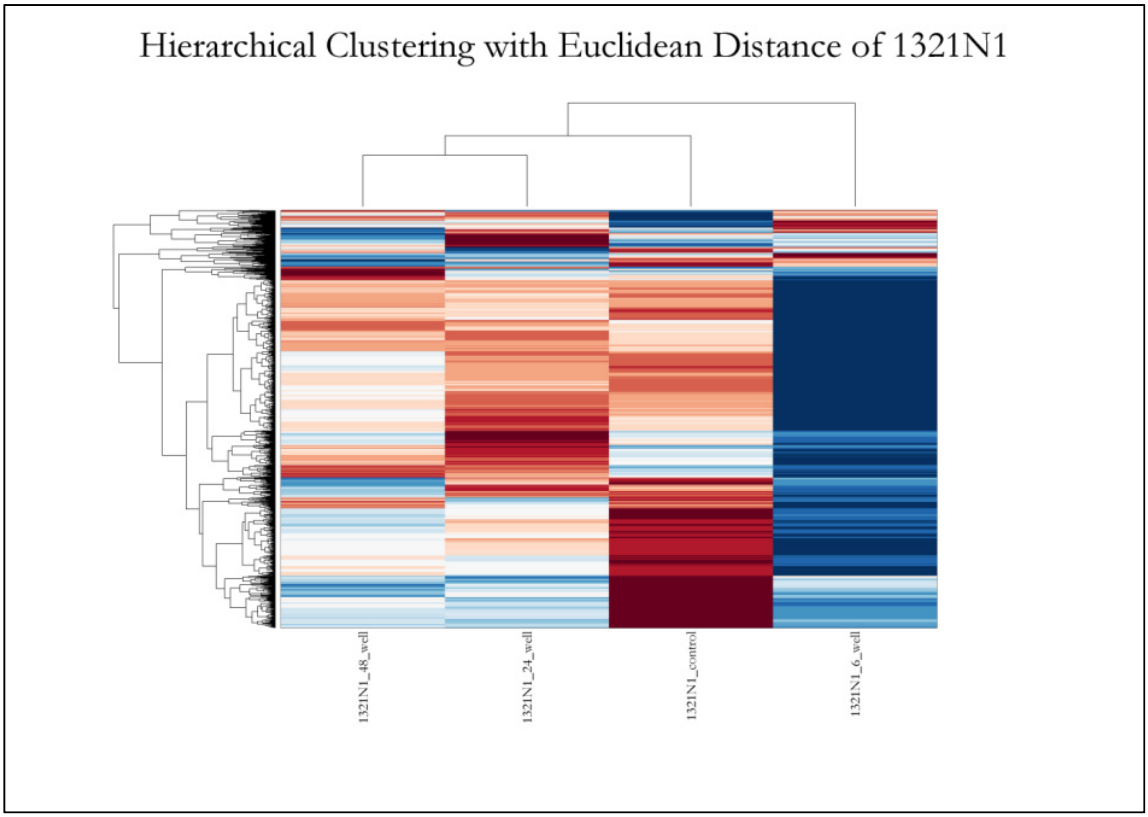


Εικόνα 248. Ιεραρχική ταξινόμηση (Hierarchical Clustering) των δειγμάτων του πολλαπλασιαστικού μοντέλου για τα κύτταρα A172 με Ευκλείδια απόσταση.

Αντίστοιχα στις παρακάτω εικόνες (Error! Reference source not found. και Error! Reference source not found.) παρουσιάζονται τα ανάλογα αποτελέσματα για τα κύτταρα TE671 και 1321N1.



Εικόνα 249. Ιεραρχική ταξινόμηση (Hierarchical Clustering) των δειγμάτων του πολλαπλασιαστικού μοντέλου για τα κύτταρα TE671 με Ευκλείδια απόσταση.

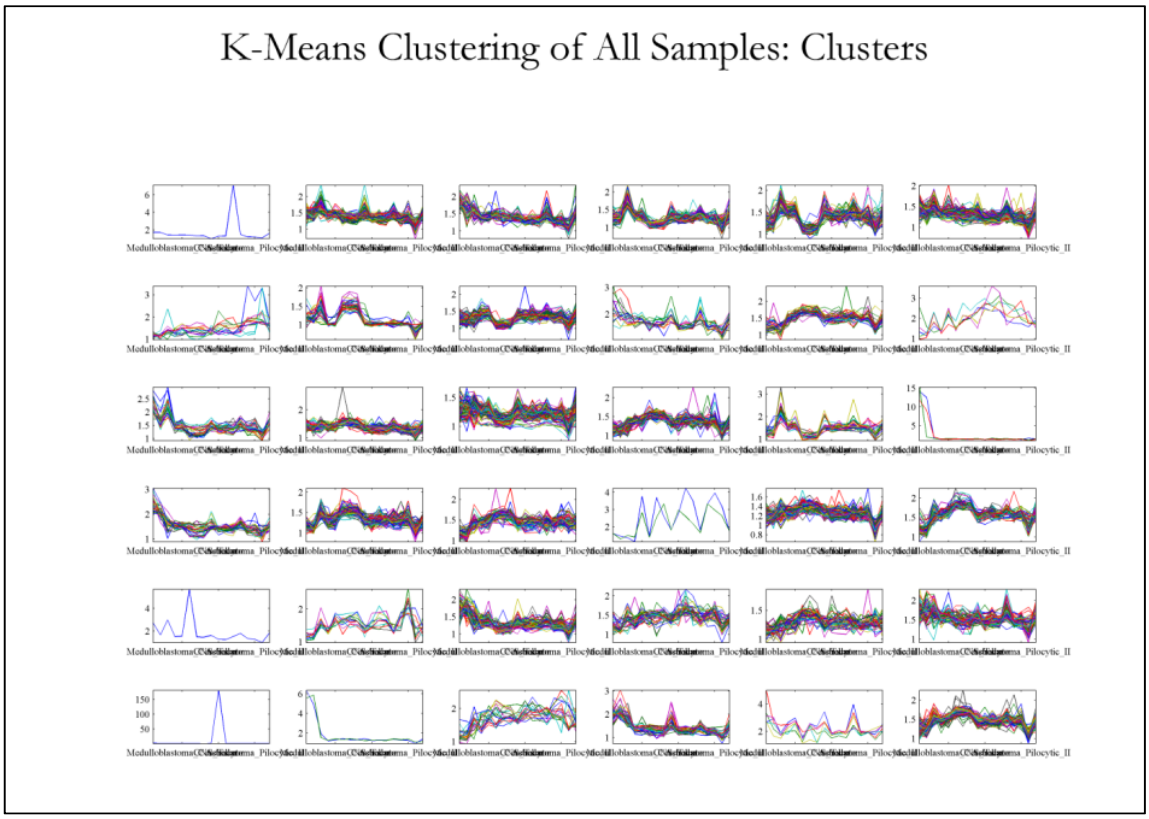


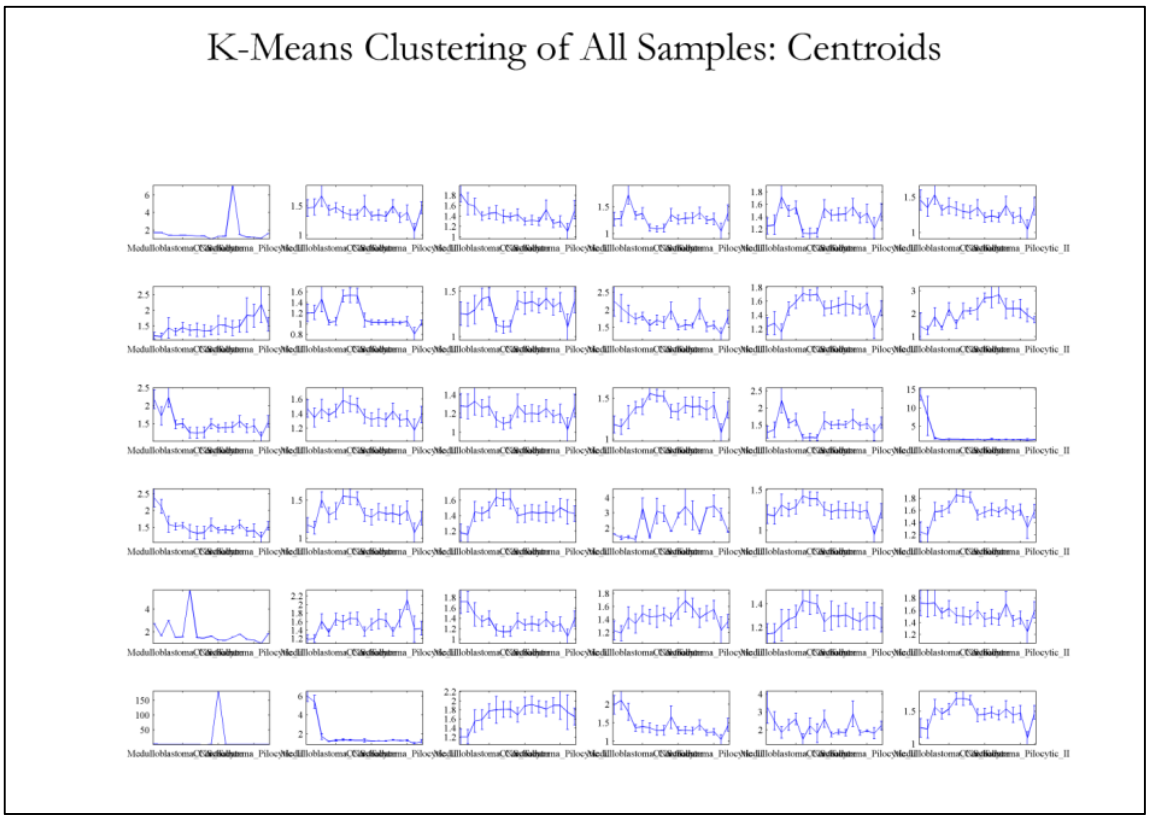
Εικόνα 250. Ιεραρχική ταξινόμηση (Hierarchical Clustering) των δειγμάτων του πολλαπλασιαστικού μοντέλου για τα κύτταρα 1321N1 με Ευκλείδια απόσταση.

Η ιεραρχική ταξινόμηση έδωσε την πληροφορία της γονιδιακής ταξινόμησης ανάμεσα στις πειραματικές διατάξεις. Αυτό που παρατηρούμε είναι ότι στις περιπτώσεις των μοντέλων πολλαπλασιασμού η ταξινόμηση δεν πέτυχε την αναπαράσταση των πειραμάτων με τη χρονική και χωρική σειρά που έγιναν. Αυτό υποδηλώνει πιθανών ότι υπάρχει μια ανακατομή της γονιδιακής έκφρασης που δεν μεταβάλλεται ανάλογα με τη χωρο-χρονική αλλαγή των κυττάρων.

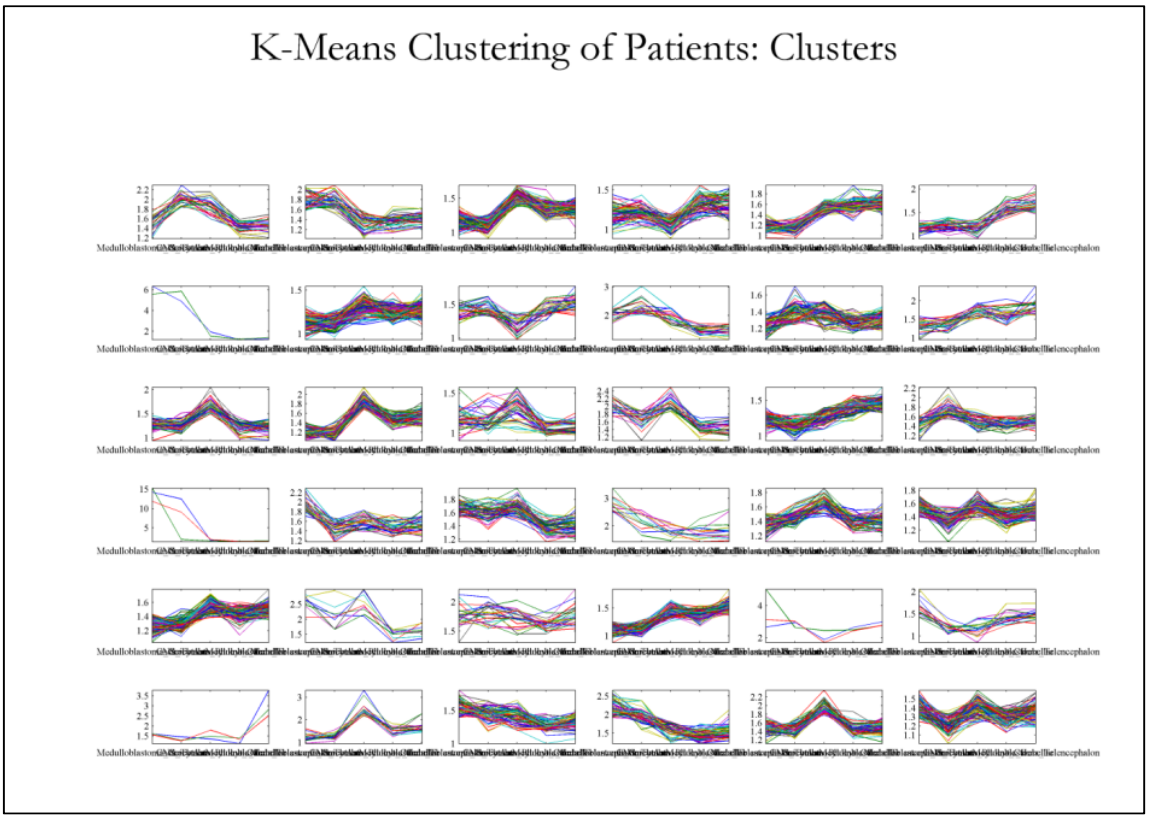
Για να διερευνήσουμε περαιτέρω τη γονιδιακή ρύθμιση αναλύσαμε τα πειραματικά δεδομένα με τον αλγόριθμο k-means (*k-means clustering*).

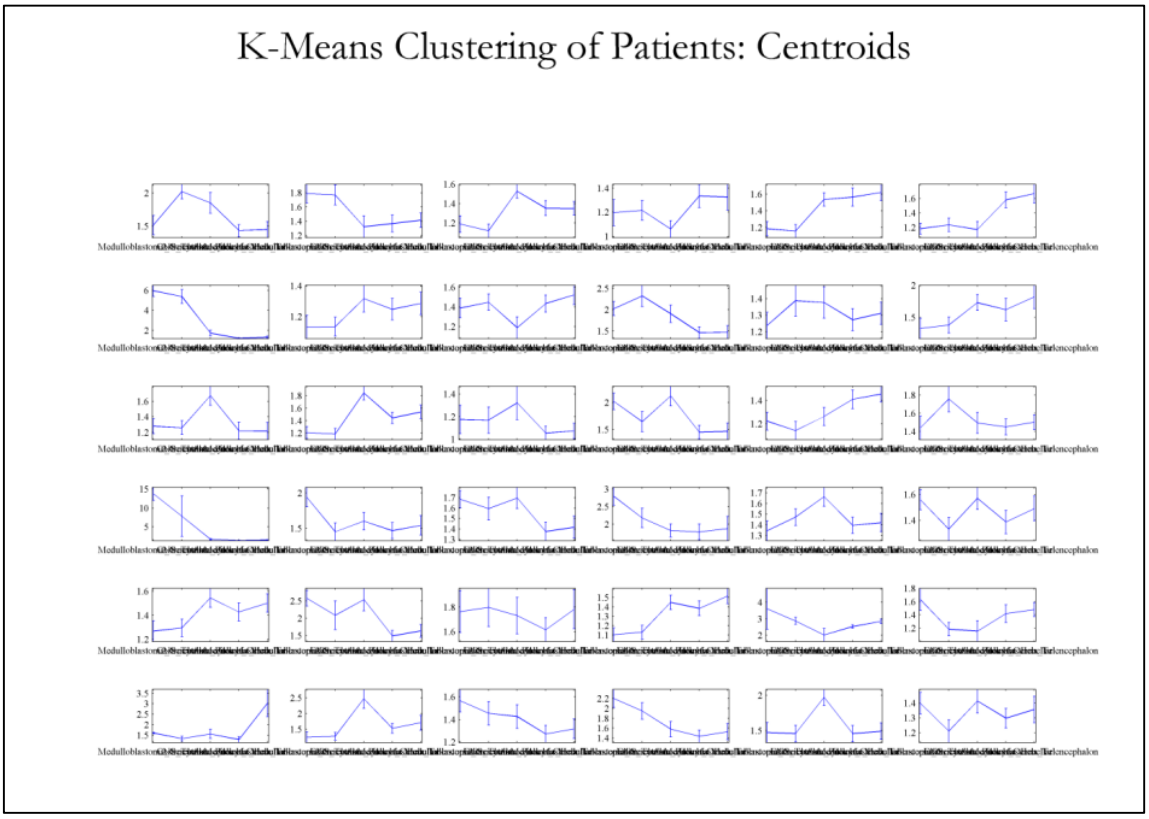
Στην Error! Reference source not found. παρουσιάζεται το αποτέλεσμα του αλγόριθμου για όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν. Στην Error! Reference source not found., παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του αλγόριθμου για τα δείγματα βιοψιών νεοπλασιών του ΚΝΣ.





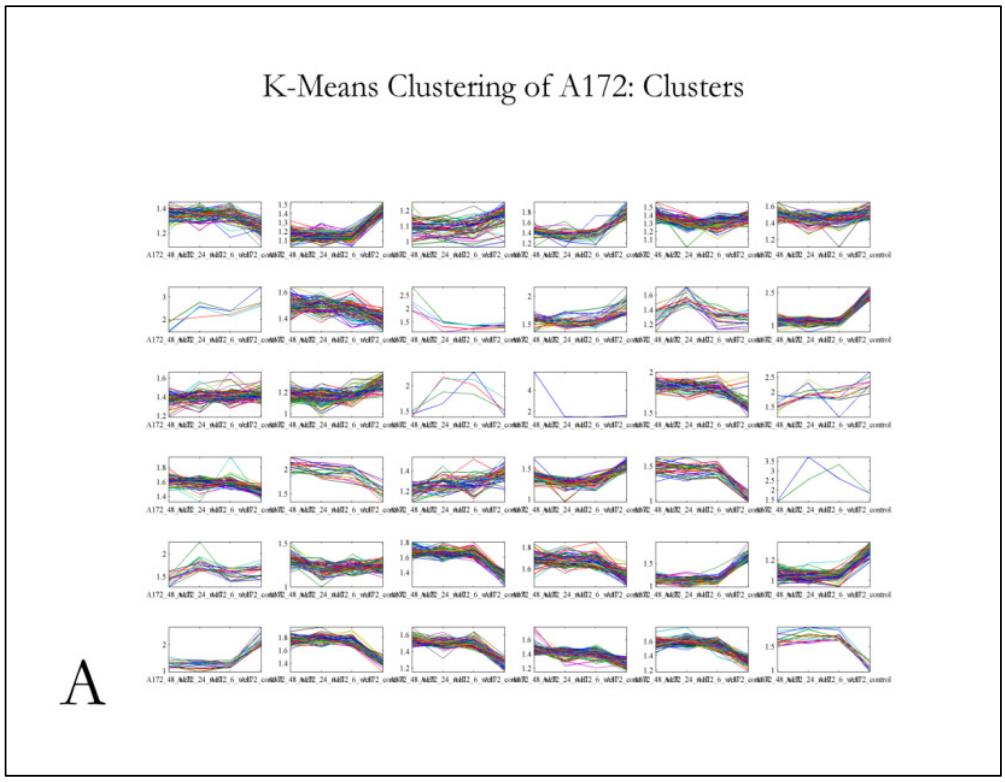
Εικόνα 251. K-means ιεράρχηση των γονιδίων σε όλα τα υπό εξέταση δείγματα.



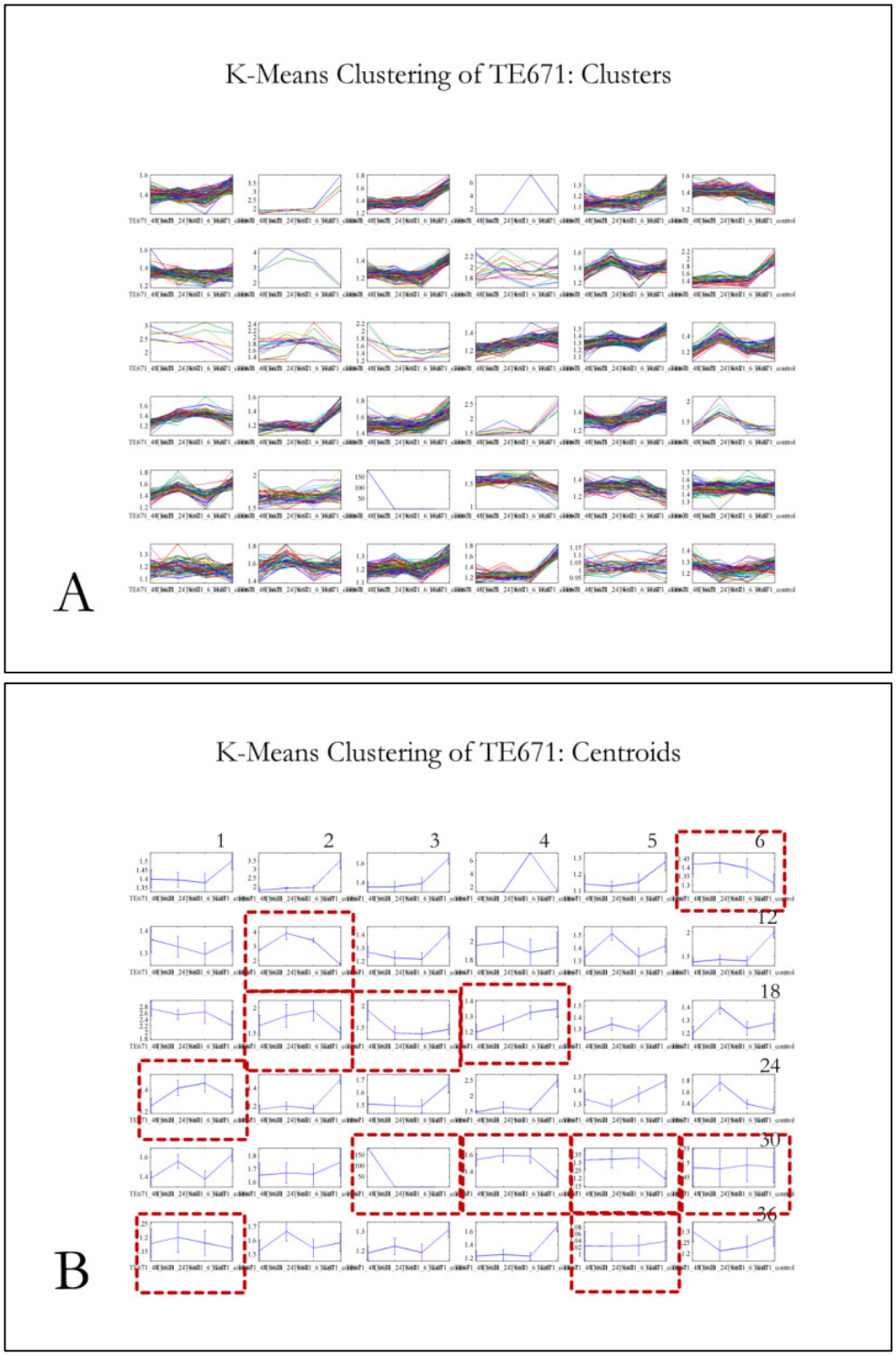


Εικόνα 252. K-means ιεράρχηση των γονιδίων σε δείγματα ασθενών.

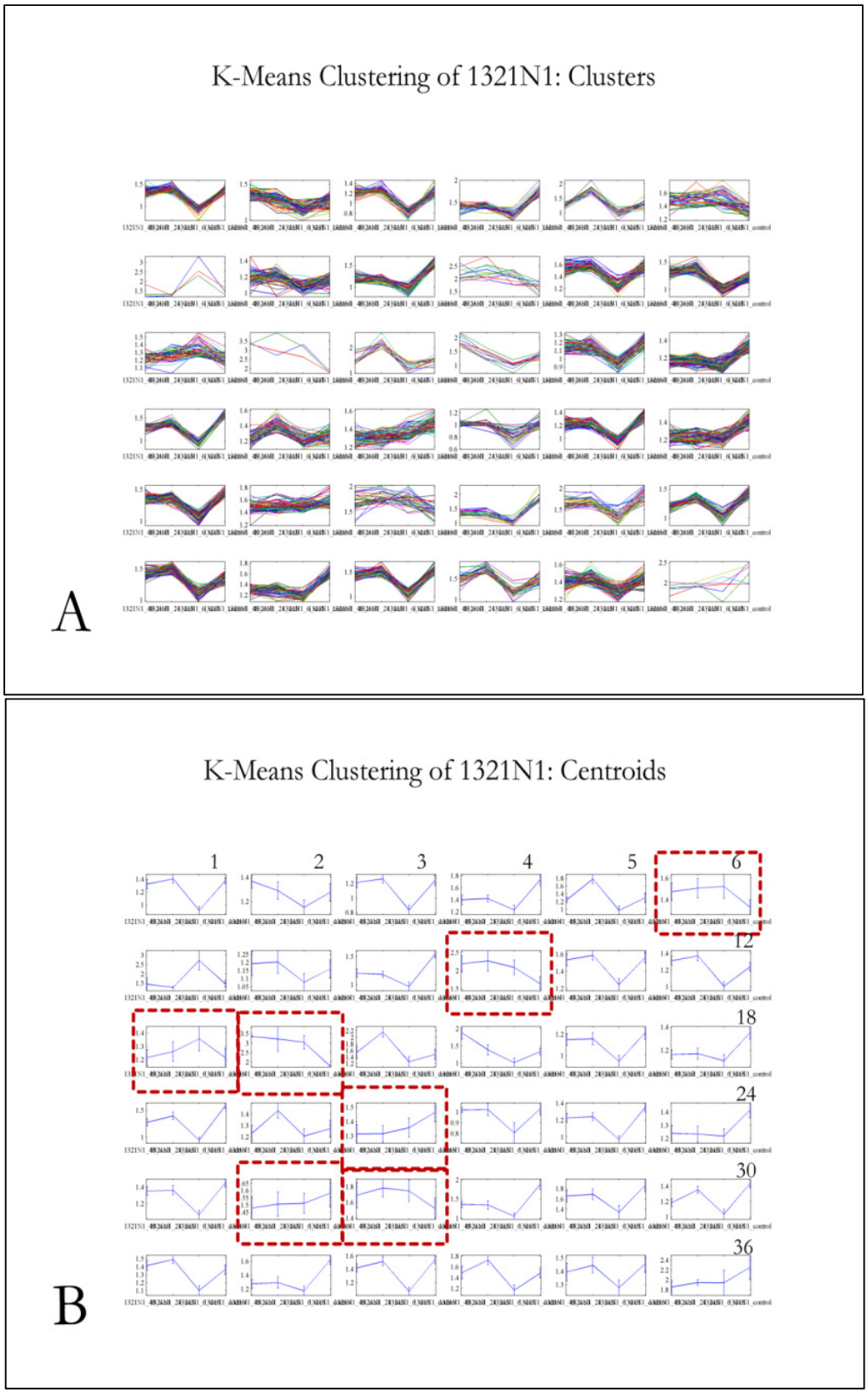
Ιδιαίτερη σημασία δόθηκε στην ανάλυση των δεδομένων των *in vitro* πειραματικών διατάξεων. Η γονιδιακή ταξινόμηση έδωσε αρκετά ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Θα μπορούσαμε να διαχωρίσουμε τα αποτελέσματα αυτά σε τρεις βασικές κατηγορίες. Η πρώτη αφορά γονίδια των οποίων η έκφραση βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα κατά τα πρώτα στάδια του πολλαπλασιασμού και αυξάνεται στο τελευταίο στάδιο (π.χ. συστάδες 2 και 4 Error! Reference source not found.). Τα γονίδια αυτά θα μπορούσαμε να τα παρομοιάσουμε με μόρια κλειδιά κατά την *in vivo* συνθήκη, τα οποία χρησιμοποιούνται σε διάφορους τύπους νεοπλασιών ως διαγνωστικοί παράγοντες. Αυτά τα μόρια όμως δεν αποτελούν ενδιαφέρον αντικείμενο μιας και η ταυτοποίησή τους ουσιαστικά έρχεται σε πολύ καθυστερημένο χρόνο για την πορεία της νόσου και του ασθενούς. Αντίστοιχα η δεύτερη ομάδα γονιδίων που παρατηρούμε αφορά σε γονίδια που αυξάνονται κατά τα ενδιάμεσα στάδια του πολλαπλασιασμού. Αυτά τα γονίδια, σε μια *in vivo* κατάσταση θα αφορούσαν τα μόρια που ενεργοποιούνται κατά τα ενδιάμεσα στάδια της ανάπτυξης και αποτελούν ενδιαφέροντα μόρια για την πρόβλεψη στόχων (π.χ. συστάδες 15 και 24 Error! Reference source not found.). Τέλος, η Τρίτη ομάδα που έχει ενδιαφέρον αφορά σε μόρια που βρίσκονται σε αυξημένα επίπεδα κατά τα αρχικά στάδια του πολλαπλασιασμού και μειώνονται σημαντικά στο τελευταίο στάδιο του πολλαπλασιαστικού μοντέλου. Τα μόρια αυτά είναι αυτά που ενδεχομένως δεν μπορεί να σημερινή διάγνωση να προσλάβει. Είναι δηλαδή μόρια που ενώ είναι εξαιρετικά σημαντικά για την πορεία της νόσου, δεν λαμβάνονται υπόψη λόγω του ότι δεν χρησιμοποιούνται από το νεόπλασμα για τη λειτουργία του ή τουλάχιστον δεν χρησιμοποιούνται σε τέτοιο βαθμό ώστε να είναι ταυτοποιήσιμα (π.χ. συστάδες 17 και 32-36 Error! Reference source not found.). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης του πολλαπλασιαστικού μοντέλου ως προς τη γονιδιακή έκφραση για τα κύτταρα A172 παρουσιάζεται στην Εικόνα 253. Παρόμοια ανάλυση ακολούθησε και για τους άλλους κυτταρικούς τύπους που μελετήθηκαν και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Error! Reference source not found. για τα κύτταρα TE671 και στην Error! Reference source not found. για τα κύτταρα 1321N1.



Εικόνα 253. K-means ιεράρχηση των γονιδίων του μοντέλου πολλαπλασιασμού των κυττάρων A172. Σε *κόκκινο* περίγραμμα βρίσκονται τα γονίδια που χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω ανάλυση.

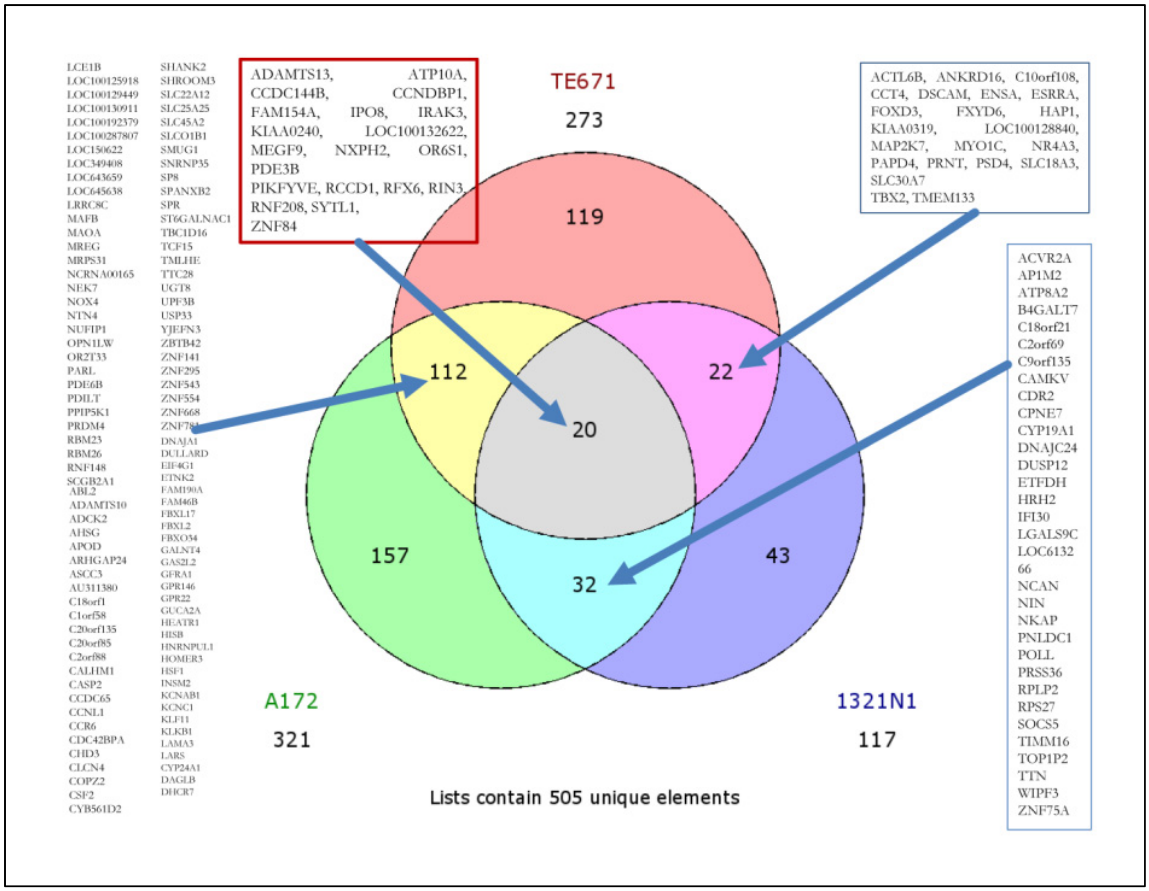


Εικόνα 254. K-means ιεράρχηση των γονιδίων του μοντέλου πολλαπλασιασμού των κυττάρων TE671. Σε κόκκινο περίγραμμα βρίσκονται τα γονίδια που χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω ανάλυση.



Εικόνα 255. K-means ιεράρχηση των γονιδίων του μοντέλου πολλαπλασιασμού των κυττάρων 1321N1. Σε κόκκινο περίγραμμα βρίσκονται τα γονίδια που χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω ανάλυση.

Έχοντας ορίσει το γονιδιακό προφίλ που εξετάζουμε μπορούμε με βάση αυτό να διερευνήσουμε τα κοινά γονίδια που χρησιμοποιούνται από τους κυτταρικούς τύπους και εφόσον αυτά φυσικά υπάρχουν. Η ανάλυση παρουσιάζεται στην Error! Reference source not found., όπου παρουσιάζουμε το διάγραμμα Venn, που αφορά στην ένωση των γονιδίων των επιμέρους πειραματικών διατάξεων για τη χωρο-χρονική μεταβολή τους.



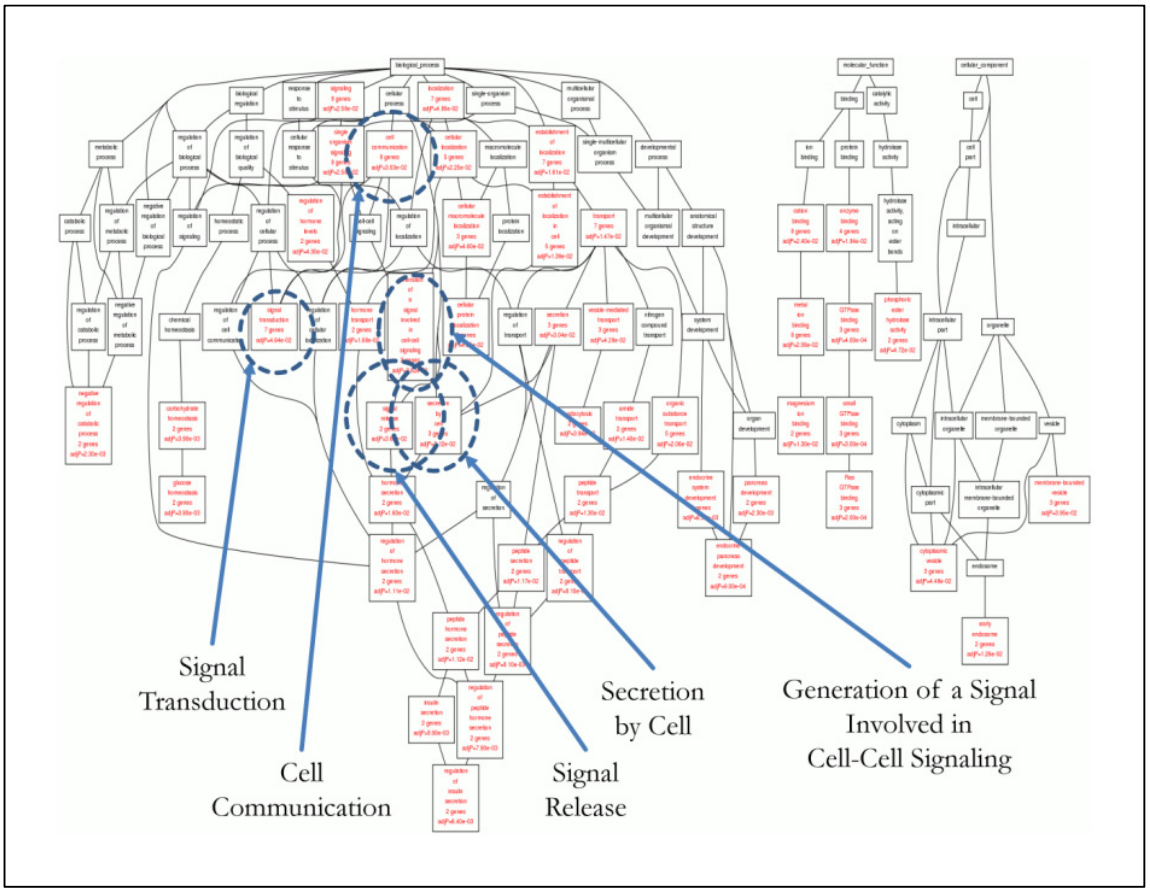
Εικόνα 256. Διάγραμμα Venn των γονιδίων που προέκυψαν από την ανάλυση του κοινού προφίλ των πολλαπλασιαστικών μοντέλων. Η ένωση των τριών κυτταρικών τύπων έδωσε 20 γονίδια από κοινού εκφραζόμενα (ένθετο με κόκκινο περίγραμμα) με τον τρόπο μεταβολής της γονιδιακής έκφρασης όπως περιγράφεται στο κείμενο. Δηλαδή, τα γονίδια αυτά αφορούν σε αυξημένα επίπεδα κατά τα πρώτα στάδια του πολλαπλασιασμού και μετάπειτα μείωση και/ή κορύφωση στα ενδιάμεσα στάδια του πολλαπλασιαστικού μοντέλου.

Η ανάλυση αυτή έδωσε 20 κοινά γονίδια που χρησιμοποιούνται κατά τον ίδιο τρόπο από τα κύτταρα κατά τα στάδια του πολλαπλασιασμού. Τα γονίδια αυτά ήταν τα ADAMTS13, ATP10A, CCDC144B, CCNDBP1, FAM154A, IPO8, IRAK3, KIAA0240, LOC100132622, MEGF9, NXPH2, OR6S1, PDE3B, PIKFYVE, RCCD1, RFX6, RIN3, RNF208, SYTL1 και ZNF84. Το γονίδιο ADAMTS13 (ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 13) είναι μέλος της οικογένειας των γονιδίων ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with

thrombospondin motif). Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για ένα ένζυμο που ονομάζεται *von Willebrand Factor* (vWF)-*cleaving protease*, το οποίο είναι υπεύθυνο για την πρωτεόλυση των αμινοξέων Tyr842-Met843 του μορίου *vWF*. Το γονίδιο ATP10A (ATPase, class V, type 10A) κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των *P-type cation transport ATPases* και στην υπο-οικογένεια των *aminophospholipid-transporting ATPases*. Το γονίδιο CCDC144B (coiled-coil domain containing 144B (pseudogene)) είναι ένα από τα άγνωστα γονίδια για τα οποία δεν έχει ταυτοποιηθεί κάποια λειτουργία. Το γονίδιο CCNDBP1 (cyclin D-type binding-protein 1) ανακαλύφθηκε από την αλληλεπίδρασή του με το την πρωτεΐνη του γονιδίου GRAP2, που είναι απαραίτητο για τη λειτουργία της ανοσοποιητικής αντίδρασης και μετάδοσης σήματος. Επίσης το γονίδιο CCNDBP1 αλληλεπιδρά με τη *cyclin D*. Η πρωτεΐνη του γονιδίου αυτού συνδέεται με το μόριο *helix-loop-helix protein E12* και είναι γνωστό ότι λειτουργεί ως ανασταλτικός παράγων στη γονιδιακή έκφραση του ήπατος. Το γονίδιο FAM154A (family with sequence similarity 154, member A) αποτελεί επίσης έναν άγνωστο μέχρι σήμερα παράγοντα. Το γονίδιο IPO8 (importin 8) Το σύμπλεγμα *importin-alpha/beta* και το μόριο *GTPase Ran* σημμετέχουν στην εισαγωγή πρωτεϊνών στον πυρήνα του κυττάρου. Το γονίδιο IPO8 κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη η οποία προσδένεται στους πόρους της κυτταρικής μεμβράνης μαζί με τις πρωτεΐνες RanGTP και RANBP1, αναστέλλουν την επαγωγή του μορίου GAP του συμπλόκου Ran GTPase. Το γονίδιο IRAK3 (interleukin-1 receptor-associated kinase 3) κωδικοποιεί μέλος της οικογένειας *interleukin-1 receptor-associated kinase protein family*. Τα μόρια αυτά είναι απαρίατητα στη σηματοδότηση της οδού Toll/IL-R. Το μόριο αυτό λειτουργεί ως βασικός αναστολέας της οδού *Toll-like receptor*. Το γονίδιο KIAA0240 (GLTSCR1-like) αποτελεί έναν άγνωστο παράγοντα αναφορικά με τη λειτουργία του. Το γονίδιο LOC100132622 (hypothetical LOC100132622) αφορά σε μια αλληλουχία νουκλεοτιδίων η οποία δεν έχει ακόμα ταυτοποιηθεί για τη λειτουργία της. Το γονίδιο MEGF9 (multiple EGF-like-domains 9) αποτελεί ένα ελάχιστα μελετημένο μόριο. Είναι πάντως γνωστό ότι εκφράζεται κυρίως στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα και δεν είναι γνωστές περαιτέρω λειτουργίες του. Έχει όμως ενδιαφέρον το γενονός ότι αποτελείται από πολλαπλά μέρη που προσομοιάζουν τον παράγοντα EGF και επίσης αποτελεί μια διαμεμβρανική προωτεΐνη, κάτι που παραπέμπει στη διακυτταρική επικοινωνία. Το γονίδιο NXPH2 (neurexophilin 2) κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη, η οποία είναι μια νευρωνική γλυκοπρωτεΐνη της οποίας ο ρόλος έχει ταυτοποιηθεί ως προ-συναπτικό μόριο στις νευρωνικές συνάψεις. Το γονίδιο OR6S1 (olfactory receptor, family 6, subfamily S, member 1) κωδικοποιεί έναν υποδοχέα, ο οποίος ενεργοποιείται από πτητικά μόρια. Έχει βρεθεί ότι οι υποδοχείς αυτοί ξεκινούν το νευρικό ερέθισμα από τη μύτη και συμμετέχουν στην οδό σηματοδότησης προς τον εγκέφαλο. Τα μόρια αυτά είναι μέλη της υπερ-οικογένειας *G-protein-coupled receptors* (GPCR). Αποτελούν διαμεμβρανικούς υποδοχείς και η δομή τους προσομοιάζει αυτή των υποδοχέων των νευροδιαβιβαστών και ορμονών. Το γονίδιο PDE3B (phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited)

κωδικοποιεί για ένα μόριο ομοιοστασίας του ενεργειακού ισοζυγίου. Το γονίδιο PIKFYVE (phosphoinositide kinase, FYVE finger containing) κωδικοποιεί για ένα μόριο, το οποίο ρυθμίζει τις κυτταροσκελετικές λειτουργίες, μετάδοση σήματος μέσω υποδοχέων και κυτταρικές και ενδοπλασματικές μεμβράνες. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για ένα ένζυμο (PIKfyve: phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase type III or PIPKIII), το οποίο φωσφορυλιώνει τη θέση D-5 της οικογένειας των πρωτεϊνών PtdIns και phosphatidylinositol-3-phosphate (PtdIns3P) προς δημιουργία των μορίων PtdIns5P και PtdIns(3,5)biphosphate. Το γονίδιο RCCD1 (RCC1 domain containing 1) αποτελεί μια πολύ ενδιαφέρουσα περίπτωση μιας και αποτελεί παράγοντα που συμμετέχει στο σύστημα Πρωτεασώματος-Ουβικουιτηνίωσης (Ubiquitinin-Proteasome System UPS). Ενδεχομένως το μόριο αυτό, χρησιμοποιούμενο από όλους τους κυτταρικούς τύπους να αποτελεί ένα σημαντικό στόχο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Δεδομένο ότι τα κύτταρα που μελετήθηκαν παρουσίασαν όλα ευαισθησία στην αναστολή του πρωτεασώματος το μόριο αυτό αποτελεί ένα σημαντικό μόριο-στόχο για περαιτέρω μελέτη. Το γονίδιο RFX6 (regulatory factor X, 6) κωδικοποιεί μια πυρηνική πρωτεΐνη που είναι μέλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων *regulatory factor X* (RFX). Το γονίδιο RIN3 (Ras and Rab interactor 3) παρουσιάζει μια ιδιαίτερη ενδοκυτταρική εναπόθεση. Έχει βρεθεί ότι εκφράζεται στα κύτταρα HeLa και βρίσκεται σε κυτταροπλασματικά θηλάκια (*RIN3-positive vesicles*). Ο ρόλος της πρωτεΐνης RIN3 φαίνεται ότι είναι σημαντικός στην ενεργοποίηση και σταθεροποίηση του συμπλέγματος GTP-Rab5 διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στη μεταφορά μορίων από την κυτταρική μεμβράνη προς τα πρώιμα ενδοσωμάτια. Το γονίδιο RNF208 (ring finger protein 208) δεν έχει ταυτοποιηθεί για συγκεκριμένες λειτουργίες. Το γονίδιο SYTL1 (synaptotagmin-like 1) έχει δειχθεί ότι συμμετέχει σε λειτουργίες της αιμόστασης και ρύθμισης των αιμοπεταλίων αφού συνδέεται με τν πρωτεΐνη Rap1GAP2, που είναι παράγοντας της αιμόστασης. Το γονίδιο ZNF84 (zinc finger protein 84) ανήκει στην οικογένεια των zinc finger οι οποίες είναι οι πιο πολυπληθέστερες πρωτεΐνες στο ευκαρυωτικό γένωμα. Οι λειτουργίες των πρωτεϊνών αυτών είναι πολυπληθείς και περιλαμβάνουν την αναγνώριση DNA αλληλουχιών, RNA packaging, μεταγραφική ενεργοποίηση, ρύθμιση της απόπτωσης, αναδίπλωση πρωτεϊνών και πρόσδεση λιπιδίων.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει πλέον να ταξινομήσουμε τα γονίδια αυτά με βάση τη λειτουργία τους και ως εκ τούτου να δούμε ποιους μηχανισμούς χρησιμοποιούν τα κύτταρα από κοινού. Στην Error! Reference source not found. παρουσιάζουμε το αποτέλεσμα της ανάλυσης οντολογίας (Gene Ontology GO).



