



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ &
ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ
ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΛΙΚΩΝ

Διπλωματική Εργασία

Βιοπληροφορική ανάλυση του αναπνευστικού συστήματος

Θεοδώρα Γ. Κίζυλη

Επιβλέπων: Δημήτριος-Διονύσιος Κουτσούρης, Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα, 2017



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ &
ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ
ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΛΙΚΩΝ

Διπλωματική Εργασία

Βιοπληροφορική ανάλυση του αναπνευστικού συστήματος

Θεοδώρα Γ. Κίζυλη

Επιβλέπων: Δημήτριος-Διονύσιος Κουτσούρης, Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή:

.....

Δημήτριος Κουτσούρης,
Καθηγητής ΕΜΠ

.....

Ματσόπουλος Γεώργιος,
Καθηγητής ΕΜΠ

.....

Κωνσταντίνα Νικήτα,
Καθηγητής ΕΜΠ

Αθήνα, 2017

.....

Θεοδώρα Γ. Κίζυλη

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

Copyright © Θεοδώρα Γ. Κίζυλη, Ιούλιος 2017

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. Allrightsreserved.

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 τη συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τη συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευτεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Περίληψη

Το αναπνευστικό σύστημα είναι ζωτικής σημασίας για την φυσιολογική λειτουργία ολόκληρου του οργανισμού, καθώς φέρει το οξυγόνο που απαιτείται από κάθε πτυχή του σώματος. Από το οξυγόνο που χρειάζονται τα κύτταρα για να αντικαταστήσουν άλλα που έχουν πεθάνει, μέχρι το οξυγόνο που χρειάζονται οι μύες. Επίσης, παρέχει το οξυγόνο για τη διαδικασία μεταβολισμού στους ιστούς, απομακρύνει επιβλαβή αέρια, όπως το διοξείδιο του άνθρακα, διευκολύνει την αίσθηση της όσφρησης, παράγει την ομιλία και διατηρεί τα επίπεδα του νερού και την ισορροπία της θερμότητας του σώματος. Το αναπνευστικό σύστημα είναι ένα πολύπλοκο σύστημα που αποτελείται από πολλά συστατικά (πνευμονικές αρτηρίες, πνευμονικές φλέβες, πνεύμονες, τραχεία, βρογχιόλια, κυψελίδες) τα οποία πρέπει να συνεργαστούν μεταξύ τους για να επιτελέσει σωστά τις λειτουργίες του. Λόγω της πολυπλοκότητάς του, το ίδιο το αναπνευστικό σύστημα και πολλές από τις λειτουργίες του δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως. Για αυτόν τον λόγο, για πολλά από τα νοσήματα που σχετίζονται με το αναπνευστικό σύστημα δεν έχουν αποκρυπτογραφηθεί οι αιτίες της εκδήλωσής τους, ενώ ταυτόχρονα η θεραπεία τους είναι ακόμα άγνωστη. Σήμερα, η επιστημονική κοινότητα στην προσπάθεια κατανόησης της φυσιολογικής και παθολογικής λειτουργίας του αναπνευστικού συστήματος έχει στραφεί στον κλάδο της Συστημικής Βιολογίας και Ιατρικής σε συνδυασμό με δεδομένα που προέρχονται από -omics τεχνολογίες. Αυτή η προσέγγιση δίνει τη δυνατότητα στους ερευνητές να αποκτήσουν μια ολιστική θεώρηση του αναπνευστικού συστήματος, να προσδιορίσουν γονίδια και άλλα βιολογικά μόρια που σχετίζονται με την εκδήλωση νοσημάτων, αλλά και την σχεδίαση νέων φαρμάκων για την εξέλιξη και τη θεραπεία τους.

Με βάση τα παραπάνω, στην παρούσα εργασία, παρουσιάζεται αρχικά μια περιγραφή της ανατομίας και των λειτουργιών του αναπνευστικού συστήματος αναδεικνύοντας με αυτό τον τρόπο την σημασία του στον οργανισμό αλλά και την πολυπλοκότητα αυτού. Στη συνέχεια, περιγράφονται οι βασικές έννοιες του κλάδου των -omics τεχνολογιών, της συστημικής βιολογίας και διαθέσιμων εργαλείων της βιοπληροφορικής που χρησιμοποιούνται σήμερα για την κατανόηση της λειτουργίας των συστημάτων του οργανισμού και τον προσδιορισμό των αιτιών που οδηγούν στην εκδήλωση νοσημάτων. Τέλος, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της διεξαγωγικής μελέτης που έλαβε χώρα για τις ασθένειες του αναπνευστικού συστήματος και των αιτιών τους, με διάφορα εργαλεία βιοπληροφορικής.

Λέξεις Κλειδιά: «αναπνευστικό σύστημα, omics τεχνολογίες, αλγόριθμος BLAST, αλγόριθμος FASTA, βιοπληροφορική ανάλυση, γονίδιο, νουκλεοτίδιο, αλληλουχίες , βιοδείκτες»

Abstract

The respiratory system is vital for the normal function of the entire body, as it carries the oxygen required by every aspect of the body, from the oxygen the cells need to replace others that have died, up to the oxygen needed by the muscles. It also provides oxygen for tissue metabolic process, removes harmful gases such as carbon dioxide, facilitates sense of smell, produces speech and maintains water levels and balance of body heat. The respiratory system is a complex system consisting of many components (pulmonary arteries, pulmonary veins, lungs, trachea, bronchioles, alveoli) that must cooperate to perform properly. Due to its complexity, the respiratory system itself and many of its functions are not fully understood. For this reason, many causes of the respiratory diseases have not been deciphered yet, while their treatment is still unknown. Today, the scientific community in the effort to understand the physiological and pathological functioning of the respiratory system has turned to the system of Systemic Biology and Medicine combined with data derived from -omics technologies. This approach enables researchers to acquire a holistic view of the respiratory system, identify genes and other biological molecules associated with disease outbreaks, and design new drugs for their progression and treatment. According to the above, in the present thesis, a description of the anatomy and functions of the respiratory system is first presented, highlighting its importance and complexity. The basic concepts of the -omics technologies, system biology and available bioinformatics tools that are currently used to understand the functioning of the body's systems and to identify the causes leading to the emergence of diseases are described. Finally, the results of the research conducted using bioinformatics tools on respiratory diseases and their causes, are presented.

Keywords: «respiratory system, omics technologies, BLAST algorithm, FASTA algorithm, bioinformatics, gene, nucleotide, sequence, biomarkers»

Ευχαριστίες

Η διπλωματική αυτή εργασία εκπονήθηκε υπό την επίβλεψη του κ. Δημητρίου Κουτσούρη, καθηγητή του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου (Ε.Μ.Π.) της σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών, στον οποίο και οφείλω ιδιαίτερες ευχαριστίες. Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον μεταδιδακτορικό συνεργάτη του εργαστηρίου Βιοϊατρικής Τεχνολογίας, κ. Ιωάννη Μακρή για την πολύτιμη βοήθεια που ήταν πάντοτε διατεθειμένος να προσφέρει, για την άριστη καθοδήγηση κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας αλλά και για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα. Έπειτα θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές της σχολής ΗΜΜΥ του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου που με καθοδήγησαν στο πολύ ενδιαφέρον και ευρύ αντικείμενο του ηλεκτρολόγου μηχανικού. Τέλος, δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου και ιδιαιτέρως την μητέρα μου, Ευτυχία, και την φίλη μου, Ευρυδίκη, για την ιδιαίτερη υποστήριξη, υπομονή και εμπύχωση που κατέδειξαν καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου. Αφιερώνω την παρούσα εργασία στον αγαπημένο μου πατέρα, Γιώργο, που μας άφησε νωρίς.

Αθήνα, 2017

Θεοδώρα Γ. Κίζυλη

*Αν να κρατάς καλά μπορείςτο λογικό σου, όταν τριγύρω σου όλοι
τά 'χουν χαμένα και σ' εσέτης ταραχής των ρίχνουν την αιτία.
Αν να εμπιστεύεσαι μπορείςτον ίδιο τον εαυτό σου, όταν ο κόσμος
δεν σε πιστεύει, κι αν μπορείςνα του σχωρνάς αυτή τη δυσπιστία.
Να περιμένεις αν μπορείςδίχως να χάνεις την υπομονή σου.
Κι αν άλλοι σε συκοφαντούν, να μην καταδεχθείς ποτέ το ψέμα,
κι αν σε μισούν, εσύ ποτέσε μίσος ταπεινό να μην ξεπέσεις,
μα να μην κάνεις τον καλόή τον πολύ σοφό στα λόγια.
Αν να ονειρεύεσαι μπορείς, και να μην είσαι δούλος των ονείρων
αν να στοχάζεσαι μπορείς, δίχως να γίνει ο στοχασμός σκοπός σου,
αν ν' αντικρίζεις σου βαστάτο θρίαμβο και τη συμφορά παρόμοια
κι όμοια να φέρνεσαι σ' αυτούς τους δυο τυραννικούς απατεώνες,
αν σου βαστά η ψυχή ν' ακούσόποιαν αλήθεια εσύ είχες ειπωμένη,
παρλλαγήμένη απ' τους κακούς, για να 'ναι για τους άμυαλους παγίδα,
ή συντριμμένα να θεωρείςόσα σου έχουν ρουφήξει τη ζωή σου
και πάλι να ξαναρχινάςνα χτίζεις μ' εργαλεία πού 'ναι φθαρμένα.
Αν όσα απόκτησες μπορείςσ' ένα σωρό μαζί να τα μαζέψεις
και δίχως φόβο, μονομιάςκορόνα ή γράμματα όλα να τα παίζεις
και να τα χάσεις και απ' αρχής, ατράνταχτος να ξεκινήσεις πάλι*

και να μη βγάλεις και μιλιάποτέ γι' αυτόν τον ζαφνικό χαμό σου.
Αν νεύρα και καρδιά μπορείς και σπλάχνα και μυαλό και όλα να τασφίζεις
να σε δουλέψουν ζαναρχής, κι ας είναι από πολύ καιρό σωσμένα
και να κρατιέσαι πάντα ορθός, όταν δε σου 'χει τίποτε απομείνει
παρά μονάχα η θέληση, κράζοντας σ' όλα αυτά: «ΒΑΣΤΑΤΕ».
Αν με τα πλήθη να μιλάς μπορείς και να κρατάς την αρετή σου,
με βασιλιάδες να γυρνάς δίχως απ' τους μικρούς να ξεμακρύνεις.
Αν μήτε φίλοι, μήτ' εχθροί μπορούνε πια ποτέ να πειράζουν,
όλο τον κόσμο αν αγαπάς, μα και ποτέ πάρα πολύ κανένα.
Αν του θυμού σου τις στιγμές που φαίνεται αδυσώπητη η ψυχή σου,
μπορείς ν' αφήσεις να διαβούν την πρώτη, ζαναβρίσκοντας, γαλήνη,
δική σου θα ναι τότε η Γη, μ' όσα και μ' ό,τι απάνω της κι αν έχει
και κάτι ακόμα πιο πολύ:
Άνδρας αληθινός θα 'σαι παιδί μου.

Rudyard Kipling (μετάφραση του Κ. Βάρναλη)

Περιεχόμενα

Εισαγωγή	1
Βιβλιογραφία-Πρόλογος.....	6
Κεφάλαιο 1: Αναπνευστικό σύστημα	7
1.1 Ορισμός.....	7
1.2 Ανατομία αναπνευστικού συστήματος	7
1.3 Πνευμονικοί Όγκοι.....	9
1.4 Ο περιοριστικός ρόλος του αναπνευστικού συστήματος κατά την άσκηση.....	10
1.5 Νοσήματα και κληρονομικότητα	13
1.5.1 Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια.....	13
1.5.2 Άσθμα.....	14
1.5.3 Πνευμονία	15
1.5.4 Κυστική ίνωση	15
1.5.5 Καρκίνος του πνεύμονα	17
1.6 Άλλες παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος.....	18
Βιβλιογραφία –Κεφάλαιο 1	21
Κεφάλαιο 2: Βιοπληροφορική	22
2.1 Ορισμός.....	22
2.2 Αναγκαιότητα βιοπληροφορικής	23
2.3 Στόχοι βιοπληροφορικής.....	24
2.4 Εργαλεία βιοπληροφορικής.....	25
2.4.1 Ο αλγόριθμος FASTA.....	26
2.4.2 Ο αλγόριθμος BLAST.....	28
2.5 Η βιοπληροφορική στη μελέτη των νοσημάτων	32
2.6 Εφαρμογές βιοπληροφορικής.....	33

2.7 Η εξέλιξη της βιοπληροφορικής σε -omic επιστήμη	34
2.8 Η κλινική βιοπληροφορική	37
Βιβλιογραφία-Κεφάλαιο 2	40
Αποτελέσματα Έρευνας.....	41
Κεφάλαιο 3: Γονιδιακή έκφραση του προσαρμοστικού αναπνευστικού συστήματος.....	43
3.1 Γονιδιακή έκφραση	43
3.1.1 Προσδιορισμός γονιδιακής έκφρασης.....	45
3.2 Σύγκριση των νουκλεοτιδικών ακολουθιών που σχετίζονται με ασθένειες του αναπνευστικού συστήματος.....	46
Βιβλιογραφία-Κεφάλαιο 3	76
Κεφάλαιο 4: Βιοδείκτες και μέθοδοι εύρεσής τους	81
4.1 Ορισμός βιοδεικτών	81
4.1.1 Βιοδείκτες και κλινικά τελικά σημεία.....	82
4.1.2 Οι βιοδείκτες ως υποκατάστατα τελικών σημείων	83
4.1.3 Χαρακτηρισμός και αξιολόγηση βιοδεικτών	85
4.1.4 Βιοδείκτες και παροδικότητα.....	87
4.2 Βιοπληροφορικές και στατιστικές μέθοδοι εύρεσης βιοδεικτών	89
4.2.1 Γονιδιωματική προσέγγιση	90
4.2.2 Πρωτεομική προσέγγιση	91
4.2.3 Μεταβολομική προσέγγιση (Metabolomic Approach)	110
4.2.4 Λιπιδομική προσέγγιση (Lipidomics Approach)	111
Βιβλιογραφία-Κεφάλαιο 4.....	113
Συμπεράσματα.....	119
Κεφάλαιο 5 :Συμπεράσματα και μελλοντική έρευνα.....	121

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Περιγραφή του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού συστήματος.	8
Εικόνα 2: Διαγραμματική απεικόνιση του αλγόριθμου FASTA.....	27
Εικόνα 3: Παράδειγμα αλγορίθμου BLAST.....	29
Εικόνα 4: Τα τέσσερα επίπεδα της γενετικής πληροφορίας και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση. 36	
Εικόνα 5: Μορφή της γέλης μετά την εκτέλεση του 2D-PAGE.....	93
Εικόνα 6: Σχηματική διάταξη ενός φασματόμετρου μάζας.....	95
Εικόνα 7: Σύνδεση αέριου χρωματογράφου (GC) με φασματόμετρο μάζας (MS).....	96
Εικόνα 8: α) Διάταξη ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό β) Εκρόφιση ιόντων από το διάλυμα.	98
Εικόνα 9: Σχηματικό διάγραμμα φασματόμετρου μάζας «χρόνου πτήσης».	99
Εικόνα 10: Δείγματα δημιουργιών μικροσυστοιχιών αντισωμάτων και ανιχνεύσεων.....	101
Εικόνα 11: Πλάκες 96 φρεατίων.....	102
Εικόνα 12: Κατασκευή μικροσυστοιχίας ιστού (TMA).	104
Εικόνα 13: Μπλοκ μικροσυστοιχίας ιστού διαμέτρου πυρήνα 0.6 mm.	105
Εικόνα 14: Μπλοκ μικροσυστοιχίας ιστού.	106
Εικόνα 15: Μια διαφάνεια μικροσυστοιχίας ιστού.....	106

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου SERPINA1 με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.	50
Πίνακας 2: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου HMOX1 με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.	51
Πίνακας 3: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου MMP1 με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.	52
Πίνακας 4: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου ELANE με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.	53
Πίνακας 5: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου ELN με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.	53
Πίνακας 6: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου CFTR με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.	54
Πίνακας 7: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου TGFB1 με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.	56
Πίνακας 8: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου HNMT με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.	57
Πίνακας 9: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου IL13 με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.	58
Πίνακας 10: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου PLA2G7 με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.	59
Πίνακας 11: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου SCGB3A2 με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.	60
Πίνακας 12: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου TNF με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.	61
Πίνακας 13: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου CCL11 με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.	62
Πίνακας 14: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου MUC7 με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.	63
Πίνακας 15: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου ADRB2 με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.	63

Πίνακας 16: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου ADAM33 με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.	64
Πίνακας 17: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου CXCL8 με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.	65
Πίνακας 18: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου IL6 με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.	66
Πίνακας 19: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου PIK3CA με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.	67
Πίνακας 20: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου ERBB2 με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.	68
Πίνακας 21: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου IRF1 με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.	69
Πίνακας 22: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου EGFR με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.	70
Πίνακας 23: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου SLC22A18 με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.	71
Πίνακας 24: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου KRAS με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.	72
Πίνακας 25: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου BRAF με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.	73
Πίνακας 26: Ονομασίες Οργανισμών των οποίων οι νουκλεοτιδικές ακολουθίες παρουσίασαν ομοιότητες με τις αντίστοιχες ανθρώπινες νουκλεοτιδικές ακολουθίες.	73

Μέρος Ι

Εισαγωγή

Πρόλογος

Τις τελευταίες δεκαετίες, πολλές έρευνες έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους στον τομέα της γονιδιωματικής και σε άλλους μοριακούς τομείς [4]. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να παραχθεί ένας τεράστιος όγκος πληροφοριών που σχετίζονται με τη μοριακή βιολογία. Η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών στις επιστήμες της βιολογίας και της ιατρικής μάς επιτρέπουν να “κοιτάξουμε” βαθιά μέσα στο ανθρώπινο γονιδίωμα του κάθε ατόμου, να ταυτοποιήσουμε τα διαφορετικά βιομόρια του κυττάρου και τις λειτουργίες που επιτελούν και να αναζητήσουμε την δομή και οργάνωση των ιστών με τεχνικές απεικόνισης υψηλής ανάλυσης. Πιο συγκεκριμένα, εξελιγμένες αναλυτικές μέθοδοι μεγάλης κλίμακας για την ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης, των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και των μεταβολιτών είναι πλέον διαθέσιμες και έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό της γενετικής βάσης των ασθενειών αλλά και βιοδεικτών των οποίων οι διαφορές στη συγκέντρωση αντανακλούν διαταραχές στη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού. Η συλλογή όλων αυτών των βιοϊατρικών δεδομένων αυξάνεται εκθετικά, από giga-(10^9), tera-(10^{12}), σε peta-(10^{15}) και zettabytes (10^{21}), τόσο αυτών που διατίθενται ελεύθερα όσο και εκείνων στα οποία η πρόσβαση είναι περιορισμένη. Ωστόσο, όλοι συμφωνούν ότι οι τεχνολογικές εφαρμογές και πληροφορίες που αφορούν ιατρικά δεδομένα έχουν επηρεάσει ελάχιστα την κλινική πράξη [5].

Επιπρόσθετα, οι ιδιότητες ενός βιολογικού συστήματος δεν προσδιορίζονται μόνο από την απλή πρόσθεση των στοιχειωδών λειτουργιών του, αλλά προκύπτουν και από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των στοιχείων του (γονιδίων, μετάγραφων, πρωτεϊνών, μεταβολιτών) σε κάθε επίπεδο βιολογικής οργάνωσης (μόρια, οργανίδια, κύτταρα, ιστούς και όργανα) [3]. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των συστατικών και η διαλεύκανση των ρυθμιστικών μηχανισμών τους θεωρείται το κλειδί για τον καθορισμό των αναδυόμενων ιδιοτήτων. Αυτή η προσέγγιση είναι ένας καινούργιος επιστημονικός κλάδος που αναφέρεται ως συστημική βιολογία, κύριος στόχος της οποίας είναι η κατανόηση των βιολογικών συστημάτων στο σύνολό τους. Οι εφαρμογές της συστημικής βιολογίας παράγουν μαθηματικά και υπολογιστικά μοντέλα που συνδέουν τις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών του εκάστοτε βιολογικού συστήματος σε αναδυόμενες ιδιότητες [1].

Οι προσεγγίσεις της συστημικής βιολογίας έχουν εφαρμοστεί με επιτυχία και σε ασθένειες του αναπνευστικού συστήματος. Η επιθηλιακή επιφάνεια του πνεύμονα είναι ένας από τους πιο ζωτικούς φραγμούς ή αισθητήρες του σώματος που ανταποκρίνονται στο εξωτερικό περιβάλλον και κατ' επέκταση κατευθύνει την έκθεση σε τοξικολογικούς παράγοντες και ερεθίσματα ή λοιμώξεις. Το αναπνευστικό σύστημα είναι εξαιρετικά πολύπλοκο, τόσο στην υγιή όσο και στην παθολογική κατάσταση. Αυτό έχει αναγνωριστεί από καιρό στην κλινική πράξη, επειδή χρόνιες ασθένειες, όπως το άσθμα και η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια είναι συνήθως πολύπλοκες, πολυπαραγοντικές και επηρεάζονται από εξωτερικά, περιβαλλοντικά και εσωτερικά φλεγμονώδη ερεθίσματα [6]. Επιπλέον, έχουν την τάση να μην εκδηλώνονται σε μια στιγμή, αλλά με την πάροδο του χρόνου, όπως για παράδειγμα η χρονική συμπεριφορά του άσθματος η οποία κυμαίνεται διαχρονικά σε απάντηση στα διαρκώς μεταβαλλόμενα ερεθίσματα. Ως αποτέλεσμα, το αναπνευστικό σύστημα είναι αναπόφευκτα μια ιδανική τοποθεσία, επιρρεπής σε διάφορες ασθένειες και τις συνέπειές τους. Ωστόσο, ένα κρίσιμο κενό στη γνώση που μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα όσον αφορά την ανάπτυξη των θεραπευτικών μεθόδων για τις ασθένειες που σχετίζονται με τον πνεύμονα είναι η έλλειψη της πλήρους κατανόησης των μηχανισμών εξέλιξης της φυσιολογικής λειτουργίας του αναπνευστικού συστήματος και του πώς οι μεταβολές σε αυτό συμβάλλουν στην παθοφυσιολογία της νόσου [7]. Επομένως, καθίσταται ολοένα και πιο σαφές ότι πολλές ασθένειες του αναπνευστικού συστήματος έχουν την καταγωγή τους στα πρώτα χρόνια ζωής και επηρεάζονται από αναπτυξιακούς, καθώς και γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Μια λεπτομερής κατανόηση της ανάπτυξης των πνευμόνων είναι απαραίτητη για να καταλάβουμε πώς οι περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες επηρεάζουν τη φυσιολογική λειτουργία τους.

Όμως, τα τελευταία χρόνια, έχει υπάρξει μια μεγάλη αύξηση των γονιδιωματικών δεδομένων που διευκολύνουν τον επαναπροσδιορισμό της ανάπτυξης των πνευμόνων σε μοριακό επίπεδο, παρέχοντας με αυτόν τον τρόπο μία καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών της παθοφυσιολογίας του πνεύμονα, και τον προσδιορισμό υποθετικών δεικτών για έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία των ασθενειών που σχετίζονται με αυτόν [7]. Πιο συγκεκριμένα, αρκετά πολυκεντρικά συνεργατικά έργα μεγάλης κλίμακας έχουν πλέον αρχίσει να αναπτύσσουν μεθόδους για την αποκρυπτογράφηση και την ανάπτυξη των αναπνευστικών ασθενειών. Κοινός στόχος τους είναι να εντοπίσουν νέα, σύνθετα προφίλ βιοδεικτών που συνδυάζουν διαφορετικούς κλινικούς,

βιολογικούς και λειτουργικούς γονιδιωματικούς τύπους δεδομένων σε μοριακά αποτυπώματα και αποτυπώματα του φαινοτύπου της εκάστοτε αναπνευστικής νόσου. Αυτά τα νέα διαγνωστικά και προγνωστικά εργαλεία βοηθούν επιπλέον στον εντοπισμό νέων φαρμακευτικών στόχων για καλύτερη και εξατομικευμένη θεραπεία [2]. Τέτοιες έρευνες συστημικής ιατρικής βασίζονται στις κοινές προσπάθειες διεπιστημονικών εμπειρογνομόνων από τον ακαδημαϊκό χώρο, από ινστιτούτα, κεντρικά νοσοκομεία και τη φαρμακευτική βιομηχανία. Μια σημαντική πρόκληση που αντιμετωπίζουν αυτές οι έρευνες είναι ο καθορισμός του βέλτιστου εύρους, ο συνδυασμός και το βάθος των πειραματικών μεθόδων, απαραίτητα για την κατανόηση της ασθένειας και της θεραπείας της.

Τέλος, σε σύγκριση με άλλους κλάδους, υπήρξε μια καθυστέρηση στην εφαρμογή της συστημικής αυτής προσέγγισης στο αναπνευστικό σύστημα. Επομένως, η συστημική μελέτη του αναπνευστικού συστήματος σε συνδυασμό με την ενσωμάτωση σε πολλαπλά επίπεδα των μοριακών και λειτουργικών πληροφοριών έχει μεγάλες δυνατότητες για την ανακάλυψη των υποκείμενων μηχανισμών που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της ανάπτυξης των πνευμόνων.

Βιβλιογραφία-Πρόλογος

1. Wheelock CE, Goss VM, Balgoma D, Nicholas B, Brandsma J, Skipp PJ, Snowden S, Burg D, D'Amico A, Horvath I, Chaiboonchoe A, Ahmed H, Ballereau S, Rossios C, Chung KF, Montuschi P, Fowler SJ, Adcock IM, Postle AD, Dahlén SE, Rowe A, Sterk PJ, Auffray C, Djukanovic R; U-BIOPRED Study Group, *Application of 'omics technologies to biomarker discovery in inflammatory lung diseases*, Eur Respir J. 2013 Sep;42(3):802-25. doi: 10.1183/09031936.00078812. Epub 2013 Feb 8
2. HoodL, BallingR, AuffrayC, *Revolutionizing medicine in the 21st century through systems approaches*, Biotechnol J 2012; 7: 992–100
3. Cracowski JL, Cracowski C, Bessard G et al *Increased lipid peroxidation in patients with pulmonary hypertension*, Am J Respir Crit Care Med 2001; 164: 1038–1042
4. Khalid Raza, *APPLICATION OF DATA MINING IN BIONFORMATICS*, Indian Journal of Computer Science and Engineering Vol 1 No 2, 114-118
5. Rozman D, Acimovic J, Schmeck B, *Training in Systems Approaches for the Next Generation of Life Scientists and Medical Doctors*, Methods Mol Biol. 2016;1386:73-86. doi: 10.1007/978-1-4939-3283-2_5
6. Lau AT, Chiu JF, *Biomarkers of Lung-Related Diseases: Current Knowledge by Proteomic Approaches*, J Cell Physiol. 2009 Dec;221(3):535-43. doi: 10.1002/jcp.21893
7. Soumyaroop Bhattacharya and Thomas J. Mariani, *Systems biology approaches to identify developmental bases for lung diseases*, Pediatr Res. 2013 Apr; 73(4 0 2): 514–522.

Κεφάλαιο 1: Αναπνευστικό σύστημα

1.1 Ορισμός

Το αναπνευστικό σύστημα¹ είναι το σύστημα εκείνων των οργάνων του ανθρώπινου οργανισμού που χρησιμεύουν στην πρόσληψη του ατμοσφαιρικού αέρα από το περιβάλλον, την εισαγωγή του στους πνεύμονες, την παραλαβή του οξυγόνου από αυτόν και την απόδοση σε αυτόν του διοξειδίου του άνθρακα. Όλη αυτή η διαδικασία που τροφοδοτεί τον οργανισμό με το απαραίτητο στη ζωή οξυγόνο είναι η αναπνοή.

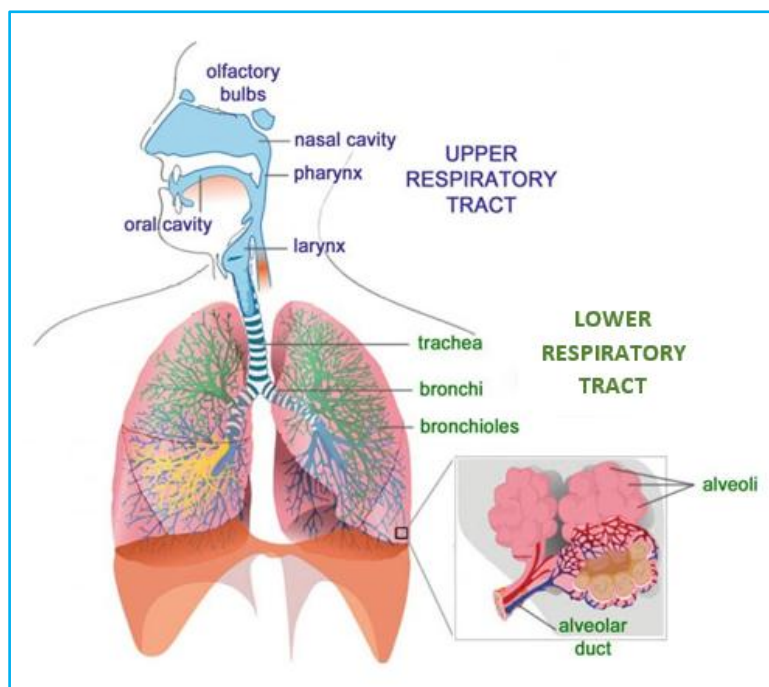
Η λειτουργία της αναπνοής διακρίνεται σε δύο φάσεις, την εισπνοή και την εκπνοή. Κατά την εισπνοή, το οξυγόνο μεταφέρεται από το αίμα σε όλα τα κύτταρα του σώματος και χρησιμεύει στην καύση των θρεπτικών ουσιών που ο ίδιος ο οργανισμός επιλέγει μέσα από τις πρώτες ύλες που λαμβάνει από τις τροφές. Με την καύση των θρεπτικών ουσιών απελευθερώνεται ενέργεια που είναι απαραίτητη για τις διάφορες λειτουργίες του οργανισμού. Κατά την καύση παράγεται, επίσης, διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) που σε μεγάλες συγκεντρώσεις είναι βλαβερό για τον ανθρώπινο οργανισμό, γι' αυτό και το αναπνευστικό σύστημα αποβάλλει μεγάλες ποσότητες CO₂ από αυτόν. Η εν λόγω αποβολή CO₂ επιτυγχάνεται μέσω του αίματος, το οποίο αφού περισυλλέξει το CO₂ από τα κύτταρα, το μεταφέρει στους πνεύμονες, οι οποίοι με τη σειρά τους το αποβάλλουν στον ατμοσφαιρικό αέρα μέσω της διαδικασίας της εκπνοής.

1.2 Ανατομία αναπνευστικού συστήματος

Το αναπνευστικό σύστημα διακρίνεται λειτουργικά σε δύο ζώνες. Την ανώτερη αναπνευστική οδό (ή ανώτερο αναπνευστικό σύστημα), που αποτελείται από την μύτη (ή ρίνα, από το αρχαίο ρίσι-ρινός), τον ρινοφάρυγγα και τον λάρυγγα, και βρίσκονται στο κεφάλι και στον λαιμό του ανθρώπου, καθώς και από την κατώτερη αναπνευστική οδό, που σχηματίζεται από την τραχεία και τους βρόγχους, και βρίσκεται στον θώρακα. Οι πνεύμονες είναι το κατ' εξοχήν όργανο της ανταλλαγής των αερίων, όπου ο αέρας έρχεται σε άμεση επαφή με το αίμα, και βρίσκονται στον θώρακα ενώ τα υπόλοιπα όργανα απαρτίζουν τους αεραγωγούς. Οι ανατομικοί αυτοί σχηματισμοί συμμετέχουν επίσης στη λειτουργία του αναπνευστικού συστήματος.

¹http://en.wikipedia.org/wiki/Respiratory_system

Πιο συγκεκριμένα, οι αεραγωγοί ξεκινούν από τα στόμια της μύτης και του στόματος πίσω από τα οποία υπάρχουν αντίστοιχα η ρινική και η στοματική κοιλότητα. Προς τα πίσω αυτές οι κοιλότητες καταλήγουν σε κοινό αγωγό τον φάρυγγα και ακόμη πιο πίσω στο επόμενο τμήμα της αναπνευστικής οδού τον λάρυγγα. Μετά τον φάρυγγα ξεκινά η τραχεία η οποία χωρίζεται σε δύο κύριους βρόγχους, τον αριστερό και τον δεξιό μέσα από τους οποίους ο αέρας κατευθύνεται αντίστοιχα στον αριστερό και δεξιό πνεύμονα. Κάθε κύριος βρόγχος χωρίζεται σε μικρότερους σχηματίζοντας έτσι την πρώτη τάξη διακλαδώσεων. Οι βρόγχοι της πρώτης τάξης διακλαδίζονται σε άλλους δευτέρας τάξεως κ.ο.κ. Μέχρι και την δέκατη έβδομη διακλάδωση οι βρόγχοι άγουν τον αέρα χωρίς να επιτελείται καμία ανταλλαγή αερίων. Τον καθαρίζουν από σκόνες, μικρόβια και άλλες ουσίες με μηχανικό, χημικό και βιολογικό τρόπο. Από εκεί και κάτω μέχρι την εικοστή τρίτη τάξη διακλαδώσεων, που είναι και η τελική, σχηματίζονται κατά μήκος των βρόγχων μικροσκοπικοί θύλακες οι οποίοι και επικοινωνούν με τον αυλό των βρόγχων. Ονομάζονται κυψελίδες και αποτελούν την κύρια λειτουργική μονάδα του πνεύμονα που υποδέχεται τελικά τον αέρα. Από τις κυψελίδες ξεκινά ουσιαστικά η ανταλλαγή των αερίων στον οργανισμό. Μια σχηματική αναπαράσταση των παραπάνω δίνεται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1: Περιγραφή του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού συστήματος.

1.3 Πνευμονικοί Όγκοι

Με τον όρο «πνευμονικό όγκο» ορίζουμε τον όγκο του αέρα που μπορεί να περιέχεται σε κάποιο διακριτό διαμέρισμα ή χώρο των πνευμόνων. Ο αέρας εντός των πνευμόνων θεωρείται ότι βρίσκεται στη θερμοκρασία του σώματος, είναι πλήρως κορεσμένος με υδρατμούς και υπόκειται στην πίεση του περιβάλλοντος (BTPS).

Πριν προχωρήσουμε στην παράθεση των υπαρχόντων πνευμονικών όγκων, θα ήταν συνετό να αναφερθούμε στον όρο της χωρητικότητας, όσον αφορά στο αναπνευστικό σύστημα του ανθρώπου, για να αποκτήσουμε μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα των πνευμονικών όγκων.

Με τον όρο χωρητικότητα εννοούμε το άθροισμα των πνευμονικών όγκων. Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι η χωρητικότητα είναι ένα μέγεθος που υποδιαιρείται σε αντίθεση με τον πνευμονικό όγκο που δεν επιδέχεται τέτοιας διαδικασίας.

Οι όγκοι που θα μας απασχολήσουν είναι 5 ενώ οι χωρητικότητες 4.

Μία σημαντική διάκριση των όγκων και των χωρητικοτήτων, που αξίζει να σημειωθεί, είναι αυτή σε στατικούς και δυναμικούς όγκους και σε στατικές και δυναμικές χωρητικότητες. Οι στατικοί όγκοι, με τους οποίους και θα ασχοληθούμε στην προκείμενη εργασία, δεν εξαρτώνται από το ρυθμό με τον οποίο εισπνέονται ή εκπνέονται, σε αντίθεση με τους δυναμικούς που εξαρτώνται άμεσα από αυτόν τον ρυθμό. Με άλλα λόγια, στατικοί είναι οι όγκοι και οι χωρητικότητες, όταν μετρούνται κατά τη διάρκεια μιας μέγιστης εισπνοής ή/και εκπνοής, ενώ δυναμικοί είναι αυτοί που μετρούνται κατά τη διάρκεια επαναλαμβανόμενων αναπνοών, όπως για παράδειγμα κατά τη διάρκεια μιας άσκησης. Οι στατικοί όγκοι σχετίζονται περισσότερο με τη μάζα του σώματος, το βάρος και το ύψος του ατόμου, και λιγότερο με την φυσική του κατάσταση, εν αντιθέσει με τους δυναμικούς, οι οποίοι συνήθως σχετίζονται περισσότερο με τη φυσική κατάσταση παρά με τα υπόλοιπα.

Οι πνευμονικοί όγκοι και οι χωρητικότητες παρουσιάζονται αναλυτικά στη συνέχεια:

- Ολική Πνευμονική Χωρητικότητα (TotalLungCapacity, TLC) είναι ο όγκος αέρα που περιέχεται στο αναπνευστικό σύστημα στην μέγιστη εισπνευστική θέση.
- Υπολειπόμενος όγκος (ResidualVolume, RV) είναι ο όγκος αέρα που παραμένει εντός του αναπνευστικού συστήματος μετά από μέγιστη εκούσια εκπνοή.

- Λειτουργική Υπολειπόμενη Χωρητικότητα (FunctionalResidualCapacity, FRC) είναι ο όγκος αέρα που παραμένει εντός του αναπνευστικού συστήματος στο τέλος ήρεμης εκπνοής. Καλείται και τελο-εκπνευστικός όγκος.
- Αναπνεόμενος όγκος (TidalVolume, V_T) είναι ο όγκος αέρα που διακινείται από το αναπνευστικό σύστημα κατά την διάρκεια κάθε ήρεμης αναπνοής
- Εισπνευστικός εφεδρικός όγκος (InspiratoryReserveVolume, IRV) είναι ο όγκος αέρα που αντιστοιχεί μεταξύ TLC και V_T . ($IRV = TLC - V_T$)
- Εκπνευστικός εφεδρικός όγκος (ExpiratoryReserveVolume, ERV) είναι ο όγκος αέρα που αντιστοιχεί μεταξύ FRC και RV. ($ERV = FRC - RV$)
- Ζωτική Χωρητικότητα (VitalCapacity, VC) είναι ο όγκος αέρα που εκπνέεται από την μέγιστη εισπνευστική θέση προς την μέγιστη εκπνευστική θέση ή και αντιστρόφως (FIVC), βιαίως (FEVC) ή βραδέως (SVC).
- Εισπνευστική Χωρητικότητα (InspiratoryCapacity, IC) είναι ο όγκος αέρα που εισπνέεται από την Λειτουργική Υπολειπόμενη Χωρητικότητα ως τη μέγιστη εισπνευστική θέση.
- Όγκος Ηρεμίας (RelaxationVolume- V_r), είναι ο πνευμονικός όγκος όπου η ελαστική δύναμη επαναφοράς του αναπνευστικού συστήματος είναι μηδέν. Σε κατάσταση ηρεμίας, σε φυσιολογικά άτομα, ισούται με την Λειτουργική Υπολειπόμενη Χωρητικότητα (FunctionalResidualCapacity-FRC).
- Θωρακικός όγκος αέρα (ThoracicGasVolume, TGV) ή Απόλυτος Πνευμονικός Όγκος (AbsoluteLungVolume, V_L) είναι συνήθως η FRC προσδιορισμένη με κάποια τεχνική μέτρησης των πνευμονικών όγκων συνήθως την «πληθυσμογραφική μέθοδο».

1.4 Ο περιοριστικός ρόλος του αναπνευστικού συστήματος κατά την άσκηση

Κατά την εκτέλεση οποιασδήποτε άσκησης, μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους που καθορίζει την συνέχειά της καθώς και την ολοκλήρωσή της, είναι το αναπνευστικό σύστημα. Οι εργατικοί μύες απαιτούν οξυγόνο τόσο κατά τη διάρκεια της άσκησης, όσο και μετά το πέρας της. Εκτός από τον ουσιαστικό ρόλο του στην ανταλλαγή των αερίων, το αναπνευστικό σύστημα συμμετέχει και σε άλλες δώδεκα λειτουργίες του οργανισμού. Συγκεκριμένα, αποτελεί απαραίτητο όργανο για την παραγωγή της φωνής και συμβάλλει στην άμυνα του οργανισμού έναντι της

εισόδου παθογόνων μικροοργανισμών ή ξένων σωματιδίων. Επιπλέον ρυθμίζει την οξεοβασική ισορροπία, που συνήθως διαταράσσεται στη διάρκεια μιας έντονης άσκησης, εκκρίνει «ορμόνες» ή άλλες ουσίες που έχουν τοπική ή γενικότερη δράση, αποτελεί «στόχο» δράσης ορμονών ή άλλων ουσιών και συμμετέχει στον έλεγχο του μεταβολισμού των λιπιδίων, των υδατανθράκων και των πρωτεϊνών.

Κατά την διάρκεια μιας άσκησης, ιδιαίτερα όταν αυτή είναι αεροβικού τύπου, οι εργατικοί μύες από το ένα μέρος απαιτούν περισσότερο O_2 και από το άλλο μέρος παράγουν περισσότερο CO_2 , από ό,τι σε καταστάσεις ηρεμίας. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι περισσότερο O_2 θα πρέπει να προσλαμβάνεται από τους πνεύμονες με την εισπνοή και να μεταφέρεται στη συνέχεια με την αιμοσφαιρίνη στους ιστούς, αλλά και μεγαλύτερες ποσότητες CO_2 θα πρέπει να διαχέονται από το αίμα στις κυψελίδες και να αποβάλλονται στη συνέχεια με την εκπνοή. Οι μηχανισμοί που θα πρέπει να ενεργοποιηθούν κατά την άσκηση, ώστε ο πνευμονικός αερισμός να ικανοποιεί τις μεταβολικές απαιτήσεις των ιστών είναι οι εξής:

α. Η πνευμονική αιμάτωση θα πρέπει να είναι αυξημένη. Πράγματι στη διάρκεια μιας άσκησης η ποσότητα του αίματος που ρέει στα αγγεία της μικρής κυκλοφορίας (δηλαδή της κυκλοφορίας του αίματος από την καρδιά στους πνεύμονες και από τους πνεύμονες στην καρδιά) είναι πολλαπλάσια της αντίστοιχης ποσότητας σε συνθήκες ηρεμίας. Η δεξιά κοιλία, λοιπόν, εξωθεί περισσότερο αίμα προς τα πνευμονικά τριχοειδή, ώστε να δοθεί η δυνατότητα ανταλλαγής σε μεγαλύτερα ποσά αναπνευστικών αερίων. Η αύξηση όμως του όγκου αίματος που κυκλοφορεί στους πνεύμονες κατά την άσκηση περιορίζει σε κάποιο βαθμό, για μηχανικούς λόγους, τον όγκο του αέρα που περιέχουν οι κυψελίδες. Έτσι τόσο η ζωτική, όσο και η ολική πνευμονική χωρητικότητα εμφανίζουν μία μικρή ελάττωση της τιμής τους (κατά 300-500 ml) σε σύγκριση με την αντίστοιχη τιμή σε καταστάσεις ηρεμίας .

