



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
& ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

*Τομέας Συστημάτων Μετάδοσης Πληροφορίας
& Τεχνολογίας Υλικών*

Διπλωματική Εργασία

Υπολογιστική και πειραματική μελέτη της αποδόμησης πολλαπλών δειγμάτων ανθρώπινου αρθρικού χόνδρου

Γκούμα Δ. Σαββίνη

*Επιβλέπων: Δρ. Λεωνίδας Αλεξόπουλος, Επ. Καθηγητής Ε.Μ.Π.
Συνεπιβλέπων: Δρ. Δημήτριος Τζεράνης*

Αθήνα, Οκτώβριος 2017



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
& ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

*Τομέας Συστημάτων Μετάδοσης Πληροφορίας
& Τεχνολογίας Υλικών*

Διπλωματική Εργασία

Υπολογιστική και πειραματική μελέτη της αποδόμησης πολλαπλών δειγμάτων ανθρώπινου αρθρικού χόνδρου

Γκούμα Δ. Σαββίνη

Επιβλέπων: Δρ. Λεωνίδας Αλεξόπουλος, Επ. Καθηγητής Ε.Μ.Π.
Συνεπιβλέπων: Δρ. Δημήτριος Τζεράνης

Εγκρίθηκε από την τριμελή επιτροπή την 24^η Οκτωβρίου 2017.

Λεωνίδας Αλεξόπουλος
Επ. Καθηγητής Ε.Μ.Π

Γιώργος Μασόπουλος
Αν. Καθηγητής Ε.Μ.Π

Δημήτριος-Διονύσιος
Κουτσούρης
Καθηγητής Ε.Μ.Π

.....
Γκούμα Δ. Σαββίνη

Διπλωματούχος Ηλεκτρολόγος Μηχανικός και Μηχανικός Υπολογιστών Ε.Μ.Π.

Copyright © Γκούμα Σαββίνη, 2017.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς τον συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εκπονήθηκε εξ ολοκλήρου στο Εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας της Σχολής Μηχανολόγων Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή κ. Λεωνίδα Αλεξόπουλου και του κ. Δημήτριου Τζεράνη (PhD).

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Αλεξόπουλο για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου εργασία στο Εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας, για την καθοδήγηση που μου προσέφερε, αλλά και για όλα τα μέσα που μου προσφέρθηκαν κατά την εκπόνηση της εργασίας μου. Είχα την δυνατότητα να εργαστώ ως μέλος μιας διεπιστημονικής ομάδας με μέλη καταρτισμένα σε διαφορετικούς τομείς και με ποικίλα ενδιαφέροντα, γεγονός που μου παρείχε γνώσεις και εμπειρία που ξεπερνά το πλαίσιο μιας διπλωματικής εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Δημήτριο Τζεράνη που ήταν συνεχώς διαθέσιμος παρέχοντας μου πολύτιμη καθοδήγηση, υποστήριξη και βοήθεια, σε κάθε βήμα και δυσκολία που αντιμετώπισα κατά την εκπόνηση αυτής της εργασίας. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δανάη Ζαρέιφη (MSc) για την διαρκή και υπομονετική συνδρομή της στην κατανόηση πολλών βιολογικών πειραματικών διαδικασιών και εννοιών. Η πειραματική αξιοποίηση της διάταξης HDD θα ήταν πολύ δυσκολότερη χωρίς την συμβολή του Ηλία Παναγιωτόπουλου (Διπλ. Μηχ. Μηχανικού, ΕΜΠ) ο οποίος ήταν πάντα διαθέσιμος για την επίλυση αποριών σχετικά με τον τρόπο λειτουργίας της. Επίσης ευχαριστώ τον Νεοκλή Βαϊνδηρλή (προπτυχιακό φοιτητή ΗΜΜΥ, ΕΜΠ) για την αναβάθμιση των ηλεκτρονικών της διάταξης, που διευκόλυνε σημαντικά την πειραματική διαδικασία, τον Asier Antoranz (MSc) για την βοήθειά του στην ολοκλήρωση της υπολογιστικής μελέτης και κάθε μέλος του εργαστηρίου ξεχωριστά για το υπέροχο καθημερινό κλίμα.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την μητέρα μου και τους φίλους μου, χωρίς την στήριξη των οποίων η εκπόνηση αυτής της διπλωματικής θα ήταν πολύ δυσκολότερη.

Περιεχόμενα

I. Εισαγωγή.....	11
1. Οι διαρθρώσεις.....	11
2. Ο αρθρικός χόνδρος.....	11
i. Λειτουργία	11
ii. Δομή.....	12
iii. Χονδροκύτταρα	13
iv. Φυσιολογία - Παθολογία - Οστεοαρθρίτιδα.....	14
v. Τροφοδοσία.....	15
3. Η άρθρωση του ισχίου.....	15
4. Αναβολικές και Καταβολικές Επιδράσεις στην Αποδόμηση Χόνδρου ...	16
5. Πειραματικές Μέθοδοι Μελέτης Αποδόμησης Χόνδρου.....	18
6. Στόχοι	21
II. Υπολογιστική Εκτίμηση Αναβολικών και Καταβολικών Επιδράσεων Κυτταροκινών στον Χόνδρο	22
1. Στόχος και Περιγραφή της Υπολογιστικής Ανάλυσης	22
2. Διαθέσιμα Πειραματικά Δεδομένα.....	23
3. Επεξεργασία Πειραματικών Δεδομένων	23
4. Υπολογιστικοί Αλγόριθμοι.....	25
i. Ο αλγόριθμος T-SNE.....	25

ii. Ο αλγόριθμος K-Means	26
iii. Μέθοδος Elbow	26
5. Αποτελέσματα	27
6. Συζήτηση αποτελεσμάτων	35
III. Πειραματική Διάταξη Μελέτης Αποδόμησης Χόνδρου.....	37
1. Στόχος της Διάταξης	37
2. Περιγραφή της Διάταξης	37
3. Προσθήκες και βελτιώσεις στην Διάταξη	41
i. Βάση έδρασης δειγμάτων.....	41
ii. Φορείς συμπίεσης	42
iii. Ηλεκτρονικό Κύκλωμα	43
4. Σύνοψη.....	49
IV. Πειραματική Μελέτη Αποδόμησης Χόνδρου	50
1. Πειραματική αξιολόγηση της διάταξης HDD	50
2. Προετοιμασία γέλης αγαρόζης.....	50
3. Προετοιμασία δειγμάτων	52
i. Κοπή και χαρακτηρισμός δειγμάτων χόνδρου	52
ii. Προετοιμασία δειγμάτων για την λήψη πειραματικών μετρήσεων	55
4. Στατιστική επεξεργασία μετρήσεων	61
5. Αποτελέσματα	61

i. Πειραματική αξιολόγηση διάταξης HDD.....	61
ii. Χαρακτηρισμός Δειγμάτων Χόνδρου	66
iii. Επίδραση Προσανατολισμού Δείγματος στην Αποδόμηση.....	69
iv. Μελέτη Επίδρασης Συγκέντρωσης Κολλαγενάσης.....	77
v. Μελέτη Επίδρασης Κυτταροκίνων	81
vi. Συμπεράσματα	84
V. Συμπεράσματα και μελλοντική εργασία	87
VI. Βιβλιογραφία	90
VII. Παράρτημα	93
1. Παράρτημα Α.....	93
i. Προετοιμασία διάταξης.....	93
ii. Προετοιμασία γέλης αγαρόζης.....	93
iii. Κοπή και προετοιμασία δειγμάτων	94
iv. Έναρξη πειράματος.....	95
v. Ολοκλήρωση πειράματος.....	96
2. Παράρτημα Β	97

Abstract

The articular cartilage is an avascular, elastic tissue that is located between the bones participating in joints. This unique tissue can distribute the load that is applied on the human body and facilitate the frictionless movement of the bones. Its repair is difficult, after degeneration has occurred, due to its avascular nature, making the reinstatement of its original mechanical properties almost impossible. The limited use of the joint, as well as the pain the patient experiences when the articular cartilage is damaged, makes the understanding of the degeneration mechanism of crucial importance.

This thesis presents the effect of cytokines and drugs on the degeneration of the human articular cartilage, using computational and experimental methods. At first, the computational analysis, labels 78 stimuli as anabolic, catabolic or control, based on the published phosphoproteomic and cytokine release data. The aim of this analysis, is to suggest cytokines that potentially have a significant effect on the regeneration/ deterioration equilibrium during cartilage degeneration.

The second part of this thesis examines the effect of the enzymic and catabolic cytokine treatment on the degradation of multiple cartilage samples and presents its experimental quantification. This experimental study exploits the High throughput Degradation Device (HDD), that was developed by I. Panagiotopoulos [13] in the Bioengineering and Systems Biology Lab of the NTUA (Department of Mechanical Engineering), by conducting mechanical indentation tests on cartilage samples, treated with various stimuli, in order to quantify their degradation. The instrument's precision, the biological error induced by the different mechanical properties of the tested samples and the device's ability to quantify the effect of different collagenase concentrations is also examined.

Finally, this thesis defines an experimental protocol, for studying the effect of the catabolic cytokines (IL1-a, IL1-b and TNF-a) on cartilage samples, harvested from human femoral heads. The described experimental methods can be used for studying the effects of cytokines and drugs on the degeneration and degradation of the articular cartilage.

Keywords: articular cartilage, femoral head, degradation, degeneration, high throughput, cytokines, collagenase, IL1-a, IL1-b , TNF-a

Περίληψη

Ο αρθρικός χόνδρος είναι ένας αναγγειακός, ελαστικός ιστός που συναντάται μεταξύ των οστών που συμμετέχουν στις αρθρώσεις. Οι μοναδικές του ιδιότητες επιτρέπουν την κατανομή των φορτίων που δέχεται το ανθρώπινο σώμα και καθιστούν δυνατή την χωρίς τριβή κίνηση των οστών. Η αναγγειακή φύση του, δυσχεραίνει την αναδόμησή του σε περίπτωση εκφυλισμού του, καθιστώντας την επαναφορά των αρχικών μηχανικών του ιδιοτήτων σχεδόν αδύνατη. Ο πόνος για τον ασθενή και η περιορισμένη λειτουργία της άρθρωσης, που συνεπάγεται η απώλεια των μηχανικών ιδιοτήτων του αρθρικού χόνδρου, καθιστούν αναγκαία την πλήρη κατανόηση του μηχανισμού μέσω του οποίου ο υγιής ιστός εκφυλίζεται.

Η παρούσα διπλωματική παρουσιάζει υπολογιστικές και πειραματικές μεθόδους για την μελέτη της επίδρασης κυτταροκινών και φαρμάκων στην αποδόμηση του ανθρώπινου χόνδρου. Το πρώτο μέρος παρουσιάζει υπολογιστική κατηγοριοποίηση 78 διεγερτών ως αναβολικών, καταβολικών ή ουδέτερων με βάση τα δημοσιευμένα δεδομένα πρωτεομικής που παρουσιάζουν την επίδραση των κυτταροκινών στην έκκριση πρωτεϊνών και στην απόκριση φωσφορυλίωσης συγκεκριμένων κινασών. Η μελέτη αυτή έχει ως στόχο να προτείνει κυτταροκίνες που δυνητικά έχουν σημαντική επίδραση στην ισορροπία σύνθεσης/αποδόμησης κατά τον εκφυλισμό του χόνδρου.

Το δεύτερο μέρος της εργασίας παρουσιάζει την πειραματική ποσοτικοποίηση της επίδρασης ενζύμων και καταβολικών κυτταροκινών στην αποδόμηση πολλαπλών δειγμάτων χόνδρου. Η πειραματική μελέτη αυτή εκμεταλλεύεται την ιδιοσυσκευή μέτρησης πολλαπλών δειγμάτων (HDD) που αναπτύχθηκε στο Εργαστήριο Εμβιομηχανικής & Συστηματικής Βιολογίας (Σχολή Μηχανολόγων Μηχανικών) του Ε.Μ.Π. από τον [Η. Παναγιωτόπουλο] [13], με σκοπό την ποσοτικοποίηση της αποδόμησης δειγμάτων αρθρικού χόνδρου, ασκώντας μηχανικές δοκιμές συμπίεσης υπό την επίδραση διαφορετικών διεγερτών (stimuli). Μελετάται η ακρίβεια μέτρησης του οργάνου, ο βιολογικός θόρυβος λόγω των διαφορετικών μηχανικών ιδιοτήτων των δειγμάτων χόνδρου, και η ικανότητα του οργάνου να ποσοτικοποιήσει την επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων κολλαγενάσης.

Τέλος παρουσιάζεται ένα πειραματικό πρωτόκολλο για την μελέτη της επίδρασης καταβολικών κυτταροκινών (IL1-a, IL1-b και TNF-a) σε δείγματα ανθρώπινου αρθρικού χόνδρου προερχόμενου από κεφαλές ισχίου. Οι πειραματικές μέθοδοι που αναπτύχθηκαν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την μελέτη των επιπτώσεων κυτταροκινών και φαρμάκων στην αποδόμηση και εκφύλιση χόνδρου.

Λέξεις κλειδιά: *αρθρικός χόνδρος, κεφαλή ισχίου, αποδόμηση, high throughput, κυτταροκίνες, κολλαγενάση, IL1-a, IL1-b, TNF-a*

I. Εισαγωγή

1. Οι διαρθρώσεις

Το ανθρώπινο σκελετικό σύστημα περιλαμβάνει τα οστά και τις αρθρώσεις. Ο σκελετός εξασφαλίζει προστασία και υποστήριξη στους μαλακούς ιστούς και σε συνδυασμό με το μυϊκό σύστημα παρέχει μορφή, σταθερότητα και κίνηση στο ανθρώπινο σώμα.

Για την κίνηση, είναι αναγκαία, μεταξύ άλλων, η ύπαρξη αρθρώσεων και διαρθρώσεων. Οι διαρθρώσεις αποτελούν το μεγαλύτερο τμήμα των αρθρώσεων του ανθρώπινου σώματος και επιτρέπουν στα συνδεδεμένα οστά να εκτελούν μία συγκεκριμένη κίνηση. Τέτοιες είναι οι άρθρωση του ισχίου, η άρθρωση του γονάτου, η άρθρωση της ποδοκνήμης κ.α. Τα τμήματα των οστών που συμμετέχουν στον σχηματισμό των αρθρώσεων καλύπτονται από ένα εξειδικευμένο είδος συνδετικού ιστού, τον αρθρικό χόνδρο.

2. Ο αρθρικός χόνδρος

i. Λειτουργία

Πρόκειται για έναν λεπτό, αδιαφανή, λείο, ελαστικό και αναγγειακό υμένα ο οποίος διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στη λειτουργία του ανθρώπινου μυοσκελετικού συστήματος, καθώς λόγω της θέσης του, μεταξύ των οστών, και της δομής του επιτρέπει την κατανομή του φορτίου, την αντίσταση σε συμπιεστικές δυνάμεις και μηχανικές καταπονήσεις και μαζί με το αρθρικό υγρό, την σχεδόν χωρίς τριβή κίνηση των οστών που συμμετέχουν στην άρθρωση.

ii. Δομή

Η δομή του αρθρικού χόνδρου αποτελείται από επιμέρους ζώνες: την επιφανειακή (superficial), την μεσαία (middle), την βαθιά (deep) και την ασβεστοποιημένη (calcified). Τα κύτταρα του χόνδρου διαφέρουν ως προς το σχήμα, το μέγεθος και την μεταβολική τους δραστηριότητα ανάλογα με την ζώνη στην οποία συναντώνται.

Η επιφανειακή ζώνη (surface zone) είναι η λεπτότερη (10%-20% του συνολικού πάχους του αρθρικού χόνδρου) και αποτελείται από πεπλατυσμένα, με δισκοειδές σχήμα, χονδροκύτταρα (flattened disk shaped chondrocytes) τα οποία περιβάλλει ένα συμπαγές δίκτυο λεπτών και καλά προσανατολισμένων ινών κολλαγόνου, παράλληλων μεταξύ τους αλλά και με την επιφάνεια του χόνδρου. Αυτή η δομή κυριαρχεί στην εξωκυττάρια μήτρα, η οποία έχει το μικρότερο ποσοστό αγκρεκάνων (aggrecan) σε σχέση με τις άλλες ζώνες. Η επιφανειακή ζώνη έχει την υψηλότερη αντοχή σε εκφυλισμό, γεγονός που της προσδίδει την δυνατότητα να κατανέμει τις διατμητικές (shear), εφελκυστικές (tensile) και συμπιεστικές δυνάμεις που εμφανίζονται κατά την κίνηση.

Η μεσαία ζώνη συναντάται μετά την επιφανειακή και καταλαμβάνει περίπου το 40%-60% του αρχικού πάχους του αρθρικού χόνδρου. Εδώ τα χονδροκύτταρα είναι σφαιρικά και περιβάλλονται από εξωκυττάρια μήτρα πλούσια σε πρωτεογλυκάνες. Οι ίνες κολλαγόνου έχουν μεγαλύτερη διάμετρο και ο προσανατολισμός τους είναι τυχαίος.

Η επόμενη ζώνη είναι η βαθιά (deep zone), η οποία καταλαμβάνει περίπου το 30% του αρχικού πάχους του αρθρικού χόνδρου. Πρόκειται για την ζώνη με την μικρότερη συγκέντρωση νερού και την μικρότερη πυκνότητα κυττάρων. Η εξωκυττάρια μήτρα είναι και

εδώ πλούσια σε πρωτεογλυκάνες, ενώ οι ελάχιστες ίνες κολλαγόνου έχουν την μεγαλύτερη διάμετρο και είναι τυχαία τοποθετημένες ως προς την επιφάνεια του αρθρικού χόνδρου.

Τέλος συναντάται η ασβεστοποιημένη ζώνη (calcified zone) στην οποία εντοπίζεται απουσία πρωτεογλυκάνων και ύπαρξη σφαιρικών χονδροκυττάρων. [6]

iii. Χονδροκύτταρα

Ο αρθρικός χόνδρος αποτελείται από έναν μικρό αριθμό εξειδικευμένων κυττάρων (μεγέθους ~20 μm), που ονομάζονται χονδροκύτταρα. Περίπου το 2% του συνολικού όγκου του αρθρικού χόνδρου ενός ενήλικα καταλαμβάνεται από κύτταρα, ενώ ο υπόλοιπος καλύπτεται από μία εκτεταμένη εξωκυττάρια μήτρα (ECM), την οποία συνθέτουν τα χονδροκύτταρα. Η εξωκυττάρια μήτρα αποτελείται κυρίως από νερό και μακρομόρια όπως τα διάφορα ισόμορφα κολλαγόνου -κυρίως τύπου II- και μεγάλα δίκτυα πρωτεογλυκάνων που περιέχουν γλυκοζαμινογλυκάνες (glycosaminoglycans, GAGs) όπως το υαλουρονικό οξύ (HA) και η χονδροϊτίνη (chondroitin sulfate) [1].

Γύρω από κάθε χονδροκύτταρο, συναντάται μία λεπτή (~2μm) [6] περικυττάρια μήτρα (PCM) που την ξεχωρίζει από την εξωκυττάρια (ECM) τόσο βιοχημικά όσο και εμβιομηχανικά [12]. Το χονδροκύτταρο και η περικυττάρια μήτρα που το περιβάλλει αποτελούν τη βασική βιολογική και δομική μονάδα του ενήλικου αρθρικού χόνδρου, τον χόνδρονα (chondron). Ο χόνδρονας έχει μεγαλύτερη διάμετρο και είναι ανθεκτικότερος, αλλά λιγότερο ελαστικός από τα χονδροκύτταρα.

Όταν ο χόνδρονας υφίσταται παραμόρφωση λόγω μηχανικής πίεσης η περικυττάρια μήτρα (PCM) παρουσιάζει απώλεια νερού, η οποία την βοηθά να προσαρμοστεί και

να μετριάσει το συμπιεστικό φορτίο, προστατεύοντας το χονδροκύτταρο. Φαίνεται λοιπόν ότι ο ρόλος της περικυττάριας μήτρας είναι και εμβιομηχανικής φύσης καθώς ενδυναμώνει και προστατεύει τα χονδροκύτταρα από την φθορά. Η ανθεκτικότητα της περικυττάριας μήτρας σε παραμορφώσεις (μέτρο ελαστικότητας 40-70 kPa) είναι πολύ μεγαλύτερη από εκείνη των χονδροκυττάρων (~0.6 kPa), αλλά ταυτόχρονα μία τάξη μεγέθους μικρότερη από εκείνη της εξωκυττάριας μήτρας του χόνδρου. Μαζί η εξωκυττάρια και η περικυττάρια μήτρα συνθέτουν το μοναδικό μικρομηχανικό περιβάλλον του χονδροκυττάρου που περιβάλλουν, μέσα στον ιστό.[12],[7],[10],[2]

Τα παραπάνω φανερώνουν ότι η μελέτη των μηχανικών ιδιοτήτων του υγιούς και του οστεοαρθρικού αρθρικού χόνδρου σε επίπεδο ιστού, είναι σημαντική για την κατανόηση τόσο της λειτουργίας όσο και του εκφυλισμού του.

iv. Φυσιολογία - Παθολογία - Οστεοαρθρίτιδα

Η λειτουργικότητα του υγιούς αρθρικού χόνδρου στηρίζεται στην δυναμική ισορροπία μεταξύ σύνθεσης και αποδόμησης της εξωκυττάριας μήτρας η οποία εξασφαλίζεται από τα χονδροκύτταρα. Η απώλεια αυτής της ισορροπίας οδηγεί στην φθορά και τη σταδιακή απώλεια αρθρικού ιστού.

Στην οστεοαρθρίτιδα ο μεταβολισμός των χονδροκυττάρων διαταράσσεται εξ αιτίας της αυξημένης απελευθέρωσης καταβολικών παραγόντων, όπως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs), οι κυτταροκίνες (cytokines) και οι αυξητικοί παράγοντες (growth factors). Η δυνατότητα των χονδροκυττάρων να δημιουργούν την εξωκυττάρια μήτρα σταδιακά παύει

να είναι επαρκής για την αναστολή της δράσης των καταβολικών παραγόντων, με αποτέλεσμα τη σταδιακή αποδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας, προκαλώντας τελικά απώλεια της λειτουργικότητας της άρθρωσης και πόνο.

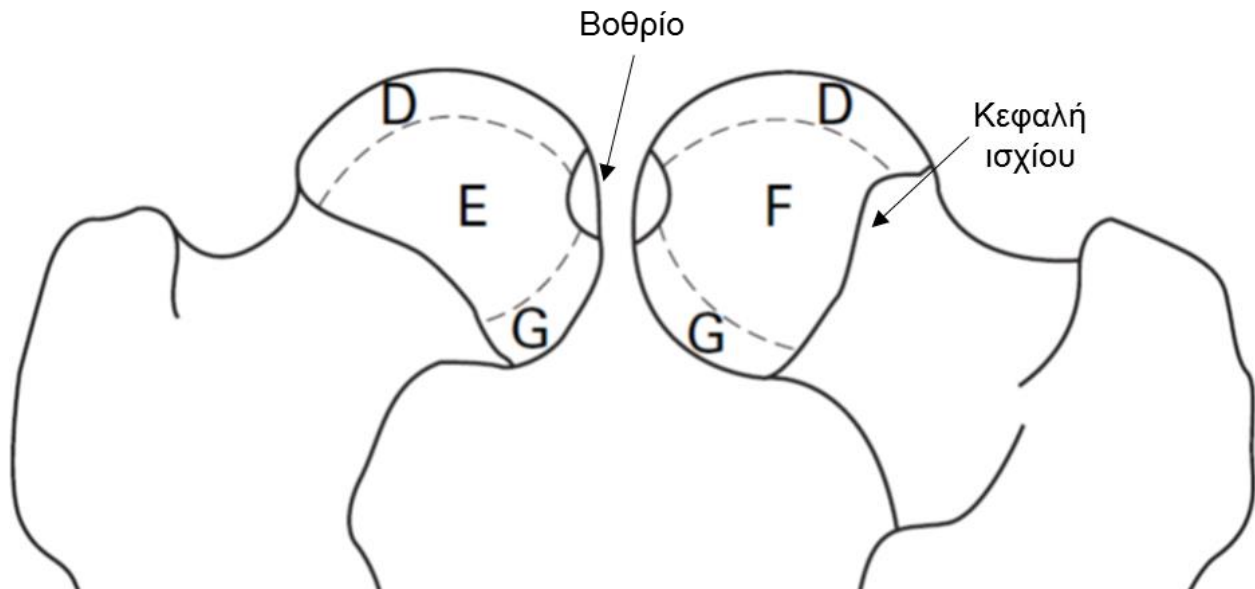
v. Τροφοδοσία

Μία από τις ξεχωριστές ιδιότητες του αρθρικού χόνδρου είναι ότι είναι αναγγειακός, χαρακτηρίζεται δηλαδή από απουσία αιμοφόρων και λεμφικών αγγείων, γεγονός που καθιστά την αναγεννητική του δυνατότητα μηδαμινή. Το αρθρικό υγρό που τον περιβάλλει, χρησιμεύει εκτός από λιπαντική ουσία κατά την κίνηση, και ως κύρια πηγή τροφοδοσίας του. Πρόκειται για ένα υπερδιηθημένο πλάσμα (plasma ultrafiltrate) που αποτελείται κυρίως από νερό και θρεπτικές ουσίες όπως είναι οι ηλεκτρολύτες, μικρά μόρια, γλυκόζη και απόβλητα του μεταβολισμού όπως το οξυγόνο και το διοξείδιο του άνθρακα. [6]

3. Η άρθρωση του ισχίου

Η μηριαία κεφαλή και η κοτύλη του ανώνυμου οστού σχηματίζουν την διάρθρωση που ονομάζεται άρθρωση του ισχίου. Πρόκειται για διάρθρωση που χρησιμεύει στην στήριξη του βάρους του ανθρώπινου σώματος, παρέχοντας σταθερότητα, γεγονός που περιορίζει την κινητικότητά της, επιτρέποντας κυκλικές κινήσεις γύρω από τον επιμήκη άξονα της άρθρωσης. Η κεφαλή του μηριαίου είναι σφαιρική καλύπτεται από αρθρικό χόνδρο (με μέσο πάχος ~1.35-2mm), ενώ στην έσω επιφάνειά της εμφανίζει ένα μη αρθρικό εντύπωμα (βοθρίο της κεφαλής) το οποίο χρησιμεύει στην πρόσφυση του συνδέσμου της κεφαλής.

Η σφαιρική κεφαλή μπορεί να χωριστεί σε τέσσερις επιμέρους περιοχές, την ανώτερη, την πρόσθια, την οπίσθια και την κατώτερη οι οποίες είναι ανομοιογενείς ως προς την μέση τιμή και την τυπική απόκλιση του πάχους του αρθρικού χόνδρου. (Εικόνα I-1) [9]



Εικόνα I-1. Διάγραμμα διαφορετικών περιοχών της κεφαλής ισχίου [9]

4. Αναβολικές και Καταβολικές Επιδράσεις στην Αποδόμηση Χόνδρου

Η διατήρηση της ισορροπίας των αναβολικών και καταβολικών λειτουργιών των χονδροκυττάρων, είναι ζωτικής σημασίας για την φυσιολογία του χόνδρου. Η διατάραξη αυτής της ισορροπίας, εκτός από εξωγενείς παράγοντες όπως είναι η μηχανική καταπόνηση ή η ενζυμική κατεργασία, οφείλεται και στην ίδια την δραστηριότητα των χονδροκυττάρων.

Η παρουσία πρωτεϊνών στο περιβάλλον των χονδροκυττάρων, μπορεί να ενεργοποιεί είτε την δυνατότητά τους να συνθέσουν εξωκυττάρια μήτρα (ECM), ώστε να διατηρείται η λειτουργικότητα του ιστού, είτε φλεγμονώδη απόκριση οδηγώντας στον εκφυλισμό και την αποδόμησή του χόνδρου. Η μελέτη των σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούνται στα χονδροκύτταρα κατά την παρουσία συγκεκριμένων κυτταροκινών, δίνει χρήσιμα συμπεράσματα για τον ρόλο που διαδραματίζουν οι πρωτεΐνες αυτές στην παθολογία του ιστού.[5]

Έχει διαπιστωθεί ότι τα χονδροκύτταρα, που απομονώθηκαν από δείγματα ιστού από ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα, παράγουν νιτρικό οξύ, IL1-b, TNF-a, IL6 και IL8. Η IL1-b και το TNF, φαίνεται ότι είναι καθοριστικές για τον εκφυλισμό του χόνδρου, καθώς μπορούν να σηματοδοτήσουν την δική τους παραγωγή, αλλά και την παραγωγή άλλων κυτταροκινών, από τα χονδροκύτταρα, όπως η IL6, IL8, LIF και διάφορες προτεάσες.

Στο αρθρικό υγρό και στον χόνδρο ασθενών που πάσχουν από οστεοαρθρίτιδα παρατηρείται αύξηση του ενζύμου (IL1-b-converting enzyme ICE/caspase 1), που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της IL1-b αλλά και των επιφανειακών υποδοχέων (cell-surface receptors) της IL1 (IL1-a/IL1-b) (IL1-R) που είναι υπεύθυνοι για την «επικοινωνία» της με το κύτταρο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη ευαισθησία του ιστού στις κυτταροκίνες αυτές και στις καταβολικές συνέπειες που έχουν.

Η κυτταροκίνη TNF-a φαίνεται να είναι επίσης ένας σημαντικός ρυθμιστής της εμφάνισης φλεγμονής στην αρθρική μεμβράνη, με έναν από τους υποδοχείς που το δεσμεύουν να είναι αυξημένος στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα, ενώ η αυξημένη παρουσία του έχει συνδεθεί και με την εμφάνιση πόνου στον ασθενή. [21]

Άλλες κυτταροκίνες που προάγουν την φλεγμονή και φαίνονται υπερεκφρασμένες σε οστεοαρθρικούς ιστούς είναι οι IL-8, LIF, IL-6, IL-11, and IL- 17, αποτελώντας για το λόγο αυτό, παράγοντες που ενδεχομένως συμβάλλουν στην παθολογία του χόνδρου. Παρ' όλα αυτά, δύο από αυτές οι IL11 και IL6 έχουν εμφανίσει και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. [32]

Έχει τέλος διαπιστωθεί ότι η παρουσία ορισμένων κατασταλτικών για τη φλεγμονή κυτταροκινών (IL-4, IL-10 και IL-13), έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της έκφρασης των IL1-β, TNF-α και MMPs και την αύξηση των ανταγωνιστών των υποδοχέων (receptors) της IL1 και των MMPs. [29]

Η αναγνώριση του ρόλου των κυτταροκινών στην οστεοαρθρίτιδα, μέσω του τρόπου με τον οποίο ενεργοποιούν τα σηματοδοτικά μονοπάτια των χονδροκυττάρων, στρέφει το ενδιαφέρον στην πραγματοποίηση μηχανικών δοκιμών σε δείγματα που έχουν υποστεί πρωτεϊνική κατεργασία ώστε να διαπιστωθεί ο τρόπος με τον οποίο συμμετέχουν στην αποδόμηση των δειγμάτων ιστού

5. Πειραματικές Μέθοδοι Μελέτης Αποδόμησης Χόνδρου

Η λειτουργικότητα του αρθρικού χόνδρου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την παρουσία του κολλαγόνου τύπου II και των αγκρεκάνων (aggrecans) του ιστού. Η σύγκριση υγιών και οστεοαρθρικών δειγμάτων, ως προς το ποσοστό του κολλαγόνου, των GAGs και του νερού που περιέχουν, φανερώνει ιστολογικές αλλαγές που σχετίζονται με την παθολογία του. [22]

Η εξάρτηση των μηχανικών ιδιοτήτων του αρθρικού χόνδρου από τη σύσταση του ιστού και τις δομικές του πρωτεΐνες καθιστά την μελέτη της εμβιομηχανικής του χόνδρου σημαντική για την κατανόηση του μηχανισμού αποδόμησής του. Για το σκοπό αυτό μηχανικές δοκιμές εξετάζουν τόσο την επίδραση της ενζυμικής κατεργασίας (enzymic treatments) των δειγμάτων, όσο και την απόκριση τους σε κυτταροκίνες και φαρμακολογικούς παράγοντες.

Οι πιο συνηθισμένες μηχανικές δοκιμές σε δείγματα χόνδρου είναι τρεις. Στην ανεμπόδιση συμπίεση (unconfined compression) ασκείται τάση ή παραμόρφωση στην επιφάνεια, με κάθετη διεύθυνση στο δείγμα. Ο συμπιεζόμενος ιστός μπορεί να διασταλεί ακτινικά και υπάρχει απώλεια υγρού από την πλευρική του επιφάνεια. Στην περιορισμένη συμπίεση (confined compression) η τάση ή παραμόρφωση ασκείται από μία πορώδη επιφάνεια, ενώ το δείγμα βρίσκεται σε θάλαμο με αδιαπέραστα τοιχώματα. Η διαρροή του υγρού γίνεται μόνο μέσα από την πορώδη επιφάνεια και η ακτινική διαστολή περιορίζεται. Τέλος, κατά την δοκιμή επιφανειακής διεύθυνσης (indentation test) χρησιμοποιείται φορέας συμπίεσης, η σφαιρική ή επίπεδη επιφάνεια του οποίου ασκεί πίεση στο δείγμα. Ο ιστός διαστέλλεται αφού οι επιφάνειες του δεν συγκρατούνται, ενώ το υγρό ρέει με αξονική και ακτινική διεύθυνση. [14]

Η πραγματοποίηση μηχανικών δοκιμών για την μελέτη της αποδόμησης του χόνδρου, μετά από αγωγή του ιστού με ένζυμα, κυτταροκίνες ή φαρμακολογικούς παράγοντες που επηρεάζουν την φυσιολογία του, μπορεί να προσφέρει χρήσιμα συμπεράσματα για την παθολογία του ιστού.

Η αξιολόγηση των μηχανικών ιδιοτήτων του χόνδρου γίνεται με την χρήση διατάξεων μέτρησης, οι οποίες διαφέρουν ως προς τις μηχανικές δοκιμές που ασκούν αλλά και

ως προς το πλήθος των δειγμάτων που μπορούν να εξετάσουν κάθε φορά. Ενδεικτικά αναφέρονται ορισμένες από αυτές.

