



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΛΙΚΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Μαθηματική Προτυποποίηση του Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού σε *in Vitro* Σύστημα Οξείας Λεμφοβλαστικής Λευχαιμίας υπό την Επίδραση Γλυκοκορτικοειδών

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Υπό:

Άννας Σιγαλού

Υποψηφίας Μηχανολόγου Μηχανικού

Επιβλέπων: Δ. Δ. Κουτσούρης

ΑΘΗΝΑ 2018



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΛΙΚΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Μαθηματική Προτυποποίηση του Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού σε *in Vitro* Σύστημα Οξείας Λεμφοβλαστικής Λευχαιμίας υπό την Επίδραση Γλυκοκορτικοειδών

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Υπό:

Άννας Σιγαλού

Υποψηφίας Μηχανολόγου Μηχανικού

Επιβλέπων: Δ. Δ. Κουτσούρης

ΑΘΗΝΑ 2018

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την .../.../2018.

.....
.. Κουτσούρης
ιθηγητής ΕΜΠ

.....
Γ. Ματσόπουλος
Αναπληρωτής Καθηγητής

.....
Λ. Αλεξόπουλος
ουρος Καθηγητής ΕΜΠ

Άννα Σιγαλού
ρία Διπλωματούχος Μηχανολόγος
Μηχανικός ΕΜΠ



Η παρούσα εργασία τελεί υπό την άδεια **Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0)**. Για τη χρήση της εργασίας είναι απαραίτητη η αναφορά τόσο στη συγγραφέα (Σιγαλού Άννα) όσο και στη Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Η/Υ του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Οι ενδιαφερόμενοι έχουν το δικαίωμα αντιγραφής, τροποποίησης και διανομής του υλικού με οποιοδήποτε μέσο, για κάθε σκοπό.

Για περαιτέρω πληροφορίες σχετικά με την άδεια, παραπέμπουμε στην ιστοσελίδα: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοϊατρικής Τεχνολογίας της Σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Ε.Μ.Π. του Δημητρίου Δ. Κουτσούρη κατά το ακαδημαϊκό έτος 2017-18, και σε συνεργασία με τον υποψήφιο διδάκτορα του ΕΜΠ Γ. Λάμπρου, σε παλαιότερη εργασία του οποίου βασίστηκε και η παρούσα διπλωματική.

Μετά από μια πορεία 8,5 χρόνων έχω φυσικά πολλούς ανθρώπους να ευχαριστήσω. Όσες και όσους διαβάζαμε μαζί τα τελευταία χρόνια στην πρυτανεία, σε καφέ, σε σπίτια κάνοντας τις φορτωμένες εξεταστικές πιο υποφερτές. Τις συντρόφισσες και τους συντρόφους από τα κινήματα για τα όσο έμαθα κατά την συνύπαρξη μαζί τους σε πορείες, συνελεύσεις και καταλήψεις. Τους γονείς μου για την υποστήριξη τους που υπήρξε τεράστια όλον αυτόν τον καιρό. Και φυσικά τους φίλους και τις φίλες μου που συνέβαλαν στο να μην καταλάβω ποτέ πέρασε τόσος καιρός, και που χάρη σ' αυτούς αυτός ο χρόνος δεν ήταν χαμένος.

Περίληψη

Αρχικά δίνεται ένα βασικό υπόβαθρο εννοιών και κάποιες απαραίτητες πληροφορίες σχετικά με την κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε, τα πειράματα, τον πειραματικό εξοπλισμό και τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν για την επεξεργασία των πειραματικών αποτελεσμάτων ενώ παρατίθεται και ένα προτεινόμενο μαθηματικό μοντέλο για την περιγραφή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα και γίνεται περιγραφική στατιστική ανάλυση αυτών, κατά την οποία μελετάται η ανάπτυξη των κυτταρικών πληθυσμών (τόσο των συνολικών, όσο και των επιμέρους -δηλαδή αυτών που βρίσκονται στην εκάστοτε φάση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού) υπό την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων πρεδνιζολόνης. Κατά την ανάλυση αυτή σχολιάζεται η συμπεριφορά των κυττάρων αυτών και συγκρίνονται μεταξύ τους οι πληθυσμοί που πολλαπλασιάστηκαν σε περιβάλλοντα με διαφορετικές συγκεντρώσεις πρεδνιζολόνης, καθώς και οι πληθυσμοί υπό την επίρεια πρεδνιζολόνης σε σχέση με το πείραμα ελέγχου.

Μετά τη στατιστική ανάλυση, η ανάπτυξη των κυτταρικών πληθυσμών προσεγγίζεται από γνωστές συναρτήσεις και υπολογίζονται ενδεικτικά οι τιμές των σταθερών συντελεστών για συγκεκριμένες περιπτώσεις.

Έπειτα γίνεται μια προσπάθεια βελτιστοποίησης του προτεινόμενου μαθηματικού μοντέλου καθώς και εκτίμηση των παραμέτρων αυτού. Παρουσιάζονται ενδεικτικά διαγράμματα για συγκεκριμένα πειραματικά δεδομένα. Τέλος αποτιμούνται τα συμπεράσματα την στατιστικής ανάλυσης καθώς και η καταλληλότητα του βελτιστοποιημένου μαθηματικού μοντέλου.

Λέξεις κλειδιά: μαθηματική προτυποποίηση, κυτταρικός πολλαπλασιασμός, στοχαστικό μοντέλο, ανθεκτικότητα σε πρεδνιζολόνη

Abstract

Initially, some necessary information is given about the terminology being used throughout this thesis, as well as information about the cell culture, the experimental procedure and the tools used to analyse the experimental data. Also, a suggested mathematical model for the description of cell proliferation is presented.

Next, the experimental results are presented, along with their descriptive statistical analysis, during which the following is discussed: the cell proliferation of both the total cell population and the populations of cells in specific stages of the cell cycle, the comparison between cell cultures under various prednisolone concentrations and the comparison between cell cultures under the influence of prednisolone and the control experiment.

Following the statistical analysis, the cell growth curves are approached by known functions and their parameters are determined for specific examples.

Then an optimisation of the mathematical model is attempted, as well as the definition of its parameters. Some indicative graphs are constructed, using some of the experimental data previously discussed, as examples. Finally, the statistical analysis' conclusions and the optimised mathematical model are discussed and evaluated.

Keywords: mathematical modelling, cell proliferation, stochastic model, cortisone resistance

Πίνακας Περιεχομένων

Ευχαριστίες.....	IV
Περίληψη	V
Abstract.....	VI
Πίνακας Περιεχομένων.....	VII
Πίνακας Εικόνων	IX
Πίνακας Διαγραμμάτων.....	X
Κατάλογος Πινάκων	XI
Πίνακας Εξισώσεων.....	XII
Πίνακας Συστημάτων Εξισώσεων.....	XIV
1 Εισαγωγή.....
1.1 Στοιχεία Κυτταρικής Βιολογίας	1
1.1.1 Κυτταρική μεμβράνη	2
1.1.2 Κυτταρικός σκελετός	3
1.1.3 Κυτταρικά οργανίδια ³	
1.2 Ο Κυτταρικός Κύκλος.....	4
1.3 Λευχαιμία και Λευχαιμικά Κύτταρα.....	7
1.3.1 Τα κύτταρα του αίματος.....	7
1.3.2 Λευχαιμικά κύτταρα ⁸	
1.4 Τα Γλυκοκορτικοειδή.....	10
1.5 Σκοπός	11
2 Υλικό και Μέθοδος.....
2.1 Κυτταρική Σειρά και Επώαση με Πρεδνιζολόνη.....	12
2.2 Μετρήσεις Κυτταρικού Πληθυσμού	12
2.3 Συλλογή Δειγμάτων για Βιοχημικές Μετρήσεις	12
2.4 Μελέτη με κυτταρομετρία ροής	13
2.5 Ανάλυση Δεδομένων	13
2.6 Μαθηματικό Μοντέλο	13
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	17
3.1 Περιγραφική Στατιστική	17
3.1.1. Συνολικός Πληθυσμός.....	17
3.1.2. Επιμέρους Πληθυσμοί.....	26

3.2	Προσέγγιση Κυτταρικών Πληθυσμών με Γνωστές Συναρτήσεις.....	30
3.2.1.	Συνολικός πληθυσμός.....	30
3.2.2.	Επιμέρους πληθυσμοί.....	39
3.3	Βελτιστοποίηση μαθηματικού μοντέλου.....	40
3.4	Προσδιορισμός Μεταβλητής k	41
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	46
5	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	47
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	48
7	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	49
7.1	Σύμβολα	49
7.2	Πίνακες	49

Πίνακας Εικόνων

Εικόνα 1. Τυπικό ευκαρυωτικό κύτταρο.	1
Εικόνα 2. Η κυτταρική μεμβράνη.....	2
Εικόνα 3. Κυτταρικός Κύκλος.....	5
Εικόνα 4. Μίτωση ευκαρυωτικού κυττάρου.....	6
Εικόνα 5. Τα κύτταρα του αίματος.	7
Εικόνα 6. Λευχαιμικά κύτταρα.....	8
Εικόνα 7. Σχηματική αναπαράσταση του προσεγγιστικού μοντέλου του κυτταρικού πληθυσμού, με τις πιθανές εξελίξεις της κάθε φάσης σε κάθε μετάβαση (προσαρμοσμένο από <i>Lambrou et al. 2010 (19)</i>).	14

Πίνακας Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Ανάπτυξη του κυτταρικού πληθυσμού συναρτήσει του χρόνου στο πείραμα ελέγχου.	17
Διάγραμμα 2: Ανάπτυξη κυτταρικού πληθυσμού συναρτήσει του χρόνου υπό 700μM prednisolone.	18
Διάγραμμα 3: Ανάπτυξη κυτταρικού πληθυσμού συναρτήσει του χρόνου υπό 350μM prednisolone.....	18
Διάγραμμα 4: Ανάπτυξη κυτταρικού πληθυσμού συναρτήσει του χρόνου υπό 175μM prednisolone.	18
Διάγραμμα 5: Ανάπτυξη κυτταρικού πληθυσμού συναρτήσει του χρόνου υπό 100μM prednisolone.	19
Διάγραμμα 6: Ανάπτυξη κυτταρικού πληθυσμού συναρτήσει του χρόνου υπό 44μM prednisolone.	19
Διάγραμμα 7: Ανάπτυξη κυτταρικού πληθυσμού συναρτήσει του χρόνου υπό 22μM prednisolone.	19
Διάγραμμα 8: Ανάπτυξη κυτταρικού πληθυσμού συναρτήσει του χρόνου υπό 10μM prednisolone.	20
Διάγραμμα 9: Ανάπτυξη κυτταρικού πληθυσμού συναρτήσει του χρόνου υπό 5μM prednisolone.	20
Διάγραμμα 10: Ανάπτυξη κυτταρικού πληθυσμού συναρτήσει του χρόνου υπό 1μM prednisolone.	20
Διάγραμμα 11: Ανάπτυξη κυτταρικού πληθυσμού συναρτήσει του χρόνου υπό 100nM prednisolone.....	21
Διάγραμμα 12: Ανάπτυξη κυτταρικού πληθυσμού συναρτήσει του χρόνου υπό 10nM prednisolone.....	21
Διάγραμμα 13: Σύγκριση ανάπτυξης των κυτταρικών πληθυσμών υπό την επίδραση πρεδνιζολόνης.	22
Διάγραμμα 14: Συνολική ανάπτυξη πληθυσμού μετά από 72 ώρες και στατιστικά στοιχεία.	25
Διάγραμμα 15: Μείωση ρυθμού ανάπτυξης πληθυσμού μετά από 72 ώρες και στατιστικά στοιχεία	25
Διάγραμμα 16: Ανάπτυξη του κυτταρικού πληθυσμού στη φάση G_1 συναρτήσει του χρόνου.....	27
Διάγραμμα 17: Ανάπτυξη του κυτταρικού πληθυσμού στη φάση S συναρτήσει του χρόνου.....	27
Διάγραμμα 18: Ανάπτυξη του κυτταρικού πληθυσμού στη φάση G_2 συναρτήσει του χρόνου.....	27
Διάγραμμα 19: Ανάπτυξη του αποπωπτικού (CD) κυτταρικού πληθυσμού συναρτήσει του χρόνου.....	28
Διάγραμμα 20: Ανάπτυξη συνολικού πληθυσμού συναρτήσει του χρόνου	28
Διάγραμμα 21: Προσέγγιση με γραμμική συνάρτηση.....	31
Διάγραμμα 22: Προσέγγιση με εκθετική συνάρτηση.....	32
Διάγραμμα 23: Προσέγγιση με συνάρτηση 3 ^{ου} βαθμού.	33
Διάγραμμα 24: Προσέγγιση με συνάρτηση 4 ^{ου} βαθμού.	34
Διάγραμμα 25: Σύγκριση καμπύλης πειραματικών δεδομένων με καμπύλες γνωστών συναρτήσεων.	35
Διάγραμμα 26: Προσαρμογή πειραματικών αποτελεσμάτων στην σιγμοειδή καμπύλη <i>Gompertz</i>	37
Διάγραμμα 27: Μεταβολή της παραμέτρου k_n συναρτήσει του χρόνου.....	43
Διάγραμμα 28: Προσέγγιση k_n με πολυώνυμο 6 ^{ου} βαθμού	45

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1. Κλίσεις ευθύγραμμων τμημάτων διαγραμμάτων για κάθε πειραματική διάταξη.	23
Πίνακας 2. Αλλαγή στις κλίσεις των ευθύγραμμων τμημάτων κάθε καμπύλης, όπου α , γ , δ , ε , η αρίθμηση των τμημάτων αυτών.	24
Πίνακας 3: Τιμές των μεταβλητών k_n	42
Πίνακας 4. Σύμβολα εξισώσεων μαθηματικού μοντέλου.....	49
Πίνακας 5. Πίνακας μέσων όρων πειραματικών αποτελεσμάτων	49
Πίνακας 6. Πίνακας απόλυτων πληθυσμών κυττάρων σε κάθε φάση για το δείγμα έλεγχο	49

Πίνακας Εξισώσεων

$$N_t = N_{G1,t} + N_{S,t} + N_{G2,t} + N_{CD,t}, \text{ Εξίσωση 1 (19)} \dots\dots\dots 14$$

$$N_{p_x,t+1} = N_{p_y,t} k_y + N_{p_z,t} k_z, \text{ Εξίσωση 2 (19)} \dots\dots\dots 15$$

$$k = a_0 + a_1 \cos(N_{p_{y,z,t}} N_{p_x,t+1}) + a_2 \sin(N_{p_{y,z,t}} N_{p_x,t+1}), \text{ Εξίσωση 3 (19)} \dots\dots\dots 16$$

$$\dot{N} = Kf(N), \text{ Εξίσωση 4} \dots\dots\dots 30$$

$$f_3(t) = N(t) = N_0 + ae^{-be^{-ct}}, \text{ Εξίσωση 5 όπου } \begin{matrix} a = 3.52872 \\ b = 2.20906 \\ c = 0.037019 \end{matrix} \text{ οι τιμές των συντελεστών για την περίπτωση του } N_0 = 1.28$$

$$\text{δείγματος ελέγχου, } \begin{matrix} a = 3,70935 \\ b = 2,02312 \\ c = 0,03574 \end{matrix} \text{ οι τιμές των συντελεστών για την περίπτωση με } 44\mu\text{M προδνιζολόνης και } N_0 = 1.04$$

$$\begin{matrix} a = 3.71866 \\ b = 2,03534 \\ c = 0,02910 \end{matrix} \text{ οι τιμές των συντελεστών για την περίπτωση με } 700\mu\text{M προδνιζολόνης.} \dots\dots\dots 36$$

$$N_0 = 1.10$$

$$N_{G1}(t) = ae^{-be^{ct}}, \text{ Εξίσωση 6, όπου } \begin{matrix} a = 2100.855 \\ b = 10.32616 \\ c = 0.002685 \end{matrix} \dots\dots\dots 39$$

$$N_S(t) = ae^{-be^{ct}}, \text{ Εξίσωση 7, όπου } \begin{matrix} a = 1132.118 \\ b = 9.218758 \\ c = 0.002815 \end{matrix} \dots\dots\dots 39$$

$$N_{CD}(t) = ae^{-be^{ct}}, \text{ Εξίσωση 8, όπου } \begin{matrix} a = 225618.5 \\ b = 16.20877 \\ c = 0.002691 \end{matrix} \dots\dots\dots 39$$

$$\dot{N} = kN, \text{ Εξίσωση 9, όπου: } N = \begin{bmatrix} N_{G1} \\ N_S \\ N_{G2} \\ N_{CD} \end{bmatrix}, \dot{N} = \begin{bmatrix} \dot{N}_{G1} \\ \dot{N}_S \\ \dot{N}_{G2} \\ \dot{N}_{CD} \end{bmatrix} = dt \begin{bmatrix} N_{G1} \\ N_S \\ N_{G2} \\ N_{CD} \end{bmatrix}, k = \begin{bmatrix} k_1 & 0 & k_8 & 0 \\ k_2 & k_4 & 0 & 0 \\ 0 & k_5 & k_7 & 0 \\ k_3 & k_6 & k_9 & 1 \end{bmatrix} \dots\dots\dots 40$$

$$N(t) = e^{kt} N(0), \text{ Εξίσωση 10, όπου } e^{kt} = \left[I + \sum_i \frac{k^i t^i}{i!} \right] \text{ ένας πίνακας } n \times n \dots\dots\dots 40$$

Πίνακας Συστημάτων Εξισώσεων

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

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

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

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

Σύστημα Εξισώσεων 1 (19). 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

$$k_{10} = 1$$

Σύστημα Εξισώσεων 2 (19). 16

$$k_1 = 2 * 10^{-4} t^2 - 1.4 * 10^{-2} t + 6.387 * 10^{-1}$$

$$k_2 = 2 * 10^{-4} t^2 - 2.12 * 10^{-2} t + 12.252 * 10^{-1}$$

$$k_3 = 0.8 * 10^{-4} t^2 - 0.55 * 10^{-2} t + 2.328 * 10^{-1}$$

$$k_4 = 3 * 10^{-4} t^2 - 2.89 * 10^{-2} t + 16.34 * 10^{-1}$$

$$k_5 = -2 * 10^{-4} t^2 + 0.69 * 10^{-2} t + 7.644 * 10^{-1}$$

$$k_6 = 1 * 10^{-4} t^2 - 0.92 * 10^{-2} t + 2.463 * 10^{-1}$$

$$k_7 = -2 * 10^{-4} t^2 + 0.6 * 10^{-2} t + 10.609 * 10^{-1}$$

$$k_8 = 3 * 10^{-4} t^2 - 2.42 * 10^{-2} t + 9.867 * 10^{-1}$$

$$k_9 = 2 * 10^{-4} t^2 - 1.18 * 10^{-2} t + 2.171 * 10^{-1}$$

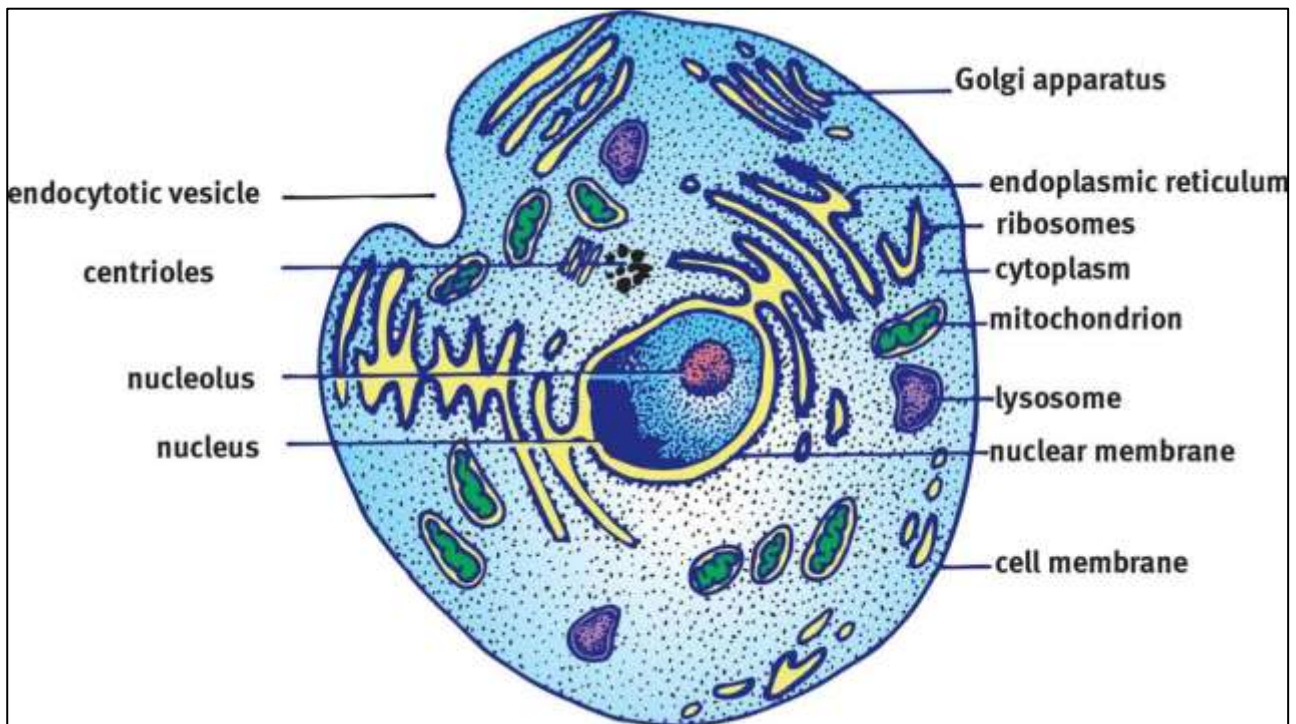
Σύστημα Εξισώσεων 3 44

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Στοιχεία Κυτταρικής Βιολογίας

Το *κύτταρο* αποτελεί την βασική δομική και λειτουργική μονάδα της έμβιας ύλης. Πρόκειται για σαφώς σχηματισμένες δομές αποτελούμενες από πληθώρα δομικών στοιχείων: κυτταρική μεμβράνη, πρωτεΐνες, ριβοσώματα, DNA, RNA κ.α. Τα κύτταρα διακρίνονται σε *προκαρυωτικά* και *ευκαρυωτικά* (κύτταρα με σαφώς σχηματισμένο πυρήνα και άλλα δομικά όργανα, καθώς και δίκτυα δομικών πρωτεϊνών).

Τα *ευκαρυωτικά κύτταρα* (**Εικόνα 1**) απαντώνται στους πολυκύτταρους οργανισμούς. Πρόκειται για κύτταρα μεγαλύτερα των προκαρυωτικών, με πιο καθορισμένη εσωτερική δομή και μεγαλύτερη πληθώρα κυτταρικών στοιχείων. Περιβάλλονται από μια *διπλή κυτταρική* (ή *πλασματική*) *μεμβράνη*, εσωτερικά της οποίας βρίσκεται το κυτταρικό περιβάλλον ή *κυτταρόπλασμα* (ή *κυτόπλασμα*). Μέσα σε αυτό υπάρχει ο *κυτταρικός πυρήνας*, διάφορα άλλα *οργανίδια*, ο *κυτταρικός σκελετός* και κάποιες ελεύθερες πρωτεΐνες [1].



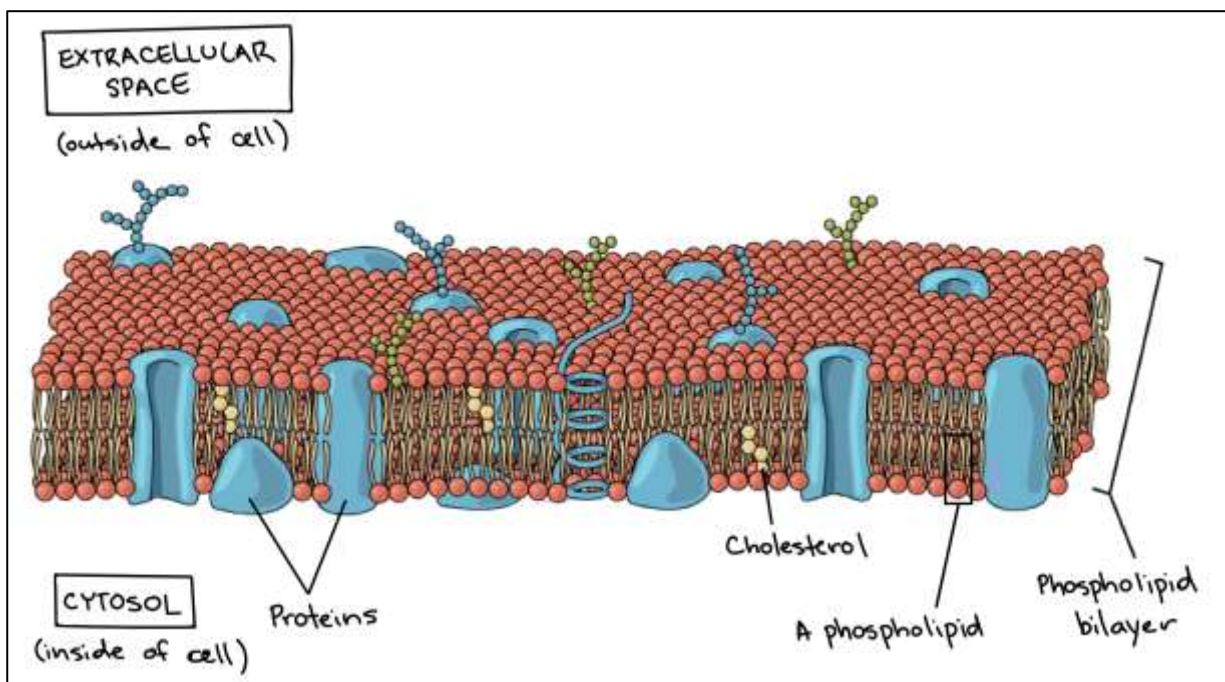
Εικόνα 1. Τυπικό ευκαρυωτικό κύτταρο¹.

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα, παρόλο που φέρουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά ως προς την δομή τους, διαφοροποιούνται και εξειδικεύονται ανάλογα με την λειτουργία τους. Τα διαφοροποιημένα κύτταρα συνθέτουν μεταξύ τους ιστούς, όργανα και συστήματα οργάνων [2].