β. Η ικανότητα διάχυσης των αερίων θα πρέπει να διευκολυνθεί. Έχει διαπιστωθεί ότι στη διάρκεια μιας έντονης άσκησης η διαχυτική ικανότητα για το οξυγόνο μπορεί να αυξηθεί μέχρι και 300% της τιμής ηρεμίας, ενώ η διάχυση του CO_2 μπορεί να γίνει μέχρι και 20% ταχύτερα. Είναι σημαντικό το γεγονός ότι σε προπονημένα άτομα η διαχυτική ικανότητα των αερίων είναι πολύ καλύτερη σε σχέση με απροπόνητα, κατά την εκτέλεση του ίδιου σωματικού έργου. Επίσης, αθλητές αντοχής (π.χ. μαραθωνοδρόμοι) εμφανίζουν διπλάσια διαχυτική ικανότητα των πνευμόνων κατά την ηρεμία σε σύγκριση με μη αθλητές. Ο κύριος μηχανισμός που οδηγεί σε

αύξηση της διαχυτικής ικανότητας των πνευμόνων είναι η αύξηση της επιφάνειας διάχυσης, ενώ οι μεταβολές στις μερικές πιέσεις των αναπνευστικών αερίων κατά την άσκηση δεν είναι σημαντικές. Η αύξηση της επιφάνειας της τριχοειδο-κυψελικής μεμβράνης, διαμέσου της οποίας γίνεται η ανταλλαγή αερίων, οφείλεται στην αύξηση του αριθμού των πνευμονικών τριχοειδών αγγείων που γεμίζουν με αίμα κατά την άσκηση και που παρέμεναν κλειστά κατά την ηρεμία.

γ.Ο πνευμονικός αερισμός θα πρέπει να αυξηθεί. Η αύξηση της αιμάτωσης των πνευμόνων, καθώς και η βελτίωση της διαχυτικής τους ικανότητας θα ήταν χωρίς ουσιαστικό αποτέλεσμα για την κάλυψη των μεταβολικών αναγκών των μυών κατά την άσκηση, αν δεν αυξανόταν και ο πνευμονικός αερισμός τους. Πράγματι έχει διαπιστωθεί ότι στη διάρκεια μιας αερόβιας άσκησης, ο αερισμός των πνευμόνων αυξάνεται κατά 10-20 φορές περισσότερο συγκριτικά με τις τιμές ηρεμίας. Η αύξηση του πνευμονικού αερισμού είναι ανάλογη με την κατανάλωση O_2 από τους ιστούς. Ωστόσο, στην πράξη η σχέση ανάμεσα στον πνευμονικό αερισμό και στην κατανάλωση O_2 από τους εργατικούς μύες δεν είναι γραμμική σε όλη τη διάρκεια της άσκησης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ένα μέρος της παραγωγής ενέργειας κατά την άσκηση καλύπτεται με αναερόβιο μηχανισμό. Για τον μηχανισμό αυτό δεν απαιτείται κατανάλωση O_2 , αλλά αυξάνεται η παραγωγή CO_2 . Το CO_2 όμως αποτελεί το πλέον ισχυρό ερέθισμα για το αναπνευστικό κέντρο. Έτσι η αύξηση του στο αρτηριακό αίμα προκαλεί αύξηση της διέγερσης του αναπνευστικού κέντρου και οδηγεί σε ακόμη μεγαλύτερο αερισμό των πνευμόνων.

Η αύξηση του πνευμονικού αερισμού κατά την άσκηση είναι αποτέλεσμα της αύξησης της συχνότητας και του εύρους των αναπνοών. Όταν όμως ο ρυθμός και το βάθος των αναπνευστικών κινήσεων αυξάνονται σημαντικά, τότε τα επίπεδα του CO_2 στο αρτηριακό αίμα είναι ελαττωμένα, ενώ τα επίπεδα του O_2 παραμένουν σταθερά. Οι μεταβολές αυτές, που είναι γνωστές ως «υπέρπνοια» μπορεί να οδηγήσουν σε διαταραχές της οξεοβασικής ισορροπίας ή να προκαλέσουν κλινικά ζάλη και αδιαθεσία στον ασκούμενο.

Ένας άλλος παράγοντας που συμβάλλει στον καλύτερο αερισμό των πνευμόνων κατά την άσκηση, είναι η πρόκληση βρογχοδιαστολής. Ωστόσο, η άσκηση μπορεί να οδηγήσει στην εκδήλωση βρογχόσπασμου σε άτομα με βρογχικό άσθμα.

Με την συστηματική προπόνηση το έργο των αναπνευστικών μυών κατά την άσκηση είναι λιγότερο επιβαρυνμένο σε σύγκριση με απροπόνητα άτομα. Αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι οι αναπνευστικοί μύες των συστηματικά προπονημένων ατόμων εκμεταλλεύονται καλύτερα το

O₂ και έτσι έχουν μικρότερες απαιτήσεις για O₂ κατά την άσκηση. Μια άλλη αιτία είναι ότι με τη συστηματική φυσική δραστηριότητα αυξάνεται η ενδοτικότητα των πνευμόνων (η αύξηση του όγκου που προκαλεί μια συγκεκριμένη αύξηση της πίεσης στον πνεύμονα ή στον θώρακα), γιατί αυξάνεται η ελαστικότητα των ιστών στους πνεύμονες και στο θωρακικό τοίχωμα.[5][6]

1.5 Νοσήματα και κληρονομικότητα

1.5.1 Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια

Ορισμός

Η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD), ΧΑΠ, είναι μια χρόνια, βραδέως εξελισσόμενη πάθηση του αναπνευστικού συστήματος, που χαρακτηρίζεται από εκτεταμένη, μη αντιστρεπτή απόφραξη των αεραγωγών η οποία οδηγεί σε δύσπνοια, βήχα, παραγωγή πτυέλων και συριγμό [7][8]. Οφείλεται στον συνδυασμό χρόνιας βρογχίτιδας και εμφυσήματος [9]. Η νόσος έχει επιπτώσεις στις αεροφόρους οδούς, στις κυψελίδες, στο πνευμονικό αγγειακό δίκτυο, καθώς επίσης και εκτός των πνευμόνων, όπως στους σκελετικούς μυς και σε άλλα όργανα. Ουσιαστικά όταν κάποιος έχει ΧΑΠ εμποδίζεται η εκπνευστική ροή αέρα από τους πνεύμονές του[11]. Η συνηθέστερη αιτία που προκαλεί ΧΑΠ είναι το κάπνισμα. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν βήχα, δύσπνοια, παραγωγή πτυέλων (βλέννα) και αυξημένη εμφάνιση αναπνευστικών λοιμώξεων. Η πιο σημαντική θεραπεία είναι η οριστική διακοπή του καπνίσματος ειδικά αν η πάθηση είναι στα αρχικά στάδια. Επιμέρους θεραπείες περιλαμβάνουν συσκευές εισπνοής ή ταμπλέτες με βρογχοδιασταλτικά ή κορτικοστεροειδή, βλεννολυτικά φάρμακα, συνεχή οξυγονοθεραπεία ή χειρουργική μείωση του όγκου του πνεύμονα².

Κληρονομικότητα

Έχει αποδειχθεί ότι κληρονομικοί παράγοντες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της ΧΑΠ. Κυριότερη κληρονομική αιτία εκδήλωσής της είναι η ανεπάρκεια της άλφα-1 αντιθρυψίνης

²http://en.wikipedia.org/wiki/Chronic_obstructive_pulmonary_disease

(AAT), μιας πρωτεΐνης η οποία παράγεται στο συκώτι, η έλλειψη της οποίας μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές παθήσεις των πνευμόνων, ιδιαίτερα αν πρόκειται για καπνιστές [9][10].

1.5.2 Άσθμα

Ορισμός

Το άσθμα είναι μία χρόνια φλεγμονώδης διαταραχή των αεραγωγών των πνευμόνων κατά την οποία λαμβάνουν χώρα διάφορα αλληπάλληλα συμπτώματα (συριγμός, δύσπνοια, βήχας, αίσθημα πίεσης στο θώρακα), βρογχόσπασμοι και στένωση των αεραγωγών³. Οφείλεται τόσο σε γενετικούς όσο και σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Ταξινομείται σε ατοπικό (εξωγενές) και μη ατοπικό (ενδογενές). Η ατοπία αφορά την προδιάθεση ανάπτυξης υπερευαισθησίας τύπου 1. Η πρόληψη ορισμένων συμπτωμάτων του άσθματος επιτυγχάνεται με την αποφυγή των αλλεργιογόνων, ερεθιστικών ουσιών και εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών. Για την αντιμετώπιση του χρησιμοποιούνται εισπνεόμενοι βήτα-2 αγωνιστές βραχείας δράσης (όπως σαλβουταμόλη), ταμπλέτες κορτικοστεροειδών και θειικό μαγνήσιο.

Κληρονομικότητα

Έχει αποδειχθεί ότι εν μέρει το άσθμα μπορεί να αποδοθεί στην κληρονομικότητα σε συνδυασμό πάντα με την αλληλεπίδρασή του με το περιβάλλον στο οποίο ζει ο μέσος άνθρωπος [12]. Έχουν εντοπιστεί γονίδια που σχετίζονται με την εμφάνιση άσθματος και αλλεργιών, το πλήθος των οποίων ανέρχεται στα 25 μέχρι στιγμής και συνεχώς προστίθενται νέα. Επίσης, έρευνες έδειξαν πως στην περίπτωση των μονοζυγωτικών διδύμων εάν πάσχει το ένα από άσθμα, η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου και στο άλλο κυμαίνεται περίπου στο 25% [13].

³ <http://en.wikipedia.org/wiki/Asthma>

1.5.3 Πνευμονία

Ορισμός

Η πνευμονία αποτελεί οξεία φλεγμονή του πνευμονικού ιστού (του πνεύμονα) που επηρεάζει κυρίως τις πνευμονικές κυψελίδες και η οποία οφείλεται στην εμφάνιση βακτηρίων, ιών και άλλων μικροοργανισμών στον ανθρώπινο οργανισμό[14]. Ταξινομείται ανάλογα με τον αιτιολογικό παράγοντα που την προκάλεσε (πχ πνευμονιοκοκκική, άτυπη κλπ.), καθώς και ανάλογα με την προέλευση του παθογόνου παράγοντα (ενδονοσοκομειακή και εξωνοσοκομειακή ή της κοινότητας). Στα συνήθη συμπτώματα περιλαμβάνονται ο βήχας, ο πυρετός με ή χωρίς ρίγος, η απόχρεμψη, η δύσπνοια, η ταχύπνοια, ο πόνος στο θώρακα και η σύγχυση. Η θεραπεία της νόσου εξαρτάται από το αίτιό της. Κατά της βακτηριακής πνευμονίας χορηγείται αγωγή με αντιβιοτικά⁴. Αν η πνευμονία είναι σοβαρής μορφής, συνήθως γίνεται εισαγωγή του ασθενούς στο νοσοκομείο.[15][16][17]

Κληρονομικότητα

Δεν παρατηρείται κληρονομικότητα στην πνευμονία.

1.5.4 Κυστική ίνωση

Ορισμός

Η κυστική ίνωση(cysticfibrosis) ή αλλιώς ινοκυστική νόσος είναι μια κατ' εξοχήν κληρονομική νόσος, αποτελεί την συχνότερη αιτία αναπνευστικής ανεπάρκειας κατά τις τρεις πρώτες δεκαετίες της ζωής του ανθρώπου και είναι η πιο διαδεδομένη κληρονομική νόσος στην λευκή φυλή. Εικάζεται ότι αποτελεί την συχνότερη θανατηφόρο γενετική ανωμαλία μεταξύ των λευκών Ευρωπαίων και Αμερικανών. Μεταδίδεται μέσω γονιδίου που βρίσκεται στο έβδομο χρωμόσωμα, μεταβιβάζεται με υπολειπόμενο χαρακτήρα και ύστερα από μια ποικιλία μεταλλάξεων που υφίσταται, προσβάλλει όλους τους εξωκρινείς αδένες, τροποποιώντας την εξ ιόντων σύσταση των εκκρίσεών τους. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί τη ρυθμιστική πρωτεΐνη διαμεμβρανικής αγωγιμότητας (CysticFibrosisTransmembraneConductanceRegulator), η οποία ελέγχει την

⁴ <http://en.wikipedia.org/wiki/Pneumonia>

διέλευση γλωρίου διαμέσου των μεμβρανών των επιθηλιακών κυττάρων διαφόρων οργάνων του σώματος όπως των πνευμόνων, του παγκρέατος, των ιδρωτοποιών αδένων και του εντέρου. Μεταλλάξεις στο εν λόγω γονίδιο προκαλούν μειωμένη παραγωγή ή λειτουργικότητα της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα στο επιθήλιο των προσβαλλομένων οργάνων να παράγεται παχύρρευστη κολλώδης βλέννα η οποία αποφράσσει τους πόρους των αδένων με συνέπεια την προοδευτική καταστροφή του ιστού των οργάνων (ίνωση) και την τελική ανεπάρκειά τους. Εκτιμάται ότι στην Ελλάδα, περίπου 1 στα 2000-2500 παιδιά γεννιούνται κάθε χρόνο με κυστική ίνωση, ενώ το 4-5% του πληθυσμού θεωρείται ότι είναι φορείς. Φορείς θεωρούνται οι ετεροζυγώτες οι οποίοι δεν παρουσιάζουν συμπτώματα ενώ ασθενείς είναι οι ομοζυγώτες, η επιβίωση των οποίων δεν ξεπερνά το 25^ο έτος της ηλικίας τους.[8] [18]

Τα συμπτώματα πρωτοεμφανίζονται μέσα στον πρώτο χρόνο της ζωής, αλλά μπορεί να εμφανιστούν και αργότερα στην παιδική ηλικία. Η δριμύτητα των συμπτωμάτων ποικίλλει. Τα συμπτώματα του αναπνευστικού συστήματος είναι ο επίμονος βήχας, ο συριγμός, η δύσπνοια καθώς και οι επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις του θώρακα που προκαλούν βλάβη στους πνεύμονες. Όσον αφορά στα γαστρεντερικά συμπτώματα διακρίνουμε τον υποσιτισμό, που οδηγεί σε μικρή σωματική ανάπτυξη και χαμηλή αύξηση του βάρους (ακόμη και αν ο ασθενής έχει καλή όρεξη και τρώει πολύ, καθώς το πρόβλημα εντοπίζεται στην πέψη και την απορρόφηση των τροφών), διογκωμένη κοιλιά, και δυσκοιλιότητα. Επιπλέον συμπτώματα είναι οι επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις των ιγμορείων, οι πολύποδες που σχηματίζονται στη μύτη, βλάβη του ήπατος που μπορεί να οδηγήσει σε κίρρωση, διαβήτη, παγκρεατίτιδα (φλεγμονή του παγκρέατος), πρόπτωση του ορθού, οστεοπόρωση (λέπτυνση των οστών) που εμφανίζεται λόγω κακής απορρόφησης ορισμένων τροφών και ιδίως της βιταμίνης D, η οποία είναι αναγκαία για τη διατήρηση υγιών οστών και η πολύ αλμυρή γεύση που έχει ο ιδρώτας.

Κληρονομικότητα

Προκαλείται από μετάλλαξη σε γονίδιο του χρωμοσώματος 7 όπου κωδικοποιείται ένα πολυπεπτιδίο 1.480 αμινοξέων που ονομάζεται «ρυθμιστής μεμβράνης της κυστικής ίνωσης» (cysticfibrosistransmembraneregulator, CFTR) . Αυτός διαδραματίζει λειτουργία διαύλου γλωρίου σε επιθηλιακές μεμβράνες. Υπάρχουν πολλές μεταλλάξεις του CFTR, η συχνότερη αφορά την απάλειψη φαινυλαλανίνης στη θέση 508(F508del) τουCFTR.

1.5.5 Καρκίνος του πνεύμονα

Ορισμός

Ο καρκίνος του πνεύμονα χαρακτηρίζεται από τον ανεξέλεγκτο και αναρχικό πολλαπλασιασμό κυττάρων στους ιστούς του πνεύμονα. Η συχνότερη μορφή καρκίνου των πνευμόνων είναι το βρογχογενές καρκίνωμα και οφείλεται στο κάπνισμα, την ατμοσφαιρική ρύπανση, τον αμίαντο και την γενετική. Μερικοί άνθρωποι έχουν γενετική προδιάθεση για καρκίνο των πνευμόνων. Σε συγγενείς ατόμων με καρκίνο των πνευμόνων, ο κίνδυνος αυξάνεται 2,4 φορές. Αυτό είναι πιθανό να οφείλεται σε γενετικούς πολυμορφισμούς δηλαδή σε αλλαγές στην αλληλουχία του DNA (πολλαπλά αλληλόμορφα) που εμφανίζονται στο γενικό πληθυσμό με συχνότητα μεγαλύτερη από 1%. Τα συχνότερα συμπτώματα είναι ο βήχας, η αιμόπτυση, η απώλεια βάρους και η δυσκολία στην αναπνοή. [20]

Κληρονομικότητα

Το γεγονός ότι, ένα μεγάλο ποσοστό (80-90%) των καπνιστών αναπτύσσει καρκίνο του πνεύμονα, άλλα όχι το 100%, υποδηλώνει πως και άλλοι παράγοντες (περιβαλλοντικοί, διατροφικοί, γενετικοί) αφενός συμμετέχουν στην καρκινογένεση και αφετέρου τροποποιούν τον τεκμηριωμένο κίνδυνο που παρέχει το κάπνισμα. Αξίζει να σημειωθεί πως μόνο το 10-15% των περιπτώσεων, του εν λόγω καρκίνου, ανήκει σε μη καπνιστές.[22]

Αν και υπάρχουν μελέτες που καταδεικνύουν αυξημένο κατά 2 έως 3 φορές κίνδυνο σε πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών με καρκίνο πνεύμονα, τα σχετιζόμενα γονίδια παραμένουν απροσδιόριστα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει η γονιδιακή περιοχή στη χρωμοσωμική θέση 6q23-25, πολυμορφισμοί στα γονίδια της οποίας σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο σε άτομα με περιορισμένη έκθεση σε προϊόντα καπνού. Ο κίνδυνος φαίνεται να είναι μεγαλύτερος σε συγγενείς ασθενών μη καπνιστών που εμφανίζουν τη νόσο σε νεαρή ηλικία.

Ο κίνδυνος για καρκίνο του πνεύμονα είναι επίσης αυξημένος στα μέλη οικογενειών με γνωστά κληρονομικά καρκινικά σύνδρομα (σύνδρομο Li-Fraumeni, οικογενές ρετινοβλάστωμα) όπως και σε περίπτωση γενετικής (και όχι απλά σωματικής) μετάλλαξης του γονιδίου του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (T790M μετάλλαξη).

Σε ένα μεγάλο αριθμό μελετών έχει εξετασθεί η σχέση μεταξύ γενετικών πολυμορφισμών που επιδρούν στην έκφραση ή τη λειτουργία: α) ενζύμων που ρυθμίζουν τον μεταβολισμό των καρκινογόνων παραγόντων του καπνού, β) επιδιορθωτικών στοιχείων του DNA, γ) διαμεσολαβητών της φλεγμονής και του καρκίνου του πνεύμονα. Για παράδειγμα, γενετικοί πολυμορφισμοί γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα του κυττοχρώματος P450 (CYP1A1) μεταβάλλοντας το μεταβολισμό των καρκινογόνων στοιχείων του καπνού, όπως και γενετικοί πολυμορφισμοί γονιδίων που σχετίζονται με την προστασία των φυσιολογικών κυττάρων από τις καρκινογόνες ουσίες του καπνού μέσω της απομάκρυνσης αυτών (GlutathioneS-transferaseM1 και T1, GSTM1 και GSTT1) σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα[21]. Ο σχετικός κίνδυνος φαίνεται να είναι μεγαλύτερος σε γυναίκες μη καπνιστές καθώς και σε μακροχρόνια εκτεθειμένους παθητικούς καπνιστές. Εντυπωσιακά είναι τα στοιχεία που καταδεικνύουν αύξηση κατά 16 φορές του κινδύνου ανάπτυξης (περίπου ίδιος με τους καπνιστές) καρκίνου του πνεύμονα, σε μη καπνιστές με συνδυασμό των υπεύθυνων γενετικών πολυμορφισμών (CYP1A1, GSTM1, GSTT1). Στον αντίποδα, γενετικός πολυμορφισμός που συνεπάγεται πλήρη απώλεια της έκφρασης του ενζύμου του κυττοχρώματος P450, CYP2A6, φαίνεται να σχετίζεται με μείωση του σχετικού κινδύνου εμφάνισης της νόσου.

Επιπλέον, γενετικοί πολυμορφισμοί σε γονίδια που συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (κυκλίνη D, p53, MDM2, ATM) ή στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA (XRCC1, ERCC2, LIG1, LIG3, MLH1, MSH6) σχετίζονται με αυξημένη ευαισθησία στην ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα. Τα παραπάνω στοιχεία είναι ιδιαίτερα σημαντικά στο σχεδιασμό και την εφαρμογή προγραμμάτων προσδιορισμού και εντόπισης των ευπαθών, στην καρκινογόνο δράση του καπνού, ατόμων/πληθυσμών που ουσιαστικά θα ωφελούνταν από τη διακοπή της καθολικά επιβλαβούς για τον οργανισμό αυτής συνήθειας, παρέχοντάς τους μάλιστα ένα σαφές και επιστημονικά τεκμηριωμένο κίνητρο.[19]

1.6 Άλλες παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος

- **Φυματίωση:** προκαλείται από στελέχη μυκοβακτηρίων και προσβάλλει οποιοδήποτε όργανο αλλά κυρίως και πρωτίστως τον πνεύμονα. Μεταδίδεται μέσω του σιέλου που μεταφέρεται δια του αέρα. Δεν παρουσιάζει κληρονομικότητα. [24]

- **Χρόνια Βρογχίτιδα:** φλεγμονή και βλάβες των βλεννογόνων αδένων των βρόγχων. Οι βρόγχοι ενώνουν την τραχεία με τους πνεύμονες. Προκαλείται από βακτήρια ή ιούς. Τα κυριότερα συμπτώματα είναι ο χρόνιος βήχας, η αύξηση παραγωγής βλέννας και η βραχύπνοια (βραχεία επιπόλαια αναπνοή). Δεν παρουσιάζει κληρονομικότητα. [23]
- **Εμφύσημα:** προκαλεί προοδευτικές βλάβες στις κυψελίδες των πνευμόνων, στις οποίες γίνονται οι ανταλλαγές αερίων. Κύρια αίτια εκδήλωσής του είναι το κάπνισμα, η συχνή εισπνοή μεγάλων ποσοτήτων σκόνης και ατμών και η έκθεση σε χημικές ουσίες. Δεν παρουσιάζει κληρονομικότητα. [23]
- **Ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (HPI):** είναι μια νόσος άγνωστης αιτιολογίας, που προσβάλλει αποκλειστικά τους πνεύμονες και όχι άλλα συστήματα του οργανισμού (π.χ. πεπτικό, μυοσκελετικό κ.ά.). Χωρίς να μπορεί να αποκλειστεί κάποιας μορφής κληρονομική επιβάρυνση (καθότι υπάρχουν σποραδικές περιπτώσεις οικογενούς προσβολής), η νόσος δε θεωρείται κληρονομούμενη. Συχνότερα προσβάλλονται οι καπνιστές ηλικίας άνω των 50 ετών, αν και σπάνια απαντάται και σε άτομα κάτω των 45 ετών.
- **Γλαρά:** ιογενής λοίμωξη του αναπνευστικού συστήματος που προκαλείται από τον παραμυξοϊό του γένους morbillivirus.
- **Κοκκύτης:** οξεία μικροβιακή λοίμωξη του αναπνευστικού συστήματος, οφείλεται στον αιμόφιλο του κοκκύτη (*Bordetellapertussis*).
- **Πλευριτική συλλογή:** η συσσώρευση υγρού γύρω από τους πνεύμονες. Αίτια του φαινομένου μπορεί να είναι η καρδιακή ανεπάρκεια και ο καρκίνος.

- **Ψευδομεμβρανώδης λαρυγγίτιδα ή λαρυγγίτιδα** (ή λαρυγγοτραχειοβρογχίτιδα ή υμενογόνος λαρυγγίτιδα): λοίμωξη του αναπνευστικού συστήματος που οφείλεται σε ιογενή λοίμωξη της ανώτερης αναπνευστικής οδού. Η λοίμωξη οδηγεί σε οίδημα του τοιχώματος του λάρυγγα κι έτσι εμποδίζεται η φυσιολογική αναπνοή. Τα συμπτώματα της ψευδομεμβρανώδους λαρυγγίτιδας είναι υλακώδης βήχας, συριγμός (υψίσυχνος ήχος), και βραχνάδα. [24]
- **Χρόνια ιγμορίτιδα:** προκαλείται από φλεγμονή των ρινικών ιγμορείων που διαρκεί για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η φλεγμονή χαρακτηρίζεται από οίδημα (πρήξιμο), πόνο, ερυθρότητα και αύξηση της θερμοκρασίας τοπικά στους ιστούς που επηρεάζονται. Η χρόνια ιγμορίτιδα μπορεί επίσης να προκληθεί έμμεσα, μέσω μιας κοινής, αλλά μικρής ανωμαλίας στο ακουστικό ή Ευσταχιανό (Eustachian) σωλήνα, που είναι συνδεδεμένος με τις κοιλότητες των ιγμορείων και τον λαιμό. Αυτός ο σωλήνας είναι συνήθως, σχεδόν, στο ίδιο επίπεδο με τις υποδοχές των ματιών, αλλά μερικές φορές, λόγω κληρονομικών διαταραχών, είναι κάτω από αυτό το επίπεδο και μερικές φορές στο ίδιο επίπεδο με το προθάλαμο (vestibule) ή τη ρινική είσοδο. Αυτό σχεδόν πάντα προκαλεί κάποιου είδους απόφραξη στην κοιλότητα των κόλπων που καταλήγει σε λοίμωξη και συνήθως οδηγεί σε χρόνια ιγμορίτιδα. [25]

Βιβλιογραφία –Κεφάλαιο 1

1. Jiyuan,Tu, Kiao, Inthavong, Goodarz Ahmadi, Computational Fluid and Particle Dynamics in the Human Respiratory System, Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering 2013
2. Ph.H. Quarier, G.J. Tammeling, J.E. Cdl)s, O.F. Pedersen, R.Peslin, J-C. Yernaut, LUNG VOLUMES AND FORCED VENTILATORY FLOWS, Eur Respir J, 1993, 6, Suppl. 16, 5—40
3. Leith D.E.,Brown R., Human lung volumes and the mechanisms that set them, Eur Respir J 1999; 13: 468-472
4. Α.Σιχλετίδης, Επαγγελματικές Παθήσεις , UniversityStudioPress – Εκδόσεις Επιστημονικών Βιβλίων και Περιοδικών , 2002
5. Audrey F. Manley, Physical Activity and Health: A Report of the Surgeon General, DIANE Publishing, 1996
6. ΔΕΛΗΓΙΑΝΝΗΣ Α, Ιατρική της Άθλησης - Από τη θεωρία στην πράξη, UniversityStudioPress - Εκδόσεις Επιστημονικών Βιβλίων και Περιοδικών, 1997
7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0062993/>
8. Πατάκας Δ. , Επιτομή Πνευμονολογίας, UniversityStudioPress - Εκδόσεις Επιστημονικών Βιβλίων και Περιοδικών, 2006, Κεφ. 12
9. <http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/copd/causes>
10. Stefan J. Marciniak, David A. Lomas, Genetic Susceptibility, Clin Chest Med 35 (2014) 29–38
11. <http://www.med.umich.edu/1info/FHP/practiceguides/copd/copd.pdf>
12. Martinez FD (2007). «Genes, environments, development and asthma: a reappraisal». EurRespir J 29 (1): 179–84.
13. <http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/asthma>
14. <http://www.iatronet.gr/iatriko-lexiko/pnevmonia.html>
15. <http://www.iatropedia.gr/medical/malady/243>
16. <http://sci-hub.bz/8f0a37234604e5ce3082745dd43bc8a3/waterer2005.pdf>
17. Lionel A. Mandell, Richard G. Wunderink, Antonio Anzueto, John G. Bartlett, G. Douglas Campbell, Nathan C. Dean, Scott F. Dowell, Thomas M. File, Jr. Daniel M. Musher, Michael S. Niederman, Antonio Torres, and Cynthia G. Whitney, Infectious Diseases Society of

- America/American Thoracic Society Consensus Guidelines on the Management of Community-Acquired Pneumonia in Adults, *Clinical Infectious Diseases* 2007; 44:S27–72
18. Ratjen F, Döring G. Cystic fibrosis. *Lancet* 2003; 361: 681-89.
 19. Ν.Κεντεποζίδης, Μ. Μπακογιώργος, Β.Γεωργούλιας, *Ιατρική Επιθεώρηση Ενόπλων Δυνάμεων, Αφιέρωμα Στην Ογκολογία*, 2015:Σελ.13-28
 20. Kern J.A, McLennan G (2008). *Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders* (4th edition). McGraw-Hill. page. 1802.
 21. Lung Cancer (Non-Small Cell) Overview, American Cancer Society,[Online].<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003060-pdf>
 22. William D. Travis, Elisabeth Brambilla, H. Konrad Müller-Hermelink, Curtis C. Harris, *Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*, World Health Organization Classification of Tumours, IARC Press Lyon, 2004
 23. Augustine G. DiGiovanna, *HUMAN AGING: BIOLOGICAL PERSPECTIVES*, The McGraw-Hill Companies, New York (2000), Chapter 5
 24. Junghyun Kim, Moon-Woo Seong, Eui-Chong Kim, Sung Koo Han, Jae-Joon Yim, Frequency and clinical implications of the isolation of rare nontuberculous mycobacteria, *BMC Infectious Diseases* (2015) 15:9
 25. Raymond G. Slavin, Sheldon L. Spector, I. Leonard Bernstein, The diagnosis and management of sinusitis: A practice parameter update, *J ALLERGY CLIN IMMUNOL* DECEMBER 2005

Κεφάλαιο 2: Βιοπληροφορική

2.1 Ορισμός

Σύμφωνα με τον Δρ. Owen White, καθηγητή του πανεπιστημίου Ιατρικής στο Maryland των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής «Βιοπληροφορική είναι η εφαρμογή της Στατιστικής και της Πληροφορικής στη Μοριακή Βιολογία». Εάν θέλαμε να περιγράψουμε την Βιοπληροφορική με έναν λιγότερο συνοπτικό ορισμό, θα λέγαμε πως είναι ο επιστημονικός κλάδος όπου η επιστήμη της Βιολογίας με την Πληροφορική, τα Μαθηματικά και την Στατιστική συνεργάζονται, με σκοπό την κατανόηση των βιολογικών διαδικασιών και κατ' επέκταση, την επίλυση των βιολογικών

προβλημάτων. Τα βιολογικά δεδομένα απεικονίζονται εύκολα ως ψηφιακή πληροφορία η οποία μπορεί να γίνει αντικείμενο επεξεργασίας από αλγορίθμους για την παραγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων. Αναλυτικότερα, τα βιολογικά μακρομόρια, όπως το DNA, το RNA και οι πρωτεΐνες, μπορούν να θεωρηθούν ως ακολουθίες συμβόλων, δηλαδή συμβολοσειρές. Το DNA, για παράδειγμα, μπορεί να θεωρηθεί ως μια ακολουθία χιλιάδων νουκλεοτιδίων ή βάσεων. Οι βάσεις ή αλλιώς νουκλεοτίδια για το DNA είναι τεσσάρων ειδών και είναι οι εξής: η αδενίνη η οποία συμβολίζεται με «A», η θυμίνη το σύμβολο της οποίας είναι το «T», η γουανίνη με «G» και η κυτοσίνη που συμβολίζεται με «C». Χρησιμοποιώντας αυτά τα σύμβολα, κατασκευάζουμε συμβολοσειρές του τύπου «... AAGCATCGCGAT...» και με παρόμοιο τρόπο οι πρωτεΐνες παρουσιάζονται ως ακολουθίες αμινοξέων, όπου ένα αμινοξύ ισοδυναμεί με τρεις βάσεις. Η αναπαράσταση αυτή είναι ιδιαίτερα χρήσιμη αφού καθίσταται πρόσφορη η επεξεργασία των ακολουθιών σε ηλεκτρονικό υπολογιστή παρέχοντας τη δυνατότητα εφαρμογής αλγορίθμων, οι οποίοι επεξεργάζονται αυτά τα δεδομένα και παρέχουν σημαντικά αποτελέσματα. [1]

Οι πληροφορίες που χρησιμοποιούνται στο πεδίο της Βιοπληροφορικής, εξάγονται από νέες δομές και διαδικασίες που προέκυψαν από τη συνεργασία των επιστημόνων Βιολόγων και των επιστημόνων του κλάδου της Πληροφορικής και ειδικότερα μέσω του προγραμματισμού που εφαρμόστηκε. Τα βιολογικά δεδομένα αποθηκεύονται σε βάσεις δεδομένων, ο όγκος των οποίων αυξάνεται ραγδαία ημέρα με την ημέρα και πρέπει να αναλύεται καθημερινά. Οι οργανισμοί, οι βιολογικές ακολουθίες των οποίων αναλύονται κάθε μέρα ανέρχονται σε 260.000, αριθμός που συνολικά αντιστοιχεί σε πάνω από 190 δισεκατομμύρια νουκλεοτίδια. Στόχος τους είναι ο εντοπισμός μεταλλάξεων του γενετικού υλικού και η αναγνώριση ακολουθιών που μοιάζουν με απώτερο σκοπό την αναγνώριση κοινών χαρακτηριστικών που μπορεί να καταλήξει στην εξιχνίαση βιολογικών λειτουργιών.[2]

2.2 Αναγκαιότητα βιοπληροφορικής

Η ολοένα και μεγαλύτερη εξέλιξη της μοριακής βιολογίας, από την ανακάλυψη του μοντέλου της διπλής έλικας του DNA το 1953 από τους Watson και Crick, και από το 1990 με την έναρξη της προσπάθειας αποκωδικοποίησης του ανθρώπινου γονιδιώματος (γνωστό ως HumanGenomeProject) μέχρι το 2003 και την επιτυχή ολοκλήρωσή της, καθώς και από το 2003 μέχρι τις ημέρες μας, δημιούργησε την ανάγκη σύζευξης της επιστήμης της Βιολογίας με μια σειρά άλλων επιστημών. Συγκεκριμένα, εφόσον τα νέα δεδομένα (συμβολοσειρές χιλιάδων

νουκλεοτιδίων που αναπαριστούν τα βιολογικά μακρομόρια) που προέκυψαν απαιτούσαν την χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή και αφού η ανάπτυξη της επιστήμης της Πληροφορικής, τα τελευταία 50 χρόνια, ήταν σχετικά παράλληλη με αυτήν της επιστήμης της Βιολογίας, κατέστη απαραίτητη η συνεργασία των δύο επιστημών, παρά το ότι μέχρι πρότινος επρόκειτο για δύο εξαιρετικά διαχωρισμένα αντικείμενα[3].

2.3 Στόχοι βιοπληροφορικής

Οι βασικοί στόχοι της βιοπληροφορικής συνοψίζονται στη συνέχεια:

- **Εντοπισμός ακολουθιών και σύγκριση των γονιδιωμάτων διαφορετικών οργανισμών.** Ο προσδιορισμός και η σύγκριση των ακολουθιών DNA διαφορετικών ειδών θα συνεισφέρει στην μελέτη και την κατανόηση των σχέσεων μεταξύ τους. Η σύγκριση διαφορετικών γονιδιωμάτων συγγενών οργανισμών, οι οποίοι έχουν κοινές πρωτεΐνες, θα δώσει σημαντικές πληροφορίες για την εξελικτική πορεία αυτών των οργανισμών.
- **Αναγνώριση γονιδίων και καθορισμός των λειτουργιών που ρυθμίζουν.** Τα σημεία πρόσδεσης της ακολουθίας του DNA στα οποία συνδέονται οι πρωτεΐνες ή τα συμπλέγματα πρωτεϊνών είναι από τα πιο κρίσιμα δομικά χαρακτηριστικά για τη λειτουργία του. Επομένως, η μελέτη αυτών των περιοχών θα βοηθήσει στην αναγνώριση των γονιδίων και στον καθορισμό των ιδιοτήτων τους.
- **Κατανόηση της γονιδιακής έκφρασης.** Στα κύτταρα, η παραγωγή της κατάλληλης πρωτεΐνης ενεργοποιεί και το αντίστοιχο γονίδιο. Η έκφραση του εκάστοτε γονιδίου ποικίλει στα διάφορα κύτταρα και εξαρτάται από την χρονική στιγμή, το περιβάλλον του κυττάρου, την λήψη βιοχημικών σημάτων και την παρουσία πρωτεϊνών. Η κατανόηση αυτής της έκφρασης είναι απαραίτητη για την εμπέδωση βασικών λειτουργιών των κυττάρων, όπως είναι η αναπνοή, ο μεταβολισμός και ο πολλαπλασιασμός.

- **Κατανόηση Γενετικών Ασθενειών.** Με τον όρο «Γενετικές Ασθένειες» εννοούμε εκείνες τις ασθένειες, οι οποίες οφείλονται στη μετάλλαξη γονιδίων. Η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο οι ασθένειες εξαρτώνται από τα γονίδια και η κατανόηση των λειτουργιών των πρωτεϊνών, που αυτά κωδικοποιούν, μπορεί να συμβάλλει στην ανάπτυξη θεραπείας που ως στόχο θα έχει τον περιορισμό και τη βελτίωση ελαττωματικών γονιδίων. Δεδομένου ότι η προδιάθεση των νεότερων οργανισμών για ορισμένες ασθένειες είναι κωδικοποιημένη στο γενετικό τους υλικό, με την κατάλληλη προληπτική ιατρική θεραπεία μπορούν έγκαιρα να αποφευχθούν οι παράγοντες που συντελούν στην εμφάνιση της συγκεκριμένης νόσου[4].

2.4 Εργαλεία βιοπληροφορικής

Η τεράστια ανάπτυξη της υπολογιστικής βιολογίας έχει φέρει τη χρήση μιας σειράς αλγοριθμικών και υπολογιστικών εργαλείων στην καθημερινότητα του βιολόγου (δεν υπάρχει βιολόγος που να μην έχει χρειαστεί να χρησιμοποιήσει το BLAST για παράδειγμα). Επομένως, θα λέγαμε ότι υπάρχουν διάφορες κατατάξεις στον τρόπο που ένας ερευνητής χρησιμοποιεί και εμπλέκεται με δραστηριότητες βιοπληροφορικής. Στην πρώτη κατηγορία, βρίσκονται οι απλές αναλύσεις που αφορούν τη χρήση λογισμικού δηλαδή αλγορίθμων για τη στοίχιση, την πολλαπλή στοίχιση, την πρόγνωση, την αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων κ.ο.κ. Στην δεύτερη κατηγορία, κατατάσσονται οι ερευνητές που χρησιμοποιούν κατά κύριο λόγο έτοιμα εργαλεία και αλγόριθμους για να πραγματοποιήσουν σύνθετες αναλύσεις και να απαντήσουν σε κάποιο βιολογικό ερώτημα. Το βασικό χαρακτηριστικό αυτής της ομάδας είναι ότι δεν αναπτύσσει αλγόριθμους, ούτε λογισμικό. Στην τρίτη και τελευταία κατηγορία, ανήκουν οι ερευνητές που εστιάζοντας σε κάποιο συγκεκριμένο πρόβλημα αναπτύσσουν και αλγόριθμους και λογισμικό [3].