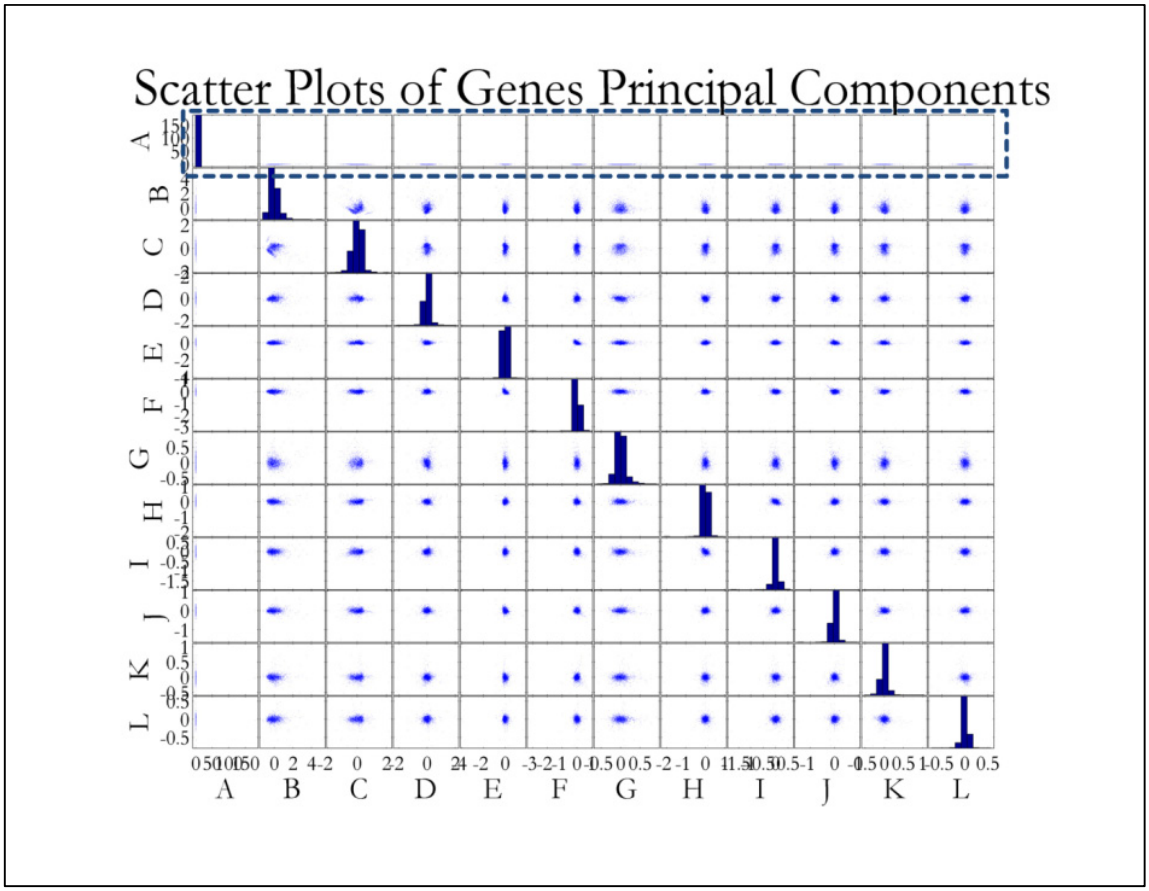
Εικόνα 257. Ανάλυση των λειτουργιών των κοινών γονιδίων κατά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων *in vitro*, με τη χρήση οντολογιών (GO).

Όπως φαίνεται από το παραπάνω αποτέλεσμα τα κοινά γονίδια συμμετέχουν στις εξής λειτουργίες: Μετάδοση σήματος (signal transduction), όπου συμμετέχουν τα γονίδια ADAMTS13, PIKFYVE, NXPH2, PDE3B, IPO8, IRAK3 και RIN3, κυτταρική επικοινωνία (cell communication), όπου συμμετέχουν τα γονίδια ADAMTS13, NXPH2, IPO8, RFX6, IRAK3, RIN3, PIKFYVE και PDE3B, παραγωγή σήματος (signal release), όπου συμμετέχουν τα γονίδια PDE3B και RFX6, κυτταρική έκκριση (secretion by cell), όπου συμμετέχουν τα γονίδια SYTL1, PDE3B και RFX6, προαγωγή σήματος στην διακυτταρική επικοινωνία (generation of a signal involved in cell-cell signaling), όπου συμμετέχουν τα γονίδια PDE3B και RFX6.

Εξετάσαμε και αναλύσαμε τα δεδομένα περαιτέρω με τον αλγόριθμο PCA (Principal Component Analysis) προς αναζήτηση σημαντικών γονιδίων, που δεν κατέστει δυνατό να φανούν με τις προηγούμενες μεθοδολογίες.

Να θυμήσουμε ότι ο αλγόριθμος αυτός αποτελεί ένα μετασχηματισμό, όπου λαμβάνει χώρα ο μετασχηματισμός του ορθογώνιου πίνακα των δεδομένων της έκφρασης των γονιδίων. Ο

μετασχηματισμός αυτός υπολογίζει τελικά τον ιδιοπίνακα και ιδιοδιάνυσμα των αρχικών πινάκων των γονιδιακών εκφράσεων. Αναπαραστίσαμε τα δεδομένα αυτά σε ένα πολυδιάστατο διάγραμμα, όπου παρουσιάζονται οι συσχετίσεις όλων των principal components, σε όλους τους συνδυασμούς. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στην Error! Reference source not found..



Εικόνα 258. PCA ανάλυση των γονιδιακών εκφράσεων. Το διακεκομένο περίγραμμα δείχνει μια ομάδα γονιδίων, τα οποία δείχνουν γραμμική απόλυτα συσχέτιση μεταξύ των principal components (PCs) με απομονωμένα γονίδια εξαιρούμενα από αυτή τη σχέση. ***Υπόμνημα αξόνων***. **A**=A172 48-well, **B**=A172 24-well, **C**=A172 6-well, **D**=A172 control (75cm² flask), **E**=TE671 48-well, **F**=TE671 24-well, **G**=TE671 6-well, **H**=TE671 control (75cm² flask), **I**=1321N1 48-well, **J**=1321N1 24-well, **K**=1321N1 6-well, **L**=1321N1 control (75cm² flask).

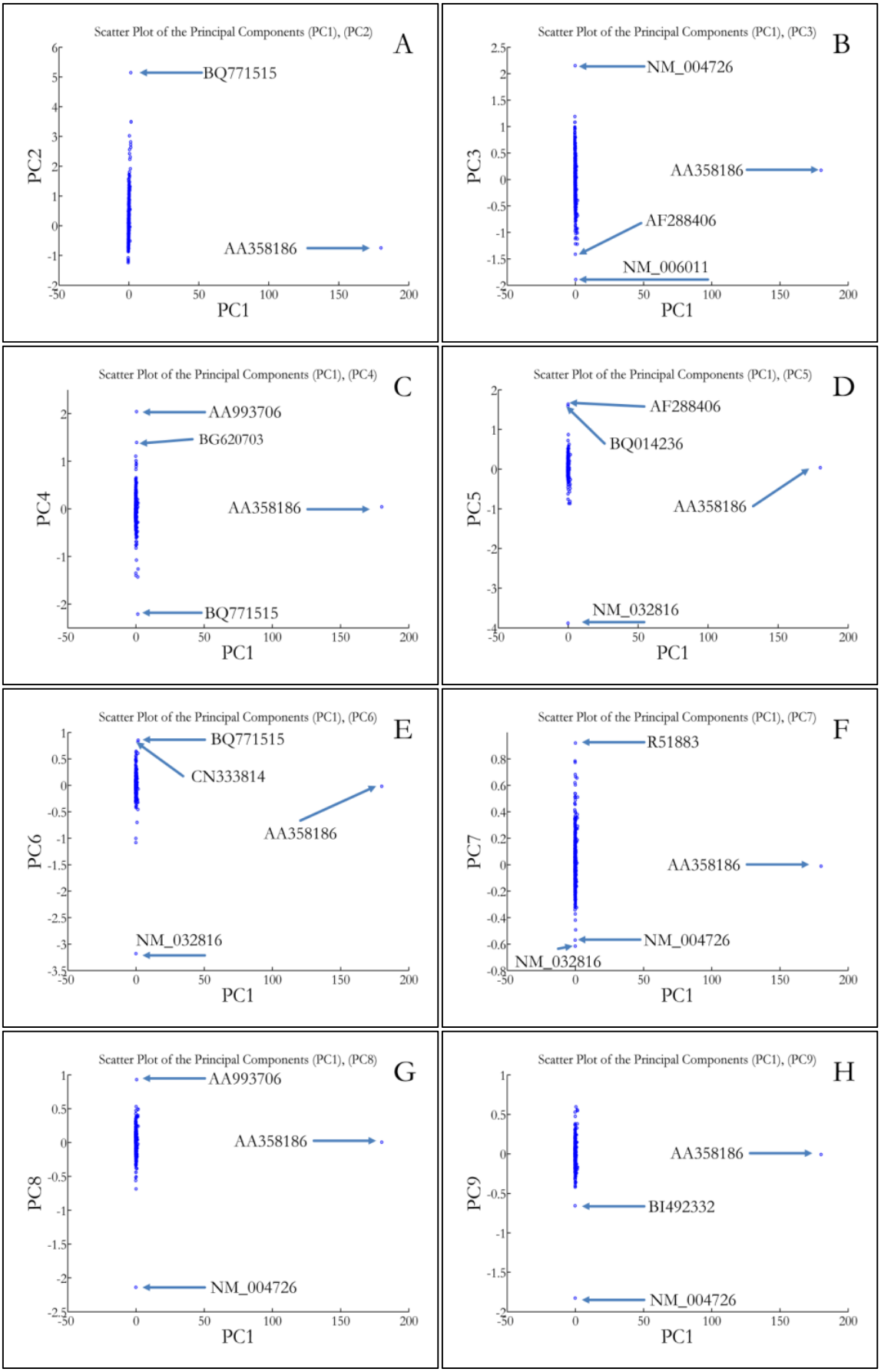
Το ενδιαφέρον στο παραπάνω αποτέλεσμα αποτελεί η εμφάνιση γραμμικών συσχετίσεων μεταξύ του principal component 1 και όλων των υπολοίπων. Οι συσχετίσεις αυτές είχαν κάποιες εξαιρέσεις, τις οποίες θα παρουσιάσουμε στην επόμενη εικόνα, και υποδεικνύουν την ύπαρξη ενός ιδιοδιανύσματος στα δεδομένα αυτά.

Η ανάλυση του αλγόριθμου αυτού έδειξε ένα μετασχηματισμό κατά τον οποίο εμφανισθηκαν γραμμικές συσχετίσεις. Εχει επίσης ενδιαφέρον να παρατηρήσουμε ότι ορισμένα γονίδια αποτέλεσαν την εξαίρεση σττις συσχετίσεις αυτές. Το αποτέλεσμα αυτό ενδεχομένως να υποδεικνύει τη σημασία

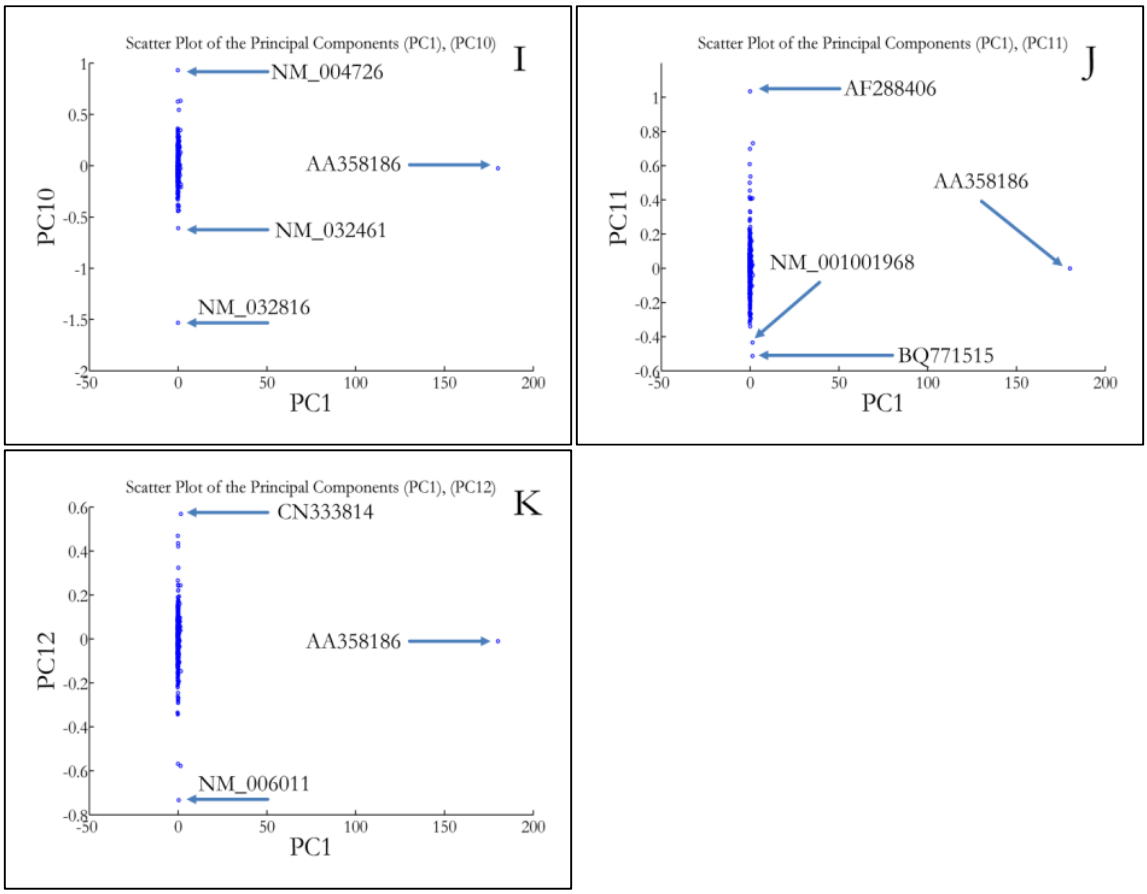
αυτών των γονιδίων μιας και διαφοροποιούνται από την υπόλοιπη γονιδιακή έκφραση. Τα γονίδια αυτά ήταν τα εξής: **BQ771515**: UI-H-EZ1-bbf-k-02-0-UI.s1 NCI_CGAP_Ch2 Homo sapiens cDNA clone UI-H-EZ1-bbf-k-02-0-UI 3, **AA358186**: EST67136 Fetal lung III Homo sapiens cDNA 3-end similar to EST containing Alu repeat, mRNA sequence, **NM_004726**: RALBP1 associated Eps domain containing 2 (REPS2), transcript variant 1, **AF288406**: G protein interaction factor 2-like mRNA sequence

NM_006011: ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 2 (ST8SIA2), **AA993706**: ot97d11.s1 Soares_total_fetus_Nb2HF8_9w Homo sapiens cDNA clone, **BG620703**: 602619595F1 NIH_MGC_79 Homo sapiens cDNA clone, **BQ014236**: UI-H-ED1-axs-b-09-0-UI.s1 NCI_CGAP_ED1 Homo sapiens cDNA clone, **NM_032816**: centrosomal protein 89kDa (CEP89), **BQ771515**: UI-H-EZ1-bbf-k-02-0-UI.s1 NCI_CGAP_Ch2 Homo sapiens cDNA clone UI-H-EZ1-bbf-k-02-0-UI 3, **CN333814**: 17000532232682 GRN_EB Homo sapiens cDNA 5-, mRNA sequence, **R51883**: yg78b08.s1 Soares infant brain 1NIB Homo sapiens cDNA clone, **AA993706**: ot97d11.s1 Soares_total_fetus_Nb2HF8_9w Homo sapiens cDNA clone, **BI492332**: df22g09.w1 Morton Fetal Cochlea Homo sapiens cDNA clone, **NM_032461**: SPANX family, member B1 (SPANXB1), **AF288406**: G protein interaction factor 2-like mRNA sequence, **NM_001001968**: olfactory receptor, family 6, subfamily S, member 1 (OR6S1), **CN333814**: 17000532232682 GRN_EB Homo sapiens cDNA 5-, mRNA sequence, **NM_006011**: ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 2 (ST8SIA2).

Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στην **Εικόνα 259**.


Scatter Plot of the Principal Components (PC1), (PC2)
A
BQ771515
AA358186
PC2
PC1
Scatter Plot of the Principal Components (PC1), (PC3)
B
NM_004726
AA358186
AF288406
NM_006011
PC3
PC1
Scatter Plot of the Principal Components (PC1), (PC4)
C
AA993706
BG620703
AA358186
BQ771515
PC4
PC1
Scatter Plot of the Principal Components (PC1), (PC5)
D
AF288406
BQ014236
AA358186
NM_032816
PC5
PC1
Scatter Plot of the Principal Components (PC1), (PC6)
E
BQ771515
CN333814
AA358186
NM_032816
PC6
PC1
Scatter Plot of the Principal Components (PC1), (PC7)
F
R51883
AA358186
NM_004726
NM_032816
PC7
PC1
Scatter Plot of the Principal Components (PC1), (PC8)
G
AA993706
AA358186
NM_004726
PC8
PC1
Scatter Plot of the Principal Components (PC1), (PC9)
H
AA358186
BI492332
NM_004726
PC9
PC1

Εικόνα 259.



Εικόνα 259 (συνέχεια). Αναπαράσταση των principal components 1-12 σε όλους τους συνδυασμούς μεταξύ του principal component 1 και των υπολοίπων. Παρουσιάστηκε γραμμική συσχέτιση στον ιδιοπίνακα της γονιδιακής έκφρασης με την εξαίρεση ορισμένων γονιδίων που παρουσιάζονται στα επιμέρους διαγράμματα.

Υπόμνημα Γονιδίων.

BQ771515: UI-H-EZ1-bbf-k-02-0-UI.s1 NCI_CGAP_Ch2 Homo sapiens cDNA clone UI-H-EZ1-bbf-k-02-0-UI 3
AA358186: EST67136 Fetal lung III Homo sapiens cDNA 3-end similar to EST containing Alu repeat, mRNA sequence
NM_004726: RALBP1 associated Eps domain containing 2 (REPS2), transcript variant 1
AF288406: G protein interaction factor 2-like mRNA sequence
NM_006011: ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 2 (ST8SIA2)
AA993706: ot97d11.s1 Soares_total_fetus_Nb2HF8_9w Homo sapiens cDNA clone
BG620703: 602619595F1 NIH_MGC_79 Homo sapiens cDNA clone
BQ014236: UI-H-ED1-axs-b-09-0-UI.s1 NCI_CGAP_ED1 Homo sapiens cDNA clone
NM_032816: centrosomal protein 89kDa (CEP89)
BQ771515: UI-H-EZ1-bbf-k-02-0-UI.s1 NCI_CGAP_Ch2 Homo sapiens cDNA clone UI-H-EZ1-bbf-k-02-0-UI 3
CN333814: 17000532232682 GRN_EB Homo sapiens cDNA 5-, mRNA sequence
R51883: yg78b08.s1 Soares infant brain 1NIB Homo sapiens cDNA clone
AA993706: ot97d11.s1 Soares_total_fetus_Nb2HF8_9w Homo sapiens cDNA clone
BI492332: df22g09.w1 Morton Fetal Cochlea Homo sapiens cDNA clone
NM_032461: SPANX family, member B1 (SPANXB1)
AF288406: G protein interaction factor 2-like mRNA sequence
NM_001001968: olfactory receptor, family 6, subfamily S, member 1 (OR6S1)
CN333814: 17000532232682 GRN_EB Homo sapiens cDNA 5-, mRNA sequence
NM_006011: ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 2 (ST8SIA2)

ΜΕΡΟΣ IV

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

"Dicebat Bernardus Carnotensis nos esse quasi nanos, gigantium humeris insidentes, ut possimus plura eis et remotiora videre, non utique proprii visus acumine, aut eminentia corporis, sed quia in altum subvenimur et extollimur magnitudine gigantea"

Bernard of Chartres used to say that we are like dwarfs on the shoulders of giants, so that we can see more than they, and things at a greater distance, not by virtue of any sharpness of sight on our part, or any physical distinction, but because we are carried high and raised up by their giant size.

John of Salisbury, Metalogicon, 1159

If I have seen further, it is by standing on the shoulders of giants

Isaac Newton (Επιστολή προς τον Robert Hooke)

Στην ενότητα αυτή αναλύουμε τα αποτελέσματα και παραθέτουμε τα συμπεράσματα από τη μελέτη που κάναμε. Η γενικότερη ιδέα της μελέτης αυτής ήταν η τοποθέτηση κάποιων βασικών ερωτημάτων και η κατανόηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων με στόχο την ανεύρεση παραγόντων που θα οδηγήσουν στην έγκαιρη ταυτοποίηση ενός νεοπλάσματος και ειδικότερα του ΚΝΣ.

Για να μπορούμε να γνωρίζουμε την έκβαση ενός χαοτικού μη-γραμμικού φαινομένου, πρέπει να γνωρίζουμε με απειροστική λεπτομέρεια τις συνθήκες του. Το ερώτημα όμως είναι μπορούμε να βρούμε τις αρχικές συνθήκες γνωρίζοντας τις τελικές.

Επίσης, ένα σημαντικό ερώτημα που μπορεί να μας απασχολήσει είναι αν τα κύτταρα είναι δυνάμει καρκινογενή. Αν αυτό ισχύει τότε η καρκινογένεση είναι θέμα συνθηκών. Υπάρχει λοιπόν το ερώτημα τα κύτταρα είναι δυνάμει ογκογεννητικά ή θέση δηλαδή φύση. Δηλαδή θα γίνουν καρκινικά μετά από ένα χρονικό διάστημα μόνο και μόνο λόγω της λειτουργίας τους; Αυτό μας ανάγει στα κοινωνικά μοντέλα του ανθρώπου, που όσο απόμακρο και να φαίνεται από την κυτταρική βιολογία, έχει μια ποιο σημαντική σύνδεση: Είναι δηλαδή ο άνθρωπος δυνάμει καλός ή κακός, ή θέση; Το περιβάλλον παίζει κάποιο ρόλο; Φυσικά η απάντηση είναι ότι παίζει σημαντικό ρόλο και μάλιστα αυτό με τη σειρά του μας φέρνει στο ερώτημα της αλληλεπίδρασης μεταξύ των γονιδίων και του περιβάλλοντος.

Επιστρέφοντας στο ρόλο των καρκινικών κυττάρων μπορούμε να πούμε ότι τα καρκινικά κύτταρα πηγαίνουν ενάντια στους νόμους της ζωής; Το φυσιολογικό κύτταρο δημιουργείται, γερνάει, πεθαίνει. Το καρκινικό ακολουθεί την πορεία γέννηση, μετασχηματισμός, αθανασία. Αν το δούμε το φαινόμενο αυτό από τη μεριά της θεωρίας συστημάτων τότε μπορούμε να πούμε ότι το καρκινικό κύτταρο ακολουθεί στρεβλή πορεία και άρα παραβαίνει τους κανόνες της ζωής. Τι σημαίνει όμως στρεβλό και τι φυσιολογικό; Πως μπορούμε να είμαστε βέβαιοι ότι η καρκινογένεση δεν αποτελεί μια άλλη εξέλιξη των κυττάρων. Αν υποθέσουμε ότι υπάρχουν ορισμένοι γενικοί κανόνες που αφορούν στη ζωή, οι ζώντες οργανισμοί ακολουθούν αυτούς τους νόμους ενώ εκ τούτου πηγάζει ότι τα καρκινικά κύτταρα κινούνται εκτός αυτών των νόμων. Εδώ τίθεται όμως ένα νέο ερώτημα: μήπως ακόμα και τα καρκινικά κύτταρα που κινούνται «άνομα» είναι *εντός των πλαισίων των νόμων της ζωής*; Ένα είναι βέβαιο, υπάρχουν ορισμένοι θεμελιώδεις νόμοι της φύσης οι οποίοι ισχύουν σε όλες τις περιπτώσεις και όλοι οι ζώντες οργανισμοί τους ακολουθούν, χωρίς να μπορούν να παρεκκλίνουν από αυτούς. Τέτοια παραδείγματα είναι η αρχή διατήρησης της ενέργειας και οι θερμοδυναμικοί νόμοι που εκπορεύονται από την αρχή διατήρησης της ενέργειας.

Από τις πειραματικές μας διατάξεις είδαμε ήδη ορισμένα τέτοια παραδείγματα, αφού παρατηρήσαμε παρόμοιες συμπεριφορές στα κυτταρικά μας συστήματα ανεξαρτήτως του τύπου κυττάρων που μελετούσαμε. Αυτή η οπτική γωνία μας δίνει μια άλλη έννοια των φαινομένων. Σήμερα είναι παραδεκτό, και ορθά αυτό είναι, ότι κάθε περίπτωση ανθρώπου αποτελεί μια ιδιαίτερη περίπτωση.

Άρα και η θεραπεία του και ειδικότερα του καρκίνου πρέπει να αποτελέσει επίσης μια ειδική περίπτωση. Άρα δεδομένων αυτών των αρχών, είναι σκόπιμο να κοιτάξει κανείς για ειδικούς παράγοντες σε κάθε τύπου νεοπλασία και με βάση αυτούς τους τύπους να υπάρχει και η ανάλογη θεραπεία. Ενώ λοιπόν η αντίληψη αυτή είναι εκ θέσεως σωστή δεν είναι εκ φύσεως. Το πρόβλημα πηγάζει από το γεγονός ότι όλοι οι ειδικοί παράγοντες προκύπτουν να ισχύουν σε ποσοστά. Ακόμα και οι πιο ειδικοί δείκτες ανευρίσκονται σε νεοπλασίες σε ποσοστά 80-90%. Τι γίνεται όμως με το υπόλοιπο 10-20%; Τα χημειοθεραπευτικά καταστρέφουν ίσως το 99% των καρκινικών κυττάρων. Το απομένων όμως 1% δεν υποκύπτει στη θεραπεία και άρα δεν ακολουθεί τους «ειδικούς» κανόνες ή για να το πούμε καλύτερα *patient-specific* κανόνες. Στο σημείο αυτό θα παραφράσουμε τα λόγια των *Planck* και *Schrödinger* (που θα τα χρησιμοποιήσουμε και παρακάτω), οι οποίοι είπαν ότι «*…είναι βέβαιο ότι η λεοπάρδαλης θα έχει τρίχωμα με βούλες αλλά ποιο θα είναι το προφίλ τους αυτό είναι πιθανότητα…*» (μ.τ.σ.). Ως εκ τούτου, η παρούσα εργασία επεδίωξε να κινηθεί προς την αντίθετη κατεύθυνση της υπάρχουσας τάσης. Δηλαδή, επεδίωξε να πάει προς τη φύση της βιολογίας των νεοπλασμάτων και εξ' ου οι κοινές γονιδιακές οδοί και δείκτες. Είναι πεποίθησή μας ότι είναι πιθανό να υπάρχει κοινή μηχανιστική στον τρόπο που οι νεοπλασίες αυξάνονται και αν δεν υπάρχει ένας και μοναδικός μηχανισμός τότε μπορούμε να υποθέσουμε ότι υπάρχει ένας μικρός αριθμός μηχανισμών μέσω των οποίων προκύπτει η οντογένεση των νεοπλασμάτων.

Ξέρουμε πλέον ότι έχουμε περάσει στη μετα-γενωμική εποχή. Τα δεδομένα από τις τεχνολογίες των μικροσυστοιχιών και αλληλουχοποίησης επόμενης γενιάς είναι τεράστια. Άρα είναι κατανοητό ότι απαιτούνται νέα εργαλεία και αντιλήψεις για την ερμηνεία των βιολογικών φαινομένων. Σύμφωνα με τον *Kauffman* (2004) υπάρχου τρεις επικρατούσες θεωρίες στη διαμόρφωση του θεωρητικού υπόβαθρου ερμηνείας των δεδομένων (Kauffman 2004). Το πρώτο αφορά στη μελέτη ορισμένων γονιδίων ή πρωτεϊνών μέσα από την προσομοίωση των σηματοδοτικών οδών. Η προσέγγιση αυτή έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί κανείς να κατανοήσει αρκετά καλά το επίπεδο αλληλεπίδρασης και ρύθμισης ενώ το μειονέκτημα είναι ότι το μικρό αυτό σύστημα δέχεται επιδράσεις από το περιβάλλον, οι οποίες δεν λαμβάνονται υπόψη. Η δεύτερη προσέγγιση αφορά στην αντίθετη μεθοδολογία, δηλαδή στη μελέτη ολόκληρου του γονιδιώματος και στην μετέπειτα ερμηνεία των αλληλεπιδράσεων. Η προσέγγιση αυτή έχει το πλεονέκτημα ότι λαμβάνει υπόψη το σύνολο των δεδομένων αλλά η περιπλοκότητά τους δεν επιτρέπει την πλήρη κατανόηση και ερμηνεία τους. Η τρίτη προσέγγιση αφορά στην αναφερόμενη ως *ζεύξη* (*ensemble*) (Kauffman 2004). Η βασική υπόθεση στην προσέγγιση αυτή είναι ότι οι σηματοδοτικές οδοί αποτελούν τμήμα ενός μεγαλύτερου δικτύου, το οποίο έχει τροποποιηθεί από την εξελικτική πορεία και έχει οδηγήσει στα σημερινά παρατηρούμενα γονιδιακά δίκτυα. Στο θέμα αυτό έχουμε αναφερθεί σε προηγούμενες εργασίες μας (Lambrou, Zaravinos et al. 2012). Στις προσεγγίσεις αυτές έχουμε να προσθέσουμε μια νέα μεθοδολογία. Αν υποθέσουμε ότι έχουμε ένα *ensemble* από μηχανισμούς που κατευθύνουν τη

γονιδιακή λειτουργία, τότε αναλόγως το φαινόμενο που μελετάμε υπάρχουν κάποια κοινά μονοπάτια/οδοί που οδηγούν στο ίδιο αποτέλεσμα, ανεξαρτήτως των τελικών συνθηκών. Αν μέχρι σήμερα ήταν αποδεκτό ότι η λειτουργία ενός ή δύο γονιδίων προκαλούσε μια νεοπλασία αυτό φαίνεται να διευρύνεται από τα πειραματικά ευρήματα. Μπορούμε λοιπόν να διατυπώσουμε την εξής θεωρία:

Θεώρημα: ο φαινότυπος ενός κυτταρικού συστήματος δεν εξαρτάται από την τιμή έκφρασης ενός ή περισσότερων γονιδίων αλλά από το *φάσμα* έκφρασης.

Λέγοντας *φάσμα* έκφρασης εννοούμε όλες τις πιθανές τιμές που μπορεί να πάρει η έκφραση ενός γονιδίου σε όλες τις χρονικές στιγμές. Προς την κατεύθυνση αυτή φαίνεται να συμφωνούν ορισμένες πρόσφατες αναφορές, όπως αυτή των *Mar* και *Quackenbush* (2009) (Mar and Quackenbush 2009). Μέσα από την παρούσα μελέτη προέκυψε και ένα άλλο ερώτημα. Εφόσον έχουμε το γονιδιακό προφίλ μεμονωμένων δειγμάτων, κυρίως από ασθενείς πάσχοντες από νεοπλάσματα, και έχουμε ήδη αναφέρει ότι τα επίπεδα έκφρασης ενός γονιδίου αφορούν στη χρονική στιγμή και μόνο σε αυτή πως μπορούμε να διερευνήσουμε το φάσμα της έκφρασης γονιδίων. Στο θέμα αυτό έχουμε αναφερθεί σε πρόσφατη εργασία μας, όπου βρέθηκε ότι το φάσμα έκφρασης του γονιδίου CDC20 ήταν υπερεκφρασμένο σε όλους τους όγκους καρκίνου της ουροδόχου κύστης, που μελετήσαμε (Zaravinos, Lambrou et al. 2011). Το ερώτημα αυτό μας απασχόλησε αρκετά μιας και δεν ήταν δυνατό να βρούμε έναν τρόπο για να μετασχηματίσουμε τις στατικές τιμές έκφρασης σε χρονικές, διότι περί αυτού πρόκειται. Για να γίνει αυτό έγιναν οι εξής υποθέσεις. Η πρώτη υπόθεση αφορά στο γεγονός ότι δεχθήκαμε ότι οι παρατηρούμενες τιμές στη γονιδιακή έκφραση δεν αφορούσαν σε διαφορετικές τιμές, ανάμεσα σε διαφορετικά δείγματα αλλά αφορούσαν *σε όλες τις πιθανές τιμές* που μπορούσε να λάβει ένα γονίδιο σε όλους τους φαινότυπους που μελετήθηκαν. Ειδικότερα μάλιστα, εννοώντας φαινότυπο αναφερόμαστε στον καρκινικό φαινότυπο της ουροδόχου κύστης για τη συγκεκριμένη πειραματική διάταξη. Ακριβώς η ίδια περίπτωση θα μπορούσε να εφαρμοσθεί σε φαινότυπους άλλων νεοπλασιών και γιατί όχι στο φαινότυπο του καρκινικού κυττάρου ανεξαρτήτως προέλευσης. Προς την κατεύθυνση αυτή βρισκόμαστε ήδη σε διαδικασία διερεύνησης καθώς έχουμε ξεκινήσει την ανάλυση ~8000 δειγμάτων νεοπλασιών από δημόσια διαθέσιμα δεδομένα.

Για να επανέλθουμε στην προηγούμενη θεματολογία, καταλαβαίνουμε ότι από την υπόθεση αυτή έχουμε τα ακρότατα της γονιδιακής έκφρασης. Η δεύτερη υπόθεση αφορά στην ύπαρξη περιοδικότητας ή ημι-περιοδικότητας στη γονιδιακή έκφραση. Αν θυμηθούμε την αναφορά μας στα βιολογικά συστήματα ως φυσικά, τότε θα δούμε ότι και η γονιδιακή έκφραση πρέπει να ακολουθεί κάποιους κανόνες. Αυτοί οι κανόνες επιβάλλουν ότι η έκφραση ενός γονιδίου δεν μπορεί να παραμένει σταθερή αλλά να ανακυκλώνεται. Σε αντίθετη περίπτωση, το κύτταρο θα οδηγείτο στο

αδιαχώρητο από τα αδιάθετα μόρια RNA που θα συγκεντρωνόντουσαν. Άρα είναι εύλογο να υποθέσουμε ότι δεν υπάρχει μια σταθερή αλλά μια μεταβαλλόμενη κατάσταση στα επίπεδα έκφρασης. Αυτή η αυξομείωση μπορεί εύκολα να παρομοιασθεί με μια περιοδική, ημι-περιοδική κατάσταση, όπου η γονιδιακή ρύθμιση ακολουθεί ταλαντώσεις. Ως εκ τούτου, με βάση αυτές τις παρατηρήσεις μπορούμε να διατυπώσουμε την υπόθεση ότι οι μεμονωμένες μετρήσιμες τιμές ενός γονιδίου, αποτελούν την αντίστοιχη τιμή μιας χρονικής στιγμής.

Θεώρημα: Οι τιμές γονιδιακής έκφρασης σε μια συγκεκριμένη κατάσταση (*states*) και σε μια δεδομένη χρονική στιγμή *t* υπό τον ίδιο φαινότυπο, από διαφορετικούς όμως φορείς, αντιστοιχούν σε μια χρονοσειρά *f(t)*,η οποία είναι περιοδική ή ημι-περιοδική.

Το θεώρημα αυτό αφορά στο μετασχηματισμό μιας σειράς τιμών έκφρασης γονιδίων σε μια χρονοσειρά. Ένα εργαλείο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για αυτή τη μετατροπή είναι ο μετασχηματισμός *Fourier*. Ο μετασχηματισμός αυτός μπορεί να λάβει χώρα μόνο με βάση την παραδοχή του παραπάνω θεωρήματος, ότι δηλαδή οι επιμέρους τιμές της γονιδιακής έκφρασης αποτελούν στο σύνολό τους μια χρονοσειρά.

Στο βαθμό που γνωρίζουμε η παραπάνω διατύπωση είναι η πρώτη φορά που παρουσιάζεται και μάλιστα θα λέγαμε ότι κατά κάποιο τρόπο «ταράζει τα νερά», μιας και εφόσον είναι ορθή μας δίνει τη δυνατότητα να ερμηνεύσουμε μια πληθώρα δεδομένων υπό μια νέα οπτική γωνία.

Μια από τις πρώτες παρατηρήσεις που έγιναν αφορούσαν στα πειράματα βαθμονόμησης, όπου είδαμε ότι οι καμπύλες αύξησης μπορούσαν να προσομοιωθούν πολύ καλά σε σχέση με τον αρχικό αριθμό. Το εύρημα αυτό, παρά το ότι έχει ανευρεθεί σε *in vitro* μοντέλο, έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον διότι υποδηλώνει ότι αν γνωρίζουμε τις τελικές συνθήκες ενός κυτταρικού πληθυσμού, είναι δυνατό να υπολογίσουμε τον αρχικό αριθμό και το χρόνο μετάβασης του συστήματος προς το τελικό αποτέλεσμα. Το μοντέλο αυτό θα μπορούσε να μεταφερθεί και σε *in vivo* συστήματα, δεδομένων όμως των δυσκολιών που υπάρχουν λόγω της περιπλοκότητάς τους το αντικείμενο αυτό χρήζει περισσότερης μελέτης για να βρεθούν οι μηχανισμοί που οδηγούν στην ταυτοποίηση των αρχικών πληθυσμών που ξεκινούν μια νεοπλασία. Στο βαθμό που μας είναι γνωστό, δεν υπάρχουν αντίστοιχες εργασίες πάνω σε αυτό το θέμα.

Από τα πειράματα ελάχιστης ανάπτυξης μπορούμε να διατυπώσουμε μια βασική υπόθεση: τα κύτταρα διαθέτουν δύο μηχανισμούς ανάπτυξης, έναν αυτόνομο και έναν επίκτητο. Μέσω αυτού του μηχανισμού, εγκαθίστανται, ενεργοποιούν τους βασικούς μηχανισμούς επιβίωσης και παραμένουν σε μια κατάσταση αναμονής μέχρι να προκύψουν πολλαπλασιαστικοί παράγοντες. Ο δεύτερος αφορά σε μόρια σηματοδότησης από όμοια τους κύτταρα είτε από την ύπαρξη αυξητικών παραγόντων. Απόδειξη αυτής της υπόθεσης αποτελεί η παρατηρούμενη αλλαγή στη μορφολογία μεμονωμένων

κυττάρων όταν αυτά βρεθούν σε εχθρικό ή μη-εχθρικό περιβάλλον. Μπορούμε να διακρίνουμε δύο στάδια στον πολλαπλασιασμό. Το πρώτο είναι η «απόφαση» (ολοκλήρωση των απαιτούμενων συνθηκών πολλαπλασιασμού) για αύξηση και το δεύτερο είναι η δια ταύτα ανάπτυξη. Αν υποθέσουμε ότι στο κλειστό σύστημα της φλάσκας έχουμε μόνο ένα μηχανισμό και αυτός είναι αυτοκρινής, δηλαδή το κύτταρο μεταφέρει σηματοδότηση από το ίδιο στον εαυτό του θα έπρεπε ανεξαρτήτως του αρχικού αριθμού να παρατηρούσαμε για κάθε περίπτωση πειραμάτων μια στοιχειώδη αύξηση ανάλογη με αυτή του αρχικού αριθμού. Άρα καταλαβαίνουμε ότι τα κύτταρα, τουλάχιστον *in vitro*, δεν έχουν τέτοιο αυτόματο μηχανισμό ανάπτυξης αλλά εξαρτώνται άμεσα από το περιβάλλον. Αντίθετα αν υπάρχει ένας παρακρινής μηχανισμός, όπου τα κύτταρα σηματοδοτούν μεταξύ τους εξωκυττάρια μόρια, τότε θα πρέπει η ανάπτυξη να λαμβάνει χώρα συναρτήσει του αρχικού πληθυσμού των κυττάρων. Αυτό είναι και η παρατήρηση που κάναμε στα πειράματά μας. Όπως επίσης είδαμε ότι υπάρχει ένα κατώφλι, το οποίο πρέπει να περάσουν ώστε να αρχίσει ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Αλλιώς θα λέγαμε ότι πρέπει να υπάρχει μια κρίσιμη μάζα ικανή και αναγκαία ώστε να προχωρήσει ο πολλαπλασιασμός. Αυτό μας υποδεικνύει ότι υπάρχει εξωκυττάρια σηματοδότηση, η οποία πρέπει να φτάσει ένα συγκεκριμένο επίπεδο συγκέντρωσης ώστε τα κύτταρα να περάσουν στην φάση της έναρξης της ανάπτυξης. Για ποιο λόγο όμως είμαστε βέβαιοι ότι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός μπορεί να χωρισθεί σε δύο φάσεις. Η απάντηση σε αυτό έρχεται από το γεγονός ότι τα κύτταρα που δεν ήταν σε ικανοποιητικούς αριθμούς παρέμεναν σε ένα είδος «νάρκης» και σε ένα σχετικά μεγάλο χρονικά διάστημα, παρέμεναν ζωντανά μεν αλλά αδρανή δε. Δηλαδή φαινόταν σαν να υπήρχε η αναμονή για το εκκινητήριο σήμα. Σε μεγαλύτερους αριθμούς κυττάρων συνέβαινε ακριβώς το αντίθετο, τα κύτταρα πολλαπλασιαζόντουσαν και μάλιστα ο ρυθμός πολλαπλασιασμού καθώς και τα τελικά επίπεδα που έφθαναν ήταν σε συνάρτηση με τις αρχικές συνθήκες.

Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφέρουμε ότι αυτή η υπόθεση αποτελεί μια σημαντική παράμετρο διότι, θεωρούμενη ως αληθινή, είναι ενδεχομένως δυνατό γνωρίζοντας τις τελικές συνθήκες ήτοι τον αριθμό κυττάρων κατά τη διάγνωση μπορούμε να βρούμε το διάστημα που χρειάσθηκε ώστε να αναπτυχθεί ένα νεόπλασμα κάτι που μέχρι σήμερα αποτελεί ένα από τα καίρια άγνωστα σημεία στη βιολογία των νεοπλασιών. Το γεγονός αυτό ήρθε να επιβεβαιωθεί από την ανάλυση παλινδρόμησης που κάναμε στα πειράματα ελάχιστης ανάπτυξης και ειδικότερα μπορέσαμε σε επίπεδο τριών διαστάσεων να μοντελοποιήσουμε εξαιρετικά καλά την πολλαπλασιαστική δυναμική συναρτήσει του χρόνου και του αρχικού αριθμού (**Εικόνα 105**).

Στο βαθμό που μας είναι γνωστό, δεν υπάρχουν αντίστοιχες πειραματικές διατάξεις ούτε έχουν αναφερθεί ή μελετηθεί οι υποθέσεις μας στη βιβλιογραφία. Υπάρχουν κάποιες μελέτες οι οποίες αναφέρονται στην πρόβλεψη της επανάκαμψης των νεοπλασμάτων μετά από θεραπεία όπως οι εργασίες των *Zhang et al* (2006) και *Begg* (2012) (Zhang, Das et al. 2006; Begg 2012). Γενικά όμως

το θέμα αυτό, που αφορά στην πρόβλεψη των αρχικών συνθηκών από την παρουσίαση του νεοπλάσματος αναφέρεται για πρώτη φορά με τον τρόπο αυτό. Στο μοντέλο αυτό παρατηρήσαμε μια εξαίρεση. Τα λευχαιμικά κύτταρα που χρησιμοποιήσαμε έδειξαν έναν ανεξάρτητο τρόπο λειτουργίας, χωρίς δηλαδή να απαιτείται μια κρίσιμη μάζα για να αναπτυχθούν. Ποια είναι η διαφορά μεταξύ των κυτταρικών συστημάτων; Κατά την άποψή μας η βασική διαφοροποίηση έγκειται στο γεγονός ότι τα μοντέλα ΚΝΣ που χρησιμοποιήσαμε ήταν επικολλώμενα δηλαδή πρακτικά λειτουργούσαν σε δύο διαστάσεις ενώ το λευχαιμικό σύστημα ήταν σε εναιώρημα δηλαδή λειτουργούσε σε τρεις διαστάσεις. Αν σκεφθούμε τις διαστάσεις στις οποίες τοποθετήσαμε το λευχαιμικό μοντέλο θα δούμε ότι ήταν εξαιρετικά μεγάλες. Μια τυπική φλάσκα καλλιέργειας $75cm^2$ έχει διαστάσεις 150mm×80mm. Αν υποθέσουμε ότι δύο κύτταρα θα είχαν μια μέση απόσταση μεταξύ τους 75mm και έχουν μέσω μήκος 50μm τότε οι διαστάσεις αυτές αντιστοιχούν σε απόσταση. Κατά προσέγγιση η απόσταση που βρίσκονταν τα λευχαιμικά κύτταρα σε μια φλάσκα αντιστοιχεί σε απόσταση 2.7 km μεταξύ δύο ατόμων. Από την **Εικόνα 102**, παρατηρούμε ότι η ταχύτητα ανάπτυξης εξαρτάται περισσότερο από τον αρχικό αριθμό των κυττάρων παρά από τον όγκο του υλικού στον οποίον μεγαλώνουν τα κύτταρα. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι τα κύτταρα σε εναιώρημα διαθέτουν εγγενή και αυτοκρινή μηχανισμό ανάπτυξης. Τα πειράματα αυτά, επίσης στο βαθμό που γνωρίζουμε δεν υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία. Η μεθοδολογία αυτή αποτελεί την πρώτη μελέτη της πολλαπλασιαστικής δυναμικής με τον τρόπο τον οποίο παρετέθει στην παρούσα εργασία.

Τα πειράματα ελάχιστης ανάπτυξης μας οδήγησαν στην επόμενη φάση πειραμάτων, που αφορούσαν στη διερεύνηση του ρόλου τόσο του όγκου καλλιέργειας όσο και του αρχικού αριθμού (CV/CIN). Είναι εν γένει γνωστό ότι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός είναι συνυφασμένος με τη διαθέσιμη τροφή ήτοι τους πόρους που υπάρχουν. Τα πειράματα μεταβλητού όγκου και μεταβλητού αρχικού αριθμού μας έδειξαν όμως κάτι διαφορετικό. Παρατηρήσαμε ότι ο μικρότερος όγκος καλλιέργειας υπό τις ίδιες συνθήκες χώρου και αρχικού αριθμού έδωσε μεγαλύτερη ανάπτυξη στα κυτταρικά συστήματα ανεξαιρέτως κυτταρικού τύπου. Άρα ένα από τα πρώτα βασικά συμπεράσματα που είχαμε ήταν ότι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός είναι ανεξάρτητος της διαθεσιμότητας της τροφής ήτοι της γλυκόζης. Τα κύτταρα που μεγάλωσαν σε μεγαλύτερο χώρο και με περισσότερη διαθεσιμότητα γλυκόζης αυξήθηκαν πιο αργά σε σχέση με τα κύτταρα που μεγάλωσαν σε μικρότερο όγκο, τα οποία είχαν πολύ μεγάλο ρυθμό πολλαπλασιασμού. Προσπαθούσαν δηλαδή να καταλάβουν το χώρο στον οποίο βρισκόντουσαν και αυτό θα το ονομάζαμε μάλλον μια κίνηση αντανακλαστική. Αυτό επίσης υποδεικνύει έλλειψη αναγνώρισης του χώρου στον οποίο βρισκόντουσαν μιας και η γρήγορη κατάληψη του χώρου θα οδηγούσε εκ των πραγμάτων πολύ γρήγορα σε κορεσμό.

Άρα πρώτο συμπέρασμα είναι ότι τα κύτταρα που μελετήσαμε λειτουργούν αντανακλαστικά χωρίς την έννοια του χώρου.

