



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο  
Σχολή Μηχανολόγων Μηχανικών

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΜΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΜΗΧΑΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΩΝ ΚΑΙ ΑΥΤΟΜΑΤΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

***ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ  
ΕΚΚΡΙΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΟΝΤΑ ΣΤΗ  
ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ***

**Παπαδόπουλος Δημήτριος**

**Επιβλέπων: Επίκουρος Καθηγητής  
Λεωνίδας Αλεξόπουλος**

**Αθήνα, Οκτώβριος 2015**



## Ευχαριστίες

Η διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας της σχολής Μηχανολόγων Μηχανικών ΕΜΠ.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κ. Αλεξόπουλο για την ευκαιρία που μου έδωσε να γίνω μέλος του εργαστηρίου και να εμπλουτίσω τις γνώσεις μου εκπονώντας τη παρούσα διπλωματική εργασία σε ένα διεπιστημονικό περιβάλλον. Ήταν πάντα διαθέσιμος να μου προσφέρει τις γνώσεις και την καθοδήγησή του για την πορεία της εργασίας μου.

Στη συνέχεια ευχαριστώ τον υποψήφιο διδάκτορα Δημήτρη Μεσσήνη για την εξαιρετική συνεργασία που είχαμε αλλά και για την βοήθεια και τις γνώσεις που μου έδωσε. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Θεόδωρο Σακελλαρόπουλο, τον Δημήτρη Τζεράνη, την Αγγελική Μήνια, την Κατερίνα Σκορδά, τον Αλέξανδρο Πόλεσιουκ, την Μαρίνα Ιωάννου, τον Νίκο Καβαλόπουλο, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για τις συμβουλές και τεχνικές που με δίδαξαν.

## Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη .....	1
Abstract .....	2
1 Εισαγωγή .....	3
1.1 Διαδικασία ELISA-Σύντομη Περιγραφή .....	3
1.2 Κλασική διαδικασία ELISA .....	3
1.3 ELISA με μικροσφαιρίδια .....	4
1.4 Κυτταρική σηματοδότηση .....	7
1.5 Αυτοκρινές σήμα .....	9
1.6 Σκοπός της διπλωματικής εργασίας .....	10
2 Υλικά και Μέθοδοι .....	11
2.1 Κυτταρική καλλιέργεια .....	11
2.2 Διέγερση κυττάρων με πρωτεΐνες .....	11
2.3 Κύλινδροι τυπωμένοι σε 3D printer .....	12
2.4 Διάταξη από Plexiglas .....	12
2.5 Μαγνήτες νεοδυμίου .....	13
2.6 Διαχωρισμός κυττάρων (split) .....	13
2.7 Μέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο .....	14
2.8 Πάγωμα κυττάρων .....	17
2.9 Sandwich ELISA με χρήση μαγνητικών μικροσφαιριδίων .....	19
2.10 Διαδικασία μέτρησης πρωτεϊνών πολύ κοντά στο κύτταρο .....	21
2.11 Απεικόνιση αποτελεσμάτων του Luminex .....	22

2.12	Μετατροπή έντασης φθορισμού σε συγκέντρωση (pg/ml) .....	22
3	Πειράματα και Αποτελέσματα .....	24
3.1	Πρώτο πείραμα μέτρησης επιπέδων πρωτεΐνης κοντά στα κύτταρα .....	24
3.1.1	Σκοπός του πειράματος .....	24
3.1.2	Πειραματική διαδικασία .....	24
3.1.3	Αποτελέσματα .....	26
3.1.4	Συμπεράσματα .....	30
3.2	Πείραμα μέτρησης επιπέδων πρωτεΐνης κοντά στα κύτταρα με 3D printed κύλινδρους .....	32
3.2.1	Σκοπός του πειράματος .....	32
3.2.2	Πειραματική διαδικασία .....	32
3.2.3	Αποτελέσματα .....	36
3.2.4	Συμπεράσματα .....	36
3.3	Δεύτερο πείραμα μέτρησης επιπέδων πρωτεΐνης κοντά στα κύτταρα .....	38
3.3.1	Σκοπός του πειράματος .....	38
3.3.2	Πειραματική διαδικασία .....	38
3.3.3	Αποτελέσματα .....	41
3.3.4	Συμπεράσματα .....	51
3.4	Τρίτο πείραμα μέτρησης επιπέδων πρωτεΐνης κοντά στα κύτταρα .....	53
3.4.1	Σκοπός του πειράματος .....	53
3.4.2	Πειραματική διαδικασία .....	53
3.4.3	Αποτελέσματα .....	55

3.4.4	Συμπεράσματα.....	60
3.5	Πείραμα για δημιουργία καμπυλών βαθμονόμησης.....	62
3.5.1	Σκοπός του πειράματος.....	62
3.5.2	Πειραματική διαδικασία.....	62
3.5.3	Αποτελέσματα.....	65
3.6	Πείραμα χρήσης μικροσφαιριδίων ως ενεργοποιητές για τα κύτταρα.....	68
3.6.1	Σκοπός του πειράματος.....	68
3.6.2	Πειραματική διαδικασία.....	68
3.6.3	Αποτελέσματα.....	70
3.6.4	Συμπεράσματα.....	71
4	Συμπεράσματα – Συζήτηση.....	72
5	Βιβλιογραφία.....	74

## Περίληψη

Η λειτουργία και επικοινωνία των κυττάρων γίνεται μέσω πρωτεϊνών. Μια συνήθης τεχνική που χρησιμοποιείται για την μέτρηση των πρωτεϊνών είναι η ELISA, με την οποία οι πρωτεΐνες ακινητοποιούνται σε μια επιφάνεια με χρήση βιομορίων πρόσδεσης. Με αυτή τη διαδικασία μπορεί να γίνει μέτρηση σε βιολογικά υγρά όπως αίμα, πλάσμα και υπερκείμενο κυτταρικών καλλιεργειών, σε μεγάλη απόσταση από την πηγή έκκρισης η οποία είναι η επιφάνεια των κυττάρων. Για καλύτερη μελέτη των κυτταρικών σημάτων πρέπει να γίνει ένας συνδυασμός μεθόδων μέτρησης πρωτεϊνών κοντά και μακριά από την πηγή έκκρισης. Σκοπός αυτής της εργασίας είναι η ανάπτυξη μιας μεθόδου, όπου με αυτή θα μπορεί να γίνεται μέτρηση πρωτεϊνών κοντά στην επιφάνεια των κυττάρων.

## **Abstract**

Cells are secreting proteins in order to communicate. A common technique that is used for measuring proteins is ELISA, in which proteins are immobilized on a surface using biomolecules of affinity. Through this process biological fluids can be measured such as blood, plasma and supernatant from cell cultures, in a large distance from the source of secretion, which is the surface of the cells. To better study cell signaling, a combination of methods must be performed, for measuring proteins near and far from the source of secretion. The scope of this thesis is to develop a method, in which proteins can be measured near the cell surface.



# 1 Εισαγωγή

## 1.1 Διαδικασία ELISA-Σύντομη Περιγραφή

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

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

## 1.2 Κλασική διαδικασία ELISA

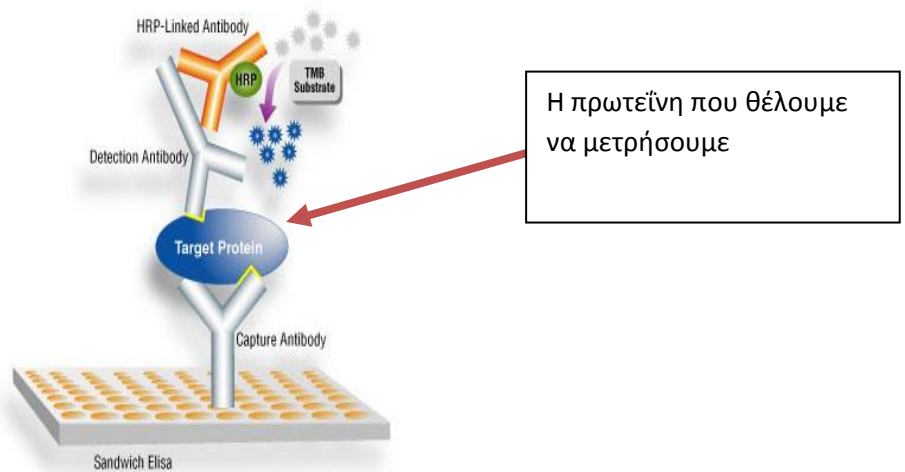


Image copyrights: Cell Signaling Technology

Εικόνα 1.1 : Κλασική διαδικασία ELISA

Στην κλασσική μέθοδο ELISA, έχουμε μία επιφάνεια (Εικόνα 1.1), στην οποία κολλάμε πολλά αντισώματα της πρωτεΐνης που θέλουμε να μετρήσουμε.

Έτσι, όταν ρίξουμε πάνω σε αυτή την επιφάνεια το υγρό που περιέχει αυτή την πρωτεΐνη, το μόνο που θα κολλήσει στην επιφάνεια θα είναι η πρωτεΐνη που θέλουμε.

Στην συνέχεια, χρησιμοποιώντας ένα δεύτερο αντίσωμα της ίδιας πρωτεΐνης που θέλουμε να μετρήσουμε, κολλάμε ένα φωσφορίζον μόριο. Τέλος, με μία συσκευή που μετρά πόσο φωσφορίζει μία επιφάνεια, μπορούμε να υπολογίσουμε την συγκέντρωση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στο δείγμα μας.

### 1.3 ELISA με μικροσφαιρίδια

Σε αυτήν την πιο σύγχρονη μέθοδο ELISA χρησιμοποιείται η επιφάνεια μικροσφαιριδίων (Εικόνα 1.2) διαμέτρου συνήθως 5.6 μm αντί της πιο πάνω επίπεδης -και ακίνητης- επιφάνειας.

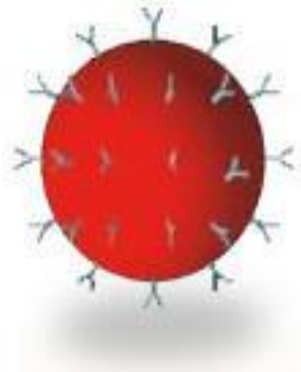


Image copyrights: Luminex Inc

**Εικόνα 1.2: Μικροσφαιρίδιο συζευγμένο με αντισώματα**

Συγκεκριμένα τα μικροσφαιρίδια στο εσωτερικό τους διαθέτουν ένα μείγμα από ερυθρή και υπέρυθρη φθορίζουσα βαφή. Χρησιμοποιώντας διαφορετικές εντάσεις και αναλογίας

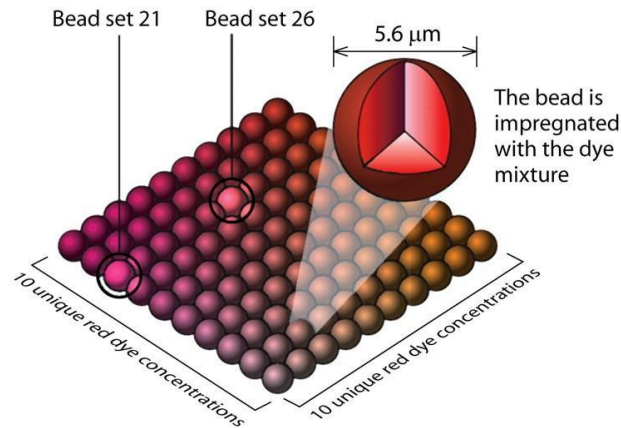


Image copyrights: Luminex Inc

**Εικόνα 1.3: Μικροσφαιρίδια διαφορετικής αναλογίας φθορίζουσών ουσιών**

των 2 βαφών όταν τα μικροσφαιρίδια προσβάλλονται από την κατάλληλη ακτινοβολία αντανακλούν ακτινοβολία μοναδικού φάσματος το κάθε ένα , έτσι έχουν δημιουργηθεί διαφορετικά είδη μικροσφαιριδίων με διαφορετικό φάσμα. Παραδείγματος χάριν, το μικροσφαιρίδιο νούμερο 83 έχει 83% από την μία ουσία και 17% από την άλλη. Έτσι ο πειραματιστής έχει την δυνατότητα να εκτελέσει ταυτόχρονα πολλές διαφορετικές μετρήσεις στο ίδιο δείγμα χρησιμοποιώντας διαφορετικά μικροσφαιρίδια για κάθε πρωτεΐνη που θέλει να ταυτοποιήσει.

Το υλικό από τα οποίο αποτελούνται είναι πλαστικό με μία μικρή περιεκτικότητα σε σίδηρο ώστε αυτά να παρουσιάζουν υπερπαραμαγνητική συμπεριφορά. Δηλαδή μόνο όταν βρίσκονται σε μαγνητικό πεδίο να συμπεριφέρονται ως μαγνητικά σωματίδια και να μπορούν με την χρήση κατάλληλων μαγνητικών δυνάμεων να μεταφερθούν ή να κρατηθούν ακίνητα, ενώ εκτός μαγνητικού πεδίου να συμπεριφέρονται ως μη μαγνητικά. Χαρακτηριστικό που διευκολύνει την συγκράτηση των μικροσφαιριδίων κατά την εκτέλεση του πρωτοκόλλου της ELISA και την εύκολη απελευθέρωσή τους.

Πρέπει να αναφερθεί ότι τα αποτελέσματα της ELISA με μικροσφαιρίδια τα παίρνουμε από το μηχάνημα LUMINEX. Το μηχάνημα αρχικά αναρροφά το υγρό με τα μικροσφαιρίδια και στη συνέχεια κάθε μικροσφαιρίδιο σκανάρεται από ένα κόκκινο και ένα πράσινο laser (Εικόνα 1.4).

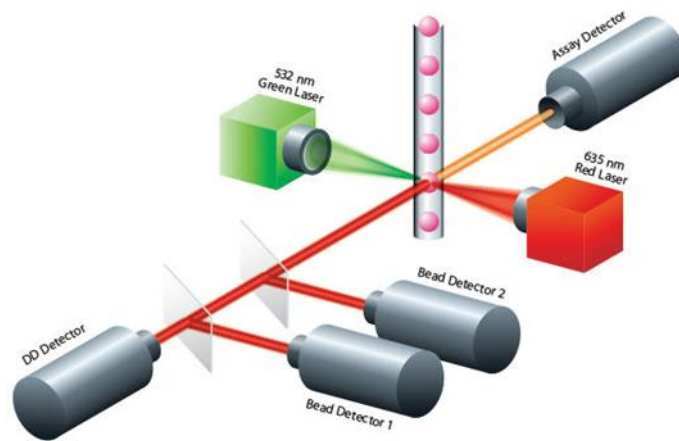


Image copyrights: Luminex Inc

**Εικόνα 1.3: Μικροσφαιρίδια διαφορετικής αναλογίας φθορίζουσών ουσιών**

Το κόκκινο laser σκανάρει το χρώμα στο εσωτερικό κάθε μικροσφαιριδίου που περνάει, οπότε ξέρουμε ποιο μικροσφαιρίδιο πέρασε, και το πράσινο laser σκανάρει το πόσα φθορίζοντα αντισώματα έχουν κολλήσει πάνω σε κάθε μικροσφαιρίδιο. Έτσι ξέρουμε κάθε μικροσφαιρίδιο που περνάει, πόση πρωτεΐνη έχει πάνω του και ποια πρωτεΐνη είναι.

## 1.4 Κυτταρική σηματοδότηση

Η κυτταρική σηματοδότηση είναι μέρος ενός πολύπλοκου συστήματος επικοινωνίας μέσω του οποίου λαμβάνουν χώρα διάφορες κυτταρικές λειτουργίες και καθορίζονται οι δράσεις των κυττάρων.

Τα βασικά είδη κυτταρικής σηματοδότησης είναι:

- I. **Η αυτοκρινής σηματοδότηση:** Αυτοκρινές λέγεται το σήμα όπου παράγεται και εκκρίνεται από ένα κύτταρο και επηρεάζει το ίδιο κύτταρο μέσω υποδοχέων που εμφανίζει. Μερικές φορές η αυτοκρινής σηματοδότηση στοχεύει γειτονικά κύτταρα, αν αυτά ανήκουν στο ίδιο είδος κυττάρου με αυτό που εκπέμπει το αυτοκρινές σήμα. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η λειτουργία των ανοσοποιητικών κυττάρων.

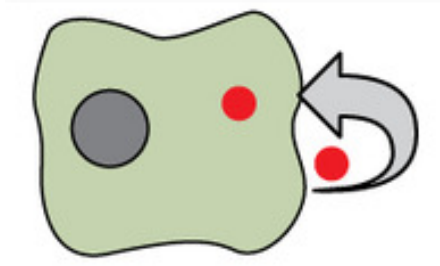


Image copyrights: boundless.com

**Εικόνα 1.4: Αυτοκρινής σηματοδότηση**

- II. Η παρακρινής σηματοδότηση: Στη παρακρινή σηματοδότηση το σήμα στοχεύει τα γειτονικά κύτταρα. Ένα παράδειγμα είναι η λειτουργία των νευροδιαβιβαστών.

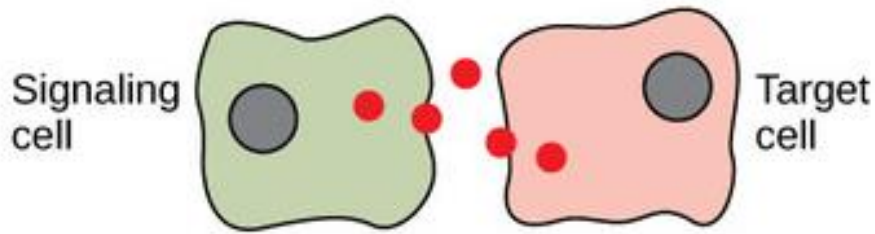


Image copyrights: boundless.com

Εικόνα 1.5: Παρακρινής σηματοδότηση

- III. Η ενδοκρινής σηματοδότηση: Το ενδοκρινές σήμα στοχεύει κύτταρα μακριά από τα κύτταρα που εκκρίνουν το σήμα. Με τη ροή του αίματος το σήμα (ορμόνες) ταξιδεύει προς όλο το σώμα οπότε βρίσει το στόχο του.

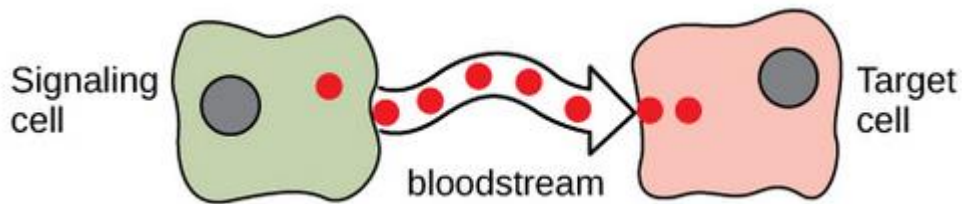


Image copyrights: boundless.com

Εικόνα 1.6: Ενδοκρινής σηματοδότηση

## 1.5 Αυτοκρινές σήμα

Μέσα από έρευνες έχει παρατηρηθεί ότι το αυτοκρινές σήμα συμμετέχει στην ανάπτυξη παθήσεων, όπως για παράδειγμα ο καρκίνος του μαστού <sup>1</sup>. Για να γίνει έλεγχος αν υπάρχει αυτοκρινής συμπεριφορά σε μια σηματοδότηση οι ερευνητές εξετάζουν το εκκρινόμενο βιομόριο όπως για παράδειγμα μια πρωτεΐνη, αν υπάρχει. Σε περίπτωση που υπάρχει εξετάζουν αν υπάρχει και ο αντίστοιχος υποδοχέας για το συγκεκριμένο βιομόριο στα κύτταρα. Υπάρχουν δύο προσεγγίσεις για τον έλεγχο της ύπαρξης ενός συγκεκριμένου υποδοχέα. Η πρώτη προσέγγιση χρησιμοποιεί τη μέθοδο Real-Time PCR (RT-PCR) και ουσιαστικά εξετάζει αν υπάρχει έκφραση του υποδοχέα στο mRNA των κυττάρων, δηλαδή σε γενομικό επίπεδο <sup>2</sup>. Η δεύτερη προσέγγιση εξετάζει την ύπαρξη ενός υποδοχέα σε πρωτεομικό επίπεδο χρησιμοποιώντας μεθόδους όπως η ELISA και η Western Blot <sup>3</sup>.

Επειδή το αυτοκρινές σήμα εκκρίνεται από ένα κύτταρο και πηγαίνει στο ίδιο ή σε κάποιο γειτονικό του αν είναι του ίδιου είδους, υπάρχει η υποψία ότι οι αυτοκρινείς πρωτεΐνες θα μεταφέρονται μέσα στο υπερκείμενο των κυττάρων σε κοντινή απόσταση από αυτά, οπότε εφαρμόζοντας bead-based ELISA δε μπορούμε να υποπτευθούμε ποια πρωτεΐνη μπορεί να είναι αυτοκρινής καθώς εξετάζουμε το ολόκληρο το υπερκείμενο των κυττάρων και δεν επικεντρωνόμαστε σε κάποιο σημείο κοντά στην κυτταρική επιφάνεια.

Σε αυτή την εργασία θα γίνει μέτρηση πρωτεϊνών κοντά στη κυτταρική επιφάνεια, ενώ παράλληλα θα μετρηθούν και οι πρωτεΐνες στο υπερκείμενο με ELISA με μικροσφαιρίδια. Σε περίπτωση που βρεθεί μεγάλη διαφορά μεταξύ των μετρήσεων μπορεί να γίνει η υπόθεση ότι οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες που είχαν αυξημένη συγκέντρωση κοντά στη κυτταρική επιφάνεια και όχι στο υπερκείμενο έχουν αυτοκρινή συμπεριφορά.

## 1.6 Σκοπός της διπλωματικής εργασίας

Η λειτουργία και επικοινωνία των κυττάρων γίνεται μέσω πρωτεϊνών. Μια συνήθης τεχνική που χρησιμοποιείται για την μέτρηση των πρωτεϊνών είναι η ELISA, με την οποία οι πρωτεΐνες ακινητοποιούνται σε μια επιφάνεια με χρήση βιομορίων πρόσδεσης. Με αυτή τη διαδικασία μπορεί να γίνει μέτρηση σε βιολογικά υγρά όπως αίμα, πλάσμα και υπερκείμενο κυτταρικών καλλιιεργειών, σε μεγάλη απόσταση από την πηγή έκκρισης η οποία είναι η επιφάνεια των κυττάρων. Για καλύτερη μελέτη των κυτταρικών σημάτων πρέπει να γίνει ένας συνδυασμός μεθόδων μέτρησης πρωτεϊνών κοντά και μακριά από την πηγή έκκρισης. Σκοπός αυτής της εργασίας είναι η ανάπτυξη μιας μεθόδου, όπου με αυτή θα μπορεί να γίνεται μέτρηση πρωτεϊνών κοντά στην επιφάνεια των κυττάρων.



## 2 Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Κυτταρική καλλιέργεια

Για τα πειράματα καλλιεργήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά είδη κυττάρων:

- ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες (Human Dermal Fibroblasts-HDF)
- Χονδροκύτταρα (Chondrocytes), προερχόμενα από ανθρώπινο φυσιολογικό χόνδρο.

Όλα τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υγρό καλλιέργειας υψηλής γλυκόζης με 1% πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη και 10% FBS.

Σε όσα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν HDF, «στρώθηκαν» 15000 ή 30000 κύτταρα/φρεάτιο. Για το πείραμα με τα chondrocytes «στρώθηκαν» 24000 κύτταρα/φρεάτιο. Οι πλάκες που χρησιμοποιήθηκαν είναι 96 well plates-flat bottom της εταιρίας Corning.