Επιπλέον, ένα βασικό εργαλείο στην υπολογιστική ανάλυση αλληλουχιών καθώς και μέρος της καθημερινής ρουτίνας ακόμα και των εργαστηριακών μοριακών βιολόγων είναι οι αναζητήσεις στις βάσεις δεδομένων. Το μεγάλο πρόβλημα προκύπτει, από τη συνεχή αύξηση του όγκου των δεδομένων που βρίσκονται κατατεθειμένα στις δημόσιες βάσεις. Είναι γνωστό ότι ο αριθμός των καταχωρήσεων διπλασιάζεται σε λιγότερο από δύο χρόνια, και πιθανολογείται ότι ο ρυθμός αυτός είναι πιο γρήγορος από τον ρυθμό αύξησης της υπολογιστικής ισχύος. Οι επιστήμονες αυτό, το είχαν αντιληφθεί ήδη από τη δεκαετία του 1980, οπότε και ξεκίνησε η έρευνα για τη δημιουργία

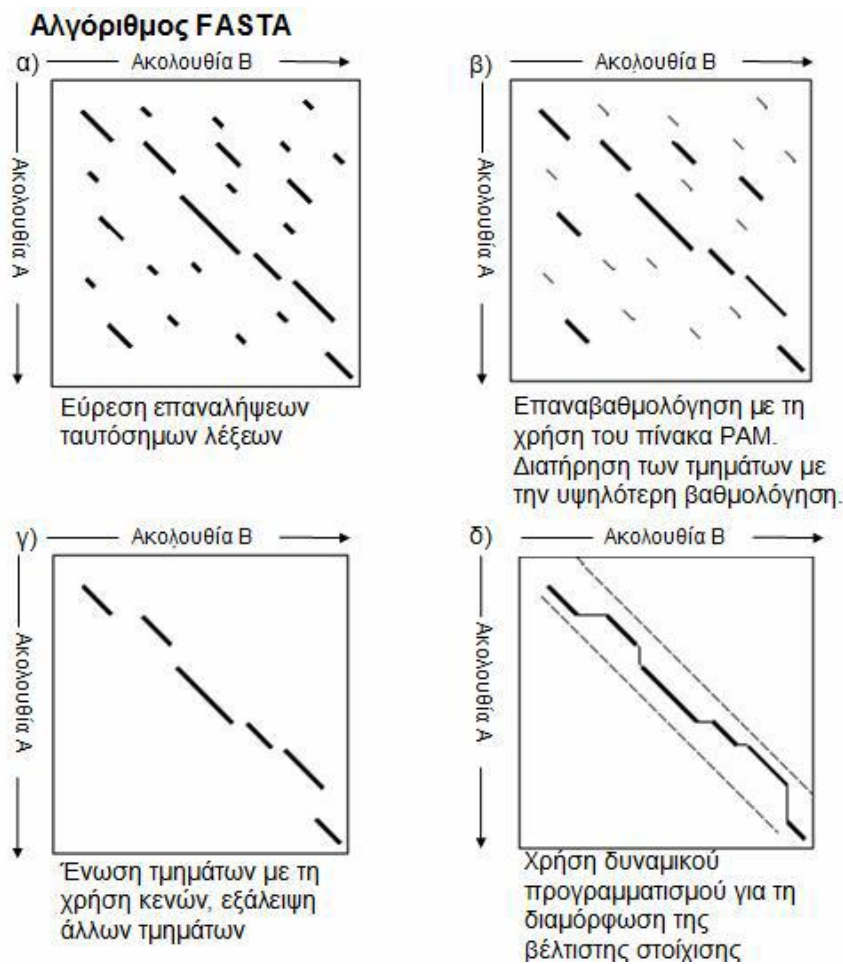
γρήγορων και αποδοτικών ευριστικών αλγορίθμων, οι οποίοι θα κάνουν ακριβώς την ίδια δουλειά αλλά σε μικρότερο χρόνο. Ο ευριστικός (heuristic) αλγόριθμος καλείται να αποδίδει «σχεδόν πάντα» το ίδιο καλά με τον αυστηρά μαθηματικό αλγόριθμο, αλλά να πραγματοποιεί τις αναλύσεις πολλές φορές πιο γρήγορα. Το «σχεδόν πάντα» δεν μπορεί να αποδειχθεί θεωρητικά αλλά μπορεί να τεκμηριωθεί με εμπειρικές αναλύσεις. Οι δύο πιο σημαντικοί αλγόριθμοι αυτής της κατηγορίας, είναι το BLAST και το FASTA.

2.4.1 Ο αλγόριθμος FASTA

Ο αλγόριθμος αυτός δημιουργήθηκε από τους D. Lipman και W. Pearson και πρόκειται για έναν ευριστικό αλγόριθμο, που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό κατά προσέγγιση τοπικών αντιστοιχίσεων και ομοιοτήτων μεταξύ δύο ακολουθιών. Η διαδικασία του επαναλαμβάνεται για κάθε ακολουθία που βρίσκεται στη βάση δεδομένων [4]. Για να γίνει πιο κατανοητή η λειτουργία του, παραθέτουμε το παρακάτω διάγραμμα με μια σειρά από οδηγίες στη συνέχεια.

Η βασική ιδέα του **FASTA**, είναι να εντοπίσει κατά προσέγγιση τη διαγώνιο γύρω από την οποία βρίσκεται η στοίχιση, ώστε έτσι να περιορίσει το εύρος της αναζήτησης κατά πολύ. Για αυτό τον σκοπό χρησιμοποιεί τα εξής βήματα:

- Στην αρχή δημιουργείται ένα ευρετήριο με τις θέσεις όλων των k-tuples (λέξεων με μέγεθος k, τυπικό μήκος για αμινοξικές αλληλουχίες είναι το 1 ή 2) που υπάρχουν ταυτόχρονα και στις δύο αλληλουχίες.
- Από τη διαφορά των θέσεων τους στις δύο αλληλουχίες εντοπίζεται η διαγώνιος στην οποία βρίσκονται, οπότε στο επόμενο βήμα εντοπίζονται οι διαγώνιοι με τα περισσότερα k-tuples.
- Ακολουθώς, αυτές οι περιοχές ταύτισης συνενώνονται επιτρέποντας την εισαγωγή κενών με τον υπολογισμό της αντίστοιχης ποινής, και
- Τελικά πραγματοποιείται η διαδικασία πλήρους δυναμικού προγραμματισμού (με τον επιλεγμένο πίνακα αντικατάστασης), περιορισμένου όμως μόνο σε μια ζώνη γύρω από τις συγκεκριμένες διαγώνιους.



Εικόνα 2: Διαγραμματική απεικόνιση του αλγόριθμου FASTA.

Παραλλαγές του FASTA

fasta3 - εξερευνεί μια πρωτεϊνική ή νουκλεοτιδική (DNA) βάση ακολουθιών για παρόμοιες ακολουθίες.

fastx/y3 - συγκρίνει μια νουκλεοτιδική ακολουθία (DNA) μεταφρασμένη σε όλα τα πλαίσια ανάγνωσης (readingframes) με μια βάση πρωτεϊνικών ακολουθιών του NCBI.

tfastx/y3 - συγκρίνει μια πρωτεΐνη με μια μεταφρασμένη DNA βάση δεδομένων.

fastf3 - συγκρίνει μείγμα πεπτιδίων με μια πρωτεϊνική βάση δεδομένων.

bic_sw - συγκρίνει μια πρωτεϊνική ή νουκλεοτιδική (DNA) ακολουθία με μια βάση ακολουθιών χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο των Smith-Waterman. (Smith & Waterman, 1981)

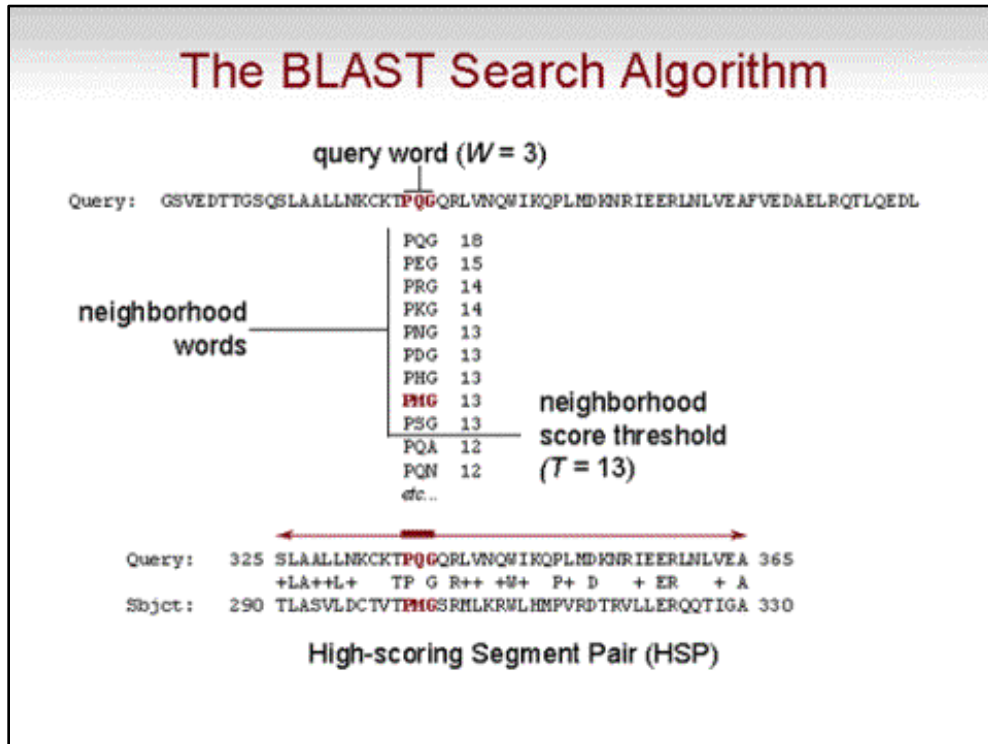
2.4.2 Ο αλγόριθμος BLAST

Ο αλγόριθμος BLAST⁵(BasicLocalAlignmentSearchTool) είναι ένας ευριστικός (heuristic) αλγόριθμος σύγκρισης ακολουθιών βελτιστοποιημένης ταχύτητας που χρησιμοποιείται για να ψάχνει σε βάσεις δεδομένων την άριστη τοπική στοίχιση με μια αναζήτηση. Είναι το αποτέλεσμα του συνδυασμού τριών προσπαθειών, με πρώτη αυτή των D. Lipman, W.Gish για τη βελτίωση της ταχύτητας του αλγόριθμου FASTA, δεύτερη του E. Myers για την εισαγωγή της ιδέας της γειτονιάς υποακολουθιών και αυτομάτων με σκοπό την εύρεση των σημείων έναρξης ταυτιζόμενων υποακολουθιών και τρίτη αυτή των S. Karlin, A. Dembo και S. Altschul το 1990, που έδωσε τα στατιστικά αποτελέσματα που χρησιμοποιεί ο BLAST για την αξιολόγηση της στατιστικής σημασίας των αποτελεσμάτων. Διατηρείται από το NCBI (NationalCenterforBiotechnologyInformation)[7] αλλά λόγω του ότι διατίθεται ελεύθερα υπάρχουν εκδόσεις του και σε άλλες αντίστοιχες βάσεις. Σχεδόν αμέσως μετά τη δημοσίευσή του, ο BLAST εκτόπισε τον FASTA από την πρώτη θέση μεταξύ των ευριστικών αλγορίθμων και έγινε ο επικρατέστερος αλγόριθμος για αναζήτηση σε βάσεις βιολογικών δεδομένων λόγω της ταχύτητάς του, της δυνατότητας παρουσίασης ευρείας σειράς αποτελεσμάτων και της στατιστικής εκτίμησης που παρέχει για κάθε αποτέλεσμα. Παρά το γεγονός ότι ο αλγόριθμος FASTA έχει εξελιχθεί σημαντικά από το 1990 έως σήμερα, η παράλληλη χρονικά εξέλιξη του BLAST, καθιστά τον τελευταίο ταχύτερο και επικρατέστερο στο πρόβλημα της αναζήτησης σε βάσεις βιολογικών δεδομένων. Για να γίνει πιο κατανοητή η λειτουργία του BLAST, παραθέτουμε το παρακάτω διάγραμμα με μια σειρά από οδηγίες στη συνέχεια.

Ο αλγόριθμος BLAST είναι μια διαισθητική (ευριστική) μέθοδος αναζήτησης που αναζητάει λέξεις μήκους W (προκαθορισμένο = 3 στο blastp) που σημειώνουν score μεγαλύτερο από ένα προκαθορισμένο όριο (Threshold- T) όταν στοιχίζονται με την δοθείσα ακολουθία (query) και με ένα δεδομένο πίνακα υποκατάστασης (substitutionmatrix). Οι λέξεις στη βάση δεδομένων που σημειώνουν score επεκτείνονται και προς τις δυο κατευθύνσεις σε μία προσπάθεια να μεγιστοποιηθεί το score, σύμφωνα με κάποιο κριτήριο ευαισθησίας (επίσης προκαθορισμένο από

⁵<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

πριν, συνήθως 10) του E-value. Στην Εικόνα 3, η τριπλέτα PQG έχει βρεθεί να στοιχίζεται στην PMG, και καθώς χρησιμοποιείται ο πίνακας BLOSUM62, το score της στοίχισης είναι $13 > T$ ($P-P=7$, $G-G=6$, $Q-M=0$). Κατόπιν αυτή η τριπλέτα θα επεκταθεί και προς τις δύο κατευθύνσεις για να δώσει τη μέγιστη τοπική στοίχιση. Τα HSPs που πληρούν αυτά τα κριτήρια θα αναφερθούν από το BLAST, υπό τον όρο ότι δεν υπερβαίνουν τον αριθμό των επιτρεπτών προς εμφάνιση ακολουθιών.



Εικόνα 3: Παράδειγμα αλγορίθμου BLAST.

Πιο συγκεκριμένα:

- Η διαδικασία της σύγκρισης ξεκινά με την κατασκευή ενός καταλόγου όλων των λέξεων που θα ταίριαζαν με κάποια λέξη της άγνωστης αλληλουχίας και ξεπερνούν την τιμή κατωφλίου (προκαθορισμένη τιμή για πρωτεϊνικές αλληλουχίες $T=13$).
- Στη συνέχεια, ο αλγόριθμος αναζητά αυτές τις λέξεις στις αλληλουχίες της βάσης δεδομένων και κάθε φορά που εντοπίζει κάποια τέτοια ξεκινάει μια διαδικασία επέκτασης του 'ευρήματος' προς τις δύο κατευθύνσεις, όσο η βαθμολογία συνεχίζει και αυξάνει.

- Οι περιοχές μέγιστης βαθμολογίας που εντοπίζονται σε αυτό το στάδιο είναι οι υποψήφιες περιοχές ομοιότητας (HSPs, highscoringpairs).
- Από όλα τα HSPs αναφέρονται στα αποτελέσματα εκείνες οι περιοχές στις οποίες η βαθμολογία υπερβαίνει μια δεύτερη τιμή κατωφλίου S
- Τελικά, επιλέγονται να αναφερθούν εκείνες μόνο οι τοπικές ομοιότητες οι οποίες εμφανίζουν υψηλή στατιστική σημαντικότητα, ο προσδιορισμός της οποίας βασίζεται στο θεώρημα Karlin και Altschul.

Οι αρχικές εκδόσεις του BLAST, δεν επέτρεπαν την εισαγωγή κενών και έτσι ο αλγόριθμος ήταν ένα απλά εύχρηστο και γρήγορο εργαλείο για τον εντοπισμό όμοιων αλληλουχιών. Από τη 2η έκδοση όμως του προγράμματος και μετά, προστέθηκε και η δυνατότητα εισαγωγής κενών με συνέπεια το BLAST να μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σαν γενικό πρόγραμμα στοίχισης. Οι νεότερες εκδόσεις του BLAST περιέχουν πολλές τροποποιήσεις που επιτρέπουν πιο ακριβείς υπολογισμούς με χρήση προφίλ και ειδικών ανά θέση πινάκων ομοιότητας (PSI-BLAST). Το BLAST, χρησιμοποιεί επίσης και μια σειρά βελτιστοποιήσεων για τον ακριβή υπολογισμό της στατιστικής σημαντικότητας, πέραν της κλασικής θεωρίας των Karlin και Altschul. Το BLAST γενικά, έχει κερδίσει την αποδοχή της κοινότητας, τόσο γιατί είναι ελεύθερα διαθέσιμο και συνδεδεμένο με τις βάσεις του NCBI, όσο και γιατί είναι ο πιο γρήγορος από τους αλγόριθμους στοίχισης[3].

Στα αρχικά στάδια, η διαδικασία του **BLAST** μοιάζει με αυτή του **FASTA**, αλλά είναι ακόμα πιο γρήγορη καθώς πολλές παραμέτρους τις έχει προϋπολογισμένες και αποφεύγει να στοιχίσει αλληλουχίες της βάσης δεδομένων που ο αλγόριθμος κρίνει ότι δεν έχουν σημαντική ομοιότητα. Ωστόσο, είναι διαφορετικός ο τρόπος υπολογισμού της στατιστικής σημαντικότητας των ευρημάτων. Ενώ το BLAST υπολογίζει τις παραμέτρους της κατανομής (K, λ) από προσομοιώσεις, που έχει πραγματοποιήσει από πριν και έχει αποθηκευμένες τις παραμέτρους, το FASTA τις υπολογίζει από όλες τις άλλες αλληλουχίες της βάσης δεδομένων και για αυτόν τον λόγο είναι και πιο αργό. Το FASTA ενσωματώνει επίσης ακριβέστερους τρόπους υπολογισμού της στατιστικής σημαντικότητας ενός ευρήματος όταν υπάρχουν κενά (Pearson, 1998). Πρέπει όμως να τονιστεί, ότι το BLAST σε αντίθεση με το FASTA δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει κάθε μέθοδο, ειδικά αυτές που για τον υπολογισμό της σημαντικότητας χρησιμοποιούν τα

αποτελέσματα της αναζήτησης στη βάση. Αυτό συμβαίνει γιατί το BLAST για τις αλληλουχίες για τις οποίες δεν βρήκε κάποια ομοιότητα, δεν θα έχει υπολογισμένο κάποιο σκορ της στοίχισης. Σε γενικές γραμμές και το BLAST και το FASTA παρέχουν αποτελέσματα σχεδόν παραπλήσια με τους κλασικούς αλγόριθμους δυναμικού προγραμματισμού και το ποιο πακέτο θα χρησιμοποιηθεί από κάποιον είναι θέμα που εξαρτάται κυρίως από το πού αποσκοπεί η έρευνά του (ακρίβεια), από την ταχύτητα και από τις ανάγκες παραμετροποίησης που έχει (είδος ακολουθίας που συγκρίνεται, πλήθος των πινάκων του σκορ, ποινές για κενά κλπ.). [5]

Παραλλαγές του BLAST

Υπάρχουν πολλές παραλλαγές του προγράμματος BLAST, οι οποίες εκτελούν διαφορετικές εργασίες.

blastn -συγκρίνει μια νουκλεοτιδική ακολουθία (DNA) με μια βάση νουκλεοτιδικών ακολουθιών (DNA). Η αναζήτηση γίνεται και στις δύο αλυσίδες. Είναι ένα πρόγραμμα βελτιστοποιημένης ταχύτητας, όχι όμως και ευαισθησίας.

blastp -συγκρίνει την ζητούμενη αμινοξική ακολουθία με μια βάση πρωτεϊνικών ακολουθιών (σύγκριση πρωτεΐνης με πρωτεΐνες).

blastx -συγκρίνει μια άγνωστη νουκλεοτιδική ακολουθία (DNA) μεταφρασμένη σε όλα τα πλαίσια ανάγνωσης (readingframes) με μια βάση πρωτεϊνικών ακολουθιών του NCBI. Χρησιμοποιείται για την εύρεση πιθανών μεταφρασμένων πρωτεϊνικών προϊόντων μιας άγνωστης νουκλεοτιδικής ακολουθίας.

tblastn -συγκρίνει την ζητούμενη πρωτεϊνική ακολουθία με μια βάση νουκλεοτιδικών ακολουθιών (DNA) του NCBI που μεταφράζεται δυναμικά σε όλα τα πλαίσια ανάγνωσης (readingframes).

tblastx-μετατρέπει μια νουκλεοτιδική ακολουθία (DNA) σε μια πρωτεϊνική ακολουθία σε όλα τα πλαίσια ανάγνωσης (readingframes) και μετά τη συγκρίνει με μια βάση νουκλεοτιδικών ακολουθιών του NCBI η οποία έχει μεταφραστεί σε όλα τα πλαίσια ανάγνωσης (readingframes).

BLAST2-Ονομάζεται εξελιγμένο (advanced) BLAST. Εκτελεί στοιχίσεις που περιέχουν κενά (gappedalignments).

MEGABLAST-είναι ένα πρόγραμμα που χρησιμοποιεί έναν πλεονεκτικό ("greedyalgorithm") αλγόριθμο (Milleretal, 2000), για αναζήτηση στοίχισης νουκλεοτιδικών ακολουθιών. Χρησιμοποιείται για στοίχιση ακολουθιών με μικρές διαφορές και είναι 10 φορές γρηγορότερο από παρόμοια προγράμματα. Ενδείκνυται για σύγκριση μεταξύ μεγάλων ακολουθιών.

PSI-BLAST-(PositionSpecificIteratedBLAST) χρησιμοποιεί σταθερή αναζήτηση, στην οποία οι ακολουθίες που θα βρεθούν στον πρώτο γύρο αναζητήσεων χρησιμοποιούνται για να χτίσουν ένα αποτελεσματικό μοντέλο για τους επόμενους κύκλους αναζητήσεων.

PHI-BLAST-(PatternHitInitiatedBLAST) συνδυάζει το ταίριασμα ενός πρότυπου φυσιολογικής έκφρασης με μια συγκεκριμένη θέση που επαναλαμβάνεται στην πρωτεϊνική ακολουθία.

RPS-BLAST-συγκρίνει μια πρωτεϊνική ακολουθία ως προς την βάση ConservedDomainDatabase (CD-Search).[5]

2.5 Η βιοπληροφορική στη μελέτη των νοσημάτων

Η επίδραση της βιοπληροφορικής στην ιατρική είναι βαθιά και καίρια . Οι γιατροί πλέον είναι σε θέση να διαγιγνώσκουν τις νόσους και να αναπτύσσουν στρατηγικές για τη θεραπεία τους με τη βοήθεια των βιολογικών βάσεων δεδομένων. Ειδικότερα, έπειτα από την ολοκλήρωση του Προγράμματος του Ανθρώπινου Γονιδιώματος (HumanGenomeProject), τα γονίδια που ελέγχουν τις ασθένειες είναι ευκολότερο να εντοπιστούν. Οι νέες τεχνολογίες επιτρέπουν στους ερευνητές να εντοπίσουν και να αναλύσουν τα γονίδια και τις πρωτεΐνες επισημαίνοντας με τον τρόπο αυτό την ακριβή φύση των διαφόρων ασθενειών και προβλέποντας τις αντιδράσεις των ατόμων στα φάρμακα.

Στην πράξη, η σύζευξη της πληροφορικής με την μοριακή βιολογία συμβάλλει σημαντικά στην επίλυση υπολογιστικών προβλημάτων, τα οποία μέχρι πρότινος η βιολογία δεν μπορούσε να επιλύσει. Επειδή το κύριο πεδίο ενασχόλησης της μοριακής βιολογίας είναι η κατηγοριοποίηση και η σύγκριση δομών όπως είναι οι ακολουθίες του DNA, τα γονίδια και οι πρωτεΐνες, τα εργαλεία της πληροφορικής συμβάλλουν στην επίλυση προβλημάτων όπως τα παρακάτω:

- 1) Σύγκριση των ακολουθιών. Είναι γνωστό ότι οι ακολουθίες του DNA και των πρωτεϊνών που μοιάζουν τείνουν να εμφανίζουν παρόμοια λειτουργία, ακόμα κι αν οι ακολουθίες αυτές προέρχονται από διαφορετικά είδη. Για αυτό τον λόγο, το πρώτο βήμα για να αναγνωρίσουμε την δράση μιας ακολουθίας είναι η σύγκρισή της με άλλες για να εξερευνήσουμε πιθανές ομοιότητες στη δομή, ενέργεια που επιτυγχάνεται με τη χρήση αλγορίθμων ανάκτησης πληροφορίας βάσει σχηματικών ομοιοτήτων, όπως είναι ο FASTA και ο BLAST που θα μελετήσουμε παρακάτω.
- 2) Κατηγοριοποίηση των πρωτεϊνών. Η κατηγοριοποίηση των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με την κατάταξή τους σε οικογένειες που έχουν παρόμοια δομή και λειτουργία. Έτσι, γνωρίζουμε την συμπεριφορά και την τρισδιάστατη δομή τους.
- 3) Εξαγωγή πληροφοριών από γονιδιακές ακολουθίες. Η εξαγωγή πληροφοριών και συμπερασμάτων σχετικά με τη βιολογική δράση και τη συμπεριφορά των γονιδίων (εμπλοκή σε συγκεκριμένες ανωμαλίες, όμοια συμπεριφορά σε θεραπευτικές αγωγές κ.ά.), αποτελεί επίπονη διαδικασία λόγω της πολύπλοκης φύσης των γονιδίων.
- 4) Αναπαράσταση των κυττάρων ως μεταγραφικών δικτύων. Τα ζωντανά κύτταρα μπορούν να χαρακτηριστούν ως αλληλεπιδράσεις διαφορετικών κυτταρικών διαδικασιών. Εάν θέλαμε να μοντελοποιήσουμε την παραπάνω κατάσταση θα την αναπαριστούσαμε με ένα δυναμικό σύστημα με συγκεκριμένες εισόδους (π.χ.: φάρμακα, λαμβανόμενα σήματα από γειτονικά κύτταρα ή τον ανθρώπινο οργανισμό) και πιθανές καταστάσεις.

2.6 Εφαρμογές βιοπληροφορικής

Η βιοπληροφορική με τις μεθόδους που εφαρμόζει, παράγει νέα γνώση, η οποία είναι πολύ σημαντική σε άλλους τομείς όπως η Ιατρική και η Φαρμακολογία.

➤ *Βιοπληροφορική και ιατρικές επιστήμες*

Στην ιατρική, η εφαρμογή της βιοπληροφορικής έγκειται στην σύγκριση του γενετικού υλικού καρκινικών κυττάρων με αυτό των υγιών, στη χρήση ακολουθιακών μεθόδων καθώς και στην ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό των γενετικών αλλαγών που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της εξαλλαγής των κυττάρων από υγιή σε καρκινικά [8][9].

➤ *Βιοπληροφορική και φαρμακολογία*

Η αρωγή της βιοπληροφορικής στον τομέα της φαρμακολογίας έγκειται στην προσπάθεια ορθολογικού σχεδιασμού φαρμάκων που αντιμετωπίζουν μολυσματικές ασθένειες, γεγονός που θα ανακούφιζε ολόκληρη την ανθρωπότητα δεδομένου ότι η θνησιμότητα παιδιών και νεαρών ενηλίκων, εξαιτίας των ανωτέρω, είναι αυξημένη στις μέρες μας. Ο λόγος που, εν έτει 2016, οι μολυσματικές ασθένειες παραμένουν σημαντικότερες αιτίες θανάτου παγκοσμίως, είναι η αναποτελεσματικότητα και το υψηλό κόστος των ήδη υπάρχοντων φαρμάκων. Μέχρι πρότινος η φαρμακευτική βιομηχανία επικεντρωνόταν στην ανακάλυψη φαρμάκων, διαδικασία ακριβή και χρονοβόρα, σε σύγκριση με αυτήν του ορθολογικού σχεδιασμού φαρμάκων που εφαρμόζεται παράλληλα πλέον.

Με την εξέλιξη της πληροφορικής, μέσω υπολογιστικών μεθόδων καθίσταται δυνατή η πρόβλεψη «ομοιότητας φαρμάκων», που δεν είναι άλλο από τον εντοπισμό και την εξάλειψη μορίων που πιθανότατα δεν θα επιβιώσουν στα τελευταία στάδια της ανακάλυψης και της ανάπτυξης. Η ανίχνευση των «όμοιων φαρμάκων» θα μπορούσε να υλοποιηθεί με τη χρήση γενετικού αλγορίθμου και προσεγγίσεων βασισμένων στο νευρωνικό δίκτυο.

Οι προγραμματιστές εντείνουν τις προσπάθειές τους για την κατασκευή αποδοτικών αλγορίθμων που θα προβλέπουν τις πρωτεϊνικές δομές και την αλληλεπίδραση των μικρών μορίων με αυτές, παρά το ότι αυτό το εγχείρημα είναι υπολογιστικά απαιτητικό και μέχρι στιγμής δεν υπάρχει η υπολογιστική δύναμη ώστε να χειριστούμε ένα τόσο μεγάλο ζήτημα[9].

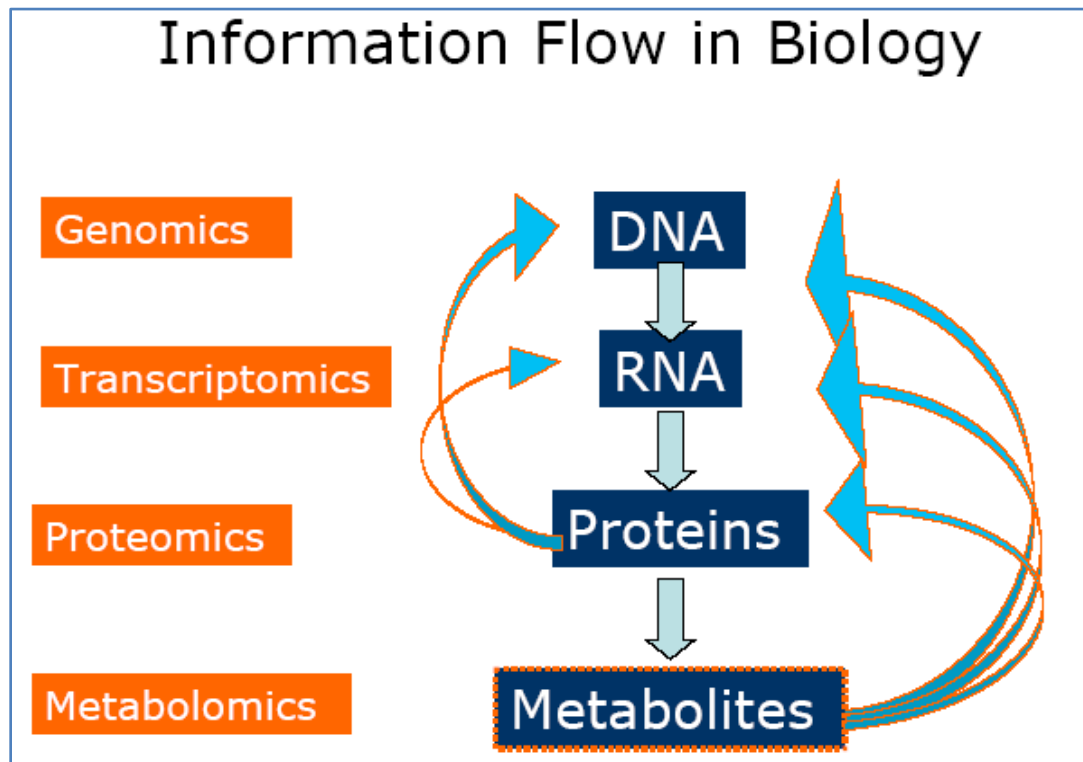
2.7 Η εξέλιξη της βιοπληροφορικής σε -omics επιστήμη

Τα τελευταία χρόνια, η έρευνα στον τομέα της βιολογίας έχει γνωρίσει επαναστατική ανάπτυξη με την εισαγωγή νέων τεχνολογιών που επιτρέπουν την γρήγορη επεξεργασία μεγάλου όγκου

δεδομένων (high-throughput analysis). Αυτή η εξέλιξη της τεχνολογίας έδωσε ώθηση στη δημιουργία νέων πεδίων επιστημών που μοιράζονται τη δημοφιλή κατάληξη -omics. Η κατάληξη αυτή προέρχεται από το ελληνικό επίθημα -ωμα, το οποίο αναλυόμενο σε -ω-μα, μας δίνει την ερμηνεία του επιθήματος, με το -ω να προέρχεται από την λέξη «στέλεχος» και το -μα να τοποθετείται ως κατάληξη σε ουσιαστικά με αφηρημένη έννοια. Σύμφωνα με το Αγγλικό Λεξικό της Οξφόρδης, στην κυτταρική και μοριακή βιολογία το επίθημα -ωμα χρησιμοποιείται για την δημιουργία ουσιαστικών που συμπυκνώνουν την έννοια «όλα τα συστατικά από τα οποία αποτελείται».

Πρόκειται για υψηλής απόδοσης τεχνικές (high-throughput techniques) που άλλαξαν ριζικά τον τρόπο με τον οποίο προσεγγίζονται τα προβλήματα στις επιστήμες ζωής και παρουσιάζουν ποικίλα πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τις κλασσικές μεθόδους βιολογίας. Συγκεκριμένα, ούσες ολιστικές τεχνολογίες παρέχουν τεράστιο όγκο πληροφορίας για το βιολογικό σύστημα, σε κάθε επίπεδο κυτταρικής λειτουργίας, ο οποίος αποθηκεύεται σε ειδικές βάσεις δεδομένων και αναλύεται μέσω υπολογιστικών στατιστικών εργαλείων. Επιπλέον, σε αντίθεση με αυτές της κλασσικής βιολογίας που στηρίζονται στην ανάλυση λίγων μοριακών δεδομένων κάθε φορά και απαιτούν μια αρχική υπόθεση συσχέτισης των εν λόγω δεδομένων, οι μέθοδοι των -omic τεχνικών δεν απαιτούν αρχική υπόθεση (μη προκατειλημμένη προσέγγιση και ανάλυση). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ελαχιστοποίηση των σφαλμάτων καθώς η αρχική υπόθεση μπορεί να είναι είτε ημιτελής είτε λανθασμένη με αποτέλεσμα να οδηγήσει σε λανθασμένα συμπεράσματα. Ένα ακόμα πλεονέκτημα των εν λόγω τεχνολογιών είναι η παροχή της δυνατότητας παράλληλης μέτρησης όλου ή ενός μεγάλου μέρους μοριακών ποσοτήτων που υπάρχουν σε ένα συγκεκριμένο επίπεδο κυτταρικής λειτουργίας με αποτέλεσμα την συσχέτιση παράλληλων φαινομένων. Τέλος, θα μπορούσαμε να πούμε ότι το σημαντικότερο πλεονέκτημα όλων, είναι η γεφύρωση του χάσματος μεταξύ γονοτύπου και φαινοτύπου. Δεδομένου ότι η γενετική ομοιότητα μεταξύ των ατόμων, ακόμα και διαφορετικών φυλών, είναι μεγαλύτερη του 99,9 % ενώ η φαινοτυπική ποικιλομορφία γιγαντιαία, εξάγεται το συμπέρασμα ότι τον κυρίαρχο ρόλο τον παίζουν τα επίπεδα ρύθμισης που μεσολαβούν. Ειδικότερα, ενώ η διαδικασία που δείχνει τι είναι πιθανότερο να συμβεί είναι η ανάλυση των μεταγραφικών ενεργειών, στην πραγματικότητα η διαδικασία που αντιπροσωπεύει τι συμβαίνει στο βιολογικό σύστημα είναι η ανάλυση των μεταβολικών ενεργειών του κυττάρου. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο μεταβολισμός

επηρεάζει το βιολογικό σύστημα και στο επίπεδο της μεταγραφής μέσω αναδρομικών μονοπατιών (Εικόνα 4).[11]



Εικόνα 4: Τα τέσσερα επίπεδα της γενετικής πληροφορίας και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση.

Πολλοί διαφορετικοί όροι χρησιμοποιούνται για να κατηγοριοποιήσουν τα νέα αντικείμενα μελέτης τα οποία και συνεχώς αυξάνονται.

Μερικά από αυτά είναι

- Genomics (γονιδιωματική), που είναι η μελέτη του συνόλου των γονιδίων ενός οργανισμού και της λειτουργίας του
- Proteomics (πρωτεομική), που είναι η μελέτη των δομών και λειτουργιών των πρωτεϊνών
- Metabolomics (μεταβολομική), που είναι η μελέτη χημικών διαδικασιών που αφορούν τους μεταβολίτες, μικρά κύτταρα που είναι παράγωγα του μεταβολισμού. Δύο υποκατηγορίες των metabolomics είναι οι εξής:
 - Glycomics, η μελέτη των κυτταρικών υδατανθράκων

- Lipidomics (λιπιδομική), η μελέτη των κυτταρικών λιπιδίων
- Transcriptomics (μεταγραφομική), η μελέτη του mRNA δηλαδή του μορίου RNA που μεταφέρει τη γενετική πληροφορία από το DNA στα ριβοσώματα, για την σύνθεση των πρωτεϊνών στα κύτταρα

Όλα τα παραπάνω που αποτελούν τη μελέτη του συνόλου των μοριακών αλληλεπιδράσεων στα κύτταρα είναι γνωστά και ως Interactomics.

2.8 Η κλινικήβιοπληροφορική

Η κλινική βιοπληροφορική(ή αλλιώς ClinicalBioinformatics) είναι μια καινούρια αναδύομενη επιστήμη που συνδυάζει τις επιστήμες της κλινικής πληροφορικής, δηλαδή το αναλυτικό ιατρικό ιστορικό του ασθενούς σε επίπεδο omics, της βιοπληροφορικής, της ιατρικής πληροφορικής, της τεχνολογίας πληροφοριών, των μαθηματικών και των –omics μαζί. Σκοπός της κλινικής βιοπληροφορικής είναι η εφαρμογή της βιολογικής και ιατρικής πληροφορικής στην ανάπτυξη της προσωπικής θεραπείας και φαρμακευτικής αγωγής του εκάστοτε ασθενούς.

Η κλινική βιοπληροφορική αρχικά προτάθηκε ως πάροχος βιολογικών και ιατρικών πληροφοριών για εξατομικευμένη διάγνωση και θεραπεία, διευκολύνοντας έτσι τους ερευνητές στην αναζήτηση τους σε διαδικτυακές βάσεις βιολογικών δεδομένων, στην εφαρμογή της βιοπληροφορικής στην ιατρική πρακτική, στην επιλογή εκ μέρους τους κατάλληλου λογισμικού ανάλυσης των δεδομένων μικροσυστοιχιών για τη λήψη ιατρικών αποφάσεων, στην βελτιστοποίηση της ανάπτυξης - σχετιζόμενων με την ασθένεια- βιοδεικτών και στην επιτήρηση ταυτοποίησης των φαρμάκων και των στόχων τους. [12]

Η κλινική βιοπληροφορική παίζει πρωταρχικό ρόλο σε πλήθος κλινικών εφαρμογών, συμπεριλαμβανομένων των τεχνικών omics (proteomics, metabolomics, pharmacomics, transcriptomics), των μεταβολικών και σηματοδοτικών μονοπατιών, της ανάπτυξης των βιοδεικτών, της υπολογιστικής βιολογίας, της ανάλυσης υψηλής απόδοσης, της ανθρώπινης μοριακής γενετικής, της τράπεζας ανθρώπινου ιστού, της μαθηματικής ιατρικής και βιολογίας, της έκφρασης πρωτεϊνών και κατηγοριοποίησης, και της βιολογίας συστημάτων. Η κατανόηση της αλληλεπίδρασης της κλινικής πληροφορικής και της βιοπληροφορικής είναι το πρώτο και κρίσιμο

βήμα για την ανακάλυψη και την εξέλιξη νέων διαγνωστικών μέσων και θεραπειών των ασθενειών.

Σε αντίθεση με τις άλλες εφαρμογές της πληροφορικής, η κλινική βιοπληροφορική πρέπει να επικεντρωθεί περισσότερο στην κλινική πληροφορική, περιλαμβάνοντας τα παράπονα του ασθενούς, το ιστορικό του, τις θεραπείες του, τα κλινικά συμπτώματα και τις ενδείξεις, τις ιατρικές εξετάσεις του, τις βιοχημικές αναλύσεις, τα προφίλ απεικόνισης, την παθολογία του ασθενούς και άλλες μετρήσεις.

Η κλινική βιοπληροφορική είναι μία καινούργια μέθοδος μέσω της οποίας οι ερευνητές και οι κλινικοί μπορούν να συνδυάσουν κλινικές μετρήσεις και ενδείξεις που προέρχονται από την εφαρμογή της βιοπληροφορικής σε ανθρώπινους ιστούς, να κατανοήσουν τα συμπτώματα, την εκδήλωση και την εξέλιξη νοσημάτων και να αναπτύξουν νέες προληπτικές και θεραπευτικές στρατηγικές. Με άλλα λόγια, αποτελεί ένα νέο εργαλείο με το οποίο μπορούμε χαρτογραφήσουμε τις σχέσεις εκείνες που ενσωματώνουν διακριτά στοιχεία, τα οποία από κοινού, κατευθύνουν τη συνολική λειτουργία του οργανισμού στο πλαίσιο μιας συγκεκριμένης ομικής τεχνικής, με κλινικές εξετάσεις, παθοφυσιολογία, βιοχημικές και απεικονιστικές αναλύσεις και θεραπείες.

Είναι ύψιστη ανάγκη να δημιουργηθεί μια ειδική πλατφόρμα επικοινωνίας μεταξύ των επιστημόνων της βιοπληροφορικής και των γιατρών ώστε να ανταλλάσσουν τις γνώσεις και τις εμπειρίες τους πάνω στη δημιουργία νέων βιοτεχνολογιών, στις γονιδιακές και πρωτεϊνικές λειτουργίες, στην δυσλειτουργία των κυττάρων και των οργάνων, στην παθολογία του ασθενούς γενικότερα, στην πρόγνωση και στα θεραπευτικά αποτελέσματα.

Με άλλα λόγια, ο όρος «κλινική βιοπληροφορική» μπορεί να ορισθεί ως «η κλινική εφαρμογή των επιστημών που σχετίζονται με την βιοπληροφορική, των τεχνολογιών προς κατανόηση των μοριακών μηχανισμών και των πιθανών θεραπειών των ανθρώπινων ασθενειών», μια νέα και σημαντικότερη ιδέα για την ανάπτυξη βιοδεικτών ανάλογων των νόσων, την κατανόηση των μηχανισμών προέλευσης των νόσων και την εφαρμογή εξατομικευμένης θεραπευτικής αγωγής σε κάθε άνθρωπο ξεχωριστά [13].

Το μέλλον της εν λόγω επιστήμης διαγράφεται λαμπρό καθώς η επιστημονική κοινότητα καθιστά αισθητή την ύπαρξη θεωριών που υποστηρίζουν την δημιουργία ειδικών λογισμικών που θα απεικονίζουν τη λειτουργία των πρωτεϊνών και την αποκαλούμενη «έκφραση των γονιδίων», καθώς και την κατασκευή υπολογιστών των οποίων η μνήμη θα έχει αντικατασταθεί με ζωντανά

νευρικά κύτταρα. Θεωρίες που αν υλοποιηθούν θα πλαισιωθούν με τη δημιουργία νέων ειδικοτήτων όπως αυτή του γιατρού-προγραμματιστή, του δικτυακού-οικονομολόγου και του βιολόγου-λογισμικού με αποτέλεσμα την ανάπτυξη νέων θέσεων εργασίας στο χώρο των επιστημών υγείας γενικότερα [14].