Η BOSE ElectroForce 3100 είναι μία εμπορική διάταξη της εταιρείας BOSE, κατάλληλη για την μελέτη της μηχανικής συμπεριφοράς των ιστών. Προσφέρει την δυνατότητα άσκησης στατικού ή δυναμικού φορτίου (μέγιστης τιμής 22N) μέσω του ιντέντορα που διαθέτει. Η κίνηση του ελέγχεται μέσω γραφικού περιβάλλοντος με την βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή. Το δείγμα που εξετάζεται κάθε φορά εναποτίθεται σε μεταλλικό έλασμα, τοποθετημένο σε δυναμοκυψέλη [14]. Μια ακόμα διάταξη, ελεγχόμενη από ηλεκτρονικό υπολογιστή, κατάλληλη για μέτρηση 6 δειγμάτων χόνδρου κατασκευάστηκε [Steinmeyer 1997] [15] για την άσκηση διάφορων δυναμικών προφίλ φορτίου, με τη χρήση εμβόλων. Οι [Frank et al. 2000] [16] κατασκεύασαν διάταξη που έχει την δυνατότητα να ασκεί συμπιεστικές και διατμητικές καταπονήσεις σε 12 δείγματα χόνδρου. Οι [Aufderheide & Athanasiou 2006] [17] χρησιμοποίησαν συσκευή που ασκούσε ταυτόχρονα μηχανικό φορτίο σε 45 δείγματα χόνδρου για 4 ημέρες. Οι [Lujan et al., 2011] [18] [Salvetti et al. 2012] [19] σχεδίασαν διάταξη συμπίεσης, με αισθητήρες δύναμης, ώστε να μελετήσουν την αποδόμηση και την απόκριση δύναμης 12 δειγμάτων, σε πραγματικό χρόνο. Η διάταξη των [Cassino et al] [23] προσφέρει την δυνατότητα ταυτόχρονης μελέτης των μηχανικών ιδιοτήτων 20 δειγμάτων ιστού έως 8mm και μπορεί να εφαρμόζει ημιτονοειδείς, τραπεζοειδείς ή στατικές κυματομορφές. Τέλος οι [Mohanraj et al. 2014] [20] κατασκεύασαν ένα όργανο γύρω από μία εμπορική διάταξη μηχανικών δοκιμών, το οποίο μπορεί να ποσοτικοποιήσει την σκληρότητα έως 48 δειγμάτων με την χρήση αισθητήρων δύναμης.

6. Στόχοι

Η παρούσα εργασία έχει ως στόχο την μελέτη της αποδόμησης δειγμάτων αρθρικού χόνδρου υπό την επίδραση κυτταροκινών με ισχυρή αναβολική ή καταβολική δράση. Αρχικά πραγματοποιήθηκε κατηγοριοποίηση των κυτταροκινών με βάση την επίδρασή τους στον ιστό σύμφωνα με πειραματικά δεδομένα που παρουσιάστηκαν σε μια παλαιότερη μελέτη [5] και στη συνέχεια ποσοτικοποιήθηκε η επίδραση γνωστών προτεινόμενων καταβολικών κυτταροκινών σε δείγματα ιστού ανθρώπινου αρθρικού χόνδρου, με τη χρήση της συσκευής HDD (High throughput Degradation Device).

Για τους σκοπούς της εργασίας, αναπτύχθηκε μία υπολογιστική μέθοδος, για τον εντοπισμό κυτταροκινών που πιθανώς είναι σημαντικές για την εμφάνιση και εξέλιξη της οστεοαρθρίτιδας και μία πειραματική μέθοδος αξιολόγησης της επίδρασης της κατεργασίας πολλαπλών δειγμάτων ανθρώπινου αρθρικού χόνδρου με ένζυμα ή κυτταροκίνες. Η αξιοποίηση των μεθόδων που αναπτύχθηκαν στην παρούσα εργασία μπορεί να συμβάλει στην ποσοτικοποίηση της αποδόμησης του χόνδρου, στην αποκάλυψη του ρόλου νέων κυτταροκινών, ορμονών, μικρών μορίων ή συνδυασμών τους στην αποδόμηση του ιστού και τελικά στην μελέτη και ανακάλυψη φαρμακολογικών παραγόντων που δυνητικά μπορούν να εφαρμοστούν για να αναστείλουν τον εκφυλισμό του χόνδρου.

II. Υπολογιστική Εκτίμηση Αναβολικών και Καταβολικών Επιδράσεων Κυτταροκινών στον Χόνδρο

1. Στόχος και Περιγραφή της Υπολογιστικής Ανάλυσης

Έχει παρατηρηθεί ότι ορισμένες κυτταροκίνες, δρουν ως διεγέρτες του χόνδρου με αναβολική ή καταβολική δράση, επιδρώντας στην εξέλιξη της οστεοαρθρίτιδας.

Σκοπός της συγκεκριμένης υπολογιστικής ανάλυσης είναι αρχικά ο εντοπισμός του προφίλ αυτών των «πρωταγωνιστών», δηλαδή του βαθμού υπερέκφρασης ή υποέκφρασης συγκεκριμένων πρωτεϊνών κατά την παρουσία τους, και στη συνέχεια ο εντοπισμός άλλων κυτταροκινών που ενδεχομένως να συνδέονται με την οστεοαρθρίτιδα. Στα επόμενα κεφάλαια, θα μελετηθεί πειραματικά η επίδρασή τους στην παθολογία του χόνδρου.

Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκε το προφίλ πολλών κυτταροκινών, μετά από ανάλυση δεδομένων φωσφοπρωτεομικής απόκρισης σε διεγέρσεις κυτταροκινών και δεδομένων έκκρισης κυτταροκινών. Στη συνέχεια, ελέγχθηκε ο βαθμός ομοιότητάς τους με εκείνον των «πρωταγωνιστών», μέσω ενός αλγόριθμου εντοπισμού ομοιότητας. Τελικά οι κυτταροκίνες κατατάχθηκαν σε 3 κατηγορίες (αναβολικές, καταβολικές και control), οι οποίες αντιστοιχούν στην πρόβλεψη της συγκεκριμένης ανάλυσης σχετικά με την δράση τους, με βάση τα αποτελέσματα της ομαδοποίησης (clustering) κατάλληλου αλγορίθμου.

2. Διαθέσιμα Πειραματικά Δεδομένα

Για την παρούσα υπολογιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα από την πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε από τον [Melas et al.] [5]. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν τα αποτελέσματα μέτρησης του βαθμού ενεργοποίησης 72 πρωτεϊνών, μετά από κατεργασία πρωτογενών χονδροκυττάρων με 78 διεγέρτες.

Μεταξύ των διεγερτών που εξετάζονται βρίσκονται τόσο εκείνοι που είναι γνωστό ότι σχετίζονται με την παθοφυσιολογία της οστεοαρθρίτιδας (IL1-b, TNF, EGF, TGFA, INS, IGF1, IL6) όσο και μοριακοί συνδέτες (ligands) που είναι γνωστό ότι προάγουν την φλεγμονή σε άλλους τύπους κυττάρων. Η ενεργοποίηση των μετρούμενων πρωτεϊνών, οδήγησε από την μία στην επικύρωση των ήδη γνωστών διεγερτών, που συνδέονται με την φλεγμονή και την παθολογία του χόνδρου, και από την άλλη, στην ανάδειξη νέων, οι οποίοι φαίνεται να ενεργοποιούν κυτταρικούς μηχανισμούς που διαταράσσουν την φυσιολογική λειτουργία των χονδροκυττάρων.

3. Επεξεργασία Πειραματικών Δεδομένων

Τρεις από τους διεγέρτες (stimuli) οι IL1-a, IL1-b και TNF-a θεωρήθηκε εξ αρχής ότι προάγουν την εμφάνιση της οστεοαρθρίτιδας, προκαλώντας καταστροφή της εξωκυττάριας μήτρας (ECM), και χαρακτηρίστηκαν «καταβολικοί», ενώ δύο ακόμα, τα FGF-2 και TGF-b, θεωρήθηκε ότι έχουν ανασταλτικό ρόλο, προκαλώντας σύνθεση της ECM, και χαρακτηρίστηκαν «αναβολικοί». Ο ρόλος των υπόλοιπων 73 διεγερτών (stimuli), θεωρήθηκε αρχικά «άγνωστος».

Στη συνέχεια ελέγχθηκε αν όσοι διεγέρτες (stimuli) ανήκουν σε αυτήν την άγνωστη κατηγορία μπορούν να χαρακτηριστούν ως αναβολικοί, καταβολικοί ή ως παράγοντες που δεν εμπλέκονται με την οστεοαρθρίτιδα. Η διάκριση αυτή έγινε με βάση την ομοιότητα των κυτταροκινών που επάγουν και των φωσφοπρωτεϊνών που ενεργοποιούν, με αυτές που ενεργοποιούνται κατά την παρουσία κάποιου από τους 5 ήδη χαρακτηρισμένους διεγέρτες ή κατά την απουσία διεγέρτη (control).

Για το σκοπό αυτό αναλύθηκαν τα δεδομένα της μέτρησης των 17 φωσφοπρωτεϊνών (Μέθοδος A) και των 55 κυτταροκινών (Μέθοδος B) ξεχωριστά, αλλά και η ένωση αυτών (Μέθοδος C= Μέθοδος A U Μέθοδος B). Προέκυψαν τρεις πίνακες δεδομένων (79x17), (79x55) και (79x72), των οποίων οι στήλες αντιστοιχούν στις μετρήσεις των Μεθόδων A, B, C μετά από διέγερση των κυττάρων με καθέναν από τους 78 διεγέρτες (stimuli) και στις αντίστοιχες μετρήσεις μη διεγερμένων κυττάρων (untreated), ως control.

Οι μετρήσεις αυτές κανονικοποιήθηκαν ώστε να είναι συγκρίσιμες μεταξύ τους χρησιμοποιώντας το z-score

$$zscore = \frac{x_{i,j} - m_j}{\sigma_j}$$

όπου $x_{i,j}$: η μέτρηση, m_j : η μέση τιμή για κάθε πρωτεΐνη και σ_j : η τυπική απόκλιση για κάθε πρωτεΐνη. Αυτή η μέθοδος κανονικοποίησης επιλέχθηκε γιατί εκφράζει αντικειμενικά τόσο την υπερέκφραση όσο και την υποέκφραση των μετρούμενων πρωτεϊνών.

Οι διαστάσεις των κανονικοποιημένων πινάκων μειώθηκαν με την χρήση του αλγορίθμου t-SNE [25], για καθεμία από τις 3 μεθόδους, και μπορούσαν πλέον να οπτικοποιηθούν σε ένα δισδιάστατο διάγραμμα διασποράς (scatter plot). (Εικόνα II-1) Για την κατηγοριοποίηση (clustering) των δεδομένων επιλέχθηκε ο αλγόριθμος k-means, ο ο-

ποίος προϋποθέτει ότι το πλήθος των κατηγοριών (clusters) είναι γνωστό εξ αρχής. Επιλέχθηκε $k=3$, που συνεπάγεται την ύπαρξη 3 κατηγοριών, ως βέλτιστο για τα συγκεκριμένα δεδομένα, όπως προέκυψε από την χρήση της μεθόδου elbow, για καθεμία από τις τρεις εξεταζόμενες μεθόδους (A,B,C). (Εικόνα II-2) Το γεγονός αυτό, επιβεβαίωσε την αρχική εκτίμηση, ότι οι διεγέρτες μπορεί να θεωρηθεί είτε ότι προάγουν την οστεοαρθρίτιδα, είτε ότι την καταστέλλουν, είτε ότι δεν παίζουν κάποιο ρόλο στην εξέλιξή της. Οι τρεις διεγέρτες οι οποίοι είχαν χαρακτηριστεί «καταβολικοί», οι 2 οι οποίοι είχαν χαρακτηριστεί «αναβολικοί» και το «control» τοποθετήθηκαν στο κέντρο (centroid) της αντίστοιχης κατηγορίας.

Τελικά οι 78 διεγέρτες κατηγοριοποιήθηκαν για κάθε μέθοδο, σε 3 ομάδες με βάση τα μετρούμενα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης.

4. Υπολογιστικοί Αλγόριθμοι

i. Ο αλγόριθμος T-SNE

Ο αλγόριθμος t-SNE (t-distributed Stochastic Neighbor Embedding) επιτρέπει την ομοιόμορφη οπτικοποίηση της ομοιότητας των δεδομένων, αποκαλύπτοντας ταυτόχρονα πληροφορίες για το σύνολό τους. Πρόκειται λοιπόν για αλγόριθμο που αναπτύχθηκε για τη διευκόλυνση της οπτικοποίησης πολυδιάστατων φύλλων δεδομένων στις δύο ή τρεις διαστάσεις, επιτυγχάνοντας την όσο το δυνατόν ακριβέστερη αποτύπωση της πολυδιάστατης πληροφορίας σε ένα δισδιάστατο (2D) ή τρισδιάστατο (3D) διάγραμμα διασποράς (scatter plot). Η ομοιότητα των δεδομένων υπολογίζεται συγκρίνοντας τις Ευκλείδειες α-

ποστάσεις τους ανά ζεύγη και όσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα ομοιότητας ενός σημείου δεδομένων με κάποιο άλλο, τόσο πιθανότερο είναι να το επιλέξει ως γείτονά του.

[24]

ii. Ο αλγόριθμος K-Means

Σκοπός του clustering είναι η κατηγοριοποίηση ενός συνόλου δεδομένων σε ομάδες (clusters). Τα στοιχεία που ανήκουν σε μία ομάδα έχουν μεγάλη ομοιότητα μεταξύ τους και μικρότερη ομοιότητα με τα στοιχεία που ανήκουν στις άλλες ομάδες. Ο k-means κατατάσσει τα δεδομένα σε έναν προκαθορισμένο από τον χρήστη πλήθος k ομάδων. Ο αλγόριθμος ομαδοποιεί τα δεδομένα γύρω από k κέντρα (centroids) χρησιμοποιώντας την Ευκλείδεια απόσταση, με επαναληπτικές μεθόδους.

Η υλοποίηση του αλγορίθμου στην γλώσσα R επιτρέπει την αρχικοποίηση της παραμέτρου k είτε ως ακέραιο αριθμό, είτε ως πίνακα με πλήθος στηλών ίδιο με αυτό του πίνακα των δεδομένων. Η πρώτη περίπτωση οδηγεί σε τυχαία επιλογή των αρχικών κέντρων κάθε cluster από τον αλγόριθμο, ενώ η δεύτερη επιτρέπει στον χρήστη την επιλογή τους. [26]

iii. Μέθοδος Elbow

Η επιλογή του πλήθους των ομάδων στις οποίες θα ομαδοποιηθούν τα δεδομένα είναι σημαντική για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από την εφαρμογή του αλγορίθμου k-means.

Η elbow method εξετάζει την ανομοιογένεια των στοιχείων κάθε ομάδας, συναρτήσει του πλήθους των ομάδων. Ως μέτρο ανομοιογένειας χρησιμοποιείται το άθροισμα των

τετραγώνων ανά ομάδα, το οποίο μειώνεται καθώς αυξάνεται το πλήθος τους (N). Η τιμή του N, στην οποία παρατηρείται ότι ο ρυθμός μείωσης της ανομοιογένειας των στοιχείων ανά ομάδα αρχίζει να σταθεροποιείται, μπορεί να θεωρηθεί ως η βέλτιστη επιλογή του πλήθους των clusters που θα χρησιμοποιηθούν κατά την εφαρμογή του k-means.

5. Αποτελέσματα

Κανονικοποίηση

Στον *Πίνακα II-1* και στον *Πίνακα II-2* παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μέτρησης φωσφοπρωτεομικής απόκρισης και απόκρισης έκκρισης κυτταροκινών μετά την των [Melas et al.] [5] κανονικοποίησή τους χρησιμοποιώντας το z_{score} . Οι γραμμές αντιστοιχούν στους 79 διεγέρτες ενώ οι στήλες στις μετρούμενες φωσφοπρωτεΐνες ή κυτταροκίνες.

Ομαδοποίηση (clustering)

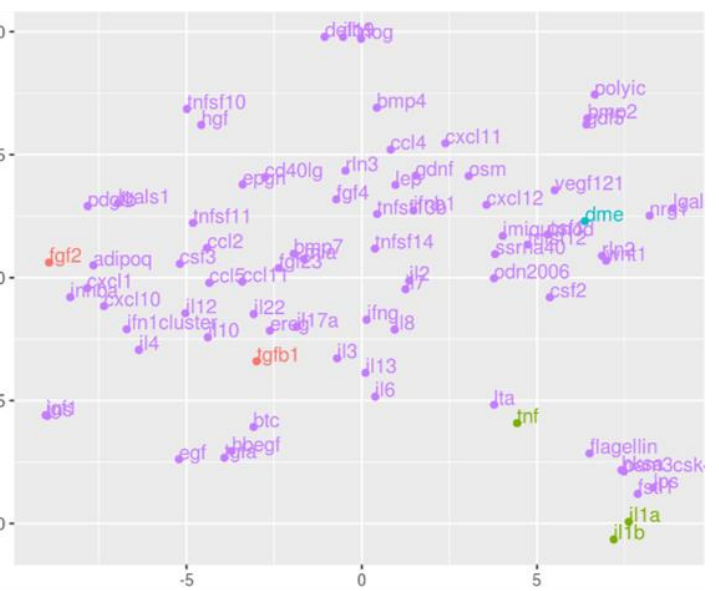
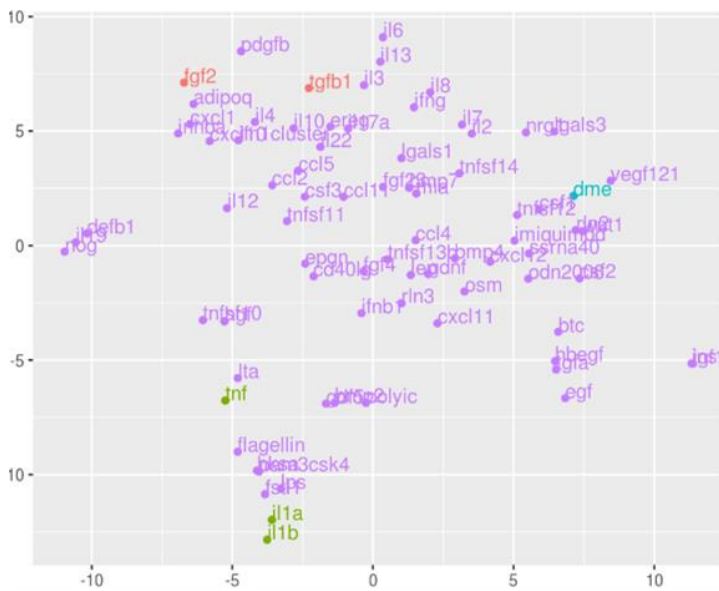
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ομαδοποίηση των δεδομένων των τριών μεθόδων παρουσιάζονται στον *Πίνακα II-3*. Μετά την εξαγωγή τους συναληθεύτηκαν (*Εικόνα II-3*) και επιλέχθηκε η τομή τους (*Πίνακας II-4*). Από την τομή αυτή προέκυψε το τελικό συμπέρασμα για το πόσοι και ποιοι διεγέρτες εμφανίζουν ομοιότητα με τους ήδη χαρακτηρισμένους, σε σχέση με τις πρωτεΐνες που ενεργοποιούν με βάση τον [Melas et al.] [5], και κατά συνέπεια είναι πιθανό να διαδραματίζουν παρόμοιο ρόλο στην εξέλιξη της οστεοαρθρίτιδας.

Μέθοδος Α			Μέθοδος Β			Μέθοδος C		
Καταβολικοί	Αναβολικοί	Control	Καταβολικοί	Αναβολικοί	Control	Καταβολικοί	Αναβολικοί	Control
il1a	fgf2	dmem	il1a	fgf2	dmem	il1a	fgf2	dmem
il1b	tgfb1		il1b	tgfb1		il1b	tgfb1	
tnf			tnf			tnf		
bmp2	adipoq	bmp4	lta	adipoq	bmp2	bmp2	adipoq	bmp4
flagellin	ccl11	bmp7	flagellin	bmp7	bmp4	flagellin	btc	bmp7
fstl1	ccl2	btc	pam3csk4	btc	ccl4	fstl1	ccl11	ccl4
gdf5	ccl5	ccl4	fstl1	ccl11	csf1	gdf5	ccl2	cd40lg
hgf	cd40lg	csf1	lps	ccl2	csf2	hgf	ccl5	csf1
hksa	cxcl10	csf2	hksa	ccl5	cxcl11	hksa	csf3	csf2
lps	csf3	cxcl11		cd40lg	cxcl12	ifng	cxcl1	cxcl11
lta	cxcl1	cxcl12		csf3	defb1	il13	cxcl10	cxcl12
pam3csk4	defb1	egf		cxcl1	fgf4	il2	egf	defb1
polyic	epng	fgf4		cxcl10	gdf5	il3	ereg	epgn
tnfsf10	ereg	gdnf		egf	gdnf	il6	fgf23	fgf4
	fgf23	hbegf		epng	ifnb1	il7	hbegf	gdnf
	ifn1cluster	ifnb1		ereg	il19	il8	ifn1cluster	ifnb1
	ifng	igf1		fgf23	il2	lgals3	igf1	il19
	il10	il2		hbegf	il7	lps	il10	imiquimod
	il12	il7		hgf	imiquimod	lta	il12	lep
	il13	imiquimod		ifn1cluster	lep	nrg1	il17a	mia
	il17a	ins		ifng	lgals3	pam3csk4	il22	nog
	il19	lep		igf1	nog	polyic	il4	odn2006
	il22	lgals3		il10	nrg1	tnfsf10	inhba	osm
	il3	mia		il12	odn2006	tnfsf14	ins	rln2
	il4	nrg		il13	osm		lgals1	rln3
	il6	odn2006		il17a	polyic		pdgfb	ssrna40
	il8	osm		il22	rln2		tgfa	tnfsf12
	inhba	rln2		il3	rln3		tnfsf11	tnfsf13b
	lgals1	rln3		il4	ssrna40			veg121
	nog	ssrna40		il6	tnfsf12			wnt1
	pdgfb	tgfa		il8	tnfsf13b			
	tnfsf11	tnfsf12		inhba	tnfsf14			
		tnfsf13b		ins	veg121			
		tnfsf14		lgals1	wnt1			
		veg121		mia				
		wnt1		pdgfb				
				tgfa				
				tnfsf10				
				tnfsf11				

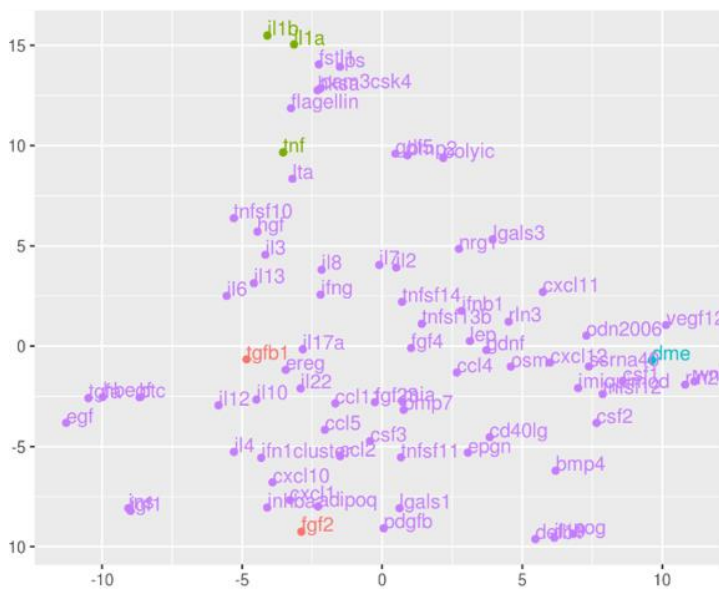
Πίνακας II-3. Ομαδοποιημένα αποτελέσματα κατηγοριοποίησης διεγερτών ανά μέθοδο. Οι πρώτες 3 σειρές του πίνακα αντιστοιχούν στους ήδη χαρακτηρισμένους καταβολικούς, αναβολικούς και control διεγέρτες, ενώ οι υπόλοιπες στην ομαδοποίηση που προέκυψε ως αποτέλεσμα της υπολογιστικής ανάλυσης.

Μέθοδος A (Φωσφοπρωτεομική απόκριση)

Μέθοδος B (Απόκριση έκκρισης κυτταροκινών)

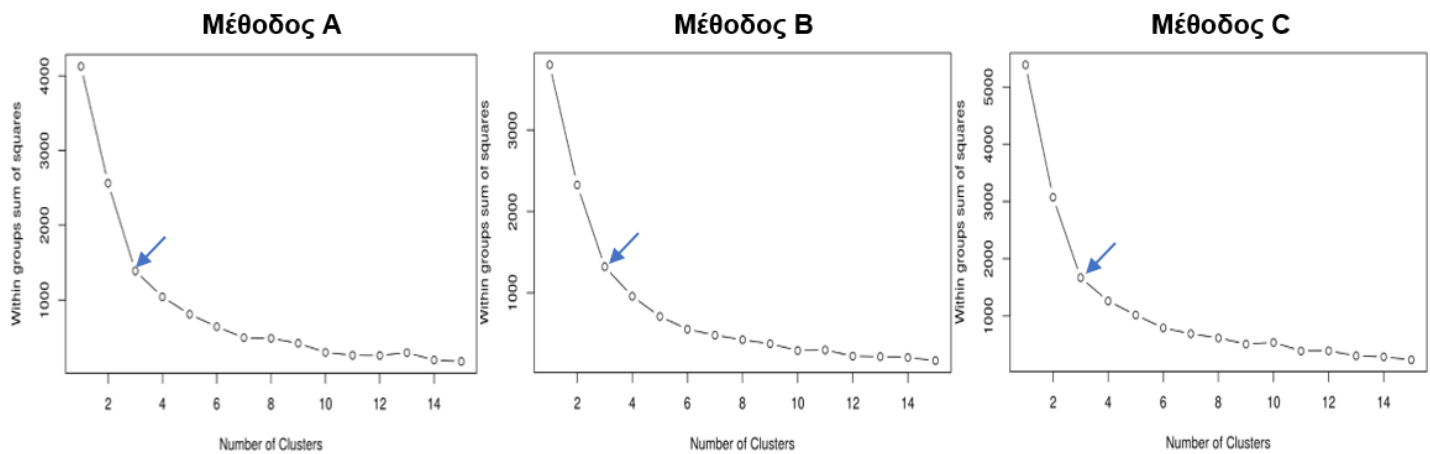


Μέθοδος C (Φωσφοπρωτεομική απόκριση & απόκριση έκκρισης κυτταροκινών)

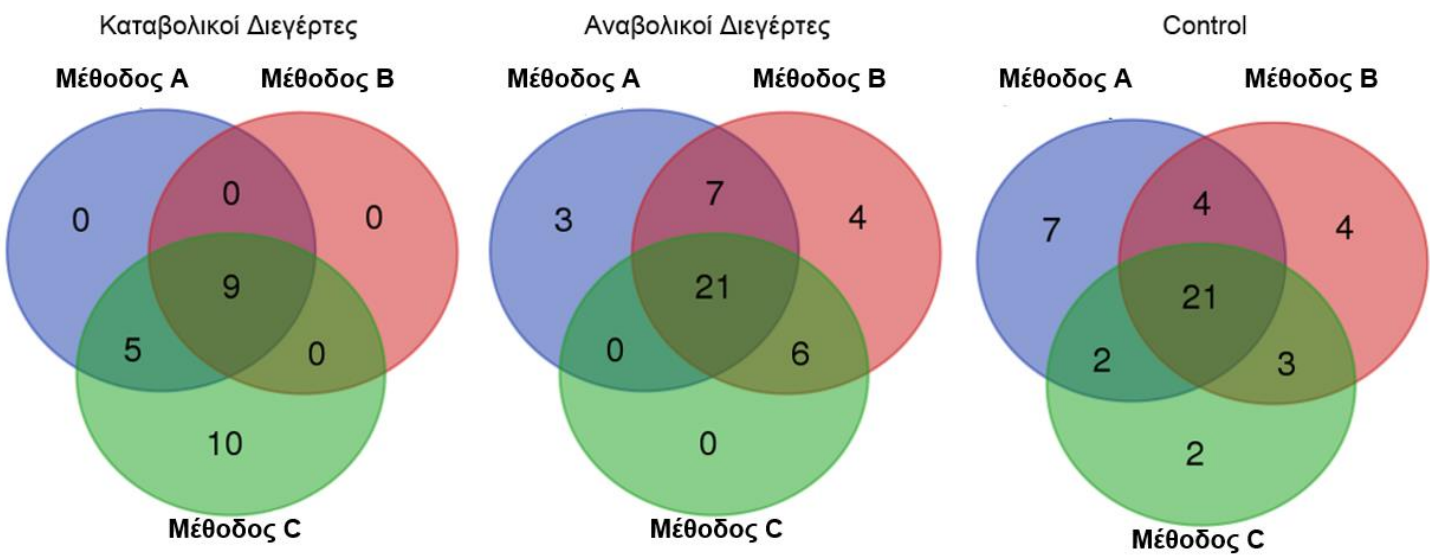


- Αναβολικοί Διεγέρτες
- Καταβολικοί Διεγέρτες
- Control
- Μη Χαρακτηρισμένοι Διεγέρτες

Εικόνα II-1. Μείωση διαστάσεων σε 2, για τα δεδομένα καθεμιάς από τις 3 μεθόδους.



Εικόνα II-3. Elbow method για την επιλογή του βέλτιστου αριθμού ομάδων (clusters), για τα δεδομένα καθεμιάς από τις 3 Μεθόδους.



Εικόνα II-2. Πλήθος “καταβολικών”, “αναβολικών” και “control” διεγερτών, μετά από συναλήθευση των αποτελεσμάτων της ομαδοποίησης των τριών Μεθόδων.

Διεγέρτες (Stimuli)			Κατάσταση Διεγερτών		
Καταβολικά	Αναβολικά	Control	Διεγέρτες με γνωστή δράση στην οστεοαρθρίτιδα, ήδη χαρακτηρισμένοι.		
il1a	fgf2	dmem			
il1b	tgfb1				
tnf					
flagellin	adipoq	il10	bmp4	lep	Διεγέρτες των οποίων μελετάται η δράση στην οστεοαρθρίτιδα, κατηγοριοποιημένοι μετά την υπολογιστική ανάλυση.
fstl1	ccl11	il12	ccl4	odn2006	
hkxa	ccl2	il17a	csf1	osm	
lps	ccl5	il22	csf2	rln2	
lta	csf3	il4	cxcl11	rln3	
pam3csk4	cxcl1	inhba	cxcl12	ssrna40	
	cxcl10	lgals1	fgf4	tnfsf12	
	ereg	pdgfb	gdnf	tnfsf13b	
	fgf23	tnfsf11	ifnb1	vegf121	
	ifn1cluster		imiquimod	wnt1	

Πίνακας II-4. Τελική κατηγοριοποίηση των διεγερτών μετά από συναλήθευση των αποτελεσμάτων των τριών Μεθόδων.

6. Συζήτηση αποτελεσμάτων

Φαίνεται ότι τα αποτελέσματα που προκύπτουν και από τις τρεις Μεθόδους, παρουσιάζουν ομοιότητες, αφού η συναλήθευση τους συγκεντρώνει μεγάλο πλήθος διεγερτών και για τις τρεις ομάδες (καταβολικοί, αναβολικοί και control). Συγκεκριμένα για τους καταβολικούς διεγέρτες η Μέθοδος B είναι η ακριβέστερη με τους 9 διεγέρτες που προτείνει να εμφανίζονται στις αντίστοιχες ομαδοποιήσεις και των άλλων δύο Μεθόδων. Αντίθετα η Μέθοδος C είναι λιγότερο αυστηρή, προτείνοντας 10 διεγέρτες οι οποίοι δεν εμφανίζονται σε καμία άλλη μέθοδο. Εξετάζοντας τους αναβολικούς διεγέρτες παρατηρείται ότι η Μέθοδος C προτείνει 21, οι οποίοι εμφανίζονται στην ίδια κατηγορία σε καμία από τις άλλες δύο μεθόδους, ενώ 7 διεγέρτες που προτείνονται από τις Μεθόδους A

και Β δεν εμφανίζονται στην C. Τέλος σε ότι αφορά τους control διεγέρτες η Μέθοδος Α είναι η λιγότερο αυστηρή χαρακτηρίζοντας control 34 διεγέρτες εκ των οποίων οι 7 δεν εμφανίζονται σε κάποια άλλη μέθοδο, ενώ 21 προτείνονται και από τις 3 μεθόδους.

Επιλέγοντας την τομή των αποτελεσμάτων κάθε μεθόδου, επιτυγχάνεται ένας πρώτος χαρακτηρισμός των εξεταζόμενων διεγερτών οι οποίοι φαίνεται ότι επιδρούν στην παθολογία του αρθρικού χόνδρου. Η συμφωνία των αποτελεσμάτων αυτών με την με την υπάρχουσα βιβλιογραφία στρέφει το ενδιαφέρον στην πειραματική μέτρηση της αποδόμησης των δειγμάτων αρθρικού χόνδρου μετά από κατεργασία με καταβολικούς διεγέρτες (Flagellin, FSTL1, HKSA, PAM3CSK4 κ.α.) αλλά και στην μελέτη της δράσης αναβολικών διεγερτών (IL4, IL10, IL17 κ.α.) στην αναστολή του εκφυλισμού του ιστού. [5], [27]-[31].

