



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ, ΗΛΕΚΤΡΟΟΠΤΙΚΗΣ

ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ ΟΠΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ

***ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΑΛΓΟΡΙΘΜΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΩΝ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ***

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

της **ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΤΡΙΚΟΥΡΑΚΗ**

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΔΙΔΩ ΓΙΟΥΒΑ

ΑΘΗΝΑ, ΑΠΡΙΛΙΟΣ 2024



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ, ΗΛΕΚΤΡΟΟΠΤΙΚΗΣ

ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ ΟΠΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΛΓΟΡΙΘΜΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΚΑΡΙΑΓΓΕΙΑΚΩΝ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

της **ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗΣ ΤΡΙΚΟΥΡΑΚΗ**

Διπλωματούχου Χημικού Μηχανικού Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου και Διπλωματούχου
Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Τεχνο-οικονομικά Συστήματα»
Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου

Συμβουλευτική Επιτροπή: Διδώ Γιόβα, Ομότιμη Καθηγήτρια Ε.Μ.Π. (επιβλέπουσα)
Γεώργιος Σταματάκος, Καθηγητής Έρευνας ΕΠΙΣΕΥ Ε.Μ.Π.
Μιχάλης Ράλλης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

Εγκρίθηκε από την επταμελή εξεταστική επιτροπή την 17^η Απριλίου 2024.

Δ. Γιόβα

Γ. Σταματάκος

Μ. Ράλλης

Ομότιμη Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Καθηγητής Έρευνας ΕΠΙΣΕΥ Ε.Μ.Π.

Αν. Καθηγητής ΕΚΠΑ

Κ. Πολιτόπουλος

Α. Μπουντουβής

Αν. Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Γ. Ματσόπουλος

Χ. Μανόπουλος

Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Επ. Καθηγητής Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ, ΑΠΡΙΛΙΟΣ 2024

Αικατερίνη Τρικούρακη

Διπλωματούχος Χημικός Μηχανικός Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου (2012)

Διπλωματούχος Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών

«Τεχνο-οικονομικά Συστήματα» Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου (2015)

Διδάκτωρ Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών Ε.Μ.Π. (2024)

Copyright © Αικατερίνη Τρικούρακη 2024

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ' ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα.

Ερωτήματα που αφορούν στη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς τον συγγραφέα.

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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο στόχος ήταν να αξιολογηθούν οι βιοδείκτες μεταξύ συμπτωματικών και ασυμπτωματικών ασθενών και να κατασκευαστεί ένας αλγόριθμος ταξινόμησης και παλινδρόμησης (CART) για τη διάκρισή τους.

Για αυτό το λόγο συμμετείχαν 136 ασθενείς. Αυτοί ήταν συμπτωματικοί (υψηλού κινδύνου) (N=82, βαθμός στένωσης $\geq 50\%$, αποδεδειγμένο ότι συνέβη ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο τους τελευταίους έξι μήνες) και ασυμπτωματικοί (χαμηλού κινδύνου) (N=54, βαθμός στένωσης $\leq 50\%$). Μετρήθηκαν τα επίπεδα του Ινωδογόνου, της Μεταλλοπρωτεΐνης-1 (MMP-1), του Αναστολέα ιστού της μεταλλοπρωτεΐνης-1 (TIMP-1), του Διαλυτού διακυτταρικού μορίου προσκόλλησης (SiCAM), του Διαλυτού μορίου προσκόλλησης αγγειακού κυττάρου (SvCAM), της Αδιπονεκτίνης και της Ινσουλίνης στην πλατφόρμα Lumiplex 3D και αξιολογήθηκαν οι διαφορές τους. Στη συνέχεια δημιουργήθηκε και αξιολογήθηκε ένα μοντέλο CART.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα, όλοι οι μετρούμενοι βιοδείκτες, εκτός από την Αδιπονεκτίνη, εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα σε συμπτωματικούς ασθενείς. Το κατασκευασμένο προγνωστικό μοντέλο CART είχε 97,6% ακρίβεια διάκρισης σε συμπτωματικούς ασθενείς και 79,6% σε ασυμπτωματικούς, ενώ η συνολική ακρίβεια ήταν 90,4%. Επιπλέον, ο πληθυσμός χωρίστηκε σε σετ εκπαίδευσης και δοκιμών για επικύρωση του CART.

Συμπερασματικά, βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στους βιοδείκτες μεταξύ συμπτωματικών και ασυμπτωματικών ασθενών. Το μοντέλο CART αποδείχθηκε ότι είναι ένας απλός αλγόριθμος λήψης αποφάσεων που συνδέεται με τις πιθανότητες κινδύνου και παρείχε στοιχεία για τον εντοπισμό και ως εκ τούτου τη θεραπεία ασθενών που διατρέχουν υψηλό κίνδυνο για καρδιαγγειακή νόσο.

Λέξεις κλειδιά

Αθηροσκλήρωση, αθηρωματική πλάκα, βιοδείκτες, δένδρα ταξινόμησης και παλινδρόμησης (CART), προγνωστικό μοντέλο

ABSTRACT

The objective was to assess biomarkers between symptomatic vs. asymptomatic patients, and to construct a classification and regression tree (CART) algorithm for their discrimination.

For that reason 136 patients were enrolled. They were symptomatic (high risk) (N=82, stenosis degree $\geq 50\%$, proven to be responsible for ischemic stroke the last six months) and asymptomatic (low risk) (N=54, stenosis degree $\leq 50\%$). Levels of Fibrinogen, matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), soluble intercellular adhesion molecule (SiCAM), soluble vascular cell adhesion molecule (SvCAM), Adiponectin and Insulin were measured on a Luminex 3D platform and their differences were evaluated; subsequently a CART model was created and evaluated.

As far as the results concerned all measured biomarkers, except Adiponectin, had significantly higher levels in symptomatic patients. The constructed CART prognostic model had 97.6% discrimination accuracy on symptomatic patients and 79.6% on asymptomatic, while the overall accuracy was 90.4%. Moreover the population was split into training and test sets for CART validation.

To conclude significant differences were found in the biomarkers between symptomatic and asymptomatic patients. The CART model proved to be a simple decision making algorithm linked with risk probabilities and provided evidence to identify and therefore treat patients being at high risk for cardiovascular disease.

Key words

Atherosclerosis, atherosclerotic plaque, biomarkers, classification and regression trees (CART), prognostic model

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής της Σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Ηλεκτρονικών Υπολογιστών του ΕΜΠ, υπό την επίβλεψη της ομότιμης Καθηγήτριας κ. Διδούς Γιόβα.

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ομότιμη Καθηγήτρια και Ιδρύτρια του Εργαστηρίου Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής κ. Διδώ Γιόβα για την ευκαιρία που μου έδωσε αναθέτοντάς μου το θέμα της Διδακτορικής Διατριβής και εντάσσοντάς με στο δυναμικό του εργαστηρίου. Αισθάνομαι ιδιαίτερα ευγνώμων, για την προσπάθεια που κατέβαλε ώστε να μου παρέχει τα μέσα και τους πόρους για την υλοποίηση της έρευνας.

Οφείλω θερμές ευχαριστίες στον Καθηγητή Έρευνας του ΕΠΙΣΕΥ και της Σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών του ΕΜΠ κ. Γιώργο Σταματάκο, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για τις χρήσιμες συμβουλές, τις ουσιαστικές παρατηρήσεις, αλλά και για την υποστήριξη καθόλη τη διάρκεια της διατριβής.

Ανάλογες θερμές ευχαριστίες θεωρώ ότι οφείλω και στον Αναπληρωτή Καθηγητή της Φαρμακευτικής Σχολής Αθηνών κ. Μιχάλη Ράλλη, μέλος της τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης, με τον οποίο είχα την ευκαιρία να συνεργαστώ.

Με συναίσθημα ιδιαίτερης ευγνωμοσύνης απευθύνομαι στον τέως Πρύτανη και Καθηγητή της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ κ. Ανδρέα Μπουντουβή, ο οποίος πίστεψε σε εμένα, δέχθηκε να είναι μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής και υποστήριξε αμέριστα το ερευνητικό μου έργο όλα αυτά τα χρόνια.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θεωρώ ότι οφείλω και στον Καθηγητή ΕΜΠ κ. Κ. Πολιτόπουλο ο οποίος με προθυμία δέχτηκε να είναι μέλος της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, καθώς επίσης και στον Καθηγητή ΕΜΠ κ. Γ. Ματσόπουλο, οι συμβουλές του οποίου αποτέλεσαν καθοριστικό παράγοντα για την ολοκλήρωση της διατριβής μου, και τέλος, στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Χ. Μανόπουλο, ο οποίος ένθερμα αποδέχτηκε την πρόταση να βρίσκεται στην επταμελή εξεταστική μου επιτροπή.

Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω και όλους εκείνους που μου παρείχαν τα μέσα και την υποδομή για την υλοποίηση των πειραματικών εργασιών της Διδακτορικής Διατριβής. Επομένως, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δρ. Άρη Σπάθη, Υπεύθυνο του Εργαστηρίου Κυτταρολογίας στο Ερευνητικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Αττικών», για την πολύτιμη βοήθειά του, ως προς την εκμάθηση της τεχνολογίας που χρησιμοποίησα για το διδακτορικό μου, για τις συμβουλές που μου παρείχε, ώστε να βελτιώνεται η κάθε λεπτομέρεια, καθώς επίσης και για τη βοήθεια που μου παρείχε στην ανάλυση των αποτελεσμάτων. Επιπλέον, ιδιαίτερα θερμές ευχαριστίες οφείλω και σε ένα άλλο μέλος του Εργαστηρίου Κυτταρολογίας τον Δρ. Αβραάμ Πουλιάκη, ο οποίος με την υπομονή και με τις γνώσεις του στο υπολογιστικό κομμάτι, στάθηκε δίπλα μου και συνέβαλε στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων με τον καλύτερο δυνατό τρόπο. Με συναίσθημα ιδιαίτερης ευγνωμοσύνης απευθύνομαι στον θανόντα Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής Αθηνών κ. Πέτρο Καρακίτσο, με τον οποίο είχα την τύχη να έρθω σε επαφή, μέσω της συνεργασίας μας στο Ερευνητικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «Αττικών». Οι συμβουλές του, η υποστήριξή του, και η εμπιστοσύνη του στο πρόσωπό μου, ήταν πολύ σημαντικοί παράγοντες για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Θα πρέπει επιπρόσθετα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής για την ηθική τους συμπαράσταση, την ουσιαστική επικοινωνία και τις χρήσιμες συμβουλές τους, όλα αυτά τα χρόνια της διατριβής μου. Ανάμεσα σε αυτά τα μέλη ξεχωρίζουν η Δρ. Ελένη Αλεξανδράτου, καθώς επίσης και ο Σπύρος Θύμης.

Περαιτέρω, ευχαριστώ τους Διδάκτορες ΕΜΠ κ. Ανδρέα Στυλιανού, κ. Στυλιανό-Βασίλειο Κοντομάρη, κ. Γιώργο Μπαλογιάννη, κ. Αναστάσιο Γεωργακόπουλο, κα. Κυριακή Σαμπάνη για την άριστη συνεργασία που είχαμε και το ευχάριστο κλίμα που φρόντισαν να υπάρχει στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους δικούς μου ανθρώπους. Όλα τα μέλη της οικογένειάς μου, από τους γονείς μου και την αδερφή μου, καθώς και τον σύζυγό μου τον Νίκο, ο οποίος στάθηκε δίπλα μου στήριγμα σε όλες τις δυσκολίες και τα εμπόδια που τελικά ξεπεράστηκαν, κατά την εκπόνηση αυτής της διατριβής, όπως επίσης και την οικογένειά του. Όλοι, με τον τρόπο τους και από τη μεριά τους, προσέφεραν αμέριστη στήριξη, βοήθεια και φυσικά αγάπη. Ήταν δίπλα μου σε όλες τις ευχάριστες, αλλά και δύσκολες στιγμές και μου έδιναν ώθηση να συνεχίσω τις σπουδές μου. Τους ευχαριστώ όλους για ό,τι έχουν κάνει για εμένα όλα αυτά τα χρόνια.

Αικατερίνη Τρικούρακη,

Ζωγράφου-Αθήνα

Απρίλιος 2024

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	VI
ABSTRACT.....	VII
ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	VIII
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	X
A: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
B: ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ.....	3
B.1 ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΡΩΤΙΔΙΚΗ ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ – ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΟΙ ΜΕ ΤΗΝ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΗ ΠΛΑΚΑ	3
B.1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	3
B.1.2 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΗΣ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΤΙΚΗΣ ΚΑΡΩΤΙΔΙΚΗΣ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗΣ ΣΤΕΝΩΣΗΣ	9
B.1.3 ΕΞΩΚΡΑΝΙΑΚΗ – ΕΝΔΟΚΡΑΝΙΑΚΗ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ	11
B.1.4 ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΟ ΕΠΕΙΣΟΔΙΟ	13
B.1.5 ΙΣΧΑΙΜΙΚΟ - ΕΜΒΟΛΙΚΟ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΟ ΕΠΕΙΣΟΔΙΟ	13
B.1.6 ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥΣ.....	15
B.1.7 ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΟΙ ΜΕ ΤΗΝ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΗ ΠΛΑΚΑ	18
B.1.8 ΒΙΟΔΕΙΚΤΗΣ ΑΔΙΠΟΝΕΚΤΙΝΗ (ADIPONECTIN).....	18
B.1.9 ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΕΣ ΚΑΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΙΣΤΟΥ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗΣ (METALLOPROTEINASES/MMPS-1, MMPS-2, MMPS-7, MMPS-9 & TISSUE INHIBITORS OF METALLOPROTEINASE/TIMP-1, TIMP-2).....	19
B.1.10 ΒΙΟΔΕΙΚΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ.....	22
B.1.11 ΒΙΟΔΕΙΚΤΗΣ ΙΝΩΔΟΓΟΝΟ (FIBRINOGEN).....	23
B.1.12 ΒΙΟΔΕΙΚΤΗΣ ΔΙΑΛΥΤΟ ΔΙΑΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΜΟΡΙΟ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΤΟ ΜΟΡΙΟ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ ΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ (SOLUBLE AΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΤΡΙΚΟΥΡΑΚΗ.....	x

INTERCELLULAR ADHESION MOLECULE/SICAM-1 & SOLUBLE VASCULAR CELL ADHESION MOLECULE/SVCAM-1)	25
Γ: ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΙΧΝΗΘΕΤΩΝ	27
Γ.1 ΠΡΩΤΑΡΧΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	27
Γ.1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	27
Γ.1.2 ΡΑΔΙΟΑΝΟΣΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ	27
Γ.1.3 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ.....	29
Γ.1.4 ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ (MICROARRAYS).....	29
Γ.1.5 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ.....	31
Γ.1.6 ΜΕΘΟΔΟΣ ELISA.....	31
Γ.1.7 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ.....	34
Γ.1.8 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ (FLOW CYTOMETRY).....	34
Γ.1.9 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ.....	36
Γ.1.10 ΘΕΜΑΤΑ ΠΡΟΣ ΕΠΙΛΥΣΗ	36
Δ: ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ.....	38
Δ.1 ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΕΣ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙΣ	38
Δ.1.1 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΠΟΥ ΑΦΟΡΑ ΣΕ ΠΟΛΛΑΠΛΕΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ.....	38
Δ.1.2 ΓΡΑΜΜΙΚΗ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗ	38
Δ.1.3 ΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗ	39
Δ.1.4 ΛΟΓΙΣΤΙΚΗ 4-ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ (4PL).....	39
Δ.1.5 ΛΟΓΙΣΤΙΚΗ 5-ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ (5PL).....	40
Δ.1.6 4PL – 5PL ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗ	41
Δ.1.7 ΓΡΑΜΜΙΚΗ Ή ΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗ	41
Δ.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΛΗΣ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗΣ	43
Δ.2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	43
Δ.2.2 ΥΠΟΘΕΣΕΙΣ – ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΟΥ ΚΟΛΜΟΓΟΡΟV-SMIRNOV TEST	43
ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΤΡΙΚΟΥΡΑΚΗ	xi

Δ.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΔΥΟ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ, ΠΟΥ ΑΚΟΛΟΥΘΟΥΝ/ΔΕΝ ΑΚΟΛΟΥΘΟΥΝ ΚΑΝΟΝΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ	46
Δ.3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	46
Δ.3.2 ΥΠΟΘΕΣΕΙΣ – ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΟΥ MANN WHITNEY U ΤΕΣΤ	46
Δ.3.3 ΥΠΟΘΕΣΕΙΣ – ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΟΥ INDEPENDENT-SAMPLES T ΤΕΣΤ	47
Δ.4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΘΕΩΡΗΣΗ	49
Δ.4.1 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ	49
Δ.5 ΔΕΝΔΡΑ ΑΠΟΦΑΣΗΣ - ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ ΚΑΙ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗΣ	50
Δ.5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	50
Δ.5.2 ΔΕΝΔΡΑ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ	50
Δ.5.3 ΔΕΝΔΡΑ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗΣ	53
Δ.5.4 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΔΕΝΔΡΩΝ ΑΠΟΦΑΣΗΣ	54
Δ.6 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΘΕΩΡΗΣΗ	56
Δ.6.1 ΔΕΝΔΡΟ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ ΚΑΙ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗΣ (CART)	56
Ε: ΠΟΛΛΑΠΛΗ (MULTIPLEX) ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ	57
Ε.1 ΑΡΧΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	57
Ε.1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	57
Ε.1.2 ΜΙΚΡΟΣΦΑΙΡΙΔΙΑ	58
Ε.1.3 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟ	60
Ε.1.4 ΣΥΣΚΕΥΗ ΑΝΑΓΝΩΣΗΣ ΠΛΑΚΑΣ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗΣ ΠΟΥ ΕΛΕΓΧΕΙ ΤΟ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟ ΑΠΟΚΤΗΣΗΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	62
Ε.1.5 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ	70
Ε.1.6 ΕΠΙΛΥΣΗ ΘΕΜΑΤΩΝ	72
ΣΤ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	73
ΣΤ.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	73
ΣΤ.1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	73

ΣΤ.1.2 ΑΣΘΕΝΕΙΣ.....	73
ΣΤ.1.3 ΥΛΙΚΑ-ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ	74
ΣΤ.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	82
ΣΤ.2.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	82
Ζ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	89
Η. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	91
Θ. ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	92
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ ΣΕ ΔΙΕΘΝΕΣ ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ	93
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	94

Α: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο σκοπός της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής είναι διττός. Αφενός, να αξιολογηθούν τα επίπεδα διαφόρων πρωτεϊνών που σχετίζονται με την αθηρωματική πλάκα και, αφετέρου, να δημιουργηθεί και να εκτιμηθεί ένα προγνωστικό μοντέλο για τον διαχωρισμό των μελετούμενων ομάδων πληθυσμού. Ο αρχικός πληθυσμός αποτελείτο από 136 ασθενείς, οι οποίοι διαχωρίστηκαν σε δύο ομάδες: τους συμπτωματικούς (αριθμός ασθενών: 82), οι οποίοι εμφανίζουν στένωση στην καρωτίδα σε βαθμό μεγαλύτερο του 50% και επιπρόσθετα είναι αποδεδειγμένο ότι το τελευταίο εξάμηνο η στένωση αυτή ήταν υπεύθυνη για ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο και τους ασυμπτωματικούς (αριθμός ασθενών: 54), η στένωση των οποίων είναι μικρότερη από 50%.

Ως προς τον πρώτο στόχο, οι πρωτεΐνες που μελετήθηκαν, με τη βοήθεια μιας νέας τεχνολογίας που συνδυάζει την κυτταρομετρία ροής και τα μικροσφαιρίδια, ανήκουν σε διάφορες κατηγορίες και, ειδικότερα, μελετήθηκε η Αδιπονεκτίνη (Adiponectin) που αφορά στην ενδοκρινολογία, η Μεταλλοπρωτεϊνάση-1 (MMP-1) και ο Αναστολέας ιστού μεταλλοπρωτεϊνάσης-1 (TIMP-1) που σχετίζονται με την ανοσολογία, ο βιοδείκτης του μεταβολισμού Ινσουλίνη (Insulin) και η έρευνα ολοκληρώθηκε με τους καρδιαγγειακούς βιοδείκτες Ινωδογόνο (Fibrinogen), Διαλυτό διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης-1 (SiCAM-1) και Διαλυτό μόριο προσκόλλησης αγγειακού κυττάρου-1 (SvCAM-1). Πέρα όμως από τους βιοδείκτες καταγράφηκαν και συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη, τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών, δηλαδή η ηλικία τους, όπως και το κάπνισμα, καθώς επίσης και τα κλινικά τους δεδομένα, ήτοι ο δείκτης μάζας σώματος (BMI), η συστολική αρτηριακή πίεση (sBP), τα τριγλυκερίδια (triglycerides) και ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων (WBC). Όπως αποτυπώθηκε στα αποτελέσματα, σχετικά με τα δημογραφικά στοιχεία, ο μέσος όρος ηλικίας ήταν μεγαλύτερος των 70 ετών και για τις δύο ομάδες ασθενών. Επιπρόσθετα, το κάπνισμα αξιολογήθηκε ως παράγοντας κινδύνου και μάλιστα μεγαλύτερος στην συμπτωματική ομάδα. Όσον αφορά στα κλινικά δεδομένα, όλα εμφάνισαν τιμές υψηλότερες στους συμπτωματικούς ασθενείς συγκριτικά με τους ασυμπτωματικούς και δη με στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$). Αναφερόμενοι στα αποτελέσματα των βιοδεικτών, παρατηρήθηκε ότι οι τιμές όλων, πλην της Αδιπονεκτίνης, ήταν σημαντικά αυξημένες στη συμπτωματική ομάδα σε σχέση με την ασυμπτωματική, και εδώ με σημαντικά στατιστική διαφορά ($p < 0,05$).

Σχετικά με τον δεύτερο στόχο, ο παραγόμενος αλγόριθμος τύπου δένδρο (classification and regression tree – CART) δημιούργησε ένα σύνολο «αν → τότε» λογικά διαχωρισμένων κανόνων, επιτρέποντας τελικά την ανάθεση των ασθενών ως συμπτωματικών ή ασυμπτωματικών. Το CART κατασκευάστηκε με αναδρομικό τρόπο, με βάση τα παρεχόμενα κλινικά χαρακτηριστικά και τους βιοδείκτες, και αποτελείται από κόμβους, οι οποίοι έχουν μια ιεραρχία επιπέδων. Κατά τη διάρκεια κάθε αναδρομής, υπολογίστηκαν τα στατιστικά μέτρα για όλες τις παρεχόμενες παραμέτρους, και στη συνέχεια η

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών
και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών
καρδιαγγειακών ασθενειών

παράμετρος που επέτρεπε τον καλύτερο διαχωρισμό των περιπτώσεων χρησιμοποιήθηκε για να διαχωριστεί η περίπτωση ως συμπτωματική ή ασυμπτωματική. Επίσης, ο πληθυσμός διασπάστηκε σε σετ εκπαίδευσης και δοκιμών προκειμένου να επικυρωθεί το μοντέλο CART. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν καταδεικνύουν ότι το μοντέλο έχει 97,6% ακρίβεια διάκρισης στους συμπτωματικούς ασθενείς και 79,6% στους ασυμπτωματικούς. Περαιτέρω, κατέστη σαφές ότι, ενώ εισήχθησαν στο μοντέλο επτά πρωτεΐνες ασθενών και τέσσερα κλινικά δεδομένα τους, τελικά αυτά που αναγνωρίστηκαν ως σημαντικά και εξήχθησαν από το CART ήταν μόνο τέσσερις πρωτεΐνες: MMP-1, TIMP-1, Insulin, Fibrinogen.

Η γενική αποτίμηση αφορά στο ότι από τη μία, εμφανίστηκαν σημαντικές διαφορές στις τιμές των βιοδεικτών στις δυο ομάδες ασθενών, ενώ από την άλλη, το προγνωστικό μοντέλο CART αποδείχθηκε ότι είναι ένας αλγόριθμος λήψης αποφάσεων που σχετίζεται με τις πιθανότητες κινδύνου και παρείχε στοιχεία για την ταυτοποίηση και επομένως, την αντιμετώπιση των ασθενών που βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο για ανάπτυξη καρδιαγγειακής νόσου.

B: ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ

B.1 ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΡΩΤΙΔΙΚΗ ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ – ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΟΙ ΜΕ ΤΗΝ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΗ ΠΛΑΚΑ

B.1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Αθηροσκλήρωση ή αρτηριοσκληρωτική αγγειακή νόσος ονομάζεται η κατάσταση κατά την οποία οι αρτηρίες υφίστανται στένωση και σκλήρυνση¹, διαδικασίες που οφείλονται σε υπερβολική συσσώρευση πλάκας γύρω από το τοίχωμα της αρτηρίας. Το εν λόγω νόσημα αποτελεί μια χρόνια εκφυλιστική² ασθένεια, ενώ διαταράσσει τη ροή του αίματος στο σώμα και αυτό έχει ως αποτέλεσμα σοβαρές καρδιαγγειακές επιπλοκές [1]. Πιο συγκεκριμένα, η καρωτιδική αθηρωμάτωση είναι μια αρτηριακή πάθηση που χαρακτηρίζεται από τη σκλήρυνση μέρους του εσωτερικού του αρτηριακού τοιχώματος της καρωτίδας, κοντά στο ενδοθήλιο³, λόγω της δημιουργίας πλακών, και αποτελεί την κύρια αιτία πρόκλησης εγκεφαλικού επεισοδίου. Οι πλάκες αυτές αποτελούνται από [2]:

- μεγάλο αριθμό ανώμαλων λείων μυϊκών κυττάρων⁴, μακροφάγων⁵ και λεμφοκυττάρων⁶
- συγκεντρώσεις χοληστερόλης⁷ και άλλων λιπιδίων⁸

¹ Δημιουργία πλάκας στα τοιχώματα του αρτηριακού δικτύου

² Θεμελιώδης και αρνητική μεταβολή στη φύση, σε μια κατάσταση ή στην ενέργεια

³ Αποτελεί τον εσωτερικό από τους τρεις χιτώνες του τοιχώματος των αγγείων

⁴ Αποτελούν το κυρίαρχο στοιχείο του μέσου χιτώνα των αιμοφόρων αγγείων, ενώ συμμετέχουν ενεργά και στο σχηματισμό και στην ωρίμανση του καρδιαγγειακού συστήματος

⁵ Προέρχονται από κύτταρα στον μυελό των οστών και συναντώνται στους περισσότερους ιστούς του σώματος

⁶ Είδος λευκού αιμοσφαιρίου, υπεύθυνο για την άμυνα του οργανισμού

⁷ Είναι κηρώδης στερόλη

⁸ Δομικό συστατικό κυτταρικών μεμβρανών, καθώς και του νευρικού ιστού

▪ παχιά στρώματα συνδετικού ιστού⁹

Η καρωτιδική αθηρωματική πλάκα είναι παρόμοια στην εμφάνιση με αυτή που βρίσκεται σε άλλες αρτηριακές θέσεις. Εκτός από πληθώρα γνωστών παραγόντων κινδύνου π.χ. κάπνισμα, υψηλή αρτηριακή πίεση, χαμηλή πυκνότητα λιποπρωτεΐνης (LDL), γενετική προδιάθεση, οι αρτηριοσκληρωτικές αλλοιώσεις εξαρτώνται, τουλάχιστον εν μέρει, από υδροδυναμικούς παράγοντες¹⁰. Τα αγγειακά τμήματα με χαμηλή διατμητική τάση¹¹ στο τοίχωμα και με στάσιμη ροή, φαίνεται να βρίσκονται σε μεγαλύτερο κίνδυνο. Ωστόσο, ο συνδυασμός της χαμηλής διατμητικής τάσης στο τοίχωμα, της υπερχοληστερολαιμίας¹² και της τυρβώδους ροής¹³ του αίματος, συμβάλλει στην ανάπτυξη της πλάκας. Η λεγόμενη «ευπαθής πλάκα» χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενός πλούσιου σε λιπίδια νεκρωτικού πυρήνα, που καλύπτεται από ένα λεπτό ινώδες κάλυμμα και δεν περιέχει λεία μυϊκά κύτταρα [3, 4]. Η πλάκα περιέχει, επίσης φλεγμονώδη κύτταρα, ενεργοποιημένα μακροφάγα και T λεμφοκύτταρα.

Η αθηροσκλήρωση αρχίζει με την είσοδο των LDL σωματιδίων στο χώρο του ενδοθηλίου, τα οποία εγκλωβίζονται με υψηλή συγγένεια¹⁴ στα γλυκοπρωτεϊνικά μόρια¹⁵ [5, 6]. Υπό συγκεκριμένες μεταβολικές συνθήκες, τα LDL σωματίδια μπορούν να οξειδωθούν· αυτό οδηγεί στη σηματοδότηση των μονοκυττάρων¹⁶ από ενεργοποιημένα μόρια προσκόλλησης¹⁷ και, εν συνεχεία, στην είσοδο αυτών στην ενδοθηλιακή επιφάνεια της περιοχής, προκειμένου να «ξεκαθαρίσουν» τα LDL σωματίδια, αλλά ταυτόχρονα δημιουργείται μία τοπική φλεγμονή. Λείοι μύες έλκονται επίσης στην περιοχή. Τα μονοκύτταρα, στη συνέχεια, μετατρέπονται σε μακροφάγα που «καταβροχθίζουν» λιπίδια και τα μετατρέπουν σε αφρώδη κύτταρα [7]. Όταν αυτά τα κύτταρα πεθάνουν, το λιπιδικό

⁹ Ένα από τα τέσσερα βασικά είδη ζωικών ιστών, με σκοπό να στηρίζει τους άλλους ιστούς, να συμβάλλει στην άμυνα του οργανισμού, στη μεταφορά, στην αποθήκευση ουσιών και στην αποκατάσταση βλαβών

¹⁰ Διέπουν την κίνηση των ασυμπιεστων υγρών, όπως τη ροή των ρευστών (αίμα), την ταχύτητά τους, τη διεύθυνση των αγωγών ή φλεβών, την παροχή τους, τις διάφορες πιέσεις αυτών και τη συμπεριφορά των διαφόρων σωμάτων που εμφανίζουν κατά την κίνησή τους μέσα στα υγρά

¹¹ Καταπόνηση του τοιχώματος των αγγείων όταν επιδρούν επάνω του δύο ίσες και αντίθετες δυνάμεις

¹² Παρουσία μεγάλων επιπέδων χοληστερόλης στο αίμα

¹³ Οι μεταβλητές πίεση και ταχύτητα, του πεδίου ροής του αίματος, μεταβάλλονται απότομα και τυχαία για κάθε σημείο του χώρου που καταλαμβάνει το πεδίο ροής και κατά τη χρονική εξέλιξη του φαινομένου

¹⁴ Είδος χημικής συγγένειας δέσμευσης (ηλεκτρονική ιδιότητα με την οποία τα ανόμοια χημικά είδη είναι ικανά να σχηματίζουν χημικές ενώσεις) μεταξύ χημικών/βιολογικών ενώσεων

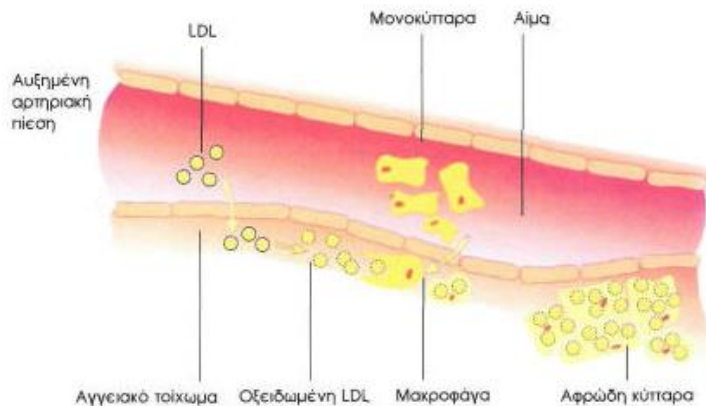
¹⁵ Πρωτεΐνες ενωμένες με μικρά μόρια υδατανθράκων (σακχάρων)

¹⁶ Τα μεγαλύτερα από τα λευκοκύτταρα – αποτελούν τις πρόδρομες μορφές των μακροφάγων

¹⁷ Καθορίζουν αν ένα κύτταρο θα παραμείνει κάπου (και πού), μεσολαβούν σε πολλές από τις αντιδράσεις κυττάρου προς κύτταρο, συμμετέχουν στη φυσιολογική ανάπτυξη και στη διατήρηση των ιστών, στην πήξη του αίματος, στην επούλωση των τραυμάτων, στη φλεγμονή κ.α.

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών
και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών
καρδιαγγειακών ασθενειών

τους φορτίο, με υψηλή περιεκτικότητα σε ελεύθερη χοληστερόλη, απελευθερώνεται στον εξωκυττάριο χώρο, με στόχο την προσέλκυση επιπλέον μακροφάγων στην περιοχή, οδηγώντας έτσι σε ένα φαύλο κύκλο μέσω του σχηματισμού ενός νεκρωτικού πυρήνα, περιορισμένου μεταξύ της εξωτερικής και της εσωτερικής ελαστικής μεμβράνης¹⁸ της αρτηρίας. Ο πυρήνας είναι πλούσιος σε κυτταρικά θραύσματα και ελεύθερη χοληστερόλη, τα οποία με φυσικούς ή/και χυμικούς μηχανισμούς¹⁹ μπορούν εν συνεχεία να σχηματίσουν κρυστάλλους χοληστερόλης. Οι κρύσταλλοι έχουν αιχμηρά άκρα που μπορούν να κόψουν τους ινώδεις ιστούς [8, 9]. Μόλις ένα κορεσμένο διάλυμα χοληστερόλης αναπτυχθεί στον πυρήνα, ξεκινάει η κρυστάλλωση, η οποία εμφανίζεται ξαφνικά και αμετάκλητα [10]. Όταν η χοληστερόλη μετατραπεί από υγρή σε στερεή κρυσταλλική κατάσταση, διαστέλλεται σε όγκο. Μέσα στα όρια της πλάκας, μπορεί να επιμηκύνει και να συρρικνώσει το ινώδες κάλυμμα. Ρήξη του ινώδους καλύμματος, που διαχωρίζει τον πυρήνα από τον αρτηριακό αυλό, λόγω κρυστάλλωσης, οδηγεί σε θρόμβωση με πιθανή απόφραξη του αρτηριακού αυλού, προκαλώντας ισχαιμία²⁰ ή/και έμφραγμα²¹. Επιπρόσθετα, οι κρύσταλλοι εντός της αρτηρίας, μπορούν να τραυματίσουν την επιφάνεια του έσω χιτώνα προκαλώντας αρτηριακό σπασμό²² που επιδεινώνει περαιτέρω την ισχαιμία [11].



Εικόνα 1: Δημιουργία αφρωδών κυττάρων από τα μακροφάγα

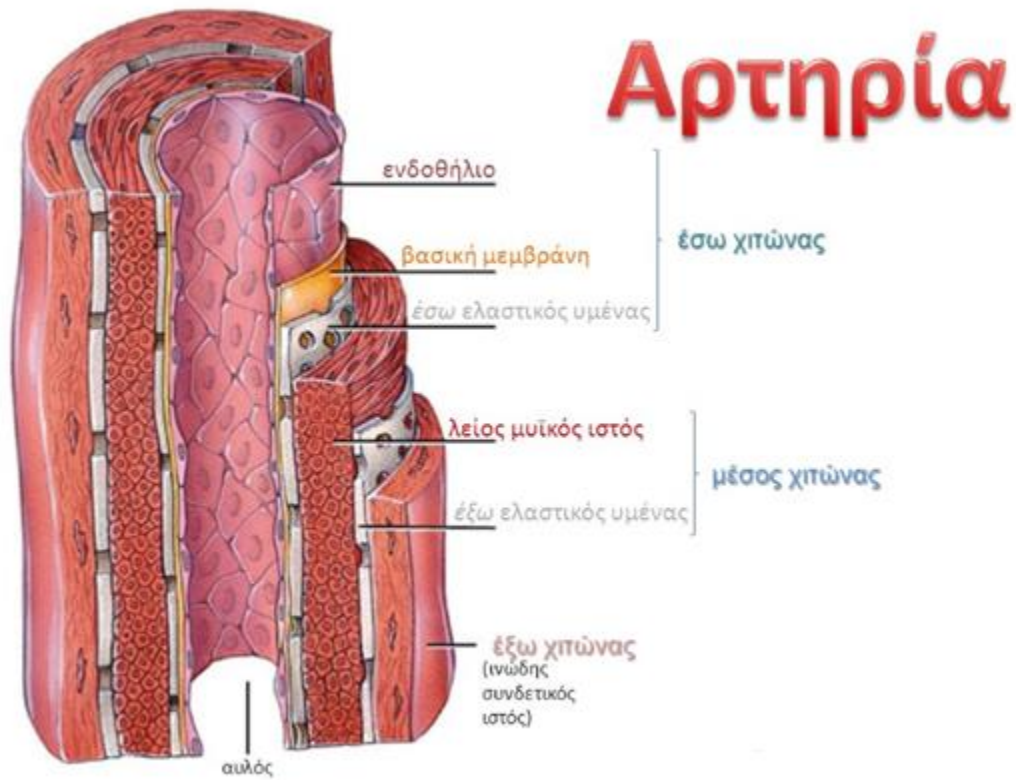
¹⁸ Δέχονται τον κύριο όγκο αίματος και αμβλύνουν τις μεταβολές της αιματικής ροής, καθώς διαθέτουν πολύ καλά ανεπτυγμένο μέσο χιτώνα

¹⁹ Β-λεμφοκύτταρα μετατρέπονται σε πλασματοκύτταρα, τα οποία με τη σειρά τους δημιουργούν αντισώματα

²⁰ Ελάττωση της κυκλοφορίας του αίματος σε ορισμένο μέρος ή όργανο του σώματος

²¹ Αιφνίδια διακοπή της ροής του αίματος προς την καρδιά

²² Σύντομη και παροδική σύσπαση των μυών του τοιχώματος της αρτηρίας

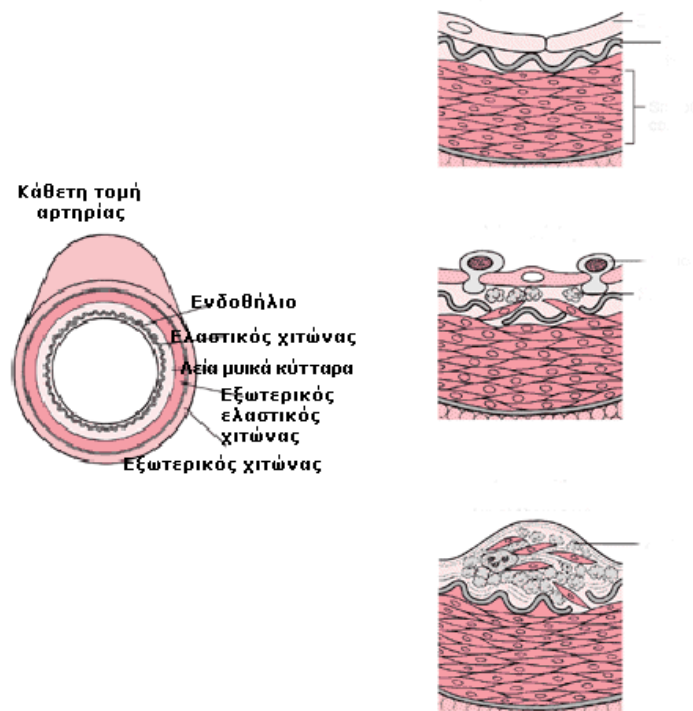


Εικόνα 2: Στρώματα αρτηρίας

Οι βασικότεροι από τους παράγοντες που επηρεάζουν τη μορφολογία της πλάκας είναι:

- **ηλικία** → οι νεότεροι ασθενείς έχουν μεγαλύτερη αναλογία διήθησης φλεγμονωδών κυττάρων, ενώ οι μεγαλύτερης ηλικίας ασθενείς έχουν ένα μεγάλο λιπιδικό πυρήνα και παρουσιάζουν και ασβεστοποίηση πλάκας, δηλαδή επηρεάζεται η μορφολογία της πλάκας, αλλά δεν υπάρχει καμία ηλικιακά συσχετιζόμενη τάση ως προς την αστάθεια της [12] και, συνεπώς, η μη σταθερότητα της πλάκας δεν επηρεάζεται από την ηλικία. Αυτό σημαίνει ότι ο αυξημένος κίνδυνος εγκεφαλικού επεισοδίου σε ηλικιωμένους ασθενείς με συμπτωματική καρωτιδική στένωση οφείλεται σε άλλους παράγοντες
- **φύλο** → ο φαινότυπος της πλάκας επηρεάζεται από τις διαφορές στο φύλο. Σε ασυμπτωματικούς ασθενείς με περισσότερο από 50% στένωση των καρωτιδίων, τα χαρακτηριστικά της πλάκας υψηλού κινδύνου βρίσκονται πιο συχνά στους άνδρες παρά στις γυναίκες [13]. Στην πραγματικότητα, για τον ίδιο βαθμό καρωτιδικής στένωσης, οι άνδρες έχουν μεγαλύτερο λιπιδικό πυρήνα από τις γυναίκες. Αυτά τα χαρακτηριστικά μπορούν να συμβάλλουν στην εξήγηση των διαφορών μεταξύ των φύλων ως προς τη συχνότητα εμφάνισης εγκεφαλικού επεισοδίου, καθώς και στην πρόληψη

- κάπνισμα → το κάπνισμα συνδέεται σε μικρότερη ηλικία με την καρωτιδική ενδαρτηρεκτομή²³, γεγονός που υποδηλώνει ότι δύναται να παίζει κάποιο ρόλο στην επιτάχυνση της ανάπτυξης ή/και στην πρόοδο της αθηρογένεσης²⁴. Ωστόσο, η μορφολογία της πλάκας φαίνεται να είναι παρόμοια σε πρώην/μη καπνιστές, επομένως ο μηχανισμός της αστάθειας της πλάκας φαίνεται να μη σχετίζεται με το κάπνισμα [12]. Παρ' όλα αυτά, δεν αποκλείεται το ενδεχόμενο μεταβολής της φυσιολογίας της πλάκας, ως αιτίας συσχετισμού
- χρονοδιάγραμμα ισχαιμικών συμπτωμάτων → η αστάθεια της πλάκας σχετίζεται με τη φύση και τον χρόνο των ισχαιμικών συμπτωμάτων και τείνει να επιμένει μετά από παροδική ισχαιμική προσβολή ενώ στη συνέχεια μειώνεται με το χρόνο, μετά από ένα εγκεφαλικό επεισόδιο. Οι συμπτωματικές καρωτιδικές βλάβες τείνουν να μετατρέπονται, με την πάροδο του χρόνου, σε πιο σταθερές πλάκες, μετά από ένα εγκεφαλικό επεισόδιο



Εικόνα 3: Ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης

Η καρωτιδική αθηροσκληρωτική στένωση αυξάνεται με την ηλικία και υπολογίζεται ότι εμφανίζεται περίπου στο 7% των ατόμων άνω των 65 ετών. Είναι κοινά αποδεκτό ότι οι καρωτιδικές αθηροσκληρωτικές πλάκες προκαλούν, σε μεγάλο βαθμό, εγκεφαλικά

²³ Χειρουργική διαδικασία αφαίρεσης της πλάκας από την καρωτιδική αρτηρία

²⁴ Δημιουργία αθηρωματικών πλακών στα αρτηριακά τοιχώματα

ισχαιμικά επεισόδια (αναπτύσσεται στο υποκεφάλαιο B.1.6), με την πλειονότητα των εγκεφαλικών επεισοδίων να έχει προκληθεί εξαιτίας της ασθένειας [1].