Βιβλιογραφία-Κεφάλαιο 2

1. Haft, D.H., Selengut, J.D., Brinkac, L.M., Zafar, N., White, O., 2005. Genome Properties: a system for the investigation of prokaryotic genetic content for microbiology, genome annotation and comparative genomics. *Bioinformatics* (Oxford, England) 21, 293-306.
2. Dennis A. Benson, Ilene Karsch-Mizrachi, David J. Lipman, James Ostell, David L. Wheeler *Nucleic Acids Res.* 2008 Jan; 36(Database issue): D25–D30.
3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 , ΣΤΟ ΒΙΒΛΙΟ ΚΟΥ ΤΙΣ ΠΗΓΕΣ ΓΙΑ BLASTΚΑΙFASTA(ΣΕΛ 147,148)
4. D. J. Lipman, W. R. Pearson: Rapid and Sensitive Protein Similarity Searches, *Science*, 227:1435-1441, 1985.
5. Stephen F. Altschul, Warren Gish, Webb Miller, Eugene W. Myers, David Lipman: Basic Local Alignment Search Tool, *J. Mol. Biol.* (1990) 251, 403-410.
6. Samuel Karlin, Stephen Altschul: Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 87, pp 2264-2268, March 1990, *Evolution*.
7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
8. Halvorsen O.J., Oyan A.M., Bo T.H., Olsen S., Rostad K., Haukaas S.A., Bakke A.M., Marzolf B., Dimitrov K., Stordrange L., Lin B., Jonassen I., Hood L., Akslen L.A. and Kalland K.H. 2005. Gene expression profiles in prostate cancer: association with patient subgroups and tumour differentiation *Int. J Oncol* 26:329-336
9. Samuel Murray, Η τεχνολογία των μικροδιατάξεων (microarrays) και εφαρμογές στη Ογκολογία, Βήμα Κλινικής Ογκολογίας, τόμος 1, τεύχος 1ο , Ιανουάριος – Μάρτιος 2002
10. New advances in Pharmacogenomics. B. Destenaves and F. Thomas. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2000. 4:440-444.
11. Fiehn, O. (2002) Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* 48: 155–171
12. Chang PL: Clinical bioinformatics. *Chang Gung Med J* 2005, 28:201-11.
13. Wang and Liotta: Clinical bioinformatics: a new emerging science. *Journal of Clinical Bioinformatics* 2011 1:1.
14. Krane D. and Raymer M.L., *Fundamental Concepts of Bioinformatics*, Pearson Education.(2003)

Μέρος II

Αποτελέσματα Έρευνας

Κεφάλαιο 3: Γονιδιακή έκφραση του προσαρμοστικού αναπνευστικού συστήματος

3.1 Γονιδιακή έκφραση

Με τον όρο «γονιδιακή έκφραση» αναφερόμαστε συνήθως στη διαδικασία με την οποία ένα γονίδιο ενεργοποιείται, για να παραγάγει μια πρωτεΐνη. Επειδή μέσα στα κύτταρα δεν παράγονται ούτε όλες οι πρωτεΐνες ούτε και σε ίδιες ποσότητες, αφού δεν χρειάζονται όλες στην ίδια ποσότητα, αλλά ούτε και την ίδια χρονική στιγμή, καθίσταται απαραίτητη η ύπαρξη και η λειτουργία ενός προγράμματος ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, που παρέχει τις οδηγίες για το είδος αλλά και την ποσότητα των πρωτεϊνών που πρέπει να παραχθούν σε κάθε συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Αυτό το πρόγραμμα, δεδομένου ότι ο άνθρωπος αποτελείται από ευκαρυωτικά κύτταρα, χαρακτηρίζεται από τέσσερα επίπεδα και παρουσιάζεται αναλυτικά παρακάτω :

Το επίπεδο της μεταγραφής: Η μεταγραφή είναι αυτή που καθορίζει ποια γονίδια θα εκφραστούν σε ποιους ιστούς και σε ποια στάδια της ανάπτυξης. Σύμφωνα με τελευταίες εκτιμήσεις, κάθε ανθρώπινο κύτταρο περιέχει το πολύ 40.000 γονίδια. Τα γονίδια αυτά διακρίνονται σε δυο κατηγορίες:

- στα γονίδια που μεταγράφονται σε mRNA και μεταφράζονται στη συνέχεια σε πρωτεΐνες και
- στα γονίδια που μεταγράφονται και παράγουν tRNA, rRNA και snRNA.

Τα παραπάνω είδη μορίων RNA είναι ακριβώς όσα μόρια RNA παράγονται με τη μεταγραφή και έχουν τις εξής ονομασίες: αγγελιοφόρο RNA (mRNA), μεταφορικό RNA(tRNA), ριβοσωμικό RNA (rRNA) και μικρό πυρηνικό RNA(snRNA). Αυτές οι ονομασίες ορίζουν και τη λειτουργία κάθε μορίου. Συνεπώς, το αγγελιοφόρο RNA μεταφέρει την πληροφορία του DNA για την παραγωγή της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, το μεταφορικό RNA συνδέεται με ένα συγκεκριμένο αμινοξύ και το μεταφέρει στη θέση της πρωτεϊνοσύνθεσης, τα ριβοσωμικά RNA συνδέονται με πρωτεΐνες και σχηματίζουν το ριβόσωμα που είναι απαραίτητο για την πρωτεϊνοσύνθεση και τέλος, τα μικρά πυρηνικά RNA είναι μικρά μόρια που, επίσης, συνδέονται με πρωτεΐνες σχηματίζοντας μικρά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια τα οποία καταλύουν την «ωρίμανση» του

mRNA. Η μεταγραφή καταλύεται από ένα ένζυμο, την RNA πολυμεράση, η οποία προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου με τη βοήθεια πρωτεϊνών που ονομάζονται μεταγραφικοί παράγοντες. Οι υποκινητές και οι μεταγραφικοί παράγοντες αποτελούν τα ρυθμιστικά στοιχεία της μεταγραφής του DNA και επιτρέπουν στην RNA πολυμεράση να αρχίσει σωστά τη μεταγραφή. Οι υποκινητές βρίσκονται πάντα πριν από την αρχή κάθε γονιδίου.

Κατά την έναρξη της μεταγραφής ενός γονιδίου η RNA πολυμεράση προσδένεται στον υποκινητή και προκαλεί τοπικό ξετύλιγμα της διπλής έλικας του DNA. Στη συνέχεια, τοποθετεί τα ριβονουκλεοτίδια απέναντι από τα δεοξυριβονουκλεοτίδια μιας αλυσίδας του DNA σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας των βάσεων και απέναντι από την αδενίνη τοποθετείται το ριβονουκλεοτίδιο που περιέχει ουρακίλη. Η RNA πολυμεράση συνδέει κάθε ριβονουκλεοτίδιο με το άλλο με φωσφοδιεστερικό δεσμό και αφού συνθέσει το μόριο RNA, απελευθερώνεται από το γονίδιο.

Στο επίπεδο μετά τη μεταγραφή: Το μόριο RNA που παράχθηκε κατά τη μεταγραφή δεν είναι ακόμα έτοιμο να μεταφραστεί καθώς περιέχει αλληλουχίες που μεταφράζονται σε αμινοξέα (εξώνια) αλλά και αλληλουχίες που δεν μεταφράζονται (εσώνια), γι' αυτό και ονομάζεται πρόδρομο mRNA. Το πρόδρομο mRNA για να μετατραπεί σε mRNA υφίσταται την διαδικασία της ωρίμανσης, κατά την οποία τα εσώνια κόβονται από μικρά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια (αποτελούμενα από snRNA και πρωτεΐνες που λειτουργούν ως ένζυμα) και τα εξώνια συρράπτονται μεταξύ τους από τα ίδια σωματίδια. Το «ώριμο» πλέον mRNA μεταφέρεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και ειδικότερα στα ριβοσώματα όπου είναι η θέση της πρωτεϊνοσύνθεσης.

Στο επίπεδο της μετάφρασης: Η αλληλουχία των βάσεων του mRNA που δημιουργήθηκε, καθορίζει την αλληλουχία των αμινοξέων στις πρωτεΐνες με βάση έναν κώδικα αντιστοίχισης νουκλεοτιδίων RNA με αμινοξέα πρωτεϊνών, τον γνωστό γενετικό κώδικα. Γι' αυτό η πρωτεϊνοσύνθεση είναι πραγματικά μια διαδικασία «μετάφρασης» από τη γλώσσα των βάσεων στη γλώσσα των αμινοξέων. Είναι γνωστό ότι ο γενετικός κώδικας είναι κώδικας τριπλέτας, δηλαδή μια τριάδα νουκλεοτιδίων ισοδυναμεί με ένα κωδικόνιο και κωδικοποιεί ένα αμινοξύ. Η μετάφραση του mRNA, δηλαδή η αντιστοίχιση κωδικονίων σε αμινοξέα και η διαδοχική σύνδεση των αμινοξέων σε πολυπεπτιδική αλυσίδα, πραγματοποιείται στα ριβοσώματα με τη βοήθεια των tRNA και τη συμμετοχή αρκετών πρωτεϊνών και ενέργειας. Η διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης

διακρίνεται σε τρία στάδια: την έναρξη, την επιμήκυνση και τη λήξη. Κατά την έναρξη το mRNA συνδέεται με το ριβόσωμα και το πρώτο tRNA που μεταφέρει το αμινοξύ μεθειονίνη προσδέεται με το αντικωδικόνιό του(τριπλέτα νουκλεοτιδίων του tRNA) στο κωδικόνιο έναρξης(AUG που κωδικοποιεί την μεθειονίνη). Κατά την επιμήκυνση τα tRNA μεταφέρουν τα αμινοξέα που αντιστοιχούν στα κωδικόνια του mRNA, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς. Έτσι, αναπτύσσεται η πολυπεπτιδική αλυσίδα και απελευθερώνεται όταν το ριβόσωμα φτάσει στο κωδικόνιο λήξης(UAG,UGA, UAA), όπου και τελειώνει η πρωτεϊνσύνθεση, γιατί δεν υπάρχουν αμινοξέα που να αντιστοιχούν σε αυτό. Να τονίσουμε ότι κατά μήκος του mRNA κινούνται πολλά ριβοσώματα ταυτόχρονα και το σύμπλεγμα που σχηματίζουν όλα αυτά μαζί ονομάζεται πολύσωμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα μόρια mRNA δεν "ζουν" στο κυτταρόπλασμα το ίδιο χρονικό διάστημα, επειδή μετά από κάποιο χρόνο αποδομούνται. Επίσης, η ικανότητα πρόσδεσης του mRNA στα ριβοσώματα ποικίλλει.

Στο επίπεδο μετά τη μετάφραση: Ακόμα και όταν πραγματοποιηθεί η πρωτεϊνσύνθεση και παραχθεί η κατάλληλη πρωτεΐνη, για να καταστεί βιολογικά λειτουργική μπορεί να πρέπει να υποβληθεί σε κάποιες τροποποιήσεις. Τα γονίδια που πάντα μεταγράφονται, άλλα περισσότερο και άλλα λιγότερο συχνά, ονομάζονται housekeeping γονίδια και είναι απαραίτητα για τις βασικές αντιδράσεις στα κύτταρα. Τα υπόλοιπα γονίδια είτε δεν μεταγράφονται καθόλου είτε μεταγράφονται υπό ιδιαίτερες εξωτερικές συνθήκες και σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές για συγκεκριμένες λειτουργίες του οργανισμού. Τα σήματα που ενεργοποιούν ή απενεργοποιούν ένα γονίδιο μπορεί να προέλθουν από το εξωτερικό του κυττάρου, και συνήθως βρίσκονται με τη μορφή μιας θρεπτικής ουσίας ή μιας ορμόνης. Το αν ένα γονίδιο θα ανταποκριθεί σ' αυτά τα σήματα, που κατ' επέκταση θα επηρεάσουν την μεταγραφή του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη, εξαρτάται από κάποιες ρυθμιστικές ακολουθίες που υπάρχουν στο DNA.

3.1.1 Προσδιορισμός γονιδιακής έκφρασης

Η τεχνική για τον προσδιορισμό αν τα ειδικά γονίδια εκφράζονται σε ειδικά κύτταρα είναι αρκετά απλή. Τα γονίδια κωδικοποιούνται από μία αλληλουχία βάσεων στο DNA. Οι επιστήμονες κατασκεύασαν μια συμπληρωματική αλληλουχία προς αυτές τις βάσεις και επισύναψαν δείκτες, για παράδειγμα έναν ανιχνευτή φθορισμού. Τα σχετικά γονίδια λούονται με αυτή τη συμπληρωματική αλληλουχία, επιτρέποντας στην αλληλουχία να συνδεθεί με τα γονίδια που

ψάχνουν. Οι ανιχνευτές παρουσιάζουν τα χρώματά του, στην περίπτωση ενός ανιχνευτή φθορισμού με ένα ομοεστιακό μικροσκόπιο και στην περίπτωση ενός χημικού που αλλάζει χρώμα με ένα μικροσκόπιο ευρέως πεδίου. Τα σχετικά κύτταρα δείχνουν ότι αυτά τα γονίδια εκφράζονται από το άναμμα (ή μαύρισμα) κάτω από το μικροσκόπιο. Το πρόβλημα είναι ότι για τον άνθρωπο υπάρχουν 30.000 γονίδια.

3.2 Σύγκριση των νουκλεοτιδικών ακολουθιών που σχετίζονται με τις ασθένειες του αναπνευστικού συστήματος

Σε αυτή την ενότητα, τα γονίδια των οποίων οι μεταλλάξεις προκαλούν τις ασθένειες του αναπνευστικού που περιεγράφηκαν στο Κεφάλαιο 1, συγκρίνονται με τα γονίδια άλλων οργανισμών μέσω του προγράμματος BLAST. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία, περιγράφεται στα παρακάτω τέσσερα (4) βήματα:

- 1 Αρχικά επισκεφθήκαμε την ιστοσελίδα του NCBI (NationalCenterofBiotechnologyInformation⁶) και επικολλήσαμε το όνομα του γονιδίου στην περιοχή κειμένου "Search", αφού επιλέξαμε η αναζήτηση να πραγματοποιηθεί στην βάση δεδομένων "Gene".
- 2 Στη συνέχεια, αφού εμφανίσθηκαν αρκετά αποτελέσματα, επιλέξαμε να εισέλθουμε σε εκείνη την καταχώρηση η οποία αναφερόταν στον ανθρώπινο οργανισμό [Homo Sapiens(human)].
- 3 Έπειτα στην κατηγορία "Genomicregions, transcripts, andproducts", επιλέξαμε το FASTA, ώστε να εμφανισθεί η νουκλεοτιδική ακολουθία του εν λόγω γονιδίου.
- 4 Τέλος, πατώντας πάνω στην επιλογή "RunBLAST" που υπάρχει στο δεξί μέρος αυτής της σελίδας, μεταφερθήκαμε στην αρχική σελίδα του αλγορίθμου BLAST όπου, αφού επιλέξαμε στο "Database" το "Others (nr etc.)", πατήσαμε αριστερό κλικ στην επιλογή "BLAST" και μεταβήκαμε στον τελικό πίνακα με τα ποσοστά ομοιότητας της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου του ανθρώπου, που σχετίζεται με την ασθένεια, με αυτήν των γονιδίων των ζώων.

⁶<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο αναγνωριστικός αριθμός προσθήκης (AccessionNumber) NC_000014.9 ο οποίος καθορίστηκε αυτόματα κατά τη μετάβαση από το NCBI στον BLAST στη διάρκεια διεξαγωγής του τέταρτου βήματος.

Γενικά, ο αλγόριθμος BLAST δέχεται έναν αριθμό διαφορετικών τύπων εισόδου οι οποίες όμως υπόκεινται σε κάποιες συμβάσεις που απαιτούνται όσον αφορά την είσοδο των αναγνωριστικών. Αυτές οι συμβάσεις είναι οι εξής:

1. Ακολουθία FASTA

Μια ακολουθία σε μορφή FASTA αρχίζει με μια περιγραφή μονής γραμμής, που ακολουθείται από γραμμές δεδομένων ακολουθίας. Η γραμμή περιγραφής διακρίνεται από τα δεδομένα αλληλουχίας από ένα σύμβολο 'μεγαλύτερο-από' (>) στην αρχή. Τα δεδομένα ακολουθίας εξαρτώνται από το εάν πρόκειται για νουκλεοτιδική ή πρωτεϊνική αλληλουχία. Ένα παράδειγμα νουκλεοτιδικής ακολουθίας σε μορφή FASTA είναι αυτό του SERPINA1, ενός γονιδίου που σχετίζεται με τη Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια(XΑΠ):

```
>NC_000014.9:c94390692-94376747 Homo sapiens chromosome 14, GRCh38.p7 Primary Assembly
TGGGCAGGAAGCTGGGCACTGTGCCAGGGCATGCACTGCCTCCACGCAGCAAC
CCTCAGAGTCCTGAGCT.....CCTTTGAGTTGGTATGATGTTCAAGTTAGA
TAACAAAATGTTTATACCCATTAGAACAGAGAATAAATAGAACTACATTTCTT
GCA
```

Εφόσον πρόκειται για νουκλεοτιδική αλληλουχία, οι κωδικοί νουκλεϊκών οξέων που υποστηρίζονται είναι:

A → adenosine C → cytidine G → guanine T → thymidine

Όταν πρόκειται για πρωτεϊνικές αλληλουχίες αυτές αναμένεται να εκπροσωπούνται στο πρότυπο αμινοξυ IUB/IUPAC και των κωδικών νουκλεϊκών οξέων. Οι κωδικοί νουκλεϊκών οξέων που υποστηρίζονται σε αυτή την περίπτωση είναι:

A adenosine	C cytidine	G guanine
T thymidine	N A/G/C/T (any)	U uridine
K G/T (keto)	S G/C (strong)	Y T/C (pyrimidine)

<i>M</i> A/C (<i>amino</i>)	<i>W</i> A/T (<i>weak</i>)	<i>R</i> G/A (<i>purine</i>)
<i>B</i> G/T/C	<i>D</i> G/A/T	<i>H</i> A/C/T
<i>V</i> G/C/A	- <i>gap of indeterminate length</i>	

Για τα προγράμματα που χρησιμοποιούν αλληλουχίες αμινοξέων, όπως το BLASTP και το TBLASTN, οι αποδεκτοί κώδικες αμινοξέων είναι [9]:

A alanin	P proline
B aspartate/asparagine	Q glutamine
C cystine	R arginine
D aspartate	S serine
E glutamate	T threonine
F phenylalanine	<i>U selenocysteine</i>
G glycine	V valine
H histidine	W tryptophan
I isoleucine	Y tyrosine
K lysine	Z glutamate/glutamine
L leucine	X any
M methionine	* translation stop
N asparagine	- <i>gap of indeterminate length</i>

2. Γυμνή ακολουθία.

Μια γυμνή ακολουθία αποτελείται από δεδομένα αλληλουχίας, χωρίς την γραμμή περιγραφής FASTA όπως, για παράδειγμα, η εξής:

```
QIKDLLVSSSTDLDTTLVLVNAIYFKGMWKTAFAEDTREMPFHVTKQESKPVQM
MCMNNSFNVATLPAEKMKILELPFASGDLSMLVLLPDEVSDLERIEKTINFEKLTE
WTNPNTMEKRRVKVYLPQMKIEEKYNLTSVLMALGMTDLFIPSANLTGISSAESL
KISQAVHGFMESEDIEMAGSTGVIEDIKHSPESQFRADHPFLFLIKHNPTNTIV
YFGRYWSP
```

Μπορεί επίσης να είναι μια ακολουθία διανθισμένη με αριθμούς και / ή κενά , όπως το τμήμα ακολουθίας μιας έκθεσης του GenBank/GenPept που φαίνεται παρακάτω:

```
1      qikdllvssstdldttlvlnaiyfkmgwktafnaedtremphvbkqeskpvmcmn
61     nsfnvatlpaekmkilelpfasgdlsmlvllpdevsdleriektinfekltewtnpntmek
```

121 rrvkvyrlpqrnkieekynltsvlmalgmtldfipsanltgissaeslkisqavhgafmels
181 edgiemagstgviedikhspeseqfradhpfllikhnpntivfyfgrywsp

Οι κενές γραμμές δεν επιτρέπονται ανάμεσα στα δεδομένα μιας γυμνής ακολουθίας.

3. Αναγνωριστική ακολουθία

Πρόκειται για απλές καταχωρήσεις οι οποίες εμφανίζονται είτε με τη μορφή «προσχώρησης» δηλαδή γραμμμάτων του αλφάβητου μαζί με ψηφία όπως π.χ. P01013, είτε με τη μορφή «προσχώρηση.έκδοση» δηλαδή γραμμμάτων_αλφαβήτου_με_ψηφία.ψηφίο όπως π.χ. AAA68881.1 είτε με τη μορφή GI (ή gi) δηλαδή μια σειρά ψηφίων που εκχωρούνται διαδοχικά σε κάθε εγγραφή ακολουθίας που επεξεργάζεται το NCBI, όπως για παράδειγμα 123456. Αποδεκτή μορφή εισόδου είναι και μια αναγνωριστική ακολουθία του NCBI χωρισμένη με μια κάθετη μπάρα (|) από το gi, λόγου χάριν gi|129295. Τα κενά πριν και μετά το αναγνωριστικό επιτρέπονται αλλά όχι ανάμεσα στα στοιχεία του αναγνωριστικού.

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα.

➤ ***Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (Chronic Obstructive Pulmonary Disease)***

• ***Γονίδιο: SERPINA1***

Το SERPINA1 γονίδιο κωδικοποιεί την Άλφα -1- αντιθρυψίνη (AAT), γνωστή και ως αναστολέας πρωτεάσης (PI), έναν από τους κυριότερους αναστολείς της πρωτεάσης σερίνης στο πλάσμα του αίματος. Η AAT αλληλεπιδρά κυρίως με την ελαστάση καθώς και με την θρυψίνη, την χυμοθρυψίνη, την θρομβίνη και με βακτηριακές πρωτεάσες, δημιουργώντας σύμπλοκα με τις παραπάνω πρωτεΐνες και ένζυμα. Η πιο σημαντική ανασταλτική δράση της AAT είναι αυτή ενάντια στην ουδετερόφιλη ελαστάση (ELANE, orHLE), μια πρωτεάση που αποδομεί την ελαστίνη των κυψελιδικών τοιχωμάτων καθώς, επίσης και άλλες δομικές πρωτεΐνες πληθώρας ιστών[1]. Η έλλειψη της Άλφα -1- αντιθρυψίνης προκαλείται από μετάλλαξη στο γονίδιο SERPINA1 συχνότερα από ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο PiZ. Είναι μια διαταραχή η οποία ακολουθεί τον αυτοσωματικό υπολειπόμενο τρόπο κληρονομησης και έχει ως κύρια εκδήλωση το εμφύσημα, το οποίο εμφανίζεται κατά την τρίτη και την τέταρτη

δεκαετία του ανθρώπου. Λιγότερο κοινή εκδήλωση της εν λόγω ανεπάρκειας είναι η ηπατική νόσος που παρατηρείται σε παιδιά και ενήλικες και μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την κίρρωση και την ηπατική ανεπάρκεια. Περιβαλλοντικοί παράγοντες, ιδιαίτερα το κάπνισμα, αυξάνουν σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης εμφυσήματος σε πιο νεαρή ηλικία[2]. Η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) προσδιορίζεται από την μη αναστρέψιμη παρεμπόδιση της ροής του αέρα εξαιτίας της χρόνιας βρογχίτιδας, του εμφυσήματος και ασθενειών των αεραγωγών [3]. Ενώ η μεγαλύτερη αιτία εκδήλωσης ΧΑΠ είναι το κάπνισμα, μόνο το 15% των καπνιστών εμφανίζει την ασθένεια , γεγονός που επιδεικνύει μεγάλες γενετικές επιρροές. Το πιο ευρέως αναγνωρισμένο υποψήφιο γονίδιο στην ΧΑΠ είναι το SERPINA1, παρά το ότι έχει προταθεί ότι το SERPINA3 μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο. Στην εργασία των Chappelletal.[4] προσδιόρισαν 15 μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNP) στα δύο αυτά γονίδια και επιβεβαίωσαν αυτούς τους πολυμορφισμούς σε ένα μεγάλο πλήθος ατόμων που έπασχαν τη δεδομένη στιγμή από ΧΑΠ.

Πίνακας 1: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου SERPINA1 με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.

Γονίδιο:	SERPINA1
Συνώνυμα:	AAT,PI
Πρωτεΐνη:	A-1- Αντιθρυψίνη
Οργανισμός	Ποσοστό ομοιότητας
Gorilla gorilla	99%
Pongo abelii	98%
Hylobates	97%
Cercopithecus aethiops	91%

- ***Γονίδιο:HMOX1***

Το γονίδιο HMOX1 κωδικοποιεί την οξυγενάση-1 της αίμης, ένα ένζυμο το οποίο λειτουργεί ως καταλύτης για τον καταβολισμό της αίμης με αποτέλεσμα το σχηματισμό της μπιλιβερδίνης, του ελεύθερου σιδήρου και του μονοξειδίου του άνθρακα [5]. Σε ασθενείς με έλλειψη της οξυγενάσης -1 της αίμης [6] εντοπίστηκε συνδυασμός ετεροζυγωτίας για 2

μεταλλάξεις στο γονίδιο HMOX1: ολική απώλεια του δεύτερου εξωνίου του μητρικού αλληλόμορφου και διαγραφή 2 νουκλεοτιδίων του τρίτου εξωνίου του πατρικού αλληλόμορφου, ενώ ένα κανονικό γονίδιο HMOX1 περιέχει 5 εξόνια. Στην εργασία των Yamadaetal. [7] μεταξύ 201 καπνιστών, βρέθηκε μια συσχέτιση του Χρόνιου Αναπνευστικού Εμφυσηματος (ΧΑΕ), το οποίο είναι ένδειξη Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας (ΧΑΠ) και ενός επαναλαμβανόμενου πολυμορφισμού μεγαλύτερου μεγέθους στον υποκινητή του γονιδίου.

Πίνακας 2: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου HMOX1 με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.

Γονίδιο:	HMOX1
Πρωτεΐνη:	Hemeoxygenase 1
Συνώνυμα:	HO, HO1
Οργανισμός	Ποσοστό ομοιότητας
Macacafascicularis	97%
Pongoabelii	96%
Pantholops hodgsonii	89%
Macaca mulatta	84%
Pongo pygmaeus	81%

- ***Γονίδιο:MMP1***

Το γονίδιο MMP1 κωδικοποιεί ένα μέλος της οικογένειας των M10 πεπτιδασών των μεταλλοπρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας, την MMP1 ή αλλιώς κολλαγενάση. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας ουσίας(MMPs-Matrix metalloproteinases) είναι πρωτεάσες, εξαρτώμενες από ψευδάργυρο, οι οποίες αποσυνθέτουν την πλειονότητα των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας δηλαδή το παρέγχυμα και τις βασικές μεμβράνες. Στον χώρο της ΧΑΠ, ο ρόλος των MMPs είναι πολύ σημαντικός και ειδικότερα της MMP1 η οποία χαρακτηρίζεται από έντονη ελαστολυτική δραστηριότητα[8].Σύμφωνα με την εργασία των Rutteretal. [9] εντοπίζεται ένας μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός στον υποκινητή του γονιδίου MMP1 όπου εμφανίζεται ένα επιπλέον νουκλεοτίδιο γουανίνης και αυτή η αλλαγή

έχει ως αποτέλεσμα σημαντικά υψηλότερη μεταγραφή σε φυσιολογικούς ινοβλάστες και κύτταρα μελανώματος.

Πίνακας 3: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου MMP1 με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.

Γονίδιο:	MMP1
Πρωτεΐνη:	Interstitial collagenase(Matrix metalloproteinase-1)
Συνώνυμα:	CLG
Οργανισμός	Ποσοστό ομοιότητας
Pongo pygmaeus	97%
Macaca mulatta	94%
Ateles geoffroyi	92%
Pan troglodytes	90%
Pongo abelii	89%
Nomascus leucogenys	81%
Sus scrofa	80%
Oryctolagus cuniculus	80%

- ***Γονίδιο:ELANE***

Η ουδετερόφιλη ελαστάση είναι μία πρωτεάση σερίνης ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων κόκκων [62]. Ο κομβικός φυσιολογικός ρόλος της είναι στην έμφυτη άμυνα του ξενιστή, αλλά μπορεί επίσης να συμμετέχει και στην αναδιαμόρφωση των ιστών. Οι ελαστάσες σχηματίζουν μια υπο-οικογένεια των πρωτεασών σερίνης που υδρολύουν πολλές πρωτεΐνες καθώς και την ελαστίνη. Οι άνθρωποι έχουν έξι γονίδια ελαστασών που κωδικοποιούν παρόμοιες δομικά πρωτεΐνες. Η κωδικοποιημένη προπροπρωτεΐνη υφίσταται πρωτεολυτική επεξεργασία για να δημιουργήσει τη δραστική πρωτεάση. Μετά την ενεργοποίηση, αυτή η πρωτεάση υδρολύει πρωτεΐνες εντός ειδικών ουδετερόφιλων λυσοσωμάτων, που ονομάζονται αζουρόφιλα κοκκία, όπως επίσης και πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας. Το ένζυμο μπορεί να παίζει ένα ρόλο σε εκφυλιστικές και φλεγμονώδεις ασθένειες μέσω της πρωτεόλυσης του κολλαγόνου-IV και της ελαστίνης. Αυτή η πρωτεΐνη διασπά επίσης την πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης A

(OmpA) του E.coli καθώς και τους λοιμογόνους παράγοντες τέτοιων βακτηρίων όπως η Shigella, η Salmonella και η Yersinia. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό συνδέονται με την κυκλική ουδετεροπενία και τη σοβαρή συγγενή ουδετεροπενία (SCN). Αυτό το γονίδιο βρίσκεται σε μία συστάδα γονιδίων στο χρωμόσωμα 19. [63]

Πίνακας 4: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου ELANE με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.

Γονίδιο:	ELANE
Συνώνυμα:	ELA2, GE, HLE, HNE, NE, PMN-E, SCN1
Πρωτεΐνη:	Neutrophil elastase
Οργανισμός	Ποσοστό ομοιότητας
Pan troglodytes	87%
Macaca mulatta	87%
Gorilla gorilla	85%

- **Γονίδιο:ELN**

Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που είναι ένα από τα δύο συστατικά των ελαστικών ινών. Η κωδικοποιημένη πρωτεΐνη είναι πλούσια σε υδρόφοβα αμινοξέα όπως την γλυκίνη και την προλίνη, τα οποία αποτελούν τις κινητές υδρόφοβες περιοχές που οριοθετούνται από σταυρωτές συνδέσεις μεταξύ των καταλοίπων λυσίνης. Οι διαγραφές και οι μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο σχετίζονται με υπερβαλβιδική στένωση αορτής (SVAS) και αυτοσωματική επικρατή γενικευμένη ελαστόλυση (Cutis Laxa - CL). Πολλαπλές παραλλαγές μετάγραφων που κωδικοποιούν διαφορετικά ισόμορφα πρωτεϊνών έχουν βρεθεί για αυτό το γονίδιο. [65]

Πίνακας 5: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου ELN με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.

Γονίδιο:	ELN
Συνώνυμα:	SVAS, WBS, WS
Πρωτεΐνη:	Elastin

Οργανισμός	Ποσοστό ομοιότητας
Pan troglodytes	98%
Macaca fascicularis	92%
Papio anubis	92%

➤ *Κυστική Ίνωση (Cystic Fibrosis)*

- *Γονίδιο: CFTR*

Το γονίδιο CFTR ή αλλιώς ρυθμιστής της διαμεμβρανικής αγωγιμότητας της κυστικής ίνωσης (CFTR), κωδικοποιεί μια ρυθμιστική πρωτεΐνη (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), η οποία ελέγχει την διέλευση χλωρίου διαμέσου των μεμβρανών των επιθηλιακών κυττάρων διαφόρων οργάνων του σώματος όπως των πνευμόνων, του παγκρέατος, των ιδρωτοποιών αδένων και του εντέρου [10]. Βρίσκεται στο έβδομο χρωμόσωμα και οι μεταλλάξεις σε αυτό προκαλούν μειωμένη παραγωγή ή λειτουργικότητα της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα στο επιθήλιο των προσβαλλομένων οργάνων να παράγεται παχύρρευστη κολλώδης βλέννα η οποία αποφράσσει τους πόρους των αδένων με συνέπεια την προοδευτική καταστροφή του ιστού των οργάνων (ίνωση) και την τελική ανεπάρκεια τους. Οι πιο συχνές ασθένειες που εμφανίζονται λόγω μεταλλάξεων στο εν λόγω γονίδιο είναι η κυστική ίνωση (από την οποία έλαβε και το όνομά του το γονίδιο) η οποία μεταβιβάζεται με αυτοσωματικό υπολειπόμενο τρόπο κληρονομησης στους απογόνους κυττάρων, καθώς και η συγγενής διμερής απλασία του σπερματικού πόρου. [11][10] Οι συνολικές μεταλλάξεις που υφίσταται το γονίδιο CFTR ανέρχονται σε δυο χιλιάδες περίπου. Η πιο συνηθής μετάλλαξη που έχει καταγραφεί είναι η ΔF508, η οποία επιφέρει την διαγραφή τριών νουκλεοτιδίων με αποτέλεσμα την απώλεια του αμινοξέος φαινυλαλανίνη (F) στην πεντακοσιοστή όγδοη τοποθεσία της πρωτεΐνης. Κατά συνέπεια, η πρωτεΐνη δεν διπλώνεται φυσιολογικά και αποσυντίθεται ευκολότερα. [13]

Πίνακας 6: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου CFTR με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.

Γονίδιο:	CFTR
Πρωτεΐνη:	Cystic fibrosis transmembrane conductance

	regulator
Συνώνυμα:	ABCC7
Οργανισμός	Ποσοστό ομοιότητας
Gorilla gorilla	99%
Pan troglodytes	99%
Nomascus leucogenys	96%
Pongo abelii	96%
Macaca mulatta	95%
Papio anubis	94%
Colobus guereza	94%
Macaca fascicularis	94%
Chlorocebus aethiops	93%
Ateles geoffroyi	90%
Saimiri boliviensis	90%
Aotus nancymae	90%
Plecturocebus moloch	89%
Callithrix jacchus	89%

- ***Γονίδιο: TGFB1***

Το γονίδιο TGFB1 παρέχει οδηγίες για την παραγωγή μιας πρωτεΐνης που ονομάζεται αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού βήτα-1 (TGFβ-1). Η πρωτεΐνη TGFβ-1 βοηθά στον έλεγχο της ανάπτυξης και διαίρεσης (πολλαπλασιασμού) των κυττάρων, τη διαδικασία με την οποία τα κύτταρα ωριμάζουν να εκτελούν ειδικές λειτουργίες (διαφοροποίηση), κυτταρική κίνηση (κινητικότητα), και την αυτοκαταστροφή των κυττάρων (απόπτωση). Η πρωτεΐνη TGFβ-1 βρίσκεται σε όλο το σώμα και παίζει ρόλο στην ανάπτυξη πριν από τη γέννηση, στον σχηματισμό των αιμοφόρων αγγείων, στη ρύθμιση του μυϊκού ιστού και την ανάπτυξη του σωματικού λίπους, στην επούλωση των πληγών, και τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Η TGFβ-1 είναι ιδιαίτερα άφθονη σε ιστούς που απαρτίζουν το σκελετό, όπου βοηθά στη ρύθμιση της ανάπτυξης των οστών, και στο περίπλοκο πλέγμα που σχηματίζει στους χώρους μεταξύ των κυττάρων (το εξωκυτταρικό πλέγμα). Μέσα στα κύτταρα, αυτή η πρωτεΐνη είναι απενεργοποιημένη (ανενεργή) μέχρι να λάβει ένα χημικό σήμα για να γίνει ενεργή.[14]

Ορισμένες μεταλλάξεις στο γονίδιο TGFB1 αποκτήθηκαν κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου και υπάρχουν μόνο σε ορισμένα κύτταρα. Αυτές οι αλλαγές καλούνται σωματικές μεταλλάξεις και δεν είναι κληρονομικές. Οι σωματικές μεταλλάξεις στο γονίδιο TGFB1 που προκαλούν αλλοιώσεις στη δραστηριότητα (έκφραση) της πρωτεΐνης TGFβ-1 σχετίζονται με ορισμένους καρκίνους. Η αλλαγμένη έκφραση πρωτεΐνης μπορεί να ενισχύσει πολλές εκδηλώσεις σχετιζόμενες με τον καρκίνο, όπως την κυτταρική διαίρεση (πολλαπλασιασμός), την κυτταρική κινητικότητα, καθώς και την ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων (αγγειογένεση) που τρέφουν έναν αναπτυσσόμενο όγκο. Η πρωτεΐνη TGFβ-1 είναι ασυνήθιστα ενεργή (υπερεκφράζεται) σε ορισμένους τύπους καρκίνων του προστάτη. Η αλλαγμένη έκφραση TGFβ-1 έχει επίσης βρεθεί σε καρκίνους του μαστού, του παχέος εντέρου, του πνεύμονα και της ουροδόχου κύστης[15]. Μια παραλλαγή (πολυμορφισμός) στο γονίδιο TGFB1 που αλλάζει ένα απλό αμινοξύ στην πρωτεΐνη TGFβ-1 συνδέεται με τον καρκίνο του προστάτη. Σε άτομα με αυτόν τον πολυμορφισμό, το αμινοξύ λευκίνη αντικαθίσταται με προλίνη στη θέση 10 στην πρωτεΐνη TGFβ-1. Αν και δεν έχει εμφανή επίδραση στα υγιή άτομα ή σε εκείνους με πάθηση που προκαλείται από μια διαφορετική μετάλλαξη στο γονίδιο TGFB1, αυτός ο πολυμορφισμός συνδέεται με την επιταχυνόμενη εξέλιξη της νόσου σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη. Μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση της νόσου Camurati-Engelmann[16].

Πίνακας 7: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου TGFB1 με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.

Γονίδιο:	TGFB1
Πρωτεΐνη:	Transforming growth factor beta-1
Συνώνυμα:	CED, DPD1, LAP, TGFB, TGFbeta
Οργανισμός	Ποσοστό ομοιότητας
Simian	97%
Sus scrofa	85%

➤ *Άσθμα (Asthma)*

- **Γονίδιο: HNMT**

Η ισταμίνη N-μεθυλτρανσφεράση (HMT, HNMT) είναι ένα ένζυμο που σε ανθρώπους κωδικοποιείται από το γονίδιο HNMT. Η ισταμίνη N-μεθυλτρανσφεράση είναι ένα από τα δύο ένζυμα που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της ισταμίνης, η άλλη είναι η οξειδάση διαμίνης. Ωστόσο, οι σχετικές συνεισφορές των δυο αυτών ενζύμων στο μεταβολισμό της ισταμίνης διαφέρουν μεταξύ των ιστών. Η HNMT πρωτεΐνη παίζει τον κυρίαρχο ρόλο στη βιομετατροπή της ισταμίνης στο βρογχικό επιθήλιο, δηλαδή στην αποικοδόμηση της ισταμίνης και στη ρύθμιση της απόκρισης των αεραγωγών στην ισταμίνη. Υπάρχουν μεγάλες ατομικές διακυμάνσεις της δραστηριότητας της πρωτεΐνης HNMT σε ανθρώπινους ιστούς. Ένας κοινός γενετικός πολυμορφισμός επηρεάζει τα επίπεδα δραστηριότητας αυτού του γονιδίου στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Για αυτό το γονίδιο έχουν βρεθεί πολλαπλές παραλλαγές μετάγραφου εναλλακτικής συναρμογής που κωδικοποιούν διαφορετικές πρωτεΐνες. [17] [18], [19]

Πίνακας 8: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου HNMT με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.

Γονίδιο:	HNMT
Πρωτεΐνη:	Histamine N-methyltransferase
Συνώνυμα:	HMT, MRT51, HNMT-S1, HNMT-S2,
Οργανισμός	Ποσοστό ομοιότητας
Macaca mulatta	93%
Rhesus Macaque	86%
Nomascus leucogenys	86%
Pongo abelii	85%
Pan troglodytes	84%

- **Γονίδιο: IL13**

Το γονίδιο IL13 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που ονομάζεται ιντερλευκίνη 13 (IL-13). Η IL-13 είναι κυτοκίνη που εκκρίνεται από πολλούς τύπους κυττάρων, αλλά ειδικά από τα βοηθητικά

κύτταρα τύπου T2 (Th2)[20], και παρέχει μηνύματα που ρυθμίζουν ανοσολογικά θέματα της κυτταρικής αύξησης και λειτουργίες κατά τη διάρκεια τόσο της φλεγμονής όσο και ειδικών ανοσολογικών αντιδράσεων. Στην εργασία τους οι Howard et al. (2001)[21] αναφέρουν ότι η παραλλαγή -1112C-T, στον υποκινητή του γονιδίου IL13, η οποία αναφέρεται και ως -1111C-T, συμβάλλει σημαντικά στη βρογχική υπεραντιδραστικότητα και την ευαισθησία στο άσθμα[22][23].

Πίνακας 9: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου IL13 με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.

Γονίδιο:	IL13
Πρωτεΐνη:	Interleukin-13
Συνώνυμα:	NC30, P600, IL-13
Οργανισμός	Ποσοστό ομοιότητας
Pan troglodytes	99%
Macaca nemestrina	97%
Cercocebus atys	97%
Papio Anubis	97%
Macaca thibetana	97%
Macaca mulatta	97%
Pongo abelii	96%
Macaca fascicularis	96%
Tursiops truncatus	91%
Delphinapterus leucas	91%
Camelus bactrianus	91%
Callithrix jacchus	90%
Saimiri sciureus	90%
Equus caballus	89%
Bos Taurus	89%
Aotus infulatus	88%
Canis lupus	86%
Canis familiaris	80%

- **Γονίδιο: PLA2G7**

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο ονομάζεται ακετυλυδρολάση και είναι ένα εκκρινόμενο ένζυμο που λειτουργεί ως καταλύτης στην αποικοδόμηση του παράγοντα

ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF-platelet-activatingfactor) σε βιολογικά αδρανή προϊόντα. Ελαττώματα σε αυτό το γονίδιο είναι μια αιτία ανεπάρκειας της ακετυλυδρολάσης. Δύο μετάγραφα που κωδικοποιούν την ίδια πρωτεΐνη βρέθηκαν για αυτό το γονίδιο[24].

Πίνακας 10: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου PLA2G7 με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.

