

**ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΕΜΠ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΜΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΙΚΗΣ  
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

---

**ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ  
ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΘΟΡΥΒΟΥ ΣΕ  
ΠΟΛΥΠΕΚΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ELISA**

**Σακελλαρόπουλος Θεόδωρος  
16/10/2012**

**Επιβλέπων: Δρ. Λεωνίδας Αλεξόπουλος**

# Περιεχόμενα

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ .....	0
Σακελλαρόπουλος Θεόδωρος.....	0
16/10/2012.....	0
Επιβλέπων: Δρ. Λεωνίδας Αλεξόπουλος .....	0
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	4
ΣΥΣΤΗΜΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ.....	4
Τι σημαίνει «κατανόηση σε συστημικό επίπεδο» στην πράξη; .....	5
ΠΡΩΤΕΪΝΩΜΑΤΙΚΗ .....	5
Γιατί είναι αναγκαία η μελέτη ενός κυττάρου σε πρωτεϊνικό επίπεδο; .....	5
Τι προσφέρει μια συστημική προσέγγιση της πρωτεϊνωματικής;.....	6
Η ΤΕΧΝΙΚΗ ELISA.....	7
ΠΟΛΥΠΛΕΞΙΑ .....	9
Χαρακτηριστικά Bead-based Sandwich ELISA:.....	9
Πλεονεκτήματα: .....	12
ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ .....	13
Εξίσωση του Langmuir.....	14
Ταχύτητα των Αντιδράσεων .....	14
Κατάσταση Ισορροπίας .....	15
Κινηματική της Αντίδρασης.....	16
ΕΡΕΥΝΑ ΜΕΧΡΙ ΤΩΡΑ .....	17
ΑΝΑΛΥΣΗ.....	21
ΠΗΓΕΣ ΘΟΡΥΒΟΥ .....	21
ΠΗΓΕΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΘΟΡΥΒΟΥ .....	22
Αντίδραση Αντισώματος-Αντιγόνου .....	22
Διαφοροποίηση των 2 Πηγών .....	24
ΜΕΤΡΗΣΗ ΘΟΡΥΒΟΥ ΣΕ ΠΟΛΥΠΛΕΚΤΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ.....	25
Αρχή Λειτουργίας xMap .....	25

Πειράματα Θορύβου .....	28
ΜΟΝΤΕΛΟ ΘΟΥΒΟΥ .....	32
Συγκέντρωση Αντιδρώντων .....	32
Αναγνωρισιμότητα .....	36
ΘΟΥΒΟΣ ΣΥΝΟΛΟΥ ΑΝΑΛΥΤΩΝ .....	40
ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ .....	43
ΜΟΝΤΕΛΟ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗΣ .....	43
ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΒΕΛΤΙΣΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ .....	44
Ορισμός «Βέλτιστου» Πειράματος.....	44
Αλγόριθμος Βελτιστοποίησης .....	45
ΒΕΛΤΙΣΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ.....	48
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ.....	51
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ .....	51
Παρατηρήσεις για τα 2 Πειράματα Θορύβου.....	51
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΥ .....	59
Διάγραμμα Οριακού Θορύβου.....	62
Διάγραμμα Γραμμικών/Κινούμενων Κλίσεων Μέσου Θορύβου.....	62
ΒΕΛΤΙΣΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑ .....	67
ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ .....	68
Τελικό Πείραμα .....	68
SNR Πολυπλεκτικής Μέτρησης .....	69
Σύγκριση Αρχικού και Τελικού Πειράματος.....	70
ΣΥΝΟΨΗ - ΕΠΕΚΤΑΣΗ .....	75
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	77
ΑΡΘΡΑ .....	77
ΠΑΡΑΔΟΣΕΙΣ - ΒΙΒΛΙΑ .....	78
ΙΣΤΟΤΟΠΟΙ .....	78
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ .....	78

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αποτελέσματα υψηλής απόδοσης και πολυπλεξίας είναι απαραίτητες προϋποθέσεις για την μοντελοποίηση πολύπλοκων βιολογικών συστημάτων. Οι 2 αυτοί στόχοι συνήθως είναι αντικρουόμενοι και ο συνδυασμός του απαιτεί την χρήση μοντέλων βελτιστοποίησης. Τα μοντέλα που αναπτύχθηκαν χρησιμοποιούν κατάλληλου τύπου δεδομένα τα οποία παρήχθησαν στο εργαστήριο, με αποτέλεσμα να αναπαριστούν τα διάφορα ήδη θορύβου, σε συνδυασμό με αλγόριθμους για την επιλογή των βέλτιστων σημάτων, έτσι ώστε να περιορίζεται, κατά το δυνατόν, ο πολλαπλασιασμός του θορύβου. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε, σε αντίθεση με τις παραδοσιακές προσέγγισης, ελέγχει το σύνολο των πιθανών συνδυασμών και επιλέγει τον συνδυασμό ο οποίος ελαχιστοποιεί τα σφάλματα τύπου I. Για την δοκιμή της μεθόδου υπολογίστηκε το καλύτερο πείραμα από ένα σύνολο 80 σημάτων για το οποίο καταφέραμε να μειώσουμε το θόρυβο πάνω από 80% και να υπερδεκαπλασιάσουμε το λόγο σήματος θορύβου περιορίζοντας τον αριθμό των σημάτων στα 56. Στόχος είναι με τα δεδομένα της ανάλυσης να μπορέσουμε να κάνουμε μια μετά-ανάλυση, ώστε να κατηγοριοποιήσουμε τα αντισώματα που χρησιμοποιούμε βάση της ιδιότητας τους να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και να παράγουν θόρυβο.

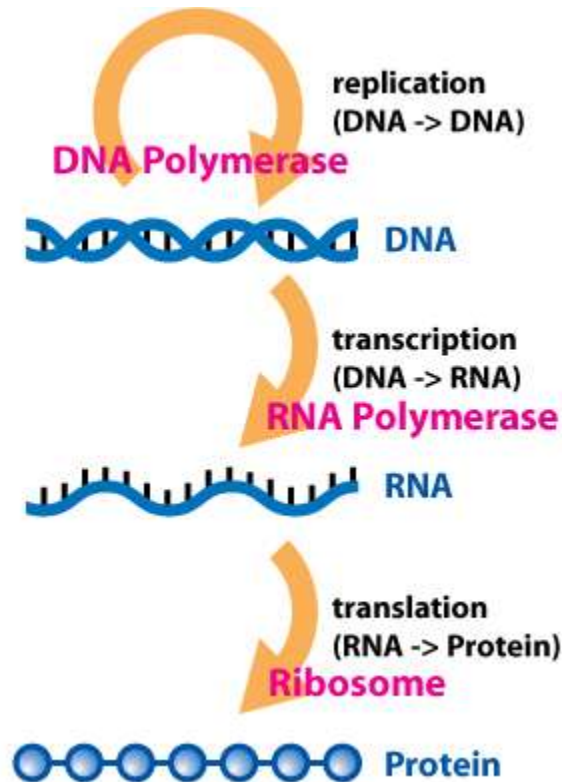
# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## ΣΥΣΤΗΜΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ

Η συστημική βιολογία είναι μια σχετικά νέα διεπιστημονική προσέγγιση στο γνωστικό αντικείμενο της βιολογίας. Συγκεκριμένα, επιχειρεί τόσο την επαναπροσέγγιση της ερευνητικής τακτικής, όσο και της υπάρχουσας γνώσης με στόχο την κατανόηση των βιολογικών φαινομένων σε συστημικό επίπεδο.

Ιστορικά, η μοριακή βιολογία, κυρίως μετά την ανακάλυψη της διπλής έλικας του DNA και της διατύπωσης του κεντρικού δόγματος της βιολογίας από τους Watson και Crick, έριξε φως στη δομή του κυττάρου μέσω της αναγνώρισης των διαφόρων συστατικών του (γονίδια, πρωτεΐνες κλπ) και των λειτουργιών που αυτά επιτελούν. Η συστημική βιολογία προσπαθεί να δώσει απάντηση στην επόμενη πρόκληση που είναι η σύνθεση της γνώσης αυτών των συστατικών (αυτόνομων συστημάτων) σε ένα βιολογικό σύστημα, είτε αυτό είναι κύτταρο είτε ιστός είτε οργανισμός, ώστε να συνδεθεί ο φαινόμενος κόσμος με το βιολογικό του υπόβαθρο. Η αναγκαιότητα αυτού του νέου βήματος πηγάζει από το γεγονός ότι γνώση των ιδιοτήτων των στοιχείων δεν ισοδυναμεί με γνώση των ιδιοτήτων του συστήματος, καθώς μερικές από αυτές δεν μπορούν να αποδοθούν σε κανένα στοιχείο παρά μόνο στο συνεργαζόμενο σύνολο τους (ολιστική προσέγγιση).

Η κατανόηση των βιολογικών συστημάτων πάντα αποτελούσε απώτατο στόχο της βιολογίας όμως τώρα, χάρη στις εξελίξεις της μοριακής βιολογίας, υπάρχει πρόσφορο έδαφος για στηρίξει αυτής της προσπάθειας. Το έδαφος αυτό είναι το μοριακό επίπεδο το οποίο παρέχει την δυνατότητα να αναπτυχθεί ένα πλαίσιο γνώσης μέσα το οποίο να εκφράζονται με σαφήνεια σχέσεις αιτιότητας και όχι απλές παρατηρήσεις.