### 2.2 Διέγερση κυττάρων με πρωτεΐνες

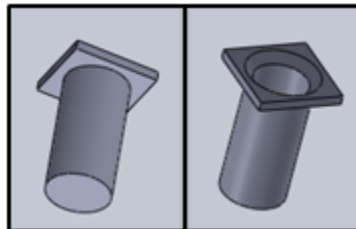
Παράλληλα σε κάποια πειράματα στα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν διεγέρτες (stimuli) ενώ σε άλλα πειράματα τα κύτταρα δεν διεγέρθηκαν (untreated). Οι διεγέρτες που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στο πίνακα 2.1 ενώ παράλληλα φαίνεται σε τι συγκέντρωση προστέθηκαν στα κύτταρα.

stimulus	target
IL1A	50 ng/ml
TNFA	100 ng/ml
EGF	100 ng/ml
TGFA	200 ng/ml

Πίνακας 2.1: Διεγέρτες που χρησιμοποιήθηκαν και η ανάλογη συγκέντρωσή τους.

### 2.3 Κύλινδροι τυπωμένοι σε 3D printer

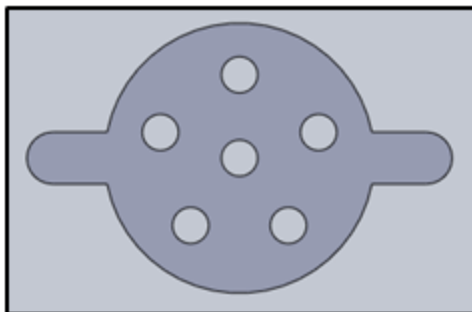
Χρησιμοποιήθηκαν σε πείραμα κύλινδροι διαμέτρου 5.7 mm και ύψους 13.2 mm, οι οποίοι τυπώθηκαν σε 3D printer στερεολιθογραφίας.



Εικόνα 2.2: Κύλινδροι τυπωμένοι σε 3D printer

### 2.4 Διάταξη από Plexiglas

Παράλληλα σχεδιάστηκε σε Solidworks και κόπηκε σε laser-cutter διάταξη για να εφαρμόζει σε petridish μικρού μεγέθους. Η συγκεκριμένη διάταξη έχει διάμετρο 52 mm και η διάμετρος της κάθε οπής είναι 7 mm, ώστε να μπορούν οι 3D printed κύλινδροι να χωρέσουν.



Εικόνα 2.3: Διάταξη από Plexiglas που εφαρμόζει σε petridish

## 2.5 Μαγνήτες νεοδυμίου

Χρησιμοποιήθηκαν μαγνήτες νεοδυμίου 52 ώστε να τοποθετηθούν μέσα στους κυλίνδρους. Οι μαγνήτες ήταν κατάλληλης διαμέτρου και ύψους ώστε να μπορούν να τοποθετηθούν μέσα στο κύλινδρο. Η εταιρία από την οποία αγοράστηκαν οι μαγνήτες είναι η ΗΚCM.

## 2.6 Διαχωρισμός κυττάρων (split)

Ο διαχωρισμός των κυττάρων πραγματοποιείται όταν η πυκνότητα των κυττάρων εντός της φλάσκας καλλιέργειας είναι υψηλή. Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιείται το πρωτόκολλο της ενζυμικής αποκόλλησης:

- Απομάκρυνση του θρεπτικού καλλιέργειας από τη φλάσκα και πλύσιμο των κυττάρων με το ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1x (phosphate buffered saline) – απομάκρυνση του PBS.
- Προσθήκη του διαλύματος τρυψίνης (ένζυμο αποκόλλησης) – EDTA (200mg/L EDTA, 500mg/L τρυψίνη) και τοποθέτηση της φλάσκας με τα κύτταρα στον κλίβανο επώασης για 5 λεπτά. Προστίθενται 40 μl διαλύματος ενζύμου για κάθε cm<sup>2</sup> της φλάσκας καλλιέργειας.
- Παρατήρηση της κυτταρικής αποκόλλησης στο οπτικό μικροσκόπιο.

- Προσθήκη της διπλάσιας ποσότητας του υλικού καλλιέργειας DMEM εμπλουτισμένο με 10% FBS και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη για την αδρανοποίηση της τρυψίνης.
- Μεταφορά του διαλύματος μαζί με τα κύτταρα σε αποστειρωμένο κωνικό σωλήνα – φυγοκέντρηση στα 380g (1500 στροφές), 10 λεπτά, 25°C.
- Μέτρηση των ζωντανών κυττάρων με τη βοήθεια αιμοκυτταρόμετρου και τη χρωστική Trypan blue 0,4% (που εισχωρεί και βάφει με μπλε χρώμα μόνο τα νεκρά κύτταρα, ενώ στέκεται στο περίγραμμα των ζωντανών κυττάρων), όπως αναφέρεται στη μέθοδο 3.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος στον κατάλληλο όγκο του υλικού καλλιέργειας και διαχωρισμός των κυττάρων σε δύο φλάσκες.
- Τοποθέτηση των φλασκών στον κλίβανο επώασης.

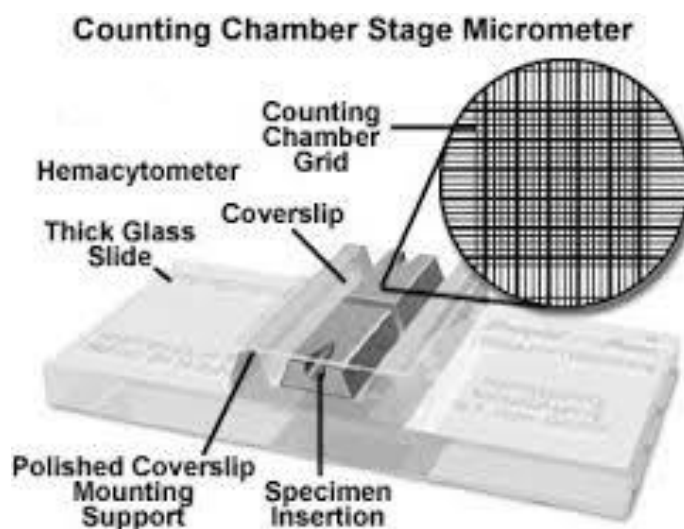
## 2.7 Μέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο

Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων είναι απαραίτητη για την πραγματοποίηση των βιολογικών πρωτοκόλλων. Μία μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως και χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι η μέτρηση των κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο.

Το αιμοκυτταρόμετρο είναι μία συσκευή που χρησιμοποιείται ευρέως για τη μέτρηση κυττάρων και η οποία σχεδιάστηκε αρχικά για την καταμέτρηση των κυττάρων του αίματος.

Το αιμοκυτταρόμετρο εφευρέθηκε από τον Louis-Charles Malassez και αποτελείται από μία παχιά γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα μικροσκοπίου με μια ορθογώνια οδόντωση που δημιουργεί ένα θάλαμο. Αυτός ο θάλαμος είναι χαραγμένος δημιουργώντας ένα πλέγμα κάθετων γραμμών. Η συσκευή είναι κατασκευασμένη με προσοχή έτσι ώστε η περιοχή που οριοθετείται από τις γραμμές να είναι γνωστή και το βάθος του θαλάμου να

είναι γνωστό. Επομένως, είναι δυνατό να μετρηθεί ο αριθμός των κυττάρων ή σωματιδίων σε ένα συγκεκριμένο όγκο ρευστού και στη συνέχεια να υπολογιστεί ο αριθμός των κυττάρων στο υγρό συνολικά (<http://en.wikipedia.org/wiki/Hemocytometer>)



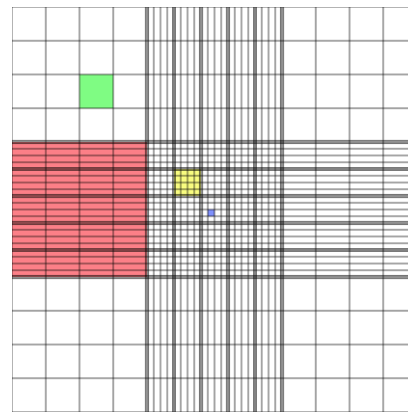
(<https://www.microscopyu.com/articles/formulas/measurements.html>)

#### Εικόνα 2.4: Διάταξη αιμοκυτταρόμετρου

Οι καλυπτρίδες που χρησιμοποιούνται για την χρήση του αιμοκυτταρόμετρου έχουν κατασκευαστεί ειδικά για να είναι παχύτερες από τις συμβατικές καλυπτρίδες μικροσκοπίου, διότι πρέπει να είναι σε θέση να ξεπεράσουν την επιφανειακή τάση μιας σταγόνα υγρού.

- Το πλέγμα του αιμοκυτταρόμετρου αποτελείται από εννέα  $1 \times 1 \text{ mm}$  ( $1 \text{ mm}^2$ ) τετράγωνα. Αυτά υποδιαιρούνται σε τρεις κατευθύνσεις:  $0,25 \times 0,25 \text{ mm}$  ( $0,0625 \text{ mm}^2$ ),  $0,25 \times 0,20 \text{ mm}$  ( $0,05 \text{ mm}^2$ ) και  $0,20 \times 0,20 \text{ χιλιοστά}$  ( $0,04 \text{ mm}^2$ ). Το κεντρικό τετράγωνο υποδιαιρείται περαιτέρω σε  $0,05 \times 0,05 \text{ mm}$  ( $0,0025 \text{ mm}^2$ ) τετράγωνα. Οι υπερυψωμένες ακμές του αιμοκυτταρόμετρου κρατούν την γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα σε απόσταση  $0,1 \text{ mm}$  από το πλέγμα, δίνοντας σε κάθε τετράγωνο ένα καθορισμένο όγκο (<http://bitesizebio.com/13687/cell-counting-with-a-hemocytometer-easy-as-1-2-3/>).

Dimensions	Area	Volume at 0.1 mm depth
1 x 1 mm	1 mm <sup>2</sup>	100 nL
0.25 x 0.25 mm	0.0625 mm <sup>2</sup>	6.25 nL
0.25 x 0.20 mm	0.05 mm <sup>2</sup>	5 nL
0.20 x 0.20 mm	0.04 mm <sup>2</sup>	4 nL
0.05 x 0.05 mm	0.0025 mm <sup>2</sup>	0.25 nL



(<http://en.wikipedia.org/wiki/Hemocytometer>)

**Εικόνα 2.5: Το πλέγμα του αιμοκυτταρόμετρου**

Για να χρησιμοποιηθεί το αιμοκυτταρόμετρο απαιτείται να βεβαιωθεί πρώτα ότι η καλυπτρίδα είναι καλά τοποθετημένη πάνω στην επιφάνεια του θαλάμου μέτρησης. Όταν οι δύο επιφάνειες είναι σε κατάλληλη επαφή τότε είναι ορατά τα δαχτυλίδια του Νεύτωνα. Αν συμβεί αυτό, μπορεί να τοποθετηθεί το κυτταρικό εναιώρημα στην άκρη της καλυπτρίδας ώστε να εισχωρήσει στο κενό ανάμεσα στον θάλαμο και την καλυπτρίδα και να γεμίσει εντελώς ο θάλαμος με το δείγμα. Με τη χρήση ενός μικροσκοπίου μπορεί να μετρηθεί άμεσα ο αριθμός των κυττάρων στον θάλαμο και αυτός ο αριθμός χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί η πυκνότητα των κυττάρων στο αρχικό μίγμα από όπου προέρχεται το δείγμα. Το αποτέλεσμα είναι ο αριθμός των κυττάρων στον θάλαμο διαιρεμένος δια του όγκου του θαλάμου, ο οποίος είναι γνωστός από την αρχή, λαμβάνοντας υπόψη τυχόν αραιώσεις και συντομεύσεις κατά την καταμέτρηση.

Δηλαδή:

$$C_{\text{cells}} = \frac{N_{\text{cells}}}{R_{\text{chamber}} V_{\text{squares}}} \frac{V_{\text{dilution}}}{V_{\text{sample}}}$$

Όπου:

- Ccells: η συγκέντρωση των κυττάρων στο προς μέτρηση δείγμα
- Ncells: ο αριθμός των κυττάρων που μετρήθηκε
- Rchamber: αναλογία των θαλάμων που μετρήθηκαν
- Vsquares: ο όγκος των τετραγώνων που μετρήθηκαν
- Vdilution: ο όγκος του δείγματος μετά από αραιώση και
- Vsample: ο όγκος του κυτταρικού εναιωρήματος χωρίς την αραιώση

Στις περισσότερες εφαρμογές, χρησιμοποιούνται μόνο τα τέσσερα μεγάλα τετράγωνα στις γωνίες. Τα κύτταρα που βρίσκονται πάνω ή αγγίζουν τις επάνω και αριστερά γραμμές υπολογίζονται, αλλά αυτά που βρίσκονται ή αγγίζουν τις δεξιά ή κάτω γραμμές αγνοούνται.

Ο συνολικός αριθμός N των κυττάρων υπολογίζεται ως:

$$N = \mu \cdot d \cdot 10^4 \cdot V$$

Όπου  $\mu$  είναι ο μέσος όρος του αριθμού κυττάρων στα τέσσερα γωνιακά τετράγωνα του αιμοκυτταρόμετρου (προκύπτει από τη μέτρηση στο μικροσκόπιο),  $d$  είναι ο λόγος αραιώσης του δείγματος πριν τη μέτρηση (με τη χρωστική Trypan blue για τη βιωσιμότητα των κυττάρων) και  $V$  είναι ο όγκος του μίγματος από όπου συλλέξαμε το δείγμα σε ml.

## 2.8 Πάγωμα κυττάρων

Τα κύτταρα, τα οποία απομονώνονται από ιστούς συνήθως ακολουθούν τη διαδικασία του παγώματος προκειμένου να είναι διαθέσιμα και να μπορούν να ανασυρθούν όποτε κάποιο πειραματικό πρωτόκολλο απαιτεί την χρήση τους. Η διαδικασία του παγώματος παρουσιάζεται παρακάτω:

- Απομάκρυνση του θρεπτικού καλλιέργειας από τη φλάσκα και πλύσιμο των κυττάρων με το ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1x (phosphate buffered saline) – απομάκρυνση του PBS.
- Προσθήκη του διαλύματος τρυψίνης (ενζύμο αποκόλλησης) – EDTA (200mg/L EDTA, 500mg/L τρυψίνη) και τοποθέτηση της φλάσκας με τα κύτταρα στον κλίβανο επώασης για 5 λεπτά. Προστίθενται 40 μl διαλύματος ενζύμου για κάθε cm<sup>2</sup> της φλάσκας καλλιέργειας.
- Παρατήρηση της κυτταρικής αποκόλλησης στο οπτικό μικροσκόπιο.
- Προσθήκη της διπλάσιας ποσότητας του υλικού καλλιέργειας DMEM εμπλουτισμένο με 10% FBS και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη για την αδρανοποίηση της τρυψίνης.
- Μεταφορά του διαλύματος μαζί με τα κύτταρα σε αποστειρωμένο κωνικό σωλήνα – φυγοκέντρηση στα 380g (1500 στροφές), 10 λεπτά, 25°C.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων.
- Συλλογή 20μl από αυτό το διάλυμα και ανάμιξη με 20μl Trypan blue – Μεταφορά 10μl στο θάλαμο του αιμοκυτταρόμετρου για τη μέτρηση των ζωντανών κυττάρων, όπως αναφέρεται στη μέθοδο 3.
- Πραγματοποίηση υπολογισμών για τον όγκο διαλύματος που περιέχει την κατάλληλη για πάγωμα ποσότητα κυττάρων – Μεταφορά του όγκου αυτού σε νέο σωληνάριο falcon και φυγοκέντρηση 380g (1500 στροφές), 10 λεπτά, 25°C.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου – επαναδιάλυση του ιζήματος σε κατάλληλη ποσότητα υλικού καλλιέργειας DMEM εμπλουτισμένο με 10% ορό από έμβρυο μοσχαριού (FBS) και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη καθώς και 10% DMSO που είναι κρυοπροστατευτική ουσία. Το DMSO δρα αφαιρώντας σταδιακά το νερό από τα κύτταρα και έτσι αποφεύγεται η λύση τους και η δημιουργία κρυστάλλων στο εσωτερικό τους κατά τη διαδικασία του παγώματος. Το γεγονός αυτό συμβάλλει στην μεγαλύτερη ανάκτηση κυττάρων κατά την διαδικασία απόψυξής τους. Σε θερμοκρασία δωματίου, όμως, προκαλεί κυτταροτοξικότητα για αυτό η διαδικασία πρέπει να λαμβάνει χώρα σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα. Το κυτταροδιάλυμα που προκύπτει τοποθετείται σε ειδικό σωληνάριο (cryovial) το



οποίο μεταφέρεται σε ένα ειδικό δοχείο που ονομάζεται Mr Frosty και έχει την ικανότητα να ρίχνει τη θερμοκρασία κατά 1°C ανά μία ώρα όταν τοποθετείται στους -80°C. Τα κύτταρα παραμένουν εκεί για μία ημέρα.

- Μεταφορά του cryovial με τα κύτταρα σε δεξαμενή υγρού αζώτου, όπου τα κύτταρα διατηρούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα.

## 2.9 Sandwich ELISA με χρήση μαγνητικών μικροσφαιριδίων

Το πρωτόκολλο της ELISA που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση πρωτεϊνών στα πειράματα, είναι το παρακάτω:

1. Τα μικροσφαιρίδια που είναι συζευγμένα με συγκεκριμένα αντισώματα (και είναι φωτοευαίσθητα) υφίστανται ανάδευση και sonication για 10 δευτερόλεπτα. Φυλάσσονται σε συγκέντρωση 5000 μικροσφαιριδίων/ μl και επαναδιαλύονται σε τελική συγκέντρωση με την χρήση κατάλληλου διαλύματος εργασίας (Assay buffer). Για κάθε δείγμα προς μέτρηση πρέπει να υπάρχουν τουλάχιστον 1250 μικροσφαιρίδια από κάθε σήμα, οπότε η συγκέντρωση υπολογίζεται κατάλληλα.
2. Ακολουθεί προετοιμασία του μίγματος των βιοτινυλιωμένων αντισωμάτων ανίχνευσης όπου ως διαλύτης χρησιμοποιείται και πάλι το διάλυμα εργασίας.
3. Στη συνέχεια μίγμα των μικροσφαιριδίων μεταφέρεται σε κάθε φρεάτιο πλάκας μικροπιλοδότησης 96 θέσεων (96 well plate). Η πλάκα τοποθετείται πάνω στον μαγνητικό διαχωριστή (μαγνητική πλάκα) και ακολουθεί αναμονή ενός λεπτού. Έπειτα, το υπερκείμενο απορρίπτεται.
4. Προστίθενται 100μl διαλύματος εργασίας σε κάθε φρεάτιο, και η πλάκα μεταφέρεται στον μαγνητικό διαχωριστή και ακολουθεί αναμονή ενός λεπτού. Έπειτα το υπερκείμενο απορρίπτεται.
5. Ακολούθως, 50μl δείγματος πρωτεΐνης μεταφέρονται στα κατάλληλα φρεάτια της πλάκας.
6. Η πλάκα καλύπτεται με ειδικό κάλυμμα και αφήνεται να αναδεύεται σε μέγιστη ταχύτητα (800g) για 90 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.

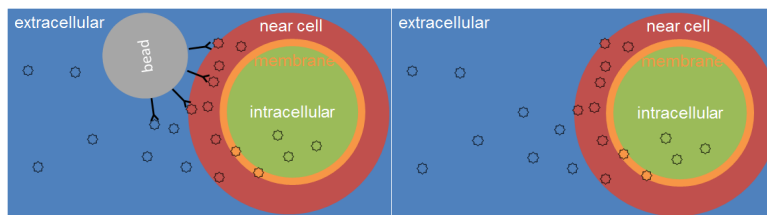
7. Με το πέρας των 90 λεπτών, η πλάκα τοποθετείται στον μαγνητικό διαχωριστή, ακολουθεί αναμονή ενός λεπτού, απορρίπτεται το υπερκείμενο και προστίθενται 100μl διαλύματος εργασίας.
8. Το βήμα 7 επαναλαμβάνεται και το υπερκείμενο απορρίπτεται.
9. Ακολουθεί μεταφορά 20μl μίγματος αντισωμάτων ανίχνευσης συζευγμένου με βιοτίνη σε κάθε φρεάτιο της πλάκας μικροτιτλοδότησης.
10. Η πλάκα καλύπτεται με ειδικό κάλυμμα και αφήνεται να αναδεύεται σε μέγιστη ταχύτητα (800g) για 60 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
11. Με το πέρας των 60 λεπτών, η πλάκα τοποθετείται στον μαγνητικό διαχωριστή, προστίθενται 100μl διαλύματος εργασίας σε κάθε φρεάτιο, ακολουθεί αναμονή ενός λεπτού και απόρριψη του υπερκειμένου.
12. Προστίθενται 100μl διαλύματος εργασίας σε κάθε φρεάτιο, και η πλάκα μεταφέρεται στον μαγνητικό διαχωριστή και ακολουθεί αναμονή ενός λεπτού. Έπειτα το υπερκείμενο απορρίπτεται.
13. Προετοιμάζεται το μίγμα της στρεπταβιδίνης – φυκοερυθρίνης (SAPE) (που συνδέεται στην βιοτίνη του αντισώματος ανίχνευσης) σε αραιώση 1:200 (φυλάσσεται σε συγκέντρωση 1mg/ml) σε διάλυμα εργασίας.
14. Προστίθενται 50μl διαλύματος SAPE σε κάθε φρεάτιο.
15. Η πλάκα καλύπτεται με ειδικό κάλυμμα και αφήνεται να αναδεύεται σε μέγιστη ταχύτητα (800g) για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
16. Με το πέρας των 15 λεπτών, η πλάκα τοποθετείται στον μαγνητικό διαχωριστή, ακολουθεί αναμονή ενός λεπτού, απορρίπτεται το υπερκείμενο και προστίθενται 100μl διαλύματος εργασίας.
17. Η πλάκα τοποθετείται στον μαγνητικό διαχωριστή, ακολουθεί αναμονή ενός λεπτού, απορρίπτεται το υπερκείμενο και προστίθενται 130μl διαλύματος εργασίας.
18. Η πλάκα καλύπτεται με ειδικό κάλυμμα και αφήνεται να αναδεύεται σε μέγιστη ταχύτητα (800g) για 1 λεπτό, σε θερμοκρασία δωματίου.

19. Το ειδικό κάλυμμα αφαιρείται, η πλάκα εισάγεται στο μηχάνημα LUMINEX και ακολουθεί ανάλυση 100μl από κάθε φρεάτιο σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης του συστήματος.
20. Τέλος, αφού γίνει η ανάλυση στο LUMINEX εξέρχονται τα αποτελέσματα σε αρχείο .csv

## 2.10 Διαδικασία μέτρησης πρωτεϊνών πολύ κοντά στο κύτταρο

Προκειμένου να μετρηθεί η συγκέντρωση των πρωτεϊνών σε κοντινή απόσταση από το κύτταρο χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που περιγράφεται παρακάτω:

1. Καλλιεργείται παράλληλα ίσος αριθμός κυττάρων σε δύο διαφορετικά φρεάτια.
2. Αλλάζεται παράλληλα το θρεπτικό των κυττάρων. Στο ένα φρεάτιο μαζί με φρέσκο θρεπτικό προσθέτονται ταυτόχρονα μικροσφαιρίδια συζευγμένα με αντισώματα για τις πρωτεΐνες προς μελέτη. Στο δεύτερο φρεάτιο απλά προσθέτεται φρέσκο θρεπτικό.



Εικόνα 2.6: Κύτταρο με μικροσφαιρίδιο στην επιφάνεια του και χωρίς

3. Σε ένα καινούργιο 96 well plate βάζουμε μικροσφαιρίδια σε όλα τα φρεάτια που πρόκειται να χρησιμοποιήσουμε εκτός από αυτά που θα μεταφέρουμε lysate με μικροσφαιρίδια.
4. Σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή συλλέγεται το υπερκείμενο από κάθε φρεάτιο και μεταφέρεται στην καινούργια 96 well plate, σε ξεχωριστό φρεάτιο το κάθε δείγμα. Για να συλλεχθεί το υπερκείμενο από τα κύτταρα τοποθετείται η 96 well plate

πάνω στη μαγνητική πλάκα για 1 λεπτό και αναρροφάται δείγμα από τη πιπέτα με προσοχή χωρίς να ακουμπήσουμε το πάτο του φρεάτιου, για να μην έχουμε απώλεια μικροσφαιριδίων.