Αντιθέτως δε αυτό που παρατηρήσαμε ήταν ότι τα κύτταρα με περίσσεια πόρων δεν πολλαπλασιάσθηκαν αλλά παρέμειναν σε πιο αργή διαδικασία.

Στο σημείο αυτό προσπαθήσαμε να δώσουμε μια ερμηνεία, αφού μας απασχόλησε πάρα πολύ καιρό για πιο λόγο συμβαίνει αυτό το φαινόμενο αντίθετο με αυτά που γνωρίζουμε μέχρι σήμερα για τη σχέση τροφής και κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Στο σημείο αυτό όμως πρέπει να αναφέρουμε μια αντιφατική παρατήρηση. Όπως είδαμε στην **Εικόνα 112**, τα κύτταρα που ξεκίνησαν από ~3000 έδειξαν στα 100μl να μειώνουν το ρυθμό πολλαπλασιασμού τους, γεγονός που δείχνει την αίσθηση του χώρου ή γενικότερα του περιβάλλοντος. Μια πιθανή ερμηνεία σε αυτό είναι ότι πρώτον ορθά θεωρήσαμε ότι τα κύτταρα δεν έχουν αισθητήρια του χώρου, αλλά έχουν μηχανισμό ανίχνευσης άλλων κυττάρων κάτι το οποίο γίνεται μέσω χημειοταξίας από παράγοντες που εκκρίνονται από αυτά. Άρα όσο περισσότερα τα κύτταρα σε ένα μικροπεριβάλλον τόσο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των παραγόντων που παράγονται και άρα ενεργοποιούνται οι μηχανισμοί πολλαπλασιασμού. Από την άλλη όμως ισχύει και το γεγονός της αντανακλαστικής αντίδρασης κατά την οποία, αυτόματα τα κύτταρα μόλις λάβουν την «απόφαση» για πολλαπλασιασμό ξεκινούν την υλοποίησή του.

Στο σημείο αυτό θα διατυπώσουμε μια θεωρία για το φαινόμενο αυτό ήτοι, η μεταβλητή που μεταβάλλεται είναι η βαρύτητα δηλαδή η πίεση. Τα κύτταρα σε μεγαλύτερο όγκο θρεπτικού (άρα μεγαλύτερη πίεση) βρίσκονται σε υπερκείμενο μεγαλύτερου ύψους από αυτά σε μικρότερο όγκο θρεπτικού (άρα μικρότερη πίεση). Άρα από τη μια πειραματική διάταξη στην άλλη ένας παράγοντας που μεταβαλλόταν σημαντικά και ενδεχομένως να επηρεάζει είναι η πίεση. Η πίεση ορίζεται ως:

$P=\rho g h$, **Εξίσωση 68**

Όπου, P είναι η πίεση, ρ είναι η πυκνότητα του υγρού, g είναι η επιτάχυνση της γης και h το ύψος του υγρού πάνω από το σημείο μέτρησης.

Άρα η πίεση που δέχεται ένα κύτταρο κατά μέσο όρο στην επιφάνειά του, είναι ίση με 8×10^5 Pascal=80kPascal ή ~0.8Atm, όταν θέτουμε ρ=1 gr/cm^3, h=8mm=0.008m, g=10m/sec^2. Επίσης αν υπολογίσουμε την πίεση στην επιφάνεια ενός κυττάρου, που είναι περίπου 2000-2500 μm^2 κατά μέσο όρο τότε η πίεση ανά μm^2 είναι 81,060.00 Newton/m^2 ή 81.06×10^{-9} Newton/μm^2. Αν υποθέσουμε ότι το μέσο μέγεθος ενός κυττάρου είναι περίπου 50μm, τότε αν το αντιστοιχήσουμε σε άνθρωπο ύψους 170cm τότε έχουμε μια αναλογία 1:34000 μεγαλύτερο σε μέγεθος. Αντίστοιχα πρέπει να πολλαπλασιάσουμε το ύψος του υγρού πάνω από το κύτταρο ήτοι 8mm με την αναλογία αυτή τότε το ύψος του υπερκείμενου αντιστοιχεί σε 272m=0.272km. Η πίεση που θα ασκηθεί σε έναν άνθρωπο σε αυτό το βάθος αντιστοιχεί σε 27.20Atm, που αντιστοιχούν σε 2,756,040.00 N/m^2. Είναι ίση με το ¼ περίπου της πίεσης στην επιφάνεια του πλανήτη *Αφροδίτη* (ενδεικτικά αναφέρουμε ότι η πίεση στην επιφάνεια της γης είναι 1Atm=100,000.00N/m^2 και στην επιφάνεια της *Αφροδίτης* είναι 90Atm=9,000,000.00N/m^2). Πίεση που υπερβαίνει κατά πολύ την πίεση που ασκείται στο

σώμα σε μακροσκοπικό επίπεδο. Τα μεγέθη είναι ασύλληπτα μιας και δεν τα αντιλαμβανόμαστε με τον τρόπο που συμβαίνει σε ένα κυτταρικό σύστημα χωρίς την υποστήριξη του συνεκτικού ιστού και των άλλων κυττάρων. Επίσης, όπως είπαμε και στην εισαγωγή της παρούσης εργασίας, ένα από τα θέματα που έχουν ληφθεί ελάχιστα υπόψη είναι το γεγονός ότι τα βιολογικά συστήματα είναι επίσης και φυσικά συστήματα άρα βρίσκονται μέσα στο φάσμα των φυσικών νόμων και όχι εκτός αυτών. Κατά συνέπεια τα κύτταρα που μελετήσαμε έχουν μια μορφολογία και δομή που σημαίνει ότι για να διατηρηθεί αυτή η δομή απαιτείται μια μηχανική και σύνθεση πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού. Η δομή αυτή είναι πολύ περίπλοκη για να θεωρηθεί αμελητέα. Αυτό σημαίνει αυτόματα ότι κύτταρα υπό μεγαλύτερες πιέσεις θα θέτουν πιθανόν ως προτεραιότητα την ενίσχυση του κυτταροσκελετού με τη σύνθεση ακτίνης, σπεκτρίνης, λαμινίνης κτλ. πράγμα που σημαίνει την κατανάλωση μεγάλων ποσών ενέργειας για τη διατήρηση του κυτταροσκελετού. Έτσι μάλιστα πιθανότατα να εξηγείται το γεγονός της μεγαλύτερης κατανάλωσης γλυκόζης όπως είδαμε στην ενότητα όπου μελετήσαμε το σύστημα μας θερμοδυναμικά.

Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφέρουμε και ένα σημαντικό λάθος που γινόταν και ακόμα γίνεται, που αφορά στη χρήση των μορίων του κυτταροσκελετού ως μόρια αναφοράς για την κανονικοποίηση πειραμάτων, όπως π.χ. μικροσυστοιχιών. Αν θεωρήσουμε ότι οι παραπάνω διατυπώσεις είναι σωστές τότε τα κυτταροσκελετικά μόρια μάλλον οτιδήποτε άλλο είναι παρά σταθερά.

Σε συνέχεια της ανάλυσης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού εισαγάγαμε δύο έννοιες στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, οι οποίες δεν έχουν λάβει ιδιαίτερης μελέτης στη διεθνή βιβλιογραφία. Οι έννοιες/μεγέθη ήταν αυτές της ταχύτητας και επιτάχυνσης πολλαπλασιασμού. Λίγες εργασίες έχουν γίνει στον τομέα αυτό, όπως αυτή των *Lecca et al* (2012) (Lecca and Morpurgo 2012), όπου αναφέρεται ο μηχανισμός πολλαπλασιασμού ήτοι η ταχύτητα συναρτήσει της τροφής. Η παρούσα εργασία πιστεύουμε ότι συνεισφέρει στον τομέα αυτό. Αντίστοιχα για την επιτάχυνση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό δεν έχουμε βρει εργασίες που να αναφέρονται στο θέμα αυτό. Η βασική μας παρατήρηση στο θέμα της ταχύτητας και επιτάχυνσης (είτε θετικής είτε αρνητικής) ήταν ότι ακολουθούν ταλαντωτική μορφή. Είναι εξαιρετικά ενδιαφέρον ότι σε όλα τα κυτταρικά συστήματα τα φυσικά αυτά μεγέθη έδειξαν να αυξομειώνονται συναρτήσει του χρόνου. Το εύρημα αυτό συσχετιζόμενο με μια πρόσφατη εργασία για τον τρόπο ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης μας δείχνει ότι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός κινείται, όπως και η γονιδιακή έκφραση δηλαδή ταλαντωτικά (Mar and Quackenbush 2009). Εφόσον η γονιδιακή έκφραση λαμβάνει χώρα σε ώσεις τότε είναι πολύ πιθανό οι κυτταρικοί πληθυσμοί να υπακούουν στον ίδιο κανόνα ρύθμισης και η διαίρεσή τους να γίνεται επίσης σε ώσεις. Η ερμηνεία αυτή μπορεί να εξηγήσει τον ταλαντωτικό χαρακτήρα του πολλαπλασιασμού και να διατυπώσει μια θεωρία με βάση την οποία τα κύτταρα είναι υποχρεωμένα να ακολουθήσουν ταλαντώσεις ως τρόπο πολλαπλασιασμού.

Η ύπαρξη περιοδικότητας μπορεί να ερμηνευθεί ως ένα φαινόμενο κατά το οποίο αν γίνει μέτρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε κάποια χρονική στιγμή τότε είναι πολύ μεγάλη η πιθανότητα η μέτρηση αυτή να βρεθεί μέσα στο πλάτος των περιοδικών συναρτήσεων που συναντήσαμε.

Παραφράζοντας και τα λόγια του *Max Planck* θα μπορούσαμε να πούμε ότι, αποτελεί βεβαιότητα το ότι τα κύτταρα θα πολλαπλασιασθούν, ο τρόπος όμως με τον οποίο θα το κάνουν ανήκει στον νόμο των πιθανοτήτων.

Το ότι παρατηρήσαμε κοινό προφίλ στα *in vitro* συστήματα που μελετήσαμε, επιβεβαιώνει την αρχική υπόθεση για κοινές γονιδιακές οδούς. Από τη στιγμή δε που ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός κινείται με ταλαντώσεις είναι το ίδιο πιθανό και για τη γονιδιακή ρύθμιση να λειτουργεί με τον ίδιο τρόπο. Αυτό σημαίνει ότι τα γονίδια υπεύθυνα για τον πολλαπλασιασμό δραστηριοποιούνται κατά τις φάσεις του πολλαπλασιασμού με τρόπο ταλαντωτικό και κατά συνέπεια μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα είναι εγκλωβισμένα από την ίδια τη φύση της πολλαπλασιαστικής δυναμικής τους. Η υπόθεση αυτή, κάνει το φαινόμενο εξαιρετικά ενδιαφέρον διότι μας ανοίγει ένα δρόμο προς την κατανόηση των νεοπλασιών.

Πρέπει να αναφέρουμε μια σημαντική παράμετρο, για την οποία μιλήσαμε στην ενότητα των αποτελεσμάτων. Ενώ διατυπώσαμε το ότι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού, η ταχύτητα ή η επιτάχυνση κινούνται ταλαντωτικά (και ως εκ τούτου, φαινομενολογικά, με διαφορετικό τρόπο από τον ένα αρχικό αριθμό στον επόμενο), ενδέχεται να υπάρχει εν τέλει μια κοινή καταβολή των μεταβλητών αυτών και να κινούνται τελικά με τον ίδιο τρόπο. Πως εξηγούνται αυτά τα δύο; Η απάντηση είναι απλή. Οι μεταβλητές που περιγράψαμε υπακούουν πιθανότατα στην ίδια συνάρτηση, η οποία όπως είδαμε προέκυψε από τους μετασχηματισμούς που πραγματοποιήσαμε αλλά η ίδια αυτή συνάρτηση συμπεριφέρεται με διαφορετικό τρόπο ανάλογα με τους παράγοντες που την απαρτίζουν. Θυμίζουμε επίσης ότι οι μετασχηματισμοί έγιναν με μια βασική υπόθεση: ότι οι φυσικές μεταβλητές του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ακολουθούν σε κάποιο βαθμό περιοδική συμπεριφορά ή ημι-περιοδική συμπεριφορά. Αυτό φάνηκε από τη μελέτη των μεμονωμένων αρχικών αριθμών όπου εμφανίσθηκαν οι καμπύλες πολλαπλασιασμού και δείχθηκε ότι ίσχυε η αρχική αυτή συνθήκη. Το γεγονός ότι το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε σε όλους τους κυτταρικούς τύπους μας δίνει μια σοβαρή ένδειξη ότι πράγματι τα κύτταρα ακολουθούν περιοδικές ή ημι-περιοδικές συναρτήσεις στον τρόπο πολλαπλασιασμού τους άρα μπορούμε να υποθέσουμε για μια κοινή μηχανιστική στο φαινόμενο αυτό.

Η παρατηρούμενη ταλαντωτική συμπεριφορά, σε όλες τις κυτταρικές σειρές, υποδεικνύει το εξής γεγονός. Ενώ παρατηρούμε έναν αριθμό κυττάρων να αυξάνεται, στην πραγματικότητα ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων αυξομειώνεται. Οι μετρήσεις μας έδειξαν ότι τόσο η ταχύτητα όσο και η επιτάχυνση είναι δύο μεγέθη που μεταβάλλονται με το χρόνο και μάλιστα σε μορφή

ταλάντωσης. Αυτό το γεγονός μας φέρνει στην επόμενη παρατήρηση. Μπορούμε να υποθέσουμε ότι αντίστοιχα λειτουργεί και η γονιδιακή έκφραση; Μάλιστα αν αυτή η υπόθεση είναι αληθής τα κύτταρα κινούνται με ώσεις, και για να το πούμε με πιο τεχνικό όρο σε κβάντα. Δεν είναι δηλαδή συνεχείς αλλά διακριτή. Πρέπει πιθανόν για κάθε κυτταρική διαίρεση να ολοκληρώνεται πρώτα μια μικρότερη ταλαντωτική πορεία των γονιδίων που ρυθμίζουν την κυτταρική διαίρεση. Όπως είδαμε επίσης αυτό που τελικά ήταν σημαντικό δεν ήταν ο τελικός αριθμός των κυττάρων που είχε το ενδιαφέρον (μιας και τα κύτταρα με τον ένα ή τον άλλο τρόπο θα αναπτύσσονταν) αλλά το φάσμα του ρυθμού πολλαπλασιασμού, που διαπιστώθηκε από τη μελέτη με τους μετασχηματισμούς.

Πρέπει στο σημείο αυτό να θυμηθούμε ότι όλα τα διαγράμματα των κυτταρικών πληθυσμών έδειξαν την ύπαρξη δύο συναρτήσεων. Αυτό ήταν αποτέλεσμα του ότι η τελική μετασχηματιζόμενη συνάρτηση αποτελείτο από δύο υπο-συναρτήσεις. Με βάση τα παραπάνω μπορούμε να διατυπώσουμε ένα θεώρημα:

Θεώρημα: ένας κυτταρικός πληθυσμός περνάει υποχρεωτικά από ταλαντωτική πορεία κατά τον πολλαπλασιασμό του λόγω της αναγκαστικής ταλαντωτικής έκφρασης των γονιδίων. Δηλαδή η κυτταρική διαίρεση είναι κβαντισμένη, όπως και η γονιδιακή έκφραση.

Για να ερμηνεύσουμε τα παραπάνω φαινόμενα θα προχωρήσουμε σε μια ακόμα ερμηνεία με βάση τη θεωρία των παιγνίων, αν και εφόσον υποθέσουμε ότι *υπάρχουν* παίγνια στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Ας επαναδιατυπώσουμε το πρόβλημα. Υπάρχουν N παίκτες (κύτταρα), οι οποίοι με δεδομένους τους πόρους του περιβάλλοντος (χώρος και τροφή) θέλουν όλοι να πολλαπλασιαστούν. Αυτό αυτομάτως μας τοποθετεί σε μια κατάσταση ανταγωνισμού διότι η κατανάλωση πόρων από μια ομάδα παικτών σημαίνει αυτόματα λιγότερους πόρους για τους υπόλοιπους. Κατά συνέπεια θεωρούμε ως καταλληλότερο μοντέλο περιγραφής το ανταγωνιστικό παίγνιο. Στο παίγνιο αυτό στα κύτταρα, ορίζουμε ότι έχουν τις εξής στρατηγικές επιλογές:

i. Να παραμείνουν όλα ανενεργά ήτοι στη G_1/G_0 φάση, να μην πολλαπλασιαστούν και να περιμένουν απλά μέχρι να τελειώσει ο πόρος-τροφή. Εναλλακτικά μια ακριβώς ισοδύναμη στρατηγική θα ήταν να αποφασίσουν να περάσουν όλοι στο μηχανισμό της απόπτωσης (*cell death CD*), όπου κανείς δεν θα πολλαπλασιασθεί εις βάρος ενός άλλου. Στις περιπτώσεις αυτές, <u>και μόνο σε αυτές</u>, έχουμε μια **καθαρή ισορροπία *Nash***, μιας και κανείς από τους παίκτες δεν έχει όφελος ή ζημία περισσότερο από τον άλλο. Εδώ μπαίνει και ένας νέος παράγοντας. Η στρατηγική αυτή δεν είναι μόνο μια ισορροπία Nash αλλά είναι και η **ενεργειακά πιο συμφέρουσα επιλογή**, μιας και απαιτούνται οι λιγότεροι πόροι για τη διατήρησή της. Αυτομάτως ερχόμαστε στο θέμα της θερμοδυναμικής ισορροπίας στην

οποία βρίσκεται το σύστημα πόροι-παίκτες. Επίσης αν τα κύτταρα επιλέξουν την παραμονή στην G_1/G_0 φάση έχουν τη χαμηλότερη εντροπία στη ζωντανή κατάσταση, ενώ αν επιλέξουν την απόπτωση η εντροπία τείνει στο μηδέν. Άρα καταλαβαίνουμε ότι έχουμε την πρώτη ζεύξη μεταξύ των ισορροπιών Nash και της θερμοδυναμικής ισορροπίας. Δεν θα αναλύσουμε περαιτέρω το συγκεκριμένο ζήτημα μιας και αποτελεί από μόνο του μια αυτόνομη εργασία, αρκετά περίπλοκη για να ξεδιπλωθεί σε μια υποενότητα.

ii. Μέρος από αυτά να περάσουν στη σύνθεση χρωματίνης, ήτοι στην *S* φάση, που είναι ο προθάλαμος του πολλαπλασιασμού και να καταναλώσουν περισσότερους πόρους από τους υπόλοιπους (οι υπόλοιποι παίκτες παραμένουν στην G_1/G_0).

iii. Μέρος από αυτά να περάσουν στη G_2 φάση, ήτοι στον προθάλαμο της μίτωσης και κατά συνέπεια στον πολλαπλασιασμό, και να καταναλώσουν περισσότερους πόρους από τους υπόλοιπους.

iv. Μέρος εξ αυτών να προχωρήσουν στο μηχανισμό της απόπτωσης (*CD*), αφήνοντας περισσότερους πόρους για τους υπόλοιπους και

v. Να περάσουν όλοι οι παίκτες (τα κύτταρα) σε διαδικασία πολλαπλασιασμού, ήτοι στην *S* φάση και μετέπειτα στη G_2 φάση, φτάνοντας γρηγορότερα σε εξάλειψη των πόρων. Στην περίπτωση αυτή, αν υποθέταμε ότι οι πόροι είναι ανεξάντλητοι (όπως π.χ. σε μια in vivo κατάσταση) τότε και εδώ έχουμε **ισορροπία *Nash***, αφού όλοι οι παίκτες έχουν το ίδιο όφελος.

Ας διατυπώσουμε τα παραπάνω με πιο συστηματικό τρόπο:

Έστω σ οι διαθέσιμες στρατηγικές, όπου $\sigma=\{1,2,\ldots,n\}$. Έστω p_{jk} το όφελος (*payoff*) για τον παίκτη που επιλέγει τη στρατηγική *j* έναντι εκείνου που επιλέγει τη στρατηγική *k* ($j,k\in\sigma$). Έστω επίσης N_j, ο πληθυσμός που επιλέγει τη στρατηγική j δηλαδή είναι $N_j(t)$ και 1- $N_j(t)$ είναι ο πληθυσμός που επιλέγει τη στρατηγική *k*. Ορίζουμε ως όφελος ή αμοιβή το βαθμό προσαρμογής στο περιβάλλον και το υπολογίζουμε ως τον αριθμό νέων κυττάρων ανά μονάδα χρόνου. Οπότε ισχύει:

$$\frac{dN_j(t)}{dt} = N_j(t)\,p_{jk}\,,$$ **Εξίσωση 32**

Τα πράγματα γίνονται πιο ενδιαφέροντα όταν παρατηρήσουμε ότι η παραπάνω συνάρτηση προσομοιάζει μια τροποποιημένη μορφή της συνάρτησης *Lotka-Voltera*, την οποία έχουμε αναφέρει και αναλύσει σε προηγούμενες αναφορές μας (Lambrou, Chatziioannou et al. 2009; Lambrou, Zaravinos et al. 2012).

Πρώτον, ως αποτέλεσμα των παραπάνω παρατηρήσεων μπορούμε να διατυπώσουμε μια σχέση μεταξύ της θερμοδυναμικής κατάστασης στο κυτταρικό σύστημα και της ισορροπίας *Nash*:

Θεώρημα: *Μια ισορροπία Nash, είναι ανεξάρτητη της εντροπίας του συστήματος και της θερμοδυναμικής του ισορροπίας.*

Δεύτερον, μήπως αυτό μας φέρνει κατά νου τα συστήματα, στα οποία μελετήσαμε την περιοδικότητα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού;

Θα μπορούσαμε να πούμε ότι k, που είναι ο μη-γραμμικός παράγοντας πολλαπλασιασμού, είναι ίσος με $p_{j,k}$.

Άρα μπορούμε να γράψουμε:

$N_{t+1}=N_t p_{j,k}=N_t k$, **Εξίσωση 69**

Άρα καταλαβαίνουμε ότι η αναδρομική συνάρτηση της σιγμοειδούς καμπύλης γίνεται αυτομάτως και μια συνάρτηση παιγνίων. Με την παρατήρηση αυτή και ως εκ τούτου το συμπέρασμα που εξήχθη από τις πειραματικές διατάξεις συμφωνούν και άλλες εργασίες, όπως αυτή των *Chen et al.* (2008) (Chen, Hambrock et al. 2008) και των *Delgado et al.* (2009) (Delgado, Montenegro et al. 2009). Από τις εργασίες αυτές αναφέρθηκε ότι η δυναμική της πληθυσμιακής ανάπτυξης εξελίσσεται σε ανταγωνιστικό παίγνιο. Το συμπέρασμα αυτό είναι λογικό μιας και δεδομένων των περιορισμένων πόρων η κυτταρική διαίρεση είναι άμεσα εξαρτώμενη από αυτούς. Έχει βέβαια ενδιαφέρον να σημειώσουμε ότι οι προηγούμενες αναφορές επεξεργάσθηκαν την περίπτωση ανταγωνισμού μεταξύ δύο πληθυσμών που ανταγωνίζονται για τους ίδιους πόρους και οι αρχικοί πληθυσμοί ήταν ήδη σε μια ισορροπία, ήτοι η μελέτη τους αφορούσε στα ανταγωνιστικά παίγνια κατά την ήδη εγκατεστημένη ύπαρξη τους. Η παρούσα εργασία ήρθε να προσθέσει κάποια γνώση στο θέμα αυτό μεταφέροντας το βάρος σε κυτταρικούς πληθυσμούς και υπό μικρούς αρχικούς αριθμούς, πολύ πριν δηλαδή υπάρξει οποιαδήποτε ισορροπία στο υπό μελέτη σύστημα. Φαίνεται όμως από όλα τα συμπεράσματα ότι εν γένει η αναπτυξιακή δυναμική ακολουθεί παρόμοιους κανόνες. Σε μια πολύ ενδιαφέρουσα εργασία φάνηκε ότι η δυναμική του πολλαπλασιασμού ακολουθεί παίγνια και μάλιστα αποδείχθη ότι σε ορισμένες περιπτώσεις είναι παίγνια μηδενικού αθροίσματος (Masuda 2008). Στην παρούσα εργασία δεν παρατηρήσαμε παίγνια μηδενικού αθροίσματος.

Στην ίδια εργασία αναφέρεται ότι η δυναμική βιολογικών συστημάτων ακολουθεί ταλαντώσεις μη-γραμμικής φύσεως, γεγονός που συνάδει με τα ευρήματα της παρούσης εργασίας. Όπως φάνηκε και από τα ευρήματά μας η δυναμική του κυτταρικού πολλαπλασιασμού έδειξε την ύπαρξη μη-γραμμικών φαινομένων.

Σε συνέχεια των παραπάνω παρατηρήσεων, όπως είδαμε στην ενότητα των αποτελεσμάτων, δημιουργήσαμε ένα μοντέλο πολλαπλασιασμού, το οποίο προσομοίωνε την ανάπτυξη ενός όγκου σε *in vitro* συνθήκες. Στο βαθμό που γνωρίζουμε δεν υπάρχουν αντίστοιχα μοντέλα στη βιβλιογραφία και ως εκ τούτου αυτό είναι το πρώτο του είδους του. Η βασική διατύπωση που προέκυψε από το μοντέλο αυτό ήταν ότι η μεταβολές του κυτταρικού πληθυσμού μπορούσαν να περιγραφούν από τη

συνάρτηση $N_{p_x,t+1} = N_{p_y,t}k_y + N_{p_z,t}k_z$, που περιγράψαμε στο Κεφάλαιο 27. Οι παράγοντες k_y και k_z είναι μη-γραμμικοί και δίνουν μια πιθανή εξήγηση για την ταλαντωτική συμπεριφορά που παρατηρήσαμε στη μετάβαση των πληθυσμών. Η πρώτη παρατήρηση που θα μπορούσαμε να κάνουμε είναι ότι σε όλες τις κυτταρικές σειρές που μελετήσαμε παρατηρήθηκε μεταβολή των πληθυσμών, ήτοι των κυττάρων στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου, με ταλαντωτική συμπεριφορά. Η δεύτερη παρατήρηση είναι ότι υπήρχαν διαφορετικές μορφές των καμπυλών για κάθε κυτταρική σειρά. Το ερώτημα που μένει να απαντήσουμε είναι αν υπάρχει ένας κοινός τόπος για όλες αυτές τις παρατηρήσεις. Σε αυτό το ερώτημα μια πιθανή απάντηση είναι η μαθηματική διατύπωση που περιγράψαμε προηγουμένως. Παρά το γεγονός ότι τα γραφήματα κάθε κυτταρικής σειράς ήταν διαφορετικά, θα μπορούσαμε να πούμε ότι αποτελούν γράφους ίδιας συνάρτησης διαφοροποιούμενη ως προς τους συντελεστές της. Αυτό φάνηκε με πολύ ενδιαφέροντα τρόπο όταν προσομοιώσαμε την παραπάνω συνάρτηση σε ένα γράφο (γράφημα) τριών διαστάσεων (**Εικόνα 175**), όπου φάνηκε η ύπαρξη ταλαντώσεων μεταξύ δύο υπο-πληθυσμών κυττάρων σε χρόνο *t* και ενός υπο-πληθυσμού σε χρόνο *t+1*. Μέσα από το γράφημα αυτό φάνηκε επίσης ότι η συνάρτηση αυτή είχε μη-γραμμική μορφή. Τελικό στάδιο στην ανάλυση της πολλαπλασιαστικής δυναμικής ήταν η μελέτη χρονοσειρών. Οι πειραματικές διατάξεις που ακολουθήσαμε αφορούσαν στη διατήρηση κυτταρικών πληθυσμών στην καλλιέργεια με στόχο τη μελέτη της επίδρασης του χρόνου στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Από τις πρώτες παρατηρήσεις ήταν η επιβεβαίωση ότι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού ακολουθεί ταλαντώσεις. Παρόμοια συμπεριφορά σε χρονοσειρές έχει αναφερθεί σε κύτταρα ηπατώματος (Wolfrom, Chau et al. 2000) ενώ στο βαθμό που γνωρίζουμε, η μελέτη των χρονοσειρών σε κύτταρα του ΚΝΣ και λευχαιμικά κύτταρα γίνεται για πρώτη φορά. Ειδικότερα για τα λευχαιμικά κύτταρα, όπως δείξαμε, παρουσιάστηκε μη-γραμμική συμπεριφορά και μάλιστα τέτοια που να πληρεί ένα μεγάλο μέρος των κριτηρίων της μη-γραμμικότητας.

Ενδιαφέρον εύρημα αποτέλεσε η διερεύνηση της ύπαρξης διάστασης *fractal* στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Το εύρημα, ότι η πολλαπλασιαστική δυναμική έχει διάσταση 1, όση δηλαδή και τα σχήματα *Cantor*, έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον μιας και δίνει μια νέα πληροφορία για το μηχανισμό της κυτταρικής διαίρεσης. Επίσης το εύρημα αυτό δίνει ένα ακόμα στοιχείο για την περιοδικότητα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε όλους τους κυτταρικούς τύπους. Στο βαθμό που γνωρίζουμε δεν υπάρχουν αντίστοιχες αναφορές για τις δομές fractal, που εμφανίζονται σε κυτταρικές χρονοσειρές τόσο για το ΚΝΣ όσο και για τα λευχαιμικά κύτταρα. Υπάρχουν δύο αναφορές για τη χρήση του δείκτη fractal με στόχο την ταυτοποίηση της διάγνωσης σε όγκους του ΚΝΣ (Martin-Landrove, Pereira et al. 2007) και την ταυτοποίηση του καρδιακού ρυθμού σε έμβρυα (Shono, Shono et al. 2001).

Οι τομείς αυτοί της έρευνας έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον αφού δεν έχουν διερευνηθεί αρκετά και πιθανότατα να αποτελούν μια επιλυτική προσέγγιση στα περίπλοκα βιολογικά φαινόμενα.

Αφού εξετάσαμε τη δυναμική των κυτταρικών πληθυσμών ως επόμενο εύλογο βήμα θα ήταν η διερεύνηση μέρους του μοριακού μηχανισμού πίσω από αυτόν. Όπως αναφέραμε στην ενότητα των αποτελεσμάτων, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός είναι σαφώς κατευθυνόμενος από τη γονιδιακή έκφραση και την ενδεχόμενη ρύθμισή του. Από αυτή τη γνώση προκύπτουν τα ερωτήματα, ποιες σηματοδοτικές οδοί είναι κρίσιμες για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, και ποιες σηματοδοτικές οδοί είναι κρίσιμες για την ανταπόκριση των κυττάρων σε συνθήκες στρες;

Οι αναστολείς και φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα Prednisolone ανταγωνιστής του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR), Trichostatin A (TSA) αναστολέας των ενζύμων Histone Deacetylase I και II, MG132 αναστολέας του πρωτεασώματος, Chloroquine (CQ) αναστολέας των λυσοσωμάτων, Rapamycin αναστολέας της σηματοδοτικής οδού mTOR, PI3K Inhibitor (*LY294002*) αναστολέας της PI3K κινάσης, Bay11 αναστολέας του IκB που αποτελεί τμήμα της σηματοδοτικής οδού IκB/NFκB και τέλος ο παράγοντας SP600, που είναι αναστολέας της JNK κινάσης.

Η χρήση γλυκοκορτικοειδούς στα κύτταρα έδειξε ότι είχε μιτωτική δράση. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με μια πληθώρα αναφορών για τον κίνδυνο που ενέχει η χρήση των στεροειδών κατά τις νεοπλασίες του ΚΝΣ (Dietrich, Rao et al. 2011; Guirguis, Cheung et al. 2012). Φαίνεται λοιπόν ότι ο GR ενισχύει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Σε συνέχεια αυτού του ευρήματος, η πειραματική μας διάταξη έδειξε ότι όχι μόνο δεν επιδρά αρνητικά στα κύτταρα αλλά μετά από ένα ισχυρό στρες έλλειψης πόρων, τα σώζει και επιταχύνουν τον πολλαπλασιασμό τους. Αν θυμηθούμε προηγούμενα ευρήματα για τον τρόπο που τα κύτταρα «θυμούνται» το περιβάλλον τους θα δούμε ότι υπό την επίδραση στεροειδούς έχουμε άρση της μνήμης αυτής (όπως φαίνεται μάλιστα και από το πείραμα ελέγχου) και τα κύτταρα συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται με τον ίδιο τρόπο όπως και στην αρχική πειραματική διάταξη.

Όπως προαναφέραμε ο στόχος του πειράματος αυτού δεν ήταν να βρει σηματοδοτικές οδούς που συμμετέχουν στον πολλαπλασιασμό, αλλά χρησιμοποιώντας μια ανάστροφη λογική, να βρει ποιες οδοί δεν είναι απαραίτητοι ή απολύτως απαραίτητοι στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Από τα ευρήματα μας φάνηκε ότι τέσσερες οδοί είναι απολύτως απαραίτητοι στα κύτταρα και μάλιστα σε όλους τους τύπους που μελετήθηκαν. Το συμπέρασμα αυτό προέκυψε από τη δράση που είχαν οι ανάλογοι αναστολείς στα υπό μελέτη κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα οι αναστολείς που παρουσίασαν το μεγαλύτερο ποσοστό αποπτώσεως σε όλους τους κυτταρικούς τύπους ήταν τα TSA, CQ, Bay11 και MG132. Για την TSA έχει ήδη αναφερθεί η δράση της στους όγκους του ΚΝΣ και έχει δειχθεί ότι είναι αποτελεσματική σε αυτά τα νεοπλάσματα (Rahman, Osteso-Ibanez et al. 2010). Ο πιθανός λόγος που έχει αναφερθεί για αυτή τη λειτουργία είναι η υπερμεθυλίωση των ιστονών που λαμβάνει χώρα κατά τα στάδια της ογκογένεσης στο ΚΝΣ (Dyer, Schooler et al. 2011).

Ένας πολύ ενδιαφέρον παράγων ήταν η CQ. Το φάρμακο αυτό αρχικά είχε βρεθεί και χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της ελονοσίας (Krafts, Hempelmann et al. 2012). Φάνηκε στη συνέχεια ότι ήταν και αναστολέας της αυτοφαγίας (Kim, Wustenberg et al. 2010). Η αυτοφαγία με τη σειρά της έχει δειχθεί ότι είναι ένας μηχανισμός επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων και άμυνας απέναντι στα χημειοθεραπευτικά (Fan and Weiss 2011; Hu, DeLay et al. 2012). Με βάση τις πειραματικές μας διατάξεις, τα κύτταρα που μελετήσαμε πέραν της επώασης με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες είχαν και το στρες της έλλειψης πόρων. Θα μπορούσαμε λοιπόν να θεωρήσουμε ότι ως φυσικός μηχανισμός αντίδρασης θα ήταν η ενεργοποίηση της αυτοφαγίας για την επιβίωσή τους. Η δράση όμως της CQ, αναστέλλοντας τη λειτουργία αυτή οδηγεί τα κύτταρα αυτά σε απόπτωση. Μια πρόσφατη αναφορά επιβεβαίωσε την υπόθεση αυτή, όπου αναφέρθηκε ότι η CQ αναστέλλει την αυτοφαγία χωρίς όμως στην περίπτωση των κυττάρων που μελέτησαν να προκαλείται ευρύς κυτταρικός θάνατος (Levy and Thorburn 2012). Η παρατηρήσεις αυτές μας φέρνουν στο προσκήνιο του ενεργειακού ισοζυγίου του κυττάρου, το οποίο θα μπορούσε να αποτελέσει ένα πιθανό στόχο για τη θεραπεία των νεοπλασιών του ΚΝΣ.

Ένας πολύ ενδιαφέρον παράγοντας ήταν το Bay11. Το μόριο αυτό είναι έμμεσος αναστολέας του παράγοντα NFκB. Εμποδίζοντας τη φωσφορυλίωση του IκB, του μορίου που ελέγχει την είσοδο του NFκB στον πυρήνα, ουσιαστικά αποτρέπει τον τελευταίο να εισέλθει στον πυρήνα και να λειτουργήσει διασωστικά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Για το ρόλο του παράγοντα αυτού υπάρχει μόνο μια αναφορά, όπου έχει δειχθεί ότι το μόριο αυτό ρυθμίζει το γονίδιο TIMP2 και κατ' επέκταση το γονίδιο MMP2, το οποίο συσχετίζεται με τον παράγοντα NFκB (Wisniewski, Ellert-Miklaszewska et al. 2010). Τα ευρήματά μας έδειξαν ότι ο ρόλος του αναστολέα Bay11 ήταν καταλυτικός στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μάλιστα οδήγησε όλους τους κυτταρικούς τύπους που μελετήθηκαν σε απόπτωση τόσο κατά την πρώτη φάση των πειραμάτων όσο και κατά τη δεύτερη.

Ο τελευταίος παράγοντας που φάνηκε να είναι ιδιαίτερα κρίσιμος ήταν ο MG132. Ο παράγοντας αυτός αποτελεί έναν αναστολέα του πρωτεασώματος. Συσχετίζεται δε με το μηχανισμό της αυτοφαγίας (ήτοι την ανακύκλωση των μορίων του ίδιου του κυττάρου) και της επιβίωσης του κυττάρου στη φυσιολογική διαδικασία (Seol 2011). Ταυτοχρόνως, μια υπόθεση που σχηματίσαμε ήταν ότι η δράση του παράγοντα MG132 ενδέχεται να συσχετίζεται με την έμμεση αναστολή της αυτοφαγίας. Η αναστολή του οργανιδίου αυτού πιθανόν να οδηγεί έμμεσα σε αναστολή της αυτοφαγίας. Επιπλέον σε μια αναφορά φάνηκε ότι υπάρχει ένας τέτοιος μηχανισμός, ο οποίος ενεργοποιείται με την ύπαρξη υποξίας (Kimura, Imaizumi et al. 2002). Δεν υπάρχουν πολλές αναφορές για το ρόλο του παράγοντα αυτού στους όγκους του ΚΝΣ. Έχει πάντως αναφερθεί ότι επάγει την απόπτωση στους όγκους του ΚΝΣ μέσω επίδρασης στον NFκB (Zanotto-Filho, Braganhol et al. 2011).

Αφού αναφερθήκαμε προηγουμένως στην εμφάνιση του ενεργειακού ισοζυγίου και δεδομένων των διαφορών που είδαμε στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μεταξύ ίδιων αρχικών πληθυσμών αλλά διαφορετικών όγκων θρεπτικού υλικού μελετήσαμε το ενεργειακό ισοζύγιο κατά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε όλους τους προαναφερόμενους κυτταρικούς τύπους. Η μελέτη αυτή έγινε έμμεσα αφού μελετήσαμε την παραγωγή του NADH μορίου και ως εκ τούτου την κατανάλωση των μορίων γλυκόζης. Όπως αναφέραμε στην ενότητα «Υλικό και Μέθοδος» καθώς και στην ενότητα των «Αποτελεσμάτων» Κεφάλαιο 28, υπάρχει μια γραμμική συσχέτιση μεταξύ της παραγωγής NADH και της κατανάλωσης γλυκόζης.

Θα εστιάσουμε στο γεγονός ότι παρατηρήσαμε μεγαλύτερη κατανάλωση γλυκόζης σε μεγαλύτερους όγκους θρεπτικού σε σχέση με τους μικρότερους και υπό τον ίδιο αρχικό αριθμό κυττάρων. Τη βασική υπόθεση για το φαινόμενο αυτό τη δώσαμε στις προηγούμενες σελίδες αυτής της ενότητας. Με βάση τα ευρήματά μας αυτή η υπόθεση αποτελεί μια πολύ βάσιμη αιτιολογία για την συμπεριφορά των κυττάρων. Οι μόνοι παράγοντες που διαφοροποιούνται από το μικρότερο προς το μεγαλύτερο όγκο θρεπτικού είναι είτε συγκεντρώσεις παρακρινών σηματοδοτικών μορίων (που είναι ανάλογοι του όγκου του θρεπτικού) είτε η πίεση. Αν ισχύει η πρώτη υπόθεση τότε οι παράγοντες αυτοί λειτουργούν ανασταλτικά προς τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις και επαγωγικά σε μικρότερες συγκεντρώσεις.

Εξαιρετικά ενδιαφέρον εύρημα είναι ότι όταν μελετήσουμε μεμονωμένα την κατανάλωση γλυκόζης βλέπουμε ότι όλα τα κύτταρα, σε όλους τους όγκους θρεπτικού και σε όλους τους αρχικούς αριθμούς παρουσιάζει ένα τοπικό μέγιστο γύρω στις 60 ώρες επώασης. Επίσης ενδιαφέρον έχει ο τρόπος που μεταβάλλεται η κατανάλωση της γλυκόζης που είναι ταλαντωτικός. Άρα καταλαβαίνουμε ότι ο τρόπος που τα κύτταρα χρησιμοποιούν το ενεργειακό τους ισοζύγιο είναι όμοιος με τη διαφορά ότι αλλάζουν τα επίπεδα της χρησιμοποιούμενης ενέργειας. Από όσο γνωρίζουμε μέχρι σήμερα, δεν υπάρχουν αντίστοιχες εργασίες που να αναφέρονται στο φαινόμενο αυτό, δηλαδή τη σχέση πόρων, αρχικού αριθμού κυττάρων και πολλαπλασιασμού.

Είναι πάντως βέβαιο ότι η παραμονή για τα κύτταρα σε μεγάλο όγκο θρεπτικού είναι ενεργειακά πιο δαπανηρή σε σχέση με την παραμονή σε μικρότερο όγκο θρεπτικού. Αν σε αυτό συνδέσουμε και τα παίγνια που προαναφέραμε θα δούμε ότι δεν συσχετίζεται η ενεργειακή επάρκεια με τις στρατηγικές που ακολουθούν τα κύτταρα (παίκτες). Θα περιμέναμε σε λιγότερους πόρους τα κύτταρα να παρέμεναν πιο συγκρατημένα ενώ σε πλεόνασμα πόρων πιο «σπάταλα». Αντιθέτως οι στρατηγικές που επιλέγονται είναι θερμοδυναμικά και ενεργειακά οι μη-συμφέρουσες.

Εν γένει, τα ευρήματα αυτά και ειδικότερα η ταλαντωτική μορφή της παραγωγής NADH ενισχύουν τις προηγούμενες διατυπώσεις για το διακριτό (κβαντισμένο) χαρακτήρα της πολλαπλασιαστικής δυναμικής. Το φαινόμενο αυτό έχει εξαιρετικό ενδιαφέρον και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Όπως διατυπώσαμε στην αρχική μας τοποθέτηση, οι αλλαγές στην κατάσταση ενός κυτταρικού συστήματος επάγουν αλλαγές στο περιβάλλον του και κατά συνέπεια αλλαγές στις ηλεκτροχημικές και ηλεκτροφυσικές ιδιότητες του περιβάλλοντος μέσου. Επιδιώξαμε να κάνουμε μετρήσεις αυτών των μεταβλητών αλλά δεν παρατηρήσαμε σημαντικά αποτελέσματα. Αυτό είναι πολύ πιθανό να οφείλεται στην ευαισθησία των οργάνων μέτρησης που χρησιμοποιήσαμε και όχι στην ορθότητα της αρχικής υπόθεσης. Θα μπορούσαμε όμως να σταθούμε σε μια παρατήρηση, όπου φάνηκε μια αλλαγή στην εμπέδηση και διηλεκτρική σταθερά του μέσου (θρεπτικού υλικού) συναρτήσει του χρόνου. Η παρατήρηση αυτή αφορούσε στη γραμμική αύξηση της εμπέδησης στο θρεπτικό υλικό και την αντίστοιχη μείωση της διηλεκτρικής στο ίδιο σύστημα, χωρίς όμως σημαντικές διαφορές μεταξύ του θρεπτικού χωρίς κύτταρα και αυτού με κύτταρα. Το αντικείμενο αυτό καθώς και η υπόθεση αυτή χρήζουν ιδιαίτερης διερεύνησης μιας και η πιθανή ορθότητα τους αποτελεί ένα σημαντικό εύρημα και μια σημαντική εφαρμογή για τη μελέτη του καρκινικού μικροπεριβάλλοντος.

Τελευταίος σταθμός στην ανάλυση της πολλαπλασιαστικής δυναμικής και κατά συνέπεια στους δείκτες που την ρυθμίζουν είναι η γονιδιακή διερεύνηση του φαινομένου. Με βάση τα δεδομένα που αναφέρθηκαν στην ενότητα των «Αποτελεσμάτων» Κεφάλαιο 30, προσπαθήσαμε αρχικά να απαντήσουμε ορισμένα ερωτήματα. Σε ένα γονιδίωμα ποια είναι τα χαρακτηριστικά γονίδια για κάθε κυτταρικό τύπο; Ποιες είναι οι ομοιότητες στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την σηματοδότηση κατά αυτόν; Ποιο είναι το κοινό εκφραστικό προφίλ μεταξύ νεοπλασιών διαφορετικών τύπων και τέλος ποιες οδοί είναι κοινές στους διαφορετικούς τύπους κυττάρων κατά τον πολλαπλασιασμό; Οι κυτταρικοί τύποι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν διαφορετικής προέλευσης. Ειδικότερα για τα λευχαιμικά κύτταρα και τα κύτταρα ραβδομυοσαρκώματος παρά το ότι και τα δύο είναι μεσοδερμικής προέλευσης είναι διαφορετικής τελικής διαφοροποίησης. Το να κατανοήσουμε την προέλευση των νεοπλασιών στο επίπεδο της «ποίησης» δηλαδή της οντογένεσης του αρχικού ιστού ίσως μας οδηγήσει στην επίλυση του φαινομένου και την δημιουργία θεραπευτικών παραγόντων (Brown, Hulitt et al. 2007).

Από τις παραπάνω παρατηρήσεις αλλά και τη γενικότερη ιδέα της εργασίας αυτής μπορούμε να υποθέσουμε ότι πίσω από τους μηχανισμούς της ογκογένεσης και οντογένεσης των νεοπλασμάτων προκύπτει η ύπαρξη ενός κοινού μηχανιστικού πλαισίου για αυτά. Η ανάλυσή μας έδειξε 35 γονίδια στόχους που συμμετέχουν στο μονοπάτι cytokine/cytokine-receptor pathway. Οι κυτοκίνες είναι σημαντικά μόρια που παίζουν ρόλο κατά την αιμοποίηση και τη φλεγμονή. Ειδικότερα οι γ-interleukins έχουν αναφερθεί ότι συμμετέχουν στη διαφοροποίηση των Τ-κυττάρων και επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Barata, Keenan et al. 2004). Έχει επίσης δειχθεί ότι τόσο τα νεοπλασματικά αιματολογικά κύτταρα όσο και τα φυσιολογικά χρησιμοποιούν την ίδια σηματοδότηση για να επάγουν τον πολλαπλασιασμό και διαφοροποίησή τους (Kiss, Benko et al.

2004). Στην ανάλυσή μας φάνηκε ότι τα κύτταρα CCRFCEM και TE671 χρησιμοποιούν από κοινού τους υποδοχείς των κυτοκινών IL8, IL9 και IL2.