Εικόνα 1: Γραφική απεικόνιση Κεντρικού Δόγματος Βιολογίας

## Τι σημαίνει «κατανόηση σε συστημικό επίπεδο» στην πράξη;

Η συστημική ανάλυση, για να μην είναι κενή έννοια, θα πρέπει όχι μόνο να επαναπροσεγγίσει την υπάρχουσα γνώση, αλλά να προσθέσει τα συμπεράσματα της σε αυτή. Οι στόχοι στους οποίους πρέπει να αποβλέπει μια συστημική ανάλυση δεν είναι κοινά αποδεκτοί. Ο Kitano, ένας από τους «πατέρες» της συστημικής βιολογίας, στην έκθεση του *Θεμέλια της Συστημικής Βιολογίας* (Foundations of System Biology) δίνει την προσωπική του άποψη για το ποιοι πρέπει να είναι οι στόχοι μιας έρευνας που επιδιώκει μια «συστημική κατανόηση» της βιολογίας. Συγκεκριμένα η έρευνα πρέπει να εστιάσει:

1. στη δομή ενός συστήματος, όπως για παράδειγμα είναι τα γονίδια, ο μεταβολισμός, τα δίκτυα μεταφοράς σήματος και οι φυσικές δομές
2. στη δυναμική των συστημάτων, πώς δηλαδή τα διάφορα συστήματα αλληλεπιδρούν μεταξύ τους (μέχρι εδώ είναι το πεδίο της απλής κατανόησης)
3. πάνω σε μεθόδους για τον έλεγχο του συστήματος, και τελικώς
4. πάνω σε μεθόδους για σχεδιασμό και τροποποίηση συστημάτων με επιθυμητές ιδιότητες

## ΠΡΩΤΕΪΝΩΜΑΤΙΚΗ

Πρωτεϊνωματική (proteomics) είναι η μεγάλης κλίμακας ανάλυση των πρωτεϊνών ενός κυττάρου ή οργανισμού. Γενικά η κατάληξη «-ωματική» (-omics) χρησιμοποιείται για να περιγράψει την ανάλυση μακρομορίων ενός **ολόκληρου** συστήματος. Η ορολογία προκύπτει ως επέκταση της έννοιας του αρχικού όρου γονιδιωματική (genomics), ο οποίος αναφέρεται στην ανάλυση του γονιδιώματος (genome), του συνόλου δηλαδή των γονιδίων του οργανισμού.

Σύμφωνα με το κεντρικό δόγμα, η διαδρομή της γενετικής πληροφορίας ξεκινά από το γονιδίωμα και τερματίζει στις πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες (το σύνολο των πρωτεϊνών που εκφράζονται σε ένα βιολογικό σύστημα) είναι οι τελικοί αποδέκτες της γενετικής πληροφορίας και ως εκ τούτου αποτελούν, από βιολογικής άποψης τουλάχιστον, τον φαινότυπο<sup>1</sup> που βλέπουμε σε κάθε σύστημα.

## Γιατί είναι αναγκαία η μελέτη ενός κυττάρου σε πρωτεϊνικό επίπεδο;

Η απάντηση είναι ότι η μελέτη σε γονιδιακό επίπεδο δεν αρκεί. Η λειτουργία ενός κυττάρου είναι πολύ πολύπλοκη και δεν μπορεί να ερμηνευτεί μόνο μέσω της έκφρασης του γονιδιώματος. Το κύτταρο βασίζεται, επιπλέον, σε διάφορα μονοπάτια (σειρές χημικών

---

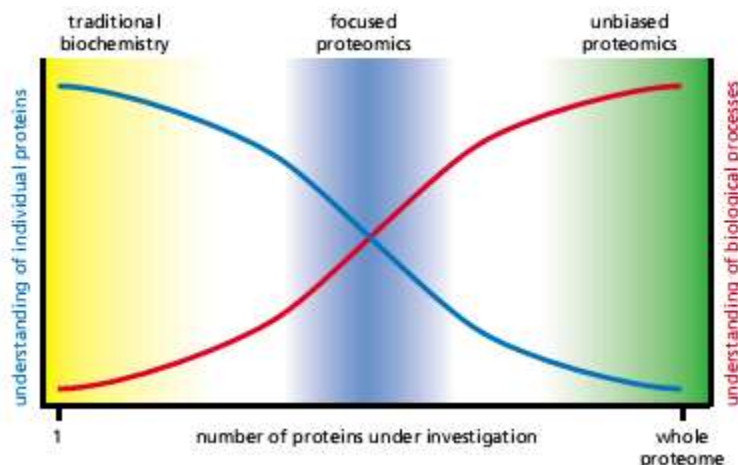
<sup>1</sup> **Φαινότυπος** είναι η σύνθεση των παρατηρήσιμων χαρακτηριστικών και των γνωρισμάτων ενός οργανισμού, όπως η μορφολογία του, η βιοχημικές ή φυσιολογικές του ιδιότητες, η συμπεριφορά του ή τα αποτελέσματα της συμπεριφοράς του (πχ η φωλιά των πουλιών), σε μια δεδομένη χρονική στιγμή. Αποτελεί δηλαδή το μέρος του γονοτύπου του οργανισμού το οποίο μπορούμε (άμεσα ή έμμεσα) να παρατηρήσουμε. (Wikipedia)

αντιδράσεων) για τη λειτουργία του (μεταβολικά, μετάδοσης σήματος κ.ά.). Κατά συνέπεια, η τελική έκφραση του πρωτεϊνώματος<sup>2</sup> δεν μπορεί να εξαχθεί από την ευθεία γραμμή αιτιότητας, που υπονοεί το κεντρικό δόγμα, αφού υπάρχουν πολλά μετα-μεταφραστικά (post-translational) φαινόμενα που το καθορίζουν.

### Τι προσφέρει μια συστημική προσέγγιση της πρωτεϊνωματικής;

Η «παραδοσιακή» πρωτεϊνωματική ανάλυση συνίσταται στο διαχωρισμό-απομόνωση και αναγνώριση της δομής και, κατά συνέπεια, της λειτουργίας των πρωτεϊνών. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται συνήθως με την τεχνική της μονοδιάστατης ή διδιάστατης ηλεκτροφόρησης σε τζελ (1 or 2-D Gel Electrophoresis), ενώ η ανάλυση με την τεχνική της φασματομετρίας μάζας (Mass Spectrometry). Οι τεχνικές αυτές συνδυαζόμενες επιτρέπουν να διαχωριστούν και αναλυθούν μέχρι 1.000 πρωτεΐνες, αριθμός που δεν θεωρείται ιδιαίτερα μεγάλος, δεδομένου ότι σε κάθε δείγμα ο αριθμός των πρωτεϊνών μπορεί να είναι της τάξης του  $10^6$ .

Η συστημική ανάλυση δεν ξεκινάει από το μηδέν όπως η παραδοσιακή ανάλυση. Αντιθέτως χτίζει πάνω στην υπάρχουσα γνώση. Στόχος της συστημικής ανάλυσης είναι η κατανόηση συγκεκριμένων φαινοτύπων, γι' αυτό και δεν στοχεύει στην αδιάκριτη αναγνώριση πρωτεϊνών, αλλά στην παρακολούθηση συγκεκριμένων πρωτεϊνών στόχων για τις οποίες εκτιμάται, εκ των προτέρων, ότι σχετίζονται (ή είναι πιθανό να σχετίζονται) με τον υπό ανάλυση φαινότυπο.

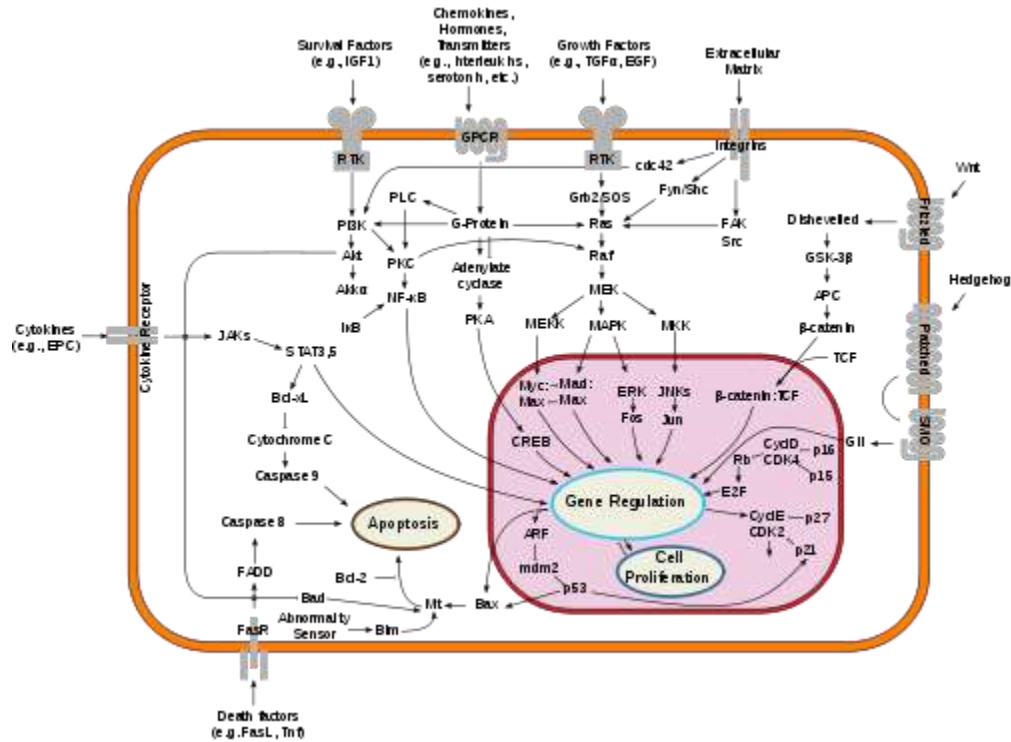


Εικόνα 2: "Φάσμα" Πρωτεϊνικής Ανάλυσης

Ως εκ τούτου, πειράματα που εντάσσονται σε μια συστημική ανάλυση δεν αποσκοπούν στην άκριτη αναγνώριση πρωτεϊνών, αλλά στην ποσοτικοποίηση της έκφρασης μερικών κρίσιμων εξ αυτών. Για μια συστημική ανάλυση, κρίσιμο μέγεθος δεν είναι το ποιες πρωτεΐνες υπάρχουν

<sup>2</sup> **Πρωτεϊνώμα** (κατά το γονίδιο – γονιδίωμα), είναι το σύνολο το πρωτεϊνών που εκφράζονται από ένα συγκεκριμένο κύτταρο (ή οργανισμό) σε κάποιο δεδομένο χρόνο για δεδομένες συνθήκες

σε ένα κύτταρο, αλλά ποιες είναι ενεργές, ποιων η έκφραση, δηλαδή, διαφοροποιείται σε μια χρονική περίοδο ως απάντηση σε κάποιο ερέθισμα. Επομένως, ο φαινότυπος, υπό το πρίσμα της πρωτεϊνωματικής, είναι το αποτέλεσμα «μονοπατιών» αλληλεπίδρασης, δηλαδή της σειριακής ενεργοποίησης διαφόρων πρωτεϊνών<sup>3</sup>.