5. Αφού συλλεχθεί το υπερκείμενο, πετάμε το υπόλοιπο υπερκείμενο από τα κύτταρα (αν έχει μείνει) και ξεπλένουμε 2 φορές με PBS (συνεχίζοντας να έχουμε την 96 well plate πάνω στη μαγνητική πλάκα).
6. Στη συνέχεια προστίθεται και στα δύο φρεάτια με τα κύτταρα, lysis buffer με αναστολείς προτεάσης (protease inhibitors). Κάνουμε up and down με τη πιπέτα ενώ παράλληλα ξύνουμε την επιφάνεια του φρεάτιου με στην οποία έχουν κολλήσει τα κύτταρα. Μεταφέρουμε τα lysates σε ξεχωριστά wells στην πλάκα που βρίσκονται τα υπερκείμενα.  
Αυτή η διαδικασία λαμβάνει χώρα διότι τα μικροσφαιρίδια κολλάνε στην επιφάνεια του κυττάρου και πρέπει να απελευθερωθούν, ενώ παράλληλα στα άλλα κύτταρα που δεν έχουν μικροσφαιρίδια στην επιφάνεια τους, τα λύουμε έτσι ώστε να φανεί αν έχουν μεγάλη συγκέντρωση πρωτεΐνης μέσα τους και στην επιφάνεια τους.
7. Ακολουθεί το πρωτόκολλο της ELISA από το βήμα 9 και μετά.

### **2.11 Απεικόνιση αποτελεσμάτων του Luminex**

Τα αποτελέσματα του Luminex απεικονίζονται με DataRail, το οποίο είναι ένα open-source εργαλείο του Matlab. Στη διπλωματική εργασία μια τροποποιημένη έκδοση DataRail χρησιμοποιήθηκε για να φτιαχτούν αυτά τα διαγράμματα <sup>4</sup>.

### **2.12 Μετατροπή έντασης φθορισμού σε συγκέντρωση (pg/ml)**

Για τη μετατροπή της έντασης φθορισμού (fluorescent intensity) του Luminex σε συγκέντρωση πρωτεΐνης (ng/ml ή pg/ml), χρησιμοποιήθηκαν καμπύλες βαθμονόμησης, οι οποίες κατασκευάστηκαν γνωρίζοντας συγκεντρώσεις συγκεκριμένων πρωτεϊνών και την αντίστοιχη ένταση φθορισμού τους. Κατασκευάζοντας αυτές τις καμπύλες και

χρησιμοποιώντας το συγκεκριμένο μαθηματικό μοντέλο είναι εύκολο να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις σε ένα άγνωστο δείγμα. Ο τύπος για να γίνει η μετατροπή είναι ο παρακάτω:

$$Y = d + \frac{a-d}{1 + \left(\frac{X}{c}\right)^b}$$

Όπου:

a: Η απόκριση σε μηδενική συγκέντρωση

b: Ο παράγοντας κλίσης

c: Η συγκέντρωση για 50% κάλυψη

d: Η απόκριση σε άπειρη συγκέντρωση

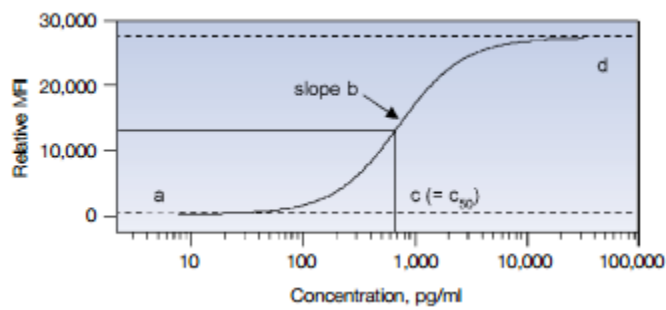


Image copyrights: Biorad

Εικόνα 2.7: Παράδειγμα καμπύλης βαθμονόμησης

## 3 Πειράματα και Αποτελέσματα

### 3.1 Πρώτο πείραμα μέτρησης επιπέδων πρωτεΐνης κοντά στα κύτταρα

Προκειμένου να μπορέσουμε να μετρήσουμε τη συγκέντρωση πολύ κοντά στα κύτταρα αναπτύξαμε μια μέθοδο ώστε αφού προσθέσουμε μικροσφαιρίδια πάνω στα κύτταρα, να μπορέσουμε να τα αφαιρέσουμε καθώς αυτά κολλάνε στη κυτταρική μεμβράνη. Για να ξεκολλήσουν προσθέτουμε lysis buffer, οπότε σπάει η κυτταρική μεμβράνη και μπορούμε να πάρουμε τα μικροσφαιρίδια και να εφαρμόσουμε τη τεχνική ELISA για να μετρήσουμε επίπεδα πρωτεΐνης.

#### 3.1.1 Σκοπός του πειράματος

Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος είναι να καταλάβουμε αν λειτουργεί η διαδικασία μέτρησης πρωτεϊνών κοντά στα κύτταρα χρησιμοποιώντας lysis mix. Για να λειτουργεί η μέθοδος θεωρούμε ότι θα πρέπει να δώσει διαφορετικά αποτελέσματα από τη κλασική ELISA.

#### 3.1.2 Πειραματική διαδικασία

Στο πείραμα που εφαρμόστηκε χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HDF. Στρώθηκαν 15000 κύτταρα/φρεάτιο και αναπτύχθηκαν για 5 ημέρες. Επιπλέον προκειμένου να καθορίσουμε τι επίδραση έχουν ενεργοποιητές που αναφέρονται στη παράγραφο 2.2 στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν ενεργοποιημένα (treated) και μη ενεργοποιημένα (untreated) κύτταρα.

Οι μετρήσεις έγιναν σε συγκεκριμένη χρονοσειρά για ενεργοποιημένα και μη κύτταρα. Η χρονοσειρά στην οποία πάρθηκαν οι μετρήσεις είναι για 5, 30, 60, 90, 330, 1140 λεπτά. Σε κάθε timepoint πάρθηκε υπερκείμενο από τα κύτταρα ενώ στη συνέχεια ακολουθήθηκε η διαδικασία της παραγράφου 2.4 προκειμένου να μετρηθούν οι πρωτεΐνες πολύ κοντά στο κύτταρο. Μετρήθηκε 32 plex όπου οι 30 ήταν πρωτεΐνες και τα 2 ήταν control beads (PE και BSA).

Παρακάτω αναφέρονται αναλυτικά τα βήματα που ακολουθήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα:

1. Προετοιμασία θρεπτικού υγρού: Προετοιμάστηκε θρεπτικό υγρό με stimuli στις αναλογίες της παραγράφου 2.2 και χωρίς stimuli.
2. Προσθήκη μικροσφαιριδίων στο θρεπτικό υγρό: Προστέθηκαν 1067 μικροσφαιρίδια/ul (όλα τα σήματα).
3. Αφαιρούμε το θρεπτικό υγρό από όλα τα φρεάτια.
4. Αναδεύουμε το διάλυμα μικροσφαιριδίων-θρεπτικού υγρού.
5. Προσθέτουμε 200μl μείγματος μικροσφαιριδίων-θρεπτικού υγρού σε κάθε φρεάτιο με κύτταρα.
6. Αφήνουμε την πλάκα με τα κύτταρα στον incubator.
7. Στο timepoint X βάζουμε τη πλάκα με τα κύτταρα στην μαγνητική πλάκα και την αφήνουμε για 1 λεπτό.
8. Κρατάμε 100μl υπερκείμενο από τα treated και 100μl από τα untreated κύτταρα σε μια καινούργια 96άρα πλάκα. Προσέχουμε να μη πλησιάσουμε τα κύτταρα πολύ και πάρουμε με τη πιπέτα τα μικροσφαιρίδια που είναι κολλημένα στην κυτταρική μεμβράνη.
9. Πετάμε το υπόλοιπο υπερκείμενο.
10. Προσθέτουμε στα κύτταρα 200μl PBS.
11. Πετάμε τα 200μl PBS.
12. Αφαιρούμε τη μαγνητική πλάκα
13. Προσθέτουμε 100μl lysis mix στα κύτταρα (treated και untreated).
14. Κάνουμε up and down με τη πιπέτα, ενώ παράλληλα «ξύνουμε» το φρεάτιο με την μύτη της πιπέτας, ώστε να ξεκολλήσουν και να λιώσουν τα κύτταρα.
15. Μεταφέρουμε τα lysates σε μια καθαρή 96άρα πλάκα.
16. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 7-15 για όλα τα timepoints.
17. Εφαρμόζουμε τη διαδικασία Sandwich ELISA της παραγράφου 2.3

### 3.1.3 Αποτελέσματα

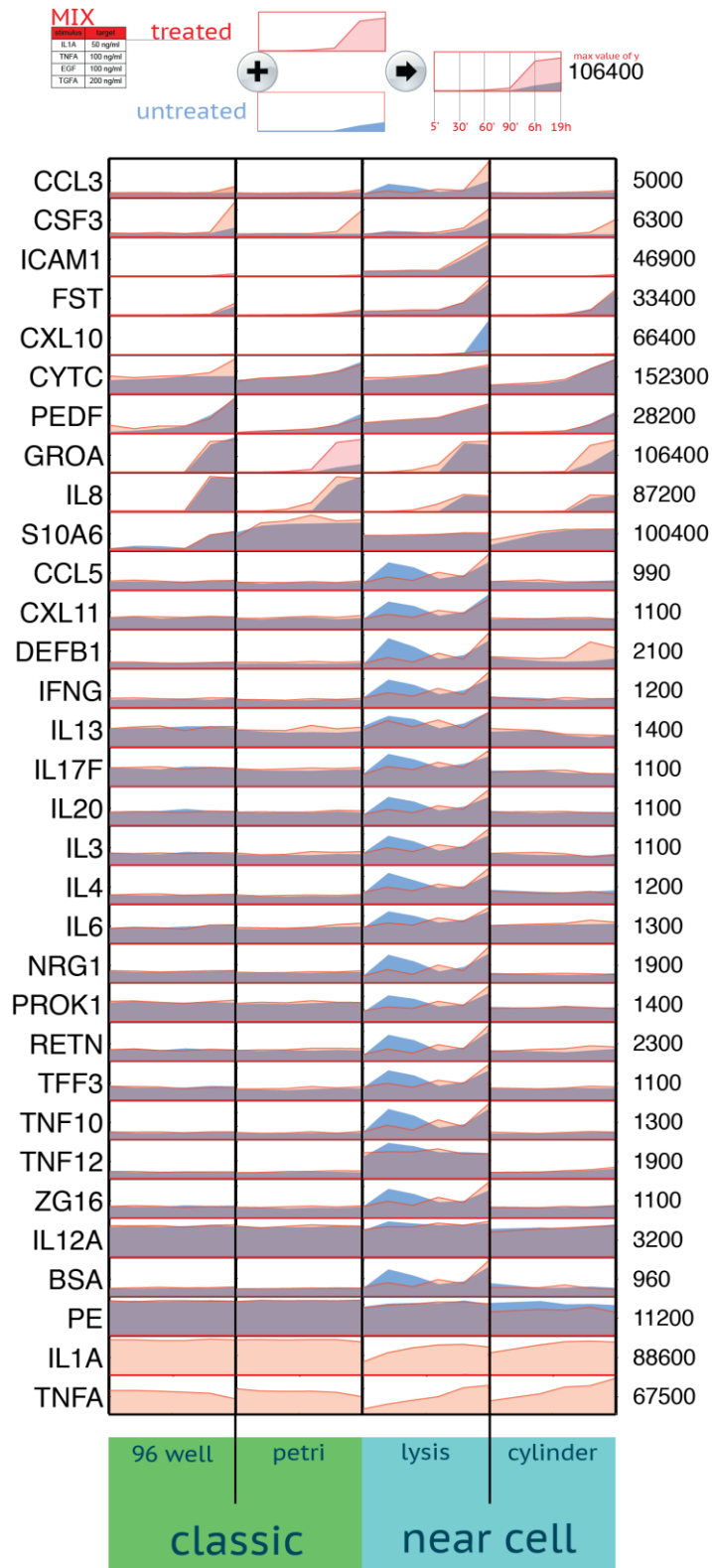
Τα αποτελέσματα της ELISA που προέκυψαν από το LUMINEX φαίνονται στον πίνακα 3.1.

sample collection of		CCL3	CSF3	CAM1	FST	CXCL10	CYTC	PEDF	GROA	L8	S10A6	CCL5	CXCL11	DEFB1	IFNG	L13	L17F	L20	L3	L4	L6	NRG1	PROK1	RETN	TFP3	TNF10	TNF12	ZG16	L12A	BSA	PE	L1A	TNFA		
supernatant in 96-well plate	treated	5	716	722	463	644	262	76911	6365	841	1949	5559	250	365	369	319	730	542	419	367	316	534	645	760	745	431	265	383	355	2803	212	11010	8809	44927	
		30	744	657	450	614	263	69467	3542	621	2000	7691	278	396	368	333	789	554	433	359	341	577	616	793	797	479	269	307	305	2786	228	10659	67047	44386	
		60	720	786	416	668	245	32655	5719	814	1962	4175	263	369	333	360	834	676	419	373	363	552	576	744	696	465	371	344	362	2865	346	10024	69126	49180	
		90	671	699	428	719	238	76262	5628	848	1916	5462	216	372	335	295	658	502	417	355	304	510	607	702	672	352	236	365	324	2667	229	10885	68662	41186	
		330	730	849	519	1202	300	90337	11522	62352	66634	44570	260	402	347	532	810	563	440	361	326	680	635	769	774	389	271	365	356	2837	230	10827	66852	36255	
		1146	724	630	486	1572	611	14976	2417	30169	8150	5445	268	380	378	326	811	532	431	378	335	480	644	627	725	397	275	364	330	2860	201	10646	6616	26751	
		5	690	692	412	462	265	58734	1180	732	1891	7159	231	354	362	277	714	543	416	355	309	555	625	733	717	440	333	383	368	2705	222	10780	667	312	
		30	665	620	433	504	235	62617	1670	771	1853	13964	249	390	388	281	764	524	447	354	311	677	682	799	815	381	232	341	347	2771	207	10899	630	302	
		60	660	615	416	624	235	66962	3423	747	1665	13278	230	332	319	263	768	497	496	335	333	563	667	724	706	362	240	360	347	2703	216	10761	545	275	
		90	722	616	434	726	276	76345	5907	839	2020	8477	360	372	345	339	821	588	634	416	330	605	598	725	839	369	383	373	366	2770	220	10876	624	336	
	330	650	723	492	1051	276	76152	14438	59816	63262	46467	245	361	367	268	522	570	465	361	319	632	604	761	757	442	268	354	372	2847	216	11166	635	304		
	1146	766	1736	1656	5018	122	76152	2152	63444	64024	56607	267	356	368	330	762	540	463	345	354	460	606	725	750	435	266	350	366	2757	247	10666	594	324		
lysis in 96-well plate	treated	5	569	523	6500	3879	286	69674	8104	515	570	43673	109	314	277	317	666	626	334	351	398	576	347	409	423	403	270	1388	346	2434	438	8699	30367	9331	
		30	636	662	6791	4396	552	69743	8749	1130	796	43512	363	465	644	509	1050	679	496	543	588	726	703	863	780	518	515	1443	516	2723	365	6570	54546	18669	
		60	675	648	7558	5313	684	76485	11069	8888	4165	45250	269	372	373	369	786	465	394	418	460	648	440	510	513	394	335	1438	388	2668	257	8699	6666	26231	
		90	1225	662	7337	5201	981	82652	12303	23861	19052	46460	497	397	397	659	1075	701	616	635	691	907	948	775	1066	600	707	1598	634	3300	446	10273	74023	32480	
		330	1002	1574	26715	12055	2793	103644	18952	36860	41624	50481	373	493	550	448	751	654	507	525	552	778	842	629	791	511	475	1336	474	2839	346	10562	73361	46462	
		1146	526	490	4617	4337	7699	12661	2303	1060	36224	5006	460	601	684	1714	1362	1050	1116	1113	1241	1241	1241	1241	1241	1241	1241	1241	1241	1241	1241	1241	1241	1241	1241
		5	568	532	7270	3864	301	57790	8030	430	607	44363	167	317	244	338	828	354	328	371	367	557	358	368	360	379	268	1167	352	2367	219	10668	391	264	
		30	4964	1101	7395	4383	1120	65729	2610	1159	1051	42283	771	658	1193	955	12397	568	893	814	1085	1141	1610	1026	1724	269	1104	1019	905	3175	721	10922	828	885	
		60	1560	967	6290	5119	1120	74816	13715	1065	971	43443	665	729	1274	778	1109	762	766	743	631	865	1169	871	1331	769	679	1749	746	2367	656	10266	717	692	
		90	839	613	7468	5367	805	84337	12616	2962	1947	47240	319	425	542	455	750	554	465	442	560	741	605	592	674	438	426	1412	465	2649	326	10206	544	390	
	330	1167	1304	23444	13079	4152	104212	17810	57607	86531	50960	424	546	799	598	942	667	692	606	627	842	656	673	894	581	557	1423	533	2860	404	1056	1475	547		
	1146	2324	3416	4366	6352	8543	11622	24711	33641	3366	48606	762	106	1676	1000	1402	581	590	645	1002	1035	1065	1108	1078	621	130	1377	865	3001	511	6710	1314	930		

**Πίνακας 3.1: Αποτελέσματα του LUMINEX για το πρώτο πείραμα μέτρησης υπερκείμενου και μέτρησης κοντά σε κύτταρα.**

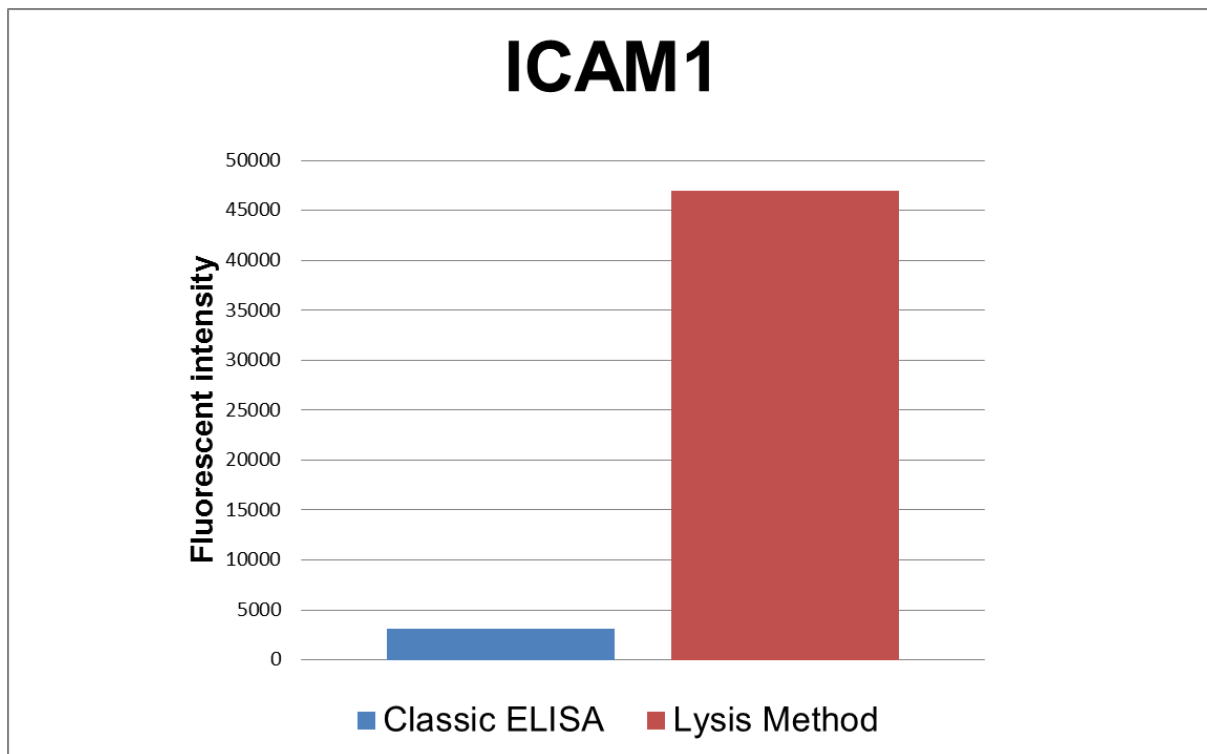
Το DataRail όπως αναφέρθηκε στη παράγραφο 2.8 είναι μια μέθοδος απεικόνισης των αποτελεσμάτων του LUMINEX. Στο συγκεκριμένο πείραμα, κάθε στήλη μας δείχνει πιο πείραμα είναι, όπου οι δύο πρώτες στήλες είναι τα αποτελέσματα της κλασικής ELISA ενώ η τρίτη και η τέταρτη είναι τα αποτελέσματα που μας έδωσαν τα lysates. Κάθε γραμμή μας δίνει κάθε διαφορετικό σήμα που μετρήθηκε. Στα αριστερά κάθε γραμμής υπάρχει το όνομα του σήματος που μετρήθηκε, ενώ στα δεξιά υπάρχει η μέγιστη τιμή που διαβάστηκε σε αυτό το σήμα. Τέλος τα γραφήματα με κόκκινο χρώμα είναι τα treated κύτταρα ενώ με μπλε τα untreated. Στην εικόνα 3.1 φαίνονται τα αποτελέσματα του πειράματος.