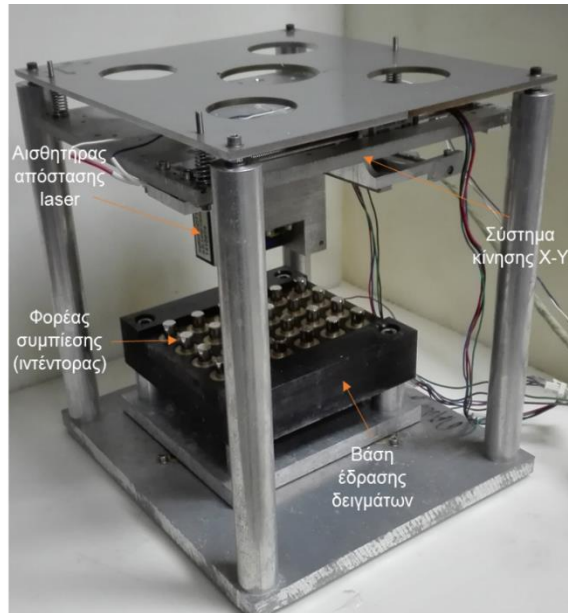
III. Πειραματική Διάταξη Μελέτης Αποδόμησης Χόνδρου

1. Στόχος της Διάταξης

Η διάταξη HDD (High-throughput Degradation Device) χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση της αποδόμησης μέχρι και 24 δειγμάτων, σε συνθήκες κατάλληλες για την επιβίωση των κυττάρων (37°C, 95% υγρασία, 5% CO₂) κατά την διάρκεια πολλών ημερών. Είναι σχεδιασμένη ώστε να λειτουργεί απρόσκοπτα σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και υγρασίας, με αποσπώμενα εξαρτήματα που διευκολύνουν τη διεξαγωγή πειραμάτων κατά την χρήση της.

2. Περιγραφή της Διάταξης

Η ποσοτικοποίηση της αποδόμησης των 24 δειγμάτων με τη χρήση της διάταξης HDD (*Εικόνα III-1*), επιτυγχάνεται μέσω της σύγκρισης του αρχικού ύψους κάθε δείγματος (h_1) τη χρονική στιγμή t_1 , με το ύψος που έχει τελικά (h_2) τη χρονική στιγμή t_2 , (όπου $t_2 > t_1$ και $h_1 \geq h_2$). Η διάταξη παρέχει έτσι τη δυνατότητα να μελετηθεί ο βαθμός της αποδόμησης των δειγμάτων ως συνάρτηση του χρόνου. Η συσκευή HDD περιέχει 3 κυρίως τμήματα: έναν αισθητήρα απόστασης laser, ένα σύστημα κίνησης X-Y του αισθητήρα και μία βάση έδρασης των δειγμάτων (*Εικόνα III-4*).

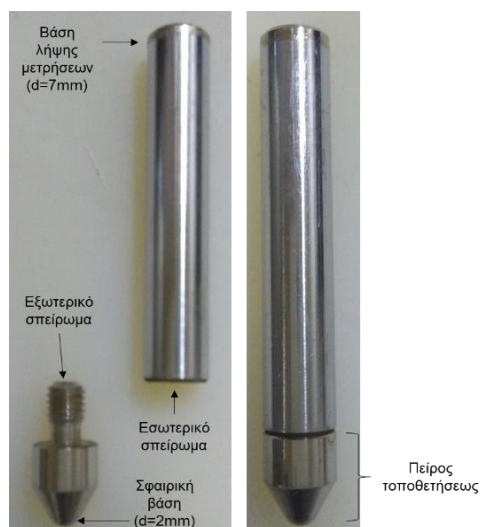


Εικόνα III-1. Η διάταξη HDD μετά τις κατασκευαστικές αλλαγές.

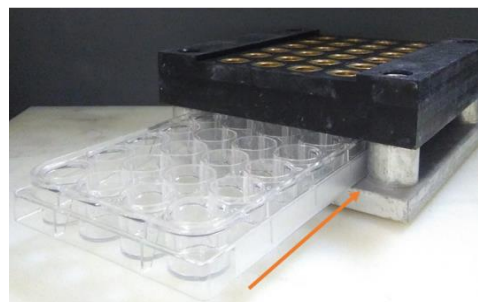
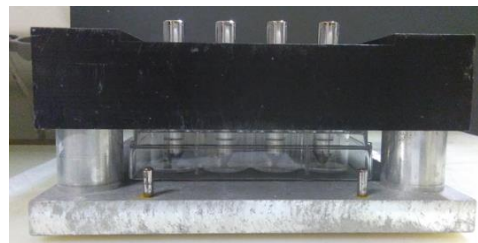
Κάθε δείγμα τοποθετείται σε ένα πηγάδι μίας πλάκας καλλιέργειας κυττάρων με 24 πηγάδια (24 well plate), η οποία με την σειρά της τοποθετείται, μέσα στην βάση έδρασης των δειγμάτων, με τρόπο τέτοιο ώστε τα πηγάδια της να είναι ευθυγραμμισμένα με τις 24 οπές που υπάρχουν στο πάνω μέρος της βάσης, το οποίο είναι κατασκευασμένο από ακετάλη (*Εικόνα III-3*).

Μέσα από τις οπές αυτές διέρχονται με ελάχιστη τριβή, 24 κυλινδρικοί φορείς συμπίεσης (ιντέντορες), διαμέτρου ~8mm, με διεύθυνση κάθετη στο επίπεδο της πλάκας 24 πηγαδιών. Στη μία βάση των κυλινδρικών φορέων υπάρχει οπή με εσωτερικό σπείρωμα στο οποίο συσφίγγονται πείροι τοποθετήσεως με εξωτερικό σπείρωμα στην μία άκρη και σφαιρική κατάληξη στην άλλη. Αυτή η σφαιρική επιφάνεια, διαμέτρου 2mm, έρχεται σε επαφή με το δείγμα. Η άλλη βάση των φορέων συμπίεσης, διαμέτρου 7mm, είναι επίπεδη και πάνω της προσπίπτει η ακτίνα του αισθητήρα απόστασης laser (*Εικόνα III-2*).

Καθώς το δείγμα αποδομείται, αυξάνεται η απόσταση της επίπεδης βάσης, κάθε ιντέντορα, από τον αισθητήρα λέιζερ, με αποτέλεσμα η διαφορά της αρχικής από την τελική του θέση να αντιστοιχεί στην αποδόμηση του δείγματος. Ο αισθητήρας μπορεί να κινείται πάνω από τους φορείς συμπίεσης με την βοήθεια των δύο βηματικών κινητήρων



Εικόνα III-2. Ιντέντορας της διάταξης HDD.

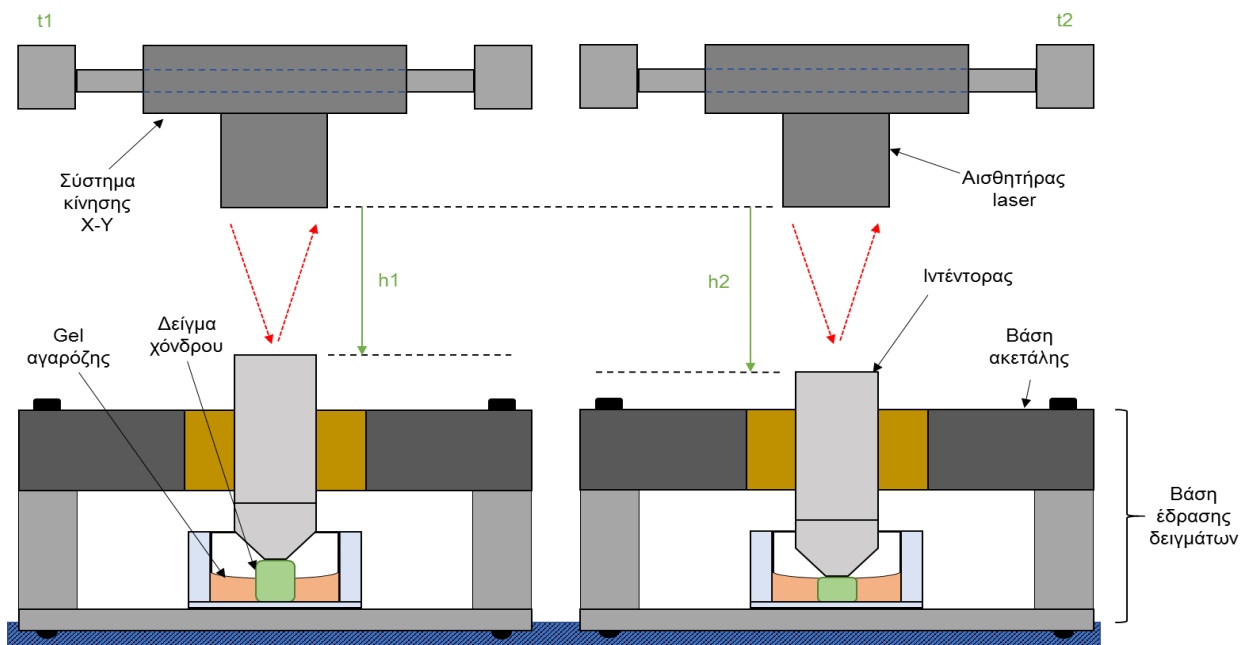


Εικόνα III-3. Ιντέντορες ευθυγραμμισμένοι στις οπές 24άρας πλάκας (επάνω). Τοποθέτηση 24άρας πλάκας στην βάση έδρασης δειγμάτων (κάτω).

του συστήματος κίνησης X-Y. Οι κινητήρες ελέγχονται από έναν μικροελεγκτή Arduino MEGA ADK, με τρόπο τέτοιο ώστε ο αισθητήρας να κινείται πάνω από κάθε φορέα συμπίεσης, και να λαμβάνει μετρήσεις από 8 διαφορετικές θέσεις κάθε φορά, σύμφωνα με το μοτίβο που φαίνεται στην Εικόνα III-5 και στην Εικόνα III-6.

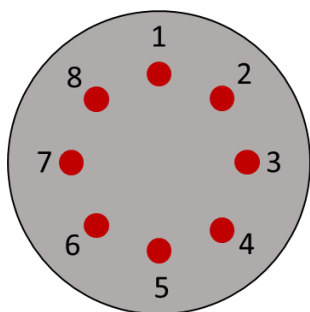
Ο αισθητήρας απόστασης συνδέεται σε προσωπικό υπολογιστή μέσω ενός καλωδίου πρωτοκόλλου RS422 σε USB, ενώ ο Arduino μέσω ενός καλωδίου USB. Οι μετρήσεις του αισθητήρα απόστασης είναι ακέραιες τιμές μεταξύ 0 και 16383 οι οποίες μετατρέπονται σε χιλιοστά σύμφωνα με τον τύπο:

$$x[mm] = \left(digital_out * \frac{1.02}{16368} - 0.01 \right) * 10[mm] .$$

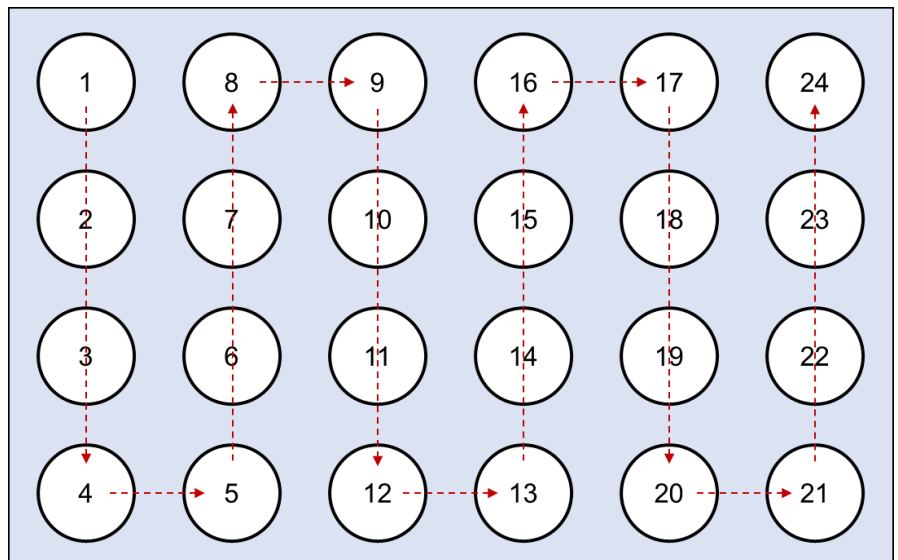


Εικόνα III-4. Μέτρηση της αποδόμησης του δείγματος μεταξύ δύο χρονικών στιγμών t_1 , t_2 ($t_1 < t_2$).

Ο έλεγχος της λειτουργίας του κυκλώματος γίνεται με την χρήση ενός γραφικού περιβάλλοντος χρήστη (GUI), το οποίο επιτρέπει και την αποθήκευση των τελικών μετρήσεων απόστασης σε mm, σε ένα αρχείο κειμένου (.txt).



Εικόνα III-5. Μοτίβο κίνησης αισθητήρα laser πάνω από κάθε ιντέντορα.



Εικόνα III-6. Μοτίβο κίνησης αισθητήρα laser πάνω από την πλάκα 24ων πηγαδιών.

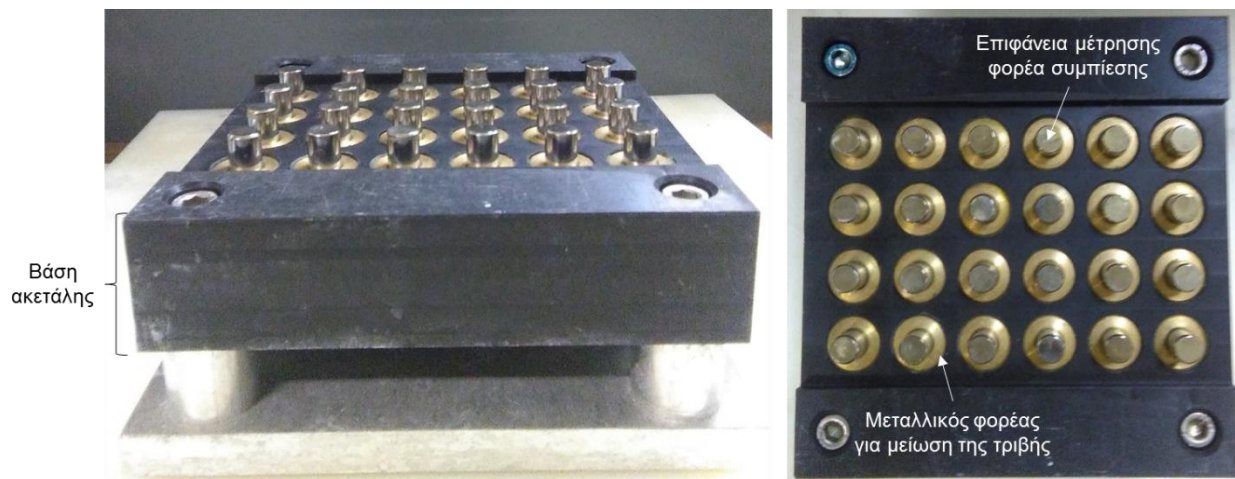
3. Προσθήκες και βελτιώσεις στην Διάταξη

Ο σχεδιασμός και η συσκευή της συσκευής HDD έχει γίνει από πολλά μέλη του Εργαστηρίου Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας, και κυρίως τους Νίκο Γεωργίου, Ηλία Παναγιωτόπουλο, Γιώργο Κανακάρη, και Δρ. Δημήτρη Τζεράνη. Κατά τα πρώτα στάδια της χρήσης της διάταξης για την εκπόνηση πειραμάτων, προέκυψε η ανάγκη για τροποποίηση ορισμένων τμημάτων της, ώστε να εξυπηρετείται καλύτερα ο σκοπός της λειτουργίας της. Επιλέχθηκε αρχικά η τροποποίηση του πάνω τμήματος της βάσης έδρασης και της πάνω βάσης των 24άρων φορέων συμπίεσης, ώστε να διορθωθούν σφάλματα που οφείλονταν στην μακρόχρονη παραμονή της διάταξης στον επωαστήρα. Οι κατεργασίες πραγματοποιήθηκαν εξ ολοκλήρου στο Εργαστήριο Στοιχείων Μηχανών του καθηγητή της Σχολής Μηχανολόγων Μηχανικών Βασίλη Σπιτά, από τον υποψήφιο διδάκτορα Γιώργο Βασιλείου. Επιπλέον έγινε νέος σχεδιασμός και κατασκευή των ηλεκτρονικών τμημάτων της συσκευής, από τον προπτυχιακό φοιτητή της Σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών & Μηχανικών Υπολογιστών του ΕΜΠ, Νεοκλή Βαϊνδηρλή.

i. Βάση έδρασης δειγμάτων

Παρατηρήθηκε ότι μετά από πολυήμερη παραμονή στον επωαστήρα, σε συνθήκες 37°C και 95% υγρασίας, ορισμένες οπές στο πάνω μέρος της βάσης έδρασης δειγμάτων εμφάνιζαν μεγάλη τριβή με τους φορείς συμπίεσης που διέρχονταν από αυτές, η οποία

αποδόθηκε στην διαστολή των υλικών. Για την επίλυση αυτού του προβλήματος επιλέχθηκε η προσθήκη μεταλλικών φορέων στο εσωτερικό κάθε οπής, οι οποίοι εξασφάλισαν την κίνηση των ιντεντόρων με ελάχιστη τριβή (Εικόνα III-7).

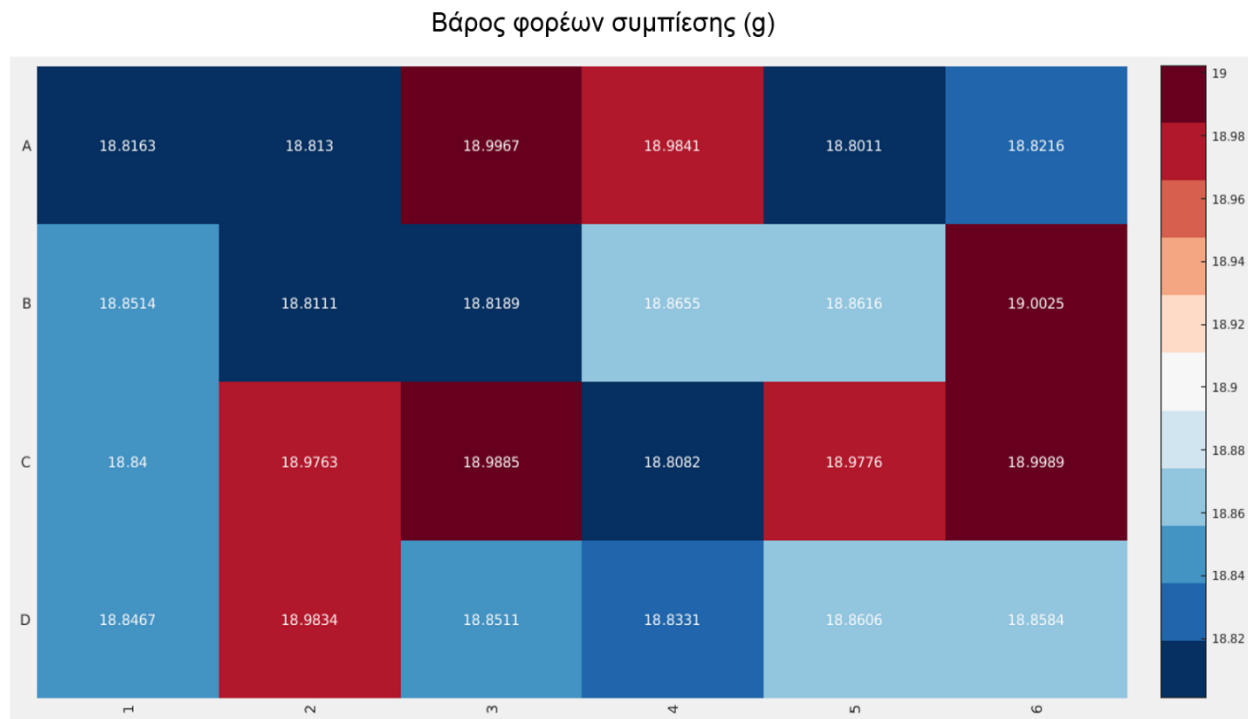


Εικόνα III-7. Βάση έδρασης δειγμάτων με 24 ιντέντορες (αριστερά). Κάτοψη της βάσης με ορατές τις κατασκευαστικές αλλαγές (δεξιά).

ii. Φορείς συμπίεσης

Η παραμονή των φορέων συμπίεσης (indenters) στον επωαστήρα (σε συνθήκες 37°C και 95% υγρασίας) καθώς και ο καθαρισμός τους μετά την ολοκλήρωση κάθε πειράματος, με υδροχλωρικό οξύ 10% και αιθανόλη 70%, είχαν σαν αποτέλεσμα ορατές φθορές στην επιμετάλλωση της επάνω βάσης τους από την οποία λαμβάνονται οι μετρήσεις. Για να αντιμετωπιστεί το σφάλμα που εισήγαγαν οι φθορές, στις μετρήσεις του αισθητήρα, επιλέχθηκε το γυάλισμα και η επιμετάλλωση της επάνω βάσης με νικέλιο. Η επιλογή του έγινε λόγω της αντοχής του στις ιδιαίτερες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας που επικρατούν στο εσωτερικό του επωαστήρα όσο και της ανακλαστικότητάς του.

Επιπλέον μετρήθηκε το ακριβές βάρος των φορέων συμπίεσης μετά την ολοκλήρωση της επεξεργασίας τους, 18.8861 ± 0.0763 gr (Mean \pm Standard Deviation) (Εικόνα III-8).



Εικόνα III-8. Βάρος των φορέων συμπίεσης, σε διάταξη 4x6 σε αντιστοιχία με τον σχεδιασμό της βάσης έδρασης δειγμάτων.

iii. Ηλεκτρονικό Κύκλωμα

Για το ηλεκτρονικό κύκλωμα της διάταξης επιλέχθηκε ένας σχεδιασμός που δεν απαιτεί την χρήση προσωπικού υπολογιστή για να λειτουργήσει και ελαχιστοποιεί τις συνδέσεις και τα εξωτερικά καλώδια που χρησιμοποιούνται.

Δεν είναι πλέον αναγκαία, για την αποθήκευση των μετρήσεων που λαμβάνονται, η σύνδεση με ηλεκτρονικό υπολογιστή, καθώς οι μετρήσεις αποθηκεύονται κατευθείαν σε μία κάρτα μνήμης SD. Παρ' όλα αυτά, η σύνδεση εξακολουθεί να είναι δυνατή, ώστε να

υπάρχει εποπτεία των λαμβανόμενων μετρήσεων σε πραγματικό χρόνο, όταν αυτό κρίνεται αναγκαίο, μέσω της δυνατότητας παρακολούθησης της κίνησης των σειριακών θυρών (serial monitor) που προσφέρει ο arduino. Επιπλέον ο έλεγχος του αισθητήρα laser (ILD 1402-10) γίνεται πια από τον μικροελεγκτή του κυκλώματος, με τη χρήση δύο MAX 485 modules, καταργώντας τη σύνδεση του καλωδίου (PC 1402-3/U) με τον ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Οι παραπάνω αλλαγές εξυπηρετούν την ανάγκη για γρήγορη εκκίνηση της λήψης μετρήσεων αμέσως μετά την τοποθέτηση της βάσης έδρασης των δειγμάτων στο εσωτερικό του επωαστήρα, αλλά και την εύκολη ανάκτηση των δεδομένων μετά την ολοκλήρωση του κάθε πειράματος. Εξασφαλίζουν ακόμα ανεξαρτησία από την λειτουργία ηλεκτρονικού υπολογιστή, εξαλείφοντας προβλήματα συμβατότητας.

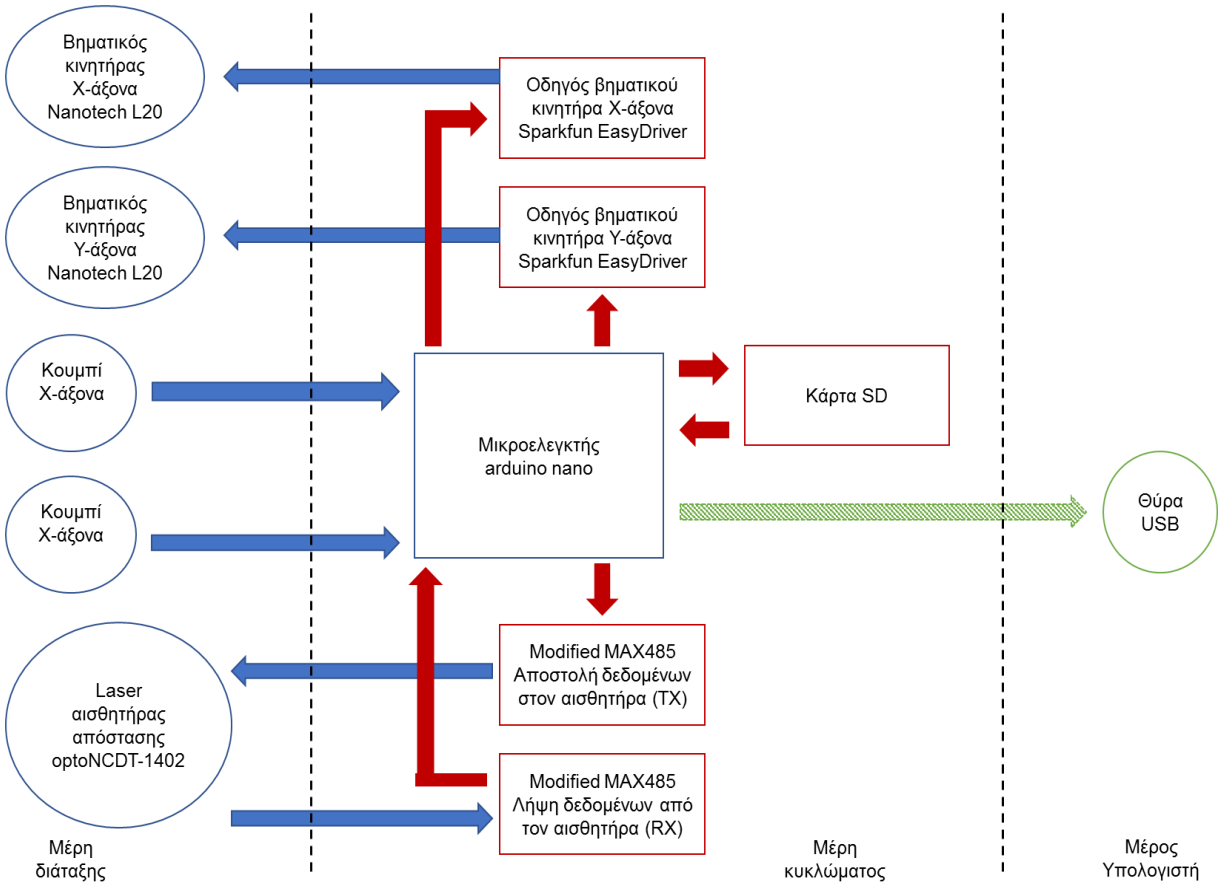
Ακολούθως θα παρουσιαστούν συνοπτικά τα ηλεκτρονικά στοιχεία εκείνα που διαφοροποιούνται από την αρχική σχεδίαση

Ηλεκτρονικά στοιχεία

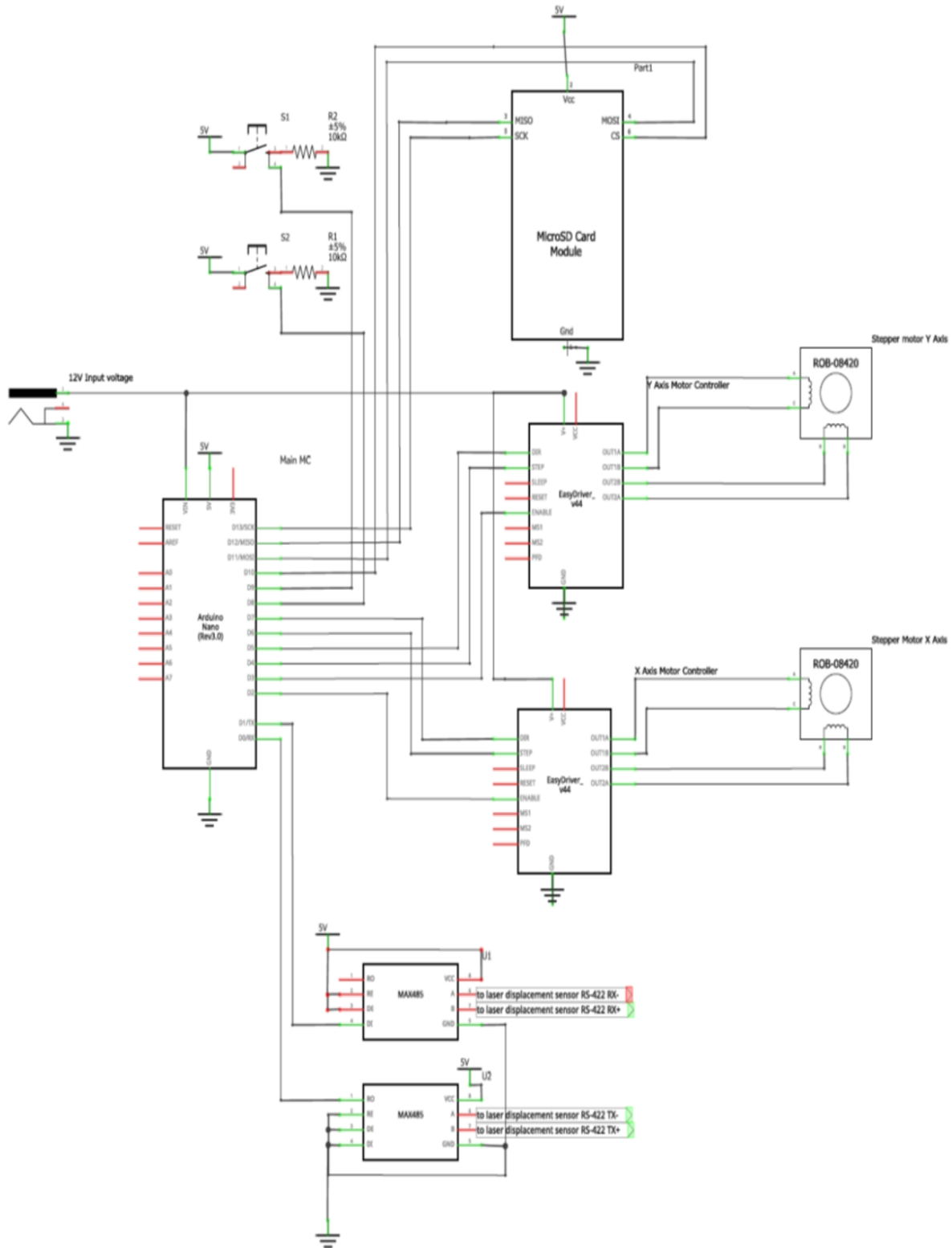
Το σημαντικότερο τμήμα του κυκλώματος είναι ο arduino nano microcontroller (περιλαμβάνει τον μικροεπεξεργαστή ATmega328), ο οποίος αντικατέστησε τον arduino MEGA ADK που χρησιμοποιούνταν στην προηγούμενη σχεδίαση. Είναι ικανός να εξυπηρετήσει τις ανάγκες του συγκεκριμένου κυκλώματος, με μικρό κόστος αγοράς και μικρό μέγεθος. Έχει την δυνατότητα να συνδέεται με προσωπικό υπολογιστή, κάνοντας εύκολη την αλλαγή του κώδικα που χρησιμοποιείται, μέσω mini USB θύρας. Οι ψηφιακές του είσοδοι/έξοδοι αναλαμβάνουν τον λογικό έλεγχο όλων των άλλων στοιχείων του κυκλώ-

ματος: των κινητήρων του συστήματος κίνησης X-Y, των κουμπιών που χρησιμοποιούνται για αρχικοποίησή του, του αισθητήρα laser και της κάρτας μνήμης SD, όπως φαίνεται στο διάγραμμα της *Εικόνας III-9*.

Η έναρξη ή η διακοπή της λειτουργίας του κυκλώματος καθορίζεται απλώς από την σύνδεση ή την αποσύνδεση του τροφοδοτικού στην προβλεπόμενη υποδοχή. Όλα τα κυκλωματικά στοιχεία κολλήθηκαν σε πλακέτα (12x8cm), σύμφωνα με το σχηματικό κύκλωμα της *Εικόνας III-10*, ώστε να εξασφαλιστεί η σταθερότητα τους, η αντοχή σε κραδασμούς και να αποφευχθούν σφάλματα που ενδεχομένως να οφείλονταν σε κακή επαφή μεταξύ των στοιχείων. Τέλος λόγω της πολυήμερης διαρκούς λειτουργίας του κυκλώματος, κρίθηκε αναγκαία η προσθήκη ανεμιστήρα, για την αποφυγή της αύξησης της θερμοκρασίας των στοιχείων και των αρνητικών συνεπειών που αυτή θα συνεπαγόταν (πχ βραχυκύκλωμα).



Εικόνα III-9. Διάγραμμα ελέγχου της λειτουργίας του κυκλώματος διάταξης HDD από τον arduino nano.



Εικόνα III-10. Σχηματικό κύκλωμα [N. Βαϊνδηρλής].

Διαδικασία λήψης και αποθήκευσης μετρήσεων

Ο laser αισθητήρας απόστασης παρέχει τις έγκυρες μετρήσεις σε μορφή ακέραιων αριθμών μεταξύ 0 και 16367, με συχνότητα λήψης 50Hz, ενώ οι τιμές μεταξύ 16370 και 16383 αντιστοιχούν σε εσφαλμένη μέτρηση. Κάθε φορά που η κίνηση του X-Y σταδίου οδηγεί τον αισθητήρα πάνω από μία από τις 8 προκαθορισμένες θέσεις μέτρησης (*Εικόνα III-5*) ο μικροελεγκτής του δίνει την εντολή να λάβει μέτρηση. Σε περίπτωση που μετρηθεί τιμή σφάλματος, σε κάποια από αυτές τις θέσεις, ο αισθητήρας κάνει 64 «προσπάθειες» να λάβει έγκυρη μέτρηση από την συγκεκριμένη θέση. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται ότι πράγματι ο αισθητήρας δεν μπορεί να λάβει σωστή μέτρηση στο συγκεκριμένο σημείο και ότι η αποτυχημένη μέτρηση δεν οφείλεται σε κάποιο στιγμιαίο γεγονός (πχ κάποια ανεπιθύμητη ανάκλαση).

Κάθε μέτρηση, μαζί με την ένδειξη του χρόνου που αντιστοιχεί στην λήψης της, αποθηκεύεται από τον μικροελεγκτή arduino σε καινούρια γραμμή σε ένα αρχείο κειμένου (.txt) στην κάρτα SD. Η επικοινωνία μικροελεγκτή και κάρτας μνήμης, γίνεται χρησιμοποιώντας τα SPI (Serial Peripheral Interface) pin που διαθέτει ο arduino nano, για επικοινωνία με περιφερειακές συσκευές.