Εικόνα 3: Υπόδειγμα "μονοπατιών" μετάδοσης σήματος

Μια από τις πιο επιτυχημένες τεχνικές γι' αυτό το σκοπό είναι η τεχνική ELISA.

## Η ΤΕΧΝΙΚΗ ELISA

**Η ELISA είναι μια δημοφιλής πλατφόρμα για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση διαφόρων αναλυτών σε μια βιοχημική δοκιμή τρυβλίου.**

**Αναλύτες** (analytes) είναι τα βιομόρια στόχοι κάθε δοκιμής, ο όρος προκύπτει από την σύλληψη ότι τα βιομόρια στόχοι είναι τα βιομόρια που θα αναλυθούν. Η παρούσα εργασία πραγματεύεται μετρήσεις πρωτεϊνών, επομένως οι αναλύτες είναι πρωτεΐνες.

<sup>3</sup> Μια πρωτεΐνη «ενεργοποιείται» μέσω της διαδικασίας της φωσφορυλίωση.

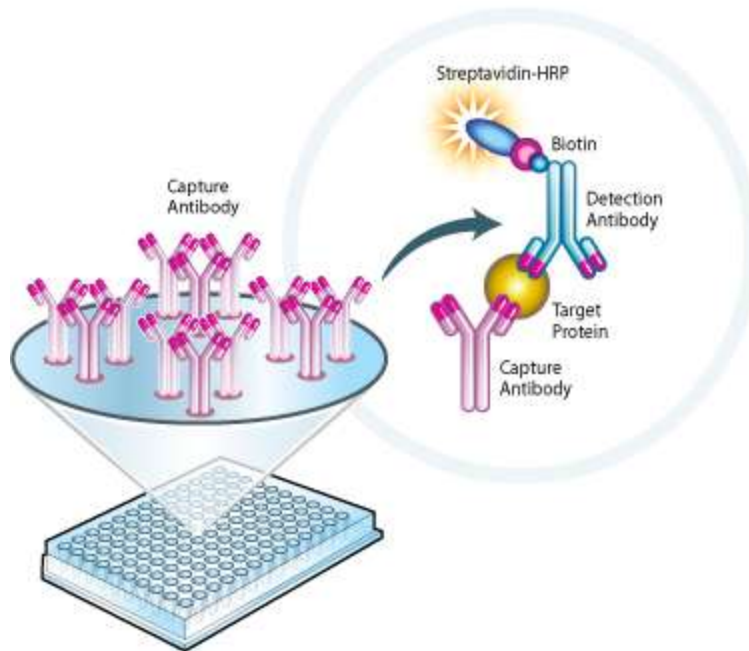


**Ως βιοχημική δοκιμή τρυβλίου** (plate-based biochemical assay) εννοείται μια τυπική δοκιμή-πείραμα (assay) στη βάση ενός τρυβλίου (plate), συνήθως 96 βοθρίων (wells), στο οποίο κάθε βοθρίο περιέχει ένα δείγμα (υγρό διάλυμα/μίγμα) του οποίου τη βιοχημική σύσταση θέλουμε να αναλύσουμε.

Η ονομασία **ELISA** (**E**nzyme-**L**inked **I**mmuno**S**orbent **A**ssay, συνοψίζει μόνο την αρχική μορφή της τεχνικής). Πρακτικώς δεν αναφέρεται σε μια συγκεκριμένη τεχνική, καθώς υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία τεχνικών που χαρακτηρίζονται με αυτό το όνομα, αλλά στην ιδέα που βασίζονται όλες αυτές οι τεχνικές. Γι' αυτό το λόγο και αφήνεται αμετάφραστο, διότι ούτως ή άλλως αποτελεί αυθαίρετη ονομασία μιας οικογένειας τεχνικών.

Η **βασική ιδέα** την οποία όλες αυτές οι τεχνικές υλοποιούν ως ένα βαθμό είναι η εξής:

1. οι αναλύτες του δείγματος **ακινητοποιούνται** πάνω σε μία στερεή επιφάνεια
2. εν συνεχεία προστίθενται, στις περισσότερες περιπτώσεις, ένα ή δύο αντισώματα (εξ ου και "immunosorbent") για την ανίχνευση των ακινητοποιημένων αναλυτών, τα οποία δημιουργούν ένα σύμπλεγμα με τον αναλύτη. Το αντίσωμα αυτό καλείται **Αντίσωμα Ανίχνευσης** ή δευτερεύον (Detection/Secondary Antibody). Στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται αντισώματα, οι αναλύτες είναι εξ ορισμού αντιγόνα.
3. Το αντίσωμα αυτό πρέπει με τη σειρά του να **σημανθεί** (labeled) μέσω μιας ανιχνεύσιμης ουσίας, η οποία παραδοσιακά ήταν κάποιο ένζυμο (εξ ου και το enzyme-linked), ώστε να μπορεί να ανιχνευτεί το σύμπλεγμα.
4. Μεταξύ των διαφόρων βημάτων συνήθως υπάρχει **πλύση** των βοθρίων, ώστε να απομακρυνθούν οι διάφορες ουσίες. Ο αριθμός των πλύσεων ποικίλει ανάλογα με τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται.
5. Η ποσοτικοποίηση γίνεται μέσω της συσχέτισης του αριθμού των ανιχνευμένων συμπλεγμάτων με την αρχική συγκέντρωση του μίγματος. Η σχέση αυτή δεν είναι γνωστή εκ των προτέρων, οπότε κάθε δοκιμή χρειάζεται και την αντίστοιχη **βαθμονόμηση** (calibration).



Εικόνα 4: αρχή λειτουργίας ELISA

## ΠΟΛΥΠΛΕΞΙΑ

Στην κλασική εκδοχή της, μια μέτρηση με την τεχνική ELISA αναγνωρίζει και ποσοτικοποιεί μόνο έναν αναλύτη ανά δείγμα. Για τις ανάγκες μιας «συστημικής» προσέγγισης, όμως, κάτι τέτοιο δεν είναι αρκετό, καθώς θα έπρεπε για κάθε μετρούμενο σε κάθε διαφορετικό υπό μελέτη ερέθισμα (stimuli να πραγματοποιείται μια ξεχωριστή μέτρηση. Μια τέτοια διαδικασία θα ήταν εξαιρετικά χρονοβόρα και απαιτητική γι' αυτό και χρειάστηκε να αναπτυχθούν ειδικές τεχνολογίες για την εκτέλεση πολυπλεκτικών (multiplexed) μετρήσεων.

Πολυπλεκτική ονομάζεται μια μέτρηση κατά την οποία μετρούνται στο ίδιο δείγμα και ταυτόχρονα πολλοί αναλύτες (τυπικά πάνω από έναν).

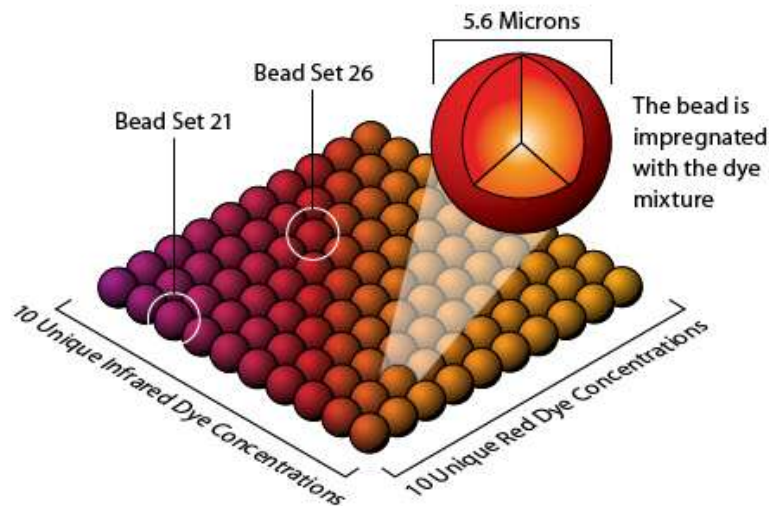
Στο εργαστήριο η εξέλιξη της κλασικής ELISA που χρησιμοποιούμε είναι η Bead-based Sandwich ELISA, η οποία είναι και η τεχνική με την οποία ασχολείται η παρούσα εργασία.

### Χαρακτηριστικά Bead-based Sandwich ELISA:

Οι αναλύτες, που στην περίπτωση μας είναι κυτταροκίνες (cytokines) και φωσφοπρωτεΐνες (phosphoproteins), ακινητοποιούνται πάνω στην επιφάνεια μικροσφαιρίδιων (beads). Σε αντίθεση με τη συνήθη τεχνική της παθητικής προσρόφησης (adsorption) πάνω σε ακίνητη, επίπεδη επιφάνεια, τα μικροσφαιρίδια (διαμέτρου 5,6μm) έχουν τη δυνατότητα να κινούνται

μέσα στο δείγμα καθώς και να επηρεάζονται από τα μαγνητικά πεδία λόγω του σιδήρου που περιέχουν (σε ποσοστό 2%-4%).