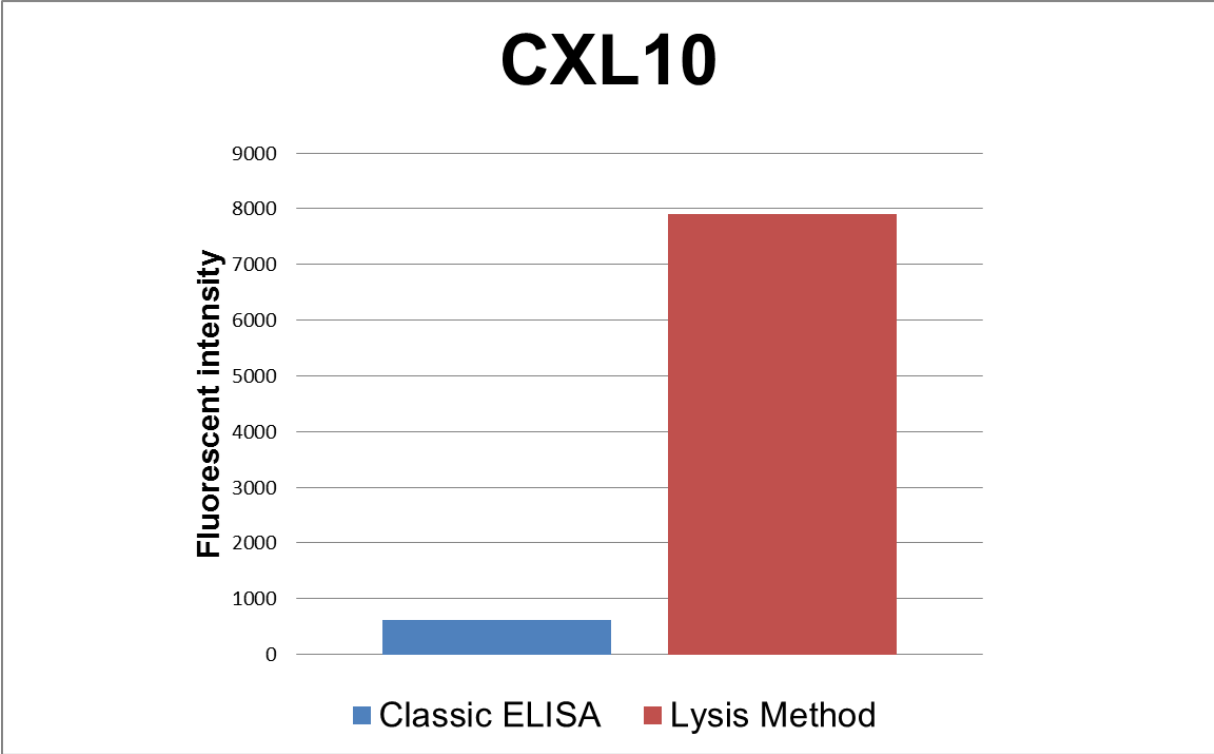


Εικόνα 3.1: DataRail πειράματος 3.1 και 3.2

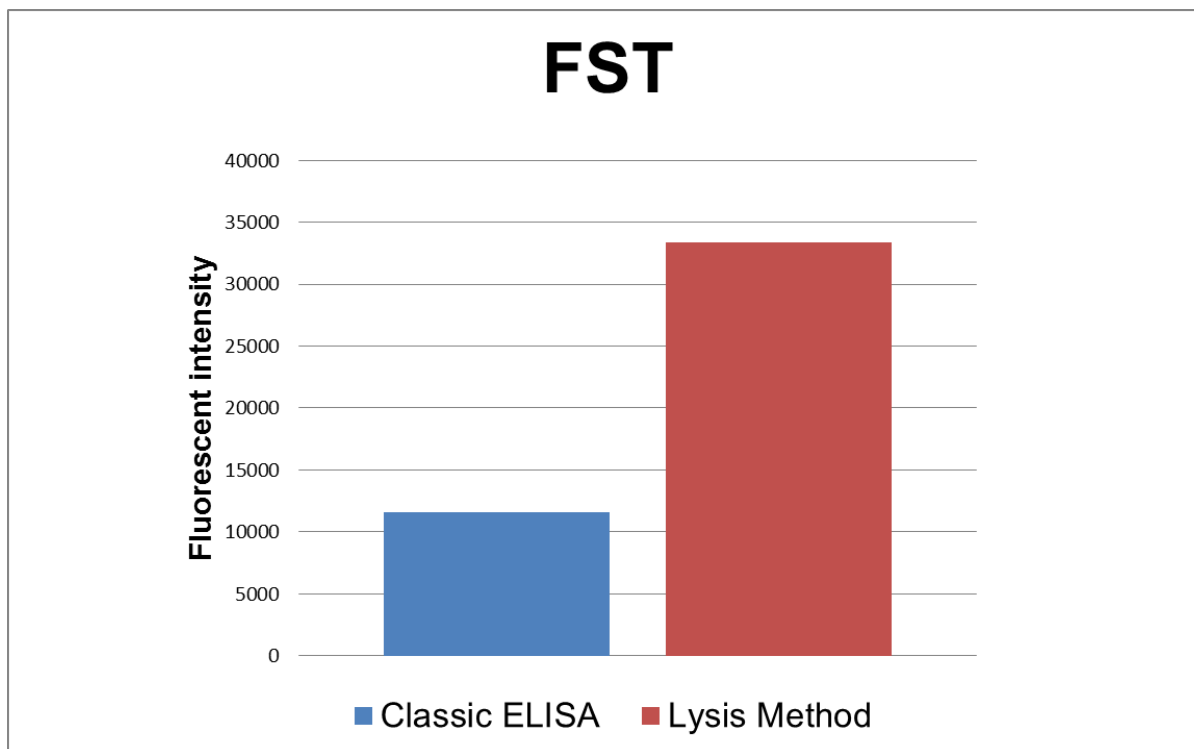
Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, οι πρωτεΐνες ICAM1, FST και CXL10 έχουν αρκετά υψηλότερα επίπεδα πολύ κοντά στα κύτταρα σε σχέση με τη μέτρηση της κλασικής ELISA. Στα γραφήματα για φαίνεται η σύγκριση για το timepoint των 1140 λεπτών (19 ωρών):



Γράφημα 3.1: Σύγκριση επιπέδων ICAM1 κλασικής ELISA και μεθόδου Lysis για 19 ώρες



Γράφημα 3.2: Σύγκριση επιπέδων CXL10 κλασικής ELISA και μεθόδου Lysis για 19 ώρες



Γράφημα 3.3: Σύγκριση επιπέδων FST κλασικής ELISA και μεθόδου Lysis για 19 ώρες

### 3.1.4 Συμπεράσματα

Με χρήση του conditional formatting στο excel, conditional formatting και επιλέγοντας με λευκό χρώμα τις χαμηλότερες τιμές, ενώ με κόκκινο τις υψηλότερες, σε κάθε στήλη ξεχωριστά τα εξής:

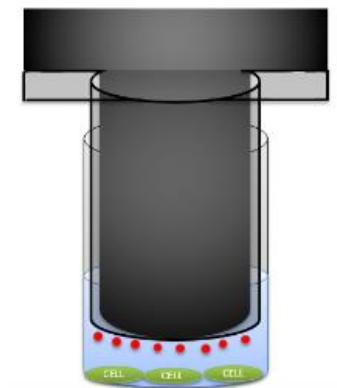
1. Όσο αυξάνονται τα timepoints, τόσο μεγαλώνει και η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα κύτταρα.
2. Το μοτίβο των αποτελεσμάτων παραμένει ίδιο, δηλαδή για πρωτεΐνες που είναι στην αρχή είναι αυξημένες και στη συνέχεια μειώνονται ή για πρωτεΐνες που είναι σε χαμηλά επίπεδα στην αρχή και στη συνέχεια αυξάνονται, το μοτίβο παραμένει ίδιο και για treated supernatant και παράλληλα για treated lysate.
3. Τα stimuli που χρησιμοποιήθηκαν λειτουργούν καθώς είναι πολύ αυξημένα τα επίπεδά τους στα treated κύτταρα σε σχέση με τα untreated.

Από το DataRail του πειράματος παρατηρούμε τα εξής:

1. Οι περισσότερες πρωτεΐνες εκκρίνονται σταθερά από τα κύτταρα, ενώ άλλες στα τελευταία timepoints υπάρχουν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ELISA.
2. Το συμπέρασμα 1 αναφέρεται σε treated και untreated κύτταρα.
3. Σύμφωνα με τη μέθοδο μέτρησης των lysates, οι πρωτεΐνες ICAM1, FST και CXL10 φαίνονται πιο αυξημένες κοντά στα κύτταρα συγκριτικά με τη κλασική ELISA. Δεν μπορούμε να βγάλουμε συμπέρασμα όμως καθώς δεν γνωρίζουμε αν αυτές είναι πρωτεΐνες που έχουν εκκριθεί, ή είναι πρωτεΐνες που βρίσκονται μέσα στο κύτταρο και περιμένουν να εκκριθούν ή είναι κάποια πρόωμη μορφή πρωτεΐνης. Συνεπώς η μέθοδος φαίνεται να λειτουργεί, αλλά χρειάζεται επαλήθευση.

## 3.2 Πείραμα μέτρησης επιπέδων πρωτεΐνης κοντά στα κύτταρα με 3D printed κύλινδρους

Ως εναλλακτικό τρόπο μέτρησης πολύ κοντά στα κύτταρα σκεφτήκαμε να εκτυπώσουμε κύλινδρους σε 3D printer (παράγραφος 2.4) και μέσω ενός μαγνήτη να κρατήσουμε τα μικροσφαιρίδια στο κάτω μέρος του κάθε κυλίνδρου. Στην εικόνα 3.2 φαίνεται το σκαρίφημα για το πώς θα λειτουργεί η μέτρηση με τους κυλίνδρους.



Εικόνα 3.2: Σκαρίφημα μέτρησης πρωτεΐνης με 3D printed κύλινδρους

### 3.2.1 Σκοπός του πειράματος

Σκοπός του πειράματος είναι να συγκρίνουμε τη μέτρηση της κλασικής ELISA με αυτή των κυλίνδρων και να δούμε διαφορά. Αν μπορέσουμε να δούμε αυξημένα τα επίπεδα της μέτρησης με τους κυλίνδρους μπορούμε να υποθέσουμε ότι η συγκέντρωση είναι μεγαλύτερη κοντά στα κύτταρα σε σχέση με το υπόλοιπο υπερκείμενο.

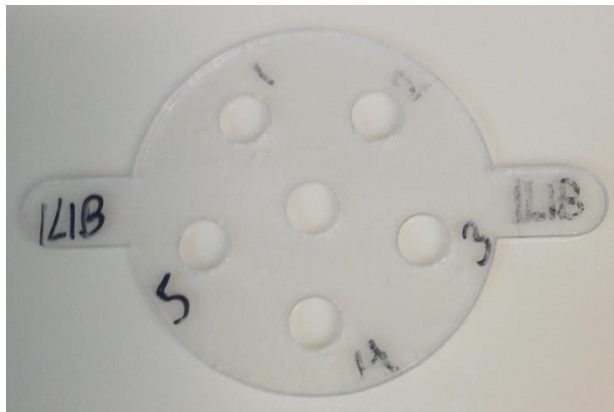
### 3.2.2 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά σχεδιάστηκαν και τυπώθηκαν οι κύλινδροι σε 3D printer (Παράγραφος 2.3-Εικόνα 3.3). Στη συνέχεια αφού βρέθηκε κατάλληλος κυλινδρικός μαγνήτης (Παράγραφος 2.5) που να μπορεί να εισέρχεται και να εξέρχεται άνετα.



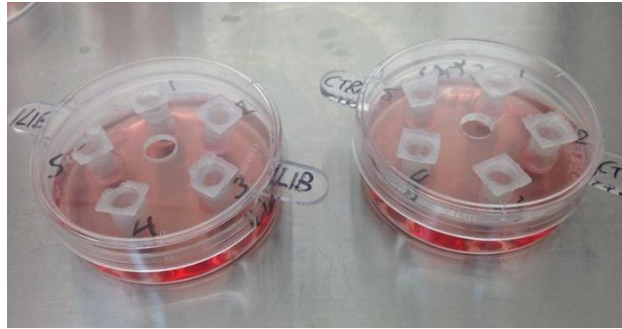
**Εικόνα 3.3: Κύλινδροι εκτυπωμένοι σε 3D printer**

Ύστερα με Plexiglas κόπηκε σε laser cutter καπάκι που μπορεί να εφαρμόζει πάνω στο petridish, ώστε να συγκρατεί του κυλίνδρους (Παράγραφος 2.4-Εικόνα 3.4).



**Εικόνα 3.4: Καπάκι από Plexiglas που εφαρμόζει πάνω σε petridish**

Συνεπώς συνδυάζοντας τα παραπάνω υλικά και καλλιεργώντας κύτταρα στα petridishes προκύπτουν οι παρακάτω διατάξεις (Εικόνα 3.5) με τις οποίες έγινε το συγκεκριμένο πείραμα. Τα μικροσφαιρίδια απέχουν 2-3 mm από τα κύτταρα.



**Εικόνα 3.5: Διάταξη μέτρησης πρωτεϊνών με 3D printed κύλινδρους**

Στο πείραμα που εφαρμόστηκε χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HDF. Στρώθηκαν 200000 κύτταρα/petridish, σε 2 διαφορετικά petridishes μικρού μεγέθους της Corning και αναπτύχθηκαν για 5 ημέρες. Στο ένα petridish, τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με τα stimuli που αναφέρονται στη παράγραφο 2.2 στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι, ενώ στο άλλο όχι.

Οι μετρήσεις έγιναν σε συγκεκριμένη χρονοσειρά για ενεργοποιημένα και μη κύτταρα. Η χρονοσειρά στην οποία πάρθηκαν οι μετρήσεις είναι για 30, 60, 90, 330, 1140 λεπτά. Σε κάθε timepoint πάρθηκε υπερκείμενο από τα κύτταρα ενώ στη συνέχεια ακολουθήθηκε η διαδικασία της παραγράφου 2.4 προκειμένου να μετρηθούν οι πρωτεΐνες πολύ κοντά στο κύτταρο.



Παρακάτω αναφέρονται αναλυτικά τα βήματα που ακολουθήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα:

1. Προετοιμασία θρεπτικού υγρού: Προετοιμάστηκε θρεπτικό υγρό με stimuli στις αναλογίες της παραγράφου 2.2 και χωρίς stimuli.
2. Προετοιμασία του bead mix: Ετοιμάζουμε μίγμα με 1067 μικροσφαιρίδια/ul assay buffer (όλα τα σήματα).
3. Προσθέτουμε 100μl/φρεάτιο bead mix σε μια καθαρή 96 well plate
4. Εφαρμόζουμε τους μαγνήτες μέσα σε κάθε κύλινδρο και τους τοποθετούμε μέσα σε κάθε φρεάτιο με bead mix (1 κύλινδρος/φρεάτιο), έτσι ώστε να κολλήσουν μαγνητικά τα μικροσφαιρίδια στο κάτω μέρος του κυλίνδρου.
5. Αφαιρούμε το αρχικό θρεπτικό υγρό από τα petridishes.
6. Προσθέτουμε 10000μl θρεπτικού υγρού (με stimuli και χωρίς) σε κάθε petridish με κύτταρα.
7. Τοποθετούμε προσεκτικά τους κυλίνδρους με τους μαγνήτες σε κάθε οπή των καπακιών από Plexiglas.
8. Εφαρμόζουμε τα καπάκια από Plexiglas στα petridishes.
9. Αφήνουμε τα petridishes με τα κύτταρα στον incubator.
10. Στο timepoint X βγάζουμε τα petridishes από τον incubator.
11. Κρατάμε 100μl υπερκείμενο από τα treated και 100μl από τα untreated κύτταρα σε μια καινούργια 96άρα πλάκα.
12. Αφαιρούμε ένα κύλινδρο από κάθε petridish.
13. Τοποθετούμε το κύλινδρο σε ένα φρεάτιο με PBS μιας καθαρής 96άρας πλάκας.
14. Αφαιρούμε τον μαγνήτη από τον κύλινδρο ώστε να πέσουν τα μικροσφαιρίδια στο φρεάτιο με το PBS.
15. Αφήνουμε τα petridishes στον incubator.
16. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 10-15 για όλα τα timepoints.
17. Εφαρμόζουμε τη διαδικασία Sandwich ELISA της παραγράφου 2.3

### 3.2.3 Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα της ELISA που προέκυψαν από το LUMINEX φαίνονται στον πίνακα 3.2.

sample collection site		CCL3	CSF3	ICAM1	FST	CXCL10	CYTC	PEDF	GRNA	IL8	S10A6	CCL5	CXCL11	DEFB1	IFNG	IL13	L17F	L20	IL3	L4	L6	NRG1	PROK1	RETN	TFF3	TNF10	TNF12	ZG16	L12A	BSA	PE	IL1A	TNFA			
supernatant petri dish	treated	5	707	548	432	448	318	54237	543	871	1687	37636	218	348	359	279	685	612	417	377	319	565	568	703	700	349	256	350	334	2789	202	10689	2631	17338		
	untreated	30	621	581	424	871	289	67849	777	851	1685	78883	317	342	358	278	682	483	426	331	330	555	533	749	734	348	224	326	321	3817	202	11131	2631	15334		
	30	681	630	425	878	849	71806	5255	2702	6742	84125	358	325	358	258	659	528	418	532	300	544	544	724	736	350	253	382	344	3733	216	10897	2134	15562			
	60	723	625	433	889	270	78211	3537	8811	22021	103039	338	339	415	307	559	533	422	439	317	777	585	338	335	413	283	354	372	3814	211	11055	2731	15388			
	130	659	588	598	4231	289	18536	6383	8878	16261	48008	211	387	361	252	626	521	476	321	307	669	577	736	332	223	422	441	3891	212	11907	8702	49328				
1160	759	598	692	512	292	75922	1836	888	11722	82707	335	336	321	252	591	531	451	421	331	512	712	639	749	309	411	359	410	377	4748	254	11159	1107	45356			
heads on cylinders	treated	5	851	597	389	459	462	6634	189	639	1629	52111	178	305	325	250	687	658	425	331	349	518	518	823	823	351	351	351	351	351	351	351	351	351	351	351
	untreated	30	658	548	415	784	231	72828	2614	818	2153	78871	218	383	350	242	682	485	427	318	265	525	526	681	718	306	228	351	284	3883	208	10883	878	281		
	60	688	548	415	784	231	72828	2614	818	2153	78871	218	383	350	242	682	485	427	318	265	525	526	681	718	306	228	351	284	3883	208	10883	878	281			
	90	688	541	378	876	224	77291	3503	1598	3348	7301	114	384	289	285	598	457	493	337	379	689	528	735	688	309	239	378	378	378	378	378	378	378	378		
	130	683	600	490	1949	270	86817	7201	15620	6589	73360	348	318	297	282	674	486	441	348	348	593	578	749	749	328	387	347	363	349	3782	241	10844	630	359		
1160	801	599	719	2613	269	13889	16299	28021	8718	79354	332	354	326	269	644	498	454	334	317	693	576	749	749	307	237	337	348	3788	234	11928	861	274				
heads on cylinders	treated	30	690	545	339	563	418	37794	777	534	500	24821	217	321	321	261	711	459	417	301	447	638	441	502	602	326	269	334	309	2118	234	7421	5212	24771		
	untreated	60	877	837	381	862	585	28333	1183	729	629	30386	333	334	358	257	686	555	311	372	681	381	530	378	346	211	348	318	3535	231	8261	7118	36306			
	90	761	474	385	1372	829	87336	1850	2411	1658	1658	1658	1658	1658	1658	1658	1658	1658	1658	1658	1658	1658	1658	1658	1658	1658	1658	1658	1658	1658	1658	1658	1658	1658		
	130	833	818	437	4748	953	103317	6525	83372	3387	10730	230	338	332	332	479	371	368	252	430	329	471	549	338	338	338	478	328	3722	218	8889	1731	13211			
	1160	718	538	438	1152	1314	548	365	383	388	342	754	429	428	511	607	588	588	588	588	588	588	588	588	588	588	588	588	588	588	588	588	588	588		

Πίνακας 3.2: Αποτελέσματα του LUMINEX για μέτρηση υπερκείμενου και μέτρηση κοντά σε κύτταρα με κυλίνδρους.

Στο συγκεκριμένο πείραμα, συγκρίνουμε την 2<sup>η</sup> στήλη (Εικόνα 3.1), η οποία δείχνει τα αποτελέσματα της μέτρησης του υπερκείμενου, με την 4<sup>η</sup> στήλη η οποία δείχνει τα αποτελέσματα της μέτρησης με τους κυλίνδρους. Επίσης μπορούμε να συγκρίνουμε την 1<sup>η</sup> με την 2<sup>η</sup> στήλη, όπου ουσιαστικά θα συγκρίνουμε τα αποτελέσματα της κλασικής ELISA του πειράματος 3.1 με το πείραμα 3.2.

### 3.2.4 Συμπεράσματα

Παρατηρούμε επιλέγοντας στο excel, conditional formatting τα εξής:

1. Όσο αυξάνονται τα timerepoints, τόσο μεγαλώνει και η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα κύτταρα.
2. Το μοτίβο των αποτελεσμάτων παραμένει ίδιο, δηλαδή για πρωτεΐνες που είναι στην αρχή είναι αυξημένες και στη συνέχεια μειώνονται ή για πρωτεΐνες που είναι σε χαμηλά επίπεδα στην αρχή και στην συνέχεια αυξάνονται, το μοτίβο παραμένει ίδιο και για treated supernatant και παράλληλα για treated lysate.
3. Τα stimuli που χρησιμοποιήθηκαν λειτουργούν καθώς είναι πολύ αυξημένα τα επίπεδά τους στα treated κύτταρα σε σχέση με τα untreated.

Από το DataRail του πειράματος (εικόνα 3.1) παρατηρούμε τα εξής:

1. Οι περισσότερες πρωτεΐνες εκκρίνονται σταθερά από τα κύτταρα, ενώ άλλες στα τελευταία timepoints υπάρχουν σε μεγαλύτερη συγκέντωση, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ELISA.
2. Το συμπέρασμα 1 αναφέρεται σε treated και untreated κύτταρα.
3. Συγκρίνοντας τη μέθοδο με της μέτρησης υπερκειμένου με τη μέθοδο μέτρησης με τους μαγνητικούς κυλίνδρους, δεν υπάρχει εμφανής διαφορά, οπότε συμπεραίνουμε ότι η μέθοδος μέτρησης λειτουργεί, αλλά δε θεωρείται μέτρηση πολύ κοντά στα κύτταρα.
4. Η μέτρηση υπερκειμένου του πειράματος 3.1 δίνει σχεδόν ίδια αποτελέσματα με τις μέτρηση του πειράματος 3.2, οπότε συμπεραίνουμε ότι το πείραμα έχει πετύχει και τα αποτελέσματα είναι αληθή.

### **3.3 Δεύτερο πείραμα μέτρησης επιπέδων πρωτεΐνης κοντά στα κύτταρα**

Σε αυτό το πείραμα ουσιαστικά θα επαναληφθεί ότι έγινε στο πρώτο πείραμα μέτρησης επιπέδων πρωτεΐνης κοντά στα κύτταρα, μόνο που επιπλέον θα μετριέται το lysate σε κύτταρα και θα προστίθενται μικροσφαιρίδια στη συνέχεια έτσι ώστε να μπορεί να διευκρινιστεί η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στην επιφάνεια και μέσα στα κύτταρα.

#### **3.3.1 Σκοπός του πειράματος**

Σκοπός του πειράματος είναι να αποδείξουμε ότι κάποιες πρωτεΐνες έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση κοντά στην επιφάνεια του κυττάρου σε σχέση με τη συγκέντρωση που μετριέται στο υπερκείμενο. Επιπλέον σκοπός είναι να αποδείξουμε ότι αυτές οι πρωτεΐνες, έχουν εκκριθεί γύρω από το κύτταρο και δε βρίσκονται μέσα ή στην επιφάνειά του.

#### **3.3.2 Πειραματική διαδικασία**

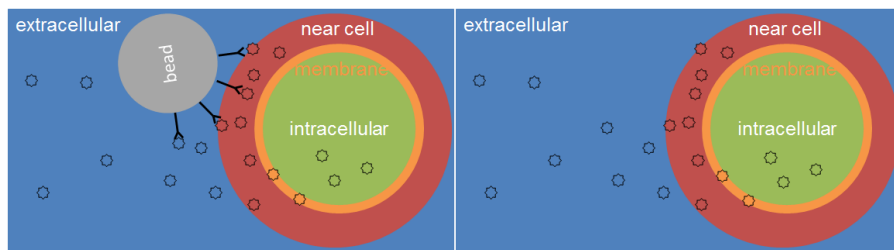
Στο πείραμα που εφαρμόστηκε χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HDF. Στρώθηκαν 30000 κύτταρα/φρεάτιο και αναπτύχθηκαν για 2 ημέρες. Χρησιμοποιήθηκαν ενεργοποιημένα (Παράγραφος 2.2) και μη ενεργοποιημένα κύτταρα.

Οι μετρήσεις έγιναν σε συγκεκριμένη χρονοσειρά για ενεργοποιημένα και μη κύτταρα. Η χρονοσειρά στην οποία πάρθηκαν οι μετρήσεις είναι για 5, 30, 120, 1440 (24 ώρες) λεπτά. Σε κάθε timepoint πάρθηκε υπερκείμενο από τα κύτταρα ενώ στη συνέχεια ακολουθήθηκε η διαδικασία της παραγράφου 2.4 προκειμένου να μετρηθούν οι πρωτεΐνες πολύ κοντά στο κύτταρο, ενώ παράλληλα μετρήθηκαν και οι πρωτεΐνες που έχει το κύτταρο μέσα και πάνω στη κυτταρική μεμβράνη. Μετρήθηκε 35 plex πρωτεϊνών.