Οι δύο κυτταρικοί τύποι στους οποίους αναφερθήκαμε έχουν κοινό προφίλ για το γονίδιο LIFR. Η πρωτεΐνη LIFR συμμετέχει στην εμφύτευση του εμβρύου στα θηλαστικά, στη διαφοροποίηση των νευρικών αρχέγονων κυττάρων προς αστροκύτες (de la Iglesia, Konopka et al. 2008), όπως επίσης στη μετατροπή του μεσεγχυματικού ιστού σε επιθηλιακό (Yoshino, Monkawa et al. 2003). Ο ρόλος της πρωτεΐνης LIFR έχει αναφερθεί ότι συνδέεται με το σύμπλεγμα PTEN-Akt-FOXO και τον παράγοντα STAT3 (de la Iglesia, Konopka et al. 2008). Στο βαθμό που γνωρίζουμε δεν υπάρχουν αναφορές για το ρόλο του LIFR σε λευχαιμικά και ραβδομυοσαρκωματικά κύτταρα. Περαιτέρω, η ανάλυση μας έδειξε ότι τα κυτταρικά συστήματα έχουν από κοινού δύο εκκριτικά μόρια τα PDGFB και VEGFC, καθώς και τους υποδοχείς MET και FLT3. Το γονίδιο PDGF ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και έχει βρεθεί ότι υπερ-εκφράζεται στη B-χρόνια λευχαιμία (Ho, Hsu et al. 2005). Επίσης έχει αναφερθεί ότι οι παράγοντες VEGF και PDGF εμπλέκονται στη νέο-αγγειογένεση στα έμβρυα και σε νεοπλάσματα (Karamysheva 2008). Έχει επίσης αναφερθεί ότι τα ραβδομυοσαρκώματα εκφράζουν τους υποδοχείς για τους παράγοντες IGF και PDGF (Blandford, Barr et al. 2006). Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι οι κυτταρικοί τύποι που μελετήσαμε χρησιμοποιούν κοινές οδούς σηματοδότησης για τον πολλαπλασιασμό τους.

Ένα άλλο ενδιαφέρον σηματοδοτικό σχήμα που προέκυψε ήταν αυτό της οδού Jak-STAT/MAPK. Το μονοπάτι αυτό ξεκινάει με τις interleukins IL2, IL8, IL9 και τους αντίστοιχους υποδοχείς τους. Η σηματοδότηση αυτή φάνηκε να είναι κοινή στα κυτταρικά συστήματα που μελετήσαμε. Ο υποδοχέας των interleukins προσδένεται στην κινάση JAK, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει τον παράγοντα STAT1 (Kisseleva, Bhattacharya et al. 2002; Levy and Darnell 2002; Rogers, Horvath et al. 2003). Ο παράγοντας STAT1 παραμένει στο κυτταρόπλασμα μέχρι να ενεργοποιηθεί από την κινάση JAK. Επόμενο βήμα στη σηματοδότηση είναι η μεταφορά στον πυρήνα του STAT1 και η μεταγραφή φάσματος γονιδίων. Οι παράγοντες STAT1 και STAT5B εκφράζονται από τα κυτταρικά συστήματα που μελετήσαμε και επίσης φαίνεται ότι χρησιμοποιούνται από κοινού. Επίσης ενδιαφέρον ήταν το εύρημα ότι και τα δύο κυτταρικά συστήματα εκφράζουν το γονίδιο PIAS2 (PIASxalpha) γνωστό παράγοντα αναστολής του STAT1, που δρα ως E3 ligase (Rogers, Horvath et al. 2003). Όταν ο STAT1 μετατίθεται στον πυρήνα αλληλεπιδρά με τον παράγοντα histone acetyltransferase (CREB-binding protein) (Korzus, Torchia et al. 1998) και τον NF-κB ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία της μεταγραφής (Hiroi and Ohmori 2003). Το τμήμα αυτό της οδού Jak-STAT έχει τη δυνατότητα να ξεκινήσει τη μεταγραφή και να επάγει τον πολλαπλασιασμό. Από την άλλη μεριά υπάρχει εναλλακτική οδός επαγωγής του πολλαπλασιασμού, που είναι μέσω της ενεργοποίησης της οδού MAPK και μέσω των πρωτεϊνών tyrosine phosphatases και της οδού Ras/MAPK (So, Oh et al. 2007). Η ενεργοποίηση μέσω της οδού Ras/MAPK συμπεριλαμβάνει

την έναρξη της σηματοδότησης μέσω των PDGFA και PDGFB, που και οι δύο εκφράζονται στα κυτταρικά συστήματα που εξετάσαμε, ενεργοποίηση του HRAS και μετέπειτα ενεργοποίηση του συμπλόκου RAF/MAPK/ERK (Dorsey, Cunnick et al. 2002). Κατόπιν τούτων των ενεργοποιήσεων, λαμβάνει χώρα ο σχηματισμός της πρωτεΐνης RPS6KA3, που ανήκει στην οικογένεια των serine/threonine kinases και σηματοδοτεί ως ενδιάμεσος κρίκος στην οδό Ras/Raf/MAPK (Delaunoy, Abidi et al. 2001). Η RPS6KA3 αλληλεπιδρά με το μεταγραφικό παράγοντα CREB και οδηγεί σε γονιδιακή ρύθμιση γονιδίων σχετικών με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Πέραν των οδών που περιγράψαμε, υπάρχει και τρίτη εναλλακτική οδός, που αφορά στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα Elk-1 από την κινάση ERK. Ο παράγοντας Elk-1 φωσφορυλιώνεται από τις κινάσες MAP (Yang, Shore et al. 1999) και σχηματίζει σύμπλοκο με τον μεταγραφικό παράγοντα SRF (Sharrocks 2001; Shaw and Saxton 2003). Ο SRF προσδένεται σε γονιδιακούς προαγωγείς που έχουν στην αλληλουχία τους τα Serum Response Elements (SREs). Η ενεργοποίηση αυτή οδηγεί στην έκφραση των γνωστών immediate early (IE) γονιδίων. Τέτοια γονίδια είναι το c-FOS και ο EGR-1 (Zhang, Li et al. 2008). Δύο επίσης ενδιαφέροντα γονίδια που φάνηκαν να εκφράζονται στα κυτταρικά συστήματα που μελετήσαμε ήταν τα TGF-beta και p38. Το γονίδιο TGF-beta ενεργοποιεί μέλη της οδού MAPK, όπως το c-JUN, το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί την stress-activated kinase p38 (Engel, McDonnell et al. 1999; Hocevar, Brown et al. 1999; Hu, Shen et al. 1999; Yue and Mulder 2000). Η κινάση p38 είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά με τον παράγοντα Elk-1 και τον ATF-2 (Raingeaud, Gupta et al. 1995; Price, Cruzalegui et al. 1996; Raingeaud, Whitmarsh et al. 1996; Whitmarsh, Yang et al. 1997).

Η μηχανισμοί που περιγράψαμε φάνηκε ότι βρίσκονται από κοινού και λειτουργούν από κοινού στα λευχαιμικά και ραβδομυοσαρκωματικά κύτταρα. Στο βαθμό που γνωρίζουμε δεν υπάρχουν αναφορές για τα κύτταρα TE671, ενώ κάποιο εκ των μηχανισμών αυτών είναι γνωστοί για τα λευχαιμικά κύτταρα. Επίσης δεν υπάρχουν αναφορές για την κοινή λειτουργική των μοριακών μηχανισμών που περιγράψαμε στους τύπους κυττάρων που μελετήσαμε.

Ένας άλλος παράγοντας που μελετήσαμε ήταν ο κυτταρικός κύκλος. Μια οδός κλειδί στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου είναι η οδός MAPK. Αναλόγως της ρύθμισης της οδού MAPK, ο κυτταρικός κύκλος λαμβάνει σήματα προκειμένου να ξεκινήσει ή να σταματήσει. Στα κύτταρα που μελετήσαμε φάνηκε ότι η σηματοδότηση στην οδό MAPK συνάδει προς την ενεργοποίηση του κυτταρικού κύκλου και μάλιστα με γονίδια που λειτουργούν από κοινού στους κυτταρικούς τύπους. Ειδικότερα για τα κύτταρα CCRFCEM και TE671 φάνηκε ότι ο κυτταρικός κύκλος ακολουθούσε μια χρονοεξαρτώμενη μετάβαση από τη φάση G1- προς την S με τη G2 να παραμένει ουσιαστικά σταθερή. Είναι γνωστό ότι η σειρά CCRF-CEM έχει ανενεργή το TP53 (Strasser-Wozak, Hartmann et al. 1998), και ως εκ τούτου αδυνατεί να αλληλεπιδράσει με το PCNA. Η έκφραση του PCNA είναι συνδεδεμένη με τη μετάβαση στην S-φάση (Tonkinson, Marder et al. 1997) κάτι που

συμφωνεί με τα ευρήματά μας, αφού το γονίδιο είναι υπερ-εκφρασμένο στα λευχαιμικά κύτταρα, τα οποία προχωρούν πιο γρήγορα προς την S-φάση από ότι τα κύτταρα TE671.

Για να κατανοήσουμε καλύτερα τη λειτουργία της γονιδιακής ρύθμισης δημιουργήσαμε ένα μοντέλο προσομοίωσης των σηματοδοτικών οδών που προαναφέραμε. Τα μοντέλα αυτά περιελάμβαναν τις οδούς JAK-STAT-MAPK-TGFb. Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι τα γονίδια JAK1, STAT1, PIAS2 και CDK4 αποτελούν κοινούς γονιδιακούς στόχους ανάμεσα σε δύο διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους. Είδαμε στην ενότητα των «Αποτελεσμάτων» ότι η έκφραση και συν-έκφραση των γονιδίων αυτών οδηγείται σε αύξουσα ταλαντωτική συμπεριφορά τείνουσα στο άπειρο. Η συμπεριφορά αυτή τα κάνει πιθανούς στόχους ογκογενετικής δυναμικής (Oncogenic Drivers). Διάφοροι γονιδιακοί στόχοι έχουν αναφερθεί ως στόχοι ογκογενετικής δυναμικής, όπως οι πρωτεΐνες PRDM, οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών SET (domain family of histone methyltransferases) (Fog, Galli et al.). Παρόμοιες αναφορές έχουν δείξει την ύπαρξη τέτοιων γονιδίων στο γλοιοβλάστωμα, όπου είχε βρεθεί ένας μετα-μεταγραφικός ρυθμιστικός μηχανισμός αποτελούμενος από περισσότερα από 248,000 microRNA (miR). Άλλες αναλύσεις σε κυτταρικές σειρές έδειξαν ότι δίκτυα ογκογενετικής δυναμικής επάγουν τον καρκινικό πολλαπλασιασμό. Τέτοια γονίδια έχουν βρεθεί να είναι μεταξύ άλλων τα PTEN, PDGFRA, RB1, VEGFA, STAT3 και RUNX1 (Sumazin, Yang et al.). Οι αναφορές αυτές συμφωνούν με τα ευρήματά μας καθώς φάνηκε ότι γονίδια όπως VEGF, PDGF και STAT προβλέφθηκαν σαν πιθανοί στόχοι.

Οι παρατηρήσεις αυτές φέρνουν κατά νου το ρόλο των μεταλλάξεων, μιας και είναι ο παράγοντας που θεωρείται ο κατ' εξοχήν σημαντικός για την ογκογένεση. Είναι γενικά αποδεκτό ότι οι μεταλλάξεις αποτελούν τους παράγοντες ογκογενετικής δυναμικής. Πάρα ταύτα, σε μια πρόσφατη αναφορά χρησιμοποιήθηκε ο όρος "backseat drivers" (Futreal 2007), όπου φαινόταν ότι οι μεταλλάξεις δεν είναι η ικανή και αναγκαία συνθήκη για να δημιουργηθεί νεοπλασία. Η αναφορά αυτή συμφωνεί με τα ευρήματά μας και για να ονομάσουμε το φαινόμενο αυτό του δώσαμε τον τίτλο "genes gone crazy". Από τις αναλύσεις μας φάνηκε, ότι ορισμένες φορές η γονιδιακή έκφραση μπορεί να οδηγηθεί σε μη-προβλεπόμενα επίπεδα. Αυτό με τη σειρά του μπορεί να οδηγήσει το κυτταρικό σύστημα εκτός των ορίων, που αναφέραμε στην αρχή της παρούσης ενότητας. Με άλλα λόγια τα γονίδια αυτά έχουν τη δυνατότητα να οδηγήσουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και κυτταρικό κύκλο πέραν του φυσιολογικού. Ως εκ τούτου, μια «παρεμβολή» και όχι μια μετάλλαξη μπορεί να γίνει το αίτιο της ογκογένεσης. Στο βαθμό που γνωρίζουμε δεν έχει αναφερθεί ο ρόλος και η μη-γραμμική φύση των γονιδίων JAK, STAT και PIAS2. Πάρα ταύτα, έχει αναφερθεί ότι η οικογένεια των γονιδίων CDK ακολουθούν μη-γραμμική δυναμική κατά τη λειτουργία τους στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.

Αφού εξετάσαμε τη γονιδιακή ρύθμιση και κοινή έκφραση σε δεδομένη χρονική στιγμή δύο κυτταρικών τύπων, προχωρήσαμε στην ανάλυση του χρονικού φάσματος της γονιδιακής έκφρασης.

Όπως αναφέραμε στην ενότητα των «Αποτελεσμάτων», δώσαμε ιδιαίτερη σημασία στην ανάλυση των δεδομένων των *in vitro* πειραματικών διατάξεων. Η γονιδιακή ταξινόμηση έδωσε αρκετά ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Θα μπορούσαμε να διαχωρίσουμε τα αποτελέσματα αυτά σε τρεις βασικές κατηγορίες. Η πρώτη αφορά γονίδια των οποίων η έκφραση βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα κατά τα πρώτα στάδια του πολλαπλασιασμού και αυξάνεται στο τελευταίο στάδιο (π.χ. συστάδες 2 και 4 Error! Reference source not found.). Τα γονίδια αυτά θα μπορούσαμε να τα παρομοιάσουμε με μόρια κλειδιά κατά την *in vivo* συνθήκη, τα οποία χρησιμοποιούνται σε διάφορους τύπους νεοπλασιών ως διαγνωστικοί παράγοντες. Αυτά τα μόρια όμως δεν αποτελούν ενδιαφέρον αντικείμενο μιας και η ταυτοποίησή τους ουσιαστικά έρχεται σε πολύ καθυστερημένο χρόνο για την πορεία της νόσου και του ασθενούς. Αντίστοιχα η δεύτερη ομάδα γονιδίων που παρατηρούμε αφορά σε γονίδια που αυξάνονται κατά τα ενδιάμεσα στάδια του πολλαπλασιασμού. Αυτά τα γονίδια, σε μια *in vivo* κατάσταση θα αφορούσαν τα μόρια που ενεργοποιούνται κατά τα ενδιάμεσα στάδια της ανάπτυξης και αποτελούν ενδιαφέροντα μόρια για την πρόβλεψη στόχων (π.χ. συστάδες 15 και 24 Error! Reference source not found.). Τέλος, η τρίτη ομάδα που έχει ενδιαφέρον αφορά σε γονίδια, που βρίσκονται σε αυξημένα επίπεδα κατά τα αρχικά στάδια του πολλαπλασιασμού και μειώνονται σημαντικά στο τελευταίο στάδιο του πολλαπλασιαστικού μοντέλου. Τα γονίδια αυτά είναι εκείνα, που ενδεχομένως δεν μπορεί η σημερινή διάγνωση να ανιχνεύσει. Είναι δηλαδή μόρια που ενώ είναι εξαιρετικά σημαντικά για την πορεία της νόσου, δεν λαμβάνονται υπόψη λόγω του ότι δεν χρησιμοποιούνται από το νεόπλασμα για τη λειτουργία του ή τουλάχιστον δεν χρησιμοποιούνται σε τέτοιο βαθμό ώστε να είναι ταυτοποιήσιμα (π.χ. συστάδες 17 και 32-36 Error! Reference source not found.). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης του πολλαπλασιαστικού μοντέλου ως προς τη γονιδιακή έκφραση για τα κύτταρα A172 παρουσιάζεται στην **Εικόνα 253**. Παρόμοια ανάλυση ακολούθησε και για τους άλλους κυτταρικούς τύπους που μελετήθηκαν και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Error! Reference source not found. για τα κύτταρα TE671 και στην Error! Reference source not found. για τα κύτταρα 1321N1.

Έχοντας ορίσει το γονιδιακό προφίλ που εξετάσαμε μπορούμε με βάση αυτό να διερευνήσουμε τα κοινά γονίδια που χρησιμοποιούνται από τους κυτταρικούς τύπους και εφόσον αυτά φυσικά υπάρχουν. Την ανάλυση αυτή την παρουσιάσαμε στην Error! Reference source not found., όπου παρουσιάσαμε το διάγραμμα Venn, που αφορά στην ένωση των γονιδίων των επιμέρους πειραματικών διατάξεων για τη χωρο-χρονική μεταβολή τους.

Η ανάλυση αυτή έδωσε 20 κοινά γονίδια που χρησιμοποιούνται κατά τον ίδιο τρόπο από τα κύτταρα κατά τα στάδια του πολλαπλασιασμού. Τα γονίδια αυτά ήταν τα ADAMTS13, ATP10A, CCDC144B, CCNDBP1, FAM154A, IPO8, IRAK3, KIAA0240, LOC100132622, MEGF9, NXPH2, OR6S1, PDE3B, PIKFYVE, RCCD1, RFX6, RIN3, RNF208, SYTL1 και ZNF84. Το γονίδιο ADAMTS13 (ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 13) είναι

μέλος της οικογένειας των γονιδίων ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif). Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για ένα ένζυμο που ονομάζεται *von Willebrand Factor* (vWF)-*cleaving protease*, το οποίο είναι υπεύθυνο για την πρωτεόλυση των αμινοξέων Tyr842-Met843 του μορίου *vWF*. Έχει αναφερθεί ότι βρίσκεται μειωμένο σε νεοπλασίες του ΚΝΣ αλλά χωρίς διαφοροποίηση μεταξύ καλοήθων και κακοήθων όγκων (Bohm, Gerlach et al. 2003). Το γονίδιο ATP10A (ATPase, class V, type 10A) κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των *P-type cation transport ATPases* και στην υπο-οικογένεια των *aminophospholipid-transporting ATPases*. Δεν υπάρχουν αναφορές για το γονίδιο ATP10A και τη σχέση του με τους όγκους του ΚΝΣ. Η παρούσα αναφορά αποτελεί την πρώτη λειτουργική προσέγγιση του γονιδίου αυτού. Το γονίδιο CCDC144B (coiled-coil domain containing 144B (pseudogene)) είναι ένα από τα άγνωστα γονίδια για τα οποία δεν έχει ταυτοποιηθεί κάποια λειτουργία. Δεν υπάρχουν αναφορές για το γονίδιο CCDC144B και η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη λειτουργική ταυτοποίηση του γονιδίου. Το γονίδιο CCNDBP1 (cyclin D-type binding-protein 1) ανακαλύφθηκε από την αλληλεπίδρασή του με το την πρωτεΐνη του γονιδίου GRAP2, που είναι απαραίτητο για τη λειτουργία της ανοσοποιητικής αντίδρασης και μετάδοσης σήματος. Επίσης το γονίδιο CCNDBP1 αλληλεπιδρά με τη *cyclin D*. Η πρωτεΐνη του γονιδίου αυτού συνδέεται με το μόριο *helix-loop-helix protein E12* και είναι γνωστό ότι λειτουργεί ως ανασταλτικός παράγων στη γονιδιακή έκφραση του ήπατος. Επίσης δεν υπάρχουν αναφορές για τη σχέση του γονιδίου αυτού με τους όγκους του ΚΝΣ. Το γονίδιο FAM154A (family with sequence similarity 154, member A) αποτελεί επίσης έναν άγνωστο μέχρι σήμερα παράγοντα. Το γονίδιο IPO8 (importin 8), το σύμπλεγμα *importin-alpha/beta* και το μόριο *GTPase Ran* συμμετέχουν στην εισαγωγή πρωτεϊνών στον πυρήνα του κυττάρου. Δεν υπάρχουν αναφορές για τη σχέση του γονιδίου αυτού με τους όγκους του ΚΝΣ. Το γονίδιο IPO8 κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη η οποία προσδένεται στους πόρους της κυτταρικής μεμβράνης μαζί με τις πρωτεΐνες RanGTP και RANBP1, αναστέλλουν την επαγωγή του μορίου GAP του συμπλόκου Ran GTPase. Έχει δειχθεί ότι το γονίδιο αυτό αποτελεί έναν στόχο γονιδίου-ελέγχου στα νεοπλάσματα του ΚΝΣ, μιας και φαίνεται ότι δεν μεταβάλλεται η έκφρασή του στους όγκους του ΚΝΣ (Kreth, Heyn et al. 2010). Το γονίδιο IRAK3 (interleukin-1 receptor-associated kinase 3) κωδικοποιεί μέλος της οικογένειας *interleukin-1 receptor-associated kinase protein family*. Τα μόρια αυτά είναι απαραίτητα στη σηματοδότηση της οδού Toll/IL-R. Το μόριο αυτό λειτουργεί ως βασικός αναστολέας της οδού *Toll-like receptor*. Δεν υπάρχουν αναφορές για το ρόλο του γονιδίου IRAK3 στις νεοπλασίες του ΚΝΣ. Το γονίδιο KIAA0240 (GLTSCR1-like) αποτελεί έναν άγνωστο παράγοντα αναφορικά με τη λειτουργία του. Το γονίδιο GLTSCR1 έχει αναφερθεί ότι έχει πολυμορφισμούς στις νεοπλασίες του ΚΝΣ και ειδικότερα στα γλοιώματα και μηνιγγιώματα (Wrensch, Kelsey et al. 2005; Yang, Kollmeyer et al. 2005; McKean-Cowdin, Barnholtz-Sloan et al. 2009; Rajaraman, Hutchinson et al. 2010). Το γονίδιο LOC100132622 (hypothetical LOC100132622) αφορά σε μια

αλληλουχία νουκλεοτιδίων η οποία δεν έχει ακόμα ταυτοποιηθεί για τη λειτουργία της. Το γονίδιο MEGF9 (multiple EGF-like-domains 9) αποτελεί ένα ελάχιστα μελετημένο μόριο. Είναι πάντως γνωστό ότι εκφράζεται κυρίως στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα και δεν είναι γνωστές περαιτέρω λειτουργίες του. Έχει όμως ενδιαφέρον το γεγονός ότι αποτελείται από πολλαπλά μέρη που προσομοιάζουν τον παράγοντα EGF και επίσης αποτελεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, κάτι που παραπέμπει στη διακυτταρική επικοινωνία. Δεν υπάρχουν άλλες αναφορές για το ρόλο του γονιδίου αυτού στους όγκους του ΚΝΣ. Το γονίδιο NXPH2 (neurexophilin 2) κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη, η οποία είναι μια νευρωνική γλυκοπρωτεΐνη της οποίας ο ρόλος έχει ταυτοποιηθεί ως προ-συναπτικό μόριο στις νευρωνικές συνάψεις (Missler and Sudhof 1998). Το γονίδιο OR6S1 (olfactory receptor, family 6, subfamily S, member 1) κωδικοποιεί έναν υποδοχέα, ο οποίος ενεργοποιείται από πτητικά μόρια (Malnic, Godfrey et al. 2004). Έχει βρεθεί ότι οι υποδοχείς αυτοί ξεκινούν το νευρικό ερέθισμα από τη μύτη και συμμετέχουν στην οδό σηματοδότησης προς τον εγκέφαλο. Τα μόρια αυτά είναι μέλη της υπερ-οικογένειας *G-protein-coupled receptors* (GPCR). Αποτελούν διαμεμβρανικούς υποδοχείς και η δομή τους προσομοιάζει αυτή των υποδοχέων των νευροδιαβιβαστών και ορμονών (Malnic, Godfrey et al. 2004). Το γονίδιο PDE3B (phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited) κωδικοποιεί για ένα μόριο ομοιοστασίας του ενεργειακού ισοζυγίου (Degerman, Ahmad et al. 2011; Sahu, Litvin et al. 2011). Επίσης μια ενδιαφέρουσα αναφορά συνδέει το γονίδιο PDE3B με τη λειτουργία της ουβικιτινίωσης, που είναι συνυφασμένη με την ανακύκλωση των πρωτεϊνών (Wagner, Beli et al. 2011). Το γονίδιο PIKFYVE (phosphoinositide kinase, FYVE finger containing) κωδικοποιεί για ένα μόριο, το οποίο ρυθμίζει τις κυτταροσκελετικές λειτουργίες, μετάδοση σήματος μέσω υποδοχέων και κυτταρικές και ενδοπλασματικές μεμβράνες. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για ένα ένζυμο (PIKfyve: phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase type III or PIPKIII), το οποίο φωσφορυλιώνει τη θέση D-5 της οικογένειας των πρωτεϊνών PtdIns και phosphatidylinositol-3-phosphate (PtdIns3P) προς δημιουργία των μορίων PtdIns5P και PtdIns(3,5)biphosphate (Hazeki, Nigorikawa et al. 2012). Έχει επίσης ιδιαίτερο ενδιαφέρον το γεγονός ότι το γονίδιο αυτό συμμετέχει στη διαδικασία εμφύτευσης του εμβρύου σε θηλαστικά (Ikonomov, Sbrissa et al. 2011). Το γονίδιο RCCD1 (RCC1 domain containing 1) είναι μια πολύ ενδιαφέρουσα περίπτωση και αποτελεί παράγοντα που συμμετέχει στο σύστημα Πρωτεασώματος-Ουβικιτινίωσης (Ubiquitinin-Proteasome System UPS) (Havugimana, Hart et al. 2012; Udeshi, Mani et al. 2012). Ενδεχομένως το μόριο αυτό, χρησιμοποιούμενο από όλους τους κυτταρικούς τύπους να αποτελεί ένα σημαντικό στόχο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Δεδομένου ότι τα κύτταρα που μελετήθηκαν παρουσίασαν όλα ευαισθησία στην αναστολή του πρωτεασώματος το μόριο αυτό αποτελεί ένα σημαντικό μόριο-στόχο για περαιτέρω μελέτη. Δεν υπάρχουν αναφορές για το ρόλο του γονιδίου στους όγκους του ΚΝΣ. Το γονίδιο RFX6 (regulatory factor X, 6) κωδικοποιεί μια πυρηνική πρωτεΐνη που είναι μέλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων *regulatory factor X* (RFX) (Taleb and

Polychronakos 2011). Το γονίδιο RIN3 (Ras and Rab interactor 3) παρουσιάζει μια ιδιαίτερη ενδοκυτταρική εναπόθεση (Kajiho, Sakurai et al. 2011). Έχει βρεθεί ότι εκφράζεται στα κύτταρα HeLa και βρίσκεται σε κυτταροπλασματικά θυλάκια (*RIN3-positive vesicles*). Ο ρόλος της πρωτεΐνης RIN3 φαίνεται ότι είναι σημαντικός στην ενεργοποίηση και σταθεροποίηση του συμπλέγματος GTP-Rab5 διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στη μεταφορά μορίων από την κυτταρική μεμβράνη προς τα πρώιμα ενδοσωμάτια (Kajiho, Saito et al. 2003; Yoshikawa, Kajiho et al. 2008; Kajiho, Sakurai et al. 2011). Το γονίδιο RNF208 (ring finger protein 208) δεν έχει ταυτοποιηθεί για συγκεκριμένες λειτουργίες. Πάρα ταύτα έχει φανεί ότι συμμετέχει στην ουβικιτινίωση των πρωτεϊνών (Rual, Venkatesan et al. 2005; Woodsmith, Jenn et al. 2012). Το γονίδιο SYTL1 (synaptotagmin-like 1) έχει δειχθεί ότι συμμετέχει σε λειτουργίες της αιμόστασης και ρύθμισης των αιμοπεταλίων αφού συνδέεται με την πρωτεΐνη Rap1GAP2, που είναι παράγοντας της αιμόστασης (Neumuller, Hoffmeister et al. 2009). Επίσης έχει φανεί ότι αποτελεί ένα στόχο των φυτοοιστρογόνων και βρίσκεται στην κατηγορία των γονιδίων που μεθυλιώνονται από αυτά (Sato, Yamakawa et al. 2011). Δεν υπάρχουν αναφορές για το γονίδιο αυτό και το ρόλο του στους όγκους του ΚΝΣ. Το γονίδιο ZNF84 (zinc finger protein 84) ανήκει στην οικογένεια των zinc finger οι οποίες είναι οι πιο πολυπληθέστερες πρωτεΐνες στο ευκαρυωτικό γένωμα (Assou, Cerecedo et al. 2009). Οι λειτουργίες των πρωτεϊνών αυτών είναι πολυπληθείς και περιλαμβάνουν την αναγνώριση DNA αλληλουχιών, RNA packaging, μεταγραφική ενεργοποίηση, ρύθμιση της απόπτωσης, αναδίπλωση πρωτεϊνών και πρόσδεση λιπιδίων (Rosati, Rocchi et al. 2001; de Andrade, Peterson et al. 2006).

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια της δημιουργίας ενός νέου μοντέλου μελέτης της πολλαπλασιαστικής δυναμικής με στόχο την κατανόηση του φαινομένου της δυναμικής που παρουσιάζουν τα νεοπλασματικά κύτταρα, και ειδικότερα αυτά του ΚΝΣ, από τη στιγμή της εμφάνισης τους μέχρι τη διάγνωση. Φάνηκε ότι υπήρχε ένα κοινό προφίλ στον τρόπο πολλαπλασιασμού από την άποψη της πολλαπλασιαστικής δυναμικής αφού όλα τα κυτταρικά συστήματα που μελετήθηκαν παρουσίασαν μη-γραμμικής φύσεως ταλαντωτική συμπεριφορά καθώς και την ανάπτυξη στρατηγικών κατά την ανάπτυξή τους. Αντίστοιχα παρόμοια στη γονιδιακή έκφραση παρουσιάστηκαν γονίδια, τα οποία από κοινού εκφράζονται και ενδεχομένως αποτελούν ένα κοινό υπόβαθρο ρύθμισης της πρώιμης γονιδιακής ρύθμισης κατά τον πολλαπλασιασμό.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alizadeh, A. A. and L. M. Staudt (2000). "Genomic-scale gene expression profiling of normal and malignant immune cells." Curr Opin Immunol **12**(2): 219-25.

Alligood, K. T., T. D. Sauer, et al. (2000). CHAOS-An Introduction to Dynamical Systems. New York, Springer-Verlag New York Inc.

Androutsos, G. and A. Diamantis (2007). "Paul Broca (1824-1880): founder of anthropology, pioneer of neurology and oncology." J Buon **12**(4): 557-64.

Armstrong, S. A., J. E. Staunton, et al. (2002). "MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia." Nat Genet **30**(1): 41-7.

Asami, K., Y. Takahashi, et al. (1989). "Dielectric properties of mouse lymphocytes and erythrocytes." Biochim Biophys Acta **1010**(1): 49-55.

Assou, S., D. Cerecedo, et al. (2009). "A gene expression signature shared by human mature oocytes and embryonic stem cells." BMC Genomics **10**: 10.

Ausserlechner, M. J., P. Obexer, et al. (2004). "Cyclin D3 and c-MYC control glucocorticoid-induced cell cycle arrest but not apoptosis in lymphoblastic leukemia cells." Cell Death Differ **11**(2): 165-74.

Axelrod, R., D. E. Axelrod, et al. (2006). "Evolution of cooperation among tumor cells." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(36): 13474-9.

Bach, L. A., S. M. Bentzen, et al. (2001). "An evolutionary-game model of tumour-cell interactions: possible relevance to gene therapy." Eur J Cancer **37**(16): 2116-20.

Badiali, M., A. Pession, et al. (1991). "N-myc and c-myc oncogenes amplification in medulloblastomas. Evidence of particularly aggressive behavior of a tumor with c-myc amplification." Tumori **77**(2): 118-21.

Baldus, C. D. and L. Bullinger (2008). "Gene expression with prognostic implications in cytogenetically normal acute myeloid leukemia." Semin Oncol **35**(4): 356-64.

Baldwin, R. T. and S. Preston-Martin (2004). "Epidemiology of brain tumors in childhood--a review." Toxicol Appl Pharmacol **199**(2): 118-31.

Bammler, T., R. P. Beyer, et al. (2005). "Standardizing global gene expression analysis between laboratories and across platforms." Nat Methods **2**(5): 351-6.

Barata, J. T., T. D. Keenan, et al. (2004). "Common gamma chain-signaling cytokines promote proliferation of T-cell acute lymphoblastic leukemia." Haematologica **89**(12): 1459-67.

Barkla, D. H. and P. R. Gibson (1999). "The fate of epithelial cells in the human large intestine." Pathology **31**(3): 230-8.

Barnes, D., R. Belcher, et al. (1967). "Identification of electrolysis products at the dropping mercury electrode by submicro-analysis and flame-ionization detection." Talanta **14**(10): 1197.

Begg, A. C. (2012). "Predicting recurrence after radiotherapy in head and neck cancer." Semin Radiat Oncol **22**(2): 108-18.

Belda-Iniesta, C., J. de Castro Carpeno, et al. (2006). "Molecular biology of malignant gliomas." Clin Transl Oncol **8**(9): 635-41.

Bennet, J. (1845). "Case of hypertrophy of the spleen and liver, in which death took place from suppuration of the blood." Edinb Med Surg J **64**: 413-423.

Berger, H. (1933). "Ueber das Elektrenkephalogramm des Menschen." Archiv fuer Psychiatrie und Nervenkrankheiten **99**(1): 555-574.

Bhatia, K., W. Goldschmidts, et al. (1993). "Hemi- or homozygosity: a requirement for some but not other p53 mutant proteins to accumulate and exert a pathogenetic effect." Faseb J **7**(10): 951-6.

Blandford, M. C., F. G. Barr, et al. (2006). "Rhabdomyosarcomas utilize developmental, myogenic growth factors for disease advantage: a report from the Children's Oncology Group." Pediatr Blood Cancer **46**(3): 329-38.

Bohm, M., R. Gerlach, et al. (2003). "ADAMTS-13 activity in patients with brain and prostate tumors is mildly reduced, but not correlated to stage of malignancy and metastasis." Thromb Res **111**(1-2): 33-7.

Brazma, A., P. Hingamp, et al. (2001). "Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data." Nat Genet **29**(4): 365-71.

Brown, V. I., J. Hulitt, et al. (2007). "Thymic stromal-derived lymphopoietin induces proliferation of pre-B leukemia and antagonizes mTOR inhibitors, suggesting a role for interleukin-7Ralpha signaling." Cancer Res **67**(20): 9963-70.

Buis, R. and J. Luck (2006). "[The notion of the internal and external limitations of monotonic growth functions. A reformulation of the logistic equation]." C R Biol **329**(11): 880-91.

Cario, G., A. Fetz, et al. (2008). "Initial leukemic gene expression profiles of patients with poor in vivo prednisone response are similar to those of blasts persisting under prednisone treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia." Ann Hematol **87**(9): 709-16.

Causton, H. C. and L. Game (2003). "MGED comes of age." Genome Biol **4**(12): 351.

Chan, S. (2004). "Targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR): a new approach to treating cancer." Br J Cancer **91**(8): 1420-4.

Chautan, M., G. Chazal, et al. (1999). "Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway." Curr Biol **9**(17): 967-70.

Chen, H. B., L. Z. Zhou, et al. (2012). "Gambogenic acid-induced time- and dose-dependent growth inhibition and apoptosis involving Akt pathway inactivation in U251 glioblastoma cells." J Nat Med **66**(1): 62-9.

Chen, P. M., Z. J. Gombart, et al. (2011). "Chloroquine treatment of ARPE-19 cells leads to lysosome dilation and intracellular lipid accumulation: possible implications of lysosomal dysfunction in macular degeneration." Cell Biosci **1**(1): 10.

Chen, T. R., C. Dorotinsky, et al. (1989). "Cell identity resolved." Nature **340**(6229): 106.

Chen, X., R. Hambrock, et al. (2008). "Evolution of conditional dispersal: a reaction-diffusion-advection model." J Math Biol **57**(3): 361-86.

Choe, G., S. Horvath, et al. (2003). "Analysis of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway in glioblastoma patients in vivo." Cancer Res **63**(11): 2742-6.

Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-9.

Chou, C. C., C. H. Chen, et al. (2004). "Optimization of probe length and the number of probes per gene for optimal microarray analysis of gene expression." Nucleic Acids Res **32**(12): e99.

Churchill, G. A. (2002). "Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays." Nat Genet **32 Suppl**: 490-5.

Ciccarone, V., B. A. Spengler, et al. (1989). "Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages." Cancer Res **49**(1): 219-25.

Cohen, M., A. Meisser, et al. (2006). "Involvement of MAPK pathway in TNF-alpha-induced MMP-9 expression in human trophoblastic cells." Mol Hum Reprod **12**(4): 225-32.

Coulter, W. (1956). High speed automatic blood cell counter and size analyzer. Proc. Natl. Electronics Conf.

Croce, C. M., J. Erikson, et al. (1984). "Translocated c-myc oncogene of Burkitt lymphoma is transcribed in plasma cells and repressed in lymphoblastoid cells." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(10): 3170-4.

Crosland-Taylor, P. J. (1953). "A device for counting small particles suspended in a fluid through a tube." Nature **171**(4340): 37-8.

de Andrade, T. G., K. R. Peterson, et al. (2006). "Identification of novel candidate genes for globin regulation in erythroid cells containing large deletions of the human beta-globin gene cluster." Blood Cells Mol Dis **37**(2): 82-90.

de la Iglesia, N., G. Konopka, et al. (2008). "Identification of a PTEN-regulated STAT3 brain tumor suppressor pathway." Genes Dev **22**(4): 449-62.

de Reynies, A., D. Geromin, et al. (2006). "Comparison of the latest commercial short and long oligonucleotide microarray technologies." BMC Genomics **7**: 51.

Deb, P., M. C. Sharma, et al. (2006). "Expression of CD34 as a novel marker for glioneuronal lesions associated with chronic intractable epilepsy." Neuropathol Appl Neurobiol **32**(5): 461-8.

Debye, P. (1929). Polar Molecules. New York, Dover.

Degenhardt, K., R. Mathew, et al. (2006). "Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis." Cancer Cell **10**(1): 51-64.

Degerman, E., F. Ahmad, et al. (2011). "From PDE3B to the regulation of energy homeostasis." Curr Opin Pharmacol **11**(6): 676-82.

Delaunoy, J., F. Abidi, et al. (2001). "Mutations in the X-linked RSK2 gene (RPS6KA3) in patients with Coffin-Lowry syndrome." Hum Mutat **17**(2): 103-16.

Delgado, M., M. Montenegro, et al. (2009). "A Lotka–Volterra symbiotic model with cross-diffusion." Journal of Differential Equations **246**(5): 2131-2149.

Den Boer, M. L., D. O. Harms, et al. (2003). "Patient stratification based on prednisolone-vincristine-asparaginase resistance profiles in children with acute lymphoblastic leukemia." J Clin Oncol **21**(17): 3262-8.

DeRisi, J., L. Penland, et al. (1996). "Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer." Nat Genet **14**(4): 457-60.

DeRisi, J. L., V. R. Iyer, et al. (1997). "Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale." Science **278**(5338): 680-6.

Dhanasekaran, S. M., T. R. Barrette, et al. (2001). "Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer." Nature **412**(6849): 822-6.

Diehn, M., A. A. Alizadeh, et al. (2000). "Examining the living genome in health and disease with DNA microarrays." Jama **283**(17): 2298-9.

Dietrich, J., K. Rao, et al. (2011). "Corticosteroids in brain cancer patients: benefits and pitfalls." Expert Rev Clin Pharmacol **4**(2): 233-42.

Dittrich, W. and W. Gohde (1969). "[Impulse fluorometry of single cells in suspension]." Z Naturforsch B **24**(3): 360-1.

Dorris, D. R., A. Nguyen, et al. (2003). "Oligodeoxyribonucleotide probe accessibility on a three-dimensional DNA microarray surface and the effect of hybridization time on the accuracy of expression ratios." BMC Biotechnol **3**: 6.

Dorsey, J. F., J. M. Cunnick, et al. (2002). "Regulation of the Erk2-Elk1 signaling pathway and megakaryocytic differentiation of Bcr-Abl(+) K562 leukemic cells by Gab2." Blood **99**(4): 1388-97.

Draghici, S., P. Khatri, et al. (2006). "Reliability and reproducibility issues in DNA microarray measurements." Trends Genet **22**(2): 101-9.

Drummond, D. C., C. O. Noble, et al. (2005). "Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents." Annu Rev Pharmacol Toxicol **45**: 495-528.

Dyer, L. M., K. P. Schooler, et al. (2011). "The transglutaminase 2 gene is aberrantly hypermethylated in glioma." J Neurooncol **101**(3): 429-40.

Dyson, J., R. Villella-Bressan, et al. (2007). "Asymptotic behaviour of solutions to abstract logistic equations." Math Biosci **206**(2): 216-32.

Eckel, J. E., C. Gennings, et al. (2005). "Normalization of two-channel microarray experiments: a semiparametric approach." Bioinformatics **21**(7): 1078-83.

Egot-Lemaire, S., J. Pijanka, et al. (2009). "Dielectric spectroscopy of normal and malignant human lung cells at ultra-high frequencies." Phys Med Biol **54**(8): 2341-57.

Einstein, A. (1905). "Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen [AdP 17, 549 (1905)]." Annalen der Physik **14**(S1): 182-193.

Eisen, M. B. and P. O. Brown (1999). "DNA arrays for analysis of gene expression." Methods Enzymol **303**: 179-205.

Elledge, S. J. (1996). "Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis." Science **274**(5293): 1664-72.

Elving, P. J. (1967). "Jaroslav Heyrovsky, 1890-1967." Anal Chim Acta **38**(4): 473.

Engel, M. E., M. A. McDonnell, et al. (1999). "Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription." J Biol Chem **274**(52): 37413-20.

Erikstein, B. S., H. R. Hagland, et al. (2010). "Cellular stress induced by resazurin leads to autophagy and cell death via production of reactive oxygen species and mitochondrial impairment." J Cell Biochem **111**(3): 574-84.

Ernst, L. A., R. K. Gupta, et al. (1989). "Cyanine dye labeling reagents for sulfhydryl groups." Cytometry **10**(1): 3-10.

Fan, Q. W. and W. A. Weiss (2011). "Autophagy and Akt promote survival in glioma." Autophagy **7**(5): 536-8.

Fare, T. L., E. M. Coffey, et al. (2003). "Effects of atmospheric ozone on microarray data quality." Anal Chem **75**(17): 4672-5.

Fiaschetti, G., D. Castelletti, et al. (2011). "Bone morphogenetic protein-7 is a MYC target with prosurvival functions in childhood medulloblastoma." Oncogene **30**(25): 2823-35.

Fodor, S. P., J. L. Read, et al. (1991). "Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis." Science **251**(4995): 767-73.

Fog, C. K., G. G. Galli, et al. "PRDM proteins: Important players in differentiation and disease." Bioessays.

Foley, G. E., H. Lazarus, et al. (1965). "Continuous Culture of Human Lymphoblasts from Peripheral Blood of a Child with Acute Leukemia." Cancer **18**: 522-9.

Freije, W. A., F. E. Castro-Vargas, et al. (2004). "Gene expression profiling of gliomas strongly predicts survival." Cancer Res **64**(18): 6503-10.

Fulwyler, M. J. (1965). "Electronic separation of biological cells by volume." Science **150**(698): 910-1.

Futreal, P. A. (2007). "Backseat drivers take the wheel." Cancer Cell **12**(6): 493-4.

Garrett, R. H. and P. H. D. Charles M Grisham (2012). Biochemistry, Brooks/Cole.

Gatenby, R. A. and T. L. Vincent (2003). "An evolutionary model of carcinogenesis." Cancer Res **63**(19): 6212-20.

Gaynon, P. S. and A. L. Carrel (1999). "Glucocorticosteroid therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia." Adv Exp Med Biol **457**: 593-605.

Ghosh, S., S. Elankumaran, et al. (2011). "Mathematical model of the role of intercellular signalling in intercellular cooperation during tumorigenesis." Cell Prolif **44**(2): 192-203.

Giard, D. J., S. A. Aaronson, et al. (1973). "In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors." J Natl Cancer Inst **51**(5): 1417-23.

Gibelli, N., C. Zibera, et al. (1989). "Hormonal modulation of brain tumour growth: a cell culture study." Acta Neurochir (Wien) **101**(3-4): 129-33.

Gillespie, D. and S. Spiegelman (1965). "A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane." J Mol Biol **12**(3): 829-42.

Gilmore, T. D. (1999). "The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction." Oncogene **18**(49): 6842-4.

Golstein, P. and G. Kroemer (2007). "Cell death by necrosis: towards a molecular definition." Trends Biochem Sci **32**(1): 37-43.

Golub, T. R., D. K. Slonim, et al. (1999). "Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring." Science **286**(5439): 531-7.

Guirguis, H. R., M. C. Cheung, et al. (2012). "Impact of central nervous system (CNS) prophylaxis on the incidence and risk factors for CNS relapse in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era: a single centre experience and review of the literature." Br J Haematol **159**(1): 39-49.

Hacia, J. G. (1999). "Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays." Nat Genet **21**(1 Suppl): 42-7.

Hacia, J. G., L. C. Brody, et al. (1996). "Detection of heterozygous mutations in BRCA1 using high density oligonucleotide arrays and two-colour fluorescence analysis." Nat Genet **14**(4): 441-7.

Haferlach, T., A. Kohlmann, et al. (2007). "Gene expression profiling for the diagnosis of acute leukaemia." Br J Cancer **96**(4): 535-40.

Hanada, M., S. Krajewski, et al. (1993). "Regulation of Bcl-2 oncoprotein levels with differentiation of human neuroblastoma cells." Cancer Res **53**(20): 4978-86.

Harris, N. L., E. S. Jaffe, et al. (1999). "The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997." Ann Oncol **10**(12): 1419-32.

Hauert, C., M. Holmes, et al. (2006). "Evolutionary games and population dynamics: maintenance of cooperation in public goods games." Proc Biol Sci **273**(1600): 2565-70.

Havugimana, P. C., G. T. Hart, et al. (2012). "A census of human soluble protein complexes." Cell **150**(5): 1068-81.

Hazeki, K., K. Nigorikawa, et al. (2012). "Essential roles of PIKfyve and PTEN on phagosomal phosphatidylinositol 3-phosphate dynamics." FEBS Lett **586**(22): 4010-5.

Heine, V. M., M. Priller, et al. (2010). "Dexamethasone destabilizes Nmyc to inhibit the growth of hedgehog-associated medulloblastoma." Cancer Res **70**(13): 5220-5.

Helson, L., C. Weinberger, et al. (1984). "Neuroectodermal tumor and monoclonal antibodies." Am J Pediatr Hematol Oncol **6**(3): 227-31.

Herms, J., I. Neidt, et al. (2000). "C-MYC expression in medulloblastoma and its prognostic value." Int J Cancer **89**(5): 395-402.

Herzenberg, L. A., R. G. Sweet, et al. (1976). "Fluorescence-activated cell sorting." Sci Am **234**(3): 108-17.

Higgins, S. C., H. Steingrimsdottir, et al. (2010). "Human, mouse or rat? Species authentication of glioma-derived cell cultures." J Neurosci Methods **194**(1): 139-43.

Hinkerohe, D., D. Wolfkuhler, et al. (2011). "Dexamethasone differentially regulates functional membrane properties in glioma cell lines and primary astrocytes in vitro." J Neurooncol **103**(3): 479-89.

Hiroi, M. and Y. Ohmori (2003). "The transcriptional coactivator CREB-binding protein cooperates with STAT1 and NF-kappa B for synergistic transcriptional activation of the CXC ligand 9/monokine induced by interferon-gamma gene." J Biol Chem **278**(1): 651-60.

Ho, C. L., L. F. Hsu, et al. (2005). "Autocrine expression of platelet-derived growth factor B in B cell chronic lymphocytic leukemia." Acta Haematol **114**(3): 133-40.

Hocevar, B. A., T. L. Brown, et al. (1999). "TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway." Embo J **18**(5): 1345-56.

Hoheisel, J. D. (2006). "Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis." Nat Rev Genet **7**(3): 200-10.

Holleman, A., M. H. Cheok, et al. (2004). "Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment." N Engl J Med **351**(6): 533-42.

Holleman, A., M. L. den Boer, et al. (2006). "The expression of 70 apoptosis genes in relation to lineage, genetic subtype, cellular drug resistance, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia." Blood **107**(2): 769-76.