Το εγκεφαλικό είναι μία από τις κύριες αιτίες νοσηρότητας, αναπηρίας και θανάτου σε παγκόσμιο επίπεδο. Πρόσφατες έρευνες υποδεικνύουν ότι, σε ετήσια βάση, ένας στους δώδεκα άντρες και μία στις δέκα γυναίκες πεθαίνουν από εγκεφαλικό στην Ευρώπη, ενώ στην Αμερική το ποσοστό των ατόμων που πεθαίνουν από εγκεφαλικό ανέρχεται στο 6% [1, 14, 15].

Οι θέσεις όπου εμφανίζεται η εγκεφαλική αθηροσκλήρωση ποικίλουν μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών. Για παράδειγμα, η εξωκρανιακή αθηροσκλήρωση (extracranial atherosclerosis – ECAS) (αναπτύσσεται στο υποκεφάλαιο B.1.3) είναι πιο συνήθης στους Καυκάσιους [16], ενώ, από την άλλη πλευρά, η ενδοκρανιακή αθηροσκλήρωση (intracranial atherosclerosis – ICAS) (αναπτύσσεται στο υποκεφάλαιο B.1.4), επικρατεί περισσότερο στους Ασιάτες. Ωστόσο, μεμονωμένοι παραδοσιακοί παράγοντες κινδύνου, όπως η υπέρταση, ο διαβήτης, το κάπνισμα, η υπερχοληστερολαιμία κ.α. δεν μπορούν να εξηγήσουν αυτές τις ενδο- και έξω- εθνικές διαφοροποιήσεις [17].

Άλλοι παράγοντες, πέραν των παραδοσιακών, όπως οι μεταλλοπρωτεΐνες²⁵, οι οποίες εμπλέκονται στην παθογένεση²⁶, στη διάγνωση και στην πρόγνωση των ισχαιμικών εγκεφαλικών επεισοδίων [18], η ομοκυστεΐνη²⁷, οι κυτοκίνες²⁸[19], οι αδιποκίνες²⁹ [20] και το μεταβολικό σύνδρομο³⁰ [21], έχουν εμπλακεί στη δημιουργία, στην ανάπτυξη ή στην πρόοδο της αθηροσκλήρωσης [22, 23].

²⁵ Αποτελούν μια οικογένεια πρωτεασών. Οι πρωτεάσες αποδομούν τις πρωτεΐνες, διασπώντας τους πεπτιδικούς δεσμούς και παράγοντας πεπτίδια, δηλαδή ομάδες οργανικών ενώσεων

²⁶ Μηχανισμοί, με τη βοήθεια των οποίων γεννιέται και εξελίσσεται μια νόσος

²⁷ Αμινοξύ που υπάρχει στο αίμα και έχει συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακών νοσημάτων και εγκεφαλικού

²⁸ Ουσίες του ανοσοποιητικού συστήματος που προέρχονται από τα λευκά αιμοσφαίρια και περιλαμβάνουν τις ιντερλευκίνες (ομάδα πρωτεϊνών που ανήκουν στις κυτταροκίνες, είναι δηλαδή υπεύθυνες για την επικοινωνία των κυττάρων κατά τη διάρκεια των ανοσοποιητικών αποκρίσεων), τις ιντερφερόνες (σύνολο φυσικών πρωτεϊνών που αποτελούν βασικό μέρος του ανοσοποιητικού συστήματος), τους παράγοντες νέκρωσης όγκων, την ερυθροποιητίνη (παράγεται από τα νεφρά, διεγείρει και ρυθμίζει το μυελό των οστών για την παραγωγή των ερυθρών αιμοσφαιρίων και της αιμοσφαιρίνης) και τους παράγοντες διέγερσης αποικίων (διεγείρει εκλεκτικά την αύξηση και την ωρίμανση διαφόρων τύπων των λευκών αιμοσφαιρίων)

²⁹ Πληθώρα ορμονών και πρωτεϊνικών παραγόντων που συμμετέχουν στη ρύθμιση της καρδιαγγειακής ομοιόστασης του οργανισμού

³⁰ Αντίσταση στην ινσουλίνη – προδιαβητική κατάσταση

B.1.2 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΗΣ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΤΙΚΗΣ ΚΑΡΩΤΙΔΙΚΗΣ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗΣ ΣΤΕΝΩΣΗΣ

Η απεικόνιση των πλακών μπορεί να ενισχύσει την κατανόηση της αθηροσκληρωτικής νόσου. Επί του παρόντος, ένας αριθμός μη επεμβατικών και επεμβατικών μεθόδων απεικόνισης χρησιμοποιείται για τη μελέτη της αθηροσκληρωτικής στένωσης της καρωτιδικής αρτηρίας, οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες εκ των οποίων είναι:

- η τομογραφική αγγειογραφία σε υπολογιστή (CTA)
- η απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού (MRI)
- η διακρανιακή Doppler (TCD)
- η Β-λειτουργία απεικόνισης της κλίμακας του γκρι (B-mode gray scale imaging)

και οι οποίες αναλύονται ακολούθως.

- Τομογραφική αγγειογραφία σε υπολογιστή (Computed Tomography/CTA)

Η τομογραφία σε υπολογιστή, γνωστή και ως διπλής ενέργειας CTA, αποτελεί μια μη επεμβατική μέθοδο και είναι η πιο ακριβής για την αξιολόγηση μορφολογικών χαρακτηριστικών της καρωτιδικής πλάκας [24]. Σε σύγκριση με τη συμβατική CTA, η διπλής ενέργειας CTA έχει δείξει ότι εντοπίζει τις ευάλωτες πλάκες με μεγαλύτερη ακρίβεια. Η αξιολόγηση του βαθμού της καρωτιδικής στένωσης χρησιμοποιώντας CTA έχει μελετηθεί με ποικίλα αποτελέσματα. Η CTA έχει συγκριθεί, με ευνοϊκά για αυτήν αποτελέσματα, με την αγγειογραφία, για την αξιολόγηση ασθενών με εξωκρανιακές αγγειακές νόσους, με 100% ευαισθησία (sensitivity) και 63% εξειδίκευση (specificity). Η συγκεκριμένη μέθοδος υποτιμά τον βαθμό της στένωσης παρά τον υπερεκτιμά, αλλά μια προσεκτική αξιολόγηση των εικόνων βοηθά στη μείωση της εσφαλμένης ταξινόμησης [25].

- Απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού (Magnetic Resonance Imaging/MRI)

Η τεχνική ιατρικής απεικόνισης MRI χρησιμοποιείται ευρέως για την αξιολόγηση χαρακτηριστικών της αθηροσκλήρωσης. Η MRI, μέσα σε ζωντανούς οργανισμούς (in vivo), απεικονίζει την αιμορραγία της καρωτιδικής πλάκας καθώς και τη λέπτυνση του υπερκειμένου του ινώδους καλύμματος τα οποία έχουν επικυρωθεί από την ιστολογική συσχέτιση [26-28]. Τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά καθιστούν την πλάκα επιρρεπή σε ρήξη, με επακόλουθα θρομβοεμβολικά ισχαιμικά επεισόδια [29]. Η κλινική σημασία αυτών των MR-απεικονιστικών χαρακτηριστικών έχει επιβεβαιωθεί σε πολλές μελέτες των ασυμπτωματικών ασθενών με μέτρια καρωτιδική στένωση που οδηγεί σε μετέπειτα εγκεφαλικά επεισόδια [30, 31]. Επιπρόσθετα, οι άντρες βρέθηκαν να διαθέτουν αυτά τα χαρακτηριστικά καρωτιδικής πλάκας σε μεγαλύτερο ποσοστό σε σύγκριση με τις γυναίκες, μετά από έλεγχο για πιθανούς συγχυτικούς³¹ παράγοντες. Αυτά τα MR-απεικονιστικά

³¹ Συσχετίζουν την έκθεση και την έκβαση

χαρακτηριστικά της καρωτιδικής πλάκας μπορούν να βοηθήσουν στην εξήγηση των διαφορών φύλλου στο εγκεφαλικό επεισόδιο και στην πρόληψή του [13].

- Διακρανιακή Doppler (Transcranial Doppler ultrasound/TCD)

Το διακρανιακό υπερηχογράφημα Doppler διαθέτει μια σημαντική τεχνική απεικόνισης στη διαχείριση των ασθενών με εγκεφαλικό επεισόδιο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ανίχνευση τόσο της ενδο- (αναπτύσσεται στο υποκεφάλαιο B.1.4) όσο και της έξω- (αναπτύσσεται στο υποκεφάλαιο B.1.3) κρανιακής αρτηριακής νόσου. Η TCD έχει χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση αιμοδυναμικών αποτελεσμάτων στην ενδοκρανιακή κυκλοφορία της στένωσης της καρωτιδικής αρτηρίας. Η ταχύτητα ροής της ενδοκρανιακής κυκλοφορίας συχνά μειώνεται, ανάλογα με τη σοβαρότητα της στένωσης της εσωτερικής καρωτιδικής αρτηρίας [32].

Το διακρανιακό υπερηχογράφημα Doppler δύναται επίσης να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της παρουσίας μικροεμβολικών σημάτων σε ασθενείς με στένωση της καρωτιδικής αρτηρίας. Τα εμβολικά σήματα μπορούν να προβλέψουν τον κίνδυνο εγκεφαλικού επεισοδίου, την υποτροπή κατά τη διάρκεια οξέος εγκεφαλικού επεισοδίου, τη συμπτωματική καρωτιδική βλάβη και τα μετεγχειρητικά στάδια μετά από καρωτιδική ενδαρτηρεκτομή. Τα εμβολικά σήματα είναι πιο συχνά σε ασθενείς με μεγάλη καρωτιδική νόσο, λιγότερο συχνά σε ασθενείς με καρδιοεμβολικό εγκεφαλικό (αναπτύσσεται στο υποκεφάλαιο B.1.7) και ελάχιστα έως ανύπαρκτα σε ασθενείς με αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο [33]. Είναι, επομένως, εφικτό να προσδιοριστεί η αιτιολογία του εγκεφαλικού επεισοδίου και να καθοριστούν οι ασθενείς που διατρέχουν κίνδυνο για εγκεφαλικό επεισόδιο και χρειάζονται πιο επιθετική θεραπεία. Εμβολικά σήματα για TCD σε ασυμπτωματικούς ασθενείς με καρωτιδική στένωση συσχετίζονται με υψηλότερο κίνδυνο εγκεφαλικού επεισοδίου [34]. Ως εκ τούτου, είναι πιθανό αυτοί οι ασυμπτωματικοί ασθενείς να μπορούν να επωφεληθούν από μια επαναγγείωση.

- B-λειτουργία απεικόνισης της κλίμακας του γκρι (B-Mode Gray Scale Imaging)

Η απεικόνιση του συνόλου της καρωτιδικής αρτηρίας, η καρωτιδική διακλάδωση, η εσωτερική καρωτιδική αρτηρία και η εξωτερική καρωτιδική αρτηρία είναι το πρώτο βήμα στην εξέταση της καρωτιδικής υπερηχογραφίας, που αποτελεί την καλύτερη μέθοδο για τη μέτρηση του πάχους του έσω χιτώνα και την εμφάνιση των αθηροσκληρωτικών πλακών. Η μέτρηση του πάχους του έσω χιτώνα μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε, χειροκίνητα είτε, με χρήση ειδικού λογισμικού από τον υπολογιστή. Στη χειροκίνητη μέθοδο, πραγματοποιούνται πολλαπλές μετρήσεις, με την τοποθέτηση ηλεκτρονικών δρομέων σε διάφορες θέσεις, και υπολογίζεται η μέση τιμή. Στην ηλεκτρονική μέθοδο, διενεργούνται τρεις μετρήσεις στο έξω τοίχωμα, σε πρόσθια, πλάγια και οπίσθια προβολή, και υπολογίζεται η μέση τιμή [35, 36].

Το φυσιολογικό πάχος του έσω χιτώνα κυμαίνεται μεταξύ 0,6mm - 0,8 mm στους ενήλικες, ενώ αυξάνεται σταδιακά με την ηλικία. Η μεταβολή του πάχους είναι αργή, κυμαινόμενη από 0,01mm μέχρι 0,03mm ανά έτος. Το αυξημένο πάχος του εσωτερικού χιτώνα θεωρείται ένας δείκτης πρόωμης αθηροσκλήρωσης και είναι η μόνη υπερηχογραφική

παράμετρος που συνιστάται από την Αμερικανική Ένωση Καρδιάς να χρησιμοποιείται ως ρουτίνα, όταν γίνεται έλεγχος για καρδιαγγειακό κίνδυνο [36]. Παρά την ιδιαίτερη σημασία των μετρήσεων του πάχους του έσω χιτώνα ως ενός δείκτη αθηροσκληρωτικών αλλαγών, αυτό δεν συμπεριλαμβάνεται στη ρουτίνα της εξέτασης των συμπτωματικών ασθενών όταν γίνεται έλεγχος για στένωση, και ο έλεγχος για το πάχος του εσωτερικού χιτώνα δεν επηρεάζει την απόφαση για καρωτιδική εγχείρηση.

B.1.3 ΕΞΩΚΡΑΝΙΑΚΗ – ΕΝΔΟΚΡΑΝΙΑΚΗ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ

Η σκλήρυνση των αρτηριών, ή αθηροσκλήρωση λαμβάνει χώρα όταν μια αρτηρία γίνεται πιο στενή και η ροή του αίματος παρεμποδίζεται. Αυτό μπορεί να συμβεί σε διάφορα μέρη του σώματος, με συνηθέστερα την καρδιά και τα πόδια. Οι αρτηρίες που παρέχουν αίμα στο κεφάλι και στο λαιμό είναι γνωστές ως καρωτίδες και σπονδυλικές αρτηρίες. Όταν αυτές οι αρτηρίες παρεμποδίζονται, η κατάσταση αυτή αναφέρεται ως εξωκρανιακή αθηροσκλήρωση. Μέσω της δημιουργίας μίας σοβαρής μορφής αθηροσκλήρωσης, η οποία οδηγεί σε μια σημαντική ποσότητα απόφραξης, η ροή του αίματος σε τμήμα του εγκεφάλου μπορεί να παρακωλυθεί και ως εκ τούτου να προκύψει ένα εγκεφαλικό [37].

Η αθηροσκλήρωση των καρωτιδικών αρτηριών υπολογίζεται ότι συμβαίνει στον γενικό πληθυσμό σε ένα ποσοστό 7% στις γυναίκες και 9% στους άντρες. Μόλις η αθηροσκλήρωση λάβει χώρα στις καρωτιδικές αρτηρίες, τα συσσωματώματα από το αίμα και η πλάκα – τα υλικά που δημιουργούν την έμφραξη – διαχωρίζονται και μεταφέρονται στο κεφάλι.

Τυπικά συμπτώματα που προκύπτουν από μια παρεμπόδιση των καρωτιδικών αρτηριών περιλαμβάνουν [37]:

- αδυναμία ή μούδιασμα της μίας πλευράς του σώματος
- ανικανότητα ομιλίας ή κατανόησης
- δυσκολία στην όραση

Όταν η παρεμπόδιση συμβαίνει στις σπονδυλικές αρτηρίες, τα συμπτώματα οφείλονται σε μειωμένη ροή του αίματος σε τμήμα του εγκεφάλου, αλλά δεν είναι εξαιτίας συσσωματωμάτων ή πλάκας. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν [37]:

- ζαλάδα
- ναυτία
- δυσκολία στην ισορροπία ή στο συντονισμό
- θολή ή διπλή όραση
- αλλαγές στην ακοή

Η ενδοκρανιακή αθηροσκλήρωση έχει διαπιστωθεί ότι αποτελεί μια μη κοινή αιτία εγκεφαλικού στη δυτική κοινωνία, καθώς εντοπίζεται σε ποσοστό μόλις 8% των ασθενών με ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο (αναπτύσσεται στο υποκεφάλαιο Β.1.6) ή παροδικό ισχαιμικό επεισόδιο. Αυτό είναι ένα σπάνιο περιστατικό ανάμεσα στους Καυκάσιους. Βλάβες σε μικρά υποφλοιώδη του μυοκαρδίου μπορούν να προκληθούν από ενδοκρανιακή αθηροσκλήρωση, το οποίο μπορεί να θεωρηθεί ως μια νόσος των μικρών αγγείων και, έτσι, το μείζον πρόβλημα της ενδοκρανιακής αθηροσκλήρωσης είναι πιθανό να υποτιμηθεί. Η συμπτωματική αθηροσκλήρωση, δηλαδή, εμφάνιση κάποιου επεισοδίου εντός έξι μηνών, έπειτα από πλήρη ιατρικό έλεγχο χωρίς ευρήματα, είναι πιο συχνή στη μέση εγκεφαλική αρτηρία, με ποσοστό της τάξης του 38%, ενώ ακολουθείται από την εσωτερική καρωτιδική αρτηρία, με ποσοστό που πλησιάζει το 28% [38]. Ασυμπτωματική αθηροσκλήρωση θεωρείται όταν οι ασθενείς δεν έχουν εμφανίσει επεισόδιο κατά την περίοδο των τελευταίων έξι μηνών, μετά από πλήρη ιατρικό έλεγχο χωρίς ευρήματα [2].

Οι παράγοντες κινδύνου της εσωτερικής αθηροσκλήρωσης περιλαμβάνουν υπέρταση, σακχαρώδη διαβήτη, κάπνισμα και υπερλιπιδαιμία. Η διάγνωση της εσωτερικής αθηροσκλήρωσης αποτελεί πολλές φορές πρόκληση, ιδιαίτερα κατά την πρώτη περίοδο μετά το εγκεφαλικό επεισόδιο. Προκειμένου να διαγνωστεί η εσωτερική αθηροσκλήρωση, απαιτούνται η συμβατική αγγειογραφία (διαδερμική προσπέλαση της μηριαίας αρτηρίας), η μαγνητική αγγειογραφία (MR – τρισδιάστατες ανασυνθέσεις των υπό εξέταση αγγείων, με τη δυνατότητα περιστροφής των εικόνων γύρω από οποιοδήποτε επιλεγμένο άξονα), η αξονική αγγειογραφία (CT – ισχυρή μηχανή ακτίνων X για την παραγωγή εικόνων της καρδιάς και των αγγείων της) και η διακρανιακή Doppler (ανίχνευση και παρουσίαση ως κυματομορφής των ταχυτήτων ροής των μεγάλων εγκεφαλικών αρτηριών). Σύμφωνα με τα κριτήρια που βασίζονται στη μέθοδο για τη μέτρηση της ενδοκρανιακής αθηροσκλήρωσης – Warfarin-Aspirin Symptomatic Intracranial Disease (WASID) – προσδιορίζεται το ποσοστό της στένωσης ως:

$$\left[\left(1 - \left(\frac{D_{stenosis}}{D_{normal}} \right) \right) \right] \times 100$$

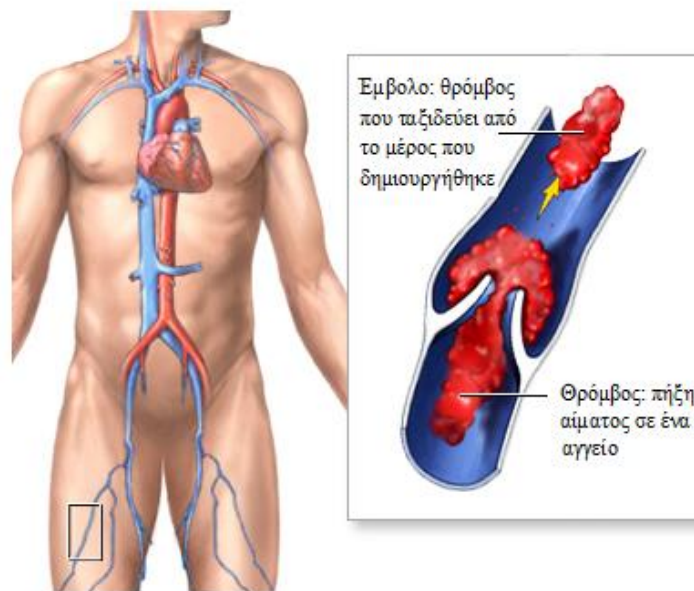
$D_{stenosis}$: διάμετρος της αρτηρίας στο σημείο όπου υπάρχει η πιο σοβαρή στένωση D_{normal} : διάμετρος της εγγύτερης φυσιολογικής αρτηρίας [38]

B.1.4 ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΟ ΕΠΕΙΣΟΔΙΟ

Σε κανονικές συνθήκες, η γλυκόζη είναι το μοναδικό συστατικό που μεταβολίζεται από τον εγκέφαλο για να παρέχει την απαραίτητη ενέργεια. Οι αποθηκευτικές ικανότητες του εγκεφάλου σε γλυκόζη είναι περιορισμένες και γι' αυτό το λόγο υπάρχει άμεση εξάρτηση της αδιάκοπης παροχής αίματος μέσω της αρτηριακής οδού, του οξυγόνου και της γλυκόζης. Η κύρια παρατηρούμενη εγκεφαλική βλάβη προέρχεται από μειωμένη παροχή αίματος σε κάποια περιοχή του εγκεφάλου. Όταν οι νευρώνες σε αυτή την περιοχή παραμείνουν για κάποια λεπτά χωρίς τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά και το οξυγόνο, τότε σταματάει η λειτουργία τους και, στη συνέχεια, πεθαίνουν. Ο νευρωνικός θάνατος αποκαλείται εγκεφαλικό επεισόδιο. Δεδομένου ότι δεν υπάρχει δυνατότητα επέκτασης, ανάπλασης και αναγέννησης του νευρωνικού δικτύου του εγκεφάλου, η εγκεφαλική βλάβη είναι μη αναστρέψιμη και, σε ορισμένες περιπτώσεις, υπάρχει θάνατος του ασθενή. Τα εγκεφαλικά επεισόδια διαχωρίζονται σε δύο είδη: το ισχαιμικό και το εμβολικό επεισόδιο [2].

B.1.5 ΙΣΧΑΙΜΙΚΟ - ΕΜΒΟΛΙΚΟ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΟ ΕΠΕΙΣΟΔΙΟ

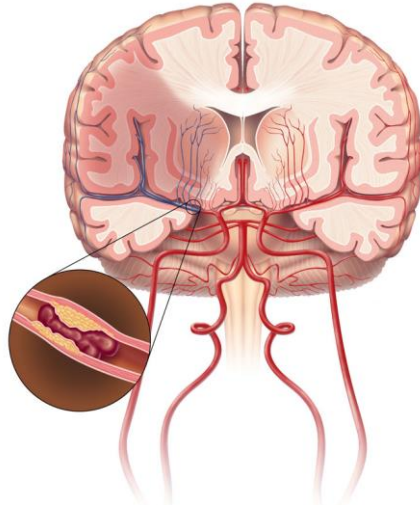
Ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο συμβαίνει όταν η παροχή αίματος σε τμήμα του εγκεφάλου διακόπτεται, και αυτό οδηγεί σε νέκρωση των εγκεφαλικών κυττάρων. Η ροή του αίματος μπορεί να διακοπεί με δύο βασικές λειτουργίες: τη θρόμβωση και την εμβολή (εικόνα 4). Αυτός ο τύπος εγκεφαλικού επεισοδίου αντιστοιχεί στο 85% του συνόλου των επεισοδίων.



Εικόνα 4: Θρόμβος που δημιουργείται και διαδικασία εμβολής από το σημείο δημιουργίας του [Πηγή, U.S. National Library of Medicine, National Institutes of Health (<http://www.nlm.nih.gov/>)]

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών
και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών
καρδιαγγειακών ασθενειών

Εμβολικό εγκεφαλικό επεισόδιο ορίζεται η διαδικασία όπου ένας θρόμβος αίματος ή ένα αποκολλημένο κομμάτι αθηρωματικής πλάκας μεταφέρεται δια της αιματικής ροής, λόγω καρδιακής αρρυθμίας. Συνήθως, αυτοί οι θρόμβοι παραμένουν στο εσωτερικό τοίχωμα της καρδιάς, αλλά περιστασιακά μπορεί να αποκολληθούν και, ταξιδεύοντας με τη ροή του αίματος, να αποφράξουν μια αρτηρία του εγκεφάλου (εικόνα 5). Οι θρόμβοι μπορεί επίσης να προέρχονται από μια μεγάλη αρτηρία, όπως οι κοινές καρωτιδικές αρτηρίες, δύο σημαντικές αρτηρίες στο λαιμό που παρέχουν αίμα στον εγκέφαλο.



Εικόνα 5: Θρόμβος κοντά σε περιοχή στένωσης, λόγω αθηρωμάτωσης, που περιορίζει τη ροή αίματος σε περιοχή εγκεφάλου (γκρίζα περιοχή) [Πηγή, *The Internet Stroke Center* (<http://www.strokecenter.org/>)]

B.1.6 ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥΣ

Ο όρος βιοδείκτης (βιολογικός δείκτης) εισήχθη το 1989 ως ένας όρος Ιατρικής Θεματικής Επικεφαλίδας (Medical Subject Heading term – MeSH) και ως τέτοιοι ορίζονται “μετρήσιμες και ποσοτικές βιολογικές παράμετροι (π.χ. παρουσία βιολογικών ουσιών, συγκεκριμένη συγκέντρωση ενζύμων, συγκεκριμένη συγκέντρωση ορμονών, συγκεκριμένος γονιδιακός φαινότυπος), οι οποίες χρησιμεύουν ως δείκτες για την υγεία και τις σχετικές με τη φυσιολογία αξιολογήσεις, όπως ο κίνδυνος νόσου, οι ψυχιατρικές διαταραχές, η περιβαλλοντική έκθεση και οι επιπτώσεις της, η διάγνωση της νόσου, οι μεταβολικές διαδικασίες, η κατάχρηση ουσιών, η εγκυμοσύνη, η ανάπτυξη κυτταρικής γραμμής, οι επιδημιολογικές μελέτες κλπ” [39].

Ένας βιοδείκτης έχει τη δυνατότητα να μετρηθεί σε ένα βιολογικό δείγμα (όπως αίμα, ούρα ή δοκιμή ιστού), δύναται να είναι μια εγγραφή ληφθείσα από ένα άτομο (πίεση αίματος, ηλεκτροκαρδιογράφημα ή Holder), ή είναι εφικτό να είναι μια απεικονιστική εξέταση (υπερηχοκαρδιογράφημα ή αξονική τομογραφία).

Οι βιοδείκτες είναι σε θέση να υποδείξουν μια ποικιλία χαρακτηριστικών, σχετιζομένων με υγεία ή ασθένεια, συμπεριλαμβανομένου του επιπέδου ή του τύπου της έκθεσης σε έναν περιβαλλοντικό παράγοντα, τη γενετική προδιάθεση, τις γενετικές απαντήσεις στην έκθεση, τους δείκτες υποκλινικής ή κλινικής ασθένειας, ή τους δείκτες στην ανταπόκριση της θεραπείας. Γι’ αυτό το λόγο, ένας απλός τρόπος για να σκεφτεί κανείς έναν βιοδείκτη είναι να τον εκλάβει ως δείκτη των γνωρισμάτων της νόσου (παράγοντας κινδύνου ή δείκτης κινδύνου), ως δείκτη της κατάστασης της νόσου (προκλινική ή κλινική) ή ως δείκτη του ρυθμού της νόσου (εξέλιξη) [40]. Επομένως, οι βιοδείκτες δύναται να κατηγοριοποιηθούν σε πρώιμους βιοδείκτες (ταυτοποίηση του κινδύνου εμφάνισης μιας ασθένειας), σε βιοδείκτες ανίχνευσης (διαλογή για υποκλινική ασθένεια), σε διαγνωστικούς βιοδείκτες (αναγνώριση έκδηλης ασθένειας), σε βιοδείκτες σταδίων (κατηγοριοποίηση σοβαρότητας της νόσου) και σε προγνωστικούς βιοδείκτες (πρόβλεψη μελλοντικής πορείας της νόσου – συμπεριλαμβανομένης της υποτροπής και της απόκρισης στη θεραπεία – και παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας) [39].

Οι βιοδείκτες, επίσης, χρησιμεύουν ως «δευτερεύοντα τελικά σημεία· ένα «δευτερεύον τελικό σημείο» είναι αυτό που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αποτέλεσμα σε κλινικές δοκιμές, για την αξιολόγηση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας των θεραπειών, αντί της μέτρησης του πραγματικού αποτελέσματος. Η βασική αρχή είναι ότι οι αλλαγές στο «δευτερεύον τελικό σημείο» παρακολουθούνται στενά σε σχέση με τις αλλαγές στο πραγματικό αποτέλεσμα [41-43]. Τα «δευτερεύοντα τελικά σημεία» έχουν το πλεονέκτημα ότι μπορούν να συγκεντρωθούν σε συντομότερο χρονικό διάστημα και με λιγότερα έξοδα από ότι τα τελικά σημεία, όπως η νοσηρότητα και η θνησιμότητα, τα οποία απαιτούν μεγάλες κλινικές μελέτες για την αξιολόγησή τους. Ένα σημαντικό μειονέκτημα των «δευτερεύοντων τελικών σημείων» είναι ότι, εάν η έκβαση ενδιαφέροντος επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες (εκτός από το «δευτερεύον τελικό σημείο»), τότε η δημιουργούμενη σύγχυση μπορεί να μειώσει την ισχύ του «δευτερεύοντος τελικού

σημείου». Έχει ειπωθεί ότι η αξιοπιστία ενός «δευτερεύοντος τελικού σημείου» είναι μεγαλύτερη, εάν μπορεί να εξηγήσει τουλάχιστον 50% της επίδρασης της έκθεσης ή της παρέμβασης σχετικά με την έκβαση ενδιαφέροντος [44].

Ανεξάρτητα από τον σκοπό της χρήσης του, ένας βιοδείκτης πρέπει να διαθέτει ορισμένα χαρακτηριστικά προκειμένου να είναι επιλέξιμος και έχει κλινική αξία μόνο εάν είναι ακριβής, εάν μπορεί να ληφθεί επαναληπτικά με έναν τυποποιημένο τρόπο, εάν είναι αποδεκτός για τον ασθενή, εάν είναι εύκολο να ερμηνευτεί από τους κλινικούς γιατρούς, εάν έχει υψηλή ευαισθησία (sensitivity) και υψηλή εξειδίκευση (specificity) ως προς το αποτέλεσμα που αναμένεται να εντοπιστεί, εάν εξηγεί ένα εύλογο ποσοστό του αποτελέσματος ανεξάρτητο των καθιερωμένων προγνωστικών (συνεπή σε πολλαπλές μελέτες), και εάν υπάρχουν δεδομένα που να υποδεικνύουν ότι η γνώση των επιπέδων ενός βιοδείκτη αλλάζει τον εκάστοτε χειρισμό [45].

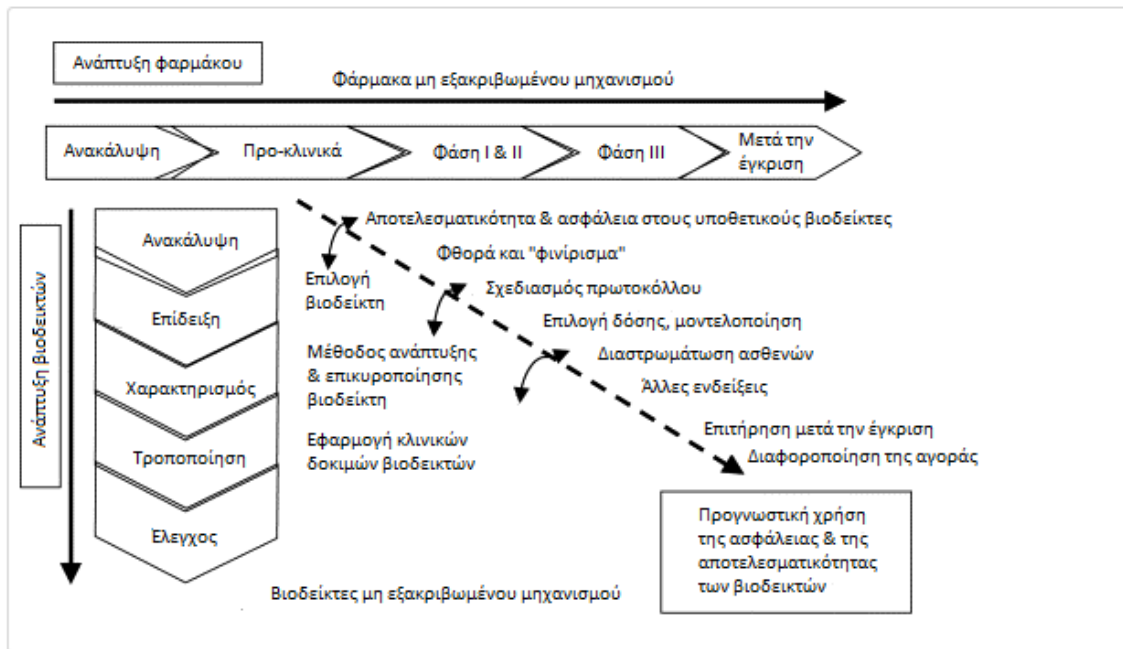
Οι επιθυμητές ιδιότητες των βιοδεικτών διαφέρουν ανάλογα με την προβλεπόμενη χρήση [46]:

- για τους βιοδείκτες διαλογής, χαρακτηριστικά όπως η υψηλή ευαισθησία, η εξειδίκευση, η προγνωστική αξία, τα μεγάλα ποσοστά πιθανότητας και το χαμηλό κόστος, είναι σημαντικά
- για τους διαγνωστικούς βιοδείκτες, πέραν των προαναφερθέντων χαρακτηριστικών, η υψηλή εξειδίκευση του ιστού, η απελευθέρωση στον οργανισμό, ανάλογα με την έκταση της νόσου και τα χαρακτηριστικά της δοκιμής που συμβάλλουν στο σημείο ελέγχου, είναι κρίσιμα [47]
- για τους βιοδείκτες που σχετίζονται με την παρακολούθηση της νόσου ή την απόκριση στη θεραπεία, χαρακτηριστικά όπως, η ευαισθησία ή η εξειδίκευση είναι λιγότερο σημαντικά, επειδή ο ασθενής χρησιμεύει ως μάρτυρας του εαυτού του

Τα κόστη μπορεί να είναι λιγότερο σημαντικά για τους προγνωστικούς δείκτες, επειδή μόνο οι άνθρωποι με την ασθένεια ελέγχονται. Ορισμένοι βιοδείκτες (π.χ. τεστ κοπώσεως) μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για διαγνωστικούς και για προγνωστικούς σκοπούς. Το να αποδειχθεί η προγνωστική χρησιμότητα ενός βιοδείκτη είναι πιο απαιτητικό, καθώς απαιτείται ο έλεγχος ενός μεγαλύτερου δείγματος και η εκπόνηση ενός μελλοντικού σχεδιασμού, ενώ το να αποδειχθεί η αξία του ως μία διαγνωστική δοκιμή απαιτεί μικρότερο δείγμα και διατμηματικό σχεδιασμό [48].

Η διαδικασία ανάπτυξης ενός νέου βιοδείκτη είναι συνυφασμένη με τη διαδικασία ανάπτυξης ενός φαρμάκου. Η ανάπτυξη του βιοδείκτη μπορεί να συμβεί ταυτόχρονα με την ανάπτυξη ενός ή πολλαπλών υποψήφιων φαρμάκων, μιας εκλεπτυσμένης νέας χημικής ή βιολογικής ουσίας καθώς και για εκτεταμένες ενδείξεις ή/και για επιπρόσθετους μηχανισμούς.

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών
και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών
καρδιαγγειακών ασθενειών



Εικόνα 6: Διαδικασία ανάπτυξης φαρμάκου και βιοδείκτη. Ο οριζόντιος κορμός αποτυπώνει την πρόοδο της ανάπτυξης ενός φαρμάκου μιας νέας χημικής ή βιολογικής ουσίας με μη επιβεβαιωμένο μηχανισμό δράσης. Ο κάθετος κορμός απεικονίζει τις αναπτυξιακές διαδικασίες μεταφοράς ενός νέου βιοδείκτη, μη επιβεβαιωμένου μηχανισμού, στην απόδειξη της βιολογίας και στον έλεγχο

B.1.7 ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΟΙ ΜΕ ΤΗΝ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΗ ΠΛΑΚΑ

Υπάρχουν διάφοροι βιοδείκτες που σχετίζονται με την αθηρωματική πλάκα, οι οποίοι εντάσσονται σε διάφορες κατηγορίες, ανάλογα με το είδος τους. Στην ενδοκρινική κατηγορία εντάσσεται η αδιπονεκτίνη. Την ανοσολογική κατηγορία αποτελούν οι μεταλλοπρωτεΐνάσες και οι αναστολείς ιστού μεταλλοπρωτεΐνάσης, ενώ στη μεταβολική βρίσκεται η ινσουλίνη. Στην καρδιαγγειακή κατηγορία υπάρχουν το ινωδογόνο, το διαλυτό διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης και το διαλυτό μόριο προσκόλλησης αγγειακού κυττάρου. Καθένας από αυτούς τους βιοδείκτες επηρεάζει την αθηρωματική πλάκα με διαφορετικό τρόπο και σε ξεχωριστό βαθμό, καθώς όλοι τους βρίσκονται στον ανθρώπινο οργανισμό και επιτελούν διακριτές λειτουργίες, ανεξάρτητα από την εκάστοτε ασθένεια.

B.1.8 ΒΙΟΔΕΙΚΤΗΣ ΑΔΙΠΟΝΕΚΤΙΝΗ (ADIPONECTIN)

Η αδιπονεκτίνη είναι η αδιποκίνη που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία στο ανθρώπινο σώμα και εκκρίνεται από λιπώδη κύτταρα, τα οποία μπορούν να συνδέσουν τη ρύθμιση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη με τον μεταβολισμό της ενέργειας [49]. Η συγκέντρωση της ρέουσας αδιπονεκτίνης στο πλάσμα, σε φυσιολογικά επίπεδα, ανέρχεται σε 2-20μg/ml, και οι γυναίκες έχουν περίπου 40% υψηλότερα ρέοντα επίπεδα αδιπονεκτίνης από τους άντρες [50].

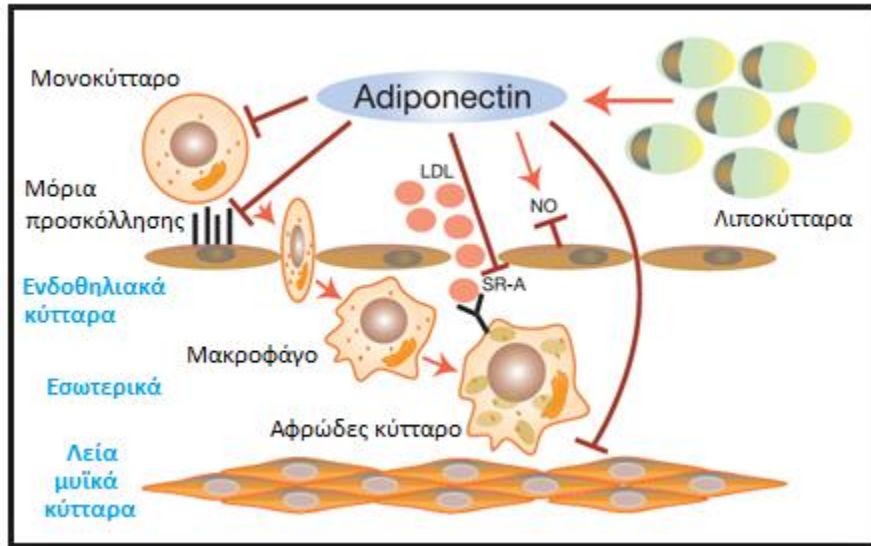
Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι χαμηλές συγκεντρώσεις της αδιπονεκτίνης σχετίζονται με την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, με το αυξημένο πάχος του έσω χιτώνα των καρωτίδων και με την ασθένεια της στεφανιαίας αρτηρίας [51-53]. Η υψηλή συγκέντρωση αδιπονεκτίνης είναι ανεξάρτητη από άλλους καρδιαγγειακούς παράγοντες που σχετίζονται με χαμηλότερη επικράτηση οξέων στεφανιαίων συνδρόμων [53]. Ως εκ τούτου, οι χαμηλές συγκεντρώσεις αδιπονεκτίνης είναι ένας παράγοντας καρδιαγγειακού κινδύνου και οι θεραπευτικές στρατηγικές που ενισχύουν την έκκριση ή τη δράση του συγκεκριμένου λιπώδους ιστού μπορούν να μειώσουν τη συχνότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων [51, 54].

Η μονοκυτταρική προσκόλληση στο αγγειακό ενδοθήλιο και η επακόλουθη διαφοροποίηση των μακροφάγων σε αφρώδη κύτταρα θεωρούνται ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη της αγγειακής νόσου. Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η αδιπονεκτίνη έχει αντιαθηρογονικές και αντι-φλεγμονώδεις ιδιότητες [55-57].

Έχει διαπιστωθεί ότι η αδιπονεκτίνη έχει επιπτώσεις στην προσκόλληση των μονοκυττάρων στο ενδοθήλιο, στη μυελοειδή διαφοροποίηση, καθώς και στην παραγωγή μακροφάγων κυτοκινών και στη φαγοκυττάρωση [58]. Έχει επίσης δειχθεί ότι η αδιπονεκτίνη αναστέλλει τόσο την παραγωγή όσο και τη δράση της TNF- α , μιας κυτοκίνης που έχει άμεσες συνέπειες για τα μόρια προσκόλλησης [55, 59]. Επιπλέον, είναι παραδεκτό ότι η αδιπονεκτίνη καταστέλλει το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων από μακροφάγα [60]. Επομένως, η αδιπονεκτίνη χρησιμεύει ως ένας ρυθμιστής για τον σχηματισμό αφρωδών

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών
και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών
καρδιαγγειακών ασθενειών

κυττάρων και μπορεί να δώσει μια απάντηση στον θεμελιώδη μηχανισμό της σχέσης
αγγειακής φλεγμονής και αθηροσκλήρωσης.



Εικόνα 7: Επίδραση της αδιπονεκτίνης στην αγγειακή και ενδοθηλιακή λειτουργία
[Πηγή, Adiponectin, obesity and cardiovascular disease: M. Fasshauer; Biochimie 86, 779 (2004)]

**B.1.9 ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΕΣ ΚΑΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ
ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΙΣΤΟΥ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗΣ
(METALLOPROTEINASES/MMPS-1, MMPS-2, MMPS-7, MMPS-9 &
TISSUE INHIBITORS OF METALLOPROTEINASE/TIMP-1, TIMP-2)**

Η εξωκυτταρική μήτρα (extracellular matrix – ECM) διαδραματίζει βασικό ρόλο για τη σωστή λειτουργία των οργάνων του ανθρώπινου σώματος, συμπεριλαμβανομένων της καρδιάς και των αγγείων. Αλλαγές στην εξωκυτταρική μήτρα έχουν ενοχοποιηθεί για την παθογένεση πολλών καρδιαγγειακών παθήσεων, συμπεριλαμβανομένης της αθηροσκλήρωσης, των ανευρυσμάτων, της επαναστένωσης μετά από αγγειοπλαστική³² και της συγκοπής [61-63]. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs) και οι αναστολείς τους (TIMPs) έχουν θεμελιώδη ρόλο στην αναδιαμόρφωση της ECM, τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές συνθήκες. Επιπρόσθετα, οι MMPs συμμετέχουν ενεργά στις καρδιαγγειακές παθήσεις, συμπεριλαμβανομένων της αθηροσκλήρωσης [64], της διεσταλμένης μυοκαρδιοπάθειας [65] και του εμφράγματος του μυοκαρδίου [66].