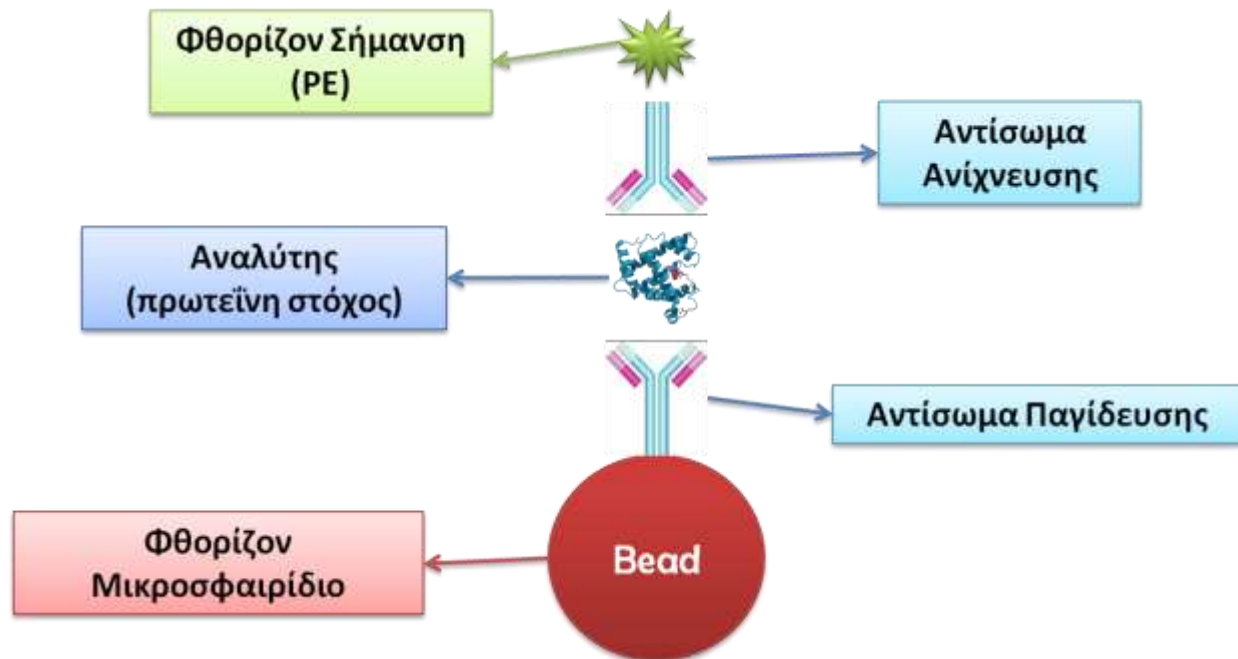
Τα μικροσφαιρίδια είναι χρωματισμένα με ειδική φθορίζουσα βαφή, ώστε το κάθε ένα (ή η κάθε ομάδα) να χαρακτηρίζεται από μια ξεχωριστή χρωματική ταυτότητα. Ο διαχωρισμός των μικροσφαιριδίων αποτελεί αναγκαία προϋπόθεση για την πολυπλεξία της μεθόδου, διότι έτσι μπορούμε να αντιστοιχίσουμε τα μικροσφαιρίδια στους διάφορους αναλύτες που μας ενδιαφέρουν.



Εικόνα 5: σετ μικροσφαιριδίων

Η προσρόφηση δεν γίνεται απευθείας στην επιφάνεια, αλλά από τα αντισώματα παγίδευσης (ή πρωτεύον αντίσωμα – Capture/Primary Antibody) με τα οποία έχουν προ-επικαλυφθεί τα μικροσφαιρίδια.

Αυτό το είδος προσρόφησης λέγεται επιλεκτική (specific binding), διότι τα αντισώματα έχουν την ιδιότητα να αντιδρούν επιλεκτικά, ως ένα βαθμό, με τους αναλύτες, ενώ όταν η προσρόφηση γίνεται απ' ευθείας στην επιφάνεια τότε λέγεται μη-επιλεκτική, διότι η επιφάνεια δεν έχει την ιδιότητα να ξεχωρίζει τους αναλύτες ή οποιαδήποτε άλλη βιομοριακή ουσία μπορεί να υπάρχει στο δείγμα. Λόγω της χρήσης δύο (2) αντισωμάτων για την ανίχνευση ενός αναλύτη, η τεχνική καλείται Sandwich ELISA.

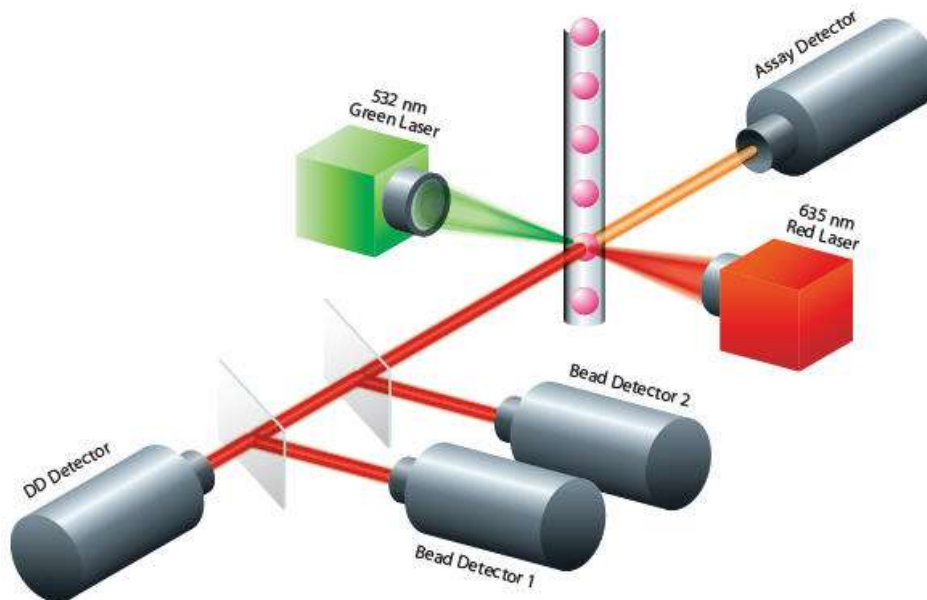


Εικόνα 6: ορολογία ELISA μικροσφαιριδίων

Η χρήση μεθόδων επιλεκτικής προσρόφησης ενδείκνυται για μια συστηματική ανάλυση, γιατί ο ερευνητής έχει τη δυνατότητα να κατευθύνει το πείραμα, χρησιμοποιώντας τις a priori γνώσεις του για το φαινόμενο, ώστε να μετρήσει μόνο τους αναλύτες που τον ενδιαφέρουν. Αντίθετα, η χρήση μη-επιλεκτικών μεθόδων συνίσταται για περιπτώσεις όπου δεν υπάρχει προγενέστερη γνώση του φαινομένου και θέλουμε να ξεκινήσουμε μια ανάλυση από το μηδέν, βασιζόμενοι μόνο στα δεδομένα μας.

Τα αντισώματα ανίχνευσης σημαίνονται με διαφορετικού χρώματος βαφή (πράσινη) από τα μικροσφαιρίδια (συνδυασμός ερυθρής και υπέρυθρης).

Για την μέτρηση, τα μικροσφαιρίδια αφήνονται να επωαστούν μαζί με το δείγμα και στη συνέχεια με τα αντισώματα ανίχνευση και κατόπιν αναγκάζονται να περάσουν μέσα από 2 συστήματα ανίχνευσης φωτεινότητας: ένα για την αναγνώριση της χρωματικής ταυτότητας του μικροσφαιριδίου, η οποία γίνεται μέσω της αναγνώρισης έντασης φωτεινότητας κάθε βαφής και του συνδυασμού τους, και ένα για την αναγνώριση της έντασης φωτεινότητας της βαφής των σημασμένων αντισωμάτων ανίχνευσης, η οποία θεωρείται ανάλογη του πλήθους τους (θεωρείται ότι κάθε αντίσωμα εκπέμπει στην ίδια ένταση)



Εικόνα 7: υπόδειγμα συστήματος ανίχνευσης

### Πλεονεκτήματα:

Τα βασικά πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι δύο (2):

1. Η δυνατότητα καθοδήγησης των μικροσφαιριδίων (είτε μαγνητικά είτε μηχανικά) και άρα αυτοματοποίησης της διαδικασίας
2. Η εξάλειψη των προβλημάτων της αντίδρασης υγρής-στερεάς φάσης

Αντίδραση υγρής-στερεάς φάσης παρατηρείται σε μια τυπική δοκιμή ELISA, καθώς οι αναλύτες που βρίσκονται σε υγρή φάση πρέπει να αντιδράσουν (έμμεσα ή άμεσα) με μια στερεή επιφάνεια. Στην αντίδραση υγρής-στερεάς φάσης υπάρχουν οι εξής περιορισμοί (αναλυτικότερα βλ. Αντίδραση Προσρόφησης):

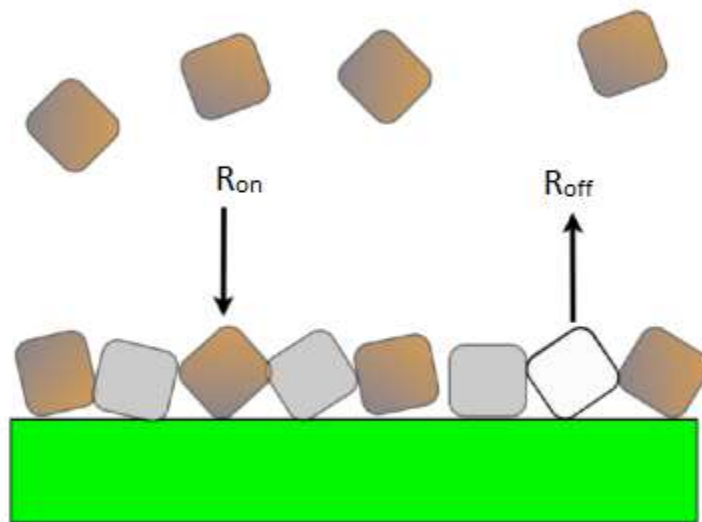
- Σε αντίθεση με τα μικροσφαιρίδια που κινούνται ελεύθερα στο δείγμα, η αντίδραση δε λαμβάνει χώρα σε όλο τον όγκο του δείγματος, αλλά σε μια περιορισμένη ζώνη κοντά στη στερεή επιφάνεια (ζώνη αντίδρασης). Συνεπώς, η μετρούμενη συγκέντρωση δεν ανταποκρίνεται σε όλο το δείγμα, αλλά στη συγκέντρωση της συγκεκριμένης ζώνης. Επιπλέον, ο ρυθμός εξέλιξης του φαινομένου δεν καθορίζεται αυστηρά από το ρυθμό της αντίδρασης, αλλά και από το ρυθμό προσέλευσης των αντιδρώντων στη ζώνη αντίδρασης.
- Παρατηρούνται στερικά φαινόμενα (steric effects), δηλαδή περιορισμοί λόγω του όγκου των αντιδρώντων και του κατάλληλου προσανατολισμού που πρέπει να έχουν μεταξύ τους (μείωση των βαθμών ελευθερίας στις κινήσεις των αντιδρώντων). Με την

χρήση μικροσφαιριδίων μπορούμε να αυξήσουμε την συνολική επιφάνεια κρατώντας τον λόγο επιφάνειας όγκου σταθερό και έτσι να περιορίσουμε σημαντικά αυτό το πρόβλημα.