Μετά την ολοκλήρωση του πειράματος, οι μετρήσεις σε ακέραιη μορφή μπορούν να ανακτηθούν από την κάρτα μνήμης μέσω οποιουδήποτε προσωπικού υπολογιστή, που διαθέτει θύρα για κάρτα SD. Η επιλογή της διατήρησης της ακέραιης μορφής των μετρήσεων κατά την αποθήκευση οφείλεται στις μειωμένες απαιτήσεις της σε χωρητικότητα, αλλά και σε λόγους απλούστευσης της ανάγνωσης του παραγόμενου αρχείου από τον χρήστη.

4. Σύνοψη

Οι παραπάνω αλλαγές εξασφάλισαν καλύτερες συνθήκες για την διεξαγωγή των πειραμάτων μελέτης της αποδόμησης του χόνδρου, περιορίζοντας όσο αυτό ήταν δυνατόν παράγοντες σφάλματος και διασφαλίζοντας τη δυνατότητα ομαλής διεξαγωγής επαναλαμβανόμενων πολυήμερων μετρήσεων μέσα στις ιδιαίτερες συνθήκες του επωαστήρα (95% υγρασία, 37°C).

IV. Πειραματική Μελέτη Αποδόμησης Χόνδρου

1. Πειραματική αξιολόγηση της διάταξης HDD

Ο περιορισμός των παραγόντων που μπορούν να προκαλέσουν σφάλμα κατά τη διάρκεια των πειραμάτων μελέτης της αποδόμησης του χόνδρου είναι ιδιαίτερα σημαντικός. Η τοποθέτηση της συσκευής στον επωαστήρα (37°C και 95% υγρασία) 24 ώρες πριν την διεξαγωγή του πειράματος και η προθέρμανση του αισθητήρα για περίπου 5 ώρες, εξασφαλίζει ότι σταθεροποιείται θερμοκρασιακά η διάταξη με αποτέλεσμα οι μετρήσεις να μην περιέχουν θερμικά σφάλματα. [13]

Για την μέτρηση της ακρίβειας των μετρήσεων που λαμβάνει η διάταξη πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα αξιολόγησης, χωρίς δείγματα χόνδρου. Στη βάση έδρασης των δειγμάτων τοποθετήθηκε μία άδεια πλάκα 24ων πηγαδιών, με τη σφαιρική βάση κάθε φορέα συμπίεσης να ακουμπάει στο εσωτερικό ενός πηγαδιού. Όντας τοποθετημένοι σε σταθερή επιφάνεια, οι ιντέντορες δεν μετατοπίζονται, επομένως είναι δυνατή η μέτρηση της ακρίβειας του οργάνου.

Το πείραμα διήρκεσε ~24 ώρες, κατά την διάρκεια των οποίων έγινε λήψη μετρήσεων 74 φορές σε κάθε φορέα συμπίεσης (74 κύκλοι), με 8 μετρήσεις ανά κύκλο, δηλαδή συνολικά $74 \cdot 8 = 592$ μετρήσεις ανά ιντέντορα.

2. Προετοιμασία γέλης αγαρόζης

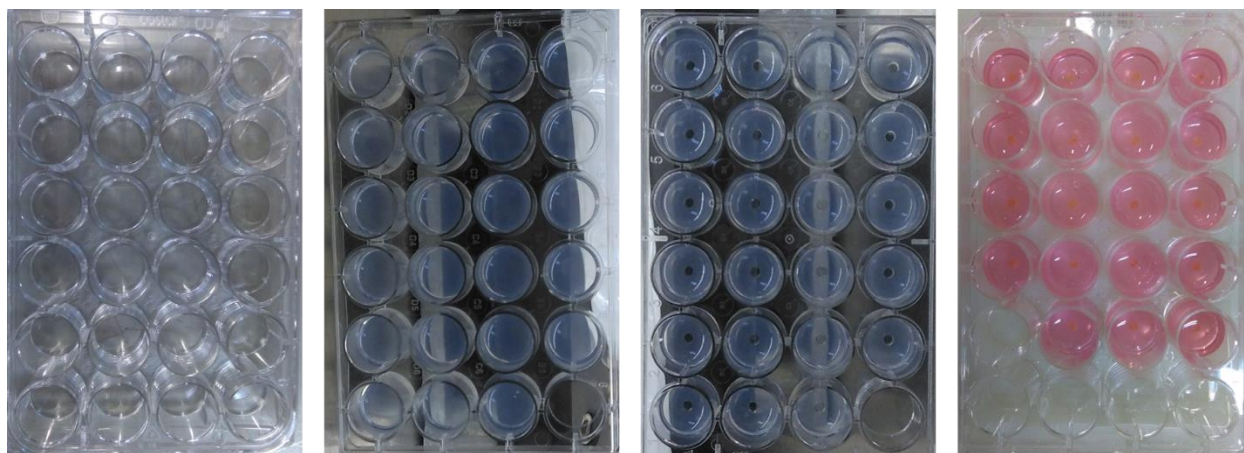
Η διάμετρος των δειγμάτων του αρθρικού χόνδρου (κυλινδρικά δισκία διαμέτρου 3mm) είναι πολύ μικρότερη από αυτήν ενός πηγαδιού μίας πλάκας 24^{ων} πηγαδιών

(15,54mm). Είναι λοιπόν απαραίτητο να εξασφαλιστεί ότι παραμένουν σταθερά στο κέντρο του πηγαδιού και ευθυγραμμισμένα με την διεύθυνση του κατακόρυφου άξονα των φορέων συμπίεσης, σε όλη τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος, χωρίς να αλλοιώνονται οι μετρήσεις. Γι' αυτόν τον σκοπό χρησιμοποιείται γέλη αγαρόζης 2% (agarose gel) διαλυμένης σε απιονισμένο νερό (Τύπου Ι).

Η αγαρόζη, σε υγρή μορφή (θερμοκρασία περίπου 60°C), τοποθετείται στα πηγάδια της πλάκας 24 πηγαδιών και αφού πήξει για μία ώρα, κόβεται στο μέσον μια οπή διαμέτρου 3mm (*Εικόνα IV-1*) μέσω ενός διατρητή βιοψίας (biopsy punch) που εδράζεται σε μια ιδιοσυσκευή κεντραρίσματος (Γ. Κανακάρης).

Έτσι σχηματίζονται κυλινδρικές «υποδοχές» στις οποίες θα τοποθετηθούν τα δείγματα χόνδρου για την εκτέλεση του πειράματος. Το κυλινδρικό αυτό κενό στην αγαρόζη, έχει διάμετρο ίση με αυτήν των δειγμάτων χόνδρου. Η χρήση της ιδιοσυσκευής εξασφαλίζει ότι κόβεται στο κέντρο του πηγαδιού με ακρίβεια και καθετότητα (*Εικόνα IV-2*).[13]

Μετά την ολοκλήρωση της προετοιμασίας η πλάκα αποστειρώνεται με υπεριώδη ακτινοβολία (UV) για 30 λεπτά.



Εικόνα IV-1. Πλάκα 24ων πηγαδιών: Πριν την προετοιμασία του πειράματος, μετά την προσθήκη γέλης αγαρόζης, μετά το άνοιγμα της οπής 3mm, μετά την προσθήκη δειγμάτων και DMEM.



Εικόνα IV-2. Ιδιοσυσκευή κοπής οπών στην γέλη αγαρόζης.

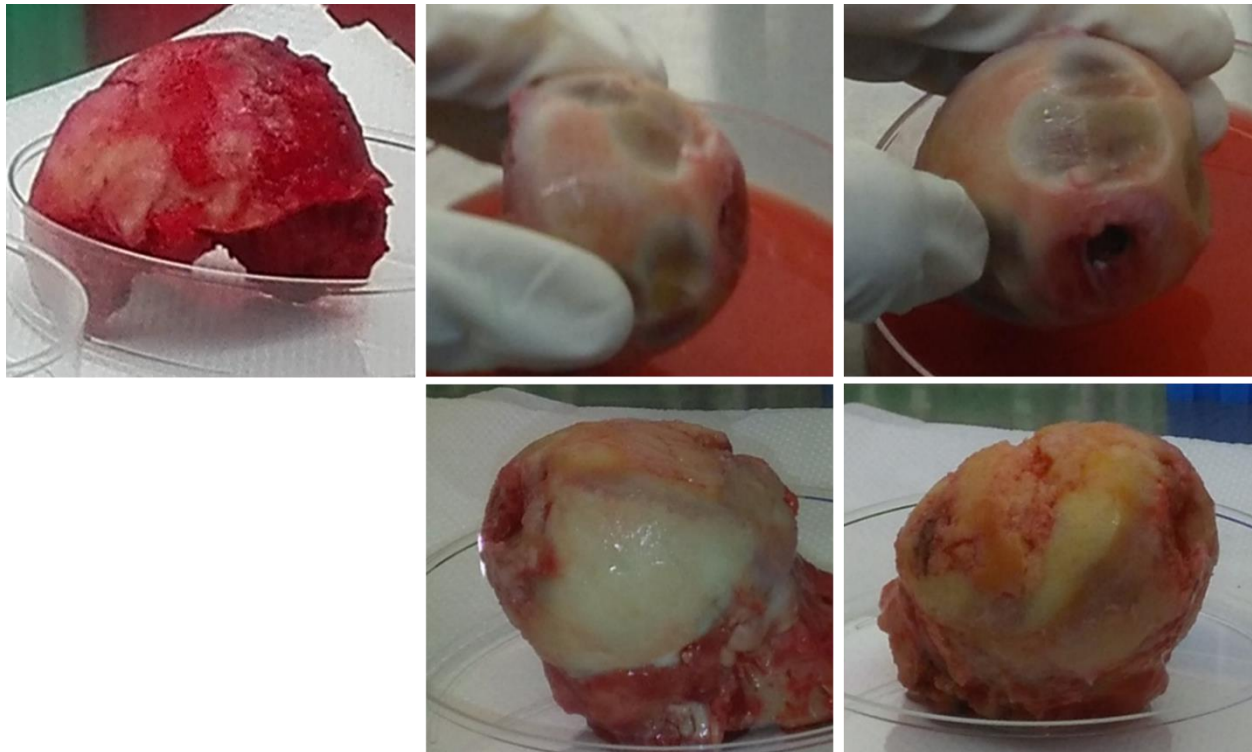
3. Προετοιμασία δειγμάτων

i. Κοπή και χαρακτηρισμός δειγμάτων χόνδρου

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ανθρώπινου αρθρικού χόνδρου, που προήλθαν από κεφαλές ισχίου, ασθενών οι οποίοι υπεβλήθησαν σε ολική αρθροπλαστική ισχίου λόγω κατάγματος (Δ' Ορθοπαιδική Κλινική, Γενικού Νοσοκομείου Αττικής, ΚΑΤ). Όλοι οι δότες ήταν γυναίκες με ηλικία $89,6 \pm 10$ έτη (Mean \pm Standard Deviation) και έχουν τηρηθεί τα αναγκαία πρωτόκολλα για την προφύλαξη της ανωνυμίας τους.

Η απομόνωση των δειγμάτων γίνεται περίπου μία ώρα μετά το χειρουργείο σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφεται από την [Minia A.] [11]. Η κεφαλή μεταφέρεται από το δοχείο συλλογής χειρουργικών δειγμάτων, σε τρυβλίο πέτρι (petri dish) όπου κα-

θαρίζεται προσεκτικά με PBS (Phosphate Buffered Saline) που περιέχει 100 I.U./mL πενικιλίνη, 100 µg/mL στρεπτομυκίνη (Pen/Strep) και 2.5 µg/mL αμφοτερισίνη β (amphotericin b). Στη συνέχεια αφού αναγνωρισθεί η ανώτερη, η πρόσθια, η οπίσθια και η κατώτερη περιοχή (Εικόνα I-1) κόβονται οριζόντιες τομές αρθρικού χόνδρου, από την επιλεγμένη περιοχή, με αποστειρωμένο νυστέρι μίας χρήσης (Εικόνα IV-4). Με τη χρήση διατρητή βιοψίας (biopsy punch) διαμέτρου 3mm με έμβολο (Εικόνα IV-5), κόβονται κυλινδρικά δείγματα αντίστοιχης διαμέτρου και ύψους (~1-2mm), από κάθε τέτοια τομή, των οποίων το ύψος μετρείται με παχύμετρο ακρίβειας (1/20mm). Στη συνέχεια ανοίγεται μία δεύτερη οπή 1mm, στο κέντρο κάθε δείγματος, με διατρητή βιοψίας αντίστοιχης διαμέτρου (Εικόνα IV-5, Εικόνα IV-6). Τελικά τα δείγματα χόνδρου τοποθετούνται σε πλάκα 24 πηγαδιών, όπου προστίθεται θρεπτικό υλικό DMEM⁺⁺⁺ (Dulbecco's Eagles Modified Medium,



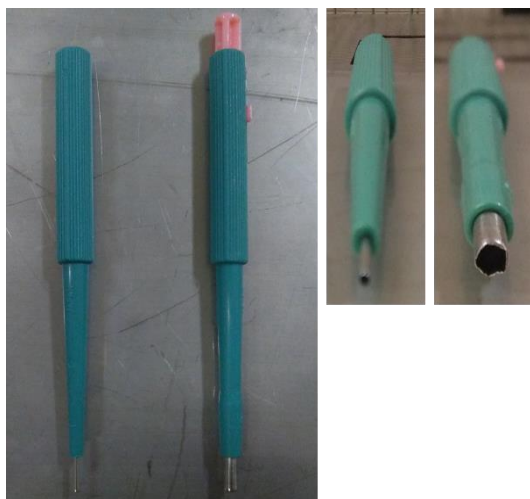
Εικόνα IV-3. (Επάνω) Κεφαλή ισχίου πριν την προετοιμασία (αριστερά), αφού αφαιρεθούν οι τομές χόνδρου. (Κάτω) Κεφαλή ισχίου με εμφανείς αλλοιώσεις λόγω οστεοαρθρίτιδας.

10% Fetal Bovine Serum, πενικιλίνης, στρεπτομυκίνης και αμφοτερισίνης β), μέχρι να ολοκληρωθεί η προετοιμασία του πειράματος (Εικόνα IV-1).

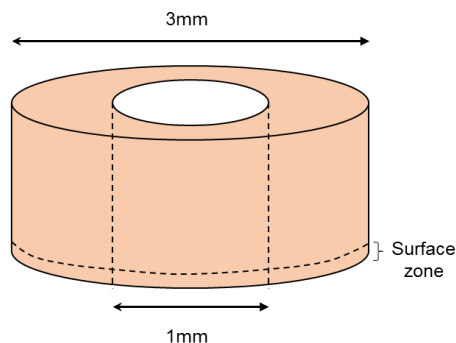


Εικόνα IV-4. Οριζόντιες τομές χόνδρου μετά την κοπή τους από την κεφαλή ισχίου (αριστερά). Τομές χόνδρου μετά την εξαγωγή των δειγμάτων 3mm (δεξιά).

Η διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων γίνεται εξ ολοκλήρου μέσα στον θάλαμο νηματικής ροής (Laminar flow hood) σε άσηπτες συνθήκες, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος μόλυνσης κατά τη διάρκεια του πειράματος.



Εικόνα IV-5. Διατηρητές βιοψίας διαμέτρου 1mm (αριστερά) και 3mm (δεξιά).



Εικόνα IV-6. Σχέδιο δείγματος χόνδρου μετά την προετοιμασία του.

ii. Προετοιμασία δειγμάτων για την λήψη πειραματικών μετρήσεων

Κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων μέτρησης της αποδόμησης του αρθρικού χόνδρου χρησιμοποιήθηκαν κολλαγενάση και καταβολικές κυτταροκίνες, με σκοπό την πρόκληση φθοράς στον ιστό. Η κολλαγενάση είναι ένζυμο που αποδομεί το κολλαγόνο τύπου II (Calbiochem-Novagen, Cat: 234155), το οποίο υπάρχει στον χόνδρο και χρησιμοποιήθηκε σε συγκεντρώσεις μεταξύ 1 και 0.125 mg/ml. Οι κυτταροκίνες που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα είναι οι IL1-α (Interleukin 1 alpha), IL1-β (Interleukin 1 beta) και το TNF-α (Tumor Necrosis Factor alpha), οι οποίες είναι υπεύθυνες για την πρόκληση φλεγμονής (proinflammatory). Οι IL1-α και IL1-β χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 100ng/ml και το TNF-α σε συγκέντρωση 200ng/ml.

Χαρακτηρισμός δειγμάτων ανθρώπινου χόνδρου

Ένα πρώτο ζήτημα που προκύπτει, πριν από την διεξαγωγή λεπτομερών πειραμάτων μελέτης αποδόμησης χόνδρου, είναι η επιλογή της περιοχής της κεφαλής ισχίου από την οποία θα κοπούν τα δείγματα που θα χρησιμοποιηθούν. Σημαντικοί παράγοντες για την επιλογή αυτή είναι αρχικά η επάρκεια του ιστού στο συγκεκριμένο σημείο, ώστε να μπορούν να κοπούν περίπου 35 δείγματα που χρειάζονται κάθε φορά, το μέσο ύψος των δειγμάτων, το οποίο πρέπει να είναι αρκετά μεγάλο ώστε να είναι δυνατή η ποσοτικοποίηση της αποδόμησης και τέλος η όσο το δυνατόν μικρότερη τυπική απόκλιση του ύψους των δειγμάτων.

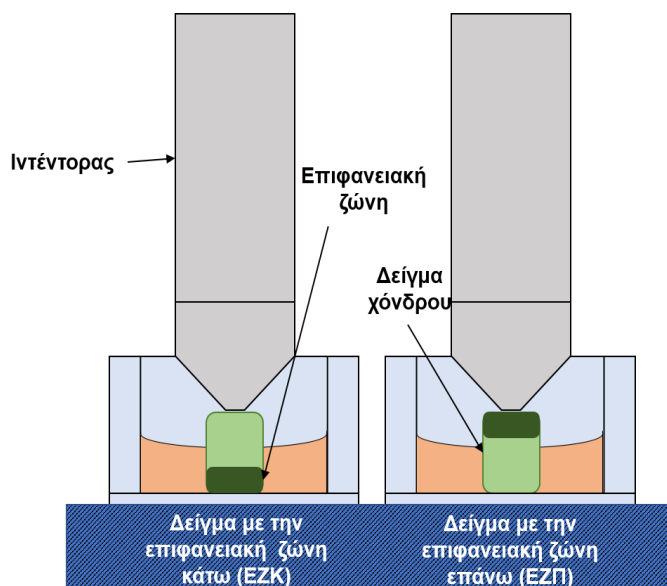
Για το σκοπό αυτό, έγινε λήψη δειγμάτων από 3 διαφορετικούς δότες ($94 \pm 2,64$ ετών), από τις 4 περιοχές της κεφαλής ισχίου (*Εικόνα I-1*). Για κάθε δότη κόπηκαν 23 δείγματα από κάθε περιοχή, εκτός αν αυτό δεν ήταν δυνατό λόγω της έκτασης του ιστού σε κάποιες περιπτώσεις, και στη συνέχεια μετρήθηκαν τα ύψη των δειγμάτων με παχύμετρο ακρίβειας ($1/20$ mm).

Ένας επιπλέον παράγοντας ο οποίος έπρεπε να ληφθεί υπ' όψιν είναι η διακύμανση του ύψους του ιστού από δότη σε δότη, καθώς είναι γνωστό ότι τα βιολογικά δείγματα που προέρχονται από ανθρώπινους δότες συχνά παρουσιάζουν σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ τους. Για την σύγκριση του ύψους του αρθρικού χόνδρου ανά δότη, λήφθηκαν δείγματα από 5 διαφορετικούς δότες (89.6 ± 10 ετών), προερχόμενα όλα από την ανώτερη περιοχή της κεφαλής ισχίου (Περιοχή D), το ύψος των οποίων μετρήθηκε με παχύμετρο (ακρίβειας $1/20$ mm).

Προετοιμασία για μελέτη της επίδρασης της φοράς του δείγματος

Η επιφανειακή ζώνη του αρθρικού χόνδρου εμφανίζει μεγάλη συγκέντρωση κολλαγόνου και είναι ανθεκτικότερη σε μηχανικές καταπονήσεις από τις υπόλοιπες. Ενδιαφέρον λοιπόν παρουσιάζει η αξιολόγηση της επίδρασής της στον βαθμό της αποδόμησης του ιστού. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η αποδόμηση δειγμάτων, προερχόμενων από την ανώτερη περιοχή (D) της κεφαλής ισχίου, ενός δότη (97 ετών), μετά από κατεργασία με κολλαγενάση, με την επιφανειακή ζώνη στραμμένη προς τα επάνω, σε επαφή με τον ιντέντορα (EZΠ), ή με την επιφανειακή ζώνη στραμμένη προς τα κάτω (EZK), σε επαφή με το εσωτερικό του πηγαδιού της πλάκας $24^{\omega v}$ πηγαδιών (*Εικόνα IV-7*).

Σε κάθε πηγάδι της πλάκας 24^{ωv} πηγαδιών, μαζί με τα δείγματα προστέθηκε συνολικό διάλυμα, όγκου 500ul, με DMEM⁺⁺⁺ και κολλαγενάση (1mg/ml). Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετήθηκε στην διάταξη και λήφθηκαν μετρήσεις για περίπου 3 ημέρες.



Εικόνα IV-7. Σχηματικό δειγμάτων με την επιφανειακή ζώνη κάτω (ΕΖΚ) και την επιφανειακή.

Προετοιμασία για μελέτη της επίδρασης της οπής 1mm

Το αρκετά μεγάλο πλήθος των δειγμάτων που απαιτούνται για την διεξαγωγή κάθε πειράματος (~30-35), αλλά και η χρωματική τους ομοιογένεια κάνουν πολύ δύσκολο να εντοπιστεί οπτικά η επιφανειακή ζώνη, αφού το δείγμα αφαιρεθεί από την τομή χόνδρου από την οποία προέρχεται. Σε περίπτωση που το δείγμα αναστραφεί κατά την διάρκεια της προετοιμασίας ή της μεταφοράς του, είναι αδύνατο να εντοπιστεί αν αυτό έχει τοποθετηθεί με την επιφανειακή ζώνη προς τα κάτω ή προς τα πάνω, παρά μόνο μετά το τέλος του πειράματος μελετώντας τις μετρήσεις. Προκύπτει λοιπόν η ανάγκη να βρεθεί ένας τρόπος να μετριάζεται η επίδραση της φοράς της επιφανειακής ζώνης στις μετρήσεις αποδόμησης.

Για το σκοπό αυτό ανοίχθηκε μία οπή, διαμέτρου 1mm, στο κέντρο κάθε δείγματος όπως περιγράφεται στο εδάφιο IV-i. Στη συνέχεια επαναλήφθηκε η διαδικασία αποδόμησης των δειγμάτων από διάλυμα κολλαγενάσης 1 mg/ml. Τα δείγματα, προερχόμενα από τον ίδιο δότη τοποθετήθηκαν, στα πηγάδια της πλάκας 24^{ωv} πηγαδιών, είτε με την επιφανειακή ζώνη σε επαφή με τον ιντέντορα (EZΠ), είτε αντίστροφα (EZΚ), με διάλυμα συνολικού όγκου 500ul, με DMEM⁺⁺⁺ και κολλαγενάση 1mg/ml και λήφθηκαν μετρήσεις για ~3 ημέρες.

Προετοιμασία για μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης κολλαγενάσης

Το κολλαγόνο τύπου II, κυριαρχεί στην εξωκυττάρια μήτρα του ανθρώπινου αρθρικού χόνδρου, η οποία συμβάλλει δραστικά στην διατήρηση της ελαστικότητας του ιστού. Η διάσπαση των δεσμών κολλαγόνου, λόγω της κατεργασίας των δειγμάτων με κολλαγενάση, ποσοτικοποιείται με την μέτρηση της αποδόμησης τους. Μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων κολλαγενάσης στον ρυθμό αποδόμησης του αρθρικού χόνδρου. Υπερβολικά μεγάλη πυκνότητα κολλαγενάσης προκαλεί πολύ έντονη αποδόμηση, η οποία μπορεί να καταστρέψει το δείγμα πολύ γρήγορα. Ακατάλληλα μικρή πυκνότητα κολλαγενάσης μπορεί να προκαλέσει μικρό ρυθμό αποδόμησης χόνδρου, δυσκολεύοντας την διεξαγωγή πειραματικών συμπερασμάτων σχετικά με την επίδραση διάφορων κυτταροκίνων ή φαρμάκων στην αποδόμηση του χόνδρου.

Χρησιμοποιήθηκε ιστός προερχόμενος από την ανώτερη περιοχή (D) της κεφαλής ισχίου, τριών διαφορετικών δοτών, ηλικίας 87.6 ± 13.6 ετών. Καθένα από τα δείγματα, μετά την προετοιμασία του όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο IV.1-i, τοποθετήθηκε με την επιφανειακή του ζώνη προς τα κάτω (EZΚ), σε συνολικό διάλυμα 500ul, με DMEM⁺⁺⁺ και

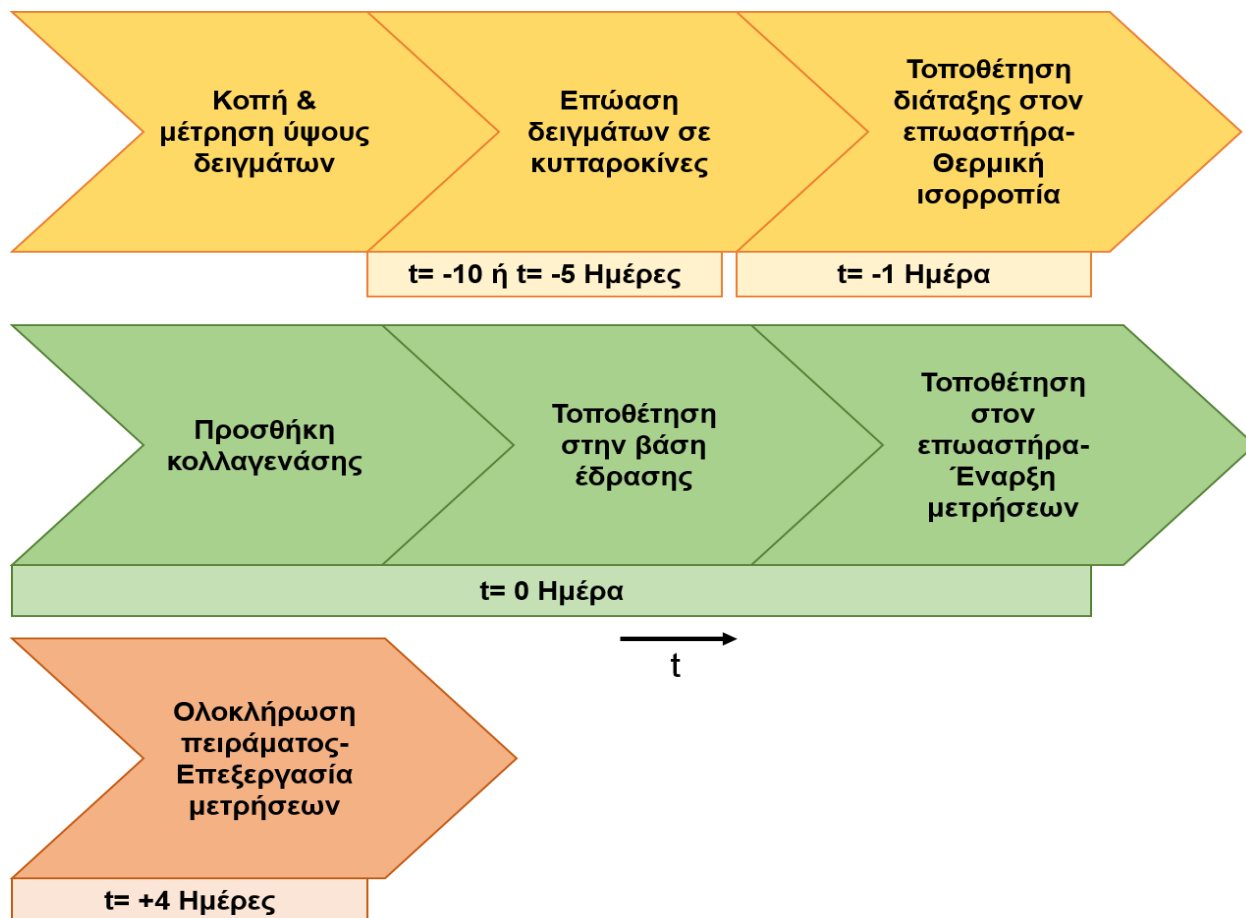
μία από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις κολλαγενάσης (1mg/ml, 0.5mg/ml, 0.25mg/ml 0.125mg/ml και 0mg/ml), και στη συνέχεια λήφθηκαν μετρήσεις απόστασης για ~3 ημέρες.

Προετοιμασία για μελέτη της επίδρασης των κυτταροκινών

Οι IL1- α , IL1- β και TNF- α απαρτίζουν την «πρωταγωνιστική» ομάδα των καταβολικών για το χόνδρο κυτταροκινών. Η ποσοτικοποίηση της επίδρασης που έχουν στον εκφυλισμό του χόνδρου επιχειρήθηκε να γίνει, ελέγχοντας εάν επηρεάζουν τον ρυθμό αποδόμησης της εξωκυττάριας μήτρας που προκαλείται από κατεργασία με διάλυμα κολλαγενάσης. Για το συγκεκριμένο πείραμα λήφθηκαν δεδομένα από την ανώτερη περιοχή (D) της κεφαλής ισχίου ενός δότη, ηλικίας 72 ετών.

Συγκεκριμένα, τα δείγματα επώαστηκαν έξω από την διάταξη HDD, σε DMEM⁺⁺⁺ και μία από τις 3 καταβολικές κυτταροκίνες, για 5 ή 10 ημέρες, (Ημέρα -10 ή Ημέρα -5 έως Ημέρα 0). Σε αυτό το χρονικό διάστημα, για να αξιολογηθεί η ανθεκτικότητα του συγκεκριμένου δείγματος στην κολλαγενάση, μελετήθηκε η αποδόμηση μετά από κατεργασία με το ένζυμο σε συγκέντρωση 1 mg/ml ή 0.5 mg/ml. Οι μετρήσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν για να επιλεγθεί, για την συνέχεια του πειράματος, συγκέντρωση κολλαγενάσης που προκαλεί σημαντική αποδόμηση σε σχέση με το control, αλλά δεν είναι αρκετά μεγάλη για να καταστρέψει το δείγμα κατά την διάρκεια 4 ημερών. Την Ημέρα 0, με βάση τα αποτελέσματα του πειράματος αξιολόγησης προστέθηκε κολλαγενάση 0.5 mg/ml, τα δείγματα τοποθετήθηκαν, με την επιφανειακή τους ζώνη προς τα κάτω (EZK), στην διάταξη HDD και ξεκίνησε η λήψη μετρήσεων μέχρι την Ημέρα 4.

Στην *Εικόνα IV-8* παρουσιάζεται η χρονική εξέλιξη της πειραματικής διαδικασίας, ενώ στον *Πίνακα IV-1* συνοψίζονται οι πληροφορίες του πειράματος την Ημέρα 0.



Εικόνα IV-8. Διάγραμμα χρονικής εξέλιξης της πειραματικής διαδικασίας.

Group A: IL1-a (100ng/ml)	Group B: IL1-b (100ng/ml)	Group Γ: TNF-a (200ng/ml)
10 Ημέρες Επώασης (10HE) + 0.5mg/ml κολλαγενάση	10 Ημέρες Επώασης (10HE) + 0.5mg/ml κολλαγενάση	10 Ημέρες Επώασης (10HE) + 0.5mg/ml κολλαγενάση
5 Ημέρες Επώασης (10HE) + 0.5mg/ml κολλαγενάση	5 Ημέρες Επώασης (10HE) + 0.5mg/ml κολλαγενάση	5 Ημέρες Επώασης (10HE) + 0.5mg/ml κολλαγενάση
Κατεργασία με Κολλαγενάση 0.50mg/ml (ΚΚ)	Κατεργασία με Κολλαγενάση 0.50mg/ml (ΚΚ)	Κατεργασία με Κολλαγενάση 0.50mg/ml (ΚΚ)
Χωρίς Κατεργασία (ΧΚ)	Χωρίς Κατεργασία (ΧΚ)	Χωρίς Κατεργασία (ΧΚ)

Πίνακας IV-1. Σύνοψη πληροφοριών πειράματος την χρονική στιγμή: Ημέρα 0.

4. Στατιστική επεξεργασία μετρήσεων

Τα δεδομένα σχετικής παραμόρφωσης (Strain) που λήφθηκαν από τα πειράματα μέτρησης προσαρμόστηκαν σε συνάρτηση της μορφής:

$$f(t) = a * (1 - e^{-bt})$$

και στη συνέχεια η παράμετρος a χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των καμπυλών. Για τη σύγκριση επιλέχθηκε η μέθοδος one way ANOVA, για να διαπιστωθεί αν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των συγκρινόμενων ομάδων. Στη συνέχεια ελέγχθηκαν όλοι οι πιθανοί συνδυασμοί καμπυλών και επιλέχθηκαν εκείνες που ήταν στατιστικά σημαντικές με βάση το p -value.

Η σχετική παραμόρφωση (Strain) (e) υπολογίζεται ως ο λόγος της μείωσης του ύψους Δh προς το αρχικό ύψος h_0 : $e = \frac{\Delta h}{h_0}$.

Με την ίδια μέθοδο συγκρίθηκαν και οι τιμές της σχετικής παραμόρφωσης (Strain) μετά από 72 ;h 96 ώρες μετρήσεων. Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε στο περιβάλλον Matlab 2016b χρησιμοποιώντας τις εντολές `anova1()` και `multcompare()`.