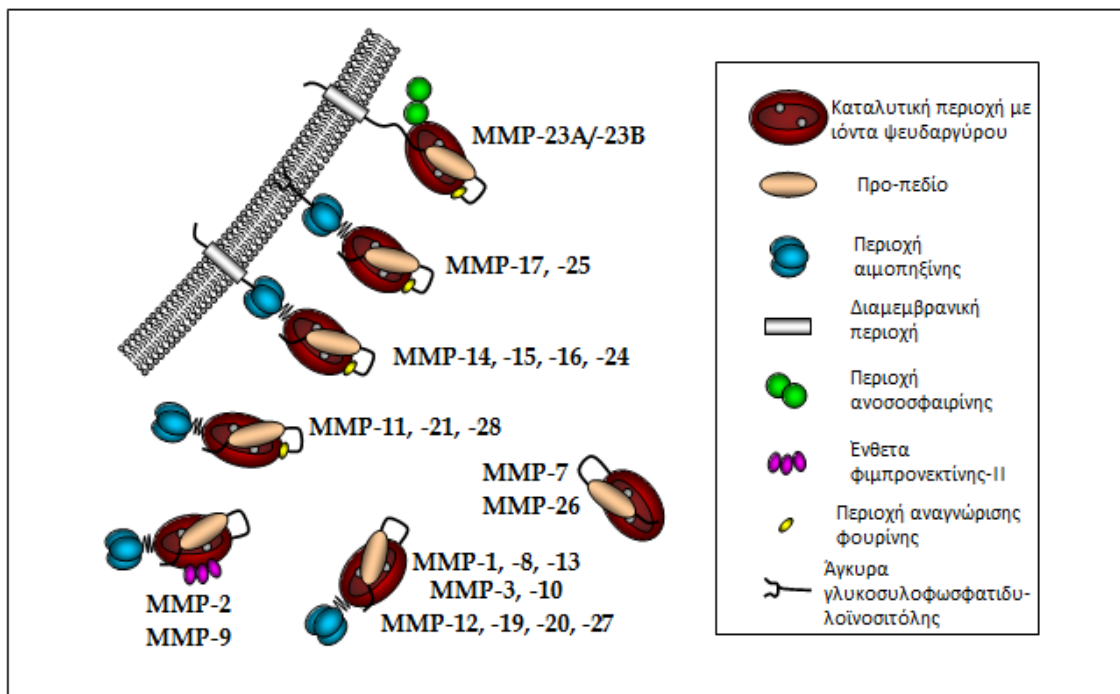
Οι MMPs όχι μόνο λαμβάνουν χώρα στις βιολογικές διεργασίες, όπως είναι η οντογένεση (μορφογένεση, αγγειογένεση, ανάπτυξη), και στην επούλωση των τραυμάτων [67, 68], αλλά καθορίζουν και τη διάρκεια της παθολογικής αναδιαμόρφωσης, όπως είναι η ανάπτυξη ενός όγκου [69]. Οι ίδιες επιπρόσθετα, επηρεάζουν τη διαδικασία σχηματισμού

³² Δημιουργία υπερπλαστικών μηχανισμών στον «τραυματισμό» του αγγείου από τη διάταση

αθηροσκληρωτικής βλάβης. Ένας μηχανισμός του παθογενετικού ρόλου των MMPs περιλαμβάνει την αυξημένη μετανάστευση των λείων αγγειακών μυϊκών κυττάρων, μέσω του εσωτερικού του ελαστικού υμένα, εντός του έσω χώρου, όπου πολλαπλασιάζονται και συμβάλλουν στη δημιουργία της πλάκας [70]. Επιπρόσθετα, η δραστηριότητα των MMPs μπορεί να μειώσει τον όγκο της πλάκας, μειώνοντας την εξωκυττάρια μήτρα στον έσω χιτώνα [71].

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα λεία μυϊκά κύτταρα και οι ινοβλάστες μπορούν να παράγουν MMPs [64] καθώς και το οξειδωτικό στρες, που εμπλέκεται στην καρδιαγγειακή νόσο, τονώνει την παραγωγή και την ενεργοποίηση των MMPs [72]. Αντίθετα, το μονοξείδιο του αζώτου αναστέλλει την παραγωγή MMPs από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα λεία μυϊκά κύτταρα [73, 74].

Οι MMPs συντίθενται ως προ-ένζυμα. Το «πεπτίδιο-σήμα» απομακρύνεται κατά τη διάρκεια της μετάφρασης και οι προ-MMPs δημιουργούνται. Η ενεργοποίηση αυτών των ζυμογόνων αποτελεί, επομένως, ένα σημαντικό ρυθμιστικό βήμα της δραστηριότητας των MMPs. Δεκατρείς MMPs εκκρίνονται από το κύτταρο ως προ-MMPs. Η παρουσία μιας ευπαθούς περιοχής πρωτεΐνωσης ως «δολώμα» στο προπεπτίδιο, επιτρέπει στις πρωτεΐνάσες του ιστού και του πλάσματος ή σε βακτηριακές πρωτεΐνάσες να ενεργοποιήσουν τις προ-MMPs. Διάσπαση της «περιοχής δολώματος» αφαιρεί μόνο ένα μέρος του προπεπτιδίου και πλήρης απομάκρυνση του προπεπτιδίου, συχνά, διεξάγεται πέραν της δράσης των ενδιάμεσων MMPs ή από άλλες ενεργές MMPs. Ο εν λόγω μηχανισμός αναφέρεται ως «Κλιμακωτή ενεργοποίηση» [75].

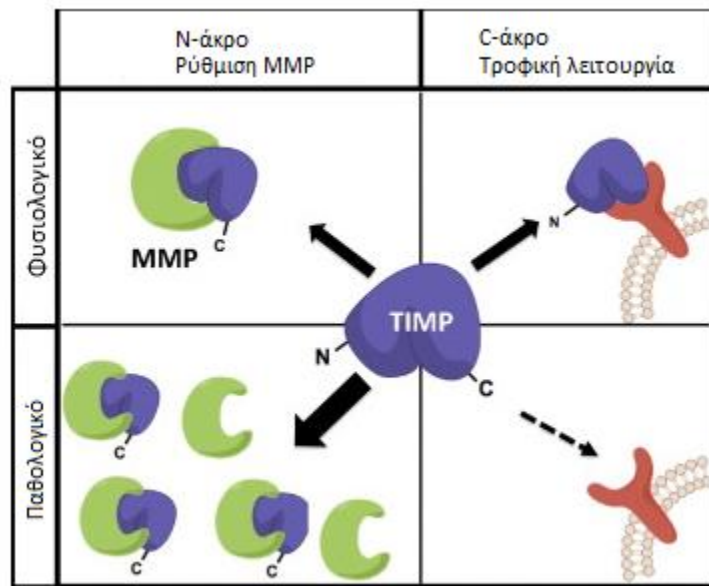


Εικόνα 8: Σχηματική δομή της οικογένειας των MMPs

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών
και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών
καρδιαγγειακών ασθενειών

Η δραστηριότητα των MMPs ελέγχεται από ενδογενείς, στον ιστό, αναστολείς, τους αναστολείς μεταλλοπρωτεϊνών (TIMPs). Υπάρχουν τέσσερα γνωστά μέλη της οικογένειας των TIMPs, οι οποίοι δεσμεύονται με ποικίλες συγγένειες με διαφορετικές MMPs και έτσι αναστέλλουν τις ενεργές μορφές των περισσότερων MMPs [76, 77]. Η ρύθμιση και η διατήρηση της ομοιόστασης της εξωκυττάριας μήτρας, είναι ο πρωταρχικός φυσιολογικός ρόλος των TIMPs. Ωστόσο, αυτές οι πολύ-λειτουργικές πρωτεΐνες ενεργοποιούν τον παράγοντα ανάπτυξης και αναστέλλουν την αγγειογένεση και την απόπτωση [78, 79]. Ο TIMP-1 είναι από τους καλύτερα χαρακτηρισμένους TIMPs, ως προς τη λειτουργία του και δεσμεύεται με υψηλή συγγένεια σε ενεργοποιημένες MMPs, καθώς έχει πολύπλοκους ρόλους στην αναδιαμόρφωση φυσιολογικών και παθολογικών ιστών [80, 81]. Ο TIMP-1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της δομής της αριστερής κοιλίας και της συστολικής λειτουργίας [82, 83]. Τα επίπεδα του TIMP-1 στο πλάσμα είναι αυξημένα σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο [84].

Αυξημένα επίπεδα του TIMP-1 έχουν αναφερθεί σε ανθρώπινες αθηροσκληρωτικές πλάκες, κυρίως σε σχέση με περιοχές της ασβεστοποίησης [85], ενώ επίσης, αυξημένα επίπεδα κυκλοφορούντος στο αίμα TIMP-1, σχετίζονται με σταθερή στεφανιαία [86], καρωτιδική [87] και περιφερική αρτηριακή αθηροσκλήρωση [87]. Ο TIMP-1 σχετίζεται με καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου, ιδίως με την υπέρταση, που μπορεί να επηρεάσει την αγγειακή και την καρδιακή αναδιαμόρφωση, μέσω του υποβιβασμού της εξωκυττάριας μήτρας.



Εικόνα 9: Σχέση MMPs και TIMPs

B.1.10 ΒΙΟΔΕΙΚΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ

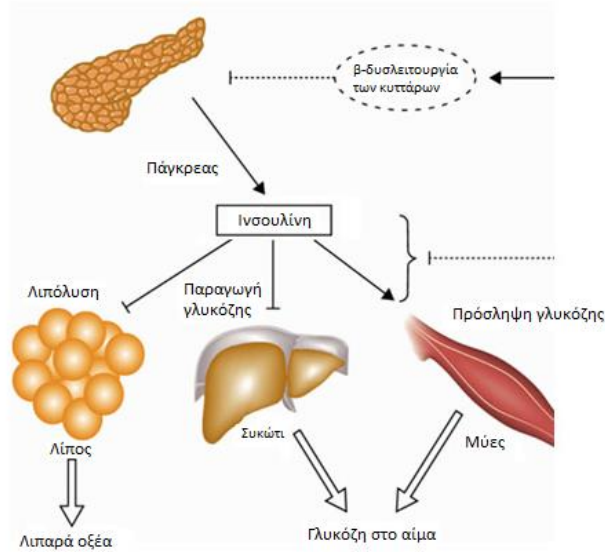
Η ινσουλίνη, που παράγεται στο πάγκρεας, είναι μια ορμόνη που βοηθάει το σώμα να χρησιμοποιήσει την ενέργεια από τη γλυκόζη του αίματος, ή του σακχάρου στο αίμα από την πέψη των τροφίμων. Η αντίσταση στην ινσουλίνη είναι μια μεταβολική διαταραχή, που εμφανίζεται όταν τα κύτταρα του σώματος δεν μπορούν να την προσλάβουν σωστά [88].

Η ινσουλίνη ρυθμίζει τον μεταβολισμό των υδατανθράκων και των λιπών, προωθώντας την απορρόφηση της γλυκόζης από το αίμα στους σκελετικούς μύες και στον λιπώδη ιστό. Οδηγεί, έτσι, το λίπος να αποθηκευτεί και όχι να χρησιμοποιηθεί για ενέργεια. Η ινσουλίνη αναστέλλει, επίσης, την παραγωγή της γλυκόζης από το ήπαρ [89]. Η δράση της ινσουλίνης είναι αρκετά ευρεία:

- διεγείρει τα κύτταρα στο ήπαρ, στους μύες και στον λιπώδη ιστό, προκειμένου να προσλάβουν τη γλυκόζη από το αίμα και να τη μετατρέψουν σε γλυκογόνο, που μπορεί να αποθηκευτεί στο ήπαρ και στους μύες
- αποτρέπει τη χρήση του λίπους ως πηγή ενέργειας. Απουσία ινσουλίνης ή σε συνθήκες όπου είναι σε χαμηλά επίπεδα, η γλυκόζη δεν παραλαμβάνεται από τα κύτταρα του σώματος και, επομένως, το σώμα αρχίζει να χρησιμοποιεί το λίπος ως πηγή ενέργειας
- ελέγχει άλλα συστήματα του σώματος και ρυθμίζει την πρόσληψη αμινοξέων από τα κύτταρα του σώματος
- έχει πολλές άλλες αναβολικές επιδράσεις σε όλο το σώμα

Η επίδραση της ινσουλίνης στην εμφάνιση της καρδιαγγειακής νόσου έχει μελετηθεί εκτενώς, αλλά μέχρι σήμερα καμία μονοσήμαντη σχέση δεν είναι γνωστή [90, 91]. Έχει παρατηρηθεί ότι οι διαταραχές στην ινσουλίνη σχετίζονται με το διαβήτη τύπου II καθώς και με το δυσμενές προφίλ καρδιαγγειακού κινδύνου.

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών
και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών
καρδιαγγειακών ασθενειών



Εικόνα 10: Δράσεις της ινσουλίνης

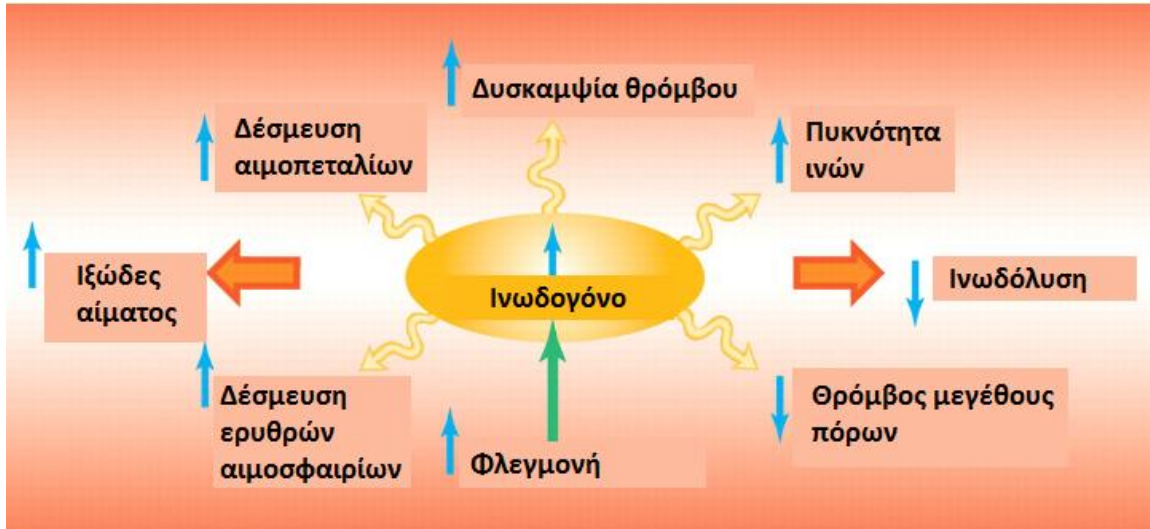
B.1.11 ΒΙΟΔΕΙΚΤΗΣ ΙΝΩΔΟΓΟΝΟ (FIBRINOGEN)

Το ινωδογόνο και οι μεταβολίτες του μπορούν να οδηγήσουν σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία [92]. Αρκετές αθηροσκληρωτικές αλλοιώσεις περιέχουν μεγάλες ποσότητες λευκής ινώδους ουσίας, είτε με τη μορφή θρόμβου στο τοίχωμα της ανέπαφης επιφάνειας της πλάκας, είτε διάχυτες σε όλη την πλάκα. Το εν λόγω φαινόμενο σχετίζεται με μείωση στην ινωδολυτική δραστηριότητα και οι συγκεντρώσεις του πλασμινογόνου δείχνουν ότι παρατηρείται στη στεφανιαία νόσο [93].

Έχει βρεθεί ότι το ινωδογόνο ενεργοποιεί τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, συμβάλλοντας στη μετανάστευσή τους, όπως και τα ομόλογα φιβρονεκτίνης, τα οποία ενεργοποιούν την κυτταρική μετανάστευση και προσκόλληση [94]. Το ινωδογόνο και τα προϊόντα της αποσύνθεσής του «μεσολαβούν» για τη μεταφορά των μορίων προσκόλλησης στην επιφάνεια του ενδοθηλίου και την περαιτέρω μετανάστευσή τους προς τον έσω χιτώνα [95]. Τα προϊόντα αποσύνθεσης που βρίσκονται στο εσωτερικό στρώμα μπορούν να προκαλέσουν τη μιτογένεση και τη σύνθεση του κολλαγόνου, να προσελκύσουν λευκοκύτταρα και να ενισχύσουν τη διαπερατότητα καθώς και τον αγγειακό τόνο. Σε προηγμένες αθηρωματικές πλάκες, η λευκή ινώδης ουσία συμμετέχει στη στενή διασύνδεση της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης και της συσσώρευσης των λιπιδίων, που οδηγούν στη δημιουργία του λιπιδικού πυρήνα της αθηροσκληρωτικής βλάβης [93, 96]. Το ινωδογόνο, επομένως, συμμετέχει στον σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας κατά τα πρώτα στάδια της στεφανιαίας νόσου, γεγονός που υποδηλώνει ότι αποτελεί έναν αιτιολογικό παράγοντα και όχι ένα αποτέλεσμα.

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών
και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών
καρδιαγγειακών ασθενειών

Η αύξηση της ηλικίας, η κληρονομικότητα, τα υψηλά επίπεδα του καπνίσματος, του άγχους, της παχυσαρκίας, η συχνή χρήση στοματικών αντισυλληπτικών, η εμμηνόπαυση, η εμφάνιση διαβήτη, η διαταραχή της ανάπτυξης του εμβρύου, η εκάστοτε εποχή (χειμώνας) και η μόλυνση, καθώς και τα χαμηλά επίπεδα της άσκησης και του αλκοόλ, επηρεάζουν τις συγκεντρώσεις του ινωδογόνου. Η επίδραση του ινωδογόνου στον κίνδυνο ανάπτυξης ισχαιμικής καρδιακής πάθησης σχετίζεται με το αθήρωμα, με το ιξώδες, με τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, με τη λευκή ινώδη ουσία και με την παραμόρφωση του θρόμβου [97].



Εικόνα 11: Πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους ο κίνδυνος θρόμβωσης αυξάνεται, με αυξημένο ινωδογόνο. Αυξημένα επίπεδα ινωδογόνου, τα οποία αποτελούν μέρος της φλεγμονώδους απόκρισης, οδηγούν σε αύξηση της ακαμψίας του θρόμβου, σε αύξηση της αντίστασης του θρόμβου προς ινωδόλυση και σε αύξηση του ιξώδους του αίματος

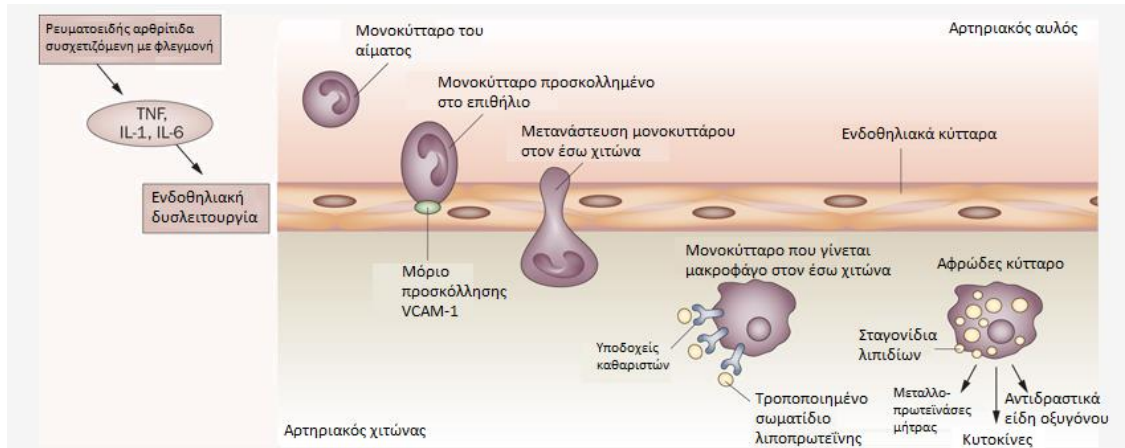
B.1.12 ΒΙΟΔΕΙΚΤΗΣ ΔΙΑΛΥΤΟ ΔΙΑΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΜΟΡΙΟ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΤΟ ΜΟΡΙΟ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ ΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ (SOLUBLE INTERCELLULAR ADHESION MOLECULE/SICAM-1 & SOLUBLE VASCULAR CELL ADHESION MOLECULE/SVCAM-1)

Το αγγειακό ενδοθήλιο θεωρείται, όχι ως ένα παθητικό φράγμα μεταξύ του ρέοντος αίματος και του αγγειακού τοιχώματος, αλλά ως ένας πολύ εξειδικευμένος και μεταβολικά ενεργά ιστός [98, 99]. Οι πιο σημαντικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων, υπό τη διεγερτική επίδραση ποικίλων παραγόντων, αποτελούνται από μία αυξημένη έκφραση των μορίων προσκόλλησης και από σελεκτίνες, των οποίων οι διαλυτές μορφές μπορούν να ανιχνευθούν στο αίμα. Η αυξημένη αυτή έκφραση οδηγεί στην κυλιόμενη ενεργοποίηση και στη σταθερή προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο [100, 101]. Παρά το γεγονός ότι τα μόρια προσκόλλησης είναι ζωτικής σημασίας για τη φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία της καρδιάς και των αιμοφόρων αγγείων, έχουν επίσης εμπλακεί στην παθογένεση της καρδιαγγειακής ασθένειας [102-104].

Το αγγειακό κυτταρικό μόριο προσκόλλησης (VCAM-1) και το μεσοκυττάριο μόριο προσκόλλησης (ICAM-1) έχουν εμφανιστεί σε ανθρώπινες αθηροσκληρωτικές πλάκες [105]. Επιπρόσθετα, η έκφραση του VCAM-1 ταυτοποιήθηκε σε ενεργοποιημένα ενδοθήλια και σε λεία αγγειακά μυϊκά κύτταρα στην πορεία της αθηρογένεσης [106, 107]. Το VCAM-1 εκφράζεται ιδιαίτερα στο νεοαγγειακό ενδοθήλιο [108] και είναι στενά συνδεδεμένο με την αυξημένη συσσώρευση λευκοκυττάρων στον έσω χιτώνα [109]. Επιπλέον, ο αποκλεισμός του VCAM-1 έχει αναφερθεί ότι συμβάλλει στη μείωση της δημιουργίας πλάκας στον έσω χιτώνα [110].

Αν και ο παθολογικός τους ρόλος παραμένει αβέβαιος, αυξημένα επίπεδα των διαλυτών μορίων προσκόλλησης έχουν ανιχνευθεί στο πλάσμα ασθενών με σταθερή στηθάγχη και με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο [175]. Αν και τα αυξημένα επίπεδα του SICAM-1 συνδέονται με μελλοντικά καρδιαγγειακά συμβάντα σε φαινομενικά υγιή άτομα [176, 177], αυτή η σχέση δεν αποδεικνύεται για το VCAM-1 [178].

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών
και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών
καρδιαγγειακών ασθενειών



Εικόνα 12: Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία στην αθηρογένεση [Πηγή, Nature Publishing Group ©Libby, P. Nature 420, 868-874 (2002)]

Γ: ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΙΧΝΗΘΕΤΩΝ

Γ.1 ΠΡΩΤΑΡΧΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Γ.1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ικανότητα να μπορούν να γίνονται κλινικές δοκιμές για πολλαπλούς αναλύτες ταυτόχρονα ονομάζεται πολυπλεξία, και αποδίδει αρκετά πλεονεκτήματα έναντι των παραδοσιακών μονών (διακριτών) δοκιμών αναλύτη, έχοντας μετατραπεί σε μια προτιμώμενη μέθοδο δοκιμής σε πολλά ερευνητικά και διαγνωστικά εργαστήρια. Μπορούν, κατ' αυτόν τον τρόπο, να ανιχνευθούν, να ποσοτικοποιηθούν ή να καταγραφούν εικόνες από πολλαπλές πρωτεΐνες, κυτοκίνες, αλληλουχίες DNA ή RNA, ταυτόχρονα, από ένα μόνο δείγμα, επιτρέποντας έτσι να ληφθούν δεδομένα υψηλής περιεκτικότητας από ελάχιστο όγκο δείγματος και με ελάχιστο χρόνο ανάλυσης και κόστος. Πριν παραστεί η ανάγκη της πολυπλεξίας, οι αναλύσεις γίνονταν με άλλες μεθόδους, πιο χρονοβόρες και κοστοβόρες.

Γ.1.2 ΡΑΔΙΟΑΝΟΣΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Αρχικά, μοναδική επιλογή για τη διεξαγωγή ενός ανοσοπροσδιορισμού ήταν η ραδιοανοσοανάλυση, μια τεχνική που χρησιμοποιεί ραδιενεργά επισημασμένα αντιγόνα³³ [115] ή αντισώματα³⁴ [116]. Στη ραδιοανοσοδοκιμασία, η ραδιενέργεια παρέχει το σήμα, το οποίο δείχνει αν ένα συγκεκριμένο αντιγόνο ή αντίσωμα είναι παρόν στο δείγμα [116].

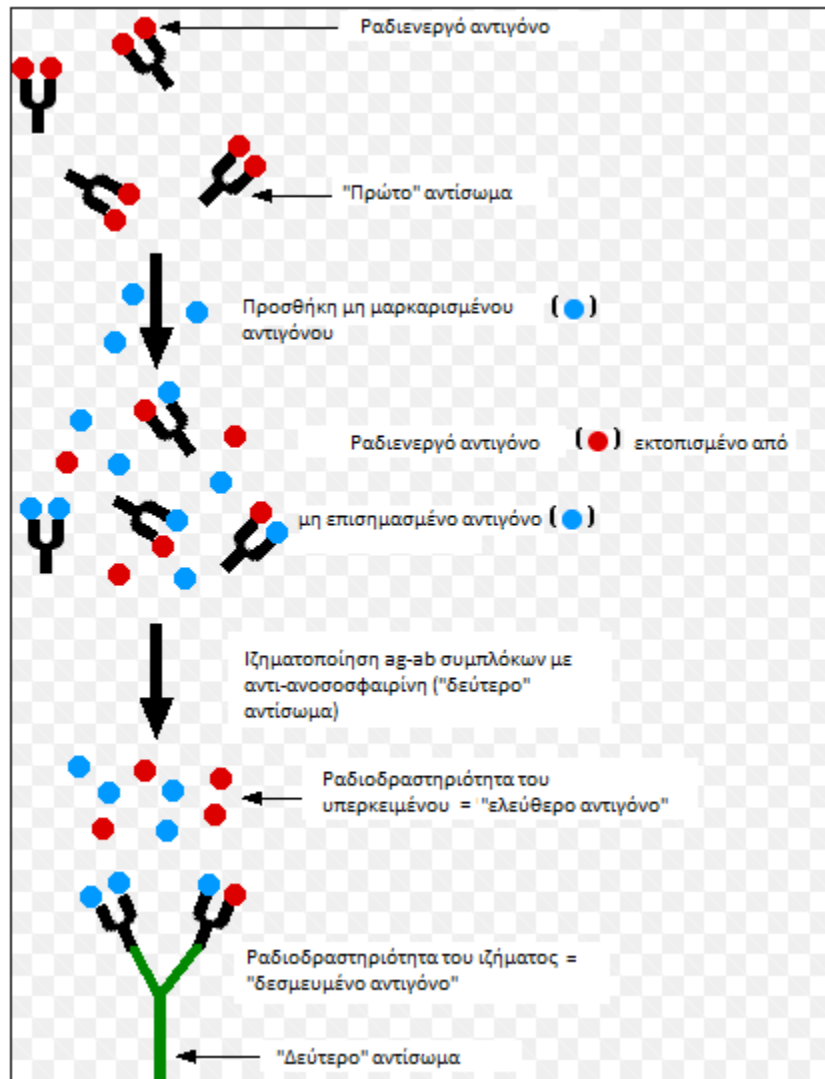
Καθώς η ραδιενέργεια αποτελεί εν δυνάμει απειλή για την υγεία, αναζητήθηκε μια ασφαλέστερη, εναλλακτική λύση. Μια κατάλληλη εναλλακτική λύση για τη ραδιοανοσοδοκιμασία είναι, να υποκαταστήσει ένα μη ραδιενεργό σήμα τη θέση του

³³ πρωτεϊνικός ή ολιγοσακχαριδικός δείκτης που βρίσκεται στην επιφάνεια των κυττάρων, με βάση τον οποίο αναγνωρίζεται το κύτταρο σαν ενδογενές ή εξωγενές, αναγνωρίζεται η προέλευση του κυττάρου και ενεργοποιείται η παραγωγή αντισωμάτων

³⁴ μια ουσία σχήματος Y, η οποία παράγεται από τα B λεμφοκύτταρα σε απάντηση ενός και μοναδικού αντιγόνου, για να το ελέγξει ή να το καταστρέψει

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών
και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών
καρδιαγγειακών ασθενειών

ραδιενεργού. Όταν τα ένζυμα αντιδράσουν με τα κατάλληλα υποστρώματα, μια αλλαγή στο χρώμα λαμβάνει χώρα, γεγονός που χρησιμοποιείται ως σήμα. Ωστόσο, το σήμα πρέπει να συνδέεται με την παρουσία του αντισώματος ή του αντιγόνου. Ως εκ τούτου, το ένζυμο πρέπει να συνδεθεί με ένα κατάλληλο αντίσωμα [117]. Δεδομένου ότι είναι απαραίτητο να απομακρυνθεί ένα οποιοδήποτε αντίσωμα ή αντιγόνο με πλύση, το αντίσωμα ή το αντιγόνο πρέπει να «στερεωθεί» στην επιφάνεια του δοχείου, δηλαδή πρέπει να προετοιμαστεί η ανοσοπροσρόφηση [118].



Εικόνα 13: Λειτουργία ραδιοανοσοπροσδιορισμού
[Πηγή, <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/R/Radioimmunoassay.html>]

Γ.1.3 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Η μέθοδος του ραδιοανοσοπροσδιορισμού είναι μια διαδικασία η οποία χρησιμοποιείται, αν και πλέον όχι τόσο συχνά, σε βιολογικές κυρίως αναλύσεις. Ωστόσο υπάρχουν συγκεκριμένες αντενδείξεις για τη χρήση της:

- ουσίες → η χρήση ραδιενεργών ουσιών είναι επικίνδυνη
- απόρριψη ουσιών → η απόρριψη ραδιενεργών ουσιών μπορεί να είναι προβληματική
- αντιδραστήρια → ο εξοπλισμός και τα αντιδραστήρια είναι ακριβά
- διάρκεια ζωής ουσιών → η διάρκεια ζωής των ραδιοσημασμένων ουσιών που χρησιμοποιούνται είναι μικρή

Γ.1.4 ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ (MICROARRAYS)

Μια μικροσυστοιχία DNA (γνωστή και ως τσιπ DNA ή βιοτσιπ) είναι μια συλλογή από μικροσκοπικές κηλίδες DNA, συνδεδεμένες σε μια στερεή επιφάνεια. Οι επιστήμονες χρησιμοποιούν τις μικροσυστοιχίες DNA για να μετρήσουν, ταυτόχρονα, τα επίπεδα έκφρασης ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων ή το γονότυπο πολλαπλών περιοχών ενός γονιδιώματος. Κάθε κηλίδα DNA περιέχει picomoles (10^{-12} moles) μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA, γνωστή ως ανιχνευτής (ή κηλίδα αναφοράς). Αυτά μπορεί να είναι ένα μικρό τμήμα ενός γονιδίου ή άλλο στοιχείο του DNA που χρησιμοποιείται για να υβριδοποιησει³⁵ ένα cDNA ή cRNA δείγμα, υπό συνθήκες υψηλής αυστηρότητας. Η υβριδοποίηση του ανιχνευτή-στόχου, συνήθως διακρίνεται και προσδιορίζεται ποσοτικά μέσω της ανίχνευσης του φθοροφόρου, του αργύρου, ή μέσω επισημασμένων στόχων χημειοφωταύγειας³⁶ για να προσδιοριστεί η σχετική αφθονία των αλληλουχιών στο στόχο [119].

Η βασική αρχή πίσω από τις μικροσυστοιχίες είναι η υβριδοποίηση μεταξύ δύο κλώνων DNA, ήτοι η ιδιότητα των συμπληρωματικών αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων να μπορούν να συζευκτούν σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου μεταξύ συμπληρωματικών ζευγών βάσης νουκλεοτιδίου. Μετά την έκπλυση μη συγκεκριμένων αλληλουχιών σύνδεσης, μόνο ισχυρά ζεύγη σκελών θα παραμείνουν υβριδοποιημένα. Οι επισημασμένες με φθορισμό αλληλουχίες-στόχοι που συνδέονται με μια αλληλουχία ανιχνευτή παράγουν ένα σήμα, το οποίο εξαρτάται από τις συνθήκες υβριδοποίησης (όπως, επί παραδείγματι, η θερμοκρασία), και υφίστανται πλύση μετά την υβριδοποίηση. Η συνολική ισχύς του σήματος από ένα σημείο, εξαρτάται από την ποσότητα του δείγματος-στόχου που είναι δεσμευμένο με τους παρόντες ανιχνευτές στο σημείο εκείνο. Οι μικροσυστοιχίες

³⁵ δημιουργία δίκλωνου μορίου νουκλεϊκού οξέος – φυσικά ή τεχνητά – με τη σύζευξη συμπληρωματικών βάσεων, ανάμεσα σε δύο κλώνους νουκλεϊκών οξέων, καθένας από τους οποίους προέρχεται από διαφορετική πηγή

³⁶ παραγωγή φωτός από μία χημική αντίδραση

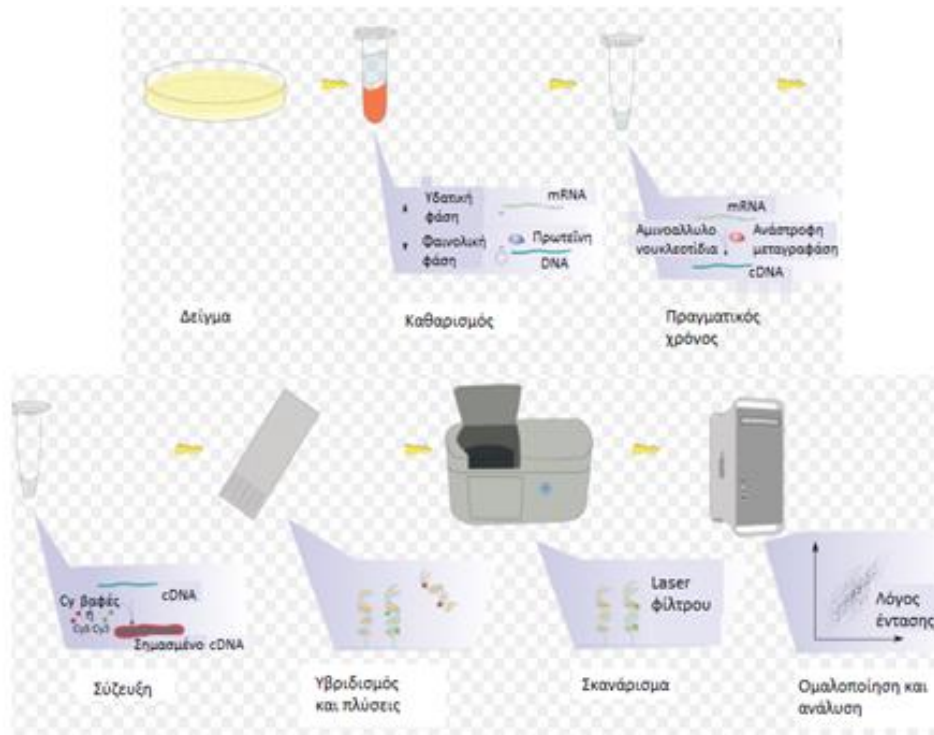
Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών
και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών
καρδιαγγειακών ασθενειών

χρησιμοποιούν σχετική ποσοτικοποίηση, στην οποία η ένταση του ενός χαρακτηριστικού συγκρίνεται με την ένταση του ίδιου χαρακτηριστικού σε διαφορετική κατάσταση, ενώ η ταυτότητα του χαρακτηριστικού είναι γνωστή από τη θέση του [119].

Υπάρχουν διάφοροι τύποι συστοιχιών, με την ευρύτερη διάκριση να αφορά στο κατά πόσον βρίσκονται χωροταξικά διατεταγμένες σε μια επιφάνεια ή σε κωδικοποιημένα σφαιρίδια. Ειδικότερα:

- η παραδοσιακή διάταξη στερεάς φάσης είναι μια συλλογή από τακτικά μικροσκοπικά «σημεία», που ονομάζονται χαρακτηριστικά, το καθένα με χιλιάδες ειδικούς και πανομοιότυπους ανιχνευτές, συνδεδεμένους σε μια στερεή επιφάνεια, όπως το γυαλί, το πλαστικό ή το βιοτσιπ. Η πλειονότητα αυτών των χαρακτηριστικών μπορούν να τοποθετηθούν σε γνωστές τοποθεσίες σε μια ενιαία μικροσυστοιχία DNA
- η εναλλακτική συστοιχία είναι μια συλλογή σφαιριδίων, καθένα με ειδικό ανιχνευτή και με μια αναλογία δύο ή περισσότερων βαφών, οι οποίες δεν περιβάλλονται από τις φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται για την αλληλουχία-στόχο

Οι μικροσυστοιχίες DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση DNA (όπως στο συγκριτικό γονιδιωματικό υβριδισμό) ή την ανίχνευση RNA, που μπορεί ή δεν μπορεί να μεταφραστεί σε πρωτεΐνες. Η διαδικασία της μέτρησης της γονιδιακής έκφρασης μέσω cDNA ονομάζεται ανάλυση έκφρασης ή προφίλ έκφρασης [119].



Εικόνα 14: Απαιτούμενα βήματα σε ένα πείραμα μικροσυστοιχιών

Γ.1.5 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Οι μικροσυστοιχίες είναι ιδιαίτερα σημαντικές για τη μέτρηση και ανίχνευση του γονιδιώματος, παρά ταύτα παρουσιάζουν συγκεκριμένες ιδιομορφίες στη χρήση τους, γεγονός που τις καθιστά όχι τόσο εύχρηστες:

- σχετική συγκέντρωση → οι μικροσυστοιχίες παρέχουν ένα έμμεσο μέτρο της σχετικής συγκέντρωσης. Το σήμα μετράται σε μια συγκεκριμένη θέση και θεωρείται ανάλογο με τη συγκέντρωση του μεμονωμένου είδους σε διάλυμα. Όμως το επίπεδο του σήματος σε μια θέση δεν είναι γραμμικά ανάλογο με τη συγκέντρωση του είδους, και μάλιστα, εξαρτάται από το αν οι συγκεντρώσεις είναι υψηλές ή χαμηλές. Επομένως, το σήμα είναι γραμμικό μόνο σε ένα συγκεκριμένο εύρος συγκεντρώσεων
- σχεδιασμός συστοιχιών → για πολύπλοκα γονιδιώματα θηλαστικών είναι ιδιαίτερα απαιτητικό να σχεδιαστούν συστοιχίες στις οποίες πολλαπλές σχετικές αλληλουχίες δε θα δεσμεύονται στον ίδιο ανιχνευτή στη συστοιχία. Είναι δυνατός ο σχεδιασμός συστοιχιών για την ανίχνευση παραλλαγών, όμως είναι δύσκολο να σχεδιαστούν συστοιχίες που θα ανιχνεύουν μοναδικά κάθε γονίδιο σε γονιδιώματα με πολλά σχετικά γονίδια
- συγκεκριμένη ανίχνευση συστοιχιών → μία συστοιχία DNA μπορεί να ανιχνεύσει μόνο συστοιχίες που η ίδια σχεδιάστηκε να ανιχνεύει. Ως εκ τούτου, μία συστοιχία που έχει σχεδιαστεί χρησιμοποιώντας ένα απομονωμένο γονίδιο, δε θα περιέχει πολλά από τα γονίδια που βρίσκονται σε άλλα απομονωμένα στελέχη

Γ.1.6 ΜΕΘΟΔΟΣ ELISA

Η ενζυμο-συνδεδεμένη ανοσορροφητική δοκιμασία (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay/ELISA) είναι μια δοκιμή που χρησιμοποιεί αντισώματα και αλλαγή χρώματος για τον προσδιορισμό μιας ουσίας. Η ELISA είναι μια δημοφιλής μορφή του τύπου αναλυτικής βιοχημικής δοκιμής «υγρό εργαστήριο (wet lab)», που χρησιμοποιεί ένα ένζυμο στερεάς βάσης για την ανοσοδοκιμασία προκειμένου να γίνει ανίχνευση της παρουσίας μιας ουσίας· συνήθως ενός αντιγόνου για απενεργοποίηση ή καταστροφή του κυττάρου αν κριθεί αναγκαίο, σε ένα υγρό δείγμα. Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικό εργαλείο στην ιατρική και στην παθολογία, καθώς και ως ποιοτικός έλεγχος σε ποικίλες βιομηχανίες [120].

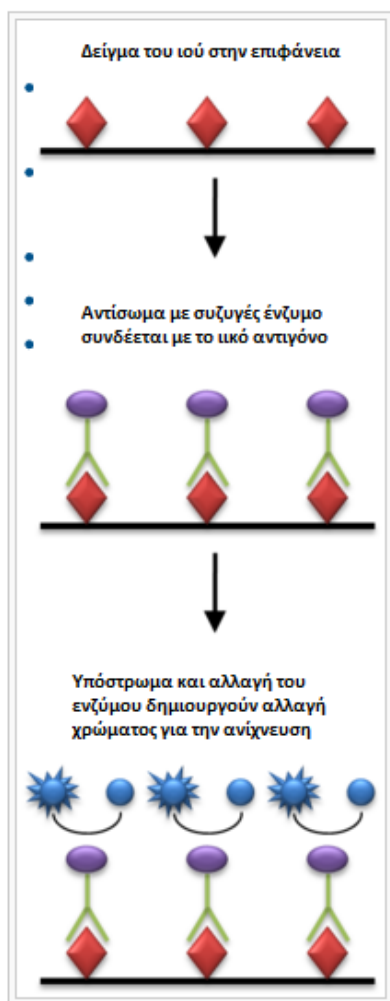
Αρχικά, τα αντιγόνα από το δείγμα συνδέονται σε μια επιφάνεια. Ακολούθως, ένα ειδικό αντίσωμα εφαρμόζεται πάνω από την επιφάνεια, ώστε να μπορεί να συνδεθεί με το αντιγόνο. Το εν λόγω αντίσωμα συνδέεται με ένα ένζυμο και, στο τελικό στάδιο, προστίθεται μια ουσία που περιέχει το υπόστρωμα του ενζύμου. Η επακόλουθη αντίδραση παράγει ένα ανιχνεύσιμο σήμα· συνθηθέστερα, μια αλλαγή χρώματος στο υπόστρωμα. Η πραγματοποίηση μιας ELISA περιλαμβάνει τουλάχιστον ένα αντίσωμα με ειδικεύση για

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών
και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών
καρδιαγγειακών ασθενειών

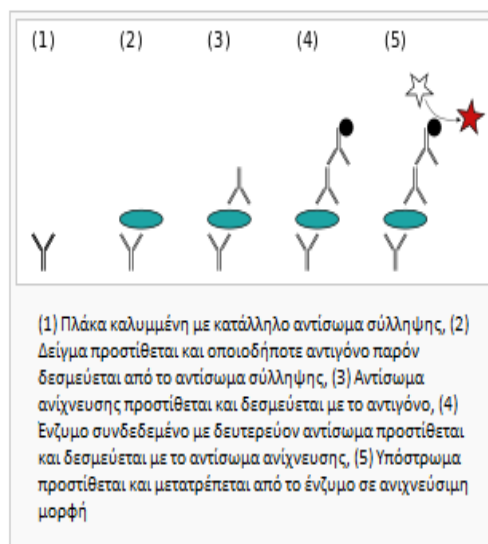
ένα συγκεκριμένο αντιγόνο. Το δείγμα, με μια άγνωστη ποσότητα αντιγόνου, ακινητοποιείται σε ένα στερεό υπόστρωμα (συνήθως μια πλάκα μικροτιτλοδοτήσεως πολυστυρενίου), είτε μη-ειδικά (μέσω προσρόφησης στην επιφάνεια), είτε ειδικά (μέσω σύλληψης από ένα άλλο αντίσωμα ειδικό για το ίδιο αντιγόνο, σε μία «sandwich-ELISA»). Αφότου, το αντιγόνο ακινητοποιηθεί, προστίθεται το αντίσωμα ανίχνευσης, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο με το αντιγόνο. Το αντίσωμα ανίχνευσης μπορεί να συνδεθεί ομοιοπολικά με ένα ένζυμο, ή μπορεί το ίδιο να ανιχνευθεί από ένα δευτερεύον αντίσωμα, που είναι συνδεδεμένο με ένα ένζυμο μέσω βιοσύζευξης. Μεταξύ κάθε βήματος, η πλάκα συνήθως ξεπλένεται με ένα ήπιο απορρυπαντικό διάλυμα για να απομακρυνθούν οποιεσδήποτε πρωτεΐνες ή αντισώματα, τα οποία είναι μη-ειδικά συνδεδεμένα. Μετά το τελικό στάδιο πλύσης, στην πλάκα προστίθεται ένα ενζυματικό υπόστρωμα, για να παραχθεί ένα ορατό σήμα που υποδεικνύει την ποσότητα του αντιγόνου στο δείγμα [120].