Hu, P. P., X. Shen, et al. (1999). "The MEK pathway is required for stimulation of p21(WAF1/CIP1) by transforming growth factor-beta." J Biol Chem **274**(50): 35381-7.

Hu, Y. L., M. DeLay, et al. (2012). "Hypoxia-induced autophagy promotes tumor cell survival and adaptation to antiangiogenic treatment in glioblastoma." Cancer Res **72**(7): 1773-83.

Huang, C. L., W. Y. Shu, et al. (2011). "Repeated small perturbation approach reveals transcriptomic steady states." PLoS One **6**(12): e29241.

Hulett, H. R., W. A. Bonner, et al. (1969). "Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence." Science **166**(906): 747-9.

Ikonomov, O. C., D. Sbrissa, et al. (2011). "The phosphoinositide kinase PIKfyve is vital in early embryonic development: preimplantation lethality of PIKfyve-/- embryos but normality of PIKfyve+/- mice." J Biol Chem **286**(15): 13404-13.

Imhof, L. A. (2005). "THE LONG-RUN BEHAVIOR OF THE STOCHASTIC REPLICATOR DYNAMICS." The Annals of Applied Probability **15**(1B): 1019-1045.

Irimajiri, A., T. Hanai, et al. (1979). "A dielectric theory of "multi-stratified shell" model with its application to a lymphoma cell." J Theor Biol **78**(2): 251-69.

Jabbour, E., J. E. Cortes, et al. (2008). "Optimizing treatment with Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitors in Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia: focus on dosing schedules." Clin Lymphoma Myeloma **8 Suppl 3**: S75-81.

Jemal, A., R. C. Tiwari, et al. (2004). "Cancer statistics, 2004." CA Cancer J Clin **54**(1): 8-29.

Kajiho, H., K. Saito, et al. (2003). "RIN3: a novel Rab5 GEF interacting with amphiphysin II involved in the early endocytic pathway." J Cell Sci **116**(Pt 20): 4159-68.

Kajiho, H., K. Sakurai, et al. (2011). "Characterization of RIN3 as a guanine nucleotide exchange factor for the Rab5 subfamily GTPase Rab31." J Biol Chem **286**(27): 24364-73.

Kamentsky, L. A. and M. R. Melamed (1967). "Spectrophotometric cell sorter." Science **156**(780): 1364-5.

Kamentsky, L. A., M. R. Melamed, et al. (1965). "Spectrophotometer: new instrument for ultrarapid cell analysis." Science **150**(3696): 630-1.

Kane, M. D., T. A. Jatkoe, et al. (2000). "Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays." Nucleic Acids Res **28**(22): 4552-7.

Karamysheva, A. F. (2008). "Mechanisms of angiogenesis." Biochemistry (Mosc) **73**(7): 751-62.

Karin, M. (1999). "The beginning of the end: IkappaB kinase (IKK) and NF-kappaB activation." J Biol Chem **274**(39): 27339-42.

Karin, M. (1999). "How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex." Oncogene **18**(49): 6867-74.

Karr, J. R., J. C. Sanghvi, et al. (2012). "A whole-cell computational model predicts phenotype from genotype." Cell **150**(2): 389-401.

Kauffman, S. (2004). "A proposal for using the ensemble approach to understand genetic regulatory networks." J Theor Biol **230**(4): 581-90.

Kaup, B., I. Schindler, et al. (2001). "Time-dependent inhibition of glioblastoma cell proliferation by dexamethasone." J Neurooncol **51**(2): 105-10.

Kees, U. R., J. Ford, et al. (2003). "Gene expression profiles in a panel of childhood leukemia cell lines mirror critical features of the disease." Mol Cancer Ther **2**(7): 671-7.

Kelly, P. N., A. Dakic, et al. (2007). "Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells." Science **317**(5836): 337.

Kerr, M. K. and G. A. Churchill (2001). "Experimental design for gene expression microarrays." Biostatistics **2**(2): 183-201.

Kerr, M. K. and G. A. Churchill (2001). "Statistical design and the analysis of gene expression microarray data." Genet Res **77**(2): 123-8.

Khalili, K., B. Krynska, et al. (1999). "Medulloblastomas and the human neurotropic polyomavirus JC virus." Lancet **353**(9159): 1152-3.

Kim, E. L., R. Wustenberg, et al. (2010). "Chloroquine activates the p53 pathway and induces apoptosis in human glioma cells." Neuro Oncol **12**(4): 389-400.

Kimura, D., T. Imaizumi, et al. (2002). "Hypoxia enhances the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in human lung cancer cells, EBC-1." Tohoku J Exp Med **196**(4): 259-67.

Kiss, C., I. Benko, et al. (2004). "Leukemic cells and the cytokine patchwork." Pediatr Blood Cancer **42**(2): 113-21.

Kisseleva, T., S. Bhattacharya, et al. (2002). "Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges." Gene **285**(1-2): 1-24.

Knudson, A. G. (2001). "Two genetic hits (more or less) to cancer." Nat Rev Cancer **1**(2): 157-62.

Kohane, I. S., A. T. Kho, et al. (2003). Microarrays for an Integrative Genomics, Mit Press.

Kool, M., A. Korshunov, et al. (2012). "Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas." Acta Neuropathol **123**(4): 473-84.

Koopman, G., C. P. Reutelingsperger, et al. (1994). "Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis." Blood **84**(5): 1415-20.

Korzus, E., J. Torchia, et al. (1998). "Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions." Science **279**(5351): 703-7.

Kowaltowski, A. J., S. S. Smaili, et al. (2000). "Elevation of resting mitochondrial membrane potential of neural cells by cyclosporin A, BAPTA-AM, and bcl-2." Am J Physiol Cell Physiol **279**(3): C852-9.

Krafts, K., E. Hempelmann, et al. (2012). "From methylene blue to chloroquine: a brief review of the development of an antimalarial therapy." Parasitol Res **111**(1): 1-6.

Kravvaritis, C. and M. Mitrouli (2009). "Compound matrices: properties, numerical issues and analytical computations." Numerical Algorithms **50**(2): 155-177.

Kreil, D. P., R. R. Russell, et al. (2006). "Microarray oligonucleotide probes." Methods Enzymol **410**: 73-98.

Kreth, S., J. Heyn, et al. (2010). "Identification of valid endogenous control genes for determining gene expression in human glioma." Neuro Oncol **12**(6): 570-9.

Kroemer, G., L. Galluzzi, et al. (2009). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." Cell Death Differ **16**(1): 3-11.

Kruse, C. A., D. H. Mitchell, et al. (1992). "Characterization of a continuous human glioma cell line DBTRG-05MG: growth kinetics, karyotype, receptor expression, and tumor suppressor gene analyses." In Vitro Cell Dev Biol **28A**(9-10): 609-14.

Krysko, D. V., G. Denecker, et al. (2006). "Macrophages use different internalization mechanisms to clear apoptotic and necrotic cells." Cell Death Differ **13**(12): 2011-22.

Kundu, M. and C. B. Thompson (2008). "Autophagy: basic principles and relevance to disease." Annu Rev Pathol **3**: 427-55.

Lambrou, G. I., A. Chatziioannou, et al. (2009). Studying the nonlinearities of T-cell leukemia growth and the underlying metabolism upon glucocorticoid treatment through the application

of dynamic mathematical methodologies. Information Technology and Applications in Biomedicine (ITAB), 2010 10th IEEE International Conference on.

Lambrou, G. I., A. Chatziioannou, et al. (2009). SETTING A RATIONAL FRAMEWORK FOR EXPERIMENTAL DESIGN AND ANALYSIS OF HIGH-THROUGHPUT DNA MICROARRAY EXPERIMENTS AND DATA. Advanced Topics in Scattering Theory and Biomedical Engineering: Proceedings of the 9th International Workshop on Mathematical Methods in Scattering Theory and Biomedical Engineering, Patras, Greece, 9-11 October 2009. A. Charalambopoulos, D. I. Fotiadis and D. Polyzos. London, World Scientific.

Lambrou, G. I., L. Papadimitriou, et al. (2012). "Glucocorticoid and proteasome inhibitor impact on the leukemic lymphoblast: multiple, diverse signals converging on a few key downstream regulators." Mol Cell Endocrinol **351**(2): 142-51.

Lambrou, G. I., E. G. Sifakis, et al. (2009). Comparative Computational Methods to Identification of Inherent or Acquired Mechanisms of Resistance to Prednisolone in Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. ITAB 2009. Larnaca, Cyprus, IEEE.

Lambrou, G. I., A. Zaravinos, et al. (2012). "Pathway simulations in common oncogenic drivers of leukemic and rhabdomyosarcoma cells: a systems biology approach." Int J Oncol **40**(5): 1365-90.

Lambrou, G. I., A. Zaravinos, et al. (2012). SYSTEMS MODELLING OF PROLIFERATION MECHANISMS IN CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA. E-Health Technologies and Improving Patient Safety: Exploring Organizational Factors. A. Moumtzoglou and A. Kastania. Hershey PA, IGI Global.

Langeveld, C. H., M. P. van Waas, et al. (1992). "Implication of glucocorticoid receptors in the stimulation of human glioma cell proliferation by dexamethasone." J Neurosci Res **31**(3): 524-31.

Lasithiotakis, K. G., T. W. Sinnberg, et al. (2008). "Combined inhibition of MAPK and mTOR signaling inhibits growth, induces cell death, and abrogates invasive growth of melanoma cells." J Invest Dermatol **128**(8): 2013-23.

Lauten, M., M. Stanulla, et al. (2001). "Clinical outcome of patients with childhood acute lymphoblastic leukaemia and an initial leukaemic blood blast count of less than 1000 per microliter." Klin Padiatr **213**(4): 169-74.

Lecca, P. and D. Morpurgo (2012). "Modelling non-homogeneous stochastic reaction-diffusion systems: the case study of gemcitabine-treated non-small cell lung cancer growth." BMC Bioinformatics **13 Suppl 14**: S14.

Lecoeur, H. (2002). "Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases." Exp Cell Res **277**(1): 1-14.

Lee, K., I. S. Kohane, et al. (2003). "PGAGENE: integrating quantitative gene-specific results from the NHLBI programs for genomic applications." Bioinformatics **19**(6): 778-9.

Levy, D. E. and J. E. Darnell, Jr. (2002). "Stats: transcriptional control and biological impact." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(9): 651-62.

Levy, J. M. and A. Thorburn (2012). "Modulation of pediatric brain tumor autophagy and chemosensitivity." J Neurooncol **106**(2): 281-90.

Li, T. Y. and J. A. Yorke (1975). "Period three implies chaos." American Mathematical Monthly **82**: 985-992.

Li, W., H. Li, et al. (2012). "CRP and TNF-alpha induce PAPP-A expression in human peripheral blood mononuclear cells." Mediators Inflamm **2012**: 697832.

Liu, Q. and Z. Liu (2012). "Malignancy through cooperation: an evolutionary game theory approach." Cell Prolif **45**(4): 365-77.

Lockhart, D. J., H. Dong, et al. (1996). "Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays." Nat Biotechnol **14**(13): 1675-80.

Lopez-Terrada, D. (2006). "Integrating the diagnosis of childhood malignancies." Adv Exp Med Biol **587**: 121-37.

Lorenz, N. (1963). "Deterministic Nonperiodic Flow." Journal of the Atmospheric Sciences **20**(2): 130-157.

Lotka, A. (1910). "Contribution to the Theory of Periodic Reaction." J. Phys. Chem **14**(3): 271–274.

Lotka, A. J. (1920). "Analytical Note on Certain Rhythmic Relations in Organic Systems." Proc Natl Acad Sci U S A **6**(7): 410-5.

Louis, D. N., H. Ohgaki, et al. (2007). "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system." Acta Neuropathol **114**(2): 97-109.

MacDonald, T. J., K. M. Brown, et al. (2001). "Expression profiling of medulloblastoma: PDGFRA and the RAS/MAPK pathway as therapeutic targets for metastatic disease." Nat Genet **29**(2): 143-52.

Malnic, B., P. A. Godfrey, et al. (2004). "The human olfactory receptor gene family." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(8): 2584-9.

Malthus, T. R. and C. Jesus (1826). An Essay on the Principle of Population, Or, A View of Its Past and Present Effects on Human Happiness: With an Inquiry Into Our Prospects Respecting the Future Removal Or Mitigation of the Evils which it Occasions, J. Murray.

Mansury, Y., M. Kimura, et al. (2002). "Emerging patterns in tumor systems: simulating the dynamics of multicellular clusters with an agent-based spatial agglomeration model." J Theor Biol **219**(3): 343-70.

Mar, J. C. and J. Quackenbush (2009). "Decomposition of gene expression state space trajectories." PLoS Comput Biol **5**(12): e1000626.

Martin-Landrove, M., D. Pereira, et al. (2007). "Fractal analysis of tumoral lesions in brain." Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc **2007**: 1306-9.

Martinez-Ramirez, A., S. Rodriguez-Perales, et al. (2003). "Characterization of the A673 cell line (Ewing tumor) by molecular cytogenetic techniques." Cancer Genet Cytogenet **141**(2): 138-42.

Masuda, N. (2008). "Oscillatory dynamics in evolutionary games are suppressed by heterogeneous adaptation rates of players." J Theor Biol **251**(1): 181-9.

Maxwell, J. C. (1873). A Treatise on Electricity and Magnetism, Clarendon Press.

May, R. M. (1974). "Biological populations with nonoverlapping generations: stable points, stable cycles, and chaos." Science **186**(4164): 645-7.

May, R. M. (1976). "Simple mathematical models with very complicated dynamics." Nature **261**(5560): 459-67.

McAllister, R. M., H. Isaacs, et al. (1977). "Establishment of a human medulloblastoma cell line." Int J Cancer **20**(2): 206-12.

McAllister, R. M., J. Melnyk, et al. (1969). "Cultivation in vitro of cells derived from a human rhabdomyosarcoma." Cancer **24**(3): 520-6.

McCune, B. K., K. Patterson, et al. (1993). "Expression of transforming growth factor-beta isoforms in small round cell tumors of childhood. An immunohistochemical study." Am J Pathol **142**(1): 49-58.

McKean-Cowdin, R., J. Barnholtz-Sloan, et al. (2009). "Associations between polymorphisms in DNA repair genes and glioblastoma." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **18**(4): 1118-26.

McLean, J. S., M. C. Frame, et al. (1986). "Phenotypic modification of human glioma and non-small cell lung carcinoma by glucocorticoids and other agents." Anticancer Res **6**(5): 1101-6.

McNally, R. J., D. Rowland, et al. (1997). "Age and sex distributions of hematological malignancies in the U.K." Hematol Oncol **15**(4): 173-89.

Miranda, L., J. Wolf, et al. (1996). "Isolation of the human PC6 gene encoding the putative host protease for HIV-1 gp160 processing in CD4+ T lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(15): 7695-700.

Mischel, P. S., T. F. Cloughesy, et al. (2004). "DNA-microarray analysis of brain cancer: molecular classification for therapy." Nat Rev Neurosci **5**(10): 782-92.

Missler, M. and T. C. Sudhof (1998). "Neurexophilins form a conserved family of neuropeptide-like glycoproteins." J Neurosci **18**(10): 3630-8.

Mizushima, N. and D. J. Klionsky (2007). "Protein turnover via autophagy: implications for metabolism." Annu Rev Nutr **27**: 19-40.

Moldavan, A. (1934). "Photo-Electric Technique for the Counting of Microscopical Cells." Science **80**(2069): 188-9.

Moolgavkar, S. H. and A. G. Knudson, Jr. (1981). "Mutation and cancer: a model for human carcinogenesis." J Natl Cancer Inst **66**(6): 1037-52.

Moore, A., C. J. Donahue, et al. (1998). "Simultaneous measurement of cell cycle and apoptotic cell death." Methods Cell Biol **57**: 265-78.

Mujumdar, R. B., L. A. Ernst, et al. (1989). "Cyanine dye labeling reagents containing isothiocyanate groups." Cytometry **10**(1): 11-9.

Nash, J. F. (1950). "The Bargaining Problem." Econometrica **18**(2): 155-162.

Nash, J. F. (1950). "Equilibrium Points in N-Person Games." Proc Natl Acad Sci U S A **36**(1): 48-9.

Nash, J. F. (1953). "Two-Person Cooperative Games
" Econometrica **21**(1): 128-140.

Naujokat, C., O. Sezer, et al. (2000). "Proteasome inhibitors induced caspase-dependent apoptosis and accumulation of p21WAF1/Cip1 in human immature leukemic cells." Eur J Haematol **65**(4): 221-36.

Nelson, D. M., X. Ye, et al. (2002). "Coupling of DNA synthesis and histone synthesis in S phase independent of cyclin/cdk2 activity." Mol Cell Biol **22**(21): 7459-72.

Neri, L. M., P. Borgatti, et al. (2003). "The phosphoinositide 3-kinase/AKT1 pathway involvement in drug and all-trans-retinoic acid resistance of leukemia cells." Mol Cancer Res **1**(3): 234-46.

Neumuller, O., M. Hoffmeister, et al. (2009). "Synaptotagmin-like protein 1 interacts with the GTPase-activating protein Rap1GAP2 and regulates dense granule secretion in platelets." Blood **114**(7): 1396-404.

Newton, H. B. (2004). "Molecular neuro-oncology and development of targeted therapeutic strategies for brain tumors. Part 2: PI3K/Akt/PTEN, mTOR, SHH/PTCH and angiogenesis." Expert Rev Anticancer Ther **4**(1): 105-28.

Newton, I., A. Motte, et al. (1729). The Mathematical Principles of Natural Philosophy. London, B. Motte.

Nicotera, P., F. Bernassola, et al. (1999). "Nitric oxide (NO), a signaling molecule with a killer soul." Cell Death Differ **6**(10): 931-3.

Novo, D., N. G. Perlmutter, et al. (1999). "Accurate flow cytometric membrane potential measurement in bacteria using diethyloxacarbocyanine and a ratiometric technique." Cytometry **35**(1): 55-63.

O'Brien, J., I. Wilson, et al. (2000). "Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity." Eur J Biochem **267**(17): 5421-6.

Okuno, S., A. Saito, et al. (2004). "The c-Jun N-terminal protein kinase signaling pathway mediates Bax activation and subsequent neuronal apoptosis through interaction with Bim after transient focal cerebral ischemia." J Neurosci **24**(36): 7879-87.

Olopade, O. I., R. B. Jenkins, et al. (1992). "Molecular analysis of deletions of the short arm of chromosome 9 in human gliomas." Cancer Res **52**(9): 2523-9.

Pahl, H. L. (1999). "Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors." Oncogene **18**(49): 6853-66.

Patterson, T. A., E. K. Lobenhofer, et al. (2006). "Performance comparison of one-color and two-color platforms within the MicroArray Quality Control (MAQC) project." Nat Biotechnol **24**(9): 1140-50.

Paugh, B. S., C. Qu, et al. (2010). "Integrated molecular genetic profiling of pediatric high-grade gliomas reveals key differences with the adult disease." J Clin Oncol **28**(18): 3061-8.

Pauly, H. and H. P. Schwan (1959). "[Impendance of a suspension of ball-shaped particles with a shell; a model for the dielectric behavior of cell suspensions and protein solutions]." Z Naturforsch B **14B**(2): 125-31.

Pearl, R. and L. J. Reed (1920). "On the Rate of Growth of the Population of the United States since 1790 and Its Mathematical Representation." Proc Natl Acad Sci U S A **6**(6): 275-88.

Pethig, R. and D. B. Kell (1987). "The passive electrical properties of biological systems: their significance in physiology, biophysics and biotechnology." Phys Med Biol **32**(8): 933-70.

Petricoin, E. F., 3rd, J. L. Hackett, et al. (2002). "Medical applications of microarray technologies: a regulatory science perspective." Nat Genet **32 Suppl**: 474-9.

Petronilli, V., G. Miotto, et al. (1999). "Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence." Biophys J **76**(2): 725-34.

Petronilli, V., G. Miotto, et al. (1998). "Imaging the mitochondrial permeability transition pore in intact cells." Biofactors **8**(3-4): 263-72.

Pickup, J. C., F. Hussain, et al. (2005). "Fluorescence-based glucose sensors." Biosens Bioelectron **20**(12): 2555-65.

Pietsch, T., M. D. Taylor, et al. (2004). "Molecular pathogenesis of childhood brain tumors." J Neurooncol **70**(2): 203-15.

Piette, C., M. Deprez, et al. (2009). "The dexamethasone-induced inhibition of proliferation, migration, and invasion in glioma cell lines is antagonized by macrophage migration inhibitory factor (MIF) and can be enhanced by specific MIF inhibitors." J Biol Chem **284**(47): 32483-92.

Piette, C., C. Munaut, et al. (2006). "Treating gliomas with glucocorticoids: from bedside to bench." Acta Neuropathol **112**(6): 651-64.

Pinkel, D., R. Segraves, et al. (1998). "High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays." Nat Genet **20**(2): 207-11.

Plowe, C. V. (2005). "Antimalarial drug resistance in Africa: strategies for monitoring and deterrence." Curr Top Microbiol Immunol **295**: 55-79.

Poincaré, J. H. (1890). "Sur le problème des trois corps et les équations de la dynamique. Divergence des séries de M. Lindstedt." Acta Mathematica **13**: 1–270.

Pollack, J. R., C. M. Perou, et al. (1999). "Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays." Nat Genet **23**(1): 41-6.

Pomeroy, S. L., P. Tamayo, et al. (2002). "Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression." Nature **415**(6870): 436-42.

Preul, M. (2005). "History of brain tumor surgery." Neurosurgical Focus **18**(4): 1.

Price, M. A., F. H. Cruzalegui, et al. (1996). "The p38 and ERK MAP kinase pathways cooperate to activate Ternary Complex Factors and c-fos transcription in response to UV light." Embo J **15**(23): 6552-63.

Quackenbush, J. (2001). "Computational analysis of microarray data." Nat Rev Genet **2**(6): 418-27.

Quackenbush, J. (2002). "Microarray data normalization and transformation." Nat Genet **32 Suppl**: 496-501.

Quaranta, V., A. M. Weaver, et al. (2005). "Mathematical modeling of cancer: the future of prognosis and treatment." Clin Chim Acta **357**(2): 173-9.

Rabinowitz, J. D. and E. White (2010). "Autophagy and metabolism." Science **330**(6009): 1344-8.

Rahman, R., T. Osteso-Ibanez, et al. (2010). "Histone deacetylase inhibition attenuates cell growth with associated telomerase inhibition in high-grade childhood brain tumor cells." Mol Cancer Ther **9**(9): 2568-81.

Raingeaud, J., S. Gupta, et al. (1995). "Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine." J Biol Chem **270**(13): 7420-6.

Raingeaud, J., A. J. Whitmarsh, et al. (1996). "MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway." Mol Cell Biol **16**(3): 1247-55.

Rajaraman, P., A. Hutchinson, et al. (2010). "DNA repair gene polymorphisms and risk of adult meningioma, glioma, and acoustic neuroma." Neuro Oncol **12**(1): 37-48.

Ramaswamy, S. and T. R. Golub (2002). "DNA microarrays in clinical oncology." J Clin Oncol **20**(7): 1932-41.

Renner, K., M. J. Ausserlechner, et al. (2003). "A conceptual view on glucocorticoid-lnduced apoptosis, cell cycle arrest and glucocorticoid resistance in lymphoblastic leukemia." Curr Mol Med **3**(8): 707-17.

Roach, H. I. and N. M. Clarke (2000). "Physiological cell death of chondrocytes in vivo is not confined to apoptosis. New observations on the mammalian growth plate." J Bone Joint Surg Br **82**(4): 601-13.

Rogers, R. S., C. M. Horvath, et al. (2003). "SUMO modification of STAT1 and its role in PIAS-mediated inhibition of gene activation." J Biol Chem **278**(32): 30091-7.

Rosati, M., M. Rocchi, et al. (2001). "Assignment to chromosome 12q24.33, gene organization and splicing of the human KRAB/FPB containing zinc finger gene ZNF84." Cytogenet Cell Genet **94**(3-4): 127-30.

Rossi, A., V. Caracciolo, et al. (2008). "Medulloblastoma: from molecular pathology to therapy." Clin Cancer Res **14**(4): 971-6.

Rual, J. F., K. Venkatesan, et al. (2005). "Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network." Nature **437**(7062): 1173-8.

Russell, S. R. H., L. A. Meadows, et al. (2009). Microarray Technology in Practice, Academic Press.

Rutkowski, S. (2006). "Current treatment approaches to early childhood medulloblastoma." Expert Rev Neurother **6**(8): 1211-21.

Sahu, M., D. G. Litvin, et al. (2011). "Phosphodiesterase-3B is expressed in proopiomelanocortin and neuropeptide Y neurons in the mouse hypothalamus." Neurosci Lett **505**(2): 93-7.

Sakata, K., S. Kato, et al. (2002). "Autocrine signaling through Ras regulates cell survival activity in human glioma cells: potential cross-talk between Ras and the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway." J Neuropathol Exp Neurol **61**(11): 975-83.

Sandstrom, P. A. and T. M. Buttke (1993). "Autocrine production of extracellular catalase prevents apoptosis of the human CEM T-cell line in serum-free medium." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(10): 4708-12.

Sanson, M., J. Thillet, et al. (2004). "Molecular changes in gliomas." Curr Opin Oncol **16**(6): 607-13.

Sato, N., N. Yamakawa, et al. (2011). "Genome-wide DNA methylation analysis reveals phytoestrogen modification of promoter methylation patterns during embryonic stem cell differentiation." PLoS One **6**(4): e19278.

Savill, J. and V. Fadok (2000). "Corpse clearance defines the meaning of cell death." Nature **407**(6805): 784-8.

Schena, M., D. Shalon, et al. (1995). "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray." Science **270**(5235): 467-70.

Scherer, A., W. Gwinner, et al. (2009). "Transcriptome changes in renal allograft protocol biopsies at 3 months precede the onset of interstitial fibrosis/tubular atrophy (IF/TA) at 6 months." Nephrol Dial Transplant **24**(8): 2567-75.

Schneider, B. S., L. Helson, et al. (1989). "Expression of the cholecystokinin gene by cultured human primitive neuroepithelioma cell lines." J Clin Endocrinol Metab **69**(2): 411-9.

Schneider, C. A., W. S. Rasband, et al. (2012). "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis." Nat Methods **9**(7): 671-5.

Schroedinger, E. (1946). Statistical Thermodynamics. Cambridge UK, Cambridge University Press.

Schroedinger, E. (1955). What is life?: the physical aspect of the living cell, The University Press.

Seol, D. W. (2011). "p53-Independent up-regulation of a TRAIL receptor DR5 by proteasome inhibitors: a mechanism for proteasome inhibitor-enhanced TRAIL-induced apoptosis." Biochem Biophys Res Commun **416**(1-2): 222-5.

Shai, R. M., J. K. Reichardt, et al. (2008). "Pharmacogenomics of brain cancer and personalized medicine in malignant gliomas." Future Oncol **4**(4): 525-34.

Shankar, S. and R. K. Srivastava (2008). "Histone deacetylase inhibitors: mechanisms and clinical significance in cancer: HDAC inhibitor-induced apoptosis." Adv Exp Med Biol **615**: 261-98.

Shapiro, H. M., P. J. Natale, et al. (1979). "Estimation of membrane potentials of individual lymphocytes by flow cytometry." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(11): 5728-30.

Sharrocks, A. D. (2001). "The ETS-domain transcription factor family." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(11): 827-37.

Shaw, P. E. and J. Saxton (2003). "Ternary complex factors: prime nuclear targets for mitogen-activated protein kinases." Int J Biochem Cell Biol **35**(8): 1210-26.

Shono, H., M. Shono, et al. (2001). "Analysis of heart rate variability of an anencephalic fetus using a new method to determine a fractal dimension of non-stationary time-serial data." Front Med Biol Eng **10**(4): 337-44.

Showe, L. C., M. Ballantine, et al. (1985). "Cloning and sequencing of a c-myc oncogene in a Burkitt's lymphoma cell line that is translocated to a germ line alpha switch region." Mol Cell Biol **5**(3): 501-9.

Smith, J. A. and L. Martin (1973). "Do cells cycle?" Proc Natl Acad Sci U S A **70**(4): 1263-7.

Smith, J. M. and G. R. Price (1973). "The Logic of Animal Conflict." Nature **246**(5427): 15-18.

So, E. Y., J. Oh, et al. (2007). "Ras/Erk pathway positively regulates Jak1/STAT6 activity and IL-4 gene expression in Jurkat T cells." Mol Immunol **44**(13): 3416-26.

Southern, E. M. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." J Mol Biol **98**(3): 503-17.

Stam, K., A. A. Stewart, et al. (1995). "Physical and biological characterization of a growth-inhibitory activity purified from the neuroepithelioma cell line A673." Biochem J **305 (Pt 1)**: 87-92.

Stankovic, T. and E. Marston (2008). "Molecular mechanisms involved in chemoresistance in paediatric acute lymphoblastic leukaemia." Srp Arh Celok Lek **136**(3-4): 187-92.

Stekel, D. (2003). Microarray Bioinformatics, Cambridge University Press.

Stoy, R. D., K. R. Foster, et al. (1982). "Dielectric properties of mammalian tissues from 0.1 to 100 MHz: a summary of recent data." Phys Med Biol **27**(4): 501-13.

Strasser-Wozak, E. M., B. L. Hartmann, et al. (1998). "Irradiation induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in p53-deficient lymphoblastic leukemia cells without affecting Bcl-2 and Bax expression." Cell Death Differ **5**(8): 687-93.

Stratton, M. R., J. Darling, et al. (1989). "Characterization of the human cell line TE671." Carcinogenesis **10**(5): 899-905.

Stromhaug, P. E. and D. J. Klionsky (2001). "Approaching the molecular mechanism of autophagy." Traffic **2**(8): 524-31.

Su, J. D., L. D. Mayo, et al. (2003). "PTEN and phosphatidylinositol 3'-kinase inhibitors up-regulate p53 and block tumor-induced angiogenesis: evidence for an effect on the tumor and endothelial compartment." Cancer Res **63**(13): 3585-92.

Sumazin, P., X. Yang, et al. (2011). "An extensive microRNA-mediated network of RNA-RNA interactions regulates established oncogenic pathways in glioblastoma." Cell **147**(2): 370-81.

Sun, S. Y., L. M. Rosenberg, et al. (2005). "Activation of Akt and eIF4E survival pathways by rapamycin-mediated mammalian target of rapamycin inhibition." Cancer Res **65**(16): 7052-8.

Suzuki, T., K. Fujikura, et al. (1997). "DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy." J Histochem Cytochem **45**(1): 49-53.

Syapin, P. J., P. M. Salvaterra, et al. (1982). "Neuronal-like features of TE671 cells: presence of a functional nicotinic cholinergic receptor." Brain Res **231**(2): 365-77.

Taleb, N. and C. Polychronakos (2011). "RFX6 is needed for the development and maintenance of the beta-cell phenotype." Islets **3**(5): 291-3.

Tarca, A. L., R. Romero, et al. (2006). "Analysis of microarray experiments of gene expression profiling." Am J Obstet Gynecol **195**(2): 373-88.

Taylor, J. J. and P. G. Middleton (1991). "The molecular genetic analysis of gene rearrangements in acute lymphoblastic leukaemia." Baillieres Clin Haematol **4**(3): 695-713.

Taylor, J. J., D. Rowe, et al. (1991). "Detection of T-cell receptor gamma chain V gene rearrangements using the polymerase chain reaction: application to the study of clonal disease cells in acute lymphoblastic leukemia." Blood **77**(9): 1989-95.

Taylor, P. D. and L. B. Jonker (1978). "Evolutionary stable strategies and game dynamics." Mathematical Biosciences **40**(1β€“2): 145-156.

Tomelleri, C., E. Milotti, et al. (2008). "A quantitative study of growth variability of tumour cell clones in vitro." Cell Prolif **41**(1): 177-91.

Tomlinson, F. H., R. B. Jenkins, et al. (1994). "Aggressive medulloblastoma with high-level N-myc amplification." Mayo Clin Proc **69**(4): 359-65.

Tomlinson, I. P. (1997). "Game-theory models of interactions between tumour cells." Eur J Cancer **33**(9): 1495-500.

Tonkinson, J. L., P. Marder, et al. (1997). "Cell cycle effects of antifolate antimetabolites: implications for cytotoxicity and cytostasis." Cancer Chemother Pharmacol **39**(6): 521-31.

Tseng, G. C., M. K. Oh, et al. (2001). "Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects." Nucleic Acids Res **29**(12): 2549-57.

Tucker, A. (1950). "On Jargon: The Prisoner's Dilemma." UMAP Journal **1**: 101.

Udeshi, N. D., D. R. Mani, et al. (2012). "Methods for quantification of in vivo changes in protein ubiquitination following proteasome and deubiquitinase inhibition." Mol Cell Proteomics **11**(5): 148-59.

Ullrich, N. J. (2008). "Inherited disorders as a risk factor and predictor of neurodevelopmental outcome in pediatric cancer." Dev Disabil Res Rev **14**(3): 229-37.

Uzman, B. G., G. E. Foley, et al. (1966). "Morphologic variations in human leukemic lymphoblasts (CCRF-CEM cells) after long-term culture and exposure to chemotherapeutic agents. A study with the electron microscope." Cancer **19**(11): 1725-42.

Van Dilla, M. A., T. T. Trujillo, et al. (1969). "Cell microfluorometry: a method for rapid fluorescence measurement." Science **163**(872): 1213-4.

Van Gelder, R. N., M. E. von Zastrow, et al. (1990). "Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(5): 1663-7.

van Genderen, H. O., H. Kenis, et al. (2008). "Extracellular annexin A5: functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization." Biochim Biophys Acta **1783**(6): 953-63.

Vanderhoeven, J., K. Pappaert, et al. (2005). "Comparison of a pump-around, a diffusion-driven, and a shear-driven system for the hybridization of mouse lung and testis total RNA on microarrays." Electrophoresis **26**(19): 3773-9.

Vanderhoeven, J., K. Pappaert, et al. (2005). "DNA microarray enhancement using a continuously and discontinuously rotating microchamber." Anal Chem **77**(14): 4474-80.

Vanhaecke, T., P. Papeleu, et al. (2004). "Trichostatin A-like hydroxamate histone deacetylase inhibitors as therapeutic agents: toxicological point of view." Curr Med Chem **11**(12): 1629-43.

Vercammen, D., R. Beyaert, et al. (1998). "Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor." J Exp Med **187**(9): 1477-85.

Verhulst, P. H. (1838). "Notice sur la loi que la population poursuit dans son accroissement." Corresp. mathématique et physique **10**: 113-121.

Vermes, I., C. Haanen, et al. (1995). "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V." J Immunol Methods **184**(1): 39-51.

Vincent, T. L. and R. A. Gatenby (2008). "An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis." Int J Oncol **32**(4): 729-37.

Viola, K., S. Kopf, et al. (2012). "Bay11-7082 inhibits the disintegration of the lymphendothelial barrier triggered by MCF-7 breast cancer spheroids; the role of ICAM-1 and adhesion." Br J Cancer.

Vlahos, C. J., W. F. Matter, et al. (1994). "A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)." J Biol Chem **269**(7): 5241-8.

Volterra, V. (1926). Variation and fluctuations of the number of individuals of animal species living together. Animal Ecology, McGraw-Hill.

von Neumann, J. and O. Morgenstern (1944). Theory of Games and Economic Behaviour. Princeton, Princeton University Press.

von Smoluchowski, M. (1906). "Zur kinetischen Theorie der Brownschen Molekularbewegung und der Suspensionen." Annalen der Physik **326**(14): 756-780.

Wagner, K. W. (1914). "Erklärung der dielektrischen Nachwirkungsvorgänge auf Grund Maxwellscher Vorstellungen." Electrical Engineering (Archiv fur Elektrotechnik) **2**(9): 371-387.

Wagner, S. A., P. Beli, et al. (2011). "A proteome-wide, quantitative survey of in vivo ubiquitylation sites reveals widespread regulatory roles." Mol Cell Proteomics **10**(10): M111 013284.

Waller, A. D. (1887). "A Demonstration on Man of Electromotive Changes accompanying the Heart's Beat." J Physiol **8**(5): 229-34.

Wang, L., P. Wang, et al. (2012). "Regulation of cellular growth, apoptosis, and Akt activity in human U251 glioma cells by a combination of cisplatin with CRM197." Anticancer Drugs **23**(1): 81-9.

Wang, X., F. F. Becker, et al. (2010). "The fractal dimension of cell membrane correlates with its capacitance: a new fractal single-shell model." Chaos **20**(4): 043133.

Wang, Y., C. Barbacioru, et al. (2006). "Large scale real-time PCR validation on gene expression measurements from two commercial long-oligonucleotide microarrays." BMC Genomics **7**: 59.

Weller, M., H. Berger, et al. (2007). "Combined 1p/19q loss in oligodendroglial tumors: predictive or prognostic biomarker?" Clin Cancer Res **13**(23): 6933-7.

Wendel, H. G., E. De Stanchina, et al. (2004). "Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy." Nature **428**(6980): 332-7.

Whitmarsh, A. J., S. H. Yang, et al. (1997). "Role of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in the activation of ternary complex factors." Mol Cell Biol **17**(5): 2360-71.

Wick, I. and G. Hardiman (2005). "Biochip platforms as functional genomics tools for drug discovery." Curr Opin Drug Discov Devel **8**(3): 347-54.

Wilson, M., J. DeRisi, et al. (1999). "Exploring drug-induced alterations in gene expression in Mycobacterium tuberculosis by microarray hybridization." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(22): 12833-8.

Wisniewski, P., A. Ellert-Miklaszewska, et al. (2010). "Non-apoptotic Fas signaling regulates invasiveness of glioma cells and modulates MMP-2 activity via NFkappaB-TIMP-2 pathway." Cell Signal **22**(2): 212-20.

Wolfrom, C., N. P. Chau, et al. (2000). "Evidence for deterministic chaos in aperiodic oscillations of proliferative activity in long-term cultured Fao hepatoma cells." J Cell Sci **113 (Pt 6)**: 1069-74.

Woodsmith, J., R. C. Jenn, et al. (2012). "Systematic analysis of dimeric E3-RING interactions reveals increased combinatorial complexity in human ubiquitination networks." Mol Cell Proteomics **11**(7): M111 016162.

Wrensch, M., K. T. Kelsey, et al. (2005). "ERCC1 and ERCC2 polymorphisms and adult glioma." Neuro Oncol **7**(4): 495-507.

Yang, P., T. M. Kollmeyer, et al. (2005). "Polymorphisms in GLTSCR1 and ERCC2 are associated with the development of oligodendrogliomas." Cancer **103**(11): 2363-72.

Yang, S. H., P. Shore, et al. (1999). "The mechanism of phosphorylation-inducible activation of the ETS-domain transcription factor Elk-1." Embo J **18**(20): 5666-74.

Yang, Y. H. and T. Speed (2002). "Design issues for cDNA microarray experiments." Nat Rev Genet **3**(8): 579-88.

Yauk, C., L. Berndt, et al. (2005). "Automation of cDNA microarray hybridization and washing yields improved data quality." J Biochem Biophys Methods **64**(1): 69-75.

Yoshikawa, M., H. Kajiho, et al. (2008). "Tyr-phosphorylation signals translocate RIN3, the small GTPase Rab5-GEF, to early endocytic vesicles." Biochem Biophys Res Commun **372**(1): 168-72.

Yoshino, J., T. Monkawa, et al. (2003). "Leukemia inhibitory factor is involved in tubular regeneration after experimental acute renal failure." J Am Soc Nephrol **14**(12): 3090-101.

Yue, J. and K. M. Mulder (2000). "Requirement of Ras/MAPK pathway activation by transforming growth factor beta for transforming growth factor beta 1 production in a smad-dependent pathway." J Biol Chem **275**(45): 35656.

Zanotto-Filho, A., E. Braganhol, et al. (2011). "NFkappaB inhibitors induce cell death in glioblastomas." Biochem Pharmacol **81**(3): 412-24.

Zaravinos, A., G. I. Lambrou, et al. (2011). "Identification of common differentially expressed genes in urinary bladder cancer." PLoS One **6**(4): e18135.

Zhang, B., S. Kirov, et al. (2005). "WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts." Nucleic Acids Res **33**(Web Server issue): W741-8.

Zhang, H. M., L. Li, et al. (2008). "Mitogen-induced recruitment of ERK and MSK to SRE promoter complexes by ternary complex factor Elk-1." Nucleic Acids Res **36**(8): 2594-607.

Zhang, M., C. Das, et al. (2006). "Predicting tumor cell repopulation after response: mathematical modeling of cancer cell growth." Anticancer Res **26**(4B): 2933-6.

Zhang, Y., J. Dong, et al. (2012). "Genistein inhibit cytokines or growth factor-induced proliferation and transformation phenotype in fibroblast-like synoviocytes of rheumatoid arthritis." Inflammation **35**(1): 377-87.

Αναστασίου, Α. (2012). Προσδιορισμός Επιπέδων Κυτοκινών και Αγγειογενετικών Παραγόντων σε Όγκους του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος της Παιδικής Ηλικίας. Α' Παιδιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών. Αθήνα, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών. **MD**.

Κουλτούκη, Ε. (2011). Μελέτη της Γονιδιακής Έκφρασης και των Γονιδιακών Οδών Με cDNA Μικροσυστοιχίες Κατά τη Διάγνωση και τη Χημειοθεραπεία στην Παιδική Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία. Α' Παιδιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών. Αυήνα, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών. **MD**.

Σηφάκης, Ε. (2012). Ανάπτυξη Μεθοδολογιών Υπολογιστικής Νοημοσύνης για την Επεξεργασία και Ανάλυση Δεδομένων Γονιδιακής Έκφρασης Μικροσυστοιχιών cDNA. Εργαστήριο Βιοϊατρικής Τεχνολογίας. Αθήνα, Εθνικό Μστσόβειο Πολυτεχνείο. **Διπλωματούχος Μηχανικός**.

Τζωρτζάτου-Σταθοπούλου, Φ. (1994). Παιδιατρική Ογκολογία. Αθήνα, Εκδόσεις Πασχαλίδη.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

ΥΛΙΚΟ, ΧΗΜΙΚΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΕΣ

TE671 (ECACC, UK, **Cat.Nr**. 94052610)

Κυτταρική σειρά αθανατοποιημένων κυττάρων από μυελοβλάστωμα παρεγκεφαλίδος. Κύτταρα ραβδομυοσαρκώματος από θήλυ 6 ετών καυκάσιας φυλής. Καρυότυπος 46, XX.

A172 (ECACC, UK, **Cat.Nr**. 88062428)

Κυτταρική σειρά αθανατοποιημένων κυττάρων γλιοβλαστώματος από άνδρα 53 ετών καυκάσιας φυλής. Καρυότυπος 46, XY.

1321N1 (ECACC, UK, **Cat.Nr**. 86030402)

Κυτταρική σειρά αθανατοποιημένων κυττάρων από αστροκύττωμα. Καρυότυπος 46, με μετάθεση t(8;14).

DBTRG.05MG (ECACC, UK, **Cat.Nr**. 93061119)

Κυτταρική σειρά αθανατοποιημένων κυττάρων από γλιοβλάστωμα. Καρυότυπος 87-91X.

SK-PN-DW (ECACC, UK, **Cat.Nr**. 94092301)

Κυτταρική σειρά αθανατοποιημένων κυττάρων από αρχέγονο νευροεκτοδερμικό όγκο από άρρεν. Καρυότυπος 82XXY.

SH-SY-5Y (ECACC, UK, **Cat.Nr**. 94030304)

Κυτταρική σειρά αθανατοποιημένων κυττάρων από νευροβλάστωμα από θήλυ. Καρυότυπος 468X.

BE(2)M17 (ECACC, UK, **Cat.Nr**. 95011816)

Κυτταρική σειρά αθανατοποιημένων κυττάρων από νευροβλάστωμα από άρρεν 22 μηνών. Ο αρχικός καρυότυπος της σειράς (SK-N-BE(2)) από την οποία προήλθε η σειρά αυτή ήταν 44XY, πάρα ταύτα, ο καρυότυπος της σειράς αυτής είναι άγνωστος.

CCRF-CEM (ECACC, UK, **Cat.Nr**. 85112105)

Κυτταρική σειρά αθανατοποιημένων Τ-λευχαιμικών κυττάρων από θήλυ 2 ετών Καυκάσιας φυλής. Καρυότυπος 46,XX.

RPMI-1640 (Gibco, Invitrogen Inc., Cat. Nr. 52400-025) **(Appendix Table 1)**

Media formulations	**RPMI1640** **130-091-440**	**RPMI 1640 with stable glutamine** **130-091-439**
Components	g/L	g/L
Inorganic salts		
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	0.1	0.1
KCl	0.4	0.4
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	0.1
NaCl	6.0	6.0
$NaHCO_3$	2.0	2.0
$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	1.512	1.512
Other components		
Glucose	2.0	2.0
Glutathione reduced	0.001	0.001
Phenol red Na	0.0053	0.0053
Amino acids		
L-Arginine	0.2	0.2
L-Asparagine	0.05	0.05
L-Aspartic Acid	0.02	0.02
L-Cystine	0.05	0.05
L-Glutamin Acid	0.02	0.02
L-Alanyl-L-Glutamine	--	0.446
Glycine	0.01	0.01
L-Histidine	0.015	0.015
L-Hydroxyproline	0.02	0.02
L-Isoleucine	0.05	0.05
L-Leucine	0.05	0.05
L-Lysine.HCL	0.04	0.04
L-Methionine	0.015	0.015
L-Phenylalanine	0.015	0.015
L-Proline	0.02	0.02
L-Serine	0.03	0.03
L-Threonine	0.02	0.02
L-Tryptophan	0.005	0.005
L-Tyrosine	0.02	0.02
L-Valine	0.02	0.02
Vitamins		
p-Aminobenzoic Acid	0.001	0.001
Biotin	0.0002	0.0002
D(+)-Ca-Pantothenate	0.00025	0.00025
Choline Chloride	0.003	0.003
Folic acid	0.001	0.001
myo-Inositol	0.035	0.035
Nicotinamide	0.001	0.001
Pyridoxine.HCl	0.001	0.001
Riboflavin	0.0002	0.0002
Thiamine.HCl	0.001	0.001
Vitamin B12	0.000005	0.000005

Reference:
1. Moore et al. (1967) JAMA 199: 519-524.
2. Moore et al. (1976) Tissue Culture Association Manual 3: 503-508.

