



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΜΗΧΑΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΩΝ & ΑΥΤΟΜΑΤΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΜΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΙΚΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΟΝΤΕΛΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΕ
ΗΠΑΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΤΟΥΝΤΑ ΤΕΡΨΙΘΕΑ**

**Επίβλεψη:
Αλεξόπουλος Λεωνίδας**

ΑΘΗΝΑ, ΑΠΡΙΛΙΟΣ 2014

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σε αυτή τη διπλωματική εργασία έγινε προσπάθεια για την ανάπτυξη μοντέλων για τη συνολική συμπεριφορά του κυττάρου. Θεωρήσαμε το κύτταρο σαν ένα σύστημα το οποίο εκκινώντας από μια κατάσταση ισορροπίας, έχει τη δυνατότητα να προσαρμόζεται στα ερεθίσματα που λαμβάνει από το περιβάλλον του μεταβάλλοντας, κατά το δυνατόν, την κατάσταση του. Στα πλαίσια αυτής τη διπλωματικής προσπαθήσαμε αρχικά να αναγνωρίσουμε την κατάσταση στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα, μετρώντας, με την τεχνική ELISA, την συγκέντρωση και δραστικότητα ορισμένων κομβικών, για την λειτουργία του κυττάρου, πρωτεϊνών. Στη συνέχεια αλλάξαμε τις συνθήκες του περιβάλλοντος των κυττάρων, χρησιμοποιώντας κατάλληλα ερεθίσματα που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αναμένεται να προκαλέσουν διαφοροποιήσεις στην κατάσταση λειτουργίας. Τέλος, μετρήσαμε τις ίδιες πρωτεΐνες στις νέες καταστάσεις ισορροπίας με σκοπό να μοντελοποιήσουμε τον μηχανισμό της κυτταρικής απόκρισης.

ABSTRACT

In this thesis an attempt was made to develop models for the overall behavior of the cancer cell. We interpret the cell as a system that starting from an equilibrium state has the capability to adapt to stimuli perturbations from its environment by changing its state accordingly. As part of this thesis we tried to recognize the state of the cells by measuring the concentration and the activity of certain key proteins. The measurements were made using the ELISA technique and the proteins measured were thought to play an important role in the cell's life and behavior, according to literature. After the initial measurement of the ground state of cells, we changed the environmental conditions, using appropriate stimuli expected to cause variations in the state of the system, according to our literature research. Finally, we measured the same proteins in the new equilibrium in order to model the mechanism of cellular response.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας της Σχολής Μηχανολόγων Μηχανικών του Ε.Μ.Π..

Η εργασία αυτή αφορά την μελέτη των καρκινικών κυττάρων του ήπατος και το πώς αυτά θα μπορούσαν να διαφοροποιηθούν κάτω από διαφορετικά ερεθίσματα στα οποία τα επιβάλλουμε.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ την διδάκτορα Πλιάκα Βασιλική για την βοήθεια της στην πειραματική διαδικασία καθώς και στην λήψη των φωτογραφιών που παρουσιάζονται στην εργασία αυτή, όπως και τον υποψήφιο διδάκτορα Μεσσήνη Δημήτρη για τις πολύτιμες συμβουλές του καθώς και την καθοδήγηση του κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Σακελλαρόπουλο Θεόδωρο, τον διδάκτορα Ιωάννη Μελά και την υποψήφια διδάκτορα Χατζοπούλου Ελισάβετ για την βοήθεια και τον άπλετο χρόνο που μου διέθεσαν για την επίλυση των αποριών μου στα διάφορα θέματα του εργαστηρίου και στην εκμάθηση όλων των πρωτοκόλλων που ακολούθησα στην πειραματική αυτή διαδικασία .

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Αλεξόπουλο Λεωνίδα για την υπόδειξη ενός τόσο ενδιαφέροντος θέματος, την πολύτιμη βοήθεια και συνεργασία του κατά την εκπόνηση της εργασίας αυτής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ.....	1.1
1.1	ΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ ΣΑΝ ΔΟΜΙΚΗ ΜΟΝΑΔΑ.....	1.1
1.1.1	Βιολογία Κυττάρου.....	1.1
1.1.2	Πρωτεΐνες.....	1.3
1.1.3	Σηματοδότηση Κυττάρων.....	1.5
1.1.4	Συστημική Βιολογία.....	1.7
1.1.5	Πρωτεϊνωματική.....	1.8
1.2	ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ.....	1.9
1.3	ΗΠΑΡ (ΣΥΚΩΤΙ).....	1.10
1.3.1	Ανατομία του Ήπατος.....	1.11
1.3.2	Φυσιολογία Ήπατος.....	1.11
1.4	ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΣΤΟ ΗΠΑΡ.....	1.13
1.4.1	Επιδημιολογία.....	1.14
1.4.2	Παράγοντες κινδύνου του ηπατοκυτταρικού καρκίνου.....	1.14
1.4.3	Αιτιολογικοί παράγοντες που σχετίζονται με την ανάπτυξη του ηπατοκυτταρικού καρκίνου.....	1.14
1.4.4	Ηπατικές Καρκινικές Σειρές.....	1.15
1.5	ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ELISA.....	1.15
1.5.1	Κλασσική διαδικασία ELISA.....	1.16
1.5.2	ELISA με χρήση μικροσφαιριδίων.....	1.16
1.5.3	Αναλυτική περιγραφή των βημάτων της διαδικασίας ELISA.....	1.17
1.5.4	Τεχνολογία xMAP.....	1.23
1.6	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ.....	1.25
2	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ.....	2.1
2.1	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΛΗΛΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ.....	2.1
2.1.1	Ξεπάγωμα Κυττάρων και δημιουργία καλλιέργειας.....	2.1
2.1.2	Τοποθέτηση και καλλιέργεια κυττάρων σε 12-well plate.....	2.2
2.1.3	Αποτελέσματα.....	2.3
2.2	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΚΑΤΑΛΛΗΛΩΝ ΕΡΕΘΙΣΜΑΤΩΝ.....	2.3
2.2.1	Δραστικές ουσίες – ενεργοποιητές (ερεθίσματα).....	2.3
2.2.2	Τοποθέτηση και καλλιέργεια κυττάρων σε 12-well plate.....	2.8

2.2.3	Αποτελέσματα.....	2.10
2.3	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΡΧΙΚΗΣ ΚΑΙ ΤΕΛΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΩΝ ΗΥΗ 7 ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΕΡΕΘΙΣΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΕΠΙΛΕΧΘΗΚΑΝ	2.10
2.3.1	Γενική περιγραφή πειραματικής διαδικασίας	2.10
2.3.2	Αποτελέσματα.....	2.13
3	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ	3.1
3.1	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	3.1
3.2	ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ.....	3.4
3.3	ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ	3.4
4	Βιβλιογραφία	4.6

1

ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

1.1 ΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ ΣΑΝ ΔΟΜΙΚΗ ΜΟΝΑΔΑ

1.1.1 Βιολογία Κυττάρου

Κατά την Βιολογία, κύτταρο ονομάζεται η βασική δομική και λειτουργική μονάδα που εκδηλώνει το φαινόμενο της ζωής. Έτσι, ως κύτταρο νοείται το μικρότερο δομικό συστατικό της έμβιας ύλης, που αποτελείται από μια συστηματικά οργανωμένη ομάδα μορίων, που βρίσκονται σε δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Το κύτταρο διαθέτει μορφολογική, φυσική και χημική οργάνωση και την ικανότητα της αφομοίωσης, της ανάπτυξης και της αναπαραγωγής. Είναι μια μονάδα της ζωής ανεξάρτητη ως προς την αυτορρύθμιση και την προσαρμοστικότητά του σε σχέση με το περιβάλλον. Εκ του υφιστάμενου αριθμού αυτών οι οργανισμοί διακρίνονται σε μονοκύτταρους και πολυκύτταρους. Ο χώρος εντός του οποίου βιώνουν τα κύτταρα των πολυκυττάρων οργανισμών ονομάζεται μεσοκυττάριο υγρό. Μεγάλες ομάδες ομοειδών κυττάρων, κατά σύσταση και ορισμένη φυσιολογική λειτουργία, χαρακτηρίζονται ιστοί, (π.χ. μυϊκός ιστός), οι οποίοι και αποτελούν την μονάδα δεύτερης τάξης στον ανθρώπινο οργανισμό, μετά τα κύτταρα.

Γενικά τα κύτταρα προκειμένου να διατηρούν τη λειτουργικότητά τους υποχρεώνονται να ανταλλάσσουν συνεχώς ουσίες από και προς το περιβάλλον τους. Η αμφίδρομη αυτή ανταλλαγή (εισαγωγή χρήσιμων ουσιών και αποβολή αχρήστων) γίνεται μέσω της πλασματικής μεμβράνης που αποτελεί και το όριο μεταξύ της έμβιας και της άβιας ύλης. Όσο μεγαλύτερη είναι η επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης τόσο μεγαλύτερη και η δυνατότητα της ανταλλαγής.

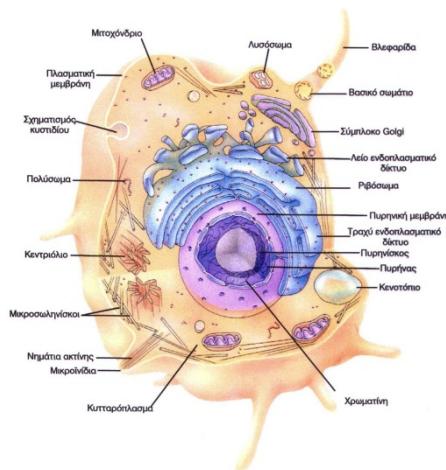
Εκτός όμως της ανταλλαγής ουσιών που καλύπτει κυρίως τις μεταβολικές ανάγκες παρατηρείται και ανταλλαγή ουσιών-μηνυμάτων με τα οποία και επικοινωνεί το κύτταρο με το περιβάλλον του και "αντιλαμβάνεται" τις διάφορες μεταβολές. Με βάση τις πληροφορίες των μηνυμάτων αυτών και υπό τον έλεγχο του γενετικού υλικού το κύτταρο εναρμονίζει και τις λειτουργίες των επιμέρους τμημάτων του. Αυτή η μεταβίβαση όμως των μηνυμάτων θα μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο αν το κύτταρο έχει σχετικά μικρό όγκο.

Έτσι λοιπόν δικαιολογείται ο μικρός όγκος των κυττάρων με τη μεγαλύτερη δυνατή επιφάνεια (αντίστοιχη του όγκου) προκειμένου να ικανοποιούνται ταυτόχρονα και οι δύο απαραίτητες για την επιβίωσή του κυττάρου προϋποθέσεις που είναι η μεγάλη επιφάνεια για ανταλλαγές ουσιών και υποδοχής μηνυμάτων και ο μικρός όγκος για την έγκαιρη μεταβίβαση των μηνυμάτων στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον.

Ως οργανισμός, το κύτταρο διαθέτει την ικανότητα να ζει ακόμη και χωρίς την ύπαρξη άλλων κυττάρων. Η ιδιότητα αυτή προϋποθέτει της ύπαρξης μιας μεταβολικής μηχανής που

μπορεί να αντλήσει ενέργεια από το περιβάλλον και να τη χρησιμοποιήσει σε ουσιώδεις βιοχημικές διεργασίες, που περιλαμβάνουν την κίνηση ουσιών, την εκλεκτική μεταφορά μορίων μέσα και έξω από το κύτταρο και την ικανότητα αλλαγής και διαμόρφωσής τους, δηλαδή της προσαρμογής τους στις περιβάλλουσες φυσικές και χημικές συνθήκες. Εκτός από τη μεταβολική μηχανή του το κύτταρο διαθέτει ομάδες γονιδίων που καθορίζουν τη σύνθεση ουσιών και μια διακριτή δομή την κυτταρική ή πλασματική μεμβράνη που τα απομονώνει από το εξωτερικό περιβάλλον. Προκειμένου να είναι βιώσιμο ένα κύτταρο, αρκούν 400 γονίδια ή και λιγότερα, ωστόσο τα περισσότερα κύτταρα περιέχουν αρκετά περισσότερα.

Τα κύτταρα διακρίνονται σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά (Σχήμα 1.1), ανάλογα με το αν διαθέτουν σχηματισμένο πυρήνα (ευκαρυωτικά) ή όχι (προκαρυωτικά). Σε αυτή την ταξινόμηση εξαίρεση αποτελούν οι ιοί, μια ιδιαίτερη κατηγορία «οργανισμών» με δυνατότητα παρέμβασης στις κυτταρικές λειτουργίες. Άλλη ιδιόμορφη κατηγορία ύλης είναι τα μυκοπλάσματα (PPLO), μια ενδιάμεση μορφή ζωής ανάμεσα στους ιούς και τα βακτήρια. Μία ακόμη κατηγορία είναι τα απλοειδή και τα διπλοειδή κύτταρα που διακρίνονται σύμφωνα με τον αριθμό χρωμοσωμάτων που υπάρχουν στον πυρήνα: Τα απλοειδή φέρουν περιττό αριθμό χρωμοσωμάτων, ενώ τα διπλοειδή άρτιο.



Εικόνα 1: Ευκαρυωτικό Κύτταρο

Όλα τα κύτταρα παρουσιάζουν τρισδιάστατες δομές που σφύζουν από δραστηριότητα και που λειτουργικά παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες αλλά και διαφορές. Κοινές λειτουργίες όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων είναι η μεταφορά ουσιών στο εσωτερικό τους, η αλλαγή θέσης των κυτταρικών δομών, όταν αυτό είναι αναγκαίο, καθώς και οι πολύπλοκες βιοχημικές διεργασίες. Υφίστανται, όμως, και λειτουργίες που δεν είναι κοινές, όπως η κίνηση, η αλλαγή σχήματος κτλ., με συνέπεια τα κύτταρα να διακρίνονται σε μεγάλο αριθμό ειδών με ιδιαίτερη χαρακτηριστική μορφή.

Στον άνθρωπο, για παράδειγμα, εντοπίζονται περί τα 200 διαφορετικά είδη κυττάρων, με καθένα είδος να παρουσιάζει χαρακτηριστική μορφή και λειτουργία. Άλλα, π.χ., είναι επιμήκη με δυνατότητα συστολής, (μυϊκά κύτταρα), άλλα έχουν προεκτάσεις για μεταβιβάσεις

μηνυμάτων, (νευρικά κύτταρα), άλλα είναι πλατεία με καλυπτήριο ρόλο (επιθηλιακά κύτταρα) κτλ.

1.1.2 Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες αποτελούν τα πιο διαδεδομένα και πολυδιάστατα τόσο στη μορφή όσο και στη λειτουργία τους μακρομόρια. Ακόμη και σε ένα απλό κύτταρο των βακτηρίων εντοπίζονται εκατοντάδες διαφορετικές πρωτεΐνες που κάθε μια εξ αυτών έχει ιδιαίτερο ρόλο. Οι πρωτεΐνες αποτελούν είτε δομικά συστατικά των μεμβρανών του κυττάρου είτε συνεργούν σε κάποια συγκεκριμένη λειτουργία, όπως η δημιουργία πρωτεϊνικών συμπλόκων. Είναι μεγάλα σύνθετα βιομόρια, με μοριακό βάρος από 10.000 μέχρι πάνω από 1 εκατομμύριο, αποτελούμενα από αμινοξέα, τα οποία ενώνονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς σχηματίζοντας μια γραμμική αλυσίδα, καλούμενη αλυσίδα πολυπεπτιδίων. Όλες οι πρωτεΐνες περιέχουν άνθρακα, οξυγόνο και άζωτο και οι περισσότερες εξ αυτών και θείο.

Η ακολουθία αμινοξέων σε μια πρωτεΐνη καθορίζεται από ένα γονίδιο και κωδικοποιείται κατά τον γενετικό κώδικα DNA. Παρόλο που ο γενετικός κώδικας κωδικοποιεί 20 αμινοξέα, τα αμινοξέα που συνιστούν την πρωτεΐνη συχνά υφίστανται χημικές αλλαγές κατά τη μετα-μεταγραφική τροποποίηση: προτού η πρωτεΐνη να μπορέσει να λειτουργήσει είτε στο κύτταρο, είτε ως τμήμα των μηχανισμών ελέγχου.

Οι διάφορες λειτουργίες που παρατηρούνται στους οργανισμούς γίνονται χάρη στις πρωτεΐνες. Ο δε βιολογικός τους ρόλος καθορίζεται κάθε φορά από την τρισδιάστατη δομή τους που είναι συνέπεια της αλληλουχίας των αμινοξέων, η οποία και ξεκινά από την πρωτοταγή δομή.

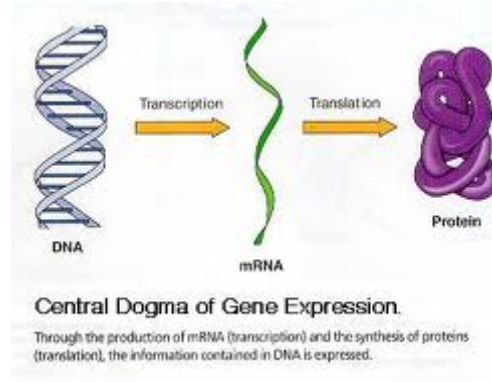


Εικόνα 2: Τρισδιάστατη Μορφή Πρωτεΐνης

Όπως άλλα βιολογικά μακρομόρια (π.χ. οι πολυσακχαρίτες, τα λιπίδια, και νουκλεϊκά οξέα) έτσι και οι πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και συμμετέχουν σε κάθε διαδικασία μέσα στα κύτταρα. Πολλές πρωτεΐνες δρουν ως ένζυμα που καταλύουν τις βιοχημικές αντιδράσεις, και είναι ζωτικής σημασίας στο μεταβολισμό. Άλλες

πρωτεΐνες έχουν δομικές ή μηχανικές λειτουργίες, όπως οι πρωτεΐνες του κυτταρικού σκελετού, οι οποίες συμβάλλουν στη διατήρηση της μορφής των κυττάρων. Οι πρωτεΐνες είναι επίσης σημαντικές στη διακυτταρική επικοινωνία, τη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος, τον σχηματισμό κυτταρικών ιστών, και τον κυτταρικό κύκλο.