¹ Πηγή: <http://schoolbag.info/biology/mcat/2.html>

1.1.1 Κυτταρική μεμβράνη

Η κυτταρική μεμβράνη (Εικόνα 2) περικλείει το κύτταρο και το οριοθετεί από το εξωκυτταρικό περιβάλλον. Αποτελείται από ένα διπλό στρώμα φωσφολιπιδίων με υδρόφιλες κεφαλές και υδρόφοβες ουρές. Οι υδρόφοβες ουρές «απωθούνται» από το εξωκυτταρικό περιβάλλον και στρέφονται ώστε να συναντηθούν μεταξύ τους, δημιουργώντας έτσι μια δομή κατά την οποία οι κεφαλές των φωσφολιπιδίων της διπλοστιβάδας στρέφονται προς το εξωκυτταρικό περιβάλλον ή προς το κυτόπλασμα. Έτσι, χάρη στα χημικά χαρακτηριστικά τους καθώς και στην παρουσία πρωτεϊνών και σακχάρων, η διπλή στιβάδα φωσφολιπιδίων καθίσταται σταθερή ως δομή.



Εικόνα 2. Η κυτταρική μεμβράνη².

Προκειμένου το κύτταρο να επικοινωνεί με το περιβάλλον του, η μεμβράνη είναι ημιπερατή και διαθέτει κανάλια και πόρους. Χάρη στην ημιπερατότητα καθίσταται δυνατή η διέλευση (με παθητική διάχυση, διευκολυνόμενη διάχυση ή ενεργητική μεταφορά) κάποιων ουσιών (μικρομοριακών και μεγαλομοριακών) και ιόντων. Στην περίπτωση των μικρομοριακών ουσιών, οι λιποδιαλυτές ουσίες ή/και οι ουσίες με πολύ μικρό μέγεθος διαπερνούν απευθείας την μεμβράνη [3]. Οι υδροδιαλυτές ουσίες ή ουσίες με μεγαλύτερο μέγεθος μετακινούνται μέσω καναλιών ή πόρων. Τέλος, κάποιες υδροδιαλυτές ουσίες διαπερνούν απευθείας την μεμβράνη αφού συνδεθούν με έναν φορέα, ο συνδυασμός με τον οποίο είναι λιποδιαλυτός. Στην περίπτωση των μεγαλομοριακών ουσιών, η εισερχόμενη ή εξερχόμενη ουσία εισέρχεται σε μια ενδίπλωση της κυτταρικής μεμβράνης και εγκολπώνεται στο κυστίδιο που δημιουργείται.

² Πηγή: <https://bodypart.science/2018/02/27/free-body-diagram-tutorial-khan-academy/free-body-diagram-tutorial-khan-academy-new-plasma-membrane-and-cytoplasm-article/>

1.1.2 Κυτταρικός σκελετός

Ο κυτταρικός σκελετός αποτελείται από δομικές πρωτεΐνες (μικροϊνίδια, ενδιάμεσα ινίδια και οι μικροσωληνίσκους) και πρόκειται για ένα δίκτυο ινών. Είναι μια στιβαρή κατασκευή που βοηθάει τα κύτταρα να διατηρήσουν το σχήμα τους, κατευθύνει την κίνηση των οργανιδίων εντός του κυττάρου, υποστηρίζει την εύθραυστη πλασματική μεμβράνη και επιτρέπει στο κύτταρο να φέρει τάσεις και καταπονήσεις χωρίς να καταρρέει.

Επιπλέον ο κυτταρικός σκελετός παίζει κομβικό ρόλο κατά την μίτωση και την μείωση (στην περίπτωση των γαμετών), καθώς αναδιοργανώνεται και σχηματίζει την μιτωτική άτρακτο, χάρη στην οποία μοιράζονται σωστά τα χρωμοσώματα και τα οργανίδια κατά την διαίρεση του πυρήνα.

1.1.3 Κυτταρικά οργανίδια

Τα κυτταρικά είναι οι δομές που βρίσκονται μέσα στο κυτταρόπλασμα. Όπως και το ίδιο το κύτταρο, τα περισσότερα οργανίδια περικλείονται από μεμβράνη, ενώ διαθέτουν δικά τους ένζυμα και άλλα εξειδικευμένα μόρια και μπορούν να επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω περίπλοκων συστημάτων. Τα κυτταρικά οργανίδια είναι τα εξής:

- *Το ενδοπλασματικό δίκτυο*

Είναι ένα σύστημα σωληνοειδών και επίπεδων μεμβρανωδών κυστών το οποίο παράγει πρωτεΐνες, πραγματοποιεί διάφορες ενζυμικές αντιδράσεις ή αποθηκεύει ασβέστιο (στα μυϊκά κύτταρα).

- *Τα ριβοσώματα*

Βρίσκονται είτε ελεύθερα μέσα στο κυτόπλασμα είτε προσκολλημένα στο ενδοπλασματικό δίκτυο και μέσα σε αυτά πραγματοποιείται η σύνθεση πρωτεϊνών. Αποτελούνται από *RNA (RiboNucleic Acid* ή *ριβο(ζο)νουκλεϊκό οξύ*)

- *Η συσκευή Golgi*

Πρόκειται για ένα σύστημα από πεπλατυσμένες κοίλες μεμβρανώδεις κύστες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την τροποποίηση, το πακετάρισμα και την μεταφορά πρωτεϊνών στην κυτταρική μεμβράνη, καθώς και για την σύνθεση κάποιων υδατανθράκων.

- *Τα μιτοχόνδρια*

Είναι ημιαυτόνομα οργανίδια (καθώς έχουν το δικό τους *DNA*) και είναι υπεύθυνα για την παραγωγή *ATP*, την «ενέργεια» του κυττάρου.

- *Τα λυσοσώματα*

Είναι μεμβρανώδεις σάκοι που περιέχουν υδρολυτικά ένζυμα χάρη στα οποία πέπτουν ξένα σώματα και φθαρμένα τμήματα κυττάρων.

- *Τα μικροϊνίδια, ενδιάμεσα ινίδια και οι μικροσωληνίσκοι*

Πρόκειται για ινίδια πρωτεΐνης που αποτελούν τον κυτταρικό σκελετό.

- *Το κεντροσωμάτιο*

Πρόκειται για έναν ή δύο κόκκους που βρίσκονται δίπλα στον πυρήνα και αναδιοργανώνει τους μικροσωληνίσκους τους κυτταρικού σκελετού για να σχηματίσουν την μιτωτική άτρακτο.

- *Ο πυρήνας*

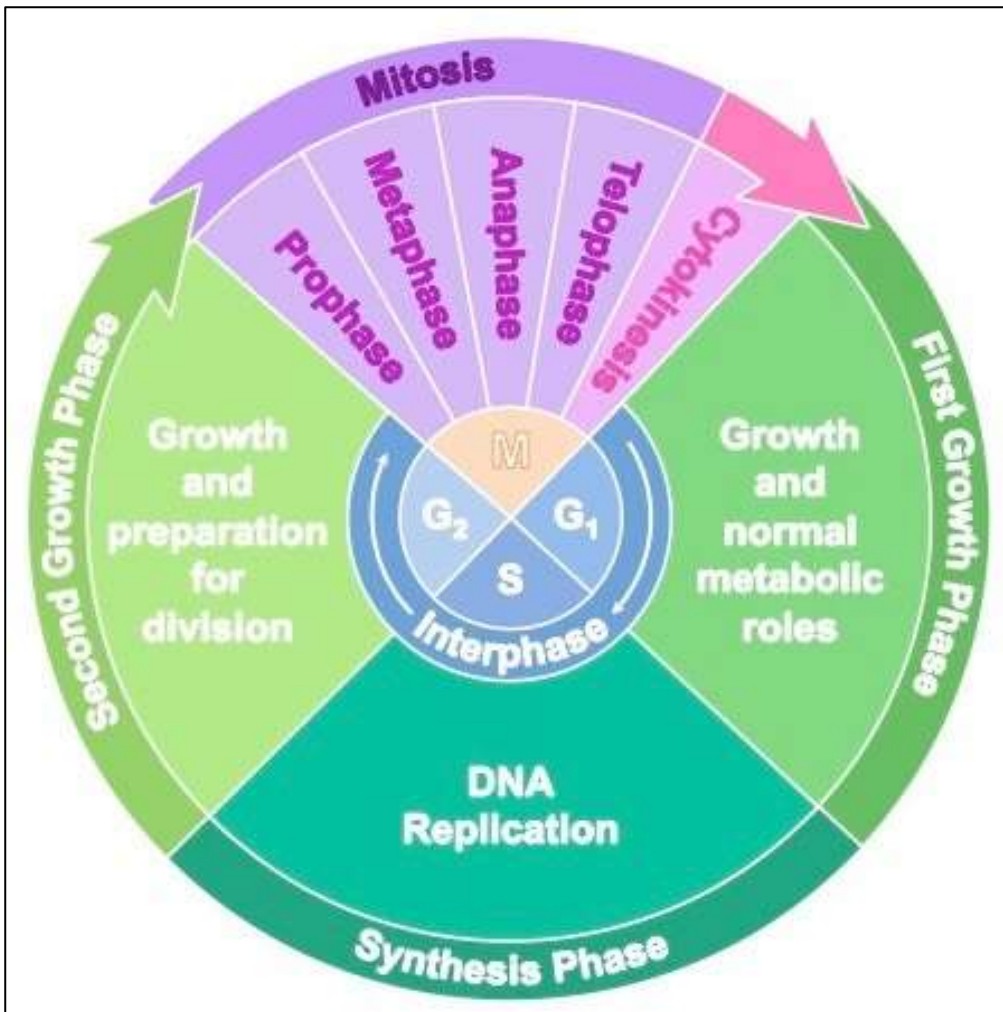
Περιβάλλεται από πυρηνική μεμβράνη, εντός της οποίας αποθηκεύεται το γενετικό υλικό (*DNA: DeoxyriboNucleic Acid* ή *δε(σ)οξυριβο(ζο)νουκλεϊ(νι)κό οξύ*). Ελέγχει τις χημικές αντιδράσεις του κυττάρου και την αναπαραγωγή του.

1.2 Ο Κυτταρικός Κύκλος

Κυτταρικός κύκλος (ή *κυτταρικός πολλαπλασιασμός*) ονομάζεται η διαδικασία κατά την οποία ένα κύτταρο αντιγράφει το περιεχόμενο του και στη συνέχεια διαιρείται σε δύο θυγατρικά κύτταρα [2]. Ο κυτταρικός κύκλος κάθε οργανισμού έχει κάποιες ομοιότητες με αυτών των άλλων οργανισμών, οι λεπτομέρειες όμως διαφέρουν.

Ο κυτταρικός κύκλος (

Εικόνα 3) αποτελείται από τέσσερις φάσεις: τις G_1 (*χάσμα 1*), S (*σύνθεση*), G_2 (*χάσμα 2*) και M (*μίτωση*) [4]. Η φάση S διαρκεί γύρω στις 10-12 ώρες στα περισσότερα θηλαστικά και είναι η φάση κατά την οποία αντιγράφονται τα χρωμοσώματα. Οι τρεις πρώτες φάσεις (G_1 , S και G_2) λέγονται και *μεσόφαση* και μπορούν να διαρκέσουν έως και 23 ώρες. Η φάση M διαρκεί συνήθως λιγότερο από μία ώρα στα περισσότερα θηλαστικά και είναι η φάση κατά την οποία πραγματοποιείται η διαίρεση του κυτταρικού πυρήνα και του κυττάρου στα δύο θυγατρικά (*κυτταροκίνηση* ή *κυτοκίνηση*). Οι φάσεις G_1 και G_2 είναι φάσεις κατά τις οποίες δεν πραγματοποιείται κάποια διεργασία ή αντίδραση, είναι δηλαδή *παύσεις*. Οι παύσεις αυτές επιτρέπουν στο κύτταρο να λάβει πληροφορίες σχετικά με το κυτταρικό και εξωκυτταρικό περιβάλλον και να κρίνει εάν οι προηγούμενες φάσεις έχουν ολοκληρωθεί χωρίς λάθη και το περιβάλλον είναι ευνοϊκό, αντίστοιχα. Εάν το εξωκυτταρικό περιβάλλον κριθεί μη βιώσιμο, ο κυτταρικός κύκλος αναστέλλεται είτε παραμένοντας στην φάση G_1 είτε μπαίνοντας στην *φάση G_0 (φάση ηρεμίας)*, μια ειδική φάση στην οποία δύναται να παραμείνει από λίγες μέρες έως μερικά χρόνια, μέχρι να συνεχιστεί ο κυτταρικός κύκλος ή να πεθάνει το κύτταρο.



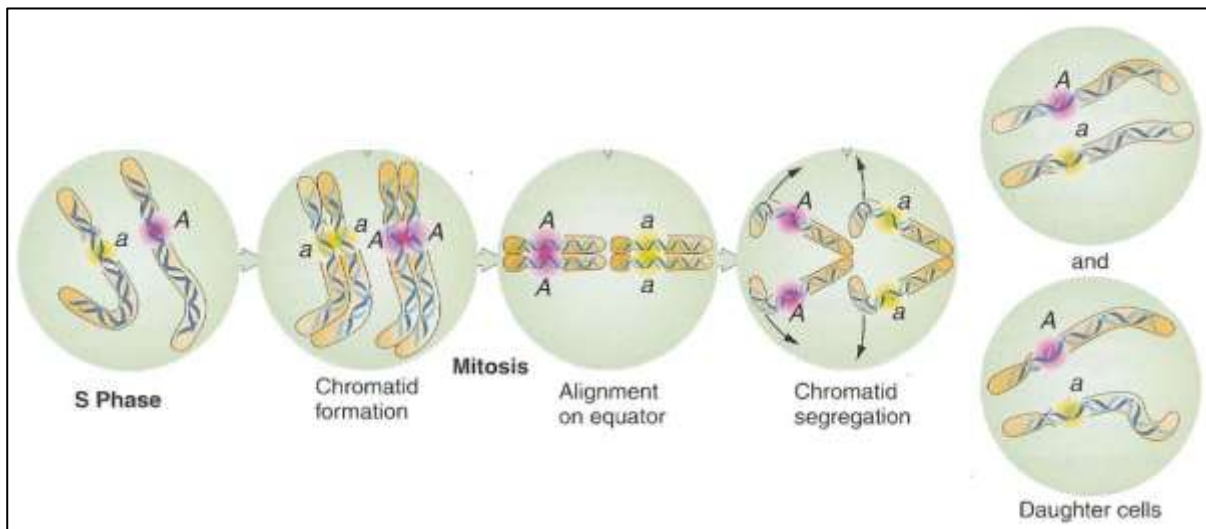
Εικόνα 3. Κυτταρικός Κύκλος³.

Το κύτταρο μπορεί να συνεχίζει ή να παύει τον κυτταρικό κύκλο χάρη σε αντίστοιχα μοριακά σήματα που εκπέμπονται ανάλογα με την κατάσταση [4]. Τα σήματα αυτά ελέγχονται από δύο κατηγορίες γονιδίων: τα *ογκοκατασταλτικά γονίδια* και τα *πρωτο-ογκογονίδια*. Τα πρώτα εμποδίζουν συγκεκριμένες διαδικασίες που οδηγούν στην δημιουργία καρκινικών κυττάρων είτε διακόπτοντας τον κυτταρικό κύκλο είτε οδηγώντας σε απόπτωση, ενώ τα δεύτερα ελέγχουν ότι η διαφοροποίηση και ο πολλαπλασιασμός του κυττάρου γίνεται φυσιολογικά μεταφέροντας σήματα από το εξωκυτταρικό περιβάλλον στον πυρήνα.

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα διαθέτουν επίσης έναν μηχανισμό ελέγχου του κυτταρικού κύκλου που λειτουργεί σαν χρονοδιακόπτης [4], ο οποίος είναι ανεξάρτητος από την διαδικασία που ελέγχει έτσι ώστε να μπορεί να συνεχίσει την λειτουργία του ακόμη κι αν υπάρξει κάποιο σφάλμα στην διαδικασία του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Ο μηχανισμός ελέγχου δίνει το έναυσμα για την έναρξη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και μπορεί να τον ελέγχει χάρη σε τρία σημεία ελέγχου: την *αφετηρία* (ή *περιοριστικό σημείο*) στα τέλη της φάσης G₁, το G₂/M όπου σηματοδοτούνται τα πρώιμα στάδια της μίτωσης (**Εικόνα**

³ Πηγή: <https://acebiology.tumblr.com/>

4) και την μετάβαση από την μετάφαση στην ανάφαση, όπου ολοκληρώνεται η μίτωση και η κυτοκίνηση.



Εικόνα 4. Μίτωση ευκαρυωτικού κυττάρου⁴.

Παρόλο που ο μηχανισμός ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι γενικά επιτυχής, υπάρχουν περιστάσεις κατά τις οποίες αποτυγχάνει. Αυτό οφείλεται συνήθως σε μεταλλάξεις του DNA που οδηγούν στη κατασκευή ελαττωματικών πρωτεϊνών ή σε αλλαγές στα χρωμοσώματα (πχ το χρωμόσωμα της Φιλαδέλφειας). Αυτές οι μεταλλάξεις μπορούν να οφείλονται σε λάθη κατά την μίτωση, σε κληρονομικότητα ή σε περιβαλλοντικούς παράγοντες (ακτινοβολία, τοξίνες κ.α.) [5] και κάποιες φορές είναι τέτοιες ώστε να παρακάμπτονται οι δικλείδες ασφαλείας που διαθέτουν τα κύτταρα, με αποτέλεσμα αυτά να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα.

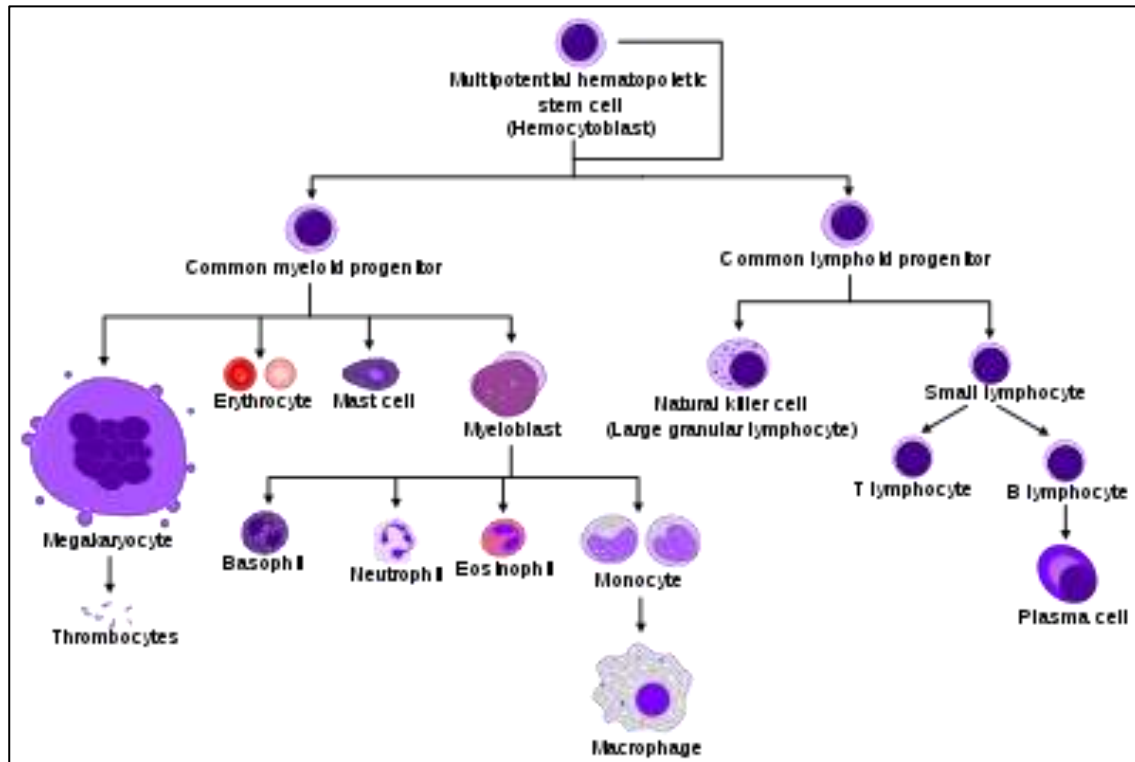
⁴ Πηγή: <https://www.mun.ca/biology/scarr/MGA2-04-20asmc.html>

1.3 Λευχαιμία και Λευχαιμικά Κύτταρα

1.3.1 Τα κύτταρα του αίματος

Τα αίμα αποτελείται κατ' όγκο 55% από πλάσμα (υγρό αποτελούμενο κατά 90% από νερό και 10% από οξυγόνο, ορμόνες, θρεπτικά συστατικά, ηλεκτρολύτες κ.α.) και 45% από κύτταρα του αίματος (**Εικόνα 5**) (λευκά αιμοσφαίρια ή λευκοκύτταρα, ερυθρά αιμοσφαίρια ή ερυθροκύτταρα και αιμοπετάλια), τα οποία είναι διαλυμένα μέσα στο πλάσμα [6].

Τα κύτταρα του αίματος παράγονται κυρίως στον μυελό των οστών, σε μια διαδικασία που λέγεται αιματοποίηση. Κάθε τέτοιο κύτταρο προέρχεται από ένα πολυδύναμο βλαστοκύτταρο που μπορεί να διαιρεθεί δίνοντας λεμφοειδή βλαστοκύτταρα, μυελοειδή βλαστοκύτταρα ή συνεχίζοντας ως πολυδύναμο βλαστοκύτταρο. Με τη σειρά τους, τα λεμφοειδή διαφοροποιούνται ως τριών τύπων λευκά αιμοσφαίρια και τα μυελοειδή ως (μεταξύ άλλων) ερυθρά αιμοσφαίρια. Υπό φυσιολογικές συνθήκες ο πληθυσμός των κυττάρων του αίματος διατηρείται σταθερός, με τον κάθε τύπο κυττάρου να ζει για ένα προκαθορισμένο διάστημα (από μερικές ώρες έως λίγες βδομάδες, ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου) ενώ τα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα πολλαπλασιάζονται είτε με σταθερούς ρυθμούς (προκειμένου να διατηρούν τον μόνιμο πληθυσμό κυττάρων στο αίμα) είτε με ταχύτερους ρυθμούς σε έκτακτες περιστάσεις που η παρουσία κάποιων κυττάρων κρίνεται απαραίτητη (πχ ασθένεια).



Εικόνα 5. Τα κύτταρα του αίματος⁵.

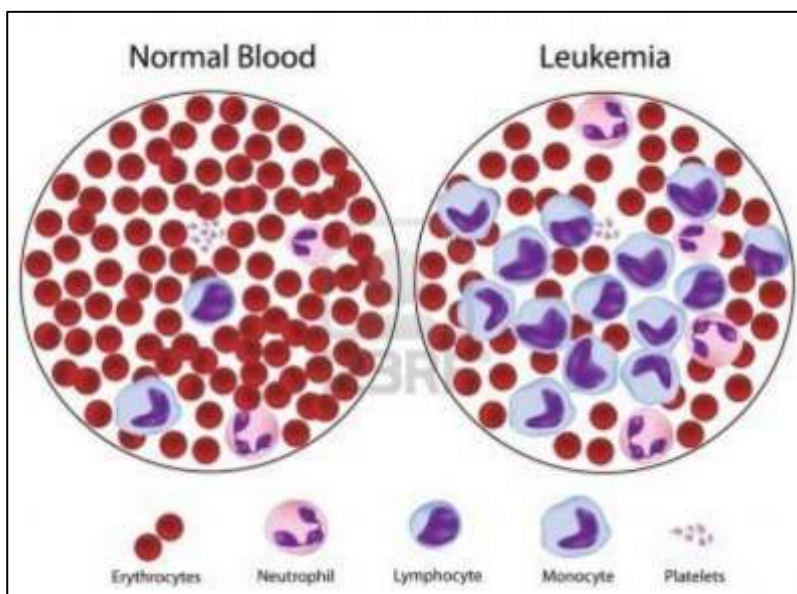
⁵ Πηγή: <http://med.stanford.edu/rivaslab/Blog.html>

1.3.2 Λευχαιμικά κύτταρα

Όταν ένα κύτταρο αποτύχει να συμπεριφερθεί σαν μέρος του ιστού ή του οργάνου στο οποίο ανήκει, δηλαδή άμα συνεχίσει να πολλαπλασιάζεται ενώ αυτό δεν είναι απαραίτητο, τότε θεωρείται καρκινικό. Πρόκειται για κύτταρα των οποίων κάποια χρωμοσώματα έχουν υποστεί μετάλλαξη με αποτέλεσμα να διαταράσσεται η ορθή επικοινωνία του κυττάρου με το εξωκυτταρικό περιβάλλον και κατ' επέκταση η εύρυθμη λειτουργία του κυτταρικού κύκλου. Οι κύριοι τύποι γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο είναι τα πρωτο-ογκογονίδια, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια και τα γονίδια που διατηρούν την ακεραιότητα του γονιδιώματος.