DMEM (Gibco, Invitrogen Inc., Cat. Nr. 10567-014) **(Appendix Table 2)**

Inorganic Salts (g/liter)	
$CaCl_2$ (anhydrous)	0.20000
$Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$	0.00010
$MgSO_4$ (anhydrous)	0.09770
KCl	0.40000
$NaHCO_3$	1.50000
NaCl	6.40000
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	0.12500
Amino Acids (g/liter)	
L-Arginine·HCl	0.08400
L-Cystine·2HCl	0.06260
L-Glutamine	0.58400
Glycine	0.03000
L-Histidine·HCl·H_2O	0.04200
L-Isoleucine	0.10500
L-Leucine	0.10500
L-Lysine·HCl	0.14600
L-Methionine	0.03000
L-Phenylalanine	0.06600
L-Serine	0.04200
L-Threonine	0.09500
L-Tryptophan	0.01600
L-Tyrosine·2Na·$2H_2O$	0.10379
L-Valine	0.09400

Vitamins (g/liter)	
Choline Chloride	0.00400
Folic Acid	0.00400
myo-Inositol	0.00720
Nicotinamide	0.00400
D-Pantothenic Acid (hemicalcium)	0.00400
Pyridoxine·HCl	0.00400
Riboflavin	0.00040
Thiamine·HCl	0.00400
Other (g/liter)	
D-Glucose	4.50000
Phenol Red, Sodium Salt	0.01500
Sodium Pyruvate	0.11000

EMEM (Gibco, Invitrogen Inc., Cat. Nr. 32561-037) **(Appendix Table 3)**

Inorganic Salts (g/liter)	
$CaCl_2$ (anhydrous)	0.20000
$MgSO_4$ (anhydrous)	0.09767
KCl	0.40000
$NaHCO_3$	1.50000
NaCl	6.80000
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	0.14000
Amino Acids (g/liter)	
L-Alanine	0.00890
L-Arginine·HCl	0.12640
L-Asparagine·H_2O	0.01500
L-Aspartic Acid	0.01330
L-Cystine·2HCl	0.03120
L-Glutamic Acid	0.01470
L-Glutamine	0.29200
Glycine	0.00750
L-Histidine·HCl·H_2O	0.04190
L-Isoleucine	0.05250
L-Leucine	0.05250
L-Lysine·HCl	0.07250
L-Methionine	0.01500
L-Phenylalanine	0.03250
L-Proline	0.01150
L-Serine	0.01050
L-Threonine	0.04760
L-Tryptophan	0.01000
L-Tyrosine·2Na·$2H_2O$	0.05190
L-Valine	0.04680

Vitamins (g/liter)	
Choline Chloride	0.00100
Folic Acid	0.00100
myo-Inositol	0.00200
Nicotinamide	0.00100
D-Pantothenic Acid (hemicalcium)	0.00100
Pyridoxine·HCl	0.00100
Riboflavin	0.00010
Thiamine·HCl	0.00100
Other (g/liter)	
D-Glucose	1.00000
Phenol Red, Sodium Salt	0.01000
Sodium Pyruvate	0.11000

NEA (non-essential amino acids) (Gibco, Invitrogen Inc. Cat. Nr. 11140035) **(Appendix Table 4)**

Components	Molecular Weight	Concentration (mg/L)	mM
Amino Acids			
Glycine	75	750	10
L-Alanine		890	∞
L-Asparagine		1320	∞
L-Aspartic acid		1330	∞
L-Glutamic Acid		1470	∞
L-Proline		1150	∞
L-Serine		1050	∞

Initial Concentration: 100×

HT supplement (Gibco, Invitrogen Inc. Cat. Nr. 11067-030)

10 mM sodium hypoxanthine, 1.6 mM thymidine

Initial Concentration: 100×

Agarose (SEAKEMGTG, NusieveGTG)

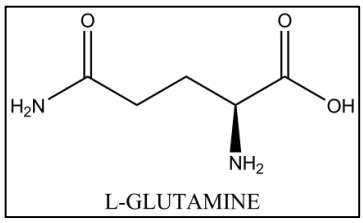
RNA Ladder 6000 (Ambion Inc. **Cat Nr**. AM7152)

Blue/Orange Loading Dye (Promega Inc. **Cat Nr**. G1881)

RQ1 DNase Iwith buffer (Promega Inc. **Cat Nr**. M610A)

Beckman Coulter Fluorospheres (Beckman Coulter Ireland Inc. **Cat Nr**. 6605359)

DAKO Fluorospheres (DAKO Inc., Denmark **Cat Nr**. K011011)



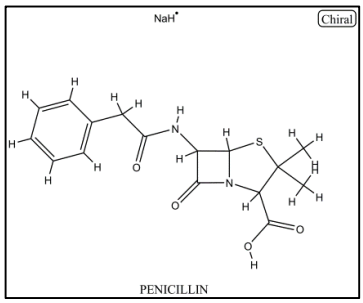
Appendix Figure 1. L-Glutamine

L-Glutamine (Gibco, Invitrogen Inc.**Cat. Nr**. A12860-01)

[$C_5H_{10}N_2O_3$], **CAS Nr.** 56-85-9

IUPAC Name:(S)-2,5-Diamino-5-oxopentanoic acid, Gln or Q

Initial Concentration: 100×



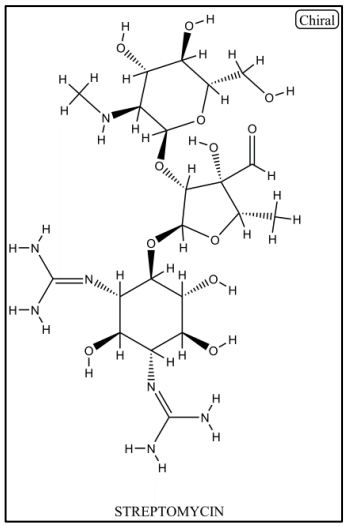
Appendix Figure 2. Penicillin

Penicillin (Gibco, Invitrogen Inc. **Cat. Nr**. 10378-016)

[$C_{16}H_{19}N_3O_5S$], **CAS Nr.** 26787-78-0

IUPAC Name:6-[[2-amino-2-(4 – hydroxyphenyl)acetyl]amino]-3,3 – dimethyl – 7 – oxo – 4 – thia – 1-azabicyclo[3.2.0]heptane - 2-carboxylic acid

Initial Concentration: 100×



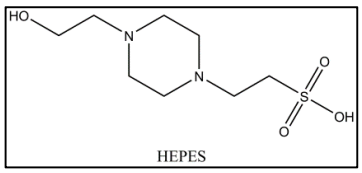
Appendix Figure 3. Streptomycin

Streptomycin (Gibco, Invitrogen Inc. Cat. Nr. 10378-016)

[$C_{16}H_{19}N_3O_5S$], **CAS Nr.** 15493-35-3

IUPAC Name:calcium 2-[(1S,2R,3S,4S,5R,6S)-5-(diaminomethylideneamino)-2-[(2S,3R,4R,5S)-3-[(2S,3S,4S,5R,6S)-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-3-methylamino-oxan-2-yl]oxy-4-formyl-4-hydroxy-5-methyl-oxolan-2-yl]oxy-3,4,6-trihydroxy-cyclohexyl]guanidine dichloride;

Initial Concentration: 100×

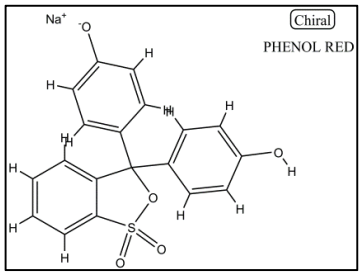


Appendix Figure 4. HEPES

HEPES free-acid (Sigma Aldrich GmbH)

[$C_8H_{18}N_2O_4S$], **CAS Nr**. 7365-45-9

IUPAC Name: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid

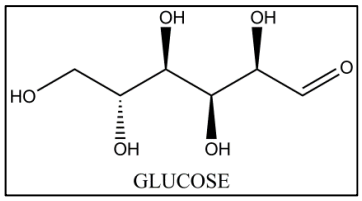


Appendix Figure 5. Phenol Red

Phenol Red

[$C_{19}H_{14}O_5S$], **CAS Nr**.143-74-8

phenolsulfonphthalein

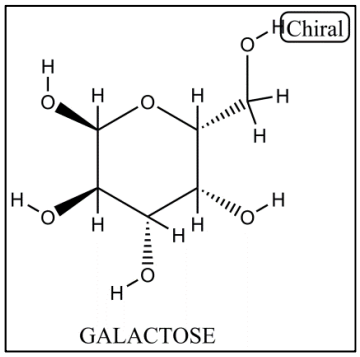


Appendix Figure 6. Glucose

Glucose (Sigma Aldrich GmbH)

[$C_6H_{12}O_6$], **CAS Nr**. 50-99-7

IUPAC Name:(3R,4S,5S,6R)-6-(hydroxymethyl)oxane-2,3,4,5-tetrol

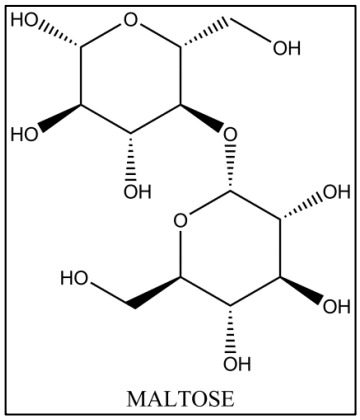


Appendix Figure 7. Galactose

Galactose

[$C_6H_{12}O_6$], **CAS Nr.** 59-23-4

D-Galactose

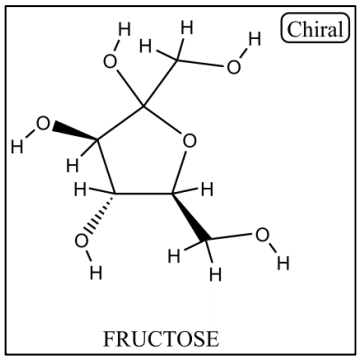


Appendix Figure 8. Maltose

Maltose

[$C_{12}H_{22}O_{11}$], **CAS Nr**. 69-79-4

D-Glucose, 4-O-a-D-glucopyranosyl-

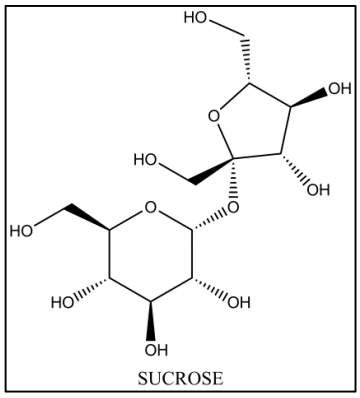


Appendix Figure 9. Fructose

Fructose

[$C_6H_{12}O_6$], **CAS Nr**. 57-48-7

D-Fructose

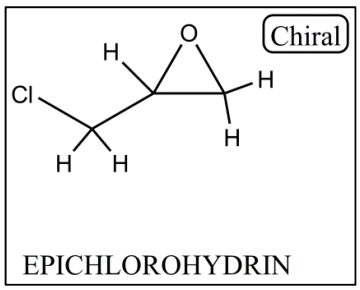


Appendix Figure 10. Sucrose

Sucrose

[$C_{12}H_{22}O_{11}$], **CAS Nr**. 57-50-1

IUPAC Name: β-D-fructofuranosyl-(2→1)-a-D-glucopyranoside

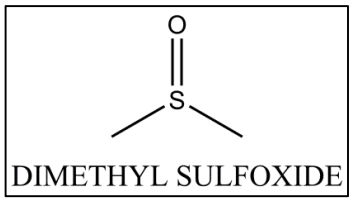


Appendix Figure 11. Epichlorohydrin

Epichlorohydrin

[C_3H_5ClO], **CAS Nr**. 106-89-8

IUPAC Name: 1-chloro-2,3-epoxypropane



Appendix Figure 12. Dimethyl Sulfoxide

Dimethyl Sulfoxide (Euroclone S.p.A.)

[$(CH_3)_2SO$], **CAS Nr**. 67-68-5

Prednisolone (NYCOMED HELLASS.A.)

[$C_{21}H_{28}O_5$] , **CAS Nr**. 50-24-8

Initial Concentration25mg/ml, i.v. use

IUPAC Name : (11β)-11,17,21-trihydroxypregna-1,4-diene-3,20-dione

Dexamethasone (Sigma Aldrich GmbH)

[$C_{22}H_{29}FO_5$], **CAS Nr**. 50-02-2

IUPAC Name: 8S,9R,10S,11S,13S,14S,16R,17R)-9- Fluoro-11,17-dihydroxy-17-(2-hydroxyacetyl)-10,13,16-trimethyl-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17- dodecahydro-3H-cyclopenta[a]phenanthren-3-one

Initial Concentration: 20mg/ml

MG132 (Sigma Aldrich GmbH)

[$C_{26}H_{41}N_3O_5$], **CAS Nr**. 133407-82-6

IUPAC Name: Z-Leu-Leu-Leu-al

Initial Concentration: 2mg/ml

Rapamycin

[$C_{51}H_{79}NO_{13}$] **CAS Nr.** 53123-88-9

IUPAC Name:

3S,6R,7E,9R,10R,12R,14S,15E,17E,19E,21S,23S,26R,27R,34aS)9,10,12,13,14,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-hexadecahydro-9,27-dihydroxy-3-[(1R)-2-[(1S,3R,4R)-4-hydroxy-3-methoxycyclohexyl]-1-methylethyl]-10,21-dimethoxy-6,8,12,14,20,26- hexamethyl-23,27-epoxy-3H-pyrido[2,1-c][1,4]-oxaazacyclohentriacontine-1,5,11,28,29(4H,6H,31H)-pentone

Bay11-7032 (Sigma Aldrich GmbH)

[$C_{10}H_9NO_2S$], **CAS Nr.** 19542-67-7

IUPAC Name: 3-[(4-methylphenyl)sulfonyl]-(2E)-propenenitrile

Initial Concentration: 10mg/ml

Trichostatin A (TSA) (Sigma Aldrich GmbH)

[$C_{17}H_{22}N_2O_3$], **CAS Nr.** 58880-19-6

IUPAC Name: 7-[4-(dimethylamino)phenyl]-N-hydroxy-4,6-dimethyl-7-oxohepta-2,4-dienamide

Initial Concentration: 200mM

Chloroquine (Sigma Aldrich GmbH)

[$C_{18}H_{26}ClN_3$], **CAS Nr.** 54-05-7

IUPAC Name: Chloroquine

Initial Concentration: 200mM

LY294002

[$C_{19}H_{17}NO_3$]

IUPAC Name: 4H-1-Benzopyran-4-one, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-

SP600 125

[$C_{14}H_8N_2O$], **CAS Nr**. 129-56-6

IUPAC Name: 1,9-Pyrazoloanthrone

Initial Concentration: 200mM

Gefitinib (ProteinKinase.de licensed from Astra Zeneca)

[$C_{22}H_{24}ClFN_4O_3$] **CAS Nr.** 184475-35-2

IUPAC Name: N-(3-chlor-4-fluoro-phenyl)-7-methoxy-6-(3-morpholin-4-ylpropoxy)quinazolin-4-amine)

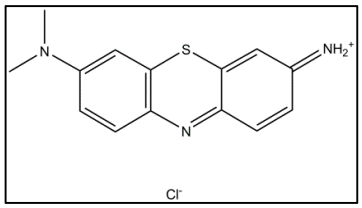
Ethanol (99%-100%) (Sigma Aldrich GmbH)

RNALater (Ambion Inc.)

1× Phosphate Buffered Saline (PBS) (Invitrogen Inc. former Gibco)

10× Phosphate Buffered Saline (PBS) (Invitrogen Inc. former Gibco)

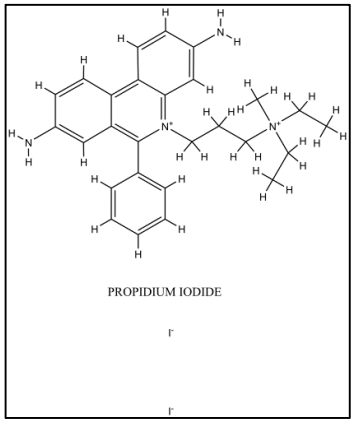
Trizol® Reagent (Invitrogen Inc.)



Appendix Figure 13. Giemsa Stain

Giemsa Stain (Sigma-Aldrich GmbH)

[$C_{14}H_{14}ClN_3S$], **CAS Nr.** 51811-82-6

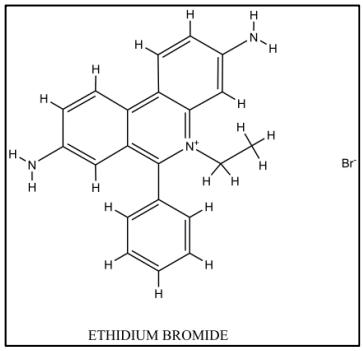


Appendix Figure 14. Propidium Iodide

Propidium Iodide (Invitrogen Inc.)

[$C_{27}H_{34}I_2N_4$],**CAS Nr.**25535-16-4

IUPAC Name: *Phenanthridinium, 3,8-diamino-5-[3-(diethylmethylammonio)propyl]-6-phenyl-, diiodide*



Appendix Figure 15. Ethidium Bromide

Ethidium Bromide (Sigma Aldrich GmbH) (**Figure AppI-X15**)

[$C_{21}H_{20}BrN_3$], **CAS Nr**. 1239-45-8

IUPAC Name: 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium bromide

GelStar Nucleic Acid Stain(CAMBREX BioScience Rockland, Inc.)

1× TAE buffer

(see below for preparation)

1× TBE buffer

(see below for preparation)

Ammonium Acetate (Sigma Aldrich GmbH)

[$C_2H_3O_2NH_4$], **CAS Nr**. 631-61-8

IUPAC Name: Ammonium Acetate

Sodium Acetate (Sigma Aldrich GmbH)

[$C_2H_3NaO_2$], **CAS Nr**. 127-09-3

IUPAC Name: Sodium Acetate

Sodium Hydroxide (Sigma Aldrich GmbH)

[NaOH], **CAS Nr**. 1310-73-2

IUPAC Name: Sodium Hydroxide

HEPES-free acid (powder) (Sigma Aldrich GmbH)

[$C_8H_{18}N_2O_4S$], **CAS Nr**. 7365-45-9

IUPAC Name: 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid

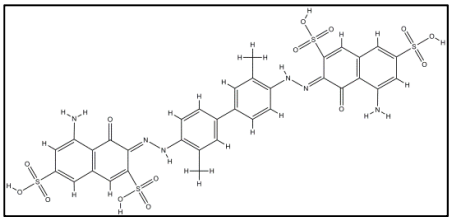
20× SSC Buffer (Ambion Inc. **Cat. Nr**. 9763)

20× SSC Buffer (custom made) (see below)

Sodium Bicarbonate (Sigma Aldrich GmbH)

[$NaHCO_3$], **CAS Nr**. 144-55-8

IUPAC Name: Sodium hydrogen carbonate

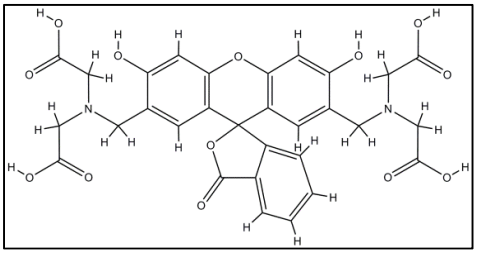


Appendix Figure 16. Trypan Blue

Trypan Blue (Gibco, Invitrogen Inc.)

$C_{34}H_{28}N_6O_{14}S_4$ **CAS Nr**. 72-57-1

IUPAC Name: (3Z,3'Z)-3,3'-[(3,3'-dimethylbiphenyl-4,4'-diyl)di(1Z)hydrazin-2-yl-1-ylidene]bis(5-amino-4-oxo-3,4-dihydronaphthalene-2,7-disulfonic acid)

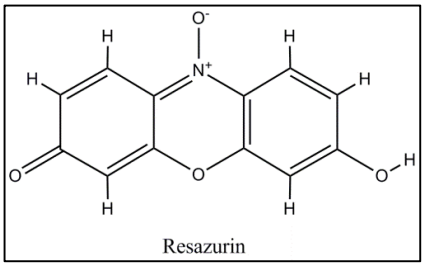


Appendix Figure 17. Alamar Blue (Resazurin)

Alamar Blue (Gibco, Invitrogen Inc.)

$C_{12}H_7NO_4$ **CAS Nr**. 550-82-3

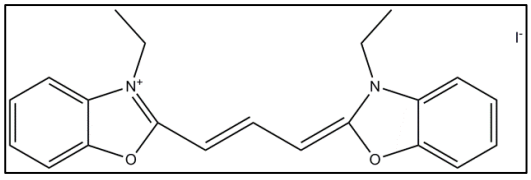
IUPAC Name: 7-hydroxy-10-oxidophenoxazin-10-ium-3-one



Appendix Figure 18. Calcein

Calcein (Molecular Probes, Invitrogen Inc.)
$C_{30}H_{26}N_2O_{13}$ **CAS Nr**. 1461-15-0

IUPAC Name: 2-[[7'-[[bis(carboxymethyl)amino]methyl]-3', 6'-dihydroxy-3-oxospiro[2-benzofuran-1, 9'-xanthene]-2'-yl]methyl- (carboxymethyl)amino]acetic acid



Appendix Figure 19. $DiOC_2(3)$

3,3'-Diethyloxacarbocyanine iodide ($DiOC_2(3)$)

$C_{21}H_{21}IN_2O_2$ **CAS Nr**. 905-96-4

IUPAC Name: 3-Ethyl-2-[3-(3-ethyl-2(3H)-benzoxazolylidene)-1-propenyl]benzoxazolium iodide, DOC Iodide, $DiOC_2(3)$

ΠΑΡΑΣΚΕΥΕΣ

1× PHOSPHATE BUFFERED SALINE (PBS)

Για 1 lt του ρυθμιστικού διαλύματος χρειάζονται

8.00 gr NaCl

0.20 gr KCl

1.44 gr Na_2HPO_4

0.24 grKH_2PO_4

Διαλύονται αυτά σε 800 ml δις απεσταγμένου νερού ή νερό κατηγορίας MBG (Molecular Biology Grade) αναλόγως της χρήσης που πρόκειται να γίνει.

Ρυθμίζεται το pH στο7.4 με πυκνό HCl(37% κ.ο.) ή πυκνό NaOH (10M).

Συμπληρώνεται με νερό κατηγορίας όπως παραπάνω μέχρι το 1lt.

Το διάλυμα μπορεί να αποστειρωθεί σε αυτόκαυστο κλίβανο ή με φίλτρο πόρου 0.2um.

10× PHOSPHATE BUFFERED SALINE (PBS)

Για 1 lt του ρυθμιστικού διαλύματος χρειάζονται

80.00 gr NaCl

2.00 gr KCl

14.4 gr Na_2HPO_4

2.4 grKH_2PO_4

Διαλύονται αυτά σε 800 ml δις απεσταγμένου νερού ή νερό κατηγορίας MBG (Molecular Biology Grade) αναλόγως της χρήσης που πρόκειται να γίνει.

Ρυθμίζεται το pH στο 6.8 με πυκνό HCl (37% κ.ο.) ή πυκνό NaOH (10M).

Συμπληρώνεται νερό κατηγορίας όπως παραπάνω μέχρι το 1lt.

Το διάλυμα μπορεί να αποστειρωθεί σε αυτόκαυστο κλίβανο ή με φίλτρο πόρου 0.2um.

50× TAE Buffer (Tris-Acetate-EDTA)

Για 1 lt του ρυθμιστικού διαλύματος χρειάζονται

242gr Tris Base

57.1ml glacial acetic acid

100ml 0.5MEDTA (pH 8.0)

Πριν την παρασκευή του διαλύματος ετοιμάζεται διάλυμα 0.5MEDTA (pH 8.0). Για την προετοιμασία του διαλύματος EDTA, διαλύεται σε 400ml ddH_2O, 93.05gr EDTA. Αναδεύεται καλά. Το EDTA, δεν πρόκειται να διαλυθεί τελείως αν δεν ρυθμισθεί το pH στα 8.0. Για το σκοπό αυτό, ρυθμίζεται το pH στα 8.0 με πυκνό NaOH (συνήθως 5-10M) και προσθέτεται 100ml ddH_2O. Κατόπιν ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

Διαλύονται πρώτα τα 242gr Tris-Base σε 800 ml δις απεσταγμένου νερού ή νερό κατηγορίας MBG (Molecular Biology Grade) αναλόγως της χρήσης που πρόκειται να γίνει. Κατόπιν τούτου, προστίθενται προσεκτικά 57.1ml glacial acetic acid και τέλος προστίθενται100ml από το διάλυμα 0.5M EDTA που παρασκευάσθηκε προηγουμένως. Ρυθμίζεται το pH στο 8.5 με πυκνό NaOH.

Συμπληρώνεται ddH_2O μέχρι το 1lt. Το διάλυμα που προκύπτει μπορεί να φυλαχθεί σε θερμοκρασία δωματίου.

Για τη χρήση του διαλύματος σε ηλεκτροφόρηση χρειάζεται η αραίωσή του 1:50 με ddH_2O.

50× TBE Buffer (Tris-Borate-EDTA)

Για 1 lt του ρυθμιστικού διαλύματος χρειάζονται

530gr Tris Base

275gr Boric Acid

200ml 0.5MEDTA (pH 8.0)

Πριν την παρασκευή του διαλύματος ετοιμάζεται διάλυμα 0.5MEDTA (pH 8.0). Για την προετοιμασία του διαλύματος EDTA, διαλύεται σε 400ml ddH_2O, 93.05gr EDTA. Αναδεύεται καλά. Το EDTA, δεν πρόκειται να διαλυθεί τελείως αν δεν ρυθμισθεί το pH στα 8.0. Για το σκοπό αυτό, ρυθμίζεται το pH στα 8.0 με πυκνό NaOH (συνήθως 5-10M) και προστίθενται 100ml ddH_2O. Κατόπιν ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

Διαλύονται πρώτα τα 530gr TrisBase σε 800 ml δις απεσταγμένου νερού ή νερό κατηγορίας MBG (Molecular Biology Grade) αναλόγως της χρήσης που πρόκειται να γίνει. Κατόπιν τούτου, προστίθενται 275gr Boric Acid και τέλος προστίθενται 200ml από το διάλυμα 0.5M EDTA που παρασκευάσθηκε προηγουμένως. Συμπληρώνεται ddH_2O μέχρι το 1lt. Το διάλυμα που προκύπτει μπορεί να φυλαχθεί σε θερμοκρασία δωματίου.

Για τη χρήση του διαλύματος σε ηλεκτροφόρηση χρειάζεται η αραίωσή του 1:50 με ddH_2O.

3M AMMONIUM ACETATE (CH_3COONH_4)

Για 500ml του ρυθμιστικού διαλύματος χρειάζονται

115.62gr Ammonium Acetate διαλύονται σε 400ml ddH_2O. Ρυθμίζεται το pH του διαλύματος στα 4.8 με πυκνό glacial acetic acid. Συμπληρώνεται νερό μέχρι τελικού όγκου 500ml.

3M SODIUM ACETATE (CH_3COONa)

Για 500ml του ρυθμιστικού διαλύματος χρειάζονται

204gr Ammonium Acetate διαλύονται σε 400ml ddH_2O. Ρυθμίζεται το pH του διαλύματος στα 4.8 με πυκνό glacial acetic acid. Συμπληρώνεται νερό μέχρι τελικού όγκου 500ml.

20× SSC (SALINE-SODIUM CITRATE BUFFER)

Για 1lt ρυθμιστικού διαλύματος χρειάζονται

175.3 gr Sodium Chloride (NaCl)

88.2 gr Sodium Citrate ($C_6H_7NaO_7$)

10N NaOH

175.3gr NaCl και 88.2gr $C_6H_7NaO_7$ διαλύονται σε 800ml ddH_2O. Ρυθμίζεται το pH στο 7.0 με διάλυμα 10N NaOH. Προστίθεται ddH_2O μέχρι το 1lt. Αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο.

10% SDS (SODIUM DODECYL SULFATE)

Για 1lt διαλύματος χρειάζονται:

Διαλύονται 100gr SDS, σε 900ml H_2O. Το SDS μπορεί να μη διαλύεται άμεσα στο νερό και μπορεί να είναι απαραίτητη η περαιτέρω ανάδευσή του. Για να επιταχυνθεί η διάλυση μπορεί να θερμανθεί στους 68°C. Το pH ρυθμίζεται στο 7.2 με προσθήκη μερικών σταγόνων πυκνού HCl (10Nή 37%). Προσθέτουμε H_2O μέχρι τελικού όγκου 1 lt.

Το SDS δεν χρειάζεται αποστείρωση μιας και είναι ένα ισχυρό απορρυπαντικό.

2% SDS (SODIUM DODECYL SULFATE)

Αραιώνεται διάλυμα 10% SDS σε αναλογία 1:5

1% SDS (SODIUM DODECYL SULFATE)

Αραιώνεται διάλυμα 10% SDS σε αναλογία 1:10

HEPES FREE-ACID 2M

Για 1lt διαλύματος χρειάζονται:

Διαλύονται 476.6gr HEPES free-acid σε 1lt ddH_2O, με ταυτόχρονη ανάδευση

3×SSC/0.1% SDS WASH SOLUTION

Για 1lt διαλύματος χρειάζονται

150ml 20×SSC, 10ml 10% SDS

Αναμιγνύονται 150ml 20×SSC και 10ml 10% SDS και συμπληρώνονται μέχρι τελικού 1lt με ddH_2O

SODIUM BICARBONATE 0.1M pH 9.0

Για 1lt διαλύματος χρειάζονται:

8.401gr Sodium Bicarbonate

Διαλύονται 8.401gr Sodium Bicarbonate σε 800ml ddH_2O και προσαρμόζεται το pH στο 9.0 με πυκνό NaOH (10M). Συμπληρώνεται με ddH_2O μέχρι το 1lt.

ΕΤΟΙΜΑ ΚΙΤ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Vybrant Apoptosis Assay Kit: *Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V Alexa Fluor 488 and Propidium Iodide for Flow Cytometry* (Molecular Probes-Invitrogen Inc. **Cat**. **Nr**. V13241)

RNEasy Mini Kit (QIAGEN Inc. **Cat**. **Nr**. 74104)

RNEasy Micro Kit (QIAGEN Inc. **Cat**. **Nr**. 74004)

CyScribe Post-Labelling kit (GE Health former Amersham BioSciences Inc. **Cat**. **Nr**.#RPN5660)

MitoProbe™ Transition Pore Assay Kit (Molecular Probes, Invitrogen Inc. CA **Cat Nr**. #M34153)

MitoProbe™ DiOC2(3) Assay Kit for Flow Cytometry (Molecular Probes, Invitrogen Inc. CA, **Cat. Nr**. #M34150)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΕΠΙΚΟΛΛΩΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *IN VITRO*

ΥΛΙΚΟ

- DMEM, EMEM, F12
- L-Glutamine, 100mM
- Streptomycin 100μg/ml και Penicillin 100 U/ml
- 10%-20% FBS
- 1×PBS
- Σωληνάρια τύπου FALCON 50ml για φυγοκεντρήσεις
- Φυγόκεντρο για σωληνάρια τύπου FALCON 50ml
- Κλίβανος επωάσεως
- Θάλαμος νηματικής ροής (απαγωγός)
- Αντλία κενού για αναρρόφηση των υπερκείμενων (αν δεν υπάρχει αντλία κενού τότε χρησιμοποιούνται ορολογικές πιπέττες 25ml)
- Στείρες πιπέττες Παστέρ με μεγάλο τριχοειδές άκρο (20cm)
- Στείρες ορολογικές πιπέττες
- Φλάσκες πολυουρεθάνης για καλλιέργεια κυττάρων 25cm^2-75cm^2

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Όλη η διαδικασία γίνεται με γάντια τα οποία συχνά σκουπίζονται με οινόπνευμα για να επιτευχθεί μέγιστη αποστείρωση.

Όλες οι διατάξεις με κύτταρα γίνονται σε θάλαμο νηματικής ροής για την αποφυγή μολύνσεων.

Όλα τα υλικά πρέπει να ζεσταθούν σε φούρνο ή επωαστή στους 37ºC. Αυτό είναι σημαντικό για να μην προκληθεί σοκ στα κύτταρα λόγω της διαφοράς θερμοκρασίας.

Προετοιμάζεται το καλλιεργητικό υγρό που θα χρησιμοποιηθεί.

Σε μια φιάλη DMEM, EMEM ή F12 προσθέτονται 100ml FBS ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση του ορού 14-15%.

Προσθέτονται 6ml μίγματος Streptomycin/Penicillin αρχικής συγκέντρωσης 10000 ug/ml και 10000 U/ml αντίστοιχα. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται τελική συγκέντρωση 100ug/ml και 100U/ml στο τελικό καλλιεργητικό υλικό όπου θα μεγαλώσουν τα κύτταρα.

- Αναλόγως της πειραματικής διάταξης τοποθετούνται στον κλίβανο επώασης τόσες φλάσκες όσες χρειάζονται με καλλιεργητικό υγρό. Συνήθως σε φλάσκες 25cm^2 μπορούν να μπουν το μέγιστο 10ml καλλιεργητικού υγρού ενώ σε φλάσκες 75cm^2 μπορούν να μπουν κατά το μέγιστο 45ml καλλιεργητικού υγρού. Η διαδικασία έχει ως εξής:
- Αναρρόφηση του υπερκείμενου θρεπτικού υλικού με στείρες πιπέττες Παστέρ. Σε περίπτωση που τα κύτταρα μεγαλώνουν και στο εναιώρημα, τότε το υπερκείμενο το τοποθετούμε σε ένα

φιαλίδιο τύπου Falcon.

- Πρόσθεση 1% Θρυψίνης (Trypsin), τόσα ml όσα απαιτούνται για την κάλυψη όλης της επιφάνειας της φλάσκας. Π.χ. για μια φλάσκα 25cm^2 απαιτούνται 2-3ml θρυψίνης, ενώ για μια φλάσκα 75cm^2 απαιτούνται 5-6ml θρυψίνης.
- Επώαση στους 37 ^{o}C για 5-6 min.
- Αναρρόφηση του επωασμένου διαλύματος θρυψίνης και κυττάρων και προσθήκη του σε φιαλίδιο Falcon.
- Φυγοκέντρηση του μείγματος κυττάρων στις 1200 rpm (rounds per minute) για 10min.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και πρόσθεση 10-15ml προ-θερμασμένου 1X PBS.
- Ελαφρά ανακίνηση και ανάδευση με ορολογική πιπέττα 10ml.
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1200 rpm (rounds per minute) για 10min.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Προσθήκη προ-ζεσταμένου καλλιεργητικού υγρού. Η ποσότητα εξαρτάται από το πόσες φλάσκες απαιτούνται για την επερχόμενη πειραματική διάταξη.
- Ανάδευση με ορολογική πιπέττα και προσθήκη μικρών όγκων (aliquots) στις φλάσκες που βρίσκονται ήδη μέσα στον κλίβανο επώασης.

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑ *IN VITRO*

ΥΛΙΚΟ

- RPMI-1640
- L-Glutamine, 100mM
- Streptomycin 100μg/ml και Penicillin 100 U/ml
- 10%-20% FBS
- 1×PBS
- Σωληνάρια τύπου FALCON 50ml για φυγοκεντρήσεις
- Φυγόκεντρο για σωληνάρια τύπου FALCON 50ml
- Κλίβανος επωάσεως
- Θάλαμος νηματικής ροής (απαγωγός)
- Αντλία κενού για αναρρόφηση των υπερκείμενων (αν δεν υπάρχει αντλία κενού τότε χρησιμοποιούνται ορολογικές πιπέττες 25ml)
- Στείρες πιπέττες Παστέρ με μεγάλο τριχοειδές άκρο (20cm)
- Στείρες ορολογικές πιπέττες
- Φλάσκες πολυουρεθάνης για καλλιέργεια κυττάρων 25cm^2-75cm^2

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Όλη η διαδικασία γίνεται με γάντια τα οποία συχνά σκουπίζονται με οινόπνευμα για να επιτευχθεί μέγιστη αποστείρωση.

Όλες οι διατάξεις με κύτταρα γίνονται σε θάλαμο νηματικής ροής για την αποφυγή μολύνσεων.

Όλα τα υλικά πρέπει να ζεσταθούν σε φούρνο ή επωαστή στους 37ºC. Αυτό είναι σημαντικό για να μην προκληθεί σοκ στα κύτταρα λόγω της διαφοράς θερμοκρασίας.

Προετοιμάζεται το καλλιεργητικό υγρό που θα χρησιμοποιηθεί.

Σε μια φιάλη RPMI-1640 προσθέτονται 100ml FBS ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση του ορού 14-15%.

Προσθέτονται 6ml μίγματος Streptomycin/Penicillin αρχικής συγκέντρωσης 10000 ug/ml και 10000 U/ml αντίστοιχα. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται τελική συγκέντρωση 100ug/ml και 100U/ml στο τελικό καλλιεργητικό υλικό όπου θα μεγαλώσουν τα κύτταρα.

- Αναλόγως της πειραματικής διάταξης τοποθετούνται στον κλίβανο επώασης τόσες φλάσκες όσες χρειάζονται με καλλιεργητικό υγρό. Συνήθως σε φλάσκες 25cm^2 μπορούν να μπουν το μέγιστο 10ml καλλιεργητικού υγρού ενώ σε φλάσκες 75cm^2 μπορούν να μπουν κατά το μέγιστο 45ml καλλιεργητικού υγρού. Η διαδικασία έχει ως εξής:
- Φυγοκέντρηση του αρχικού μείγματος κυττάρων στις 1200 rpm (rounds per minute) για 10min.

- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και πρόσθεση 10-15ml προ-θερμασμένου 1X PBS.
- Ελαφριά ανακίνηση και ανάδευση με ορολογική πιπέττα 10ml.
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1200 rpm (rounds per minute) για 10min.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Προσθήκη προ-ζεσταμένου καλλιεργητικού υγρού. Η ποσότητα εξαρτάται από το πόσες φλάσκες απαιτούνται για την επερχόμενη πειραματική διάταξη.
- Ανάδευση με ορολογική πιπέττα και προσθήκη μικρών όγκων (aliquots) στις φλάσκες που βρίσκονται ήδη μέσα στον κλίβανο επώασης.

ΚΡΥΟΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΜΑΚΡΟΧΡΟΝΙΑ ΦΥΛΑΞΗ

ΥΛΙΚΟ

- Καλλιεργητικό θρεπτικό υλικό όμοιο με αυτό που χρησιμοποιείται για το μεγάλωμα των κυττάρων. Στην παρούσα περίπτωση αυτά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα DMEM, EMEM, μίγμα EMEM/F12 και το RPMI-1640 εμπλουτισμένο με 15% FBS.
- 1×PBS
- Σωληνάρια τύπου FALCON 50ml ή 15ml για φυγοκεντρήσεις
- Σωληνάρια κρυοκατάψυξης με βιδωτό πώμα, αποστειρωμένα
- Φυγόκεντρο για σωληνάρια τύπου FALCON 50ml
- Κλίβανος επωάσεως
- Θάλαμος νηματικής ροής (απαγωγός)
- Αντλία κενού για αναρρόφηση των υπερκείμενων (αν δεν υπάρχει αντλία κενού τότε χρησιμοποιούνται ορολογικές πιπέττες 25ml)
- Στείρες πιπέττες Παστέρ με μεγάλο τριχοειδές άκρο (20cm)
- Στείρες ορολογικές πιπέττες
- DMSO, απόλυτο

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Όλη η διαδικασία γίνεται με γάντια τα οποία συχνά σκουπίζονται με οινόπνευμα για να επιτευχθεί μέγιστη αποστείρωση.

Όλες οι διατάξεις με κύτταρα γίνονται σε θάλαμο νηματικής ροής για την αποφυγή μολύνσεων.

Προετοιμάζεται το καλλιεργητικό υγρό που θα χρησιμοποιηθεί ως κρυοψυκτικό μέσο.

Σε ένα σωληνάριο 50ml τύπου Falcon τοποθετούνται 40ml καλλιεργητικού υλικού και 10ml DMSO. Κατά αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται διάλυμα 20% Θρεπτικού υλικού/DMSO κ.ο.

Πριν την οποιαδήποτε κατεργασία είναι σημαντικό να γνωρίζει κανείς τον αριθμό των κυττάρων που υπάρχει μέσα στη φλάσκα. Οπότε, το πρώτο βήμα πριν τη φύλαξη των κυττάρων είναι η μέτρηση του αριθμού τους. Ιδανικά τα κύτταρα αφήνονται να μεγαλώσουν μέχρι τα 1000/ul και να βρίσκονται στην λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Κατά κανόνα, για τα υπό μελέτη κύτταρα, αν έχουν αφεθεί να μεγαλώσουν από τα 500/ul σε 48h θα έχουν φτάσει τα 1000/ul και θα είναι στη λογαριθμική φάση μετά από 48h.

- Αφού έχουν ετοιμαστεί στον επωαστικό κλίβανο τα κύτταρα που πρόκειται να κρυοδιατηρηθούν, τοποθετούνται σε σωληνάριο Falcon. Η διαδικασία ακολουθεί ως εξής:
- Φυγοκέντρηση του αρχικού μείγματος κυττάρων στις 1200 rpm (rounds per minute) για 10min.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και πρόσθεση 10-15ml προ-θερμασμένου 1X PBS.

- Ελαφριά ανακίνηση και ανάδευση με ορολογική πιπέττα 10ml.
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1200 rpm (rounds per minute) για 10min.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Προσθήκη 1ml διαλύματος κρυοδιατήρησης (Θρεπτικό υλικό/DMSO 20% κ.ο.). Χρειάζεται πολύ καλή ανάδευση με πιπέττα τύπου Gilson μέγιστου όγκου αναρρόφησης 1ml.
- Αναρρόφηση του μίγματος κυττάρων DMSO, και τοποθέτησή του στο σωληνάριο βαθειάς κατάψυξης. Τα επόμενα στάδια είναι κρίσιμα.
- Επώαση του σωληναρίου βαθειάς κατάψυξης στους +4°C για 1h.
- Επώαση του σωληναρίου βαθειάς κατάψυξης στους -20°C για 1h.
- Επώαση του σωληναρίου βαθειάς κατάψυξης στους -80°C για 1h-8h.
- Αποθήκευση του σωληναρίου σε υγρό άζωτο στους -196°C.

ΑΠΟΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΜΑΚΡΟΧΡΟΝΙΑ ΦΥΛΑΞΗ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΥΓΡΟΥ ΑΖΩΤΟΥ

ΥΛΙΚΟ

- Υδατόλουτρο προθερμασμένο στους 37°C.
- Κλίβανος επωάσεως.
- Καλλιεργητικό θρεπτικό υλικό RPMI-1640 με 15% FBS και αντιβιοτικά, όπως αναφέρεται παραπάνω.
- Φλάσκες καλλιέργειας 75cm^2.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Όλη η διαδικασία γίνεται με γάντια τα οποία συχνά σκουπίζονται με οινόπνευμα για να επιτευχθεί μέγιστη αποστείρωση.

Όλες οι διατάξεις με κύτταρα πρέπει να γίνονται σε θάλαμο νηματικής ροής για την αποφυγή μολύνσεων.

Προετοιμάζονται μια ή δύο φλάσκες των 75cm^2 αναλόγως με το πόσα σωληνάρια βαθειάς κατάψυξης θα αποψυχθούν. Γεμίζονται οι φλάσκες με 45-50ml θρεπτικού υλικού (το max που μπορεί να πάρει μια φλάσκα σε οριζόντια διάταξη) και ο λόγος είναι ώστε να επιτευχθεί μια συγκέντρωση DMSO μετά την απόψυξη <0.2% κ.ο. Το DMSO θεωρείται τοξικό για τα κύτταρα σε συγκεντρώσεις >0.2% κ.ο. Η φλάσκα/φλάσκες προθερμαίνονται τουλάχιστον 1h πριν την όλη διαδικασία στον επωαστικό κλίβανο, ώστε να φτάσουν στους 37°C και να υπάρχει κορεσμός του θρεπτικού με CO_2.

Η διαδικασία απόψυξης γίνεται ταχύτατα και είναι σκόπιμο το δοχείο του υγρού αζώτου να είναι κοντά στο υδατόλουτρο.

<u>Επίσης ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται αφού το υγρό άζωτο μπορεί να προκαλέσει πολύ σοβαρά εγκαύματα και όλη η διαδικασία γίνεται με ειδικά θερμομονωτικά γάντια.</u>

- Λαμβάνονται τα κύτταρα από το υγρό άζωτο και όσο γρηγορότερα γίνεται τοποθετείται το σωληνάριο βαθειάς κατάψυξης στο προθερμασμένο υδατόλουτρο στους 37°C.
- Καθ' όλη τη διάρκεια στο υδατόλουτρο ανακινείται ελαφρά το σωληνάριο με τρόπο ώστε να μην μπει μέχρι το βιδωτό πώμα μέσα στο νερό αλλά μόνο το πλαστικό μέρος κάτω από αυτό. Ο λόγος είναι ότι η παραμονή στο υγρό άζωτο αλλάζει τις ιδιότητες των υλικών με αποτέλεσμα, τα πρώτα λεπτά απόψυξης να μην είναι στεγανό το πώμα του σωληναρίου.
- Μόλις ξεπαγώσουν τα κύτταρα, φέρνονται στο θάλαμο νηματικής ροής, όπου σκουπίζεται σχολαστικά το εξωτερικό μέρος με διάλυμα αιθανόλης 75% για αποφυγή μολύνσεων από το υδατόλουτρο.
- Γίνεται ελαφριά ανακίνηση και ανάδευση με πιπέττα τύπου Gilson1ml.
- Τοποθετείται το περιεχόμενο του σωληναρίου στην προθερμασμένη φλάσκα στον επωαστικό

κλίβανο.

- Αφήνονται τα κύτταρα να ξεπεράσουν το στρες της απόψυξης για ένα βράδυ και την επομένη μπορούν να μετρηθούν για τη βιωσιμότητά τους.
- Αφού μπουν τα κύτταρα στη φλάσκα, μπορεί να ελεγχθεί κάτω από ένα ανάστροφο μικροσκόπιο η πυκνότητά τους και, ως ένα βαθμό, η βιωσιμότητά τους.

ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΠΛΑΚΑ *NEUBAUER*

ΥΛΙΚΟ

- Πλάκα *Neubauer* (*Precicolor HBG*)
- Trypan Blue (Gibco, Invitrogen Inc.)
- Καλυπτρίδες
- Πιπέττα μικρών όγκων (1-10ul)

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Λαμβάνεται μικρή ποσότητα από το κυτταρικό δείγμα (συνήθως 100ul)
- Αραιώνεται το δείγμα αυτό σε μια αναλογία 1:10. Η αραίωση είναι ανάλογη του αριθμού των κυττάρων που υπάρχει στο εναιώρημα. Ο σκοπός είναι να μην υπάρχει πολύ πυκνό διάλυμα κυττάρων αλλά ούτε και πολύ αραιό. Το πρώτο εμποδίζει τη μέτρηση, ενώ το δεύτερο βρίσκεται στα όρια της ευαισθησίας της μέτρησης.
- Βρέχονται ελαφρά δύο άκρες της καλυπτρίδας και επικολλάται στα σημεία στήριξης που έχει ήδη η πλάκα Neubauer για το σκοπό αυτό. Ο λόγος που βρέχεται είναι για να δημιουργηθούν τριχοειδή φαινόμενα και να παραμένει σταθερή η καλυπτρίδα επάνω στην πλάκα.
- Λαμβάνεται ένα μικρό δείγμα από το αραιωμένο εναιώρημα και εκχύεται στο χώρο που σχηματίζεται μεταξύ της καλυπτρίδας και των σημείων μέτρησης.
- Τοποθετείται η πλάκα κάτω από οπτικό μικροσκόπιο και γίνεται διερεύνηση με φακό μεγέθυνσης 10×. Μόλις ανιχνευθούν τα κύτταρα ελέγχουμε με μεγέθυνση 40×. Μετρώνται τα κύτταρα, όπως περιγράφεται στην ενότητα «Μεθοδολογία, Αρχές Μεθόδων και Πειραματικές Διατάξεις».

ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΜΕΤΡΗΤΗ *COULTER*

ΥΛΙΚΟ

- Μετρητής Coulter (NIHON KOHDEN CellTAQα)
- Eppendorf 1.5ml
- Πιπέττα 200ul

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Από μια φλάσκα με κυτταρικό εναιώρημα αφαιρούνται 200ul εναιωρήματος.
- Τοποθετείται το Eppendorf στο μετρητή Coulter και γίνεται η μέτρηση.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΟΥ *IN VITRO* ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ

ΥΛΙΚΟ

- Φλάσκες 25cm^2
- Θρεπτικό υλικό RPMI-1640, εμπλουτισμένο με FBS 15%, Glutamine 2mM και Penicillin/Streptomycin
- Μετρητής Coulter ή Neubauer
- Χημειοθεραπευτικοί παράγοντες
- Φυγόκεντρος δαπέδου ή όμοιου τύπου για σωληνάρια τύπου Falcon 50ml

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Πριν ξεκινήσει η διαδικασία του πειράματος τοποθετείται μια φιάλη θρεπτικού υλικού σε κλίβανο ή υδατόλουτρο στους 37°C για να προθερμανθεί το θρεπτικό υλικό. Είναι πολύ σημαντικό τα κύτταρα που τοποθετηθούν στις φλάσκες να βρίσκονται στην ίδια θερμοκρασία ή κοντά σε αυτή του σώματος.