Οι πρωτεΐνες είναι απαραίτητα συστατικά στη διατροφή μας, δεδομένου ότι τα ζώα δεν μπορούν να συνθέσουν όλα τα αμινοξέα, αλλά πρέπει να τα λάβουν από τα τρόφιμα. Μέσω της διαδικασίας της πέψης, τα ζώα αποικοδομούν την πρωτεΐνη στα ελεύθερα αμινοξέα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρωτεϊνική σύνθεση.



Εικόνα 3: Κεντρικό Δόγμα της Γονιδιακής Έκφρασης

Μία υποκατηγορία των πρωτεϊνών είναι οι κυτοκίνες. Οι κυτοκίνες είναι μια ευρεία κατηγορία των μικρών πρωτεϊνών (~ 5-20 kDa) που είναι σημαντικές στην κυτταρική σηματοδότηση καθώς απελευθερώνονται από τα κύτταρα και επηρεάζουν τη συμπεριφορά των άλλων κυττάρων , και μερικές φορές ακόμα και την ίδια την απελευθέρωση των κυττάρων . Χαρακτηριστικά παραδείγματα κυτοκινών χημειοκίνες , ιντερφερόνες , ιντερλευκίνες, λεμφοκίνες , παράγοντες νέκρωσης όγκου , αλλά γενικά όχι ορμόνες ή αυξητικούς παράγοντες. Παράγονται από ένα ευρύ φάσμα κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος , όπως από μακροφάγα, Β-λεμφοκύτταρα, Τ λεμφοκύτταρα και ιστιοκύτταρα , καθώς και τα ενδοθηλιακά κύτταρα , ινοβλάστες , και διάφορα στρωματικά κύτταρα. Μια δεδομένη κυτοκίνη μπορεί να παράγεται με περισσότερους από έναν τύπους κυττάρων .

Δρουν μέσω υποδοχέων , και είναι ιδιαίτερα σημαντικές στο ανοσοποιητικό σύστημα. Ταυτόχρονα ρυθμίζουν την ισορροπία μεταξύ χημικής και κυτταρικής ανοσοαπόκρισης , καθώς και την ωρίμανση , την ανάπτυξη , και την ανταπόκριση συγκεκριμένων κυτταρικών πληθυσμών. Κάποιες κυτοκίνες ενισχύουν ή αναστέλλουν τη δράση των άλλων κυτοκινών με πολύπλοκους τρόπους.

Οι κυτοκίνες διαφέρουν από τις ορμόνες , οι οποίες είναι επίσης σημαντικά μόρια κυτταρικής σηματοδότησης , στο ότι οι ορμόνες κυκλοφορούν σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις και τείνουν να δημιουργούνται από συγκεκριμένα είδη κυττάρων.

Τέλος, οι κυτοκίνες είναι σημαντικές στην υγεία και την ασθένεια, και πιο συγκεκριμένα στην απόκριση του ξενιστή σε μόλυνση, ανοσοαποκρίσεις, φλεγμονή, τραύμα, σήψη, τον καρκίνο, και την αναπαραγωγή.

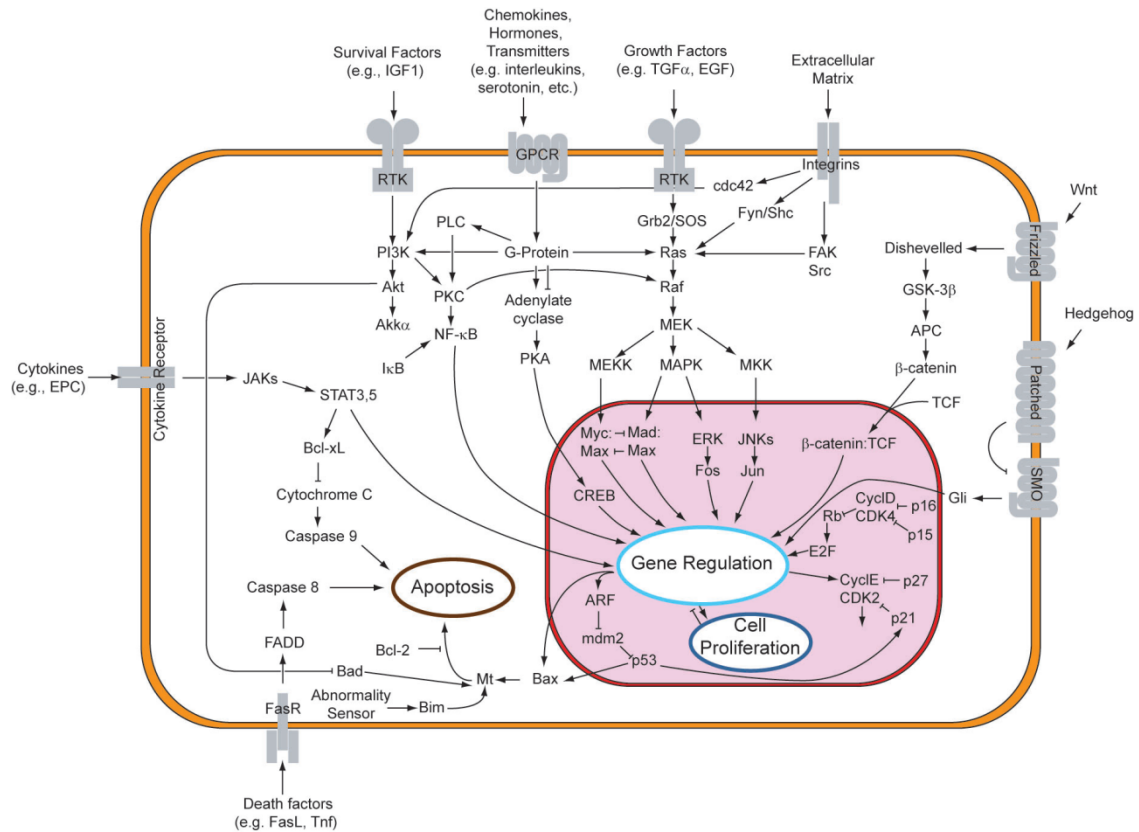
Μια δεύτερη υποκατηγορία πρωτεϊνών είναι οι φωσφοπρωτεΐνες. Πρόκειται για πρωτεΐνες οι οποίες είναι μετα-μεταφραστικά τροποποιημένες με την προσάρτηση είτε μιας μεμονωμένης φωσφορικής ομάδας, ή ενός μορίου, όπως 5'-φωσφο-DNA, μέσω μιας φωσφορικής ομάδας. Ο στόχος του συγκεκριμένου αμινοξέος είναι συνήθως σερίνη, θρεονίνη ή κατάλοιπα τυροσίνης (ως επί το πλείστον σε ευκαρυωτικά κύτταρα), ασπαρτικό οξύ ή κατάλοιπα ιστιδίνης (κυρίως στα προκαρυωτικά).

1.1.3 Σηματοδότηση Κυττάρων

Η αλληλεπίδραση των κυττάρων με το μικρο-περιβάλλον τους καθώς επίσης και η διακυττάρια επικοινωνία προϋποθέτει την ικανότητα μετάδοσης πληροφοριών από και προς το κύτταρο. Η πρόσληψη, η κωδικοποίηση και η διανομή της πληροφορίας στο κύτταρο μέσω υποδοχέων των πρωτεϊνών προς συγκεκριμένες θέσεις του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα, ώστε να προκληθούν απαντήσεις που τροποποιούν και ελέγχουν το σύνολο των κυτταρικών λειτουργιών, επιτυγχάνεται μέσω ενός βιολογικά περίπλοκου συστήματος σηματοδότησης. Επιπλέον των εξωτερικών ερεθισμάτων το ίδιο σύστημα σηματοδότησης επεξεργάζεται και μεταβιβάζει πληροφορίες που προέρχονται και από το ίδιο το κύτταρο.

Οι κυτταρικές σηματοδοτικές οδοί ασκούν ουσιώδεις ρυθμιστικές επιδράσεις σε όλο το φάσμα της κυτταρικής ζωής των οργανισμών από την μορφογένεση έως και την ενήλικη ζωή, όπως μεταξύ άλλων στην ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και την μετανάστευση των κυττάρων, στην επιβίωση και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο μέσω της απόπτωσης, στο κυτταρικό μεταβολισμό και την διεκπεραίωση των ειδικών λειτουργιών των ώριμων κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων της σύσπασης, της έκκρισης, της ανοσολογικής ρύθμισης, και της νευρικής διαβίβασης. Εμπλέκονται επίσης στην παθογένεια μιας σειράς νοσημάτων ελέγχοντας την μεταγραφική ρύθμιση των φλεγμονωδών και άλλων γονιδίων και προκαλώντας γενικά λειτουργικές και φαινοτυπικές μεταβολές σε διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς.

Η υποδοχή, η πρόσληψη και η ενδοκυττάρια ροή της πληροφορίας ακολουθεί συγκεκριμένα κυτταρικά μονοπάτια, που αναφέρονται ως κυτταρικές σηματοδοτικές οδοί (cell signaling pathways) ή κυτταρικές οδοί μεταγωγής σήματος (cell signal transduction pathways) (Σχήμα 1.2),.



Εικόνα 4: Υπόδειγμα Μονοπατιού Μετάδοσης Σήματος

Αυτές οι οδοί παραδοσιακά περιγράφονται ως καταρράκτες γεγονότων που μεταβιβάζουν την πληροφορία από το ένα μόριο στο επόμενο και τελικά σε ειδικά εκτελεστικά μόρια (effectors) που προάγουν συγκεκριμένες κυτταρικές απαντήσεις. Η μεταβίβαση της πληροφορίας πραγματοποιείται με στερεότυπους μηχανισμούς κοινούς για όλα τα κύτταρα, που αφορούν, αφενός, στην αλλαγή της στερεοχημικής διαμόρφωσης πρωτεϊνών, που αποκαλύπτει κρίσιμες περιοχές με ενζυματική δραστηριότητα, και αφετέρου, σε μεταγραφικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην οδό, συμπεριλαμβανομένων της φωσφορυλίωσης-αποφωσφορυλίωσης, της οξειδωσης, της ακετυλίωσης, της μεθυλίωσης και της αποδόμησης.

Οι κυτταρικές σηματοδοτικές οδοί διαθέτουν μια σύνθετη βιολογική δομή. Η διευθέτηση στον κυτταρικό χώρο των συστατικών μιας σηματοδοτικής οδού και τη συναρμογή των στοιχείων που τις αποτελούν σε σηματοδοτικά συμπλέγματα έλκει και καθιστά αποτελεσματική την ροή και την εξειδίκευση της μεταδιδόμενης πληροφορίας. Δομές που υποστηρίζονται από τον κυτταροσκελετό του κυττάρου, όπως τα πρωτεϊνικά ικρίωματα (protein scaffolds) και τα λιπιδιακά πλέγματα (lipid rafts) συμμετέχουν στην χωρική οργάνωση μιας σηματοδοτικής οδού και επιτρέπουν την δημιουργία εντοπισμένων σηματοδοτικών γεγονότων που αναφέρονται ως στοιχειώδη σηματοδοτικά συμβάντα. Πέραν αυτού υπάρχει επίσης οργάνωση της ροής της πληροφορίας σε χρονική κλίμακα.

Τέλος, κάθε κυτταρικός τύπος διαθέτει ένα μοναδικό ρεπερτόριο κυτταρικών σηματοδοτικών συστατικών, που αναφέρεται με τον όρο κυτταρικό συσσωμάτωμα. Κατά την

διάρκεια των τελικών σταδίων της ανάπτυξης, τα κύτταρα εκφράζουν έναν ειδικό φαινότυπο και αυτή η διαδικασία της διαφοροποίησης περιλαμβάνει την έκφραση ενός διακριτού set από συστατικά της σηματοδότησης (ειδικό για τον κυτταρικό πληθυσμό συσσωματωμάτων) που προϋποτίθεται για τον έλεγχο των ειδικών λειτουργιών. Αυτά τα συσσωματώματα έχουν υψηλό βαθμό πλαστικότητας και διαρκώς αναδιαμορφώνονται ώστε να ανταπεξέρχονται στις μεταβαλλόμενες ανάγκες. Η μη φυσιολογική αναδιαμόρφωση του κυτταρικού συσσωματώματος δημιουργεί σηματοδοτικά ελαττώματα που είναι ουσιώδους σημασίας για την εισβολή αρκετών νόσων.

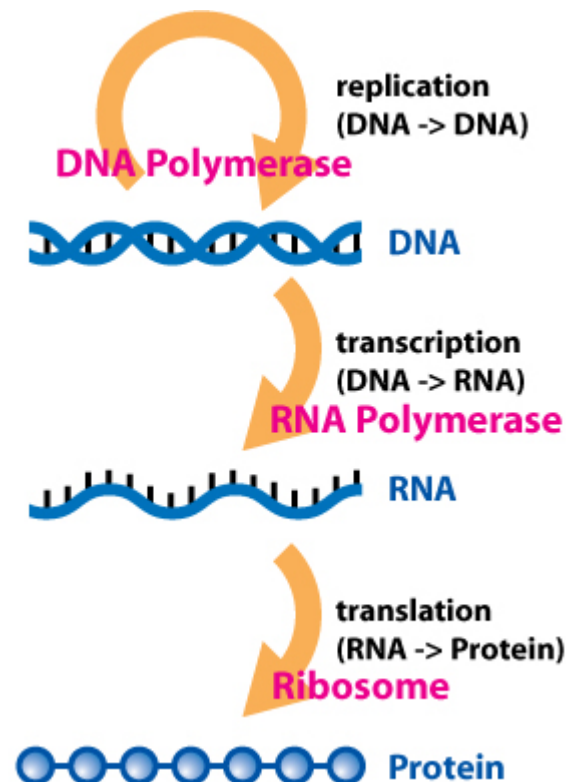
1.1.4 Συστημική Βιολογία

Η συστημική βιολογία είναι μια σχετικά νέα διεπιστημονική προσέγγιση στο γνωστικό αντικείμενο της βιολογίας. Συγκεκριμένα, επιχειρεί τόσο την επαναπροσέγγιση της ερευνητικής τακτικής, όσο και της υπάρχουσας γνώσης με στόχο την κατανόηση των βιολογικών φαινομένων σε συστημικό επίπεδο.

Ιστορικά, η μοριακή βιολογία, κυρίως μετά την ανακάλυψη της διπλής έλικας του DNA και της διατύπωσης του κεντρικού δόγματος της βιολογίας από τους Watson και Crick, έριξε φως στη δομή του κυττάρου μέσω της αναγνώρισης των διαφόρων συστατικών του (γονίδια, πρωτεΐνες κλπ) και των λειτουργιών που αυτά επιτελούν. Η συστημική βιολογία προσπαθεί να

δώσει απάντηση στην επόμενη πρόκληση που είναι η σύνθεση της γνώσης αυτών των συστατικών (αυτόνομων συστημάτων) σε ένα βιολογικό σύστημα, είτε αυτό είναι κύτταρο είτε ιστός είτε οργανισμός, ώστε να συνδεθεί ο φαινόμενος κόσμος με το βιολογικό του υπόβαθρο. Η αναγκαιότητα αυτού του νέου βήματος πηγάζει από το γεγονός ότι γνώση των ιδιοτήτων των στοιχείων δεν ισοδυναμεί με γνώση των ιδιοτήτων του συστήματος, καθώς μερικές από αυτές δεν μπορούν να αποδοθούν σε κανένα στοιχείο παρά μόνο στο συνεργαζόμενο σύνολο τους (ολιστική προσέγγιση).

Η κατανόηση των βιολογικών συστημάτων πάντα αποτελούσε απώτατο στόχο της βιολογίας όμως τώρα, χάρη στις εξελίξεις της μοριακής βιολογίας, υπάρχει πρόσφορο έδαφος για στηρίξει αυτής της προσπάθειας. Το έδαφος αυτό είναι το μοριακό επίπεδο το οποίο παρέχει την δυνατότητα να αναπτυχθεί ένα πλαίσιο γνώσης μέσα το οποίο να εκφράζονται με σαφήνεια σχέσεις αιτιότητας και όχι απλές παρατηρήσεις.



Εικόνα 5: Μοριακό Δόγμα Βιολογίας

Η συστημική ανάλυση, για να μην είναι κενή έννοια, θα πρέπει όχι μόνο να επαναπροσεγγίσει την υπάρχουσα γνώση, αλλά να προσθέσει τα συμπεράσματα της σε αυτή. Οι στόχοι στους οποίους πρέπει να αποβλέπει μια συστημική ανάλυση δεν είναι κοινά αποδεκτοί. Ο Kitano, ένας από τους «πατέρες» της συστημικής βιολογίας, στην έκθεση του Θεμέλια της Συστημικής Βιολογίας (Foundations of System Biology) δίνει την προσωπική του άποψη για το ποιοι πρέπει να είναι οι στόχοι μιας έρευνας που επιδιώκει μια «συστημική κατανόηση» της βιολογίας. Συγκεκριμένα η έρευνα πρέπει να εστιάζει:

1. στη δομή ενός συστήματος, όπως για παράδειγμα είναι τα γονίδια, ο μεταβολισμός, τα δίκτυα μεταφοράς σήματος και οι φυσικές δομές.
2. στη δυναμική των συστημάτων, πώς δηλαδή τα διάφορα συστήματα αλληλεπιδρούν μεταξύ τους (μέχρι εδώ είναι το πεδίο της απλής κατανόησης).
3. πάνω σε μεθόδους για τον έλεγχο του συστήματος, και τελικώς.
4. πάνω σε μεθόδους για σχεδιασμό και τροποποίηση συστημάτων με επιθυμητές ιδιότητες.