Στην περίπτωση που κύτταρα ιστών ή οργάνων γίνουν καρκινικά, ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός τους οδηγεί στην δημιουργία όγκου ο οποίος μπορεί να είναι *καλοήθης* ή *κακοήθης*. Εάν είναι κακοήθης μπορεί κάποια κύτταρα του να περάσουν μέσω της κυκλοφορίας ή των λεμφαδένων σε άλλα όργανα, να κάνουν δηλαδή *μετάσταση*. Η παρουσία όγκων δυσχεραίνει τις λειτουργίες των οργάνων και μπορεί, εάν δεν αφαιρεθεί, να οδηγήσει σε βλάβη ή νέκρωση και τελικά σε θάνατο ολόκληρου του οργανισμού. Τα λευχαιμικά κύτταρα αποτελούν ιδιαίτερη περίπτωση καρκινικών κυττάρων [6]. Πρόκειται για κύτταρα του κυκλοφοριακού συστήματος (*λευκά αιμοσφαίρια*, *ερυθρά αιμοσφαίρια* ή *αιμοπετάλια*) που έχουν γίνει καρκινικά. Μιας και αυτά τα κύτταρα υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν συνθέτουν ιστό ή όργανο, όταν γίνουν καρκινικά δεν οδηγούν σε δημιουργία όγκου αλλά σε συσσώρευση αφύσικα μεγάλου αριθμού κυττάρων του αίματος που τελικά οδηγεί είτε σε θρόμβωση, είτε σε διόγκωση της σπλήνας, είτε σε αναιμία (είτε σε όλα τα παραπάνω) (

Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Λευχαιμικά κύτταρα.⁶

⁶ Πηγή: <https://nurseandhealth.wordpress.com/2014/11/27/leukemia-definition/>

Η επικρατούσα άποψη σχετικά με την προέλευση των λευχαιμικών κυττάρων υποστηρίζει ότι προέρχονται από ένα *καρκινικό βλαστοκύτταρο*. Μια σειρά πειραμάτων, από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες σε διαφορετικές χρονικές περιόδους κατέληξε σε μια σειρά συμπερασμάτων, που οδήγησε στην διατύπωση αυτής της πρότασης. Αρχικά παρατηρήθηκε από τους *Rudolf Virchow* [7] και *Julius Cohnheim* [8] ότι οι ιστοί εμβρύων φέρουν πολλές ομοιότητες με κάποια είδη νεοπλασιών. Το 1977 η *Anne Hamburger* και ο *Sydney Salmon* [9] παρατήρησαν ότι μόνο 1 στα 1000 με 1 στα 5000 κύτταρα που απομονώθηκαν από συμπαγείς όγκους μπορούσαν να καλλιεργηθούν, ενώ το 1985 ο *Jim McGriffin* [10, 11], σε παρόμοιο πείραμα με ανθρώπινα κύτταρα, παρατήρησε ότι ένας μικρός πληθυσμός μόνο ευθύνεται για την παραγωγή λευχαιμικών κυττάρων. Τελικά η ύπαρξη του λευχαιμικού βλαστοκυττάρου αποδείχτηκε το 1997 από τον *John Dick* και τους συνεργάτες του [12, 13].

Η λευχαιμία κατηγοριοποιείται σε τέσσερις βασικές κατηγορίες: *οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία (acute lymphocytic leukaemia -ALL)*, *χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (chronic lymphocytic leukaemia -CLL)*, *οξεία μυελογενή λευχαιμία (acute myelogenous leukaemia -AML)* και *χρόνια μυελογενή λευχαιμία (chronic myelogenous leukaemia -CML)*. Οι οξείες και οι χρόνιες αναφέρονται στον ρυθμό εξέλιξης της ασθένειας και οι λεμφοκυτταρικές και μυελογενείς στην καταγωγή (λεμφοειδή ή μυελοειδή αντίστοιχα). Η ALL είναι η πιο συνήθης παιδική λευχαιμία, με την διάγνωση να γίνεται συνήθως σε ηλικίες μεταξύ 2-8 ετών. Η CLL είναι η πιο συνήθης λευχαιμία στους ενήλικες των δυτικών χωρών και η διάγνωση γίνεται συνήθως μετά τα 45 έτη. Η ACL είναι η πιο θανατηφόρα και η διάγνωση γίνεται συνήθως σε κάπως μεγαλύτερες ηλικίες, με μέσο ηλικιακό όρο τα 65. Η CML είναι η σπανιότερη (και γενικότερα καθώς και σε παιδιά και εφήβους) και έχει την πιο αργή εξέλιξη, ενώ είναι η λευχαιμία για την οποία έχουμε τις περισσότερες, άρα και την αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση.

Η λευχαιμία γενικότερα είναι η πιο συχνή μορφή παιδικού καρκίνου, αποτελώντας το 25% των περιπτώσεων, ενώ προσβάλλει και νεογνά. Η παιδική λευχαιμία παρατηρείται συνήθως σε αγόρια, ενώ η βρεφική λευχαιμία κυρίως σε κορίτσια. Τα συμπτώματα της λευχαιμίας είναι τα ίδια, ανεξάρτητα της ηλικίας των ασθενών: κόπωση, συχνές ρινορραγίες, ευαλωτότητα σε λοιμώξεις κ.α. καθώς και ναυτία, πόνο στα κόκκαλα και ανορεξία. Σε περίπτωση μετάστασης στον εγκέφαλο ή στον νωτιαίο μυελό, επιπλέον συμπτώματα που παρατηρούνται είναι πονοκέφαλοι, κρίσεις επιληψίας, προβλήματα ισορροπίας και όρασης.

Όπως και οι υπόλοιποι καρκίνοι, έτσι και η λευχαιμία αποδίδεται σε ένα εύρος παραγόντων: γενετική προδιάθεση, έκθεση σε επιβλαβείς περιβαλλοντικούς παράγοντες και τύχη. Συγκεκριμένα για την παιδική λευχαιμία, πολύ υποστηρίζουν ότι φταίει και το ανεπαρκές ανοσοποιητικό σύστημα των παιδιών ή ακόμα και η ελλιπής έκθεση τους σε συνήθεις παιδικές ασθένειες. Και στις δύο περιπτώσεις θεωρείται ότι η έκθεση στις ασθένειες αυτές σε μεγαλύτερες ηλικίες μπορεί να προκαλέσει δυσλειτουργικές αντιδράσεις

του ανοσοποιητικού, μια εκ των οποίων μπορεί να είναι ο αφύσικος πολλαπλασιασμός υπανάπτυκτων λεμφοκυττάρων. Κάποιες έρευνες έδειξαν ότι παιδιά που περάσανε μολύνσεις αυτιών σε μικρότερες ηλικίες είχαν λιγότερες πιθανότητες νοσήσουν από λευχαιμία ενώ άλλες έδειξαν ότι η μη-έκθεση σε συνήθεις ασθένειες κατά το πρώτο έτος της ζωής ενός παιδιού αυξάνει τις πιθανότητες αυτά να νοσήσουν από λευχαιμία και συγκεκριμένα από ALL. Αυτό επιβεβαιώνεται από τα αυξημένα κρούσματα λευχαιμίας που παρατηρούνται σε πιο ανεπτυγμένα κράτη, έναντι των κρουσμάτων που παρατηρούνται στα αναπτυσσόμενα.

1.4 Τα Γλυκοκορτικοειδή

Τα *γλυκοκορτικοειδή* ή *γλυκοκορτικοστεροειδή* είναι μια κατηγορία *κορτικοστεροειδών*, που με την σειρά τους είναι μια κατηγορία *στεροειδών ορμονών*. Φυσιολογικά εκκρίνονται από τον φλοιό των επινεφρίδιων με σκοπό την ρύθμιση του μεταβολισμού των υδρογονανθράκων, την γλυκονογέννηση, την λιπόλυση, την ομοιοστασία υγρών και ηλεκτρολυτών, την μείωση της φλεγμονώδης αντίδρασης κ.α. [14].

Συνδέονται με πρωτεΐνες-φορείς (σφαιρίνες πχ. αλβουμίνη) ώστε να μπορέσουν μέσω της κυκλοφορίας να προσεγγίσουν τους ιστούς-στόχους. Στους ιστούς, χάρη στην υδρόφοβη (λιπόφιλη) ιδιότητα τους, διαχέονται μέσω των κυτταρικών μεμβρανών και συνδέονται με εξειδικευμένους υποδοχείς που βρίσκονται είτε στο κυτταρόπλασμα είτε στον πυρήνα. Στη συνέχεια το σύμπλεγμα στεροειδούς-υποδοχέα διμερίζεται και το στεροειδές (εν προκειμένω το γλυκοκορτικοειδές) συνδέεται σε συγκεκριμένες περιοχές του DNA εντός του πυρήνα, όπου επηρεάζουν την μεταγραφή ειδικών γονιδίων, παράγοντας αντίστοιχο mRNA. Αυτό μεταναστεύει στο ενδοπλασματικό δίκτυο και σηματοδοτεί την πρωτεϊνοσύνθεση. Οι παραγόμενες πρωτεΐνες συμμετέχουν στην ομαλή λειτουργία του κυττάρου. Τα γλυκοκορτικοειδή (και γενικότερα τα στεροειδή) δεν αποθηκεύονται στο κύτταρο αλλά χρησιμοποιούνται άμεσα.

Ως φάρμακα έχουν αρκετές εφαρμογές: χρησιμοποιούνται στην αντιμετώπιση του καρκίνου και ειδικότερα στην αντιμετώπιση ορισμένων παρενεργειών που προκύπτουν από τις προκαλούμενες νεοπλασματικές φλεγμονές, ως αντιφλεγμονώδες, για την αντιμετώπιση αρθριτιδών και αλλεργιών κ.α. Ειδικά για την αντιμετώπιση της λευχαιμίας, χρησιμοποιούνται λόγω της ικανότητας τους να μειώνουν τον πληθυσμό των λεμφοκυττάρων. Η χρήση τους πρέπει να γίνεται με σύνεση και η χορήγηση τους να διακόπτεται ελεγχόμενα, καθώς έχουν αρκετές παρενέργειες [15], μερικές εκ των οποίων είναι η οστεοπόρωση, η κακή επούλωση πληγών, η κατακράτηση νερού κι αλάτων, τα πεπτικά έλκη, η ελάττωση μυϊκής μάζας, το σύνδρομο *Cushing* κ.α. Σταδιακή διακοπή πρέπει να γίνεται προς αποφυγή οξείας επινεφριδιακής ανεπάρκειας. Ένα γλυκοκορτικοειδές που χρησιμοποιείται λόγω κάποιων μειωμένων παρενεργειών και αυξημένης αντιφλεγμονώδους δράσης είναι η συνθετική *πρεδνιζολόνη* (*prednisone* και *prednisolone*).

1.5 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να εξεταστεί η ύπαρξη μαθηματικού μοντέλου, το οποίο να περιγράφει ικανοποιητικά την εξέλιξη μιας κυτταρικής καλλιέργειας, μέσα από την ανάλυση πειραματικών αποτελεσμάτων, όπως προέκυψαν από έρευνα των *Lambrou et al* [16] πάνω στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό λευχαιμικών κυττάρων κατά θεραπεία με πρεδνιζολόνη. Αρχικά θα σχολιαστούν τα πειραματικά αποτελέσματα και στη συνέχεια θα προσαρμοστούν πάνω σε καμπύλες γνωστών συναρτήσεων. Επίσης θα βελτιστοποιηθεί το προτεινόμενο μαθηματικό μοντέλο για την περιγραφή του φαινομένου, ενώ θα γίνει και συσχετισμός του με τις συναρτήσεις που προέκυψαν.

2 ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Για την μελέτη του κυτταρικού πληθυσμού, πραγματοποιήθηκε μια σειρά μετρήσεων με δείγματα κυτταρικής σειράς CCRF-CEM, που καλλιεργήθηκαν σε 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις πρεδνιζολόνης (Prednisolone) (Pharmacia, Boston, MA). Κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε σε τρεις επαναλήψεις. Τα παρόντα δεδομένα ελήφθησαν από τα αποτελέσματα πειραματικών διατάξεων, που πραγματοποιήθηκαν στο Χωρέμειο Ερευνητικό Εργαστήριο της Α' Παιδιατρικής Κλινικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και όπως αυτά έχουν δημοσιευθεί σε προηγούμενες αναφορές [16-19].

2.1 Κυτταρική Σειρά και Επώαση με Πρεδνιζολόνη

Τα πειράματα της ανάπτυξης της κυτταρικής σειράς και η επώαση της με διαδοχικές συγκεντρώσεις πρεδνιζολόνης έγινε όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενες αναφορές [16-19]. Εν συντομία, η κυτταρική σειρά CCRF-CEM προήρθε από την *European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC)* και χρησιμοποιήθηκε ως το κυτταρικό πρότυπο για την παρούσα μελέτη. Τα T-λεμφοβλαστικά λευχαιμικά κύτταρα CCRF-CEM καλλιεργήθηκαν σε διάλυμα RPMI-1640 (Gibco, Carlsbad, CA) συμπληρωμένο με 2mM L-Glutamine, Στρεπτομυκίνη/Πενικιλίνη 100 U/ml (Gibco, Carlsbad, CA), 20% FBS (Gibco, Carlsbad, CA), σε περιβάλλον με 37°C, 5% CO₂ και ~100% υγρασία. Τα κύτταρα αφέθηκαν να αυξηθούν μέχρι συγκεντρώσεως $\sim 900-1.500 \times 10^3$ cells/μl. Στα προαναφερθέντα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συγκεντρώσεις πρεδνιζολόνης (Pharmacia, Boston, MA): 0μM (control), 10nM, 100nM, 1μM, 10μM, 100μM and 700μM.

2.2 Μετρήσεις Κυτταρικού Πληθυσμού

Οι μετρήσεις κυτταρικού πληθυσμού πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο *Coulter* και πιο συγκεκριμένα με τον αιματολογικό αναλυτή NIHON KOHDEN CellTaq-α [16-19]. Οι μετρήσεις έγιναν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές και πιο συγκεκριμένα στα στις -24h (ήτοι κατά τη στιγμή εναπόθεσής τους στο καλλιεργητικό υλικό στη φλάσκα καλλιέργειας) καθώς και στις 0h, 4h, 24h, 48h και 72h αφότου επιτράπηκε στα κύτταρα να πολλαπλασιαστούν υπό κανονικές συνθήκες. Για τις μετρήσεις του κυτταρικού πληθυσμού, 200μl ελαιωρήματος ελαμβάνατο από κάθε φλάσκα και μετρούντο απευθείας με τον αναλυτή [16-19].

2.3 Συλλογή Δειγμάτων για Βιοχημικές Μετρήσεις

Για τη συλλογή δείγματος, προς ανάλυση βιοχημικών παραμέτρων χρησιμοποιήθηκε η διαδικασία, που έχει αναφερθεί σε προηγούμενες αναφορές [16-19]. Ειδικότερα, ανά 24 ώρες συλλέγονταν υπερκείμενο

υγρό από τις κυτταρικές καλλιέργειες και φυλάσσονταν σε θερμοκρασία -80°C έως ότου επεξεργαστούν περαιτέρω. Η λήψη υπερκείμενου γινόταν με τη φυγοκέντριση 1ml του εναιωρήματος της κυτταροκαλλιέργειας στις 1200rpm για 10min και στη συνέχεια αφαιρούνταν το υπερκείμενο υγρό, το οποίο φυλασσόταν για περαιτέρω επεξεργασία. Στη συνέχεια τα δείγματα μετρούνταν με αναλυτή τύπου *Siemens biochemical analyzer Advia 1800*. Οι παράγοντες που μετρούνταν ήταν η γλυκόζη (mg/dlt), το γαλακτικό οξύ (mg/dlt), η γαλακτική αφυδρογονάση (LDH, IU/l) και η αλκαλική φωσφατάση (ALP, IU/l).

2.4 Μελέτη με κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του κυτταρομετρητή (FACS) *FlowCount XL* (Beckman Coulter). Όλα τα πειράματα έγιναν εις τριπλούν. Τα τελικά αποτελέσματα αποτελούν τη μέση τιμή τριών ξεχωριστών πειραμάτων.

Η δειγματοληψία για τη μελέτη της απόπτωσης και της νέκρωσης με κυτταρομετρία ροής αφορούσε σε ζωντανά κύτταρα που φυλάσσονταν σε αιθανόλη 75% κ.ο. και διατηρούνταν στους -20°C μέχρι την ημέρα της μέτρησης. Τα υπό μελέτη κύτταρα χρωματίστηκαν με φθορίζουσες χρωστικές εκ των οποίων οι δύο βασικές ήταν η *Alexa Fluor 488* και το *Propidium Iodide*.

Για την μελέτη του βαθμού απόπτωσης και νέκρωσης των λευχαιμικών κυττάρων-τόσο για κύτταρα καλλιέργειας που δεν είχαν υποστεί καμία εξεργασία όσο και για κύτταρα καλλιέργειών που είχαν υποστεί την εφαρμογή χημειοθεραπευτικών παραγόντων- χρησιμοποιήθηκε το *Vybrant Apoptosis Assay Kit* (Dead Cell Apoptosis Kit with AnnexinV Alexa Fluor 488 and Propidium Iodide for Flow Cytometry, Molecular Probes-Invitrogen Inc. **Cat. Nr.** V13241), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.5 Ανάλυση Δεδομένων

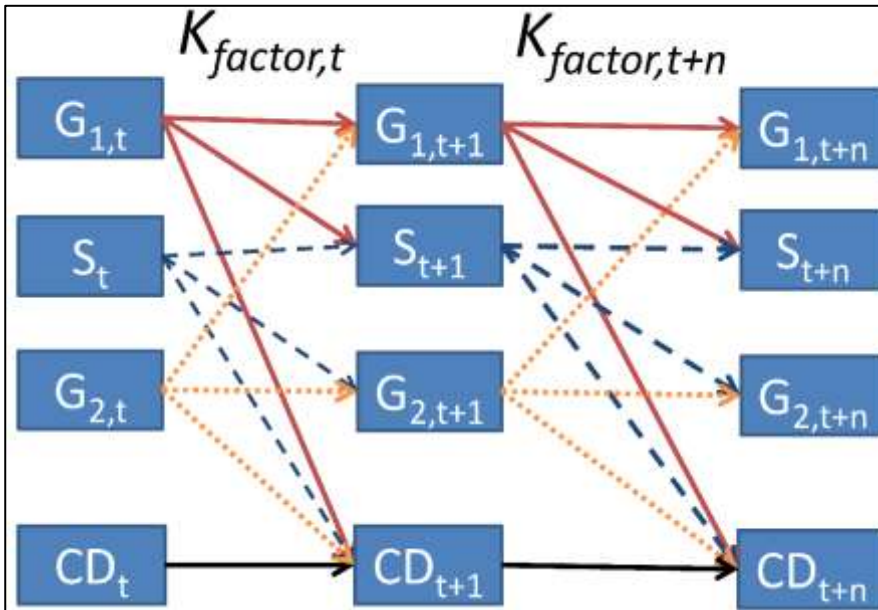
Τα δεδομένα που προέκυψαν από την κυτταρομετρία ροής αναλύθηκαν με την έκδοση του λογισμικού *WinMDI v. 2.8*. (*The Scripps Institute, Flow Cytometry Core Facility*) και του *Cylchred v. 1.0.2* (*Cardiff University, Wales*) που βασίζεται στους αλγορίθμους που προτάθηκαν από τους *Watson et al.* (1987) [20] και *Ormerod et al.* (1987). Η προ-επεξεργασία των πρωτογενών δεδομένων της κυτταρομετρίας ροής έγινε στο Microsoft Excel® και η περαιτέρω επεξεργασία στο περιβάλλον της Matlab® (The Mathworks Inc.).

2.6 Μαθηματικό Μοντέλο

Για την περιγραφή του φαινομένου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, προτείνεται ένα μαθηματικό

μοντέλο πρωτοβάθμιων εξισώσεων [16] που φιλοδοξεί να προβλέψει τα χαρακτηριστικά του κυτταρικού πληθυσμού μια δεδομένη χρονική στιγμή t , γνωρίζοντας την παρελθούσα $t-1$.

Για να γίνει αυτό γίνεται διάκριση μεταξύ των διαφόρων φάσεων του κυτταρικού πληθυσμού σε G_1 , S , G_2 και του κυτταρικού θανάτου CD , καθώς κάθε χρονική στιγμή t ο συνολικός κυτταρικός πληθυσμός N αποτελείται από κύτταρα που βρίσκονται και στις τέσσερις αυτές φάσεις. Στην **Εικόνα 7** παρουσιάζεται η σχηματική αναπαράσταση αυτού του μοντέλου, ενώ στον **Πίνακα 4** εξηγούνται όσα σύμβολα θα εισαχθούν στη συνέχεια.



Εικόνα 7. Σχηματική αναπαράσταση του προσεγγιστικού μοντέλου του κυτταρικού πληθυσμού, με τις πιθανές εξελίξεις της κάθε φάσης σε κάθε μετάβαση (προσαρμοσμένο από Lambrou et al. 2010 [19]).

Κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου αναπαρίσταται στις n χρονικές στιγμές. Ως $G_{1,t}$, $G_{1,t+1}$, $G_{1,t+n}$ παρίσταται το πλήθος των κυττάρων που βρίσκονται στην φάση G_1 τις χρονικές στιγμές t , $t+1$ και $t+n$ αντίστοιχα, ως S_t , S_{t+1} , S_{t+n} ο αριθμός των κυττάρων που βρίσκονται στην φάση S τις χρονικές στιγμές t , $t+1$ και $t+n$ αντίστοιχα, ως $G_{2,t}$, $G_{2,t+1}$, $G_{2,t+n}$ ο αριθμός των κυττάρων που βρίσκονται στην φάση G_2 τις χρονικές στιγμές t , $t+1$ και $t+n$ αντίστοιχα και ως CD_t , CD_{t+1} , CD_{t+n} ο αριθμός των νεκρών κυττάρων τις χρονικές στιγμές t , $t+1$ και $t+n$ αντίστοιχα. Κάθε χρονική στιγμή, συνυπάρχουν κύτταρα όλων των φάσεων, δηλαδή ο κυτταρικός πληθυσμός N την χρονική στιγμή t αποτελείται από ένα μείγμα κυττάρων, όπως περιγράφεται στην παρακάτω εξίσωση:

$$N_t = N_{G1,t} + N_{S,t} + N_{G2,t} + N_{CD,t}, \text{ **Εξίσωση 1** [19].}$$

Τα βέλη από και προς κάθε φάση, ήτοι από μια χρονική στιγμή στην επόμενη, δείχνει τις δυνατότητες μετάβασης ενός κυττάρου από μια δεδομένη φάση τη χρονική στιγμή t , προς τη χρονική στιγμή $t+1$.

Ο παράγοντας k είναι ένας διορθωτικός, πειραματικά προσδιορίσιμος παράγοντας που δείχνει τον ρυθμό μεταβολής ενός πληθυσμού, από μια χρονική στιγμή t σε μια χρονική στιγμή $t+1$. Η μεταβολή περιγράφεται από τις κάτωθι εξισώσεις:

$$\begin{aligned} N_{G_{1,t+1}} &= N_{G_{1,t}} \cdot k_1 + N_{G_{2,t}} \cdot k_8 \\ N_{S_{t+1}} &= N_{S_t} \cdot k_4 + N_{G_{1,t}} \cdot k_2 \\ N_{G_{2,t+1}} &= N_{G_{2,t}} \cdot k_7 + N_{S_t} \cdot k_5 \\ N_{CD,t+1} &= N_{CD_t} + N_{G_{1,t}} \cdot k_3 + N_{G_{2,t}} \cdot k_9 + N_{S_t} \cdot k_6 \end{aligned} \quad \text{Σύστημα Εξισώσεων 1 [19].}$$

Ή, στην πιο γενική μορφή:

$$N_{p_x,t+1} = N_{p_y,t} k_y + N_{p_z,t} k_z, \text{ Εξίσωση 2 [19].}$$

Το παραπάνω (Σύστημα Εξισώσεων 1) περιγράφει ότι και η **Εικόνα 7**, ότι η κάθε κατάσταση καθορίζεται από την ακριβώς προηγούμενη και ότι ο κάθε υποπληθυσμός χρονικής στιγμής $t+1$ διαμορφώνεται τόσο από τον ίδιο υποπληθυσμό σε χρονική στιγμή t , όσο και από τους άλλους υποπληθυσμούς την χρονική στιγμή t .

Οι ίδιες οι εξισώσεις φαίνονται γραμμικές και εύκολες ως προς την επίλυση, αλλά οι παράγοντες k είναι μη-γραμμικοί, πράγμα που καθιστά τελικά την επίλυση του παραπάνω συστήματος περίπλοκη. Πιο συγκεκριμένα, οι παράγοντες k καθορίζονται από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως ο χώρος, οι διαθέσιμοι πόροι και εν προκειμένω, η παρουσία και συγκέντρωση πρεδνιζολόνης. Σε προηγούμενη εργασία [19] διατυπώθηκε ότι τέτοιοι -πειραματικά προσδιορίσιμοι- παράγοντες μπορούν να προσδιοριστούν από σειρές *Fourier*.

Για την εκτίμηση των k λοιπόν, προτείνεται να χρησιμοποιηθούν σειρές *Fourier* όπου $k=f(x,y,z)$, με $f(x,y) = a_0 + a_1 \cos(xy) + a_2 \sin(xy)$, οπότε έχουμε:

$$\begin{aligned}
k_1 &= a_{0,1} + a_{1,1} \cos(N_{G_{1,t}} \cdot N_{G_{1,t+1}}) + a_{2,1} \sin(N_{G_{1,t}} \cdot N_{G_{1,t+1}}) \\
k_2 &= a_{0,2} + a_{1,2} \cos(N_{G_{1,t}} \cdot N_{S_{t+1}}) + a_{2,2} \sin(N_{G_{1,t}} \cdot N_{S_{t+1}}) \\
k_3 &= a_{0,3} + a_{1,3} \cos(N_{G_{1,t}} \cdot N_{CD_{t+1}}) + a_{2,3} \sin(N_{G_{1,t}} \cdot N_{CD_{t+1}}) \\
k_4 &= a_{0,4} + a_{1,4} \cos(N_{S_t} \cdot N_{S_{t+1}}) + a_{2,4} \sin(N_{S_t} \cdot N_{S_{t+1}}) \\
k_5 &= a_{0,5} + a_{1,5} \cos(N_{S_t} \cdot N_{G_{2,t+1}}) + a_{2,5} \sin(N_{S_t} \cdot N_{G_{2,t+1}}) \\
k_6 &= a_{0,6} + a_{1,6} \cos(N_{S_t} \cdot N_{CD_{t+1}}) + a_{2,6} \sin(N_{S_t} \cdot N_{CD_{t+1}}) \\
k_7 &= a_{0,7} + a_{1,7} \cos(N_{G_{2,t}} \cdot N_{G_{2,t+1}}) + a_{2,7} \sin(N_{G_{2,t}} \cdot N_{G_{2,t+1}}) \\
k_8 &= a_{0,8} + a_{1,8} \cos(N_{G_{2,t}} \cdot N_{G_{1,t+1}}) + a_{2,8} \sin(N_{G_{2,t}} \cdot N_{G_{1,t+1}}) \\
k_9 &= a_{0,9} + a_{1,9} \cos(N_{G_{2,t}} \cdot N_{CD_{t+1}}) + a_{2,6} \sin(N_{G_{2,t}} \cdot N_{CD_{t+1}}) \\
k_{10} &= 1
\end{aligned}$$

Σύστημα Εξισώσεων 2 [19].