- Τοποθετούνται οι φλάσκες με κύτταρα που θα χρησιμοποιηθούν για τα πειράματα σε δύο Falcon 50ml και φυγοκεντρούνται για 10min στις 1200rpm.
- Πετιέται το υπερκείμενο και επαναδιαλύεται το ίζημα κάθε σωληναρίου Falcon σε 10ml προζεσταμένου θρεπτικού υλικού.
- Σε περίπτωση που τα κύτταρα δεν έχουν διαλυθεί καλά και δεν είναι κατά μόνας (αυτό μπορεί να το ελέγξει κανείς σε ένα ανάστροφο μικροσκόπιο με μεγέθυνση 40×) λαμβάνονται με μια σύριγγα 10ml και αναδεύονται με αυτήν μια ή δυο φορές. Με τον τρόπο αυτό όλα τα κύτταρα θα έχουν περάσει από τη βελόνα και τυχόν συσσωματώματα θα έχουν σπάσει.
- Από τα σωληνάρια Falcon λαμβάνεται ένα δείγμα 200ul και μετράται ο αριθμός των κυττάρων όπως έχει περιγραφεί παραπάνω.
- Αφού καθορισθεί ο αριθμός των κυττάρων υπολογίζεται πόσα κύτταρα δηλαδή πόσα ml πρέπει να ληφθούν από το αρχικό κυτταρικό διάλυμα και να διαλυθούν στις φλάσκες για τα πειράματα. Συγκεκριμένα, οι αρχικοί αριθμοί που χρησιμοποιήθηκαν στις παρούσες πειραματικές διατάξεις ήταν 600-1200 κύτταρα/ul.
- Με μια πιπέττα λαμβάνεται ο απαιτούμενος όγκος από το αρχικό Falcon και τοποθετείται προσεκτικά σε κάθε φλάσκα ξεχωριστά. Είναι πολύ σημαντικό μέσα στη φλάσκα να περάσει μόνο το αποστειρωμένο tip και όχι τμήμα της πιπέττας για την αποφυγή μολύνσεων.
- Κατόπιν τούτου μετρούνται πάλι οι κυτταρικοί πληθυσμοί αλλά αυτή τη φορά μέσα από τις φλάσκες ώστε να υπάρχει εικόνα του αρχικού αριθμού των κυττάρων. Το σημείο αυτό είναι πολύ σημαντικό διότι όπως φαίνεται από την εμπειρία πολλές φορές πυκνότερα κυτταρικά διαλύματα είχαν διαφορετική απόκριση στα χημειοθεραπευτικά από αραιότερα και αντίστροφα. Έτσι, ο μόνος τρόπος για να κάνει κανείς κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων

με βάση των κυτταρικό πληθυσμό είναι να γνωρίζει όσο το δυνατόν ακριβέστερα τον αριθμό των κυττάρων.

- Αφού μετρηθούν οι κυτταρικοί πληθυσμοί τοποθετούνται τα κύτταρα στον επωαστικό κλίβανο, όπου και αφήνονται για 24 ώρες.
- Την επομένη ημέρα προετοιμάζεται το διάλυμα του φαρμάκου που θα χρησιμοποιηθεί και υπολογίζονται οι αρχικοί όγκοι που πρέπει να ληφθούν από το φάρμακο και οι τελικοί όγκοι που πρέπει να φτάσουν μέσα στη φλάσκα. Η κυριότερη μέθοδος που χρησιμοποιείται για αυτούς τους υπολογισμούς είναι ο νόμος των αραιώσεων (βλ. Παράρτημα ΙΙΙ).
- Τοποθετείται το φάρμακο σε κάθε μια φλάσκα ξεχωριστά και ορίζεται η ώρα χορήγησης ως *ώρα 0*. Κατόπιν τούτου, λαμβάνεται πάλι μικρό δείγμα από κάθε φλάσκα και υπολογίζεται ο κυτταρικός πληθυσμός.

ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΓΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΚΑΙ ΝΕΚΡΩΣΗΣ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

ΥΛΙΚΟ

- Eppendorfs 1.5ml ή 2ml
- Φυγόκεντρος επιτραπέζια για σωληνάρια τύπου Eppendorf
- Πιπέττες 1ml, 200ul
- Προθερμασμένο στους 37°C Ρυθμιστικό διάλυμα 1× PBS

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Πριν ξεκινήσει η διαδικασία απομόνωσης προζεσταίνεται ρυθμιστικό διάλυμα 1× PBS στους 37°C. Επίσης πολύ σημαντικό είναι να μετράται ο κυτταρικός πληθυσμός τη στιγμή της λήψεως. Το πρωτόκολλο της χρώσης είναι σχεδιασμένο για ένα συνολικό πληθυσμό κυττάρων μέχρι 10^6.

- Από τις φλάσκες με τις πειραματικές διατάξεις λαμβάνεται δείγμα έως 1ml και τοποθετείται σε Eppendorf 1.5ml ή 2ml
- Φυγοκεντρείται για 10min στις 1200rpm
- Αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται 1ml προθερμασμένου ρυθμιστικού διαλύματος 1× PBS
- Αναδεύεται ελαφρά με μια πιπέττα 1ml και φυγοκεντρείται για 10min στις 1200rpm
- Αφαιρείται και απορρίπτεται το υπερκείμενο
- Ακολουθείται η διαδικασία της χρώσης με Annexin και Propidium Iodide όπως περιγράφεται παρακάτω
- Σημαντικό είναι τα δείγματα να μετρηθούν το πολύ 15 min αφού γίνει η χρώση τους, ώστε να αποφευχθούν φαινόμενα απόπτωσης λόγω της παραμονής των κυττάρων εκτός καλλιεργητικού υλικού.

ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΓΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

ΥΛΙΚΟ

- Eppendorfs 1.5ml ή 2ml
- Φυγόκεντρος επιτραπέζια για σωληνάρια τύπου Eppendorf
- Πιπέττες 1ml, 200ul
- Φυγόκεντρος επιτραπέζια για σωληνάρια τύπου Eppendorf
- 75% κρύα αιθανόλη
- Προψυγμένο στους +4ºC Ρυθμιστικό διάλυμα 1× PBS

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Πριν ξεκινήσει η διαδικασία της δειγματοληψίας πρέπει να έχει τοποθετηθεί τουλάχιστον ένα 24ωρο πριν διάλυμα 75% αιθανόλης στους -20ºC. Επίσης πρέπει να έχει ψυχθεί στους +4 ºC ρυθμιστικό διάλυμα 1× PBS τουλάχιστον ένα 24ωρο πριν τη δειγματοληψία.

- Από τις φλάσκες με τις πειραματικές διατάξεις λαμβάνεται έως 1ml και τοποθετείται σε Eppendorf 1.5ml ή 2ml
- Φυγοκεντρείται για 10min στις 1200rpm
- Αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται 1ml κρύου ρυθμιστικού διαλύματος 1× PBS
- Αναδεύεται ελαφρά με μια πιπέττα 1ml και φυγοκεντρείται για 10min στις 1200rpm
- Αφαιρείται το υπερκείμενο και τίθενται στο ίζημα 500ul με 1ml κρύας αιθανόλης 75% κ.ο.
- Αν τα κύτταρα μετρηθούν την επόμενη ημέρα τότε επωάζονται για 18-24 ώρες στους +4ºC. Σε διαφορετική περίπτωση τα κύτταρα μπορούν να φυλαχθούν στους -20ºC για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα
- Για τη χρώση των κυττάρων με Propidium Iodide συνεχίζεται η διαδικασία όπως περιγράφεται παρακάτω.

ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΓΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA ΜΕ ΦΥΛΑΞΗ ΣΕ RNALATER

ΥΛΙΚΟ

- Eppendorfs 1.5ml ή 2ml
- Φυγόκεντρος επιτραπέζια για σωληνάρια τύπου Eppendorf
- Πιπέττες 1ml, 200ul
- Φυγόκεντρος επιτραπέζια για σωληνάρια τύπου Eppendorf
- RNALater (Ambion Inc.)

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Από τις φλάσκες με τις πειραματικές διατάξεις λαμβάνεται δείγμα έως 1ml και τοποθετείται σε Eppendorf 1.5ml ή 2ml
- Φυγοκεντρείται για 10min στις 1200rpm
- Αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται 1ml RNALater. Δεν γίνεται έκπλυση με PBS.
- Γίνεται ανάδευση ελαφρά με μια πιπέττα 1ml
- Επωάζεται το μίγμα κυττάρων και RNALater στους +4°C για 18-14 ώρες και μετά τοποθετείται στους -20°C για μακροχρόνια φύλαξη ή μέχρι να επεξεργαστούν τα δείγματα.

ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΓΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA ΜΕ ΦΥΛΑΞΗ ΣΕ *TRIZOL*® REAGENT

ΥΛΙΚΟ

- Eppendorfs 1.5ml ή 2ml
- Φυγόκεντρος επιτραπέζια για σωληνάρια τύπου Eppendorf
- Πιπέττες 1ml, 200ul
- Φυγόκεντρος επιτραπέζια για σωληνάρια τύπου Eppendorf
- Trizol® (Invitrogen Inc.)

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Από τις φλάσκες με τις πειραματικές διατάξεις λαμβάνεται δείγμα έως 1ml και τοποθετείται σε Eppendorf 1.5ml ή 2ml
- Φυγοκεντρείται για 10min στις 1200rpm
- Αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται 1ml *Trizol*. Το *Trizol* είναι τοξικό και πρέπει να χειρίζεται με εξαιρετική προσοχή.
- Γίνεται ανάδευση έντονα με σύριγγα 2ml μέχρι να μην υπάρχουν ίχνη ιζήματος ή κυττάρων στο μίγμα.
- Τα δείγματα μπορούν να φυλαχθούν στους -80^{o}C μέχρι την επεξεργασία τους. Ο κατασκευαστής οίκος αναφέρει ότι τα δείγματα μπορούν να φυλαχθούν σε αυτές τις συνθήκες για ένα μήνα.

ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΓΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA

ΥΛΙΚΟ

- Eppendorfs 1.5ml ή 2ml
- Φυγόκεντρος επιτραπέζια για σωληνάρια τύπου Eppendorf
- Πιπέττες 1ml, 200ul

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Από τις φλάσκες με τις πειραματικές διατάξεις λαμβάνεται δείγμα έως 1ml και τοποθετείται σε Eppendorf 1.5ml ή 2ml
- Φυγοκεντρείται για 10min στις 1200rpm
- Αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται 1ml κρύου ρυθμιστικού διαλύματος 1× PBS
- Γίνεται ανάδευση ελαφρά με μια πιπέττα 1ml και φυγοκεντρείται για 10min στις 1200rpm
- Αφαιρείται το υπερκείμενο και αφαιρείται όλο το ρυθμιστικό διάλυμα με το οποίο έχουν πλυθεί τα κύτταρα.
- Τα δείγματα μπορούν να φυλαχθούν στους -80°C ως έχει μέχρι την επεξεργασία τους.

ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΧΡΩΣΗ GIEMSA

ΥΛΙΚΟ

- Αντικειμενοφόρες πλάκες
- Καλυπτρίδες
- Πιπέττα 20ul
- Ρύγχη πιπέττας 20ul
- Ογκομετρικό δοχείο 250ml (beaker)
- Αιθανόλη 95-100%
- Μικροσκόπιο NIKON ECLIPSE50i
- Giemsa Stain (98%)
- *DPXMounting medium* (Scharlau GmbH)(**Cat. Nr**. DP0050)

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αφού έχει γίνει η πειραματική προετοιμασία, όπου έχει προκληθεί η απόπτωση ή η δράση των κυττάρων με το επιθυμητό χημειοθεραπευτικό, πρέπει να γίνει λήψη μικρής ποσότητας κυτταρικού εναιωρήματος για μικροσκόπηση. Πριν την έναρξη της διαδικασίας μονιμοποίησης ετοιμάζεται το διάλυμα της χρωστικής Giemsa, που θα χρησιμοποιηθεί. Το διάλυμα Giemsa, πρέπει να είναι 5%-10% κ.ο.

- Λαμβάνονται 20ul από κάθε φλάσκα που πρέπει να γίνει μικροσκοπική ανάλυση.
- Τοποθετείται το κάθε δείγμα σε ξεχωριστές αντικειμενοφόρους πλάκες
- Με μια καλυπτρίδα, απλώνεται το δείγμα ομοιόμορφα κατά μήκος της αντικειμενοφόρου πλάκας
- Στεγνώνονται τα δείγματα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για τόσο διάστημα όσο να μην υπάρχει πλέον νερό. Για μια επίστρωση κυττάρων ένας ικανός χρόνος είναι 20-30min.
- Αφού έχει στεγνώσει το επίχρισμα, εμβαπτίζονται τα δείγματα σε γυάλινο ογκομετρικό δοχείο χωρητικότητας 250ml για 10min, πλήρες με απόλυτη αιθανόλη (95-100%)
- Αφήνονται τα δείγματα να στεγνώσουν στον αέρα, σε θερμοκρασία δωματίου για 20-30min
- Τοποθετούνται τα πλακάκια οριζόντια και με μια πιπέττα απλώνεται σε όλη την επιφάνεια της αντικειμενοφόρου πλάκας το διάλυμα της χρωστικής που έχει ετοιμασθεί προηγουμένως. Χρώνυνται για 15min αν χρησιμοποιείται 10% διάλυμα και για 30min αν χρησιμοποιείται 5% διάλυμα.
- Αφήνονται οι αντικειμενοφόροι να στεγνώσουν στον αέρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μετά το στέγνωμά τους, μπορούν να εξετασθούν τα δείγματα σε ένα φωτονικό μικροσκόπιο.
- Σε περίπτωση που χρειάζεται να διατηρηθούν τα δείγματα για μεγάλα χρονικά διαστήματα,

επικαλύπτονται με *DPX Mounting medium* (Scharlau GmbH) (**Cat. Nr**. DP0050).

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΚΑΙ ΝΕΚΡΩΣΗΣ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ ΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΣΕ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑ

ΥΛΙΚΟ

- Eppendorfs 1.5ml ή 2ml
- Φυγόκεντρος επιτραπέζια για σωληνάρια τύπου Eppendorf
- Πιπέττες 1ml, 200ul, 20ul
- Vybrant Apoptosis Assay Kit (βλ. Παράρτημα Ι)
- Κυτταρόμετρο ροής (Beckman Coulter XL και FC500)

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Το πρώτο βήμα είναι η πρόκληση του κυτταρικού θανάτου με το επιθυμητό πρωτόκολλο όπως αναφέρθηκε παραπάνω για τη χρήση των χημειοθεραπευτικών στα κύτταρα υπό μελέτη. Για τη δειγματοληψία βλ. παραπάνω την ενότητα «*Δειγματοληψία για τη Μέτρηση Απόπτωσης και Νέκρωσης με Κυτταρομετρία Ροής*» στο παρόν παράρτημα.

Για τη μέτρηση, πέραν των δειγμάτων υπό τη δράση φαρμάκου, απαιτούνται τέσσερα δείγματα ελέγχου. Ένα δείγμα χωρίς καμία απολύτως χρωστική και χωρίς φαρμακευτική επώαση, ένα δείγμα μόνο με χρώση Alexa 488/AnnexinV χωρίς φαρμακευτική επώαση, ένα δείγμα μόνο με χρώση Propidium Iodide χωρίς φαρμακευτική επώαση και τέλος ένα δείγμα και με τις δύο χρωστικές, επίσης χωρίς φαρμακευτική επώαση.

Πριν την οποιαδήποτε μέτρηση έχει ξεκινήσει το κυτταρόμετρο και έχει γίνει η απαιτούμενη προθέρμανση που απαιτείται, καθώς και τα απαιτούμενα καθημερινά διαγνωστικά τεστ.

- Προετοιμάζεται διάλυμα 1× Annexin-binding Buffer. Για κάθε 10 δείγματα προσθέτονται 1ml 5× Annexin-binding Buffer (Component C στο κιτ του κατασκευαστή) σε 4ml δις-απεσταγμένου νερού.
- Ετοιμάζεται ένα διάλυμα Propidium Iodide με τελική συγκέντρωση 100 ug/mL (working solution) διαλύοντας 5ul του αρχικού διαλύματος PI (stock solution, Component B) συγκέντρωσης 1mg/ml σε 45ul1× Annexin-binding Buffer. Το διάλυμα αυτό μπορεί να φυλαχθεί στους +4^{o}C για μελλοντική χρήση.
- Σε συνέχεια του πρωτοκόλλου δειγματοληψίας και αφού έχουν πλυθεί με 1× PBS, έχουν φυγοκεντρηθεί τα δείγματα στις 1200 rpm για 10 min, πετιέται το υπερκείμενο και επαναδιαλύονται τα κύτταρα στο 1× Annexin-binding Buffer που φτιάχτηκε στο προηγούμενο στάδιο.
- Για κάθε 10^6 κύτταρα χρησιμοποιούνται 100ul 1× Annexin-binding Buffer.

- Στο διάλυμα αυτό προστίθενται 5 ul Alexa Fluor 488/AnnexinV (Component A) και 1 ul του διαλύματος 100 ug/ml Propidium Iodide που φτιάχτηκε προηγουμένως.
- Επωάζεται στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου για 15min.
- Μετά το πέρας της επώασης προστίθενται 400 ul1× Annexin-binding Buffer, σε τελικό όγκο 500ul, γίνεται ανάδευση ελαφρά και τοποθετούνται τα δείγματα σε πάγο.
- Από το σημείο αυτό και μετά πρέπει να μετρηθούν τα κύτταρα εντός 15 min χρησιμοποιώντας laser στα 488 nm excitation και οι φωτοπολλαπλασιαστές να ανιχνεύουν το φθορισμό στα 530 nm και 575 nm (ή αντίστοιχο).

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΚΑΙ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ DNA ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ ΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΣΕ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑ

ΥΛΙΚΟ

- Eppendorfs 1.5ml ή 2ml
- Φυγόκεντρος επιτραπέζια για σωληνάρια τύπου Eppendorf
- Πιπέττες 1ml, 200ul, 20ul
- Propidium Iodide (Invitrogen Inc.) (βλ. Παράρτημα Ι)
- Κυτταρόμετρο ροής (Beckman Coulter XL και FC500)
- Προψυγμένο στους +4°C Ρυθμιστικό διάλυμα 1× PBS

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Το πρώτο βήμα είναι η επώαση των κυττάρων με το επιθυμητό πρωτόκολλο όπως αναφέρθηκε παραπάνω για τη χρήση των χημειοθεραπευτικών στα κύτταρα υπό μελέτη. Για τη δειγματοληψία βλ. παραπάνω την ενότητα «*Δειγματοληψία για τη Μέτρηση Κυτταρικού Κύκλου με Κυτταρομετρία Ροής*» στο παρόν παράρτημα.

Για τη μέτρηση, πέραν των δειγμάτων υπό τη δράση φαρμάκου, απαιτούνται δύο δείγματα ελέγχου. Ένα δείγμα χωρίς καμία απολύτως χρωστική και χωρίς φαρμακευτική επώαση, ένα δείγμα χωρίς καμία απολύτως χρωστική με φαρμακευτική επώαση. Πριν την οποιαδήποτε μέτρηση πρέπει να έχει ξεκινήσει το κυτταρόμετρο και να έχει γίνει η απαιτούμενη προθέρμανση που απαιτείται καθώς και να έχουν γίνει τα απαιτούμενα καθημερινά διαγνωστικά τεστ.

Πρέπει επίσης να έχει προ-ψυχθεί Ρυθμιστικό διάλυμα 1× PBS στους +4°C.

- Φυγοκεντρείται 1ml από το εναιώρημα κυττάρων της κάθε φλάσκας στα 1000 rpm για 10 λεπτά.
- Απορρίπτεται το υπερκείμενο και επαναδιαλύεται/εκπλένεται σε 1ml προψυγμένο στους +4°Cρυθμιστικό διάλυμα 1× PBS
- Φυγοκεντρείται ξανά στις 1000 rpm για 10 λεπτά. Απορρίπτεται το υπερκείμενο.
- Φυγοκεντρείται ομοίως και επαναδιαλύεται σε 1 mlPBS, pH 7.4.
- Προσθέτονται 0.25 μg/ml RNaseA και επωάζονται στους 37°C για 30 λεπτά, για να απομακρυνθούν ίχνη RNA που θα μπορούσαν να αντιδράσουν με το PI
- Προσθέτεται το PI σε τελική συγκέντρωση 1 ug/ml
- Από το σημείο αυτό και μετά προστατεύονται τα δείγματα από το φως
- Μετά από αυτό το σημείο μπορούν να μετρηθούν εντός ευλόγου χρονικού διαστήματος τα δείγματα στον κυτταρομετρητή.

ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ (RNA) ΜΕ ΤΗΝ ΑΡΧΗ ΤΟΥ TRIZOL® ΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΣΕ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑ

ΥΛΙΚΟ

- Trizol (Invitrogen Inc.)
- Chloroform (Sigma-Aldrich GmbH)
- Isopropanol, 100% (AppliChem)
- Ethanol, 75%, διάλυμα (AppliChem)
- Double Distilled, DNase-, RNase-free water (Gibco, Invitrogen Inc.)
- Eppendorfs 1.5ml ή 2ml
- Φυγόκεντρος επιτραπέζια για σωληνάρια τύπου Eppendorf
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος επιτραπέζια για σωληνάρια τύπου Eppendorf
- Πιπέττες 1ml, 200ul, 20ul
- ddH2O, DNase, RNase-Free

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η διαδικασία που ακολουθεί αφορά σε κύτταρα που έχουν αποχωρισθεί από το καλλιεργητικό/θρεπτικό υλικό. Για το διαχωρισμό κυττάρων από το θρεπτικό υλικό γίνεται φυγοκέντρηση για 10min στις 1200 rpm και αναρροφάται το υπερκείμενο. Δεν γίνεται πλύση των κυττάρων μετά από αυτό το στάδιο. Επίσης πριν ξεκινήσει η διαδικασία αυτή πρέπει να ετοιμασθεί η ψυχόμενη φυγόκεντρος στους +4^{o}C.

- Για κάθε 10^7 κύτταρα χρησιμοποιούνται 1mlTrizol reagent.
- Γίνεται ανάδευση καλά με μια πιπέττα 1ml
- Επωάζεται το ομογενοποιημένο διάλυμα Trizol/κύτταρα για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Αυτό γίνεται για να επιτευχθεί η αποδιάταξη των πρωτεϊνών που είναι προσδεδεμένες στο DNA ή RNA
- Προσθέτονται 200ul Chloroform και γίνεται ανάδευση με το χέρι έντονα για περίπου 15sec. Ο σκοπός αυτής του βήματος είναι να επιτευχθεί ανάμειξη των δύο φάσεων.
- Επωάζεται το δείγμα μετά την ανακίνηση για 5min σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκεντρείται το δείγμα στις 12000×g (~11000rpm) για 15min στους +4^{o}C
- Μετά τη φυγοκέντρηση το δείγμα πρέπει να έχει χωρισθεί σε δύο φάσεις: μια ερυθρή που περιέχει το διάλυμα φενόλης (*phenolphase*), μια διαφανή την υδατοδιαλυτή φάση, (*acqueous phase*) στην οποία βρίσκεται το RNA και τέλος ανάμεσα σε αυτές τις δύο υπάρχει μια λευκή ζώνη που είναι το DNA.
- Μεταφέρεται προσεκτικά η υδάτινη φάση σε ένα νέο αποστειρωμένο σωληνάριο και

προσθέτονται 500ul απόλυτης ισοπροπανόλης. Γίνεται καλή ανάδευση.

- Επωάζεται το μίγμα για 10min σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκεντρείται σε 12000×g για 10min στους +4^{o}C
- Αφαιρείται το υπερκείμενο, προσεκτικά, μιας και το ίζημα του RNA είναι πολλές φορές μη ορατό.
- Προσθέτονται 1ml 75% αιθανόλης, γίνεται ανάδευση με vortex
- Φυγοκεντρείται στις 7500×g για 5min στους +4^{o}C
- Αφαιρείται το υπερκείμενο όσο γίνεται καλύτερα, ώστε να μην υπάρχουν υπολείμματα αιθανόλης και αφήνονται τα δείγματα να στεγνώσουν στον αέρα για 5-10min
- Διαλύεται το ίζημα σε 80ul ddH_2O, RNase-free
- Το RNA που έχει εκχυλιστεί έχει και ένα ποσοστό DNA, το οποίο πρέπει να καθαρισθεί όπως περιγράφεται παρακάτω στη μεθοδολογία
- Το εκχυλισμένο RNA μπορεί να φυλαχθεί στους -80 ^{o}C μέχρι την περαιτέρω κατεργασία του και ανάλυσή του
- Μετά το πέρας της παραπάνω διαδικασίας γίνεται επώαση του δείγματος στους 37^{o}C για 30 min. Ο λόγος για αυτή την επώαση είναι για να ελεγχθεί η ποιότητα του RNA. Αν το δείγμα έχει υπολείμματα RNases τότε αυτές θα κόψουν το RNA και στον επόμενο καθαρισμό που θα περιγραφεί δεν θα εκχυλιστεί καθόλου RNA.

ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

ΥΛΙΚΟ

- SmartSpec *3000* (BioRad)
- NanoDrop *2000* (Thermo Scientific)
- DNase-, RNase-freeddH_2O
- Eppendorfs 1.5ml ή 2ml
- Πιπέττες 1ml, 200ul, 20ul, 2ul

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Για τη φωτομέτρηση χρησιμοποιήθηκαν δύο εναλλακτικές μεθοδολογίες. Η πρώτη αφορούσε στην αραίωση του αρχικού δείγματος και μέτρησή του με το φωτόμετρο SmartSpec, σε κυβέτες πυριτίου (quartz) και η δεύτερη αφορούσε στη μέτρηση του δείγματος απευθείας στο φωτόμετρο χρησιμοποιώντας μια νεότερη τεχνολογία αυτή του NanoDrop.

SmartSpec

- Λαμβάνεται ένα δείγμα 10ul από το αρχικό διάλυμα και αραιώνεται 50×, προσθέτοντας 490ul ddH_2O.
- Τοποθετούνται στην κυβέτα 500ul ddH_2O
- Γίνεται φωτομέτρηση ώστε να ρυθμιστούν τα επίπεδα θορύβου. Η μέτρηση αυτή δίνει τη βάση πάνω από την οποία θα μετρηθεί η συγκέντρωση του RNA. Καταγράφεται η μέτρηση ($A_{260,blank}$).
- Σε μια δεύτερη κυβέτα (ή με την ίδια μετά από ένα σύντομο πλύσιμο) τοποθετείται το αραιωμένο δείγμα
- Καταγράφεται η απορρόφηση στα 260nm(A_{260}) και 280nm (A_{280})
- Ο λόγος (λ) για την καθαρότητα του RNA δίνεται από τη σχέση $\lambda = \frac{(A_{260} - A_{260,blank})}{A_{280}}$
- Η συγκέντρωση (C_{RNA}) του RNA δίνεται από τη σχέση, $C_{RNA} = \frac{(A_{260} - A_{260,blank})}{\varepsilon l} \cdot dilution_factor$ ή $C_{RNA} = \frac{(A_{260} - A_{260,blank})}{\varepsilon l}$

NanoDrop

- Φωτομετρούνται 2ul καθαρού ddH_2O ως μέτρηση *0* (*blank*)
- Από το δείγμα RNA 2 μl τοποθετούνται στο φωτόμετρο και μετρούνται
- Για τον υπολογισμό της καθαρότητας και συγκέντρωσης ισχύουν όλα τα παραπάνω

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΓΕΛΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

ΥΛΙΚΟ

- Agarose (mixture of SEAKEMGTG and NusieveGTG)
- Ethidium Bromide, (EtBr) (Sigma Aldrich GmbH)
- GelStar Nucleic Acid Stain (CAMBREX BioScience Rockland, Inc.)
- 1×TAE buffer
- Electrophoresis bath
- Power supply
- Imaging device - AlphaImager (Alpha Innotech, Inc.)
- Loading Dye 6× (Promega Inc.)

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Με την ηλεκτροφόρηση γίνεται ποιοτική ανάλυση των δειγμάτων, σε σχέση με την περιεκτικότητά τους σε RNA. Χρησιμοποιείται η φθορίζουσα χρωστική, EtBr, ή μη τοξική χρωστική (που συνιστάται) GelStar, η οποία αντικαθιστά υδροξυλικές ομάδες των νουκλεοτιδίων, στην περίπτωση αυτή του RNA. Στο υπεριώδες φώς, UV device, AlphaImager, ήταν δυνατό να απεικονισθεί η πρόσληψη της χρωστικής από το δείγμα κι επομένως η ύπαρξη RNA.

- Ζυγίζονται 2 gr αγαρόζη (μίγμα 1.5gr SEAKEM GTG και 0.5gr Nusieve GTG)
- Διαλύεται η αγαρόζη σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος 1×TAE
- Αναδεύεται ελαφρά
- Ζεσταίνεται στα μικροκύματα για 2 λεπτά σε δοχείο Elenmeyer χωρητικότητας 250ml
- Όταν αρχίσει ο βρασμός, βγαίνει από τα μικροκύματα και αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσθέτονται 5μl EtBr, από διάλυμα 10mg/ml (stock solution) ή 5ul GelStar stain (stock solution)
- Στη συνέχεια αφήνεται το υγρό να γίνει gel στο κουτί ηλεκτροφόρησης, μαζί με το ειδικό χτενάκι για τη δημιουργία πηγαδιών.
- Προσθέτεται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης
- Φορτώνονται τα δείγματα στα πηγαδάκια και τρέχει το gel για 1,5 με 2 ώρες στα 100 Volt
- Φωτογραφίζονται τα αποτελέσματα.

ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟ ΚΑΙ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ DNA

ΥΛΙΚΟ

- RQ1 RNase-freeDNase (PromegaInc.)
- 10× DNase Buffer (Promega Inc. Provided with the enzyme)
- Stop Solution (Promega Inc. Provided with the enzyme)
- Heat Block or water bath or incubator for 37^{o}C incubation

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Με τη διαδικασία αυτή γίνεται κατεργασία των δειγμάτων RNA με DNase, προκειμένου να απορριφθούν τμήματα DNA που μπορεί να υπάρχουν μέσα στα δείγματα.

- Σε σωληνάριο eppendorf αναμιγνύονται: 10μl 10× RQ1 reaction buffer, 10μl RQ1 RNase-freeDNase, 2μl RNasin, 10 μg RNA. Συμπληρώνεται μέχρι 100μl DNase- RNase free ddH_2O
- Επωάζεται στους 37^{o}C, για 30 λεπτά
- Προσθέτονται 10μl stop solution
- Για επιβεβαίωση της απενεργοποίησης της DNase επωάζεται επιπροσθέτως το παραπάνω μίγμα στους 85^{o}Cγια 5 min.
- Ακολουθείται η διαδικασία καθαρισμού με τα παρακάτω πρωτόκολλα

ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ RNA ΚΑΙ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΤΟΥ DNA ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΙΠΩΝ DNASE

ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ RNA ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΦΑΙΝΟΛΗΣ/ΧΛΩΡΟΦΟΡΜΙΟΥ ΚΑΙ ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗΣ ΜΕ ΟΞΙΚΟ ΝΑΤΡΙΟ Ή ΑΜΜΩΝΙΟ

ΥΛΙΚΟ

- Διάλυμα οξικού αμμωνίου (CH_3COONH_4) 3M, pH 4.8
- Διάλυμα οξικού νατρίου (CH_3COONa) 3M, pH 4.8
- Φαινόλη (Sigma Aldrich GmbH)
- Chloroform (Sigma Aldrich GmbH)
- Ethanol 70%
- ddH2O, DNase- RNase-free

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Στο διάλυμα που έχει προκύψει μετά την κατεργασία με DNase I προσθέτεται ddH_2O μέχρι τα 200ul
- Προσθέτονται 200μl Phenol/Chloroform και αναδεύονται καλώς για 15sec
- Φυγοκεντρείται για 10min στις 14000rpm
- Μεταφέρεται η υδάτινη φάση (~210μl) σε νέο σωλήνα
- Προσθέτεται ένας όγκος (~210μl) 3M NαOAc ή NH_4Ac, με pH 4.8 και στη συνέχεια 577,5 μl Ethanol (100%)
- Αφήνεται το RNA να καθιζήσει για ένα βράδυ στους -20^oC ή σε περίπτωση που θα συνεχίσει το πείραμα την ίδια ημέρα επωάζεται για >1h στους -80^oC
- Την επόμενη ημέρα φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 14000 rpm στους 4^oC
- Πετιέται το υπερκείμενο και γίνεται νέα έκπλυση με 500μl παγωμένη Ethanol (70%)
- Φυγοκεντρείται ξανά για 10 λεπτά στις 14000 rpm στους 4^oC και επαναδιαλύεται το RNAσε 50-100μl TE (1μg/ml) ή ddH2O, DNase- RNase-free.

ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ RNA ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΚΙΤ

ΥΛΙΚΟ

(provided by the manufacturer)

- RNEasy MinElute Columns
- Collection tubes (1.5ml)
- Collection tubes (2ml)
- Buffer RLT
- Buffer RW1
- Buffer RPE
- RNase-free ddH_2O

(provided by the user)

- 14.3M β-mercaptoethanol
- Ethanol 70%
- Ethanol 100%
- Tips
- Microcentrifuge
- Vortexer

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων RLT και RPE. Στο ρυθμιστικό διάλυμα RLT γίνεται προσθήκη 10 μl β- mercaptoethanol για κάθε 1ml διαλύματος. Το διάλυμα RPE γίνεται με προσθήκη 4 όγκων απόλυτης αιθανόλης (100%), στο παρεχόμενο εργοστασιακά συμπυκνωμένο προϊόν
- Προσθέτονται 350 μl ρυθμιστικού διαλύματος RLT στο δείγμα (συνολικού όγκου 100ul) και αναμιγνύονται καλά με μια πιπέττα
- Προσθέτονται 250 μl αιθανόλης 100% στο δείγμα και αναμιγνύεται καλά με μια πιπέττα
- Θέτεται το δείγμα (μέχρι 700 μl) σε στήλη με φίλτρο RNeasy σε σωληνάριο 2ml
- Φυγοκεντρείται για 15 δευτερόλεπτα σε ≥ 8.000 ×g (≥10000rpm)
- Μεταφέρεται η στήλη RNeasy σε νέο σωληνάριο των 2 ml
- Προσθέτονται 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος RPE και φυγοκεντρούνται για 15 δευτερόλεπτα σε ≥ 8.000 ×g (≥10000rpm)
- Απορρίπτεται το υπερκείμενο και επαναλαμβάνεται το βήμα αυτό άλλη μια φορά

- Τοποθετείται η στήλη RNeasy σε νέο σωλήνα των 2 ml και φυγοκεντρείται για 2 λεπτά σε ≥ 8.000 ×g (≥10000rpm)
- Μεταφέρεται η στήλη RNeasy σε νέο σωλήνα των 1.5 ml και εγχέονται 50 μlRNase-free ddH_2O κατευθείαν στη RNeasy μεμβράνη
- Επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά
- Εκλούεται το RNA με φυγοκέντρηση σε ≥ 8.000 ×g (≥10000rpm) για 1 λεπτό, χωρίς να αφαιρεθεί η στήλη
- Εγχέονται άλλα 50 μl RNase-free ddH_2O κατευθείαν στην ίδια RNeasy μεμβράνη
- Επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά
- Εκλούεται το RNA με φυγοκέντρηση σε ≥ 8.000 ×g (≥10000rpm) για 1 λεπτό, στο ίδιο σωληνάριο του προηγούμενου βήματος
- Αφαιρείται η στήλη και αναμιγνύεται το διάλυμα με ελαφρά χτυπήματα στο πλάι του σωλήνα
- Το RNA μπορεί να φυλαχθεί στους -80°C μέχρι την περαιτέρω κατεργασία του.

Περίληψη Πρωτοκόλλου

1. **Εκτίμηση της συγκέντρωσης και ποιότητας του ολικού RNA.**

Εκτίμηση της συγκέντρωσης και ποιότητας του δείγματος ολικού RNA με σπεκτροφωτομετρία και ηλεκτροφόρηση.

2. **Σύνθεση πρώτης έλικας cDNA.**

Επωάζεται ολικό RNA (0.2-2 μg), με βακτηριακά mRNA δείγματα ελέγχου σε διάλυση και T7 ολιγο (dT) εκκινητή για 10 λεπτά στους 70^{o}C. Προσθέτονται τα υλικά της αντίδρασης για την πρώτη έλικα, και επωάζονται για 2 ώρες στους 42^{o} C.

3. **Σύνθεση της δεύτερης έλικας cDNA.**

Προσθέτονται τα προϊόντα της σύνθεσης της πρώτης έλικας στα συστατικά της αντίδρασης της δεύτερης έλικας και επωάζονται για 2 ώρες στους 16^{o}C

4. **Καθαρισμός του cDNA διπλής έλικας.**

Καθαρίζεται και διαλύεται δύο φορές με 30 μl EB ρυθμιστικό διάλυμα κάθε φορά. Συμπυκνώνεται το καθαρμένο cDNA σε ≤ 9.5μl ανά σωληνάριο.

5. **Σύνθεση cRNA με IVT.**

Προσθέτεται αρκετό ύδωρ ελεύθερο νουκλεασών, ώστε να έρθει ο όγκος του δείγματος cDNA στα 9.5 μl. Ετοιμάζεται το μείγμα IVT του βιοτινιλιομένου UTP, ριβονουκλεοτίδια και το μείγμα ενζύμων 10× T7 και προστίθεται στο αναδιαλυμένο cDNA. Επωάζεται στους 37^{o} C για 14 ώρες.

6. **Ανάκτηση του σημασμένου με βιοτίνη cRNA.**

Καθαρίζεται το cRNA και επαναδιαλύεται δύο φορές- την κάθε φορά με 50 μl ύδατος ελεύθερου νουκλεασών.

7. **Εκτίμηση της συγκέντρωσης, καθαρότητας και ποσότητας του cRNA.**

Μετράται η απορρόφηση στα 260 nm μιας ποσότητας 2 μl cRNA διαλυμένης σε 98 μl ύδατος. Η συγκέντρωση του cRNA θα πρέπει να είναι > 0.5 μg/ μl. Προσθέτονται 11 μl από 0.1 M Tris-HCL στο δείγμα και διαβάζεται το δείγμα ξανά στα 260 nm και 280 nm για να καθορισθεί η αναλογία A260: A280. Αν η αναλογία είναι μικρότερη του 1.8, καθιζάνεται το cRNA σύμφωνα με το παράρτημα 7. Δεν προχωρά το πείραμα αν η αναλογία A260:A280 δεν είναι μεγαλύτερη από 1.8. Το ενισχυμένο cRNA θα πρέπει να έχει μέγεθος περίπου ≈1200nt.

8. **Κατάτμηση cRNA.**

Σε 25 μl ολικού όγκου, προσθέτονται 10 μg cRNA σε 5 μl από 5× ρυθμιστικό διάλυμα κατάτμησης και επωάζεται στους 94^{o}C για 20 λεπτά.

9. **Προετοιμασία μείγματος για την αντίδραση υβριδισμού.**

Τίθενται 10 μg κατατετμημένου cRNA, 78 μl από το συνθετικό Α του ρυθμιστικού διαλύματος υβριδισμού, και 130 μl από το συνθετικό Β του ρυθμιστικού διαλύματος υβριδισμού σε τελικό όγκο 260 μl με προσθήκη νερού. Επωάζονται στους 90°C για 5 λεπτά και αμέσως κρυώνονται σε πάγο για 5-30 λεπτά.

10. Φόρτωση των μειγμάτων αντίδρασης στις θέσεις των συστοιχιών

Εννύονται σιγά 250 μl από το μείγμα αντίδρασης υβριδισμού στις θέσεις των συστοιχιών και σφραγίζονται με τις ταινίες σφράγισης.

11. Υβριδισμός

Θέτεται η ταχύτητα του αναδευτή στις 300 rpm και επωάζονται τα πλακάκια για 18-24 ώρες στους 37°C, διατηρώντας σταθερό χρονικό διάστημα υβριδισμού για συγκριτικά πειράματα.

12. Έκπλυση μετά τον υβριδισμό.

Αφαιρείται το FlexChamber, χρησιμοποιώντας το ειδικό εργαλείο, σε γωνία 60° με το πλακάκι. Μετά, τοποθετούνται οι βιοσυστοιχίες στη θήκη, ενώ αυτή βρίσκεται στο ρεζερβουάρ που περιέχει 0.75 ×TNT. Μεταφέρεται η θήκη στο μεγάλο ρεζερβουάρ που περιέχει προθερμασμένο 0.75 ×TNT , και επωάζεται στους 46°C για 1 ώρα ακριβώς.

13. Ανίχνευση με το σύμπλοκο της χρωστικής στρεπταβιδίνης.

Γεμίζεται κάθε σχισμή του μικρού ρεζερβουάρ με το αντιδραστήριο με 3.4 ml από ενεργό διάλυμα Cy-5 Streptavidin. Μεταφέρεται η θήκη με τις βιοσυστοιχίες από το μεγάλο στο μικρό ρεζερβουάρ και επωάζονται οι βιοσυστοιχίες σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Γίνεται έκπλυση των βιοσυστοιχιών τέσσερις φορές με 1×TNT (5 λεπτά η κάθε έκπλυση) σε μεγάλα ρεζερβουάρ. Ξεπλένονται οι βιοσυστοιχίες σε 0.1 ×SSC/0.05% Tween™για 30 δευτερόλεπτα. Αμέσως μετά γίνεται φυγοκέντρηση για να στεγνώσουν οι βιοσυστοιχίες, και μετά φυλάσσονται στο σκοτάδι.

14. Σάρωση των βιοσυστοιχιών και ανάλυση.

Οι βιοσυστοιχίες σαρώνονται και αναλύονται με το λογισμικό της Codelink Expression Analysis.

ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΗ ΧΕΙΡΟΠΟΙΗΤΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΤΟΧΩΝ

Codelink Expression Assay Reagent Kit, Manual prep, 24 αντιδράσεις

Αντιδραστήρια σύνθεσης cDNA:

T7 ολιγο (dT) εκκινητής

10× ρυθμιστικό διάλυμα πρώτης έλικας

Μείγμα 5mMdNTP

Ανάστροφη τρανσκριπτάση

Αναστολέας RNase

10× ρυθμιστικό διάλυμα δεύτερης έλικας

Μείγμα DNA πολυμεράσης

RNaseH

Ύδωρ ελεύθερο νουκλεασών

RNA ελέγχου (1μg/μlHeLaή RatthymusRNA ελέγχου)

Βακτηριδιακά mRNA ελέγχου

Βακτηριδιακό mRNA ελέγχου araB (0.1 μg/ μl)

Βακτηριδιακό mRNA ελέγχου entF (0.1 μg/ μl)

Βακτηριδιακό mRNA ελέγχου fixB (0.1 μg/ μl)

Βακτηριδιακό mRNA ελέγχου gnd (0.1 μg/ μl)

Βακτηριδιακό mRNA ελέγχου hisB (0.1 μg/ μl)

Βακτηριδιακό mRNA ελέγχου leuB (0.1 μg/ μl)

Αντιδραστήρια IVT

10× T7 ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης

10× T7 μείγμα ενζύμων

T7 ATP διάλυμα

T7 GTP διάλυμα

T7 CTP διάλυμα

T7 UTP διάλυμα

pTRI-Xef 1 έλεγχος

Άλλα αντιδραστήρια

5× ρυθμιστικό διάλυμα κατάτμησης

Ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού, συστατικό A

Ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού, συστατικό B

ΑΛΛΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗ ΧΕΙΡΟΠΟΙΗΤΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΤΟΧΩΝ

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στο πρωτόκολλο θα πρέπει να είναι μοριακού επιπέδου ή υψηλότερα

- 10 mM biotin-11-UTP (PerkinElmer, NEL 543 ή 999-543)
- QIAquick™ PCR Purification Kit (QIAGEN Corp, 28104 ή 28106)
- RNeasy Mini Kit (QIAGEN Corp, 74104 ή 74106)
- Ύδωρ ελεύθερο νουκλεασών

- HPLC-grade absolute ethanol
- Ethidium bromide, 10μg/μl
- 1 kb DNA ladder
- 1×TAE ρυθμιστικό διάλυμα
- Αγαρόζη
- 14.3 M β-mercaptoethanol (β-ME)
- 37% φορμαλδεΰδη
- 3-[N-Morpholino] propanesulfonic acid (MOPS) free acid
- Μπλε βρωμοφαινόλης
- Φορμαμίδη
- RNA 6000 molecular weight ladder (Ambion, 7152)
- 5M οξικό αμμώνιο
- Ρύγχη πιπεττών: αποστειρωμένα, ελεύθερα RNase και ανθεκτικά στο αεροσόλ
- 1.7-ml σωληνάρια μικροφυγοκέντρου: αποστειρωμένα, ελεύθερα RNase
- 15- και 50- ml κωνικοί σωληνίσκοι: αποστειρωμένοι, ελεύθερα RNase
- Αναρροφητήρες (10-, 20-, 200- και 1000- μl)
- UV σπεκτροφωτόμετρο και 100- μl quartz κυβέτες
- Μικροφυγόκεντρος: σε θερμοκρασία και 4°C
- Υδρόλουτρο (σε 70 °C, 42 °C)
- Επωαστής (16 °C)
- Επωαστής αέρος (37 °C)
- Αναδευτής vortex
- Αυτόματος ορολογικός πιπέττας και μιας χρήσης ορολογικές πιπέττες
- Σύστημα οριζόντιας ηλεκτροφόρησης με γέλη
- Pre-cast TAE γέλη αγαρόζης
- Παροχή ηλεκτρικού
- Εξοπλισμό απεικόνισης της γέλης
- SpeedVac™ συμπυκνωτής

ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑ

CodeLink Expression Assay Reagent Kit, Manual Prep, 24 αντιδράσεις 320012

5× ρυθμιστικό διάλυμα κατάτμησης

Ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού, συστατικό A

Ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού, συστατικό Β

Cy5-Streptavidin (το διάλυμα χρώσης είναι σε διάλυση 1:500 σε TNB) PA 45001

CodeLink Expression Analysis Software 310030

CodeLink Shaker Kit, 12 πλακίδια, 310016

CodeLink Parallel Processing Kit, 12 πλακίδια 310010

Innova™ 4080 shakingincubator310024

ΑΛΛΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑ

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στο πρωτόκολλο θα πρέπει να είναι μοριακού επιπέδου ή υψηλότερα

- 0.5% NEN blocking reagent (PerkinElmer, FP1020)
- Ύδωρ ελεύθερο νουκλεασών
- 1M Tris-HCL, pH 7.6
- 5M NaCl
- Tween 20
- 20 × SSC (Ambion, 9763)
- Ισοπροπανολόλη (για την έκπλυση του δοχείου με το αντιδραστήριο για την Παρασκευή του TNT)
- GenePix 4000B Array Scanner (Axon Instruments) και GenePix 4000B Array Scanner
- Φυγόκεντρος, 4-15C (QIAGEN Corp, 81010)
- Ρύγχη πιπετών, αποστειρωμένα, ελεύθερα RNase και ανθεκτικά σε αεροσόλ
- 1.7-ml σωληνάρια μικροφυγοκέντρου: αποστειρωμένα, ελεύθερα RNase
- 15- και 50- ml κωνικοί σωληνίσκοι: αποστειρωμένοι, ελεύθερα RNase
- Ρύγχη πιπετών ευρείας διαμέτρου: αποστειρωμένα, ελεύθερα RNase και ανθεκτικά σε αεροσόλ
- Αναδευτής vortex
- Υδρόλουτρο (σε θερμοκρασία 90 °C και 46 °C)
- Αναρροφητήρες
- Thermal Cycler
- Γάντια χωρίς πούδρα
- Microtiter plate lid, black (Corning Corp, 3935)

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΓΙΑ ΧΕΙΡΟΠΟΙΗΤΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΤΟΧΩΝ

70% αιθανόλης

Προσθέτονται 175 ml απόλυτης (100%) αιθανόλης σε 75 ml ύδατος ελεύθερου νουκλεασών και αναδεύονται.