1.1.5 Πρωτεϊνωματική

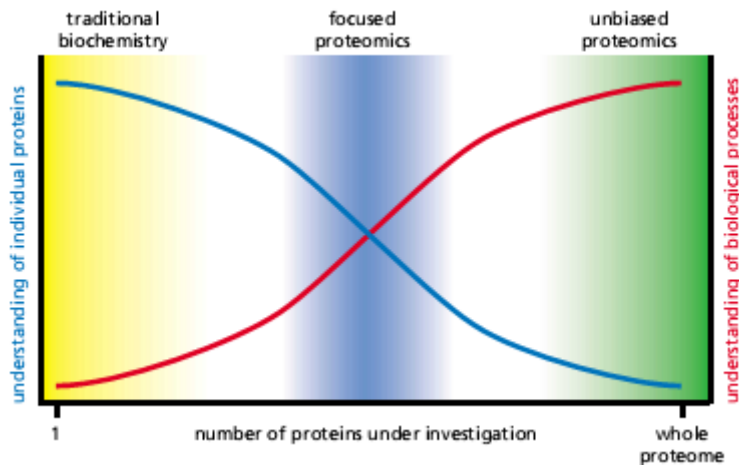
Πρωτεϊνωματική (proteomics) είναι η μεγάλης κλίμακας ανάλυση των πρωτεϊνών ενός κυττάρου ή οργανισμού. Γενικά η κατάληξη «-ωματική» (-omics) χρησιμοποιείται για να περιγράψει την ανάλυση μακρομορίων ενός ολόκληρου συστήματος. Η ορολογία προκύπτει ως επέκταση της έννοιας του αρχικού όρου γονιδιωματική (genomics), ο οποίος αναφέρεται στην ανάλυση του γονιδιώματος (genome), του συνόλου δηλαδή των γονιδίων του οργανισμού. Σύμφωνα με το κεντρικό δόγμα, η διαδρομή της γενετικής πληροφορίας ξεκινά από το γονιδίωμα και τερματίζει στις πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες (το σύνολο των πρωτεϊνών που εκφράζονται σε ένα βιολογικό σύστημα) είναι οι τελικοί αποδέκτες της γενετικής πληροφορίας και ως εκ τούτου αποτελούν, από βιολογικής άποψης τουλάχιστον, τον φαινότυπο που βλέπουμε σε κάθε σύστημα.

Η μελέτη ενός κυττάρου σε πρωτεϊνικό επίπεδο είναι αναγκαία διότι η μελέτη σε γονιδιακό επίπεδο δεν αρκεί. Η λειτουργία ενός κυττάρου είναι πολύ πολύπλοκη και δεν μπορεί να ερμηνευτεί μόνο μέσω της έκφρασης του γονιδιώματος. Το κύτταρο βασίζεται, επιπλέον, σε διάφορα μονοπάτια (σειρές χημικών αντιδράσεων) για τη λειτουργία του (μεταβολικά, μετάδοσης σήματος κ.ά.). Κατά συνέπεια, η τελική έκφραση του πρωτεϊνώματος δεν μπορεί να εξαχθεί από την ευθεία γραμμή αιτιότητας, που υπονοεί το κεντρικό δόγμα, αφού υπάρχουν πολλά μετα-μεταφραστικά (post-translational) φαινόμενα που το καθορίζουν.

Η «παραδοσιακή» πρωτεϊνωματική ανάλυση συνίσταται στο διαχωρισμό-απομόνωση και αναγνώριση της δομής και, κατά συνέπεια, της λειτουργίας των πρωτεϊνών. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται συνήθως με την τεχνική της μονοδιάστατης ή δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης σε τζελ (1 or 2-D Gel Electrophoresis), ενώ η ανάλυση με την τεχνική της φασματομετρίας μάζας (Mass Spectrometry). Οι τεχνικές αυτές συνδυαζόμενες επιτρέπουν να διαχωριστούν και αναλυθούν μέχρι 1.000 πρωτεΐνες, αριθμός που δεν θεωρείται ιδιαίτερα

μεγάλος, δεδομένου ότι σε κάθε δείγμα ο αριθμός των πρωτεϊνών μπορεί να είναι της τάξης του 106.

Η συστημική ανάλυση δεν ξεκινάει από το μηδέν όπως η παραδοσιακή ανάλυση. Αντιθέτως χτίζει πάνω στην υπάρχουσα γνώση. Στόχος της συστημικής ανάλυσης είναι η κατανόηση συγκεκριμένων φαινοτύπων, γι' αυτό και δεν στοχεύει στην αδιάκριτη αναγνώριση πρωτεϊνών, αλλά στην παρακολούθηση συγκεκριμένων πρωτεϊνών στόχων για τις οποίες εκτιμάται, εκ των προτέρων, ότι σχετίζονται (ή είναι πιθανό να σχετίζονται) με τον υπό ανάλυση φαινότυπο.

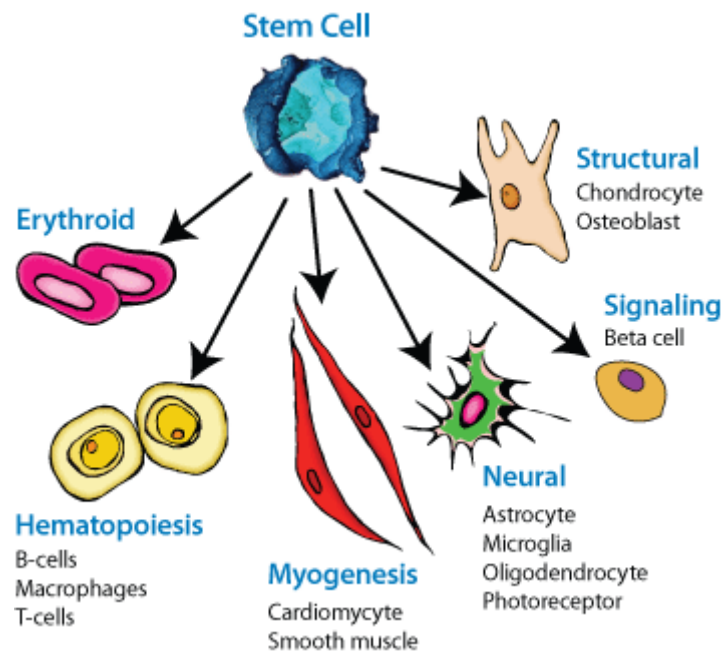


Εικόνα 6: "Φάσμα" Πρωτεϊνικής Ανάλυσης

Ως εκ τούτου, πειράματα που εντάσσονται σε μια συστημική ανάλυση δεν αποσκοπούν στην άκριτη αναγνώριση πρωτεϊνών, αλλά στην ποσοτικοποίηση της έκφρασης μερικών κρίσιμων εξ αυτών. Για μια συστημική ανάλυση, κρίσιμο μέγεθος δεν είναι το ποιες πρωτεΐνες υπάρχουν σε ένα κύτταρο, αλλά ποιες είναι ενεργές, ποιων η έκφραση, δηλαδή, διαφοροποιείται σε μια χρονική περίοδο ως απάντηση σε κάποιο ερέθισμα. Επομένως, ο φαινότυπος, υπό το πρίσμα της πρωτεϊνωματικής, είναι το αποτέλεσμα «μονοπατιών» αλληλεπίδρασης, δηλαδή της σειριακής ενεργοποίησης διαφόρων πρωτεϊνών .

1.2 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ

Η κυτταρική διαφοροποίηση είναι η διαδικασία με την οποία ένα κύτταρο μετατρέπεται σε ένα πιο εξειδικευμένο. Η διαδικασία λαμβάνει χώρα αναρίθμητες φορές στους πολυκύτταρους οργανισμούς, από το ζυγωτό μέχρι σε ένα περίπλοκο σύστημα ιστών και οργάνων. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας στα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης, τα κύτταρα συνθέτουν συγκεκριμένες ποσότητες πρωτεϊνών, αποκτούν τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους και εξειδικεύονται στο να επιτελούν τις επιμέρους λειτουργίες τους. Ανάλογα με τις λειτουργίες που επιτελούν τα κύτταρα αποκτούν και το χαρακτηριστικό τους σχήμα.



Εικόνα 7: Διαφοροποίηση Κυττάρων

Η πορεία της εξειδίκευσης των κυττάρων στον άνθρωπο ξεκινά ήδη από τη δέκατη μέρα της οντογένεσης, όπου τα πρώτα κύτταρα που δημιουργούνται είναι τα βλαστομερή. Τα βλαστομερή σχηματίζουν τρεις βλαστικές στιβάδες, οι οποίες είναι το εξώδερμα, το ενδόδερμα και το μεσόδερμα, από όπου θα προκύψουν τελικά οι τέσσερις μεγάλες κυτταρικές ομάδες, οι οποίες είναι τα επιθηλιακά κύτταρα, τα μυικά κύτταρα, τα νευρικά κύτταρα και τα κύτταρα του συνδετικού ιστού.

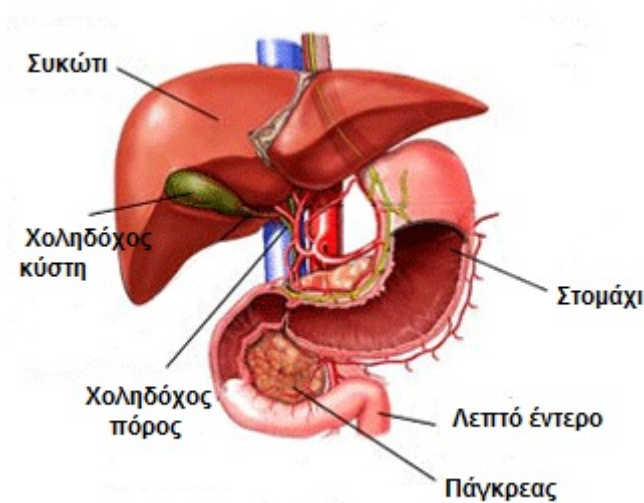
1.3 ΗΠΑΡ (ΣΥΚΩΤΙ)

Το ήπαρ ή συκώτι είναι ένα ζωτικό όργανο που διαθέτουν τα σπονδυλωτά, καθώς και κάποια άλλα ζώα. Έχει ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών στο οποίο περιλαμβάνεται η αποτοξίνωση, η σύνθεση πρωτεϊνών και η παραγωγή βιοχημικών ουσιών απαραίτητων για την πέψη των τροφών. Το ήπαρ είναι απαραίτητο για τη ζωή. Επί του παρόντος δεν έχει ανευρεθεί τρόπος αντιστάθμισης των λειτουργιών του, σε περίπτωση πλήρους απουσίας του σε βάθος χρόνου, παρόλο που η αιμοκάθαρση ήπατος μπορεί να συνεισφέρει για ένα μικρό διάστημα.

Το όργανο αυτό παίζει κυρίαρχο ρόλο στο μεταβολισμό και επιτελεί πολλές λειτουργίες του οργανισμού, μεταξύ άλλων την αποθήκευση γλυκογόνου, καταστροφή ερυθροκυττάρων, σύνθεση των πρωτεϊνών του πλάσματος, παραγωγή ορμονών και απομάκρυνση των τοξικών ουσιών από το σώμα, είτε είναι εξωγενείς είτε είναι παράγωγα του μεταβολισμού. Βρίσκεται κάτω από το διάφραγμα, στο δεξιό και άνω μέρος της κοιλιάς, που ονομάζεται δεξιό υποχόνδριο, και επεκτείνεται και στο κεντρικό και άνω μέρος της κοιλιάς, που ονομάζεται επιγάστριο. Παράγει τη χολή, ένα αλκαλικό μίγμα, που αποδομεί μικρά και περίπλοκα μόρια, πολλά από τα οποία είναι αναγκαία για της φυσιολογικές ζωτικές λειτουργίες.

1.3.1 Ανατομία του Ήπατος

Το ήπαρ είναι ένα όργανο χρώματος κοκκινωπού καφέ, με τέσσερις λοβούς, διαφορετικού μεγέθους και σχήματος. Το ανθρώπινο ήπαρ φυσιολογικά έχει βάρος 1.4–1.6 kg (3.1–3.5 lb) και αποτελεί περίπου το 2% του συνολικού βάρους του σώματος. Καταλαμβάνει ολόκληρο το δεξιό υποχόνδριο, τμήμα του ιδίως επιγαστρίου καθώς επίσης και τμήματα του αριστερού υποχονδρίου. Το σχήμα του μοιάζει με σφήνα με τη βάση προς τα δεξιά και την κορυφή προς τα αριστερά. Διακρίνονται 3 χείλη (πρόσθιο, δεξιό και αριστερό) και 3 επιφάνειες (άνω, κάτω και οπίσθια). Στην κάτω επιφάνεια του ήπατος υπάρχουν οι πύλες δια των οποίων εισέρχονται η πυλαία φλέβα και η ηπατική αρτηρία και εξέρχεται ο χοληδόχος πόρος. Η ηπατική αρτηρία μεταφέρει αίμα από την αορτή, ενώ η πυλαία φλέβα μεταφέρει αίμα, που περιέχει θρεπτικά συστατικά προϊόντα της πέψης, από όλο το γαστρεντερικό σωλήνα, και επίσης από το σπλήνα και το πάγκρεας. Αυτά τα αγγεία διαιρούνται σε τριχοειδή και καθένα από αυτά καταλήγει σε ένα λόβιο. Κάθε λόβιο αποτελείται από εκατομμύρια ηπατοκύτταρα, που είναι τα κύρια λειτουργικά κύτταρα του ήπατος. Στην κάτω επιφάνεια του δεξιού λοβού υπάρχει ο κυστικός βόθρος με τη χοληδόχο κύστη καθώς επίσης και διάφορα εντυπώματα που σχηματίζονται από πιέσεις των πέριξ σπλάγχων.



Εικόνα 8: Ανατομία Ήπατος

1.3.2 Φυσιολογία Ήπατος

Οι διάφορες λειτουργίες του ήπατος διεκπεραιώνονται από τα ηπατοκύτταρα. Προς το παρόν δε έχει κατασκευαστεί τεχνητό όργανο ή συσκευή ικανή να υποκαταστήσει όλες τις λειτουργίες

του ήπατος. Κάποιες λειτουργίες υποκαθιστά η αιμοκάθαρση ήπατος, μια πειραματική θεραπεία για την ηπατική ανεπάρκεια.

- Σύνθεση
 - ✓ Ένα μεγάλο μέρος της σύνθεσης των αμινοξέων
 - ✓ Το ήπαρ αναλαμβάνει διάφορους ρόλους στο μεταβολισμό των υδατανθράκων:
 - ✓ Γλυκονογένεση (σύνθεση γλυκόζης από συγκεκριμένα αμινοξέα, γαλακτικό οξύ ή γλυκερόλη)
 - ✓ Γλυκογονόλυση (η αποδόμηση του γλυκογόνου σε γλυκόζη)
 - ✓ Γλυκογονογένεση (σύνθεση γλυκογόνου από γλυκόζη)
 - ✓ Το ήπαρ είναι ο ακρογωνιαίος λίθος στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών (σύνθεση και αποδόμηση)
 - ✓ Το ήπαρ επίσης έχει ρόλο στο μεταβολισμό των λιπιδίων:
 - Σύνθεση χοληστερόλης
 - Λιπογένεση (η παραγωγή των τριγλυκεριδίων)
 - ✓ Το ήπαρ συνθέτει τους παράγοντες πήξης I (ινωδογόνο), II (προθρομβίνη), V, VII, IX, X και XI, όπως και την πρωτεΐνη C, S και αντιθρομβίνη.
 - ✓ Το 1ο τρίμηνο της εμβρυϊκής ζωής η κύρια θέση παραγωγής ερυθροκυττάρων. Περί την 32η εβδομάδα της κύησης ο μυελός των οστών αναλαμβάνει σχεδόν αποκλειστικά αυτή τη διεργασία.
 - ✓ Το ήπαρ παράγει και εκκρίνει χολή (ένα κιτρινωπό υγρό), που απαιτείται για την γαλακτωματοποίηση του λίπους. Ένα μέρος της χολής παροχετεύεται απευθείας στο δωδεκαδάκτυλο, ενώ το υπόλοιπο αποθηκεύεται προσωρινά στη χοληδόχο κύστη.
 - ✓ Το ήπαρ επίσης παράγει τον ινσουλινόμορφο αυξητικό παράγοντα 1 (IGF-1), μια πολυπεπτιδική πρωτεϊνική ορμόνη που παίζει σημαντικό ρόλο στην σωματική αύξηση στα παιδιά και συνεχίζει να έχει αναβολική δράση στους ενήλικες.
 - ✓ Το ήπαρ είναι μια σημαντική θέση παραγωγής θρομβοποιητίνης. Η θρομβοποιητίνη είναι μια γλυκοπρωτεϊνική ορμόνη που ρυθμίζει την παραγωγή αιμοπεταλίων από το μυελό των οστών.
- Αποδόμηση
 - ✓ Αποδόμηση ινσουλίνης και άλλων ορμονών
 - ✓ Στο ήπαρ γίνεται η γλυκουρονίδωση της χολερυθρίνης, διευκολύνοντας την έκκρισή της με τη χολή.
 - ✓ Το ήπαρ αποδομεί ή τροποποιεί τοξικές ουσίες (π.χ. μέσω μεθυλίωσης), όπως επίσης και την πλειονότητα των φαρμακευτικών προϊόντων.
 - ✓ Το ήπαρ μετατρέπει την αμμωνία σε ουρία.