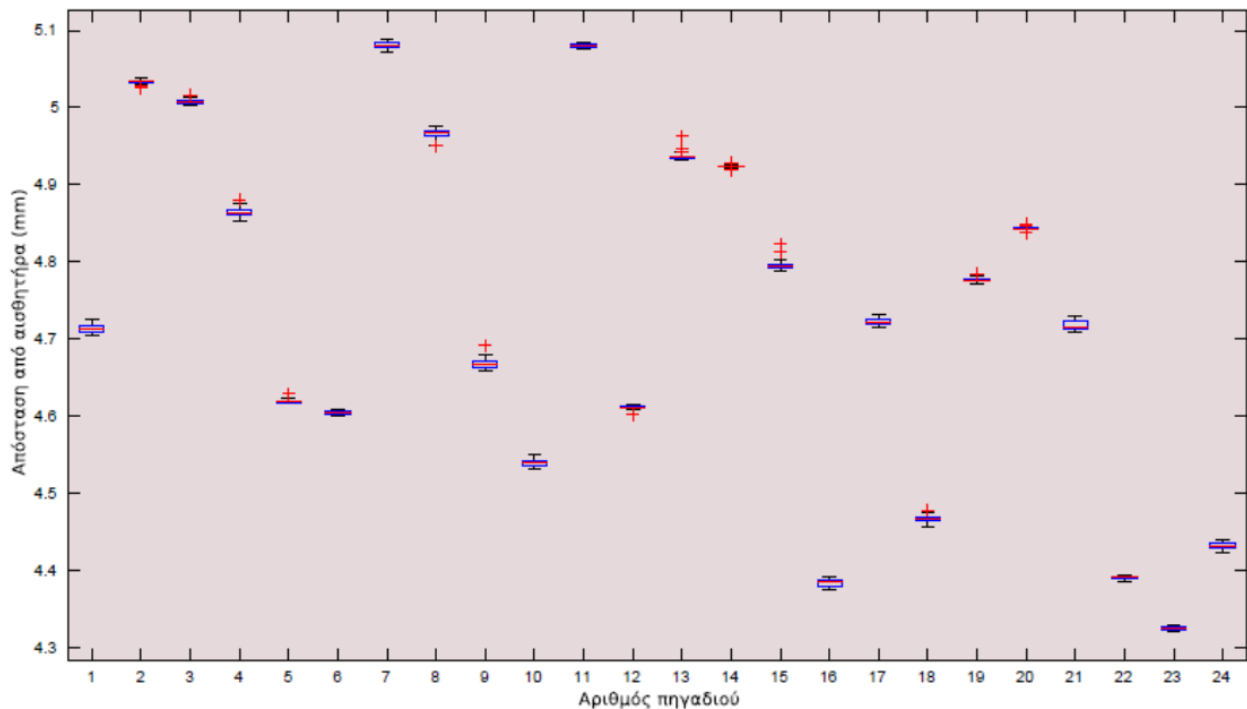
5. Αποτελέσματα

i. Πειραματική αξιολόγηση διάταξης HDD

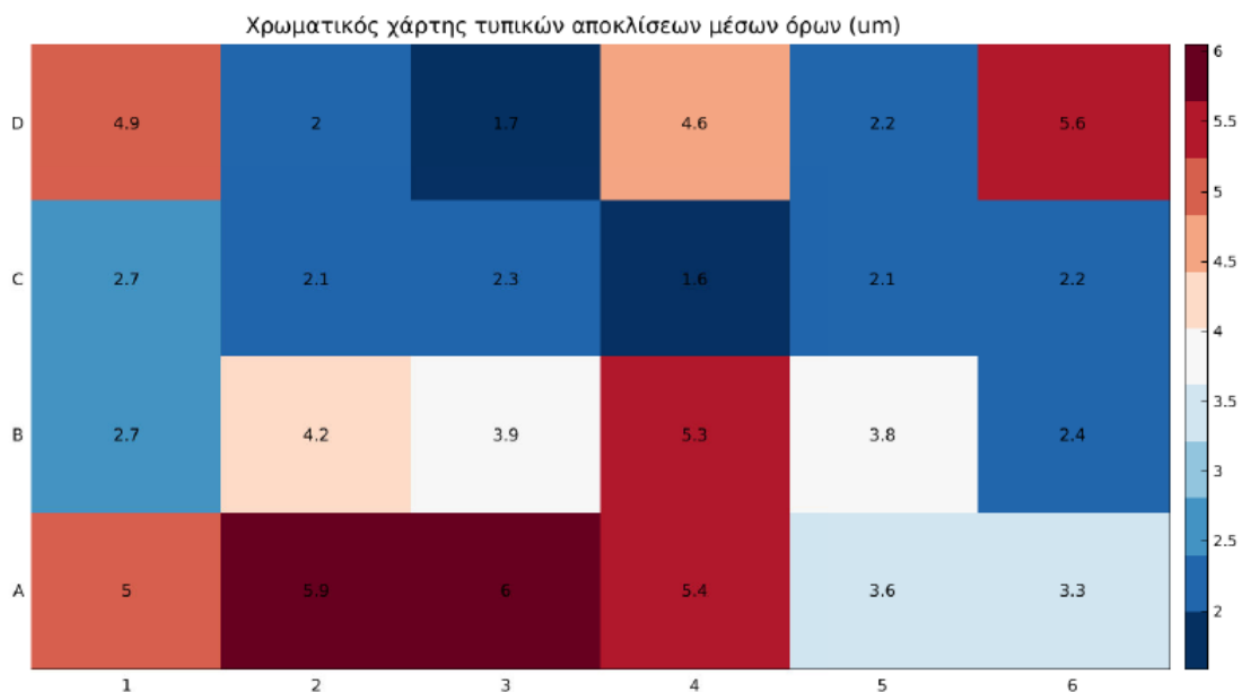
Ακρίβεια μέτρησης διάταξης

Για την εκτίμηση της μετρητικής ακρίβειας της διάταξης, υπολογίζεται ο μέσος όρος των 8 θέσεων κάθε ιντέντορα και συγκρίνεται με τους μέσους όρους κάθε οχτάδας από τον ίδιο ιντέντορα.

Αξιολογώντας την τυπική απόκλιση που προκύπτει ανά φορέα συμπίεσης, όπως αυτή φαίνεται στο θηκόγραμμα της *Εικόνας IV-9*, διαπιστώνεται ότι η μέγιστη απόσταση ιντέντορα-αισθητήρα, είναι 5.01mm, ενώ η ελάχιστη 4,32mm. Επιπλέον φαίνεται ότι το εύρος κάθε κουτιού του διαγράμματος, είναι μικρό και οι ακραίες τιμές που βρίσκονται έξω από αυτό είναι λίγες και δεν απέχουν πολύ. Στην *Εικόνα IV-10* παρουσιάζεται η τυπική απόκλιση των μέσων τιμών των 8 θέσεων ανά ιντέντορα, σε ένα χρωματικό διάγραμμα του οποίου η διάταξη (4x6), αντιστοιχεί στον τρόπο με τον οποίο τοποθετούνται οι φορείς συμπίεσης στη βάση έδρασης δειγμάτων. Παρατηρείται μέγιστη τυπική απόκλιση 6um και ελάχιστη 1.6um, γεγονός που εξασφαλίζει ικανοποιητική ακρίβεια μέτρησης του οργάνου και φανερώνει ότι οι κατασκευαστικές αλλαγές που έγιναν δεν επηρέασαν την αρχική ακρίβεια της διάταξης [13].



Εικόνα IV-9. Θηκόγραμμα μέσων όρων των μετρήσεων ανά ιντέντορα.

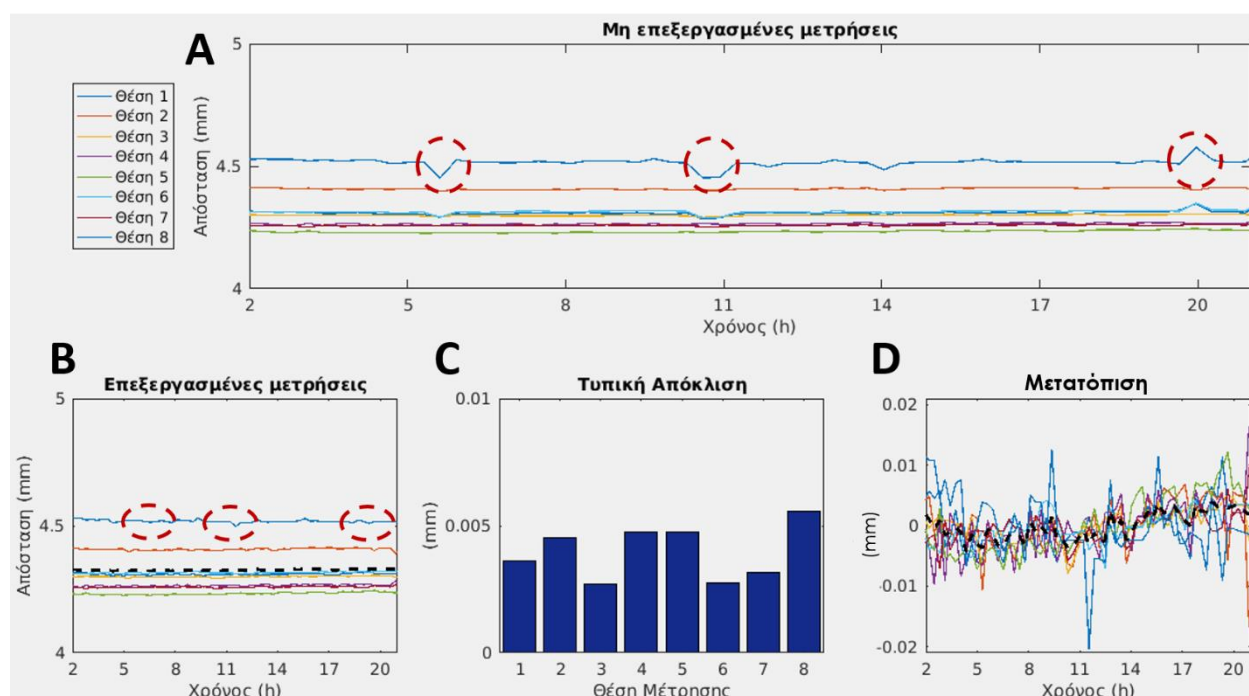


Εικόνα IV-10. Χρωματικό διάγραμμα τυπικής απόκλισης των μέσων τιμών 8 θέσεων κάθε ιντέ-
ντορα.

Σφάλμα Μετρήσεων

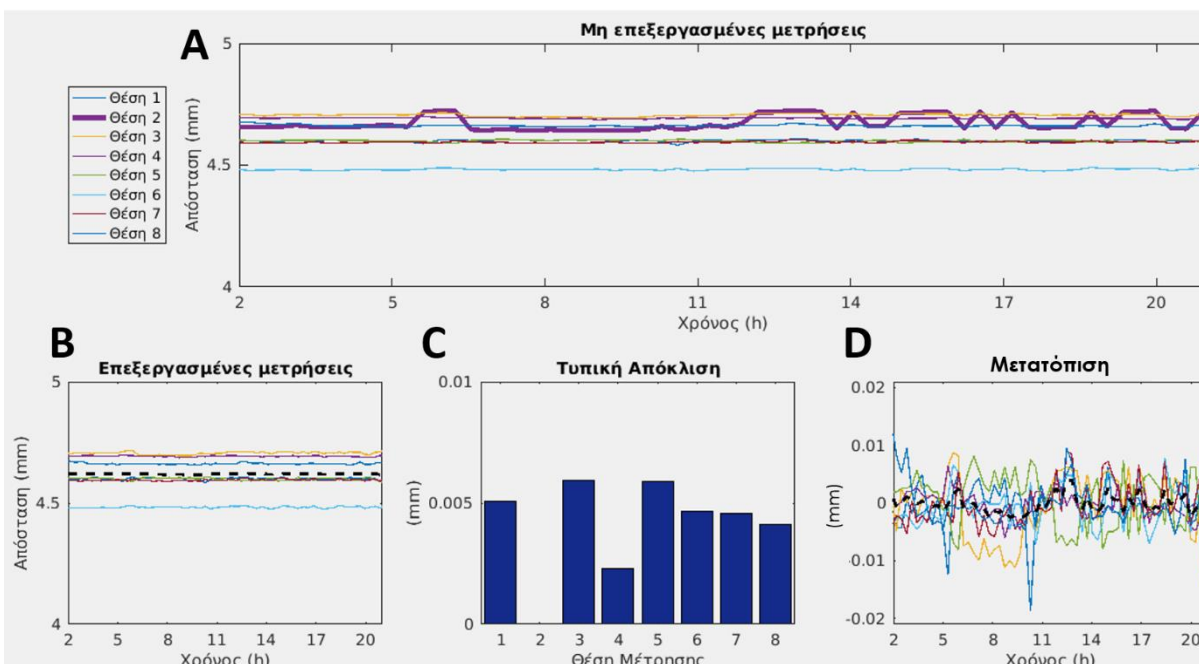
Οι μετρήσεις απόστασης που λαμβάνει ο αισθητήρας από τις οχτώ θέσεις της επι-
φάνειας μετρήσεων, κάθε φορά συμπίεσης, παρουσιάζουν ορισμένες φορές σφάλμα το
οποίο φαίνεται να κατατάσσεται σε δύο κατηγορίες. Είτε παρατηρούνται ορισμένες κορυ-
φές, που οφείλονται σε μετρούμενες τιμές πολύ μεγαλύτερες ή πολύ μικρότερες από την
μέση μετρούμενη τιμή της συγκεκριμένης θέσης μέτρησης (Κατηγορία I), είτε παρατηρού-
νται τυχαίες μεταβάσεις μεταξύ δύο τιμών στην μεγαλύτερη έκταση του μετρούμενου σή-
ματος (Κατηγορία II) (Εικόνα IV-11 και Εικόνα IV-12 αντίστοιχα).

Ανάλογα με την κατηγορία του σφάλματος επιλέγεται και ο τρόπος διαχείρισής του. Τα σφάλματα Κατηγορίας I, που πιθανώς να προέρχονται από κάποιο σημείο του φορέα συμπίεσης που δεν είναι λείο ή από εξωτερικούς παράγοντες (πχ άνοιγμα πόρτας του επωαστήρα, λειτουργία άλλων οργάνων στον ίδιο χώρο κ.α.), απομακρύνονται αποτελεσματικά με την χρήση ενός φίλτρου διαμέσου (median filter) που εφαρμόζεται στις γειτονικές του μετρήσεις (Εικόνα IV-11). Αντίθετα στα σφάλματα Κατηγορίας II, που πιθανώς εμφανίζονται λόγω ηλεκτρονικού θορύβου σε μία το πολύ θέση μέτρησης, δεν εφαρμόζεται αποτελεσματικά φίλτρο διαμέσου και λόγω του ότι είναι ορατά στην μεγαλύτερη έκταση του σήματος, οι μετρήσεις της συγκεκριμένης θέσης δεν θεωρούνται αξιόπιστες. Κατά



Εικόνα IV-11. Μετρήσεις που περιέχουν σφάλμα Κατηγορίας I. **A**: Οι μη επεξεργασμένες μετρήσεις απόστασης της επιφάνειας μέτρησης ενός φορέα συμπίεσης από τον αισθητήρα. Κάθε καμπύλη αντιστοιχεί σε μετρήσεις μίας από τις 8 θέσεις σε συνάρτηση με τον χρόνο. Σημειωμένες, με κύκλο, φαίνονται οι κορυφές που οφείλονται σε εσφαλμένες μετρήσεις. **B**: Οι μετρήσεις των ίδιων θέσεων μετά την αφαίρεση των σφαλμάτων Κατηγορίας I. **C**: Η τυπική απόκλιση για κάθε θέσης μέτρησης, μετά την αφαίρεση των σφαλμάτων Κατηγορίας I (<6μm για όλες τις θέσεις). **D**: Μετατόπιση του φορέα συμπίεσης για κάθε μία από τις 8 μετρούμενες θέσεις, μετά την αφαίρεση του σφάλματος Κατηγορίας I.

συνέπεια οι θέσεις που εμφανίζουν σφάλμα Κατηγορίας II, δεν λαμβάνονται υπ' όψει κατά την επεξεργασία των μετρήσεων του συγκεκριμένου ιντέντορα (Εικόνα IV-12).

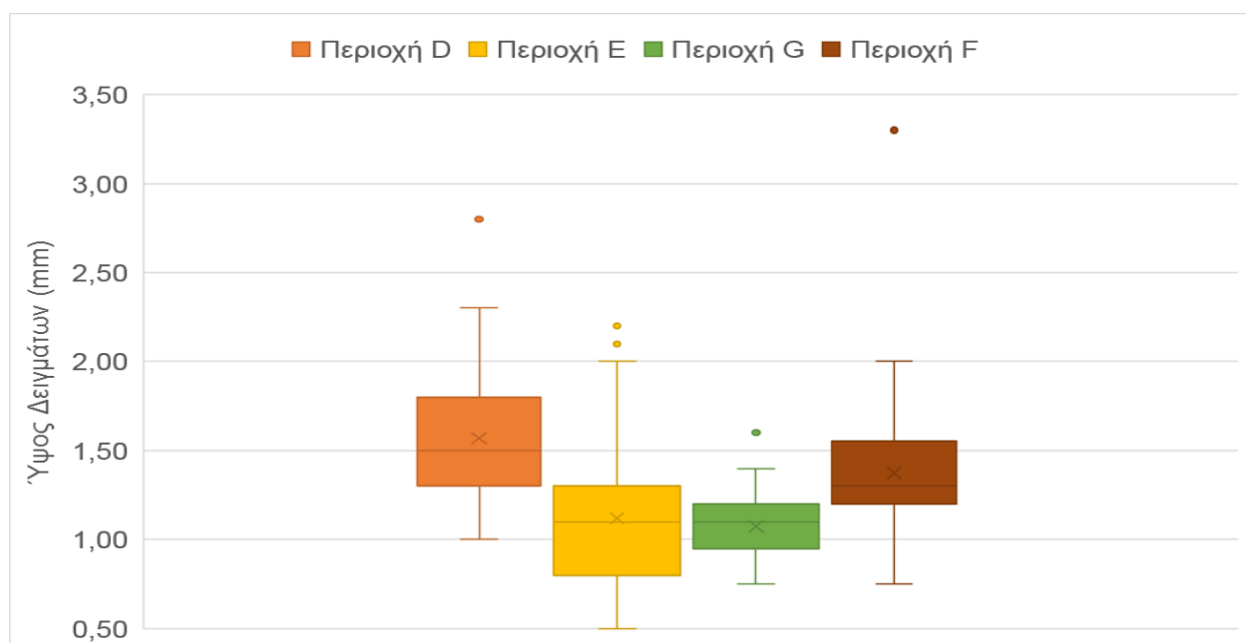


Εικόνα IV-12. Μετρήσεις που περιέχουν σφάλμα Κατηγορίας II. **A**: Οι μη επεξεργασμένες μετρήσεις απόστασης της επιφάνειας μέτρησης ενός φορέα συμπίεσης από τον αισθητήρα. Κάθε καμπύλη αντιστοιχεί σε μετρήσεις μίας από τις 8 θέσεις σε συνάρτηση με τον χρόνο. Σημειωμένη φαίνεται η Θέση 2 στην οποία εμφανίζεται το σφάλμα. **B**: Οι μετρήσεις των ίδιων θέσεων μετά την αφαίρεση της Θέσης 2. **C**: Η τυπική απόκλιση για κάθε θέση μέτρησης, μετά την αφαίρεση της Θέσης 2 ($<7\mu\text{m}$ για όλες τις θέσεις). **D**: Μετατόπιση του φορέα συμπίεσης για κάθε μία από τις 8 μετρούμενες θέσεις, μετά την αφαίρεση της Θέσης 2.

Η λήψη μετρήσεων από 8 θέσεις, κάθε φορά, πάνω από καθένα από τους 24 φορείς συμπίεσης, εξασφαλίζει αρκετές μετρήσεις ώστε να μην χάνεται σημαντική πληροφορία στην περίπτωση που κάποια από τις θέσεις δεν λαμβάνεται υπ' όψει λόγω σφαλματος. Τελικά η διαχείριση των σφαλμάτων μέτρησης της διάταξης οδηγεί σε ακρίβεια ικανοποιητική όπως αυτή παρουσιάστηκε στο προηγούμενο εδάφιο («Ακρίβεια μέτρησης της διάταξης»).

ii. Χαρακτηρισμός Δειγμάτων Χόνδρου

Στην *Εικόνα IV-13* φαίνεται το θηκόγραμμα (boxplot) που παρουσιάζει τις μετρήσεις ύψους δειγμάτων αρθρικού χόνδρου, προερχόμενων από 4 περιοχές της κεφαλής ισχίου (*Εικόνα I-1*). Στον *Πίνακα IV-2* παρατίθεται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση του ύψους των δειγμάτων κάθε περιοχής.



Εικόνα IV-13. Σύγκριση ύψους δειγμάτων χόνδρου, ανά περιοχή της κεφαλής ισχίου.

	Μέση τιμή (mm)	Τυπική απόκλιση (mm)
Περιοχή D	1,57	0,35
Περιοχή E	1,12	0,39
Περιοχή G	1,07	0,19
Περιοχή F	1,37	0,39

Πίνακας IV-2. Σύγκριση μέσης τιμής και τυπικής απόκλισης του ύψους των δειγμάτων προερχόμενων από διαφορετικές περιοχές της κεφαλής ισχίου, 3 δοτών.

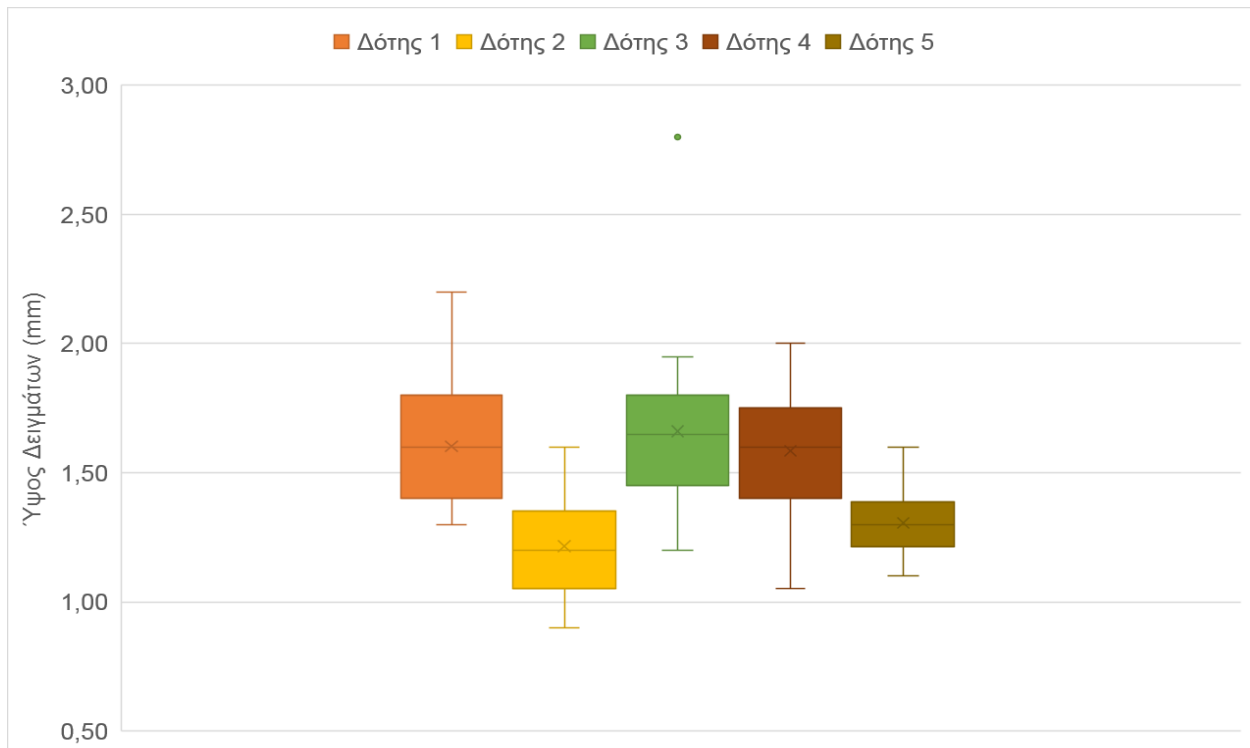
Παρατηρήθηκε ότι η ανώτερη και η οπίσθια περιοχή (D και F), εμφανίζουν αρκετά μεγαλύτερη μέση τιμή (1.57 και 1.37 mm) από την κατώτερη, Περιοχή G, (1.07mm) και

την πρόσθια, Περιοχή E, (1.12mm). Η τελευταία παρουσιάζει και αρκετά μεγάλο εύρος τιμών με τυπική απόκλιση 0,39 mm, επομένως απορρίπτεται καθώς δεν πληροί τα κριτήρια που αναφέρθηκαν παραπάνω. Αντίστοιχα η Περιοχή G, αν και εμφανίζει μικρό εύρος τιμών και την μικρότερη τυπική απόκλιση 0.19 mm απορρίπτεται αφού η μέση τιμή των δειγμάτων που προέρχονται από αυτήν είναι μικρή (1.07mm). Μένει λοιπόν η επιλογή μεταξύ της Περιοχής D και F, από τις οποίες επιλέγεται τελικά η Περιοχή D λόγω του μικρότερου εύρους του ύψους των δειγμάτων που προέρχονται από αυτή και της μικρότερης τυπικής απόκλισης (0,35mm) σε σχέση με την F (0,39mm).

Με βάση τα συμπεράσματα αυτά, τα δείγματα που έχουν επιλεγθεί για την διεξαγωγή πειραμάτων μελέτης αποδόμησης του αρθρικού χόνδρου, προέρχονται στο σύνολό τους από την ανώτερη περιοχή (D) της κεφαλής ισχίου.

Στο θηκόγραμμα (boxplot) της *Εικόνας IV-14*, φαίνονται οι μετρήσεις ύψους δειγμάτων αρθρικού χόνδρου προερχόμενων από την ανώτερη περιοχή (D) της κεφαλής ισχίου για πέντε δότες. Στον *Πίνακα IV-3* παρατίθεται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση του ύψους των δειγμάτων χόνδρου, που προέρχονται από την ανώτερη περιοχή (D), των πέντε δοτών.

Παρατηρείται ότι η μέγιστη και η ελάχιστη τιμή για όλους τους δότες είναι 2.80mm και 0.90mm αντίστοιχα. Παρά την μεγάλη διαφορά των ακραίων τιμών, φαίνεται ότι η μέση τιμή τριών από τους δότες κυμαίνεται μεταξύ 1.58 και 1.66mm, ενώ των υπόλοιπων δύο μεταξύ 1.22 και 1.31mm. Οι μικρότερες διαστάσεις των δειγμάτων, που προέρχονται από αυτούς τους δύο δότες, ενδέχεται να οφείλονται σε παράγοντες όπως η ηλικία ή η μικρότερη σωματική διάπλαση.



Εικόνα IV-14. Σύγκριση ύψους δειγμάτων προερχόμενων από την Περιοχή D, για 5 διαφορετικούς δότες.

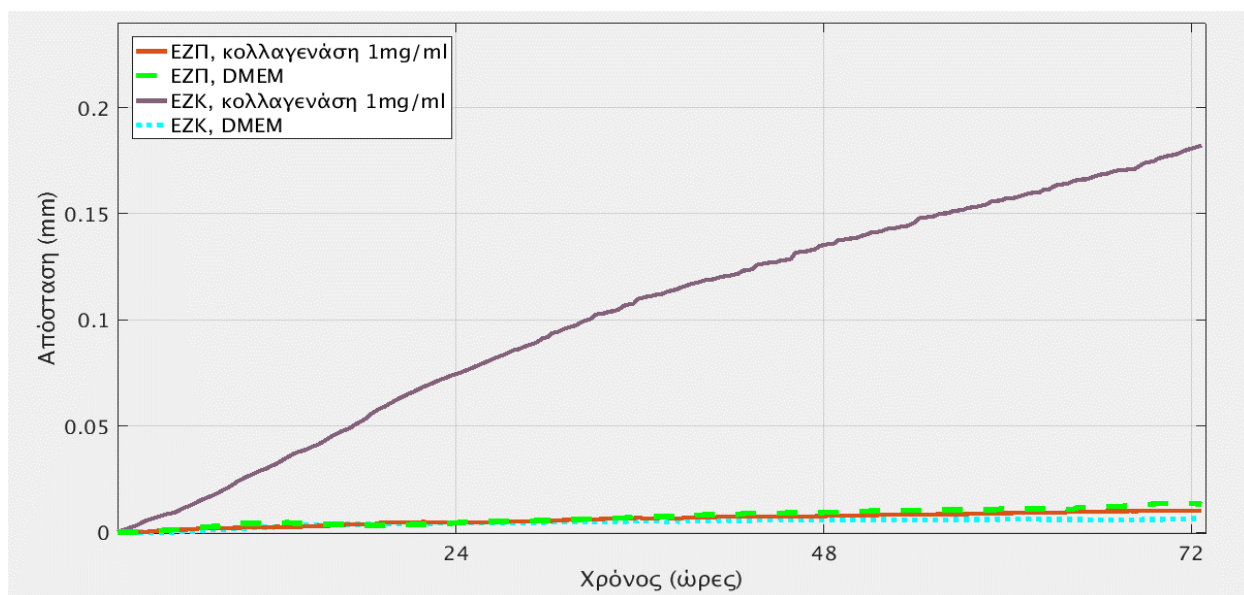
	Μέση τιμή (mm)	Τυπική απόκλιση (mm)
Δότης 1	1,60	0,24
Δότης 2	1,22	0,19
Δότης 3	1,66	0,32
Δότης 4	1,58	0,23
Δότης 5	1,31	0,12

Πίνακας IV-3. Σύγκριση μέσης τιμής και τυπικής απόκλισης του ύψους των δειγμάτων προερχόμενων από την ανώτερη περιοχή (D) της κεφαλής ισχίου, 5 δοτών.

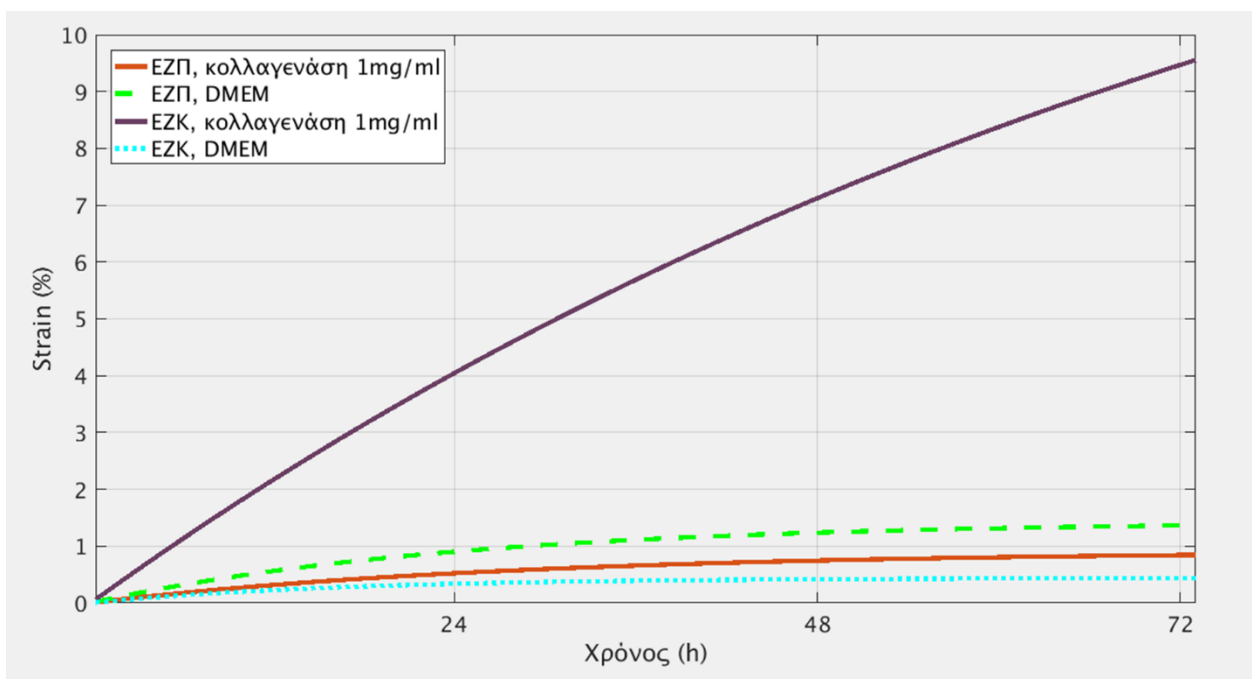
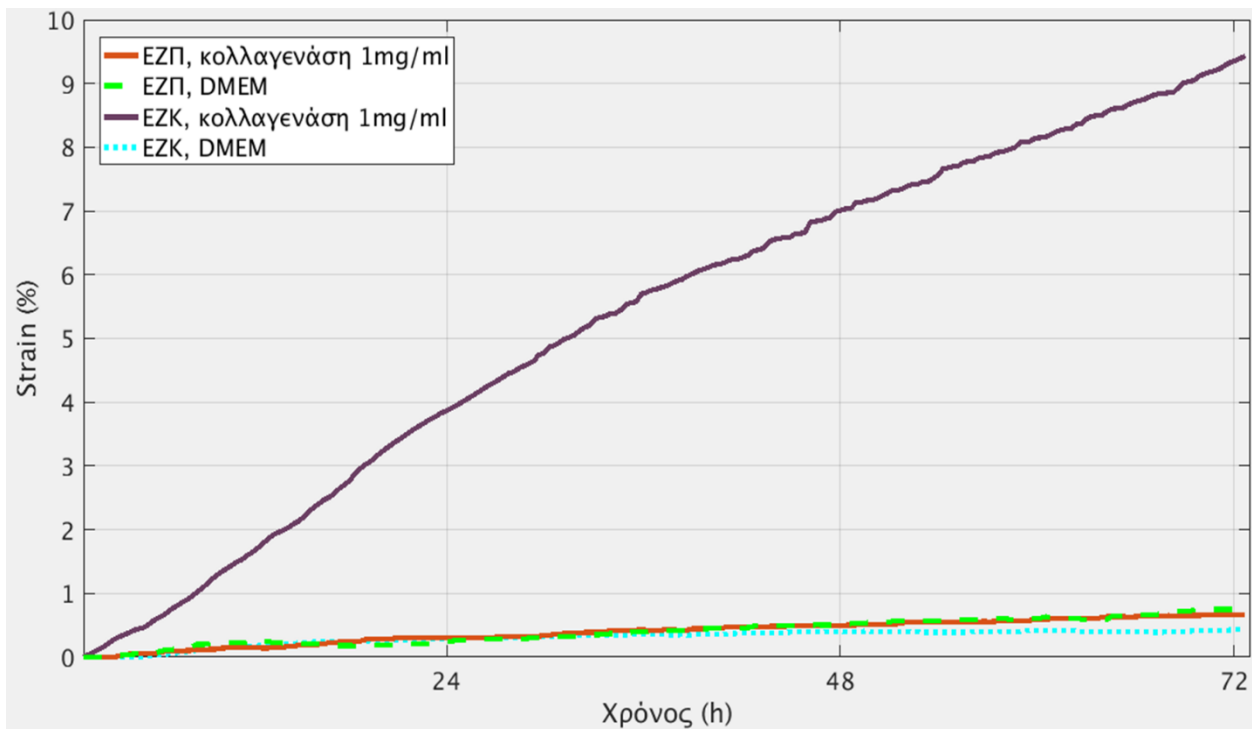
iii. Επίδραση Προσανατολισμού Δείγματος στην Αποδόμηση

Επίδραση της θέσης της επιφανειακής ζώνης στην αποδόμηση του χόνδρου

Στην *Εικόνα IV-15* φαίνονται οι μετρήσεις μετατόπισης μετά από κατεργασία με κολλαγενάση ανάλογα με την θέση της επιφανειακής ζώνης των δειγμάτων. Στην *Εικόνα IV-16* φαίνονται οι αντίστοιχες μετρήσεις και καμπύλες για τη σχετική παραμόρφωση (Strain) και οι καμπύλες των εκθετικών συναρτήσεων στις οποίες προσαρμόστηκαν.