Πέραν των βασικών θεωρητικών πλεονεκτημάτων, στην πράξη παρατηρούνται και τα εξής πλεονεκτήματα:

- Ευκολότερη πολυπλεξία, καθώς αρκεί να προστεθούν στο μίγμα μικροσφαιρίδια διαφορετικών χρωμάτων, ενώ στην επίπεδη επιφάνεια πρέπει να χωριστεί η επιφάνεια σε περιοχές μειώνοντας έτσι την συνολική επιφάνεια αντίδρασης.
- Μεγαλύτερη οικονομία σε χρόνο και χρήμα για τον ίδιο όγκο δεδομένων

### ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ



Εικόνα 8: προσρόφηση σε επιφάνεια

Η αντίδραση προσρόφησης αποτελεί μια αμφίδρομη βιοχημική αντίδραση κατά την οποία ελεύθερα αντισώματα και αντιγόνα αντιδρούν για να δημιουργήσουν ένα σύμπλεγμα με ρυθμό  $R_{on}$  (Rate-on), το οποίο αντίστοιχα διασπάται στα αρχικά αντισώματα και αντιγόνα με ρυθμό  $R_{off}$  (Rate-off).



## Εξίσωση του Langmuir

Η διαδικασία εξελίσσεται μέχρι να επέλθει δυναμική ισορροπία, όπου οι δύο (2) ρυθμοί εξισώνονται. Η κατάσταση ισορροπίας συνήθως μοντελοποιείται μέσω της **Εξίσωσης του Langmuir** (1916), η οποία βασίζεται στην αμφίδρομη αντίδραση που παρουσιάστηκε και συσχετίζει την προσρόφηση μορίων στην επιφάνεια με την συγκέντρωση τους σε ένα μέσο πάνω από αυτή για σταθερή θερμοκρασία (γι' αυτό και μερικές φορές χρησιμοποιείται ο όρος **Ισόθερμος του Langmuir**). Το μοντέλο του Langmuir στηρίζεται σε τέσσερις (4) υποθέσεις:

1. Η επιφάνεια προσρόφησης είναι ομοιόμορφη (όλες οι θέσεις προσρόφησης είναι ισοδύναμες)
2. Δεν υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων που έχουν προσροφηθεί.
3. Όλες οι αντιδράσεις γίνονται μέσω του ίδιου μηχανισμού.
4. Σε περίπτωση μέγιστης προσρόφησης σχηματίζεται ένα στρώμα «μοναδιαίου πάχους» (monolayer), δηλαδή δε γίνεται προσρόφηση πάνω από ήδη προσροφημένα μόρια.

Οι υποθέσεις αυτές σπάνια ικανοποιούνται ταυτόχρονα. Για παράδειγμα, λόγω των στερικών φαινομένων, η προσρόφηση ενός μορίου επιδρά στις γύρω θέσεις του και έτσι το πρώτο μόριο δεν προσροφάτε το ίδιο εύκολα με το τελευταίο. Παρόλα αυτά, το μοντέλο δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα και γι' αυτό τυγχάνει ευρείας αποδοχής.

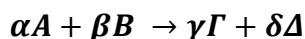
## Ταχύτητα των Αντιδράσεων

Γενικά ο **νόμος της ταχύτητας** μιας χημικής αντίδρασης δηλώνει:

**Η ταχύτητα μιας χημικής αντίδρασης είναι ανάλογη των ενεργών μαζών των αντιδρώντων σωμάτων**

Ως ενεργή ή δρώσα μάζα ορίζεται η γραμμομοριακή κατ' όγκο συγκέντρωση του αντιδρώντος, υψωμένη σε εκθέτη ίσο με τον συντελεστή που υπάρχει μπροστά από το αντιδρών. Όταν μια αντίδραση ακολουθεί τον παραπάνω κανόνα, χαρακτηρίζεται ως "απλή" ή "αντίδραση ενός μόνο σταδίου".

Έτσι, για μια απλή χημική αντίδραση:



η ταχύτητα (rate) θα υπολογίζεται από τη σχέση:

$$u = k[A]^\alpha[B]^\beta$$

όπου [A]= συγκέντρωση του A.

Η σταθερά αναλογίας **k** ονομάζεται σταθερά ταχύτητας της αντίδρασης (ή *ειδική ταχύτητα*) και εξαρτάται από την θερμοκρασία και τη φύση των αντιδρώντων. Εκφράζει την ταχύτητα της

αντίδρασης όταν κάθε μια από τις συγκεντρώσεις των αντιδρώντων είναι 1M. Οι μονάδες μέτρησης της εξαρτώνται από τις τιμές των  $\alpha$ ,  $\beta$ .

Η **τάξη της αντίδρασης  $\nu$**  ισούται με το άθροισμα των συντελεστών  $\alpha$ ,  $\beta$  ( $\nu = \alpha + \beta$ ).

Για την αμφίδρομη αντίδραση προσρόφησης θα ισχύει:

- **$R_{on}$** : Ο ρυθμός με τον οποίο προσροφώνται τα αντιγόνα στην επιφάνεια είναι ανάλογος της συγκέντρωσης τους στο διάλυμα και των ελεύθερων αντισωμάτων που υπάρχουν (αντίδραση 2<sup>ης</sup> τάξης). Δηλαδή:  $R_{on} = k_{on}(\Gamma_{max} - \Gamma)c^{bulk}$
- **$R_{off}$** : Ο ρυθμός με τον οποίο διασπάται το σύμπλεγμα είναι ανάλογος του αριθμού των συμπλεγμάτων (αντίδραση 1<sup>ης</sup> τάξης). Δηλαδή:  $R_{off} = k_{off} \cdot \Gamma$

Όπου:

- $\Gamma$  η επιφανειακή συγκέντρωση των αντιγόνων (συμπλεγμάτων)  
 $\Gamma =$  Αριθμός Συμπλεγμάτων / Συνολική Επιφάνεια (mol/Area) και
- $\Gamma_{max}$  η επιφανειακή συγκέντρωση των αντισωμάτων  
 $\Gamma_{max} =$  ο Συνολικός αριθμός θέσεων / Συνολική Επιφάνεια (mol/Area),
- $c^{bulk}$  η συγκέντρωση των αντιγόνων στο διάλυμα (M)
- το  $k_{on}$  ως συντελεστής αντίδρασης 2<sup>ης</sup> τάξης έχει μονάδες μέτρησης  $M^{-1} \cdot s^{-1}$  ενώ το  $k_{off}$  ως 1<sup>ης</sup> τάξης  $s^{-1}$

### Κατάσταση Ισορροπίας

Μετά από κάποιο χρονικό διάστημα η αύξηση του  $\Gamma$  θα οδηγήσει σε εξισορρόπηση των 2 ρυθμών και τελικώς σε δυναμική ισορροπία για την οποία θα ισχύει:

$$R_{on} = R_{off}$$

$$k_{on}(\Gamma_{max} - \Gamma)c^{bulk} = k_{off} \cdot \Gamma$$

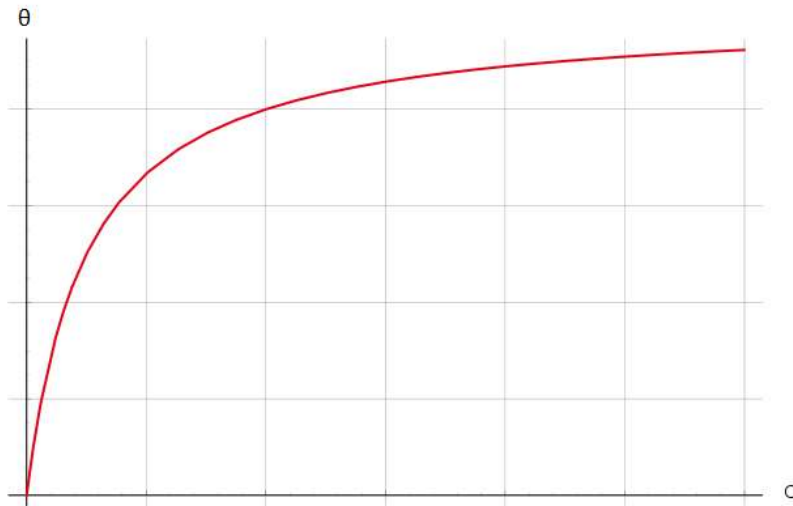
$$K = \frac{k_{on}}{k_{off}} = \frac{\Gamma}{(\Gamma_{max} - \Gamma)c^{bulk}} = \frac{\theta}{(1 - \theta)c^{bulk}}$$

Όπου:  $\theta$  είναι το ποσοστό κάλυψης της επιφάνειας  $\theta = \Gamma / \Gamma_{max}$ ,

Η τελευταία εξίσωση είναι η εξίσωση του Langmuir και συνδέει την συγκέντρωση στην επιφάνεια με τη συγκέντρωση στο διάλυμα. Λύνοντας ως προς  $\theta$  προκύπτει η Συγκέντρωση Ισορροπίας:



$$\theta_{eq} = \frac{Kc^{bulk}}{1 + Kc^{bulk}}$$



Εικόνα 9: καμπύλη ποσοστού κάλυψης - συγκέντρωσης επιφανείας

Οπότε, τελικώς, από τη μέτρηση της επιφανειακής συγκέντρωσης σε κατάσταση ισορροπίας μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση του διαλύματος, θεωρώντας ότι η προσρόφηση δεν την επηρεάζει σημαντικά (μη-παρεμβατική μέτρηση).