Υπάρχουν τρεις τύποι της μεθόδου ELISA: η άμεση ELISA, η sandwich ELISA και η ανταγωνιστική ELISA. Στην άμεση ELISA αναλύεται η παρουσία ενός αντιγόνου και, σε αυτήν, χρησιμοποιείται μόνο ένα πρωτεύον σημασμένο αντίσωμα. Στη sandwich ELISA γίνεται χρήση δύο αντισωμάτων, ενός σύλληψης και ενός ανίχνευσης. Ανάμεσα στα δύο, παρεμβάλλεται το προς μέτρηση αντιγόνο. Στο τέλος προστίθεται και ένα δευτερεύον αντίσωμα το οποίο είναι σημασμένο. Στην ανταγωνιστική ELISA περιλαμβάνεται ένα σημασμένο αντιγόνο, αντί για αντίσωμα, το οποίο ανταγωνίζεται για τις θέσεις σύνδεσης του πρωτογενούς αντισώματος με το αντιγόνο του δείγματος (μη σημασμένο). Όσο λιγότερο αντιγόνο υπάρχει στο δείγμα, τόσο περισσότερο σημασμένο αντιγόνο εισάγεται στην πλάκα και, έτσι, το σήμα είναι ισχυρότερο [120].

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών καρδιαγγειακών ασθενειών



Εικόνα 15: Διάγραμμα άμεσης ELISA



Εικόνα 16: Διάγραμμα sandwich ELISA

Γ.1.7 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Παρά το γεγονός ότι η ELISA χρησιμοποιείται ευρέως, δύναται να έχει περιορισμούς:

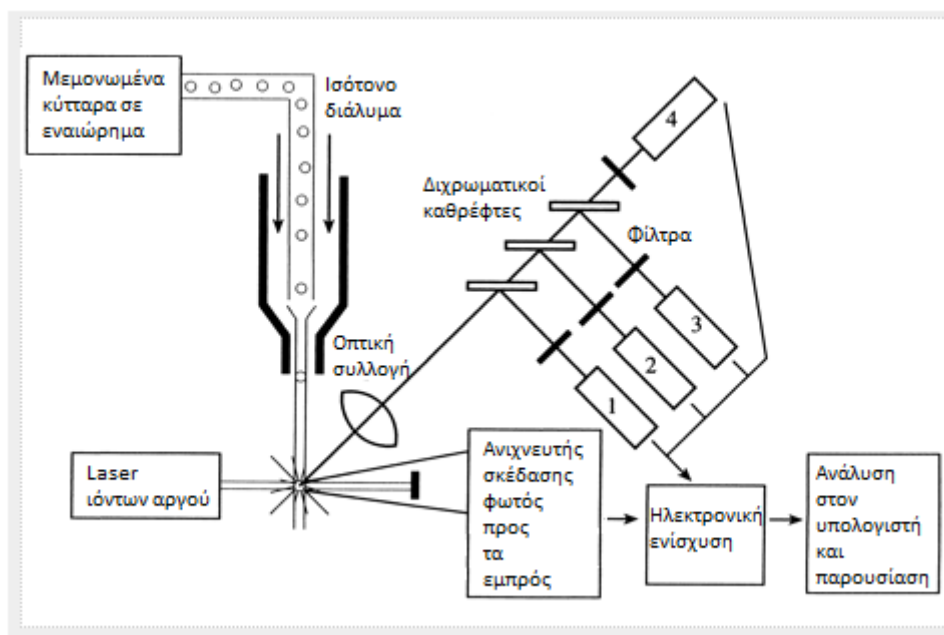
- όγκος δείγματος → μια στερεής-φάσης ELISA τυπικά εκτελείται σε μια μικροπλάκα 96 πηγαδιών (wells), και απαιτεί ένα σχετικά μεγάλο ποσό του δείγματος
- μη εξειδικευμένο δέσιμο (binding) → η μέθοδος ELISA είναι πιθανό να περιορίζεται από μη ειδική δέσμευση και αυξημένο βάθος, εξαιτίας της μεγάλης επιφανειακής περιοχής των ατομικών πηγαδιών της μικροπλάκας ELISA και της υδρόφοβης δέσμευσης του αντισώματος σύλληψης
- ευκαμψία → δεν επιτρέπεται η ευκαμψία στη χημική δοκιμή σε μονή ή σε πολλαπλή μορφή
- κόστος → το κόστος της sandwich ELISA είναι αρκετά αυξημένο
- χρόνος και εργασιακά κόστη → ο συνολικός χρόνος της χημικής δοκιμής είναι σχετικά μικρός, ενώ υπάρχει αυξημένο εργασιακό κόστος
- αναλυτική απόδοση → υπάρχει χρωματομετρική ανίχνευση, που γίνεται με τη μεσολάβηση ενός ενζύμου και επιπλέον υπάρχει παθητική επένδυση των μικροπλακών ELISA, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε υψηλότερη πυκνότητα του αντισώματος σύλληψης ανά επιφανειακή περιοχή, και τα αντισώματα σύλληψης δε θα ξεπλυθούν κατά τη διάρκεια της δοκιμής

Γ.1.8 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ (FLOW CYTOMETRY)

Η κυτταρομετρία ροής μετρά τα οπτικά χαρακτηριστικά και τα χαρακτηριστικά φθορισμού των μεμονωμένων κυττάρων (ή οποιουδήποτε άλλου σωματιδίου, συμπεριλαμβανομένων των πυρήνων, των μικροοργανισμών, των παρασκευασμάτων από χρωμοσώματα και των μικροσφαιριδίων από λάτεξ). Τα μεμονωμένα κύτταρα διαθέτουν ορισμένες φυσικές ιδιότητες, όπως το μέγεθος (που αντιπροσωπεύεται από τη σκέδαση του φωτός στην εμπρός γωνία) και την εσωτερική πολυπλοκότητα (που αντιπροσωπεύεται από τη δεξιά γωνία σκέδασης). Οι χρωστικές φθορισμού μπορούν να δεσμεύονται ή να παρεμβάλλονται σε διαφορετικά κυτταρικά συστατικά, όπως το DNA ή το RNA. Επιπρόσθετα, τα συζευγμένα με τις χρωστικές φθορισμού αντισώματα μπορούν να δεσμεύσουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες στις μεμβράνες των κυττάρων ή στο εσωτερικό τους. Όταν τα σημασμένα κύτταρα περνούν από μία πηγή φωτός, τα φθορίζοντα μόρια διεγείρονται σε μια υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση. Μετά την επιστροφή στην ηρεμία, τα φθοροχρώματα εκπέμπουν φωτεινή ενέργεια σε υψηλότερα μήκη κύματος. Η χρήση πολλαπλών φθοροχρωμάτων, το καθένα με παρόμοια μήκη κύματος διέγερσης και διαφορετικά μήκη κύματος εκπομπής (ή «χρώματα»), επιτρέπει σε διάφορες ιδιότητες των κυττάρων να μετρηθούν ταυτόχρονα. Αν και είναι διαθέσιμες πολλές άλλες χρωστικές, οι κοινά χρησιμοποιούμενες χρωστικές περιλαμβάνουν ιωδιούχο προπίδιο, φυκοερυθρίνη (χρησιμοποιείται τυπικά για κυτταρομετρία ροής και άλλες εφαρμογές που απαιτούν είτε υψηλή ευαισθησία είτε ταυτόχρονη πολύχρωμη ανίχνευση, εμφανίζει εξαιρετικά φωτεινό φθορισμό και

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών
και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών
καρδιαγγειακών ασθενειών

υψηλές αποδόσεις κβάντων) [116] και φλουορεσκεΐνη [121-126]. Μέσα σε ένα κυτταρόμετρο ροής, τα κύτταρα σε εναιώρημα έλκονται από ένα ρεύμα που δημιουργείται από ένα ισότονικό υγρό για τη δημιουργία στρωτής ροής, επιτρέποντας στα κύτταρα να περάσουν χωριστά, μέσω ενός σημείου. Στο σημείο αυτό, μια δέσμη μονοχρωματικού φωτός, συνήθως από ένα laser, τέμνει τα κύτταρα. Το εκπεμπόμενο φως διαχέεται προς όλες τις κατευθύνσεις και συλλέγεται μέσω οπτικών ινών που το κατευθύνουν σε μια σειρά φίλτρων και διχρωματικών καθρέφτων που απομονώνουν συγκεκριμένες ζώνες μήκους κύματος. Τα φωτεινά σήματα ανιχνεύονται από σωλήνες φωτοπολλαπλασιαστών και ψηφιοποιούνται για ανάλυση στον υπολογιστή. Οι προκύπτουσες πληροφορίες συνήθως εμφανίζονται σε ιστόγραμμα ή σε διδιάστατες μορφές σε διάγραμμα με κουκκίδες.



Εικόνα 17: Σχηματοποίηση ενός κυτταρομέτρου ροής.

Τα μεμονωμένα κύτταρα που βρίσκονται σε εναιώρημα συγκεντρώνονται υδροδυναμικά με το ισότονο διάλυμα για να τμηθούν από ένα laser ιόντων αργού. Τα σήματα συγκεντρώνονται από έναν ανιχνευτή σκέδασης φωτός στην εμπρός γωνία, έναν πλευρικό ανιχνευτή σκέδασης (1) και πολλαπλούς ανιχνευτές εκπομπής φθορισμού (2-4). Τα σήματα ενισχύονται και μετατρέπονται σε ψηφιακή μορφή για ανάλυση και παρουσίαση στην οθόνη του υπολογιστή

Γ.1.9 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Η κυτταρομετρία ροής είναι η πλέον διαδεδομένη μέθοδος για τη μέτρηση κυττάρων ή γενικότερα οποιουδήποτε σωματιδίου. Παρ' όλα αυτά, η ίδια αντιμετωπίζει διάφορους περιορισμούς που πρέπει να υπερνικηθούν συνδυαστικά με άλλες μεθόδους:

- ακρίβεια → σε ομοιόμορφο πληθυσμό κυττάρων, τα επιθυμητά δεδομένα είναι οι μέσες πυκνότητες των υποδοχέων. Η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής παρέχει την πληροφορία της μέσης πυκνότητας, ταυτόχρονα και με άλλες πληροφορίες που δεν είναι απαραίτητες, καθιστώντας έτσι την τεχνική αυτή πιο ακριβή από άλλες εναλλακτικές
- ταχύτητα → οι διαλογείς της κυτταρομετρίας ροής είναι πολύ ακριβείς και παρέχουν πληροφορίες από μικρούς ή πολύπλοκους υποπληθυσμούς. Όμως ακόμη και αυτοί δεν είναι ιδιαίτερα γρήγοροι ώστε να επιτύχουν τα επιθυμητά αποτελέσματα. Ένας διαλογέας υψηλής ταχύτητας μπορεί να μετρήσει μέχρι και 100 κύτταρα/ώρα, όταν αναφέρεται σε έναν υποπληθυσμό που αποτελεί το 20% του συνολικού πληθυσμού. Αυτό είναι ένα πολύ χαμηλό ποσοστό για πολλά πειράματα
- άμεση επεξεργασία δειγμάτων → απαιτούνται δείγματα, τα οποία πρέπει να υποβάλλονται σε επεξεργασία το συντομότερο δυνατό μετά τη συλλογή τους. Λανθασμένη αποθήκευση των δειγμάτων ή αποθήκευσή τους για μεγάλες χρονικές περιόδους, μπορεί να οδηγήσει σε φυσική απόπτωση των κυττάρων, με συνέπεια ψευδώς θετικά αποτελέσματα
- εξειδικευμένο προσωπικό → ο εξοπλισμός της κυτταρομετρίας ροής είναι ιδιαίτερα σύνθετος και απαιτούνται εκπαιδευμένοι χειριστές για τη λειτουργία των μηχανημάτων

Γ.1.10 ΘΕΜΑΤΑ ΠΡΟΣ ΕΠΙΛΥΣΗ

Από την προηγηθείσα ανάλυση, καθίσταται σαφές ότι προκειμένου να υλοποιηθούν αναλύσεις σε βιολογικό, κυρίως, υλικό χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι, όπως είναι ο ραδιοανοσοπροσδιορισμός, οι μικροσυστοιχίες, η μέθοδος ELISA και η κυτταρομετρία ροής. Κάθε τεχνική έχει τα δικά της δυνατά στοιχεία και μέσω αυτών λαμβάνονται τα επιθυμητά αποτελέσματα. Φυσικά, δεν υπάρχουν μόνο θετικά στοιχεία σε κάθε μία εξ' αυτών, αλλά και αρνητικά, τα οποία όσο αναπτύσσεται η τεχνολογία και εξελίσσεται η επιστήμη πρέπει να περιοριστούν ή και να εξαλειφθούν.

Ενδεικτικά, μπορούν να αναφερθούν κάποια προβλήματα που αντιμετωπίζουν οι εν λόγω τεχνικές:

- μεγάλος όγκος δείγματος, όπου αφενός, η συλλογή του είναι δύσκολη και αφετέρου, απαιτεί ειδικά κατασκευασμένα δοχεία ώστε να περιλαμβάνεται όλη η απαιτούμενη ποσότητα για το αντίστοιχο πείραμα

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών
και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών
καρδιαγγειακών ασθενειών

- ακριβιά αντιδραστήρια, που μάλιστα είναι εξατομικευμένα για τη συγκεκριμένη περίπτωση η οποία μελετάται κάθε φορά, και ειδικά, ώστε να αφορούν σε συγκεκριμένο γονίδιο ή πρωτεΐνη ή αντίσωμα ή αντιγόνο
- επεξεργασία δειγμάτων, η οποία είναι επιτακτικό να γίνει άμεσα αφότου συλλεχθεί το δείγμα, καθώς όσο περισσότερη χρονική καθυστέρηση υφίσταται, τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα τα αποτελέσματα να είναι ψευδή
- απόδοση ανάλυσης, όπου ειδικά στις χρωματομετρικές ανιχνεύσεις μπορεί να προκληθούν συσσωματώματα κατά την πειραματική διαδικασία, και άρα να μην ακολουθηθεί με τον ορθό τρόπο η ανάλυση, και ως εκ τούτου να μην είναι ασφαλή τα συμπεράσματα
- χρόνος επεξεργασίας δειγμάτων, όπου απαιτείται αρκετή διάρκεια για την προετοιμασία των δειγμάτων, ενώ επίσης χρειάζεται εξίσου μεγάλη διάρκεια για την εκτέλεση του πειράματος
- ταχύτητα, όπου ακόμη και διαλογείς υψηλής ταχύτητας μετράνε πολύ μικρό μέρος του συνολικού πληθυσμού, καθιστώντας σαφές ότι δεν είναι ιδιαίτερα γρήγοροι για να επιτευχθούν τα επιθυμητά αποτελέσματα
- κόστος σε χρόνο και σε χρήμα, καθώς τα μηχανήματα χρειάζονται ανά τακτά διαστήματα βαθμονομήσεις και τεχνικό έλεγχο από εξειδικευμένους χειριστές

Βάσει των προαναφερθέντων, οι συγκεκριμένες τεχνικές δεν χρησιμοποιούνται πλέον τόσο εντατικά. Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί μια νέα τεχνολογία – δοκιμή πολυπλεξίας με βάση μικροσφαιρίδια – η οποία έχει παραγκωνίσει αρκετά από τα προβλήματα που υπήρχαν, διευκολύνοντας έτσι το έργο του προσωπικού των ερευνητικών κέντρων, των νοσοκομείων, των φαρμακευτικών εταιρειών κ.α. Όπως θα τεκμηριωθεί και σε μεταγενέστερο κεφάλαιο, χάρη σε αυτή την τεχνική αίρονται ένα-ένα τα όποια ζητήματα υφίστανται και τα πειράματα διεξάγονται με μεγαλύτερη ευκολία σε πολλαπλό επίπεδο.

Δ: ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

Δ.1 ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΕΣ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙΣ

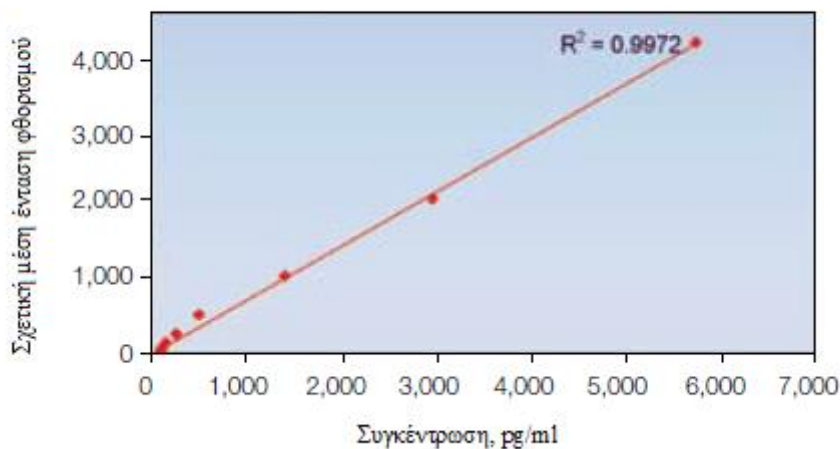
Δ.1.1 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΠΟΥ ΑΦΟΡΑ ΣΕ ΠΟΛΛΑΠΛΕΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

Οι δοκιμές των κυτοκινών βασίζονται σε πολυπαραμετρικές ανοσολογικές αναλύσεις μικροσωματιδίων. Οι συγκεντρώσεις των αναλυτών σε μια τέτοια μελέτη ποσοτικοποιούνται μέσω της βαθμονόμησης ή της πρότυπης καμπύλης. Ειδικότερα, μια σειρά γνωστών συγκεντρώσεων ενός αναλύτη χρησιμοποιείται για τη δημιουργία ενός διαγράμματος, με άξονες την ένταση του σήματος και τη συγκέντρωση. Το διάγραμμα είναι μαθηματικά προτυποποιημένο για να εξάγει μια συνάρτηση, η οποία χρησιμοποιείται για να προβλέψει τις συγκεντρώσεις άγνωστων δειγμάτων. Ο τύπος της καμπύλης, καθώς και η προσαρμογή του μοντέλου, έχουν άμεση επίδραση στην ακρίβεια των αποτελεσμάτων. Για το λόγο αυτό, η δημιουργία της καμπύλης είναι ένα ζωτικό στοιχείο της ανοσολογικής διαδικασίας.

Δ.1.2 ΓΡΑΜΜΙΚΗ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗ

Ο απλούστερος τρόπος για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων από μια πρότυπη καμπύλη είναι να δημιουργηθεί ένα διάγραμμα της συγκέντρωσης ως προς την «απάντηση», κάνοντας χρήση του γραμμικού τμήματος της καμπύλης απόκρισης [127]. Στην εικόνα 18 παρουσιάζεται μια κλινική δοκιμή με χρήση της γραμμικής παλινδρόμησης. Για τον προσδιορισμό της εκτίμησης της γραμμικής προσαρμογής χρησιμοποιείται η τιμή του R^2 [128]. Η γραμμική προσαρμογή με τιμή $R^2 > 0.99$ θεωρείται ότι «εφαρμόζει» εξαιρετικά καλά [127]. Το κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η υπερβολική απλότητά της. Από τη στιγμή που προκαθοριστεί το γραμμικό εύρος μιας δοκιμής, επιπρόσθετες πρότυπες συγκεντρώσεις εντός του συγκεκριμένου εύρους μπορούν να προστεθούν για να βελτιώσουν την ακρίβεια της προσαρμογής.

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών
και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών
καρδιαγγειακών ασθενειών



Εικόνα 18: Απεικόνιση κλινικής δοκιμής με χρήση γραμμικής παλινδρόμησης

Δ.1.3 ΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗ

Τα δεδομένα των ανοσολογικών δοκιμών μπορούν να μοντελοποιηθούν χρησιμοποιώντας μία ρουτίνα μη γραμμικής παλινδρόμησης, ευρέως γνωστή ως λογιστική παλινδρόμηση [129]. Στην εικόνα 19 απεικονίζεται η λογιστική παλινδρόμηση μίας πρότυπης καμπύλης, που αφορά σε ανοσολογική δοκιμή, όπου ο λογάριθμος της συγκέντρωσης εμφανίζεται στον άξονα x και η «απάντηση» (σχετική μέση ένταση φθορισμού) στον άξονα y. Η λογιστική παλινδρόμηση χρησιμοποιείται ευρύτατα σε διάφορες δοκιμές [129]. Δύο είναι οι πιο γνωστές λογιστικές εξισώσεις, η λογιστική 4 παραμέτρων (4 parameter logistic, 4PL), και η λογιστική 5 παραμέτρων (5 parameter logistic, 5PL) [188]. Ανάλογα με τα δεδομένα, η μία παλινδρόμηση μπορεί να παράγει καλύτερα αποτελέσματα από την άλλη.

Δ.1.4 ΛΟΓΙΣΤΙΚΗ 4-ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ (4PL)

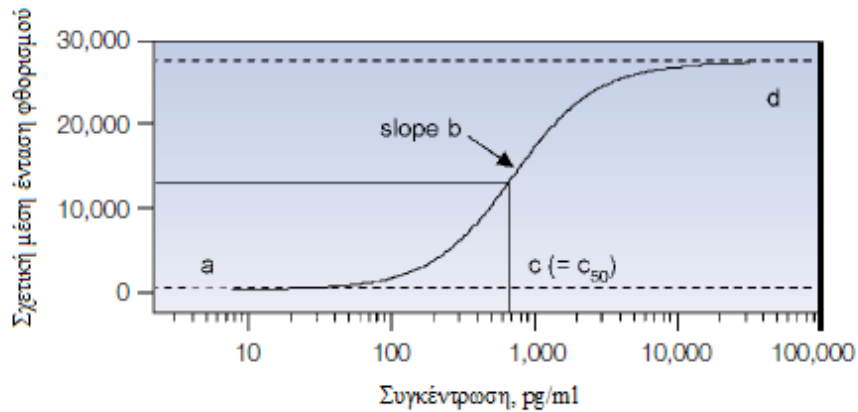
Η εξίσωση 4PL περιλαμβάνει 4 παραμέτρους ή μεταβλητές σχετιζόμενες με τις γραφικές ιδιότητες της καμπύλης, όπως φαίνεται στην εικόνα 19. Η «παραγωγή» της 4PL καμπύλης εκφράζεται ως:

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

όπου:

- a: η αναμενόμενη απάντηση σε μηδενική συγκέντρωση
- b: ο συντελεστής κλίσης
- c: η συγκέντρωση στο μέσο της απόστασης (mid-range), c_{50}
- d: η αναμενόμενη απάντηση σε άπειρη συγκέντρωση

Από τη στιγμή που δημιουργείται η εξίσωση 4PL από ένα σύνολο δεδομένων, οι τιμές και για τις τέσσερις παραμέτρους προκαθορίζονται. Η εξίσωση, μπορεί από αυτό το σημείο και μετά, να χρησιμοποιηθεί για να υπολογίσει άγνωστες συγκεντρώσεις (x) από τα κλινικά δεδομένα (y), όπως γίνεται και στη γραμμική συνάρτηση $y = mx + b$.



Εικόνα 19: Απεικόνιση κλινικής δοκιμής με χρήση πρότυπης καμπύλης προσαρμοσμένης με παλινδρόμηση 4PL

Δ.1.5 ΛΟΓΙΣΤΙΚΗ 5-ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ (5PL)

Η εξίσωση 5PL είναι ισοδύναμη με την 4PL, με την επιπρόσθετη παράμετρο που χρησιμοποιείται για την ασυμμετρία [188]. Η επιπρόσθετη παράμετρος παρέχει καλύτερη προσαρμογή, όταν η καμπύλη «απάντησης» δεν είναι συμμετρική. Η «παραγωγή» της 5PL εκφράζεται ως:

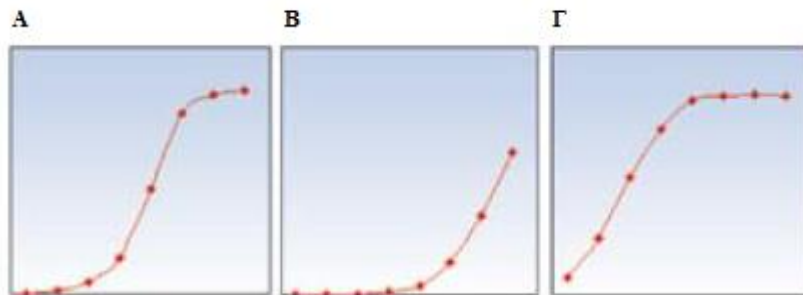
$$y = d + \frac{a - d}{[1 + (\frac{x}{c})^b]^g}$$

όπου:

- a: η αναμενόμενη απάντηση σε μηδενική συγκέντρωση
- b: ο συντελεστής κλίσης
- c: η συγκέντρωση στο μέσο της απόστασης (mid-range), c_{50}
- d: η αναμενόμενη απάντηση σε άπειρη συγκέντρωση
- g: ο παράγοντας ασυμμετρίας

Δ.1.6 4PL – 5PL ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗ

Ο τύπος της λογιστικής εξίσωσης που θα αποδώσει την καλύτερη προσαρμογή, μέσα από ένα σύνολο σημείων, εξαρτάται από την «απάντηση» ή το σχήμα της πρότυπης καμπύλης της δοκιμής. Τρεις διαφορετικοί τύποι καμπύλης «απάντησης» μπορούν να προκύψουν όταν γίνονται ανοσολογικές δοκιμές: (α) μια σιγμοειδής ή σχήματος S καμπύλη (εικόνα 20Α), (β) μια καμπύλη χαμηλής-«απάντησης» (εικόνα 20Β), ή μια καμπύλη υψηλής-«απάντησης» (εικόνα 20Γ). Εάν η καμπύλη είναι σχήματος S και συμμετρική (παραπλήσια σχήματα και στα δύο «τελειώματα» του S), μία 4PL ή μία 5PL παλινδρόμηση, θα αποδώσει παρόμοια αποτελέσματα. Όταν η καμπύλη δεν είναι συμμετρική, όπως στις εικόνες 20Β ή 20Γ, καλύτερη προσαρμογή επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας την παλινδρόμηση 5PL, αφού λαμβάνει υπόψη και τον παράγοντα ασυμμετρίας.



Εικόνα 20: Τρία σχήματα πρότυπων καμπυλών, που εμφανίζονται σε αναλύσεις δεδομένων κλινικών δοκιμών. Α: σιγμοειδής ή σχήματος S καμπύλη, Β: χαμηλής-«απάντησης» καμπύλη, Γ: υψηλής-«απάντησης» καμπύλη

Δ.1.7 ΓΡΑΜΜΙΚΗ Ή ΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗ

Οι μέθοδοι της γραμμικής και της λογιστικής παλινδρόμησης έχουν διακριτά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Η γραμμική παλινδρόμηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί εύκολα όταν γίνεται ανάλυση στα επίπεδα κυτοκινών σε ορό ή σε πλάσμα. Το βιολογικό εύρος των περισσότερων κυτοκινών σε ορό βρίσκεται εντός του γραμμικού εύρους της πρότυπης καμπύλης και, γι' αυτό, η γραμμική παλινδρόμηση ενδείκνυται για ανάλυση. Ορισμένα δείγματα χρειάζονται αραιώση και ανάλυση ξανά, εάν το αποτέλεσμα υπερβαίνει το εύρος που παρέχει η πρότυπη καμπύλη. Αν και η γραμμική παλινδρόμηση χρειάζεται λιγότερα σημεία δεδομένων ή πρότυπα δείγματα (π.χ. 3) συγκρινόμενη με τη λογιστική παλινδρόμηση (η 4PL και η 5PL απαιτούν 6 σημεία δεδομένων), το καλύτερο αποτέλεσμα επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας τουλάχιστον 6 σημεία ανεξαρτητως του τύπου παλινδρόμησης [128].

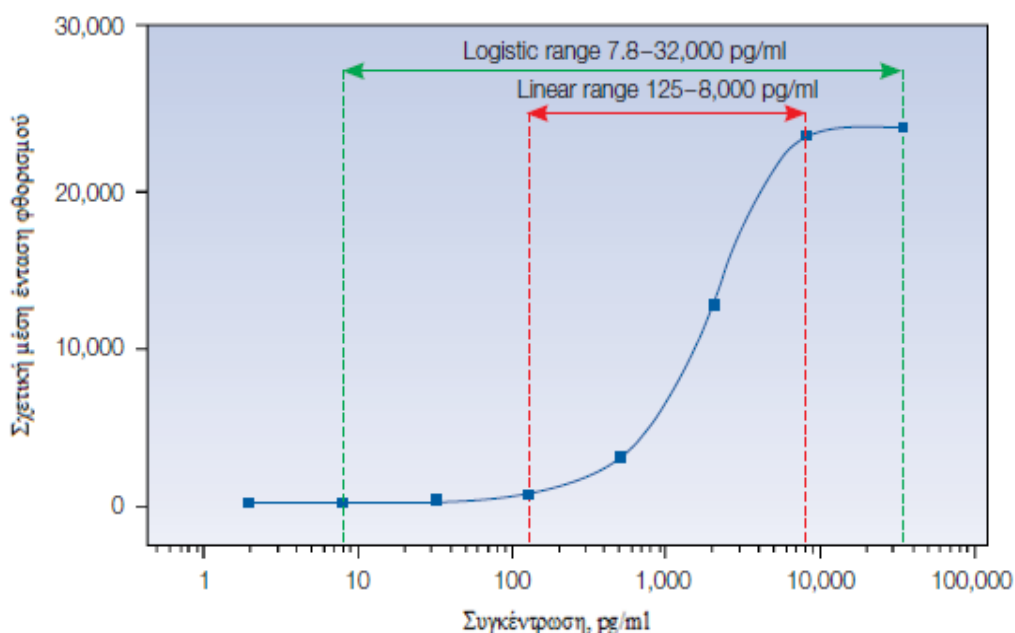
Αντίθετα, η λογιστική παλινδρόμηση ενδέχεται να μην είναι τόσο χρήσιμη όταν γίνεται ανάλυση δειγμάτων προερχομένων από πολυπαραμετρική ανάλυση. Κάθε αναλύτης επιδεικνύει μια διαφορετική «απάντηση» και, κατ' αντιστοιχία, διαφορετικό γραμμικό

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών
και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών
καρδιαγγειακών ασθενειών

εύρος επομένως, είναι δύσκολο να επιλεγεί ένα καθολικό σύνολο προτύπων δειγμάτων, τα οποία να καλύπτουν όλους τους αναλύτες.

Η λογιστική παλινδρόμηση προσφέρει ακριβή ποσοτικοποίηση σε ένα μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων, συγκρινόμενη με τη γραμμική παλινδρόμηση, το οποίο αποτελεί και το βασικό πλεονέκτημα για να χρησιμοποιηθεί. Το ότι το εύρος, με χρήση της λογιστικής παλινδρόμησης, είναι ευρύτερο, σε σύγκριση με τη γραμμική παλινδρόμηση, αποδεικνύεται και από την εικόνα 21. Οι κόκκινες μπάρες υποδεικνύουν το εύρος των συγκεντρώσεων, δείχνοντας 70-130% ανάκτηση με χρήση της γραμμικής παλινδρόμησης ($R^2 = 0.9996$), ενώ οι πράσινες μπάρες υποδηλώνουν το εύρος των συγκεντρώσεων, δείχνοντας 70-130% ανάκτηση χρησιμοποιώντας τη λογιστική παλινδρόμηση. Το δυναμικό εύρος με χρήση γραμμικής παλινδρόμησης είναι στενότερο από το αντίστοιχο με χρήση λογιστικής παλινδρόμησης.

Από πρακτικής πλευράς, η λογιστική παλινδρόμηση είναι πολύ πιο ευέλικτη σε σχέση με τις πρότυπες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται σε πολυπαραμετρικές αναλύσεις. Ένα εύρος της τάξης του 1.95-32,000 pg/ml είναι αποδεκτό για όλους τους αναλύτες σε κλινικές δοκιμές κυτοκινών, γεγονός που διευκολύνει την ανάλυση των δεδομένων, συγκρινόμενο με τη γραμμική παλινδρόμηση. Πρέπει να σημειωθεί ότι, αν και είναι εφικτή η μετατροπή τόσο στο σήμα («απάντηση») όσο και στη συγκέντρωση, προκειμένου να προκύψει ένα γραμμικό διάγραμμα, η γραμμική προσαρμογή των δεδομένων είναι λιγότερο ακριβής [129]. Η ανακρίβεια αυτή οφείλεται στην αλλοίωση του πειραματικού λάθους και στην αλλαγή της σχέσης μεταξύ x και y [129].



Εικόνα 21: Σύγκριση του δυναμικού εύρους της γραμμικής και λογιστικής παλινδρόμησης. Τα δυναμικά εύρη της γραμμικής και λογιστικής παλινδρόμησης υποδεικνύονται με κόκκινα και πράσινα βέλη, αντίστοιχα. Τα βέλη υποδηλώνουν το εύρος συγκέντρωσης, όπου η ανάκτηση των πρότυπων δειγμάτων είναι 70-130%

Δ.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΛΗΣ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗΣ

Δ.2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ένα σημαντικό πρόβλημα στη στατιστική είναι η εξεύρεση πληροφορίας σχετικά με τη μορφή της κατανομής από την οποία προέρχεται ένα τυχαίο δείγμα. Είναι εξάλλου, γνωστό ότι η πλειονότητα των ελέγχων πραγματοποιείται με την προϋπόθεση ότι (υπό την H_0) το τυχαίο δείγμα προέρχεται από μια συγκεκριμένη κατανομή. Έλεγχοι αυτής της μορφής καλούνται «έλεγχοι καλής προσαρμογής» των δεδομένων σε μια συγκεκριμένη κατανομή και έχουν προταθεί αρκετοί. Ένας σημαντικός έλεγχος καλής προσαρμογής είναι το Kolmogorov-Smirnov test.

Δ.2.2 ΥΠΟΘΕΣΕΙΣ – ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΟΥ ΚΟΛΜΟΓΟΡΟV-SMIRNOV TEST

Για τον έλεγχο καλής προσαρμογής ενός τυχαίου δείγματος σε μία δεδομένη συνεχή κατανομή ($H_0: X_i \sim F_0$) χρησιμοποιείται το κριτήριο K-S. Το κριτήριο K-S βασίζεται στη διαφορά της εμπειρικής συνάρτησης κατανομής (που προέρχεται από το δείγμα) και της αναμενόμενης F_0 (υπό την H_0). Πιο συγκεκριμένα, αν X_1, X_2, \dots, X_n είναι ένα τυχαίο δείγμα, η εμπειρική συνάρτηση κατανομής (ΕΣΚ) του δείγματος αυτού είναι:

$$\hat{F}_n(x) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n I(X_i \leq x) = \frac{\{X_i \leq x\}}{n}$$

$I(X_i \leq x) = 1$ ή 0 , ανάλογα με το αν $X_i \leq x$ ή όχι, η οποία ως γνωστόν αποτελεί εκτίμηση της συνάρτησης κατανομής των X_i , διότι (από το νόμο των μεγάλων αριθμών, θέτοντας $Y_i = I(X_i \leq x)$)

$$\hat{F}_n(x) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n I(X_i \leq x) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n Y_i \xrightarrow[n \rightarrow \infty]{} E(Y_1) = OP(Y_1 = 0) + 1P(Y_1 = 1) = P(Y_1 = 1) = P(X_1 \leq x) = F(x)$$

για κάθε x . Επομένως, υπό την H_0 , η ΕΣΚ θα πρέπει να είναι «κοντά» στην F_0 . Αντίθετα, αν δεν ισχύει η H_0 αναμένεται σημαντική απόκλιση της ΕΣΚ από την F_0 . Για να κατασκευαστεί ένας έλεγχος με βάση αυτόν τον συλλογισμό, θα πρέπει να οριστεί μία «απόσταση» μεταξύ των δύο κατανομών (της ΕΣΚ και της F_0) και να απορρίπτεται η H_0 , όταν αυτή η απόσταση γίνεται «μεγάλη». Επομένως, υπάρχει ο επόμενος ορισμός.

Ορισμός: Αν F, G είναι δύο συναρτήσεις κατανομής στον R , τότε η ποσότητα

$$d_K(F, G) = \sup_{x \in R} \{|F(x) - G(x)|\}$$

καλείται απόσταση Kolmogorov μεταξύ της F και της G .

Σύμφωνα με τα παραπάνω, θα απορρίπτεται η $H_0: X_i \sim F_0$ όταν η στατιστική συνάρτηση

$$D_n = d(\widehat{F}_n, F_0)_K = \sup_{x \in R} \{|\widehat{F}_n(x) - F_0(x)|\}$$

λαμβάνει «ασυνήθιστα» μεγάλες τιμές, δηλαδή όταν $D_n > c$. Το κριτήριο αυτό είναι γνωστό ως κριτήριο Kolmogorov – Smirnov (και η στατιστική συνάρτηση D_n καλείται ελεγχοςυνάρτηση Kolmogorov – Smirnov). Προκειμένου να χρησιμοποιηθεί το συγκεκριμένο κριτήριο θα πρέπει να προσδιοριστεί η κατανομή της τυχαίας μεταβλητής D_n κάτω από την H_0 , έτσι ώστε να υπολογιστεί το c (για δεδομένο επίπεδο σημαντικότητας α) και το p -value ενός δείγματος. Σε αυτό το σημείο ίσως κάποιος αναλογιστεί ότι το κριτήριο αυτό έχει ένα σοβαρό μειονέκτημα: η κατανομή της D_n θα πρέπει να εξαρτάται από την F_0 (την κατανομή από την οποία προέρχεται το δείγμα, υπό την H_0) και, επομένως, θα πρέπει να βρεθεί η κατανομή της D_n για κάθε διαφορετική κατανομή F_0 . Αντίθετα με αυτό που θα περίμενε κανείς, αποδεικνύεται ότι η κατανομή της στατιστικής συνάρτησης D_n δεν εξαρτάται από την F_0 . Το γεγονός αυτό δίνει την δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί το συγκεκριμένο κριτήριο οποιαδήποτε και αν είναι η κατανομή από την οποία προέρχεται το δείγμα (υπό την H_0). Τέτοιοι έλεγχοι καλούνται *απαραμετρικοί έλεγχοι* (η κατανομή της στατιστικής συνάρτησης που χρησιμοποιείται και, επομένως, η κρίσιμη περιοχή και το p -value δεν εξαρτώνται από την κατανομή του δείγματος υπό την H_0).

Το κριτήριο K-S μπορεί να τροποποιηθεί ώστε να χρησιμοποιηθεί για να ελεγχθεί αν δύο δείγματα προέρχονται από την ίδια κατανομή. Συγκεκριμένα, έστω X_1, X_2, \dots, X_m και Y_1, Y_2, \dots, Y_n δύο τυχαία δείγματα από τις κατανομές F και G αντίστοιχα και έστω ότι πρέπει να ελεγχθεί η υπόθεση:

$$H_0 : F = G \text{ έναντι της } H_1 : F \neq G$$

Όπως και στο K-S για ένα δείγμα, θα χρησιμοποιηθούν οι εμπειρικές συναρτήσεις κατανομής των δύο δειγμάτων. Αυτή την φορά δε συγκρίνονται με κάποια θεωρητική κατανομή, αλλά μεταξύ τους. Τίθεται:

$$D_{m,n} = d_K(\widehat{F}_m, \widehat{G}_n) = \sup_{x \in R} \{|\widehat{F}_m(x) - \widehat{G}_n(x)|\}$$

Όπως και στην περίπτωση του ενός δείγματος, υπό την $H_0 : F = G$, η κατανομή του $D_{m,n}$ δεν εξαρτάται από την κοινή κατανομή των X_i, Y_i ενώ υπό την $H_1 : F \neq G$, η $D_{m,n}$ λαμβάνει μεγάλες τιμές. Επομένως, θα απορρίπτεται η H_0 όταν:

$$D_{m,n} > c = D_{m,n}(\alpha): \text{άνω } \alpha\text{-σημείο της κατανομής της τ.μ. } D_{m,n}(\alpha)$$

Η ακριβής κατανομή της τυχαίας μεταβλητής $D_{m,n}$ είναι δύσκολο να υπολογιστεί και για αυτό έχουν κατασκευαστεί πίνακες με τα άνω α -σημεία της. Αποδεικνύεται όμως ότι (υπό την H_0 και για συνεχείς F, G), όπως και στην περίπτωση του ενός δείγματος:

$$P\left(\sqrt{\frac{mn}{m+n}} * D_{m,n} \leq z\right) \rightarrow_{n \rightarrow \infty} 1 - 2 \sum_{i=1}^{\infty} (-1)^{i-1} e^{-2i^2 z^2} \text{ για κάθε } z \geq 0$$

και, επομένως, το p -value ενός δείγματος που έδωσε $D_{m,n} = d$ θα είναι (ασυμπτωτικά):

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών
και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών
καρδιαγγειακών ασθενειών

$$p - value = P(D_{m,n} > d/H_0) = 1 - P(\sqrt{\frac{mn}{m+n}} * D_{n,m} < \sqrt{\frac{mn}{m+n}} * d)$$
$$\approx 2 \sum_{i=1}^{\infty} (-1)^{i-1} e^{-2i^2 \frac{mn}{m+n} d^2}$$

Δ.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΔΥΟ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ, ΠΟΥ ΑΚΟΛΟΥΘΟΥΝ/ΔΕΝ ΑΚΟΛΟΥΘΟΥΝ ΚΑΝΟΝΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ

Δ.3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στα ανεξάρτητα δείγματα οι παρατηρήσεις αναφέρονται στη μέτρηση κάποιας εξαρτημένης μεταβλητής σε δύο διαφορετικές ομάδες ατόμων. Όταν οι επιδόσεις των ατόμων, που ανήκουν στα δύο προαναφερθέντα ανεξάρτητα δείγματα, δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή, εφαρμόζεται ένα μη παραμετρικό τεστ, όπως είναι το Mann Whitney U. Αντιθέτως, όταν τα δεδομένα ακολουθούν κανονική κατανομή, τότε πραγματοποιείται για τα ανεξάρτητα δείγματα το t-test (Independent-Samples T Test).