Παρακάτω αναφέρονται αναλυτικά τα βήματα που ακολουθήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα:

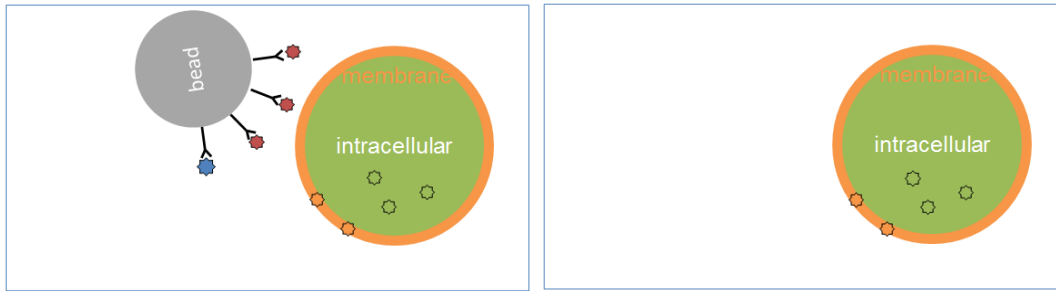
1. Προετοιμασία θρεπτικού υγρού: Προετοιμάστηκε θρεπτικό υγρό με stimuli στις αναλογίες της παραγράφου 2.2 και χωρίς stimuli.

2. Προσθήκη μικροσφαιριδίων στο θρεπτικό υγρό: Προστέθηκαν 6800 μικροσφαιρίδια/200μl θρεπτικού υγρού (όλα τα σήματα).
3. Αφαιρούμε το θρεπτικό υγρό από όλα τα φρεάτια.
4. Αναδεύουμε το διάλυμα μικροσφαιριδίων-θρεπτικού υγρού.
5. Προσθέτουμε 200μl μείγματος μικροσφαιριδίων-θρεπτικού υγρού και σκέτου θρεπτικού αντίστοιχα σε κάθε φρεάτιο με κύτταρα.



**Εικόνα 3.6: Κύτταρο με μικροσφαιρίδιο στην επιφάνεια του και χωρίς**

6. Αφήνουμε την πλάκα με τα κύτταρα στον incubator.
7. Ετοιμάζουμε μια καινούργια 96άρα πλάκα για να γίνει η ELISA: Υπολογίζουμε πόσα φρεάτια θα χρησιμοποιήσουμε. Στα φρεάτια στα οποία θα μεταφερθεί υπερκείμενο ή lysate χωρίς beads βάζουμε beads. Σε αυτά που θα μπει lysate με beads τα αφήνουμε κενά.
8. Αφού αφαιρέσουμε το assay buffer και τα μικροσφαιρίδια μείνουν στεγνά στο ELISA plate, το καλύπτουμε και το βάζουμε στους 4 °C να αναδεύεται συνεχώς.
9. Στο timepoint X βάζουμε τη πλάκα με τα κύτταρα στην μαγνητική πλάκα και την αφήνουμε για 1 λεπτό.
10. Κρατάμε 70μl υπερκείμενο από τα treated και 70μl από τα untreated κύτταρα (με μικροσφαιρίδια στην επιφάνεια τους ή χωρίς) στην ELISA plate. Προσέχουμε να μη πλησιάσουμε τα κύτταρα πολύ και πάρουμε με τη πιπέτα τα μικροσφαιρίδια που είναι κολλημένα στην κυτταρική μεμβράνη.
11. Πετάμε το υπόλοιπο υπερκείμενο.
12. Προσθέτουμε στα κύτταρα 200μl PBS.
13. Πετάμε τα 200μl PBS.
14. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 12-13

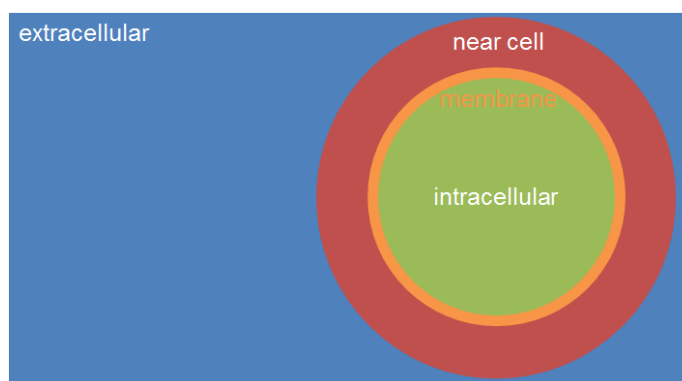


**Εικόνα 3.7:** Κύτταρο με μικροσφαιρίδιο στην επιφάνεια του και χωρίς. Το μικροσφαιρίδιο θα έχει «πιάσει» λίγη πρωτεΐνη από το υπερκείμενο (μπλε χρώμα) και περισσότερη από τη κοντινή περιοχή του κυττάρου (κόκκινο χρώμα).

15. Προσθέτουμε 70μl lysis mix στα κύτταρα (treated και untreated).
16. Ρυθμίζουμε τη πιπέτα ώστε να αναρροφά 50μl. Κάνουμε up and down με τη πιπέτα, ενώ παράλληλα «ξύνουμε» το φρεάτιο με την μύτη της πιπέτας, ώστε να ξεκολλήσουν και να λιώσουν τα κύτταρα.
17. Μεταφέρουμε τα lysates στην ELISA plate.
18. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 7-15 για όλα τα timepoints.
19. Εφαρμόζουμε τη διαδικασία Sandwich ELISA της παραγράφου 2.3

### 3.3.3 Αποτελέσματα

Στην εικόνα 3.8 φαίνεται χρωματικά τι θεωρούμε υπερκείμενο, περιοχή κοντά στο κύτταρο, επιφάνεια του κυττάρου και ενδοκυττάρια περιοχή. Επίσης πρέπει να αναφερθεί ότι μετρήθηκε το θρεπτικό υγρό από μόνο του καθώς περιέχει πρωτεΐνες μέσα και πρέπει να γνωρίζουμε τα επίπεδά τους πριν εκκριθούν επιπλέον πρωτεΐνες από τα κύτταρα.

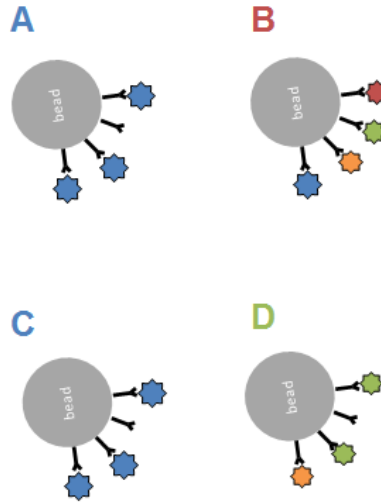


Εικόνα 3.8: Περιοχές του κυττάρου οι οποίες μετρήθηκαν, διακριτοποιημένες χρωματικά

Πρέπει να αναφερθεί ότι κατά το πείραμα μετρήσαμε ουσιαστικά 4 διαφορετικές περιπτώσεις:

- A. Υπερκείμενο του οποίου τα κύτταρα είχαν μικροσφαιρίδια.
- B. Υπερκείμενο
- C. Lysate το οποίο έχει μέσα μικροσφαιρίδια. Στα συγκεκριμένα μικροσφαιρίδια θα έχουν κολλήσει πρωτεΐνες από το υπερκείμενο σε μικρό βαθμό (μπλε χρώμα), πρωτεΐνες που εκκρίνονται πολύ κοντά στο κύτταρο (κόκκινο χρώμα) σε μεγαλύτερο βαθμό και επίσης πρωτεΐνες από την επιφάνεια του κυττάρου (πορτοκαλί χρώμα) και από το εσωτερικό του κυττάρου (πράσινο χρώμα).
- D. Lysate. Περιέχει πρωτεΐνες από την επιφάνεια του κυττάρου (πορτοκαλί χρώμα) και από το εσωτερικό του κυττάρου (πράσινο χρώμα).

Οι μετρήσεις αυτές φαίνονται χρωματικά στην εικόνα 3.9:



Εικόνα 3.9: Μικροσφαιρίδια που μετρήθηκαν, διακριτοποιημένα χρωματικά

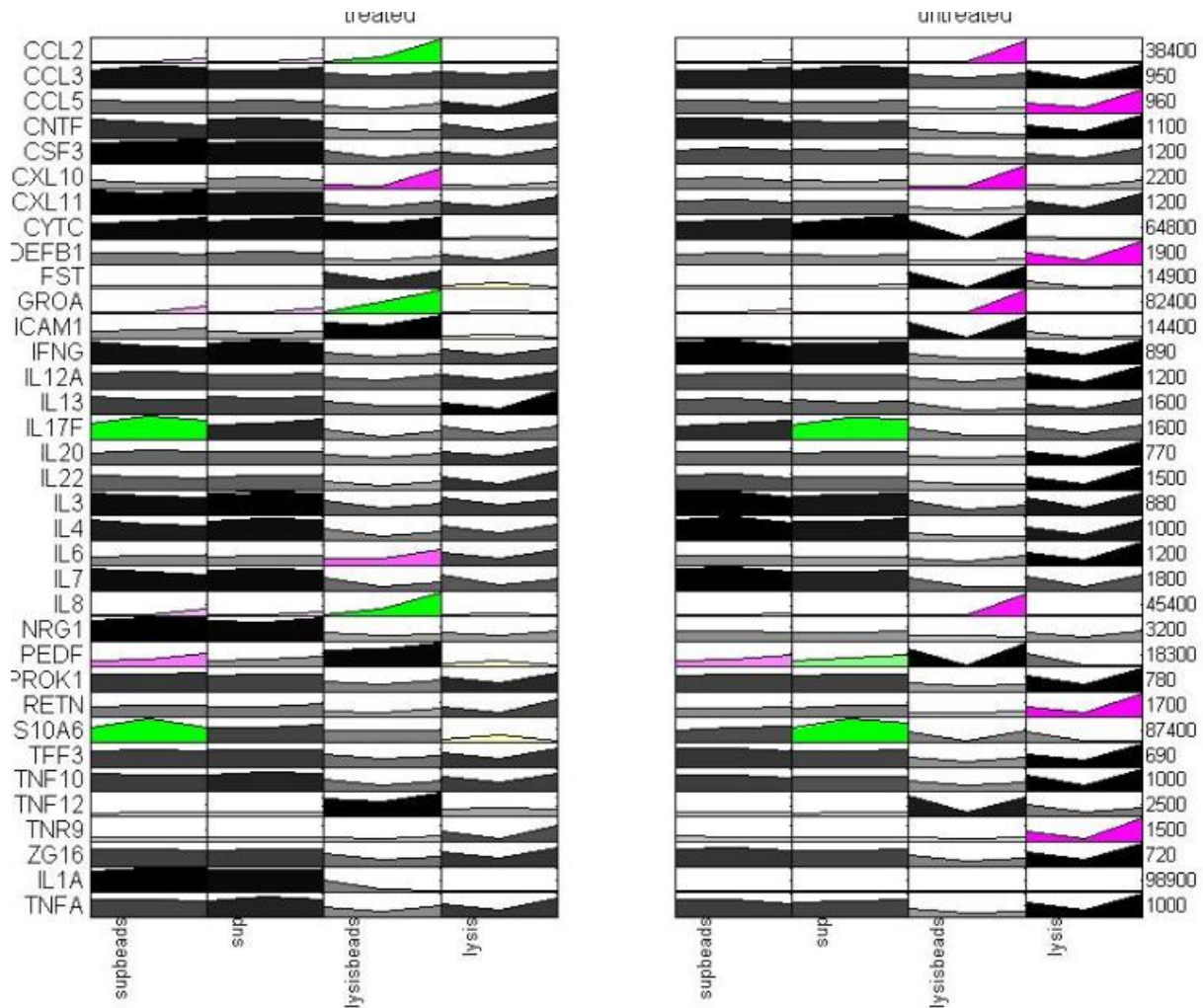
Τα αποτελέσματα της ELISA που προέκυψαν από το LUMINEX φαίνονται στον πίνακα 3.3.

		COL2	COL3	COL5	DNTP	ESF3	EXL10	COL11	CVTC	DEFB1	FST	GRDA	ICAM1	IFNG	IL12A	IL13	IL17F	IL20	IL3	IL4	IL6	IL7	IL8	NRG1	PDGF	PROK1	RETN	S10A6	TFP3	TNF10	TNF12	TNR9	ZS16	L1A	TNF4			
supernatant	there are beads on cells when we take the supernatant	treated	30	695	702	552	885	1050	803	1214	2308	883	1432	1050	3012	831	774	1185	1031	387	936	898	446	1624	1502	2818	3811	566	728	51045	644	702	229	240	509	85383	718	
		untreated	60	520	881	448	745	1106	524	1054	4828	882	1780	1422	5417	674	878	952	1578	458	800	691	686	500	1422	1501	3172	5654	659	655	87376	523	785	382	278	528	93748	738
		120	8434	844	451	804	1209	553	1232	62573	845	1950	25024	5929	611	829	994	1250	430	770	861	652	526	1227	12786	3233	9880	608	847	53775	475	722	331	246	485	88991	677	
	the classic one: there are no beads on cells when we take the supernatant	treated	30	516	684	550	515	882	984	694	27293	854	1244	1079	596	825	762	977	911	416	939	858	896	453	1673	1563	1356	3550	547	617	42897	539	740	398	300	542	1510	750
		untreated	60	534	688	523	567	843	1106	767	54294	866	1254	1301	666	885	756	1021	1037	438	1018	879	1058	474	1701	1591	1400	5209	576	607	53887	543	772	314	278	566	1530	760
		1440	42214	935	26222	11197	2472	108480	2334	117597	1341	18712	75078	5476	1154	950	1879	1227	541	1311	1142	1383	981	2144	42767	1661	21326	771	1000	30766	786	1108	439	386	764	1987	1024	
lytate	beads on cells -> lysate -> transfer lysate with beads to ELISA plate	treated	30	1187	557	292	463	669	295	499	50367	482	10763	2924	9554	459	607	877	707	305	535	551	482	375	1018	1339	1107	12374	309	359	41328	380	544	1917	225	388	48997	440
		untreated	60	8560	458	176	346	261	214	322	42606	360	4194	89243	8366	244	442	559	199	219	276	267	194	356	254	13621	731	13241	244	293	42805	263	241	1593	109	227	7727	235
		120	85991	971	580	375	615	5930	693	82918	844	12192	82448	14444	383	709	152	560	356	261	405	383	793	580	49268	998	17837	372	586	43188	356	441	2541	363	298	4670	462	
	lysate -> transfer lysate to ELISA plate (beads already on plate)	treated	30	886	693	215	489	456	250	328	32247	365	10913	1003	8857	387	558	743	739	257	514	538	328	363	1014	913	743	13256	288	288	40308	203	448	2863	201	346	1569	391
		untreated	60	439	386	174	212	326	186	187	2757	270	587	1293	503	194	340	249	278	201	349	212	170	164	243	599	668	654	197	236	1743	172	215	404	153	178	401	190
		1440	39535	584	236	182	267	2197	346	64392	401	14899	80769	13765	195	582	363	230	266	322	368	189	526	291	41431	533	18693	246	428	42030	295	398	2005	208	244	437	230	
beads already on plate	treated	30	960	670	470	645	610	411	599	3215	862	1615	1321	1040	563	716	798	878	428	806	695	607	611	1152	735	1008	1663	468	738	6158	421	674	742	613	438	3631	644	
	untreated	60	997	686	207	304	319	194	331	30718	342	3733	1862	1872	313	452	330	318	260	382	351	322	332	380	4489	741	4365	289	295	25322	288	301	875	189	252	1765	676	
	1440	47778	1036	867	865	1628	2392	1096	39795	1419	17952	107209	31160	944	1248	866	942	718	1161	864	795	1154	1400	63805	1588	12973	824	1277	48708	732	1171	2867	854	723	2909	809		
beads already on plate	treated	30	754	714	432	626	549	420	673	8903	889	5166	807	4344	626	626	715	882	411	883	653	588	600	1112	717	1117	10431	635	754	36243	399	715	1304	621	449	1386	625	
	untreated	60	289	335	235	290	183	285	2428	302	695	277	463	293	348	359	376	234	349	266	238	251	268	280	574	729	243	285	2513	211	248	396	194	199	314	264		
	1440	1981	947	862	1080	804	753	1043	1705	10266	1096	901	991	886	1394	1064	925	770	1550	798	911	1162	1175	974	1365	96	776	1686	1619	692	1034	633	1004	715	1210	1077		

Πίνακας 3.3: Αποτελέσματα του LUMINEX για το δεύτερο πείραμα μέτρησης υπερκείμενου και μέτρησης κοντά σε κύτταρα.

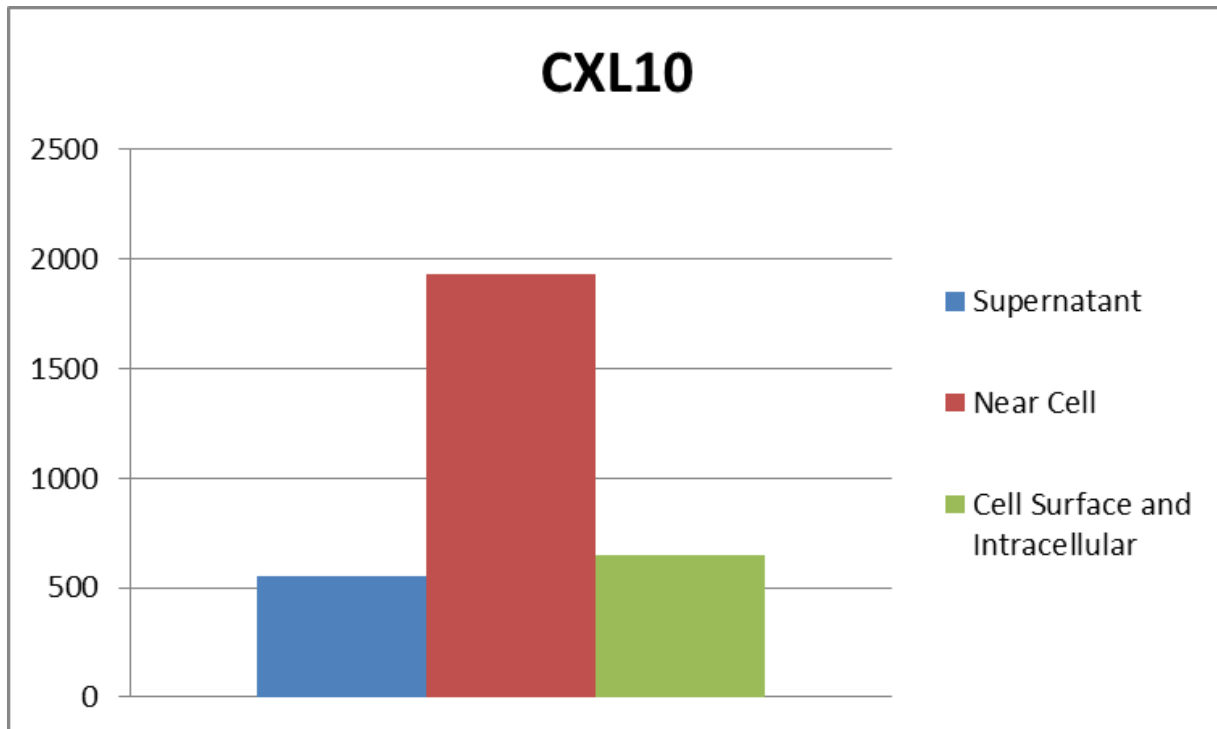


Το DataRail για αυτό το πείραμα έγινε για τα timepoints των 5, 30, 120 λεπτών, καθώς οι μετρήσεις των 24 ωρών δεν απεικονίζουν το επιθυμητό αποτέλεσμα, οπότε δε θα ασχοληθούμε με αυτό το timepoint. Το DataRail της εικόνας 3.10 μας δείχνει όλες τις πρωτεΐνες για treated και untreated κύτταρα. Πρέπει να αναφερθεί ότι ως supbeads ονομάζουμε τη περίπτωση A της παραγράφου 3.3.3. Αντίστοιχα sup είναι η περίπτωση C, lysisbeads η περίπτωση B και lysis η περίπτωση D.

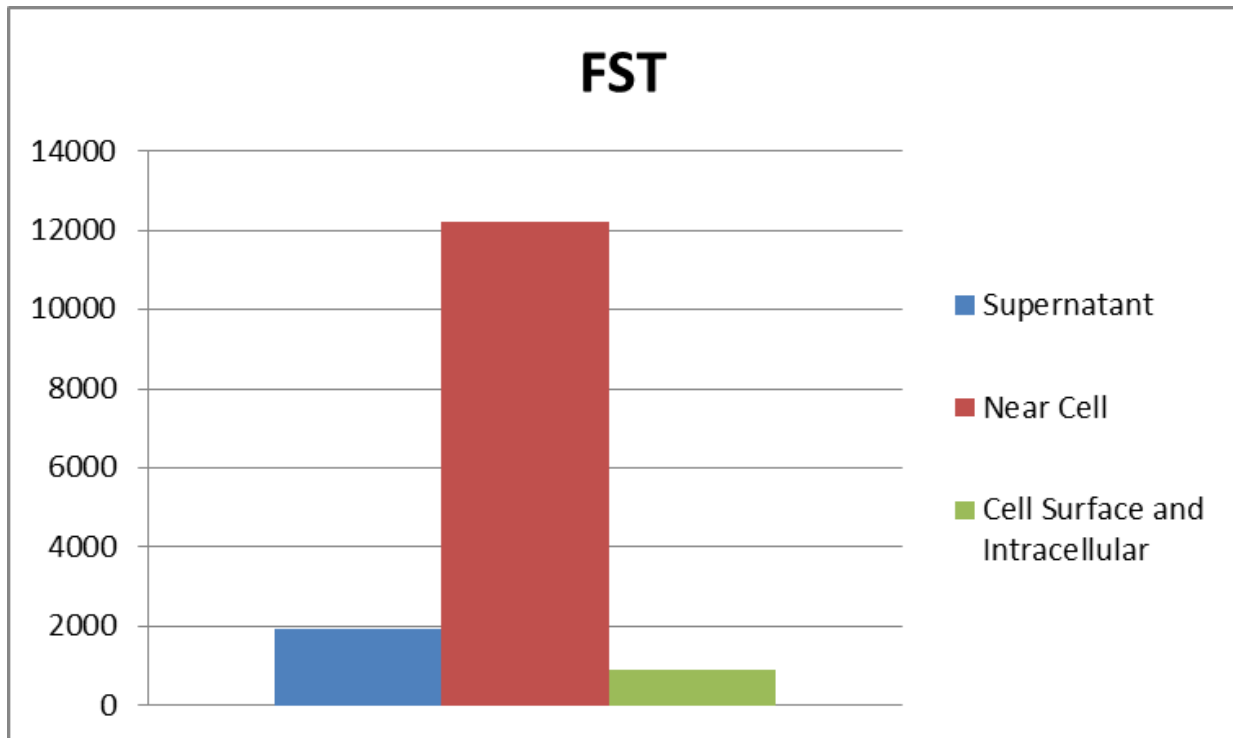


Εικόνα 3.10: DataRail πειράματος 3.3 για timepoint 5, 30 και 120 λεπτών

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, οι πρωτεΐνες CXL10, FST, GROA, ICAM1, CCL2, IL8, TNF12 και PEDF έχουν αρκετά υψηλότερα επίπεδα πολύ κοντά στα κύτταρα σε σχέση με το υπερκείμενο, την επιφάνεια των κυττάρων και το εσωτερικό τους. Στα γραφήματα για φαίνεται η σύγκριση για το timepoint των 120 λεπτών (2 ωρών):