- Άλλες Λειτουργίες
 1. Το ήπαρ αποθηκεύει ένα πλήθος ουσιών, συμπεραλαμβανομένων της γλυκόζης (με μορφή γλυκογόνου), βιταμίνη Α (απόθεμα για 1-2 χρόνια), βιταμίνη D (για 1-4 μήνες), βιταμίνη Β12 (για 1-3 χρόνια), σίδηρο και χαλκό.
 2. Το ήπαρ έχει επίσης ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς το δικτυοενδοθηλιακό σύστημά του περιλαμβάνει πολλά ανοσοϊκανά κύτταρα, που λειτουργούν σαν *κόσκινο* για αντιγόνα, που μεταφέρονται μέσω της πυλαίας κυκλοφορίας.
 3. Το ήπαρ συνθέτει αλβουμίνη, το κύριο ωσμωτικό συστατικό του πλάσματος του αίματος.
 4. Συνθέτει αγγειοτενσινογόνο, μια ορμόνη υπεύθυνη για την αύξηση της αρτηριακής πίεσης, όταν ενεργοποιείται από τη ρενίνη, ένα ένζυμο που απελευθερώνεται όταν οι νεφροί ανιχνεύουν ελαττωμένη αρτηριακή πίεση.

1.4 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΣΤΟ ΗΠΑΡ

Ο ηπατοκυτταρικός καρκίνος (ΗΚΚ) είναι ένα συχνό νεόπλασμα ιδιαίτερης βαρύτητας, αλλά διαχρονικά πολύ ενδιαφέρον. Κατά τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον αυτό έχει ενταθεί και έχει προσελκύσει την προσοχή των επιστημόνων χάρη στις εξελίξεις της επιδημιολογίας, της χειρουργικής, της μοριακής βιολογίας, της απεικόνισης και της θεραπείας.

Η σχέση του ηπατοκυτταρικού καρκίνου με τους ιούς της ηπατίτιδας Β και C, όπως επίσης και με τον αλκοολισμό, καθορίζει την επιδημιολογία της νόσου. Παράλληλα, είναι πρόκληση για πρόληψη μέσω υγειονομικών παρεμβάσεων και εμβολιασμού.

Οι εξελίξεις στις χειρουργικές τεχνικές, η καλύτερη κατανόηση της ανατομικής και της βιολογίας του ήπατος, οι διεγχειρητικοί υπέρηχοι και οι μέθοδοι υποβοήθησης της ηπατικής λειτουργίας έχουν συμβάλει σημαντικά στη μειωμένη θνητότητα στις χειρουργικές επεμβάσεις και στη μεγαλύτερη επιβίωση των ασθενών εκείνων που έχουν επιλεγεί για εγχείρηση.

Η μοριακή βιολογία αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο στην κατανόηση της καρκινογένεσης και ενδεχομένως της θεραπείας. Η παθολογική έκφραση διαφόρων γονιδίων στην ηπατοκαρκινογένεση είναι το κυριότερο χαρακτηριστικό σε μοριακό επίπεδο. Η αλλαγή της έκφρασης των γονιδίων μπορεί να είναι αποτέλεσμα γενετικής, επιγενετικής βλάβης και σχετίζεται με τη λοίμωξη, με τους ιούς της ηπατίτιδας.

Η επανάσταση στην απεικόνιση έχει συμβάλει ουσιαστικά στην έγκαιρη διάγνωση, στη σταδιοποίηση και στην παρακολούθηση των ασθενών. Το υπερηχογράφημα, η αξονική και η μαγνητική τομογραφία και η ποζιτρονική τομογραφία είναι οι αιχμές του δόρατος στην απεικόνιση.

Στον τομέα της θεραπείας, υπάρχουν βήματα προόδου, όχι όμως σε βαθμό που να μεταβληθεί η φυσική ιστορία εξέλιξης της νόσου. Οι χημειοεμβολισμοί, οι ραδιοσυχνότητες, οι ακτίνες laser και η έγχυση αλκοόλης μόνο παρηγορητική αντιμετώπιση προσφέρουν. Επίσης, η

συστηματική χημειοθεραπεία δεν έχει συμβάλει σημαντικά στην παράταση ζωής. Η ελπίδα έχει στραφεί στη στοχευμένη θεραπεία, όπου, όπως και σε άλλες μορφές καρκίνου, εξειδικευμένα φάρμακα έλκονται από στόχους των καρκινικών κυττάρων, με αποτέλεσμα τα φάρμακα αυτά να καταστρέφουν τα κύτταρα αυτά.

1.4.1 Επιδημιολογία

Η επίπτωση της νόσου (620.000 περιπτώσεις ανά έτος) διαφέρει ελάχιστα από τη θνητότητα (595.000 περιπτώσεις ανά έτος), αποδεικνύοντας τη δυσμενή πρόγνωση και τις περιορισμένες θεραπευτικές δυνατότητες. Συναντάται συχνότερα (σε ποσοστό 80%) στην Ασία και στις υποσαχάριες χώρες της Αφρικής και στην ανατολική Ασία (>20 περιπτώσεις/100.000). Στη νότια Ευρώπη η επίπτωση του ΗΚΚ είναι μέτρια (Ιταλία 13,5 και 4,6/100.000, Ελλάδα 12,5 και 4,6/100.000, Ισπανία 7,5 και 2,4/100.000, για άνδρες και γυναίκες αντίστοιχα), ενώ στις ΗΠΑ, στον Καναδά και στη δυτική Ευρώπη ο ΗΚΚ είναι αρκετά σπανιότερος (<5/100.000 ανά έτος).

1.4.2 Παράγοντες κινδύνου του ηπατοκυτταρικού καρκίνου

Σύμφωνα με έρευνες, οι κυριότεροι παράγοντες κινδύνου για τον ηπατικό καρκίνο είναι:

1. Ηλικία: Η μέγιστη επίπτωση αφορά στις ηλικίες 74 - 79 ετών σε περιοχές χαμηλού κινδύνου, ενώ στις χώρες με υψηλή επίπτωση ΗΚΚ η νόσος απαντά σε μικρότερες ηλικίες, φτάνοντας τη μεγαλύτερη συχνότητα στα 40 έτη.
2. Φύλο: Παγκοσμίως οι άνδρες προσβάλλονται συχνότερα από τις γυναίκες (αναλογία ανδρών/γυναϊκών από 2:1 έως 4:1), πιθανώς λόγω συχνότερης λοίμωξης από τους ιούς της ηπατίτιδας Β και C, της κατάχρησης αιθυλικής αλκοόλης, του καπνίσματος και της επίδρασης των ανδρογόνων.
3. Εθνικότητα: Ο ΗΚΚ είναι 4 φορές συχνότερος σε άτομα ασιατικής και αφρικανικής καταγωγής.

1.4.3 Αιτιολογικοί παράγοντες που σχετίζονται με την ανάπτυξη του ηπατοκυτταρικού καρκίνου

Μερικοί από τους πιο σημαντικούς αιτιολογικούς παράγοντες που σχετίζονται με την ανάπτυξη του ηπατικού καρκίνου είναι:

1. Τη λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας Β, την κύρια αιτία, με ετήσια επίπτωση πολύ μικρή σε απλούς φορείς, 0,5% - 0,8% σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα και 1,5% - 6,6% σε ασθενείς με κίρρωση.

2. Τη λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας C.
3. Την κίρρωση του ήπατος ανεξαρτήτως αιτιολογίας, αλλά κυρίως την ιογενή B και C και την αλκοολική, με ετήσια επίπτωση 2% - 6,6%, ενώ συνολικά το 80% των περιπτώσεων ΗΚΚ αναπτύσσεται σε κίρρωτικούς ασθενείς.
4. Την αφλατοξίνη που παράγεται από το μύκητα *Aspergillus flavus*.
5. Το κάπνισμα. Στην Ελλάδα τα τελευταία χρόνια φαίνεται ότι αυξάνεται η συχνότητά του, με την ΗCV λοίμωξη σχετιζόμενο ΗΚΚ.

Οι τρεις πρώτες ομάδες συνιστούν και τον πληθυσμό των ατόμων που έχουν ανάγκη επιτήρησης.

1.4.4 Ηπατικές Καρκινικές Σειρές

Οι Βιολόγοι επέλεξαν τη λέξη «αθάνατα» ώστε να ορίσουν κύτταρα που δεν υπόκεινται στο όριο Hayflick , το σημείο στο οποίο τα κύτταρα δεν μπορούν πλέον να διαιρευθούν, που οφείλεται σε βλάβη του DNA ή στα τελομερή. Ο όρος " αθανατοποίηση" εφαρμόστηκε για πρώτη φορά στα καρκινικά κύτταρα που εξέφρασαν το ένζυμο τελομεράση , και με τον τρόπο αυτό απέφευγαν την απόπτωση, τον κυτταρικό θάνατο δηλαδή που προκαλείται από ενδοκυτταρικούς μηχανισμούς .

Αθάνατες κυτταρικές σειρές καρκινικών κυττάρων μπορούν να δημιουργηθούν με την επαγωγή των ογκογονιδίων ή απώλειας των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Μερικές από τις πιο γνωστές κυτταρικές σειρές που αναφέρονται σε ηπατικό καρκίνο είναι οι Huh 7, HepG2, Focus, Hep3B κ.α.. Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά Huh 7.

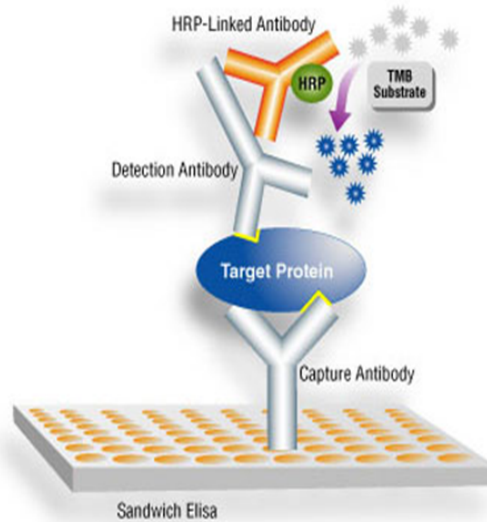
Η κυτταρική σειρά Huh 7 είναι μια καλά διαφοροποιημένη κυτταρική γραμμή η οποία αρχικά είχε ληφθεί από έναν όγκο ήπατος σε έναν άντρα 57 χρονών που καταγόταν από την Ιαπωνία το έτος 1982. Η κυτταρική σειρά ιδρύθηκε από Nakabayshi, H. και Sato, J.. Τα Huh 7 είναι μια αθάνατη κυτταρική σειρά επιθηλιακών ογκογόνων κυττάρων, τα οποία συνήθως αναπτύσσονται σε 2D μονοστοιβάδες.

1.5 ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ELISA

Η διαδικασία ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) είναι η κύρια μέθοδος με την οποία εξετάζεται η παρουσία και η συγκέντρωση ενός βιομορίου, όπως μιας πρωτεΐνης.

Χρησιμοποιείται σε τεστ HIV, SARS, εγκυμοσύνης και γενικότερα σαν διαγνωστικό εργαλείο στην ιατρική. Επίσης εφαρμόζεται σε βιομηχανίες για έλεγχο της ποιότητας ή για εντοπισμό αλλεργιογόνων στα τρόφιμα, στην τοξικολογία για έλεγχο ύπαρξης ουσιών στο αίμα, όπως στεροειδή και σε όλα τα εργαστήρια που ασχολούνται με ανοσολογία, έρευνα κατά του καρκίνου και άλλων ασθενειών.

1.5.1 Κλασσική διαδικασία ELISA



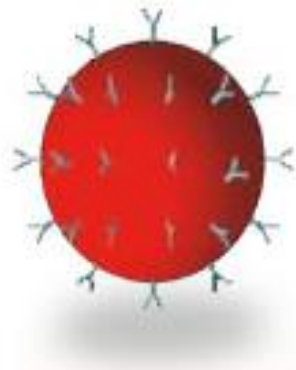
Εικόνα 9: Κλασσική Μέθοδος ELISA

(Image copyrights: Cell Signaling Technology)

Στην κλασσική μέθοδο ELISA, έχουμε μία επιφάνεια [Εικόνα 9], στην οποία κολλάμε πολλά αντισώματα της πρωτεΐνης που θέλουμε να μετρήσουμε. Έτσι, όταν ρίξουμε πάνω σε αυτή την επιφάνεια το υγρό που περιέχει αυτή την πρωτεΐνη, το μόνο που θα κολλήσει στην επιφάνεια θα είναι η πρωτεΐνη που θέλουμε. Στην συνέχεια, χρησιμοποιώντας ένα δεύτερο αντίσωμα της ίδιας πρωτεΐνης που θέλουμε να μετρήσουμε, κολλάμε ένα φωσφορίζον μόριο. Τέλος, με μία συσκευή που μετρά πόσο φωσφορίζει μία επιφάνεια, μπορούμε να υπολογίσουμε την συγκέντρωση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στο δείγμα μας.

1.5.2 ELISA με χρήση μικροσφαιριδίων

Σε αυτήν την πιο σύγχρονη μέθοδο ELISA χρησιμοποιείται η επιφάνεια μικροσφαιριδίων [Εικόνα 10] διαμέτρου συνήθως 6.5 μm αντί της πιο πάνω επίπεδης -και ακίνητης- επιφάνειας.

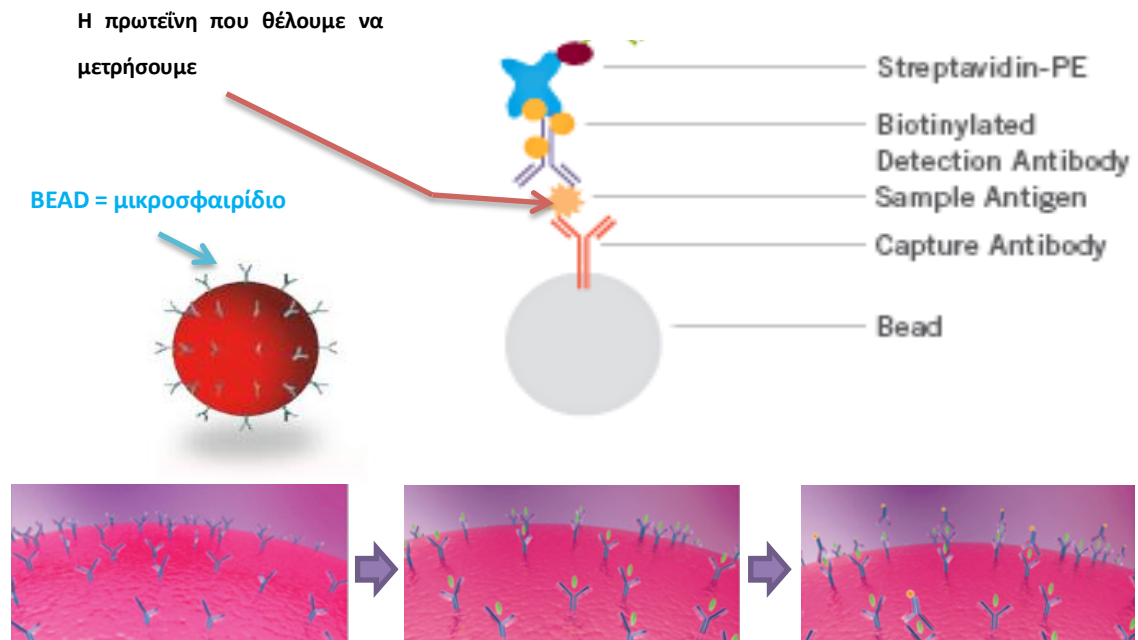


Εικόνα 10: Μικροσφαιρίδιο

Image copyrights: Luminex Inc

Από το 2008 κατασκευάστηκαν και μικροσφαιρίδια που περιέχουν ποσοστό σιδήρου, και άρα μπορούν να αλληλεπιδράσουν με μαγνητικά πεδία.