Δ.3.2 ΥΠΟΘΕΣΕΙΣ – ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΟΥ MANN WHITNEY U ΤΕΣΤ

Έστω ότι X_1, X_2, \dots, X_m και Y_1, Y_2, \dots, Y_n δύο τυχαία δείγματα από τις κατανομές F και G αντίστοιχα και έστω ότι πρέπει να ελεγχθεί η υπόθεση:

$$H_0 : F = G \text{ έναντι της } H_1 : F \neq G$$

Γίνεται ένωση των δύο παραπάνω δειγμάτων σε ένα δείγμα $n + m$ παρατηρήσεων και, στη συνέχεια, διατάσσονται (από την μικρότερη προς τη μεγαλύτερη) οι παρατηρήσεις στο κοινό αυτό δείγμα. Μετράται το πλήθος από τα Y_i που είναι μικρότερα του X_1 συν το πλήθος από τα Y_i που είναι μικρότερα του X_2 κ.ο.κ. στο διατεταγμένο από κοινού δείγμα. Θα απορρίπτεται η $H_0 : F = G$ έναντι της $H_1 : F \neq G$, όταν το U είναι αδικαιολόγητα μικρό ή μεγάλο ($U < c_1$ ή $U > c_2$). Η κατανομή της τυχαίας μεταβλητής U μπορεί να παρασταθεί αναλυτικά (κάτω από την H_0), αλλά και πάλι δεν έχει απλή μορφή. Αποδεικνύεται ότι, ασυμπτωτικά,

$$Z = \frac{U - mn/2}{\sqrt{mn(m+n+1)/12}} \underset{H_0}{\sim} N(0,1) \quad m, n \rightarrow \infty$$

και επομένως (για μεγάλα m, n) αν z είναι η τιμή της παραπάνω στατιστικής συνάρτησης στο δείγμα:

$$p \text{ value} = P(|Z| > |z|) \approx 2(1 - \Phi(|z|)) = 2(1 - \Phi(\frac{|u - mn/2|}{\sqrt{mn(m+n+1)/12}}))$$

Το τεστ αυτό είναι σε αρκετές περιπτώσεις πιο ισχυρό από άλλα τεστ, διότι χρησιμοποιεί περισσότερη πληροφορία από το δείγμα.

Δ.3.3 ΥΠΟΘΕΣΕΙΣ – ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΟΥ INDEPENDENT-SAMPLES T ΤΕΣΤ

Η μηδενική υπόθεση για το ανεξάρτητο t-τεστ σημαίνει ότι ο μέσος πληθυσμός από δύο μη σχετιζόμενες ομάδες είναι ίσος:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

Στις περισσότερες περιπτώσεις η προσπάθεια αφορά στην απόδειξη της δυνατότητας απόρριψης της μηδενικής υπόθεσης και στην αποδοχή της εναλλακτικής, δηλαδή αυτής περί της μη ισότητας των πληθυσμών:

$$H_A: \mu_1 \neq \mu_2$$

Για να γίνει αυτό πρέπει να οριστεί ένα επίπεδο σημαντικότητας (επίσης ονομάζεται άλφα) που επιτρέπει είτε την απόρριψη είτε την αποδοχή της εναλλακτικής υπόθεσης. Αυτή η τιμή ορίζεται συχνότερα στο 0.05. Για να εκτελεστεί μια ανεξάρτητη δοκιμή t, χρειάζεται:

- A) μια ανεξάρτητη, κατηγορική μεταβλητή που έχει δύο επίπεδα/ομάδες
- B) μια συνεχής εξαρτώμενη μεταβλητή

Προϋπόθεση ίσων διακυμάνσεων

Όταν τα δύο ανεξάρτητα δείγματα υποτίθεται ότι προέρχονται από πληθυσμούς με ταυτόσημες μεταβολές του πληθυσμού ($\sigma_1^2 = \sigma_2^2$), το στατιστικό αποτέλεσμα της δοκιμής t υπολογίζεται ως:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{sp \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

$$\text{με } sp = \sqrt{\frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

όπου:

\bar{x}_1 : ο μέσος όρος του πρώτου δείγματος

\bar{x}_2 : ο μέσος όρος του δεύτερου δείγματος

n_1 : το μέγεθος δείγματος (αριθμός παρατηρήσεων) του πρώτου δείγματος

n_2 : το μέγεθος δείγματος (αριθμός παρατηρήσεων) του δεύτερου δείγματος

s_1 : η τυπική απόκλιση του πρώτου δείγματος

s_2 : η τυπική απόκλιση του δεύτερου δείγματος

s_p : η συγκεντρωτική τυπική απόκλιση

Η υπολογιζόμενη τιμή t, στη συνέχεια, συγκρίνεται με την κρίσιμη τιμή t από τον πίνακα κατανομής t με βαθμούς ελευθερίας $df = n_1 + n_2 - 2$ και επιλεγμένο επίπεδο εμπιστοσύνης. Εάν η υπολογιζόμενη τιμή t είναι μεγαλύτερη από την κρίσιμη τιμή t, απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση. Επειδή θεωρούνται ίσες μεταβολές του πληθυσμού, είναι ορθό να «συγκεντρωθούν» οι διακυμάνσεις του δείγματος (s_p). Ωστόσο, αν η παραδοχή αυτή παραβιαστεί, η συγκεντρωτική εκτίμηση της διακύμανσης ενδέχεται

να μην είναι ακριβής, γεγονός που θα επηρέαζε την ακρίβεια των στατιστικών στοιχείων δοκιμής καθώς και της τιμής p .

Προϋπόθεση μη ίσων διακυμάνσεων

Όταν τα δύο ανεξάρτητα δείγματα θεωρούνται ότι προέρχονται από πληθυσμούς με μη ταυτόσημες μεταβολές του πληθυσμού ($\sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$), το στατιστικό αποτέλεσμα της δοκιμής t υπολογίζεται ως:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

όπου:

\bar{x}_1 : ο μέσος όρος του πρώτου δείγματος

\bar{x}_2 : ο μέσος όρος του δεύτερου δείγματος

n_1 : το μέγεθος δείγματος (αριθμός παρατηρήσεων) του πρώτου δείγματος

n_2 : το μέγεθος δείγματος (αριθμός παρατηρήσεων) του δεύτερου δείγματος

s_1 : η τυπική απόκλιση του πρώτου δείγματος

s_2 : η τυπική απόκλιση του δεύτερου δείγματος

Η υπολογιζόμενη τιμή t , στη συνέχεια, συγκρίνεται με την κρίσιμη τιμή t από τον πίνακα κατανομής t με βαθμούς ελευθερίας:

$$df = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{1}{n_1 - 1} \left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2 + \frac{1}{n_2 - 1} \left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}$$

και επιλεγμένο επίπεδο εμπιστοσύνης. Εάν η υπολογιζόμενη τιμή $t >$ κρίσιμη τιμή t , τότε απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση.

Δ.4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΘΕΩΡΗΣΗ

Δ.4.1 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

Η διακύμανση των επιπέδων των βιοδεικτών μεταξύ συμπτωματικών και ασυμπτωματικών ασθενών πραγματοποιήθηκε με το t -τεστ ανεξάρτητων δειγμάτων (independent samples t -test), δηλαδή με μια παραμετρική στατιστική διαδικασία που ελέγχει τη στατιστική σημαντικότητα των διαφορών των μέσων όρων. Είναι σημαντικό να οριστεί το «επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας», η λανθασμένη δηλαδή, απόρριψη της μηδενικής υπόθεσης. Η πιο συνηθισμένη τιμή είναι 5%. Τα αποτελέσματα καταγράφηκαν ως μέση τιμή \pm διακύμανση. Επιπρόσθετα, οι κατανομές δοκιμάστηκαν για κανονικότητα με την ανάλυση Kolmogorov-Smirnov. Συγκεκριμένα η ανάλυση αυτή είναι μια μη παραμετρική δοκιμή της ισότητας συνεχών (ή ασυνεχών) μονοδιάστατων κατανομών πιθανότητας που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη σύγκριση δυο δειγμάτων. Επιπλέον, είναι ευαίσθητη σε διαφορές τόσο στη θέση όσο και στο σχήμα των εμπειρικών συναρτήσεων αθροιστικής κατανομής των δύο δειγμάτων. Ως στατιστικά σημαντική θεωρήθηκε η τιμή $p < 0,05$. Για τη διενέργεια των παραπάνω χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό στατιστικής SPSS, δηλαδή για την στατιστική ανάλυση, αλλά και για την κατασκευή του αλγορίθμου CART.

Δ.5 ΔΕΝΔΡΑ ΑΠΟΦΑΣΗΣ - ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ ΚΑΙ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗΣ

Δ.5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

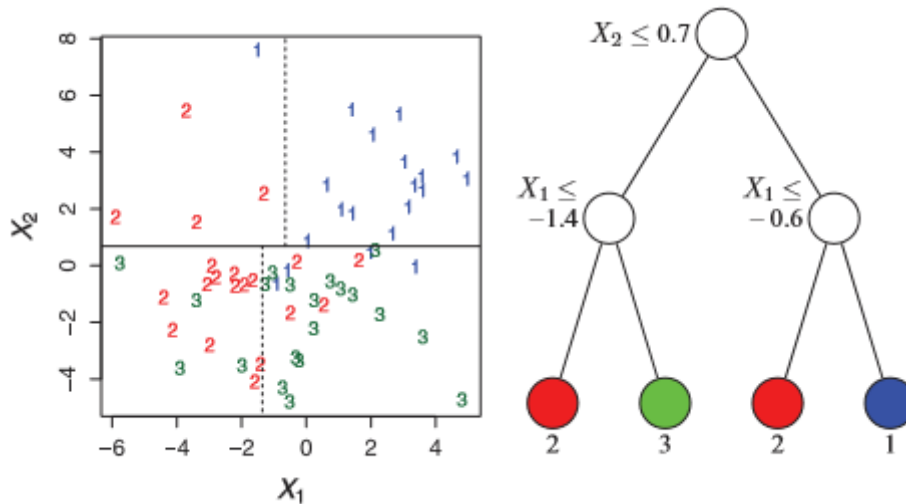
Τα δένδρα απόφασης τα οποία χωρίζονται σε δένδρα ταξινόμησης και παλινδρόμησης είναι μέθοδοι εκμάθησης μηχανών για την κατασκευή προτύπων πρόβλεψης βάσει συγκεκριμένων δεδομένων. Τα μοντέλα που κατασκευάζονται επιτυγχάνονται με την αναλογική κατανομή του χώρου δεδομένων και τη δημιουργία ενός απλού μοντέλου πρόβλεψης μέσα σε κάθε διαμοίραση. Ως αποτέλεσμα, η διαμοίραση μπορεί να αναπαρασταθεί γραφικά ως δένδρο απόφασης [130].

Δ.5.2 ΔΕΝΔΡΑ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ

Η ανάλυση δένδρων ταξινόμησης είναι όταν το προβλεπόμενο αποτέλεσμα είναι η κλάση στην οποία ανήκουν τα δεδομένα [130]. Σε ένα πρόβλημα ταξινόμησης έχουμε ένα δείγμα εκπαίδευσης n παρατηρήσεων σε μια μεταβλητή τάξης Y που λαμβάνει τιμές $1, 2, \dots, k$ και p μεταβλητές πρόβλεψης X_1, X_2, \dots, X_p . Ο στόχος είναι να βρεθεί ένα μοντέλο για την πρόβλεψη των τιμών του Y από τις νέες τιμές X . Θεωρητικά, η λύση είναι απλώς μια κατάτμηση του χώρου X σε k διακεκομμένες ομάδες A_1, A_2, \dots, A_k , έτσι ώστε η προβλεπόμενη τιμή του Y να είναι j , εάν το X ανήκει στο A_j για $j = 1, 2, \dots, k$. Εάν οι μεταβλητές X παίρνουν διατεταγμένες τιμές, δύο κλασικές λύσεις είναι η ανάλυση γραμμικών διακρίσεων [131] και η ταξινόμηση του πλησιέστερου γείτονα [132]. Αυτές οι μέθοδοι αποδίδουν σύνολα A_j με μερικώς γραμμικά και μη γραμμικά, αντίστοιχα, όρια που δεν είναι εύκολο να ερμηνευθούν αν το p είναι μεγάλο.

Οι μέθοδοι δένδρων ταξινόμησης παράγουν ορθογώνια σύνολα A_j με την αναλογική κατανομή στο σύνολο των δεδομένων μιας μεταβλητής X κάθε φορά. Αυτό κάνει τα σεντ πιο εύκολα στην ερμηνεία. Η εικόνα 22 δίνει ένα παράδειγμα όπου υπάρχουν 3 κλάσεις και 2 μεταβλητές X . Ο αριστερός πίνακας περιγράφει τα σημεία δεδομένων και τα διαμερίσματα και ο δεξιός πίνακας δείχνει την αντίστοιχη δομή δένδρου αποφάσεων. Ένα βασικό πλεονέκτημα της δομής του δένδρου είναι η δυνατότητα εφαρμογής του σε οποιονδήποτε αριθμό μεταβλητών, ενώ το γράφημα αριστερά του περιορίζεται σε δύο το πολύ.

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών καρδιαγγειακών ασθενειών



Εικόνα 22: Διαμερίσεις (αριστερά) και δομή δένδρου αποφάσεων (δεξιά) για ένα δένδρο ταξινόμησης με τρεις τάξεις κατηγοριοποιημένες ως 1, 2, 3. Σε κάθε ενδιάμεσο κόμβο, μια υπόθεση πηγαίνει στον αριστερό κόμβο «παιδί», εάν και μόνο εάν, η συνθήκη ικανοποιείται. Η προβλεπόμενη τάξη δίνεται κάτω από κάθε κόμβο φύλλων

Ο πρώτος δημοσιευμένος αλγόριθμος ταξινόμησης δένδρων είναι ο THAID [133, 134]. Χρησιμοποιώντας ένα μέτρο της μη καθαρότητας του κόμβου, με βάση την κατανομή των παρατηρούμενων τιμών Y στον κόμβο, ο THAID διαιρεί εξ' ολοκλήρου έναν κόμβο ψάχνοντας όλα τα X και S για το χωρισμό $\{X \in S\}$ που ελαχιστοποιεί τη συνολική μη καθαρότητα των δύο κόμβων-παιδιών του. Αν το X λαμβάνει ταξινομημένες τιμές το σύνολο S είναι ένα διάστημα του $(-\infty, c]$. Διαφορετικά, το S είναι ένα υποσύνολο των τιμών που λαμβάνονται από το X . Η διαδικασία εφαρμόζεται αναδρομικά στα δεδομένα, σε κάθε κόμβο-παιδί. Ο διαχωρισμός σταματά εάν η σχετική μείωση της μη καθαρότητας βρίσκεται κάτω από ένα προκαθορισμένο όριο.

Ο C4.5 [135] και ο CART [136] αποτελούν δύο μεταγενέστερες ταξινομήσεις αλγορίθμων δένδρων που ακολουθούν αυτή την προσέγγιση. Ο πρώτος χρησιμοποιεί την εντροπία για τη λειτουργία μη καθαρότητας, ενώ ο δεύτερος χρησιμοποιεί μια γενίκευση της διωνυμικής διακύμανσης, που ονομάζεται δείκτης Gini. Αντίθετα από τον THAID όμως, πρώτα αναπτύσσουν (grow) ένα υπερβολικά μεγάλο δένδρο και, στη συνέχεια, το «κλαδεύουν» σε ένα μικρότερο μέγεθος για να ελαχιστοποιηθεί η εκτίμηση της εσφαλμένης ταξινόμησης λάθους. Ο CART χρησιμοποιεί δέκα φορές (προεπιλογή) τη διασταυρούμενη πιστοποίηση, ενώ ο C4.5 χρησιμοποιεί μια ευριστική φόρμουλα για να εκτιμήσει τα ποσοστά σφάλματος.

Παρά την απλότητα και την κομψότητα, η εξαντλητική αναζήτηση προσέγγισης παρουσιάζει μια ανεπιθύμητη ιδιότητα: μια διατεταγμένη μεταβλητή με m διακριτές τιμές έχει $(m - 1)$ διαχωρισμούς του τύπου $X \leq c$ και μια μη διατεταγμένη μεταβλητή με m διακριτές μη διατεταγμένες τιμές έχει $(2m - 1 - 1)$ διαχωρισμούς του τύπου $X \in S$. Επομένως, αν οτιδήποτε άλλο είναι ίσο, οι μεταβλητές με πιο διακριτές τιμές έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να επιλεγούν. Αυτή η απόκλιση της επιλογής επηρεάζει την ακεραιότητα των εξαγόμενων συμπερασμάτων από τη δομή του δένδρου.

Βασιζόμενοι σε μια ιδέα που προέκυψε από τον αλγόριθμο FACT [137], οι αλγόριθμοι CRUISE [138, 139], GUIDE [140] και QUEST [141] κάνουν χρήση μιας προσέγγισης δύο βημάτων βασισμένη σε τεστ σημαντικότητας για τη διαίρεση του κάθε κόμβου. Αρχικά, κάθε X εξετάζεται για τη συσχέτισή του με το Y και επιλέγεται η πιο σημαντική μεταβλητή. Στη συνέχεια, διεξάγεται μια εξαντλητική αναζήτηση για το σετ S . Επειδή, κάθε X έχει την ίδια δυνατότητα να επιλεγεί, εάν κάθε ένα είναι ανεξάρτητο από το Y , αυτή η προσέγγιση είναι ουσιαστικά χωρίς προκαταρκτική επιλογή. Εκτός αυτού, πολλοί υπολογισμοί αποθηκεύονται, καθώς πραγματοποιείται η αναζήτηση για S μόνο στην επιλεγμένη μεταβλητή X . Οι GUIDE και CRUISE χρησιμοποιούν δοκιμές τετραγώνων (χ^2 tests) και ο QUEST χρησιμοποιεί δοκιμές τετραγώνων για μη ταξινομημένες μεταβλητές και ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) για ταξινομημένες μεταβλητές.

Ο CHAID [142] χρησιμοποιεί μια ακόμη στρατηγική. Εάν το X είναι μια διατεταγμένη μεταβλητή, οι τιμές δεδομένων στον κόμβο διαιρούνται σε 10 διαστήματα και εκχωρείται ένας κόμβος-παιδί σε κάθε διάστημα. Εάν το X είναι μη διατεταγμένη μεταβλητή, ένας κόμβος-παιδί εκχωρείται σε κάθε τιμή του X . Στη συνέχεια, ο CHAID χρησιμοποιεί δοκιμές σημαντικότητας και διορθώσεις Bonferroni για να γίνει προσπάθεια, επαναληπτικά, να συγχωνευθούν τα ζευγάρια των κόμβων-παιδιών. Αυτή η προσέγγιση έχει δύο συνέπειες: αφενός, μερικοί κόμβοι μπορούν να διαχωριστούν σε περισσότερους από δύο κόμβους-παιδιά και, αφετέρου, λόγω της διαδοχικής φύσης των τεστ και της μη ακρίβειας των δοκιμών, η μέθοδος είναι προκατειλημμένη προς την επιλογή μεταβλητών με λίγες ξεχωριστές τιμές.

Οι CART, CRUISE και QUEST μπορούν να επιτρέψουν διαχωρισμούς σε γραμμικούς συνδυασμούς όλων των γραμμικών μεταβλητών, ενώ ο GUIDE μπορεί να διαχωριστεί σε συνδυασμούς δυο μεταβλητών κάθε φορά. Εάν υπάρχουν τιμές που λείπουν, οι CART και CRUISE χρησιμοποιούν εναλλακτικούς διαχωρισμούς σε άλλες μεταβλητές όταν απαιτείται, ο C4.5 στέλνει κάθε παρατήρηση με εκλιπούσα τιμή σε έναν διαχωρισμό μέσω κάθε κλάδου, χρησιμοποιώντας ένα σχήμα στάθμισης πιθανότητας, ο QUEST καταλογίζει τις τιμές που λείπουν τοπικά και ο GUIDE αντιμετωπίζει τις εκλιπούσες τιμές ως μέλη ξεχωριστής κατηγορίας. Όλοι, εκτός από τον C4.5, αποδέχονται το κόστος εσφαλμένης ταξινόμησης που έχει οριστεί από τον χρήστη και όλοι, εκτός από τον C4.5 και τον CHAID, αποδέχονται την τάξη που καθορίζεται από τον χρήστη από προηγούμενες πιθανότητες. Εξ' ορισμού, όλοι οι αλγόριθμοι ταιριάζουν με ένα σταθερό μοντέλο σε κάθε κόμβο, προβλέποντας το Y να είναι η τάξη με το μικρότερο κόστος εσφαλμένης ταξινόμησης. Ο CRUISE μπορεί, προαιρετικά, να προσαρμόζει διμερή γραμμικά μοντέλα διάκρισης και ο GUIDE μπορεί να χωρέσει την πυκνότητα πυρήνα διμερών και τα μοντέλα του πιο κοντινού γείτονα στους κόμβους.

Δ.5.3 ΔΕΝΔΡΑ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗΣ

Η ανάλυση δένδρων παλινδρόμησης είναι όταν το προβλεπόμενο αποτέλεσμα μπορεί να θεωρηθεί πραγματικός αριθμός (π.χ. η τιμή ενός σπιτιού ή η διάρκεια διαμονής ενός ασθενούς σε ένα νοσοκομείο) [143]. Ένα δένδρο παλινδρόμησης είναι παρόμοιο με ένα δένδρο ταξινόμησης, εκτός από το ότι η μεταβλητή Y παίρνει διακριτές τιμές και ότι ένα μοντέλο παλινδρόμησης προσαρμόζεται σε κάθε κόμβο για να δώσει τις προβλεπόμενες τιμές του Y . Ιστορικά, ο πρώτος αλγόριθμος παλινδρόμησης δένδρου είναι ο AID [144], ο οποίος εμφανίστηκε αρκετά χρόνια πριν τον THAID. Οι μέθοδοι δένδρων παλινδρόμησης AID και CART ακολουθούν τη λογική του αλγορίθμου THAID, με τον μη καθαρό κόμβο να είναι το άθροισμα των τετραγωνικών αποκλίσεων για τον μέσο όρο και ο κόμβος να προβλέπει τον μέσο του δείγματος για το Y . Το γεγονός αυτό παράγει σταθερά μοντέλα των οποίων η ακρίβεια της πρόβλεψης, συχνά υστερεί σε σχέση με τα μοντέλα με μεγαλύτερη ομαλότητα. Όμως, η επέκταση αυτής της προσέγγισης σε γραμμικό μοντέλο, μπορεί να είναι υπολογιστικά ανέφικτη, καθώς δύο γραμμικά μοντέλα (ένα για κάθε κόμβο-παιδί) πρέπει να τοποθετηθούν για κάθε υποψήφιο διαχωρισμό.

Ο M5 [145], μια προσαρμογή ενός αλγορίθμου δένδρου παλινδρόμησης από την Quinlan [146], χρησιμοποιεί μια πιο αποτελεσματική στρατηγική, από υπολογιστικής απόψεως, για την κατασκευή τμηματικών γραμμικών μοντέλων. Πρώτα κατασκευάζει ένα τμήμα σταθερού δένδρου και, έπειτα, προσαρμόζει ένα μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης στα δεδομένα, σε κάθε φύλλο κόμβου. Επειδή η δομή του δένδρου είναι ίδια με το τμηματικό σταθερό μοντέλο, τα προκύπτοντα δένδρα τείνουν να είναι μεγαλύτερα από άλλες τμηματικές, γραμμικές μεθόδους δένδρων. Ο GUIDE [147] χρησιμοποιεί τεχνικές δένδρων ταξινόμησης για να λύσει το πρόβλημα παλινδρόμησης. Σε κάθε κόμβο, ταιριάζει ένα μοντέλο παλινδρόμησης με τα δεδομένα και υπολογίζει τα υπολείμματα. Κατόπιν, ορίζει μια μεταβλητή τάξης Y που λαμβάνει τιμές 1 ή 2, ανάλογα με το αν το σημάδι του υπολοίπου είναι θετικό ή αρνητικό. Στο τέλος, εφαρμόζει τη λογική του αλγορίθμου του GUIDE στη μεταβλητή Y για να διαχωρίσει τον κόμβο σε δύο. Αυτή η τεχνική έχει τρία πλεονεκτήματα:

- οι διαχωρισμοί είναι αμερόληπτοι
- σε κάθε κόμβο τοποθετείται μόνο ένα μοντέλο παλινδρόμησης
- επειδή βασίζεται στα υπόλοιπα, η μέθοδος δεν περιορίζεται ούτε από τμηματικά σταθερά μοντέλα, ούτε από το κριτήριο ελαχίστων τετραγώνων

Επειδή η συνολική πολυπλοκότητα του μοντέλου διαμοιράζεται μεταξύ της δομής του δένδρου και του σετ των κόμβων του μοντέλου, η πολυπλοκότητα της δομής ενός δένδρου συχνά μειώνεται, καθώς η πολυπλοκότητα του κόμβου αυξάνεται. Για αυτό το λόγο, ο χρήστης μπορεί να διαλέξει ένα μοντέλο με την «ανταλλαγή» (trade-off) της πολυπλοκότητας της δομής του δένδρου ενάντια στην πολυπλοκότητα των κόμβων του μοντέλου. Τα τμηματικά σταθερά μοντέλα χρησιμοποιούνται κυρίως για τις πληροφορίες που οι δομές τους παρέχουν, αλλά τείνουν να έχουν χαμηλή ακρίβεια πρόβλεψης, εκτός αν τα δεδομένα είναι αρκετά ενημερωμένα και άφθονα, ώστε να

παράξουν ένα δένδρο με πολλούς κόμβους. Το πρόβλημα είναι πως όσο μεγαλύτερο είναι το δένδρο, τόσο πιο δύσκολο είναι να αντληθεί πληροφορία από αυτό.

Δ.5.4 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΔΕΝΔΡΩΝ ΑΠΟΦΑΣΗΣ

Μεταξύ άλλων μεθόδων εξόρυξης δεδομένων, τα δένδρα απόφασης έχουν τα κάτωθι πλεονεκτήματα:

- απλά στην κατανόηση και στην ερμηνεία → οι άνθρωποι είναι σε θέση να κατανοήσουν τα μοντέλα δένδρων αποφάσεων μετά από μια σύντομη εξήγηση. Τα δένδρα μπορούν επίσης να εμφανίζονται γραφικά, με τρόπο που είναι εύκολο για τους μη εμπειρογνώμονες να τα ερμηνεύουν [148]
- μπορούν να χειριστούν τόσο αριθμητικά όσο και κατηγορικά δεδομένα → άλλες τεχνικές, συνήθως, εξειδικεύονται στην ανάλυση συνόλων δεδομένων που έχουν μόνο έναν τύπο μεταβλητής (π.χ. οι κανόνες σχέσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο με ονομαστικές μεταβλητές, ενώ τα νευρωνικά δίκτυα μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο με αριθμητικές μεταβλητές ή με κατηγορικές που μετατρέπονται σε τιμές 0-1) [148]
- απαιτείται ελάχιστη προετοιμασία δεδομένων → άλλες τεχνικές συχνά απαιτούν κανονικοποίηση δεδομένων. Δεδομένου ότι τα δένδρα μπορούν να χειριστούν ποιοτικούς προγνωστικούς παράγοντες, δεν υπάρχει ανάγκη δημιουργίας εικονικών μεταβλητών (dummy variables) [148]
- χρησιμοποιούν μοντέλου λευκού κουτιού → εάν μια δεδομένη κατάσταση είναι παρατηρήσιμη σε ένα μοντέλο, η εξήγηση για την κατάσταση εξηγείται εύκολα με Boolean λογική³⁷. Αντίθετα, σε ένα μοντέλο μαύρου κουτιού, η εξήγηση των αποτελεσμάτων είναι δύσκολο να κατανοηθεί, π.χ. με ένα τεχνητό νευρωνικό δίκτυο
- δυνατότητα επικύρωσης ενός μοντέλου χρησιμοποιώντας στατιστικές δοκιμές → αυτό καθιστά δυνατό τον υπολογισμό της αξιοπιστίας του μοντέλου
- μη στατιστική προσέγγιση που δεν κάνει υποθέσεις των δεδομένων εκπαίδευσης ή υπολειμμάτων πρόβλεψης → δεν υπάρχουν υποθέσεις κατανομής, ανεξαρτησίας ή σταθερής διακύμανσης
- λειτουργεί καλά με μεγάλα σύνολα δεδομένων → μεγάλα ποσά δεδομένων μπορούν να αναλυθούν χρησιμοποιώντας τους συνήθεις υπολογιστικούς πόρους σε εύλογο χρόνο
- κατανόηση της ανθρώπινης απόφασης που λαμβάνει, περισσότερο από άλλες προσεγγίσεις → αυτό είναι χρήσιμο όταν διαμορφώνονται ανθρώπινες αποφάσεις/συμπεριφορές [148]

³⁷ Υποπεριοχή της Άλγεβρας, όπου οι τιμές των μεταβλητών είναι οι τιμές αληθείας «αληθές» και «ψευδές», που συνήθως αναπαρίστανται με «1» και «0» αντίστοιχα

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών
και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών
καρδιαγγειακών ασθενειών

- σταθερό έναντι της γραμμικότητας → ιδιαίτερα της ενίσχυσης³⁸
- ενσωματωμένη επιλογή χαρακτηριστικών → η πρόσθετη άσχετη λειτουργία χρησιμοποιείται λιγότερο, ώστε να μπορεί να αφαιρεθεί σε επόμενες εκτελούμενες εργασίες

³⁸ Μετά-αλγόριθμος μηχανικής μάθησης για τον πρωταρχικό περιορισμό της μεροληψίας, αλλά και της διακύμανσης στην εποπτευόμενη μάθηση

Δ.6 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΘΕΩΡΗΣΗ

Δ.6.1 ΔΕΝΔΡΟ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ ΚΑΙ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗΣ (CART)

Το δένδρο ταξινόμησης και παλινδρόμησης είναι μια αναδρομική, διαμεριστική τεχνική μηχανικής μάθησης, που δημιουργεί δομές που μοιάζουν με δένδρα για την πρόβλεψη ή τη διάκριση συνεχών μεταβλητών (παλινδρόμηση) ή κατηγορικών μεταβλητών (ταξινόμηση). Στη συγκεκριμένη διατριβή, ο παραγόμενος αλγόριθμος που μοιάζει με δένδρο CART, δημιούργησε ένα σύνολο λογικά διαχωρισμένων κανόνων της μορφής «αν \rightarrow τότε» επιτρέποντας, εν τέλει, την κατηγοριοποίηση των ασθενών ως συμπτωματικών ή ασυμπτωματικών. Η πιθανότητα να ανήκει μια υπόθεση σε μία από τις δύο κατηγορίες δόθηκε επίσης από το CART. Το μοντέλο CART αποτελείται από κόμβους (σημεία όπου λαμβάνονται οι αποφάσεις), ενώ επιπλέον οι κόμβοι έχουν και μια ιεραρχία επιπέδων: το πρώτο επίπεδο έχει μόνο έναν κόμβο (κόμβος «ρίζας»), ενώ οι κόμβοι σε μεταγενέστερα επίπεδα συνδέονται με κόμβους σε δυο άλλα επίπεδα (κόμβοι γονέα και παιδιών, που ονομάζονται «κλαδιά»). Αυτή η ιεραρχική δομή ολοκληρώνεται με τερματικούς κόμβους (που έχουν μόνο γονείς, αλλά όχι παιδιά, που ονομάζονται «φύλλα»).

Το μοντέλο CART κατασκευάστηκε με αναδρομικό τρόπο με βάση τα παρεχόμενα κλινικά χαρακτηριστικά και τους βιοδείκτες. Κατά τη διάρκεια κάθε επανάληψης, υπολογίστηκαν στατιστικά μέτρα για όλες τις παρεχόμενες παραμέτρους, και στη συνέχεια η παράμετρος που επέτρεπε τον καλύτερο διαχωρισμό των περιπτώσεων αναγνωρίστηκε και χρησιμοποιήθηκε για να διαχωρίσει την εκάστοτε περίπτωση σε συμπτωματική ή ασυμπτωματική (δηλαδή δημιουργήθηκε ένας νέος κανόνας «αν \rightarrow τότε») ενώ, επιπρόσθετα δημιουργήθηκαν δύο (ή περισσότεροι) νέοι θυγατρικοί κόμβοι. Κατόπιν, οι ασθενείς κατανεμήθηκαν σε κάθε έναν από τους κόμβους «παιδιά», οι οποίοι περιείχαν τον αριθμό των ασθενών που ήταν συμπτωματικοί και ασυμπτωματικοί, μαζί με τη σχετική πιθανότητα. Μετέπειτα, και εφόσον κάθε κόμβος περιείχε και συμπτωματική και ασυμπτωματική περίπτωση, ο αλγόριθμος επαναλαμβανόταν για κάθε θυγατρικό κόμβο που παραγόταν. Και σε αυτήν την περίπτωση, η παράμετρος που επέτρεψε τον καλύτερο διαχωρισμό των περιπτώσεων, προσδιορίστηκε στατιστικά και χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία ενός νέου κανόνα «αν \rightarrow τότε» και νέων κόμβων «παιδιά».

Στην περίπτωση της παρούσας διατριβής, το ελάχιστο μέγεθος γονέα CART ορίστηκε σε 10, το ελάχιστο μέγεθος παιδιού ορίστηκε σε 5, ενώ το μέγιστο επιτρεπόμενο βάθος ορίστηκε σε 8. Ο αλγόριθμος ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο επονομαζόμενος QUEST³⁹, ενώ πραγματοποιήθηκε διασταυρούμενη επικύρωση.

³⁹ Ο κανόνας διαχωρισμού σε αυτόν τον αλγόριθμο περιλαμβάνει την υπόθεση ότι η μεταβλητή στόχος είναι μια συνεχής μεταβλητή και είναι ο πιο κατάλληλος για μεταβλητές πολλαπλών κατηγοριών

Ε: ΠΟΛΛΑΠΛΗ (MULTIPLEX) ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

Ε.1 ΑΡΧΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Ε.1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η πολλαπλή (multiplex) τεχνολογία είναι μια νέα μέθοδος που συνδυάζει τις ικανότητες της τεχνικής της κυτταρομετρίας ροής με δύο laser και της χρήσης των μικροσφαιριδίων από πολυστυρένιο. Ως εκ τούτου, αποτελεί ένα ισχυρό αναλυτικό σύστημα, το οποίο δύναται να μετρήσει μέχρι και 500 διαφορετικά μικροσφαιρίδια, τα οποία μπορούν να συμπεριληφθούν στο ίδιο πηγάδι της μικροπλάκας, γεγονός που υποδηλώνει υψηλές δυνατότητες ανάλυσης. Επιπλέον, η εν λόγω τεχνολογία είναι πιθανό να ενδιαφέρει πολλές βιολογικές επιστήμες, καθώς, επί του παρόντος, πολλές δοκιμές είτε διατίθενται ήδη στην αγορά είτε βρίσκονται στο στάδιο έρευνας και ανάπτυξης.

Υπάρχουν δύο γενιές μηχανημάτων, η πρώτη γενιά πολλαπλής (multiplex) τεχνολογίας 100/200 και η πιο ανεπτυγμένη γενιά πολλαπλής (multiplex) τεχνολογίας FLEXMAP 3D. Η πρώτη γενιά 100/200 περιλαμβάνει τον αναλυτή ροής, την πλατφόρμα XYP για χειρισμό πλάκας, το σύστημα παράδοσης υγρού περιροής, το λογισμικό xPONENT και έναν συνδεδεμένο υπολογιστή. Από την άλλη πλευρά, η ανεπτυγμένη γενιά FLEXMAP 3D περιλαμβάνει τον αναλυτή, την πλατφόρμα για τον χειρισμό της πλάκας, ολοκληρωμένα συστήματα παράδοσης υγρών σε μια ενιαία μονάδα, το λογισμικό xPONENT και έναν υπολογιστή με έναν αρθρωτό βραχίονα για τη στήριξη της οθόνης και του πληκτρολογίου.

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών καρδιαγγειακών ασθενειών



Εικόνα 23: Σύστημα πρώτης γενιάς 100/200



Εικόνα 24: Σύστημα ανεπτυγμένης γενιάς FLEXMAP 3D

Ε.1.2 ΜΙΚΡΟΣΦΑΙΡΙΔΙΑ

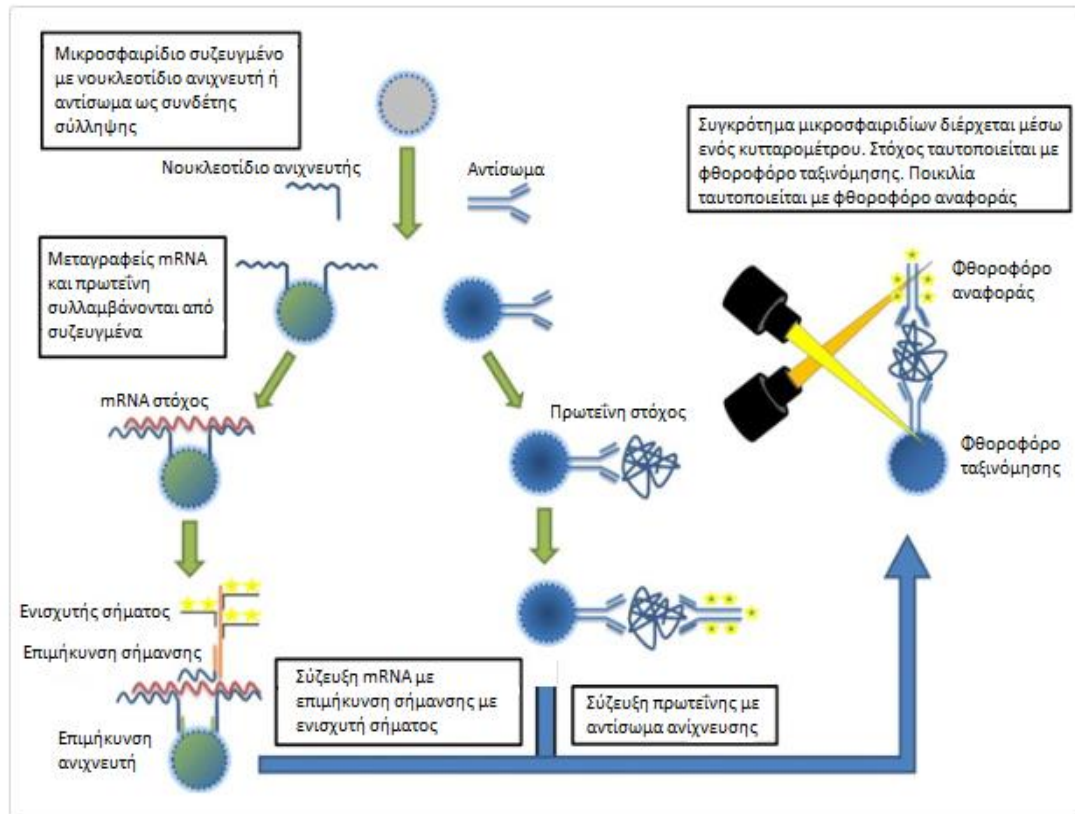
Τα μικροσφαιρίδια αποτελούνται από πολυστυρένιο και έχουν διάμετρο 5,6 μm . Κατά την κατασκευή τους, δυο ή τρία φθοροχρώματα ενσωματώνονται εντός των σφαιριδίων. Για κάθε μικροσφαιρίδιο υπάρχει μία συγκεκριμένη αναλογία της ποσότητας των δύο ή τριών φθοροχρωμάτων που ενσωματώνονται [149], ενώ είναι πανομοιότυπα σε μέγεθος. Τα μικροσφαιρίδια αναμιγνύονται στην αρχή της ανάλυσης, συμπαρασύρονται στο υγρό ρεύμα, διαχωρίζονται και προσδιορίζονται κατά τη διάρκεια της φάσης απόκτησης των δεδομένων [150, 151]. Στην έξοδο του υγρού ρεύματος, τα διεγερμένα από το κόκκινο laser στα 633 nm μικροσφαιρίδια, επαναμεταδίδουν έναν κόκκινο φθορισμό (675 nm) και έναν υπέρυθρο (>712 nm).

Κάθε μικροσφαιρίδιο επαναμεταδίδει με ένα διαφορετικό τρόπο και προσδιορίζεται από τις εντάσεις των δυο φθοροχρωμάτων, του κόκκινου και του υπέρυθρου, που καταγράφονται από έναν αισθητήρα στην έξοδο της ροής. Τα φθοροχρώματα έχουν παρόμοιες απαιτήσεις διέγερσης, αλλά μοναδικά προφίλ εκπομπής, τα οποία παρέχουν μοναδικά φασματικά χαρακτηριστικά σε κάθε μεμονωμένη περιοχή των μικροσφαιριδίων ή συνόλων και επιτρέπουν στο κάθε σύνολο να διαφοροποιείται ειδικά από όλα τα άλλα στην πολυπλεξία. Κάθε μικροσφαιρίδιο έχει το δικό του κώδικα χρωματικού προσδιορισμού, και πολλά διαφορετικά μικροσφαιρίδια (μέχρι 100, επί του παρόντος) μπορούν να αναμιχθούν σε έναν ενιαίο σωλήνα, ο οποίος πολλαπλασιάζει σημαντικά τις πιθανότητες ανάλυσης [151, 152]. Κάθε σύνολο μικροσφαιριδίων μπορεί να συνδεθεί ομοιοπολικά με ένα μοναδικό αντιδραστήριο σύλληψης και, από τη στιγμή που τα μικροσφαιρίδια μπορούν να διαχωριστούν μέσω της φασματικής τους «διεύθυνσης» και κάθε «διεύθυνση» σχετίζεται με ένα συγκεκριμένο αναλύτη, τα σφαιρίδια μπορούν να συνδυαστούν σε μια μόνο αντίδραση για να μετρηθούν ταυτόχρονα πολλαπλοί αναλύτες.

Κάθε μικροσφαιρίδιο έχει έναν σύνδεσμο ή ένα βιομόριο που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με αυτό, για τη «σύλληψη του στόχου». Οι δεσμευμένοι στα μικροσφαιρίδια αναλύτες μπορούν, στη συνέχεια, να υποβληθούν σε δευτερεύουσα επεξεργασία, μέσω σύνδεσης με ένα μόριο που περιέχει ένα φθοροφόρο αναφοράς. Για τις πρωτεΐνες, αυτό είναι ένα αντίσωμα ανίχνευσης και, για το mRNA, είναι μία επιμήκυνση της σήμανσης. Η νεότερη γενιά της τεχνολογίας ενσωματώνει, επίσης, μαγνητικά σωματίδια στα μικροσφαιρίδια, έτσι ώστε, μετά τη σύζευξη των μικροσφαιριδίων με τα φθοροφόρα αναφοράς, να μπορούν να συγκρατηθούν σταθερά στη θέση τους στη μικροπλάκα κατά τη διάρκεια μιας διαδικασίας πλύσης της πλάκας, η οποία απομακρύνει τα μη συνδεδεμένα μόρια. Στη συνέχεια, τα μικροσφαιρίδια διέρχονται μέσα από ένα κυτταρόμετρο ροής και οι αναλύτες σύλληψης ποσοτικοποιούνται βάσει των φθοροφόρων αναφοράς και κατηγοριοποιούνται μέσω της ταξινόμησης των φθοροφόρων [152]. Η ένταση φθορισμού του φθοροφόρου αναφοράς είναι ανάλογη με τον αριθμό των δεσμευμένων αναλυτών ανά μικροσφαιρίδιο, και πολλαπλά μικροσφαιρίδια κάθε τύπου αναλύονται σε κάθε δείγμα, για να παρέχουν στατιστική ακρίβεια της μέσης έντασης φθορισμού και, ως εκ τούτου, της ποσότητας αναλύτη. Η τυπική πρωτεϊνική χημική δοκιμασία απαιτεί μόνο 15 ng της συνολικής πρωτεΐνης ανά πηγάδι μικροπλάκας, με μια δυνητική ικανότητα ανίχνευσης άνω των 100 αναλυτών σε πολλαπλά δείγματα, σε λιγότερο από 24 ώρες του συνολικού πειραματικού χρόνου⁴⁰.