Η **σταθερά K** ονομάζεται σταθερά ισορροπίας (ή σταθερά της αντίδρασης) και αντιστοιχεί στην αναλογία που πρέπει να έχει η συγκέντρωση της επιφάνειας με αυτή του διαλύματος, ώστε η αμφίδρομη αντίδραση να μην «κλίνει» προς κάποια από τις 2 πλευρές και να επέλθει η ισορροπία. Η αναλογία αυτή εξαρτάται από το είδος της αντίδρασης (τα  $k$ ) και τις συνθήκες του περιβάλλοντος (θερμοκρασία, πίεση, PH). Δε συνδέεται με κάποιο από τα αντιδρώντα, καθώς αποτελεί χαρακτηριστική τιμή της αντίδρασης και καθορίζει την κατάσταση ισορροπίας για σταθερό  $c^{bulk}$ . Οι μονάδες της, στην προκειμένη περίπτωση, είναι  $M^{-1}$ .

### Κινηματική της Αντίδρασης

Η χρονική εξέλιξη του φαινομένου καθορίζεται και αυτή με τη σειρά της από τις ταχύτητες των δύο (2) αντιδράσεων. Συγκεκριμένα, ο ρυθμός δημιουργίας συμπλεγμάτων προκύπτει ως η διαφορά του ρυθμού προσρόφησης και του ρυθμού διάσπασης:

$$\frac{d\theta}{dt} = k_{on}c^{bulk}(1 - \theta) - k_{off}\theta$$

Για κατάσταση ισορροπίας  $\frac{d\theta}{dt} = 0$ , το  $\theta_{eq}$  προκύπτει ίδιο με πριν.

Λύνοντας τη διαφορική εξίσωση, θεωρώντας ότι όλα τα μεγέθη, εκτός του  $\theta$ , είναι ανεξάρτητα του χρόνου, δηλαδή οι συνθήκες περιβάλλοντος παραμένουν αμετάβλητες, προκύπτει η συνάρτηση  $\theta(t)$ .

$$\theta = \frac{k_{on}c^{bulk}}{k_{on}c^{bulk} + k_{off}} [1 - \exp[-(k_{on}c^{bulk} + k_{off})t]]$$

Η οποία μπορεί να γραφεί πιο σύντομα αν αντικατασταθεί το αρχικό κλάσμα με  $\theta_{eq}$  καθώς:

$$\frac{k_{on}c^{bulk}}{k_{on}c^{bulk} + k_{off}} = \frac{Kc^{bulk}}{1 + Kc^{bulk}} = \theta_{eq}$$

και εισάγοντας την χρονική σταθερά

$$\tau = \frac{1}{k_{on}c^{bulk} + k_{off}} \text{ (έχει μονάδες χρόνου)}$$

$$\text{Άρα τελικά: } \theta = \theta_{eq} [1 - \exp(-t/\tau)]$$

### Παρατηρήσεις:

- Η αντίδραση προσρόφησης δεν έχει άπειρη εμβέλεια, αλλά λαμβάνει χώρο κάτω από μία συγκεκριμένη απόσταση από την επιφάνεια προσρόφησης, η οποία καλείται ζώνη αντίδρασης.
- Ως αποτέλεσμα, ο ρυθμός της αντίδρασης δεν εξαρτάται μόνο από τη σταθερά  $K$ , αλλά και από το ρυθμό με τον οποίο τα αντιδρώντα προσέρχονται σε αυτή τη ζώνη, εφόσον αναμένεται να παρατηρηθεί εξάντληση των αντιδρώντων σε αυτή τη ζώνη.
- Άρα, στην ουσία, η μέτρηση αποτελεί συνδυασμό δύο (2) φαινομένων: της βιοχημικής προσρόφησης και της μεταφοράς μάζας, το πιο αργό εκ των οποίων καθορίζει τον ρυθμό εξέλιξης της.
- Αυτό συμβαίνει, διότι το πιο γρήγορο φαινόμενο θα πρέπει να περιμένει μέχρις ότου το πιο αργό ολοκληρώσει το δικό του μέρος στη διαδικασία για να εκκινήσει. Αν, για παράδειγμα, η μεταφορά μάζας είναι αργή σε σχέση με την προσρόφηση, η προσρόφηση θα πρέπει να «περιμένει» μέχρι τα φαινόμενα μεταφοράς φέρουν τα αντίγona εντός της ζώνης αντίδρασης για να γίνει η αντίδραση. Το αντίθετο συμβαίνει αν η προσρόφηση είναι αργή σε σχέση με τη μεταφορά μάζας.

### ΕΡΕΥΝΑ ΜΕΧΡΙ ΤΩΡΑ

Από βιολογικής απόψεως, η βάση της τεχνικής ELISA, από την αρχή που αναπτύχθηκε μέχρι σήμερα, είναι η αντίδραση του αντισώματος με το αντιγόνο. Η αντίδραση αντισώματος-αντιγόνου θεωρείται από τις ισχυρότερες και πιο εξειδικευμένες βιολογικές αντιδράσεις,

χαρακτηριστικά που εξασφαλίζουν την απαραίτητη ευαισθησία στις μεταβολές της συγκέντρωσης και στον αριθμό των σφαλμάτων. Ως εκ τούτου, το μεγαλύτερο μέρος της προσπάθειας για βελτιστοποίηση της τεχνικής στρέφεται γύρω από την ανάπτυξη καλύτερων αντισωμάτων, καθώς μόνο υψηλής ποιότητας αντισώματα είναι κατάλληλα.

Παρόλα αυτά, η ποιότητα των αντισωμάτων εξακολουθεί να αποτελεί τον μεγαλύτερο περιορισμό που πρέπει κάποιος να λάβει υπόψη κατά την σχεδίαση ενός πειράματος, ειδικά αν πρόκειται για sandwich ELISA, το οποίο απαιτεί δύο (2) διαφορετικά αντισώματα για την μέτρηση ενός αναλύτη. Είναι χαρακτηριστικό, εξάλλου, ότι σχεδόν όλες οι μελέτες που βασίζονται σε μέτρηση τύπου Sandwich έχουν ως αντικείμενο τις κυτταροκίνες. Για την μέτρηση κυτταροκινών έχουν αναπτυχθεί, λόγω των παραδοσιακών πακέτων ELISA, πολλά ζεύγη εξειδικευμένων αντισωμάτων και επιπλέον, επειδή οι κυτταροκίνες είναι πρωτεΐνες που εκκρίνονται από το κύτταρο, το περιβάλλον τους είναι σχετικώς πιο «καθαρό» από το περιβάλλον άλλων πρωτεϊνών. Για παράδειγμα οι P. Sorger και G. MacBeath του Harvard είχαν υπολογίσει ότι μόλις το 5% από τα διαθέσιμα πακέτα αντισωμάτων (του 2004) είναι κατάλληλα για μέτρηση ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών.

Τα αντισώματα, που συνήθως προέρχονται από ποντίκια, είναι δύο ειδών:

- **μονοκλωνικά**, αυτά δηλαδή που προκύπτουν από ίδια λεμφοκύτταρα (κλώνοι του ίδιου μητρικού κυττάρου) και
- **πολυκλωνικά**, αυτά δηλαδή που προκύπτουν από διαφορετικά λεμφοκύτταρα (που υπάρχουν σε έναν οργανισμό).

Γενικά οι δεσμοί των πολυκλωνικών αντισωμάτων παρουσιάζουν μεγαλύτερη ισχύ, ενώ των μονοκλωνικών μεγαλύτερη εξειδίκευση, γι' αυτό και προτιμώνται για πολυπλεκτικές μετρήσεις.

Πέραν της ανάπτυξης καλύτερων αντισωμάτων, η οποία γίνεται με διαλογή κατόπιν πολλαπλών δοκιμών, συνήθεις τακτικές για τον περιορισμό του θορύβου των μετρήσεων αφορούν την καλύτερη σχεδίαση της διαδικασίας. Σχεδόν το σύνολο αυτών των αναλύσεων βασίζεται σε εμπειρικές-πειραματικές παρατηρήσεις και στοχεύει στην βελτιστοποίηση ενός εκ των παρακάτω παραγόντων:

- **Αριθμός Πλύσεων:** πρέπει να είναι τέτοιος, ώστε να εξασφαλίζει την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων (πλέον) ουσιών που μπορεί να συμμετέχουν σε «δευτερεύοντα» φαινόμενα. Από την άλλη πλευρά, η αύξηση του αριθμού των πλύσεων καθιστά την μέτρηση πιο απαιτητική και χρονοβόρα και επιπλέον, όπως σχεδόν όλοι οι παράγοντες που εξετάζονται, έχει επίπτωση και στο κόστος καθώς οδηγεί σε μεγαλύτερη κατανάλωση αναλώσιμων.

- **Χρόνοι Επώασης:** ο χρόνος επώασης πρέπει να είναι αρκετός, ώστε να προλαβαίνει να αναπτυχθεί το κύριο φαινόμενο. Από την άλλη, παρατεταμένοι χρόνοι επώασης, εκτός του ότι καθυστερούν την όλη διαδικασία, δίνουν χρόνο και σε περισσότερα δευτερεύοντα φαινόμενα να αναπτυχθούν
- **Συγκέντρωση Αντισωμάτων:** η συγκέντρωση των αντισωμάτων έχει επίδραση τόσο στο πρωτεύον φαινόμενο όσο και στα δευτερεύοντα φαινόμενα. Χρησιμοποιείται για να εναρμονίσει (tune) τις πραγματικές συγκεντρώσεις με τις μετρούμενες<sup>4</sup>.
- **Παράγοντες Παρεμπόδισης:** η χρήση παρεμποδιστικών παραγόντων (blocking agents), όπως το ξηρό γάλα<sup>5</sup>, έχει στόχο την προσρόφηση τους από το υπόβαθρο της μετρητικής διάταξης, ώστε να παρεμποδιστεί η αντίδραση των αναλυτών ή αντισωμάτων με αυτό
- **Άλλοι παράγοντες:** θεωρητικά κάθε βήμα της διαδικασίας έχει επίδραση στην τελική μέτρηση. Οι υπόλοιποι, όμως, παράγοντες θεωρούνται (ιστορικά) ήσσονος σημασίας σε σχέση με τους προηγούμενους. Επιγραμματικά, μερικοί από αυτούς είναι θερμοκρασία δείγματος, PH, συγκέντρωση της φθορίζουσας ουσίας κ.ά.