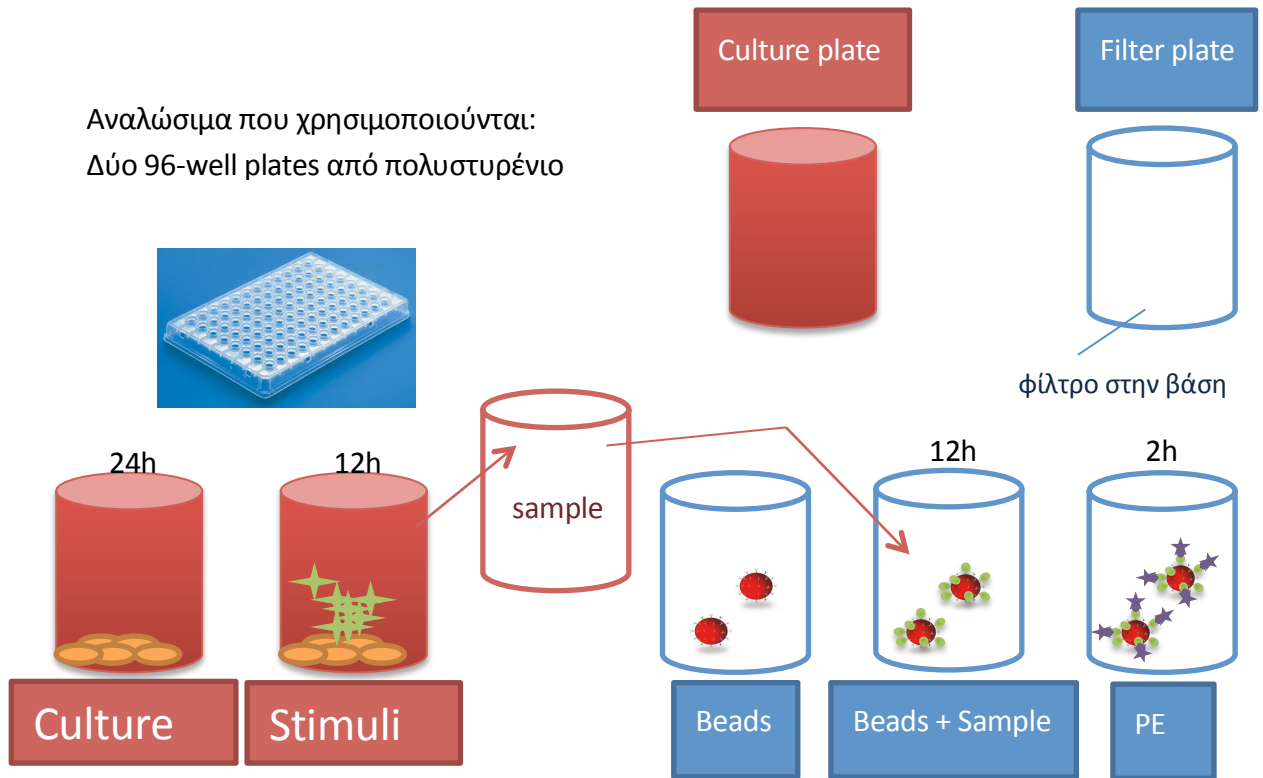
1.5.3 Αναλυτική περιγραφή των βημάτων της διαδικασίας ELISA



Εικόνα 11: Bead Based ELISA

Image copyrights: Luminex Inc

Κατά την διάρκεια της διαδικασίας, ο στόχος είναι να δημιουργηθεί πάνω στα μικροσφαιρίδια το σύμπλοκο που φαίνεται στην [Εικόνα 11], όπως ακριβώς και στην κανονική διαδικασία ELISA. Στην συνέχεια θα αναλύσουμε τα βήματα της διαδικασίας πιο λεπτομερώς.



Εικόνα 12: Περιγραφή της κλασσικής διαδικασίας ELISA

Κατά την εξέλιξη μίας συνηθισμένης πειραματικής διαδικασίας ELISA, χρησιμοποιούνται δύο είδη αναλώσιμων τρυβλίων συνήθως:

- Τρυβλίο 96 βοθρίων από πολυστυρένιο, που χρησιμοποιείται κυρίως για την καλλιέργεια των κυττάρων. (culture plate)
- Τρυβλίο 96 βοθρίων από πολυστυρένιο, με ειδικό φίλτρο στον πυθμένα κάθε βοθρίου. Το φίλτρο χρησιμοποιείται ώστε να μπορεί να αφαιρεθεί το υγρό περιεχόμενο των βοθρίων με συσκευή αναρρόφησης, χωρίς να αφαιρεθούν τα μικροσφαιρίδια διαμέτρου 6.5 μm . Η διάμετρος πόρου του φίλτρου είναι συνήθως 1.0 μm . (filter plate)

Η διαδικασία αρχίζει εφόσον έχουμε κάποια δείγματα προς μέτρηση και τα αντίστοιχα μικροσφαιρίδια με τα συγκεκριμένα σήματα (συνήθως πρωτεΐνες) που θέλουμε να


μετρήσουμε. Όπως έχει αναφερθεί, τα δείγματα μπορεί να προέρχονται από ένα πολύ μεγάλο φάσμα εφαρμογών.

Ο τρόπος απόκτησης των δειγμάτων μπορεί να διαφέρει από εφαρμογή σε εφαρμογή. Η διαδικασία ELISA παραμένει η ίδια κάθε φορά, ωστόσο θα χρησιμοποιήσουμε ένα συγκεκριμένο παράδειγμα για να συνεχίσουμε την παρουσίαση των βημάτων της.

Έστω λοιπόν ότι τα δείγματα προέρχονται από μία καλλιέργεια κυττάρων, αφού διεγείρουμε τα κύτταρα με κάποιες ουσίες-ερεθίσματα. Συγκεκριμένα, θα παραλάβουμε το υπερκείμενο υγρό της καλλιέργειας.

Συνοπτικά λοιπόν, τα βήματα είναι τα ακόλουθα:

- Καλλιεργούμε τα κύτταρα στο culture plate
- Προσθέτουμε ουσίες (stimuli - input) που θα κάνουν τα κύτταρα να ανταποκριθούν (output)
- Παραλαμβάνουμε τα δείγματα που θέλουμε να αναλύσουμε

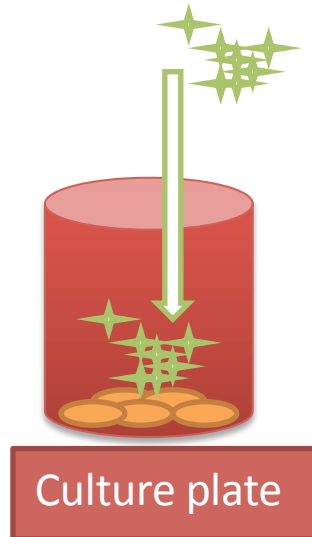


Εικόνα 13: Αναπαράσταση Καλλιέργειας σε Βοθρίο (Well)

- Καλλιεργούμε τα κύτταρα προσομοιάζοντας τις συνθήκες του ανθρώπινου οργανισμού σε ειδικό εκκολαπτήριο (incubator). Οι συνθήκες αυτές είναι 37° C, 5% συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα και 100% υγρασία.

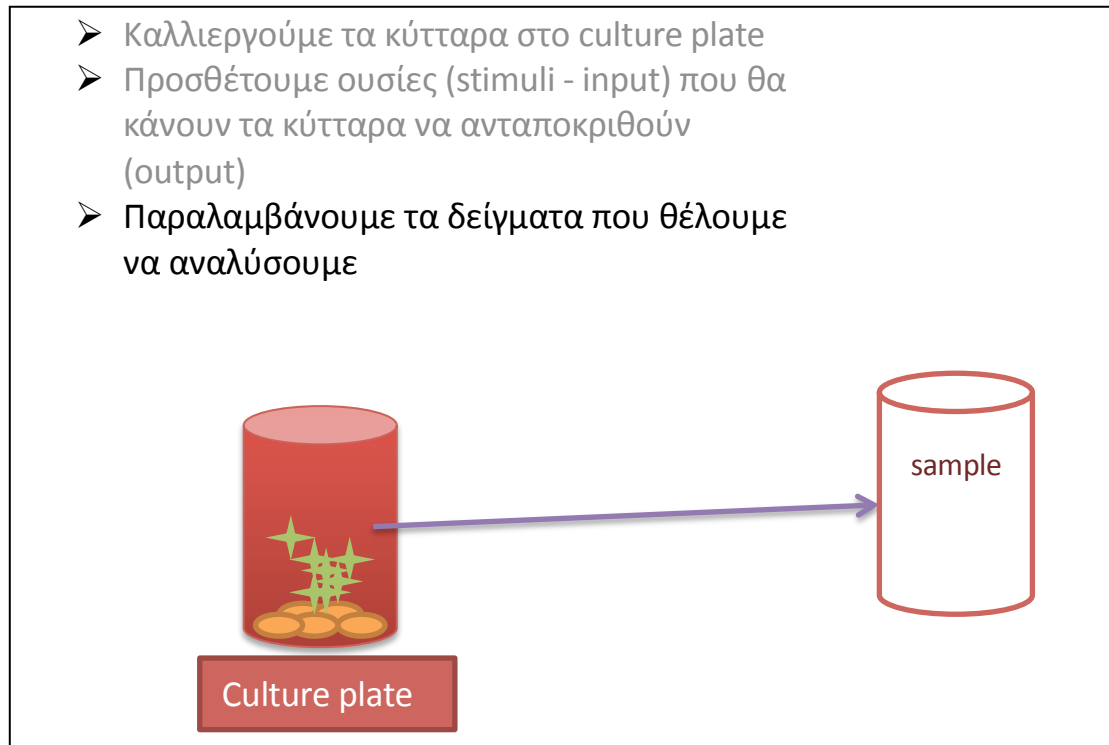
Τα κύτταρα κολλάνε στους πυθμένες των βοθρίων με ειδικές πρωτεΐνες που εμφανίζουν από μόνα τους στην επιφάνεια των κυτταρικών τους μεμβρανών (Cell Adhesion Molecules CAMs). [Εικόνα 13]. Κάθε βοθρίο περιέχει 100-200μl (350μl είναι η συνολική χωρητικότητα κάθε βοθρίου) ειδικού υγρού που ευνοεί την καλλιέργεια των κυττάρων.

- Καλλιεργούμε τα κύτταρα στο culture plate
- Προσθέτουμε ουσίες (stimuli - input) που θα κάνουν τα κύτταρα να ανταποκριθούν (output)
- Παραλαμβάνουμε τα δείγματα που θέλουμε να αναλύσουμε



Εικόνα 14: Αναπαράσταση Προσθήκης Stimuli

- Προσθέτουμε στο υγρό των κυττάρων σε κατάλληλες συγκεντρώσεις τις ουσίες-ερεθίσματα (stimuli) που θέλουμε να συμπεριλάβουμε στο πείραμά μας και να διαπιστώσουμε την απόκριση των κυττάρων σε αυτά. [Εικόνα 14].
- Στην συνέχεια, έπειτα από προκαθορισμένο -σύμφωνα με το σχέδιο πειράματος- χρονικό διάστημα, συλλέγουμε το υπερκείμενο υγρό των κυττάρων από κάθε βοθρίο του τρυβλίου που χρησιμοποιήσαμε για το πείραμα. [Εικόνα 15].



Εικόνα 15: Αναπαράσταση Παραλαβής Δειγμάτων Από το Δείγμα

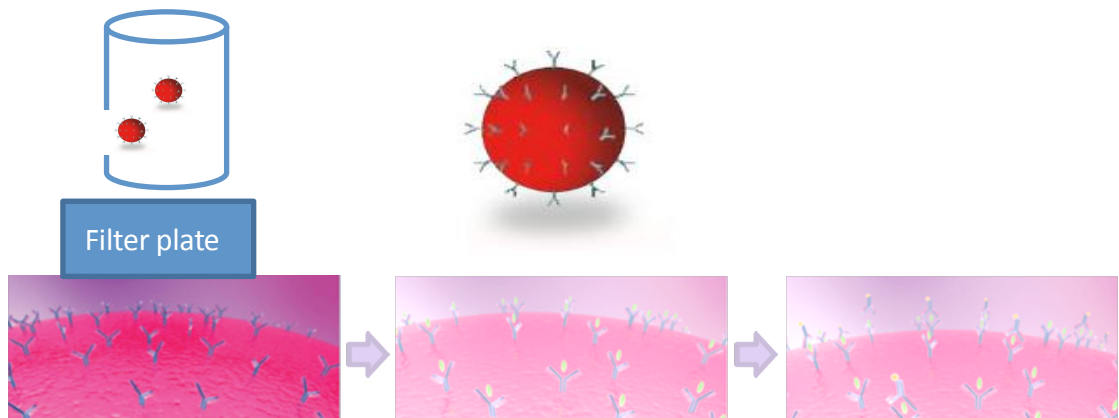
Έχοντας συλλέξει τα δείγματα (samples) που θέλουμε να αναλύσουμε, συνεχίζουμε την διαδικασία στο τρυβλίο με τα φίλτρα (filter plate), όπου ακολουθούμε τα εξής βήματα:

- Τοποθετούμε τα μικροσφαιρίδια στο τρυβλίο και αφαιρούμε το υγρό στο οποίο περιέχονται, ώστε να μείνουν μόνο τα μικροσφαιρίδια. [Εικόνα 16].

➡ Βάζουμε τα beads στο filter plate

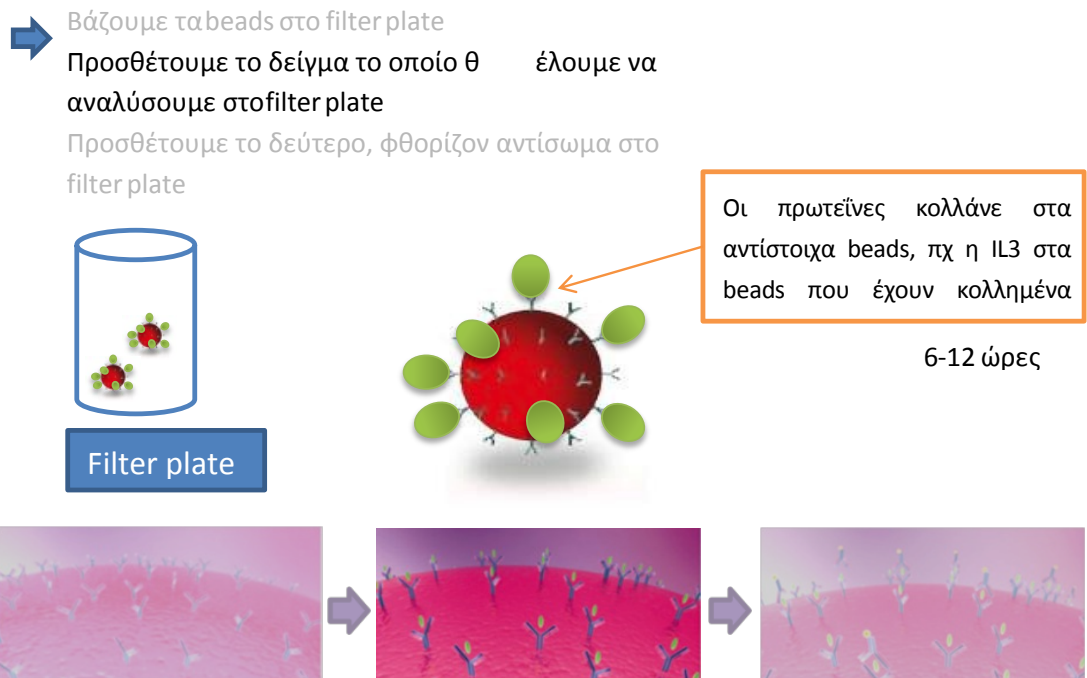
Προσθέτουμε το δείγμα το οποίο θέλουμε να αναλύσουμε στο filter plate

Προσθέτουμε το δεύτερο, φθορίζον αντίσωμα στο filter plate



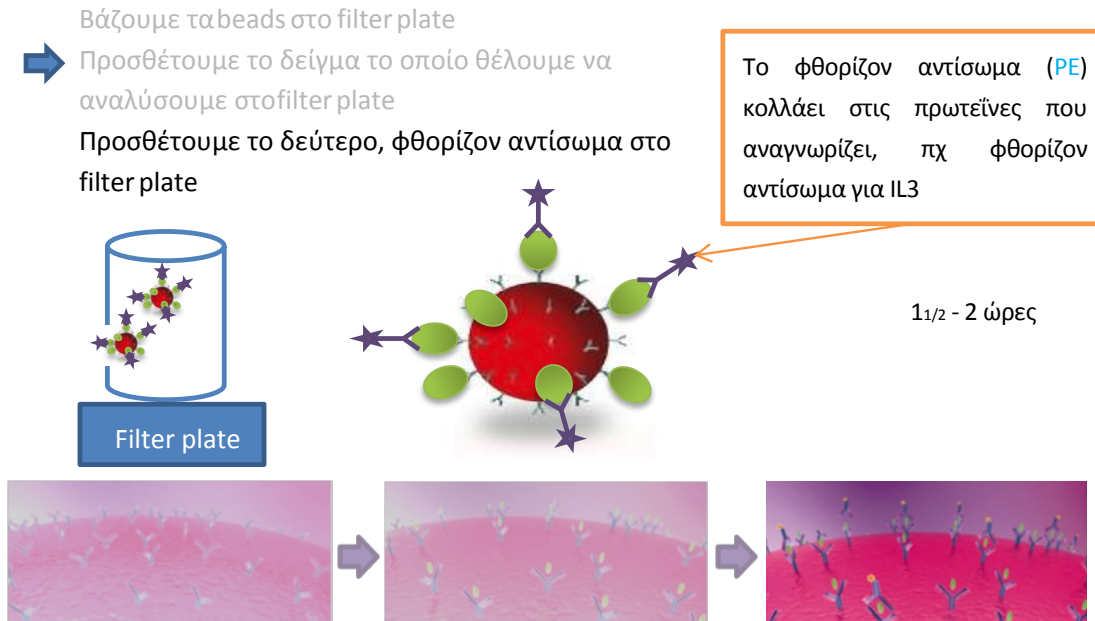
Εικόνα 16: Αναπαράσταση Προσθήκης Beads στα wells

- Προσθέτουμε τα δείγματα που έχουμε συλλέξει προηγουμένως από την καλλιέργεια των κυττάρων, το καθένα σε διαφορετικό βοθρίο. Ανακατεύουμε για τουλάχιστον 3 ώρες (αναλόγως με το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται σε κάθε εργαστήριο) τα μικροσφαιρίδια με τα δείγματα, ώστε να κολλήσει μεγάλο ποσοστό των πρωτεϊνών του δείγματος πάνω στα μικροσφαιρίδια [Εικόνα 17].



Εικόνα 17: Αναπαράσταση προσθήκης δείγματος

- Έπειτα, αδειάζουμε πάλι το υγρό από τα βοθρία, αφήνοντας μόνο τα σύμπλοκα που έχουν σχηματιστεί ως τώρα [φαίνονται στην Εικόνα 1618]. Προσθέτουμε το φθορίζον αντίσωμα και ανακατεύουμε πάλι το μείγμα.
- Τέλος, γίνεται η ανάλυση των συμπλόκων που δημιουργήθηκαν από ειδική συσκευή που χρησιμοποιεί την τεχνολογία xMAP της εταιρείας Luminex για τον τελικό υπολογισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στο διάλυμα.