⁴⁰ το μεγαλύτερο μέρος του χρόνου δαπανάται στην προετοιμασία του δείγματος

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών καρδιαγγειακών ασθενειών



Εικόνα 25: Σύστημα xMap για πρωτεΐνες και για mRNA

Τα πλεονεκτήματα των μεθόδων κωδικοποίησης μέσω φθορισμού περιλαμβάνουν:

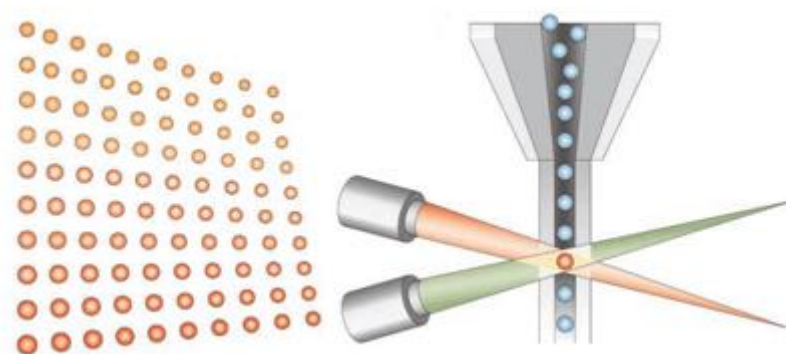
- γρήγορη απόκτηση του σήματος, όπου κάθε μεμονωμένη σήμανση μπορεί να παρέχει 107-108 φωτόνια για την ανίχνευση
- υψηλή ευαισθησία για την οπτική ανίχνευση βιολογικών αντικειμένων, όπου η έννοια ανίχνευση μορίου έχει επικρατήσει για πολλές εφαρμογές [153]
- το σήμα είναι εντοπισμένο, σε αντίθεση με ορισμένα συστήματα ενίσχυσης συνδεδεμένα με ένζυμο
- η διαδικασία σήμανσης είναι άμεση, υπό την προϋπόθεση ότι είναι διαθέσιμες κατάλληλες λειτουργικές ομάδες

Ε.1.3 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟ

Ο όρος «κυτταρομέτρο» δεν είναι ο πλέον ορθός, για τη συσκευή που χρησιμοποιείται, αφού δεν υπάρχει ανάλυση των κυττάρων. Ωστόσο, η αρχή είναι η ίδια, δεδομένου ότι ένα εναιώρημα μικροσφαιριδίων υφίσταται αναρρόφηση και, στη συνέχεια, ακολουθεί μια διαδρομή σε υγρό ρεύμα. Στην έξοδο του υγρού ρεύματος, τα μικροσφαιρίδια διεγείρονται από δύο laser, το καθένα με συγκριμένο ρόλο:

- το κόκκινο laser (633 nm, 10 mW) διεγείρει τα φθοροχρώματα που ενσωματώνονται στα μικροσφαιρίδια που εκπέμπουν στο κόκκινο και στο υπέρυθρο, τα οποία αντιστοιχούν στον χρωματικό κώδικα κάθε μικροσφαιριδίου, επιτρέποντας την ακριβή αναγνώριση του καθενός

- το πράσινο laser (532 nm, 13 mW) διεγείρει το φθορόχρωμα που είναι συζευγμένο με ένα μόριο αναφοράς. Αυτό το μόριο αναφοράς επιτρέπει την ανίχνευση της αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος που συμβαίνει στην επιφάνεια του μικροσφαιριδίου, μετά την προσθήκη ενός σημασμένου συζυγούς με ένα φθορόχρωμα που εκπέμπει στο πράσινο. Συνήθως είναι η φυκοερυθρίνη που διεγείρεται στα 532 nm και εκπέμπει εκ νέου στα 575 nm. Ο εκπεμπόμενος φθορισμός είναι απόδειξη της αντίδρασης στην επιφάνεια και καθορίζει τη θετικότητα της αντίδρασης σύμφωνα με ένα κατάφλι φθορισμού κατάλληλο για κάθε μικροσφαιρίδιο. Ο φθορισμός που εκπέμπεται από το φθορόχρωμα αναφοράς ανιχνεύεται από έναν φωτοπολλαπλασιαστή στην έξοδο του υγρού ρεύματος [150, 151]



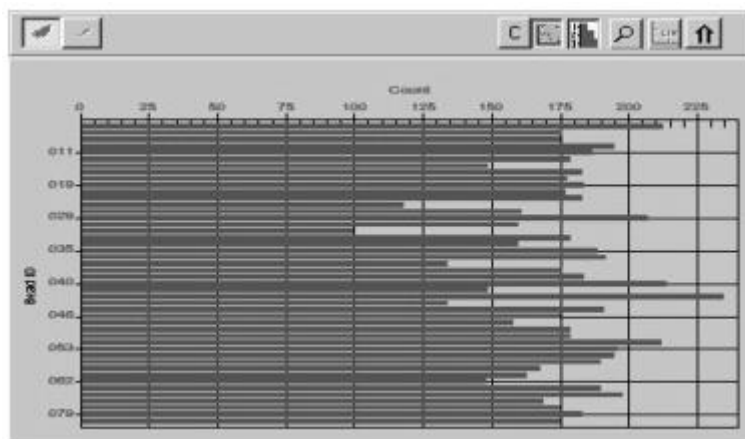
Εικόνα 26: Διέγερση μικροσφαιριδίων με κόκκινο και πράσινο laser [Πηγή, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2002(www.nature.com)]

Το σύστημα FLEXMAP 3D είναι η δεύτερη γενιά ανάλυσης και προσφέρει αυξημένη ευαισθησία, παρατεταμένο δυναμικό εύρος, αυξημένη πολυπλεξία μέχρι 500 αναλύτες και αυξημένη απόδοση. Επιπρόσθετα, το όργανο αυτό έχει σχεδιαστεί για να υπάρχει εύκολη διασύνδεση με τους αυτοματοποιημένους υγρούς χειριστές και είναι συμβατό με τις πλάκες 96 πηγαδιών και 384 πηγαδιών. Το σύστημα είναι, επίσης, εξοπλισμένο με αυτορύθμιση του καθετήρα για τη συλλογή των δειγμάτων. Η υψηλή ανάλυση ενισχύεται μέσω ενός συστήματος διπλής σύριγγας, το οποίο επιτρέπει στις πλάκες να αναλυθούν δύο έως τρεις φορές πιο γρήγορα από την προηγούμενη γενιά μηχανημάτων, 100/200. Μία πλάκα 96 πηγαδιών μπορεί να «διαβαστεί» σε περίπου 20 λεπτά, ενώ μία πλάκα 384 πηγαδιών σε περίπου 75 λεπτά. Το σύστημα FLEXMAP 3D περιλαμβάνει επίσης εύκολη καθορισμένη σειρά εντολών για τις λειτουργίες βαθμονόμησης και τακτικής συντήρησης. Λόγω του ενισχυμένου δυναμικού εύρους του, αναλύτες πολύ διαφορετικών επιπέδων, που προηγούμενα έπρεπε να διαχωριστούν στα πηγάδια, μπορούν τώρα να υπολογιστούν στην ίδια αντίδραση. Αυτός ο συνδυασμός των ενισχυμένων χαρακτηριστικών και δυνατοτήτων κάνει το FLEXMAP 3D ιδανικό για γρήγορη ανάπτυξη δοκιμών και για ανακάλυψη εφαρμογών υψηλής απόδοσης.

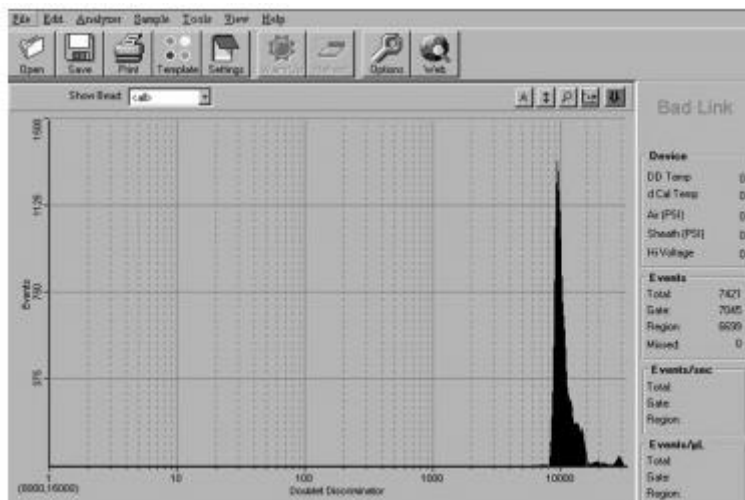
Ε.1.4 ΣΥΣΚΕΥΗ ΑΝΑΓΝΩΣΗΣ ΠΛΑΚΑΣ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗΣ ΠΟΥ ΕΛΕΓΧΕΙ ΤΟ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟ ΑΠΟΚΤΗΣΗΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Χρησιμοποιούνται πλάκες 96 πηγαδιών (τύπου ELISA). Μια βελόνα κατεβαίνει σε κάθε πηγάδι και απορροφά το μείγμα της αντίδρασης στο υγρό ρεύμα. Τα μικροσφαιρίδια διεγείρονται στην έξοδο της ροής, μέσω των δύο laser και, ακολούθως, ανιχνεύονται και μετρούνται μέχρις ότου κάθε ένα να ανιχνευθεί τουλάχιστον 100 φορές, δηλαδή να υπάρχουν τουλάχιστον 10.000 γεγονότα (100×100), όπως φαίνεται και στην εικόνα 27.

Κατά τη διάρκεια αυτής της ανάγνωσης, μπορεί να ακολουθηθεί, σε πραγματικό χρόνο, η απόκτηση δεδομένων, από την αύξηση της κορυφής απόκτησης αυτών. Το λογισμικό απόκτησης δύναται να ανιχνεύει και να εξαλείφει τις δυνάδες των μικροσφαιριδίων που δε χρησιμοποιούνται για την απόκτηση των κορυφών. Αν η κορυφή δεν εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της ανάγνωσης, είναι πρόβλημα απόφραξης στη βελόνα ή πρόβλημα του επιπέδου στο οποίο βρίσκεται η βελόνα, δηλαδή, δεν κατεβαίνει αρκετά κάτω στο πηγάδι, ώστε να απορροφήσει αρκετό μείγμα.



Εικόνα 27: Μέτρηση μικροσφαιριδίων κατά την απόκτηση δεδομένων

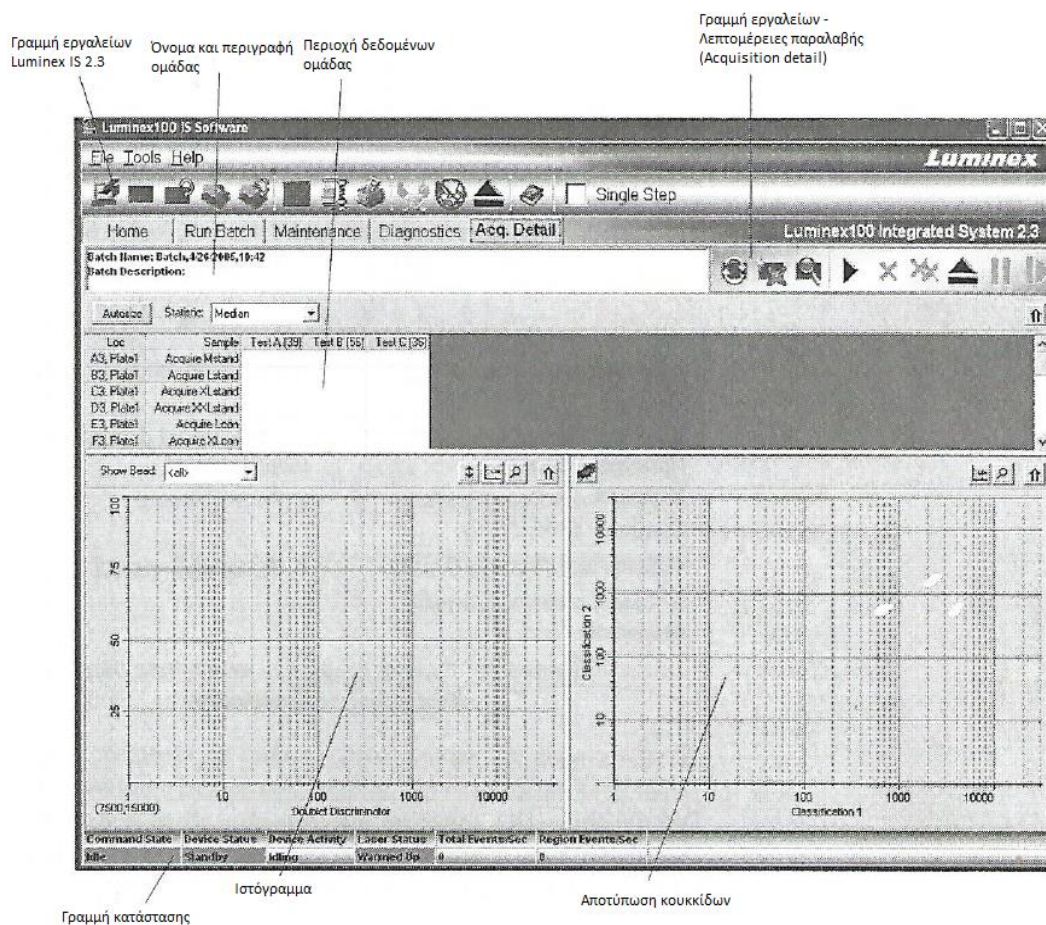


Εικόνα 28: Κορυφή απόκτησης δεδομένων

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών καρδιαγγειακών ασθενειών

Το μηχάνημα διαθέτει προηγμένες δυνατότητες παρακολούθησης ομαδικών δειγματοληψιών και «άμεση» παραλαβή δεδομένων χωρίς χρήση προτύπων. Η βασική λειτουργία είναι η σε πραγματικό χρόνο παρακολούθηση ομαδικών δειγμάτων κατά την παραλαβή, διαμέσου της εμφάνισης στατιστικών στοιχείων των σφαιριδίων των δειγμάτων, ιστογραμμάτων και δεδομένων αποτύπωσης κουκκίδων [154].

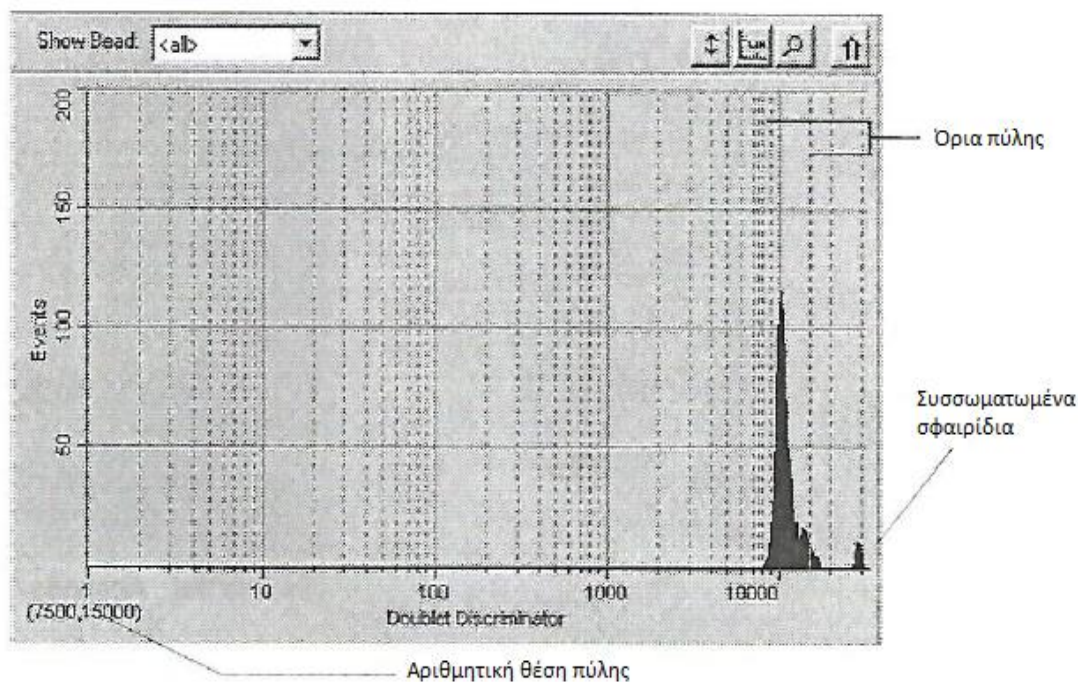
Κατά την ομαδική παραλαβή, ορισμένα στατιστικά στοιχεία σφαιριδίων μπορεί να είναι χρήσιμα, αν παρουσιαστούν σφάλματα στην ομάδα. Αν, για παράδειγμα, οι αναλύσεις δειγμάτων αποτυγχάνουν συνεχώς λόγω ανεπαρκούς αριθμού σφαιριδίων, μπορεί να γίνει εμφανές κατά πόσον η αποτυχία οφείλεται στη χαμηλή συγκέντρωση σφαιριδίων δείγματος ή αν υπάρχουν άλλα προβλήματα στον προσδιορισμό [155]. Οι λεπτομέρειες παραλαβής εμφανίζονται στην εικόνα 29.



Εικόνα 29: Κартέλα Λεπτομέρειες Παραλαβής (Acquisition Detail)

Το ιστόγραμμα εμφανίζει εξ ορισμού τη διάκριση δυάδων (Doublet Discriminator/DD) στον άξονα X και τα συμβάντα (Events) στον άξονα Ψ. Δυάδες εμφανίζονται όταν κολλάνε δύο μικροσφαιρίδια, δημιουργώντας ανεπιθύμητα αποτελέσματα. Όταν ενεργοποιείται η πύλη, εμφανίζονται δύο κατακόρυφες κόκκινες διακεκομμένες γραμμές, οι οποίες αντιπροσωπεύουν τις θέσεις πύλης που ορίζονται από το πρότυπο ή από ρυθμίσεις. Μετά τη ρύθμιση της πύλης, όλα όσα βρίσκονται εκτός αυτής, αγνοούνται. Κατά την ομαδική παραλαβή, η θέση της πύλης δεν αλλάζει· οι θέσεις της

πύλης αλλάζουν πριν την παραλαβή των δεδομένων, αφού το σύστημα την ολοκληρώσει ή μετά από παύση του συστήματος. Τα δεδομένα εξακολουθούν να συλλέγονται σύμφωνα με τις θέσεις πύλης που έχουν οριστεί στο πρότυπο του προσδιορισμού. Η πύλη που είναι ενεργοποιημένη όταν το σύστημα συλλέγει δεδομένα, προσδιορίζει τις τιμές που θα χρησιμοποιηθούν για την παραλαβή των αποτελεσμάτων. Η εφαρμογή ή η αλλαγή μιας πύλης για υπάρχοντα δεδομένα δεν αλλάζει τις υπολογιζόμενες τιμές. Οι θέσεις πύλης, οι οποίες χρησιμοποιούνται κατά τη συλλογή δεδομένων και βρίσκονται στην κάτω δεξιά γωνία του ιστογράμματος, είναι οι αριθμητικές τιμές που επιλέγονται στο πρότυπο. Στην εικόνα 30 παρουσιάζεται η ρύθμιση της πύλης DD [155].

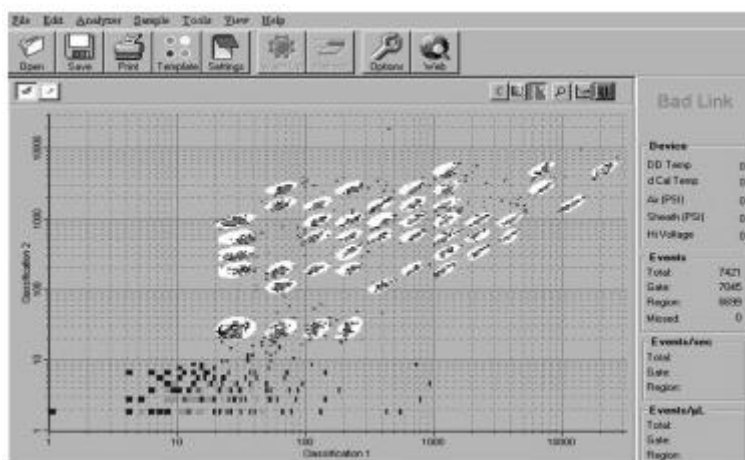


Εικόνα 30: Ρύθμιση πύλης DD

Η αποτύπωση κουκκίδων (χάρτης σφαιριδίων) παρουσιάζει με γραφικά τη συλλογή δεδομένων πραγματικού χρόνου. Οι προεπιλεγμένοι άξονες είναι η Ταξινόμηση 1 (Classification 1) στον άξονα X και η Ταξινόμηση 2 (Classification 2) στον άξονα Ψ (εικόνα 31). Για να φανεί η αποτύπωση κουκκίδων πρέπει να χρησιμοποιηθεί ο προεπιλεγμένος άξονας. Γενικώς, η αποτύπωση διασπώμενων κουκκίδων εμφανίζει μόνο τα 100 πιο πρόσφατα παραληφθέντα συμβάντα. Η αποτύπωση πυκνότητας κουκκίδων εμφανίζει μια σταθερή συσσώρευση συμβάντων. Η αύξηση της πυκνότητας δηλώνεται με χρώματα που παρουσιάζουν αντίθεση. Η αποτύπωση πυκνότητας κουκκίδων επιτρέπει την οπτική εξάλειψη των τιμών δεδομένων που προσδιορίζονται ως ασήμαντες για προβολή. Μετά την παραλαβή δεν εμφανίζεται η αποτύπωση διασπώμενων κουκκίδων, καθώς πρόκειται για μια λειτουργία πραγματικού χρόνου [155].

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών
και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών
καρδιαγγειακών ασθενειών

Κατά τη διάρκεια της απόκτησης δεδομένων, είναι επίσης δυνατή η παρακολούθηση της θέσης του νέφους των μικροσφαιριδίων μέσα σε μια προκαθορισμένη μάσκα – κάθε σύννεφο αντιστοιχεί σε μια παρτίδα μικροσφαιριδίων (εικόνα 31). Μερικές φορές μπορεί να παρατηρηθεί μια εκτροπή του νέφους των μικροσφαιριδίων σε σχέση με τη μάσκα. Τότε, είτε πρόκειται για εσωτερικό σφάλμα σήμανσης των μικροσφαιριδίων, είτε για αδυναμία προσαρμογής της συσκευής, της οποίας τα laser είναι ευαίσθητα σε αλλαγές της θερμοκρασίας. Στην πραγματικότητα, μια αλλαγή 3°C γύρω από την τιμή του κατωφλίου καθιστά απαραίτητη μια νέα βαθμονόμηση του συστήματος. Ο κατασκευαστής συστήνει τα laser να αναπροσαρμόζονται κάθε 15 μέρες, αν δεν υπάρχει αλλαγή στη θερμοκρασία. Μια άλλη δυνατότητα αφορά σε κακή συντήρηση του κιτ που περιέχει τα μικροσφαιρίδια, καθώς είναι φωτοευαίσθητα [155].

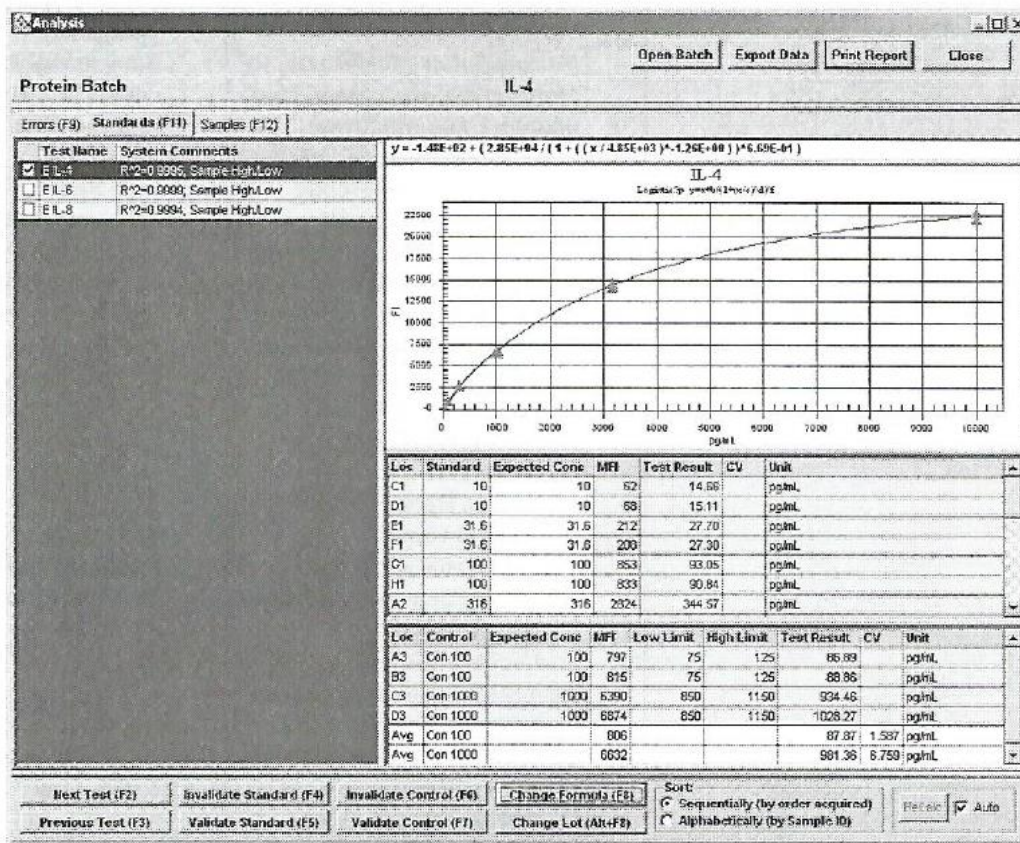


Εικόνα 31: Ταξινόμηση των νεφών των μικροσφαιριδίων με βάση τον εκπεμπόμενο κόκκινο φθορισμό και τον υπέρυθρο

Το μηχάνημα δίνει τη δυνατότητα εμφάνισης ποσοτικής πρότυπης καμπύλης της ομάδας. Οι ομάδες ποιοτικού προσδιορισμού εμφανίζονται με τη μορφή γραφήματος στον πρότυπο προσδιορισμό. Πάνω από τις απεικονιζόμενες πληροφορίες, η καρτέλα εμφανίζει τον τύπο που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των ομαδικών δεδομένων. Κάτω από τις απεικονιζόμενες πληροφορίες, η καρτέλα εμφανίζει τις τιμές των προτύπων δειγμάτων και των μαρτύρων⁴¹ για την επιλεγμένη δοκιμή. Αυτές οι πληροφορίες εμφανίζονται στην εικόνα 32 [155].

⁴¹ χρησιμοποιούνται για επαλήθευση της βαθμονόμησης του αναλυτή 100/200

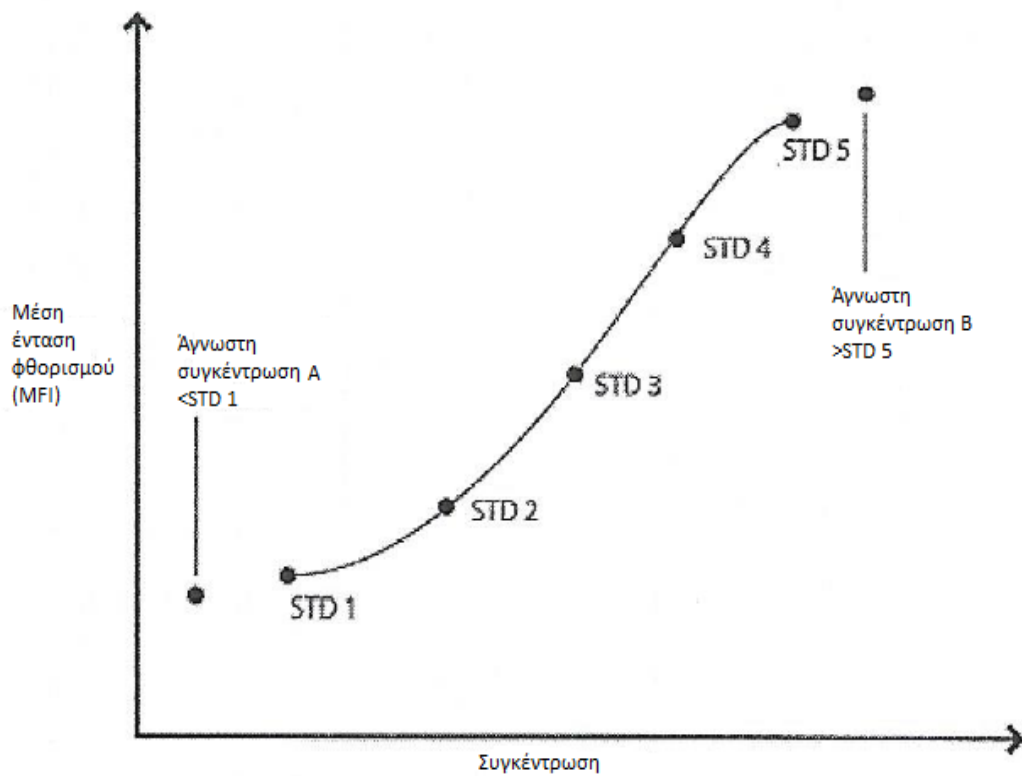
Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών καρδιαγγειακών ασθενειών



Εικόνα 32: Παράθυρο Ανάλυση (Analysis)

Όταν η τιμή της μέσης έντασης φθορισμού (Median Fluorescent Intensity/MFI) για ένα άγνωστο δείγμα ή μάρτυρα βρίσκεται εκτός του εύρους τιμών MFI της πρότυπης καμπύλης, η συγκέντρωση δεν υπολογίζεται. Το αποτέλεσμα για το άγνωστο δείγμα ή μάρτυρα αναφέρεται με το σύμβολο μικρότερο από (<) ή μεγαλύτερο από (>) δίπλα στην αναμενόμενη συγκέντρωση του αντίστοιχου προτύπου δείγματος. Τα εκτός εύρους δείγματα και οι μάρτυρες έχουν την επισήμανση «Δείγμα Υψηλό/Χαμηλό» («Sample High/Low») στη στήλη των σχολίων. Αν ένα δείγμα βρίσκεται εντός της περιοχής τιμών MFI της πρότυπης καμπύλης, αλλά η τιμή MFI του δείγματος δεν τέμνει την καμπύλη, το αποτέλεσμα αναφέρεται ως «Σφάλμα» («Error») [155]. Στην εικόνα 33 φαίνεται η πρότυπη καμπύλη μη ανταγωνιστικού προσδιορισμού (δηλαδή το πρώτο δείγμα είναι το πιο πυκνό, ενώ το τελευταίο το πιο αραιό) με το υπόμνημα της, ενώ στην εικόνα 34 εμφανίζεται η πρότυπη καμπύλη ανταγωνιστικού προσδιορισμού (δηλαδή το πρώτο δείγμα είναι το πιο αραιό, ενώ το τελευταίο το πιο πυκνό) με το αντίστοιχο υπόμνημα [155].

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών καρδιαγγειακών ασθενειών

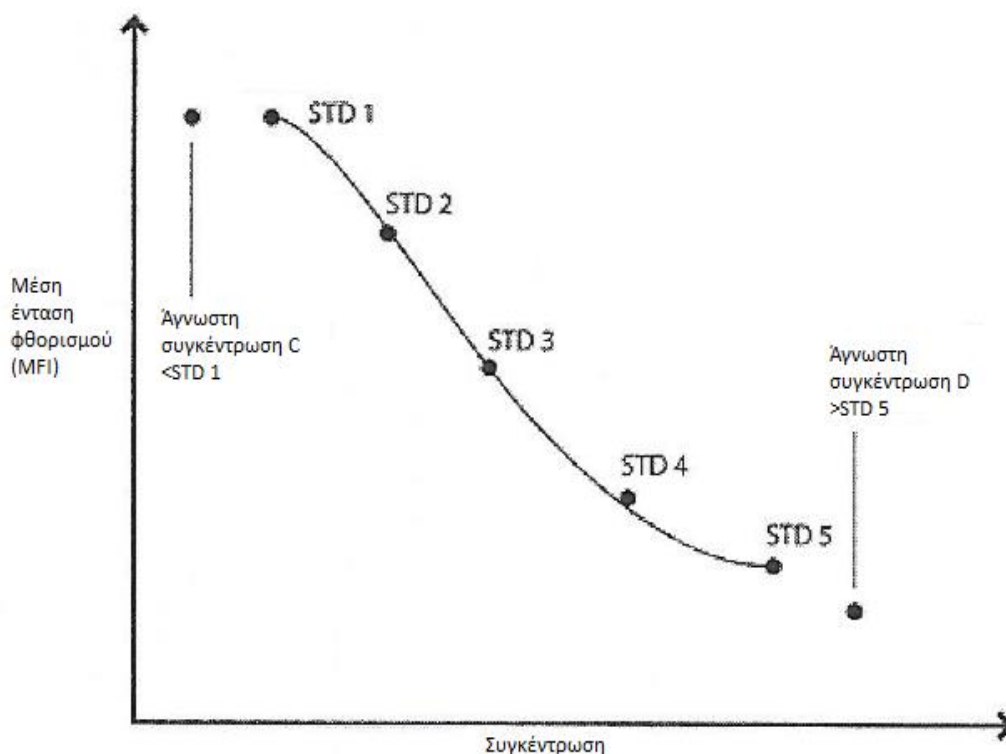


Εικόνα 33: Μη ανταγωνιστικός προσδιορισμός

Υπόμνημα μη ανταγωνιστικού προσδιορισμού

Κατάσταση	Ετικέτα συγκέντρωσης	MFI Χρησιμοποιούμενου προτύπου
Αριστερή πλευρά καμπύλης	< ελάχιστη συγκέντρωση προτύπου	Ελάχιστο
Δεξιά πλευρά καμπύλης	> μέγιστη συγκέντρωση προτύπου	Μέγιστο

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών καρδιαγγειακών ασθενειών



Εικόνα 34: Ανταγωνιστικός προσδιορισμός

Υπόμνημα ανταγωνιστικού προσδιορισμού

Κατάσταση	Ετικέτα συγκέντρωσης	MFI Χρησιμοποιούμενου προτύπου
Αριστερή πλευρά καμπύλης	< ελάχιστη συγκέντρωση προτύπου	Μέγιστο
Δεξιά πλευρά καμπύλης	> μέγιστη συγκέντρωση προτύπου	Ελάχιστο

Τα δείγματα υποβάθρου χρησιμοποιούνται συχνά στη διαδικασία προσδιορισμού. Παρόλο που συνιστώνται, η χρήση ή η μη χρήση αυτών είναι στην ευχέρεια του δημιουργού του κιτ. Εφόσον περιλαμβάνονται δείγματα υποβάθρου, δηλαδή, δείγματα χωρίς ενεργό ουσία για δοκιμή, αυτά ορίζονται στο πρότυπο του προσδιορισμού. Το σύστημα χρησιμοποιεί δείγματα υποβάθρου για να αφαιρεί τον θόρυβο του υποβάθρου του προσδιορισμού από τα αποτελέσματα των δειγμάτων. Τα συνηθισμένα δείγματα υποβάθρου περιέχουν ζεύγη σφαιριδίων, ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού, αντιδραστήρια ανίχνευσης και φθορισμοφόρο ανταποκριτή. Τα δείγματα υποβάθρου δεν περιέχουν αναλυόμενες ουσίες-στόχους. Εντούτοις, αν το δείγμα υποβάθρου είναι κατάλληλα προσδιορισμένο, το σύστημα αφαιρεί τον αναφερόμενο φθορισμό του δείγματος υποβάθρου από όλα τα άλλα δείγματα μιας ομάδας για να αναφέρει την καθαρή μέση ένταση φθορισμού (MFI). Στην περίπτωση που μια ομάδα περιέχει περισσότερα του ενός δείγματα υποβάθρου, από τις τιμές φθορισμού των δύο

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών
και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών
καρδιαγγειακών ασθενειών

δειγμάτων υποβάθρου υπολογίζεται η μέση τιμή, η οποία, στη συνέχεια, και αφαιρείται από τα άλλα δείγματα, ώστε να υπολογιστεί η καθαρή ένταση φθορισμού [155].

Στην εικόνα 35 αναφέρονται δοκιμές από την ομάδα και εμφανίζονται αποτελέσματα για κάθε δείγμα. Αριστερά φαίνονται οι δοκιμές (IL-4, IL-6, IL-8), με τη δοκιμή IL-4 να είναι επιλεγμένη, εν προκειμένω. Δεξιά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της δοκιμής IL-4. Για τη δοκιμή που αντιστοιχεί στο κελί G3 το αποτέλεσμα είναι «<10» και η αντίστοιχη στήλη Σχόλια (Comments) για αυτό το δείγμα αναφέρει: «Δείγμα Υψηλό/Χαμηλό» («Sample High/Low»), επειδή το συγκεκριμένο δείγμα έχει τιμή MFI μικρότερη από τη χαμηλότερη τιμή προτύπου στην πρότυπη καμπύλη αυτής της μη ανταγωνιστικής ομάδας.

Test Name	System Comments	Loc	Sample ID	MFI	Test Result	CV	Unit	Comments
IL-4	R ² =0.9999, Sample High/Low	Avg	Background	7				
IL-6	R ² =0.9999, Sample High/Low	A1	Background	7				
IL-8	R ² =0.9994, Sample High/Low	B1	Background	7				
		B3	Unknown 1	4309	569.61		pg/mL	
		G3	Unknown 1	4309	580.61		pg/mL	
		G3	Unknown 2	3	< 10		pg/mL	Sys Sample High/Low
		H3	Unknown 2	1	< 10		pg/mL	Sys Sample High/Low
		A4	Unknown 3	15848	> 10,000		pg/mL	Sys Sample High/Low
		B4	Unknown 3	15000	> 10,000		pg/mL	Sys Sample High/Low
		C4	Unknown 4	4758	643.26		pg/mL	
		D4	Unknown 4	4259	581.58		pg/mL	
		Avg	Unknown 1	4309	569.61	0.00	pg/mL	
		Avg	Unknown 2	2	N/A	0.00	pg/mL	
		Avg	Unknown 3	2	N/A	0.00	pg/mL	
		Avg	Unknown 4	4508	602.40	9.53	pg/mL	

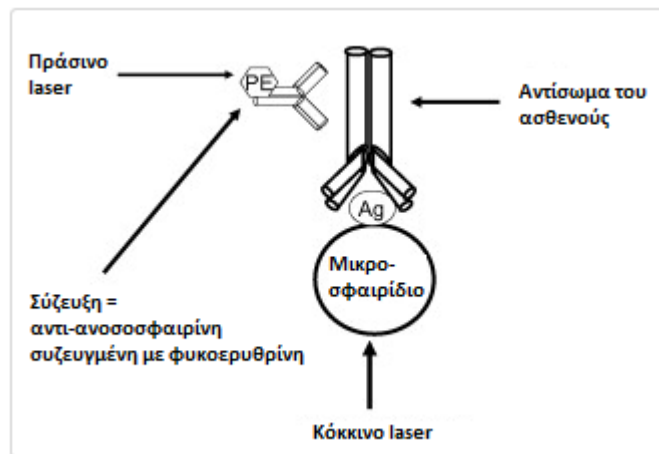
Εικόνα 35: Παράθυρο Ανάλυσης (Analysis)

Το σύστημα δεν επισημαίνει τα αποτελέσματα ως φυσιολογικά ή μη φυσιολογικά με βάση ένα καθορισμένο εύρος τιμών. Αντιθέτως, οι επισημάνσεις σφαλμάτων αναδεικνύουν μόνο τα δείγματα που βρίσκονται κάτω ή πάνω από τα όρια της πρότυπης καμπύλης.

Ε.1.5 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

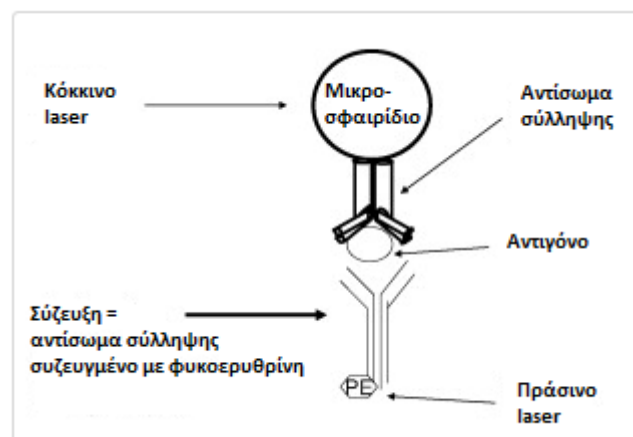
Οι εφικτές αναλύσεις που μπορούν να γίνουν με την εν λόγω τεχνολογία, όπως έχει αναλυθεί διεξοδικά ανωτέρω, είναι οι ακόλουθες:

- έρευνα σε αντισώματα → τα μικροσφαιρίδια έρχονται σε σύζευξη με τα αντιγόνα. Τα αντισώματα που ενδέχεται να είναι παρόντα στον ασθενή δεσμεύονται στο αντιγόνο που έχει συζευχθεί με τα μικροσφαιρίδια. Η αποκάλυψη της αντίδρασης αντιγόνου-αντισώματος στην επιφάνεια του μικροσφαιριδίου γίνεται με τη χρήση μιας ανθρώπινης αντι-ανοσοσφαιρίνης, σημασμένης με ένα φθορόχρωμα που εκπέμπει στο πράσινο, όπως η φυκοερυθρίνη [156]



Εικόνα 36: Ανίχνευση αντισώματος με τη βοήθεια της πολλαπλούς τεχνολογίας

- έρευνα συγκεκριμένων πεπτιδίων → όταν τα μικροσφαιρίδια έχουν συζευχθεί με τα αντισώματα σύλληψης, η αποκάλυψη γίνεται με ένα δεύτερο σημασμένο αντι-πεπτιδικό αντίσωμα με ένα φθορόχρωμα που εκπέμπει στο πράσινο [152]

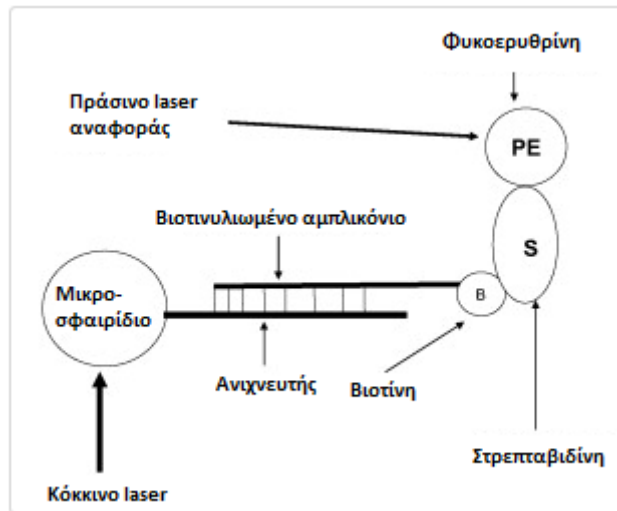


Εικόνα 37: Ανίχνευση αντιγόνων με τη βοήθεια της πολλαπλούς τεχνολογίας

- έρευνα συγκεκριμένων αλληλόμορφων → όταν τα μικροσφαιρίδια υφίστανται σύζευξη με ειδικούς ανιχνευτές νουκλεϊκών οξέων επιτρέπουν την αναγνώριση των αμπλικονίων [157]. Το DNA ή/και το RNA στόχου είναι αρχικά ενισχυμένο

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών καρδιαγγειακών ασθενειών

με PCR χρησιμοποιώντας ειδικούς βιοτινυλιωμένους εκκινητές. Τα προϊόντα της βιοτινυλιωμένης PCR που λαμβάνονται, στη συνέχεια μετουσιώνονται. Μετέπειτα, τα βιοτινυλιωμένα και μετουσιωμένα αμπλικόνια, έρχονται σε επαφή με τα μικροσφαιρίδια. Η στερέωση ενός αμπλικονίου στον ειδικό ανιχνευτή που υπάρχει στην επιφάνεια του μικροσφαιριδίου, θα αποκαλυφθεί χρησιμοποιώντας στρεπταβιδίνη συζευγμένη με φυκοερυθρίνη. Ως αποτέλεσμα, η στρεπταβιδίνη δεσμεύεται με τη βιοτίνη των αμπλικονίων.