Γονίδιο:	PLA2G7
Πρωτεΐνη:	Platelet-activating factor acetylhydrolase
Συνώνυμα:	PAFAH
Οργανισμός	Ποσοστό ομοιότητας
Pan troglodytes	99%
Papio anubis	94%
Rhesus Macaque	93%
Macaca fascicularis	93%
Ovis canadensis canadensis	75%

- **Γονίδιο: SCGB3A2**

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο SCGB3A2 είναι μία επιφανειοδραστικού χαρακτήρα εκκρινόμενη πρωτεΐνη του πνεύμονα. Ένας μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός στον υποκινητή αυτού του γονιδίου έχει ως αποτέλεσμα την ευαισθησία στο άσθμα.

Εκτός από τη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με τον θυρεοειδή αδένα, ο θυρεοειδικός παράγοντας μεταγραφής (thyroidtranscriptionfactor - TTF1) ελέγχει τη μεταγραφή των γονιδίων που εκφράζονται ειδικά στους πνεύμονες, όπως πρωτεΐνες επιφανειοδραστικού χαρακτήρα (SFTPA1) και της μητροσφαιρίνης (Uteroglobin – UGB). Τα ποντίκια που στερούνται TTF1 πεθαίνουν αμέσως μετά τη γέννησή τους από αναπνευστική ανεπάρκεια που προκαλείται από βαθιά υποπλαστικούς πνεύμονες, δηλαδή από πνεύμονες που δεν έχουν αναπτυχθεί πλήρως.[25][26].

Πίνακας 11: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου SCGB3A2 με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.

Γονίδιο:	SCGB3A2
Πρωτεΐνη:	Secretoglobin family 3A member 2(UTEROGLOBIN-RELATED PROTEIN 1)
Συνώνυμα:	PNSP1, UGRP1, LU103,pnSP-1
Οργανισμός	Ποσοστό ομοιότητας
Pan troglodytes	100%
Gorilla gorilla	99%
Papio papio	99%
Pongo abelii	99%
Pan paniscus	99%
Bos Taurus	90%
Ovis Canadensis	75%

- ***Γονίδιο: TNF***

Το γονίδιο TNF κωδικοποιεί μια πολυλειτουργική κυτοκίνη που ονομάζεται παράγοντας νέκρωσης όγκων (Tumor necrosis factor - TNF) και εκκρίνεται κυρίως από μονοκύτταρα/ μακροφάγα πριν από την δημιουργία φλεγμονής. Η TNF κυτοκίνη επηρεάζει τον μεταβολισμό των λιπιδίων, την πήξη του αίματος, την αντίσταση στην ινσουλίνη, και την ενδοθηλιακή λειτουργία. Η TNF εντοπίστηκε αρχικά σε ορό ποντικού μετά από ένεση μεστέλεχος του μυκοβακτηρίου *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) και ενδοτοξίνη. Ορός από τα ζώα αυτά ήταν

κυτταροτοξικός ή κυτταροστατικός σε έναν αριθμό μετασηματισμένων κυτταρικών γραμμών ποντικών και ανθρώπων και προκάλεσε αιμορραγική νέκρωση και σε μερικές περιπτώσεις πλήρη υποχώρηση ορισμένων μεταμοσχευμένων όγκων σε ποντικούς. [27][28]

Πίνακας 12: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου TNF με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.

Γονίδιο:	TNF
Πρωτεΐνη:	Tumor necrosis factor
Συνώνυμα:	TNFA, TNFSF2, DIF, TNLG1F, TNF-alpha
Οργανισμός	Ποσοστό ομοιότητας
Pan troglodytes	99%
Gorilla	99%
Pongo abelii	98%
Callithrix jacchus	96%
Papio sp.	96%
Papio ursinus	94%
Macaca mulatta	93%
Chlorocebus sabaues	93%
Macaca sp.	93%
Saimiri sciureus sciureus	90%
Saguinus oedipus	90%
Canis familiaris	82%
Neophocaena asiaeorientalis	81%
Sus scrofa	78%
Pig	78%
Bubalus carabanensis	78%
Bubalus bubalis	78%

- *Γονίδιο:CCL11*

Αυτό το αντιμικροβιακό γονίδιο είναι ένα από τα πολλά γονίδια χημειοκινών που είναι συγκεντρωμένα στον Q-βραχίονα του χρωμοσώματος 17 και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ηωταξίνη-1(eotaxin-1).[30] Οι χημειοκίνες σχηματίζουν μία υπεροικογένεια εκκρινόμενων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στις ανοσορυθμιστικές και φλεγμονώδεις διεργασίες. Η υπεροικογένεια διαιρείται σε τέσσερις υποοικογένειες με βάση τη διάταξη των N-τερματικών καταλοίπων κυστεΐνης του ώριμου πεπτιδίου. Η εν λόγω πρωτεΐνη ως μέλος της CC υποοικογένειας, εμφανίζει χημειοτακτική δραστηριότητα για τα ηωσινόφιλα, αλλά όχι για τα μονοκύτταρα ή ουδετερόφιλα και πιστεύεται ότι εμπλέκεται σε ηωσινοφιλικές φλεγμονώδεις νόσους, όπως ατοπική δερματίτιδα, αλλεργική ρινίτιδα, άσθμα και παρασιτικές λοιμώξεις. [31][32]

Πίνακας 13: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου CCL11 με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.

Γονίδιο:	CCL11
Πρωτεΐνη:	Eotaxin(C-C motif chemokine 11)
Συνώνυμα:	SCYA11
Οργανισμός	Ποσοστόμοιότητας
Macaca mulatta	99%
Tupaia belangeri	97%
Oryctolagus cuniculus algirus	88%
Oryctolagus cuniculuscuniculus	84%
Lepus granatensis	79%
Bunolagus monticularis	77%

- **Γονίδιο: MUC7**

Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί μια μικρή βλεννίνη που εκκρίνεται από τους σιελογόνους αδένες, η οποία θεωρείται ότι παίζει ρόλο στη διευκόλυνση της κάθαρσης των βακτηρίων στην στοματική κοιλότητα και βοηθά στην μάσηση, την ομιλία και την κατάποση.[33] Η κεντρική περιοχή αυτής της γλυκοπρωτεΐνης περιέχει διαδοχικές επαναλήψεις, καθεμία από τις οποίες αποτελείται από 23 αμινοξέα. Αυτή η αντιμικροβιακή πρωτεΐνη έχει

αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση. Το πιο κοινό αλληλόμορφο περιέχει 6 επαναλήψεις, και ορισμένα αλληλόμορφα σχετίζονται με την ευαισθησία στο άσθμα. Παραλλαγές εναλλακτικού μετάγραφου που κωδικοποιεί την ίδια πρωτεΐνη έχουν βρεθεί για αυτό το γονίδιο.[34]

Πίνακας 14: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου MUC7 με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.

Γονίδιο:	MUC7
Πρωτεΐνη:	Mucin-7 (MUC-7) (Apo-MG2) (Salivary mucin-7)
Συνώνυμα:	MG2
Οργανισμός	Ποσοστό ομοιότητας
Pongo abelii	96%
Pan Troglodytes	89%
Pongo pygmaeus	89%
Macaca mulatta	88%
Rhesus macaque	88%

- **Γονίδιο: ADRB2**

Το γονίδιο ADRB2 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που ονομάζεται υποδοχέας βητα-2-αδρενεργικών η οποία είναι μέλος της G υπεροικογένειας υποδοχέων – πρωτεϊνών. Αυτό το γονίδιο είναι εσώνιο. Οι διαφορετικοί πολυμορφισμοί, οι σημειακές μεταλλάξεις, και / ή προς τα κάτω ρύθμιση του γονιδίου αυτού σχετίζονται με την εμφάνιση νυχτερινού άσθματος, παχυσαρκίας και διαβήτη τύπου 2. [35]

Πίνακας 15: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου ADRB2 με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.

Γονίδιο:	ADRB2
-----------------	--------------

Πρωτεΐνη:	Beta-2 adrenergic receptor (Beta-2 adrenoreceptor) (Beta-2 adrenoceptor)
Συνώνυμα:	ADRB2R, ADRBR, B2AR, BAR, BETA2AR
Οργανισμός	Ποσοστό ομοιότητας
Pan troglodytes	99%
Gorilla gorilla	99%
Macaca fascicularis	98%
Macaca mulatta	97%
Canis lupus	87%
Bos Taurus	86%

- **Γονίδιο: ADAM33**

Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί ένα μέλος της οικογένειας ADAM(adisintegrin and metalloprotease domain). Εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, με εξαίρεση το ήπαρ, με υψηλή έκφραση στον πλακούντα, τον πνεύμονα, τον σπλήνα και τις φλέβες. Μέλη αυτής της οικογένειας είναι πρωτεΐνες που βρίσκονται στην μεμβράνη και έχουν εμπλακεί σε μία ποικιλία βιολογικών διεργασιών που περιλαμβάνουν αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου και κυττάρου-μήτρας, συμπεριλαμβανομένης της γονιμοποίησης, της μυϊκής ανάπτυξης, και της νευρογένεσης. Αυτή η πρωτεΐνη είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I που εμπλέκεται στο άσθμα και την βρογχική υπεραντιδραστικότητα. Η διαδικασία της εναλλακτικής συναρμογής οδηγεί στη δημιουργία διαφορετικών μετάγραφων τα οποία κωδικοποιούν διαφορετικές ισομορφές πρωτεϊνών. [59]

Πίνακας 16: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου ADAM33 με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.

Γονίδιο:	ADAM33
Συνώνυμα:	C20orf153, DJ964F7.1
Πρωτεΐνη:	Disintegrin and metalloproteinase

	domain-containing protein 33
Οργανισμός	Ποσοστό ομοιότητας
Rhesus Macaque	92%
Saimiri boliviensis	84%
Mus musculus	76%

- **Γονίδιο: CXCL8**

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο(ιντερλευκίνη-8 (IL8)) είναι ένα μέλος της οικογένειας χημειοκίνης CXC. Αυτή η χημειοκίνη είναι ένας από τους σημαντικότερους μεσολαβητές της φλεγμονώδους απόκρισης δηλαδή μεσολαβεί στην ενεργοποίηση και την μετανάστευση των ουδετερόφιλων στον ιστό από το περιφερικό αίμα. Αυτή η χημειοκίνη εκκρίνεται από διάφορους τύπους κυττάρων. Λειτουργεί ως χημειοελκτικό, και είναι επίσης ένας ισχυρός αγγειογόνος παράγοντας. Αυτό το γονίδιο πιστεύεται ότι παίζει ρόλο στην παθογένεση της βρογχολίτιδας, μια κοινή ασθένεια της αναπνευστικής οδού που προκαλείται από ιογενή λοίμωξη. Αυτό το γονίδιο και άλλα δέκα μέλη της γονιδιακής οικογένειας των χημειοκινών CXC σχηματίζουν μια συστάδα γονιδίων χημειοκίνης σε μια περιοχή του χρωμοσώματος 4q. [60]

Πίνακας 17: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου CXCL8 με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.

Γονίδιο:	CXCL8
Συνώνυμα:	IL8
Πρωτεΐνη:	Interleukin-8
Οργανισμός	Ποσοστό ομοιότητας
Rhesus Macaque	95%
Macaca nemestrina	95%
Macaca mulatta	95%
Cercocebus torquatus	95%
Papio anubis	95%
Chlorocebus sabaues	95%

Elephas maximus	87%
Bubalus bubalis	86%
Marmota monax	86%
Ovis aries	85%
Ovis canadensis	84%
Bos indicus	83%
Bos taurus	76%

- **Γονίδιο: IL6**

Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί μια ανοσορυθμιστική κυτοκίνη που λειτουργεί σε κατάσταση φλεγμονής και στην ωρίμανση των Β κυττάρων. Επιπλέον, η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί αυτό το γονίδιο (ιντερλευκίνη 6) έχει δειχθεί ότι είναι ένας ενδογενής πυρετογόνος παράγοντας ικανός να προκαλέσει πυρετό σε άτομα με αυτοάνοσα νοσήματα ή μολύνσεις. Επενεργεί σε Β-κύτταρα, Τ-κύτταρα, ηπατοκύτταρα, αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα και τα κύτταρα του ΚΝΣ. Η πρωτεΐνη αυτή παράγεται κυρίως σε θέσεις οξείας και χρόνιας φλεγμονής, όπου εκκρίνεται εντός του ορού και προκαλεί μια μεταγραφική φλεγμονώδη απόκριση μέσω του υποδοχέα άλφα της ιντερλευκίνης-6. Η λειτουργία αυτού του γονιδίου εμπλέκεται σε μια ευρεία ποικιλία καταστάσεων ασθένειας που σχετίζεται με φλεγμονή, συμπεριλαμβανομένης της ευαισθησίας στην εμφάνιση του σακχαρώδους διαβήτη και της συστημικής νεανικής ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Η διαδικασία της εναλλακτικής συναρμογής οδηγεί στη δημιουργία διαφορετικών μετάγραφων τα οποία κωδικοποιούν διαφορετικές ισομορφές πρωτεϊνών. [61]

Πίνακας 18: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου IL6 με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.

Γονίδιο:	IL6
Συνώνυμα:	CDF, HGF, HSF, BSF2, IL-6, BSF-2, IFNB2, IFN-beta-2
Πρωτεΐνη:	Interleukin-6
Οργανισμός	Ποσοστό ομοιότητας
Pan troglodytes	99%

Pan paniscus	99%
Gorilla gorilla	98%
Rhesus Macaque	95%
Macaca fascicularis	95%
Aotus infulatus	92%
Saimiri sciureus	92%

➤ **Καρκίνος του Πνεύμονα(LungCancer)**

• **Γονίδιο: PIK3CA**

Η φωσφατιδυλνινοσιτόλη-4,5-διφωσφορική 3-κινάση (που ονομάζεται επίσης 3-κινάση φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (P3K)) αποτελείται από την ρυθμιστική υπομονάδα 85 kDa και την καταλυτική υπομονάδα 110 kDa. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο αντιπροσωπεύει την καταλυτική υπομονάδα, η οποία χρησιμοποιεί ATP για τη φωσφορυλίωση των φωσφατιδυλοϊνοσιτόλων (PtdIns), PtdIns4P και PtdIns (4,5) P2 [36]. Η εμπλοκή του p110α στον καρκίνο στον άνθρωπο έχει υποτεθεί από το 1995. Η υποστήριξη αυτής της υπόθεσης προήλθε από γενετικές και λειτουργικές μελέτες, συμπεριλαμβανομένης της ανακάλυψης κοινών ενεργοποιητικών μεταλλάξεων στο γονίδιο PIK3CA σε κοινές μορφές όγκου [37]. Έχει βρεθεί ότι το p110α είναι ογκογόνο και εμπλέκεται σε καρκίνους του τραχήλου της μήτρας [38]. Οι μεταλλάξεις του PIK3CA είναι παρούσες σε πάνω από το ένα τρίτο των καρκίνων του μαστού[39]. Ενώ σημαντικά προκλινικά δεδομένα δείχνουν μια συσχέτιση με ισχυρή ενεργοποίηση του μονοπατιού και αντίσταση σε κοινές θεραπείες, τα κλινικά δεδομένα δεν δείχνουν ότι τέτοιες μεταλλάξεις σχετίζονται με υψηλά επίπεδα ενεργοποίησης του μονοπατιού ή με κακή πρόγνωση. Δεν είναι γνωστό εάν η μετάλλαξη προβλέπει αυξημένη ευαισθησία σε παράγοντες που στοχεύουν το P3K μονοπάτι. [37] Το PIK3CA συμμετέχει σε μια σύνθετη αλληλεπίδραση εντός του μικροπεριβάλλοντος του όγκου σε αυτό το φαινόμενο.

Πίνακας 19: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου PIK3CA με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.

Γονίδιο:	PIK3CA
-----------------	---------------

Πρωτεΐνη:	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform
Συνώνυμα:	CLOVE, CWS5, MCAP, MCM, MCMTC, PI3K, PI3K-alpha, p110-alpha
Οργανισμός	Ποσοστό ομοιότητας
Pongo abelii	97%
Pan troglodytes	97%
Macaca fascicularis	94%
Macaca mulatta	94%
Ovis canadensis	85%

- **Γονίδιο:ERBB2**

Το CancerGenomeProjectandCollaborativeGroup (2004)(Έργο γονιδιώματος του Καρκίνου και συνεργατική ομάδα) αλληλούχισε το γονίδιο ERBB2 από 120 πρωτογενείς πνευμονικούς όγκους και εντόπισε ότι 4% αυτών είχαν μεταλλάξεις εντός της περιοχής κινάσης. Στο αδενοκαρκίνωμα, έναν υπότυπο του καρκίνου του πνεύμονα, το 10% των περιπτώσεων είχε μεταλλάξεις. Διαγραφές εντός της περιοχής κινάσης του EGFR (π.χ., 131550.0001) σχετίζονται με όγκους πνεύμονα που ανταποκρίνονται στη θεραπεία με gefitinib, έναν αναστολέα του EGFR. Το ίδιο έργο πρότεινε ότι οι αναστολείς του ERBB2, οι οποίοι τη δεδομένη στιγμή αποδείχθηκαν αναποτελεσματικοί στην αντιμετώπιση του καρκίνου του πνεύμονα, θα πρέπει να επανεξεταστούν κλινικά στο συγκεκριμένο υποσύνολο ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα των οποίων οι όγκοι φέρουν μεταλλάξεις στο ERBB2. [40]

Πίνακας 20: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου ERBB2 με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.

Γονίδιο:	ERBB2
Πρωτεΐνη:	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2
Συνώνυμα:	HER2, MLN19, NEU, NGL
Οργανισμός	Ποσοστό ομοιότητας
Felis catus	92%
Canis lupus familiaris	91%
Bos Taurus	90%
Ursus americanus	90%
Tyupaia chinensis	90%

Sus scrofa	90%
-------------------	------------

- **Γονίδιο:IRF1**

Ο ρυθμιστικός παράγοντας ιντερφερόνης 1, δηλαδή η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο IRF1, ήταν το πρώτο μέλος της οικογένειας των ρυθμιστικών παραγόντων μεταγραφής ιντερφερόνης (IRF) που έχουν ταυτοποιηθεί. Αρχικά περιεγράφηκε ως παράγοντας μεταγραφής ο οποίος είναι σε θέση να ενεργοποιήσει την έκφραση της ιντερφερόνης βήτα. Ο IRF-1 στη συνέχεια αποδείχθηκε ότι λειτουργεί ως ένας μεταγραφικός ενεργοποιητής ή καταστολέας μιας ποικιλίας γονιδίων-στόχων. Ο IRF-1 ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων-στόχων με την πρόσδεσή του στους υποκινητές στοιχείων ISRE (interferonstimulatedresponseelement). Πέρα από τη λειτουργία του ως παράγοντας μεταγραφής, ο IRF-1 έχει επίσης αποδειχθεί ότι ενεργοποιεί την p53, μια ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη μέσω της δέσμευσής του στο συν-παράγοντα της p53, p300 [42]. Ο IRF-1 έχει δειχθεί ότι παίζει ρόλο στην ανοσολογική απόκριση, ρυθμίζοντας την απόπτωση, την βλάβη του DNA και την καταστολή όγκων. [43]

Πίνακας 21: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου IRF1 με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.

Γονίδιο:	IRF1
Πρωτεΐνη:	Interferon regulatory factor 1
Συνώνυμα:	IRF-1, MAR
Οργανισμός	Ποσοστό ομοιότητας
Pan troglodytes	98%
Pongo abelii	97%
Macaca fascicularis	96%
Macaca mulatta	96%
Rhesus Macaque	94%
Sus scrofa	84%
Canis Familiaris	78%
Bos taurus	76%
Bubalus bubalis	76%

- **Γονίδιο:EGFR**

Το γονίδιο EGFR και οι συνδέτες (ligands) αυτού είναι σηματοδοτικά μόρια που εμπλέκονται σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης, της σηματοδότησης, της επιβίωσης, και της ανάπτυξης των ιστών[44]. Μεταλλάξεις που οδηγούν σε υπερέκφραση του EGFR ή σε υπερδραστηριότητα έχουν συσχετιστεί με έναν αριθμό καρκίνων, συμπεριλαμβανομένου του καρκινώματος των πλακωδών κυττάρων του πνεύμονα (80% των περιπτώσεων), του πρωκτικού καρκίνου, του γλοιοβλαστώματος (50%) και επιθηλιακούς όγκους της κεφαλής και του λαιμού (80-100%). Οι σωματικές μεταλλάξεις που περιλαμβάνουν το γονίδιο EGFR οδηγούν στη μόνιμη ενεργοποίησή του, η οποία παράγει την ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση[45]. Στο γλοιοβλάστωμα παρατηρείται συχνά μια περισσότερο ή λιγότερο συγκεκριμένη μετάλλαξη του EGFR, που ονομάζεται EGFRvIII. Οι μεταλλάξεις, οι επεκτάσεις και οι δυσλειτουργίες του EGFR ή των μελών της οικογένειας στην οποία ανήκει αυτό, εμπλέκονται σε περίπου 30% του συνόλου των επιθηλιακών καρκίνων[46].

Πίνακας 22: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου EGFR με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.

Γονίδιο:	EGFR
Πρωτεΐνη:	Epidermal growth factor receptor
Συνώνυμα:	ERBB, ERBB1, HER1, NISBD2, PIG61, mENA
Οργανισμός	Ποσοστό ομοιότητας
Pan troglodytes	98%
Macaca fascicularis	93%

- **Γονίδιο:SLC22A18**

Αυτό το γονίδιο είναι ένα από τα πολλά θραύσματα με ογκοκατασταλτική ιδιότητα που εντοπίζονται στην γονιδιακή περιοχή 11p15.5, μια σημαντική περιοχή γονιδίου καταστολής όγκων. Οι μεταβολές στην περιοχή αυτή έχουν συσχετιστεί με το σύνδρομο Beckwith-

Wiedemann, τον όγκο Wilms, το ραβδομυοσάρκωμα, το καρκίνωμα των επινεφριδίων και τον καρκίνο των πνευμόνων, των ωθηκών και του μαστού. Μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο έχουν βρεθεί στον όγκο Wilms και τον καρκίνο του πνεύμονα. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το εν λόγω γονίδιο μπορεί να δρα ως μεταφορέας οργανικών κατιόντων και να έχει ένα ρόλο στη μεταφορά χλωροκινών και σχετιζόμενων με κινιδίνη ενώσεων στους νεφρούς. Έχουν περιγραφεί αρκετά εναλλακτικά μετάγραφα που κωδικοποιούν διαφορετικά ισόμορφα.[49][50]

Πίνακας 23: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου SLC22A18 με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.

Γονίδιο:	SLC22A18
Πρωτεΐνη:	Solute carrier family 22 member 18
Συνώνυμα:	BWR1A, BWSCR1A, HET, IMPT1, ITM, ORCTL2, SLC22A1L, TSSC5
Οργανισμός	Ποσοστό ομοιότητας
Pongo abelii	95%
Pongo pygmaeus	94%
Pan troglodytes	94%

- ***Γονίδιο:KRAS***

Αυτό το γονίδιο, ή αλλιώς το Kirsten ras ογκογονίδιο που ανήκει στην οικογένεια των γονιδίων ras των θηλαστικών, κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που είναι μέλος της μικρής οικογένειας GTPάσης. Μια απλή αντικατάσταση αμινοξέος είναι υπεύθυνη για μια μετάλλαξη ενεργοποίησης. Η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη που προκύπτει εμπλέκεται σε διάφορες κακοήθειες, συμπεριλαμβανομένου του αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα, του αδενώματος του βλεννογόνου και των καρκινωμάτων του παγκρέατος και του παχέος εντέρου.[53]

Πίνακας 24: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου KRAS με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.

Γονίδιο:	KRAS
Πρωτεΐνη:	GTPase KRas
Συνώνυμα:	KRAS2, RASK2
Οργανισμός	Ποσοστό ομοιότητας
Macaca mulatta	98%
Pongo pygmaeus	96%
Macaca fascicularis	91%

- ***Γονίδιο: BRAF***

Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που ονομάζεται B-Raf και ανήκει στην οικογένεια raf/ mlf των πρωτεϊνικών κινασών σερίνης/θρεονίνης. Αυτή η πρωτεΐνη παίζει ένα ρόλο στη ρύθμιση του MAP/ ERK σηματοδοτικού μονοπατιού, το οποίο επηρεάζει την κυτταρική διαίρεση, τη διαφοροποίηση, και την έκκριση. Μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό σχετίζονται με το σύνδρομο Cardio-Facio-Cutaneous (CFC), μια ασθένεια που χαρακτηρίζεται από ανωμαλίες της καρδιάς, διανοητική καθυστέρηση και χαρακτηριστικές δυσπλασίες προσώπου. Μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό έχουν επίσης συσχετιστεί με διάφορες μορφές καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων του λεμφώματος non-Hodgkin, του καρκίνου του παχέος εντέρου, του κακοήθους μελανώματος, του καρκινώματος του θυρεοειδούς, του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα και του αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα [56]. Σήμερα, έχουν αναπτυχθεί διάφορα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του καρκίνου που καθοδηγείται από μεταλλάξεις του BRAF. Δύο από αυτά τα φάρμακα, είναι το vemurafenib και το dabrafenib που έχουν εγκριθεί από το FDA για τη θεραπεία του προχωρημένου σταδίου του μελανώματος.

Διάφορες ερευνητικές μελέτες έχουν ταυτοποιήσει περισσότερες από 30 μεταλλάξεις του γονιδίου BRAF που σχετίζονται με ανθρώπινους καρκίνους. Η συχνότητα των μεταλλάξεων BRAF ποικίλλει ευρέως σε ανθρώπινους καρκίνους. Περισσότερο από 80% σε μελανώματα, 0-18% σε άλλους όγκους, 1-3% σε καρκίνους του πνεύμονα και 5% σε καρκίνο του παχέος

εντέρου. Στο 90% των περιπτώσεων, η θυμίνη(T) έχει αντικατασταθεί με αδενίνη(A) στο νουκλεοτίδιο 1799. Αυτό οδηγεί στην αντικατάσταση του αμινοξέος βαλίνη (V) από το γλουταμικό στο 600ο κωδικόνιο, για αυτό η μετάλλαξη είναι γνωστή ως V600E. Αυτή η μετάλλαξη έχει ευρέως παρατηρηθεί σε θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς, του παχέος εντέρου, του μελανώματος και τον καρκίνο των μη μικρών κυττάρων του πνεύμονα[57].

Άλλες μεταλλάξεις που έχουν ταυτοποιηθεί είναι οι R461I, I462S, G463E, G463V, G465A, G465E, G465V, G468A, G468E, N580S, E585K, D593V, F594L, G595R, L596V, T598I, V599D, V599E, V599K, V599R, V600K, A727V, κ.λπ. και οι περισσότερες από αυτές τις μεταλλάξεις είναι συγκεντρωμένες σε δύο περιοχές: στον πλούσιο σε γλυκίνη βρόχο P του λοβού N και στο τμήμα ενεργοποίησης μαζί με τις πλευρικές περιοχές. Αυτές οι μεταλλάξεις αλλάζουν το τμήμα ενεργοποίησης από αδρανή κατάσταση σε ενεργή κατάσταση[58].

Πίνακας 25: Σύγκριση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου BRAF με τη νουκλεοτιδική ακολουθία άλλων οργανισμών.

Γονίδιο:	BRAF
Πρωτεΐνη:	Serine/threonine-protein kinase B-raf
Συνώνυμα:	BRAF1, RAFB1, B-RAF1, B-raf1, NS7,
Οργανισμός	Ποσοστό ομοιότητας
Pan troglodytes	99%
Gorilla gorilla	96%
Macaca fascicularis	94%

Παρατηρείται ότι κάποιες ανθρώπινες νουκλεοτιδικές ακολουθίες είναι ίδιες ή παρόμοιες σε εξαιρετικά μεγάλο ποσοστό με αυτές άλλων οργανισμών όπως αυτών που φαίνονται αναλυτικά στον παρακάτω Πίνακα 26.

Πίνακας 26: Ονομασίες Οργανισμών των οποίων οι νουκλεοτιδικές ακολουθίες παρουσίασαν ομοιότητες με τις αντίστοιχες ανθρώπινες νουκλεοτιδικές ακολουθίες.

Ονομασία	Είδος
Mus musculus	ποντίκι

Rattus norvegicus	αρουραίος
Heterocephalus glaber	αρουραίος naked mole
Bos taurus	ταύρος
Sus scrofa	αγριόχοιρος
Pan troglodytes	χιμπαντζής
Gorilla gorilla	γορίλας
Macaca mulatta	πίθηκος μακάκα
Nomascus leucogenys	πίθηκος
Hylobates	πίθηκος
Pongo abelii	ουρακοτάγκος
Pongo pygmaeus	ουρακοτάγκος
Cercopithecus aethiops	μαϊμού του Παλαιού κόσμου
Camelus ferus	καμήλα
Pantholops hodgsonii	θιβετιανή αντιλόπη
Oryctolagus cuniculus	αγριοκούνελο
Papio Anubis	Μπαμπούνος
Colobus guereza	μαϊμού του Παλαιού κόσμου
Macaca fascicularis	πίθηκος μακάκα
Chlorocebus aethiops	μαϊμού
Ateles geoffroyi	μαϊμού
Saimiri boliviensis	μαϊμού
Aotus nancymae	μαϊμού
Plecturocebus moloch	μαϊμού του Νέου Κόσμου
Callithrix jacchus	μαϊμού του Νέου Κόσμου
Simian	μαϊμού
Rhesus Macaque	πίθηκος μακάκα
Macaca nemestrina	πίθηκος μακάκα
Macaca thibetana	πίθηκος μακάκα
Macaca sp.	πίθηκος μακάκα

Cercocebus atys	μαϊμού του Παλαιού κόσμου
Tursiops truncatus	δελφίνι
Delphinapterus leucas	λευκή φάλαινα
Camelus bactrianus	Βακτριανή καμήλα
Saimiri sciureus	μαϊμού του Νέου Κόσμου
Equus caballus	άλογο
Aotus infulatus	μαϊμού
Canis lupus	γκρίζος λύκος
Canis familiaris	σκύλος
Ovis canadensis	κερασφόρο πρόβατο
Pan Paniscus	χιμπαντζής
Papio sp	μπαμπούνος
Saguinus Oedipus	μαϊμού του Νέου Κόσμου
Neophocaena asiaeorientalis	Γουρουνόψαρο – δελφίνι
Pig	χοίρος
Papio ursinus	μπαμπούνος
Bubalus Bubalis carabanensis	υδροβούβαλο
Oryctolagus cuniculus algirus	αγριοκούνελο
Oryctolagus cuniculus	κουνέλι
Ursus americanus	μαύρη αρκούδα
Tupaia chinensis	θηλαστικό σαν τον σκίουρο
Lepus granatensis	λαγός
Bunolagus monticularis	κουνέλι
Bubalus bubalis	βούβαλος
Chlorocebus sabaues	μαϊμού του Παλαιού Κόσμου

Βιβλιογραφία-Κεφάλαιο 3

1. Cox, D. W. Alpha-1-antitrypsin. In: Scriver, C. R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D. (eds.): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Vol. IV. (8th ed.) New York: McGraw-Hill 2001. Pp. 5559-5584.
2. Celedon, J. C., Lange, C., Raby, B. A., Litonjua, A. A., Palmer, L. J., DeMeo, D. L., Reilly, J. J., Kwiatkowski, D. J., Chapman, H. A., Laird, N., Sylvia, J. S., Hernandez, M., Speizer, F. E., Weiss, S. T., Silverman, E. K. The transforming growth factor-beta-1 (TGFB1) gene is associated with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Hum. Molec. Genet.* 13: 1649-1656, 2004
3. Crystal, R. G. Alpha-1-antitrypsin deficiency, emphysema, and liver disease: genetic basis and strategies for therapy. *J. Clin. Invest.* 85: 1343-1352, 1990.
4. Chappell, S., Daly, L., Morgan, K., Baranes, T. G., Roca, J., Rabinovich, R., Millar, A., Donnelly, S. C., Keatings, V., MacNee, W., Stolk, J., Hiemstra, P., Miniati, M., Monti, S., O'Connor, C. M., Kalsheker, N. Cryptic haplotypes of SERPINA1 confer susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. *Hum. Mutat.* 27: 103-109, 2006.
5. Guenegou, A., Leynaert, B., Benessiano, J., Pin, I., Demoly, P., Neukirch, F., Boczkowski, J., Aubier, M. Association of lung function decline with the heme oxygenase-1 gene promoter microsatellite polymorphism in a general population sample. Results from the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS), France. *J. Med. Genet.* 43: e43, 2006. Note: Electronic Article.
6. Yachie, A., Niida, Y., Wada, T., Igarashi, N., Kaneda, H., Toma, T., Ohta, K., Kasahara, Y., Koizumi, S. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J. Clin. Invest.* 103: 129-135, 1999.
7. Yamada, N., Yamaya, M., Okinaga, S., Nakayama, K., Sekizawa, K., Shibahara, S., Sasaki, H. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am. J. Hum. Genet.* 66: 187-195, 2000. Note: Erratum: *Am. J. Hum. Genet.* 68: 1542 only, 2001.
8. Nagase, H., Barrett, A. J., Woessner, J. F., Jr. Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases. *Matrix Suppl.* 1: 421-424, 1992.
9. Rutter, J. L., Mitchell, T. I., Buttice, G., Meyers, J., Gusella, J. F., Ozelius, L. J., Brinckerhoff, C. E. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. *Cancer Res.* 58: 5321-5325, 1998
10. Davies, R; Conroy, S-J; Davies, WL; Potter, IC; Rrezise, Ann EO (19–23 June 2005). "Evolution and Regulation of the Cystic Fibrosis Gene" (conference paper). *Molecular Biology and Evolution*

- (MBE05) Conference. Retrieved 28 July 2014.
11. Kavic SM, Frehm EJ, Segal AS (1999). "Case studies in cholera: lessons in medical history and science". *Yale J Biol Med.* 72 (6): 393–408.
 12. Araújo FG, Novaes FC, Santos NP, Martins VC, Souza SM, Santos SE, Ribeiro-dos-Santos AK (January 2005). "Prevalence of deltaF508, G551D, G542X, and R553X mutations among cystic fibrosis patients in the North of Brazil". *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38 (1): 11–5.
 13. Wang, Y., Wrennall, J. A., Cai, Z., Li, H., Sheppard, D. N. Understanding how cystic fibrosis mutations disrupt CFTR function: from single molecules to animal models. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 52: 47-57, 2014
 14. Derynck, R., Akhurst, R. J., Balmain, A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature Genet.* 29: 117-129, 2001. Note: Erratum: *Nature Genet.* 29: 351 only, 2001.
 15. Faria PC, Saba K, Neves AF, Cordeiro ER, Marangoni K, Freitas DG, Goulart LR. Transforming growth factor-beta 1 gene polymorphisms and expression in the blood of prostate cancer patients. *Cancer Invest.* 2007 Dec;25(8):726-32
 16. Jakowlew SB. Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2006 Sep;25(3):435-57. Review.
 17. Price, R. A., Scott, M. C., Weinshilboum, R. M. Genetic segregation analysis of red blood cell (RBC) histamine N-methyltransferase (HNMT) activity. *Genet. Epidemiol.* 10: 123-131, 1993.
 18. Sharma, S., Mann, D., Singh, T. P., Ghosh, B. Lack of association of histamine-N-methyltransferase (HNMT) polymorphisms with asthma in the Indian population. *J. Hum. Genet.* 50: 611-617, 2005.
 19. Deindl, P., Peri-Jerkan, S., Deichmann, K., Niggemann, B., Lau, S., Sommerfeld, C., Sengler, C., Muller, S., Wahn, U., Nickel, R., Heinzmann, A., German Multicenter Atopy Study Group. No association of histamine-N-methyltransferase polymorphism with asthma or bronchial hyperresponsiveness in two German pediatric populations. *Pediat. Allergy Immun.* 16: 40-42, 2005
 20. Howard, T. D., Whittaker, P. A., Zaiman, A. L., Koppelman, G. H., Xu, J., Hanley, M. T., Meyers, D. A., Postma, D. S., Bleecker, E. R. Identification and association of polymorphisms in the interleukin-13 gene with asthma and atopy in a Dutch population. *Am. J. Resp. Cell Molec. Biol.* 25: 377-384, 2001.
 21. Minty A, Chalon P, Derocq JM, Dumont X, Guillemot JC, Kaghad M, Labit C, Leplatois P, Liauzun P, Miloux B (March 1993). "Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses". *Nature.* 362 (6417): 248–50.
 22. Zurawski G, de Vries JE (January 1994). "Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells". *Immunol. Today.* 15 (1): 19–26.
 23. Wynn TA (2003). "IL-13 effector functions". *Annu. Rev. Immunol.* 21: 425–56.

24. Kruse, S., Mao, X.-Q., Heinzmann, A., Blattmann, S., Roberts, M. H., Braun, S., Gao, P.-S., Forster, J., Kuehr, J., Hopkin, J. M., Shirakawa, T., Deichmann, K. A. The ile198tothr and ala379toval variants of plasmatic Paf-acetylhydrolase impair catalytical activities and are associated with atopy and asthma. *Am. J. Hum. Genet.* 66: 1522-1530, 2000
25. Kimura, S., Hara, Y., Pineau, T., Fernandez-Salguero, P., Fox, C. H., Ward, J. M., Gonzalez, F. J. The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes Dev.* 10: 60-69, 1996
26. Niimi T, Keck-Waggoner CL, Popescu NC, Zhou Y, Levitt RC, Kimura S (Oct 2001). "UGRP1, a uteroglobin/Clara cell secretory protein-related protein, is a novel lung-enriched downstream target gene for the T/EBP/NKX2.1 homeodomain transcription factor". *Mol Endocrinol.* 15 (11): 2021–36
27. Shirai, T., Yamaguchi, H., Ito, H., Todd, C. W., Wallace, R. B. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for human tumour necrosis factor. *Nature* 313: 803-806, 1985
28. Pennica, D., Nedwin, G. E., Hayflick, J. S., Seeburg, P. H., Derynck, R., Palladino, M. A., Kohr, W. J., Aggarwal, B. B., Goeddel, D. V. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312: 724-729, 1984
29. Muscat P, et al., *BMC Immunol*, PHF11 expression and cellular distribution is regulated by the Toll-Like Receptor 3 Ligand Polyinosinic:Polycytidylic Acid in HaCaT keratinocytes., 2015 Nov 14.
30. Kitaura M, Nakajima T, Imai T, Harada S, Combadiere C, Tiffany HL, Murphy PM, Yoshie O (Mar 1996). "Molecular cloning of human eotaxin, an eosinophil-selective CC chemokine, and identification of a specific eosinophil eotaxin receptor, CC chemokine receptor 3". *The Journal of Biological Chemistry.* 271 (13): 7725–30.
31. Hein H, Schlüter C, Kulke R, Christophers E, Schröder JM, Bartels J (Aug 1997). "Genomic organization, sequence, and transcriptional regulation of the human eotaxin gene". *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 237 (3): 537–42.
32. Ogilvie P, Bardi G, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Ugucioni M (Apr 2001). "Eotaxin is a natural antagonist for CCR2 and an agonist for CCR5". *Blood.* 97(7): 1920–4
33. Kirkbride, H. J., Bolscher, J. G., Nazmi, K., Vinall, L. E., Nash, M. W., Moss, F. M., Mitchell, D. M., Swallow, D. M. Genetic polymorphism of MUC7: allele frequencies and association with asthma. *Europ. J. Hum. Genet.* 9: 347-354, 2001
34. Rousseau, K., Vinall, L. E., Butterworth, S. L., Hardy, R. J., Holloway, J., Wadsworth, M. E. J., Swallow, D. M. MUC7 haplotype analysis: results from a longitudinal birth cohort support protective effect of the MUC7*5 allele on respiratory function. *Ann. Hum. Genet.* 70: 417-427, 2006
35. Rosenbaum, D. M., Zhang, C., Lyons, J. A., Holl, R., Aragao, D., Arlow, D. H., Rasmussen, S. G. F., Choi, H.-J., DeVree, B. T., Sunahara, R. K., Chae, P. S., Gellman, S. H., Dror, R. O., Shaw, D. E.,

- Weis, W. I., Caffrey, M., Gmeiner, P., Kobilka, B. K. Structure and function of an irreversible agonist-beta-2 adrenoceptor complex. *Nature* 469: 236-240, 2011
36. Ogino S, Lochhead P, Giovannucci E, Meyerhardt JA, Fuchs CS, Chan AT. "Discovery of colorectal cancer PIK3CA mutation as potential predictive biomarker: power and promise of molecular pathological epidemiology. *Oncogene* 2013; doi:10.1038/onc.2013.244
 37. Samuels, Yarden; Waldman, Todd (2010-01-01). Rommel, Christian; Vanhaesebroeck, Bart; Vogt, Peter K., eds. *Oncogenic Mutations of PIK3CA in Human Cancers. Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer Berlin Heidelberg. pp. 21–41. doi:10.1007/82_2010_68. ISBN 9783642148156. PMC 3164550 Freely accessible. PMID 20535651
 38. Ma YY, Wei SJ, Lin YC, Lung JC, Chang TC, Whang-Peng J, Liu JM, Yang DM, Yang WK, Shen CY (May 2000). "PIK3CA as an oncogene in cervical cancer". *Oncogene*. 19 (23): 2739–44 .
 39. Zardavas, Dimitrios; Phillips, Wayne A; Loi, Sherene (2014-01-23). "PIK3CA mutations in breast cancer: reconciling findings from preclinical and clinical data". *Breast Cancer Research*. 16 (1).
 40. Cancer Genome Project and Collaborative Group. Intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature* 431: 525-526, 2004
 41. Daigo, Y., Nishiwaki, T., Kawasoe, T., Tamari, M., Tsuchiya, E., Nakamura, Y. Molecular cloning of a candidate tumor suppressor gene, DLC1, from chromosome 3p21.3. *Cancer Res*. 59: 1966-1972, 1999.
 42. Escalante CR, Yie J, Thanos D, Aggarwal AK (January 1998). "Structure of IRF-1 with bound DNA reveals determinants of interferon regulation". *Nature*. 391 (6662): 103–6.
 43. Dornan D, Eckert M, Wallace M, Shimizu H, Ramsay E, Hupp TR, Ball KL (November 2004). "Interferon regulatory factor 1 binding to p300 stimulates DNA-dependent acetylation of p53". *Mol. Cell. Biol*. 24 (22): 10083–98
 44. Wang, K., Yamamoto, H., Chin, J. R., Werb, Z., Vu, T. H. Epidermal growth factor receptor-deficient mice have delayed primary endochondral ossification because of defective osteoclast recruitment. *J. Biol. Chem*. 279: 53848-53856, 2004.
 45. Kumar V, Abbas A, Aster J (2013). *Robbins basic pathology*. Philadelphia: Elsevier/Saunders. p. 179.
 46. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA (May 2004). "Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib". *The New England Journal of Medicine*. 350 (21): 2129–39
 47. Kane LP, Mollenauer MN, Xu Z, Turck CW, Weiss A (Aug 2002). "Akt-dependent phosphorylation specifically regulates Cot induction of NF-kappa B-dependent transcription". *Molecular and Cellular Biology*. 22 (16): 5962–74

48. Decicco-Skinner KL, Trovato EL, Simmons JK, Lepage PK, Wiest JS. "Loss of tumor progression locus 2 (tpl2) enhances tumorigenesis and inflammation in two-stage skin carcinogenesis". 2011 Jan 27;30(4):389-97
49. Lee, M. P., Reeves, C., Schmitt, A., Su, K., Connors, T. D., Hu, R.-J., Brandenburg, S., Lee, M. J., Miller, G., Feinberg, A. P. Somatic mutation of TSSC5, a novel imprinted gene from human chromosome 11p15.5. *Cancer Res.* 58: 4155-4159, 1998.
50. Vinayagam A1, Stelzl U, Foulle R, Plassmann S, Zenkner M, Timm J, Assmus HE, Andrade-Navarro MA, Wanker EE. A directed protein interaction network for investigating intracellular signal transduction. 2011 Sep 6;4(189):rs8.
51. Kranenburg, O. The KRAS oncogene: past, present, and future. *Biochim. Biophys. Acta* 1756: 81-82, 2005
52. Suda K, Tomizawa K, Mitsudomi T (Mar 2010). "Biological and clinical significance of KRAS mutations in lung cancer: an oncogenic driver that contrasts with EGFR mutation". *Cancer Metastasis Reviews.* 29 (1): 49–60
53. Riely GJ, Marks J, Pao W (Apr 2009). "KRAS mutations in non-small cell lung cancer". *Proceedings of the American Thoracic Society.* 6 (2): 201–5.
54. Brose, M. S., Volpe, P., Feldman, M., Kumar, M., Rishi, I., Gerrero, R., Einhorn, E., Herlyn, M., Minna, J., Nicholson, A., Roth, J. A., Albelda, S. M., Davies, H., Cox, C., Brignell, G., Stephens, P., Futreal, P. A., Wooster, R., Stratton, M. R., Weber, B. L. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res.* 62: 6997-7000, 2002.
55. Kumar, R., Angelini, S., Czene, K., Sauroja, I., Hahka-Kemppinen, M., Pyrhonen, S., Hemminki, K. BRAF mutations in metastatic melanoma: a possible association with clinical outcome. *Clin. Cancer. Res.* 9: 3362-3368, 2003.
56. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA (June 2002). "Mutations of the BRAF gene in human cancer". *Nature.* 417 (6892): 949–54
57. Cutler RE Jr; Stephens RM; Saracino MR; Morrison DK (August 1998). "Autoregulation of the Raf-1 serine/threonine kinase". *PNAS.* 95 (16): 9214–9219.
58. Bollag G, Tsai J, Zhang J, Zhang C, Ibrahim P, Nolop K, Hirth P (November 2012). "Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer". *Nature Reviews Drug Discovery.* 11 (11): 873–886

59. Yoshinaka T., Nishii K., Yamada K., Sawada H., Nishiwaki E., Smith K., Yoshino K., Ishiguro H., Higashiyama S., "Identification and characterization of novel mouse and human ADAM33s with potential metalloprotease activity." *Gene* 282:227-236(2002)
60. Hull, J., Ackerman, H., Isles, K., Usen, S., Pinder, M., Thomson, A., Kwiatkowski, D. Unusual haplotypic structure of IL8, a susceptibility locus for a common respiratory virus. *Am. J. Hum. Genet.* 69: 413-419, 2001.
61. Boulanger, M. J., Chow, D., Brevnova, E. E., Garcia, K. C. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science* 300: 2101-2104, 2003. Note: Erratum: *Science* 301: 918 only, 2003.
62. Horwitz, M., Benson, K. F., Person, R. E., Aprikyan, A. G., Dale, D. C. Mutations in ELA2, encoding neutrophil elastase, define a 21-day biological clock in cyclic haematopoiesis. *Nature Genet.* 23: 433-436, 1999
63. Chua, F., Laurent, G. J. Neutrophil elastase: mediator of extracellular matrix destruction and accumulation. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 3: 424-427, 2006.
64. "Human leukocyte elastase and cathepsin G are specific inhibitors of C5a-dependent neutrophil enzyme release and chemotaxis." *Tralau T., Meyer-Hoffert U., Schroder J.M., Wiedow O. Exp. Dermatol.* 13:316-325(2004)
65. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell.* 4th edition. New York: Garland Science; 2002.