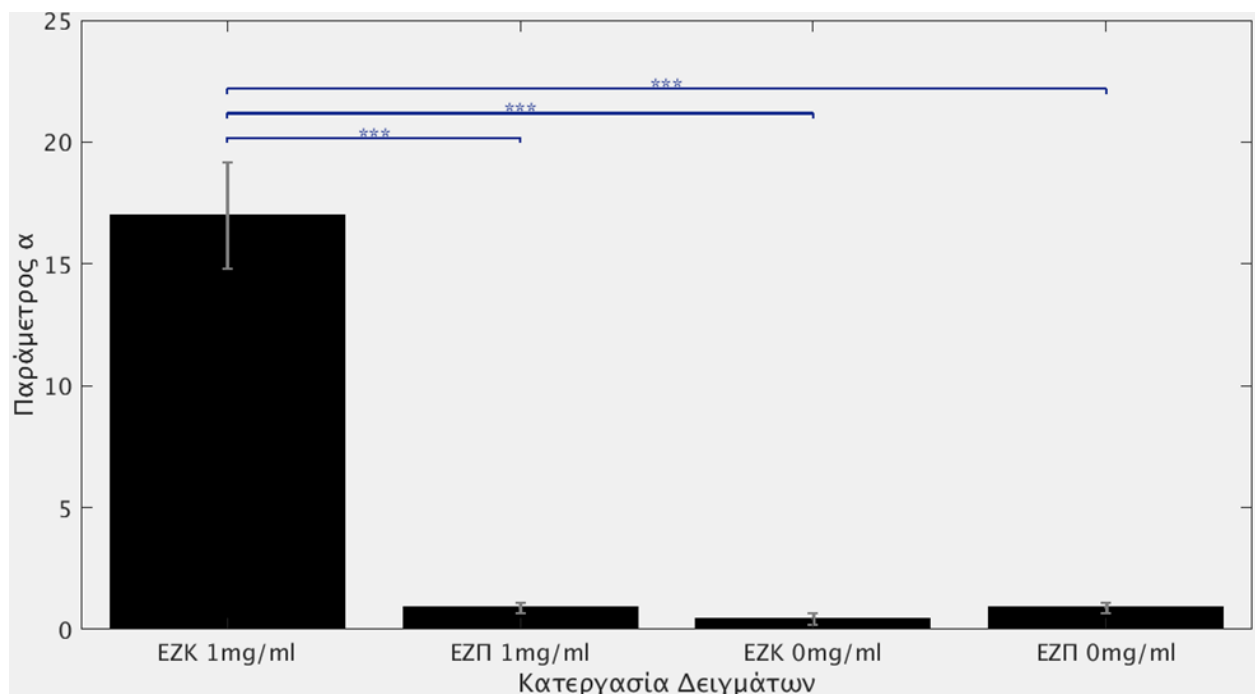
Εικόνα IV-15. Μετρήσεις μετατόπισης για την μελέτη της επίδρασης της θέσης της επιφανειακής ζώνης κατά την κατεργασία με κολλαγενάση. EZP: Επιφανειακή Ζώνη προς τα Πάνω, EZK: Επιφανειακή Ζώνη προς τα Κάτω, 1mg/ml: Κατεργασία με κολλαγενάση σε συγκέντρωση 1mg/ml και DMEM: Χωρίς ενζυμική κατεργασία.



Εικόνα IV-16. Μελέτη της επίδρασης της θέσης της επιφανειακής ζώνης κατά την κατεργασία με κολλαγενάση. Μετρήσεις σχετικής παραμόρφωσης (Strain) (Επάνω) και προσαρμογή των μετρήσεων σε εκθετικές συναρτήσεις της μορφής $f(t)=a(1-e^{-bt})$ (Κάτω). EZΠ: Επιφανειακή Ζώνη προς τα Πάνω, EZΚ: Επιφανειακή Ζώνη προς τα Κάτω, 1mg/ml: Κατεργασία με κολλαγενάση σε συγκέντρωση 1mg/ml και DMEM: Χωρίς ενζυμική κατεργασία.

Τα πειραματικά αποτελέσματα της αποδόμησης του χόνδρου, δείχνουν ότι τα δείγ-

ματα που βρίσκονταν σε διάλυμα με κολλαγενάση και με την επιφανειακή τους ζώνη προς τα κάτω (EZK, 1mg/ml), παρουσίασαν μέγιστη αποδόμηση ~200um και απώλεια του αρχικού τους ύψους κατά ~10%, ενώ εκείνα που τοποθετήθηκαν σε διάλυμα με ίδια συγκέντρωση ενζύμου αλλά με την επιφανειακή τους ζώνη προς τα επάνω (EZΠ, 1mg/ml), παρουσίασαν μέγιστη αποδόμηση ~10um (0.5% απώλεια του αρχικού τους ύψους), όμοια δηλαδή με εκείνη των δειγμάτων που δεν έχουν υποστεί ενζυμική κατεργασία (EZΠ, DMEM και EZK, DMEM).



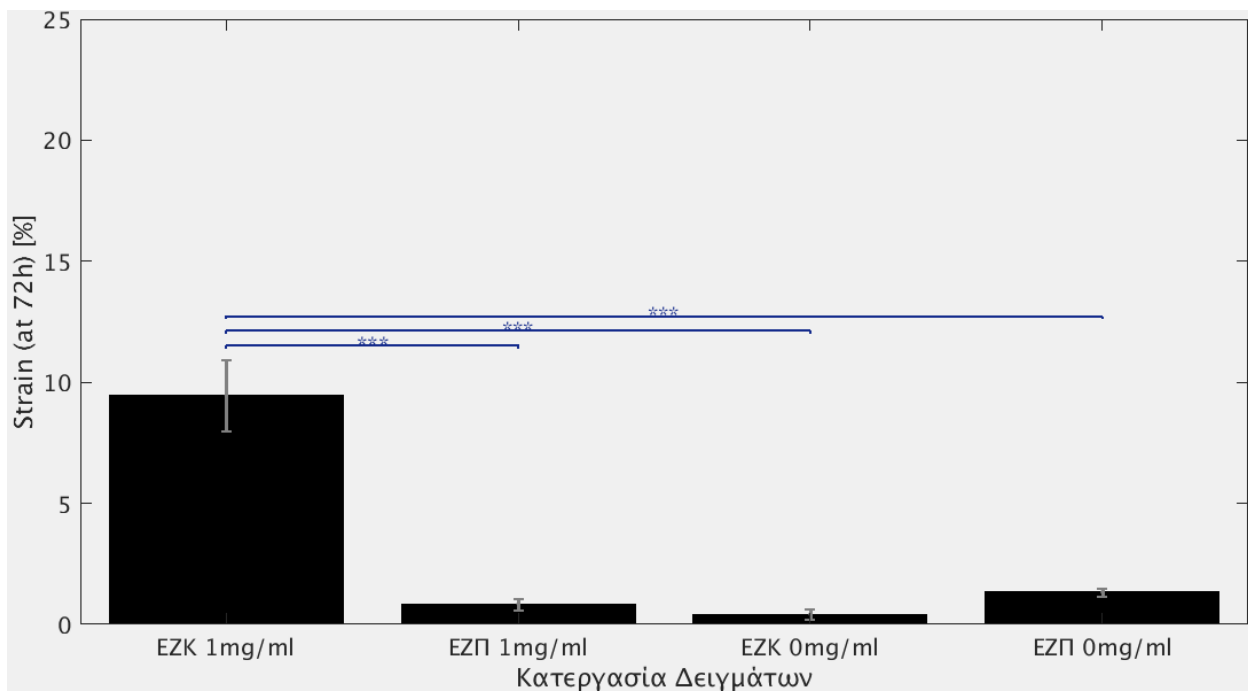
Εικόνα IV-17. Σύγκριση παραμέτρου α, των εκθετικών συναρτήσεων $f(t)=a(1-e^{-bt})$, με βάση τον προσανατολισμό της επιφανειακής τους ζώνης. ***: $p < 0.001$. Τα δεδομένα παρουσιάζονται στην μορφή: μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα μέσης τιμής (mean ± SEM).

	a	b	n
EZΠ 1mg/ml	0,91	0,03	3
EZΠ DMEM	1,43	0,04	3
EZK 1mg/ml	16,9	0,01	3
EZK DMEM	0,44	0,05	3

Εικόνα IV-18. Μέση τιμή παραμέτρων α, b με βάση τον προσανατολισμό της επιφανειακής ζώνης και την κατεργασία με κολλαγενάση. n: Πλήθος δειγμάτων. EZΠ: Επιφανειακή Ζώνη προς τα Πάνω, EZK: Επιφανειακή Ζώνη προς τα Κάτω, 1mg/ml: Κατεργασία με κολλαγενάση σε συγκέντρωση 1mg/ml και DMEM: Χωρίς ενζυμική κατεργασία.

Συγκρίνοντας την παράμετρο α, των εκθετικών συναρτήσεων (Εικόνα IV-17) αλλά και την τιμή της σχετικής παραμόρφωσης μετά από 72 ώρες μέτρησης (Εικόνα IV-19),

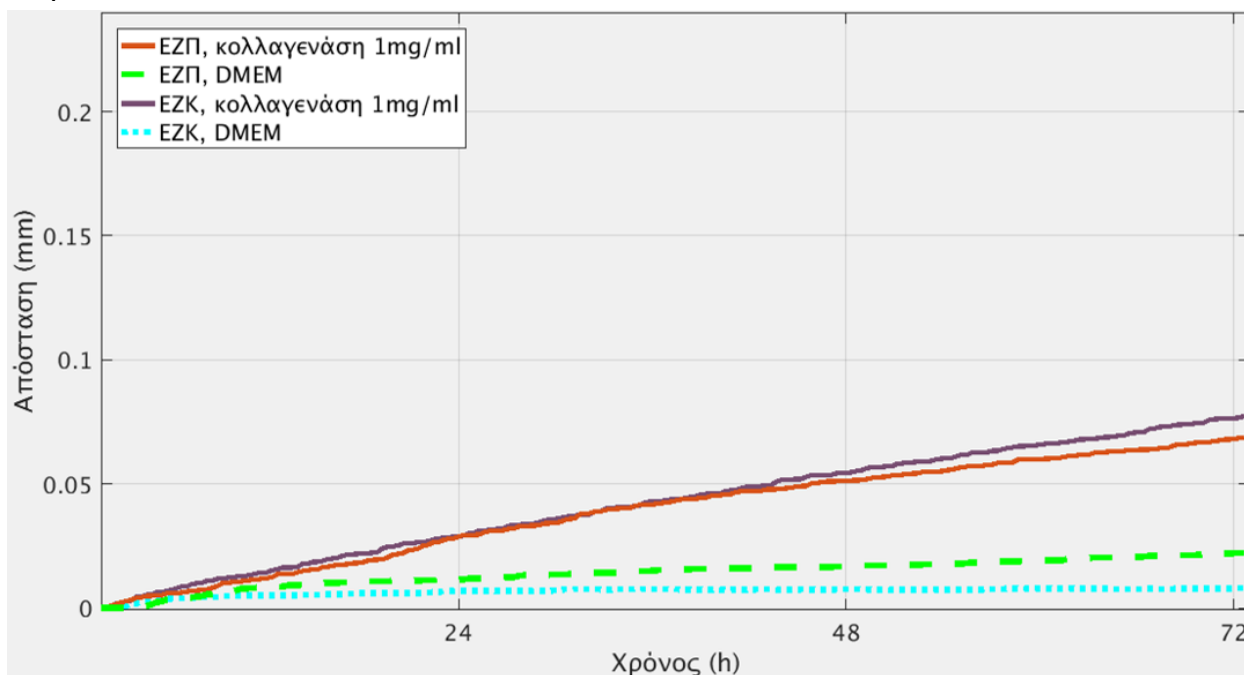
προέκυψε ότι η διαφορά της αποδόμησης των δειγμάτων με την επιφανειακή ζώνη προς τα κάτω, σε διάλυμα κολλαγενάσης (EZK, 1mg/ml), με αυτών σε διάλυμα κολλαγενάσης με την επιφανειακή ζώνη προς τα επάνω (EZΠ, 1mg/ml), είναι στατιστικά σημαντική ($p_a=5.6e-5$ και $p_{\text{Strain72h}}=2.6e-4$). Επίσης σημαντική είναι η διαφορά της, με την αποδόμηση, εκείνων που βρίσκονται σε διάλυμα χωρίς ένζυμο, ανεξάρτητα από τη θέση της επιφανειακής ζώνης, (EZK, DMEM με $p_a=2.2e-5$ και $p_{\text{Strain72h}}=9.6e-5$) και (EZΠ, DMEM με $p_a=3.37e-5$ και $p_{\text{Strain72h}}=1.9e-4$).



Εικόνα IV-19. Σύγκριση σχετικής παραμόρφωσης (Strain) των δειγμάτων μετά από 72 ώρες, με βάση τον προσανατολισμό της επιφανειακής τους ζώνης. ***: $p < 0.001$. Τα δεδομένα παρουσιάζονται στην μορφή: μέση τιμή \pm τυπικό σφάλμα μέσης τιμής (mean \pm SEM).

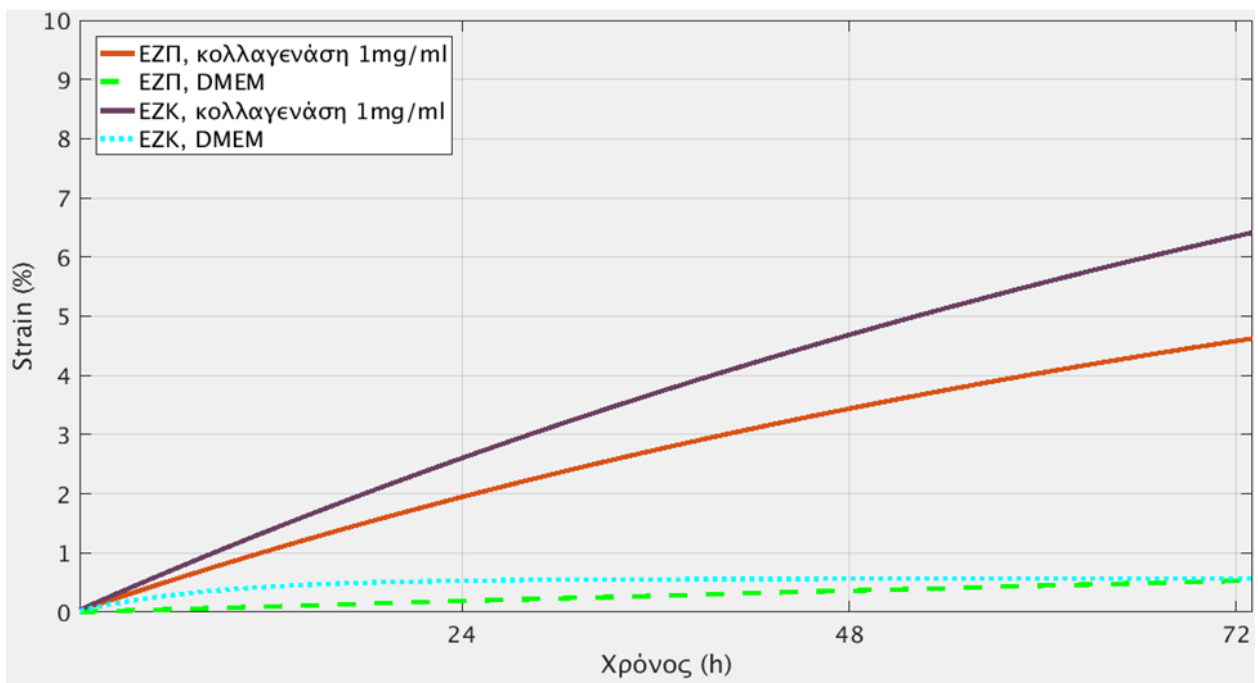
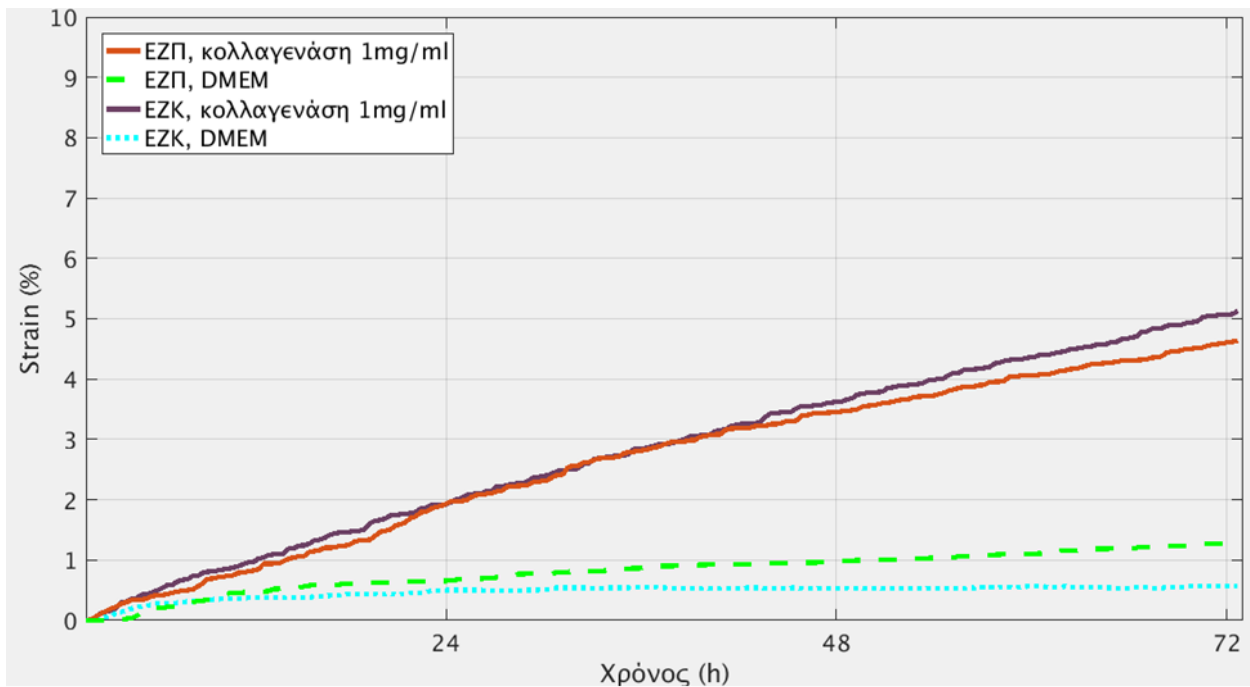
Επίδραση της οπής 1mm στην αποδόμηση του χόνδρου

Στην *Εικόνα IV-20* φαίνονται οι μετρήσεις μετατόπισης μετά από κατεργασία με κολλαγενάση ανάλογα με την θέση της επιφανειακής ζώνης των δειγμάτων με οπή 1mm . Στην *Εικόνα IV-21* φαίνονται οι αντίστοιχες μετρήσεις και καμπύλες για την σχετική παραμόρφωση (Strain) και οι καμπύλες των εκθετικών συναρτήσεων στις οποίες προσαρμόστηκαν.



Εικόνα IV-20. Μετρήσεις μετατόπισης για την μελέτη της επίδρασης της θέσης της επιφανειακής ζώνης κατά την κατεργασία με κολλαγενάση, σε δείγματα με οπή 1mm. EZΠ: Επιφανειακή Ζώνη προς τα Πάνω, EZΚ: Επιφανειακή Ζώνη προς τα Κάτω, 1mg/ml: Κατεργασία με κολλαγενάση σε συγκέντρωση 1mg/ml και DMEM: Χωρίς ενζυμική κατεργασία

Από τα πειραματικά αποτελέσματα της αποδόμησης του χόνδρου, φαίνεται ότι η αποδόμηση των δειγμάτων που βρίσκονταν σε διάλυμα με κολλαγενάση 1mg/ml, είτε με την επιφανειακή ζώνη προς τα επάνω (EZΠ), είτε με την επιφανειακή ζώνη προς τα κάτω (EZΚ), είναι παρόμοια και ίση περίπου με 75μm, ενώ εμφανίζουν απώλεια του αρχικού τους ύψους κατά 4.5% και 6.5% αντίστοιχα.



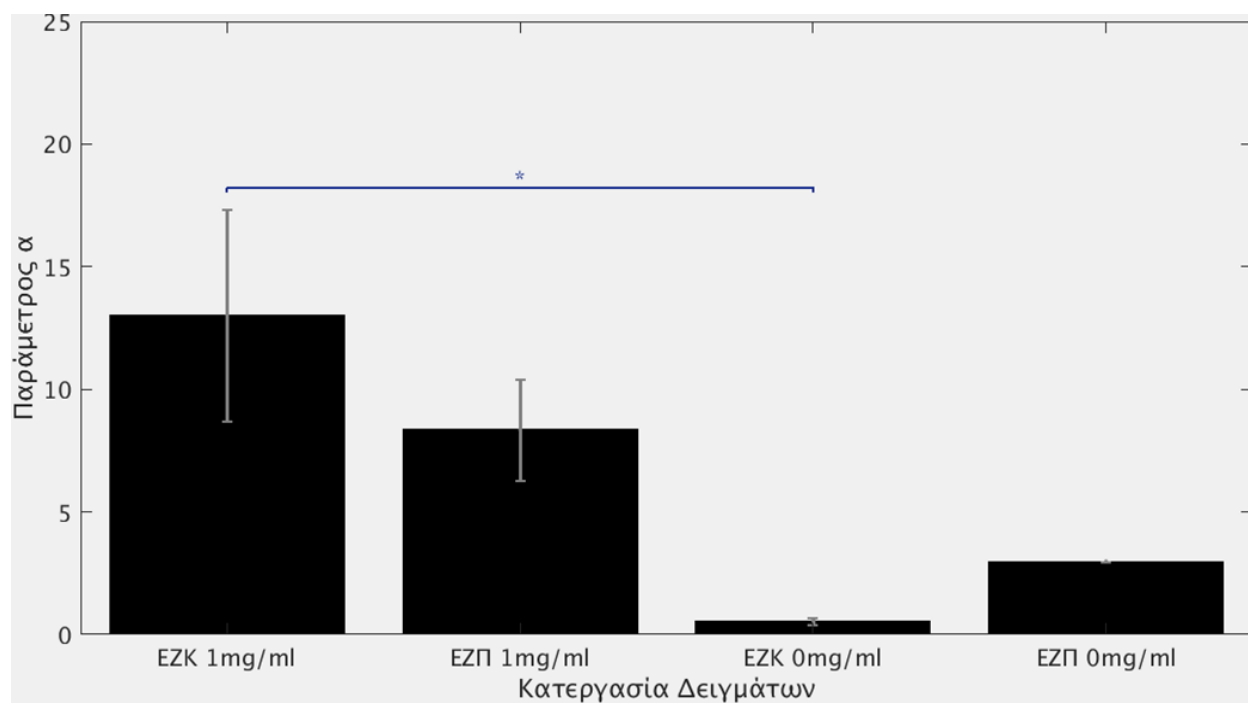
Εικόνα IV-21. Μελέτη της επίδρασης της θέσης της επιφανειακής ζώνης σε δείγματα με οπή 1mm, κατά την κατεργασία με κολλαγενάση. Μετρήσεις σχετικής παραμόρφωσης (Strain) (Επάνω) και προσαρμογή των μετρήσεων σε εκθετικές συναρτήσεις της μορφής $f(t)=a(1-e^{-bt})$ (Κάτω).

Παρατηρείται ακόμα ότι τα δείγματα με οπή, και την επιφανειακή ζώνη προς τα πάνω (EZΠ), σε DMEM⁺⁺⁺, σταθεροποιούνται μετά από 24 ώρες σε μία αποδόμηση

(~20 μ m), η οποία είναι ελαφρώς μεγαλύτερη από εκείνων που είναι τοποθετημένα αντίστροφα.

Μετά από σύγκριση της παραμέτρου α των εκθετικών συναρτήσεων (Εικόνα IV-22) και της απώλειας του αρχικού ύψους μετά από 72 ώρες μετρήσεων (Εικόνα IV-23), διαπιστώθηκε ότι η διαφορά στην αποδόμηση των δειγμάτων σε διάλυμα κολλαγενάσης (1mg/ml), με την επιφανειακή ζώνη προς τα κάτω (EZK, 1 mg/ml), με εκείνα σε διάλυμα χωρίς κολλαγενάση με την επιφανειακή ζώνη προς τα κάτω (EZK, DMEM), είναι στατιστικά σημαντική ($p_a=0.0187$ και $p_{Strain72h}=0.0234$).

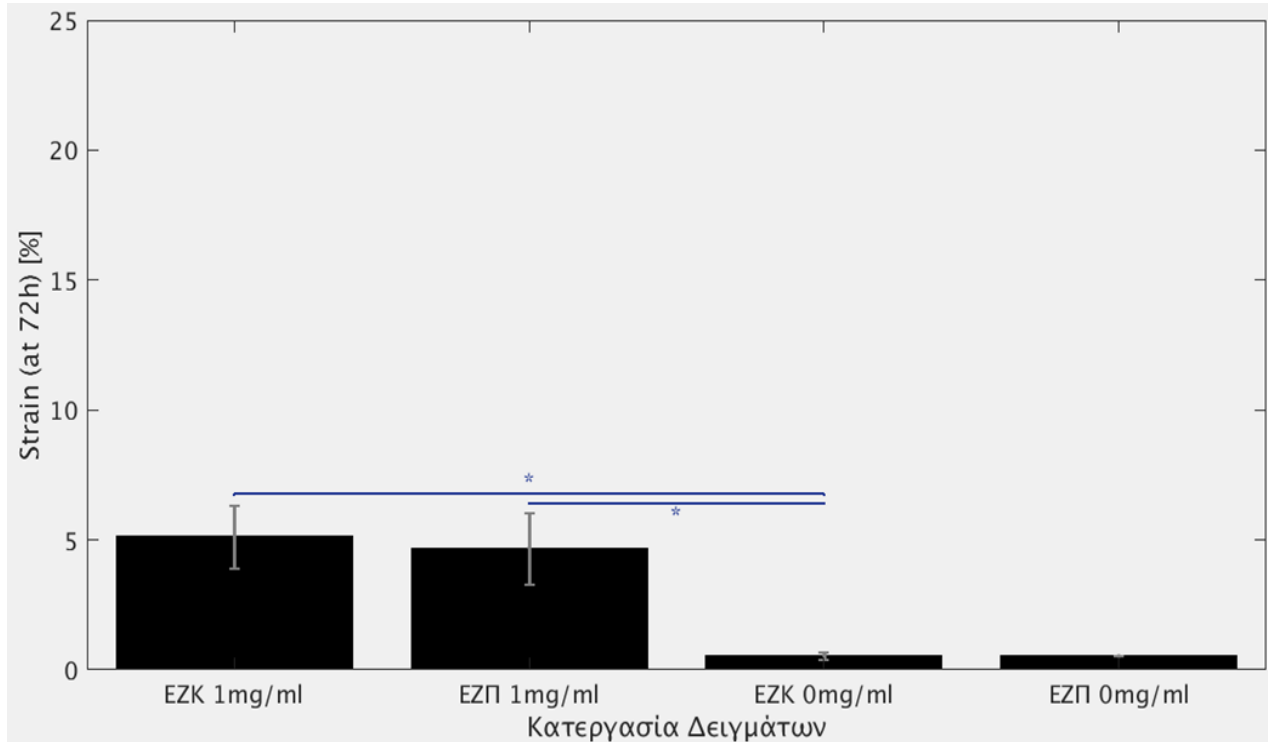
Στατιστικά σημαντική, για τα δείγματα με οπή 1mm, φαίνεται και η διαφορά στην αποδόμηση των δειγμάτων σε διάλυμα κολλαγενάσης με την επιφανειακή ζώνη προς τα πάνω (EZΠ, 1mg/ml), με εκείνα που βρίσκονται με την επιφανειακή ζώνη προς τα κάτω σε διάλυμα χωρίς κολλαγενάση (EZK, 0mg/ml) ($p_{Strain72h}=0.0342$).



Εικόνα IV-22. Σύγκριση παραμέτρου α , των εκθετικών συναρτήσεων $f(t)=a(1-e^{-bt})$, με βάση τον προσανατολισμό της επιφανειακής τους ζώνης. *: $p < 0.05$. Τα δεδομένα παρουσιάζονται στην μορφή: μέση τιμή \pm τυπικό σφάλμα μέσης τιμής ($mean \pm SEM$).

	a	b	n
EZΠ 1mg/ml	8,36	0,011	3
EZΠ DMEM	2,99	0,003	3
EZΚ 1mg/ml	13,03	0,009	3
EZΚ DMEM	0,56	0,119	3

Εικόνα IV-24. Μέση τιμή παραμέτρων a, b με βάση τον προσανατολισμό της επιφανειακής ζώνης και την κατεργασία με κολλαγενάση, σε δείγματα με οπή 1mm. n: Πλήθος δειγμάτων. EZΠ: Επιφανειακή Ζώνη προς τα Πάνω, EZΚ: Επιφανειακή Ζώνη προς τα Κάτω, 1mg/ml: Κατεργασία με κολλαγενάση σε συγκέντρωση

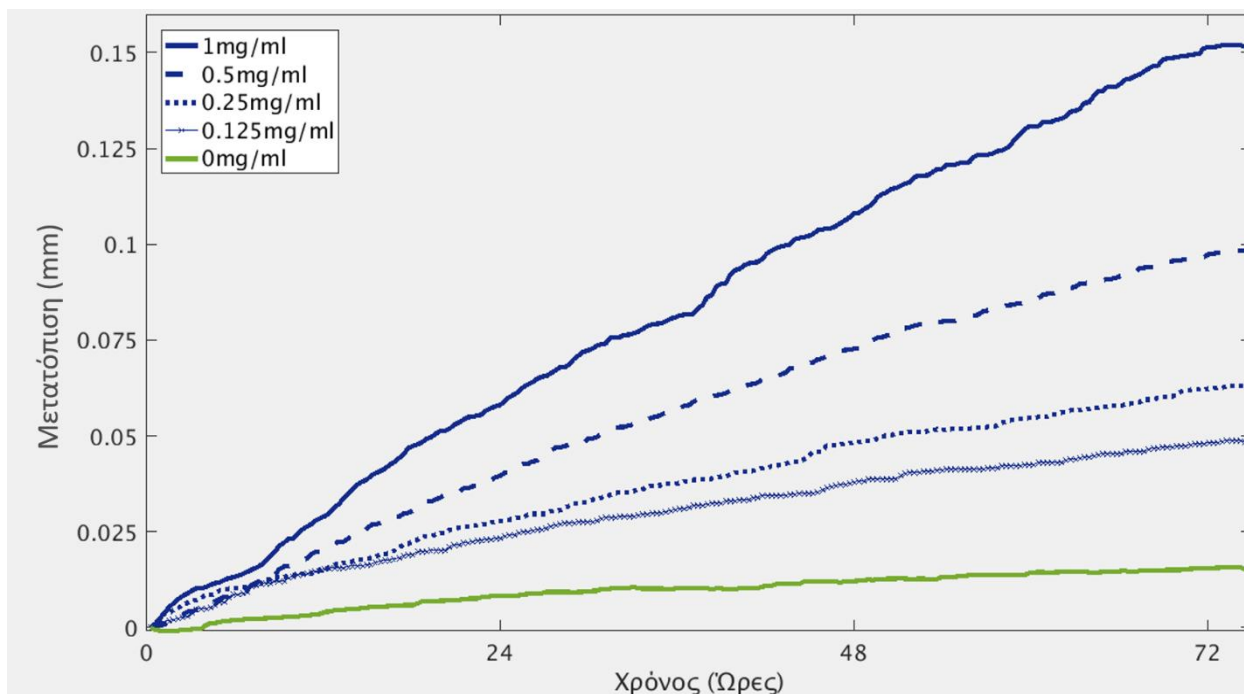


Εικόνα IV-23. Σύγκριση σχετικής παραμόρφωσης (Strain) των δειγμάτων μετά από 72 ώρες, με βάση τον προσανατολισμό της επιφανειακής τους ζώνης. ***: $p < 0.05$. Τα δεδομένα παρουσιάζονται στην μορφή: μέση τιμή \pm τυπικό σφάλμα μέσης τιμής (mean \pm SEM).