Ή, στη γενική μορφή:

$$k = a_0 + a_1 \cos(N_{p_{y,z,t}} N_{p_{x,t+1}}) + a_2 \sin(N_{p_{y,z,t}} N_{p_{x,t+1}}), \text{ Εξίσωση 3 [19].}$$

Όπου τα $a_{i,j}$: σταθερές.

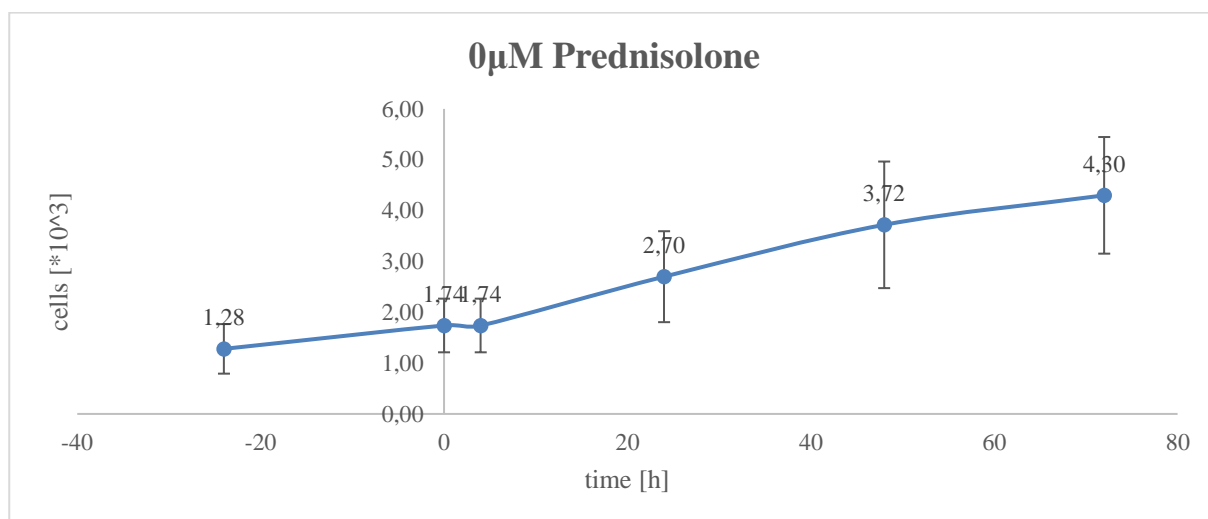
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Περιγραφική Στατιστική

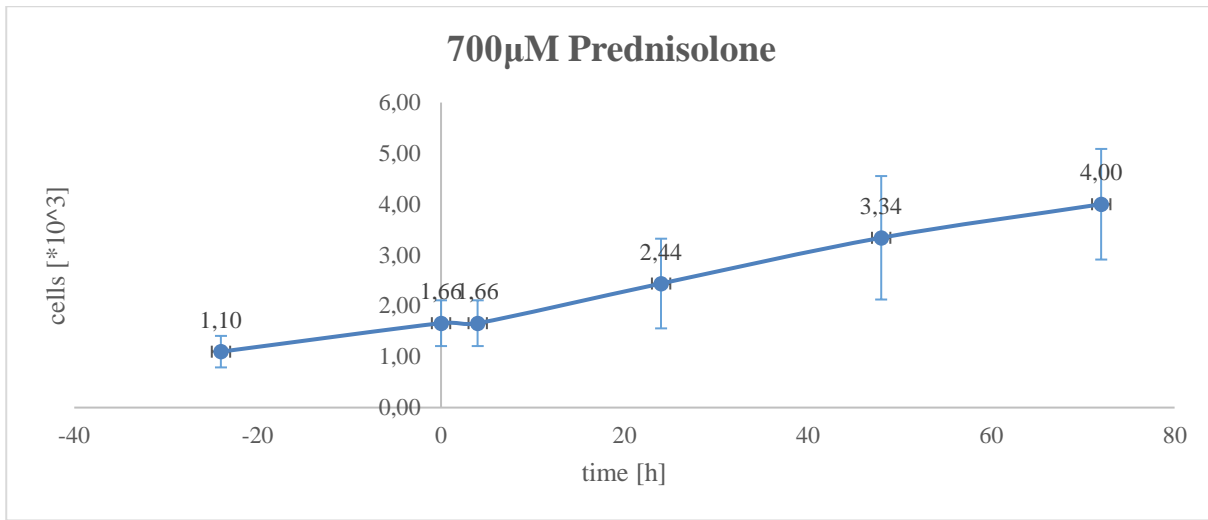
Παρακάτω παρουσιάζονται οι καμπύλες μεταβολής τόσο του συνολικού, καθώς και του κάθε επιμέρους κυτταρικού πληθυσμού.

3.1.1. Συνολικός Πληθυσμός

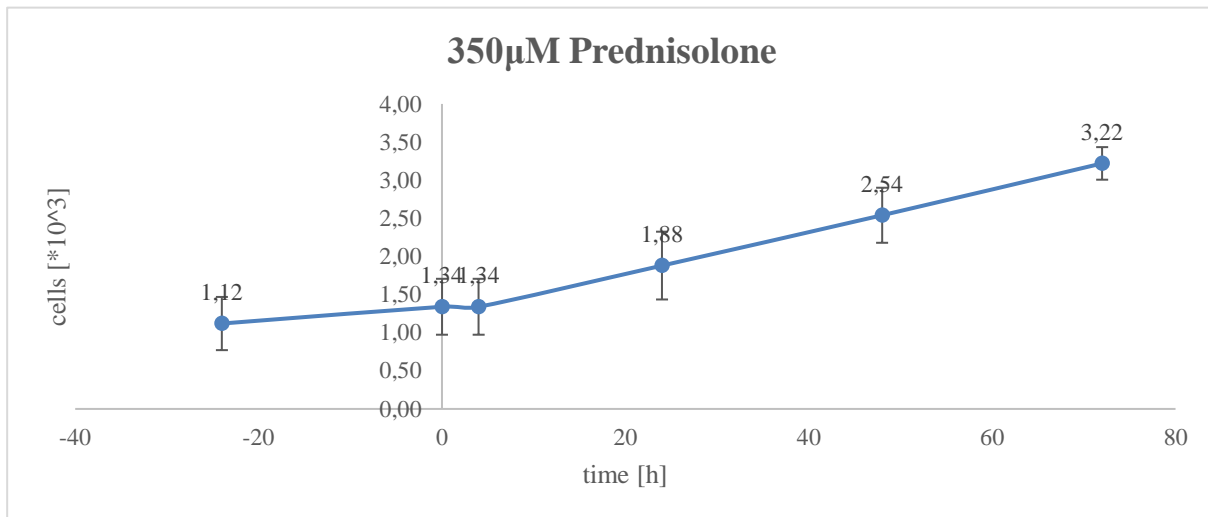
Τα πειραματικά αποτελέσματα καταγράφηκαν σε πίνακα σε αρχείο excel (βλ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1, Πίνακας 5). Παρακάτω, αναλύονται σε διαγράμματα οι συνολικοί πληθυσμοί συναρτήσει του χρόνου, σε κάθε μια από τις 12 φλάσκες, δηλαδή για τις 12 διαφορετικές συγκεντρώσεις πρεδνιζολόνης, όπου η φλάσκα 0 είναι το πείραμα ελέγχου, καθώς δεν περιέχει καθόλου πρεδνιζολόνη. Ειδικότερα, στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται οι καμπύλες πολλαπλασιασμού για το πείραμα ελέγχου (0μM πρεδνιζολόνη) (**Διάγραμμα 1**), για την επώαση των κυττάρων με 700μM πρεδνιζολόνης (**Διάγραμμα 2**), για την επώαση των κυττάρων με 350μM πρεδνιζολόνης (**Διάγραμμα 3**), για την επώαση των κυττάρων με 175μM πρεδνιζολόνης (**Διάγραμμα 4**), για την επώαση των κυττάρων με 88μM πρεδνιζολόνης (**Διάγραμμα 5**), για την επώαση των κυττάρων με 44μM πρεδνιζολόνης (**Διάγραμμα 6**), για την επώαση των κυττάρων με 22μM πρεδνιζολόνης (**Διάγραμμα 7**), για την επώαση των κυττάρων με 11μM πρεδνιζολόνης (**Διάγραμμα 8**), για την επώαση των κυττάρων με 5μM πρεδνιζολόνης (**Διάγραμμα 9**), για την επώαση των κυττάρων με 1μM πρεδνιζολόνης (**Διάγραμμα 10**), για την επώαση των κυττάρων με 100nM πρεδνιζολόνης (**Διάγραμμα 11**) και τέλος για την επώαση των κυττάρων με 10nM πρεδνιζολόνης (**Διάγραμμα 12**).



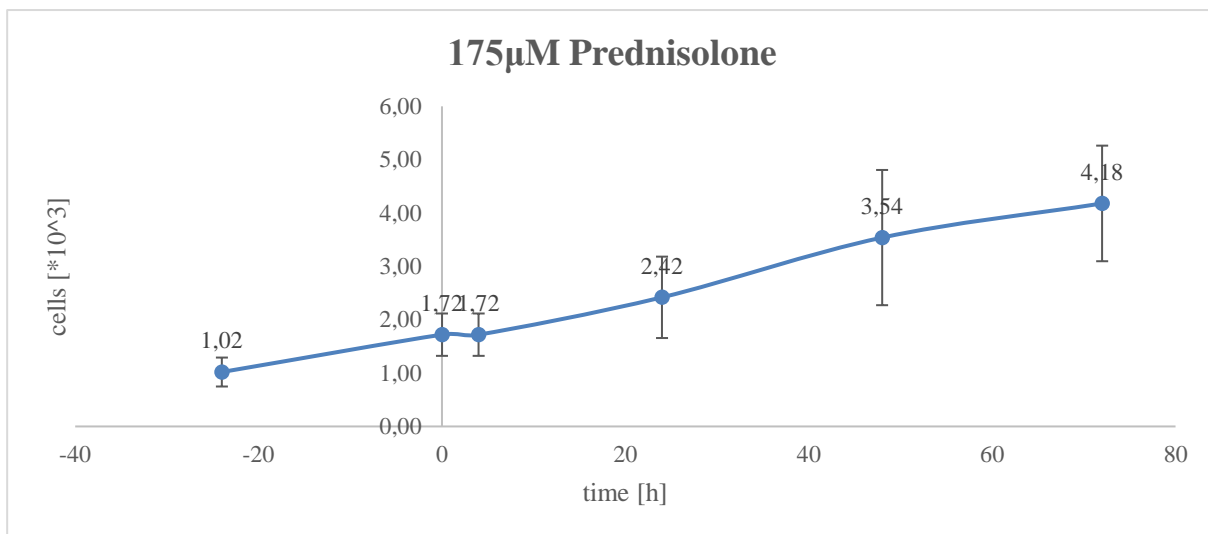
Διάγραμμα 1: Ανάπτυξη του κυτταρικού πληθυσμού συναρτήσει του χρόνου στο πείραμα ελέγχου.



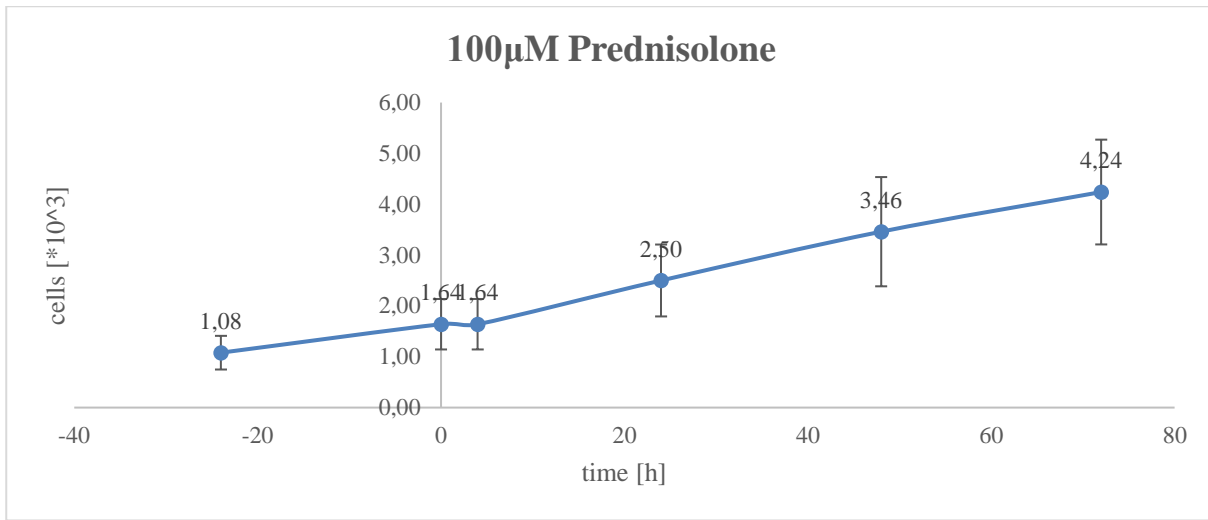
Διάγραμμα 2. Ανάπτυξη κυτταρικού πληθυσμού συναρτήσει του χρόνου υπό 700µM prednisolone.



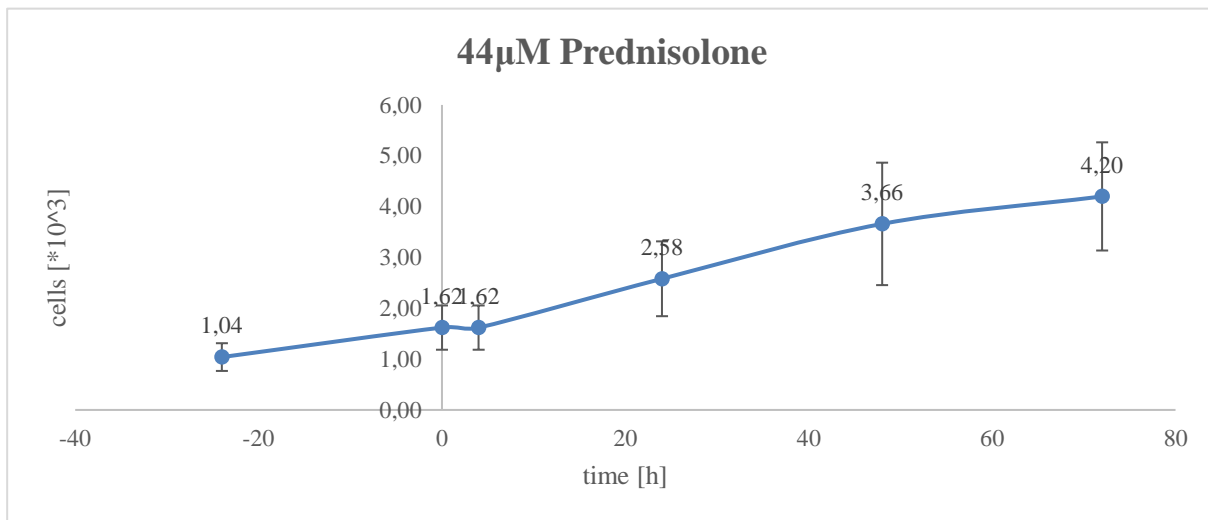
Διάγραμμα 3. Ανάπτυξη κυτταρικού πληθυσμού συναρτήσει του χρόνου υπό 350µM prednisolone.



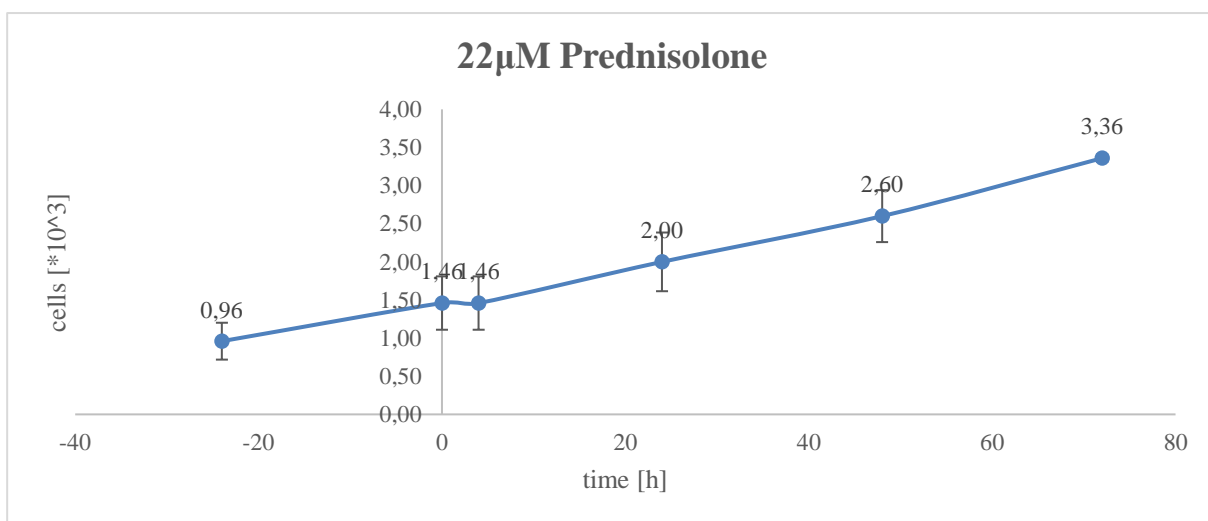
Διάγραμμα 4. Ανάπτυξη κυτταρικού πληθυσμού συναρτήσει του χρόνου υπό 175µM prednisolone.



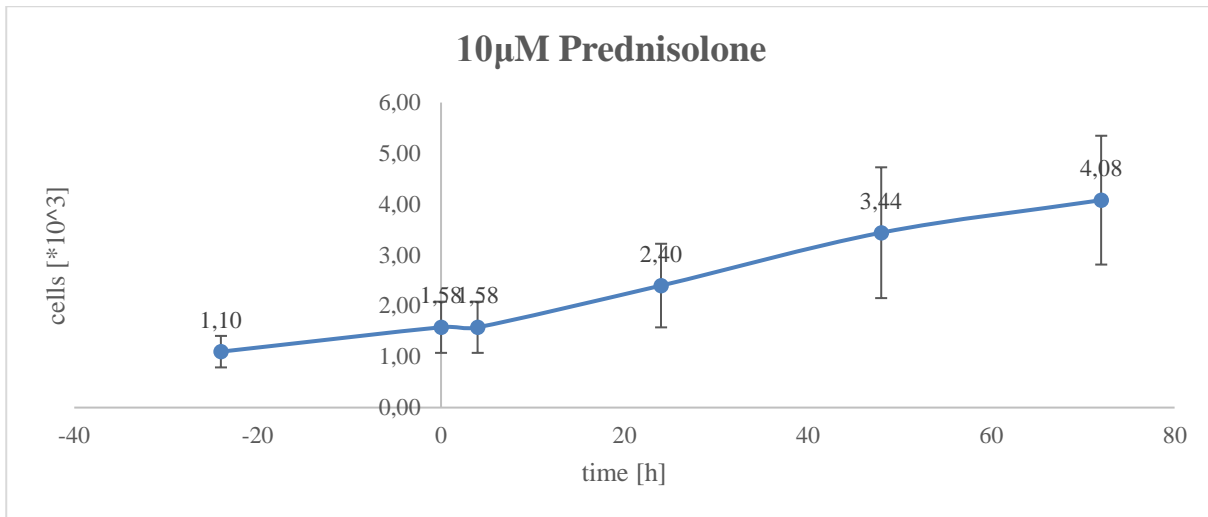
Διάγραμμα 5. Ανάπτυξη κυτταρικού πληθυσμού συναρτήσει του χρόνου υπό 100µM prednisolone.



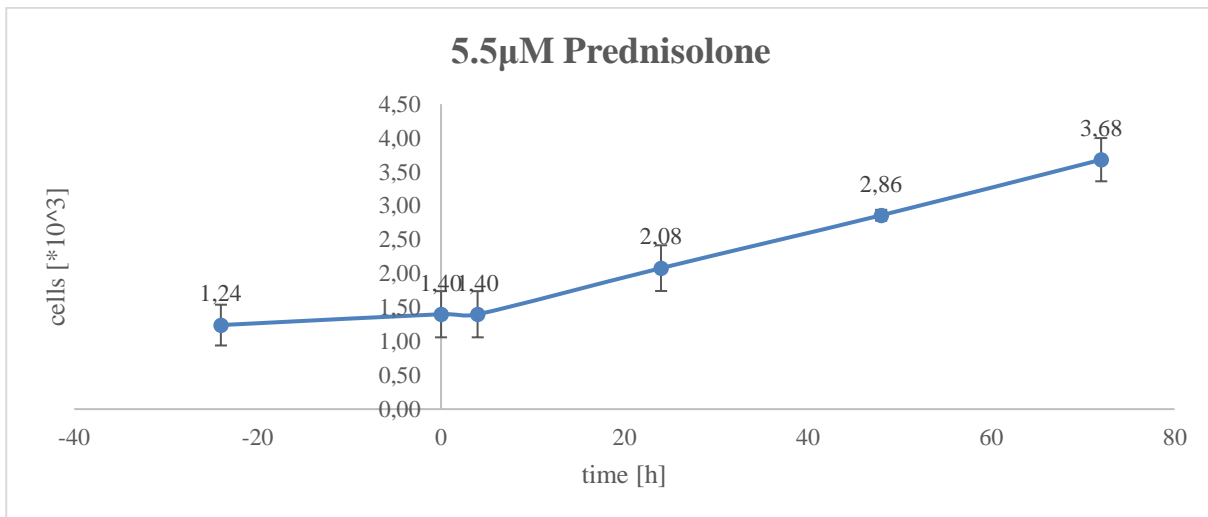
Διάγραμμα 6. Ανάπτυξη κυτταρικού πληθυσμού συναρτήσει του χρόνου υπό 44µM prednisolone.



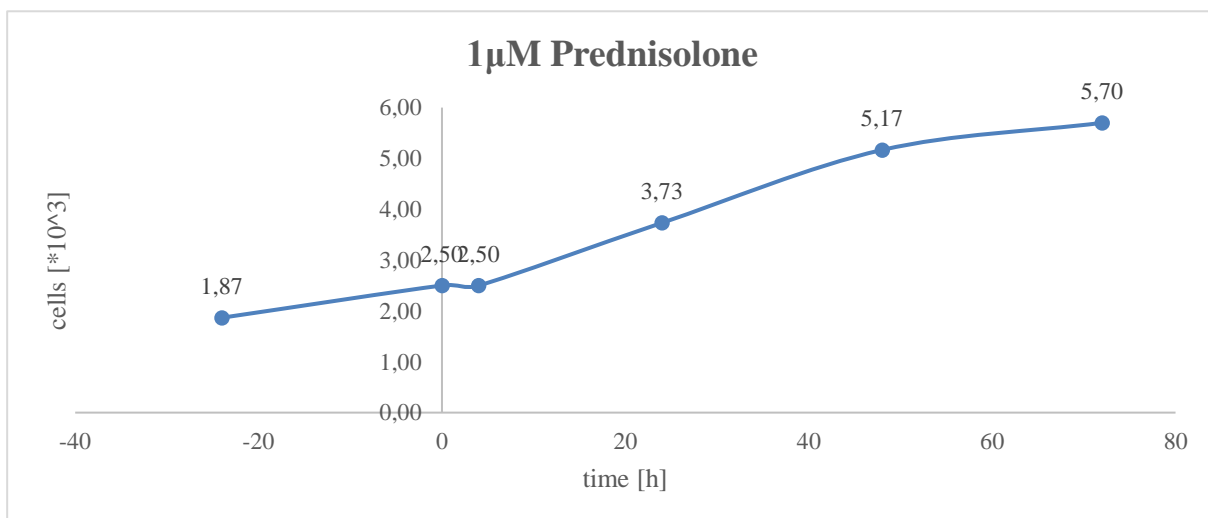
Διάγραμμα 7. Ανάπτυξη κυτταρικού πληθυσμού συναρτήσει του χρόνου υπό 22µM prednisolone.



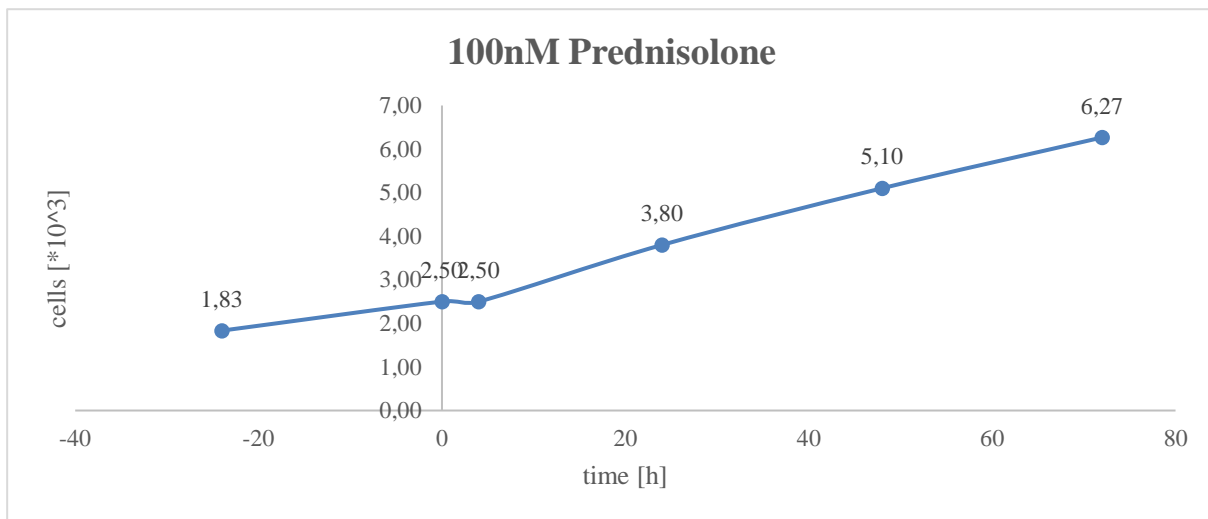
Διάγραμμα 8. Ανάπτυξη κυτταρικού πληθυσμού συναρτήσει του χρόνου υπό 10µM prednisolone.