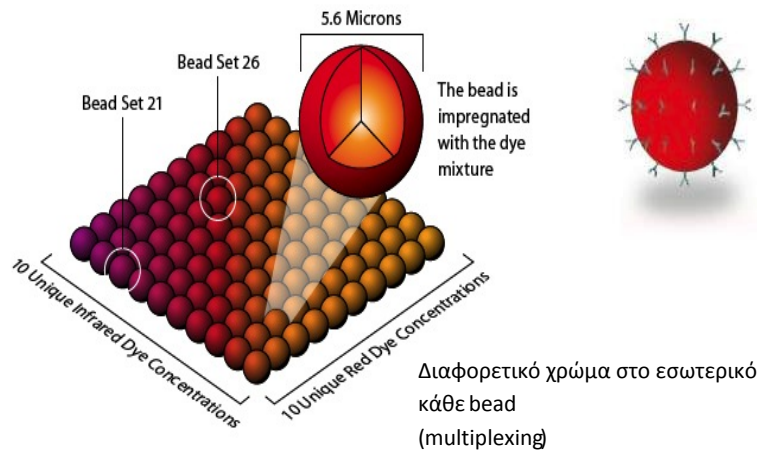
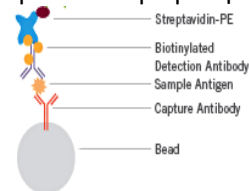
Εικόνα 18: Αναπαράσταση Προσθήκης PE

1.5.4 Τεχνολογία xMAP

Κάθε μικροσφαιρίδιο έχει στο εσωτερικό του μείγμα από δύο ουσίες, σε διαφορετική - χαρακτηριστική για το μικροσφαιρίδιο- συγκέντρωση. Παραδείγματος χάριν, το μικροσφαιρίδιο νούμερο 83 έχει 83% από την μία ουσία και 17% από την άλλη. Επίσης έχει αντισώματα για την πρωτεΐνη TWEAK, που είναι έτσι συνδεδεμένη με τον αριθμό 83 του μικροσφαιριδίου.

bead-based ELISA

TWEAK → 83
 IL3 → 48



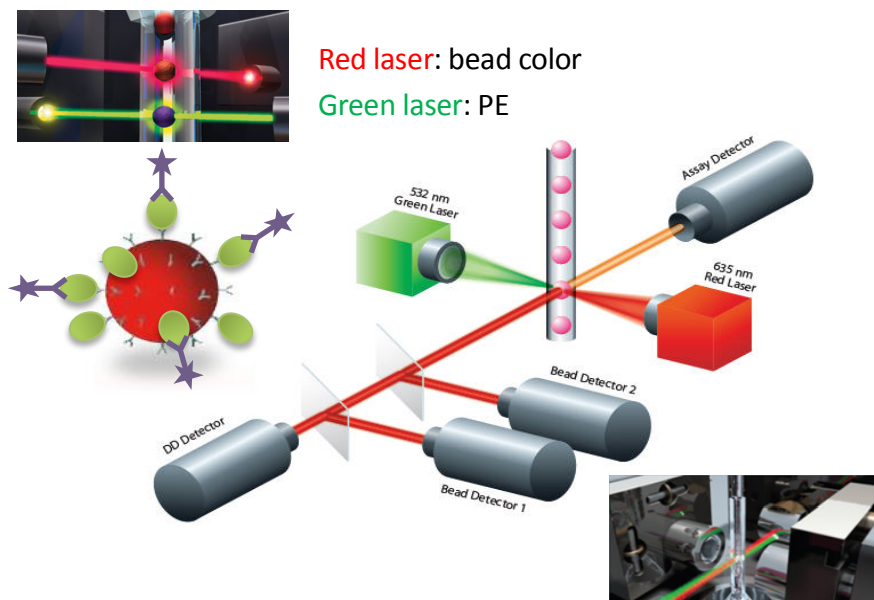
Εικόνα 19: Εσωτερική Διαμόρφωση Bead

Image copyrights: Luminex Inc

Αυτό γίνεται έτσι ώστε να μπορεί η ειδική συσκευή της Luminex που αναλύει τα μικροσφαιρίδια να αναγνωρίσει πιο νούμερο μικροσφαιριδίου περνάει από την βελόνα συλλογής του, σκανάροντας το με ένα laser που αναγνωρίζει ότι την περιεχόμενη σε αυτό ουσία (πχ ότι το μικροσφαιρίδιο που πέρασε είχε στο εσωτερικό του 83% από το ένα χρώμα και 17% από το άλλο). Έτσι θα «ξέρει» ότι το μικροσφαιρίδιο που μόλις πέρασε είχε πάνω του αντισώματα για την πρωτεΐνη TWEAK και έτσι μπορεί να έχουν κολλήσει πάνω του μόνο πρωτεΐνες TWEAK.

Ταυτόχρονα, την στιγμή που περνάει κάποιο μικροσφαιρίδιο από την βελόνα συλλογής, σκανάρεται και από ένα ακόμα laser, το οποίο αναγνωρίζει πόσο μεγάλη ποσότητα φθορίζουσας ουσίας υπάρχει στην επιφάνεια του μικροσφαιριδίου.

Στην [Εικόνα 20] βλέπουμε πώς λειτουργεί η συσκευή ανάλυσης των μικροσφαιριδίων.



Εικόνα 20: Συσκευή Ανάλυσης Μικροσφαιριδίων

Image copyrights: Luminex Inc

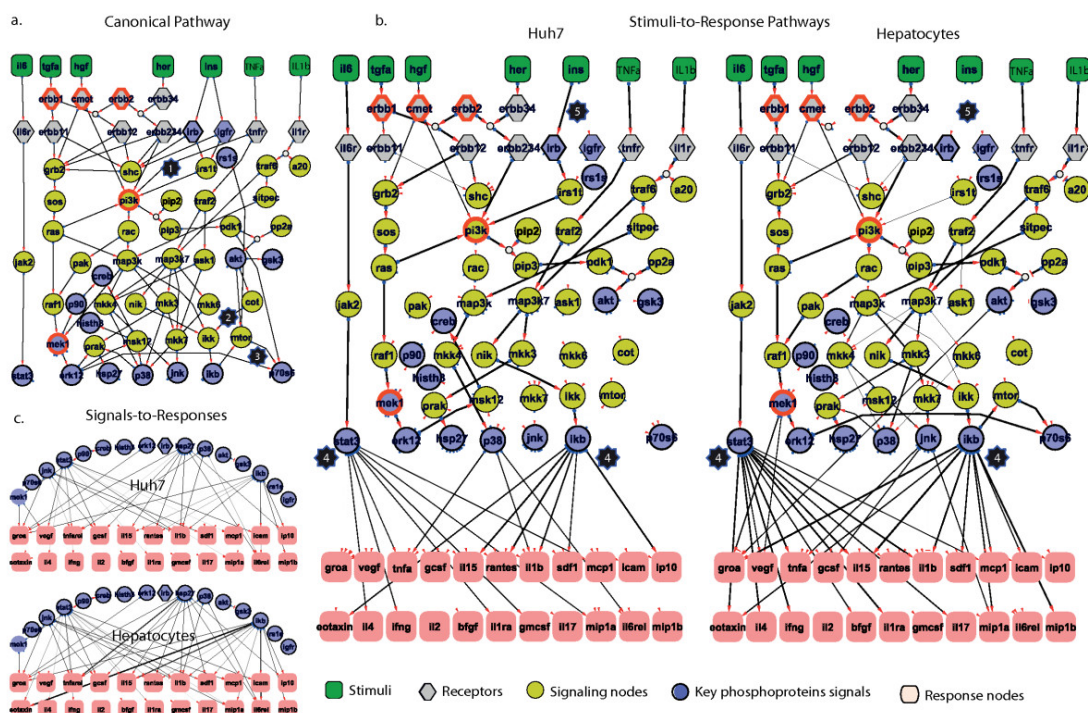
Η βελόνα αναρρόφησης «κατεβαίνει» μέσα σε κάθε βοθρίο του τρυβλίου και αναρροφά υγρό. Έτσι περνάνε από μέσα της τα μικροσφαιρίδια που περιέχει το υγρό, δηλαδή τα σύμπλοκα που έχουν σχηματιστεί πάνω στα μικροσφαιρίδια.

Το κόκκινο laser σκανάρει το χρώμα στο εσωτερικό κάθε μικροσφαιριδίου που περνάει, οπότε ξέρουμε ποιο μικροσφαιρίδιο πέρασε, και το πράσινο laser σκανάρει το πόσα φθορίζοντα αντισώματα έχουν κολλήσει πάνω σε κάθε μικροσφαιρίδιο. Έτσι ξέρουμε κάθε μικροσφαιρίδιο που περνάει, πόσες πρωτεΐνες κουβαλάει και ποιες.

Στη συνέχεια γίνεται ανάλυση στον υπολογιστή και τα δεδομένα εξέρχονται σε μορφή αρχείου csv.

1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ

Μετά από έρευνες που έχουν γίνει στο εργαστήριο μας [1] προκύπτει ότι τα καρκινικά ηπατικά κύτταρα, έχοντας διαφοροποιηθεί από τα κανονικά ηπατικά κύτταρα, “κρύβονται” από τον οργανισμό εκκρίνοντας λιγότερες κυτοκίνες [Εικόνα 21].



Εικόνα 21: Μονοπάτια για τα πρωτογενή μη καρκινικά ηπατοκύτταρα και τα καρκινικά ηπατοκύτταρα (Huh 7) α) Γενικό μονοπάτι που έχει προκύψει από τη βιβλιογραφία β) Huh 7 και μη καρκινικά ηπατοκύτταρα που εξάγονται από μία προσέγγιση που βασίζεται σε δεδομένα (πολυγραμμική παλινδρόμηση) γ) παρατεταμένα μονοπάτια για Huh7 και πρωτογενή ηπατοκύτταρα που κατασκευάζονται με την τοποθέτηση κανονικών και μη-κανονικών ακμών σε πειραματικά δεδομένα μέσω ενός σκευάσματος ILP.

Εκμεταλλευόμενοι το γεγονός ότι μπορούμε να αναγνωρίσουμε και να ποσοτικοποιήσουμε αυτές τις κυτταροκίνες θα προσπαθήσουμε να διαφοροποιήσουμε ξανά τα καρκινικά ηπατικά κύτταρα έτσι ώστε να αποκτήσουν το φαινότυπο των κανονικών ηπατικών κυττάρων, κρίνοντας το φαινότυπο από το προφίλ των κυτταροκινών που εκκρίνονται σε κάθε περίπτωση.

Ταυτόχρονα, θα θέλαμε να δούμε πως συνδέεται η παραγωγή των συγκεκριμένων κυτταροκινών με την ενεργοποίηση συγκεκριμένων ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών (φωσφοπρωτεϊνών).

Για να το πετύχουμε αυτό, θα χρησιμοποιήσουμε διάφορες ουσίες – ενεργοποιητές σαν ερεθίσματα, γνωστές από τη βιβλιογραφία να προκαλούν κυτταρική διαφοροποίηση, και

θα μετρήσουμε την απόκριση των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών για να συγκρίνουμε τα μονοπάτια των καρκινικών και μη καρκινικών ηπατικών κυττάρων.

2

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ

2.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΛΗΛΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ

Για να μπορέσουμε να πάρουμε τις κατάλληλες μετρήσεις από τα πειράματά μας, είναι απαραίτητη μια συγκέντρωση της τάξεως του 80 % των κυττάρων ανά well. Για το λόγο αυτό κρίθηκε απαραίτητη η διεξαγωγή ενός πειράματος για να βρεθεί η κατάλληλη αρχική συγκέντρωση για τα καρκινικά ηπατικά κύτταρα Huh7 έτσι ώστε την 7^η ημέρα που θα πραγματοποιηθεί η μέτρηση, να έχουμε περίπου 80% συγκέντρωση ανά well.

2.1.1 Ξεπάγωμα Κυττάρων και δημιουργία καλλιέργειας

Αρχικά αφαιρούμε τα κύτταρα από το υγρό άζωτο στο οποίο διατηρούνται στους – 190° C. Στη συνέχεια, ακολουθώντας το πρωτόκολλο του εργαστηρίου [Π1.1] για ξεπάγωμα κυττάρων, τα τοποθετούμε σε φιάσκες 75cm², όπως φαίνεται στην Εικόνα 22, μέσα σε ειδικό εκκολαπτήριο (incubator) που τους παρέχει θερμοκρασία 37° C, 5% CO₂ και 100% υγρασία για τουλάχιστον 24 ώρες. Μετά είναι διαθέσιμα για το επόμενο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας.



Εικόνα 22: Φιάσκα 75cm²

Η όλη διαδικασία λαμβάνει χώρα σε θάλαμο νηματικής ροής ο οποίος προστατεύει τα κύτταρα από ενδεχόμενη μόλυνση.

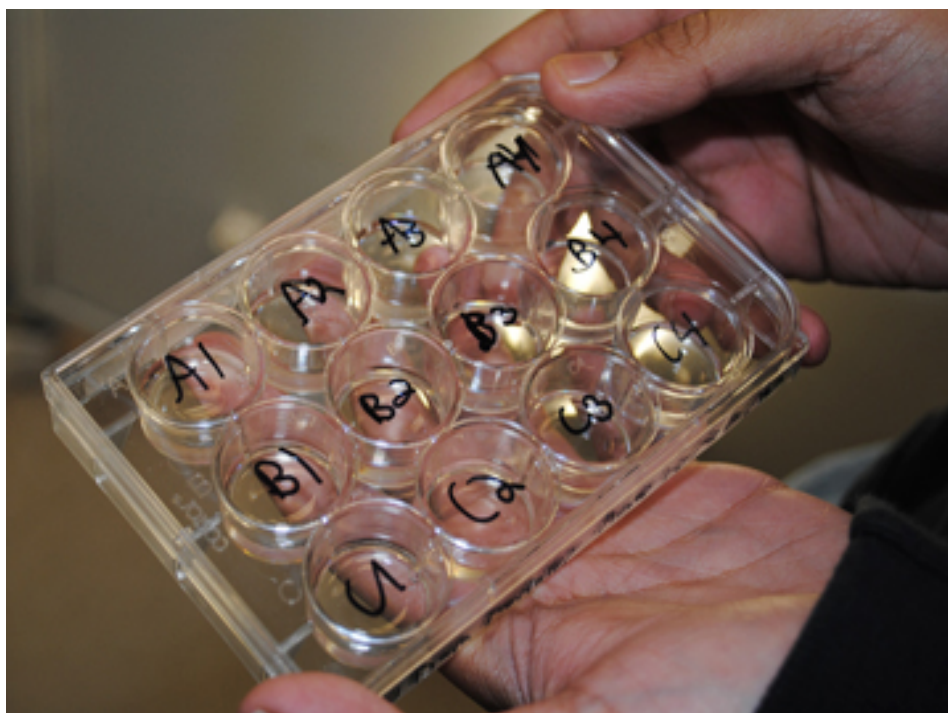
2.1.2 Τοποθέτηση και καλλιέργεια κυττάρων σε 12-well plate

Στη συνέχεια, αφού μεγάλωσε η κυτταρική καλλιέργεια, τα τοποθετήσαμε σε 12 well plate, όπως φαίνεται στην Εικόνα 23. Σε κάθε πηγαδάκι (well) χρησιμοποιήσαμε διαφορετική συγκέντρωση κυττάρων, όπως φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα:

	1	2	3	4
A	200000	100000	80000	60000
B	40000	30000	20000	15000
C	10000	8000	5000	2000

Πίνακας 1: Συγκεντρώσεις Κυττάρων [κύτταρα/well]

Στη συνέχεια τα αφήσαμε στον incubator για 7 ημέρες παρατηρώντας και καταγράφοντας καθημερινά την μεταβολή της συγκέντρωσης των κυττάρων.



Εικόνα 23: 12-well plate

2.1.3 Αποτελέσματα

Μετά από 7 ημέρες παραμονής στον incubator τα κύτταρα πολλαπλασιάστηκαν και ανάλογα με την αρχική τους συγκέντρωση πήραμε τα ακόλουθα αποτελέσματα:

- Τα κύτταρα που είχαν αρχική συγκέντρωση μεγαλύτερη από 100.000 κύτταρα/well ξεπέρασαν την επιθυμητή συγκέντρωση για τις συγκεκριμένες πλάκες και έφτασαν σε κορεσμό με αποτέλεσμα να έχουν ήδη μπει στην διαδικασία της απόπτωσης. Οι συγκεντρώσεις αυτές απορρίφθηκαν από το πείραμα.
- Τα κύτταρα που είχαν αρχική συγκέντρωση μικρότερη από 20.000 κύτταρα/well δεν έφτασαν την επιθυμητή συγκέντρωση για τις συγκεκριμένες πλάκες, γεγονός που σημαίνει ότι δεν υπήρχαν αρκετά κύτταρα ώστε να μπουν τα κύτταρα σε διαδικασία αναδιπλασιασμού. Οι συγκεντρώσεις αυτές απορρίφθηκαν από το πείραμα.
- Τελικά επιλέχθηκαν οι εξής συγκεντρώσεις, οι οποίες ικανοποιούσαν τους περιορισμούς μας:

1. 100.000 κύτταρα/well
2. 80.000 κύτταρα/well
3. 40.000 κύτταρα/well
4. 20.000 κύτταρα/well

2.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΚΑΤΑΛΛΗΛΩΝ ΕΡΕΘΙΣΜΑΤΩΝ

Στη συνέχεια έπρεπε να αποφασίσουμε ποιες δραστικές ουσίες - ενεργοποιητές (ερεθίσματα) θα χρησιμοποιήσουμε στο πείραμα μας. Κάποιοι ενεργοποιητές βοηθούν τα κύτταρα να μεγαλώσουν και να αναπτυχθούν πιο γρήγορα, ενώ κάποιοι άλλοι τα καθυστερούν ή ακόμα και τα σκοτώνουν. Έπρεπε επομένως να κάνουμε ένα πείραμα για να ελέγξουμε την συμπεριφορά αυτή των δραστικών ουσιών ως προς τα συγκεκριμένα καρκινικά κύτταρα καθώς και τις συγκεντρώσεις που βρήκαμε στο προηγούμενο πείραμα, μιας και ακόμα και η συγκέντρωση των κυττάρων παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην μετέπειτα συμπεριφορά και εξέλιξη τους.