Κεφάλαιο 4: Βιοδείκτες και μέθοδοι εύρεσής τους

4.1 Ορισμός βιοδεικτών

Ο όρος "βιοδείκτης", μία σύνθεση της φράσης «βιολογικός δείκτης», αναφέρεται σε μια ευρεία υποκατηγορία ιατρικών σημείων - δηλαδή, αντικειμενικές ενδείξεις της ιατρικής κατάστασης του ασθενή που όμως παρατηρείται εξωτερικά από αυτόν - η οποία μπορεί να μετρηθεί με ακρίβεια και με δυνατότητα επανάληψης. Τα εν λόγω ιατρικά σημάδια στέκονται σε αντίθεση με τα ιατρικά συμπτώματα, τα οποία περιορίζονται σε εκείνες τις ενδείξεις για την υγεία ή την ασθένεια όπως αυτή γίνεται αντιληπτή από τους ίδιους τους ασθενείς. Το 1998, το Εθνικό Ινστιτούτο Ομάδας Εργασίας Ορισμού των Βιοδεικτών Υγείας όρισε τον βιοδείκτη ως "ένα χαρακτηριστικό που

αντικειμενικά μετράται και αξιολογείται ως δείκτης των κανονικών βιολογικών διεργασιών, παθολόγων διεργασιών, ή φαρμακολογικών αποκρίσεων σε μια θεραπευτική παρέμβαση.”[1]

Μια κοινή επιχείρηση για την χημική ασφάλεια, το Διεθνές Πρόγραμμα για τη Χημική Ασφάλεια, υπό την ηγεσία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) και σε συντονισμό με τα Ηνωμένα Έθνη και τη Διεθνή Οργάνωση Εργασίας, όρισε τον βιοδείκτη ως “κάθε ουσία, δομή, ή διαδικασία που μπορεί να μετρηθεί στο σώμα ή τα προϊόντα της και η επιρροή της ή να προβλέψει την επίπτωση της έκβασης ή της ασθένειας” [2]. Ένας ακόμη ευρύτερος ορισμός συμπεριλαμβάνει όχι μόνο τη συχνότητα και την έκβαση της νόσου, αλλά και τα αποτελέσματα των θεραπειών, των παρεμβάσεων, ακόμη και την ανεπιθύμητη έκθεση στο περιβάλλον, όπως σε χημικές ουσίες ή θρεπτικά συστατικά. Στην έκθεσή του σχετικά με την εγκυρότητα των βιοδεικτών σε περιβάλλον αξιολόγησης του κινδύνου, ο ΠΟΥ έχει δηλώσει ότι ένας αληθινός ορισμός των βιοδεικτών περιλαμβάνει “σχεδόν κάθε μέτρηση που αντανακλά την αλληλεπίδραση ανάμεσα σε ένα βιολογικό σύστημα και ένα δυνητικό κίνδυνο, ο οποίος μπορεί να είναι χημικός, φυσικός ή βιολογικός. Η μετρούμενη απόκριση μπορεί να είναι λειτουργική και φυσιολογική, βιοχημική σε κυτταρικό επίπεδο ή σε μια μοριακή αλληλεπίδραση.” [3].

Παραδείγματα βιοδεικτών περιλαμβάνουν τα πάντα από τον παλμό και την αρτηριακή πίεση μέσω της βασικής χημείας έως πιο πολύπλοκες εργαστηριακές εξετάσεις αίματος και άλλων ιστών. Τα ιατρικά σημεία έχουν μια μακρά ιστορία χρήσης στην κλινική πρακτική- τόσο παλιά όσο και η ίδια η ιατρική πρακτική -και οι βιοδείκτες είναι απλώς τα πιο αντικειμενικά, υπολογίσιμα ιατρικά σημάδια που τα σύγχρονα επιστημονικά εργαστήρια μας επιτρέπουν να μετράμε επαναλαμβανόμενα. Η χρήση των βιοδεικτών, και ιδίως των εργαστηριακά μετρήσιμων βιοδεικτών, στην κλινική έρευνα είναι κάπως νεότερη, και οι καλύτερες προσεγγίσεις για την πρακτική αυτή εξακολουθούν να αναπτύσσονται. Το βασικό ζήτημα είναι να καθοριστεί η σχέση μεταξύ κάθε δεδομένου μετρήσιμου βιοδείκτη και των σχετικών κλινικών τελικών σημείων. [4]

4.1.1 Βιοδείκτες και κλινικά τελικά σημεία

Οι βιοδείκτες είναι από εξ ορισμού αντικειμενικά, υπολογίσιμα χαρακτηριστικά των βιολογικών διεργασιών. Μπορούν, αλλά δεν συσχετίζονται απαραίτητα με την εμπειρία και την αίσθηση ευεξίας του ασθενούς, και είναι εύκολο να φανταστεί κανείς μετρήσιμα βιολογικά χαρακτηριστικά

που δεν αντιστοιχούν στην κλινική κατάσταση των ασθενών, των οποίων οι μεταβολές είναι μη ανιχνεύσιμες και χωρίς συνέπειες για την υγεία.[5]

Επίσης, υπάρχουν μετρήσιμα βιολογικά χαρακτηριστικά των οποίων η διακύμανση μεταξύ των πληθυσμών είναι τόσο μεγάλη ώστε να τα αναφέρουμε όλα, και η αξιοπιστία τους, ως μέσα πρόβλεψης της νόσου ή της απουσίας της, μηδαμινή. Αντιθέτως, τα κλινικά σημεία είναι μεταβλητές οι οποίες είτε αντανακλούν είτε χαρακτηρίζουν το πώς το υποκείμενο μιας μελέτης ή κλινικής δοκιμής "αισθάνεται, λειτουργεί, ή επιβιώνει"[1]. Πρόκειται, με άλλα λόγια, για μεταβλητές που αντιπροσωπεύουν την υγεία και την ευημερία του υποκειμένου μελέτης, όπως όμως γίνεται αντιληπτό από την πλευρά του υποκειμένου. [6]

Υπάρχει εδώ και καιρό ευρεία ομοφωνία στις επιστημονικές κοινότητες, ότι τα κλινικά σημεία είναι τα κύρια, και για μερικούς τα μόνα σχετικά, τελικά σημεία όλης της κλινικής έρευνας, και ουσιαστικά όλης της βιοϊατρικής έρευνας. Ο στόχος της κλινικής πρακτικής είναι να βελτιώσει τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα, και όχι, για παράδειγμα, να αλλάξει υπολογίσιμα χαρακτηριστικά της εγγενούς βιοχημείας των ασθενών.[7]

Η επιβίωση θεωρείται από πολλούς το πρότυπο κλινικό τελικό σημείο για τις περισσότερες δοκιμές HIV, αλλά και άλλες σαφώς καθορισμένες, σαφείς κλινικές μεταβλητές-όπως το εγκεφαλικό, το έμφραγμα του μυοκαρδίου, και η εμφάνιση προκαθορισμένων ευκαιριακών λοιμώξεων-έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ως τελικά σημεία υπό τις κατάλληλες συνθήκες επειδή προσφέρουν σαφή, ακριβή δεδομένα με τη δυνατότητα να φανεί οριστικά εάν οι παρεμβάσεις είναι αποτελεσματικές ή αναποτελεσματικές, καθώς και ασφαλείς ή όχι. Ωστόσο, δεν συμβαίνει το ίδιο με όλα τα τελικά σημεία. Παραδείγματα κλινικών στοιχείων που παρέχουν λιγότερο αξιόπιστες και μετρήσιμες πληροφορίες περιλαμβάνουν τους ήχους της αναπνοής, τον πόνο, και την ανακούφιση των «συμπτωμάτων» σε περιπτώσεις όπου τα συμπτώματα δεν ορίζονται εκ των προτέρων.

4.1.2 Οι βιοδείκτες ως υποκατάστατα τελικών σημείων

Όταν χρησιμοποιούνται ως αποτελέσματα σε κλινικές δοκιμές, οι βιοδείκτες θεωρούνται υποκατάστατα τελικά σημεία, δηλαδή, ενεργούν ως αναπληρωματικά ή υποκατάστατα σημαντικών κλινικών τελικών σημείων. Αλλά, δεν είναι όλοι οι βιοδείκτες υποκατάστατα τελικά

σημεία, ούτε όλοι προορίζονται να είναι. Τα υποκατάστατα τελικά σημεία είναι ένα μικρό υποσύνολο από επαρκώς χαρακτηρισμένους βιοδείκτες με καλώς αξιολογημένη κλινική σχετικότητα [1]. Για να θεωρηθεί ένας βιοδείκτης ως ένα υποκατάστατο τελικό σημείο, πρέπει να υπάρχουν αξιόπιστα επιστημονικά στοιχεία (π.χ., επιδημιολογικά, θεραπευτικά ή / και παθοφυσιολογικά) ότι με συνέπεια και ακρίβεια ο εν λόγω βιοδείκτης προβλέπει μια κλινική έκβαση, είτε θετική είτε αρνητική. Με αυτή την έννοια, ένα υποκατάστατο τελικό σημείο είναι ένας βιολογικός δείκτης που μπορεί να χρησιμεύσει ως αναπληρωματικό κλινικό τελικό σημείο, αλλά όχι ως αντικαταστάτης αυτού.

Ακόμη και βιοδείκτες που είναι στατιστικά επικυρωμένοι ως υποκατάστατα για ένα δεδομένο κλινικό τελικό σημείο, μπορεί στην πραγματικότητα να μην είναι μέρος της παθοφυσιολογικής οδού που οδηγεί σε αυτό το τελικό σημείο. Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να υπάρχουν αποδείξεις ότι οι βιολογικοί δείκτες μετρούν μία διαδικασία ή το προϊόν ενός βασικού σταδίου της οδού, αλλά το να υποθέτουμε ότι αυτό ισχύει σε όλες τις περιπτώσεις εγκυμονεί τον κίνδυνο παρερμηνεύσης της απλής συσχέτισης με την αιτιότητα. Υπάρχουν πολλές πιθανές εξηγήσεις για βιοδείκτες που σχετίζονται με τις κλινικές παραμέτρους μόνο υπό περιορισμένες συνθήκες. Για παράδειγμα, πολλαπλά συγγενικά μονοπάτια της νόσου μπορεί να αναμιγνύονται, ή οι βιοδείκτες μπορεί να είναι έμμεσα σημάδια ενός μονοπατιού που δεν είναι θεμελιώδους σημασίας για τις βασικές διαδικασίες της νόσου.

Υπάρχει ένας αριθμός από πλεονεκτήματα για τη χρήση βιοδεικτών ως υποκατάστατα τελικά σημεία σε δοκιμές. Βασικά κλινικά σημεία, όπως η επιβίωση, μπορεί να συμβούν τόσο σπάνια ώστε η χρήση τους σε κλινικές μελέτες μπορεί να μην είναι καθόλου πρακτική, ή να είναι ακόμα και ανήθικη.[8]

Για πολλές ασθένειες, σαφή κλινικά τελικά σημεία, όπως η επιβίωση ή η υποτροπή, για παράδειγμα, ενός καρδιαγγειακού συμβάντος μπορεί να συμβεί μόνο μετά από πολλά χρόνια θεραπείας. Οι βιοδείκτες μπορούν να προσφέρουν στους ερευνητές ενδιάμεσα στοιχεία σχετικά με την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα αυτών των θεραπειών, ενώ πιο καθοριστικά κλινικά δεδομένα συλλέγονται[9]. Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να είναι προτιμότερη η χρήση εμπεριστατωμένων βιοδεικτών ως υποκατάστατα τελικά σημεία για να μειωθεί ο κίνδυνος βλάβης των ατόμων. Τα πρώτα στοιχεία που παρέχονται από τους βιοδείκτες δίνουν στους ερευνητές την ευκαιρία να σταματήσουν τις δυνητικά επιβλαβείς, για τα άτομα, παρεμβάσεις προτού τα σχετικά

κλινικά δεδομένα να είναι διαθέσιμα. Σε άλλες περιπτώσεις, μπορεί απλά οι βιοδείκτες να επιτρέψουν στους ερευνητές το σχεδιασμό μικρότερων και πιο αποτελεσματικών μελετών, μειώνοντας έτσι τον αριθμό των ατόμων που εκτίθενται σε μια δεδομένη πειραματική θεραπεία.

Μειώνοντας το χρόνο έγκρισης νέων θεραπειών, πιο αποτελεσματικές δοκιμές θα μπορούσαν να επιταχύνουν τη συνολική διαδικασία ανάπτυξης φαρμάκων, επιτρέποντας σε αποτελεσματικές θεραπείες να “φτάσουν” γρηγορότερα στους ασθενείς πληθυσμούς ενώ παράλληλα η διατήρηση τόσο υλικών όσο και ανθρώπινων πόρων για άλλα ερευνητικά προγράμματα και άλλες κλινικές δοκιμές, θα ήταν εφικτή [10]. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο όρος "υποκατάστατο δείκτη" - σε αντίθεση με τον όρο "υποκατάστατο τελικό σημείο" - έχει επικριθεί γιατί λανθασμένα υπονοεί ότι το "υποκατάστατο", στην εν λόγω περίπτωση ο βιοδείκτης, αναπληρώνει προσωρινά κάποιον άλλο δείκτη[1]. Στην πραγματικότητα, οι βιοδείκτες θα πρέπει να λαμβάνουν την θέση υποκατάστατων τελικών σημείων μόνο σε περιπτώσεις σαφών κλινικών τελικών σημείων, και η χρήση τους ως υποκατάστατα τελικά σημεία είναι κατάλληλη μόνο σε περιορισμένες περιπτώσεις, οι οποίες συζητούνται παρακάτω. [11]

4.1.3 Χαρακτηρισμός και αξιολόγηση βιοδεικτών

Για να θεωρηθούν οι βιοδείκτες ως υποκατάστατα τελικά σημεία απαιτείται ο προσδιορισμός της σχετικότητας και της εγκυρότητάς τους. Ο όρος “σχετικότητα” αναφέρεται στην ικανότητα ενός βιοδείκτη να παρέχει κατάλληλα σχετικές κλινικές πληροφορίες για ζητήματα που παρουσιάζουν ενδιαφέρον για το κοινό, τους παρόχους υγειονομικής περίθαλψης, ή της επίσημης πολιτικής για την υγεία. Ο όρος “εγκυρότητα” αναφέρεται στην ανάγκη να χαρακτηριστεί η αποτελεσματικότητα ή η χρησιμότητα ενός βιοδείκτη ως υποκατάστατο τελικό σημείο. Δυστυχώς, η εγκυρότητα χαρακτηρίζεται από ένα φάσμα απόψεων. Μερικοί ερευνητές στην πραγματικότητα έχουν απορρίψει τον όρο “εγκυρότητα” ως “ακατάλληλο“ για τη μελέτη των βιολογικών δεικτών, διότι υποδεικνύει ότι μπορεί να υπάρξει μια πλήρης βιολογική κατανόηση της σχέσης μεταξύ ενός δεδομένου βιοδείκτη και ένα κλινικό τελικό σημείο, μια υπόθεση που απορρίπτουν [1] [12].

Αντ' αυτού, ένας εναλλακτικός όρος που έχει προταθεί είναι η “αξιολόγηση“. Η “αξιολόγηση“ αναφέρεται στην εν εξελίξει διαδικασία της μελέτης της επιτυχίας των βιοδεικτών κατά τη δράση τους ως υποκατάστατα για μεμονωμένα κλινικά τελικά σημεία. Σύμφωνα με αυτή την άποψη, η ανάπτυξη της θεραπείας με τη χρήση βιοδεικτών δεν αποδεικνύει ποτέ με βεβαιότητα ότι

οι θεραπείες οδηγούν σε συγκεκριμένα κλινικά σημεία. Αντίθετα, η διαδικασία κλινικής δοκιμής δεν παρέχει βεβαιότητα όσον αφορά στη σχέση μεταξύ μιας παρέμβασης, ένα βιοδείκτη, και ένα κλινικό τελικό σημείο. Αφήνοντας κατά μέρος τη σημασιολογική συζήτηση, υπάρχουν διάφορα επίπεδα εγκυρότητας -ή επίπεδα επιτυχίας της υποκατάστασης -που πρέπει να εξεταστούν και να μελετηθούν. Στο απλούστερο επίπεδο βρίσκεται η εγκυρότητα της μέτρησης. Είναι ο βιολογικός δείκτης που προτείνεται ως υποκατάστατο, ικανός να μετρηθεί αντικειμενικά και επαναλαμβανόμενα σε μια συγκεκριμένη περίπτωση, και μπορεί να μετρήσει ένα αντικειμενικό, υπολογίσιμο χαρακτηριστικό με επιτυχία;

Ένα βήμα πέρα από αυτό, η εγκυρότητα της μελέτης του υποκατάστατου πρέπει να αξιολογηθεί: στο πλαίσιο της μελέτης, μπορεί ο βιοδείκτης να μετριέται όχι μόνο με επαναληψιμότητα, αλλά και με ακρίβεια; Με άλλα λόγια, σε αυτή την μελέτη μπορεί ο βιοδείκτης να σχετιστεί σθεναρά με το κλινικό τελικό σημείο για το οποίο λειτουργεί ως υποκατάστατο; Το επόμενο στάδιο του ελέγχου εγκυρότητας είναι η εξωτερική ισχύς: μπορεί αυτό το υποκατάστατο να αποδειχθεί ότι έχει παρόμοια προβλεπτική ικανότητα σε άλλους πληθυσμούς ή σε άλλες σχετικές μελέτες θεραπείας; Αν ναι, ο βιοδείκτης μπορεί να θεωρηθεί ένα χρήσιμο υποκατάστατο σε μελέτες που έχουν στενή σχέση με τις μελέτες για την καθιέρωση της υπό όρους "εγκυρότητας". Σύμφωνα με ορισμένους σχολιαστές, το τελικό επίπεδο της επιτυχίας της υποκατάστασης δεν έχει λάβει τη δέουσα προσοχή. Μόλις οι βιοδείκτες καθιερωθούν ως υποκατάστατοι δείκτες για την πρόβλεψη των επιπτώσεων μιας δεδομένης κλάσης θεραπειών σε ένα κλινικό τελικό σημείο, μπορούν οι επιστήμονες να επαφίενται με σιγουριά στους βιοδείκτες ότι χρησιμεύουν ως υποκατάστατα και για άλλα σχετικά κλινικά σημεία ή για άλλες κλάσεις θεραπειών;[10] [11] [13]

Η υπόθεση ότι οι βιοδείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ευρέως, από τη στιγμή που έχουν καθιερωθεί στο πλαίσιο της έρευνας, έχει συμβεί αρκετές φορές στο σχεδιασμό της μελέτης. Ωστόσο, αυτή η επιστημονικά αβάσιμη προσέγγιση στο σχεδιασμό της δοκιμής έχει τις τελευταίες δεκαετίες οδηγήσει σε λανθασμένα ερευνητικά συμπεράσματα, αρκετά από τα οποία έχουν εξεταστεί σε μεγαλύτερο βάθος σε άρθρα ανασκόπησης σχετικά με το θέμα. Για χρόνια, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν την καταστολή των αρρυθμιών ως υποκατάστατο τελικό σημείο για μειωμένη νοσηρότητα από καρδιαγγειακά νοσήματα, με αποτέλεσμα την έγκριση φαρμάκων κατά της αρρυθμίας (π.χ., ενκαϊνίδη, φλεκαϊνίδη) που σε μεταγενέστερες δοκιμές βρέθηκαν να αυξάνουν τη θνησιμότητα σε ορισμένους πληθυσμούς ασθενών. Πιο πρόσφατα, μια μεγάλη και ευρέως κοινοποιημένη δοκιμή του συνδυασμού δύο φαρμάκων που μειώνουν τη χοληστερόλη, της

εξετιμίμης και της συμβαστατίνης, υπογράμμισε τον κίνδυνο της υπερεκτίμησης των βιοδεικτών: αν και ο συνδυασμός μείωσε τα επίπεδα χοληστερόλης του ασθενούς, περισσότερο από ότι η συμβαστατίνη μόνη της, δεν οδήγησε σε βελτίωση της αθηροσκλήρωσης ή της συνολικής θνησιμότητας, θέτοντας υπό αμφισβήτηση μια μεγάλη παλαιότερη έρευνα η οποία εξαρτάτο από την παραδοχή ότι με τη μείωση της χοληστερόλης μειώνεται απαραίτητα η νοσηρότητα και η θνησιμότητα [7]. Και στις δύο αυτές περιπτώσεις, όπως και σε πολλές άλλες, παρά τα καλύτερα βιολογικά και στατιστικά στοιχεία, βιοδείκτες που ήταν «επικυρωμένοι» ακόμη και σε μια σειρά προηγούμενων μελετών, διαπιστώθηκαν κακοί προγνωστικοί παράγοντες των κλινικών αποτελεσμάτων.

4.1.4 Βιοδείκτες και παροδικότητα

Οι βιοδείκτες που έχουν εγκριθεί από κανονισμό του US-Food and Drug Administration (FDA) χρησιμοποιούνται μόνο ως υποκατάστατα τελικά σημεία στην διαδικασία ανάπτυξης θεραπείας [8]. Ο FDA επιτρέπει την προσωρινή έγκριση επέμβασης με υποκατάστατο δείκτη καθορισμένης αποτελεσματικότητας αλλά απαιτεί περαιτέρω μελέτες παρακολούθησης φάσης IV που αποδεικνύουν ότι υπάρχει συσχέτισή του με το σχετικό κλινικό τελικό σημείο. Μερικοί προσεκτικοί ερευνητές και σχολιαστές έχουν προτείνει ότι οι βιοδείκτες είναι πιο αποτελεσματικοί και να καλύτερα να αφεθούν για χρήση ως τελικά σημεία σε δοκιμές φάσης I και φάσης II. Η χρήση τους μπορεί να βοηθήσει να προσδιοριστούν οι πιθανές θεραπείες που αξίζουν την προσπάθεια και τους πόρους μιας μεγάλης δοκιμής φάσης III. Ελλοχεύει, βέβαια, ο κίνδυνος ότι οι ερευνητές μπορεί ανάρμοστα να εγκαταλείψουν μιας μεγάλης κλίμακας έρευνα για θεραπείες που, παρά το ότι είναι πραγματικά αποτελεσματικές στην βελτίωση της κλινικής έκβασης, δεν φαίνεται να είναι αποτελεσματικές στη βάση της ανάλυσης των βιοδεικτών. Το παραπάνω γεγονός συνέβη πράγματι στη δοκιμή μιας χρόνιας κοκκιωματώδους νόσου σε παιδιά. Η εν λόγω δοκιμή, η οποία σχεδιάστηκε για να μετρήσει τόσο τα αποτελέσματα των υποκατάστατων όσο και τα πραγματικά κλινικά τελικά σημεία, έδειξε ότι η θεραπεία, η ιντερφερόνη γάμμα, ήταν αποτελεσματική μεν στη μείωση της θνησιμότητας, αλλά δεν υπήρξε καμία σχετική βελτίωση στο αποτέλεσμα των υποκατάστατων, την παραγωγή του υπεροξειδίου, η οποία αναμενόταν να αυξήσει την ικανότητα των ασθενών να σκοτώσουν τα βακτήρια. Με άλλα λόγια, η βιολογική διεργασία που οδήγησε σε βελτιωμένα κλινικά αποτελέσματα, δεν συνελήφθη από το βιολογικό μηχανισμό που προτάθηκε

και προβλέφθηκε από τους ερευνητές. Αν η δοκιμή είχε σχεδιαστεί για να βασιστεί πρώτα στην προσωρινή ανάλυση μόνο των βιοδεικτών, οι αληθινές και κλινικά συναφείς επιδράσεις της θεραπείας ίσως να μην είχαν ανακαλυφθεί. Το συμπέρασμα εδώ είναι ότι επιδράσεις των θεραπειών στους βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται ως υποκατάστατα των αποτελεσμάτων, δεν προβλέπουν απαραίτητως τα αληθή κλινικά αποτελέσματα. Χωρίς την ανάλυση που επιβεβαιώνει τα κλινικά τελικά σημεία, η υπέρμετρη στήριξη στους βιοδείκτες, ακόμα και στους ήδη επικυρωμένους σε ορισμένα πλαίσια θεραπείας, παρουσιάζει τον σοβαρό και διαρκή κίνδυνο παραγωγής παραπλανητικών, και σε μερικές περιπτώσεις επικίνδυνων, εσφαλμένων συμπερασμάτων. Οι βιοδείκτες παίζουν έναν κρίσιμο ρόλο στη βελτίωση της διαδικασίας ανάπτυξης φαρμάκων, καθώς και στην ευρύτερη επιχείρηση της βιοϊατρικής έρευνα. Η κατανόηση της σχέσης μεταξύ μετρήσιμων βιολογικών διεργασιών και κλινικών αποτελεσμάτων είναι ζωτικής σημασίας για την επέκταση του “οπλοστασίου” θεραπειών για όλες τις ασθένειες, καθώς και για την εμβάθυνση της κατανόησης της κανονικής, υγιούς φυσιολογίας. Τουλάχιστον από τη δεκαετία του 1980, η αναγκαιότητα της χρήσης των βιοδεικτών ως υποκατάστατο τελικών σημείων σε μεγάλες δοκιμές σοβαρών ασθενειών, όπως ο καρκίνος και η καρδιακή νόσος, έχει συζητηθεί ευρέως.

Ο FDA συνεχίζει να προωθεί τη χρήση των βιοδεικτών στη βασική και κλινική έρευνα, καθώς και την έρευνα για πιθανούς νέους βιοδείκτες για να χρησιμοποιηθούν ως υποκατάστατα σε μελλοντικές μελέτες. Ωστόσο, παρά τη δυνατότητά τους να κάνουν το καλό, όπως να επιταχύνουν την ανάπτυξη φαρμάκων, τη μείωση της έκθεσης σε αναποτελεσματικές πειραματικές θεραπείες, και ούτω καθεξής-οι βιοδείκτες εγκυμονούν σημαντικούς κινδύνους όταν οι σχεδιαστές των δοκιμών τους συγχέουν με τα κλινικά τελικά σημεία. Οι βιοδείκτες θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν μόνο ως αληθινός αντικαταστάτης κλινικών τελικών σημείων αν κατανοηθεί πλήρως η κανονική φυσιολογία μιας βιολογικής διαδικασίας, η παθοφυσιολογία αυτής της διαδικασίας σε κατάσταση νόσου, και τα αποτελέσματα μιας παρέμβασης μέσω κάποιας συσκευής ή φαρμακευτικής, σε αυτή τη διαδικασία. Δεδομένου ότι σπάνια, αν όχι ποτέ, έχουμε πλήρη εικόνα αυτής της διαδικασίας, αφού υπάρχουν πάντα περισσότερες λεπτομέρειες που δεν ξέρουμε ή δεν καταλαβαίνουμε, οι βιοδείκτες ως υποκατάστατα τελικά σημεία χρειάζονται συνεχή επαναξιολόγηση.

Οι μελέτες που χρησιμοποιούν βιοδείκτες θα πρέπει να έχουν πάντα ως τελικές μετρήσεις τα κλινικά αποτελέσματα, τουλάχιστον για αναδρομική ανάλυση της επιτυχίας συσχέτισης των

βιοδεικτών. Χωρίς διαρκή επαναξιολόγηση της σχέσης μεταξύ των υποκατάστατων των τελικών σημείων και των πραγματικών κλινικών τελικών σημείων, διακινδυνεύουμε και πάλι την έγκριση ολόκληρων κατηγοριών φαρμάκων που είτε δεν έχουν κανένα πρόσθετο όφελος ή, ακόμα χειρότερα, που βλάπτουν τους ασθενείς.

4.2 Βιοπληροφορικές και στατιστικές μέθοδοι εύρεσης βιοδεικτών

Η εύρεση βιοδείκτη είναι ένας ιατρικός όρος που περιγράφει τη διαδικασία με την οποία ανακαλύπτονται βιοδείκτες. Οι κοινές εξετάσεις αίματος στην ιατρική είναι βιοδείκτες. Υπάρχει ενδιαφέρον για την ανακάλυψη βιοδεικτών εκ μέρους της φαρμακευτικής βιομηχανίας αφού οι εξετάσεις αίματος ή άλλοι βιοδείκτες θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως ενδιάμεσοι δείκτες μιας νόσου σε κλινικές δοκιμές, και ως πιθανοί στόχοι φαρμάκων.

Μηχανισμός δράσης

Ο τρόπος με τον οποίο αυτές οι εξετάσεις ανακαλύφθηκαν μπορεί να θεωρηθεί ως τρόπος εύρεσης βιοδεικτών. Για παράδειγμα, κατά τη διαδικασία αξιολόγησης της λειτουργίας των νεφρών μέσω ενέσεων ινουλίνης, ανακαλύφθηκε ένα ήδη φυσικό υπάρχον μόριο, η κρεατινίνη, η οποία επιτρέπει ακριβώς τις ίδιες μετρήσεις εξυπηρετώντας την εν λόγω αξιολόγηση λειτουργίας. Νέες μοριακές βιολογικές τεχνικές έχουν κινήσει το πρόσφατο ενδιαφέρον γύρω από την ανακάλυψη βιοδεικτών, υποσχόμενες την ταχεία εύρεση σχετικών δεικτών χωρίς λεπτομερή εικόνα των μηχανισμών μιας ασθένειας.

Με τη διαλογή πολλών πιθανών βιομορίων ταυτόχρονα κάνοντας χρήση της γονιδιωματικής και της πρωτεομικής, μπορεί να επιχειρηθεί μια παράλληλη προσέγγιση. Μια υποκατηγορία της πρωτεομικής είναι εκείνη στην οποία όλες οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες ενός κυττάρου, ιστού ή οργανισμού, αναλύονται διεξοδικά, γι' αυτό και τα τελευταία χρόνια έχει αναδειχθεί ως μια σημαντική τεχνολογία στην υψηλής απόδοσης αναζήτηση για βιοδείκτες. Ωστόσο, σημαντικές τεχνικές δυσκολίες παραμένουν. Η ταυτοποίηση των κλινικά σημαντικών πρωτεϊνών – βιοδεικτών του φαινοτύπου και των βιολογικών λειτουργιών είναι ένας διευρυνόμενος χώρος έρευνας που θα επεκτείνει τις διαγνωστικές ικανότητες. Οι βιοδείκτες που ανακαλύφθηκαν πιο πρόσφατα είναι το ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA) για τον καρκίνο του προστάτη [2] και η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) για την καρδιακή νόσο[3].

Το επιγενετικό ρολόι που μετρά την ηλικία των κυττάρων / ιστών / οργάνων με βάση τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA είναι αναμφισβήτητα ο πιο ακριβής γονιδιωματικός βιοδείκτης. Η χρήση βιοδεικτών από εύκολα αξιολογήσιμα βιο-υγρά(π.χ. αίμα και ούρα) είναι ευεργετική για την αξιολόγηση της κατάστασης των ιστών και οργάνων, τα οποία αντικειμενικά είναι δύσκολο να προσπελαστούν. Τα βιο-υγρά είναι πιο εύκολα προσβάσιμα, σε αντίθεση με πιο επεμβατικές ή ανέφικτες τεχνικές όπως η βιοψία ιστού. Τα βιο-υγρά περιέχουν πρωτεΐνες από τους ιστούς και χρησιμεύουν ως αποτελεσματικοί ορμονικοί πληροφοριοδότες. Ο ιστός δρα ως πομπός των πληροφοριών, και το βιο-υγρό(που έχει δειγματοληφθεί από τον ιατρό) δρα ως δέκτης. Η δεκτικότητα του βιο-υγρού βασίζεται στην πιστότητα του καναλιού μεταφοράς των πληροφοριών. Οι πηγές θορύβου που ελαττώνουν την πιστότητα περιλαμβάνουν την προσθήκη πρωτεϊνών που προέρχονται από άλλους ιστούς (ή από το ίδιο το βιο-υγρό). Πρωτεΐνες μπορούν επίσης να χαθούν μέσω της σπειραματικής διήθησης(εξέταση που αποτελεί πολύ καλό δείκτη εκτίμησης της νεφρικής λειτουργίας και δείχνει πόσο γρήγορα διηθούνται τα ούρα στους νεφρούς)[4]. Αυτοί οι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τη σύνθεση πρωτεϊνών ενός βιο-υγρού[5]. Επιπλέον, απλά κοιτάζοντας τις επικαλύψεις πρωτεϊνών μπορεί να χαθούν οι πληροφορίες μεταφοράς που εμφανίζονται μέσω των τάξεων των πρωτεϊνών και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών.

Αντ' αυτού, η προβολή των πρωτεϊνών επάνω σε χώρους που σχετίζονται με τη λειτουργία, τη φαρμακολογία και την ασθένεια, επιτρέπουν τη μέτρηση της λειτουργικής απόστασης μεταξύ του ιστού και του βιο-υγρού. Η εγγύτητα σε αυτούς τους αφηρημένους χώρους σηματοδοτεί ένα χαμηλό επίπεδο παραμόρφωσης κατά μήκος του καναλιού πληροφοριών. Ωστόσο, οι τρέχουσες προσεγγίσεις για την πρόβλεψη βιοδεικτών αναλύουν ιστούς και βιο-υγρά χωριστά. [6]

Στη συνέχεια αυτού του κεφαλαίου περιγράφονται οι μέθοδοι εύρεσης βιοδεικτών.

4.2.1 Γονιδιωματική προσέγγιση

Υπάρχουν τέσσερις κύριες μέθοδοι για την γονιδιωματική ανάλυση. Πρώτον, η τεχνική αποτύπωσης Northern μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση ενός συνόλου αλληλουχιών RNA. Δεύτερον, οι βιοδείκτες μπορούν να αναλυθούν με τυπικές τεχνικές γονιδιακής έκφρασης, και τρίτον να ερευνηθούν χρησιμοποιώντας SAGE. Τέλος, η μέτρηση μιας μικροσυστοιχίας DNA [7] μπορεί να ληφθεί, για να προσδιοριστεί η συχνότητα του κάθε γονιδίου, η οποία καθορίζει αν το γονίδιο είναι ένας βιοδείκτης.

Συχνά, μια αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιείται για να δημιουργήσει πολλά αντίγραφα των αλληλουχιών ώστε να είναι ευκολότερο να εργαστεί κανείς με αυτές. Τον Φεβρουάριο του 2016 η Δρ. Laura Elnitski και η ομάδα της χρησιμοποίησε αυτή την τεχνική για την ανίχνευση ενός βιοδείκτη που συναντάται σε πέντε τύπους καρκίνου. [8]

4.2.2 Πρωτεομική προσέγγιση

Υπάρχουν πέντε διαφορετικές μέθοδοι εύρεσης βιοδεικτών με την πρωτεομική προσέγγιση και είναι οι εξής :

- 1 Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων γέλης πολυακρυλαμιδίου (TwoDimensionalPolyacrylamidegelElectrophoresis(2D-PAGE))
- 2 Διασύνδεση υγρού χρωματογράφου με Φασματομετρίας μάζας (LC-MS)
- 3 Ιονισμός εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενος από ενισχυμένη επιφάνεια (SurfaceEnhancedLaserDesorption/Ionization - SELDI)SELDI-TOF ή Ιονισμός εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενος από υλικό μήτρας (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI) (orMALDI-TOF)
- 4 Τεχνική Μικροσυστοιχίας Αντισώματος (Antibody Array)
- 5 Τεχνική Μικροσυστοιχίας Ιστού (Tissue Microarray)

Οι ανωτέρω τεχνικές παρουσιάζονται αναλυτικότερα παρακάτω:

1. Ηλεκτροφόρησηδύοδιαστάσεωνγέληςπολυακρυλαμιδίου (TwoDimensionalPolyacrylamidegelElectrophoresis(2D-PAGE))

Η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων γέλης πολυακρυλαμιδίου (2D-PAGE) βασίζεται στο συνδυασμό δύο ορθογώνιων τεχνικών διαχωρισμού. Στην πρώτη διάσταση, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο, μια τεχνική γνωστή ως ισοηλεκτρική εστίαση (IEF). Στην δεύτερη διάσταση, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται περαιτέρω με βάση την μοριακή τους μάζα μέσω της ηλεκτροφορητικής κινητικότητάς τους χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρησης(SDS-PAGE).Επειδή είναι απίθανο τα δυο μόρια να έχουν ίδιες και τις δυο

ιδιότητες, τα μόρια διαχωρίζονται πιο αποτελεσματικά με την ηλεκτροφόρηση δυο διαστάσεων από ό,τι με την ηλεκτροφόρηση μιας διάστασης. Τέλος, οι πρωτεΐνες μπορούν να απεικονισθούν και να ποσοτικοποιηθούν με διαφορετικές διαδικασίες χρώσης, όπως την μέθοδο Coomassie, με χρώση άργυρου, ή χρώση φθορισμού[66].