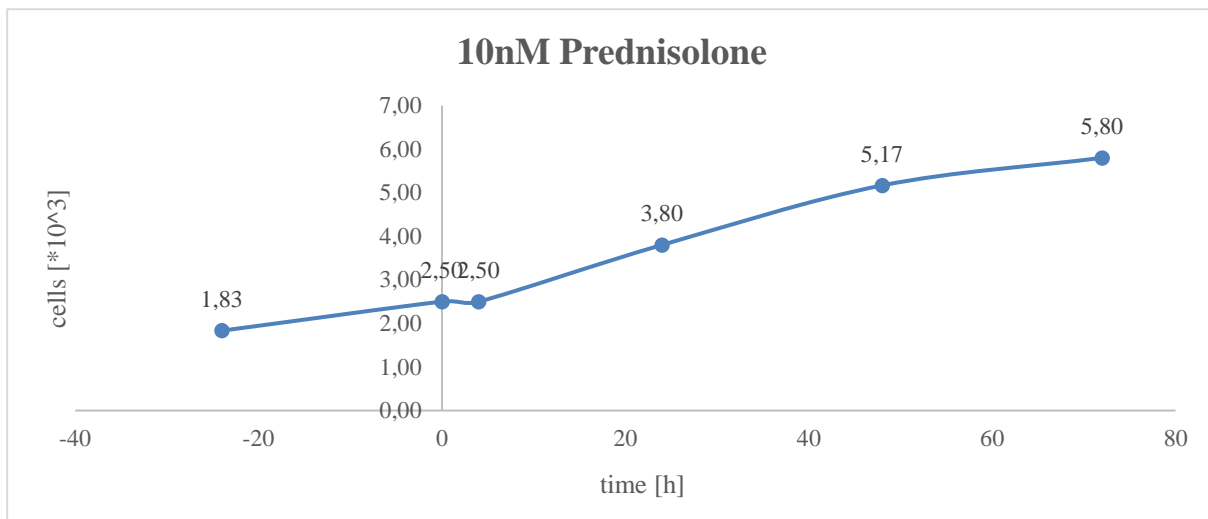
Διάγραμμα 9. Ανάπτυξη κυτταρικού πληθυσμού συναρτήσει του χρόνου υπό 5µM prednisolone.



Διάγραμμα 10. Ανάπτυξη κυτταρικού πληθυσμού συναρτήσει του χρόνου υπό 1µM prednisolone.



Διάγραμμα 11. Ανάπτυξη κυτταρικού πληθυσμού συναρτήσει του χρόνου υπό 100nM prednisolone.



Διάγραμμα 12. Ανάπτυξη κυτταρικού πληθυσμού συναρτήσει του χρόνου υπό 10nM prednisolone.

Παρατηρούμε ότι και στις 12 περιπτώσεις, ο κυτταρικός πληθυσμός αυξάνεται τις πρώτες 24 ώρες, μένει σταθερός τις επόμενες 4 ώρες, από την 4^η ώρα μέχρι την 48^η αυξάνεται με ταχύτερο ρυθμό, ενώ από την 48^η έως την 72^η ώρα αυξάνεται με χαμηλότερο ρυθμό.

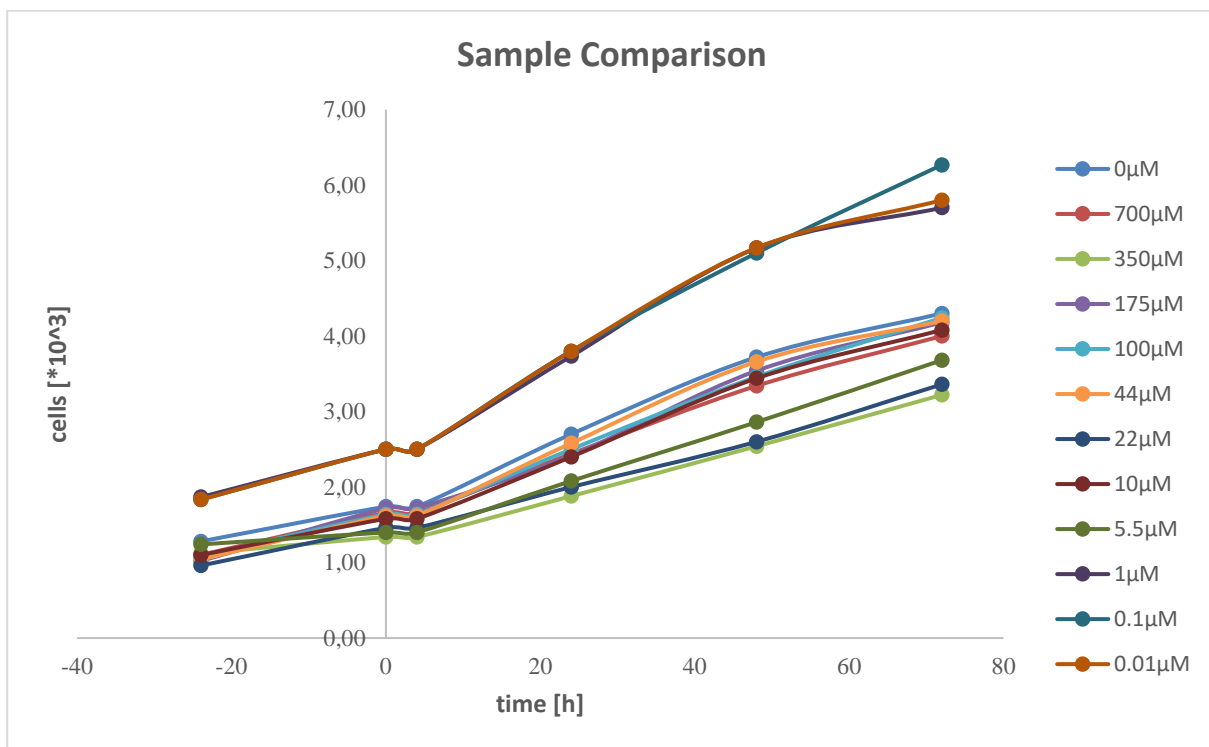
Η μεταβολή του ρυθμού ανάπτυξης του, καθώς και το προσωρινό πλατό μεταξύ της δεύτερης και της τρίτης δειγματοληψίας, δείχνει ότι ο κυτταρικός πληθυσμός δεν αυξάνεται άκριτα. Τον αρχικό πολλαπλασιασμό του που οφείλεται στην ύπαρξη διαθέσιμων πόρων και χώρου, ακολουθεί μια μικρή παύση κατά την οποία πιθανόν αλληλοεπιδρά με το περιβάλλον προκειμένου να εκτιμηθεί κατά πόσο αξίζει να συνεχιστεί ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και με τι ρυθμό. Στα επόμενα δύο 24ωρα παρατηρείται εκ νέου πολλαπλασιασμός, με σταδιακά φθίνοντα ρυθμό.

Αυτή η συμπεριφορά παρατηρείται ανεξάρτητα από την παρουσία ή μη της πρεδνιζολόνης, πράγμα που αντιτίθεται στην αναμενόμενη συμπεριφορά υπό την επίδραση φαρμάκου. Η παρόμοια συμπεριφορά

συναρτήσει του χρόνου γνωρίζουμε μεν ότι ακολουθεί συγκεκριμένες κατανομές και δεν είναι τυχαία [21], οι διαφορές όμως που παρουσιάζουν τα κύτταρα υπό την επίδραση της πρεδνιζολόνης φαίνεται να είναι πολύ μικρές έως αμελητέες.

Το ερώτημα είναι, αφενός, κατά πόσο οι διαφορές αυτές είναι σημαντικές, δηλαδή κατά πόσο η παρουσία της πρεδνιζολόνης έχει τελικά επίδραση στην ανάπτυξη των πληθυσμών αυτών και αφετέρου, κατά πόσο τα πειράματα που παρουσιάζονται εδώ είναι επαρκή για την διεξαγωγή κάποιου ασφαλούς συμπεράσματος.

Στο ακόλουθο διάγραμμα (**Διάγραμμα 13**) παρουσιάζονται όλες οι καμπύλες των κυτταρικών πληθυσμών κάθε φλάσκας συναρτήσει του χρόνου. Επιβεβαιώνεται ότι όλα τα δείγματα έχουν ποιοτικά παρόμοια συμπεριφορά, φαίνεται όμως ότι κάποια από αυτά έχουν διαφοροποιήσεις:



Διάγραμμα 13. Σύγκριση ανάπτυξης των κυτταρικών πληθυσμών υπό την επίδραση πρεδνιζολόνης.

A) Καταρχήν, τρία εξ' αυτών φαίνεται να έχουν μεγαλύτερους αφετηριακούς πληθυσμούς σε σχέση με το πείραμα ελέγχου. Ενώ ο αφετηριακός πληθυσμός του δείγματος ελέγχου είναι $1.28 \text{ (cells/}\mu\text{l)} \cdot 10^3$, αυτός της φιάλης κυτταροκαλλιέργειας επώασης πρεδνιζολόνης $22\mu\text{M}$ είναι $0.96 \text{ (cells/}\mu\text{l)} \times 10^3$ ενώ αυτός με $1\mu\text{M}$ είναι $1.87 \text{ (cells/}\mu\text{l)} \cdot 10^3$. Από το **Διάγραμμα 13** φαίνεται να υπάρχουν δύο ομάδες δειγμάτων, αυτή των φιάλων επώασης πρεδνιζολόνης $1\mu\text{M}$, $10^{-1}\mu\text{M}$ και $10^{-2}\mu\text{M}$, και αυτή των υπόλοιπων πειραματικών διατάξεων, το κριτήριο όμως για αυτήν την ομαδοποίηση είναι ο απόλυτος αρχικός πληθυσμός, που σαν κριτήριο είναι ασήμαντο καθώς αυτό που μας ενδιαφέρει είναι ο ρυθμός ανάπτυξης του πληθυσμού.

B) Μια άλλη ομαδοποίηση που προκύπτει από την παρατήρηση του είναι αυτή με βάση την κλίση των καμπυλών μεταξύ της 4^{ης} και της 48^{ης} ώρας. Φαίνεται να υπάρχουν τρεις ομάδες: η πρώτη είναι αυτή με την μεγαλύτερη κλίση και αποτελείται από τα φιάλες κυτταροκαλλιέργειας πρεδνιζολόνης $1\mu\text{M}$, $10^{-1}\mu\text{M}$ και $10^{-2}\mu\text{M}$, η δεύτερη αυτή με την μικρότερη κλίση που αποτελείται από δείγματα με $5.5\mu\text{M}$, $22\mu\text{M}$ και $350\mu\text{M}$ και η τρίτη αυτή με τις υπόλοιπες φιάλες.

Γ) Η τρίτη ομαδοποίηση αφορά στις κλίσεις κατά το πρώτο 24ωρο και αποτελείται από δύο ομάδες: η μια από τα φιάλες με $350\mu\text{M}$ και $5.5\mu\text{M}$ που έχουν μικρή κλίση και η άλλη με όλα τα υπόλοιπα, που έχουν σημαντικά μεγαλύτερη κλίση.

Δ) Μια τελευταία ομαδοποίηση που μπορεί να γίνει αφορά στις κλίσεις κατά το τελευταίο 24ωρο και αποτελείται από δύο ομάδες: η μία αποτελείται από ένα μια φιάλη, αυτή με $10^{-1}\mu\text{M}$ πρεδνιζολόνης που φαίνεται να έχει μεγαλύτερη κλίση από τις υπόλοιπες. Προφανώς η άλλη ομάδα θα αποτελείται από όλες τις υπόλοιπες.

Πειραματική Διάταξη (μM)	Ευθύγραμμα Τμήματα				
	-24h-0h	0h-4h	4h-24h	24h-48h	48h-72h
0	0,01917	0	0,04800	0,04250	0,02417
700	0,02778	0	0,06500	0,05694	0,02639
350	0,02778	0	0,06500	0,05417	0,04861
175	0,02639	0	0,06167	0,05972	0,02222
100	0,00667	0	0,03400	0,03250	0,03417
44	0,02000	0	0,04100	0,04333	0,02667
22	0,02083	0	0,02700	0,02500	0,03167
10	0,02417	0	0,04800	0,04500	0,02250
5.5	0,02333	0	0,04300	0,0400	0,03250
1	0,02917	0	0,03500	0,04667	0,02667
$1 \cdot 10^{-1}$	0,00917	0	0,02700	0,02750	0,02833
$1 \cdot 10^{-2}$	0,02333	0	0,03900	0,03750	0,02750

Πίνακας 1. Κλίσεις ευθύγραμμων τμημάτων διαγραμμάτων για κάθε πειραματική διάταξη.

Παρατηρούμε ότι κατά γενικό κανόνα, οι κλίσεις είναι της ίδια τάξης μεγέθους (10^{-2}) καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων, με εξαίρεση την κλίση των φιαλών 9 και 3 (με ποσότητα πρεδνιζολόνης $5.5\mu\text{M}$ και

350μM αντίστοιχα) κατά το πρώτο 24ωρο. Άρα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ανεξαρτήτως του μεγέθους του αρχικού πληθυσμού, η δυναμική που ακολουθούν οι κυτταρικοί πληθυσμοί είναι παρόμοια.

Έστω α , β , γ , δ και ε τα διαδοχικά ευθύγραμμα τμήματα, από την χρονική στιγμή -24h έως και την 72h. Όπως παρατηρήσαμε ποιοτικά και στα διαγράμματα, κατά πλειοψηφία τα ευθύγραμμα τμήματα γ των διαγραμμάτων έχουν μεγαλύτερη κλίση από τα ευθύγραμμα τμήματα α , τα ευθύγραμμα τμήματα δ μικρότερη από τα γ -με εξαίρεση τις φιάλες 8, 4 και 5 (με συγκέντρωση πρεδνιζολόνης 10μM, 175μM, 100μM αντίστοιχα)- ενώ τα ευθύγραμμα τμήματα ε μικρότερη κλίση από τα δ -με εξαίρεση τις φιάλες 9, 7 και 3 (με συγκέντρωση πρεδνιζολόνης 5.5μM, 22μM, 350μM αντίστοιχα).

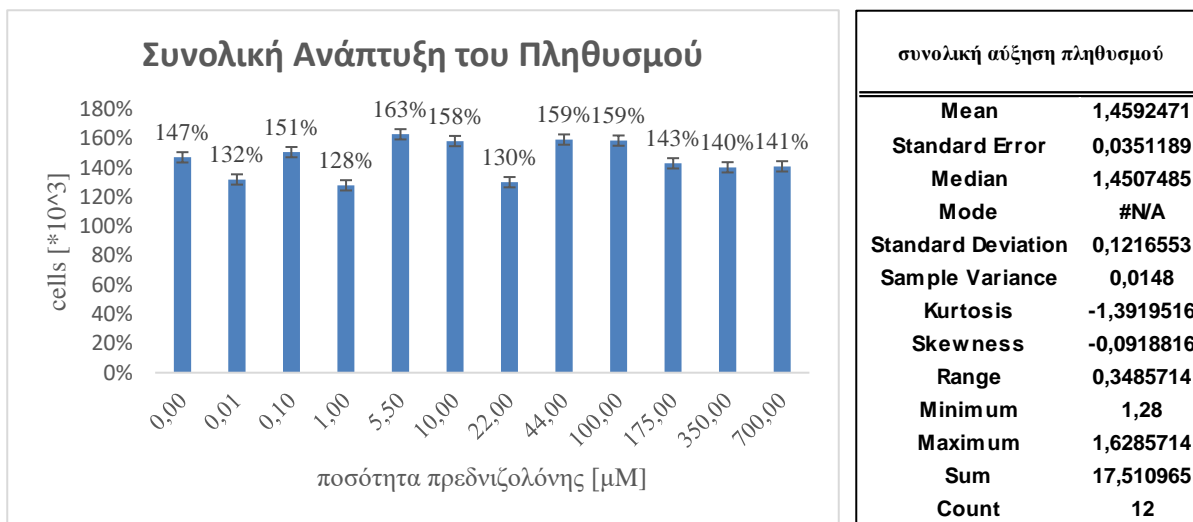
Στον ακόλουθο πίνακα (**Πίνακας 2**) παρουσιάζεται η μεταβολή της κλίσης από το ένα ευθύγραμμο τμήμα στο επόμενο καθώς και η συνολική μεταβολή της κλίσης. Εξαιρείται το ευθύγραμμο τμήμα β , καθώς είναι αυτό μεταξύ της μηδενικής και της 4^{ης} ώρας που έχει κλίση μηδέν.

Πειραματική Διάταξη	Αλλαγή στην κλίση ευθύγραμμων τμημάτων καμπύλης			
	γ - α	δ - γ	ε - δ	ε - α
0	150%	-11%	-43%	26%
12	134%	-12%	-54%	-5%
11	134%	-17%	-10%	75%
10	134%	-3%	-63%	-16%
9	410%	-4%	5%	413%
8	105%	6%	-38%	33%
7	30%	-7%	27%	52%
6	99%	-6%	-50%	-7%
5	84%	-7%	-19%	39%
4	20%	33%	-43%	-9%
3	195%	2%	3%	209%
2	67%	-4%	-27%	18%

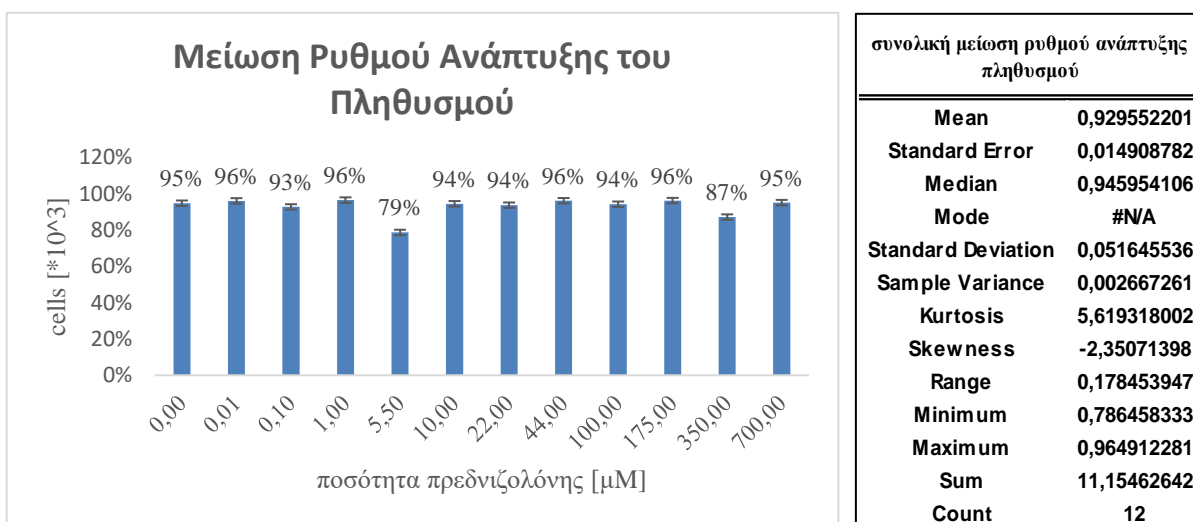
Πίνακας 2. Αλλαγή στις κλίσεις των ευθύγραμμων τμημάτων κάθε καμπύλης, όπου α , γ , δ , ε , η αρίθμηση των τμημάτων αυτών.

Παρατηρείται ότι γενικά, μέχρι την τέταρτη μέτρηση (δηλ. την μέτρηση που αντιστοιχεί στην 24^η ώρα) υπάρχει αύξηση στην κλίση των καμπύλων, άρα και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ενώ στη συνέχεια οι κλίσεις ολοένα και μικραίνουν, πράγμα που σημαίνει ότι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων γίνεται σταδιακά μικρότερος, όπως εξάλλου φαίνεται ποιοτικά κι από τα διαγράμματα 1-12. Κατά τα δύο πρώτα 24ωρα δεν υπάρχουν εξαιρέσεις, κατά το τρίτο 24ωρο εξαίρεση αποτελούν τα δείγματα με ποσότητα πρεδνιζολόνης 10μM, 175μM και 350μM ενώ κατά το τελευταίο 24ωρο εξαιρέσεις αποτελούν τα δείγματα με συγκεντρώσεις 5.5μM, 22μM και 350μM.

Παρακάτω παρουσιάζονται η συνολική ποσοστιαία αύξηση του κυτταρικού πληθυσμού μετά από 72 ώρες σε κάθε φλάσκα και η συνολική ποσοστιαία μείωση του ρυθμού ανάπτυξης μετά από 72 ώρες.



Διάγραμμα 14. Συνολική ανάπτυξη πληθυσμού μετά από 72 ώρες και στατιστικά στοιχεία.



Διάγραμμα 15. Μείωση ρυθμού ανάπτυξης πληθυσμού μετά από 72 ώρες και στατιστικά στοιχεία

Παρατηρούμε ότι για ποσότητα πρεδνιζολόνης 700μM, 350μM, 175μM, 22μM, 1μM και 10⁻²μM η συνολική αύξηση του κυτταρικού πληθυσμού είναι μικρότερη από ότι στο πείραμα ελέγχου (0μM πρεδνιζολόνης). Όσον αφορά τον ρυθμό ανάπτυξης, για ποσότητες 350μM, 100μM, 22μM, 10μM, 5.5μM, 10⁻¹μM είναι μικρότερος από ότι στο πείραμα ελέγχου, ενώ για ποσότητα 700μM είναι σχεδόν ίδιος με του πειράματος ελέγχου.

Παρατηρούμε επίσης ότι τόσο η συνολική μεταβολή του πληθυσμού, όσο και ο ρυθμός μεταβολής του, δεν φαίνεται να έχει συγκεκριμένη σχέση με την συγκέντρωση πρεδνιζολόνης. Αντί, π.χ. ο συνολικός τελικός πληθυσμός να μεταβάλλεται γραμμικά καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση πρεδνιζολόνης, ή αντί να προσεγγίζεται από κάποια στατιστική κατανομή, οι μεταβολές δεν φαίνεται να ακολουθούν κάποιο μοτίβο. Σύμφωνα μάλιστα με τα στατιστικά στοιχεία, όπως υπολογίστηκαν στο excel, φαίνεται πως και στις δύο περιπτώσεις η διακύμανση των τιμών είναι πολύ μικρή, όπως επίσης και το τυπικό σφάλμα.

Ενώ θα μπορούσαμε να πούμε ότι σύμφωνα με τα πειράματα, η ποσότητα πρεδνιζολόνης του 1μM

ευθύνεται για την μικρότερη τελική αύξηση του κυτταρικού πληθυσμού, ή η ποσότητα του $1\mu\text{M}$ και των $44\mu\text{M}$ ευθύνονται για την μεγαλύτερη πτώση του ρυθμού ανάπτυξης. Δεδομένης όμως της στατιστικής αβεβαιότητάς που χαρακτηρίζει και τα δύο διαγράμματα, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι οι παραπάνω κυτταρικοί πληθυσμοί ακολουθούν παρόμοια δυναμική, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι αυτές οι τιμές μάλλον οφείλονται σε άλλους παράγοντες και δεν είναι αποτέλεσμα της παρουσίας της πρεδνιζολόνης.

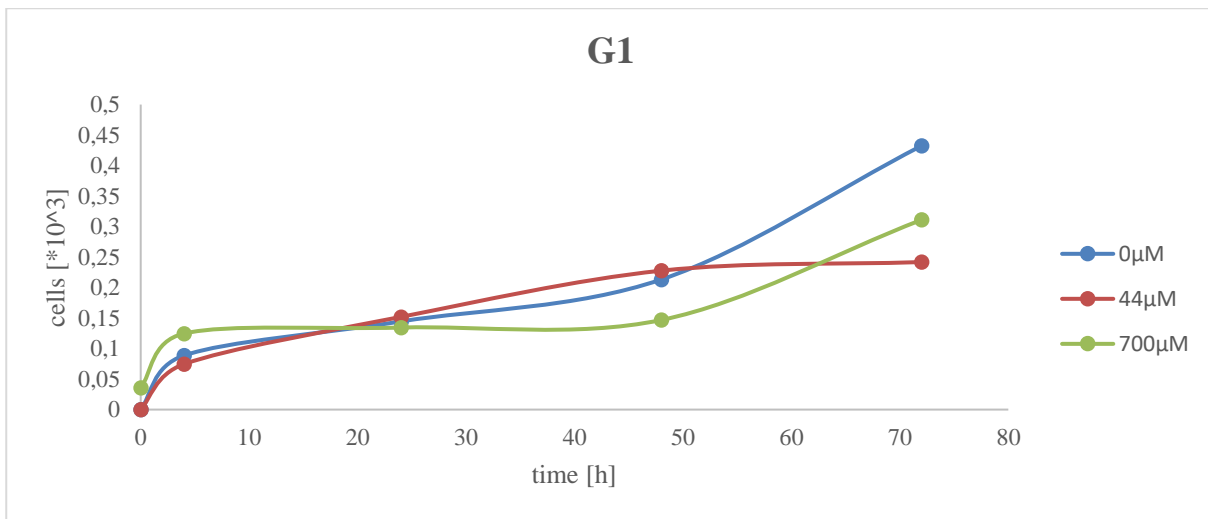
Το παραπάνω οδηγεί προς το συμπέρασμα ότι τα εν λόγω κύτταρα είναι ανθεκτικά στην πρεδνιζολόνη και δεν ανταποκρίνονται σε θεραπεία με την χορήγηση της, ανεξάρτητα από το μέγεθος της δοσολογίας της.

Τέλος, βάσει των παρόντων μετρήσεων δεν μπορεί να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα για το πως θα συμπεριφερθεί στην συνέχεια ο κυτταρικός πληθυσμός. Μπορούμε να εικάσουμε ότι ο ρυθμός δεν θα αυξηθεί αλλά θα συνεχίσει να φθίνει, ενδεχομένως μέχρι να φτάσει σε νέο πλατό, δεν ξέρουμε όμως πόσα 24ωρα απέχουμε όμως από αυτό το πλατό. Καλύτερη εικόνα για την συμπεριφορά του μπορούμε να αποκτήσουμε εάν γίνει προσαρμογή των καμπύλων αυτών σε κάποια γνωστή συνάρτηση και προσδιοριστούν οι σταθεροί συντελεστές της.