10× MOPS διάλυμα

1. Σε 470 ml ύδατος ελεύθερου νουκλεασών διαλύονται τα παρακάτω:

21g 3-[N-Morpholino] propanesulfonic acid (MOPS) ελεύθερο οξύ

2.05 g οξικό νάτριο

10 ml 0.5M EDTA

2. Ρύθμιση του pH στο 7.0 με 1N NaOH.
3. Ρύθμιση του όγκου στα 500 ml με προσθήκη ύδατος ελεύθερου νουκλεασών. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου, σε δοχείο τυλιγμένο με αλουμινόχαρτο, γιατί είναι φωτοευαίσθητο.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΓΙΑ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

1×TNT ρυθμιστικό διάλυμα (10 λίτρα)

0.10 M tris-HCl, pH 7.6

0.15 M NaCl

0.05 % Tween 20

1. Απαιτούνται περίπου 1 λίτρο 1×TNT για 12 βιοσυστοιχίες.

2. Ξεπλένεται δοχείο 10 λίτρων με 150 ml ισοπροπανολόλης και στη συνέχεια με απιονισμένο ύδωρ και στραγγίζεται.

3. Σε ξεχωριστό δοχείο προσθέτονται τα ακόλουθα:

1 λίτρο 1M tris-HCl, pH 7.6

300 ml 5 M NaCl

5ml Tween 20

8.7 λίτρα απιονισμένο ύδωρ

4. Αναμιγνύονται καλώς, φιλτράρονται με φίλτρο 0.2 μm και μεταφέρονται σε νέο δοχείο. Διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου.

0.75×TNT ρυθμιστικό διάλυμα

1. Απαιτούνται περίπου 500ml 0.75×TNT ρυθμιστικού διαλύματος για 12 βιοσυστοιχίες.

2. Σε 25ml απιονισμένου ύδατος προσθέτονται 75ml 1×TNT ρυθμιστικού διαλύματος για κάθε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος που παρασκευάζονται.

TNB ρυθμιστικό διάλυμα (0.6 λίτρα)

0.10 M tris-HCl, pH 7.6

0.15 M NaCl

0.5% NEN blocking reagent (PerkinElmer, FP1020)

1. Σε δοχείο Erlenmeyer των 2 λίτρων, προσθέτονται τα εξής:

522ml ύδατος ελεύθερου νουκλεασών

60 ml 0.10 M tris-HCl, pH 7.6

18ml 5M NaCl

2. Διαλύονται 3 g NEN blocking reagent, σε θερμαινόμενο δοχείο στους 60 °C, προσθέτοντας το υλικό ανά δόσεις του 0.5 g.

3. Σβήνεται η φωτιά και συνεχίζεται η μίξη για 30 λεπτά. Ενώ το διάλυμα παραμένει ζεστό, φιλτράρεται με φίλτρο των 0.88 μm.

4. Μοιράζεται το TNB διάλυμα σε σωλήνες των 50 μl και φυλάσσεται στους -20 °C.

5. Τα σωληνάρια που θα χρησιμοποιηθούν φυλάσσονται για ένα βράδυ στους 4 °C

Διάλυμα Cy5-Streptavidin

1. Προσθέτονται 1 ml ύδατος ελεύθερου νουκλεασών στο φιαλίδιο με το 1 mg λυοφιλοποιημένης Cy5-Streptavidin. Αναμιγνύονται και τοποθετούνται στον πάγο για 5 λεπτά. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία τρεις επιπλέον φορές, βάζοντας κάθε φορά στο ενδιάμεσο τους σωλήνες στον πάγο και διατηρώντας το φιαλίδιο μακριά από το φως.
2. Μοιράζεται το διάλυμα Cy5-Streptavidin σε σωλήνες των 90 μl για πείραμα 12 βιοσυστοιχιών.
3. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C, μακριά από το φως

1:500 διάλυμα Cy5-Streptavidin

1. Πριν τη διάλυση, φυγοκεντρείται το διάλυμα που θα αραιωθεί για 1 λεπτό σε ≥ 8.000 ×g.
2. Προσθέτονται 6.8 μl από το στοκ διάλυμα Cy5-Streptavidin σε 3393.2 φιλτραρισμένου TNB ρυθμιστικού διαλύματος, για κάθε βιοσυστοιχία που θα επεξεργασθεί. Αναμιγνύονται.

0.1 × SSC/0.05% Tween 20 (1 λίτρο)

20 × SSC (Ambion, 9763)

Tween 20

1. Προετοιμασία για περίπου 250ml 0.1 ×SSC/0.05% Tween ρυθμιστικού διαλύματος για 12 βιοσυστοιχίες.

2. Σε καθαρό δοχείο του 1 λίτρου, προσθέτονται τα παρακάτω:

994.5ml απιονισμένου ύδατος

0.5 ml Tween 20

5ml 20 × SSC ρυθμιστικού διαλύματος

Αναμιγνύονται και διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου.

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΓΙΑ ΧΕΙΡΟΠΟΙΗΤΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΤΟΧΩΝ

Αξιολόγηση ολικού RNA

1.1 Αξιολόγηση της ποσότητας και καθαρότητας του ολικού RNA, για τη σύνθεση του cDNA

Το ολικό RNA που θα χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση cDNA, θα πρέπει να αξιολογηθεί ποσοτικά με UV σπεκτροφωτομέτρηση. Ετοιμάζεται δείγμα ολικού RNA διαλυμένου σε ύδωρ ελεύθερο νουκλεασών και μετράται η απορρόφηση UV στα 260 nm.

Υπολογίζεται η συγκέντρωση, ως εξής:

1A260 unit= 40 μg/ ml (1-cm path length κυβέτα)

Συγκέντρωση σε μg/ μl= A260×παράγοντα διάλυσης×40 μg/ ml ×0.001 ml/ μl

Η ποιότητα του RNA υπολογίζεται από την αναλογία A260:A280, και η αναλογία αυτή εξαρτάται από το pH, για το λόγο αυτό το διάλυμα μετράται ως προς το pH. Στη συνέχεια, προσθέτουμε 1/9 όγκου από 0.1 M Tris-HCL, pH 7.6 στο δείγμα RNA και μετράται η απορρόφηση UV στα 260 και 280 nm.

Σ' αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα, το ολικό RNA θα πρέπει να έχει αναλογία A260:A280 μεταξύ 1.8 και 2.1. Δείγματα που η αναλογία ήταν κάτω από 1.8 απορρίφθηκαν. Επιπλέον, όπου η τιμή του A260 ήταν κάτω από 0.15, έγινε επιπλέον διάλυση του RNA και μέτρηση εκ νέου.

1.2 Αξιολόγηση ολικού RNA ή cRNA με ηλεκτροφόρηση σε γέλη μετουσίωσης αγαρόζης.

1.2.1 Παρασκευή αγαρόζης γέλης.

- Σε 72ml ύδατος ελεύθερου αγαρόζης, έβρασαν 1.0 g αγαρόζης
- Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει μέχρι τους 60 °C περίπου και μετά προσθέτονται 10 ml από διάλυμα 10×MOPS και 18 ml από 37% φορμαλδεΰδης.
- Τοποθετείται το χτένι στο δοχείο του ζελέ και χύνεται το διάλυμα αγαρόζης στο δοχείο. Αφού αφαιρεθούν τυχόν φυσαλίδες με πιπέττα, αφήνεται η γέλη να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

1.2.2 Παρασκευή των δειγμάτων και της κλίμακας RNA

Αναμιγνύονται σε σωλήνα τα ακόλουθα υλικά:

- 20 μl φορμαμίδης (απιονισμένη)
- 7 μl φορμαλδεΰδης
- 4 μl 10× MOPS ρυθμιστικό διάλυμα
- 2 μl 1% διάλυμα μπλε βρωμοφαινόλης
- 1 μl ethidium bromide (5 μg/ μl)
- 5 μg ολικού RNA (ή 2 μg cRNA)
- X ml ύδατος ελεύθερου νουκλεασών
- 40 μl ολικού όγκου

Για την προετοιμασία κλίμακας RNA, φτιάχνεται μίγμα από τα παραπάνω αντιδραστήρια, με 1 μl RNA.

1.2.3. Ηλεκτροφόρηση

Γεμίζεται το δοχείο ηλεκτροφόρησης με διάλυμα 1× MOPS, για να βυθισθεί η γέλη.

Θερμαίνονται τα δείγματα RNA στους 65 °C για 5 λεπτά, και μετά παγώνουν σε πάγο. Φορτώνονται τα δείγματα στα πηγαδάκια της γέλης.

Ηλεκτροφορούνται σε 5V/cm σταθερής τάσης μέχρι η άκρη της χρωστικής να φτάσει στο 1/3 από την κάτω άκρη της γέλης. Αφαιρείται η γέλη από τη συσκευή και απεικονίζονται τα αποτελέσματα στη συσκευή απεικόνισης.

1.2.4 Ανάλυση του δείγματος

Για να αξιολογηθεί η ποιότητα του RNA, αναλύονται 5-10 μg ολικού RNA σε μετουσιωμένη γέλη ηλεκτροφόρησης, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Θα πρέπει να εμφανισθούν μεγάλες και μικρές ριβοσωμικές RNA ζώνες, και η αναλογία των ζωνών RNA, 28S:18S, ελέγχεται ώστε να πλησιάζει το 2.

2. Σύνθεση της πρώτης έλικας cDNA

2.1 Έγινε προετοιμασία διαλύματος από βακτηριακά mRNA ελέγχου, ως εξής:

2.1.1 Μέθοδος διάλυσης

Τοποθετούνται σωλήνες που περιέχουν τα βακτηριακά mRNA ελέγχου στον πάγο και ετοιμάζεται διάλυμα 16.7 ng/ μl, ως εξής:

5 μl από 0.1 μg/ μl Βακτηριδιακό mRNA ελέγχου araB

5 μl από 0.1 μg/ μl Βακτηριδιακό mRNA ελέγχου entF

5 μl από 0.1 μg/ μl Βακτηριδιακό mRNA ελέγχου fixB

5 μl από 0.1 μg/ μl Βακτηριδιακό mRNA ελέγχου gnd

5 μl από 0.1 μg/ μl Βακτηριδιακό mRNA ελέγχου hisB

5 μl από 0.1 μg/ μl Βακτηριδιακό mRNA ελέγχου leuB

30 μl τελικού όγκου

Αναμιγνύονται καλά και φυγοκεντρούνται για 5 δευτερόλεπτα σε ≥ 10.000 ×g για τη συλλογή του υγρού. Φυλάσσεται ο σωλήνας σε πάγο.

Μοιράζεται το μίγμα RNA σε 10 ξεχωριστούς σωλήνες, τον καθένα των 3 μl. Οι σωλήνες αυτοί φυλάσσονται στους -70 °C.

Το τελικό διάλυμα ετοιμάζεται σε τελική συγκέντρωση 50.2 pg/ μl. araB, entF, fixB, gnd, hisB και leuB:

3μl 16.7 ng/μl από το στοκ

997 μl ύδατος ελεύθερου νουκλεασών

1000 μl τελικού όγκου

Αναμιγνύονται καλά και φυγοκεντρούνται για 5 δευτερόλεπτα σε ≥ 10.000 ×g για τη συλλογή του υγρού. Φυλάσσεται ο σωλήνας σε πάγο.

Χρησιμοποιούνται 1.0 μl έτοιμου διαλύματος για κάθε 1.0 μg ολικού RNA.

2.2 Ετοιμάζεται κάθε δείγμα ολικού RNA, ως εξής:

0.2-2 μg	ολικού RNA
X μl	έτοιμου διαλύματος από βακτηριδιακό RNA ελέγχου (1 μl για κάθε 1 μg ολικού RNA)
1 μl	T7 oligo (dT) εκκινητή
Y μl	ύδωρ ελεύθερο νουκλεασών
12 μl	τελικός όγκος

2.3 Επωάζεται για 10 λεπτά στους 70 °C και αμέσως τοποθετείται ο σωλήνας στον πάγο μέχρι να κρυώσει (3 λεπτά).

2.4 Φυγοκεντρείται για 5 δευτερόλεπτα για να συλλεχθεί το δείγμα κι επιστρέφεται ο σωλήνας στον πάγο.

2.5 Διατηρείται ο σωλήνας στον πάγο και προσθέτονται τα ακόλουθα αντιδραστήρια, σε 12 μl μείγματος ολικού RNA/ RNA ελέγχου/ εκκινητών:

2 μl 10× ρυθμιστικό διάλυμα πρώτης έλικας

4 μl 5mM μίγμα dNTP

1 μl RNase inhibitor

1 μl ανάστροφης τρανσκριπτάσης

20 μl τελικός όγκος

2.6 Επωάζονται στους 42 °C για 2 ώρες.

3. Σύνθεση της δεύτερης αλύσου cDNA

3.1 Προετοιμάζεται το μίγμα της αντίδρασης για τη σύνθεση της δεύτερης έλικας cDNA, για κάθε δείγμα, ως εξής:

20 μl της αντίδρασης για τη σύνθεση της πρώτης έλικας cDNA, από τη προηγούμενη φάση

63 μl ύδατος ελεύθερου νουκλεασών

10 μl 10× ρυθμιστικό διάλυμα δεύτερης αλύσου

2μl μίγματος DNA πολυμεράσης

1 μl RNaseH

100 μl τελικός όγκος

3.2 Αναμιγνύονται και φυγοκεντρούνται για 5 δευτερόλεπτα σε ≥ 10.000 ×g για την ανάμιξη των αντιδραστηρίων. Επωάζονται για 2 ώρες στους 16 °C.

3.3 Φυγοκεντρούνται για 5 δευτερόλεπτα σε μέγιστη ταχύτητα για τη συλλογή του δείγματος. Ανακατεύονται και τοποθετείται ο σωλήνας στον πάγο.

4. Κάθαρση του cDNA διπλής έλικας

4.1 Στο δείγμα cDNA που μόλις ετοιμάστηκε προστίθενται 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος PB και αναμιγνύονται με πιπέττα.

4.2 Τοποθετείται μία QIAquick spin στήλη σε ένα σωλήνα των 2- ml

4.3 Μεταφέρεται το διάλυμα cDNA / ρυθμιστικό διάλυμα PB σε μία QIAuickspin στήλη.

4.4 Φυγοκεντρείται η στήλη σε ≥ 10.000 × g για 30-60 δευτερόλεπτα.

4.5 Απορρίπτεται το υπερκείμενο. Για την έκπλυση της στήλης, προσθέτονται 700 μl ρυθμιστικού διαλύματος PE στη στήλη και φυγοκεντρούνται για 30 δευτερόλεπτα σε ≥ 10.000 ×g.

4.6 Απορρίπτεται το υπερκείμενο. Για να στεγνώσει η στήλη, τοποθετείται η QIAquick στήλη σε ένα νέο σωλήνα των 2 ml και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό σε ≥ 10.000 ×g .

4.7 Θέτεται η QIAquick στήλη σε καθαρό σωλήνα μικροφυγοκέντρησης των 1.5 ml.

4.8 Για τη διάλυση του cDNA, προσθέτονται 30 μl ρυθμιστικού διαλύματος EB στο κέντρο της QIAquick μεμβράνης. Μετά από 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκεντρείται για 1 λεπτό σε ≥ 10.000 ×g. Επαναλαμβάνεται άλλη μία φορά μέχρι τελικού όγκου 60 μl.

4.9 Συμπυκνώνεται το διάλυμα cDNA σε SpeedVac σε μέτρια θερμοκρασία σε τελικό όγκο ≤ 9.5 μl, ανά σωληνάριο.

4.10 Γίνεται μέτρηση για να επιβεβαιωθεί ότι το cDNA είναι σε τελικό όγκο 9.5 μl ύδατος ελεύθερου νουκλεασών και αναμιγνύεται καλά με vortex.

5. Σύνθεση cDNA με in vitro μεταγραφή (IVT)

5.1 Το μίγμα IVT παρασκευάζεται με την προσθήκη των παρακάτω συστατικών, με συγκεκριμένη σειρά σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης, ελεύθερο RNase:

4.0 μl 10× T7 ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης

4.0 μl T7 διάλυμα ATP

4.0 μlT7 διάλυμα GTP

4.0 μlT7 διάλυμα CTP

3.0 μlT7 διάλυμα UTP

7.5 μl 10mM biotin-11-UTP

4.0 μl 10× T7 μίγμα ενζύμων

30.5 μl τελικός όγκος

5.2 Γίνεται ανάμιξη των IVT υλικών με vortex. Φυγοκεντρούνται για 5 δευτερόλεπτα σε ≥ 10.000 ×g. Το μείγμα αντίδρασης (30.5 μl) μεταφέρεται στο σωλήνα του βήματος 4.10, και γίνεται ανάμιξη με πιπέττα.

5.3 Γίνεται επώαση της αντίδρασης για 14 ώρες στους 37 ºC.

6. Ανάκτηση του σημασμένου με βιοτίνη cRNA

6.1 Παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων RLT και RPE. Στο ρυθμιστικό διάλυμα RLT γίνεται προσθήκη 10 μl β- mercaptoethanol για κάθε 1 ml διαλύματος. Το διάλυμα RPE γίνεται με προσθήκη 4 όγκων απόλυτης αιθανόλης (100%), στο παρεχόμενο εργοστασιακά συμπυκνωμένο προϊόν.

6.2 Φυγοκεντρείται ο σωλήνας με την αντίδραση IVT και συλλέγονται τα συστατικά στον πυθμένα του σωλήνα. Ρυθμίζεται το διάλυμα σε όγκο 100 μl με την προσθήκη 60 μl ύδατος ελεύθερου νουκλεασών.

6.3 Προσθέτονται 350 μl ρυθμιστικού διαλύματος RLT στο δείγμα και αναμιγνύονται.

6.4 Προσθέτονται 250 μl αιθανόλης 100% στο δείγμα και αναμιγνύονται.

6.5 Θέτεται το δείγμα 700 μl σε στήλη φυγοκέντρησης RNeasy σε σωληνάριο. Φυγοκεντρείται για 15 δευτερόλεπτα σε ≥ 8.000 ×g.

6.6 Μεταφέρεται η στήλη RNeasy σε νέο σωληνάριο των 2 ml. Προσθέτονται 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος RPE και φυγοκεντρούνται για 15 δευτερόλεπτα σε ≥ 8.000 ×g. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και επαναλαμβάνεται το βήμα αυτό άλλη μια φορά.

6.7 Τοποθετείται η στήλη RNeasy σε νέο σωλήνα των 2 ml και φυγοκεντρείται για 2 λεπτά σε ≥ 8.000 ×g.

6.8 Μεταφέρεται η στήλη RNeasy σε νέο σωλήνα των 1.5 ml και εγχύονται 50 μl ύδατος ελεύθερου νουκλεασών κατευθείαν στη RNeasy μεμβράνη.

6.9 Επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Εκλούεται το cRNA με φυγοκέντρηση σε ≥ 8.000 ×g για1 λεπτό, χωρίς να αφαιρεθεί η στήλη.

6.10 Εγχύονται άλλα 50 μl ύδατος ελεύθερου νουκλεασών κατευθείαν στην ίδια RNeasy μεμβράνη.

6.11 Επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Εκλούεται το cRNA με φυγοκέντρηση σε ≥ 8.000 ×g για1 λεπτό, στο ίδιο σωληνάριο του βήματος 6.8.

6.12 Αφαιρείται η στήλη και αναμιγνύεται το διάλυμα με ελαφρά χτυπήματα στο πλάι του σωλήνα.

7. Αξιολόγηση της συγκέντρωσης, καθαρότητας και ποιότητας του cRNA

7.1 Παρασκευάζεται διάλυμα 1:50 για κάθε δείγμα cRNA σε ύδωρ ελεύθερο νουκλεασών, ως εξής:

2μl cRNA

98 μl ύδωρ ελεύθερο νουκλεασών

100μl τελικός όγκος

7.2 Αναμιγνύεται το μίγμα και φυγοκεντρείται για 5 δευτερόλεπτα σε ≥ 10.000 ×g για τη συλλογή όλου του υγρού στον πυθμένα του σωλήνα.

7.3 Μεταφέρεται το διάλυμα cRNA σε quartz κυβέτα των 100μl (1εκ path length), και μετράται η UV απορρόφηση στα 260 nm. Τα δείγματα που είχαν A260 μετρήσεις κάτω του 0.15, διαλύθηκαν σε 1:20 και μετρήθηκε η απορρόφηση στα A260.

7.4 Υπολογίζεται η συγκέντρωση cRNA, με τον παρακάτω τύπο:

1 μονάδα A260= 40 μg/ ml

Συγκέντρωση σε μg/ μl=A260 × συντελεστή διάλυσης× 40 μg/ ml×0.001 ml/ μl

7.5 Επειδή η αναλογία A260:A280 είναι ευαίσθητη στο pH, το διάλυμα μεταφέρεται σε σωλήνα μικροφυγοκέντρησης και προσθέτονται 11.1 μl από 0.1 M Tris-HCL, pH 7.6, και αναμιγνύονται.

7.6 Μεταφέρεται το παραπάνω μίγμα (≈100 μl) σε quartz κυβέτα και μετράται η UV απορρόφηση στα 260 και 280 nm. Η αναλογία A260:A280, που καθορίζει την καθαρότητα του δείγματος θα πρέπει να είναι μεταξύ 1.8-2.1.

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

8. Κατάτμηση cRNA

8.1 Για κάθε βιοσυστοιχία που θα φορτωθεί, ετοιμάζονται 10 μgcRNA από το βήμα 6.13, σε τελικό όγκο 20 μl, με προσθήκη ύδατος ελεύθερου νουκλεασών, μέσα σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης.

8.2 Προσθέτονται 5 μl από 5 ×ρυθμιστικού διαλύματος κατάτμησης, για κάθε βιοσυστοιχία. Τοποθετείται ο σωλήνας στο θερμικό κυκλοποιητή, για 20 λεπτά στους 94 °C.

8.3 Ψύχεται στους 0 °C στο θερμικό κυκλοποιητή, για τουλάχιστο 5 λεπτά.

9. Παρασκευή του μίγματος αντίδρασης υβριδισμού

9.1 Τοποθετούνται οι δίσκοι βιοσυστοιχιών της Code Link Shaker Kit στην πλατφόρμα του επωαστή, που έχει προγραμματισθεί στους 37 °C.

9.2 Μεταφέρεται το δείγμα cRNA σε σωλήνα μικροφυγοκέντρησης του 1.5 ml. Για κάθε βιοσυστοιχία, ετοιμάζονται 260 μl διαλύματος υβριδισμού, που περιέχουν 10 μg κατατετμημένου cRNA, σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης του 1.5 ml:

78 μl ρυθμιστικού διαλύματος υβριδισμού συστατικό Α

130 μl ρυθμιστικού διαλύματος υβριδισμού συστατικό Β

27 μl ύδατος ελεύθερου νουκλεασών

25 μl κατατετμημένο cRNA (από το βήμα 1)

260 μl τελικός όγκος

9.3 Αναμιγνύεται το μίγμα σε συσκευή vortex σε μέγιστη ταχύτητα για 5 δευτερόλεπτα. Επωάζεται το διάλυμα υβριδισμού στους 90 °C για 5 λεπτά, για τη μετουσίωση του cRNA.

9.4 Κρυώνονται οι σωλήνες σε πάγο για τουλάχιστο 5 λεπτά και φορτώνονται όλες τις βιοσυστοιχίες μέσα σε 30 λεπτά από τη μετουσίωση του cRNA.

10. Φόρτωση των μιγμάτων στις κυψέλες των μικροσυστοιχιών

10.1 Φορτώνονται οι βιοσυστοιχίες ανά 12 και τοποθετούνται στον αναδευτήρα.

10.2 Αναδεύεται το μίγμα της αντίδρασης υβριδισμού για 5 δευτερόλεπτα σε μέγιστη ταχύτητα. Φυγοκεντρείται για λίγο για να συλλεχθεί το υγρό στον πυθμένα του σωλήνα και τίθεται ο σωλήνας σε πάγο.

10.3 Για κάθε θέση βιοσυστοιχιών, λαμβάνονται 250 μl με πιπέττα του 1 ml.

10.4 Αργά εγχύεται όλο το δείγμα στο Flex Chamber.

10.5 Μετά τη φόρτωση 12 βιοσυστοιχιών, σφραγίζεται η είσοδος του Flex Chamber με τις ταινίες και το αντίστοιχο εξάρτημα που παρέχεται από την εταιρεία.

11. Υβριδισμός

11.1 Τίθενται οι 12 βιοσυστοιχίες στον αναδευτήρα.

11.2 Ρυθμίζεται η ταχύτητα του αναδευτήρα στις 300 rpm και επωάζονται τα πλακάκια στους 37 °C για 18-24 ώρες. Όλα τα δείγματα επωάζονται στο ίδιο χρονικό διάστημα για να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματά τους.

11.3 Η προετοιμασία για το επόμενο δείγμα περιλαμβάνει το γέμισμα του μεγάλου δοχείου με 240 ml φιλτραρισμένου 0.75× TNT ρυθμιστικού διαλύματος. Καλύπτεται το δοχείο και επωάζεται σε υδρόλουτρο στους 46 °C για ένα βράδυ.

12. Έκπλυση μετά τον υβριδισμό

12.1 Γεμίζεται κάθε εσοχή στο μεσαίο δοχείο με 13 ml φιλτραρισμένου 0.75 ×TNT. Τοποθετούνται οι βιοσυστοιχίες πίσω στο δοχείο και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου.

12.2 Αφαιρείται ο δίσκος με τα 12 πλακίδια από τον αναδευτήρα επωαστή και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου.

12.3 Τίθεται η πρώτη βιοσυστοιχία στο FlexChamber εξάρτημα.

12.4 Αφαιρείται το FlexChamber, σηκώνοντας τη διαφάνεια σε γωνία 60 ^{o} ώστε να μη δημιουργηθούν πτυχές.

12.5 Τοποθετείται η βιοσυστοιχία στη σχισμή της σχάρας, που είχε τοποθετηθεί στο δοχείο με το 0.75×TNT του βήματος 5.1.

12.6 Ξεπλένεται η επιφάνεια του FlexChamber με 5 ml 0.75×TNT ρυθμιστικού διαλύματος για την αποφυγή επιμόλυνσης.

12.7 Τα βήματα 5.3-5.6 επαναλαμβάνονται για κάθε υβριδισμένη βιοσυστοιχία.

12.8 Μεταφέρεται η σχάρα των βιοσυστοιχιών από το δοχείο μέσου μεγέθους στο μεγάλο δοχείο με το προθερμασμένο 0.75×TNT από το βήμα 4.3, σκεπάζεται το μεγάλο δοχείο και το υδατόλουτρο και επωάζεται στους 46^{o}C για 1 ώρα.

13. Ανίχνευση με το σύμπλοκο της στρεπταβιδίνης

13.1 Γεμίζεται κάθε σχισμή του μικρού δοχείου με 3.4 ml διαλύματος Cy5-Streptavidin. Αφήνεται σκεπασμένο με μαύρο καπάκι για να προστατευθεί από το φως η χρωστική σε θερμοκρασία δωματίου.

13.2 Αφαιρείται η σχάρα με τις βιοσυστοιχίες από το μεγάλο δοχείο στους 46^{o}C και τοποθετείται στο μικρό δοχείο που περιέχει το διάλυμα Cy5-Streptavidin. Σκεπάζεται με το καπάκι και επωάζονται οι βιοσυστοιχίες σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.

13.3 Κατά την επώαση προετοιμάζονται τα επόμενα βήματα γεμίζοντας τρία δοχεία με 240 ml 1×TNT ρυθμιστικού διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου.

13.4 Μετά από 30 λεπτά επώασης, βγαίνει η σχάρα των μικροσυστοιχιών από το διάλυμα χρωστικής και τίθεται στο μεγάλο δοχείο με το 1×TNT ρυθμιστικού διαλύματος (από το βήμα 6.3). Επωάζονται οι βιοσυστοιχίες σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά καλυμμένα από το φως.

13.5 Βγαίνει η σχάρα των βιοσυστοιχιών από το πρώτο μεγάλο δοχείο με το 1×TNT ρυθμιστικού διαλύματος και τίθεται στο δεύτερο δοχείο με το ίδιο διάλυμα. Επωάζεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, καλυμμένη από το φως και επαναλαμβάνεται η έκπλυση στα άλλα δύο δοχεία για τρίτη και τέταρτη έκπλυση.

13.6 Στην τρίτη έκπλυση, ξεπλένεται το δοχείο με αποστειρωμένο ύδωρ και στεγνώνεται. Γεμίζεται πλήρως το δοχείο αυτό με το διάλυμα τελικής έκπλυσης 0.1 ×SSC/0.05% Tween 20.

13.7 Μεταφέρεται η σχάρα των βιοσυστοιχιών στο μεγάλο δοχείο που έχει πληρωθεί με 0.1 ×SSC/0.05% Tween 20 και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου, για 30 δευτερόλεπτα με μικρή ανάδευση.

13.8 Αφαιρείται η σχάρα των βιοσυστοιχιών από το μεγάλο δοχείο και σκουπίζεται η κάτω επιφάνεια με απορροφητικό χαρτί. Τοποθετείται η σχάρα σε στεγνό και καθαρό δοχείο. Φυγοκεντρούνται οι βιοσυστοιχίες στις ακόλουθες ρυθμίσεις:

Ταχύτητα: 2000 rpm (644×g)

Επιτάχυνση: 9

Επιβράδυνση: 9

Χρόνος: 3 λεπτά

13.9 Οι βιοσυστοιχίες που είναι πια στεγνές τοποθετούνται σε κουτί που προστατεύεται από το φως μέχρι να σαρωθούν, σε διάστημα δύο ημερών.

14. Σάρωση και ανάλυση των βιοσυστοιχιών

Χρησιμοποιήθηκε GenePix Array Scanner, στις ακόλουθες ρυθμίσεις:

Expand setting file name:	Expression_5um.gps: whole genome products
	Expression_10um.gps: 10K και 20K products
Wavelength:	635 nm
PMT voltage:	600 V
Laser power:	100%
Pixel size:	5μm για whole genome products
	10 μm για 10K και 20K products
Focus position:	0μm

Η εικόνα κάθε βιοσυστοιχίας αναλύθηκε με το λογισμικό της CodeLink Expression Analysis.

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ

ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ RNA ΕΛΕΓΧΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΤΟΧΩΝ

Χρησιμοποιούνται 2μl (2μg) Hela ή Rat Thymus RNA ελέγχου (1μg/μl) σε ανεξάρτητη αντίδραση για σύνθεση cDNA και σύνθεση cRNA με IVT, όπως στα βήματα 2.2-7.6. Αξιολογείται η παραγωγή όπως στο τμήμα 7 και θα πρέπει να είναι ≥20 μgcRNA, ενώ το μέσο μέγεθος του cRNA θα πρέπει να είναι ≥1kb.

ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ IVT ΕΛΕΓΧΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΤΟΧΩΝ (PTRI-XEF1)

Χρησιμοποιούνται 1 μl (500ng) από τοPTRI-XEF1 για μία ανεξάρτητη αντίδραση κατά το στάδιο 4.10, παράλληλα με το πείραμα χρησιμοποιώντας τα βήματα 5.1-7.6. Η παραγωγή αυτής της αντίδρασης θα πρέπει να είναι 80-100 μg RNA

ΚΑΘΙΖΗΣΗ ΤΟΥcRNA

Για την απομάκρυνση προσμίξεων στο διάλυμα cRNA, χρησιμοποιείται αιθανόλη για να καθιζήσουν.

a. Μεταφέρεται το cRNA από το βήμα 6.13 σε σωλήνα μικροφυγοκέντρησης του 1.5 ml, προσθέτονται 50 μl (0.5 όγκος) παγωμένο 5M οξικό αμμώνιο και αναδεύονται σε μέγιστη ταχύτητα για 5 δευτερόλεπτα. Προσθέτονται 375 μl (2.5 όγκοι) παγωμένης απόλυτης αιθανόλης στο δείγμα και αναδεύονται ξανά σε μέγιστη ταχύτητα για 5 δευτερόλεπτα. Επωάζεται το δείγμα τουλάχιστο για 30 λεπτά στους -20 °C.
b. Φυγοκεντρείται σε ≥ 10.000 ×g για 15 λεπτά στους 4 °C και απορρίπτεται το υπερκείμενο.
c. Προσθέτονται 0.5 ml 70% αιθανόλης και αναδεύονται για 5 δευτερόλεπτα.
d. Φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά σε ≥ 10.000 ×g στους 4 °C, απορρίπτεται το υπερκείμενο και στεγνώνεται το ίζημα στον αέρα.
e. Επαναδιαλύεται το cRNA σε 20 μl ύδατος ελεύθερου νουκλεασών και ελέγχεται το cRNA με UV φασματοφωτομετρία όπως περιγράφεται στο τμήμα 7.
f. Φυλάσσεται το cRNA στους -70 °C.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

ΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΔΟΧΕΣ ΚΑΙ ΥΠΟΘΕΣΕΙΣ

Στο παράρτημα IV, περιέχονται μερικές γενικές παραδοχές και υποθέσεις στο παρών σύγγραμμα.

i. Τα σύμβολα της υποδιαστολής ακολουθούν το αμερικανικό σύστημα. Δηλαδή ο αριθμός *εκατό κόμμα δύο*, γράφεται 100.2 και όχι 100,2 όπως είναι στο ελληνικό σύστημα. Επίσης ο αριθμός *δύο χιλιάδες εκατό κόμμα τέσσερα* γράφεται 2,100.4 και όχι 2.100,4. Ο λόγος που χρησιμοποιείται αυτή η παραδοχή είναι ότι όλα σχεδόν τα αποτελέσματα έχουν παραχθεί με λογισμικό το οποίο χρησιμοποιεί αυτή την διάταξη αριθμών.
ii. Η βιοδιαθεσιμότητα των φαρμάκων θεωρήθηκε ότι αγγίζει το 99% με εξαίρεση την L-Asparaginase, όπου οι υπολογισμοί έγιναν με δεδομένη βιοδιαθεσιμότητα 45%.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V

ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΑΡΜΟΛΟΓΗΣΗ ΟΡΓΑΝΩΝ ΜΕΤΡΗΣΗΣ

COLOUR VIDEO CAMERAS

1

1/3-inch CCD Colour DSP CCTV Video Camera

TK-C420E 24 V AC/12 V DC
TK-C421EG 220 V - 240 V AC

TK-C400E 24 V AC/12 V DC
TK-C401EG 220 V - 240 V AC

TK-C420E/C421EG/400E/C401EG

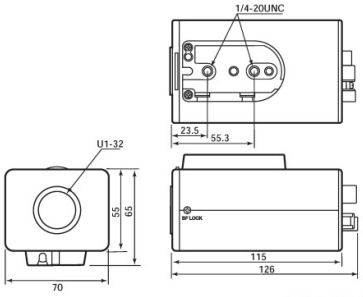
TK-C420E/TK-C421EG
- High-resolution 1/3 inch Interline transfer (IT) CCD with 440K pixels (470 TV lines horizontal resolution)

TK-C400E/TK-C401EG
- High-sensitivity 1/3 inch Interline Transfer (IT) CCD with 290K pixels with no image lag or distortion (0.9 lux at F1.2)

Both TK-C420E and TK-C400E
- Digital Signal processor automatically adjusts parameters to ensure sharp, natural colour pictures in a wide range of lighting conditions, even near total darkness
- Automatic gain control (AGC) adjusts gain as ambient light sensitivity changes for fully exposed pictures even at 1.5 lux (TK-C420E) and 0.9 lux (TK-C400E)
- White balance is adjusted either automatically (Auto-white) or manually over colour temperature range from 2,900K to 8,000K, assuring accurate rendition under varying lighting conditions
- Quiet signal to noise ratio of 48 dB
- Wide range detail enhancement in both horizontal and vertical; dual edged with 2H line memory

TK-C420E/TK-C400E

TK-C421EG/TK-C401EG



Design and specifications subject to change without notice.

JVC PROFESSIONAL

Appendix Figure 20. Προδιαγραφές της ψηφιακής κάμερας του συστήματος μικροσκοπίας και ανάλυσης εικόνας.

ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗΣ ΜΟΝΑΔΑΣ (WORKSTATION)

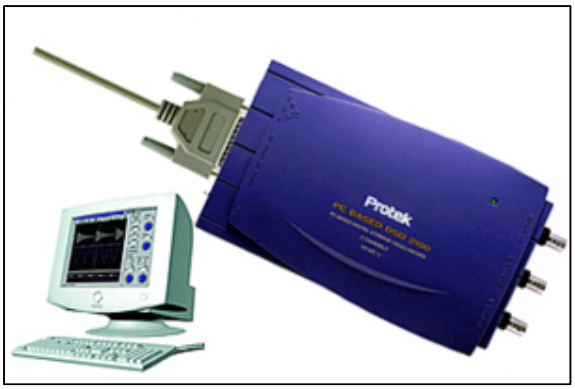
Operating System	Microsoft Windows XP Professional 5.1.2600 (WinXP Retail)
Computer:	
Operating System	Microsoft Windows XP Professional
OS Service Pack	Service Pack 3
DirectX	4.09.00.0904 (DirectX 9.0c)
Motherboard:	
CPU Type	Intel Pentium 4, 2800 MHz (21 x 133)
Motherboard Name	Lite-On NR146
Motherboard Chipset	Intel Morgan Hill i865GV
System Memory	246 MB (PC3200 DDR SDRAM)
BIOS Type	AMI (08/26/04)
Display:	
Video Adapter	Intel(R) 82865G Graphics Controller (96 MB)
3D Accelerator	Intel Extreme Graphics 2
Monitor	Jean JT166 [16" CRT] (8105DD007260)
Multimedia:	
Audio Adapter	Intel 82801EB ICH5 - AC'97 Audio Controller [A-2/A-3]
Storage:	
IDE Controller	Intel(R) 82801EB Ultra ATA Storage Controllers
Floppy Drive	Μονάδα δισκέτας
Disk Drive	Maxtor 6E040L0 (40 GB, 7200 RPM, Ultra-ATA/133)
Optical Drive	HL-DT-ST DVDRAM GSA-4167B (DVD+R9:8x, DVD-R9:4x, DVD+RW:16x/8x, DVD-RW:16x/6x, DVD-RAM:5x, DVD-ROM:16x, CD:48x/32x/48x DVD+RW/DVD-RW/DVD-RAM)
Optical Drive	LITE-ON CD-ROM LTN-487T
SMART Hard Disks Status	OK
Graphics Processor Properties:	
Video Adapter	Intel 82865GV Graphics Controller [A-2]
GPU Code Name	Springdale-G (Integrated 8086 / 2572, Rev 02)
GPU Clock	266 MHz
--------[Windows Video]----------	
[Intel(R) 82865G Graphics Controller]	
Video Adapter Properties:	
Device Description	Intel(R) 82865G Graphics Controller
Adapter String	Intel(R) 82865G Graphics Controller
BIOS String	Intel Video BIOS
Chip Type	Intel(R) 82865G Graphics Controller
DAC Type	Internal
Installed Drivers	ialmrnt5 (6.14.10.4396)

Memory Size	96 MB
Video Adapter Manufacturer:	
Company Name	Intel Corporation
Product Information	http://www.intel.com/products/browse/chipsets.htm
Driver Download	http://support.intel.com/support/graphics
--------[PCI / AGP Video]----------	
Intel Extreme Graphics 2	Video Adapter
Intel Extreme Graphics 2	3D Accelerator
Conexant (Internext Compression) WinTV PVR 250 - 16	Multimedia Video
--------[GPU]----------	
[Integrated: Intel 82865GV Graphics Controller [A-	2]]
Graphics Processor Properties:	
Video Adapter	Intel 82865GV Graphics Controller [A-2]
GPU Code Name	Springdale-G
PCI Device	8086 / 2572
Bus Type	Integrated
GPU Clock	266 MHz
RAMDAC Clock	350 MHz
Pixel Pipelines	1
TMU Per Pipeline	2
Vertex Shaders	1 (v1.1)
Pixel Shaders	Not Supported
DirectX Hardware Support	DirectX v7.0
Pixel Fillrate	266 MPixel/s
Texel Fillrate	532 MTexel/s
Graphics Processor Manufacturer:	
Company Name	Intel Corporation
Product Information	http://www.intel.com/products/browse/chipsets.htm
Driver Download	http://support.intel.com/support/graphics

Appendix Table 5. Προδιαγραφές της υπολογιστικής μονάδας (workstation) του συστήματος μικροσκοπίας και ανάλυσης εικόνας.

Oscilloscope DSO-2100

In combination with a PC, the **DSO 2100** is a two-channel, digital 30MHz storage oscilloscope. The operating interface and graphics to show the curves are laid out as for normal oscilloscopes. The oscilloscope attachment is connected via the parallel port of the computer using the software cable provided. You have two completely separate channels at your disposal, each with a scanning frequency of 100MS/s. The Auto-Setup function gives the best possible automatic setting of the measurement range after a new measurement signal has been applied. In addition, you can also use the **DSO 2100** as a spectrum analyzer: it shows you the individual harmonics, so you can, for example, analyse filter circuits. A further major advantage of this device lies in the fact that it saves the measurement data obtained on your hard disk.



Technical data:

- Requirements
  IBM compatible PC(Pentium) 32M RAM/100MB of free hard disk space Windows 95/98
- PC Connection : Parallel
- Power : DC ±8V
- Channel : 2Channel
- Impedance : 1MΓΙΙ25pF
- Coupling : AC/DC/GND
- Bandwidth : DC~30MHz -3dB
- Resolution : 8Bit
- Voltage Range : 50mV~5V, 1,2,5 7Steps
- Display area : 8Ч10div
- Accuracy : ±3JΓ(Gain), ±0.01%(Time)
- Time Base Range : 50ns~320s
- Input Range : ±50V
- Max. Input : ±100VDC Continuous ±250V(DC+AC) Transient
- X-Y : ±3%
- Auto Setup : DC~30MHz, Frequency Counter
- Sample Clock Rate :1Hz ~ 100MHz
- EXT Trigger Input : TTL only
- Trigger Type : ±Slope
- TV - V/H : Yes

- Trigger Level : ±3div (DC only)
- Trigger Type : Analog
- Trigger Source : CH1, CH2, EXT
- Mag (Time) : OK
- Offset Range : ±4div
- Memory Depth : 32KB/CH
- Max Sampling Rate : 100MSPS/CH, Dual 100MSPS
- Auto Calibration : OK
- Trace Display : Point/Line
- Grid : On/Off
- Vertical Mode : CH1, CH2, Dual , ADD
- Horizontal Mode : AUTO, NORM, SINGLE
- Single : DC ~ 30MHz

Appendix Table 6. Τεχνικά στοιχεία του ψηφιακού παλμογράφου.

ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗΣ ΜΟΝΑΔΑΣ (WORKSTATION)

Computer:
Operating System Microsoft Windows 98SE,SP1
OS Service Pack Service Pack 1
DirectX 4.09.00.0904 (DirectX 9.0c)
Computer Name UOA-D6CD6B76B40
User Name Administrator
Motherboard:
CPU Type Intel Celeron 1800 MHz (18 x 100)
Motherboard Name Albatron PX845PEV (Pro) Rev 800 (5 PCI 1 AGP 3 DDR DIMM Audio)
Motherboard Chipset Intel Brookdale i845PE
System Memory 119 MB (PC2100 DDR SDRAM)
BIOS Type Award (06/02/04)
Communication Port Θύρα επικοινωνιών (COM1)
Communication Port Θύρα εκτυπωτή ECP (LPT1)
Display:
Video Adapter Intel(R) 82845G/GL/GE/PE/GV Graphics Controller (32 MB)
3D Accelerator Intel Extreme Graphics
Monitor LG WS771B [17" CRT]
Multimedia:
Audio Adapter Intel 82801DB ICH4 - AC'97 Audio Controller [B-0]
Storage:
IDE Controller Intel(R) 82801DB Ultra ATA Controller

Floppy Drive Μονάδα δισκέτας
Disk Drive USB Driver USB Device (14 GB USB)
Disk Drive ExcelStor Technology J640 (40 GB 7200 RPM Ultra-ATA/100)
Optical Drive HL-DT-ST CD-RW GCE-8525B (52x/32x/52x CD-RW)
SMART Hard Disks Status OK
Partitions:
C: (FAT32) 39252 MB (30619 MB free)
Input:
Keyboard Standard 101/102-Key or Microsoft Natural PS/2 Keyboard
Mouse Ποντίκι συμβατό με PS/2
Network:
Network Adapter Προσαρμογέας OvisLink LFE-8139ATX Fast Ethernet
Peripherals:
Printer Microsoft XPS Document Writer
USB1 Controller Intel 82801DB ICH4 - USB Controller [B-0]
USB1 Controller Intel 82801DB ICH4 - USB Controller [B-0]
USB2 Controller Intel 82801DB ICH4 - Enhanced USB2 Controller [B-0]
USB Device Συσκευή αποθήκευσης USB

Appendix Table 7. Προδιαγραφές υπολογιστικής μονάδας φυσικοχημικών μετρήσεων.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VI

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

George I. Lambrou is a member of the FDPUOA research and laboratory team. He studied Biology with specializations in Developmental Biology and Neurochemistry at the Philipps-University, Marburg Germany and is a Ph.D. candidate at the University of Athens, Medical School. His is active in FDPUOA in the administrative sector as well as he is involved in research projects. Main research interests are resistance mechanisms to glucocorticoid-induced cell death, proliferation and chaos dynamics with the utilization of high-throughput methodologies and computational/systems/physical biology approaches. It has participated and coordinated numerous research projects in the past hence has an extensive experience in project management.

PUBLICATIONS

1. Lambrou GI, Vlahopoulos S, Papathanasiou C, Papanikolaou M, Karpusas M, Zoumakis E, Tzortzatou-Stathopoulou F. Prednisolone exerts late mitogenic and biphasic effects on resistant acute lymphoblastic leukemia cells: Relation to early gene expression. Leuk Res. 2009 Dec;33(12):1684-95. Epub 2009 May 18. PubMed PMID: 19450877.
2. Nader N, Ng SS, Lambrou GI, Pervanidou P, Wang Y, Chrousos GP, Kino T. AMPK regulates metabolic actions of glucocorticoids by phosphorylating the glucocorticoid receptor through p38 MAPK. Mol Endocrinol. 2010 Sep;24(9):1748-64. Epub 2010 Jul 21. PubMed PMID: 20660302; PubMed Central PMCID: PMC2940476.
3. Zaravinos A, Chatziioannou M, Lambrou GI, Boulalas I, Delakas D, Spandidos DA. Implication of RAF and RKIP genes in urinary bladder cancer. Pathol Oncol Res. 2011 Jun;17(2):181-90. Epub 2010 Sep 18. PubMed PMID: 20853079.
4. Zaravinos A, Lambrou GI, Volanis D, Delakas D, Spandidos DA. Spotlight on differentially expressed genes in urinary bladder cancer. PLoS One. 2011 Apr 5;6(4):e18255. PubMed PMID: 21483670; PubMed Central PMCID: PMC3071699.
5. Zaravinos A, Lambrou GI, Boulalas I, Delakas D, Spandidos DA. Identification of common differentially expressed genes in urinary bladder cancer. PLoS One. 2011 Apr 4;6(4):e18135. PubMed PMID: 21483740; PubMed Central PMCID: PMC3070717.