Η ισοηλεκτρική εστίαση (IEF)

Στην IEF, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε βαθμίδες pH με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI). Μία βαθμίδα pH δημιουργείται εντός της γέλης και ένα ηλεκτρικό δυναμικό εφαρμόζεται κατά μήκος της γέλης. Σε οποιοδήποτε pH εκτός του ισοηλεκτρικού τους σημείου, οι πρωτεΐνες φορτίζονται. Αν φορτιστούν θετικά, θα κινηθούν προς το πιο αρνητικό άκρο της γέλης και αν φορτιστούν αρνητικά, θα κινηθούν προς το πιο θετικό άκρο της γέλης

SDS-PAGE κίνηση

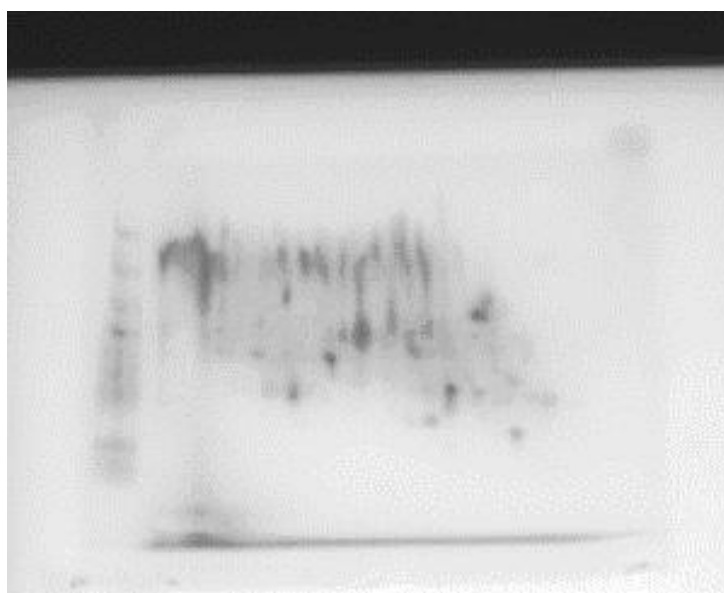
Ηλεκτρικό ρεύμα εφαρμόζεται κατά μήκος της γέλης, προκαλώντας τις αρνητικά-φορτισμένες πρωτεΐνες να κινηθούν έξω από τη γέλη και να μεταναστεύσουν κατά μήκος της γέλης. Ανάλογα με το μέγεθος της, κάθε πρωτεΐνη κινείται με διαφορετικό τρόπο πάνω στον πίνακα της γέλης. Μικρότερες πρωτεΐνες ταξιδεύουν μακρύτερα κάτω από τη γέλη, ενώ οι μεγαλύτερες παραμένουν πιο κοντά στο αρχικό σημείο. Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται χονδρικά ανάλογα με το μέγεθος και ως εκ τούτου το μοριακό τους βάρος. Συνηθίζεται, μια “πρωτεΐνη – δείκτης” γνωστού μοριακού βάρους να μετακινείται σε ξεχωριστή λωρίδα στη γέλη, προκειμένου να βαθμονομηθεί η γέλη και να καθοριστεί το βάρος άγνωστων πρωτεϊνών συγκρίνοντας την απόσταση που διένυσαν σε σχέση με την “πρωτεΐνη – δείκτη”.

Οπτικοποίηση

Μετά την ηλεκτροφόρηση η γέλη χρωματίζεται για να απεικονίσει τις διαχωρισμένες πρωτεΐνες. Συνήθως χρησιμοποιούνται χρώσεις όπως η Coomassie Brilliant Blue ή SYPRO Ruby ή χρώση αργύρου. Διαφορετικές πρωτεΐνες θα εμφανίζονται ως διακριτά σημεία εντός της γέλης. Οι χρώσεις Coomassie Brilliant Blue ή SYPRO Ruby είναι συμβατές με την φασματομετρία μάζας. Η Coomassie Brilliant Blue έχει όριο ανίχνευσης περίπου 10 ng πρωτεϊνών ανά κηλίδα και οι

εικόνες γέλης των κηλίδων μπορούν να συλληφθούν με σάρωση πυκνόμετρου που λειτουργούν στο ορατό φως [65].

Η SYPRO Ruby μπορεί να ανιχνεύσει 1 ng πρωτεϊνών ανά κηλίδα και αφού είναι φθορίζουσα, οι κηλίδες εμφανίζονται από ένα φθορίζον σύστημα απεικόνισης[67]. Η χρώση με άργυρο μπορεί να ανιχνεύσει κηλίδες που περιέχουν πρωτεΐνες ελαφρύτερες από 1 ng και είναι η πιο ευαίσθητη μέθοδος απεικόνισης μη ραδιενεργών πρωτεϊνών. Οι συσκευές laser για τη λήψη εικόνων είναι χρήσιμες για γέλες με φθορίζουσα χρώση.



Εικόνα 5: Μορφή της γέλης μετά την εκτέλεση του 2D-PAGE.

Ανάλυση

Οι εικόνες μπορούν να αναλυθούν περαιτέρω χρησιμοποιώντας λογισμικά ανάλυσης εικόνας. Αυτά τα λογισμικά ποσοτικοποιούν τα σημεία των πρωτεϊνών, αντιστοιχίζουν εικόνες και συγκρίνουν αντίστοιχες κηλίδες σχετικών γελών, καταρτίζουν εκθέσεις δεδομένων γελών, και ενσωματώνουν τις πληροφορίες των εικόνων σε βάσεις δεδομένων. Εναλλακτικά οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες μπορούν να ληφθούν από τη γέλη και να αναλυθούν με MS για ταυτοποίηση πρωτεϊνών.

Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της μεθόδου 2D-PAGE

Χρησιμοποιώντας 2D-PAGE, 100 έως 1000 πολυπεπίδια μπορούν να αναλυθούν σε μια απλή εκτέλεση. Οι πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν σε καθαρή μορφή από τις κηλίδες. Οι κηλίδες μπορούν να ποσοτικοποιηθούν και να αναλυθούν με MS. Σε αυτή τη μέθοδο τα πολυπεπίδια μπορεί να ανιχνευθούν με αντισώματα και επίσης μπορούν να ερευνηθούν για τροποποιήσεις. Τα μειονεκτήματα μπορεί να περιλαμβάνουν μεγάλη ποσότητα χειρισμού του δείγματος, λιγότερη επαναληψιμότητα, δυσκολία διαχωρισμού όξινων και βασικών πρωτεϊνών, πολύ μεγάλων και πολύ μικρών πρωτεϊνών και υδρόφοβων πρωτεϊνών. Επίσης, η μη αυτοματοποιημένη ανάλυση υψηλής απόδοσης και η περιορισμένη δυναμική κλίμακα είναι σημαντικά μειονεκτήματα. [68]

2. Διασύνδεση υγρού χρωματογράφου με φασματομετρίας μάζας (LC-MS, LiquidChromatography – MassSpectrometry)

Φασματομετρία μάζας (MS)

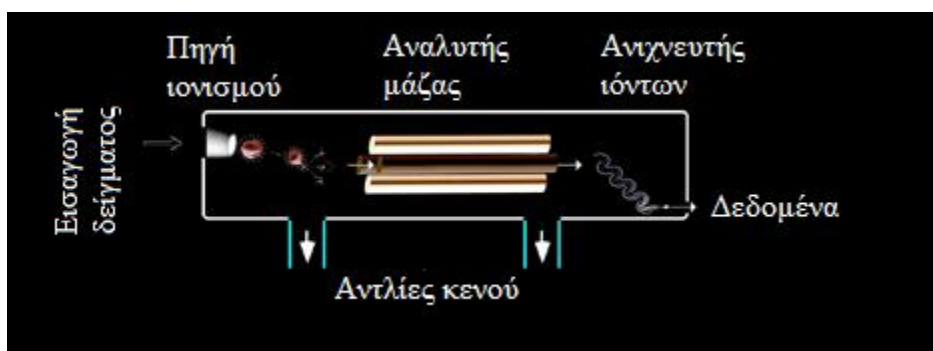
Επί του παρόντος, η φασματομετρία μάζας (MS) είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος σε υψηλής απόδοσης μελέτες πρωτεομικής. Ένα φασματόμετρο μάζας μπορεί να μετρήσει τις μάζες μικρών μορίων όπως είναι τα πεπίδια, μέσα από την μετατροπή τους σε ιόντα και την διαλογή τους μέσω ενός ρεύματος ηλεκτρικών πεδίων σύμφωνα με την αναλογία τους μάζα/φορτίο (m/z). Τα βασικά όργανα της MS αποτελούνται από τρεις συνιστώσες: μια πηγή ιονισμού που μετατρέπει τα σωματίδια σε ιόντα, έναν αναλυτή μάζας που ταξινομεί ιόντα σύμφωνα με το πηλίκο m/z , και έναν ανιχνευτή ιόντων που μετρά το πηλίκο m/z . Η πρόσφατη και συνεχής ανάπτυξη και βελτίωση αυτών των συνιστωσών, όπως η εφεύρεση μαλακών μεθόδων ιονισμού και η καινοτομία των υβριδικών μέσων που αποτελούνται από δύο αναλυτές μάζας, έχουν καταστήσει την φασματομετρία μάζας σημαντικά κατάλληλη για υψηλής απόδοσης μελέτες πρωτεομικής.

Ένα φασματόμετρο μάζας αποτελείται από τα εξής βασικά τμήματα:

- 1 Σύστημα εισαγωγής δείγματος.
- 2 Πηγή ιονισμού.
- 3 Αναλυτής μαζών για το διαχωρισμό των ιόντων με βάση το λόγο m/z .
- 4 Ανιχνευτής για την καταγραφή της θέσης και έντασης των ιόντων.

- 5 Επεξεργαστής του ηλεκτρικού σήματος του ανιχνευτή και αποθήκευση στη μνήμη του υπολογιστή.
- 6 Καταγραφή και εκτύπωση φασμάτων.

Το σύστημα υψηλού κενού είναι απαραίτητο για την αποφυγή της αλληλεπίδρασης των φορτισμένων σωματιδίων, που παράγονται από την πηγή ιονισμού, με τα αέρια της ατμόσφαιρας με συνέπεια την εκφόρτισή τους.



Εικόνα 6:Σχηματική διάταξη ενός φασματομέτρου μάζας.

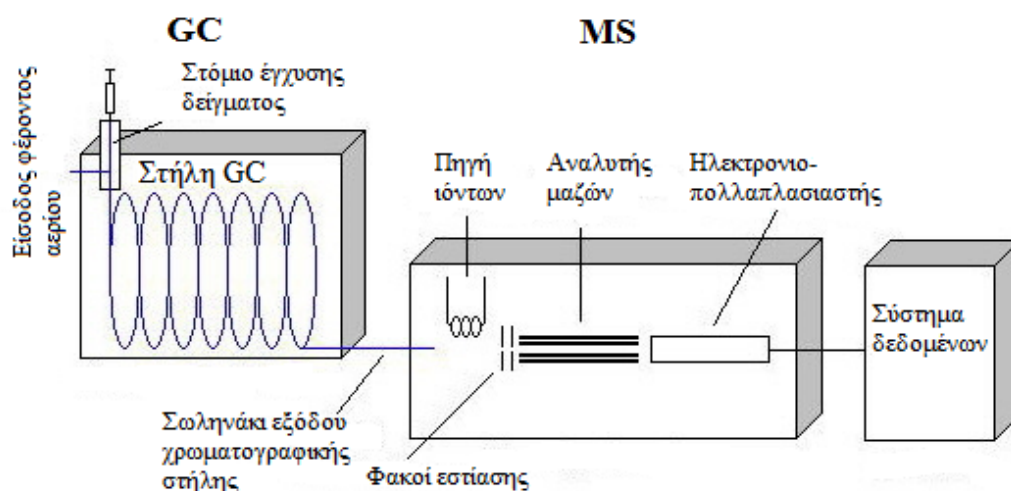
Σύστημα ιονισμού από αέριο ή υγρό χρωματογράφο – Συνδυασμένες τεχνικές

Σύνθετα μίγματα αναλύονται συνήθως με συνδυασμένες τεχνικές, όπου μια μέθοδος διαχωρισμού (αέρια ή υγρή χρωματογραφία ή τριχοειδής ηλεκτροφόρηση) συνδέεται με ένα φασματοόμετρο μάζας.

(GC = Gas Chromatography – Mass Spectrometry ή LC – MS = Liquid Chromatography – Mass Spectrometry)

GC – MS

Η διασύνδεση ενός αέριου χρωματογράφου με ένα φασματογράφο μάζας είναι απλή. Το τριχοειδές σωληνάκι εξόδου της χρωματογραφικής στήλης συνδέεται απ' ευθείας με το θάλαμο ιονισμού.



Εικόνα 7: Σύνδεση αέριου χρωματογράφου (GC) με φασματόμετρο μάζας (MS).

Τα συστατικά που διαχωρίζονται στο χρωματογράφο, εκλύονται σε αέρια κατάσταση από τη στήλη, έπειτα εισάγονται στην πηγή ιονισμού και αναλύονται στο φασματόμετρο μάζας σύμφωνα με τη σειρά εξαγωγής τους από τη στήλη GC. Με το σύστημα κενού του φασματόμετρου μάζας μπορούν να επιτευχθούν ροές χρωματογραφικής στήλης 1-2 ml/min. Με τη μέθοδο αυτή χρειάζεται ελάχιστη ποσότητα αρχικού δείγματος σε σύγκριση με τις άλλες μεθόδους εισαγωγής.

HPLC-MS

Η διασύνδεση υγρού χρωματογράφου υψηλής διαχωριστότητας (HPLC) ή τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (CE) με φασματόμετρο μάζας είναι από τεχνικής πλευράς περισσότερο σύνθετη απ' ότι η σύνδεση GC-MS, διότι αυτές οι τεχνικές χρησιμοποιούν διαλύτες που είναι συχνά υδατικοί, πράγμα που πρέπει να αποφεύγεται σε ένα φασματόμετρο μάζας. Ως επί το πλείστον

χρησιμοποιούνται μικροστήλες στην HPLC όταν συνδέεται με MS, λόγω των πολύ μικρών ταχυτήτων ροής.

3. Ιονισμός εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενος από ενισχυμένη επιφάνεια (SurfaceEnhancedLaserDesorption/Ionization - SELDI)SELDI-TOF ή Ιονισμός εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενος από υλικό μήτρας (MatrixAssistedLaserDesorptionIonization, MALDI) (orMALDI-TOF)

Υπάρχουν δύο κοινοί τύποι μαλακών μεθόδων ιονισμού: Ιονισμός εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενος από υλικό μήτρας (Matrix-AssistedLaserDesorption/Ionization - MALDI) και ιοντισμός ηλεκτροψεκασμού (electrosprayionization- ESI). Στη μέθοδο MALDI, τα δείγματα που περιέχουν πεπτίδια ενσωματώνονται σε ειδικά μόρια μήτρας. Η μήτρα απορροφά την ακτίνα λέιζερ ιονισμού και μεταφέρει την ενέργεια στον αναλυτή. Η ανάλυση του δείγματος με τον ESI, από την άλλη πλευρά, περιλαμβάνει την άμεση έγχυση του αναλυτή μέσα στο θάλαμο ιονισμού μετατρέποντας τα πεπτίδια σε μικρότερα ιόντα. Και στις δύο προσεγγίσεις, τα ιονισμένα πεπτίδια κατευθύνονται μέσω ενός αναλυτή μάζας προς έναν ανιχνευτή, ο οποίος παράγει το φάσμα MS με κάθε κορυφή να αντιπροσωπεύει μία αναλογία m/z ενός ιόντος.

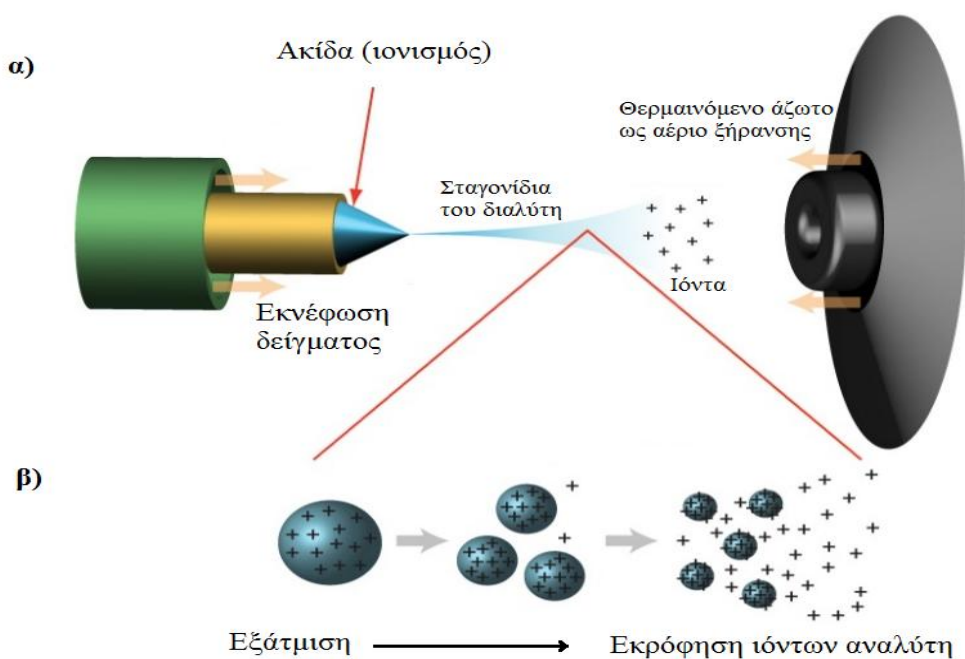
Ιονισμός εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενος από υλικό μήτρας (MatrixAssistedLaserDesorptionIonization, MALDI)

Η τεχνική MALDI είναι μια τεχνική ιονισμού για τη μελέτη βιοπολυμερών μεγάλου μοριακού βάρους και ως τεχνική εκρόφησης οδηγεί σε μικρή θραυσματοποίηση. Το δείγμα αναμειγνύεται μ' ένα κατάλληλο οργανικό υλικό μήτρας που απορροφά ακτινοβολία στο UV. Η ενέργεια του λέιζερ απορροφάται από το υλικό της μήτρας και μεταδίδεται στο μόριο το οποίο εκροφάται και ιονίζεται. Η τεχνική MALDI χρησιμοποιείται κυρίως με αναλυτή μάζας χρόνου-πτήσης (Time of flight analyser, TOF) ο οποίος λειτουργεί με παλμικό ιονισμό και ενδείκνυται για την ανάλυση

μικρών μορίων με μοριακά βάρη μικρότερα των 500Da λόγω της αποσύνθεσης του υλικού της μήτρας.

Ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό (Electrosprayionization, ESI)

Η τεχνική αυτή αποτελεί σήμερα μια από τις σημαντικότερες τεχνικές για αναλύσεις πολυπεπτιδίων, πρωτεϊνών και ολιγονουκλεοτιδίων με μοριακά βάρη ≥ 100.000 Da, όπου (1 Da = 1/12 της μάζας ενός ατόμου άνθρακα, 1 Da = 1 amu)



Εικόνα 8: α) Διάταξη ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό β) Εκρόφιση ιόντων από το διάλυμα.

Στην Εικόνα 8 (α) απεικονίζεται η διάταξη της πηγής ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό. Το διάλυμα μέσω ενός εκνεφωτή διαβιβάζεται σε μια ακίδα που βρίσκεται σε υψηλή τάση. Τα μόρια του δείγματος ιονίζονται και περνούν κατόπι από ένα τριχοειδές, όπου με τη βοήθεια θερμαινόμενου αζώτου εξατμίζεται ο διαλύτης. Επειδή εξατμίζεται ο διαλύτης τα σταγονίδια συρρικνώνονται οπότε αυξάνει η πυκνότητα του φορτίου τους και εκροφούνται στο ρεύμα του αερίου μετά από διάσπαση, όπως φαίνεται στο σχήμα (β). Επειδή το φορτίο των πρωτεϊνών αυξάνεται με το μοριακό τους βάρος και στη φασματομετρία μάζας μετριέται ο λόγος m/z , προκύπτουν πολύ μικρές τιμές αυτού του λόγου και με τη μέθοδο ESI μπορούν να ανιχνευθούν ενώσεις με μεγάλα

μοριακά βάρη μέχρι 150000 με ένα απλό φασματομέτρο μάζας που καλύπτει περιοχή μοριακών βαρών 1500 ή μικρότερα. Η τεχνική ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό προσαρμόζεται εύκολα στην έξοδο στηλών υγρής χρωματογραφίας υψηλής διαχωριστότητας (HPLC) ή τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (Capillary Electrophoresis), όπου η κινητή φάση εκνοφούται απ' ευθείας στο φασματομέτρο μάζας.

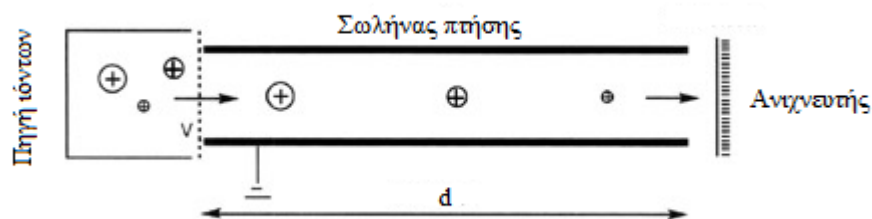
Αναλυτές μαζών χρόνου πτήσης (Time of flight analysers, TOF)

Μια ηλεκτρομαγνητική δύναμη επιβάλλεται σε όλα τα ιόντα που δημιουργούνται με παλμικό ιονισμό, στον ίδιο χρόνο και τα αναγκάζει να επιταχυνθούν και να διασχίσουν μια δεδομένη απόσταση d μέσα σε ένα σωλήνα χωρίς την ύπαρξη ηλεκτρομαγνητικών πεδίων.

Ελαφρύτερα ιόντα μετακινούνται γρηγορότερα απ' ό,τι βαρύτερα οπότε φθάνουν νωρίτερα στον ανιχνευτή. Οι χρόνοι πτήσης των ιόντων t εξαρτώνται από τη μάζα τους και ποικίλλουν από 1 έως 30 μs . Για τον διαχωρισμό μαζών σύμφωνα με το χρόνο πτήσης τους ισχύει η σχέση:

$$\frac{m}{z} = 2eV \left(\frac{t}{d} \right)^2$$

Όπου m =μάζα του ιόντος, z =φορτίο του ιόντος, t =χρόνος πτήσης και d =μήκος σωλήνα ελεύθερης πτήσης



Εικόνα 9: Σχηματικό διάγραμμα φασματομέτρου μάζας «χρόνου πτήσης».

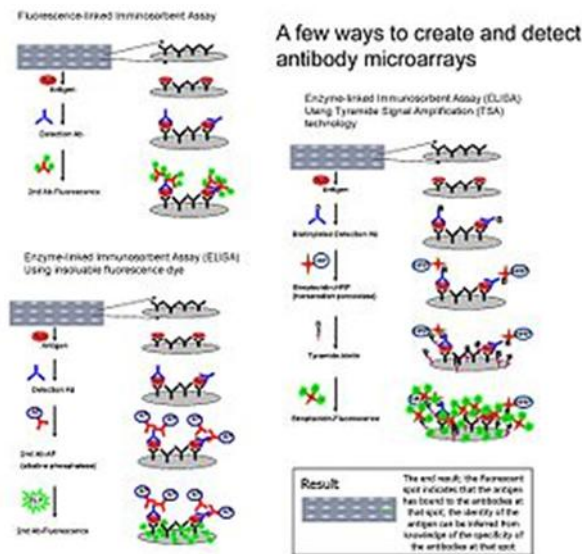
Τα φασματόμετρα μάζας με αναλυτή μαζών χρόνου πτήσης είναι απλά, φθηνά και μετρούν μάζες μεγάλου εύρους μέχρι 300 kDa. Ωστόσο, έχουν μικρότερη διαχωριστική ικανότητα και επαναληψιμότητα από τα τετραπολικά φίλτρα μάζας και από τους αναλυτές μαγνητικού πεδίου.

Ιονισμός εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενος από ενισχυμένη επιφάνεια (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization - SELDI)

Οι πολύπλοκες ασθένειες δεν μπορούν να σημειωθούν με έναν μόνο πρωτεΐνη-βιοδείκτη. Ως εκ τούτου, ένα σημαντικό μέρος, αν όχι το σύνολο των πρωτεϊνών, πρέπει να σαρωθεί σε αναζήτηση για μάλλον ένα συγκεκριμένο προφίλ των συγκεκριμένων ασθενειών. Μια ισχυρή και πιο ευέλικτη τεχνολογία που ονομάζεται ιονισμός εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενος από ενισχυμένη επιφάνεια (SELDI) κλάδος της φασματομετρίας μάζας MALDI-TOF έχει αναπτυχθεί και μπορεί να παράσχει μια λύση για υψηλής απόδοσης αναλύσεις των κυτταρικών πρωτεϊνών (Yip και Hutchens, 1992). Αυτή η τεχνολογία επιτρέπει στους ερευνητές να αναζητήσουν μεμονωμένους βιοδείκτες, μια ομάδα βιοδεικτών, ή ένα πρωτεομικό προφίλ. Στον SELDI, ένα δείγμα εφαρμόζεται στην επιφάνεια ενός τσιπ και όχι αναμεμιγμένο με ένα μόριο μήτρας όπως διεξάγεται στον MALDI. Το τσιπ στη συνέχεια τοποθετείται σε ένα θάλαμο κενού του οργάνου SELDI όπου τα πεπτίδια και οι μικρές πρωτεΐνες ιονίζονται και ταξιδεύουν προς έναν ανιχνευτή αντιστρόφως ανάλογα με τις μάζες τους.

4. Τεχνική Μικροσυστοιχίας Αντισώματος (Antibody Array)

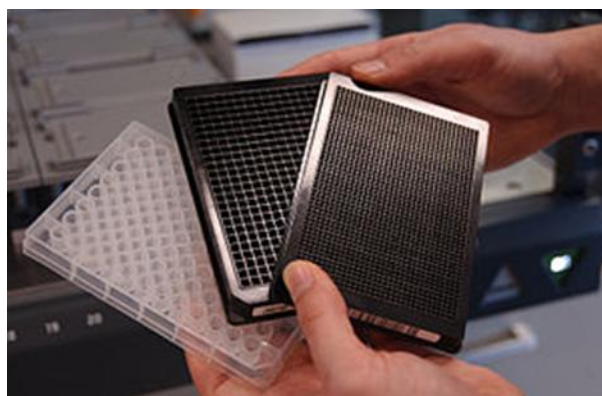
Μια μικροσυστοιχία αντισώματος (επίσης γνωστή ως συστοιχία αντισωμάτων) είναι μια ειδική μορφή πρωτεϊνικής μικροσυστοιχίας. Στην τεχνολογία αυτή, μία συλλογή αντισωμάτων σύλληψης κηλιδώνεται και στερεώνεται σε μια στερεή επιφάνεια όπως γυαλί, πλαστικό, μεμβράνη ή τσιπ πυριτίου, και ανιχνεύεται η αλληλεπίδραση μεταξύ του αντισώματος και του αντιγόνου στόχου του. Μικροσυστοιχίες αντισωμάτων χρησιμοποιούνται συχνά για την ανίχνευση της έκφρασης πρωτεΐνης από διάφορα βιολογικά υγρά, συμπεριλαμβανομένου του λύματος ορού, πλάσματος και κυττάρων ή ιστών. Οι συστοιχίες αντισωμάτων μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο για τη βασική έρευνα όσο και για τις ιατρικές και διαγνωστικές εφαρμογές. [1] [2] [3] [4]



Εικόνα 10: Δείγματα δημιουργιών μικροσυστοιχιών αντισωμάτων και ανιχνεύσεων.

Ιστορικό

Οι πρώτες προσεγγίσεις συστοιχιών προσπάθησαν να μικρύνουν τις βιοχημικές και ανοσοβιολογικές δοκιμασίες που συνήθως εκτελούνταν σε πλάκες με 96 φρεάτια. Ενώ οι συστοιχίες αντισωμάτων με πλάκες 96 φρεατίων έχουν ικανότητα υψηλής απόδοσης, η μικρή επιφάνεια σε κάθε φρεάτιο περιορίζει τον αριθμό των κηλίδων αντισωμάτων και επομένως τον αριθμό των αναλυτών που ανιχνεύονται. Άλλα στερεά υποστηρίγματα, όπως οι υαλοπίνακες και οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη συστοιχιών που θα μπορούσαν να φιλοξενήσουν μεγαλύτερα πάνελ αντισωμάτων [13]. Οι συστοιχίες που βασίζονται σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης είναι εύκαμπτες, εύχρηστες και έχουν αυξημένη ικανότητα δέσμευσης πρωτεϊνών αλλά είναι λιγότερο υποκείμενες σε υψηλή απόδοση ή αυτοματοποιημένη επεξεργασία. Οι γυάλινες αντικειμενοφόρες πλάκες, που παράγονται χημικά, επιτρέπουν την εκτύπωση κηλίδων αντισωμάτων μεγέθους μικρότερου του μικρολίτρου (μl), μειώνοντας την επιφάνεια της συστοιχίας χωρίς να θυσιάζεται η πυκνότητα κηλίδων. Αυτό με τη σειρά του μειώνει την ποσότητα του δείγματος που καταναλώνεται. Οι συστοιχίες που τοποθετούνται σε διαφανείς γυάλινες πλάκες, χάρη στην ομαλή και άκαμπτη δομή τους, μπορούν επίσης εύκολα να προσαρμοστούν στα συστήματα χειρισμού υγρών υψηλής απόδοσης.



Εικόνα 11: Πλάκες 96 φρεατίων.

Τα περισσότερα συστήματα συστοιχίας αντισωμάτων χρησιμοποιούν 1 από 2 μη ανταγωνιστικές μεθόδους ανοσοανίχνευσης: ανίχνευση με μονό αντίσωμα (με βάση την ετικέτα) και ανίχνευση με 2 αντισώματα (βασισμένη σε σάντουιτς). Η τελευταία μέθοδος, στην οποία η ανίχνευση αναλυτή απαιτεί τη δέσμευση 2 διαφορετικών αντισωμάτων (ένα αντίσωμα σύλληψης και ένα αντίσωμα αναφοράς, που το καθένα συνδέεται με έναν μοναδικό επίτοπο), προσδίδει μεγαλύτερη εξειδίκευση και χαμηλότερο σήμα υποβάθρου σε σύγκριση με την βασισμένη σε ετικέτα ανοσοανίχνευση (όπου μόνο ένα αντίσωμα σύλληψης χρησιμοποιείται και η ανίχνευση επιτυγχάνεται με χημική σήμανση όλων των πρωτεϊνών στο αρχικό δείγμα). Οι συστοιχίες αντισωμάτων με βάση το σάντουιτς συνήθως επιτυγχάνουν την υψηλότερη ακρίβεια και ευαισθησία (επίπεδα ng - pg) από οποιαδήποτε μορφή συστοιχίας. Η αναπαραγωγιμότητά των εν λόγω συστοιχιών επιτρέπει επίσης την ποσοτική ανάλυση [14] [15]. Λόγω της δυσκολίας ανάπτυξης αντιστοιχών ζευγών αντισωμάτων που είναι συμβατά με όλα τα άλλα αντισώματα στο πάνελ, οι μικρές συστοιχίες συχνά κάνουν χρήση της προσέγγισης σάντουιτς. Αντίθετα, οι συστοιχίες υψηλής πυκνότητας αναπτύσσονται ευκολότερα με χαμηλότερο κόστος χρησιμοποιώντας την προσέγγιση με βάση την ετικέτα-μεμονωμένου αντισώματος. Σε αυτή τη μεθοδολογία, χρησιμοποιείται ένα σύνολο ειδικών αντισωμάτων και όλες οι πρωτεΐνες σε ένα δείγμα επισημαίνονται άμεσα με φθορίζουσες χρωστικές ή απτένια.

Τα τελευταία δέκα χρόνια, η ευαισθησία της μεθόδου βελτιώθηκε με τη βελτιστοποίηση της επιφανειακής χημείας καθώς και με ειδικά πρωτόκολλα για τη χημική τους επισημάνση [27]. Επί

του παρόντος, η ευαισθησία των συστοιχιών αντισωμάτων είναι συγκρίσιμη με εκείνη της ELISA [28] [29] και οι συστοιχίες αντισωμάτων χρησιμοποιούνται τακτικά σε πειράματα για τη διαμόρφωση προφίλ σε δείγματα ιστών, δείγματα πλάσματος ή ορού και πολλούς άλλους τύπους δειγμάτων. Μια βασική εστίαση σε μελέτες που βασίζονται σε συστοιχία αντισωμάτων είναι η ανακάλυψη βιολογικών δεικτών, ειδικά για τον καρκίνο.[30] [31] [32] [33] [34] Το 2010, σε έρευνα σχετιζόμενη με τον καρκίνο, αναφέρθηκε η ανάπτυξη και εφαρμογή μιας συστοιχίας αντισωμάτων που περιλάμβανε 810 διαφορετικά αντισώματα που σχετίζονται με τον καρκίνο [35]. Επίσης, το 2010 χρησιμοποιήθηκε μια συστοιχία αντισωμάτων που περιείχε 507 κυτοκίνες, χημειοκίνες, αδιποκίνες, αυξητικούς παράγοντες, αγγειογόνους παράγοντες, πρωτεάσες, διαλυτούς υποδοχείς, διαλυτά μόρια προσκόλλησης και άλλες πρωτεΐνες για τον έλεγχο του ορού ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών και υγιών ατόμων και βρέθηκε σημαντική διαφορά στην έκφραση πρωτεϊνών μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών δειγμάτων [36]. Πιο πρόσφατα, οι συστοιχίες αντισωμάτων έχουν βοηθήσει στον προσδιορισμό συγκεκριμένων πρωτεϊνών ορού σχετιζόμενων με αλλεργία, τα επίπεδα των οποίων συνδέονται με το γλοίωμα και μπορούν να μειώσουν τα έτη κινδύνου πριν από τη διάγνωση [37]. Η δημιουργία προφίλ πρωτεϊνών με συστοιχίες αντισωμάτων έχει επίσης αποδειχθεί επιτυχής σε άλλες περιοχές εκτός από την έρευνα για τον καρκίνο, ειδικά σε νευρολογικές παθήσεις όπως η νόσος του Alzheimer. Ορισμένες μελέτες έχουν επιχειρήσει να εντοπίσουν πίνακες βιοδεικτών που μπορούν να διακρίνουν ασθενείς με Αλτσχάιμερ και σε πολλές μελέτες έχουν χρησιμοποιηθεί συστοιχίες αντισωμάτων. Ο Jaeger και οι συνάδελφοί του μέτρησαν σχεδόν 600 κυκλοφορικές πρωτεΐνες για να ανακαλύψουν τις βιολογικές οδούς και τα δίκτυα που επηρεάζονται από το Alzheimer. Σήμερα, η μεγαλύτερη εμπορικά διαθέσιμη διάταξη αντισωμάτων με βάση σάντουιτς ανιχνεύει 1000 διαφορετικές πρωτεΐνες. [39] Οι συστοιχίες αντισωμάτων χρησιμοποιούνται συχνά για την ανίχνευση της έκφρασης πρωτεΐνης από πολλούς τύπους δειγμάτων, αλλά και σε δείγματα με ποικίλα παρασκευάσματα. Ο Jiang και οι συνάδελφοί του απεικόνισαν όμορφα τη συσχέτιση μεταξύ συστοιχιών έκφρασης πρωτεΐνης σε δύο διαφορετικά παρασκευάσματα αίματος: τον ορό και τις αποξηραμένες κηλίδες αίματος [40]. Αυτά τα διαφορετικά παρασκευάσματα δείγματος αίματος αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας τρεις πλατφόρμες συστοιχίας αντισωμάτων: βασισμένη σε σάντουιτς, ποσοτικά και με βάση την ετικέτα. Βρέθηκε ισχυρή συσχέτιση στην έκφραση πρωτεΐνης, υποδηλώνοντας ότι οι ξηρές κηλίδες αίματος, οι οποίες είναι πιο βολικό, ασφαλές και φθινό μέσο λήψης αίματος, ειδικά σε μη νοσηλευτικές περιοχές δημόσιας υγείας, μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά στην

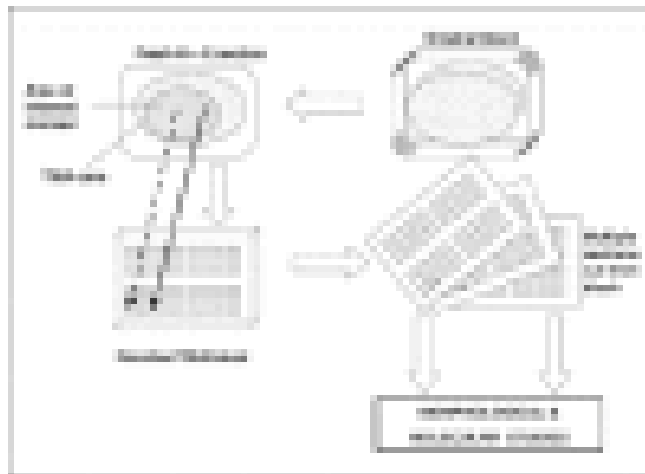
ανάλυση συστοιχίας αντισωμάτων για την ανακάλυψη βιολογικών δεικτών, τη διαμόρφωση πρωτεϊνικών προφίλ, την απεικόνιση, τη διάγνωση και τη θεραπεία ασθενειών.

5. Τεχνική Μικροσυστοιχίας Ιστού (Tissue Microarray)

Διαδικασία

Η μικροσυστοιχία είναι μια τεχνική για την οργάνωση μικρών ποσοτήτων βιολογικών δειγμάτων σε ένα στερεό υπόστρωμα.[70] Οι μικροσυστοιχίες ιστών είναι σύνθετα μπλοκ παραφίνης που κατασκευάζονται με εκχύλιση "βιοψιών" κυλινδρικών πυρηνικών ιστών από διαφορετικά μπλοκ παραφίνης - δοτών και οι οποίες επανεμβολιάζονται σε ένα μπλοκ - δέκτη(μικροσυστοιχίας) σε καθορισμένες συντεταγμένες συστοιχίας.[71]

Αρχικά, τα μπλοκ-δότες (κατά κανόνα αποθηκευμένα μπλοκ παραφίνης) ανακτώνται και διαχωρίζονται για να παράγουν πρότυπες μικροσκοπικές αντικειμενοφόρες πλάκες που χρωματίζονται με αιματοξυλίνη και ηωσίνη. Ένας έμπειρος παθολόγος εξετάζει τις διαφάνειες για να επισημάνει την περιοχή ενδιαφέροντος, η οποία είναι συνήθως μια περιοχή καρκίνου (Εικόνα 12), μετά την οποία τα δείγματα μπορούν να τοποθετηθούν καταλλήλως.[72]

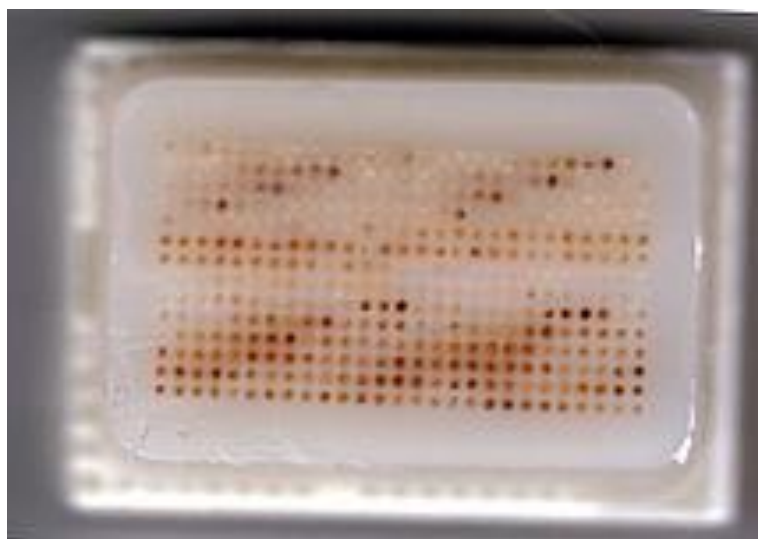


Εικόνα 12: Κατασκευή μικροσυστοιχίας ιστού (TMA).

Για την απόκτηση ενός πυρήνα ιστού από το μπλοκ δότη χρησιμοποιείται ένα όργανο μικροσυστοιχίας ιστού. Ο πυρήνας αυτός τοποθετείται έπειτα σε ένα κενό μπλοκ παραφίνης - το

μπλοκ υποδοχής (Εικόνα 11). Η εν λόγω συσκευή έχει σχεδιαστεί για να παράγει δείγματα κυκλικών κηλίδων με διάμετρο 0,6 mm σε απόσταση 0,7-0,8 mm. Η επιφάνεια κάθε δείγματος είναι 0,282 mm² ή σε ιατρική ορολογία, περίπου το μέγεθος 2-3 πεδίων υψηλής ισχύος. Ο αριθμός των κηλίδων σε μία πλάκα είναι μεταβλητός ανάλογα με το σχέδιο του πίνακα, το τρέχον μέγιστο που επιτυγχάνεται με τη βελόνα των 0,6 mm είναι περίπου 600 κηλίδες ανά πρότυπη πλάκα μικροσκοπίου(Εικόνα 12).

Ο πυρήνας τοποθετείται σε μια συγκεκριμένη συντεταγμένη (άξονας X-Y), η οποία καταγράφεται με ακρίβεια, συνήθως σε υπολογιστικό φύλλο, όπως το Microsoft Excel.[72]

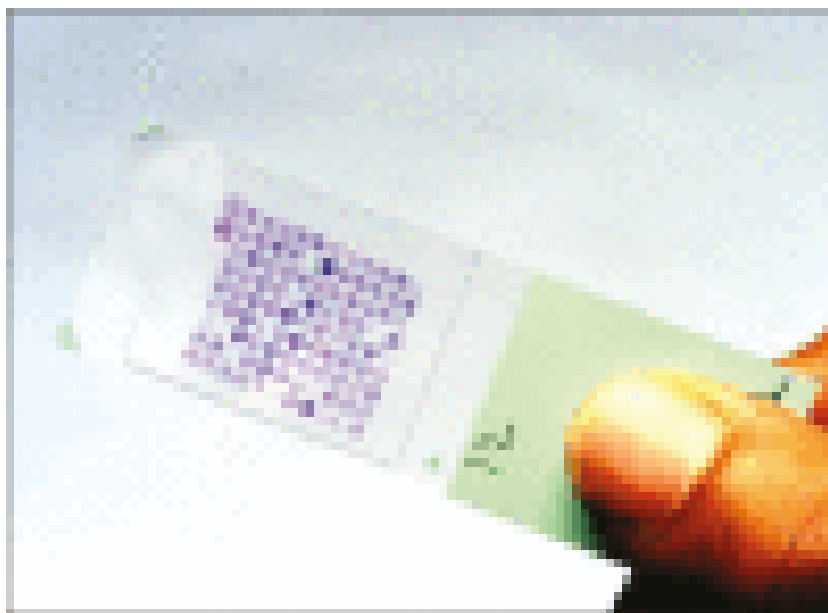


Εικόνα 13: Μπλοκ μικροσυστοιχίας ιστού διαμέτρου πυρήνα 0.6 mm.