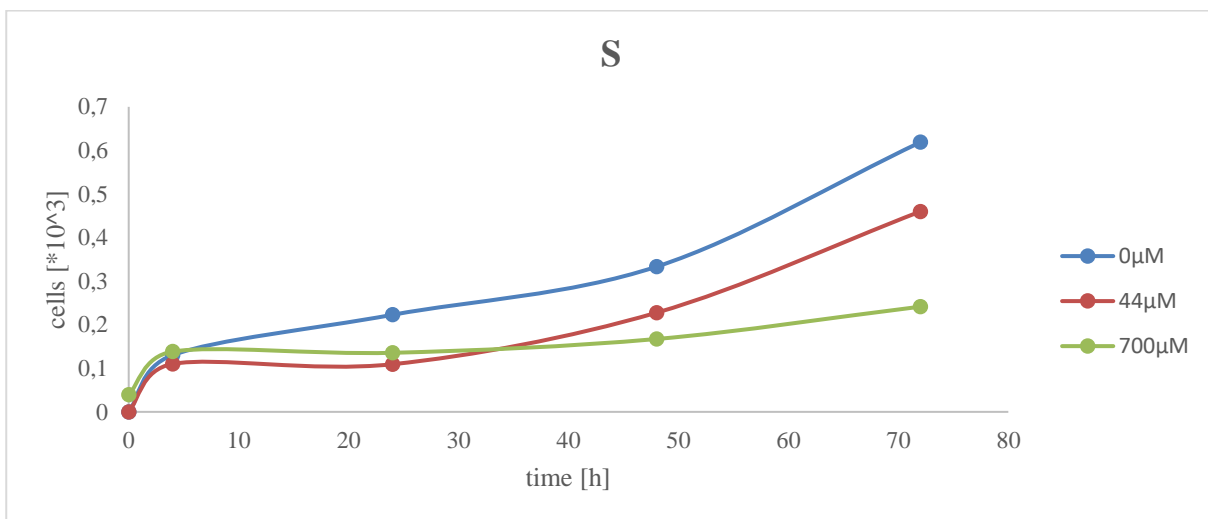
3.1.2. Επιμέρους Πληθυσμοί

Εκτός από τα πειράματα κυτταροτοξικότητας, που αφορούσαν στο συνολικό πληθυσμό, έγιναν και πειράματα για τον κυτταρικό κύκλο, όπου μετρήθηκαν οι επιμέρους πληθυσμοί και η εξέλιξη τους συναρτήσει του χρόνου. Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν μεν με άλλα δείγματα, των οποίων οι αφετηριακοί πληθυσμοί ήταν διαφορετικοί ανά φλάσκα σε σχέση με τα πειράματα κυτταροτοξικότητας, έγινε όμως ο ίδιος αριθμός πειραμάτων, σε ίδιους χρόνους και με ίδιες συγκεντρώσεις πρεδνιζολόνης. Άρα τα διαγράμματα που θα παρουσιαστούν για τους επιμέρους πληθυσμούς N_{G1} , N_S , N_{G2} , και N_{CD} , παρόλο που προέκυψαν από διαφορετικό πείραμα και διαφορετικές φιάλες από αυτά που παρουσιάζονται στο κεφάλαιο 3.1.1. Συνολικός Πληθυσμός, ποιοτικά είναι αντιπροσωπευτικά όσον αφορά την συμπεριφορά των εν λόγω κυτταρικών υποπληθυσμών.

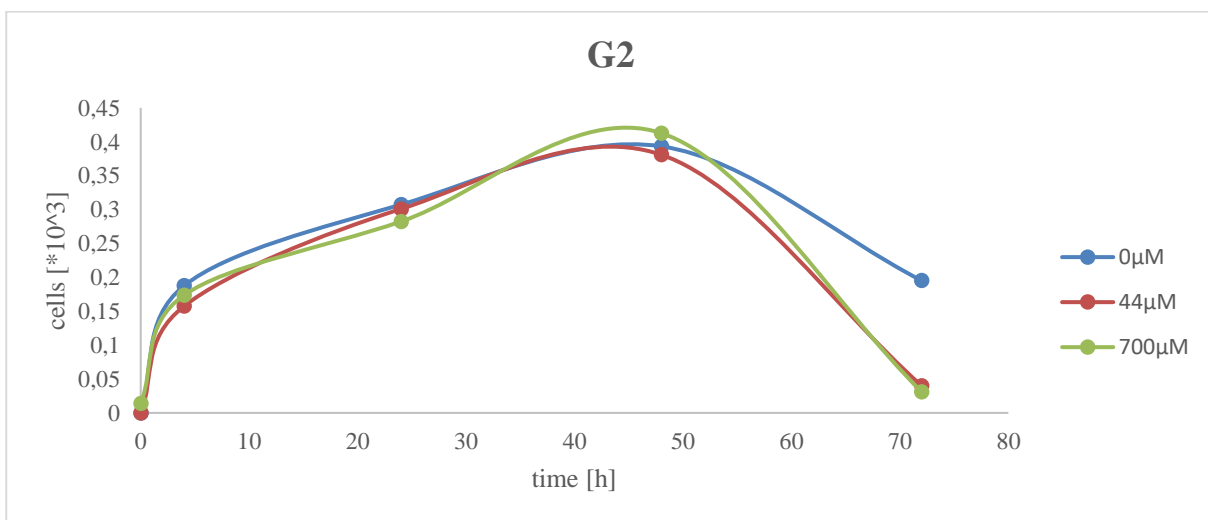
Όπως και στα πειράματα με τον συνολικό κυτταρικό πληθυσμό, έτσι κι εδώ τα πειραματικά αποτελέσματα καταγράφηκαν σε πίνακα σε αρχείο excel (βλ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1, Πίνακας 5). Παρακάτω, αναλύονται σε κοινά διαγράμματα οι επιμέρους πληθυσμοί -δηλαδή οι N_{G1} , N_S , N_{G2} , και N_{CD} - συναρτήσει του χρόνου (Διάγραμμα 16, Διάγραμμα 17, Διάγραμμα 18, Διάγραμμα 19, Διάγραμμα 20), για το πείραμα ελέγχου, το πείραμα με $44\mu\text{M}$ πρεδνιζολόνης και αυτό με $700\mu\text{M}$ πρεδνιζολόνης.



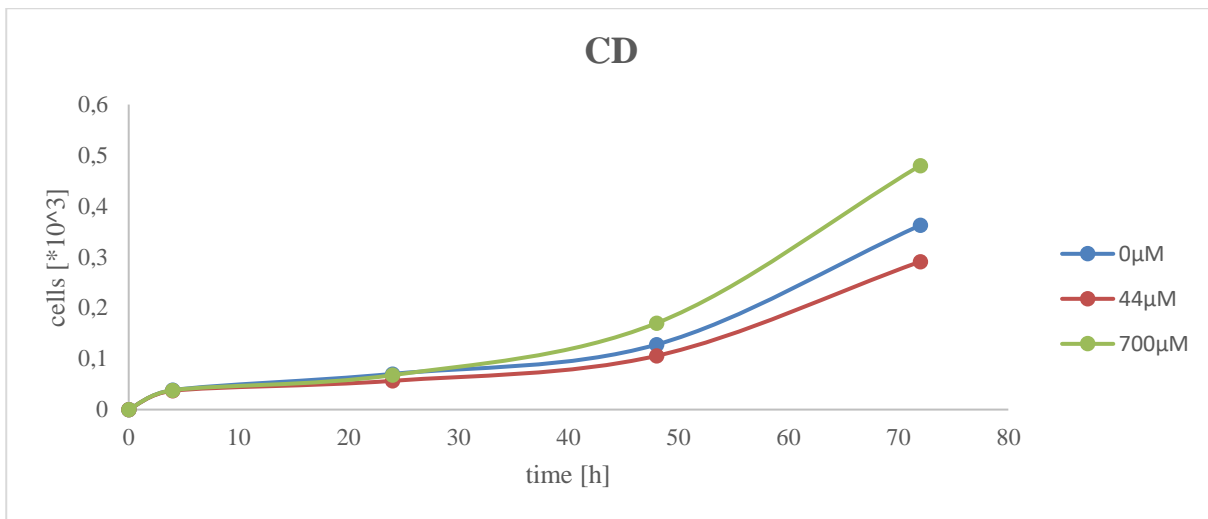
Διάγραμμα 16. Ανάπτυξη του κυτταρικού πληθυσμού στη φάση G_1 συναρτήσει του χρόνου.



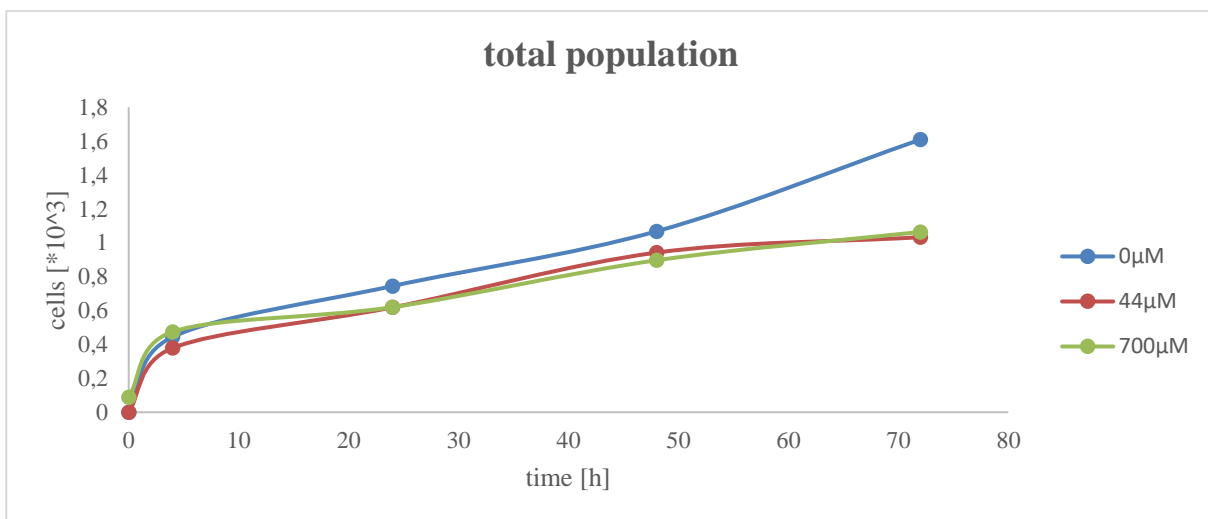
Διάγραμμα 17. Ανάπτυξη του κυτταρικού πληθυσμού στη φάση S συναρτήσει του χρόνου.



Διάγραμμα 18. Ανάπτυξη του κυτταρικού πληθυσμού στη φάση G_2 συναρτήσει του χρόνου.



Διάγραμμα 19. Ανάπτυξη του αποπτικού (CD) κυτταρικού πληθυσμού συναρτήσει του χρόνου.



Διάγραμμα 20. Ανάπτυξη συνολικού πληθυσμού συναρτήσει του χρόνου

Παρατηρούμε ότι και στις τρεις περιπτώσεις (0μM, 44μM και 700μM) οι καμπύλες που περιγράφουν τον εκάστοτε πληθυσμό έχουν παρόμοια μορφή. Αυτό σημαίνει ότι ανεξάρτητα από την συγκέντρωση πρεδνιζολόνης, η εξέλιξη των κυτταροκαλλιιεργειών θα είναι παρόμοια. Παρατηρούνται μεν κάποιες διαφορές ανάλογα με την συγκέντρωση πρεδνιζολόνης, πχ: οι πληθυσμοί σε φάσεις G₁, S, G₂ καθώς και ο συνολικός πληθυσμός έχουν ταχύτερη ανάπτυξη σε περιβάλλον χωρίς πρεδνιζολόνη και εφόσον υπάρχει πρεδνιζολόνη, αναπτύσσονται κάπως ταχύτερα αυτά με την μικρότερη συγκέντρωση αυτής (δηλαδή αυτά με 44μM αντί αυτών με 700μM). Αντίστοιχα, ο αποπτικός πληθυσμός αναπτύσσεται ταχύτερη σε διάλυμα με 700μM πρεδνιζολόνης και αργότερα σε διάλυμα με 44μM (αντί να αναπτύσσεται αργότερα σε περιβάλλον χωρίς πρεδνιζολόνη. Αυτά οδηγούν προς το συμπέρασμα ότι οι διαφορές αυτές μάλλον δεν οφείλονται στην παρουσία ή μη πρεδνιζολόνης, επιβεβαιώνοντας την υποψία ότι τα εν λόγω κύτταρα είναι ανθεκτικά στην πρεδνιζολόνη.

Παρατηρούμε τέλος ότι η μορφή των καμπύλων του συνολικού πληθυσμού είναι παρόμοιες με αυτές των συνολικών πληθυσμών που παρουσιάζονται στο κεφάλαιο **3.1.1.** Επίσης, οι καμπύλες των επιμέρους πληθυσμών -πλην της καμπύλης ανάπτυξης των κυττάρων στη φάση G_2 - έχουν κι αυτές παρόμοια μορφή με τις καμπύλες συνολικού πληθυσμού. Η καμπύλη του κυτταρικού πληθυσμού στη φάση G_2 , φαίνεται να έχει κάποιες ομοιότητες με καμπύλη πολυωνύμου δευτέρου βαθμού, πλην όμως δεν είναι συμμετρική.

3.2 Προσέγγιση Κυτταρικών Πληθυσμών με Γνωστές Συναρτήσεις

3.2.1. Συνολικός πληθυσμός

Πέρα από το σύστημα εξισώσεων που περιγράφει την μεταβολή του εκάστοτε πληθυσμού, υπάρχει και μια εξίσωση που περιγράφει την μεταβολή του συνολικού πληθυσμού, της μορφής:

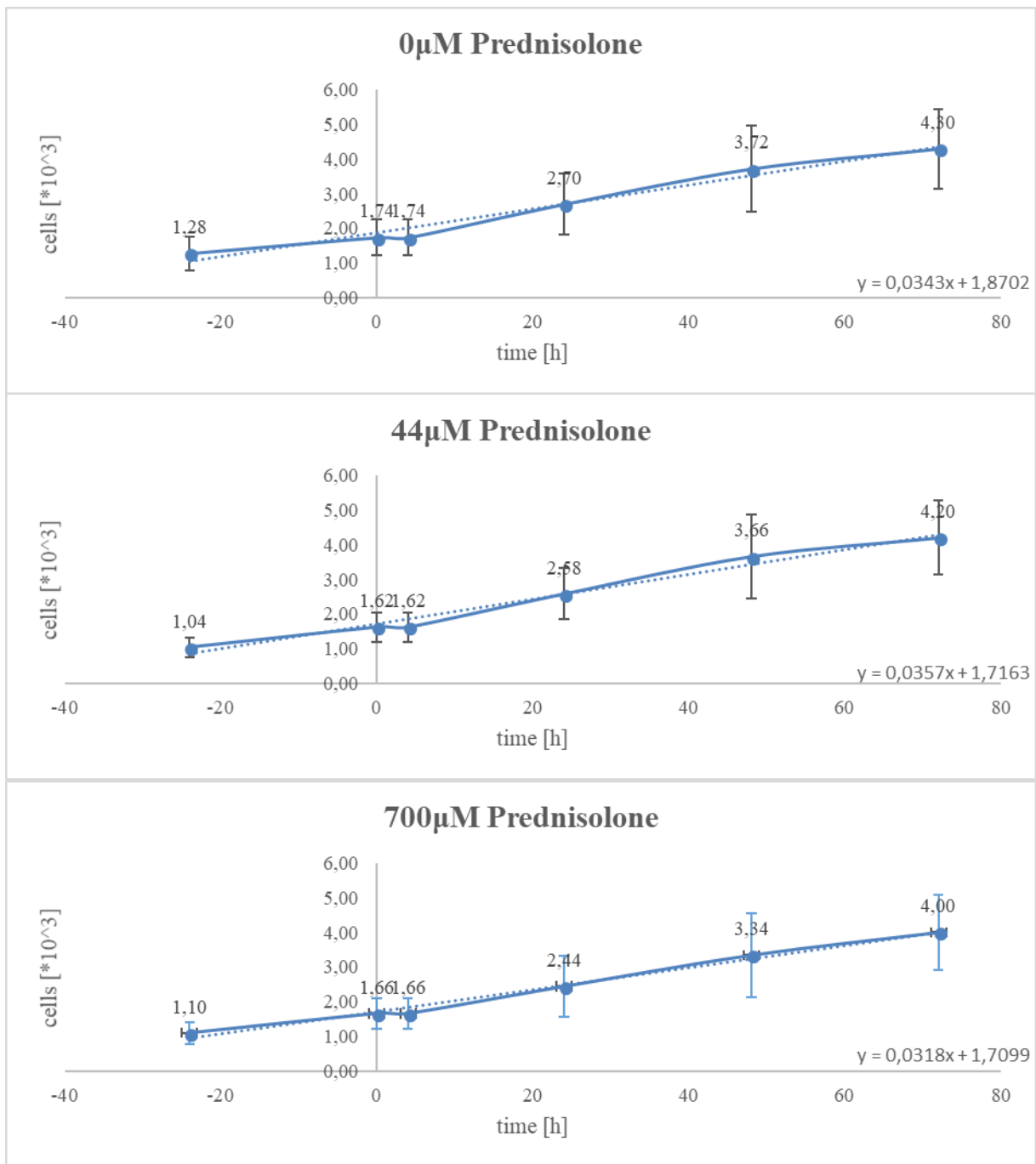
$$\dot{N} = Kf(N), \text{ Εξίσωση 4}$$

όπου $K = f(k_n)$ και k_n οι μεταβλητές του **Συστήματος Εξισώσεων 1** με $n = 1, 2, 3, \dots, 9$.

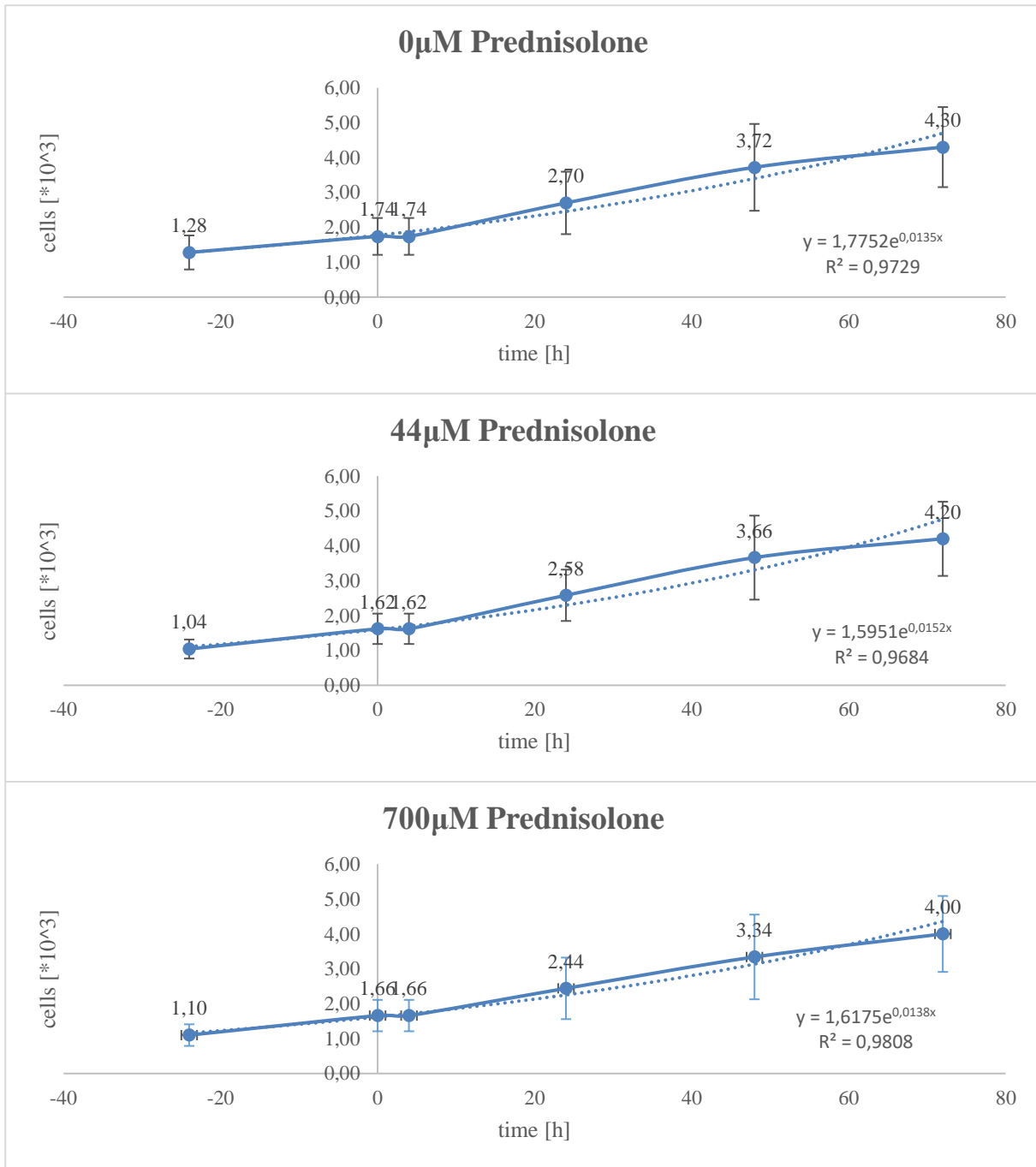
Η εξίσωση αυτή, ενδεχομένως με διαφορετικά K για κάθε περίπτωση, θα είναι αυτή που παρουσιάζεται στα διαγράμματα **Διάγραμμα 1-Διάγραμμα 12**. Εκ πρώτης όψεως, οι καμπύλες μοιάζουν να προσεγγίζουν την σιγμοειδή καμπύλη $f(x) = \frac{1}{1 - e^{-x}}$ και όχι την καμπύλη ανάπτυξης όγκων $f(x) = xr(1 - x)$.

Προσαρμόζοντας λοιπόν τις καμπύλες των διαγραμμάτων **Διάγραμμα 1-Διάγραμμα 12** σε γνωστές καμπύλες, μπορούμε να μάθουμε την μορφή της $f(N)$ και άρα να είμαστε σε θέση να προβλέψουμε την συμπεριφορά μιας αντίστοιχης κυτταρικής καλλιέργειας σε παρόμοιες συνθήκες. Οι δοκιμές θα γίνουν στο **Διάγραμμα 1**, το **Διάγραμμα 2** και το **Διάγραμμα 6**, δηλαδή για το δείγμα ελέγχου, το δείγμα με 700μM πρεδνιζολόνης και το δείγμα με 44μM πρεδνιζολόνης.

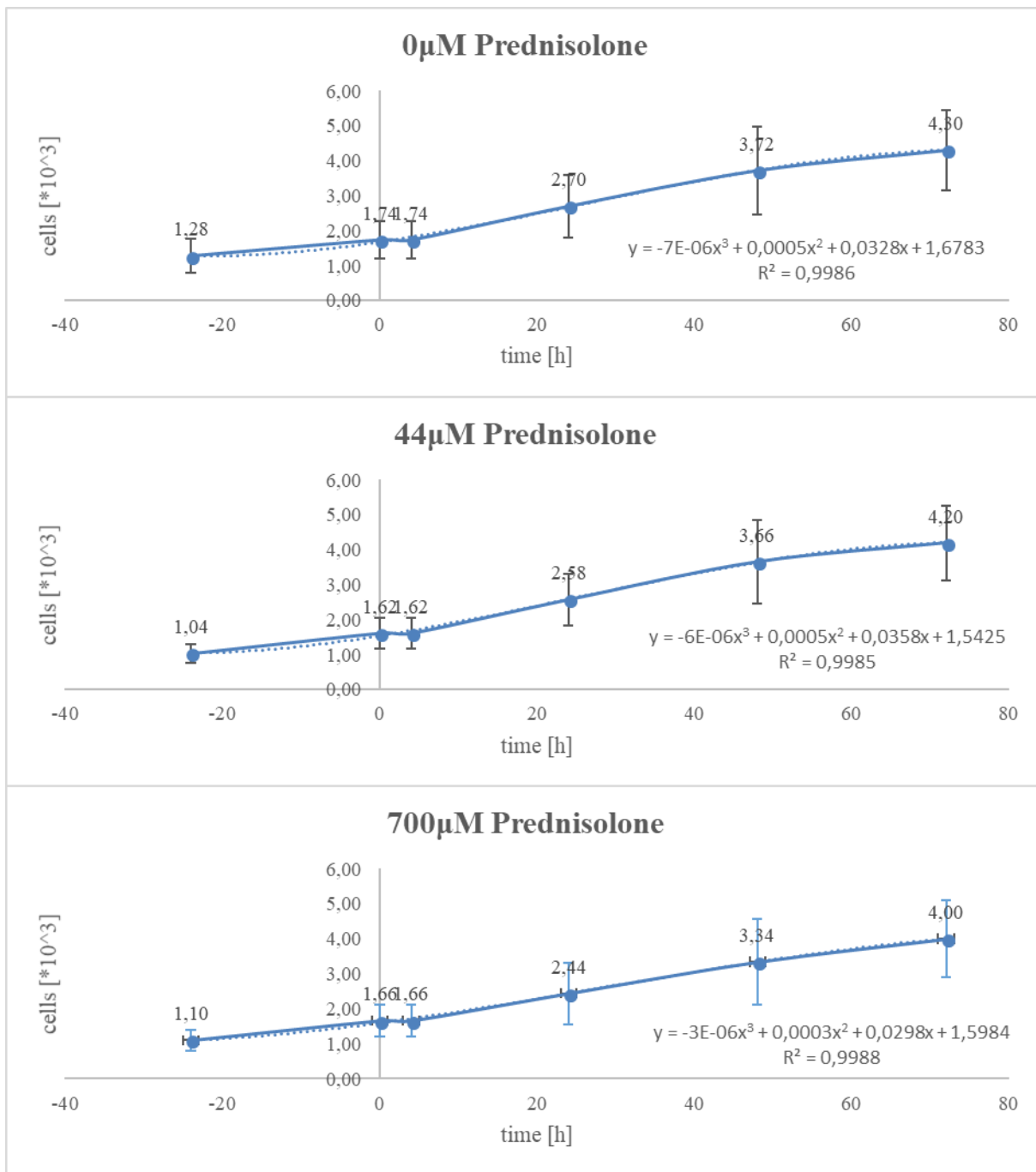
Κατ' αρχήν εξετάζουμε κατά πόσο μπορεί να προσεγγιστεί η μορφή από απλούστερες συναρτήσεις. Παρακάτω παρουσιάζονται οι γραμμές τάσης για προσέγγιση με γραμμική συνάρτηση, με εκθετική συνάρτηση, με συνάρτηση τρίτου και με συνάρτηση τέταρτου βαθμού.