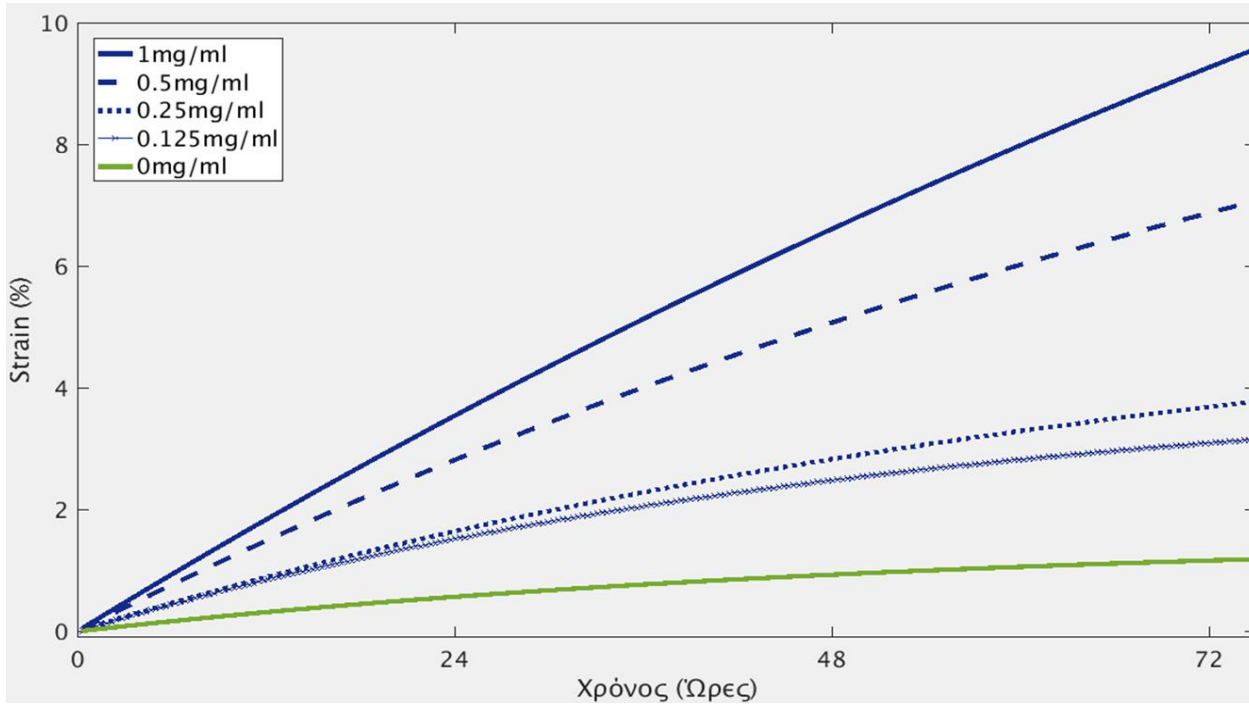
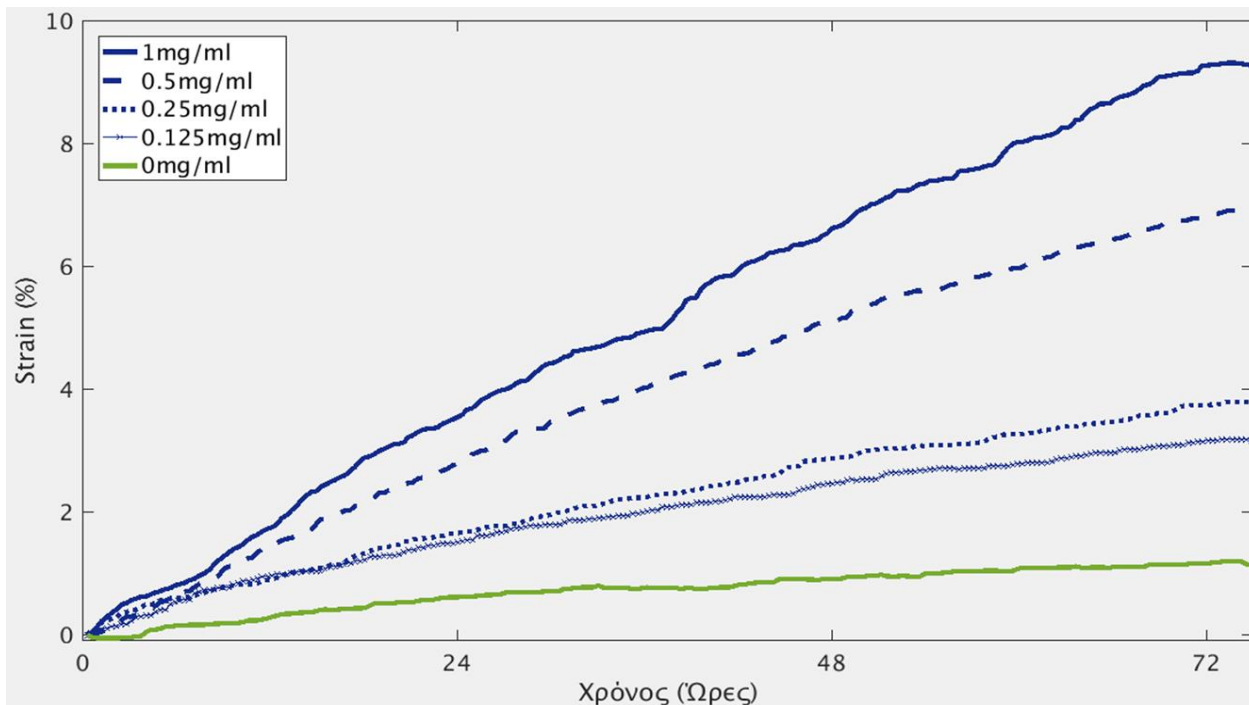
iv. Μελέτη Επίδρασης Συγκέντρωσης Κολλαγενάσης

Η επίδραση της συγκέντρωσης της κολλαγενάσης παρουσιάζεται στις καμπύλες της *Εικόνας IV-25* και της *Εικόνας IV-26*, όπου φαίνεται η μετατόπιση και η σχετική παραμόρφωση (Strain) που αντιστοιχεί στην μέση τιμή της μείωσης του ύψους των δειγμάτων για κάθε group συγκέντρωσης. Αρχικά φαίνεται ότι τα δείγματα που δεν έχουν υποστεί κατεργασία με κολλαγενάση (0 mg/ml), μετά από περίπου 24 ώρες σταθεροποιούνται έχοντας χάσει ~1% του αρχικού τους ύψους.

Εξετάζοντας την κλίση της καμπύλης, που αντιστοιχεί στο ρυθμό αποδόμησης του χόνδρου, διαπιστώνεται η τιμή της εξαρτάται από την συγκέντρωση της κολλαγενάσης, και μεγιστοποιείται στην συγκέντρωση 1 mg/ml (περίπου 150 μ m και 10% σχετική παραμόρφωση).

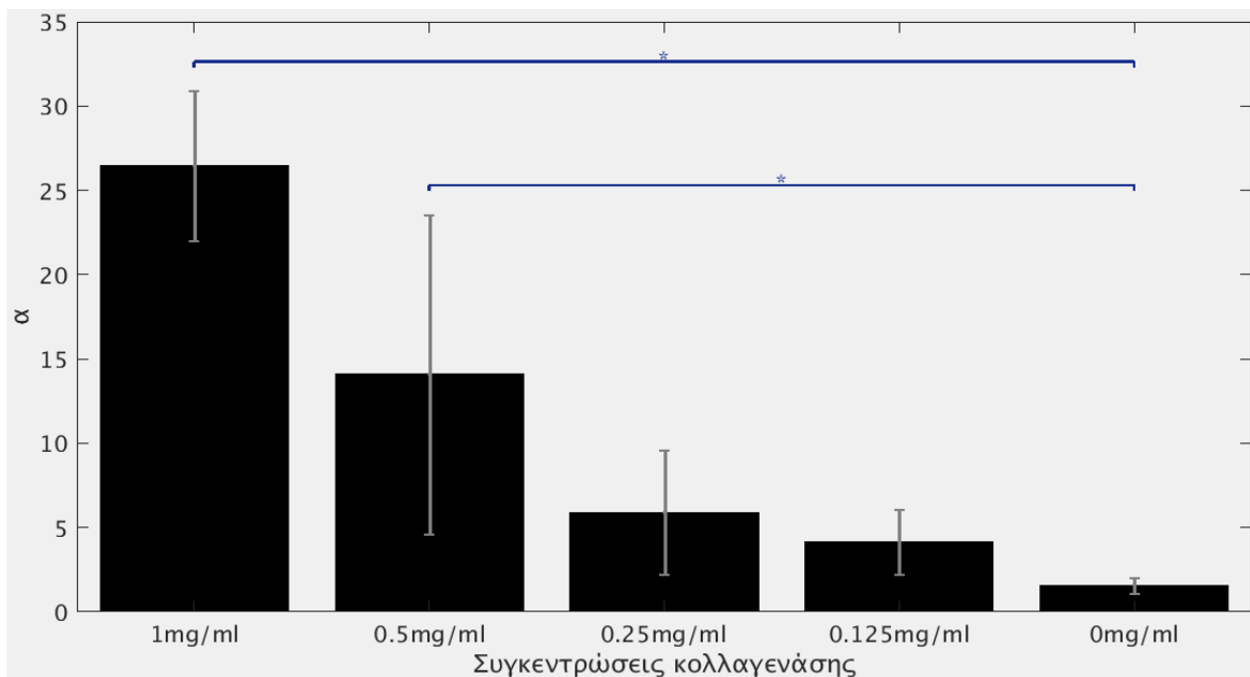


Εικόνα IV-25. (Επάνω) Μετρήσεις απόστασης, διάρκειας 4 ημερών, μετά από κατεργασία με διαφορετικές συγκεντρώσεις κολλαγενάσης: 1) 1 mg/ml, 2) 0.5 mg/ml, 3) 0.25 mg/ml, 4) 0.125mg/ml 5) 0 mg/ml.



Εικόνα IV-26. (Επάνω) Strain, μετά από κατεργασία τεσσάρων ημερών, με διαφορετικές συγκεντρώσεις κολλαγενάσης: 1) 1 mg/ml, 2) 0.5 mg/ml, 3) 0.25 mg/ml, 4) 0.125mg/ml 5) 0 mg/ml. (Κάτω) Προσαρμογή των μετρήσεων σχετικής αποδόμησης σε εκθετική συνάρτηση.

Συγκρίνοντας τις παραμέτρους α των εκθετικών συναρτήσεων στις οποίες έχουν προσαρμοστεί τα δεδομένα (Εικόνα IV-27), αλλά και την απώλεια του αρχικού ύψους των δειγμάτων μετά από μετρήσεις 72 ωρών (Εικόνα IV-28), είναι φανερό ότι τα δείγματα που έχουν υποστεί κατεργασία με κολλαγενάση συγκέντρωσης 1mg/ml ($p_a=0.0443$ και $p_{\text{Strain72h}}=0.0037$) και 0.5mg/ml ($p_a=0.0209$ και $p_{\text{Strain72h}}=0.0351$) παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική φθορά της εξωκυττάριας μήτρας τους (ECM), σε σχέση με τα δείγματα που δεν έχουν υποστεί ενζυμική κατεργασία (0 mg/ml). Η διαφορά της αποδόμησης των δειγμάτων σε κολλαγενάση συγκέντρωσης 1mg/ml, με εκείνη για 0.125mg/ml ($p_{\text{Strain72h}}=0.0316$) είναι επίσης στατιστικά σημαντική. Παρατηρείται τέλος, ότι τα δείγματα που υπέστησαν κατεργασία με μικρότερες συγκεντρώσεις (0.25 mg/ml και 0.125 mg/ml) εμφανίζουν ορατή, μικρότερη και παρόμοια μεταξύ τους, αποδόμηση (με σχετική παραμόρφωση ~3-4%).

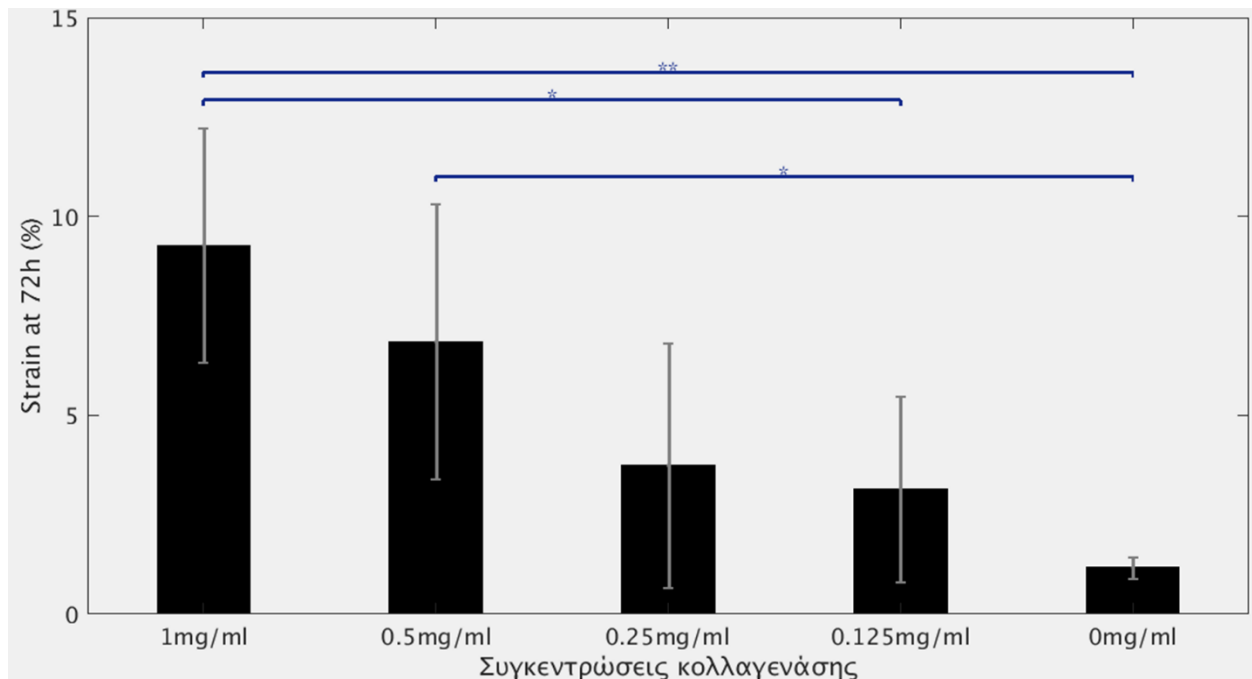


Εικόνα IV-27. Σύγκριση παραμέτρου α , των εκθετικών συναρτήσεων $f(t)=a(1-e^{-bt})$, με βάση την συγκέντρωση της κολλαγενάσης του διαλύματος. *: $p < 0.05$. Τα δεδομένα παρουσιάζονται στην μορφή: μέση τιμή \pm τυπικό σφάλμα μέσης τιμής (mean \pm SEM).

	a	b	n
1mg/ml	26,44	0,006	5
5mg/ml	14,09	0,009	5
25mg/ml	5,90	0,014	7
125mg/ml	4,15	0,019	6
0mg/ml	1,58	0,019	6

Εικόνα IV-29. Μέση τιμή παραμέτρων a, b με βάση την συγκέντρωση κολλαγενάσης με την οποία έγινε η κατεργασία των δειγμάτων. n: αριθμός δειγμάτων.

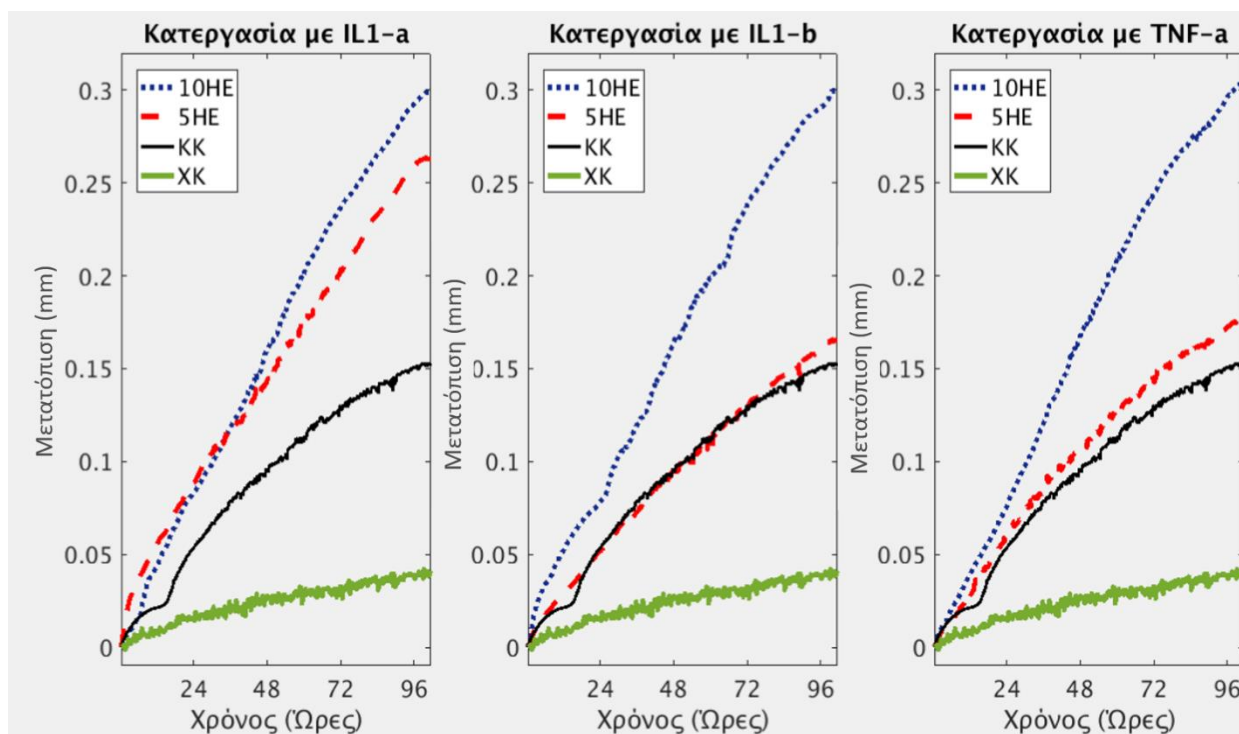
Είναι φανερή η ύπαρξη αρκετά μεγάλης διακύμανσης της μετρούμενης αποδόμησης, η οποία καθιστά αναγκαία την μέτρηση πολλών δειγμάτων για την εξαγωγή ασφαλών στατιστικών συμπερασμάτων. Οι δυνατότητες της διάταξης για την ταυτόχρονη μέτρηση πολλαπλών δειγμάτων, διευκολύνουν, εκτός από την μελέτη διαφορετικών διεγερτών, την λήψη δεδομένων από πολλαπλά δείγματα που έχουν υποστεί την ίδια κατεργασία ανά δόση και κατά συνέπεια την ορθότερη μελέτη της αποδόμησης που προκαλείται σε κάθε περίπτωση.



Εικόνα IV-28. Σύγκριση σχετικής παραμόρφωσης (Strain) δειγμάτων που έχουν υποστεί κατεργασία με διαφορετικές συγκεντρώσεις κολλαγενάσης, μετά από 72 ώρες μετρήσεων. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$. Τα δεδομένα παρουσιάζονται στην μορφή: μέση τιμή \pm τυπικό σφάλμα μέσης τιμής (mean \pm SEM).

ν. Μελέτη Επίδρασης Κυτταροκίνων

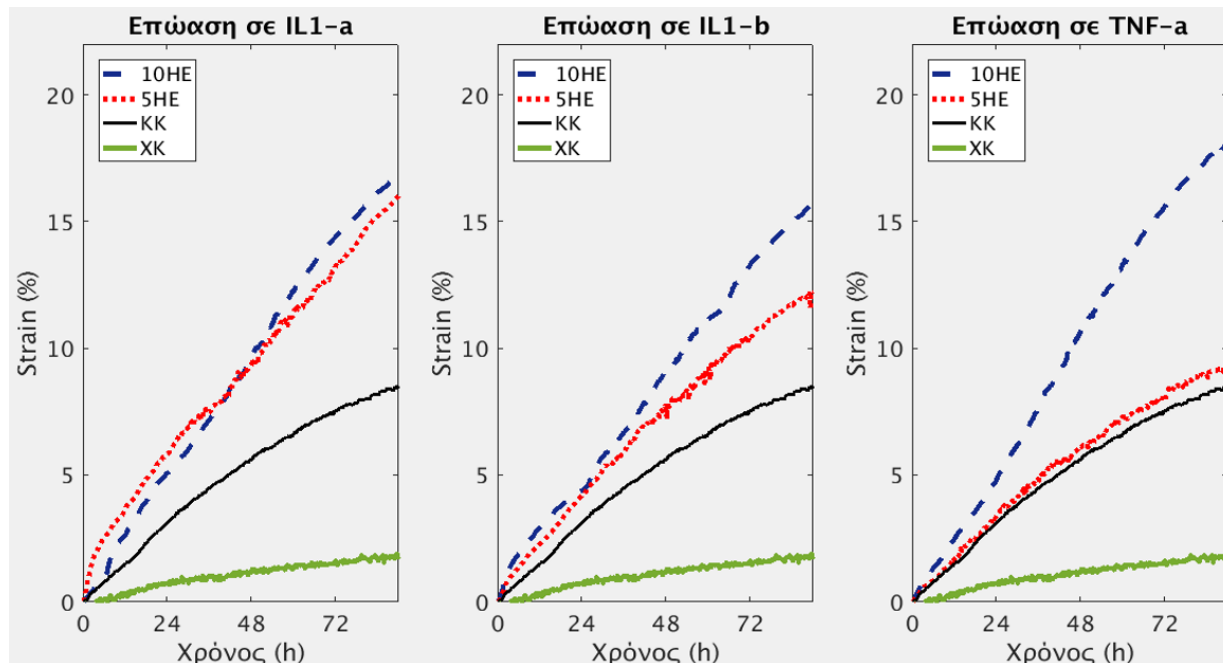
Η επίδραση της επώασης των δειγμάτων, για πέντε ή δέκα ημέρες, στις καταβολικές κυτταροκίνες IL1-a, IL1-b και TNF-a φαίνεται στην *Εικόνα IV-30* και *Εικόνα IV-31*, όπου παρουσιάζονται οι μετρήσεις αποδόμησης και σχετικής παραμόρφωσης (Strain) για κάθε περίπτωση.



Εικόνα IV-30. Μέση τιμή μετρήσεων μετατόπισης, διάρκειας 4 ημερών, για διαφορετικές περιόδους επώασης με: IL1-a, IL1-β και TNF-a (n=3 δείγματα). 10HE: 10 Ημέρες Επώασης με κυτταροκίνες, 5HE: 5 Ημέρες Επώασης με κυτταροκίνες, KK: Κατεργασία με Κολλαγενάση (0.5mg/ml), XK: Χωρίς Κατεργασία.

Μελετώντας τόσο την μετατόπιση, που αντιστοιχεί στην μείωση του ύψους των δειγμάτων, όσο και την σχετική αποδόμηση (Strain), διαπιστώνεται ότι και για τις 3 κυτταροκίνες η επώαση δέκα ημερών (10HE) οδηγεί σε αποδόμηση των δειγμάτων με όμοιο τρόπο, με μέγιστη τιμή ~300um και μέγιστη σχετική παραμόρφωση ~15%. Φαίνεται ακόμα ότι για την IL1-a (100ng/ml) η επώαση πέντε ημερών (5HE) προκαλεί αποδό-

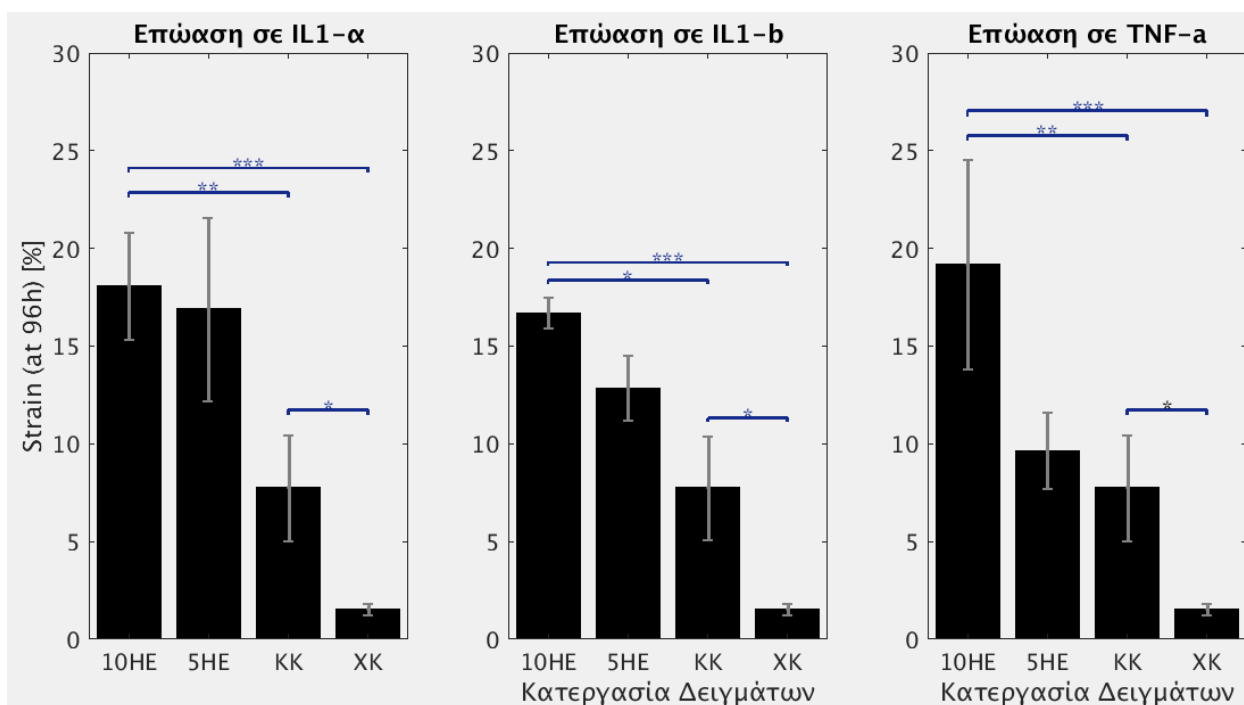
μηση ~250um. Η τιμή της σχετικής παραμόρφωσης (~15%) είναι όμοια με την αντίστοιχη για επώαση 10 ημερών και αρκετά μεγαλύτερη από εκείνη της απλής κατεργασίας με κολλαγενάση. Για τις άλλες δύο κυτταροκίνες η επώαση πέντε ημερών φαίνεται να έχει μικρότερα αποτελέσματα με την ταχύτητα δράσης της IL1-b να φαίνεται ελαφρώς ταχύτερη από εκείνη του TNF-a.



Εικόνα IV-31. Μέση τιμή μετρήσεων σχετικής παραμόρφωσης (Strain), 4 ημερών, για διαφορετικές περιόδους επώασης με: IL1-a, IL1-β και TNF-a και κατεργασία με κολλαγενάση (n=3). 10HE: 10 Ημέρες Επώασης με κυτταροκίνες, 5HE: 5 Ημέρες Επώασης με κυτταροκίνες, KK: Κατεργασία με Κολλαγενάση (0.5mg/ml), XK: Χωρίς Κατεργασία.

Για τη σύγκριση της επίδρασης του χρόνου επώασης σε κυτταροκίνες, στον βαθμό αποδόμησης του αρθρικού χόνδρου από την κολλαγενάση χρησιμοποιήθηκε η τιμή της σχετικής παραμόρφωσης (Strain) 96 ώρες μετά την εκκίνηση των μετρήσεων (Εικόνα IV-33). Παρατηρείται ότι και για τους 3 χρησιμοποιούμενους καταβολικούς διεγέρτες η επίδραση των δέκα ημερών επώασης (10HE) προκαλεί στατιστικά σημαντική διαφορά από την απλή κατεργασία με κολλαγενάση ($p_{IL1-a}=0.0025$, $p_{IL1-b}=0.0152$ και $p_{TNF-a}=0.0097$). Επιπλέον η αποδόμηση λόγω απλής κατεργασίας με κολλαγενάση (KK) έχει στατιστικά

σημαντική διαφορά από την αποδόμηση που εμφανίζεται σε δείγματα χωρίς κατεργασία (ΧΚ) και στις τρεις περιπτώσεις ($p_{IL1-a}=0.0327$, $p_{IL1-b}=0.0208$ και $p_{TNF-a}=0.0467$). Τέλος η επώαση 10 ημερών σε καθεμιά από τις τρεις καταβολικές κυτταροκίνες προκάλεσε αποδόμηση στατιστικά σημαντική σε σχέση με εκείνη που εμφανίζεται κατά την απουσία κατεργασίας (ΧΚ) ($p_{IL1-a}=6.2e-5$, $p_{IL1-b}=2.6e-4$ και $p_{TNF-a}=2.97e-4$).



Εικόνα IV-33. Σύγκριση επίδρασης χρόνου επώασης σε IL1-a, IL1-b και TNF-a, στην δυνατότητα της κολλαγενάσης να προκαλεί αποδόμηση του αρθρικού χόνδρου, με δείγματα ανά περίπτωση. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. Τα δεδομένα παρουσιάζονται στην μορφή: μέση τιμή \pm τυπικό σφάλμα μέσης τιμής ($mean \pm SEM$).

Πλήθος δειγμάτων (n)				
Επώαση σε	10HE	5HE	KK	XK
IL1-a	2	3	2	2
IL1-b	3	3	2	2
TNF-a	3	3	2	2

Εικόνα IV-32. Πλήθος δειγμάτων ανά κατεργασία. 10HE: 10 Ημέρες Επώασης με κυτταροκίνες, 5HE: 5 Ημέρες Επώασης με κυτταροκίνες, KK: Κατεργασία με Κολλαγενάση (0.5mg/ml), XK: Χωρίς Κατεργασία.

Φαίνεται ότι η επώαση διάρκειας 10 ημερών και στις τρεις κυτταροκίνες δρα ενισχυτικά στην αποδόμηση που προκαλεί η κολλαγενάση κατά την διάρκεια των 5 ημερών

που διαρκούν οι μετρήσεις. Αν και απαιτείται μελέτη μεγαλύτερου πλήθους δειγμάτων για την εξαγωγή ασφαλέστερων στατιστικών συμπερασμάτων, αφού τα δείγματα χόνδρου παρουσιάζουν μεγάλη διακύμανση ακόμα και όταν προέρχονται από τον ίδιο δότη, είναι φανερό ότι η διάρκεια επώασης των δειγμάτων σε καταβολικές κυτταροκίνες είναι καθοριστική ώστε να είναι μετρήσιμη η αποδόμηση που προκαλούν. Η τιμή της σχετικής παραμόρφωσης μετά από 96 ώρες μέτρησης, φανερώνει μια τάση της IL1-a να δρα γρηγορότερα από τους άλλους δυο διεγέρτες και του TNF-a να είναι έχει την πιο αργή δράση. Η επώαση 10 ημερών φαίνεται να είναι χρονικό διάστημα ικανό ώστε να είναι ορατή η επίδραση των κυτταροκινών στην αποδόμηση που προκαλεί η κολλαγενάση στον ιστό. Η επίδραση διαφορετικών χρόνων επώασης αφήνεται για μελλοντική μελέτη, με στόχο την μέτρηση αποδόμησης των δειγμάτων που να προκαλείται αποκλειστικά από τις κυτταροκίνες.

vi. Συμπεράσματα

Ο ανθρώπινος αρθρικός χόνδρος παρουσιάζει αρκετά μεγάλο εύρος ως προς το ύψος του, ανάλογα με την περιοχή της κεφαλής ισχίου από την οποία προέρχεται. Την καλύτερη σχέση ύψους-τυπικής απόκλισης, παρουσιάζει η ανώτερη περιοχή (D) της κεφαλής. Τα ύψη των δειγμάτων που προέρχονται από εκεί, παρουσιάζουν μικρή διακύμανση και κυμαίνονται σε σταθερό εύρος από δότη σε δότη.

Οι μετρήσεις που λήφθηκαν κατά την πειραματική μελέτη αποδεικνύουν ότι η καταστροφή των δεσμών μεταξύ των μορίων του κολλαγόνου τύπου II, της εξωκυττάριας μήτρας (ECM) των χονδροκυττάρων του ανθρώπινου αρθρικού χόνδρου, συνεπάγεται τον

εκφυλισμό της και την απώλεια των μηχανικών ιδιοτήτων του ιστού. Η αποδόμηση των δειγμάτων αρθρικού χόνδρου, που εκδηλώνεται ως μείωση του αρχικού τους ύψους, είναι της τάξης μερικών δεκάδων μm και μπορεί να μετρηθεί με ικανοποιητική ακρίβεια, με την χρήση της διάταξης HDD. Η αποδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας (ECM) μπορεί να επιτευχθεί με την κατεργασία των δειγμάτων με κολλαγενάση, με την δράση του ενζύμου να είναι αναλογική με την συγκέντρωσή του. Για την επίτευξη στατιστικά σημαντικής αποδόμησης του ανθρώπινου αρθρικού χόνδρου χρειάζεται συγκέντρωση κολλαγενάσης μεγαλύτερη ή ίση των 0.5mg/ml .

Καθοριστική για την διατήρηση των μηχανικών ιδιοτήτων του ανθρώπινου αρθρικού χόνδρου είναι η επίδραση της επιφανειακής ζώνης του ιστού, με την δράση της να μειώνεται σημαντικά όταν μετριέται η αποδόμηση ανεστραμμένων δειγμάτων. Όταν η φορά των δειγμάτων είναι ορθή, με την επιφανειακή τους ζώνη προς τα επάνω, σε επαφή με τον ιντέντορα, η δράση της κολλαγενάσης (1mg/ml) είναι αμελητέα. Αντίθετα, τα δείγματα με ίδια κατεργασία, αλλά ανεστραμμένη φορά, δηλαδή με την επιφανειακή ζώνη σε επαφή με την εσωτερική επιφάνεια του πηγαδιού της πλάκας $24^{\omega\text{v}}$ βοθρίων, εμφανίζουν σημαντική απώλεια της ελαστικότητάς τους, που αντικατοπτρίζεται σε $\sim 10\%$ μείωση του αρχικού τους ύψους. Η επίδραση της φοράς της επιφανειακής ζώνης, μετριάζεται με την προσθήκη οπής 1mm στα μετρούμενα δείγματα, καθώς σε αυτήν την περίπτωση, η αποδόμηση που παρατηρείται είναι όμοια και για τις δύο θέσεις της επιφανειακής ζώνης.