Η διαδικασία δειγματοληψίας μπορεί στη συνέχεια να επαναληφθεί πολλές φορές από διαφορετικά μπλοκ - δότες μέχρι να τοποθετηθούν εκατοντάδες ή ακόμα και χιλιάδες πυρήνες σε ένα μπλοκ υποδοχής, παράγοντας το τελικό μπλοκ μικροσυστοιχίας ιστού (Εικόνα 13). Χρησιμοποιώντας ένα μικροτόμο, κόβονται τμήματα των 5 μm από τα μπλοκ μικροσυστοιχίας ιστών για τη δημιουργία πλακών μικροσυστοιχίας ιστών για μοριακές και ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις (Εικόνα 14) .



Εικόνα 14: Μπλοκ μικροσυστοιχίας ιστού.



Εικόνα 15: Μια διαφάνεια μικροσυστοιχίας ιστού.

Νέες τεχνολογίες βρίσκονται σε εξέλιξη και μπορούν να επιτρέψουν έως 2000 ή περισσότερες ενότητες ανά διαφάνεια. Χρησιμοποιώντας αυτή τη μέθοδο, μια ολόκληρη ακολουθία περιπτώσεων μπορεί να αναλυθεί με χρώση μόνο μίας ή δύο κύριων πλακών συστοιχίας, αντί να κηλιδώνονται εκατοντάδες συμβατικές διαφανείς πλάκες [73]. Ωστόσο, κάθε κηλίδα στην κύρια

συστοιχία που είναι παρόμοια με κηλίδες σε συμβατικές πλάκες διατηρείται για κάθε περίπτωση έτσι ώστε να μπορεί να γίνει αυστηρή στατιστική ανάλυση τόσο γρήγορα όσο γίνεται η ανάλυση των συστοιχιών .

Πλεονεκτήματα και εφαρμογές της μικροσυστοιχίας ιστών

Υπάρχουν πολλά πλεονεκτήματα της μικροσυστοιχίας ιστών έναντι των τυπικών τεχνικών, όπως:

Ενίσχυση ενός σπάνιου πόρου. Ένα τυπικό ιστολογικό τμήμα είναι πάχους περίπου 3-5 mm, με διακύμανση ανάλογα με τον παθολογοανατόμο ή τον τεχνικό. Μετά τη χρήση για την κύρια διάγνωση, τα τμήματα μπορούν να κοπούν 50-100 φορές, ανάλογα με τη φροντίδα και την ικανότητα του τεχνικού που τα διαχωρίζει. Έτσι, κατά μέσο όρο, κάθε αρχειοθετημένο μπλοκ μπορεί να αποδώσει υλικό για μέγιστο αριθμό 100 αναλύσεων [70]. Αν το ίδιο μπλοκ υποβληθεί σε επεξεργασία για βέλτιστη κατασκευή μικροσυστοιχιών, θα μπορούσε να υποβληθεί σε βιοψία βελόνης 200-300 φορές ή περισσότερο, ανάλογα με το μέγεθος του όγκου στο αρχικό μπλοκ. Μόλις κατασκευαστούν μικροσυστοιχίες ιστών, μπορούν να διαχωριστούν με τέτοιο τρόπο ώστε να μεγιστοποιηθεί ο αριθμός των τμημάτων που κόβονται από μια συστοιχία. Η διαδικασία διατομής χρησιμοποιεί ένα βοήθημα διατομής με ταινία που επιτρέπει την κοπή λεπτότερων τμημάτων. Η βέλτιστη τομή των συστοιχιών επιτυγχάνεται με διατομές 2-3 μm περίπου. Έτσι, αντί 50-100 συμβατικών τμημάτων ή δειγμάτων για ανάλυση από μία βιοψία ιστού, η τεχνική μικροσυστοιχίας θα μπορούσε να παράγει υλικό για 500.000 δοκιμασίες (υποθέτοντας 250 βιοψίες ανά τομή 2000 τομές 2,5 μm ανά τεμάχιο συστοιχίας 5 mm) ως και 0,6 mm δίσκων ιστού. Έτσι, αυτή η τεχνική ουσιαστικά ενισχύει (μέχρι και 10.000 φορές) τον περιορισμένο πόρο ιστού.

Ταυτόχρονη ανάλυση πολύ μεγάλου αριθμού δειγμάτων. Οι μικροσυστοιχίες ιστών παρέχουν δεδομένα υψηλής ποιότητας απόκτησης δεδομένων. Για παράδειγμα, εάν ένα μπλοκ μικροσυστοιχίας ιστού που περιέχει 1000 πυρήνες κόβεται 200 φορές, αυτό επιτρέπει 200.000 μεμονωμένες δοκιμές.[74][75]

Πειραματική ομοιομορφία. Με αυτή την τεχνολογία, κάθε δείγμα ιστού αντιμετωπίζεται με τον ίδιο τρόπο και οι μικροσυστοιχίες υποβάλλονται σε ένα ευρύ φάσμα τεχνικών, συμπεριλαμβανομένων

ιστοχημικών κηλίδων, ανοσολογικών κηλίδων με χρωματογόνο ή φθορίζουσα οπτικοποίηση, in situ υβριδισμό (συμπεριλαμβανομένου του mRNA ISH και FISH), ακόμη και τεχνικές μικροδιάταξης ιστών. Για κάθε ένα από αυτά τα πρωτόκολλα, οι συμβατικές διαδικασίες μπορούν να έχουν σημαντική μεταβλητότητα slide-to-slide που σχετίζεται με την επεξεργασία 300 διαφανειών (για παράδειγμα, 20 παρτίδες των 15 διαφανειών). Η μικροσυστοιχία ιστού επιτρέπει την ανάλυση ολόκληρης της ακολουθίας σε μία παρτίδα σε μια μόνο διαφάνεια. Έτσι, οι μεταβλητές όπως η ανάκτηση του αντιγόνου, η θερμοκρασία, οι χρόνοι επώασης, η διαδικασία πλύσης και η συγκέντρωση του αντιδραστηρίου τυποποιούνται για ολόκληρη την ακολουθία. [76-78]

Μειωμένος όγκος δοκιμής, χρόνος και κόστος. Καθώς απαιτείται μια πολύ μικρή ποσότητα αντιδραστηρίου (λίγα μL) για την ανάλυση μιας ολόκληρης ομάδας, απαιτούνται λιγότερα εργαστήρια για την εκτέλεση των πειραμάτων. Αυτή η μέθοδος αποδείχθηκε εξαιρετικά αποτελεσματική, μικρότερης διάρκειας και οικονομικά αποδοτική, ειδικά με δαπανηρά αντιδραστήρια [72]. Αυτό το πλεονέκτημα αυξάνει τη δυνατότητα χρήσης μικροσυστοιχιών ιστών στις διαδικασίες διαλογής.

Δεν καταστρέφει το αρχικό μπλοκ διάγνωσης και έτσι διατηρεί πολύτιμους ιστούς. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου το αρχικό μπλοκ πρέπει να επιστραφεί στον ασθενή ή στο ίδρυμα δωρεάς. Στις περιπτώσεις αυτές, το μπλοκ μπορεί να χρησιμοποιηθεί μερικές φορές χωρίς να καταστραφεί το αρχικό μπλοκ ιστών. Στη συνέχεια, κατά την επόμενη τομή, είναι ακόμα δυνατή η διάγνωση, ακόμη και αν έχει παρθεί ιστός για μελέτες βασισμένες σε συστοιχίες. Η μικροσυστοιχία ιστών έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα αποτελεσματικό και επαρκές εργαλείο για την αξιολόγηση προγραμμάτων διασφάλισης της ποιότητας, όπως ενδο-και διεργαστηριακές μεταβολές στις ανοσοϊστοχημικές και μοριακές μελέτες. Ένα μπλοκ μικροσυστοιχίας ιστού μπορεί να δημιουργηθεί από πολυάριθμα δείγματα ιστών, και από διαχωρισμένες και μη χρωματισμένες αντικειμενοφόρες πλάκες που διανέμονται σε διαφορετικά εργαστήρια, με κάθε εργαστήριο να κάνει ανοσοϊστοχημικές ή μοριακές εξετάσεις. Έτσι, η μικροσυστοιχία ιστών μπορεί να διευκολύνει την τυποποίηση της ανοσοϊστοχημικής, του φθορισμού στην in situ υβριδοποίηση και άλλων μοριακών αναλύσεων, έτσι ώστε τα αποτελέσματα να είναι αναπαράξιμα μεταξύ των

εργαστηρίων. Η μικροσυστοιχία των ιστών μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί σε εσωτερικό έλεγχο ποιότητας (π.χ. τριμηνιαία ή μηνιαία) για να διασφαλιστεί ότι δεν υπάρχει μεταβολή των αποτελεσμάτων χρώσης ή αναφοράς σε εργαστήριο. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη βελτιστοποίηση διαγνωστικών αντιδραστηρίων όπως μονόκλωνα αντισώματα και ανιχνευτές γονιδίων [79]. Πιστεύεται ότι η μικροσυστοιχία ιστού είναι μια βελτίωση σε σχέση με την τρέχουσα πρακτική που χρησιμοποιεί έναν ισχυρό θετικό έλεγχο ποιότητας.[80-82]

Η μικροσυστοιχία ιστών διευκολύνει την ταχεία μετάφραση των μοριακών ανακαλύψεων σε κλινικές εφαρμογές. Η τεχνική έχει εφαρμοστεί στην έρευνα όγκων (γλοιώματα, όγκοι του μαστού, καρκίνος του πνεύμονα μεταξύ άλλων). Η ανάπτυξη καινοτόμων τεχνολογιών βιοτσίπ έχει ανοίξει νέες δυνατότητες για τον υψηλού επιπέδου μοριακό προσδιορισμό των ανθρώπινων όγκων. Νέοι μοριακοί δείκτες που προκύπτουν από έρευνες έκφρασης υψηλής απόδοσης μπορούν να αναλυθούν σε μικροσυστοιχία όγκου ιστού [83]. Τα πρόσφατα ταυτοποιημένα γονίδια απαιτούν κλινική επικύρωση σε ιστοπαθολογικά δείγματα για οποιοδήποτε σημαντικό αποτέλεσμα. Αυτή η επικύρωση επιτυγχάνεται καλύτερα με μικροσυστοιχία ιστού, όπως φαίνεται στην ανάλυση δειγμάτων όγκου. Σύμφωνα με τα παραπάνω, μπορούν να οριστούν τρεις κατηγορίες μικροσυστοιχιών ιστών [72]: 1) με τις συστοιχίες πολλαπλών όγκων, δειγματίζονται πολλοί τύποι όγκων από ένα διαφορετικό σύνολο μπλοκ- δότη και διατάσσονται σε ένα μπλοκ-δέκτη μικροσυστοιχίας ιστού. Με αυτόν τον τύπο μικροσυστοιχίας ιστού, μια μεγάλη ομάδα όγκων μπορεί στη συνέχεια να εξεταστεί ταχέως για την παρουσία ή την απουσία νέων δεικτών [84-86], 2) με τις συστοιχίες εξέλιξης όγκων, οι μορφολογικές και μοριακές μεταβολές στα διάφορα στάδια εξέλιξης του όγκου ενός συγκεκριμένου τύπου όγκου, μπορούν να εκτιμηθούν σε μικροσυστοιχίες ιστού προόδου όγκου. Στον καρκίνο του προστάτη, για παράδειγμα, η κατασκευή μιας τέτοιας συστοιχίας θα περιλάμβανε δειγματοληψία κανονικού προστάτη, καλοήθους προστατικής υπερπλασίας, προστατικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας και διαφορετικών σταδίων καρκίνου του προστάτη, από εντοπισμένη ασθένεια έως μεταστατικό καρκίνο. Σε μία από τις σημαντικότερες μελέτες για τον καρκίνο του προστάτη πρόσφατα, χρησιμοποιήθηκε μια συστοιχία εξέλιξης του όγκου για να καταδείξει ότι η έκφραση μιας νέας πρωτεΐνης, της EZH2, συσχετίζεται με την επιθετικότητα της νόσου.[87], 3) στις συστοιχίες πρόγνωσης ή έκβασης ασθενούς, η συσχέτιση των δεδομένων που προέρχονται από μικροσυστοιχία ιστού με κλινική παρακολούθηση, για την εκτίμηση της πρόγνωσης ή της έκβασης του ασθενούς, είναι μείζονος σημασίας για τους κλινικούς ιατρούς και τους ασθενείς τους [72]. Ένα παράδειγμα είναι η μελέτη

της έκφρασης της πρωτεΐνης EZH2 στον καρκίνο του προστάτη. Εκτός από το όφελος του ως δείκτη της εξέλιξης του καρκίνου του προστάτη, αποδείχθηκε ότι ο βαθμός έκφρασης αυτής της πρωτεΐνης σχετίζεται με την έκβαση μετά από ριζική προστατεκτομή[87]. Ενώ η ισχυρή έκφραση της εν λόγω πρωτεΐνης σχετίστηκε με την επανεμφάνιση όγκου μετά από χειρουργική επέμβαση στο ένα τρίτο των ασθενών, η ασθενής χρώση της EZH2 βρέθηκε μόνο σε 9% των ατόμων με κλινική αποτυχία. Παρόμοιες συσχετίσεις έχουν περιγραφεί σε άλλα νεοπλάσματα.[88-90]

Αυτοματοποίηση

Έχουν γίνει προσπάθειες για την αυτοματοποίηση της διαδικασίας κατασκευής μικροσυστοιχιών ιστού. Διάφορες μηχανές είναι τώρα διαθέσιμες (αυτοματοποιημένη συστοιχία ιστών), η οποία μπορεί να συστοιχίσει μπλοκ μικροσυστοιχίας μονού και πολλαπλού ιστού σε μια ακόμη μικρότερη χρονική περίοδο από αυτή που εκτελείται με το χέρι [91]. Επιπλέον, οι ψηφιακές τεχνικές κατέχουν κεντρικό ρόλο στην κλινική ιατρική καθώς και στη βιοϊατρική έρευνα. Πρόσφατα η παθολογία άρχισε να αγκαλιάζει αυτήν την ψηφιακή επανάσταση. Η πρώτη εξέλιξη ήταν ένας ανιχνευτής μικροσκοπικών διαφανειών υψηλής ταχύτητας, ο οποίος μπορεί να μετατρέψει τις παραδοσιακές μικροσκοπικές αντικειμενοφόρες πλάκες σε ψηφιακές εικόνες που μπορούν να αποθηκευτούν, να ανακτηθούν, να μοιραστούν μέσω του διαδικτύου και, κυρίως, να αναλυθούν αλγοριθμικά. Η άλλη εξέλιξη ήταν η δημιουργία αλγορίθμων που μπορούν να αναγνωρίσουν και να ποσοτικοποιήσουν τα ανοσοϊστοχημικά μοτίβα χρώσης και συγκεκριμένα ιστολογικά χαρακτηριστικά, όπως το πυρηνικό μέγεθος και η μίτωση. Ένας τέτοιος αλγόριθμος μπορεί να εφαρμοστεί σε ψηφιακές εικόνες μικροσυστοιχιών. Η ψηφιακή παθολογία και η τεχνολογία απεικόνισης που μπορούν να ανιχνεύσουν μικροσυστοιχίες ιστών σε "εικονικές διαφάνειες" με υψηλή ανάλυση και που μπορούν να αναλύσουν τις εικόνες τους αλγοριθμικά θα επιταχύνουν την ανακάλυψη νέων προγνωστικών βιοδεικτών.[92]

4.2.3 Μεταβολομική προσέγγιση (Metabolomic Approach)

Ο όρος μεταβολομική έχει εισαχθεί πρόσφατα για να συμπεριλάβει την παγκόσμια ανάλυση όλων των μεταβολιτών σε ένα βιολογικό δείγμα. Ένας συναφής όρος, η μεταβονομική, εισήχθη για να αναφέρεται ειδικά στην ανάλυση των μεταβολικών αποκρίσεων σε φάρμακα ή ασθένειες. Η μεταβονομική έχει γίνει ένας σημαντικός τομέας έρευνας. Είναι η περίπλοκη βιολογική μελέτη

του συστήματος, που χρησιμοποιείται ως μέθοδος για τον εντοπισμό του βιοδείκτη για διάφορες ασθένειες. Γενικά, στις περισσότερες περιπτώσεις ασθενειών, μια μεταβολική οδός είχε ή έχει ενεργοποιηθεί ή απενεργοποιηθεί, γεγονός που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για ορισμένες ασθένειες. Οι οδοί παραγωγής σεροτονίνης, που ενεργοποιούνται σε ένα άτομο που έχει καταναλώσει πρόσφατα αλκοόλ για παράδειγμα, μπορεί να είναι ένας μεταβολικός δείκτης της πρόσφατης κατανάλωσης αλκοόλ.[94]

4.2.4 Λιπιδομική προσέγγιση (Lipidomics Approach)

Η λιπιδομική αναφέρεται στην ανάλυση των λιπιδίων. Δεδομένου ότι τα λιπίδια έχουν μοναδικές φυσικές ιδιότητες, είναι παραδοσιακά δύσκολο να μελετηθούν. Ωστόσο, οι βελτιώσεις σε νέες αναλυτικές πλατφόρμες κατέστησαν δυνατή την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση των περισσότερων λιπιδίων από ένα μόνο δείγμα. Οι τρεις βασικές πλατφόρμες που χρησιμοποιούνται για τη διαμόρφωση των προφίλ των λιπιδίων είναι οι: φασματομετρία μάζας, χρωματογραφία και πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός. Η φασματομετρία μάζας χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει τη σχετική συγκέντρωση και τη σύνθεση των μορίων των λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL) από εκχυλίσματα λιπιδίων που απομονώθηκαν από ασθενείς με στεφανιαία παράκαμψη και υγιείς εθελοντές. Διαπίστωσαν ότι τα μόρια HDL από ασθενείς με στεφανιαία παράκαμψη περιείχαν σημαντικά λιγότερη σφιγγομυελίνη σε σχέση με τη φωσφατιδυλοχολίνη και υψηλότερα τριγλυκερίδια σε σχέση με τους εστέρες χοληστερυλίου. Η λιπιδομική χρησιμοποιήθηκε επίσης για τη μελέτη της επίδρασης της ροσιγλιταζόνης, ενός αγωνιστή PPAR γ , στον μεταβολισμό των λιπιδίων σε ποντίκια. Η ροσιγλιταζόνη παρατηρήθηκε να μεταβάλλει τη σύνθεση των λιπιδίων σε διάφορα όργανα. Επίσης, αύξησε τη συσσώρευση τριγλυκεριδίων στο ήπαρ, αλλοίωσε ελεύθερα λιπαρά οξέα στον λιπώδη ιστό και στην καρδιά και μείωσε τα επίπεδα τριγλυκεριδίων στο πλάσμα.[95]

Έρευνα

Έχει εισαχθεί ένα πληροφοριακό-θεωρητικό πλαίσιο για την ανακάλυψη βιολογικών δεικτών, που ενσωματώνει πληροφορίες για τα βιολογικά υγρά και τους ιστούς. Αυτή η προσέγγιση εκμεταλλεύεται τη λειτουργική συνέργεια μεταξύ ορισμένων βιολογικών υγρών και ιστών, με την

πιθανότητα κλινικά σημαντικών ευρημάτων (δεν είναι δυνατή αν οι ιστοί και τα βιολογικά υγρά εξετάζονταν χωριστά). [93] Θεωρώντας τα βιο-υγρά των ιστών ως κανάλια πληροφοριών, εντοπίστηκαν σημαντικοί μεσολαβητές βιο-υγρών και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για κατευθυνόμενη ανάπτυξη κλινικών διαγνωστικών. Οι υποψήφιοι βιοδείκτες προβλέφθηκαν στη συνέχεια, με βάση τα κριτήρια μεταφοράς πληροφοριών σε διάφορους διαύλους βιο-υγρού ιστού. Σημαντικές σχέσεις βιο-υγρού ιστού μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να δοθεί προτεραιότητα στην κλινική επικύρωση των βιολογικών δεικτών.

Ex vivo (εξωσωματική) διέγερση αίματος

Η εξωσωματική διέγερση αίματος είναι η διαδικασία με την οποία οι ερευνητές μπορούν να αναλύσουν τους ανοσολογικούς βιοδείκτες των επιδράσεων των φαρμάκων σε υγιείς εθελοντές. Δείγματα αίματος (που λαμβάνονται από υγιείς εθελοντές) διεγείρονται στο εργαστήριο με σκοπό την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι μελέτες διέγερσης αίματος ex vivo, συνεπώς, επιτρέπουν την αξιολόγηση της επίδρασης μιας νέας ένωσης σε ένα "ζωντανό σύστημα" του οποίου το ανοσοποιητικό σύστημα έχει προσβληθεί [96]. Οι περισσότερες έρευνες που χρησιμοποιούν αυτή τη μέθοδο πραγματοποιούνται από τους κλινικούς ερευνητικούς οργανισμούς Φάσης I, επιτρέποντάς τους να συλλέγουν δείγματα αίματος και να τα αναλύουν αμέσως, ώστε να μην επιδεινωθούν.

Βιβλιογραφία-Κεφάλαιο 4

1. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. Biomarkers Definition Working Group Clin Pharmacol Therapeutics. 2001; 69:89–95.
2. WHO International Programme on Chemical Safety. Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation. 2001. Retrieved from <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm>
3. WHO International Programme on Chemical Safety. Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles. 1993. Retrieved from <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc155.htm>
4. Fleming TR, DeMets DL. Surrogate end points in clinical trials: Are we being misled? Ann Intern Med. 1996; 125:605–613. [PubMed: 8815760]
5. D'Agostino RB Jr. Debate: The slippery slope of surrogate outcomes. Curr Control Trials Cardiovasc Med. 2000; 1:76–78. [PubMed: 11714414]
6. DeGruttola D, Fleming TR, Lin DY, Coombs R. Perspective: Validating surrogate markers: Are we being naïve? J Infect Dis. 1997; 127:237–246.
7. Mitka, Mike. Controversies Surround Heart Drug Study. JAMA. 2008; 299(8):885–887.
8. Food and Drug Administration Modernization Act of 1997, 21CFR314.
9. The International Chronic Granulomatous Disease Cooperative Study Group. A Controlled Trial of Interferon Gamma to Prevent Infection in Chronic Granulomatous Disease. N Engl J Med. 1991; 324:509–16.
10. Ellenberg SS, Hamilton JM. Surrogate endpoints in clinical trials: cancer. Statistics in Medicine. 1989; 8:405–413.
11. Wittes J, Lakatos E, P Robstfield J. Surrogate endpoints in clinical trials: cardiovascular diseases. Statistics in Medicine. 1989; 8:415–425.
12. Food and Drug Administration. Innovation and Stagnation: Challenges and Opportunity on the Critical Path to New Medical Products (White Paper). 2004. updated 2010. Retrieved from <http://www.fda.gov/ScienceResearch/SpecialTopics/CriticalPathInitiative/ucm204289.htm>
13. Strimbu, Kyle, and Jorge A. Tavel. “What Are Biomarkers?” Current opinion in HIV and AIDS 5.6 (2010): 463–466. PMC .
14. H. W. Gu, Z. Z. Pan, B. W. Xi, B. E. Hainline, N. Shanaiah, V. Asiago, G. A. N. Gowda and D. Raftery, Nmr Biomed, 2009, 22, 826-833.
15. A. Sreekumar, L. M. Poisson, T. M. Rajendiran, A. P. Khan, Q. Cao, J. D. Yu, B. Laxman, R. Mehra, R. J. Lonigro, Y. Li, M. K. Nyati, A. Ahsan, S. Kalyana-Sundaram, B. Han, X. H. Cao, J. Byun, G. S. Omenn, D. Ghosh, S. Pennathur, D. C. Alexander, A. Berger, J. R. Shuster, J. T. Wei, S. Varambally, C. Beecher and A. M. Chinnaiyan, Nature, 2009, 457, 910- 914.

16. J. L. Spratlin, N. J. Serkova and S. G. Eckhardt, *Clin Cancer Res*, 2009, 15, 431-440.
17. X. W. Zhang, D. Wei, Y. Yap, L. Li, S. Y. Guo and F. Chen, *Mass Spectrometry Reviews*, 2007, 26, 403-431.
18. C. Abate-Shen and M. M. Shen, *Nature*, 2009, 457, 799-800.
19. J. L. Griffin and R. A. Kauppinen, *J Proteome Res*, 2007, 6, 498-505
20. M. Bogdanov, W. R. Matson, L. Wang, T. Matson, R. Saunders-Pullman, S. S. Bressman and M. F. Beal, *Brain*, 2008, 131, 389-396.
21. G. L. A. H. Jones, E. Sang, C. Goddard, R. J. Mortishire-Smith, B. C. Sweatman, J. N. Haselden, K. Davies, A. A. Grace, K. Clarke and J. L. Griffin, *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280, 7530-7539.
22. P. Espandiari, J. Zhang, B. A. Rosenzweig, V. S. Vaidya, J. Sun, L. Schnackenberg, E. H. Herman, A. Knapton, J. V. Bonventre, R. D. Beger, K. L. Thompson and J. Hanig, *Toxicological Sciences*, 2007, 99, 637-648.
23. Y. L. Wang, M. E. Bollard, J. K. Nicholson and E. Holmes, *J Pharmaceut Biomed*, 2006, 40, 375-381.
24. J. J. Xu, J. Zhang, J. Y. Dong, S. H. Cai, J. Y. Yang and Z. Chen, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 393, 1657-1668.
25. B. C. Chunt, *Drug Metabolism Reviews*, 2006, 38, 20-21.
26. J. C. Lindon, E. Holmes and J. K. Nicholson, *Febs J*, 2007, 274, 1140- 1151.
27. H. C. Keun and T. J. Athersuch, *Pharmacogenomics*, 2007, 8, 731-741.
28. H. C. Keun, *Pharmacol Therapeut*, 2006, 109, 92-106.
29. D. S. Wishart, *Trends Food Sci Tech*, 2008, 19, 482-493.
30. M. J. Gibney, M. Walsh, L. Brennan, H. M. Roche, B. German and B. van Ommen, *Am J Clin Nutr*, 2005, 82, 497-503.
31. W. N. P. Lee and V. L. W. Go, *J Nutr*, 2005, 135, 3027s-3032s.
32. B. Ruby, R. Robergs, G. Leadbetter, C. Mermier, T. Chick and D. Stark, *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 1996, 36, 246-254.
33. J. Shearer, G. Duggan, A. Weljie, D. S. Hittel, D. H. Wasserman and H. J. Vogel, *Diabetes Obes Metab*, 2008, 10, 950-958.
34. W. B. Dunn, N. J. C. Bailey and H. E. Johnson, *Analyst*, 2005, 130, 606- 625.
35. M. E. Lacey, R. Subramanian, D. L. Olson, A. G. Webb and J. V. Sweedler, *Chem Rev*, 1999, 99, 3133.
36. D. Raftery, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, 378, 1403-1404.
37. J. C. Lindon, *Drug Discov Today*, 2003, 8, 1021-1022.
38. R. A. Johnson and D. W. Wichern, Prentice Hall: Upper Saddle River, NJ, 1998, 5th edition.

39. D. I. Broadhurst and D. B. Kell, *Metabolomics*, 2006, 2, 171-196.
40. S. C. Zhang, C. Zheng, I. R. Lanza, K. S. Nair, D. Raftery and O. Vitek, *Anal Chem*, 2009, 81, 6080-6088.
41. J. L. Griffin and R. A. Kauppinen, *Febs J*, 2007, 274, 1132-1139.
42. O. Beckonert, H. C. Keun, T. M. D. Ebbels, J. G. Bundy, E. Holmes, J. C. Lindon and J. K. Nicholson, *Nature Protocols*, 2007, 2, 2692-2703.
43. M. D. Reily, L. C. Robosky, M. L. Manning, A. Butler, J. D. Baker and R. T. Winters, *J Am Chem Soc*, 2006, 128, 12360-12361
44. N. Shanaiah, M. A. Desilva, G. A. N. Gowda, M. A. Raftery, B. E. Hainline and D. Raftery, *P Natl Acad Sci USA*, 2007, 104, 11540-11544.
45. S. C. Brown, G. Kruppa and J. L. Dasseux, *Mass Spectrometry Reviews*, 2005, 24, 223-231.
46. J. H. Granger, A. Baker, R. S. Plumb, J. C. Perez and I. D. Wilson, *Drug Metabolism Reviews*, 2004, 36, 252-252.
47. G. Villas-Boas, S. Mas, M. Akesson, J. Smedsgaard and J. Nielsen, *Mass Spectrometry Reviews*, 2005, 24, 613-646.
48. I. D. Wilson, R. Plumb, J. Granger, H. Major, R. Williams and E. A. Lenz, *J Chromatogr B*, 2005, 817, 67-76.
49. H. W. Chen, A. Venter and R. G. Cooks, *Chemical Communications*, 2006, 2042-2044.
50. Z. Takats, J. M. Wiseman, B. Gologan and R. G. Cooks, *Science*, 2004, 306, 471-473.
51. R. B. Cody, J. A. Laramée and H. D. Durst, *Anal Chem*, 2005, 77, 2297- 2302.
52. J. K. Nicholson and I. D. Wilson, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 1989, 21, 449-501.
53. L. M. Smith, A. D. Maher, O. Cloarec, M. Rantalainen, H. R. Tang, P. Elliott, J. Stamler, J. C. Lindon, E. Holmes and J. K. Nicholson, *Anal Chem*, 2007, 79, 5682-5689.
54. Y. Tikunov, A. Lommen, C. H. R. de Vos, H. A. Verhoeven, R. J. Bino, R. D. Hall and A. G. Bovy, *Plant Physiology*, 2005, 139, 1125-1137.
55. O. Fiehn, *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2008, 27, 261-269.
56. H. W. Gu, H. W. Chen, Z. Z. Pan, A. U. Jackson, N. Talaty, B. W. Xi, C. Kissinger, C. Duda, D. Mann, D. Raftery and R. G. Cooks, *Anal Chem*, 2007, 79, 89-97.
57. E. C. Y. Chan, P. K. Koh, M. Mal, P. Y. Cheah, K. W. Eu, A. Backshall, R. Cavill, J. K. Nicholson and H. C. Keun, *J Proteome Res*, 2009, 8, 352-361
58. A. W. Strauss, *Journal of Clinical Investigation*, 2004, 113, 354-356.
59. S. Kochhar, D. M. Jacobs, Z. Ramadan, F. Berruex, A. Fuerhoz and L. B. Fay, *Anal Biochem*, 2006, 352, 274-281.

60. G. Lu, J. Wang, X. Zhao, H. Kong and G. Xu, *Chinese Journal of Chromatography*, 2006, 24, 109-113
61. C. L. Arthur and J. Pawliszyn, *Anal Chem*, 1990, 62, 2145-2148.
62. Z. Z. Pan and D. Raftery, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 387, 525-527.
63. J. K. Nicholson, *Mol Syst Biol*, 2006, -.
64. W. B. Dunn, N. J. C. Bailey and H. E. Johnson, *Analyst*, 2005, 130, 606- 625.
65. Beranova-Giorgianni, S. (2003) Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 22(5), 273-281
66. Stephen J Fey* and Peter Mose Larsen(2001)2D or not 2D. *Current Opinion in Chemical Biology* 2001, 5:26–33[[3]]
67. Wayne F Patton*, Birte Schulenberg and Thomas H Steinberg(2002) Two-dimensional gel electrophoresis; better than a poke in the ICAT?.*Current Opinion in Biotechnology*, 13:321–328[[4]]
68. David E. Garfin(2003)Two-dimensional gel electrophoresis: an overview.*Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 22, No. 5
69. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP: Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998, 4:844-847.
70. Jena M Giltnane, David L Rimm. Technology Insight: identification of biomarkders with tissue microarray technology. *Nature Clinical Practtice Oncology*. 2004 Dec;1(2):104–11
71. Wang H, Wang H, Zhang W, Fuller GN. Tissue microarrays: applications in neuropathology research, diagnosis, and education. *Brain Pathol*. 2002 Jan;12(1):95–107.
72. Shergill IS, Shergill NK, Arya M, Patel HR. Tissue microarrays: a current medical research tool. *Curr Med Res Opin*. 2004 May;20(5):707–12.
73. Olli-P Kallioniemi, Urs Wagner, Juha Kononen, Guido Sauter. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Human Molecular Genetics*. 2001;10(7):657–662
74. Mousses S, Kallioniemi A, Kauraniemi P, Elkahloun A, Kallioniemi OP. Clinical and functional target validation using tissue and cell microarrays. *Curr Opin Chem Biol*. 2002;6:97–101.
75. Rimm DL, Camp RL, Charette LA, Olsen DA, Provost E. Amplification of tissue by construction of tissue microarrays. *Exp Mol Pathol*. 2001;70:255–64.
76. Zhang D, Salto-Tellez M, Putti TC, Do E, Koay ES. Reliability of tissue microarrays in detecting protein expression and gene amplification in breast cancer. *Mod Pathol*. 2003;16(1):79–84.
77. Rimm DL, Camp RL, Charette LA, Costa J, Olsen DA, Reiss M. Tissue microarray: a new technology for amplification of tissue resources. *Cancer J*. 2001;7:24–31.

78. Rhodes A, Jasani B, Couturier J, et al. A formalin-fixed, paraffin-processed cell line standard for quality control of immunohistochemical assay of HER-2/neu expression in breast cancer. *Am J Clin Pathol.* 2002;117:81–89.
79. Kumar B, De Silva M, Venter DJ, Armes JE. *Tissue microarrays: a practical guide.* Pathology. 2004 Aug;36(4):295–300.
80. Robin L Parker, MD, David G Huntsman, MD, David W Lesack, MD, James B Cupples, MD, Dennis R Grant, MD, Majid Akbari, MD, Blake Gilks C., MD Assessment of Interlaboratory Variation in the Immunohistochemical Determination of Estrogen Receptor Status Using a Breast Cancer Tissue Microarray. *Am J Clin Pathol.* 2002;117(5):723–728.
81. Watanabe A, Cornelison R, Hostetter G. Tissue microarrays: applications in genomic research. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005 Mar;5(2):171–81.
82. Hsu FD, Nielsen TO, Alkushi A, Dupuis B, Huntsman D, Liu CL, van de Rijn M, Gilks CB. Tissue microarrays are an effective quality assurance tool for diagnostic immunohistochemistry. *Mod Pathol.* 2002 Dec;15(12):1374–80.
83. Zhang Xi-ping, Su Dan, Cheng Qi-hui. Advantages and applications of tissue microarray technology on cancer research. *Chinese Journal of Cancer Research.* 2003;15(1):74–78.
84. Wilson, J. J., Burgess, R., Mao, Y. Q., Luo, S., Tang, H., Jones, V. S., et al. (2015). Chapter Seven- Antibody Arrays in Biomarker Discovery. *Advances in clinical chemistry*, 69, 255-324.
85. Peter Schraml, 1, Juha Kononen, Lukas Bubendorf, Holger Moch, Heidi Bissig, Antonio Nocito, Michael J Mihatsch, Olli-P Kallioniemi, Guido Sauter. Tissue Microarrays for Gene amplification Surveys in Many Different Tumor Types. *Clinical Cancer Research.* 1999 Aug;5:1966–1975.
86. Marlena Schoenberg Fejzo, Dennis J Slamon. Frozen Tumor Tissue Microarray Technology for Analysis of Tumor RNA, DNA, and Proteins. *Am J Pathol.* 2001 Nov;159(5):1645–1650.
87. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RG, Otte AP, Rubin MA, Chinnaiyan AM. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature.* 2002 Oct 10;419(6907):572–3.
88. Moch H, Schraml P, Bubendorf L, Mirlacher M, Kononen J, Gasser T, Mihatsch MJ, Kallioniemi OP, Sauter G. High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am J Pathol.* 1999;154:981–986.
89. Rhodes DR, Sanda MG, Otte AP, Chinnaiyan AM, Rubin MA. Multiplex biomarker approach for determining risk of prostate-specific antigen-defined recurrence of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95:661–668.
90. De la Taille A, Viellefond A, Berger N, Boucher E, De Fromont M, Fondimare A, Molinié V, Piron D, Sibony M, Staroz F, Triller M, Peltier E, Thiounn N, Rubin MA. Evaluation of the interobserver

- reproducibility of Gleason grading of prostatic adenocarcinoma using tissue microarrays. *Hum Pathol.* 2003;34(5):444–449.
91. Matysiak BE, Brodzeller T, Buck S, French A, Counts C, Boorsma B, Datta MW, Kajdacsy-Balla AA. Simple, inexpensive method for automating tissue microarray production provides enhanced microarray reproducibility. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2003 Sep;11(3):269–73
 92. Sharangpani GM, Joshi AS, Porter K, Deshpande AS, Keyhani S, Naik GA, Gholap AS, Barsky SH. Semi-automated imaging system to quantitate estrogen and progesterone receptor immunoreactivity in human breast cancer. *J micros.* 2007 Jun;226(Pt 3):244–55.
 93. Alterovitz, G; Xiang, M; Liu, J; Chang, A; Ramoni, MF (2008). "System-wide peripheral biomarker discovery using information theory". *Pacific Symposium on Biocomputing:* 231–42. doi:10.1142/9789812776136_0024. PMID 18229689.
 94. Götz Schlotterbeck, Alfred Ross, Frank Dieterle, Hans Senn
Pharmacogenomics. Metabolic profiling technologies for biomarker discovery in biomedicine and drug development. 2006 Oct; 7(7): 1055–1075. doi: 10.2217/14622416.7.7.1055
 95. Zhao YY1, Cheng XL, Lin RC, Wei F. Lipidomics applications for disease biomarker discovery in mammal models. *Biomark Med.* 2015;9(2):153-68. doi: 10.2217/bmm.14.81.
 96. Edward R LaVallie1, Andrew J Dorner1, Michael E Burczynski. *Current Opinion in Pharmacology, (Use of ex vivo systems for biomarker discovery).* October 2008; Volume 8, Issue 5, , Pages 647–653

Μέρος III

Συμπεράσματα

Κεφάλαιο 5 :Συμπεράσματα και μελλοντική έρευνα

Με το πέρας της ολοκλήρωσης της χαρτογράφησης του ανθρώπινου γονιδιώματος, πριν από μια εικοσαετία περίπου, βιολόγοι και ερευνητές προέβησαν στην εκτίμηση της Επιστήμης της Βιοπληροφορικής ως το σημαντικότερο εργαλείο για την αξιολόγηση φυσιολογικών και παθοφυσιολογικών επιπτώσεων της γενετικής ποικιλομορφίας. Ωστόσο, τίποτα από όλα αυτά δεν θα πραγματοποιούνταν χωρίς την αρωγή εξελιγμένων στατιστικών αλγορίθμων όπως είναι η ανάλυση της ακολουθίας του DNA (DNA sequencing), η γονιδιακή έκφραση βασισμένη σε συστοιχίες μικροδιατάξεων (microarraybasedgenome-wideexpressionanalysis) καθώς και η ακολουθιακή ανάλυση του γονιδιώματος (Genomic Sequence Analysis). Γενικά, η επιστήμη της Βιοπληροφορικής θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι συγκεντρώνει τη χρήση των μαθηματικών, στατιστικών και υπολογιστικών μεθόδων για την επεξεργασία και ανάλυση βιολογικών δεδομένων. Οι πρόσφατες εξελίξεις στο χώρο της Βιοπληροφορικής καταδεικνύουν ότι η ανάλυση των δεδομένων και η ερμηνεία τους είναι βήματα που καθορίζουν το συνολικό ρυθμό απόκτησης της βιολογικής γνώσης και κατανόησης των θεραπευτικών διαδικασιών. Καθίσταται σαφές, ότι τόσο η ανάπτυξη όσο και η χρήση της Βιοπληροφορικής σχετίζονται με τη θεραπεία των αναπνευστικών διαταραχών και όχι μόνο, καθώς συμβάλλουν στην μελέτη και τον σχεδιασμό νέων φαρμάκων.

Η αποκωδικοποίηση των γονιδίων του ανθρώπινου οργανισμού και κατ' επέκταση των γονιδίων που αφορούν το αναπνευστικό σύστημα, θα βοηθήσει τους ερευνητές να προβλέψουν ποιοι οργανισμοί είναι ευάλωτοι σε συγκεκριμένες ασθένειες καθώς και το είδος των θεραπευτικών φαρμάκων στα οποία μπορεί να είναι δεκτικοί. Ενώ η χαρτογράφηση του γονιδιώματος του ποντικού ήταν ένα τεράστιο έργο, ήταν ένα μικρό σκαλοπάτι για την χαρτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος.

Η σύγκριση των αλληλουχιών του ανθρώπινου γονιδιώματος με το γονιδίωμα άλλων ποικίλων οργανισμών, όπως ο πίθηκος, με τη βοήθεια του αλγορίθμου BLAST κατέδειξε ότι υπάρχει, σε μεγάλο ποσοστό(έως και 99%), ομοιότητα στην αλληλουχία των γονιδίων που προκαλούν συγκεκριμένες αναπνευστικές ασθένειες. Αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει μία αρχή για μελλοντικές έρευνες και μελέτες στα εν λόγω γονίδια των παραπάνω οργανισμών των οποίων οι μεταλλάξεις προκαλούν αναπνευστικές διαταραχές.

Αν και οι περισσότερες αναπνευστικές ασθένειες δεν είναι ιάσιμες, η επιστήμη της Βιοπληροφορικής σε συνδυασμό με τις ολοένα αναπτυσσόμενες μεθόδους εύρεσης βιοδεικτών φαίνεται πως θα καθοδηγήσουν και θα συντονίσουν τις ερευνητικές προσπάθειες με σκοπό την πρόγνωση, τη διάγνωση και τελικά την εξατομικευμένη ιατρική θεραπεία που είναι και ο απώτερος στόχος όλων των Επιστημών Ιατρικής.