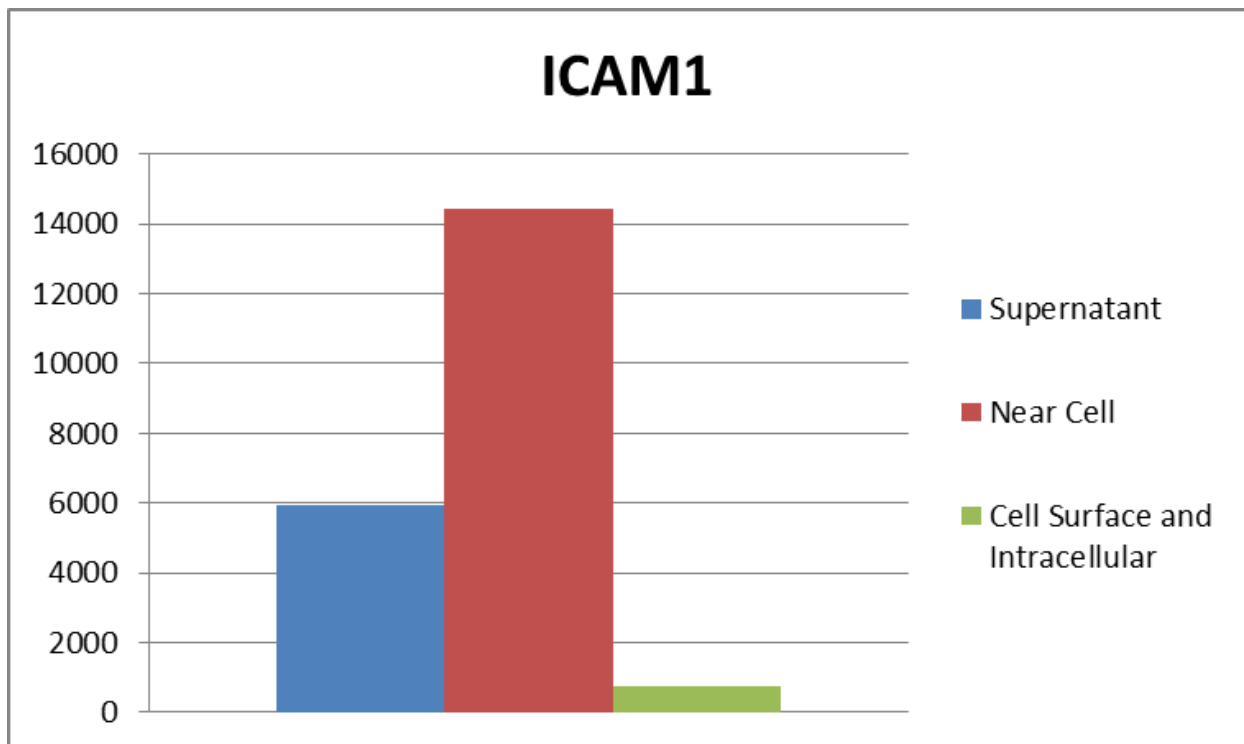
**Γράφημα 3.4:** Σύγκριση επιπέδων CXL10 υπερκειμένου, κοντά στο κύτταρο, στην επιφάνεια και μέσα στο κύτταρο, για timepoint 2 ωρών



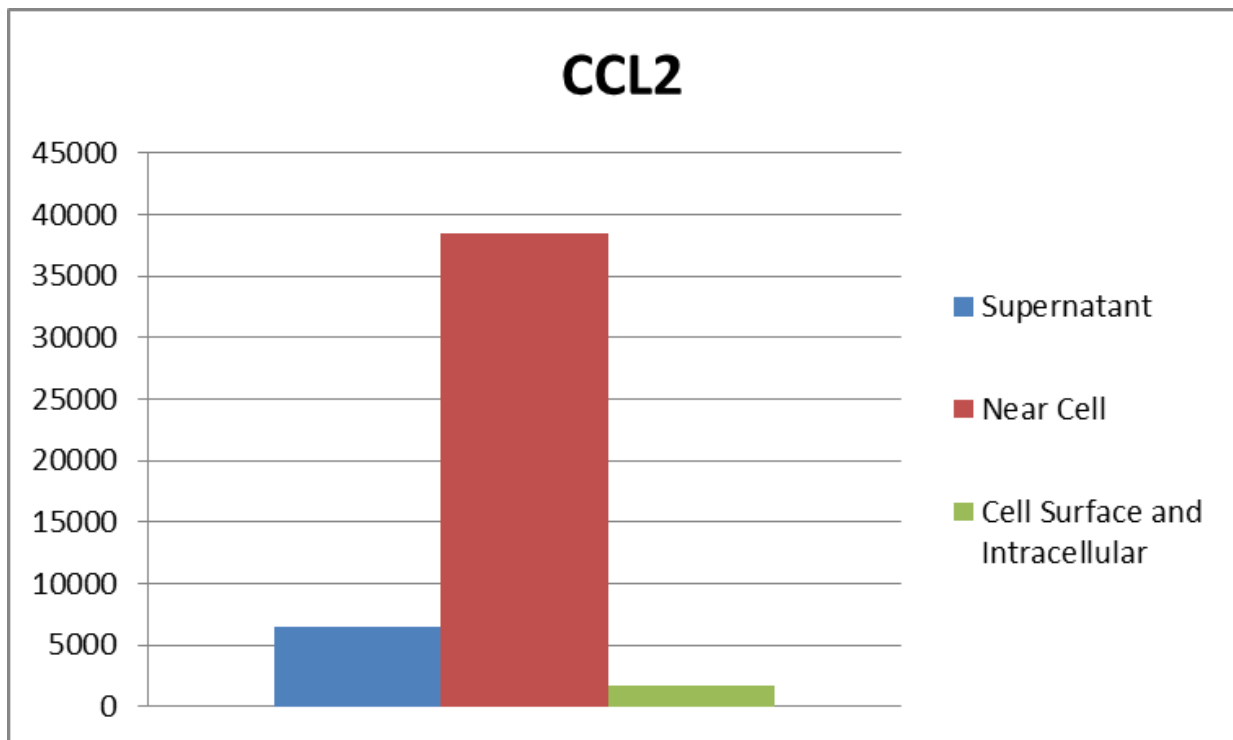
Γράφημα 3.5: Σύγκριση επιπέδων FST υπερκειμένου, κοντά στο κύτταρο, στην επιφάνεια και μέσα στο κύτταρο, για timepoint 2 ωρών



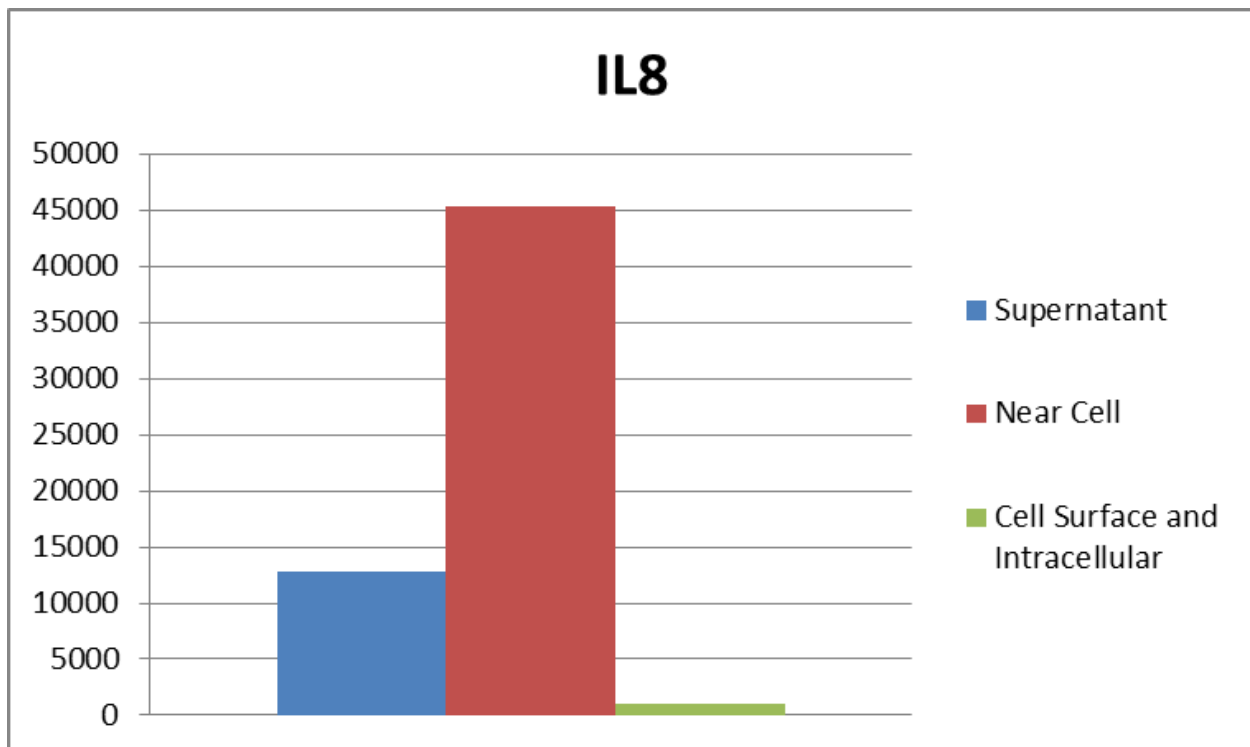
Γράφημα 3.6: Σύγκριση επιπέδων GROA υπερκειμένου, κοντά στο κύτταρο, στην επιφάνεια και μέσα στο κύτταρο, για timepoint 2 ωρών



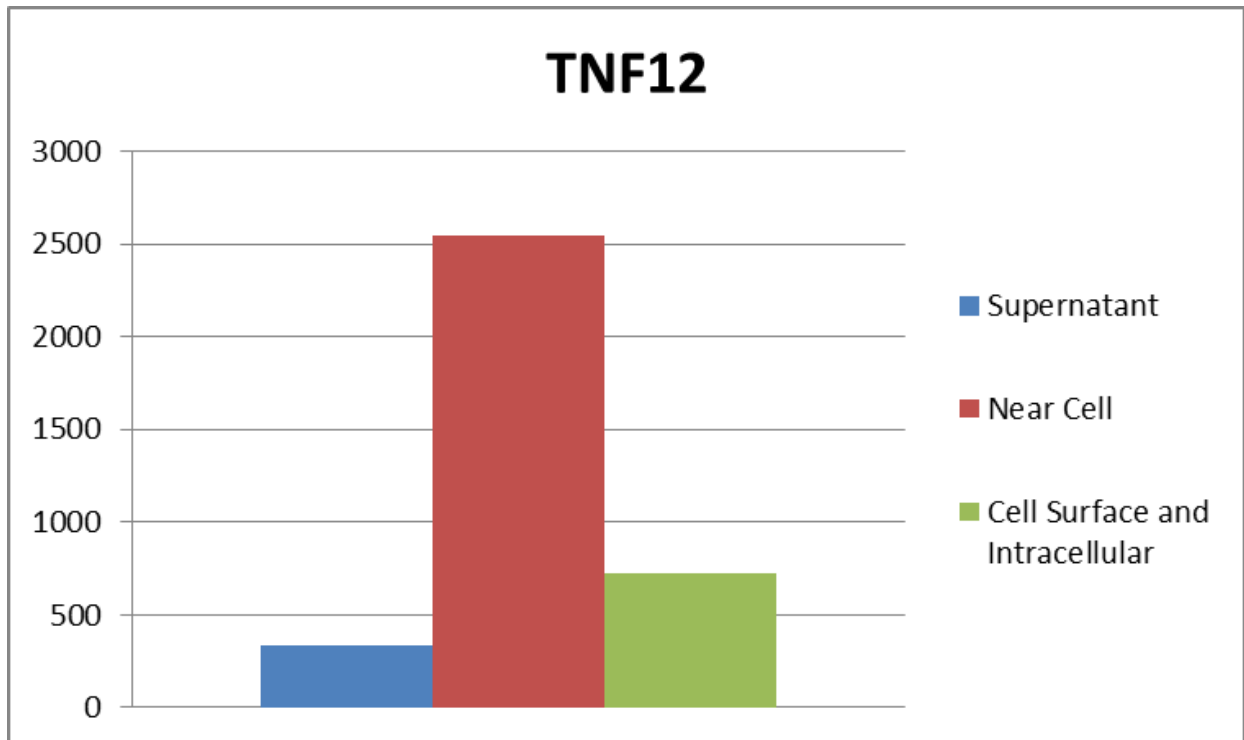
Γράφημα 3.7: Σύγκριση επιπέδων ICAM1 υπερκειμένου, κοντά στο κύτταρο, στην επιφάνεια και μέσα στο κύτταρο, για timepoint 2 ωρών



Γράφημα 3.8: Σύγκριση επιπέδων CCL2 υπερκειμένου, κοντά στο κύτταρο, στην επιφάνεια και μέσα στο κύτταρο, για timepoint 2 ωρών

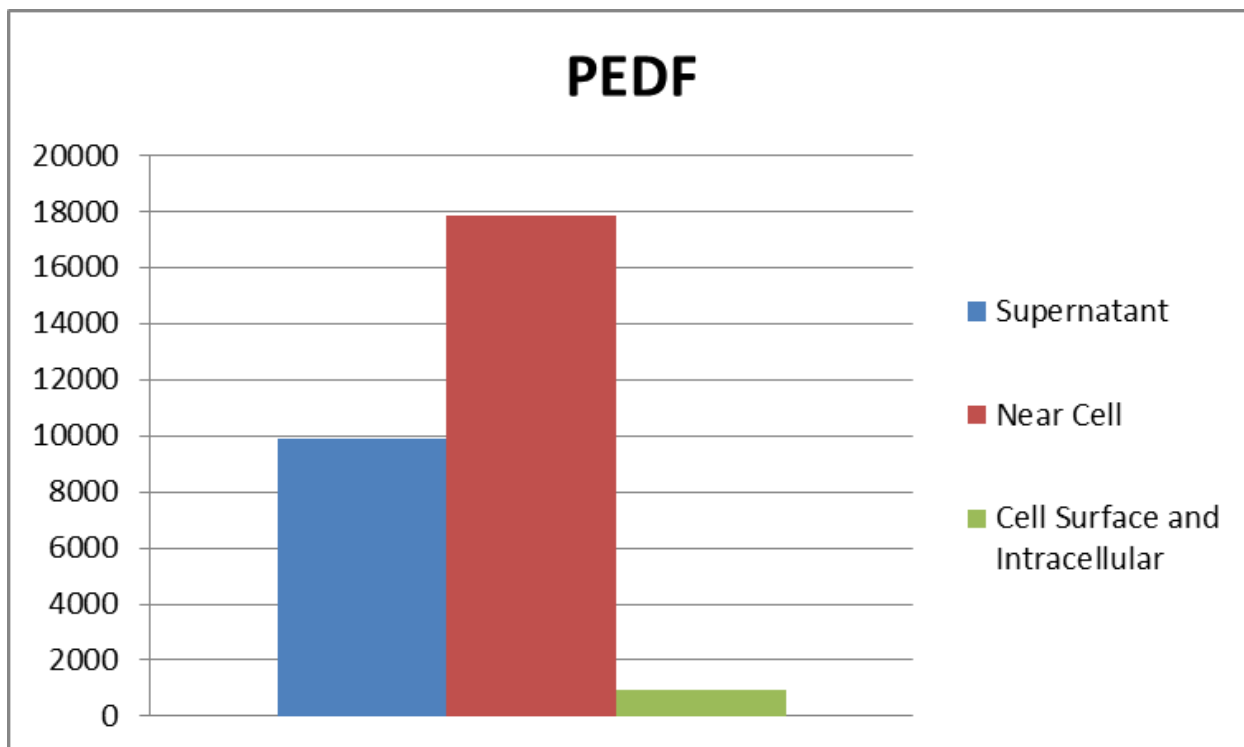


Γράφημα 3.9: Σύγκριση επιπέδων IL8 υπερκειμένου, κοντά στο κύτταρο, στην επιφάνεια και μέσα στο κύτταρο, για timepoint 2 ωρών



**Γράφημα 3.10: Σύγκριση επιπέδων TNF12 υπερκειμένου, κοντά στο κύτταρο, στην επιφάνεια και μέσα στο κύτταρο, για timepoint 2 ωρών**





**Γράφημα 3.11: Σύγκριση επιπέδων PEDF υπερκειμένου, κοντά στο κύτταρο, στην επιφάνεια και μέσα στο κύτταρο, για timepoint 2 ωρών**

### 3.3.4 Συμπεράσματα

Παρατηρούμε επιλέγοντας στο excel (Πίνακας 3.3), conditional formatting τα εξής:

1. Όσο αυξάνονται τα timepoints μέχρι το timepoint των 2 ωρών, τόσο μεγαλώνει και η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα κύτταρα ή παραμένει σταθερή.
2. Στο timepoint των 24 ωρών η συγκέντρωση κάποιων πρωτεϊνών συνεχίζουν να αυξάνονται ενώ άλλες μειώνονται.
3. Το μοτίβο των αποτελεσμάτων παραμένει ίδιο, δηλαδή για πρωτεΐνες που είναι στην αρχή είναι αυξημένες και στη συνέχεια μειώνονται ή για πρωτεΐνες που είναι σε χαμηλά επίπεδα στην αρχή και στη συνέχεια αυξάνονται, το μοτίβο παραμένει ίδιο και για treated supernatant και παράλληλα για treated lysate.

4. Τα stimuli που χρησιμοποιήθηκαν λειτουργούν καθώς είναι πολύ αυξημένα τα επίπεδά τους στα treated κύτταρα σε σχέση με τα untreated εκτός από το TNFA, το οποίο δε λειτούργησε.

Από το DataRail του πειράματος παρατηρούμε τα εξής (Εικόνα 3.10):

1. Οι περισσότερες πρωτεΐνες εκκρίνονται σταθερά από τα κύτταρα, ενώ άλλες στα τελευταία timepoints υπάρχουν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ELISA.
2. Δεν υπάρχει αξιοσημείωτη διαφορά σε treated και untreated κύτταρα.
3. Σύμφωνα με τη μέθοδο μέτρησης των lysates με μικροσφαιρίδια, οι πρωτεΐνες CXL10, FST, GROA, ICAM1, CCL2, IL8, TNF12 και PEDF φαίνονται πιο αυξημένες κοντά στα κύτταρα συγκριτικά με τη κλασική ELISA, αλλά παράλληλα είναι και πιο αυξημένες από τη μέτρηση σκέτων lysates χωρίς μικροσφαιρίδια, τα οποία δείχνουν τα επίπεδα των συγκεκριμένων πρωτεϊνών πάνω και μέσα στα κύτταρα.

### **3.4 Τρίτο πείραμα μέτρησης επιπέδων πρωτεΐνης κοντά στα κύτταρα**

Εφόσον παρατηρήθηκε ότι το πείραμα στο οποίο μετράμε lysates έχει επαναληψιμότητα και οι μετρήσεις δείχνουν ότι κάποιες συγκεκριμένες πρωτεΐνες έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση κοντά στα κύτταρα, δημιουργήθηκε ένα 13 plex αποτελούμενο από 11 beads για μέτρηση πρωτεϊνών και 2 controls ( PE και BSA). Από αυτές τις 11 πρωτεΐνες οι CXL10, FST, GROA, ICAM1, IL8 και TNF12 έχουν υψηλή συγκέντρωση κοντά στα κύτταρα. Παράλληλα επιλέχθηκαν να μετρηθούν και 5 πρωτεΐνες, οι οποίες δεν έχουν υψηλή συγκέντρωση κοντά στα κύτταρα προκειμένου να δειχθεί η εγκυρότητα των μετρήσεων. Αυτές οι πρωτεΐνες είναι οι CSF3, IL17F, IL4, TNFA και IFNG.

#### **3.4.1 Σκοπός του πειράματος**

Σκοπός του πειράματος είναι να δούμε τι συμβαίνει αν εφαρμόσουμε το πείραμα μέτρησης επιπέδων πρωτεΐνης κοντά στα κύτταρα, σε διαφορετικό είδος κυττάρων. Για το σκοπό αυτόν το πείραμα έγινε εκτός από HDF και σε χονδροκύτταρα από ανθρώπινο φυσιολογικό χόνδρο.

#### **3.4.2 Πειραματική διαδικασία**

Στο πείραμα που εφαρμόστηκε χρησιμοποιήθηκαν HDF και χονδροκύτταρα από ανθρώπινο φυσιολογικό χόνδρο. Στρώθηκαν 30000 HDF/φρεάτιο και 24000 χονδροκύτταρα/φρεάτιο και αναπτύχθηκαν για 2 ημέρες. Σε αυτό το πείραμα όλα τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μη ενεργοποιημένα. Προκειμένου να κάνουμε στατιστική ανάλυση στα αποτελέσματα, για κάθε μέτρηση χρησιμοποιήθηκαν triplicates. Η χρονοσειρά στην οποία πάρθηκαν οι μετρήσεις είναι για 30, 120, 240 λεπτά. Σε κάθε timepoint πάρθηκε υπερκείμενο από τα κύτταρα ενώ στη συνέχεια ακολουθήθηκε η διαδικασία της παραγράφου 2.4 προκειμένου να μετρηθούν οι πρωτεΐνες πολύ κοντά στο κύτταρο, ενώ παράλληλα μετρήθηκαν και οι πρωτεΐνες που έχει το κύτταρο μέσα και πάνω στη κυτταρική μεμβράνη. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω χρησιμοποιήθηκε 13 plex.

Παρακάτω αναφέρονται αναλυτικά τα βήματα που ακολουθήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα:

1. Προσθήκη μικροσφαιριδίων στο θρεπτικό υγρό: Προστέθηκαν 6800μικροσφαιρίδια/200μl θρεπτικού υγρού (όλα τα σήματα).
2. Αφαιρούμε το θρεπτικό υγρό από όλα τα φρεάτια.
3. Αναδεύουμε το διάλυμα μικροσφαιριδίων-θρεπτικού υγρού.
4. Προσθέτουμε 200μl μείγματος μικροσφαιριδίων-θρεπτικού υγρού και σκέτου θρεπτικού αντίστοιχα σε κάθε φρεάτιο με κύτταρα.
5. Αφήνουμε την πλάκα με τα κύτταρα στον incubator.
6. Ετοιμάζουμε μια καινούργια 96άρα πλάκα για να γίνει η ELISA: Υπολογίζουμε πόσα φρεάτια θα χρησιμοποιήσουμε. Στα φρεάτια στα οποία θα μεταφερθεί υπερκείμενο ή lysate χωρίς beads βάζουμε beads. Σε αυτά που θα μπει lysate με beads τα αφήνουμε κενά.
7. Αφού αφαιρέσουμε το assay buffer και τα μικροσφαιρίδια μείνουν στεγνά στο ELISA plate, το καλύπτουμε και το βάζουμε στους 4 °C να αναδεύεται συνεχώς.
8. Στο timepoint X βάζουμε τη πλάκα με τα κύτταρα στην μαγνητική πλάκα και την αφήνουμε για 1 λεπτό.
9. Κρατάμε 70μl υπερκείμενο από τα treated και 70μl από τα untreated κύτταρα (με μικροσφαιρίδια στην επιφάνεια τους ή χωρίς) στην ELISA plate. Προσέχουμε να μη πλησιάσουμε τα κύτταρα πολύ και πάρουμε με τη πιπέτα τα μικροσφαιρίδια που είναι κολλημένα στην κυτταρική μεμβράνη.
10. Πετάμε το υπόλοιπο υπερκείμενο.
11. Προσθέτουμε στα κύτταρα 200μl PBS.
12. Πετάμε τα 200μl PBS.
13. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 12-13
14. Προσθέτουμε 70μl lysis mix στα κύτταρα (treated και untreated).
15. Ρυθμίζουμε τη πιπέτα ώστε να αναρροφά 50μl. Κάνουμε up and down με τη πιπέτα, ενώ παράλληλα «ξύνουμε» το φρεάτιο με την μύτη της πιπέτας, ώστε να ξεκολλήσουν και να λιώσουν τα κύτταρα.
16. Μεταφέρουμε τα lysates στην ELISA plate.

17. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 7-15 για όλα τα timepoints.
18. Εφαρμόζουμε τη διαδικασία Sandwich ELISA της παραγράφου 2.3

### 3.4.3 Αποτελέσματα

Από τα αποτελέσματα που δόθηκαν εφαρμόζοντας την Sandwich ELISA της παραγράφου 2.3 έγινε στατιστική ανάλυση. Στο πίνακα παρακάτω βλέπουμε το C.V. (Coefficient Variation) / σήμα, το συνολικό C.V. και το C.V. χωρίς τα δύο σήματα που έδωσαν τα χειρότερα αποτελέσματα.