Εικόνα 38: Ανίχνευση συγκεκριμένων αλληλόμορφων με τη βοήθεια της πολλαπλούς τεχνολογίας

E.1.6 ΕΠΙΛΥΣΗ ΘΕΜΑΤΩΝ

Με την πρόοδο της τεχνολογίας και την εξέλιξη της επιστήμης περιορίζονται ή και εξαλείφονται διάφορα θέματα που υπήρχαν με τις προηγούμενες μεθόδους που χρησιμοποιούνταν για την ανάλυση σε βιολογικό υλικό. Ενδεικτικά αναφέρονται κάποια από τα επιλυμένα ζητήματα:

- μείωση του μεγάλου όγκου δείγματος το οποίο απαιτείτο στις προηγούμενες μεθόδους, καθώς στον μικρό πλέον όγκο δείγματος περιέχεται όλη η ποσότητα που είναι απαραίτητη για τα πειράματα
- αντιδραστήρια που μπορούν να συνδυαστούν, ώστε να μελετηθούν ταυτόχρονα περισσότερες της μίας πρωτεΐνης, μειώνοντας το κόστος και τον χρόνο των πειραμάτων
- μείωση δημιουργίας συσσωματωμάτων, άρα η ανάλυση επιτυγχάνεται με ορθό τρόπο και τα συμπεράσματα είναι αρκετά ασφαλή
- περιορισμός χρόνου επεξεργασίας δειγμάτων, καθώς και διάρκειας εκτέλεσης πειράματος
- ελάττωση χρόνου και χρήματος ως προς τις βαθμονομήσεις, εφόσον αυτές γίνονται ως μέρος της διαδικασίας του πειράματος, πριν την έναρξη αυτού, και ο εξειδικευμένος τεχνικός έλεγχος περιορίζεται στον άκρως αναγκαίο, συνήθως ετήσιο, αλλά αυτό καθορίζεται και από τη συχνότητα χρήσης του μηχανήματος

Βάσει της νέας τεχνικής, δηλαδή της πολλαπλής τεχνολογίας, τα όποια προβλήματα υπήρχαν με τις προηγούμενες μεθόδους σταδιακά εξαλείφθηκαν και πλέον τα πειράματα διεξάγονται με μεγαλύτερη ευκολία σε πολλαπλό επίπεδο.

ΣΤ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΣΤ.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΣΤ.1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σκοπός του κεφαλαίου αυτού είναι η παρουσίαση των αποτελεσμάτων, που προέκυψαν από τη συλλογή του πλάσματος του αίματος των υποκειμένων προς μελέτη και της μέτρησης των βιοδεικτών σε αυτό, μέσω του μηχανήματος κυτταρομετρίας ροής και μικροσφαιριδίων, καθώς και η μετέπειτα στατιστική τους επεξεργασία, ώστε να είναι εφικτή η σύγκριση των βιοδεικτών που σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση. Παράλληλα, συλλέχθηκαν και κλινικά δεδομένα των υπό μελέτη υποκειμένων, τα οποία συνυπολογίστηκαν στην αξιολόγηση του μοντέλου του δένδρου ταξινόμησης και παλινδρόμησης που κατασκευάστηκε για τον διαχωρισμό των υποκειμένων σε συμπτωματικούς και ασυμπτωματικούς, προκειμένου να δημιουργηθεί ένας δυνητικός αλγόριθμος προς χρήση στην κλινική ιατρική.

ΣΤ.1.2 ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Στην παρούσα μελέτη αξιοποιήθηκαν 136 άτομα, τα οποία, είτε είχαν συμπτώματα καρωτιδικής αθηροσκλήρωσης, είτε δεν είχαν εμφανείς εκδηλώσεις της ασθένειας. Το σύνολο των ατόμων, είχε νοσηλευτεί στην αγγειοχειρουργική κλινική ή στην καρδιολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου «Αττικόν». Επιπρόσθετα, όλοι οι συμμετέχοντες υποβλήθηκαν σε υπερηχογραφικό έλεγχο καρωτίδων κατά την έναρξη της μελέτης· στο πλαίσιο αυτό, ο βαθμός καρωτιδικής στένωσης υπολογίστηκε με βάση κατευθυντήριες οδηγίες⁴² της Ευρωπαϊκής Ένωσης Αγγειοχειρουργικής. Βάσει αυτών, τα άτομα που συγκαταλέγονται στους συμπτωματικούς ασθενείς, διαθέτουν βαθμό αθηρωματικής στένωσης άνω του 50%, ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη δημιουργία ισχαιμικού εγκεφαλικού. Από την άλλη, οι επονομαζόμενοι ασυμπτωματικοί έχουν βαθμό αθηρωματικής στένωσης μικρότερο του 50%.

⁴² <https://www.med.uth.gr/pms.vasc.thrombosis/wp-content/uploads/2021/10/pdf>

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών
και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών
καρδιαγγειακών ασθενειών

Τα δημογραφικά δεδομένα των ασθενών που καταγράφηκαν συμπεριλαμβάνουν το φύλο, την ηλικία, τις συνήθειες καπνίσματος, ενώ τα κλινικά δεδομένα περιλαμβάνουν το δείκτη μάζας σώματος⁴³, τη συστολική πίεση του αίματος⁴⁴, τα τριγλυκερίδια, καθώς και τα λευκά αιμοσφαίρια. Τα επίπεδα βάσει των οποίων κάποιος χαρακτηρίζεται ως υγιής ή όχι, ταξινομούνται όπως φαίνονται παρακάτω:

- δείκτης μάζας σώματος →

ελλιποβαρής	<18,5
φυσιολογικός	18,5-25
υπέρβαρος	25-30
παχύσαρκος	>30

- συστολική πίεση αίματος →

φυσιολογική	100-140mmHg
-------------	-------------

- τριγλυκερίδια →

φυσιολογικά	<150
σχετικά αυξημένα	150-199
υψηλά	200-499
πολύ υψηλά	>500

- λευκά αιμοσφαίρια →

μέσο κανονικό εύρος	4.500-10.000/mm ³
---------------------	------------------------------

Όλοι οι ασθενείς προέβησαν σε συλλογή αίματος τις πρωινές ώρες (8:00-10:00), έπειτα από ολονύχτια «νηστεία».

ΣΤ.1.3 ΥΛΙΚΑ-ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ

Η βιολογική διαδικασία εξελίχθηκε σε διάφορα στάδια μέχρι το δείγμα να καταστεί έτοιμο προς ανάλυση. Αρχικά, απομονώθηκε το πλάσμα του αίματος από τους ασθενείς, καταχωρήθηκε με αύξοντα αριθμό σε ειδικούς περιέκτες (ependorffs) και καταψύχθηκε στους -80 °C, προκειμένου να διατηρηθεί. Κάθε φορά που χρειαζόταν να υποστεί βιολογική επεξεργασία, προκειμένου να εισαχθεί στο μηχάνημα κυτταρομετρίας ροής και μικροσφαιριδίων και να προκύψουν τα βιολογικά αποτελέσματα, οι αντίστοιχοι περιέκτες ξεπαγώνονταν και τοποθετούνταν σε ειδικό μηχάνημα δόνησης (vortex) προκειμένου να ελεγχθεί η ροή τους. Έπειτα, οδηγούνταν στο μηχάνημα φυγοκέντρωσης για χρονικό διάστημα 5 λεπτών, στις 12.000 στροφές. Μέσω αυτής της διαδικασίας το μείγμα διαχωριζόταν σε δύο φάσεις: η μία ήταν αυτή που βρισκόταν στο επάνω τμήμα του περιέκτη και από αυτήν γινόταν η άντληση της αντίστοιχης ποσότητας πλάσματος που χρειαζόταν, και η άλλη αυτή που βρισκόταν

⁴³ Προσδιορίζεται μέσω της εξίσωσης Βάρους/Ύψος²

⁴⁴ Μετρήθηκε δις με τον ασθενή καθήμενο για τουλάχιστον 15 λεπτά και με ένα ενδιάμεσο χρονικό διάστημα μεταξύ των μετρήσεων των 5 λεπτών

στο κάτω μέρος του, το επονομαζόμενο ίζημα. Αντλείτο πάντα διπλή ποσότητα από αυτήν που χρειαζόταν για τις βιολογικές μετρήσεις, προκειμένου να διασφαλιστεί ότι δε θα συμβεί κάποιο «ατύχημα» (πχ. κατά την τοποθέτηση στους περιέκτες να χανόταν ποσότητα υλικού, επομένως να μην επαρκούσε η εναπομείνασα), και τοποθετείτο σε αριθμημένους περιέκτες. Στις περιπτώσεις που θα εκτελεστούν αρκετές βιολογικές διαδικασίες με το ίδιο πλάσμα αίματος, τότε εξάγεται περισσότερη ποσότητα πλάσματος προκειμένου να μην είναι ελλιπής και έτσι παραστεί ανάγκη να ξαναξεπαγώνει ολόκληρο το αίμα, καθώς, κάθε φορά που υπάρχει ξεπάγωμα του αίματος, αυτό υφίσταται μερική αλλοίωση. Τέλος, οι αρχικοί περιέκτες με όλη την ποσότητα αίματος επανατοποθετούνταν στη βαθιά κατάψυξη προκειμένου να μην αλλοιωθεί το αίμα.

Έπειτα από την απόκτηση του πλάσματος αίματος από τους ασθενείς, βάσει της παραπάνω διαδικασίας και προκειμένου να έρθει το μείγμα σε μορφή ώστε να μπορέσει να εισαχθεί στο μηχάνημα κυτταρομετρίας ροής και μικροσφαιριδίων προς επεξεργασία, υφίστατο ένα πρωτόκολλο δυο ημερών, ως ακολούθως:

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 1^{ης} ΜΕΡΑΣ

1. Το πλάσμα αίματος έχει ξεπαγωθεί και έχει ελεγχθεί η ροή του. Αφήνεται στην άκρη, μέχρι να χρησιμοποιηθεί
2. Ανοίγεται το κουτί που περιέχει τα βιολογικά υλικά προκειμένου να ετοιμαστεί το δείγμα
3. Σε ένα άδειο δοχείο (μπανάκι) αδειάζεται ολόκληρο το μπουκάλι που περιέχει το υγρό ξεπλύματος (wash buffer) και συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό μέχρι η ποσότητα να είναι συνολικά 300ml
4. Χρησιμοποιούνται τα 0,2ml από το προηγούμενο υγρό, προκειμένου να ξεπλυθεί η πλάκα που θα υποδεχθεί το βιολογικό υλικό. Γίνονται διαδοχικές πλύσεις, με τη βοήθεια της πιπέτας⁴⁵, και μεταξύ των πλύσεων η πλάκα εισάγεται στο μηχάνημα ταρακούνησης (shaker) για διάστημα 10 λεπτών
5. Στα ειδικά μπουκάλια, που περιέχουν το μείγμα που δημιουργεί την πρότυπη καμπύλη⁴⁶, δηλαδή στα standards⁴⁷, εισάγονται 0,25ml απιονισμένου νερού και έπειτα αναδεύονται τα μπουκάλια 10 φορές με το χέρι και στη συνέχεια εισάγονται στο vortex για 1 λεπτό
6. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και στα ειδικά μπουκάλια που περιέχουν το μείγμα που ελέγχει αν οι τιμές βρίσκονται εντός του οριζόμενου πεδίου, δηλαδή στα controls
7. Προκειμένου να δημιουργηθούν 7 standards (σε δοκιμές υψηλής απόδοσης) ή 6 (σε δοκιμές έρευνας και ανάπτυξης), ακολουθείται η εξής διαδικασία: Το

⁴⁵ Εργαστηριακό εργαλείο που χρησιμοποιείται για την ακριβή μέτρηση και μεταφορά όγκου υγρού

⁴⁶ Δημιουργείται από τα πρότυπα (standards) που υπάρχουν σε κάθε κιτ ανάλυσης

⁴⁷ Είναι γνωστές συγκεντρώσεις των μελετώμενων αναλυτών, με στόχο τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης, ώστε να μπορούν να προβλεφθούν οι συγκεντρώσεις άγνωστων δειγμάτων

πυκνότερο είναι αυτό που περιέχει το κουτί των υλικών (αφού εισαχθούν σε αυτό 0,25ml απιονισμένου νερού). Τοποθετούνται στη σειρά 6 ή 5 περιέκτες (ependorffs), οι οποίοι αριθμούνται και σε καθέναν εξ' αυτών εισάγονται 0,2ml από ένα υγρό διάλυμα (assay buffer). Έπειτα, από το πυκνό διάλυμα standard εισάγονται 0,1ml στον 1^ο ependorff. Ο ependorff υφίσταται ανάδευση 10 φορές με το χέρι και μετά εισάγεται στο vortex για 1 λεπτό. Από αυτόν (ependorff) αφαιρούνται 0,1ml, τα οποία εισάγονται στον 2^ο ependorff και συνεχίζεται η διαδικασία, μέχρι να συμπληρωθούν και οι 6 ependorffs ή 5 (όπου ο 7^{ος} ή 6^{ος} είναι ο πιο αραιός). Το συγκεκριμένο βήμα παρουσιάζεται στην εικόνα 39.

8. Τα μαγνητικά μικροσφαιρίδια βιοδεικτών (beads), που περιέχουν τους βιοδείκτες, τοποθετούνται στο μηχάνημα υπερήχων (sonication), το οποίο χρησιμοποιεί ηχητική ενέργεια προκειμένου να αναδευτούν τα σωματίδια του δείγματος. Οι υπερηχητικές συχνότητες που χρησιμοποιούνται είναι >20 KHz
9. Μόλις αφαιρεθούν από το μηχάνημα υπερήχων τα μικροσφαιρίδια τοποθετούνται για 1 λεπτό στο vortex
10. Σε ειδικό μπουκάλι ανάμειξης εισάγονται 0,15ml από κάθε μαγνητικό μικροσφαιρίδιο και προστίθεται ειδικός διαλύτης (bead diluent), ώστε ο τελικός όγκος να αντιστοιχεί σε 3ml. Το αν θα εισαχθούν 0,15ml ή περισσότερα, σχετίζεται με το αν το συγκεκριμένο κουτί βιολογικών υλικών περιέχει μικροσφαιρίδια για έναν βιοδείκτη⁴⁸ ή περισσότερους
11. Στο ειδικό μπουκάλι που περιέχει το serum matrix εισάγεται 1ml απιονισμένου νερού και ύστερα αναδεύεται 10 φορές με το χέρι και έπειτα τοποθετείται στο vortex για 1 λεπτό
12. Στην πλάκα τοποθετούνται, σε όλα τα «πηγαδάκια» (wells) 0,025ml από το κουτί ανάμειξης και αντίστοιχη ποσότητα από το assay buffer
13. Στην πλάκα εισάγονται 0,025ml από το serum matrix στις πρώτες θέσεις, δηλαδή σε αυτές που αντιστοιχούν στα backgrounds⁴⁹, standards, controls⁵⁰
14. Στις πρώτες θέσεις τοποθετούνται αντίστοιχα και 0,025ml από τα standards και τα controls. Η τοποθέτηση των standards γίνεται από το πιο πυκνό προς το πιο αραιό. Στη θέση του background τοποθετείται assay buffer
15. Τα υπόλοιπα «πηγαδάκια» συμπληρώνονται με 0,025ml από το ξεπαγωμένο πλάσμα αίματος. Σε κάθε «πηγαδάκι» εισάγεται η αντίστοιχη ποσότητα πλάσματος αίματος από ξεχωριστό ependorff που αντιστοιχεί σε διαφορετικό υποκείμενο μελέτης

⁴⁸ Για τη μείωση του κόστους, όπου είναι εφικτό, γίνεται συνδυασμός βιοδεικτών, ώστε με ένα βιολογικό κουτί να μπορούν να ελεγχθούν περισσότεροι δείκτες

⁴⁹ Δεν περιλαμβάνουν ενεργό ουσία και προορίζονται για χρήση με στόχο την αφαίρεση του θορύβου που προκύπτει από τα μελετώμενα δείγματα

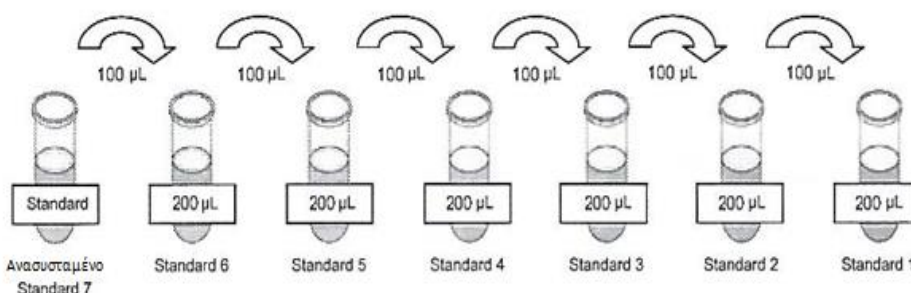
⁵⁰ Χρησιμοποιούνται για την πιστοποίηση της απόδοσης της ανάλυσης

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών καρδιαγγειακών ασθενειών

16. Η πλάκα εισάγεται στο ψυγείο στους 4 °C και παραμένει εκεί για ολόκληρη τη νύχτα
17. Το μείγμα υγρού που βρίσκεται στο μπανάκι κρατείται στην άκρη για την επόμενη ημέρα
18. Όλα τα υπόλοιπα καθαρίζονται, πλην των μαγνητικών μικροσφαιριδίων βιοδεικτών

Standard #	Προστιθέμενος όγκος Απιονισμένου Νερού	Προστιθέμενος όγκος Standard
Standard 7	250 μ L	0

Standard #	Προστιθέμενος όγκος Assay Buffer	Προστιθέμενος όγκος Standard
Standard 6	200 μ L	100 μ L Standard 7
Standard 5	200 μ L	100 μ L Standard 6
Standard 4	200 μ L	100 μ L Standard 5
Standard 3	200 μ L	100 μ L Standard 4
Standard 2	200 μ L	100 μ L Standard 3
Standard 1	200 μ L	100 μ L Standard 2



Εικόνα 39: Αποτύπωση αραιώσης των standards, ώστε να είναι έτοιμα προς χρήση

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 2^{ης} ΜΕΡΑΣ

1. Η πλάκα τοποθετείται σε ειδικό μαγνήτη προκειμένου να «κολλήσουν» τα μαγνητικά μικροσφαιρίδια στον πάτο της, για διάρκεια 1 λεπτού
2. Το υγρό περιεχόμενο αδειάζεται
3. Ξεπλένεται με 0,2ml από το μπανάκι που περιέχει το μείγμα υγρού που δημιουργήθηκε την προηγούμενη ημέρα (wash buffer + απιονισμένο νερό). Η διαδικασία έκπλυσης ακολουθείται 3 φορές. Μόλις τοποθετηθεί το υγρό στην πλάκα, αυτή εισάγεται στο μηχάνημα ταρακούνησης (shaker) για 30 δευτερόλεπτα και αμέσως μετά στον ειδικό μαγνήτη για 1 λεπτό
4. Τα μαγνητικά μικροσφαιρίδια βιοδεικτών (beads), που έχουν υποστεί βιολογική διεργασία την προηγούμενη ημέρα, εισάγονται στο vortex και έπειτα υφίστανται ανάδευση με το χέρι

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών καρδιαγγειακών ασθενειών

5. Στην πλάκα εισάγονται 0,025ml από τα beads σε κάθε «πηγαδάκι» και έπειτα η πλάκα τοποθετείται για 1 λεπτό στο shaker
6. Εισάγεται στον ειδικό μαγνήτη για 1 λεπτό
7. Σε κάθε «πηγαδάκι» εισάγεται η στρεπταβιδίνη⁵¹
8. Η πλάκα τοποθετείται στο shaker για 30 δευτερόλεπτα
9. Η πλάκα τοποθετείται στον μαγνήτη για 1 λεπτό και έπειτα αδειάζεται το περιεχόμενό της. Μετά ξεπλένεται 3 φορές με τη διαδικασία που ακολουθείται στο βήμα 3 αυτής της ημέρας
10. Η πλάκα τοποθετείται στον ειδικό μαγνήτη για 1 λεπτό
11. Προστίθενται σε όλα τα «πηγαδάκια» της πλάκας 0,1ml από το υγρό sheath (το οποίο διαρρέει το μηχάνημα καθόσον λειτουργεί, αφού χρησιμοποιείται ως μέσο παροχής για τη μεταφορά του δείγματος στο κομμάτι του μηχανήματος που σχετίζεται με την οπτική)
12. Η πλάκα εισάγεται στο shaker για 5 λεπτά

Η βιολογική διαδικασία έχει ολοκληρωθεί και η πλάκα είναι έτοιμη να εισαχθεί στο μηχάνημα, ώστε να προκύψουν τα αντίστοιχα αποτελέσματα. Στην εικόνα 40 φαίνεται η πλάκα όταν έχει συμπληρωθεί με το κατάλληλο βιολογικό υλικό.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Background 1	Background 2	Standard 1	Standard 1	Standard 2	Standard 2	Standard 3	Standard 3	Standard 4	Standard 4	Standard 5	Standard 5
B	Standard 6	Standard 6	Standard 7	Standard 7	Control 1	Control 1	Control 2	Control 2	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 3	Δείγμα 4
C	Δείγμα 5	Δείγμα 6	Δείγμα 7	Δείγμα 8	Δείγμα 9	Δείγμα 10	Δείγμα 11	Δείγμα 12	Δείγμα 13	Δείγμα 14	Δείγμα 15	Δείγμα 16
D	Δείγμα 17	Δείγμα 18	Δείγμα 19	Δείγμα 20	Δείγμα 21	Δείγμα 22	Δείγμα 23	Δείγμα 24	Δείγμα 25	Δείγμα 26	Δείγμα 27	Δείγμα 28
E	Δείγμα 29	Δείγμα 30	Δείγμα 31	Δείγμα 32	Δείγμα 33	Δείγμα 34	Δείγμα 35	Δείγμα 36	Δείγμα 37	Δείγμα 38	Δείγμα 39	Δείγμα 40
F	Δείγμα 41	Δείγμα 42	Δείγμα 43	Δείγμα 44	Δείγμα 45	Δείγμα 46	Δείγμα 47	Δείγμα 48	Δείγμα 49	Δείγμα 50	Δείγμα 51	Δείγμα 52
G	Δείγμα 53	Δείγμα 54	Δείγμα 55	Δείγμα 56	Δείγμα 57	Δείγμα 58	Δείγμα 59	Δείγμα 60	Δείγμα 61	Δείγμα 62	Δείγμα 63	Δείγμα 64
H	Δείγμα 65	Δείγμα 66	Δείγμα 67	Δείγμα 68	Δείγμα 69	Δείγμα 70	Δείγμα 71	Δείγμα 72	Δείγμα 73	Δείγμα 74	Δείγμα 75	Δείγμα 76

Εικόνα 40: Πλάκα συμπληρωμένη με το βιολογικό υλικό

⁵¹ Φθορόχρωμα που εκπέμπει στο πράσινο φως για να αναγνωριστεί από το αντίστοιχο laser του μηχανήματος

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών
και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών
καρδιαγγειακών ασθενειών

Ο βιοδείκτης που σχετίζεται με την **ενδοκρινολογία** και μελετάται στην παρούσα διατριβή είναι η: Αδιπονεκτίνη (Adiponectin). Σχετικοί με την **ανοσολογία** είναι οι κάτωθι βιοδείκτες: Μεταλλοπρωτεϊνάση-1 (MMP-1) και Αναστολέας ιστού μεταλλοπρωτεϊνάσης-1 (TIMP-1). Ως βιοδείκτης του **μεταβολισμού** χρησιμοποιείται η: Ινσουλίνη (Insulin), ενώ τέλος **καρδιαγγειακοί** βιοδείκτες είναι οι ακόλουθοι: Ινωδογόνο (Fibrinogen), Διαλυτό διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης-1 (SICAM-1) και Διαλυτό μόριο προσκόλλησης αγγειακού κυττάρου-1 (SvCAM-1). Ο κάθε βιοδείκτης έχει συγκεκριμένο εύρος ορίων, όπου βρίσκονται οι τιμές των controls. Παρατίθεται ο πίνακας 1 για κάθε έναν βιοδείκτη ξεχωριστά.

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών
και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών
καρδιαγγειακών ασθενειών

Πεδίο βιοδείκτη	Βιοδείκτης	Επίπεδα controls	Εύρος τιμών	Μονάδες μέτρησης
Ενδοκρινολογία	Adiponectin	Control 1	2102-4366	pg/ml
		Control 2	12012-24948	
Ανοσολογία	MMP-1	Control 1	250-520	pg/ml
		Control 2	1289-2677	
	TIMP-1	Control 1	264-548	pg/ml
		Control 2	1363-2832	
Μεταβολισμός	Insulin	Control 1	2427-5041	pg/ml
		Control 2	6960-14455	
Καρδιαγγειακοί	Fibrinogen	Control 1	0.34-0.71	ng/ml
		Control 2	3.3-6.9	
	SiCAM-1	Control 1	1.1-2.2	ng/ml
		Control 2	9.4-19	
	SvCAM-1	Control 1	1.6-3.4	ng/ml
		Control 2	13-27	

Πίνακας 1: Βιοδείκτες με το αντίστοιχο εύρος τιμών των controls

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών καρδιαγγειακών ασθενειών

Αντίστοιχα, ο κάθε βιοδείκτης έχει συγκεκριμένες τιμές για τα standards, και επομένως σχηματίζει τη δική του καμπύλη. Ο πίνακας 2 παρουσιάζει τις τιμές αυτές.

Standard	Adiponectin (pg/ml)	MMP-1 (pg/ml)	TIMP-1 (pg/ml)	Insulin (pg/ml)	Fibrinogen (ng/ml)	SiCAM-1 (ng/ml)	SvCAM-1 (ng/ml)
1	26	27	20	137	0.024	0.085	0.122
2	128	82	78	412	0.098	0.342	0.489
3	640	247	313	1,235	0.39	1.367	1.953
4	3,200	741	1,250	3,704	1.56	5.469	7.812
5	16,000	2,222	5,000	11,111	6.25	21.87	31.25
6	80,000	6,667	20,000	33,333	25	87.5	125
7	400,000	20,000	-	100,000	100	350	500

Πίνακας 2: Βιοδείκτες με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των standards

Προκειμένου να εκφραστεί η ακρίβεια ή η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων των δοκιμών ανοσοπροσδιορισμού, αναφέρονται συνήθως δύο μετρήσεις του συντελεστή μεταβλητότητας (CV): η ακρίβεια μεταξύ της ανάλυσης (inter-assay) και η ακρίβεια εντός της ανάλυσης (intra-assay). Πιο συγκεκριμένα, ο συντελεστής μεταβλητότητα είναι ένας αδιάστατος αριθμός που ορίζεται ως η τυπική απόκλιση ενός συνόλου μετρήσεων διαιρούμενη με το μέσο όρο του συνόλου. Εμβαθύνοντας, πρέπει να ειπωθεί ότι η ακρίβεια μεταξύ της ανάλυσης (inter-assay) είναι μία έκφραση «συνοχής» από πλάκα σε πλάκα και υπολογίζεται από τις μέσες τιμές των υψηλών και των χαμηλών τιμών control σε κάθε πλάκα, ενώ η ακρίβεια εντός της ανάλυσης (intra-assay) είναι η μέση τιμή του συντελεστή μεταβλητότητας, ο οποίος είναι μετρημένος για όλες τις συγκεντρώσεις πρωτεϊνών κάθε πλάκας δύο φορές. Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται αυτά τα δεδομένα.

Βιοδείκτης	Inter-assay ακρίβεια	Intra-assay ακρίβεια
Adiponectin (pg/ml)	10	2
MMP-1 (pg/ml)	8.4	2.6
TIMP-1 (pg/ml)	≤ 10	≤ 10
Insulin (pg/ml)	≤ 15	≤ 10
Fibrinogen (ng/ml)	≤ 20	≤ 15
SiCAM-1 (ng/ml)	≤ 20	≤ 15
SvCAM-1 (ng/ml)	≤ 20	≤ 15

Πίνακας 3: Βιοδείκτες με την αντίστοιχη ακρίβεια inter-assay και intra-assay

ΣΤ.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

ΣΤ.2.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αρχικά, ως προς τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών, καταγράφεται ότι η μέση ηλικία είναι μεγαλύτερη των 70 ετών τόσο για τους συμπτωματικούς, όσο και για τους ασυμπτωματικούς ασθενείς, και πιο συγκεκριμένα για τους συμπτωματικούς είναι $72,3 \pm 9,7$, ενώ για την ασυμπτωματική ομάδα είναι $70,4 \pm 9,1$. Να σημειωθεί ότι τα εν λόγω δεδομένα καταγράφονται χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά, δηλαδή $p = 0,264$. Επιπρόσθετα, οι 57 από τους 82 συμπτωματικούς ασθενείς είναι άνδρες, δηλαδή ποσοστό 69,5%, ενώ στους ασυμπτωματικούς ισχύει ότι 31 από τους 54 είναι άνδρες, δηλαδή ποσοστό 57,4%, καταδεικνύοντας ότι η σύνθεση του πληθυσμού δε διαφέρει σημαντικά σε σχέση με το φύλο. Και εδώ δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, εφόσον ισχύει ότι $p = 0,148$. Για την ολότητα της έρευνας, αξιολογείται και το κάπνισμα ως παράγοντας κινδύνου με αποτέλεσμα 61,0% ως προς τη συμπτωματική ομάδα και 54,8% ως προς την ασυμπτωματική, χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά, $p = 0,373$.

Περαιτέρω, ως προς τα κλινικά δεδομένα, οι συμπτωματικοί ασθενείς εμφανίζουν υψηλότερο δείκτη μάζας σώματος (BMI) με $p < 0,001$, υψηλότερη συστολική αρτηριακή πίεση (BP) με $p = 0,007$, υψηλότερα τριγλυκερίδια με $p < 0,001$ και υψηλότερο αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων (WBC) με $p < 0,001$, συγκριτικά με τους ασυμπτωματικούς ασθενείς. Είναι εμφανές ότι και τα τέσσερα κλινικά δεδομένα, μεταξύ των δύο ομάδων, παρουσιάζουν σημαντική διαφορά, όπως παρουσιάζεται βάσει της τιμής p , καθιστώντας τους διακριτικούς παράγοντες μεταξύ συμπτωματικών και ασυμπτωματικών ασθενών. Τα δεδομένα αυτά παρουσιάζονται στον πίνακα 4.

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών
και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών
καρδιαγγειακών ασθενειών

Κλινικά χαρακτηριστικά			
Μεταβλητές	Συμπτωματικοί ασθενείς (πλήθος ασθενών: n=82)	Ασυμπτωματικοί ασθενείς (πλήθος ασθενών: n=54)	Τιμή p
Δείκτης Μάζας Σώματος (Body Mass Index-BMI) (kg/m ²)	26,9 ± 3,8	24,2 ± 2,3	<0,001
Συστολική Αρτηριακή Πίεση (Systolic Blood Pressure-Systolic BP) (mmHg)	141,9 ± 22,4	131,7 ± 13,2	0,007
Τριγλυκερίδια (Triglycerides) (mg/dl)	227,0 ± 85,6	85,7 ± 47,1	<0,001
Αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων (White Blood Cells-WBC) (thousands/mm ³)	7,1 ± 1,8	5,4 ± 1,2	<0,001

Πίνακας 4: Κλινικά χαρακτηριστικά συμπτωματικών έναντι ασυμπτωματικών ασθενών

Ως προς τις μετρούμενες πρωτεΐνες παρατηρείται ότι τα επίπεδα των πρωτεϊνών MMP-1, TIMP-1, Insulin, Fibrinogen, SiCAM-1, SvcAM-1 είναι σημαντικά αυξημένα στους συμπτωματικούς ασθενείς συγκρινόμενα με εκείνα των ασυμπτωματικών, ενώ τα επίπεδα της Adiponectin παρουσιάζουν την αντίθετη μορφή, δηλαδή είναι αυξημένα στην ασυμπτωματική ομάδα, με $p < 0,05$ για όλες τις περιπτώσεις. Τα δεδομένα εμφανίζονται στον πίνακα 5.

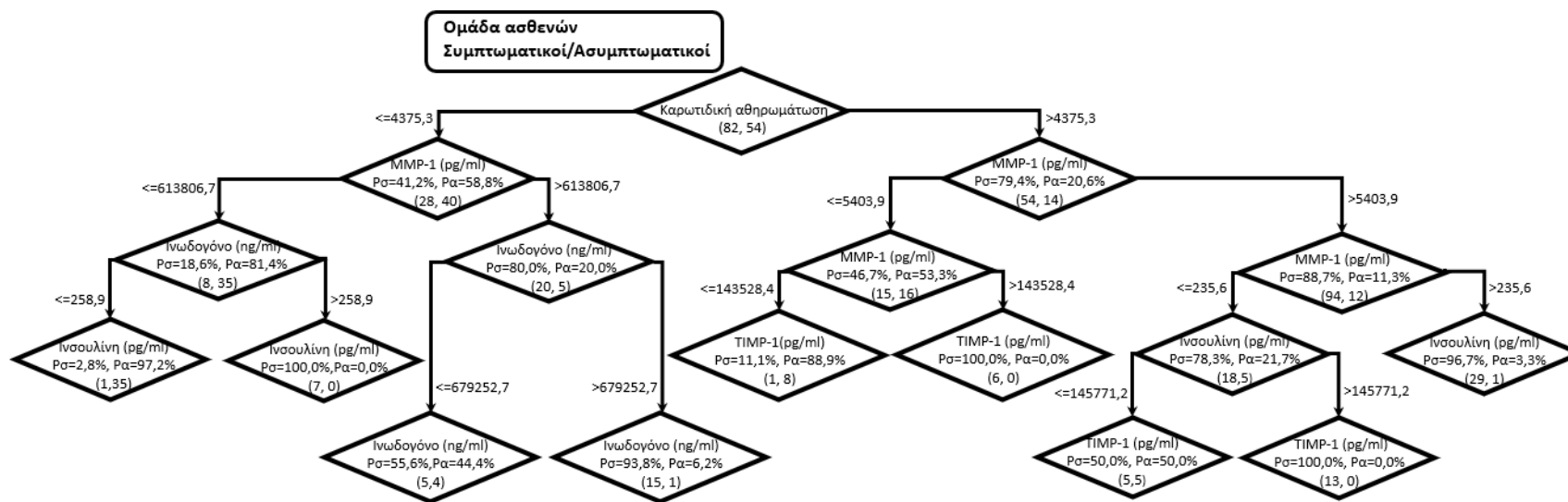
Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών καρδιαγγειακών ασθενειών

Μεταβλητές	Ομάδες ασθενών		
	Συμπτωματικοί (πλήθος ασθενών: n=82)	Ασυμπτωματικοί (πλήθος ασθενών: n=54)	Τιμή p
Adiponectin (pg/ml)	72.485 ± 12.507	87.672 ± 16.439	<0,05
MMP-1 (pg/ml)	5.503 ± 2.271	4.687 ± 2.179	<0,001
TIMP-1 (pg/ml)	153.949 ± 26.480	146.124 ± 23.101	<0,001
Insulin (pg/ml)	295 ± 107	270 ± 89	<0,001
Fibrinogen (ng/ml)	651.390 ± 215.152	577.181 ± 208.717	<0,001
SiCAM (ng/ml)	3.804 ± 754	1.403 ± 332	<0,05
SvCAM (ng/ml)	5.983 ± 2.201	3.273 ± 1.107	<0,05

Πίνακας 5: Τιμές βιοδεικτών συμπτωματικών έναντι ασυμπτωματικών ασθενών

Το κατασκευασμένο μοντέλο CART παρουσιάζει τα αποτελέσματα μαζί με την κατηγορία όπου «ανήκει» κάθε κόμβος, τον αριθμό των σωστά εκχωρημένων περιπτώσεων σε κάθε κατηγορία, καθώς και τα σχετικά ποσοστά (εντός κάθε μεμονωμένου κόμβου). Όπως είναι σαφές, από την εικόνα 41, από τις επτά πρωτεΐνες και τα κλινικά χαρακτηριστικά που παρέχονται ως εισροές στο CART, παρ' ότι όλα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ συμπτωματικών και ασυμπτωματικών ασθενών, οι πιο σημαντικές (όπως εντοπίστηκαν κατά τη διάρκεια της εκπαίδευσης (training) του μοντέλου) είναι οι εξής: MMP-1, Ινωδογόνο, Ινσουλίνη και TIMP-1.

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών καρδιαγγειακών ασθενειών



Εικόνα 41: Δένδρο ταξινόμησης και παλινδρόμησης, για συμπτωματικούς έναντι ασυμπτωματικών ασθενών

Προκειμένου να καταστεί πιο κατανοητή η λογική του CART, ενδεικτικά αναφέρεται στη συνέχεια ένα παράδειγμα, όπως φαίνεται στην εικόνα 41. Οι πιο σημαντικές διαδρομές, με τον μεγαλύτερο αριθμό περιστατικών είναι: **(α)** η διαδρομή με τις πρωτεΐνες MMP-1, MMP-1, Ινσουλίνη και **(β)** η διαδρομή με τις πρωτεΐνες MMP-1, Ινωδογόνο, Ινσουλίνη. Βάσει της διαδρομής **(α)**, εάν τα επίπεδα του MMP-1 είναι μεγαλύτερα από 4375,3 τότε χρειάζεται μια επιπρόσθετη εξέταση, όπου αν τα επίπεδα του MMP-1 είναι μεγαλύτερα του 5403,9 εξετάζεται η Ινσουλίνη, όπως προκύπτει από το μοντέλο και, εάν τα επίπεδα της είναι μεγαλύτερα από 235,6 τότε το περιστατικό μπορεί να χαρακτηριστεί ως συμπτωματικό με πιθανότητα 96,7%. Αντίθετα, αν τα επίπεδα του MMP-1 είναι μικρότερα από 4375,3 τότε χρειάζεται ένα επιπλέον βήμα, όπου, εάν τα επίπεδα του Ινωδογόνου είναι μικρότερα από 613806,7, τότε εξετάζεται η Ινσουλίνη και, αν τα επίπεδά της είναι μικρότερα από 258,9, η περίπτωση μπορεί να χαρακτηριστεί ως ασυμπτωματική με πιθανότητα 97,2%. Με παραπλήσιο τρόπο, το μοντέλο CART μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να κατηγοριοποιήσει έναν ασθενή ως συμπτωματικό ή ασυμπτωματικό, με τη βοήθεια των σημαντικών βιοδεικτών και βάσει της αντίστοιχης πιθανότητας για όλες τις περιπτώσεις.

Παράλληλα, προκύπτει και ο πίνακας συσχέτισης (πίνακας 6), ο οποίος είναι αντιπροσωπευτικός της απόδοσης και παρουσιάζει το ποσοστό μεταξύ της πραγματικής (παρατηρούμενης) κατηγορίας και της εκχωρημένης κατηγορίας. Εκ των πραγματικά συμπτωματικών ασθενών, 80 ασθενείς χαρακτηρίζονται με ακρίβεια ως συμπτωματικοί (ορθός-θετική τιμή), ενώ 2 εκχωρούνται λανθασμένα ως ασυμπτωματικοί (ψευδώς-αρνητική τιμή). Από την άλλη πλευρά, στην ασυμπτωματική ομάδα, η ορθά-αρνητική τιμή είναι 43 και η ψευδώς-θετική τιμή είναι 11. Στο σημείο αυτό, είναι σημαντικό να υπάρξει μια παρατήρηση που αφορά στην ευαισθησία (sensitivity) και στην ειδικότητα (specificity). Οι δυο αυτοί όροι περιγράφουν μαθηματικά την ακρίβεια ενός τεστ που αναφέρει την παρουσία ή την απουσία μιας κατάστασης. Ειδικότερα, η ευαισθησία (πραγματικό θετικό ποσοστό) αναφέρεται στην πιθανότητα ενός θετικού τεστ, υπό τον όρο ότι είναι πραγματικά θετικό. Η ειδικότητα (πραγματικό αρνητικό ποσοστό) αναφέρεται στην πιθανότητα ενός αρνητικού τεστ, υπό τον όρο ότι είναι πραγματικά αρνητικό. Συνήθως, σε όλες τις εξετάσεις, υπάρχει μια αντιστάθμιση μεταξύ ευαισθησίας και ειδικότητας, ώστε οι υψηλότερες ευαισθησίες να σημαίνουν χαμηλότερες ειδικότητες και το αντίστροφο. Επομένως, βάσει και των προαναφερθέντων, πρέπει να καταγραφεί ότι για τις συγκεκριμένες δοκιμές η ευαισθησία είναι 97,6%, ενώ η ειδικότητα είναι 79,6%.

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών καρδιαγγειακών ασθενειών

Ταξινόμηση			
Πραγματική κατηγορία (παρατηρούμενη)	Εκχωρημένη κατηγορία (από το μοντέλο CART)		
	Συμπτωματικοί	Ασυμπτωματικοί	Ορθό Ποσοστό
Συμπτωματικοί	80	2	97,6%
Ασυμπτωματικοί	11	43	79,6%
Ολικό Ποσοστό	66,9%	33,1%	90,4%

Πίνακας 6: Ταξινόμηση παρατηρούμενων έναντι εκχωρημένων από το CART τιμών, για τους συμπτωματικούς και τους ασυμπτωματικούς ασθενείς

Επιπρόσθετα, με τη 10-πλάσια διασταυρούμενη επικύρωση, ο πληθυσμός χωρίζεται σε σετ εκπαίδευσης και δοκιμών. Συγκεκριμένα, περίπου τα 2/3 των δεδομένων επιλέγονται τυχαία (με σεβασμό στην κατανομή των περιπτώσεων υψηλού και χαμηλού κινδύνου) για να εκπαιδευτεί ένα μοντέλο CART, ενώ το υπόλοιπο 1/3 (σετ δοκιμής) χρησιμοποιείται για την επικύρωση του μοντέλου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 7, ενισχύοντας τα αποτελέσματα που ελήφθησαν με την τεχνική της διασταυρούμενης επικύρωσης επί 10 φορές. Σε αυτή την περίπτωση, στο σετ εκπαίδευσης η απόδοση είναι: ευαισθησία 92,59% και ειδικότητα 80,6%, και στο σετ δοκιμής: ευαισθησία 89,3% και ειδικότητα 77,8%.