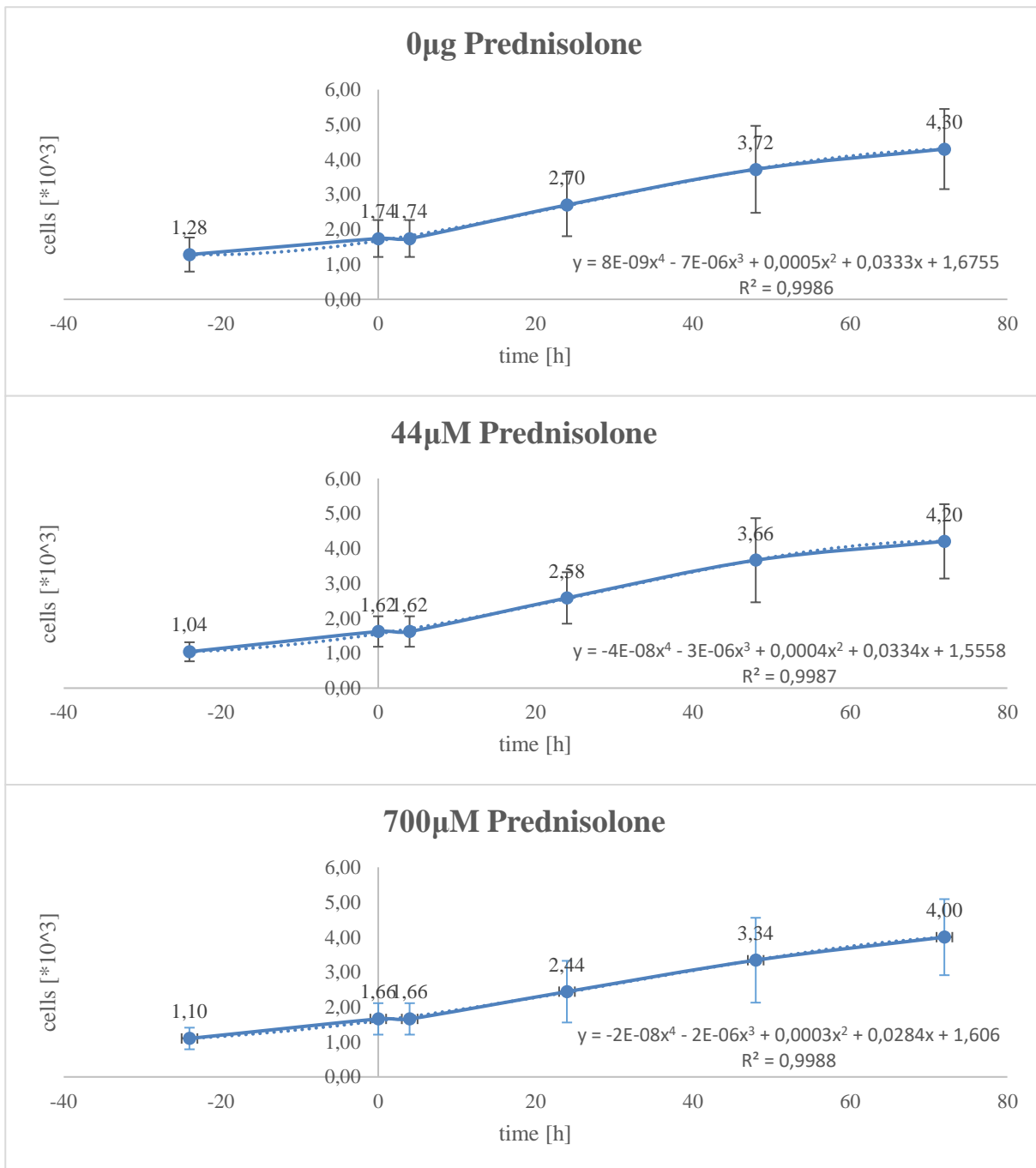
Διάγραμμα 21. Προσέγγιση με γραμμική συνάρτηση.



Διάγραμμα 22. Προσέγγιση με εκθετική συνάρτηση.



Διάγραμμα 23. Προσέγγιση με συνάρτηση 3^{ου} βαθμού.

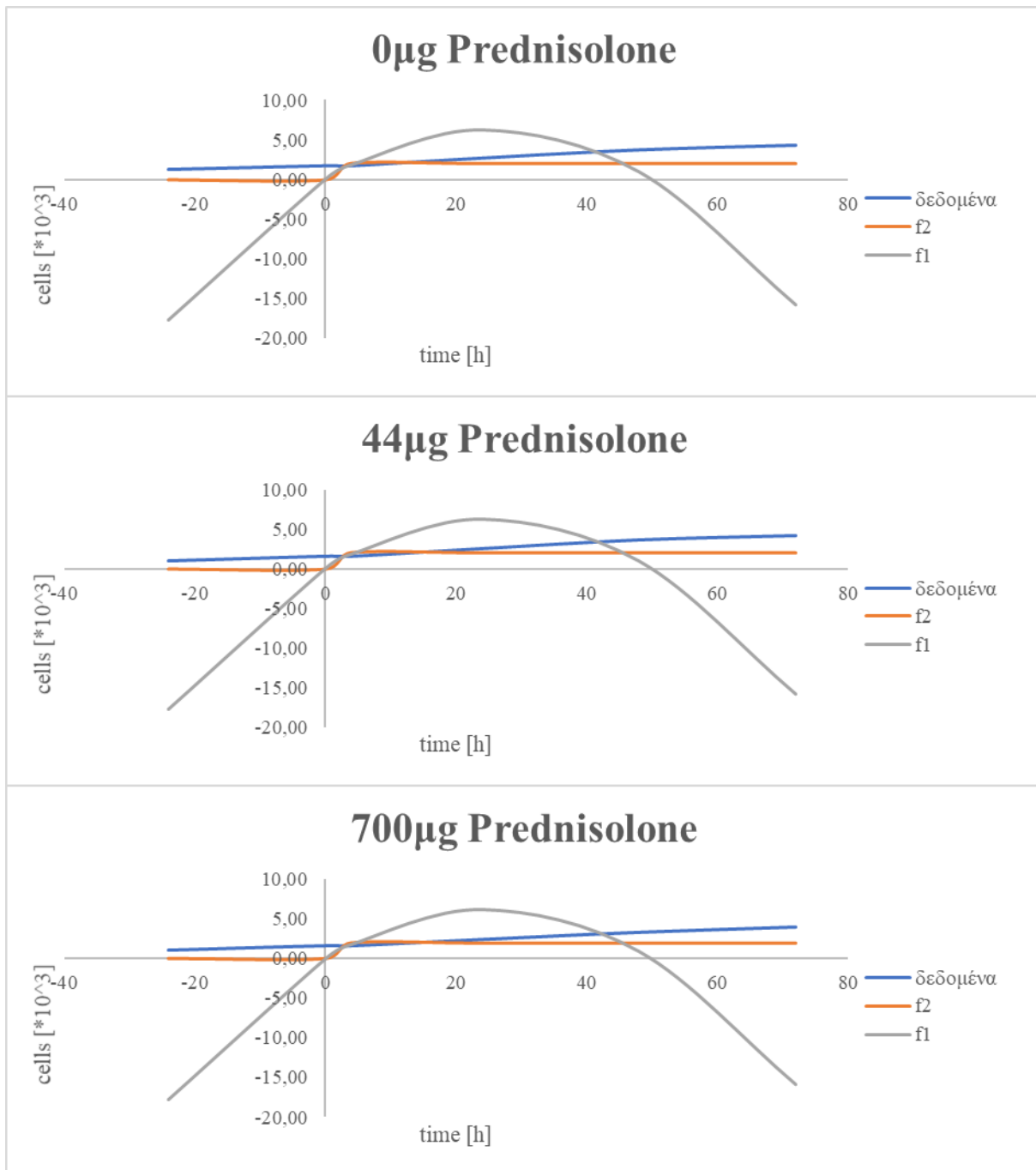


Διάγραμμα 24. Προσέγγιση με συνάρτηση 4^{ου} βαθμού.

Παρατηρούμε τόσο διαισθητικά, όσο και με κατάλληλο έλεγχο στο *Excel*, ότι η γραμμική και η εκθετική συνάρτηση, δεν αποτελούν σωστές προσεγγίσεις για την καμπύλη, παρόλο που έχουν και οι δύο μεγάλες τιμές R^2 . Οι πολυωνυμικές, ενώ φαίνεται να προσεγγίζουν κάπως καλύτερα την μορφή των καμπύλων, και μάλιστα με ίδιο -και πολύ καλό- R^2 , μετά από αντίστοιχο έλεγχο στο *Excel*, ούτε αυτά αποτελούν ικανοποιητικές προσεγγίσεις των καμπύλων.

Στο παρακάτω διάγραμμα έχουν χαραχτεί, μαζί με την καμπύλη των πειραματικών αποτελεσμάτων, οι

καμπύλες $\dot{N} = Kf(N)$, με $f_1(t) = tr(1-t)$ και $f_2(t) = \frac{1}{1-e^{-t}}$.



Διάγραμμα 25. Σύγκριση καμπύλης πειραματικών δεδομένων με καμπύλες γνωστών συναρτήσεων.

Είναι εμφανές από το παραπάνω διάγραμμα (**Διάγραμμα 25**) ότι η καμπύλη της εξίσωσης f_1 δεν μπορεί να περιγράψει το φαινόμενο που εξετάζουμε. Η εξίσωση f_2 (σιγμοειδής καμπύλη) φαίνεται να έχει πιο κοντινή μορφή. Για την περαιτέρω προσαρμογή των πειραματικών αποτελεσμάτων σε καμπύλη, δεν θα γίνει χρήση της σιγμοειδούς καμπύλης όπως περιγράφεται από την συνάρτηση f_2 , αλλά της συνάρτησης *Gompertz* με γενικό τύπο $f(t) = ae^{-be^{-ct}}$, που πρόκειται για μια σιγμοειδή καμπύλη της οποίας η αύξηση είναι πιο αργή στην αρχή και στο τέλος, και ταχύτερη στο ενδιάμεσο -συμπεριφορά που φαίνεται να ταιριάζει στην

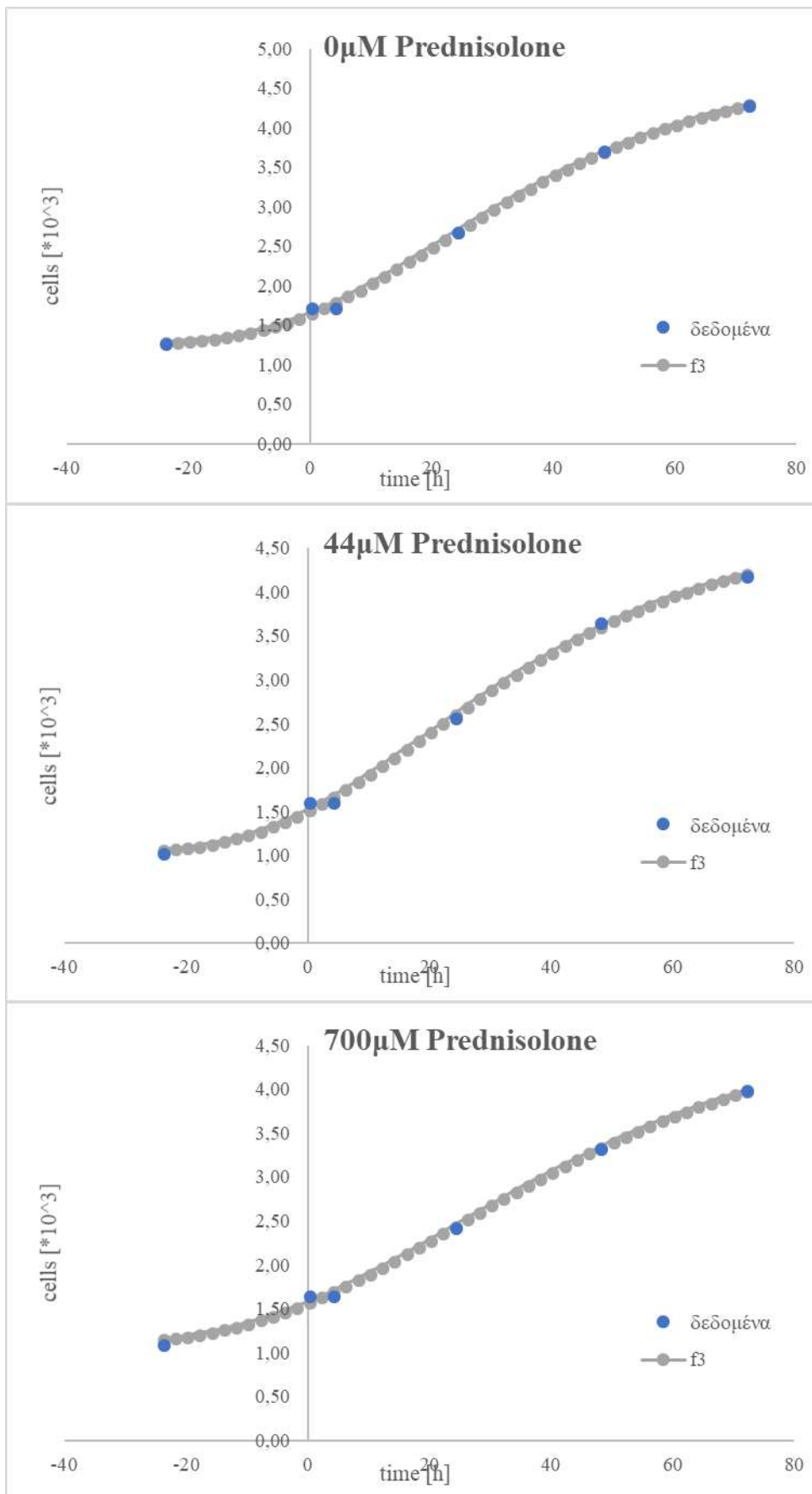
παρούσα περίπτωση.

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται τα σημεία των πειραματικών αποτελεσμάτων, μαζί με την καμπύλη που δίνεται από τη συνάρτηση:

$$f_3(t) = N(t) = N_0 + ae^{-be^{-ct}}, \text{ Εξίσωση 5 όπου: } \begin{matrix} a = 3.52872 \\ b = 2.20906 \\ c = 0.037019 \\ N_0 = 1.28 \end{matrix} \text{ οι τιμές των συντελεστών για την περίπτωση}$$

$$\text{του δείγματος ελέγχου, } \begin{matrix} a = 3,70935 \\ b = 2,02312 \\ c = 0,03574 \\ N_0 = 1.04 \end{matrix} \text{ οι τιμές των συντελεστών για την περίπτωση με } 44\mu\text{M προδνιζολόνης}$$

$$\text{και } \begin{matrix} a = 3.71866 \\ b = 2,03534 \\ c = 0,02910 \\ N_0 = 1.10 \end{matrix} \text{ οι τιμές των συντελεστών για την περίπτωση με } 700\mu\text{M προδνιζολόνης.}$$



Διάγραμμα 26. Προσαρμογή πειραματικών αποτελεσμάτων στην σιγμοειδή καμπύλη *Gompertz*.

Η προσαρμογή έγινε με το εργαλείο βελτιστοποίησης του Excel, ενώ για την **Εξίσωση 5** επιλέχτηκε να προστεθεί η τιμή του αρχικού πληθυσμού, κατά την χρονική στιγμή -24h. Φαίνεται τελικά από τα ίδια τα διαγράμματα πως η **Εξίσωση 5** προσεγγίζει ικανοποιητικά τα πειραματικά αποτελέσματα. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, για την προσέγγιση των υπόλοιπων πειραματικών αποτελεσμάτων (δηλαδή των αποτελεσμάτων που παρουσιάζονται στα υπόλοιπα εκ των διαγραμμάτων (**Διαγράμματα 1-12**)) μπορεί να χρησιμοποιηθεί η **Εξίσωση 5** με διαφορετικούς σταθερούς συντελεστές a , b , c και N_0 , με την ίδια διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε και στις τρεις περιπτώσεις που παρουσιάζονται εδώ.

Ένας επιπλέον λόγος, που επιβεβαιώνει την ορθότητα της προσέγγισης αυτής, είναι η ύπαρξη βιβλιογραφίας, σύμφωνα με την οποία παραλλαγές της συνάρτησης και καμπύλης *Gompertz* έχουν περιγράψει με επιτυχία αντίστοιχα φαινόμενα [22-25]. Το γεγονός ότι πρόκειται για μια γνωστή συνάρτηση, με γνωστές ιδιότητες, σημαίνει ότι μπορούν να γίνουν προβλέψεις σχετικά με την εξέλιξη ενός πληθυσμού, εφόσον είναι γνωστός ο αρχικός πληθυσμός του και οι σταθεροί συντελεστές.

3.2.2. Επιμέρους πληθυσμοί

Με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που έγινε προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων σε καμπύλη του συνολικού πληθυσμού, έγινε και στους επιμέρους πληθυσμούς. Όπως και πριν, εξετάστηκαν ως ενδεικτικοί οι πληθυσμοί του δείγματος ελέγχου.

Οι πληθυσμοί N_{G1} , N_S , και N_{CD} προσεγγίστηκαν με καμπύλη *Gompertz* της μορφής $f(t) = ae^{-be^{-ct}}$ δίνοντας τις εξής εξισώσεις:

$$N_{G_1}(t) = ae^{-be^{-ct}}, \text{ Εξίσωση 6, όπου } a = 2100.855 \\ b = 10.32616 \\ c = 0.002685$$

$$N_S(t) = ae^{-be^{-ct}}, \text{ Εξίσωση 7, όπου } a = 1132.118 \\ b = 9.218758 \\ c = 0.002815$$

$$N_{CD}(t) = ae^{-be^{-ct}}, \text{ Εξίσωση 8, όπου } a = 225618.5 \\ b = 16.20877 \\ c = 0.002691$$

Ο πληθυσμός N_{G2} θα μπορούσε να προσεγγιστεί από πολυωνυμική εξίσωση δευτέρου βαθμού (όπως είναι π.χ. η καμπύλη ανάπτυξης όγκων), αλλά δεν είναι συμμετρική. Η μορφή της μοιάζει περισσότερο με καμπύλες στατιστικής κατανομής.

3.3 Βελτιστοποίηση μαθηματικού μοντέλου

Η γενική **Εξίσωση 2** όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο *Μαθηματικό Μοντέλο* δεν είναι ικανή να περιγράψει το **Σύστημα Εξισώσεων 1** καθώς το δεύτερο μέλος έχει μόνο δύο μεταβλητές N και k , άρα δεν μπορεί να εξαχθεί από αυτήν η τέταρτη εξίσωση του ίδιου συστήματος. Επιπλέον η χρήση των μεταβλητών x , y και z είναι κάπως αόριστη -και ελλιπής κατά μία μεταβλητή- ενώ θα μπορούσε να υπάρξει πιο αναλυτική αντιστοιχία των G_1 , S , G_2 , CD με άλλες μεταβλητές. Εφόσον δεχόμαστε ότι το **Σύστημα Εξισώσεων 1** περιγράφει ορθά την εξέλιξη των κυτταρικών πληθυσμών, τότε πρέπει να διατυπωθεί εκ νέου μια γενική εξίσωση.

Οι μεταβλητές του συστήματος είναι 4: οι επιμέρους πληθυσμοί στις τέσσερις φάσεις, για δεδομένη χρονική στιγμή N_{G1} , N_S , N_{G2} , και N_{CD} . Οι μεταβλητές αυτές μπορούν εύκολα να μετρηθούν για δεδομένη χρονική στιγμή t από υπάρχουσα πειραματική διάταξη. Οι παράμετροι k_n δεν ξέρουμε ακόμα άμα είναι σταθερές ή μεταβλητές, υποθέτουμε πάντως πως εάν μεταβάλλονται, θα ακολουθούν κάποια συγκεκριμένη κατανομή και δεν θα μεταβάλλονται τυχαία. Εφόσον οι N_{G1} , N_S , N_{G2} , και N_{CD} για $t+1$ εξαρτώνται μόνο από τους πληθυσμούς την ακριβώς προηγούμενη χρονική στιγμή και τους k_n , η γενική εξίσωση μπορεί να περιγραφεί πιο ικανοποιητικά με χρήση πινάκων, ως εξής:

$$\dot{N} = kN, \text{ Εξίσωση 9, όπου: } N = \begin{bmatrix} N_{G1} \\ N_S \\ N_{G2} \\ N_{CD} \end{bmatrix}, \dot{N} = \begin{bmatrix} \dot{N}_{G1} \\ \dot{N}_S \\ \dot{N}_{G2} \\ \dot{N}_{CD} \end{bmatrix} = dt \begin{bmatrix} N_{G1} \\ N_S \\ N_{G2} \\ N_{CD} \end{bmatrix}, k = \begin{bmatrix} k_1 & 0 & k_8 & 0 \\ k_2 & k_4 & 0 & 0 \\ 0 & k_5 & k_7 & 0 \\ k_3 & k_6 & k_9 & 1 \end{bmatrix}$$

Η **Εξίσωση 9** είναι η εξίσωση κατάστασης του φαινομένου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και πρόκειται για ένα γραμμικό διαφορικό σύστημα με μη-μηδενικές αρχικές συνθήκες.

Εφόσον οι N_{G1} , N_S , N_{G2} , και N_{CD} είναι οι μεταβλητές κατάστασης και λόγω της μορφής της προηγούμενης εξίσωσης (**Εξίσωση 9**) μπορούμε να θεωρήσουμε ότι η λύση είναι παρόμοια σε μορφή με αυτή μιας εξίσωσης πρώτης τάξης και ότι δίνεται από την:

$$N(t) = e^{kt} N(0), \text{ Εξίσωση 10, όπου } e^{kt} = \left[I + \sum_i \frac{k^i t^i}{i!} \right] \text{ ένας πίνακας } n \times n.$$

Τόσο η **Εξίσωση 9** όσο και η λύση της (**Εξίσωση 10**), χρησιμοποιούνται για την περιγραφή και απόκριση στο πεδίο του χρόνου (σε αρχικές συνθήκες), αντίστοιχα, με ένα παράδειγμα εφαρμογής να είναι και η απόκριση κυκλωμάτων 1^{ης} τάξης [26]. Καθώς και σε εκείνη την περίπτωση πρόκειται για μοντελοποίηση ενός συστήματος στο οποίο μεταβάλλονται φυσικά μεγέθη συναρτήσει μόνο του χρόνου -πράγμα που ισχύει και για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όπως προσεγγίστηκε στα πείραμα που αφορούν την παρούσα εργασία- αξίζει να εξεταστεί κατά πόσο όντως οι εξισώσεις αυτές περιγράφουν ικανοποιητικά

και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Πάντως παρατηρούμε ότι η **Εξίσωση 10** μοιάζει αρκετά με την **Εξίσωση 9** στην οποία και προσαρμόστηκαν τα πειραματικά αποτελέσματα, οπότε μάλλον επιβεβαιώνεται και η εγκυρότητα της ως συνάρτησης που περιγράφει το φαινόμενο.

3.4 Προσδιορισμός Μεταβλητής k

Προκειμένου να μπορεί να λυθεί η **Εξίσωση 9** πρέπει να προσδιοριστούν τα k_n . Για αυτά δεν γνωρίζουμε πολλά πράγματα, αλλά θεωρούμε ότι ικανοποιείται η συνθήκη $K = f(k_n)$. Επιπλέον, λόγω της μορφής των καμπύλων στα διαγράμματα των επιμέρους πληθυσμών (βλ. κεφάλαιο **3.1.2. Επιμέρους Πληθυσμοί**) και εφόσον οι εξισώσεις που τις δίνουν είναι πρώτου βαθμού, αναμένεται τα k_n να μην μένουν σταθερά αλλά να μεταβάλλονται συναρτήσει του χρόνου, ακολουθώντας κάποια συνάρτηση. Η υποψία αυτή αποτυπώνεται και στο **Σύστημα Εξισώσεων 2**, μένει όμως να διερευνηθεί κατά πόσο αυτό δίνει τις σωστές σχέσεις.

Το **Σύστημα Εξισώσεων 2** είναι σύστημα τεσσάρων εξισώσεων με εννέα αγνώστους, άρα δεν μπορεί να λυθεί αναλυτικά. Εφόσον όμως έχουμε δεδομένα για τους πληθυσμούς για πάνω από μια χρονικές στιγμές, μπορεί να λυθεί με κάποια μέθοδο αριθμητικής ανάλυσης ή με κάποιο πρόγραμμα. Συγκεκριμένα, για τους επιμέρους πληθυσμούς έχουμε μετρήσεις για τέσσερις χρονικές στιγμές, άρα μπορούν να γίνουν τρεις υπολογισμοί για κάθε k_n , για τις τρεις μεταβάσεις από χρονική στιγμή t σε $t+1$. Από τους υπολογισμούς αυτούς θα επιβεβαιωθεί κατά πόσο τα k_n μένουν σταθερά ή αν όντως μεταβάλλονται με τον χρόνο.