2.2.1 Δραστικές ουσίες – ενεργοποιητές (ερεθίσματα)

Οι παρακάτω ουσίες, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αλλά και παλιότερα πειράματα του εργαστηρίου, ενεργοποιούν τα συγκεκριμένα καρκινικά κύτταρα (Huh 7) και δημιουργούν κάποιες αλλαγές στα σηματοδοτικά μονοπάτια τους, επομένως είναι πιθανόν να μπορούν να διαφοροποιήσουν και το φαινότυπο τους:

1. Tumor Necrosis Factor Alpha (TNFA)

Είναι μια κυτταροκίνη που εμπλέκεται στην συστημακή φλεγμονή και είναι μέλος μιας ομάδας κυτταροκινών που διεγείρουν την αντίδραση οξείας φάσης . Παράγεται κυρίως από ενεργοποιημένα μακροφάγα (M1) , αν και μπορεί να παραχθεί από πολλούς άλλους τύπους κυττάρων όπως τα λεμφοκύτταρα CD4 + , natural killer κύτταρα και νευρώνες. Ο πρωταρχικός ρόλος του TNF είναι στη ρύθμιση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος . Το TNF, είναι ένα ενδογενές πυρετογόνο και έτσι είναι ικανό να επάγει πυρετό, αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο , καχεξία, φλεγμονή και να αναστείλει την ογκογένεση και την αντιγραφή ενός ιού, όπως επίσης να ανταποκριθεί σε σήψη μέσω κυττάρων που παράγουν IL1 και IL6.

2. Interleukin-1 alpha (IL1A)

Είναι μια πρωτεΐνη της οικογένειας ιντερλευκινών-1 και κωδικοποιείται στον άνθρωπο από το γονίδιο IL1A. Σε γενικές γραμμές, η IL1A είναι υπεύθυνη για την παραγωγή της φλεγμονής, καθώς και την προώθηση του πυρετού και της σήψης. Αναστολείς για την IL1A αναπτύσσονται για να μπορέσουμε να διακόψουμε αυτές τις διαδικασίες και να θεραπεύσουμε διάφορες ασθένειες.

Η IL1A παράγεται κυρίως από ενεργοποιημένα μακροφάγα, καθώς και ουδετερόφιλα, επιθηλιακά κύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα. Έχει μεταβολικές, φυσιολογικές, αιμοποιητικές δραστηριότητες, και διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων. Δεσμεύεται με τον υποδοχέα της ιντερλευκίνης-1 και αφορά το μονοπάτι που ενεργοποιεί το TNFA.

3. Cholecalciferol (VITD3)

Είναι επίσης γνωστό ως toxiferol, και είναι μία μορφή βιταμίνης D, που ονομάζεται αλλιώς βιταμίνη D3. Είναι δομικά παρόμοια με τα στεροειδή όπως η τεστοστερόνη, χοληστερόλη, και κορτιζόλη, αν και η ίδια η βιταμίνη D3 είναι ένα σεκοστεροειδές.

4. Staurosporine (αντιβιοτικό AM-2282 ή STS ή STAUR)

Είναι ένα φυσικό προϊόν που αρχικά απομονώθηκε το 1977 από το βακτήριο *Streptomyces staurosporus*. Ήταν το πρώτο από πάνω από 50 αλκαλοειδή που απομονώθηκαν με αυτό το είδος της bis-indole χημική δομή.

Η χημική δομή της σταυροσπορίνης διαλευκάνθηκε από ανάλυση ακτίνων Χ μονού κρυστάλλου και η απόλυτη στερεοχημική διαμόρφωση με την ίδια μέθοδο, το 1994.

Η Staurosporine ανακαλύφθηκε να έχει βιολογικές δραστηριότητες που κυμαίνονται από αντι-μυκητιασική μέχρι αντι-υπερτασική. Το ενδιαφέρον στις δραστηριότητες αυτές κατέληξε σε μεγάλη ερευνητική προσπάθεια στη χημεία και τη βιολογία και την ανακάλυψη της δυνατότητας για αντι-καρκινική θεραπεία.

5. MEDIUM (DMEM)

Είναι μία παραλλαγή του EMEM, που ονομάζεται Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), (Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium). Το EMEM είναι ένα μέσο κυτταρικής καλλιέργειας που αναπτύχθηκε από τον Harry Eagle και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να διατηρήσει τα κύτταρα σε καλλιέργεια. Περιέχει: αμινοξέα, άλατα (χλωριούχο ασβέστιο, χλωριούχο κάλιο, θειικό μαγνήσιο, χλωριούχο νάτριο, και φωσφορικό μονονάτριο), γλυκόζη και βιταμίνες (φολικό οξύ, νικοτιναμίδιο, ριβοφλαβίνη, B12). Το DMEM περιέχει περίπου τέσσερις φορές περισσότερες βιταμίνες και αμινοξέα από το EMEM και δύο έως τέσσερις φορές γλυκόζη. Επιπλέον, περιέχει σίδηρο και ερυθρό φαινόλης. Το DMEM είναι κατάλληλο για τους περισσότερους τύπους κυττάρων.

- L-glutamine

Είναι ένα συστατικό που συνήθως προστίθεται στο DMEM και υποστηρίζει την ανάπτυξη των κυττάρων που έχουν υψηλές απαιτήσεις ενέργειας και συνθέτουν μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων. Είναι μια εναλλακτική πηγή ενέργειας για ταχέως διαιρούμενα κύτταρα και κύτταρα που χρησιμοποιούν τη γλυκόζη αναποτελεσματικά.

- Fetal bovine serum (FBS)

Είναι το κλάσμα αίματος που απομένει μετά την φυσική πήξη του αίματος, ακολουθούμενη από φυγοκέντρηση για να απομακρυνθούν οποιαδήποτε εναπομείναντα ερυθρά αιμοσφαίρια. Προέρχεται από το αίμα εμβρύων βοοειδών μέσω ενός κλειστού συστήματος συλλογής στο σφαγείο. Το FBS είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο συμπλήρωμα για την *in vitro* κυτταρική καλλιέργεια των ευκαρυωτικών κυττάρων. Αυτό οφείλεται στο ότι έχει πολύ

χαμηλό επίπεδο αντισωμάτων και περιέχει περισσότερους παράγοντες ανάπτυξης, επιτρέποντας ευελιξία σε πολλές διαφορετικές εφαρμογές κυτταρικής καλλιέργειας.

6. Betacellulin (BTC)

Είναι μια πρωτεΐνη που στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο BTC που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 4 στο locus 4q13-q21. Είναι ένα μέλος της οικογένειας αυξητικών παραγόντων EGF. Κατά κύριο λόγο συντίθεται ως ένας πρόδρομος στην κυτταρική μεμβράνη και στη συνέχεια υφίσταται επεξεργασία με πρωτεολυτικά γεγονότα για να γίνει ώριμο μόριο. Αυτή η πρωτεΐνη είναι ένα πρόσδεμα για τον υποδοχέα EGFR.

7. Transforming growth factor alpha (TGFA)

Είναι μια πρωτεΐνη που ρυθμίζεται αυξητικά σε ορισμένες ανθρώπινων καρκίνων. Παράγεται σε μακροφάγα, κύτταρα του εγκεφάλου και κερατινοκύτταρα και επάγει την επιθηλιακή ανάπτυξη. Είναι στενά συνδεδεμένη με το EGF, και μπορεί επίσης να συνδέεται με τον υποδοχέα EGFR με παρόμοια αποτελέσματα. Το TGFA διεγείρει πολλαπλασιασμό των νευρικών κυττάρων στον τραυματισμένο εγκέφαλο ενηλίκων. Το TGFA αναφέρθηκε στο NIH 2001 Stem Cell report προς το Κογκρέσο των ΗΠΑ ως ελπιδοφόρο στοιχείο για την ικανότητα των ενήλικων βλαστικών κυττάρων να αποκαθιστούν τη λειτουργία σε νευροεκφυλιστικές διαταραχές.

8. Sodium Chloride (NaCl)

Επίσης γνωστό ως άλας, κοινό αλάτι, επιτραπέζιο αλάτι, είναι μια ιοντική ένωση με τον τύπο NaCl, αντιπροσωπεύοντας ίσες αναλογίες νατρίου και χλωρίου. Το χλωριούχο νάτριο είναι το άλας που κυρίως ευθύνεται για την αλατότητα του εξωκυττάρου υγρού πολλών πολυκύτταρων οργανισμών.

9. Interferon gamma (IFN γ ή IFNG)

Είναι μια διμεριζόμενη διαλυτή κυτοκίνη που είναι το μόνο μέλος της κατηγορίας τύπου II των ιντερφερονών. Η ύπαρξη αυτής της ιντερφερόνης, η οποία στις αρχές της ιστορίας της ήταν γνωστή ως ανοσοϊντερφερόνη, αναγνωρίστηκε όταν ανθρώπινα λεμφοκύτταρα του αίματος ή περιτοναϊκά λεμφοκύτταρα ποντικού που λήφθηκαν από ευαισθητοποιημένα σε φυματίνη άτομα ενεργοποιήθηκαν με PPD και τα προκύπτοντα υπερκείμενα υγρά

φάνηκε να αναστέλλουν την ανάπτυξη του ιού της φυσαλιδώδους στοματίτιδας. Στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο IFNg.

10. DMSO

Είναι μια ένωση με τον τύπο $(CH_3)_2SO$. Αυτό το άχρωμο υγρό είναι ένας σημαντικός πολικός απρωτονικός διαλύτης που διαλύει πολικές και μη πολικές ενώσεις ενώ χρησιμοποιείται σαν διαλύτης για ένα ευρύ φάσμα οργανικών διαλυτών. Διαπερνά το δέρμα πολύ εύκολα και έχει την ασυνήθιστη ιδιότητα που πολλά άτομα αντιλαμβάνονται μία γεύση σκόρδου στο στόμα μετά την επαφή του DMSO με το δέρμα. Το καθαρό χημικό DMSO είναι άοσμο. Αν και έχει κάποιες εξειδικευμένες ιατρικές χρήσεις, έχει επίσης σημαντικές γνωστές παρενέργειες. Έχει συζητηθεί ως θεραπεία για τον καρκίνο και άλλες ασθένειες.

11. Retinoic Acid (RETAC)

Είναι ένας μεταβολίτης της βιταμίνης A (ρετινόλη) που ρυθμίζει τις λειτουργίες της βιταμίνης A που απαιτούνται για την ανάπτυξη. Το ρετινοϊκό οξύ απαιτείται σε όλα τα ανώτερα ζώα από τα ψάρια μέχρι των άνθρωπο. Κατά τη διάρκεια της πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης, το ρετινοϊκό οξύ που παράγεται σε μια συγκεκριμένη περιοχή του εμβρύου βοηθά να καθοριστεί θέση κατά μήκος του εμβρυϊκού πρόσθιου / οπίσθιου άξονα χρησιμεύοντας ως ένα ενδοκυτταρικό μόριο σηματοδότησης που καθοδηγεί την ανάπτυξη του οπίσθιου τμήματος του εμβρύου.

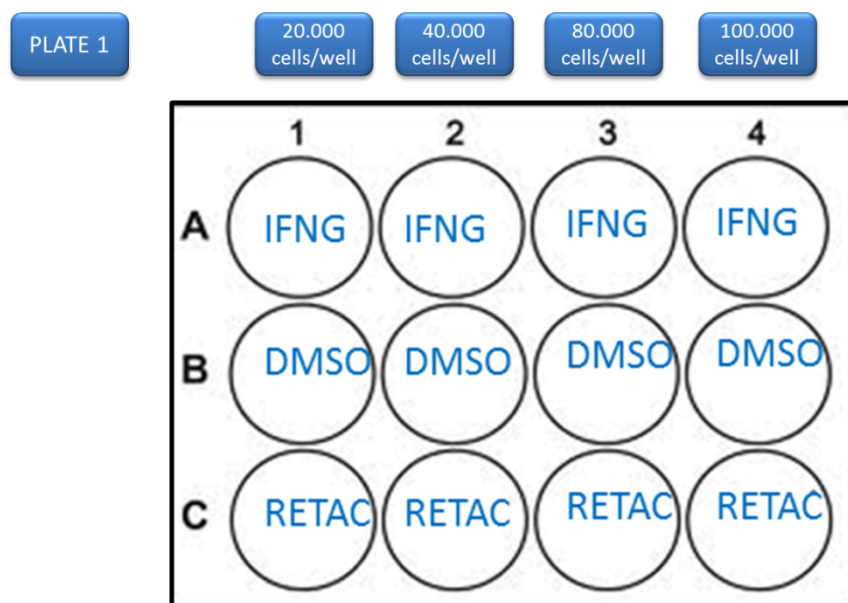
Ο βασικός ρόλος του ρετινοϊκού οξέος στην εμβρυϊκή ανάπτυξη προκαλεί υψηλή τερατογένεση που σχετίζεται με ρετινοειδή φαρμακευτικά προϊόντα, όπως η ισοτρετινοΐνη που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του καρκίνου και της ακμής.

12. TNF13 (Tumor necrosis factor ligand superfamily member 13 ή APRIL)

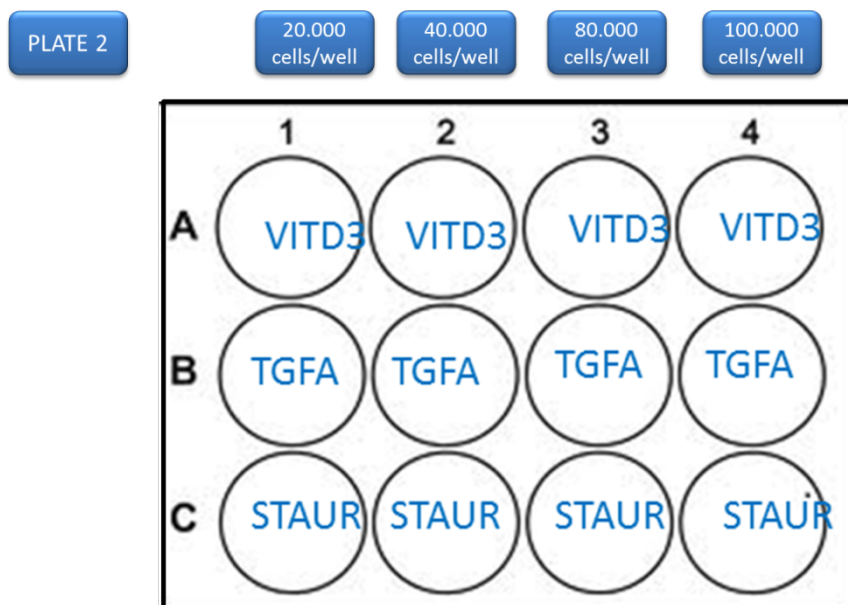
Είναι μια κυτταροκίνη που συνδέεται με TNFRSF13B/TACI και TNFRSF17/BCMA. Διαδραματίζει ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης του όγκου. Μπορεί να εμπλέκεται στη ρύθμιση ανοσολογικών διεργασιών μονοκυττάρων/μακροφάγων.