Δείγμα	Πραγματική κατηγορία (Παρατηρούμενη)	Ταξινόμηση		
		Εκχωρημένη κατηγορία (από το CART)		
		Υψηλού κινδύνου	Χαμηλού κινδύνου	Ορθό ποσοστό
Εκπαίδευση	Υψηλού κινδύνου	50	4	92,59%
	Χαμηλού κινδύνου	7	29	80,56%
	Ολικό Ποσοστό	63,33%	36,67%	87,78%
Δοκιμές	Υψηλού κινδύνου	25	3	89,29%
	Χαμηλού κινδύνου	4	14	77,78%
	Ολικό Ποσοστό	63,04%	36,96%	84,78%

Πίνακας 7: Ταξινόμηση για την πραγματική και την εκχωρούμενη κατηγορία στο σετ εκπαίδευσης και δοκιμών

Καθώς εφαρμόζεται η μέθοδος εκπαίδευσης και δοκιμής στο CART, διαχωρίζεται ο πληθυσμός όλων των ασθενών (άτομα που παρουσιάζουν στένωση σε βαθμό μεγαλύτερο ή ίσο του 50%), σε δύο κύριες κατηγορίες, οι οποίες περιλαμβάνουν, κατά προσέγγιση, το 60% και το 40% του πληθυσμού αντίστοιχα: η πρώτη ταξινόμηση των

Ανάπτυξη νέων συνδυασμένων βιοτεχνολογικών τεχνικών
και αλγορίθμων για την αξιολόγηση βιοδεικτών
καρδιαγγειακών ασθενειών

ασθενών περιλαμβάνει αυτούς οι οποίοι υπέστησαν ισχαιμικό εγκεφαλικό, ενώ η δεύτερη αυτούς στους οποίους δε συνέβη κανένα περιστατικό. Η ολική δεξαμενή άντλησης ασθενών είναι οι αρχικοί 136, στους οποίους προστίθενται άλλοι 8 με στένωση μεγαλύτερη ή ίση του 50%, αλλά δεν παρουσιάζουν συμπτώματα ισχαιμικού εγκεφαλικού και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 8. Η απόδοση αυτού του μοντέλου στο σετ εκπαίδευσης είναι: ευαισθησία 91,5% και ειδικότητα 83,3%, ενώ στο σετ δοκιμής είναι: ευαισθησία 77,1% και ειδικότητα 81,3%.

Δείγμα	Ταξινόμηση			
	Πραγματική Κατηγορία (Παρατηρούμενη)	Εκχωρημένη κατηγορία (από το CART)		
		Εγκεφαλικό	Όχι εγκεφαλικό	Ορθό Ποσοστό
Εκπαίδευση	Εγκεφαλικό	43	4	91,5%
	Όχι εγκεφαλικό	5	25	83,3%
	Ολικό Ποσοστό	62,3%	37,7%	88,3%
Δοκιμές	Εγκεφαλικό	27	8	77,1%
	Όχι εγκεφαλικό	6	26	81,3%
	Ολικό Ποσοστό	49,3%	50,7%	79,1%

Πίνακας 8: Ταξινόμηση για την πραγματική και την εκχωρημένη κατηγορία στο σετ εκπαίδευσης και δοκιμής

Ζ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η συγκεκριμένη μελέτη της διδακτορικής διατριβής επικεντρώθηκε στην αξιολόγηση των βιοδεικτών [39,40] ανάμεσα σε συμπτωματικούς και ασυμπτωματικούς ασθενείς, καθώς και στη δημιουργία ενός δένδρου ταξινόμησης [130] και παλινδρόμησης [143] για τον διαχωρισμό τους. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των πρωτεϊνών, μεταξύ ασθενών με και χωρίς συμπτώματα ($p < 0,05$). Τα επίπεδα των μετρούμενων βιοδεικτών σε συμπτωματικούς ασθενείς ήταν υψηλότερα από αυτά σε ασυμπτωματικούς ασθενείς, εκτός από την Αδιπονεκτίνη. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα MMP-1, TIMP-1, Ινσουλίνης, Ινωδογόνου, SiCAM-1 και SνCAM-1, αυξήθηκαν σημαντικά στους συμπτωματικούς ασθενείς σε σύγκριση με τους ασυμπτωματικούς ($p < 0, 05$). Είναι γνωστό πως τα αυξημένα επίπεδα διαφόρων βιοδεικτών φλεγμονής, όπως αυτοί που μελετώνται στην παρούσα διατριβή, έχουν συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο ισχαιμικών καρδιαγγειακών επεισοδίων. Ειδικότερα, ο δείκτης MMP-1 [64, 72, 73, 74,75] εκφράζεται στη νόσο της ανθρώπινης καρωτίδας και, επομένως, υπάρχει συσχέτιση μεταξύ αυτής της πρωτεΐνης και της αστάθειας της πλάκας, ενώ ο έτερος δείκτης TIMP-1 [80, 81, 87] εμπλέκεται στον σχηματισμό πλάκας, δηλαδή οι ασθενείς με αθηροσκλήρωση της καρωτίδας εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα αυτού του δείκτη. Συνεχίζοντας, η Ινσουλίνη [90, 91] οδηγεί σε σημαντική αύξηση του κινδύνου για συμπτωματική καρωτιδική αρτηριακή νόσο, καθώς υπάρχει μια θετική σχέση μεταξύ των επιπέδων ινσουλίνης και των αθηροσκληρωτικών επεισοδίων, ενώ το Ινωδογόνο [93, 96, 97] ως δείκτης αθηρώματος, έχει καταδείξει ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις του έχουν συσχετιστεί με ισχαιμική καρδιοπάθεια και υποκλινική νόσο της καρωτίδας.

Ως προς την αξιολόγηση της ευρωστίας των ταξινομητών υπάρχουν δύο δημοφιλείς μέθοδοι. Η πρώτη [136] αναφέρεται στον διαχωρισμό του συνόλου των δεδομένων σε ένα τμήμα που χρησιμοποιείται για εκπαίδευση και σε ένα άλλο τμήμα που χρησιμοποιείται για δοκιμές. Αυτή η μέθοδος είναι ιδιαίτερα χρήσιμη όταν το σύνολο δεδομένων που πρέπει να αναλυθεί είναι αρκετά μεγάλο, επομένως κατ' αυτόν τον τρόπο παρέχεται μια αρκετά καλή εκτίμηση της απόδοσης του συστήματος. Η δεύτερη [142] είναι η γνωστή μέθοδος k-fold, βάσει της οποίας το σύνολο των δεδομένων χωρίζεται σε k υποσύνολα, και κάθε ένα υποσύνολο διατηρείται «στην άκρη», ενώ το μοντέλο εκπαιδεύεται χρησιμοποιώντας τα υπόλοιπα υποσύνολα (k-1). Αυτό το σύστημα επαναλαμβάνεται για όλα τα υποσύνολα και παράγεται μια μέση εκτίμηση ακριβείας. Η εν λόγω προσέγγιση θεωρείται μια ισχυρή μέθοδος για την εκτίμηση της ακρίβειας, και συγκεκριμένα για καλύτερη αμεροληψία στην εκτίμηση είναι γενικά παραδεκτό ότι η τιμή $k = 10$ είναι η πλέον δημοφιλής. Για τα πειράματα της παρούσας διατριβής επιλέχθηκε η δεύτερη μέθοδος, εφόσον ο αριθμός των υπό μελέτη περιπτώσεων ήταν σχετικά περιορισμένος.

Τα δεδομένα μέσω της διασταυρούμενης επικύρωσης από το CART, κατέδειξαν ενδιαφέροντα αποτελέσματα για την ταυτοποίηση τόσο των συμπτωματικών όσο και των ασυμπτωματικών ασθενών. Σε περίπτωση που ένα «κλαδί» δένδρου περιέχει και συμπτωματικά και ασυμπτωματικά περιστατικά, τότε η περίπτωση χαρακτηρίζεται ανάλογα με την ομάδα που έχει τη μεγαλύτερη πιθανότητα. Τα ληφθέντα αποτελέσματα έδειξαν ότι η διάκριση μέσω του CART ήταν ακριβής για περίπου το 97% των συμπτωματικών ασθενών και περίπου για το 80% των ασυμπτωματικών. Επί παραδείγματι, και σύμφωνα με τα προαναφερθέντα, εάν τα επίπεδα του MMP-1 ήταν μεγαλύτερα από 5403,9 και εάν τα επίπεδα της Ινσουλίνης ήταν μεγαλύτερα από 235,6 (δύο επίπεδα ελέγχου), τότε ο ασθενής μπορούσε να χαρακτηριστεί ως συμπτωματικός με επίπεδο εμπιστοσύνης 96,7%. Αντίστοιχα, εάν τα επίπεδα του MMP-1 ήταν μικρότερα από 4375,3 και εάν τα επίπεδα του Ινωδογόνου ήταν μικρότερα από 613806,7 και εάν τα επίπεδα της Ινσουλίνης ήταν μικρότερα από 258,9 (τρία επίπεδα ελέγχου), τότε η περίπτωση χαρακτηριζόταν ως ασυμπτωματική με επίπεδο εμπιστοσύνης 97,2%.

Τα δένδρα ταξινόμησης και παλινδρόμησης αντιπροσωπεύουν μια πολύ δημοφιλή τεχνική για την επίλυση ποικίλων προβλημάτων, ειδικά ιατρικής ταξινόμησης. Διαθέτουν πληθώρα πλεονεκτημάτων [148], μερικά εκ των οποίων είναι:

- παράγουν απλούς στην κατανόηση και στην ερμηνεία τους αλγορίθμους, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ακόμη και χωρίς χρήση υπολογιστή
- είναι μη παραμετρικά, επομένως δε χρειάζεται να γίνει έλεγχος ως προς το κατά πόσον τα δεδομένα πληρούν τις εκάστοτε ειδικές προϋποθέσεις που τυχόν απαιτούνται για στατιστικές δοκιμές, όπως η κανονικότητα
- μπορούν να χειριστούν τόσο αριθμητικά όσο και κατηγορικά δεδομένα ταυτόχρονα
- είναι αποτελεσματικά όταν είναι διαθέσιμα και απαιτούνται μεγάλα σύνολα δεδομένων, επομένως δεν υπάρχουν απαιτούμενοι εξειδικευμένοι υπολογιστικοί πόροι
- είναι δυνατή η επικύρωση των παραγόμενων μοντέλων μέσω στατιστικών δοκιμών

Η. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το συγκεκριμένο διδακτορικό επιχείρησε να χρησιμοποιήσει το εργαλείο ταξινόμησης και παλινδρόμησης δένδρων (CART) στην καρωτιδική νόσο, προκειμένου να διερευνήσει και να διακρίνει τους συμπτωματικούς από τους ασυμπτωματικούς ασθενείς. Ο στόχος επομένως ήταν, αφενός, να αξιολογήσει τις στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα πρωτεΐνης μεταξύ ασθενών με και χωρίς συμπτώματα και, αφετέρου, να αξιολογήσει εάν θα μπορούσε να υπάρξει ακριβής διάκριση μεταξύ τους: συμπτωματικοί – ασυμπτωματικοί. Όπως αποτυπώθηκε, υπήρξαν πράγματι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων, ενώ επιπλέον, τα αποτελέσματα του CART έδειξαν υψηλής ακρίβειας διάκριση μεταξύ συμπτωματικών και ασυμπτωματικών ασθενών, και ταυτόχρονα προσδιόρισαν τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά από τις εισροές. Εν κατακλείδι, ο εντοπισμός και η μελέτη συγκεκριμένων κυκλοφορούντων αδιποκινών σε συνδυασμό με τα δημογραφικά δεδομένα ήταν σημαντική.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, η εφαρμογή ενός προγνωστικού μοντέλου δένδρου ταξινόμησης και παλινδρόμησης (CART) για τη νόσο της καρωτίδας, παρείχε έναν αλγόριθμο απόφασης που συνδέεται με πιθανότητες. Η προγνωστική αξία σε συμπτωματικούς ασθενείς ήταν υψηλή, ήτοι $> 97\%$, και, ως εκ τούτου, αυτό το εργαλείο μπορεί να παρέχει ενθαρρυντικά στοιχεία για τον έγκαιρο εντοπισμό και τη θεραπεία συμπτωματικών από ασυμπτωματικούς ασθενείς. Αυτή η διάκριση θα μπορούσε να είναι σημαντική στην κλινική πράξη, καθώς οι μη συμπτωματικοί ασθενείς μπορεί να έχουν ήδη εμφανίσει απαρατήρητα συμπτώματα που μπορούν να εντοπιστούν χρησιμοποιώντας τεχνικές απεικόνισης. Επομένως, μια μελλοντική δοκιμή στο κλινικό περιβάλλον κρίνεται θεμιτή καθώς, θα μπορούσε να αξιολογήσει την τιμή του δένδρου ταξινόμησης και παλινδρόμησης στην πράξη.

Θ. ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Το συγκεκριμένο διδακτορικό ουσιαστικά συνέβαλε στον έγκαιρο εντοπισμό των συμπτωματικών από ασυμπτωματικούς ασθενείς, σχετικά με την καρωτιδική αθηρωμάτωση και την καρδιαγγειακή νόσο. Αυτή η δυνατότητα μπορεί να αξιοποιηθεί περαιτέρω για να μελετηθούν και άλλες ασθένειες ή να διεξαχθούν συγκριτικές μελέτες.

Καταρχάς, μια έρευνα σχετικά με το εγκεφαλικό και την πιθανότητα εμφάνισής του ανάλογα το φύλο και την ηλικία, μπορεί να συμβάλει στο να δοθεί δέουσα προσοχή σε συμπτώματα που διαφορετικά λογίζονται απαρατήρητα. Πιο αναλυτικά, η συχνότητα εμφάνισης εγκεφαλικού προερχόμενο από τη συμπτωματική στένωση της καρωτίδας, είναι υψηλότερη στους άνδρες από σχετικά νωρίς ηλικιακά μέχρι την προχωρημένη ηλικία, ενώ αντίθετα, στις γυναίκες η μεγαλύτερη συχνότητα εμφανίζεται μετά τα 85 έτη. Επομένως, μια μελέτη με σκοπό τον εντοπισμό συμπτωματικών από ασυμπτωματικούς ασθενείς, αλλά με διευρυνμένο ηλικιακό όριο ως προς τους ασθενείς, θα έδινε ενδιαφέροντα αποτελέσματα σχετικά με τη νόσο του εγκεφαλικού. Είναι σαφές ότι η ίδια μελέτη, ως προς το εγκεφαλικό, θα μπορούσε να διεξαχθεί και σε άτομα μικρότερης ηλικιακής ομάδας και οι δύο ξέχωρες μελέτες ως προς τους ασθενείς, αλλά με κοινή βάση την ασθένεια να ενέπιπταν σε συγκριτική αξιολόγηση μεταξύ τους.

Ένα άλλο δεδομένο που είναι ιδιαίτερα σημαντικό και μπορεί να αξιολογηθεί σε μελλοντική έρευνα, είναι η επίδραση των χορηγούμενων φαρμάκων στους ασθενείς. Μια μελέτη σχετικά με το τι φάρμακα λαμβάνει ο κάθε ασθενής, ανάλογα την πάθησή του και το στάδιο στο οποίο αυτή βρίσκεται είναι κρίσιμη, εφόσον η χορήγησή τους είναι πιθανό να επηρεάζει τις τιμές του πλάσματος του αίματος και άρα κατ' επέκταση να διαφοροποιείται και η στατιστική ανάλυση. Επομένως, η έρευνα που αφορά σε ασθενείς που βρίσκονται υπό την επίρεια φαρμακευτικής αγωγής δεν είναι η ίδια με αυτήν σε όμοιους τους χωρίς φαρμακευτική αγωγή, καθώς η λήψη φαρμάκων πιθανότατα «αλλοιώνει» τις παρατηρούμενες τιμές και άρα διαφοροποιεί την στατιστική τους.

Τρίτο στοιχείο που μπορεί να μελετηθεί είναι να πραγματοποιηθεί η ίδια ανάλυση ως προς τους βιοδείκτες και την ασθένεια (καρδιαγγειακή νόσος), αλλά σε άλλον πληθυσμό. Ειδικότερα, άνθρωποι που ζουν σε διαφορετικές συνθήκες και με άλλες συνήθειες, συγκριτικά με τα άτομα του δυτικού κόσμου, όπως είναι οι λαοί της ανατολής ή της Αφρικής και νότιας Αμερικής είναι πιθανό να μην εμφανίζουν τα ίδια στατιστικά αποτελέσματα, λόγω διαφοροποίησης του πλάσματος του αίματός τους. Αυτό εμπίπτει σε συγκριτική ανάλυση και είναι προφανής η χρησιμότητα της μελέτης για τη διαφορετική αντιμετώπιση των ασθενών από ιατρικής οπτικής, είτε λόγω αλλαγής των φαρμάκων, είτε λόγω αλλαγής του τρόπου ζωής (πχ. υιοθέτηση πιο υγιεινού τρόπου ή χορήγηση βιταμινών).

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ ΣΕ ΔΙΕΘΝΕΣ ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ

- 1) **Trikouraki A**, Yova D, Pouliakis A, Spathis A, Moulakakis K. 2021. Serum biomarkers and classification and regression trees can discriminate symptomatic from asymptomatic carotid artery disease patients, *Artery Research*, 27, 159-166.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Gastouniotti, A., et al., *CAROTID - a web-based platform for optimal personalized management of atherosclerotic patients*. Comput Methods Programs Biomed, 2014. **114**(2): p. 183-93.
2. Πρεβένιος, Μ., *Υποστήριξη της διάγνωσης της καρωτιδικής αθηρωμάτωσης με τη βοήθεια προτύπων κινητικότητας και παραμόρφωσης του αρτηριακού τοιχώματος*. 2014, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. p. 9-12.
3. Kichun, K., et al., *Association of Plasma Marker of Oxidized Lipid with Histologic Plaque Instability in Patients with Peripheral Artery Disease*. Annals of Vascular Surgery, 2020. **66**: p. 554-565.
4. Schaar, J.A., et al., *Terminology for high-risk and vulnerable coronary artery plaques. Report of a meeting on the vulnerable plaque, June 17 and 18, 2003, Santorini, Greece*. Eur Heart J, 2004. **25**(12): p. 1077-82.
5. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 868-74.
6. Kobayashi, K., et al., *Circulating oxidized LDL forms complexes with beta2-glycoprotein I: implication as an atherogenic autoantigen*. J Lipid Res, 2003. **44**(4): p. 716-26.
7. Binisha, H.M., et al., *Lipidomic Architecture shared by subclinical markers of osteoporosis and atherosclerosis: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study*. Bone, 2020. **131**: 115160.
8. Abela, G.S. and K. Aziz, *Cholesterol crystals rupture biological membranes and human plaques during acute cardiovascular events--a novel insight into plaque rupture by scanning electron microscopy*. Scanning, 2006. **28**(1): p. 1-10.
9. Abela, G.S., et al., *Effect of cholesterol crystals on plaques and intima in arteries of patients with acute coronary and cerebrovascular syndromes*. Am J Cardiol, 2009. **103**(7): p. 959-68.
10. Vedre, A., et al., *Physical factors that trigger cholesterol crystallization leading to plaque rupture*. Atherosclerosis, 2009. **203**(1): p. 89-96.
11. Gadeela, N., et al., *The impact of circulating cholesterol crystals on vasomotor function: implications for no-reflow phenomenon*. JACC Cardiovasc Interv, 2011. **4**(5): p. 521-9.
12. Redgrave, J.N., J.K. Lovett, and P.M. Rothwell, *Histological features of symptomatic carotid plaques in relation to age and smoking: the oxford plaque study*. Stroke, 2010. **41**(10): p. 2288-94.
13. Ota, H., et al., *Sex differences in patients with asymptomatic carotid atherosclerotic plaque: in vivo 3.0-T magnetic resonance study*. Stroke, 2010. **41**(8): p. 1630-5.

14. Roger, V.L., et al., *Executive summary: heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association*. *Circulation*, 2012. **125**(1): p. 188-97.
15. Nichols, M., et al., *European Cardiovascular Disease Statistics*. 2012 ed. 2012, Brussels, Belgium. Sophia, Antipolis: European Heart Network AISBL, European Society of Cardiology.
16. Jeon, S.B., et al., *Biomarkers and location of atherosclerosis: matrix metalloproteinase-2 may be related to intracranial atherosclerosis*. *Atherosclerosis*, 2012. **223**(2): p. 442-7.
17. Αράπογλου, Β., et al. *Παραδοσιακοί παράγοντες κινδύνου αθηρωμάτωσης, όχι η υπερομοκυστεϊναιμία, σχετίζονται με το ανεύρυσμα της κοιλιακής αορτής σε Έλληνες ασθενείς*. 2006-2007. 213-222. Available from: http://www.iatrikionline.gr/Aggeio_6-7_06/02.pdf.
18. Συρίγος, Δ., et al., *Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες ως διαγνωστικός και προγνωστικός δείκτης των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων. Μια νέα θεραπευτική πρόκληση*. *ΙΑΤΡΙΚΑ ΧΡΟΝΙΚΑ*, 2008. **ΚΑ'**(7-8): p. 361-366.
19. Anonymous. *Κυτοκίνες*. 2016 [cited 2017 10 May]; Available from: <http://www.bioneurologics.gr/search/%CE%BA%CF%85%CF%84%CE%BF%CE%BA%CE%AF%CE%BD%CE%B5%CF%82>.
20. Κατσίκη, Ν., et al., *Ο λόγος λεπτίνης/αδιπονεκτίνης ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας 10ετούς καρδιαγγειακού κινδύνου σε ινσουλινοθεραπευόμενους ασθενείς με διαβήτη τύπου 2*. Νοσοκομείο ΑΧΕΠΑ. p. 1-17. http://medicalrecords.gr/debe_22/speakers/presentations/EA/EA_020_katsiki.pdf
21. Anonymous. *Τι είναι το Μεταβολικό Σύνδρομο*. 2013 [cited 2017 10 May]; Available from: <http://www.healthyliving.gr/2013/06/18/metaboliko-syndromo/>.
22. Weinberger, J., *Diagnosis and prevention of atherosclerotic cerebral infarction*. *Core*, 2005. **10**(7): p. 553-564.
23. Elkind, M.S., *Inflammation, atherosclerosis, and stroke*. *Neurologist*, 2006. **12**(3): p. 140-8.
24. Muhlenbruch, G., et al., *Comparison of dual-source CT angiography and MR angiography in preoperative evaluation of intra- and extracranial vessels: a pilot study*. *Eur Radiol*, 2010. **20**(2): p. 469-76.
25. Silvennoinen, H.M., et al., *CT angiographic analysis of carotid artery stenosis: comparison of manual assessment, semiautomatic vessel analysis, and digital subtraction angiography*. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2007. **28**(1): p. 97-103.
26. Cai, J., et al., *In vivo quantitative measurement of intact fibrous cap and lipid-rich necrotic core size in atherosclerotic carotid plaque: comparison of high-*

- resolution, contrast-enhanced magnetic resonance imaging and histology. Circulation, 2005. 112(22): p. 3437-44.*
27. Ota, H., et al., *Carotid intraplaque hemorrhage imaging at 3.0-T MR imaging: comparison of the diagnostic performance of three T1-weighted sequences. Radiology, 2010. 254(2): p. 551-63.*
 28. Saam, T., et al., *Quantitative evaluation of carotid plaque composition by in vivo MRI. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. 25(1): p. 234-9.*
 29. Virmani, R., et al., *Pathology of the vulnerable plaque. J Am Coll Cardiol, 2006. 47(8 Suppl): p. C13-8.*
 30. Singh, N., et al., *Moderate carotid artery stenosis: MR imaging-depicted intraplaque hemorrhage predicts risk of cerebrovascular ischemic events in asymptomatic men. Radiology, 2009. 252(2): p. 502-8.*
 31. Takaya, N., et al., *Association between carotid plaque characteristics and subsequent ischemic cerebrovascular events: a prospective assessment with MRI--initial results. Stroke, 2006. 37(3): p. 818-23.*
 32. Jaiswal, S.K., et al., *Accuracy of Transcranial Doppler Ultrasound Compared with Magnetic Resonance Angiography in the Diagnosis of Intracranial Artery Stenosis. Journal of neurosciences in rural practice, 2019. 10(3): p. 400-4.*
 33. Ha, J., et al., *Prevalence and Impact of Venous and Arterial Thromboembolism in Patients With Embolic Stroke of Undetermined Source With or Without Active. Journal of the American Heart Association, 2019. 8(21).*
 34. Markus, H.S., et al., *Asymptomatic embolisation for prediction of stroke in the Asymptomatic Carotid Emboli Study (ACES): a prospective observational study. Lancet Neurol, 2010. 9(7): p. 663-71.*
 35. Simon, A., et al., *Intima-media thickness: a new tool for diagnosis and treatment of cardiovascular risk. J Hypertens, 2002. 20(2): p. 159-69.*
 36. O'Leary, D.H. and J.F. Polak, *Intima-media thickness: a tool for atherosclerosis imaging and event prediction. Am J Cardiol, 2002. 90(10c): p. 181-211.*
 37. Meyers, P. *Extracranial (Brachiocephalic) Atherosclerosis. 2017 [cited 2017 10 May]; Available from: <http://esnr.com/public/studies/extracranial-atherosclerosis.shtml>.*
 38. Kim, J.S., D.W. Kang, and S.U. Kwon, *Intracranial atherosclerosis: incidence, diagnosis and treatment. J Clin Neurol, 2005. 1(1): p. 1-7.*
 39. *Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. Clin Pharmacol Ther, 2001. 69(3): p. 89-95.*
 40. Fox, N. and J.H. Growdon *Biomarkers and Surrogates. 2004. 1, 181. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC534922/>.*

41. De Gruttola, V.G., et al., *Considerations in the evaluation of surrogate endpoints in clinical trials. summary of a National Institutes of Health workshop*. Control Clin Trials, 2001. **22**(5): p. 485-502.
42. Colburn, W.A., *Optimizing the use of biomarkers, surrogate endpoints, and clinical endpoints for more efficient drug development*. J Clin Pharmacol, 2000. **40**(12 Pt 2): p. 1419-27.
43. Prentice, R.L., *Surrogate endpoints in clinical trials: definition and operational criteria*. Stat Med, 1989. **8**(4): p. 431-40.
44. Huang, Y., Zhuang, Y., and Gilbert, P., *Sensitivity Analysis for Evaluating Principal Surrogate Endpoints Relaxing the Equal Early Clinical Risk Assumption*. The annals of applied statistics, 2022. **16**(3): p. 1774-1794.
45. Manolio, T., *Novel risk markers and clinical practice*. N Engl J Med, 2003. **349**(17): p. 1587-9.
46. LaBaer, J., *So, you want to look for biomarkers (introduction to the special biomarkers issue)*. J Proteome Res, 2005. **4**(4): p. 1053-9.
47. Morrow, D.A., et al., *The search for a biomarker of cardiac ischemia*. Clin Chem, 2003. **49**(4): p. 537-9.
48. Sekhri, N., et al., *Incremental prognostic value of the exercise electrocardiogram in the initial assessment of patients with suspected angina: cohort study*. BMJ, 2008. **13**(337).
49. Stumvoll, M., et al., *Association of the T-G polymorphism in adiponectin (exon 2) with obesity and insulin sensitivity: interaction with family history of type 2 diabetes*. Diabetes, 2002. **51**(1): p. 37-41.
50. Arita, Y., et al., *Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **257**(1): p. 79-83.
51. Szmítko, P.E., et al., *Adiponectin and cardiovascular disease: state of the art?* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(4): p. H1655-63.
52. Pilz, S., et al., *Early atherosclerosis in obese juveniles is associated with low serum levels of adiponectin*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(8): p. 4792-6.
53. Wolk, R., et al., *Association between plasma adiponectin levels and unstable coronary syndromes*. Eur Heart J, 2007. **28**(3): p. 292-8.
54. Kadowaki, T. and T. Yamauchi, *Adiponectin and adiponectin receptors*. Endocr Rev, 2005. **26**(3): p. 439-51.
55. Lei, X., et al., *Adiponectin and metabolic cardiovascular diseases: Therapeutic opportunities and challenges*. Genes and Diseases, 2022. **10**(4): p. 1525-1536.
56. Arita, Y., et al., *Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-*

- induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell.* Circulation, 2002. **105**(24): p. 2893-8.
57. Okamoto, Y., et al., *An adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, adheres to injured vascular walls.* Horm Metab Res, 2000. **32**(2): p. 47-50.
58. Anonymous. *Σχηματισμός της αθηρωματικής πλάκας.* [cited 2017 10 May]; Available from: http://www.incardiology.gr/pathiseis_lipidia/lipidia_plaka.html.
59. Hotamisligil, G.S., *The role of TNFalpha and TNF receptors in obesity and insulin resistance.* J Intern Med, 1999. **245**(6): p. 621-5.
60. Ouchi, N., et al., *Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages.* Circulation, 2001. **103**(8): p. 1057-63.
61. Newby, A.C., *Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture.* Physiol Rev, 2005. **85**(1): p. 1-31.
62. Spinale, F.G., *Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart.* Circ Res, 2002. **90**(5): p. 520-30.
63. Shah, P.K., *Inflammation, metalloproteinases, and increased proteolysis: an emerging pathophysiological paradigm in aortic aneurysm.* Circulation, 1997. **96**(7): p. 2115-7.
64. Galis, Z.S., et al., *Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques.* J Clin Invest, 1994. **94**(6): p. 2493-503.
65. Tyagi, S.C., et al., *Matrix metalloproteinase activity expression in infarcted, noninfarcted and dilated cardiomyopathic human hearts.* Mol Cell Biochem, 1996. **155**(1): p. 13-21.
66. Cleutjens, J.P., et al., *Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction.* J Mol Cell Cardiol, 1995. **27**(6): p. 1281-92.
67. Shapiro, S.D., *Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences.* Curr Opin Cell Biol, 1998. **10**(5): p. 602-8.
68. Birkedal-Hansen, H., *Proteolytic remodeling of extracellular matrix.* Curr Opin Cell Biol, 1995. **7**(5): p. 728-35.
69. Brinckerhoff, C.E., J.L. Rutter, and U. Benbow, *Interstitial collagenases as markers of tumor progression.* Clin Cancer Res, 2000. **6**(12): p. 4823-30.
70. Jiang, Y., et al., *Identification and Quantitative Assessment of Different Components of Intracranial Atherosclerotic Plaque by Ex Vivo 3T High-Resolution Multicontrast MRI.* American journal of neuroradiology, 2017. **38**(9): p. 1716-1722.

71. Ardans, J.A., et al., *Raloxifene-mediated increase in matrix metalloproteinase-1 production by activated monocytes*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. **21**(8): p. 1265-8.
72. Rajagopalan, S., et al., *Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability*. *J Clin Invest*, 1996. **98**(11): p. 2572-9.
73. Milkiewicz, M., et al., *Nitric oxide and p38 MAP kinase mediate shear stress-dependent inhibition of MMP-2 production in microvascular endothelial cells*. *J Cell Physiol*, 2006. **208**(1): p. 229-37.
74. Sinha, I., et al., *The nitric oxide donor DETA-NONOate decreases matrix metalloproteinase-9 expression and activity in rat aortic smooth muscle and abdominal aortic explants*. *Ann Vasc Surg*, 2006. **20**(1): p. 92-8.
75. Yamamoto, K., et al., *Targeting Dysregulation of Metalloproteinase Activity in Osteoarthritis*. *Calcified tissue international*, 2021. **109**(3): p. 277-290.
76. Nagase, H., et al., *Involvement of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPS) during matrix metalloproteinase activation*. *Adv Exp Med Biol*, 1996. **389**: p. 23-31.
77. Liu, J., et al., *Mechanism of inhibition of matrix metalloproteinase-2 expression by doxycycline in human aortic smooth muscle cells*. *J Vasc Surg*, 2003. **38**(6): p. 1376-83.
78. Bertaux, B., et al., *Growth stimulation of human keratinocytes by tissue inhibitor of metalloproteinases*. *J Invest Dermatol*, 1991. **97**(4): p. 679-85.
79. Sternlicht, M.D. and Z. Werb, *How matrix metalloproteinases regulate cell behavior*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001. **17**: p. 463-516.
80. Gomez, D.E., et al., *Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions*. *Eur J Cell Biol*, 1997. **74**(2): p. 111-22.
81. Jiang, Y., I.D. Goldberg, and Y.E. Shi, *Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer*. *Oncogene*, 2002. **21**(14): p. 2245-52.
82. Li, Y.Y., et al., *Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in the failing human heart*. *Circulation*, 1998. **98**(17): p. 1728-34.
83. Timms, P.M., et al., *Plasma tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels are elevated in essential hypertension and related to left ventricular hypertrophy*. *Am J Hypertens*, 2002. **15**(3): p. 269-72.
84. DeLeon-Pennell, K., et al., *Matrix Metalloproteinases in Myocardial Infarction and Heart Failure*. *Progress in molecular biology and translational science*, 2017. **147**: p. 75-100.

85. Orbe, J., et al., *Different expression of MMPs/TIMP-1 in human atherosclerotic lesions. Relation to plaque features and vascular bed.* *Atherosclerosis*, 2003. **170**(2): p. 269-76.
86. Noji, Y., et al., *Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in premature coronary atherosclerosis.* *Clin Chem Lab Med*, 2001. **39**(5): p. 380-4.
87. Beaudoux, J.L., et al., *Serum matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 as potential markers of carotid atherosclerosis in infraclinical hyperlipidemia.* *Atherosclerosis*, 2003. **169**(1): p. 139-46.
88. Ghose, T. *Insulin Resistance: Risk Factor for Heart Disease and Diabetes.* 2015 [cited 2017 August 2]; Available from: <https://www.livescience.com/34757-insulin-resistance-develop-diabetes-heart-disease.html>.
89. Sonksen, P. and J. Sonksen, *Insulin: understanding its action in health and disease.* *Br J Anaesth*, 2000. **85**(1): p. 69-79.
90. Park, K., et al., *Exogenous insulin infusion can decrease atherosclerosis in diabetic rodents by improving lipids, inflammation, and endothelial function.* *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2018. **38**(1): p. 92-101.
91. Jarrett, R.J., *Is insulin atherogenic?* *Diabetologia*, 1988. **31**(2): p. 71-5.
92. Cook, N.S. and D. Ubben, *Fibrinogen as a major risk factor in cardiovascular disease.* *Trends Pharmacol Sci*, 1990. **11**(11): p. 444-51.
93. Davalos, D. and Akassoglou, K., *Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease.* *Seminars in immunopathology*, 2012. **34**(1): p. 43-62.
94. Naito, M., et al., *Substrate-bound fibrinogen, fibrin and other cell attachment-promoting proteins as a scaffold for cultured vascular smooth muscle cells.* *Atherosclerosis*, 1992. **96**(2-3): p. 227-34.
95. Su, J.H., et al., *Interleukin-6: a novel target for cardio-cerebrovascular diseases.* *Frontiers in pharmacology*, 2021. **24**(12).
96. Tousoulis, D., et al., *Effects of lipids on thrombotic mechanisms in atherosclerosis.* *Int J Cardiol*, 2002. **86**(2-3): p. 239-47.
97. Meade, T.W., *Fibrinogen and cardiovascular disease.* *J Clin Pathol*, 1997. **50**(1): p. 13-5.
98. Behrendt, D. and P. Ganz, *Endothelial function. From vascular biology to clinical applications.* *Am J Cardiol*, 2002. **90**(10c): p. 401-481.
99. Celermajer, D.S., *Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible?* *J Am Coll Cardiol*, 1997. **30**(2): p. 325-33.
100. Hunt, B.J. and K.M. Jurd, *Endothelial cell activation. A central pathophysiological process.* *Bmj*, 1998. **316**(7141): p. 1328-9.

101. Cotran, R.S. and T. Mayadas-Norton, *Endothelial adhesion molecules in health and disease*. Pathol Biol (Paris), 1998. **46**(3): p. 164-70.
102. De Leonardis, F., et al., Endothelial dysfunction, erectile deficit and cardiovascular disease: an overview of the pathogenetic links. *Biomedicines*, 2022. **10**(8).
103. Hillis, G.S. and A.D. Flapan, *Cell adhesion molecules in cardiovascular disease: a clinical perspective*. Heart, 1998. **79**(5): p. 429-31.
104. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
105. Davies, M.J., et al., *The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis*. J Pathol, 1993. **171**(3): p. 223-9.
106. Cybulsky, M.I. and M.A. Gimbrone, Jr., *Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis*. Science, 1991. **251**(4995): p. 788-91.
107. Li, H., et al., *Inducible expression of vascular cell adhesion molecule-1 by vascular smooth muscle cells in vitro and within rabbit atheroma*. Am J Pathol, 1993. **143**(6): p. 1551-9.
108. O'Brien, K.D., et al., *Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis*. J Clin Invest, 1993. **92**(2): p. 945-51.
109. O'Brien, K.D., et al., *Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content*. Circulation, 1996. **93**(4): p. 672-82.
110. Oguchi, S., et al., *Monoclonal antibody against vascular cell adhesion molecule-1 inhibits neointimal formation after periadventitial carotid artery injury in genetically hypercholesterolemic mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(7): p. 1729-36.
111. Haught, W.H., et al., *Alterations in circulating intercellular adhesion molecule-1 and L-selectin: further evidence for chronic inflammation in ischemic heart disease*. Am Heart J, 1996. **132**(1 Pt 1): p. 1-8.
112. Ridker, P.M., et al., *Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men*. Lancet, 1998. **351**(9096): p. 88-92.
113. Hwang, S.J., et al., *Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study*. Circulation, 1997. **96**(12): p. 4219-25.

114. de Lemos, J.A., C.H. Hennekens, and P.M. Ridker, *Plasma concentration of soluble vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent cardiovascular risk*. J Am Coll Cardiol, 2000. **36**(2): p. 423-6.
115. Γρυπάρη, Α., et al., *Immunoenzymatic assay ELISA for creating standard titration curve of cytokine PAI1*, Α. Μήνια and Κ. Σκορδά, Editors. 2009, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. p. 1-18.
116. Yalow, R.S. and S.A. Berson, *Immunoassay of endogenous plasma insulin in man*. J Clin Invest, 1960. **39**: p. 1157-75.
117. Lequin, R.M., *Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. Clin Chem, 2005. **51**(12): p. 2415-8.
118. Wide, L. and J. Porath, *Radioimmunoassay of proteins with the use of Sephadex-coupled antibodies*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1966. **130**(1): p. 257-260.
119. Anonymous. *DNA microarray*. 2017 [cited 2017 10 May]; Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/DNA_microarray.
120. Anonymous. *ELISA*. 2017 [cited 2017 10 May]; Available from: <https://en.wikipedia.org/wiki/ELISA>.
121. Recktenwald, D.J., *Introduction to flow cytometry: principles, fluorochromes, instrument set-up, calibration*. J Hematother, 1993. **2**(3): p. 387-94.
122. Orfao, A., et al., *Flow cytometry: its applications in hematology*. Haematologica, 1995. **80**(1): p. 69-81.
123. Watson, J.V., *The early fluidic and optical physics of cytometry*. Cytometry, 1999. **38**(1): p. 2-14; discussion 1.
124. Mandy, F.F., M. Bergeron, and T. Minkus, *Principles of flow cytometry*. Transfus Sci, 1995. **16**(4): p. 303-14.
125. Keren, D.F., C.A. Hanson, and P.E. Hurtubise, *Flow cytometry and clinical diagnosis*. 1994, Chicago: ASCP Press. xi, 664 p.
126. Shapiro, H.M., *Practical flow cytometry*. 3rd ed. 1995, New York: Wiley-Liss. xxxviii, 542 p., 8 p. of plates.
127. Nix, B. and D. Wild, *Calibration curve-fitting*. 2001, Nature Publishing Group, New York, NY The Immunoassay Handbook, 2nd ed. p. 198–210. https://www.dartmouth.edu/~dartlab/uploads/Bio-RadTechNote2861_principles_of_curve_fitting.pdf
128. Motulsky, H., *The GraphPad Guide to Nonlinear Regression*. 1996, GraphPad Software, Inc. p. 1-17.
129. Davis, D., et al., *Principles of Curve Fitting for Multiplex Sandwich Immunoassays*. Bio-Rad Laboratories, Inc. p. 1-4.

130. Loh, W.-Y., *Classification and regression trees*. John Wiley & Sons, Inc., 2011(1): p. 14-23.
131. Fisher, R., *The use of multiple measurements in taxonomic problems*. Ann Eugen, 1936. **7**: p. 179-188.
132. Cover, T., Hart. P., *Nearest neighbor pattern classification*. IEEE Trans inf Theory, 1967. **13**: p. 21-27.
133. Mabbett, A., Stone, M., *Cross-validators selection of binary variables in differential diagnosis*. Journal of the Royal Statistical Society, 2018. **29**(2): p. 198-204.
134. Messenger, R., Mandell, L., *A modal search technique for predictive nominal scale multivariate analysis*. J Am Stat Assoc, 1972. **67**: p. 768-772.
135. Quinlan, J., *C4.5: Programs for Machine Learning*. 1993, San Mateo: Morgan Kaufmann.
136. Breiman, L., Friedman, JH., Olshen, RA., Stone, CJ., *Classification and Regression Trees*. 1984, CRC Press.
137. Loh, W., Vanichsetakul, N., *Tree-structured classification via generalized discriminant analysis (with discussion)*. J Am Stat Assoc 1988. **83**: p. 715-728.
138. Kim, H., Loh, WY., *Classification trees with unbiased multiway splits*. J Am Stat Assoc, 2001. **96**: p. 589-604.
139. Kim, H., Loh, WY., *Classification trees with bivariate linear discriminant node models*. J Comput Graphical Stat, 2003. **12**: p. 512-530.
140. Loh, W., Chen, C., Hordle, W., Unwin, A., *Improving the precision of classification trees*. Ann Appl Stat 2009. **3**: p. 1710-1737.
141. Loh, W., Shih, Y., *Split selection methods for classification trees*. Stat Sin, 1997. **7**: p. 815-840.
142. Hothorn, T., Hornik, K., Zeileis, A., *Unbiased recursive partitioning: a conditional inference framework*. J Comput Graphical Stat, 2006. **15**: p. 651-674.
143. Breiman, L., Friedman, J.H., Olshen, R.A., Stone, C.J. *Classification and regression trees*. 1984 [cited 2017 25 September].
144. Morgan, J., Sonquist, JA., *Problems in the analysis of survey data, and a proposal*. J Am Stat Assoc, 1963. **58**: p. 415-434.
145. Witten, I., Frank, E., *Data Mining: practical Machine Learning Tools and Techniques in San Francisco: Morgan Kaufmann*. 2005.
146. Quinlan, J., *Learning with continuous classes*. Proceedings of the 5th Australian Joint Conference on Artificial Intelligence, 1992: p. 343-348.

147. Loh, W., *Regression trees with unbiased variable selection and interaction detection*. Stat Sin, 2002. **12**: p. 361-386.
148. Gareth, J., Witten, Daniela., Hastie, Trevor., Tibshirani, Robert. *An Introduction to Statistical Learning*. 2015 [cited 2017 25 September].
149. Joos, T.O., D. Stoll, and M.F. Templin, *Miniaturised multiplexed immunoassays*. Curr Opin Chem Biol, 2002. **6**(1): p. 76-80.
150. Fulton, R.J., et al., *Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system*. Clin Chem, 1997. **43**(9): p. 1749-56.
151. Vignali, D.A., *Multiplexed particle-based flow cytometric assays*. J Immunol Methods, 2000. **243**(1-2): p. 243-55.
152. Hanley, B.P., L. Xing, and R.H. Cheng, *Variance in multiplex suspension array assays: microsphere size variation impact*. Theor Biol Med Model, 2007. **4**: p. 31.
153. Weiss, S., *Fluorescence spectroscopy of single biomolecules*. Science, 1999. **283**(5408): p. 1676-83.
154. Moalic, V., M. Bernard, and F. Claude, *Technologie Luminex™ : principe, applications, et perspectives*. Vol. 19. 2004. 181-187.
155. Bellisario, R., R.J. Colinas, and K.A. Pass, *Simultaneous measurement of thyroxine and thyrotropin from newborn dried blood-spot specimens using a multiplexed fluorescent microsphere immunoassay*. Clin Chem, 2000. **46**(9): p. 1422-4.
156. Seideman, J. and D. Peritt, *A novel monoclonal antibody screening method using the Luminex-100 microsphere system*. J Immunol Methods, 2002. **267**(2): p. 165-71.
157. Colinas, R.J., R. Bellisario, and K.A. Pass, *Multiplexed genotyping of beta-globin variants from PCR-amplified newborn blood spot DNA by hybridization with allele-specific oligodeoxynucleotides coupled to an array of fluorescent microspheres*. Clin Chem, 2000. **46**(7): p. 996-8.