Η επώαση δειγμάτων σε καταβολικές κυτταροκίνες (IL1-a, IL1-β και TNF-a) προκαλεί φθορά ικανή να διευκολύνει σημαντικά την δράση της κολλαγενάσης στην αποδόμηση του ιστού, προκαλώντας σχεδόν διπλάσια απώλεια του αρχικού ύψους. Η διάρκεια της επώασης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δυνατότητα λήψης μετρήσιμης αποδόμησης,

που να οφείλεται στην παρουσία των κυτταροκινών. Οι δέκα ημέρες επώασης (10HE), είναι χρονικό διάστημα ικανό ώστε η απώλεια του αρχικού ύψους να είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με εκείνη που παρατηρείται κατά την απλή κατεργασία με κολλαγενάση. Το αποτέλεσμα της είναι όμοιο και για τις τρεις κυτταροκίνες, οδηγώντας μετά την προσθήκη κολλαγενάσης (0.5mg/ml) σε αποδόμηση 300um και σχετική παραμόρφωση (Strain) ~15%. Αντίθετα η επώαση πέντε ημερών (5HE) δεν είναι επαρκής για την μέτρηση στατιστικά σημαντικών αποτελεσμάτων σε σχέση με την απλή κατεργασία κολλαγενάσης, για τον διαθέσιμο αριθμό δειγμάτων, με την IL1-a να παρουσιάζει την τάση να δρα ταχύτερα από την IL1-b και το TNF-a. Ενδέχεται η μέτρηση περισσότερων δειγμάτων να δώσει στατιστικά σημαντική αποδόμηση μετά από πέντε ημέρες επώασης σε σχέση με την απλή κατεργασία με την κολλαγενάση. Γενικά μπορεί να παρατηρηθεί η τάση και στις τρεις «πρωταγωνιστικές» για την οστεοαρθρίτιδα κυτταροκίνες, να διευκολύνουν τον βαθμό αποδόμησης των δειγμάτων μετά από κατεργασία με κολλαγενάση, καθώς αυξάνεται ο χρόνος επώασης σε αυτές.

Αν και είναι αναγκαία η εξέταση δειγμάτων από περισσότερους δότες, φαίνεται ότι η επώαση δειγμάτων αρθρικού χόνδρου στις «πρωταγωνιστικές» καταβολικές κυτταροκίνες για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα, προκαλεί μείωση της ελαστικότητας του ιστού. Η αύξηση του χρόνου επώασης πιθανώς να οδηγήσει σε μεγαλύτερη δράση των κυτταροκινών και τελικά σε αποδόμηση του ιστού μετρήσιμη από την διάταξη HDD, χωρίς την κατεργασία κολλαγενάσης.

V. Συμπεράσματα και μελλοντική εργασία

Στο πλαίσιο αυτής της διπλωματικής αξιοποιήθηκε πειραματικά η διάταξη μέτρησης αποδόμησης πολλαπλών δειγμάτων (High throughput Degradation Device) για την μέτρηση της αποδόμησης δειγμάτων αρθρικού χόνδρου προερχόμενων από κεφαλές ισχίου ανθρώπινων δοτών. Ποσοτικοποιήθηκε η αποδόμηση του ανθρώπινου αρθρικού χόνδρου μετά από ενζυμική κατεργασία με κολλαγενάση και επισημάνθηκε η σημασία της επιφανειακής ζώνης στην διατήρηση των μηχανικών ιδιοτήτων του ανθρώπινου χόνδρου. Πραγματοποιήθηκε υπολογιστική ανάλυση με την οποία 72 διεγέρτες (stimuli) κατατάχθηκαν σε κατηγορίες με βάση την αναβολική ή καταβολική δράση τους στην αποδόμηση του ιστού. Επιπλέον αναπτύχθηκε μέθοδος για την πειραματική μελέτη των αναβολικών και καταβολικών κυτταροκινών με βάση την επίδρασή τους στον βαθμό αποδόμησης του ιστού μετά από κατεργασία με κολλαγενάση. Με βάση αυτήν ποσοτικοποιήθηκε η αποδόμηση που οφείλεται σε τρεις γνωστές καταβολικές κυτταροκίνες και αποδείχτηκε ότι η επώαση για επαρκές χρονικό διάστημα στις κυτταροκίνες αυτές αυξάνει τον βαθμό αποδόμησης του ιστού μετά από κατεργασία με κολλαγενάση. Η μέθοδος αυτή εξασφαλίζει αρκετή αποδόμηση ώστε λαμβάνεται μετρήσιμο σήμα και δεν απαιτεί μεγάλο χρόνο επώασης στην HDD, καθώς τα δείγματα δεν χρειάζεται να βρίσκονται στην διάταξη παρά μόνο τις τελευταίες 4-5 μέρες της επώασής τους. Βέβαια, επιτρέπει την μέτρηση της καταβολικής επίδρασης των κυτταροκινών μόνο με την παρουσία κολλαγενάσης, ενώ απαιτείται μελέτη περισσότερων δειγμάτων ώστε να εξασφαλιστεί με μεγαλύτερη βεβαιότητα ότι λειτουργεί αξιόπιστα.

Η ανάδειξη της επίδρασης της επώασης σε γνωστές καταβολικές κυτταροκίνες, στην αποδόμηση του ανθρώπινου αρθρικού χόνδρου, στρέφει το ενδιαφέρον στην μελέτη της

επίδρασης τους για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε δείγματα προερχόμενα από περισσότερους δότες και τελικά στην επίτευξη μετρήσιμης αποδόμησης χωρίς την παρουσία κολλαγενάσης. Πέρα από τις «πρωταγωνιστικές» για την οστεοαρθρίτιδα κυτταροκίνες, χρήσιμη για την κατανόηση της εμφάνισης και της πορείας της, θα ήταν η πειραματική μελέτη αποδόμησης μετά από κατεργασία με καταβολικές κυτταροκίνες οι οποίες προέκυψαν από την παραπάνω υπολογιστική ανάλυση. Τέλος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα παρουσίαζε να μελετηθούν τα αποτελέσματα της επώασης των δειγμάτων σε «πρωταγωνιστικές», ή μη, αναβολικές κυτταροκίνες και να ελεγχθεί αν είναι μετρήσιμη από την διάταξη HDD η δυνατότητα τους να μετριάζουν τον εκφυλισμό του ιστού.

Πέρα από την εξέλιξη των πειραμάτων μέτρησης αποδόμησης που πραγματοποιούνται με την διάταξη HDD, χρήσιμες θα ήταν τροποποιήσεις στην ίδια την διάταξη με γνώμονα την διεύρυνση των δυνατοτήτων της, την διευκόλυνση του χρήστη και τον περιορισμό των παραγόντων που εισάγουν σφάλμα. Πρώτα απ' όλα οι βίδες, που εδράζουν τις δυο βίδες οδηγούς κάθε κινητήρα, συχνά ξεβιδώνουν με αποτέλεσμα να μην υπάρχει πλέον ευθυγράμμιση της κίνησης των κινητήρων με τα αντίστοιχα γραμμικά έδρανα και να απαιτείται διόρθωση της ευθυγράμμισης από τον χρήστη. Προτείνεται ο σχεδιασμός και η κατασκευή ενός νέου συστήματος κίνησης, με χρήση δυο γραμμικών εδράνων για κάθε άξονα και με καινούργιες εδράσεις των βιδών οδηγών των κινητήρων. Επιπλέον, η πραγματοποίηση πολυήμερων μετρήσεων, *in vitro*, γεννά την ανάγκη για τροποποίηση της βάσης έδρασης δειγμάτων, ώστε να υπάρχει η δυνατότητα ανανέωσης του διαλύματος που περιβάλλει τα δείγματα, χωρίς να απαιτείται η αφαίρεση των φορέων συμπίεσης

και της πλάκας 24^{ωv} πηγαδιών από την βάση. Τέλος, χρήσιμα συμπεράσματα θα προέκυπταν αν υπήρχε η δυνατότητα ταυτόχρονης άσκησης δυναμικών δοκιμών συμπίεσης σε πολλά δείγματα.

VI. Βιβλιογραφία

- [1] Gao, Y., Liu, S., Huang, J., Guo, W., Chen, J., Zhang, L., Zhao, B., Peng, J., Wang, A., Wang, Y., Xu, W., Lu, S., Yuan, M. and Guo, Q. (2014). The ECM-Cell Interaction of Cartilage Extracellular Matrix on Chondrocytes. *BioMed Research International*, 2014, pp.1-8.
- [2] Guilak, F., Alexopoulos, L., Haider, M., Ting-Beall, H. and Setton, L. (2005). Zonal Uniformity in Mechanical Properties of the Chondrocyte Pericellular Matrix: Micropipette Aspiration of Canine Chondrons Isolated by Cartilage Homogenization. *Annals of Biomedical Engineering*, 33(10), pp.1312-1318.
- [3] HUBER, M., TRATTNIG, S. and LINTNER, F. (2000). Anatomy, Biochemistry, and Physiology of Articular Cartilage. *Investigative Radiology*, 35(10), pp.573-580.
- [4] Li, X., Ellman, M., Muddasani, P., Wang, J., Cs-Szabo, G., van Wijnen, A. and Im, H. (2009). Prostaglandin E2 and its cognate EP receptors control human adult articular cartilage homeostasis and are linked to the pathophysiology of osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 60(2), pp.513-523.
- [5] Melas, I., Chairakaki, A., Chatzopoulou, E., Messinis, D., Katopodi, T., Pliaka, V., Samara, S., Mitsos, A., Dailiana, Z., Kollia, P. and Alexopoulos, L. (2014). Modeling of signaling pathways in chondrocytes based on phosphoproteomic and cytokine release data. *Osteoarthritis and Cartilage*, 22(3), pp.509-518.
- [6] Poole, A., Kojima, T., Yasuda, T., Mwale, F., Kobayashi, M. and Lavery, S. (2001). Composition and Structure of Articular Cartilage. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 391, pp.S26-S33.
- [7] Poole, C., Flint, M. and Beaumont, B. (1987). Chondrons in cartilage: Ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages. *Journal of Orthopaedic Research*, 5(4), pp.509-522. Drake, R. (2007).
- [8] *Ανατομία (Επίτομο)*. Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης, pp.485-490.
- [9] Shepherd, D. and Seedhom, B. (1999). Thickness of human articular cartilage in joints of the lower limb. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 58(1), pp.27-34.
- [10] Wang, Q. (2009). Gene expression profiles of dynamically compressed single chondrocytes and chondrons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379(3), pp.738-742.
- [11] Minia, A. (2015). Study of Cell-ECM interaction and mechanotransduction in chondrocyte/alginate scaffolds (*M. Sc. Thesis*). Retrieved from ntuabiolab.wikispaces.com/5.+REPOSITORY
- [12] Wilusz, R., Sanchez-Adams, J. and Guilak, F. (2014). The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage. *Matrix Biology*, 39, pp.25-32.
- [13] Παναγιωτόπουλος, Δ. Η. (2016). *Σχεδιασμός Συσκευής Ταυτόχρονης Μέτρησης Βαθμού αποδόμησης σε Πολλαπλά Δείγματα Ιστού* (Διπλωματική Εργασία). Retrieved from ntuabiolab.wikispaces.com/5.+REPOSITORY
- [14] Gkousioudi, A. (2016). *Frequency Domain Analysis of Cartilage Viscoelasticity* (*M. Sc. Thesis*). Retrieved from ntuabiolab.wikispaces.com/5.+REPOSITORY

- [15] Steinmeyer, J. (1997). A computer-controlled mechanical culture system for biological testing of articular cartilage explants. *Journal of Biomechanics*, 30(8), 841-845. doi:10.1016/s0021-9290(97)00040-7
- [16] Frank EH, Jin M, Loening AM, Levenston ME, Grodzinsky AJ. A versatile shear and compression apparatus for mechanical stimulation of tissue culture explants. *J Biomech.* 33(11): 1523-7, 2000.
- [17] Aufderheide, A.C., Athanasiou, K.A. A direct compression stimulator for articular cartilage and meniscal explants. *Ann Biomed Eng.* 34(9),1463-1474, 2006.
- [18] Lujan TJ, Wirtz KM, Bahney CS, Madey SM, Johnstone B, Bottlang M. A Novel Bioreactor for the Dynamic Stimulation and Mechanical Evaluation of Multiple Tissue-Engineered Constructs, *Tissue Eng Part C.* 17(3): 367-74, 2011. doi: 10.1089/ten.TEC.2010.0381.
- [19] Salvetti DJ, Pino CJ, Manuel SG, Dallmeyer I, Rangarajan SV, Meyer T, Kotov M, Shastri VP. Design and Validation of a Compressive Tissue Stimulator with High-Throughput Capacity and Real-Time Modulus Measurement Capability. *Tissue Eng Part C.* 18(3):205-14, 2012. doi: 10.1089/ten.TEC.2011.0233.
- [20] Mohanraj B, Hou C, Meloni GR, Cosgrove BD, Dodge GR, Mauck RL. A high throughput mechanical screening device for cartilage tissue engineering. *J Biomech.* 47(9): 2130-6, 2014. doi: 10.1016/j.jbiomech.2013.10.043.
- [21] Orita, S., Koshi, T., Mitsuka, T., Miyagi, M., Inoue, G., Arai, G., Ohtori, S. (2011). Associations between proinflammatory cytokines in the synovial fluid and radiographic grading and pain-related scores in 47 consecutive patients with osteoarthritis of the knee. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 12(1). doi:10.1186/1471-2474-12-144
- [22] Hosseininia, S., Lindberg, L. R., & Dahlberg, L. E. (2013). Cartilage collagen damage in hip osteoarthritis similar to that seen in knee osteoarthritis; a case–control study of relationship between collagen, glycosaminoglycan and cartilage swelling. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 14(1). doi:10.1186/1471-2474-14-18
- [23] Cassino, T. R., Anderson, R., Love, B. J., Huckle, W. R., Seamans, D. K., & Forsten-Williams, K. (2007). Design and application of an oscillatory compression device for cell constructs. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(1), 211-220. doi:10.1002/bit.21422
- [24] L.J.P. van der Maaten and G.E. Hinton. Visualizing High-Dimensional Data Using t-SNE. *Journal of Machine Learning Research* 9(Nov):2579-2605, 2008.
- [25] T-SNE. (n.d.). Retrieved October 1, 2017, from <https://lvdmaaten.github.io/tsne/>
- [26] (n.d.). Retrieved October 19, 2017, from <https://stat.ethz.ch/R-manual/R-devel/library/stats/html/kmeans.html>
- [27] Ni, S., Miao, K., Zhou, X., Xu, N., Li, C., Zhu, R., . . . Wang, Y. (2015). The involvement of follistatin-like protein 1 in osteoarthritis by elevating NF-κB-mediated inflammatory cytokines and enhancing fibroblast like synoviocyte proliferation. *Arthritis Research & Therapy*, 17(1). doi:10.1186/s13075-015-0605-6
- [28] Liu-Bryan, R., Pritzker, K., Firestein, G. S., & Terkeltaub, R. (2005). TLR2 Signaling in Chondrocytes Drives Calcium Pyrophosphate Dihydrate and Monosodium Urate Crystal-Induced Nitric Oxide Generation. *The Journal of Immunology*, 174(8), 5016-5023. doi:10.4049/jimmunol.174.8.5016

- [29] Wojdasiewicz, P., Poniatowski, Ł A., & Szukiewicz, D. (2014). The Role of Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Mediators of Inflammation*, 2014, 1-19. doi:10.1155/2014/561459
- [30] Fernandes, J., Martel-Pelletier, J., & Pelletier, J. (2002). The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 39, 2002, 237–246.
- [31] LeGrand, A., Fermor, B., Fink, C., Pisetsky, D. S., Weinberg, J. B., Vail, T. P. and Guilak, F. (2001), Interleukin-1, tumor necrosis factor α , and interleukin-17 synergistically up-regulate nitric oxide and prostaglandin E₂ production in explants of human osteoarthritic knee menisci. *Arthritis & Rheumatism*, 44: 2078–2083. doi:10.1002/1529-0131(200109)44:9<2078::AID-ART358>3.0.CO;2-
- [32] Kokebie, R., Aggarwal, R., Lidder, S., Hakimiyan, A. A., Rueger, D. C., Block, J. A., & Chubinskaya, S. (2011). The role of synovial fluid markers of catabolism and anabolism in osteoarthritis, rheumatoid arthritis and asymptomatic organ donors. *Arthritis Research & Therapy*, 13(2). doi:10.1186/ar3293

vii. Παράρτημα

1. Παράρτημα Α

Στο παράρτημα Α παρουσιάζονται οι οδηγίες προετοιμασίας για κάθε στάδιο της διεξαγωγής ενός πειράματος μέτρησης αποδόμησης.

i. Προετοιμασία διάταξης

1. Η διάταξη, η βάση έδρασης δειγμάτων και οι φορείς συμπίεσης καθαρίζονται προσεκτικά με αιθανόλη 70% και απολυμαντικό.
2. Τοποθετούνται στον επωαστήρα και αποστειρώνονται με την χρήση ακτινοβολίας UV, για ~30λεπτά.
3. Η διάταξη μένει στον επωαστήρα για 1 ημέρα, ώστε να έρθει σε θερμική ισορροπία.
4. Μισή ώρα πριν από την έναρξη του πειράματος, ο αισθητήρας λέιζερ τίθεται σε λειτουργία, ώστε να προθερμαθεί.

ii. Προετοιμασία γέλης αγαρόζης

Προετοιμάζονται 500ul αγαρόζης 2% για τα 24 πηγάδια

1. Ζυγίζεται η αγαρόζη σε σκόνη (0,336g) και προστίθεται σε νερού τύπου Ι (16.8ml).
2. Τοποθετείται σε μαγνητικό αναδευτήρα σε θερμοκρασία για περίπου 30'
3. Μόλις το διάλυμα γίνει διάφανο η αγαρόζη είναι έτοιμη.

4. Όσο είναι ακόμα ρευστή τοποθετείται στο εσωτερικό κάθε πηγαδιού της πλάκας 24^{ωv} πηγαδιών και αφήνεται να στερεοποιηθεί.
5. Στη συνέχεια ανοίγονται οπές 3mm με biopsy punch, στο κέντρο κάθε πηγαδιού, με την χρήση ιδιοσυσκευής που εξασφαλίζει ευθυγράμμιση και καθετότητα.
6. Η αгарόζη αποστειρώνεται με ακτινοβολία UV για περίπου 30' και είναι έτοιμη να χρησιμοποιηθεί για την τοποθέτηση δειγμάτων.

iii. Κοπή και προετοιμασία δειγμάτων

1. Το δοχείο συλλογής χειρουργικών δειγμάτων που περιέχει την κεφαλή ισχίου τοποθετείται στον θάλαμο νηματικής ροής (Laminar flow hood), αφού ψεκαστεί με αιθανόλη 70%.
2. Η κεφαλή τοποθετείται σε τρυβλίο πέτρι (petri dish) και πλένεται με PBS+P/S με τη χρήση πιπέτας Παστέρ.
3. Η κεφαλή μεταφέρεται σε καινούργιο τρυβλίο πέτρι (petri dish) όπου κόβονται οριζόντιες τομές του ιστού από την επιθυμητή περιοχή.
4. Ο αρθρικός χόνδρος που έχει κοπεί μεταφέρεται σε τρίτο τρυβλίο πέτρι (petri dish), όπου αφού αναγνωριστεί η επιφανειακή ζώνη, προστίθεται DMEM+P/S+AMPB.
5. Με τη χρήση biopsy punch 3mm κόβονται δείγματα αντίστοιχης διαμέτρου από τα σημεία που η τομή έχει το πλήρες ύψος της.
6. Καταγράφεται το ακριβές ύψος των δειγμάτων που έχουν κοπεί, αφού μετρηθούν με παχύμετρο.

7. Κάθε δείγμα αφού μετρηθεί τοποθετείται, προσεκτικά ώστε να είναι γνωστή η θέση της επιφανειακής ζώνης, στην υποδοχή αγαρόζης που έχει δημιουργηθεί γι' αυτό τον σκοπό στην πλάκα 24^{ωv} πηγαδιών.
8. Σε κάθε πηγάδι προστίθεται διάλυμα θρεπτικού DMEM και του διεγέρτη που έχει επιλεγεί για το πείραμα.
9. Η βάση έδρασης δειγμάτων και οι ιντέντορες μεταφέρονται από τον επωαστήρα (incubator) στον θάλαμο νηματικής ροής (Laminar flow hood).
10. Η πλάκα 24^{ωv} πηγαδιών εισάγεται στην βάση έδρασης δειγμάτων και οι ιντέντορες τοποθετούνται χειροκίνητα, στις οπές της βάσης έδρασης δειγμάτων, ώστε να έρχονται σε επαφή με την επιφάνεια των δειγμάτων.
11. Η βάση έδρασης των δειγμάτων τοποθετείται στην διάταξη μέσα στον επωαστήρα (incubator).

iv. Έναρξη πειράματος

1. Διαγράφεται, με την χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή, το περιεχόμενο του αρχείου MILLIS.TXT και DATA_0.TXT που είναι αποθηκευμένα στην κάρτα μνήμης SD, ώστε μην περιέχουν πληροφορίες από προηγούμενα πειράματα.
2. Η κάρτα μνήμης SD τοποθετείται στην υποδοχή που υπάρχει γι' αυτόν τον σκοπό στο κύκλωμα.
3. Ο arduino nano συνδέεται μέσω USB, με ηλεκτρονικό υπολογιστή ώστε να μπορεί ο χρήστης να βλέπει τις λαμβανόμενες μετρήσεις. (Προαιρετικό)

4. Η ακίδα του τροφοδοτικού τοποθετείται στην υποδοχή που υπάρχει στο κύκλωμα γι' αυτό τον σκοπό και η διάταξη τίθεται σε λειτουργία.

v. Ολοκλήρωση πειράματος

1. Μετά το τέλος του πειράματος, τερματίζεται η λειτουργία της διάταξης, αφαιρώντας την ακίδα του τροφοδοτικού από το κύκλωμα
2. Αφαιρείται από την διάταξη η βάση έδρασης δειγμάτων.
3. Ακολουθείται η διαδικασία απόρριψης των αποβλήτων που προέρχονται από ανθρώπινο δότη.
4. Οι ιντέντορες καθαρίζονται με 10% bleach για 20' και στην συνέχεια με αιθανόλη 70%.
5. Οι μετρήσεις του πειράματος λαμβάνονται με την μορφή .txt αρχείο από την κάρτα μνήμης SD.

2. Παράρτημα Β

Παρατίθεται ο κώδικας arduino ο οποίος είναι υπεύθυνος για την κίνηση του αισθητήρα πάνω από την βάση έδρασης δειγμάτων, την λήψη και την αποθήκευση μετρήσεων.

```
#include <SD.h>
#include <AccelStepper.h>

AccelStepper stepperX(1, 4 ,5); //(1, step , dir), EasyDriver 1/8 microstepping
AccelStepper stepperY(1, 6, 7);//A4988driver full step

const int resetPin = A5;
unsigned long milli=0;
const int enableX = 2;
const int enableY = 3;
const int buttonY = 9;
const int buttonX = 8;
int fByte = 0;
int inByte = 0;
int i = 0;
int j = 0;
char stopByte;
int count=1;
int post_count=1;
boolean Stop = true;
String filename = "data_";
int fileindex = 0;

//functions for laser control
void laser();
void getinfo();
void dataon();
void dataoff();
void setextinput();
void trigger();
void scanrate();
void move_down();
void move_up();
void move_right();
void experiment();
void scan();
void initi();
void init_on_first();
void metrisi();
void stopit();
int chipSelect = 10;
int newproject = 0;
void setup(){
```

```

    digitalWrite(resetPin, HIGH);
    delay(200);
    pinMode(resetPin, OUTPUT);

    Serial.begin(115200);
    stepperY.setMaxSpeed(10000.0);
    stepperY.setAcceleration(5000.0);
    stepperX.setMaxSpeed(10000.0);
    stepperX.setAcceleration(5000.0);
    pinMode(buttonX, INPUT);
    pinMode(buttonY, INPUT);
    pinMode(enableX, OUTPUT);
    pinMode(enableY, OUTPUT);

    digitalWrite(enableY,LOW);
    digitalWrite(enableX, LOW);
    //initialize;
    Serial.print("Initializing SD card...");

    // see if the card is present and can be initialized:
    if (!SD.begin(chipSelect)) {
        Serial.println("Card failed, or not present");
        return;
    }
    Serial.println("card initialized.");
    if (newproject) SD.remove("millis.txt"); else {
        File dataFile = SD.open("millis.txt");
        if (dataFile) {
            int mil[10];
            int i = 0;
            while (dataFile.available()) {
                int data = dataFile.read();
                if (data >= 48 && data <= 57) {
                    mil[i] = data-48;
                    i++;
                }
                else break;
            }
            int k=0;
            for (int j=i-1; j>=0; j--){
                milli=milli+mil[j]*pow(10,k);
                k++;
            }
            milli++;
            dataFile.close();
        }
    }
    delay(600);
    laser();
    setextinput();
    delay(200);
    laser();
    scanrate();
    delay(200);
    laser();
    settime();
    delay(200);

```

```

laser();
getinfo();

// Experiment Begining
Serial.println("Starting experiment..");
initi(); //steilto sthn arxh na akoumphsei kai ta duo buttons
init_on_first(); //steilto apo ekei sto kentro toy lou post
delay(500);
experiment();
delay(500);
Serial.println("End of experiment :)");
initi();
delay(500);
//Experiment End
//FINAL RESET
SD.remove("millis.txt");
File myFile = SD.open("millis.txt", FILE_WRITE);
if (myFile) {
  Serial.print("Writing to millis.txt...");
  myFile.println(milli+millis());
  // close the file:
  myFile.close();
} else {
  // if the file didn't open, print an error:
  Serial.println("error opening millis.txt");
}
digitalWrite(resetPin, LOW);
}

void loop()
{

}

//subrutines
void init_on_first() //initialize over 1st posts center. Oles oi routines
8ewroun arxh auto
{
  digitalWrite(enableY, LOW);
  stepperY.move(-6500);
  stepperY.runToPosition();
  digitalWrite(enableY, HIGH);
  delay(500);
  digitalWrite(enableX, LOW);
  stepperX.move(11700);
  stepperX.runToPosition();
  digitalWrite(enableX, HIGH);
  delay(500);
}

void move_down() //Move from one post's center to the other's.
{
  digitalWrite(enableY, LOW);
  stepperY.move(-31000);
  stepperY.runToPosition();
  digitalWrite(enableY, HIGH);
  delay(500);
}

```

```

    stopit();
}

void move_right() //Move from one post's center to the other's.
{
    digitalWrite(enableX, LOW);
    stepperX.move(31050);
    stepperX.runToPosition();
    digitalWrite(enableX, HIGH);
    delay(500);
    stopit();
}

void move_up() //Move from one post's center to the other's.
{
    digitalWrite(enableY, LOW);
    stepperY.move(31000);
    stepperY.runToPosition();
    digitalWrite(enableY, HIGH);
    delay(500);
    stopit();
}

void experiment() //consider laser initialized over the first post's center
{
    count=1;
    post_count=1;
    check1:
        scan();
        post_count=post_count+1;
        move_down();
        if (post_count<3)
        {
            goto check1;
        }
    scan();
        move_down();
        scan();
        post_count=post_count+1;
        move_right();
    scan();
    check2:
        post_count=post_count+1;
        move_up();
        scan();
        if (post_count<7)
        {
            goto check2;
        }
        post_count=post_count+1;
    count=count+1;
        if (count<4 )
        {
            move_right();
        }
    post_count=1;
    goto check1;
}
    stopit();
}

```

```

        delay(1000);
    }
    void scan(){

        digitalWrite(enableY, LOW);
        stepperY.move(3500); //3700
        stepperY.runToPosition();
        digitalWrite(enableY, HIGH);
        delay(1000);
        stopit();
        metrisi();
        digitalWrite(enableY, LOW);
        stepperY.move(-1700);
        stepperY.runToPosition();
        digitalWrite(enableY, HIGH);
        delay(200);
        digitalWrite(enableX, LOW);
        stepperX.move(3200);
        stepperX.runToPosition();
        digitalWrite(enableX, HIGH);
        delay(1000);
        stopit();
        metrisi();
        digitalWrite(enableY, LOW);
        stepperY.move(-1800);
        stepperY.runToPosition();
        digitalWrite(enableY, HIGH);
        delay(200);
        digitalWrite(enableX, LOW);
        stepperX.move(300);
        stepperX.runToPosition();
        digitalWrite(enableX, HIGH);
        delay(1000);
        stopit();
        metrisi();
        digitalWrite(enableX, LOW);
        stepperX.move(-300);
        stepperX.runToPosition();
        digitalWrite(enableX, HIGH);
        delay(200);
        digitalWrite(enableY, LOW);
        stepperY.move(-1800);
        stepperY.runToPosition();
        digitalWrite(enableY, HIGH);
        delay(1000);
        stopit();
        metrisi();
        digitalWrite(enableX, LOW);
        stepperX.move(-3200);
        stepperX.runToPosition();
        digitalWrite(enableX, HIGH);
        delay(200);
        digitalWrite(enableY, LOW);
        stepperY.move(-1700);
        stepperY.runToPosition();
        digitalWrite(enableY, HIGH);
        delay(1000);
    }
}

```

```

    stopit();
    metrisi();
    digitalWrite(enableY,LOW);
    stepperY.move(1700);
    stepperY.runToPosition();
    digitalWrite(enableY,HIGH);
    delay(200);
    digitalWrite(enableX,LOW);
    stepperX.move(-3200);
    stepperX.runToPosition();
    digitalWrite(enableX,HIGH);
    delay(1000);
    stopit();
    metrisi();
    digitalWrite(enableY,LOW);
    stepperY.move(1800);
    stepperY.runToPosition();
    digitalWrite(enableY,HIGH);
    delay(200);
    digitalWrite(enableX,LOW);
    stepperX.move(-300);
    stepperX.runToPosition();
    digitalWrite(enableX,HIGH);
    delay(1000);
    stopit();
    metrisi();
    digitalWrite(enableX,LOW);
    stepperX.move(300);
    stepperX.runToPosition();
    digitalWrite(enableX,HIGH);
    delay(200);
    digitalWrite(enableY,LOW);
    stepperY.move(1800);
    stepperY.runToPosition();
    digitalWrite(enableY,HIGH);
    delay(1000);
    stopit();
    metrisi();
    digitalWrite(enableX,LOW);
    stepperX.move(3200);
    stepperX.runToPosition();
    digitalWrite(enableX,HIGH);
    digitalWrite(enableY,LOW);
    stepperY.move(-1800);
    stepperY.runToPosition();
    digitalWrite(enableY,HIGH);
    delay(600);
}
void metrisi(){
    long input;
    for (int i=0; i<64; i++) Serial.read();
        while(1){
            if (Serial.read() == 13) break;
        }
        input = Serial.parseInt();
        while (input > 17000 || input<1000) input = Serial.parseInt(); //correc-
tion 4 first problematic values and wrong readouts due to buffer overfilling

```

```

    for (int i=0; i<50; i++){
        if (input >1000 && input < 10000) break;
        input = Serial.parseInt();
    }
    String timestamp = "";
    unsigned long mil = milli+millis();
    unsigned long hours = mil/3600000;
    mil = mil - hours*3600000;
    unsigned long minutes = mil/60000;
    mil = mil - minutes*60000;
    unsigned long seconds = mil/1000;
    mil = mil - seconds*1000;
    timestamp += " ";
    timestamp += hours;
    timestamp += ":";
    timestamp += minutes;
    timestamp += ":";
    timestamp +=seconds;
    String output ="";
    if (input < 16367){
        output += input;
        output += timestamp;
    }
    else{
        output += "Error meas";
        output += timestamp;
    }
    Serial.println(output);
    File file;
    file = SD.open(filename + fileindex + ".txt", FILE_WRITE);
    if (file){
        file.println(output);
        file.close();
    }
}
}
void stopit(){
//while (digitalRead(buttonX) == LOW || digitalRead(buttonY) == LOW){
    digitalWrite(enableX, LOW);
    stepperX.setSpeed(0);
    stepperX.runSpeed();
    digitalWrite(enableX, HIGH);
    digitalWrite(enableY,LOW);
    stepperY.setSpeed(0);
    stepperY.runSpeed();
    digitalWrite(enableY, HIGH);
}
void laser(){
    Serial.write(43);
    Serial.write(43);
    Serial.write(43);
    Serial.write(13);
    Serial.write(73);
    Serial.write(76);
    Serial.write(68);
    Serial.write(49);
}

```

```

void getinfo(){
    Serial.write(32);
    Serial.write(73);
    Serial.write(0);
    Serial.write(2);
}

void dataon(){
    Serial.write(32);
    Serial.write(119);
    Serial.write(0);
    Serial.write(2);
}

void dataoff(){
    Serial.write(32);
    Serial.write(118);
    Serial.write(0);
    Serial.write(2);
}

void setttime(){
    Serial.write(32);
    Serial.write(245);
    Serial.write(0);
    Serial.write(3);
    Serial.write(0);
    Serial.write(0);
    Serial.write(0);
    Serial.write(255);
}

void setextinput(){
    Serial.write(32);
    Serial.write(244);
    Serial.write(0);
    Serial.write(3);
    Serial.write(0);
    Serial.write(0);
    Serial.write(0);
    Serial.write(1);
}

void scanrate(){
    Serial.write(32);
    Serial.write(133);
    Serial.write(0);
    Serial.write(3);
    Serial.write(0);
    Serial.write(0);
    Serial.write(0);
    Serial.write(4);
}

void initi(){
while (digitalRead(buttonX) == LOW || digitalRead(buttonY) == LOW){
    if(digitalRead(buttonY) == LOW)
    {

```



```
    digitalWrite(enableY, LOW);
    stepperY.setSpeed(5000);
    stepperY.runSpeed();
}
else{
    digitalWrite(enableY, HIGH);
}
if (digitalRead(buttonX) == LOW)
{
    digitalWrite(enableX, LOW);
    stepperX.setSpeed(-5000);
    stepperX.runSpeed();
}
else{
    digitalWrite(enableX, HIGH);
}
}
```