2.2.2 Τοποθέτηση και καλλιέργεια κυττάρων σε 12-well plate

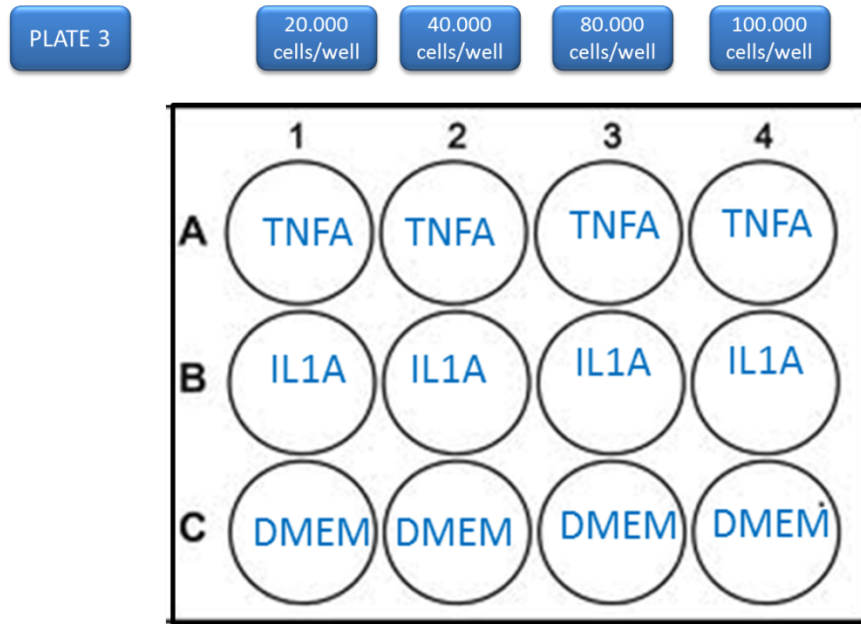
Αρχικά, τοποθετήσαμε σε 12 well plates τα κύτταρα. Σε κάθε στήλη του plate το κάθε πηγαδάκι (well) είχε διαφορετική συγκέντρωση κυττάρων, ακολουθώντας τα αποτελέσματα του προηγούμενου πειράματος, ενώ ανά γραμμή χρησιμοποιήσαμε διαφορετική δραστική ουσία – ενεργοποιητή, όπως φαίνεται στις ακόλουθες εικόνες :



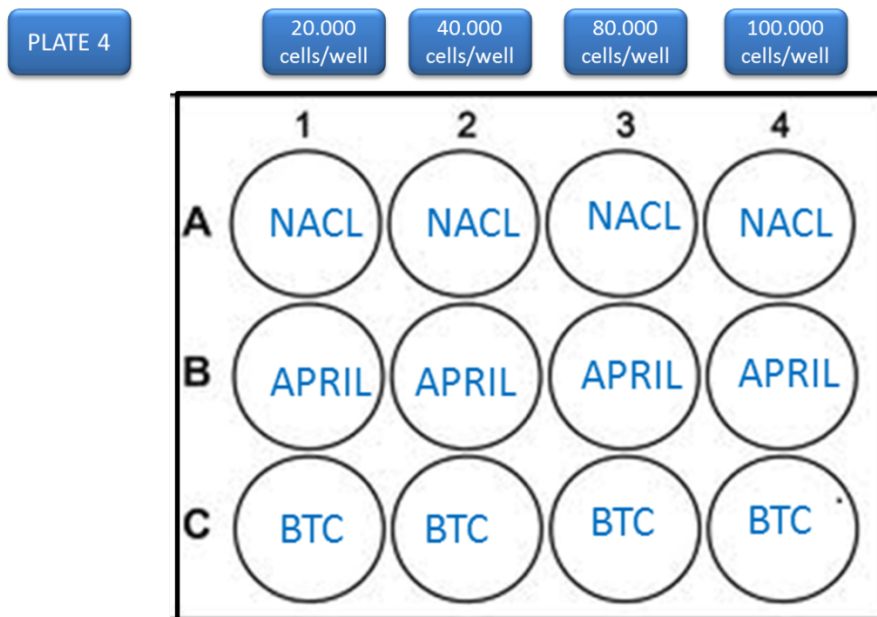
Εικόνα 24: Plate 1



Εικόνα 25: Plate 2



Εικόνα 26: Plate 3



Εικόνα 27: Plate 4

Στη συνέχεια τα αφήσαμε στον incubator για 5 ημέρες παρατηρώντας και καταγράφοντας καθημερινά την μεταβολή της συγκέντρωσης των κυττάρων καθώς και την γενική συμπεριφορά τους.

2.2.3 Αποτελέσματα

Μετά από 5 ημέρες παραμονής στον incubator παρατηρώντας τα κύτταρα στο μικροσκόπιο πήραμε τα ακόλουθα αποτελέσματα:

- Τα κύτταρα που είχαν σαν δραστική ουσία – ενεργοποιητή το staurosporine ήταν σε κάθε συγκέντρωση νεκρά. Από την πρώτη κιόλας μέρα παραμονής τους στον incubator τα κύτταρα που είχαν τοποθετηθεί σε μεγάλες συγκεντρώσεις ήταν νεκρά.
- Τα κύτταρα που είχαν σαν δραστική ουσία το Retinoic Acid είχαν αλλάξει την μορφολογία τους, καθώς είχαν διαφορετικό σχήμα από το αρχικό, σε κάθε συγκέντρωση.
- Τα κύτταρα που είχαν τοποθετηθεί με αρχική συγκέντρωση 100.000 κύτταρα/well την 5^η ημέρα είχαν ξεπεράσει την επιθυμητή και αποδεκτή συγκέντρωση της τάξεως του 80%, σχεδόν σε όλες τις δραστικές ουσίες – ενεργοποιητές. Το ίδιο ισχύει και για τα κύτταρα που είχαν τοποθετηθεί με αρχική συγκέντρωση 80.000 κύτταρα/well.

2.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΡΧΙΚΗΣ ΚΑΙ ΤΕΛΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΩΝ HUH 7 ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΕΡΕΘΙΣΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΕΠΙΛΕΧΘΗΚΑΝ

Για το τελικό πείραμα θα χρησιμοποιήσουμε τις συγκεντρώσεις που βρήκαμε από το πρώτο πείραμα καθώς και τις δραστικές ουσίες – ενεργοποιητές που βρήκαμε από το δεύτερο πείραμα.

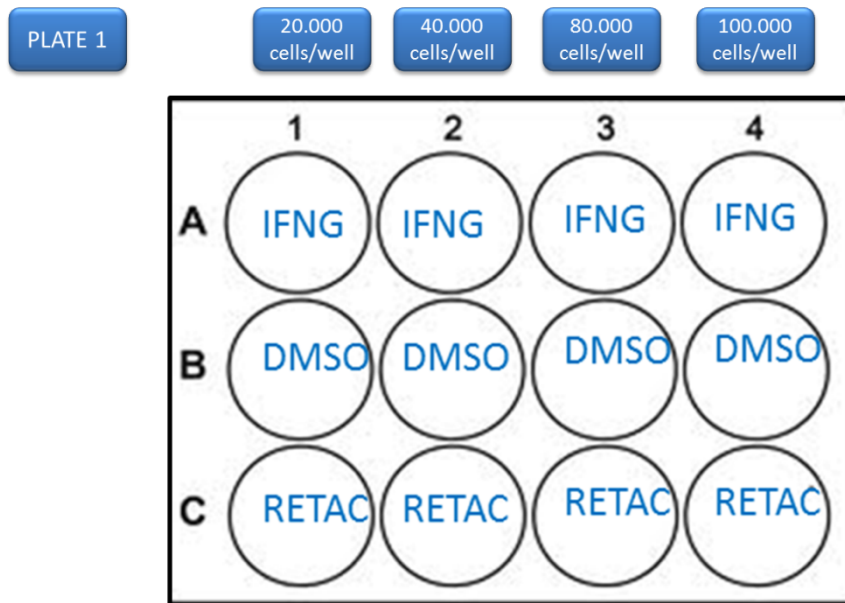
Ενδεικτικά, πήραμε και κάποιες φωτογραφίες από την ημέρα 1 (24 ώρες παραμονής των κυττάρων υπό την επίδραση της δραστικής ουσίας – ενεργοποιητή) και ημέρα 5 (120 ώρες παραμονής των κυττάρων υπό την επίδραση της δραστικής ουσίας – ενεργοποιητή) οι οποίες παραθέτονται στο παράρτημα.

2.3.1 Γενική περιγραφή πειραματικής διαδικασίας

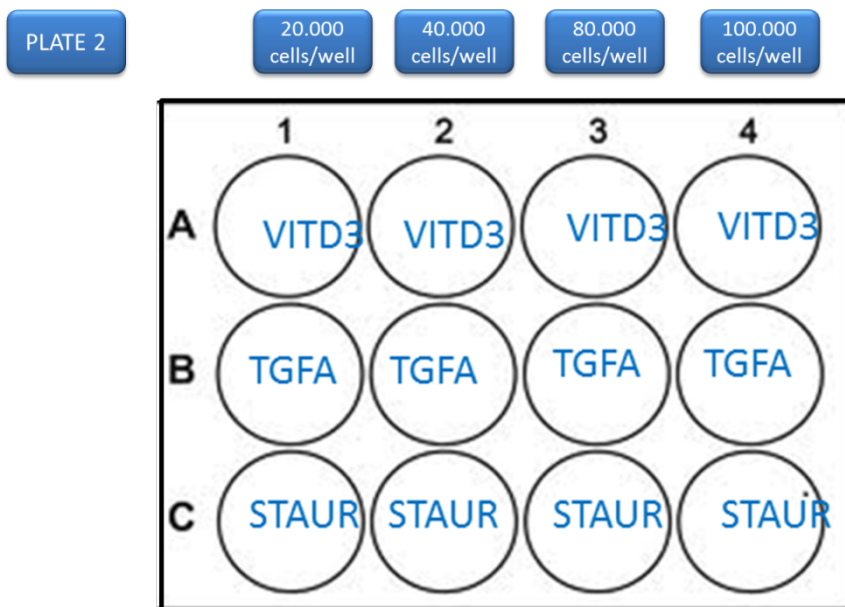
Τοποθετήσαμε τα κύτταρα της καρκινικής ηπατικής σειράς Huh 7 σε 4 plates και τα αφήσαμε για 24h στο θρεπτικό υλικό (medium).

Στη συνέχεια προσθέσαμε τις δραστικές ουσίες – ενεργοποιητές όπως φαίνεται παρακάτω:

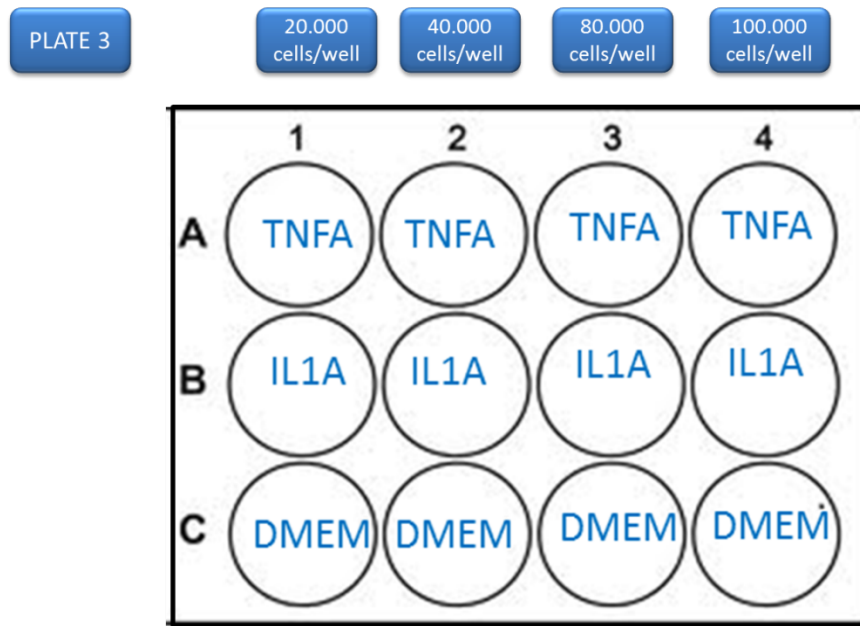
**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΡΧΙΚΗΣ ΚΑΙ ΤΕΛΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΩΝ ΗΥΗ
7 ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΕΡΕΘΙΣΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΕΠΙΛΕΧΘΗΚΑΝ 2.11**



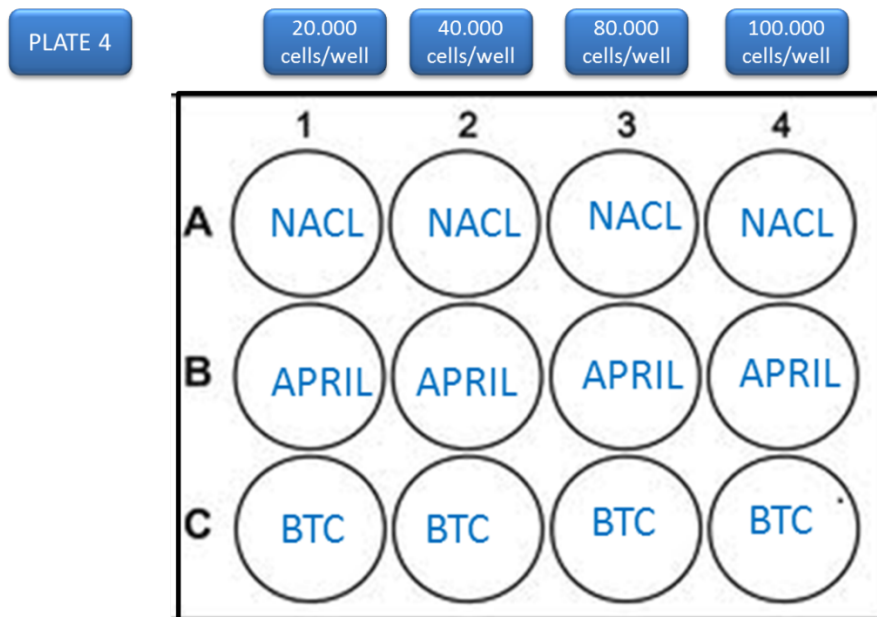
Εικόνα 28: Plate 1



Εικόνα 29: Plate 2



Εικόνα 30: Plate 3



Εικόνα 31: Plate 4

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΡΧΙΚΗΣ ΚΑΙ ΤΕΛΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΩΝ ΗΥΗ 7 ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΕΡΕΘΙΣΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΕΠΙΛΕΧΘΗΚΑΝ 2.13

Έπειτα, για τις επόμενες 5 ημέρες, αφαιρούσαμε μία μικρή ποσότητα υλικού από το κάθε well (της τάξεως του 0,1 % του συνολικού όγκου) και την συμπληρώναμε ξανά με νέο υλικό, έτσι ώστε να μην αλλάζουμε τις συνθήκες του πειράματος και να μπορούμε να τις θεωρήσουμε σταθερές (να θεωρήσουμε δηλαδή ότι το σύστημα βρίσκεται σε ισορροπία).

Μετά το πέρασμα 5 ημερών, αφαιρέσαμε τις δραστικές ουσίες ενεργοποιητές, και προσθέσαμε θρεπτικό υλικό (medium) στα κύτταρα, έτσι ώστε να μπορέσουμε να μετρήσουμε τις διαφορές σε σύγκριση με την αρχική τους κατάσταση, την ημέρα 0, καθώς τα κύτταρα αυτές τις μέρες βρίσκονταν στο ίδιο εξωτερικό περιβάλλον (μόνο medium) και επομένως οι πρωτεΐνες που ενέκριναν θα έπρεπε να είναι κοινές, σε περίπτωση που τα κύτταρα δεν έχουν διαφοροποιηθεί. Και σε αυτό το στάδιο αφαιρούσαμε την ίδια ποσότητα με τις προηγούμενες μέρες για να πραγματοποιήσουμε τις τελικές μας μετρήσεις (της τάξεως του 0,1 % του συνολικού όγκου).

Ένα συνοπτικό χρονοδιάγραμμα του πειράματος φαίνεται στον ακόλουθο Πίνακα 2 :

DAY 0	DAY 1	DAY 2	DAY 3	DAY 4	DAY 5	DAY 6	DAY 7
24h medium	24h treatment	48h treatment	72h treatment	96h treatment	120h treatment	24h medium	48h medium

Πίνακας 3: Χρονοδιάγραμμα τελικού πειράματος

Τέλος, πραγματοποιήσαμε ένα πείραμα E.L.I.S.A. , σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εργαστηρίου, για να μετρήσουμε την τελική απόκριση των πρωτεϊνών.

2.3.2 Αποτελέσματα

Μετά το πέρας των 7 ημερών, πραγματοποιήσαμε τις μετρήσεις στα δείγματα μας. Με βάση τα αποτελέσματα του δεύτερου πειράματος, πήραμε την απόφαση να κάνουμε τις μετρήσεις στα πηγαδάκια (wells) που είχαν αρχική συγκέντρωση 20.000 κύτταρα/well.

Για να ερμηνεύσουμε τα αποτελέσματα χρησιμοποιήσαμε το DataRail, το οποίο είναι ένα πρόγραμμα που παίρνει σαν "είσοδο" το αρχείο csv που μας δίνει το "luminex" και το επεξεργάζεται έτσι ώστε να βγάλει σαν έξοδο μια γραφική μορφή/διαγράμματα για να μπορέσει να γίνει πιο κατανοητή και εύκολη η κατανόηση και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Το DataRail είναι ένα ανοιχτό λογισμικό Toolbox της Matlab.

Στο DataRail, οι γραμμές στο σχήμα αντιστοιχούν στα μετρούμενα σήματα (φωσφοπρωτεΐνης ή κυταροκίνης), π.χ. akt , mek , erk κλπ. Ενώ οι στήλες αντιστοιχούν στα ερεθίσματα που διαταράσσουν τα κύτταρα. Κάθε "κουτάκι" σε αυτό το γράφημα αντιπροσωπεύει τη χρονική πορεία του σήματος από την μη διεγερμένη κατάσταση μέχρι και την τελική απόκριση.

Τα χρώματα σε κάθε αντίστοιχο "κουτάκι" του γραφήματος υποδηλώνουν τα εξής:
Στην περίπτωση 2 χρονικών στιγμών:



Εικόνα 32: Επεξήγηση Data Rail 2 χρονικές στιγμές

- Το χρώμα γεμίματος αντιστοιχεί στο επίπεδο της αλλαγής του σήματος (πριν και μετά από τη διέγερση).
- Μπλε συνεπάγεται η αλλαγή φορές είναι πάνω από 1,5.

$$\left(\frac{X_{stimulated}}{X_{unstimulated}} > 1.5 \right)$$

- Γκρι συνεπάγεται ότι η αλλαγή είναι 1.5 φορές παρακάτω.
- Όσο πιο σκούρο είναι το χρώμα τόσο μεγαλύτερη είναι η απόλυτη τιμή της μέτρησης.

Στην περίπτωση τριών χρονικών στιγμών:



Εικόνα 33: Επεξήγηση Data Rail για 3 χρονικές στιγμές

- **Transient:** το σήμα αυξάνεται και μετά μειώνεται
- **Sustained:** το σήμα αυξάνεται και παραμένει σταθερό
- **Late:** το σήμα είναι αρχικά σταθερό και στη συνέχεια αυξάνεται
- **No response:** καμία αλλαγή

Από τις μετρήσεις μας αυτές, μέσω του DataRail προέκυψαν τα εξής διαγράμματα, αρχικά για τις μεσοκυττάρια πρωτεΐνες ή κυτοκίνες (cytokines) [Εικόνες 34-36].

Και στη συνέχεια για τις ενδοκυττάρια πρωτεΐνες [Εικόνες 37-38] :