Επίσης, επειδή κάθε εξίσωση έχει πάνω από έναν αγνώστους και αυτός ο αγνώστος δεν εμφανίζεται σε άλλη εξίσωση του συστήματος, αναμένεται να υπάρχουν πάνω από μια σωστές λύσεις για τα k_n κάθε εξίσωσης. Για τις τρεις πρώτες εξισώσεις, θα υπάρχουν ζεύγη λύσεων, ενώ για την τέταρτη, τριάδα. Αυτό επιβεβαιώνεται και αντικαθιστώντας εξισώσεις των επιμέρους πληθυσμών (βλ. **Εξίσωση 5**), στις εξισώσεις του **Συστήματος Εξισώσεων 1**. Το αποτέλεσμα που δίνεται είναι μια μεταβλητή k_n συναρτήσει κάποιας άλλης. Ενδεικτικά, για τα k_2, k_4 , η εξίσωση $N_s(t+1) = N_s(t)k_4 + N_{G_1}k_2$ γίνεται με τις αντικαταστάσεις:

$$a_s e^{-b_s e^{-c_s(t+1)}} = a_s e^{-b_s e^{-c_s t}} k_4 + a_{G_1} e^{-b_{G_1} e^{-c_{G_1} t}} k_2, \quad \text{οπότε λύνοντας ως προς } k_4 \text{ έχουμε:}$$

$$k_4 = \frac{1}{a_s e^{-b_s e^{-c_s t}}} \left(a_s e^{-b_s e^{-c_s(t+1)}} - a_{G_1} e^{-b_{G_1} e^{-c_{G_1} t}} k_2 \right).$$

Η επίλυση έγινε με το εργαλείο *Solver* του *Excel*, και επαναλήφθηκε πέντε φορές, πάντα για τους πληθυσμούς του δείγματος ελέγχου, θέτοντας κάθε φορά άλλη αφετηριακή τιμή για τα k_n : στην πρώτη

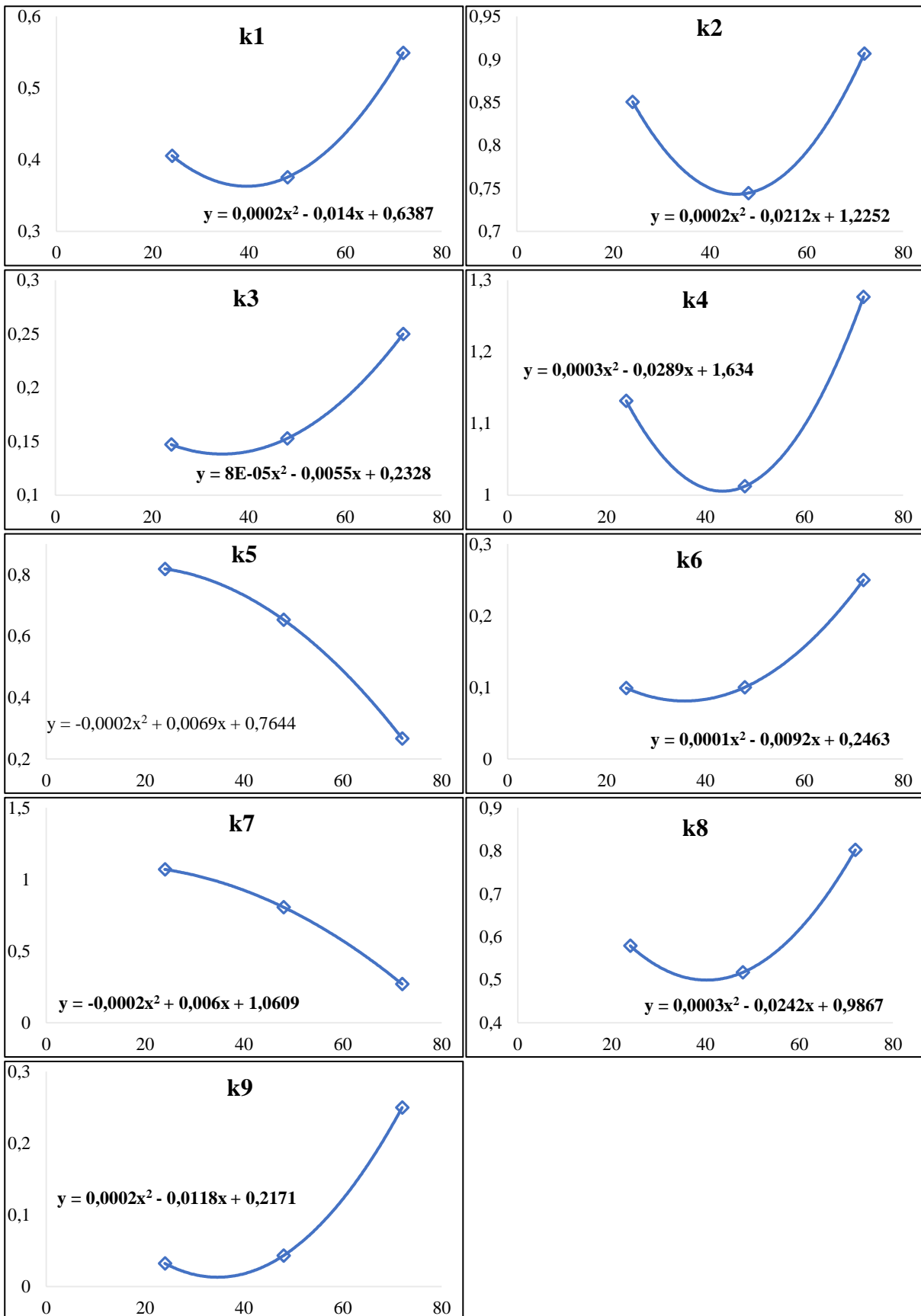
δοκιμή τέθηκε $k_n=0$, στη δεύτερη $k_n=0.25$, στην τρίτη $k_n=0.5$, στην τέταρτη $k_n=0.75$ και στην πέμπτη $k_n=1$. Θεωρούμε ότι έχει γίνει μια επίλυση, όταν έχουν υπολογιστεί k_n και για τις τρεις μεταβάσεις που αναφέρονται παραπάνω.

Και οι πέντε προαναφερθείσες δοκιμές συνέκλιναν σε κάποιες τιμές για τα k_n , επιβεβαιώνοντας και την υποψία για πάνω από μια σωστές λύσεις για κάθε k_n . Εξ αυτών, κάποιες επέστρεψαν μηδενικές τιμές για κάποια k_9 οπότε και απορρίφθηκαν ως μη έχουσες φυσική σημασία. Από τις υπόλοιπες, υπολογίζοντας και τις τετραγωνικές αποκλίσεις των τιμών των πληθυσμών που προκύπτουν από τις εξισώσεις και των πειραματικών δεδομένων, θεωρούμε ότι η καλύτερη προσέγγιση των k_n προκύπτουν όταν θέτουμε ως αρχικά $k_n=0.25$ και είναι, για τις τρεις χρονικές μεταβάσεις:

	k1	k2	k3	k4	k5	k6	k7	k8	k9
24h	0,4055064	0,850693	0,147046	1,131567	0,81905	0,098907	1,069825	0,578792	0,032322
48h	0,3756687	0,744649	0,152738	1,012454	0,65325	0,10008	0,806214	0,517185	0,043212
72h	0,5492109	0,907027	0,249865	1,276678	0,26701	0,249788	0,270078	0,801876	0,24975

Πίνακας 3: Τιμές των μεταβλητών k_n

Παρατηρούμε ότι πράγματι, τα k_n μεταβάλλονται με τον χρόνο. Τα k_5 και k_7 μειώνονται, ακολουθώντας πολυωνυμική συνάρτηση δεύτερου βαθμού ενώ όλα τα υπόλοιπα αυξάνονται, επίσης ακολουθώντας πολυωνυμική δεύτερου βαθμού. Μάλιστα, οι συντελεστές των μεταβλητών δεύτερου βαθμού είναι ίδια τάξης για όλα σχεδόν τα k . Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα, τα οποία για οικονομία χώρου είναι χαραγμένα χωρίς μονάδες στους άξονες. Αναφέρεται ότι στον οριζόντιο άξονα είναι ο χρόνος σε ώρες [h], ενώ στον κάθετο άξονα είναι οι τιμές του αδιάστατου μεγέθους k . (**Διάγραμμα 27**).



Διάγραμμα 27. Μεταβολή της παραμέτρου k_n συναρτήσει του χρόνου

Οι πολυωνυμικές εξισώσεις ισχύουν για κάθε σενάριο αρχικών τιμών k_n με συντελεστές ίδιου βαθμού -και μάλιστα με αρκετά κοντινά νούμερα. Παρακάτω παρουσιάζονται οι εξισώσεις για αρχικά $k_n=0.25$, δηλαδή για τα k_n του προηγούμενου πίνακα (**Πίνακας 3**).

$$k_1 = 2 * 10^{-4} t^2 - 1.4 * 10^{-2} t + 6.387 * 10^{-1}$$

$$k_2 = 2 * 10^{-4} t^2 - 2.12 * 10^{-2} t + 12.252 * 10^{-1}$$

$$k_3 = 0.8 * 10^{-4} t^2 - 0.55 * 10^{-2} t + 2.328 * 10^{-1}$$

$$k_4 = 3 * 10^{-4} t^2 - 2.89 * 10^{-2} t + 16.34 * 10^{-1}$$

$$k_5 = -2 * 10^{-4} t^2 + 0.69 * 10^{-2} t + 7.644 * 10^{-1} \quad \text{Σύστημα Εξισώσεων 3}$$

$$k_6 = 1 * 10^{-4} t^2 - 0.92 * 10^{-2} t + 2.463 * 10^{-1}$$

$$k_7 = -2 * 10^{-4} t^2 + 0.6 * 10^{-2} t + 10.609 * 10^{-1}$$

$$k_8 = 3 * 10^{-4} t^2 - 2.42 * 10^{-2} t + 9.867 * 10^{-1}$$

$$k_9 = 2 * 10^{-4} t^2 - 1.18 * 10^{-2} t + 2.171 * 10^{-1}$$

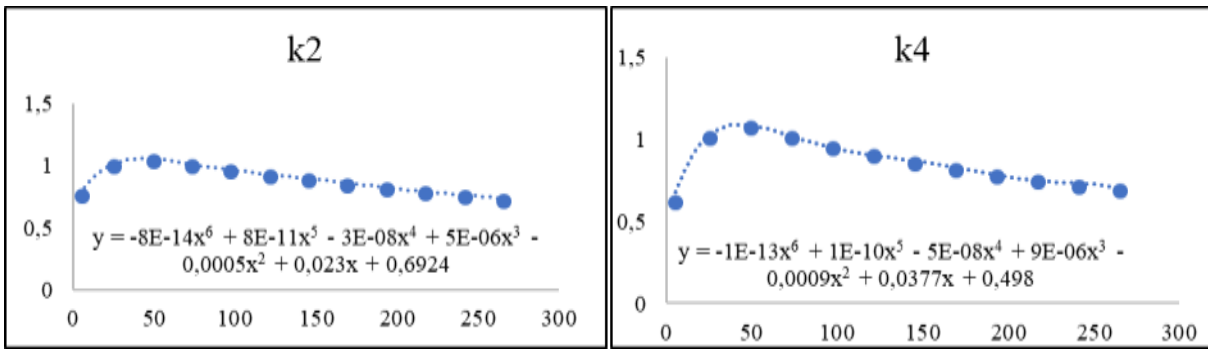
Οι παραπάνω εξισώσεις μπορούν να γραφούν και ως:

$$k_n = \alpha_0 t^2 + \alpha_1 t + \alpha_2, \quad \text{Εξίσωση 11.}$$

Βέβαια, κάνοντας την αντίστροφη διαδικασία, δηλαδή θεωρώντας ως δεδομένες τις εξισώσεις που παρουσιάζονται στο **Σύστημα Εξισώσεων 3** και υπολογίζοντας τους πληθυσμούς N_{G1} , N_S , N_{G2} , και N_{CD} , προκύπτουν πληθυσμοί που ακολουθούν, όπως και τα k_n του **Συστήματος Εξισώσεων 2**, πολυωνυμική κατανομή δευτέρου βαθμού. Αυτό δεν συμπίπτει με τις καμπύλες που προκύπτουν από τα πειραματικά αποτελέσματα, που δείχνουν ότι οι πληθυσμοί N_{G1} , N_S , και N_{CD} ακολουθούν συνάρτηση παρόμοια της σιγμοειδούς καμπύλης ενώ ο N_{G2} συνάρτηση παρόμοια της $f(x) = xr(1-x)$.

Ένας άλλος τρόπος να προσδιοριστούν τα k_n είναι μέσω των εξισώσεων του **Συστήματος Εξισώσεων 1** σε συνδυασμό με τις εξισώσεις επιμέρους πληθυσμών. Από τις εξισώσεις αυτές, υπολογίζουμε τον πληθυσμό για διάφορες χρονικές στιγμές, και στη συνέχεια, προσδιορίζουμε τα αντίστοιχα k_n με χρήση του *Solver* του *Excel*. Ενδεικτικά, αυτό έγινε για την εξίσωση $\dot{N}_S = N_S k_4 + N_{G_1} k_2$, χρησιμοποιώντας τις $N_i(t) = ae^{-be^t}$. Η συνθήκη ελέγχου για τα k_n είναι οι πληθυσμοί που προκύπτουν και από τις δύο αυτές εξισώσεις για τον N_S να είναι μεταξύ τους ίσοι.

Το αποτέλεσμα είναι μεταβλητές k_n που προσεγγίζονται από πολυωνυμικές συναρτήσεις έκτου βαθμού. Κάνοντας την αντίστροφη διαδικασία (υπολογίζοντας δηλαδή ως $\dot{N}_S = N_S k_4 + N_{G_1} k_2$ έναν πληθυσμό) προκύπτει καμπύλη που μοιάζει αρκετά στην μορφή με αυτή που δίνεται από την **Εξίσωση 5**. Οπότε, μπορούμε με αρκετή ασφάλεια να πούμε ότι μια πρώτη προσέγγιση των k_2 , k_4 γίνεται από πολυώνυμο έκτου βαθμού ως εξής:



Διάγραμμα 28: Προσέγγιση k_n με πολυώνυμο 6ου βαθμού

Αντίστοιχα, για τα k_1, k_3, k_6 που αφορούν εξισώσεις N ίδιας μορφής, αναμένουμε αντίστοιχα αποτελέσματα, ενώ για τα k_5, k_7, k_8 και k_9 που αφορούν τον πληθυσμό N_{G2} ο οποίος περιγράφεται από πιο σύνθετη συνάρτηση, αναμένουμε διαφορετικό αποτέλεσμα.

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ενώ κατά την στατιστική ανάλυση τα δείγματα είχαν μεταξύ τους διαφορές όσον αφορά τον ρυθμό ανάπτυξης ή τον πληθυσμό στον οποίο πλέον έχουμε πλατό, αυτές οι διαφορές δεν έχουν άμεση σχέση με την ποσότητα της προδνιζολόνης στο σύστημα. Η έλλειψη σημαντικών διαφορών μεταξύ των δειγμάτων υπό διαφορετική συγκέντρωση προδνιζολόνης, καθώς και η έλλειψη σημαντικών διαφορών μεταξύ των παραπάνω με το πείραμα ελέγχου, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα είναι ανθεκτικά στην προδνιζολόνη. Παρόλα αυτά, επειδή παρατηρήθηκαν κάποιες διαφορές σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις προδνιζολόνης και επειδή ο όγκος των δεδομένων δεν επαρκεί για την ασφαλή διατύπωση συμπεράσματος, είναι χρήσιμο το πείραμα να επαναληφθεί προκειμένου να διαπιστωθεί κατά πόσο υπάρχει ή δεν υπάρχει τελικά κάποια δοσολογία στην οποία να ανταποκρίνονται τα κύτταρα αυτά και, εάν όντως δεν υπάρχει, να αναζητηθούν εναλλακτικές θεραπείες.

Όσον αφορά το μαθηματικό μοντέλο που προτείνεται, που περιγράφει την κατάσταση ενός επιμέρους πληθυσμού συναρτήσει μόνο της προηγούμενης, εάν είναι ορθό οφείλει να μπορεί να συσχετιστεί άμεσα με τις εξισώσεις που περιγράφουν συνολικά την εξέλιξη των πληθυσμών αυτών. Για τους επιμέρους πληθυσμούς N_{GI} , N_S , και N_{CD} μπόρεσε και δόθηκε μια ικανοποιητική σχέση. Για τον επιμέρους πληθυσμό N_{G2} δεν μπόρεσε να δοθεί κάποια συγκεκριμένη εξίσωση που τον περιγράφει συνολικά, υπάρχουν όμως ενδείξεις ότι μια τέτοια εξίσωση υπάρχει και έχει μορφή παρόμοια με αυτή κάποιας στατιστικής κατανομής (π.χ. με την κατανομή Γάμα, την Poisson, την Gompertz πιθανοτήτων κ.α.). Λόγω της αδυναμίας περιγραφής της συνολικής μεταβολής του πληθυσμού N_{G2} δεν μπόρεσαν να προσδιοριστούν και οι μεταβλητές k_5 , k_7 , k_8 και k_9 , ο προσδιορισμός τους όμως θα είναι αρκετά απλός μόλις αποκτήσουμε ικανοποιητική συνάρτηση για την συνολική μεταβολή του N_{G2} .

Όσον αφορά την δήλωση «θεωρούμε ότι ικανοποιείται η συνθήκη $K = f(k_n)$ », παρόλο που αυτή δεν μπόρεσε τελικά να εξεταστεί εξ ολοκλήρου μιας και δεν υπολογίστηκαν όλα τα k_n και οι μεταβλητές της εξίσωσης της συνολικής μεταβολής του N_{G2} , εξακολουθούμε να την θεωρούμε ορθή καθώς από την μέχρι τώρα ανάλυση επιβεβαιώνεται.

5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την ανάλυση των πειραματικών αποτελεσμάτων, φάνηκε ότι ο συνολικός κυτταρικός πληθυσμός αυξάνεται με παρόμοιο τρόπο, ανεξάρτητα από την παρουσία ή μη πρεδνιζολόνης στο περιβάλλον του. Μένει μεν να επιβεβαιωθεί από επαναληπτικά πειράματα, αλλά σαν συμπεριφορά αποτελεί ένδειξη ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην πρεδνιζολόνη.

Η συμπεριφορά του κυτταρικού πληθυσμού -αύξηση τις πρώτες ώρες, σταδιακή μείωση του ρυθμού ανάπτυξης και τελικά σταθεροποίηση του- μπορεί να προσεγγιστεί ικανοποιητικά από συνάρτηση *Gompertz*, της οποίας οι ιδιότητες είναι γνωστές. Γνωρίζοντας λοιπόν τον πληθυσμό σε λίγες αρχικές χρονικές στιγμές, είναι δυνατό να προσδιοριστούν οι σταθεροί παράγοντες που χαρακτηρίζουν το συγκεκριμένο δείγμα, και να γίνουν προγνώσεις για μελλοντική συμπεριφορά με βάση αυτήν, σχετικά με τον ρυθμό ανάπτυξης και το μέγεθος του πληθυσμού κατά το πλατό. Διευκρινίζοντας σε ποιο φυσικό μέγεθος (φάρμακο, τροφή, χώρος κλπ.) αντιστοιχεί η κάθε μεταβλητή, αυτή μπορεί να προσαρμοστεί αναλόγως, προκειμένου να μειωθεί ο ρυθμός ανάπτυξης του πληθυσμού και ο πληθυσμός που αντιστοιχεί στο πλατό. Εφόσον γίνει αυτό *in vitro*, υπάρχουν αρκετές πιθανότητες να γίνεται και *in vivo*.

6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Machalek, A.Z., et al., *Inside the cell*. A publication of the US National Institute of Health, 2007.
2. Schleif, R., *Genetics and molecular biology*. 1993: Johns Hopkins University Press.
3. Ρήγας, Π., *Εργαστήριο Φυσιολογίας Ι: Συμπληρωματικά Φυλλάδια Διδασκαλίας*, in *1. Εισαγωγή στο Κύτταρο*. 2010, Τ.Ε.Ι. Αθήνας.
4. Ε.Ε.Π.Ο.Ε., Γ. Ρήγας, and Α. Αθανασίου, *Κλινική Ογκολογία*, in *Κλινική Ογκολογία*. 2007: Αθήνα.
5. Ε.Ε.Π.Ο.Ε. and Α. Παναγή, *Κλινική Ογκολογία*, in *Κλινική Ογκολογία*. 2007: Αθήνα.
6. Bozzone, D.M., *Leukemia: Biology of cancer*. 2009, New York: Info base Publishing.
7. Virchow, R., *Editorial Archive fuer pathologische Anatomie und Physiologie fuer klinische Medizin*, 1855. **8**: p. 23-54.
8. Cohnheim, J., *Uber Entzundung und Eiterung [About inflammation and sepsis]*. *Pathol Anat Physiol Klin Med*, 1867. **40**: p. 79.
9. Hamburger, A.W. and S.E. Salmon, *Primary bioassay of human tumor stem cells*. *Science*, 1977. **197**(4302): p. 461-3.
10. Griffin, J. and B. Lowenberg, *Clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia*. *Blood*, 1986. **68**(6): p. 1185-1195.
11. Sabbath, K.D., et al., *Heterogeneity of clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia*. *J Clin Invest*, 1985. **75**(2): p. 746-53.
12. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. *Nature medicine*, 1997. **3**(7): p. 730.
13. Huntly, B.J. and D.G. Gilliland, *Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research*. *Nature Reviews Cancer*, 2005. **5**(4): p. 311.
14. Κολιούλης, Ι.Π., *Σημειώσεις Φαρμακολογίας*. Τ.Ε.Ι. Δυτικής Μακεδονίας, Τμήμα Μαιευτικής.
15. Becker, D.E., *Basic and clinical pharmacology of glucocorticosteroids*. *Anesth Prog*, 2013. **60**(1): p. 25-31; quiz 32.
16. Lambrou, G.I., et al., *Studying Non-Linear Phenomena of Tumour Cell Populations under Chemotherapeutic Drug Influence*. *Chaotic Modeling and Simulation (CMSIM)*, 2012. **2**: p. 371-385.
17. Lambrou, G.I., et al., *Comparative computational methods for identification of inherent or acquired mechanisms of resistance to prednisolone in acute lymphoblastic leukemia cells*, in *ITAB 2009. 9th International Conference on Information Technology and Applications in Biomedicine. IEEE*. 2009: Larnaca, Cyprus. p. 1-5.
18. Lambrou, G.I., et al., *Prednisolone exerts late mitogenic and biphasic effects on resistant acute lymphoblastic leukemia cells: Relation to early gene expression*. *Leuk Res*, 2009. **33**(12): p. 1684-95.
19. Lambrou, G.I., et al., *Studying the nonlinearities of T-cell leukemia growth and the underlying metabolism upon glucocorticoid treatment through the application of dynamic mathematical methodologies*, in *10th IEEE International Conference on Information Technology and Applications in Biomedicine, Corfu, 2010*. 2010: Corfu, Greece. p. 1-6.
20. Watson, J.V., S.H. Chambers, and P.J. Smith, *A pragmatic approach to the analysis of DNA histograms with a definable G1 peak*. *Cytometry Part A*, 1987. **8**(1): p. 1-8.
21. Vandermeer, J., *How Populations Grow: The Exponential and Logistic Equations*. *Nature Education Knowledge*, 2010. **3**(10):15.
22. Brunton, G.F. and T.E. Wheldon, *The Gompertz equation and the construction of tumour growth curves*. *Cell Tissue Kinet*, 1980. **13**(4): p. 455-60.
23. Laird, A.K., *Dynamics of Tumor Growth*. *Br J Cancer*, 1964. **13**: p. 490-502.
24. Laird, A.K., *Dynamics of Tumour Growth: Comparison of Growth Rates and Extrapolation of Growth Curve to One Cell*. *Br J Cancer*, 1965. **19**(2): p. 278-91.
25. Rossi, S., A. Deslauriers, and H. Morin, *Application of the Gompertz equation for the study of xylem cell development*. *Dendrochronologia*, 2003. **21**(1): p. 33-39.
26. Παπαδόπουλος, Ε., *Εισαγωγή στα Ηλεκτρικά Κυκλώματα και Συστήματα*. 1999: Θωμάϊδιο Κέντρο Εκδόσεων ΕΜΠ.

7 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

7.1 Σύμβολα

Σύμβολο	Σημασία	Μονάδες
G_1	φάση κυτταρικού κύλου	-
S	φάση κυτταρικού κύλου	-
G_2	φάση κυτταρικού κύλου	-
CD	φάση κυτταρικού κύλου	-
$N_{p,t}$	κυτταρκός πληθυσμός φάσης p την χρονική στιγμή t	cells/ul · 10 ³
k_i	διορθωτικός παράγοντας	-

Πίνακας 4. Σύμβολα εξισώσεων μαθηματικού μοντέλου.

7.2 Πίνακες

-24h (cells/μl)·10 ³	0h (cells/μl)·10 ³	4h (cells/μl)·10 ³	24h (cells/μl)·10 ³	48h (cells/μl)·10 ³	72h (cells/μl)·10 ³	Flask Number	Prednisolone (μg)	Prednisolone (uM)
1,28	1,74	1,74	2,70	3,72	4,30	0	0,00	0,00
-	-	-	-	-	-	1	4037,60	1400,00
1,10	1,66	1,66	2,44	3,34	4,00	2	2018,80	700,00
1,12	1,34	1,34	1,88	2,54	3,22	3	1009,40	350,00
1,02	1,72	1,72	2,42	3,54	4,18	4	504,70	175,00
1,08	1,64	1,64	2,50	3,46	4,24	5	288,40	100,00
1,04	1,62	1,62	2,58	3,66	4,20	6	126,90	44,00
0,96	1,46	1,46	2,00	2,60	3,36	7	63,45	22,00
1,10	1,58	1,58	2,40	3,44	4,08	8	28,84	10,00
1,24	1,40	1,40	2,08	2,86	3,68	9	15,86	5,50
1,87	2,50	2,50	3,73	5,17	5,70	10	2,88	1,00
1,83	2,50	2,50	3,80	5,10	6,27	11	0,29	0,10
1,83	2,50	2,50	3,80	5,17	5,80	12	0,03	0,01
-	-	-	-	-	-	13	0,00	0,00

Πίνακας 5. Πίνακας μέσων όρων πειραματικών αποτελεσμάτων

Time [h]	Total Cells in G1 (cells·10 ³ /ul)	Total Cells in G2 (cells·10 ³ /ul)	Total Cells in S (cells·10 ³ /ul)	Total Cell Death Cells (cells·10 ³ /ul)
0	0	0	0	0
4	0,08870395	0,1875497	0,1301804	0,038255
24	0,14452234	0,3072694	0,2227676	0,0702364
48	0,21320754	0,393248	0,3331605	0,1278827
72	0,43243188	0,1951644	0,6187237	0,3625891

Πίνακας 6. Πίνακας απόλυτων πληθυσμών κυττάρων σε κάθε φάση για το δείγμα έλεγχου