	IL4	GROA	IFNG	CSF3	IL8	IL17F	TNFA	ICAM1	FST	CXL10	TNF12	BSA	PE
single cv	14%	13%	12%	23%	11%	21%	13%	7%	13%	16%	9%	18%	2%
Total	14%												
Without CSF3 and IL17F	12%												

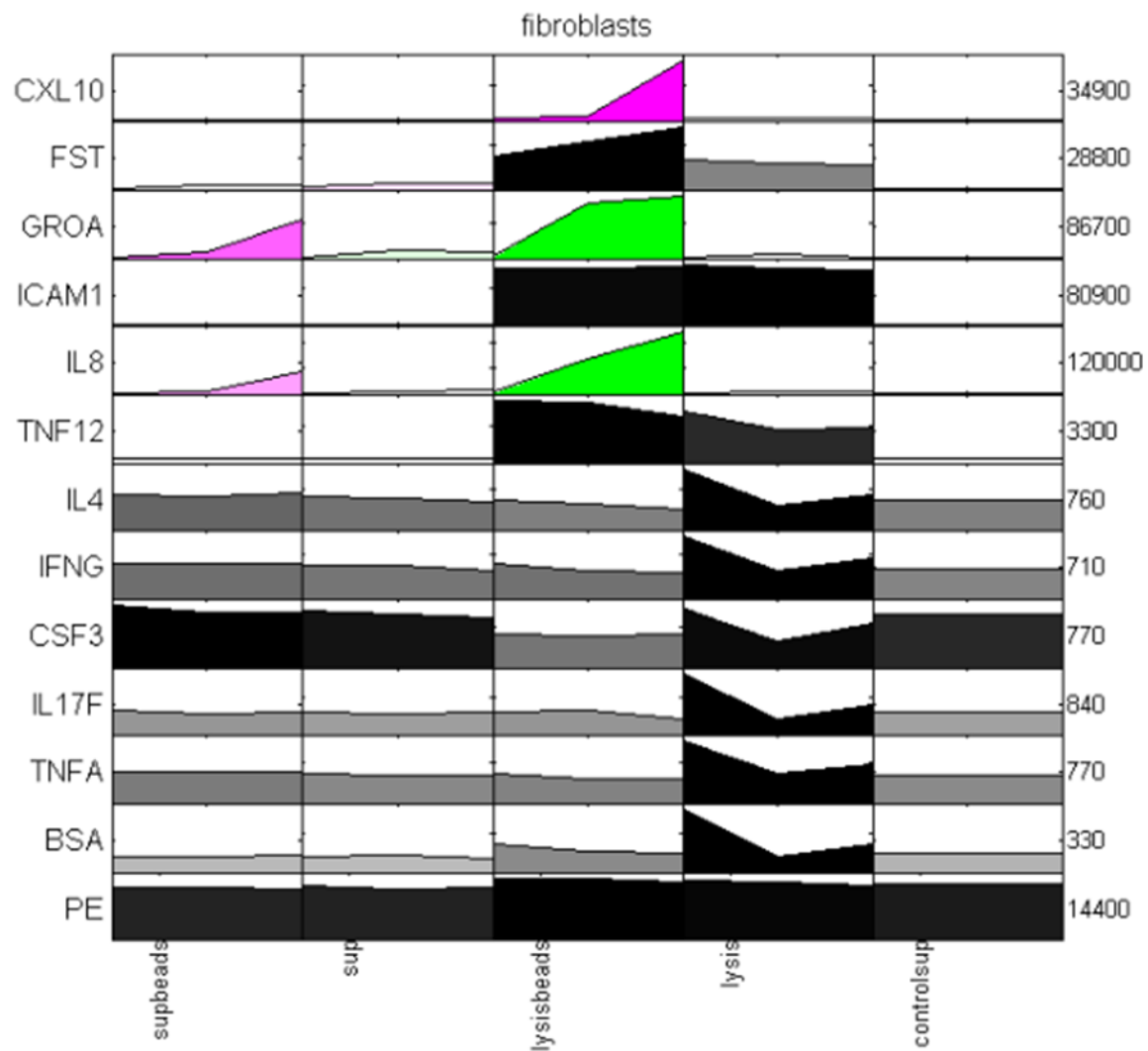
**Πίνακας 3.3: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης τρίτου πειράματος μέτρησης επιπέδων πρωτεΐνης κοντά στα κύτταρα**

Προκειμένου να παρουσιαστούν τα αποτελέσματα του LUMINEX και εφόσον είναι σε triplicates,

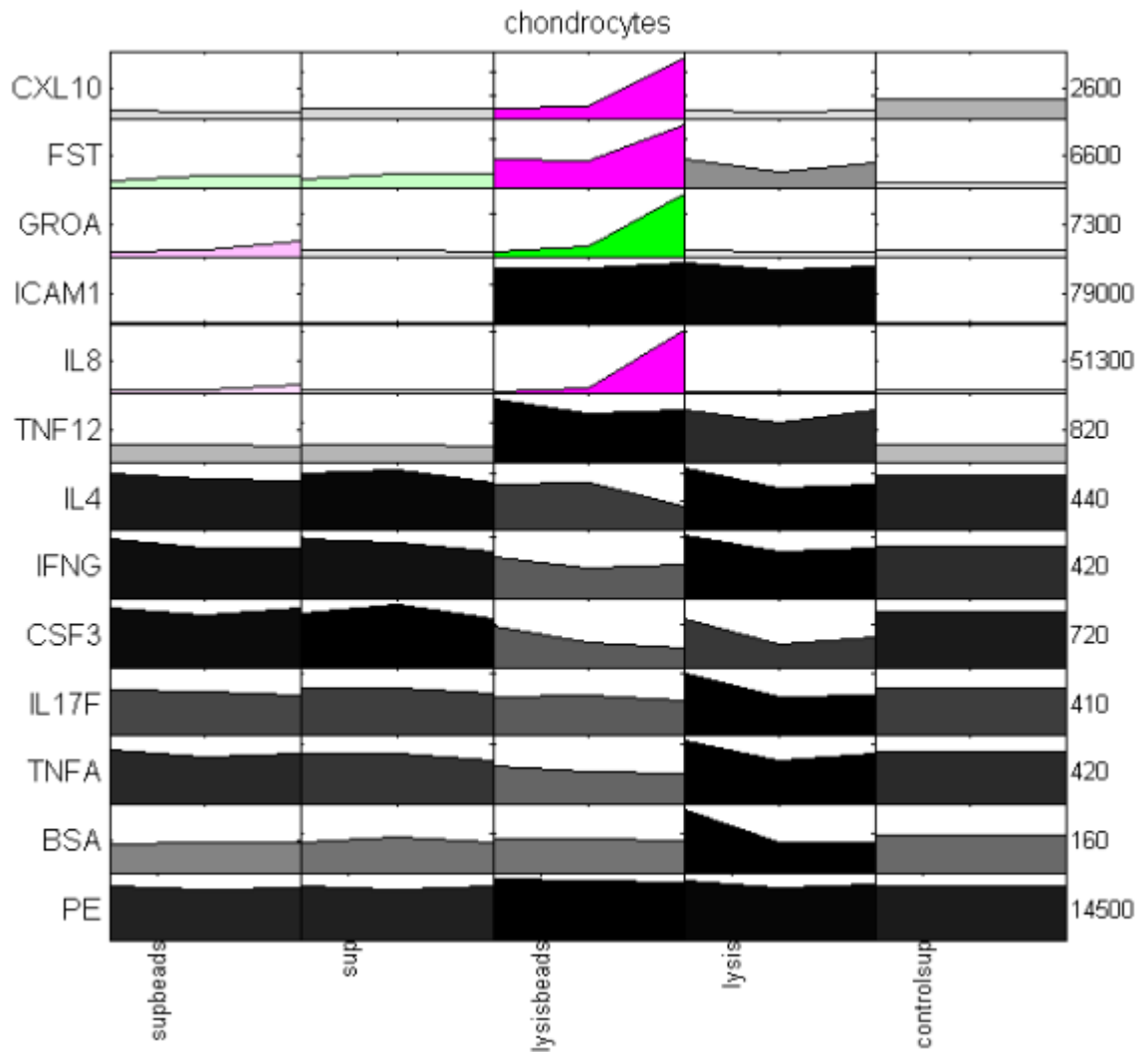
			IL4	GROA	IFNG	CSF3	IL8	IL17F	TNFA	ICAM1	FST	CXL10	TNF12	BSA	PE
sup with beads	HDF	30	438	896	396	773	1819	343	396	750.5	787.5	416	241	79	12420
		120	424	7664	404	684	6246	288	394	834	1842	372	213	78	12041
		240	459	53834	400	677	44575	301	381	1261	2407	560	254	89	11850
	Chondro	30	396	610	392	692	1583	293	354	779	689	347	231	74	12486
		120	356	747	327	604	1690	290	309	1069	1197	309	223	77	11985
		240	349	1818	328	686	6451	264	330	1338	1265	304	211	79	12367
sup	HDF	30	422	864	385	713	1922	316	356	820	941.5	455	240	79	12499
		120	388	10081	373	649	6736	295	346	912	2781	507	238	86	11768
		240	351	7847	315	614.5	7787	307	341	979	3218	480	211	75	12077
	Chondro	30	400	633	388	609	1625	306	328	853	870	408	236	79	12642
		120	425	774	373	724	1741	302	331	1053	1499	398	235	90	11687
		240	332	626	306	551	1645	268	290	1039	1506	404	213	77	12473
beads incubated with cells +then lysed	HDF	30	381	2498	395	407	3239	314	374	74819	15089	1708	3310	149	14448
		120	325	76536	310	394	66379	345	299	74553	21769	2090	3182	107	14261
		240	261	86741	297	416	120027	215.5	292	77943	28756	34890	2430	99	13598
	Chondro	30	315	463	268	466	949	242	252	72720	2971	430.5	823	89	14457
		120	333	1259	204	292	4194	261	208	70852	2876	530	636	86	13792
		240	166	7302	219	221	51251	220	204	79015	6624	2614	673	81	13584
Beads added on lysate	HDF	30	764	1831	712	740	2474	837	767	80860	13878	1234	2764.5	325	14061
		120	306	5928	326	333	5425	205	356	76098	11771	1148	1752	80	13696
		240	450	1731	469	550	4024	412	485	72455	10831	1102	1839	150	12772
	Chondro	30	437	642	416	564	910	406	419.5	77735	2916	337	686	163	14083
		120	296	473	309	263	817	249	291	69249	1667	251	501	78	12389
		240	321	532	333	343	896	254	335	73331	2539	334	685	80	13083
Control supernatant			380	634	343	649	1817	308	349	575	427	782	216	96	12887

**Πίνακας 3.4: Αποτελέσματα του LUMINEX για το τρίτο πείραμα μέτρησης υπερκείμενου και μέτρησης κοντά σε κύτταρα.**

Το DataRail της εικόνας 3.11 μας δείχνει τα αποτελέσματα για όλα τα timepoints για fibroblasts, ενώ αντίστοιχα η εικόνα 3.12 για χονδροκύτταρα. Πρέπει να αναφερθεί ότι ως supbeads ονομάζουμε τη περίπτωση A της παραγράφου 3.3.3. Αντίστοιχα sup είναι η περίπτωση C, lysisbeads η περίπτωση B και lysis η περίπτωση D. Το controlsup είναι η περίπτωση που μετράμε ότι περιλαμβάνει μέσα στο θρεπτικό υγρό.



Εικόνα 3.11: DataRail πειράματος για κύτταρα HDF και για timerpoint 30, 120 και 240 λεπτών



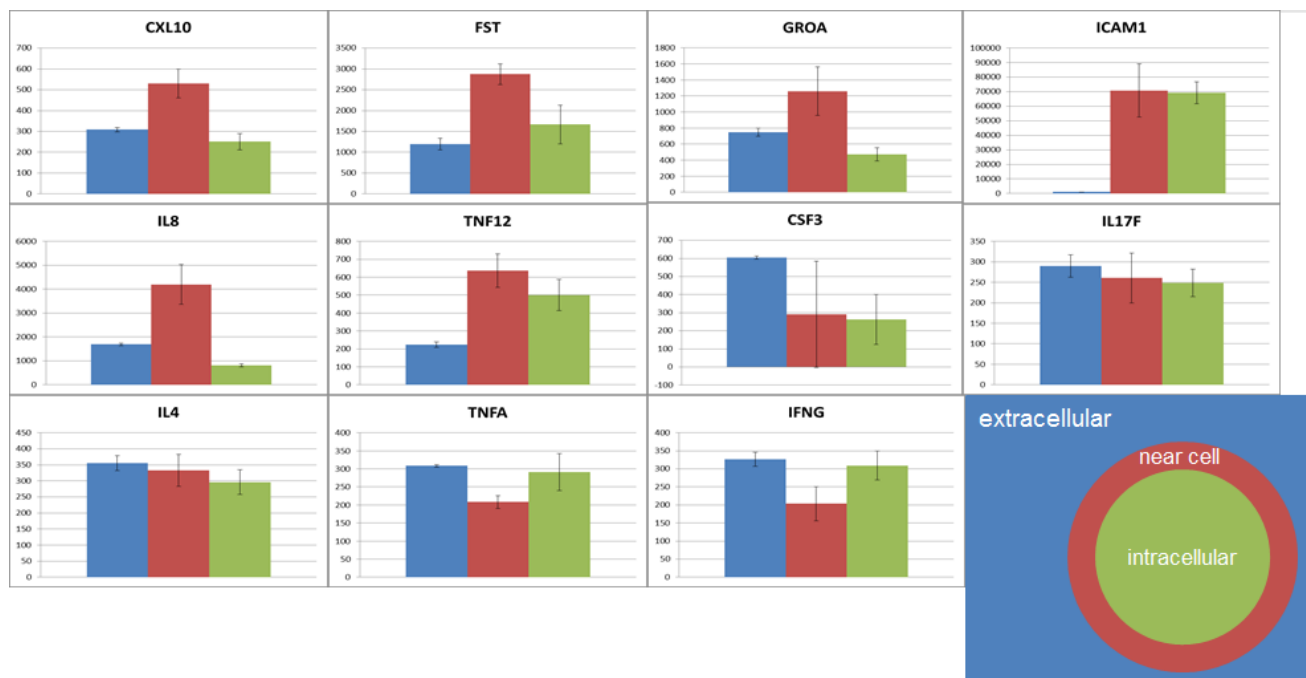
Εικόνα 3.12: DataRail πειράματος για κύτταρα χονδροκύτταρα και για timepoint 30, 120 και 240 λεπτών



Στην εικόνα 3.13 παρουσιάζονται όλα τα γραφήματα για το timepoint των 120 λεπτών για τα HDF. Επίσης στην εικόνα 3.14 παρουσιάζονται τα αντίστοιχα γραφήματα για τα χονδροκύτταρα.



Εικόνα 3.13: Γραφήματα στο timepoint 120' για HDF



Εικόνα 3.14: Γραφήματα στο timepoint 120' για χονδροκύτταρα

### 3.4.4 Συμπεράσματα

Παρατηρούμε επιλέγοντας στο excel, conditional formatting τα εξής (Πίνακας 3.4):

1. Όσο αυξάνονται τα timepoints, τόσο μεγαλώνει και η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα κύτταρα. Ενώ άλλες πρωτεΐνες έχουν περίπου σταθερά επίπεδα.
2. Για κάποιες πρωτεΐνες η απεικόνιση με conditional formatting δεν είναι ιδανική, διότι η διαφορά των τιμών μπορεί να είναι ελάχιστα διαφορετική, οπότε να μην έχει σημασία, αλλά χρωματικά αλλάζουν.

Από το DataRail του πειράματος για κύτταρα HDF παρατηρούμε τα εξής (Εικόνα 3.4):

1. Συγκρίνοντας την μέτρηση υπερκειμένου με μικροσφαιρίδια και χωρίς, ενώ δε θα έπρεπε να έχουν καμία διαφορά, παρατηρούμε ότι η GROA και η IL8 αυξάνονται για τα μεγαλύτερα timepoints, στο υπερκείμενο με τα beads. Θεωρούμε ότι μπορεί για κάποιο λόγο τα μικροσφαιρίδια μπορεί να ενεργοποιούν τα κύτταρα.
2. Όπως ήταν αναμενόμενο, οι CXL10, FST, GROA, ICAM1, IL8 και TNF12 ήταν πιο αυξημένες κοντά στο κύτταρο σε σχέση με το υπερκείμενο.

3. Οι CXL10, FST, GROA, IL8 και TNF12 βρίσκονται επίσης σε υψηλότερα επίπεδα κοντά στα κύτταρα, συγκριτικά με το εσωτερικό των κυττάρων και την επιφάνεια τους.
4. Η ICAM1 βρίσκεται στα ίδια επίπεδα μετρώντας πολύ κοντά στο κύτταρο και μετρώντας μόνο μέσα και πάνω στο κύτταρο. Συμπεραίνουμε ότι αυτή η πρωτεΐνη δεν εκκρίνεται, αλλά βρίσκεται μόνο στην επιφάνεια των κυττάρων και στο εσωτερικό τους.
5. Οι CSF3, IL17F, IL4, TNFA και IFNG, βρίσκονται σε σταθερά επίπεδα σε όλες τις μετρήσεις, κάτι το οποίο ήταν αναμενόμενο διότι δε θα έπρεπε η μέτρηση κοντά στο κύτταρο να βρίσκεται σε μεγαλύτερο επίπεδο.
6. Στη μέτρηση του lysate χωρίς μικροσφαιρίδια, για το BSA το οποίο είναι control και πρέπει να παραμένει σταθερό, υπάρχει κάποιο σφάλμα.

Από το DataRail του πειράματος για χονδροκύτταρα παρατηρούμε τα εξής:

1. Ισχύουν ακριβώς τα ίδια συμπεράσματα για χονδροκύτταρα και για HDF.
2. Στα χονδροκύτταρα οι τιμές του fluorescent intensity είναι αρκετά μικρότερες συγκριτικά με τα HDF για όλα τα timepoints. Από αυτή τη παρατήρηση μπορούμε να συμπεράνουμε ότι τα χονδροκύτταρα εκκρίνουν λιγότερες πρωτεΐνες σε σχέση με τα HDF, τουλάχιστον για τις πρωτεΐνες που εξετάστηκαν.
3. Οι CSF3, IL17F, IL4, TNFA και IFNG, βρίσκονται σε μεγαλύτερα επίπεδα στο υπερκείμενο συγκριτικά με τις μετρήσεις των lysates, το οποίο ήταν αναμενόμενο.

### **3.5 Πείραμα για δημιουργία καμπυλών βαθμονόμησης**

Για να μετατραπεί η ένταση φθορισμού σε ng/ml ή pg/ml είναι αναγκαίο να δημιουργηθούν καμπύλες βαθμονόμησης (Παράγραφος 2.9). Όπως έχει αναφερθεί για να δημιουργηθούν οι συγκεκριμένες καμπύλες πρέπει να γνωρίζουμε τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών σε ένα διάλυμα. Παράλληλα το rplex το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για την δημιουργία των καμπυλών βαθμονόμησης πρέπει να είναι το ίδιο με το οποίο έχουμε μετρήσει την έκκριση πρωτεϊνών από τα κύτταρα.

#### **3.5.1 Σκοπός του πειράματος**

Σκοπός του πειράματος είναι η δημιουργία καμπυλών βαθμονόμησης για τη μετατροπή της έντασης φθορισμού σε συγκέντρωση, για το 13plex του τρίτου πειράματος μέτρησης επιπέδων πρωτεΐνης κοντά στα κύτταρα. Θα δημιουργηθούν 3 καμπύλες βαθμονόμησης για κάθε σήμα. Η 1<sup>η</sup> θα είναι για Assay buffer, η 2<sup>η</sup> για Lysis buffer και η 3<sup>η</sup> για DMEM (θρεπτικό υγρό).

#### **3.5.2 Πειραματική διαδικασία**

Αρχικά φτιάχτηκαν ένα mix από standard πρωτεΐνες. Το συνολικό mix ποσότητας αποτελείται από πρωτεΐνες και assay buffer. Στο πίνακα 3.5 βλέπουμε τις ποσότητες του mix.

Standard Protein	Volume (μl)
CSF3	58.5
CXL10	58.5
FST	58.5
GROA	58.5
ICAM1	58.5
IFNG	58.5
IL17F	58.5
IL4	43.0
IL8	58.5
TNF12	58.5
TNFA	58.5
Assay buffer	22.0
<b>Total</b>	<b>650</b>

**Πίνακας 3.5: Standard mix πρωτεϊνών για τη δημιουργία καμπυλών βαθμονόμησης**

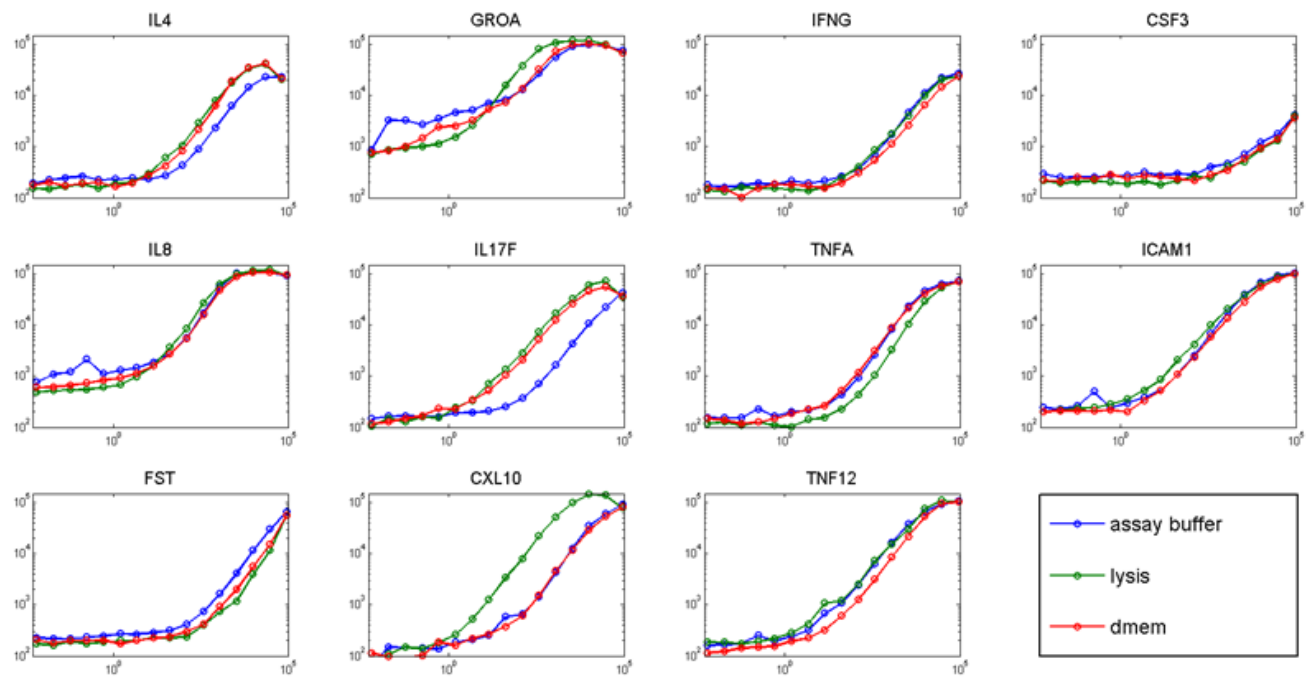
Τα βήματα του πειράματος είναι τα παρακάτω:

1. Προετοιμασία standard mix πρωτεϊνών.
2. Προσθέτουμε 300 μl standard mix σε ένα φρεάτιο μιας 96 well plate.
3. Προσθέτουμε 200 μl assay buffer σε ακόμα 15 φρεάτια.
4. Αναρροφάμε με τη πιπέτα 100 μl από το standard mix.
5. Αναδεύουμε κάνοντας up and down πολλές φορές με τη πιπέτα σε ένα φρεάτιο με assay buffer.
6. Αναρροφάμε με τη πιπέτα 100 μl από το φρεάτιο με το standard mix πρωτεϊνών και assay buffer.
7. Αναδεύουμε κάνοντας up and down πολλές φορές με τη πιπέτα στο επόμενο φρεάτιο με assay buffer.

8. Επαναλαμβάνουμε το βήμα 6-7 για όλα τα φρεάτια με assay buffer εκτός από το τελευταίο.
9. Προσθέτουμε 120 μl standard mix σε ένα φρεάτιο μιας 96 well plate.
10. Προσθέτουμε 80 μl lysis buffer σε ακόμα 15 φρεάτια.
11. Αναρροφάμε με τη πιπέτα 40 μl από το standard mix.
12. Αναδεύουμε κάνοντας up and down πολλές φορές με τη πιπέτα σε ένα φρεάτιο με lysis buffer.
13. Αναρροφάμε με τη πιπέτα 40 μl από το φρεάτιο με το standard mix πρωτεϊνών και lysis buffer.
14. Αναδεύουμε κάνοντας up and down πολλές φορές με τη πιπέτα στο επόμενο φρεάτιο με lysis buffer.
15. Επαναλαμβάνουμε το βήμα 13-14 για όλα τα φρεάτια με lysis buffer εκτός από το τελευταίο.
16. Προσθέτουμε 120 μl standard mix σε ένα φρεάτιο μιας 96 well plate.
17. Προσθέτουμε 80 μl DMEM σε ακόμα 15 φρεάτια.
18. Αναρροφάμε με τη πιπέτα 40 μl από το standard mix.
19. Αναδεύουμε κάνοντας up and down πολλές φορές με τη πιπέτα σε ένα φρεάτιο με DMEM.
20. Αναρροφάμε με τη πιπέτα 40 μl από το φρεάτιο με το standard mix πρωτεϊνών και DMEM.
21. Αναδεύουμε κάνοντας up and down πολλές φορές με τη πιπέτα στο επόμενο φρεάτιο με DMEM.
22. Επαναλαμβάνουμε το βήμα 13-14 για όλα τα φρεάτια με DMEM εκτός από το τελευταίο.

### 3.5.3 Αποτελέσματα

Οι καμπύλες βαθμονόμησης φαίνονται στην εικόνα 3.15:



Εικόνα 3.15: Καμπύλες βαθμονόμησης για 11 plex (fluorescent intensity to pg/ml)

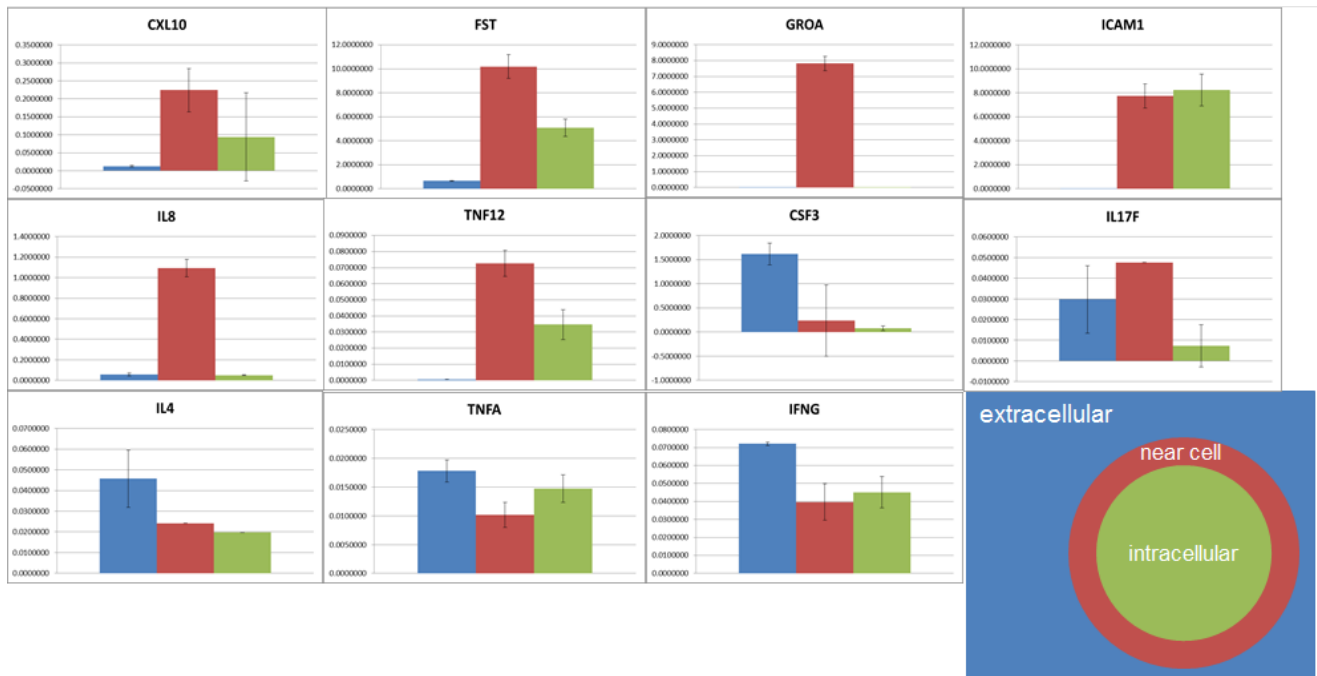
Στο παρακάτω πίνακα φαίνονται τα αποτελέσματα του τρίτου πειράματος σε ng/ml. Να παρατηρηθεί ότι σε όποιο κελί γράφει LLoD (Lower Limit of Detection) δεν μπορούν να δοθούν αποτελέσματα καθώς οι συγκεκριμένες τιμές βρίσκονται στο κατώτατο όριο στο οποίο η καμπύλη βαθμονόμησης δε μπορεί να διακρίνει διαφορά στην τιμή.

		IL4	GROA	IFNG	CSF3	IL8	IL17F	TNFA	ICAM1	FST	CXL10	TNF12	
sup with beads	HDF	30	0.0488270	LLoD	0.0692971	2.1960700	0.0103402	0.0469904	0.0179484	0.0124457	0.2006749	0.0158242	0.0007639
		120	0.0457582	0.0036139	0.0720824	1.6167952	0.0587647	0.0296988	0.0177895	0.0146649	0.6536030	0.0124427	0.0003864
		240	0.0532279	2.5381898	0.0706894	1.5705654	0.5166715	0.0335064	0.0167550	0.0260039	0.8978423	0.0283840	0.0009534
sup	HDF	30	0.0454393	LLoD	0.0652993	1.7966587	0.0117804	0.0381776	0.0147572	0.0142908	0.2657445	0.0190167	0.0007497
		120	0.0380235	0.0094902	0.0613098	1.4051113	0.0634391	0.0318210	0.0139553	0.0167594	1.0592567	0.0235255	0.0007214
		240	0.0299920	0.0039301	0.0413758	1.2068849	0.0733059	0.0355176	0.0135538	0.0185429	1.2481616	0.0211504	0.0003612
beads incubated with cells +then lysed	HDF	30	0.0366080	0.0000525	0.0687753	0.2729942	0.0279762	0.0377058	0.0161568	7.8337464	6.7031722	0.1689568	0.0761588
		120	0.0241351	7.8130751	0.0396780	0.2340752	1.0931922	0.0476425	0.0101700	7.7513938	10.2005017	0.2243924	0.0725989
		240	0.0090270	11.6174598	0.0352852	0.3041080	22.2069301	0.0097466	0.0096047	8.8733306	14.2588165	7.9909592	0.0521729
Beads added on lysate	HDF	30	0.1129444	0.0000139	0.1800124	1.9763165	0.0189664	0.2283565	0.0461533	9.9734050	6.1060182	0.1050535	0.0611362
		120	0.0197704	0.0014352	0.0451251	0.0802770	0.0507816	0.0072874	0.0147572	8.2433805	5.0920866	0.0941526	0.0346348
		240	0.0512432	0.0000108	0.0947993	0.8662263	0.0365267	0.0700167	0.0249419	7.1308759	4.6493429	0.0884280	0.0368451

**Πίνακας 3.6: Αποτελέσματα για το τρίτο πείραμα μέτρησης υπερκείμενου και μέτρησης κοντά σε κύτταρα σε ng/ml.**

Στην εικόνα 3.16 παρουσιάζονται όλα τα γραφήματα σε ng/ml, για το timepoint των 120 λεπτών για τα HDF, του τρίτου πειράματος μέτρησης επιπέδων πρωτεΐνης κοντά στα κύτταρα.





Εικόνα 3.13: Γραφήματα στο timepoint 120' για HDF σε ng/ml

### **3.6 Πείραμα χρήσης μικροσφαιριδίων ως ενεργοποιητές για τα κύτταρα**

Από τα συμπεράσματα του 3.4 πειράματος, προέκυψε ότι η GROA και η IL8 αυξάνονται για τα μεγαλύτερα timepoints, στο υπερκείμενο με τα μικροσφαιρίδια ενώ στο υπερκείμενο χωρίς τα μικροσφαιρίδια, βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα. Συνεπώς πρέπει να διευκρινιστεί αν τα μικροσφαιρίδια, όλα η κάποια από αυτά συζευγμένα με συγκεκριμένα αντισώματα ενεργοποιούν τα κύτταρα.

#### **3.6.1 Σκοπός του πειράματος**

Σκοπός του πειράματος είναι να διευκρινίσουμε αν τα μικροσφαιρίδια με αντισώματα ή χωρίς ενεργοποιούν την έκκριση κάποιων πρωτεϊνών.

#### **3.6.2 Πειραματική διαδικασία**

Στρώθηκαν 33000 HDF/φρεάτιο και αναπτύχθηκαν για 2 ημέρες. Στη συνέχεια αφού αλλάχθηκε το θρεπτικό υγρό και μπήκε φρέσκο. Στη συνέχεια από κάθε bead vial πήραμε 1 μl το οποίο περιέχει 5000 μικροσφαιρίδια. Συνολικά είχαμε 11 διαφορετικά μικροσφαιρίδια συζευγμένα με αντισώματα, 2 μικροσφαιρίδια συζευγμένα με PE και BSA και μικροσφαιρίδια τα οποία δεν είναι συζευγμένα. Επίσης επειδή τα μικροσφαιρίδια μέσα στα vials τους περιέχουν storage buffer και δεν γνωρίζουμε αν το storage buffer επηρεάζει άμεσα τα κύτταρα σε μικρή ποσότητα καθώς αποτελείται από 0.5% sodium azide, χρησιμοποιήσαμε 1 μl storage buffer ως stimulus. Στο πίνακα 3.7 φαίνονται συνολικά τα stimuli που χρησιμοποιήθηκαν. Το πείραμα έγινε με triplicates.

Stimuli
CSF3 bead
CXL10 bead
FST bead
GROA bead
ICAM1 bead
IFNG bead
IL17F bead
IL4 bead
IL8 bead
TNF12 bead
TNFA bead
PE bead
BSA bead
Uncoupled bead
Storage buffer

**Πίνακας 3.5: Beads που χρησιμοποιήθηκαν για να αποδειχθεί αν ενεργοποιούν τα κύτταρα**

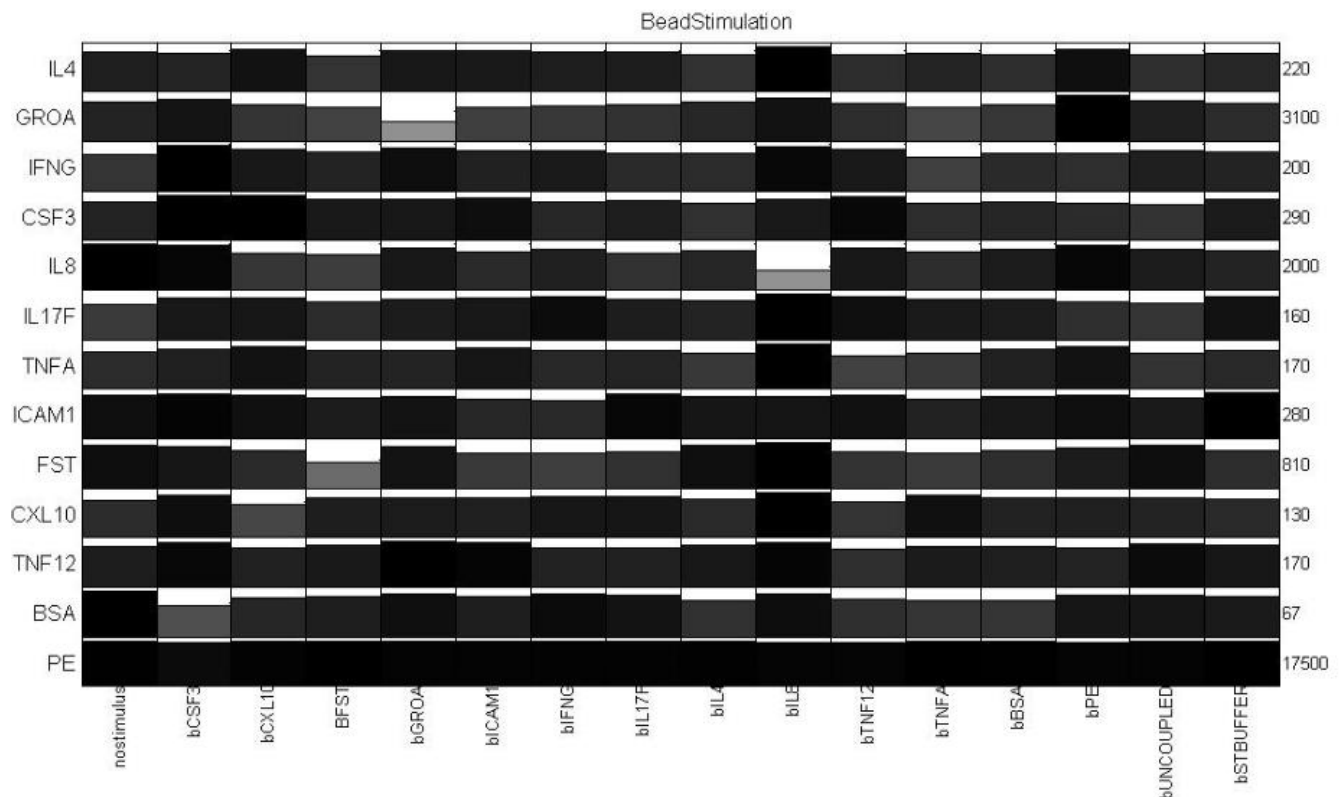
Τα βήματα του πειράματος είναι τα παρακάτω:

1. Αφαιρούμε το υπερκείμενο από τα κύτταρα.
2. Προσθέτουμε 200 μl φρέσκο θρεπτικό σε κάθε φρεάτιο.
3. Προσθέτουμε 1 μl/φρεάτιο από κάποιο 1<sup>ο</sup> stimulus του πίνακα 3.5 σε 3 φρεάτια με κύτταρα.
4. Επαναλαμβάνουμε το βήμα 3 για όλα τα stimuli. Δεν βάζουμε ποτέ παραπάνω από ένα stimulus σε ένα φρεάτιο.
5. Τοποθετούμε τη πλάκα με τα κύτταρα στον incubator και την αφήνουμε για 2 ώρες.
6. Εφαρμόζουμε τη διαδικασία Sandwich ELISA της παραγράφου 2.3.

### 3.6.3 Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 3.14. Να αναφερθεί ότι στον άξονα x φαίνονται όλα τα stimuli που χρησιμοποιήθηκαν. Το nonstimulus είναι το control που χρησιμοποιήθηκε στο οποίο δε χρησιμοποιήθηκε κανένα stimulus οπότε μας δείχνει την έκκριση των κυττάρων για τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες.

Στον άξονα y αριστερά φαίνονται όλα τα σήματα που μετρήθηκαν, ενώ δεξιά η μέγιστη τιμή της μέτρησης για κάθε σήμα.



Εικόνα 3.14: DataRail πειράματος ενεργοποίησης κυττάρων με μικροσφαιρίδια

### 3.6.4 Συμπεράσματα

Από το DataRail τα συμπεράσματα που προκύπτουν είναι τα παρακάτω:

1. Τα μικροσφαιρίδια ανεξάρτητα αν είναι συζευγμένα ή όχι δεν φαίνεται να επηρεάζουν τα κύτταρα.
2. Τα σήματα GROA, IL8, FST και CXL10 φαίνεται να έχουν χαμηλότερα επίπεδα για το ίδιο αντίστοιχο μικροσφαιρίδιο που χρησιμοποιήθηκε ως stimulus. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο ότι, εκκρίθηκε η ίδια ποσότητα πρωτεΐνης με το control αλλά κόλλησε στα αντισώματα των μικροσφαιριδίων.

#### 4 Συμπεράσματα – Συζήτηση

Από τα πειράματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας προέκυψε ότι η μέθοδος με τους 3D printed κυλίνδρους είναι μέθοδος που λειτουργεί και δίνει αποτελέσματα ίδια με αυτά της ELISA, όμως δεν θεωρείται μέτρηση κοντά στα κύτταρα, διότι αφενός η επιφάνεια που συγκρατεί τα μικροσφαιρίδια έχει μεγάλη απόσταση από τα κύτταρα, αφετέρου είναι δύσκολο να κατασκευαστεί κύλινδρος στον τρισδιάστατο εκτυπωτή με τις επιθυμητές διαστάσεις διότι δεν έχει μεγάλη ακρίβεια ο εκτυπωτής.

Από τα πειράματα μέτρησης πρωτεϊνών κοντά στην κυτταρική επιφάνεια χρησιμοποιώντας lysis buffer προκύπτει ότι όσο περνάει η ώρα η τιμή σε MFI (Median Fluorescent Intensity) που θα δώσουν τα μικροσφαιρίδια αυξάνεται, ανεξαρτήτως αν έχουν χρησιμοποιηθεί stimuli ή όχι στα κύτταρα. Στη συνέχεια σε σύγκριση με την bead-based ELISA, παρατηρήθηκε ότι κάποιες πρωτεΐνες έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση κοντά στην επιφάνεια των κυττάρων σε σχέση με την ELISA ενώ κάποιες άλλες έχουν μικρότερη συγκέντρωση. Σε κάθε περίπτωση όμως πρέπει να γίνεται παράλληλα μέτρηση των ίδιων πρωτεϊνών, σε ίδιο είδος και αριθμό κυττάρων, στην επιφάνεια και το εσωτερικό τους με τη μέθοδο που περιγράφεται στη παράγραφο 3.3 έτσι ώστε να είναι γνωστό ότι η πρωτεΐνη που μετρούνται είναι όντως εξωκυτταρικές και όχι στο εσωτερικό ή την επιφάνεια των κυττάρων. Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι κάνοντας ELISA, στο υπερκείμενο τους οποίου τα κύτταρα είχαν μικροσφαιρίδια στην επιφάνεια τους και ταυτόχρονα στο υπερκείμενο με ίδιο είδος και αριθμό κυττάρων αλλά χωρίς μικροσφαιρίδια στην επιφάνεια τους, η πρωτεΐνη GROA και η IL8 βρέθηκαν αρκετά αυξημένες στο πρώτο. Έτσι σε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν όλων των ειδών τα μικροσφαιρίδια ,συζευγμένα με αντισώματα ή μη, για να διευκρινιστεί αν αυτά ενεργοποιούν τα κύτταρα, οπότε προέκυψε ότι δεν τα ενεργοποιούν καθώς η ELISA έδωσε σταθερά αποτελέσματα ακόμα και στα κύτταρα, στα οποία είχαν μικροσφαιρίδια στην επιφάνεια τους και σε κύτταρα που δεν είχαν. Τέλος πρέπει να αναφερθεί ότι σε όλα τα πειράματα πρέπει να μετριέται με ELISA μόνο το θρεπτικό χωρίς να έχουν καλλιεργηθεί κύτταρα σε αυτό, έτσι ώστε να γνωρίζει ο πειραματιστής τα επίπεδα των πρωτεϊνών που περιέχει από μόνο του και σε κάθε περίπτωση πόση πρωτεΐνη έχουν εκκρίνει τα κύτταρα.

Από τη βιβλιογραφία προέκυψε ότι από τις πρωτεΐνες που βρέθηκαν με υψηλά επίπεδα κοντά στην κυτταρική επιφάνεια, η CXL10, GROA και IL4 σχετίζονται με αυτοκρινή συμπεριφορά σε διαφορετικά είδη κυττάρων<sup>5-7</sup>. Στη παρούσα εργασία για να βεβαιωθεί κάποιος ότι όντως οι πρωτεΐνες που βρέθηκαν να έχουν υψηλή συγκέντρωση κοντά στην επιφάνεια των κυττάρων είναι αυτοκρινείς, πρέπει να εφαρμοστεί RT-PCR και να βρεθεί η έκφραση των υποδοχέων αυτών των πρωτεϊνών στο mRNA των κυττάρων, ενώ δεν πρέπει να βρεθεί η έκφραση των υποδοχέων των άλλων πρωτεϊνών που βρέθηκαν με μικρή συγκέντρωση γύρω από την επιφάνεια των κυττάρων.

Συμπερασματικά η παρούσα εργασία αποτελεί μια καινοτόμο προσέγγιση για τον έλεγχο της συγκέντρωσης εκκρινόμενων πρωτεϊνών σε κοντινή απόσταση από τα κύτταρα, καθώς και ένα πιθανό τρόπο ποσοτικοποίησης του αυτοκρινούς σήματος των κυττάρων. Περαιτέρω πειραματική σχεδίαση, μελέτη και έλεγχος μπορούν να θέσουν τη βάση για έναν πιο αντιπροσωπευτικό τρόπο εκτίμησης της αυτοκρινούς σηματοδότησης, σε σχέση με τις κυρίαρχες προσεγγίσεις.

## 5 Βιβλιογραφία

1. Schlange T, Matsuda Y, Lienhard S, Huber A, Hynes NE. Autocrine WNT signaling contributes to breast cancer cell proliferation via the canonical WNT pathway and EGFR transactivation. *Breast Cancer Res.* 2007;9(5):R63. doi:10.1186/bcr1769.
2. Kenney-Herbert EM, Ball SLR, Al-Mayhany TMF, Watts C. Glioblastoma cell lines derived under serum-free conditions can be used as an in vitro model system to evaluate therapeutic response. *Cancer Lett.* 2011;305(1):50-57. doi:10.1016/j.canlet.2011.02.025.
3. Copland IB, Jolicoeur EM, Gillis M-A, et al. Coupling erythropoietin secretion to mesenchymal stromal cells enhances their regenerative properties. *Cardiovasc Res.* 2008;79(3):405-415. doi:10.1093/cvr/cvn090.
4. Saez-Rodriguez J, Goldsipe A, Muhlich J, et al. Flexible informatics for linking experimental data to mathematical models via DataRail. *Bioinformatics.* 2008;24(6):840-847. doi:10.1093/bioinformatics/btn018.
5. Ichikawa A, Kuba K, Morita M, et al. CXCL10-CXCR3 enhances the development of neutrophil-mediated fulminant lung injury of viral and nonviral origin. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187(1):65-77. doi:10.1164/rccm.201203-0508OC.
6. Nanney LB, Mueller SG, Bueno R, Peiper SC, Richmond a. Distributions of melanoma growth stimulatory activity of growth-regulated gene and the interleukin-8 receptor B in human wound repair. *Am J Pathol.* 1995;147(5):1248-1260.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1869526&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.



7. Bouffi C, Rochman M, Zust CB, et al. IL-33 markedly activates murine eosinophils by an NF- $\kappa$ B-dependent mechanism differentially dependent upon an IL-4-driven autoinflammatory loop. *J Immunol.* 2013;191(8):4317-4325. doi:10.4049/jimmunol.1301465.