Όλοι πάντως οι παράγοντες αυτοί επηρεάζονται άμεσα (όπως ο χρόνος επώασης) ή έμμεσα (όπως ο αριθμός των πλύσεων) από την ποιότητα των αντισωμάτων.

Οι ανάγκες για πολυπλεξία μέχρι πρόσφατα δεν ήταν πολύ μεγάλες. Οι περισσότερες μελέτες που έχουν γίνει αναφέρονται σε απλές μετρήσεις ή μετρήσεις λίγων αναλυτών. Η διαχείριση, όμως, του θορύβου στα πολυπλεκτικά πειράματα είναι πολύ δυσχερέστερη των απλών πειραμάτων λόγω της αύξησης της πολυπλοκότητας. Ο σημαντικότερος παράγοντας που επηρεάζει τη σχεδίαση μιας πολυπλεκτικής δοκιμής, όσο ο αριθμός των αναλυτών που μετρώνται ταυτόχρονα μεγαλώνει, είναι ο θόρυβος λόγω «διασταυρούμενων αντιδράσεων»<sup>6</sup>, για τον οποίο η σχετική έρευνα είναι πολύ περιορισμένη.

Ήδη, πάντως, όσοι ερευνητές ασχολούνται με πολυπλεκτικά πειράματα έχουν αναγνωρίσει την σημασία του και έχουν εκφράσει φόβους ότι θα θέσει ένα όριο στο πόσοι αναλύτες μπορούν να μετρηθούν ταυτόχρονα σε ένα δείγμα. Ο αριθμός των παράλληλων μετρήσεων που μπορεί να πραγματοποιηθεί αυτή τη στιγμή με ανεκτά επίπεδα θορύβου είναι περίπου 30, ενώ μια εκτίμηση για το πιθανό όριο είναι οι 50 αναλύτες<sup>7</sup>. Ενδεικτικά αναφέρουμε ότι το μεγαλύτερο πείραμα που έχει δημοσιευθεί και γνωρίζουμε έχει πραγματοποιηθεί από τους Schweitzer et

<sup>4</sup> βλέπε παρακάτω «Καμπύλες Βαθμονόμησης»

<sup>5</sup> Για περισσότερα βλέπε «Quantitative differences among various proteins as blocking agents for ELISA microtiter plates» από Robert V. Vogt Jr et al.

<sup>6</sup> Βλ. Παρακάτω «Πηγές Βιολογικού Θορύβου»

<sup>7</sup> Βλ. (Review 2004) «Multiplexed sandwich assays in microarray format» από Nielsen & Geierstanger

al. (2002)<sup>8</sup>, οι οποίοι μέτρησαν 75 συνολικά αναλύτες. Για την μέτρηση χρησιμοποιήθηκαν χημικώς επεξεργασμένες γυάλινες διαφάνειες υψηλής χωρικής ανάλυσης και τεχνικές ενίσχυσης σήματος (Rolling-Circle Amplification). Παρόλα αυτά, και αυτοί αντιμετώπισαν προβλήματα διασταυρούμενων αντιδράσεων και αναγκάστηκαν να σπάσουν την μέτρηση σε 2 ταυτόχρονες μετρήσεις.

Για την συστημική ανάλυση των βιολογικών συστημάτων, οι πολυπλεκτικές μετρήσεις αποτελούν αναντικατάστατο εργαλείο, οπότε είναι βέβαιο ότι τα προβλήματα που σχετίζονται με αυτές δεν θα μπορούν να παραβλεφθούν για πολύ ακόμα. Ήδη μερικοί ερευνητές έχουν προσπαθήσει να προσεγγίσουν το θέμα. Δύο από τις πιο σημαντικές μελέτες πάνω στο θέμα είναι αυτές των J.M. Schwenk et al. (2007) «Determination of Binding Specificities in Highly Multiplexed Bead-based Assays for Antibody Proteomics» και O.Poetz et al. «Protein microarrays for antibody profiling: Specificity and affinity determination on a chip». Και οι δύο μελέτες εστιάζουν στην μαζική αξιολόγηση αντισωμάτων ως προς 2 παράγοντες: την ικανότητα τους να αναγνωρίζουν αποκλειστικά την πρωτεΐνη στόχο τους (specificity) και την ισχύ με την οποία αντιδρούν με αυτή (affinity).

---

<sup>8</sup> «Multiplexed protein profiling on microarrays by rolling-circle amplification»

# ΑΝΑΛΥΣΗ

## ΠΗΓΕΣ ΘΟΡΥΒΟΥ

**Θόρυβος στα πειράματα ELISA εννοείται κυρίως τα σφάλματα τύπου I.**

**Σφάλμα τύπου I** αντιστοιχεί σε εσφαλμένη απόρριψη της βασικής υπόθεσης (ότι δεν έχουμε σήμα), δηλαδή το πείραμα μετράει κάποιο σήμα, ενώ στην πραγματικότητα δεν υπάρχει σήμα (false positive). Σφάλματα τέτοιου είδους μπορεί να οφείλονται σε τεχνικούς ή βιολογικούς λόγους<sup>9</sup>.

Τεχνικοί λόγοι μπορεί να είναι οι διάφορες ατέλειες του μηχανήματος ή οι δυσκολίες στην υλοποίηση του πειραματικού πρωτοκόλλου, ενώ ως βιολογικοί λόγοι εννοούνται οι διάφορες παράπλευρες αντιδράσεις που λαμβάνουν μέρος κατά τη διάρκεια του πειράματος και δίνουν σήμα το οποίο δεν αντιστοιχεί στην κύρια αντίδραση, οπότε από τεχνικής απόψεως ορθώς μετριέται σήμα, αλλά η μέτρηση ερμηνεύεται λανθασμένα ως κύρια.

Ο τεχνικός θόρυβος εκφράζεται μέσω της μεταβλητότητας (variability) που θα εμφανιστεί αν μετρηθεί το ίδιο δείγμα πολλές φορές, καθώς δεδομένου ότι το δείγμα μένει αμετάβλητο (η μέτρηση θεωρείται μη-παρεμβατική) δεν υπάρχει βιολογικός θόρυβος (θεωρείται σταθερός) και επομένως όλες οι μεταβολές του σήματος μπορούν να αποδοθούν σε τεχνικούς λόγους. Αντίστοιχα, ο βιολογικός θόρυβος εμφανίζεται όταν μετρηθούν με την ίδια, κατά το δυνατόν, διαδικασία δείγματα από διαφορετικούς δότες.

**Σφάλματα τύπου II**, αντιστοιχούν σε εσφαλμένη αποδοχή της βασικής υπόθεσης, ενώ υπάρχει σήμα (false negative) εμφανίζεται κυρίως σε περιπτώσεις που μετράμε πολλά σήματα σε ένα δείγμα ως συνέπεια μεγάλου θορύβου τύπου I. Σε αυτή την περίπτωση, ο θόρυβος υποβάθρου είναι τόσο μεγάλος που μας οδηγεί εσφαλμένα στο να θεωρήσουμε μερικά χαμηλά σήματα σαν θόρυβο.

Εναλλακτικά μπορούμε να πούμε ότι τα σφάλματα τύπου II δυσχεραίνουν κατά βάση την ποσοτικοποίηση ενός σήματος, ενώ τα σφάλματα τύπου I την αναγνώριση.

### **Παρατηρήσεις:**

Ο βιολογικός θόρυβος είναι σημαντικά μεγαλύτερος από τον τεχνικό και πιο ιδιόμορφος (δεν ακολουθεί πάντα την κανονική κατανομή)

---

<sup>9</sup> Συνήθως τα είδη θορύβου θεωρούνται 3, ο βιολογικός, ο τεχνικός και ο θόρυβος του μηχανήματος. Επειδή αντικείμενο αυτής της μελέτης αποτελεί κυρίως ο βιολογικός θόρυβος οι άλλοι 2 ομαδοποιήθηκαν και δεν θα μας απασχολήσουν ιδιαίτερα

Είναι γενικά δύσκολο να εξαληφθεί πλήρως ένα είδος θορύβου για να «μετρηθεί» ένα άλλο, οπότε η μέτρηση βασίζεται στη παραδοχή ότι, υπό τις συνθήκες που περιγράφησαν, το μετρούμενο είδος είναι σημαντικά μεγαλύτερο. Παραδοχή που για την μέτρηση του τεχνικού θορύβου απαιτεί όσο δυνατόν μεγαλύτερη ομοιογένεια του δείγματος, ενώ για τον βιολογικό θόρυβο απαιτεί την ταυτόχρονη και κατά το δυνατόν ίδια επεξεργασία και μέτρηση των δειγμάτων.

Η δυσκολία στον εντοπισμό του βιολογικού θορύβου έγκειται στο πώς θα μπορέσουμε να τον ξεχωρίσουμε από το σήμα, δηλαδή κατά πόσο είναι βιολογικώς επιτρεπτό να θεωρήσουμε δύο (2) διαφορετικούς δότες ίδιους και να ψάξουμε για στατιστικές διαφορές. Η δυσκολία αυτή συνήθως παρακάμπτεται με την καλλιέργεια κυττάρων, οπότε από βιολογικής άποψης δεν υπάρχει κάποια δυνατότητα για περαιτέρω ομοιότητα δύο (2) δειγμάτων, αφού ουσιαστικά πρόκειται για κλώνους των ίδιων μητρικών κυττάρων.

## ΠΗΓΕΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΘΟΡΥΒΟΥ

Ο βιολογικός θόρυβος οφείλεται σε:

1. **τυχαία γεγονότα με βιολογικές συνέπειες.** Σε αυτή την περίπτωση θα πρέπει να έχει την τυπική μορφή, δηλαδή μια κανονική κατανομή γύρω από το μηδέν. Με τον περιορισμό ότι ο αρνητικός θόρυβος περιορίζεται, καθώς η τιμή του σήματος πλησιάζει στο μηδέν, διότι η μέτρηση δεν μπορεί να επιστρέψει αρνητικές τιμές φωτεινότητας (επομένως στο μηδέν θα υπάρχει μόνο θετικός θόρυβος -ροζ θόρυβος-). Τέτοια τυχαία γεγονότα μπορεί να είναι και χαλαρές βιοχημικές αντιδράσεις ή στερικά φαινόμενα, όπως, για παράδειγμα, κακώς προσανατολισμός των αντισωμάτων κατά την επικόλληση τους στην επιφάνεια.
2. **σε (σχετικά) ισχυρές παράπλευρες βιοχημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα παράλληλα στην κύρια (μετρούμενη) αντίδραση**

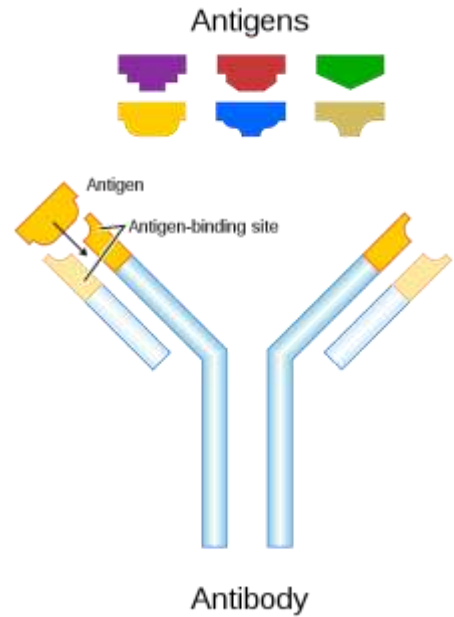
Για να γίνει κατανοητό τι σημαίνει **παράπλευρη αντίδραση** πρέπει να έχουμε υπόψη το πώς γίνεται η αντίδραση μεταξύ ενός αντισώματος και ενός αντιγόνου.

### Αντίδραση Αντισώματος-Αντιγόνου

Ως αντιγόνο ορίζεται κάθε ουσία (μόριο) που μπορεί να προκαλέσει ειδική ανοσιακή απάντηση ή και να αντιδρά με τα προϊόντα αυτής (αντισώματα, ευαισθητοποιημένα T-λεμφοκύτταρα). Όλες σχεδόν οι πρωτεΐνες είναι ανοσογόνα (και άρα αντιγόνα), με αποτέλεσμα να διεγείρεται συχνότερα η ανοσιακή απάντηση έναντι των πρωτεϊνών.

Λόγω της δομής των πρωτεϊνών και των αντισωμάτων ένα αντισωμα μπορεί να αντιδράει με περισσότερες από μια πρωτεΐνες. Η βασική αρχή βάση της οποίας ένα αντισωμα αντιδράει με ένα αντιγόνο είναι η ακόλουθη:

Στην άκρη του αντισώματος υπάρχει μία περιοχή (σειρά από 5-7 περίπου αμινοξέα), ο παράτοπος (paratope), ο οποίος έχει την ιδιότητα να αναγνωρίζει μια αντίστοιχη συμπληρωματική περιοχή πάνω στη πρωτεΐνη, τον επίτοπο ή αντιγονικό καθοριστή (epitope or antigenic determinant). **Δυνητικά, κάθε περιοχή της επιφάνειας ενός αντιγόνου μπορεί να λειτουργήσει ως επίτοπος και, κατά συνέπεια, κάθε αντιγόνο περιέχει μεγάλο αριθμό επιτόπων οι οποίοι μπορεί να αναγνωρίζονται από διάφορους παράτοπους αντισωμάτων.**



Εικόνα 10: Αντίσωμα-Αντιγόνα (σηματικά)

Τα αμινοξέα που σχηματίζουν τον επίτοπο δεν χρειάζεται να είναι συνεχή στην πολυπεπτιδική αλυσίδα. Διακρίνονται δύο είδη επιτόπων:

1. Ο *διαμορφωτικός ή ασυνεχής (conformational or discontinuous epitope)* επίτοπος αποτελείται από αλληλουχία αμινοξέων που έχουν *ασυνεχή διάταξη* στην πολυπεπτιδική αλυσίδα, όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται σε πρωτοταγή δομή. Αυτή η ασυνεχής διάταξη γίνεται συνεχής όταν η πρωτεΐνη αποκτά την τρισδιάστατη δομή της.
2. Ο *συνεχής ή γραμμικός (continuous or linear epitope)* επίτοπος αποτελείται από αλληλουχία αμινοξέων που βρίσκονται σε *συνεχή διάταξη* στην πολυπεπτιδική αλυσίδα



Εικόνα 11: επίτοποι στην πολυπεπτιδική αλυσίδα



Γενικά, τα μονοκλωνικά αντισώματα αναγνωρίζουν τον ίδιο επίτοπο, ενώ τα πολυκλωνικά διαφορετικούς. Όπως γίνεται αντιληπτό αντίδραση ενός αντισώματος με ένα αντιγόνο δεν γίνεται «αυστηρώς» επιλεκτικά. Υπάρχουν πολλές αντιδράσεις στις οποίες μπορεί να συμμετέχει ένα αντίσωμα. Ο «θόρυβος» προκύπτει ως έννοια από τη στιγμή που η αντίδραση με το μεγαλύτερο ρυθμό οριστεί «αυθαίρετα» ως επιθυμητή και οι άλλες ως ανεπιθύμητες.

### **Διαφοροποίηση των 2 Πηγών**

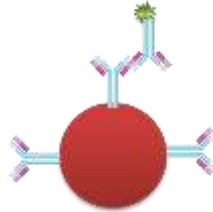
Το πρώτο είδος θορύβου (τυχαίος) οφείλεται, λοιπόν, στην αβεβαιότητα που προκύπτει από κάθε μέτρηση και μπορούμε να το αντιμετωπίσουμε μόνο με καλύτερο έλεγχο της πειραματικής διαδικασίας ή με στατιστικό τρόπο.

Το δεύτερο είδος όμως (παράπλευρες αντιδράσεις), είναι σημαντικά διαφορετικό από το πρώτο γιατί:

- προκύπτει λόγω αναγνώρισης ενός εκ των επιτόπων της πρωτεΐνης στόχου ή ενός αντισώματος από διαφορετικό αντίσωμα λόγω αντιστοιχίας με κάποιο παράτοπο
- **αντιστοιχεί, ως εκ τούτου, σε υπαρκτό πλην ανεπιθύμητο σήμα και άρα έχει τάξη μεγέθους και μορφή ανάλογης του σήματος που θέλουμε να μετρήσουμε και, κατά συνέπεια, είναι αδύνατο να διαχωριστεί από αυτό με στατιστικούς τρόπους (γιατί ακριβώς δεν είναι τυχαίο)**
- «ανταγωνίζεται», υπό περιπτώσεων, το υπαρκτό σήμα και άρα όχι μόνο οδηγεί σε σφάλμα τύπου I, αλλά και δυσκολεύει σημαντικά την ποσοτικοποίηση του μεγέθους (σφάλμα τύπου II)
- ακόμα και σε ένα τέλεια ελεγχόμενο πειραματικό περιβάλλον αυτός ο θόρυβος θα υπήρχε γιατί συνδέεται με το πείραμα καθ' εαυτό.

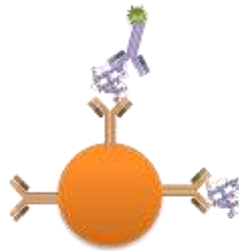
Τα ίδια τα αντισώματα μπορούν να λειτουργήσουν ως αντιγόνα, δηλαδή και αυτά έχουν περιοχές από αμινοξέα που μπορούν να αναγνωριστούν από άλλα αντισώματα. Βάσει αυτής της παρατήρησης, αυτό το είδος θορύβου μπορεί να αναλυθεί σε:

- **Θόρυβο Υποβάθρου** (Background Noise): ο οποίος είναι ο θόρυβος που προκύπτει όταν ένα αντίσωμα ανίχνευσης συνδεθεί με μια περιοχή ενός πρωτεύοντος αντισώματος (τα πρωτεύοντα αντισώματα αποτελούν μαζί με το μικροσφαιρίδιο το υπόβαθρο στην προκειμένη περίπτωση)



Εικόνα 12: αντίδραση υποβάθρου

- **Θόρυβος Διασταυρούμενων Αντιδράσεων** (CrossReactivity Noise): ο οποίος οφείλεται στην αναγνώριση μιας πρωτεΐνης στόχου από κάποιο άλλο σετ αντισωμάτων (ετερόλογο) εκτός του προβλεπόμενου (ομόλογο)



Εικόνα 13: διασταυρούμενη αντίδραση

## ΜΕΤΡΗΣΗ ΘΟΡΥΒΟΥ ΣΕ ΠΟΛΥΠΛΕΚΤΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ

### Αρχή Λειτουργίας xMap

**Το πρώτο βήμα για ελαχιστοποίηση του θορύβου είναι η αναγνώριση του.**

Για να μετρηθεί ο θόρυβος πρέπει να σχεδιαστούν κατάλληλα πειράματα, ώστε κάθε φορά να ξέρουμε ποια μέτρηση αντιστοιχεί σε θόρυβο και ποια μέτρηση αντιστοιχεί σε πραγματικό σήμα.

Σε ένα «κανονικό» πείραμα κάτι τέτοιο δεν είναι εφικτό λόγω της αδυναμίας διαχωρισμού του σετ αντισωμάτων που αντιδρούν με κάθε αντιγόνο στην κάθε μέτρηση<sup>10</sup>. Συγκεκριμένα το

<sup>10</sup> αν υπήρχε τρόπος τότε η μέτρηση θα ήταν ανούσια, θα ακούσε απλώς η αναγνώριση των αντιγόνων

μηχάνημα xMap της Luminox (με το οποίο πραγματοποιούνται οι μετρήσεις στο εργαστήριο) έχει δύο (2) συστήματα ανίχνευσης φωτεινότητας και επιστρέφει δύο (2) τιμές:

1. μία που αντιστοιχεί στο χρώμα του μικροσφαιριδίου, και άρα μπορούμε να την αντιστοιχίσουμε στο πρωτεύον αντίσωμα, διότι για τη διαδικασία επικάλυψης των μικροσφαιριδίων προβλέπεται η επώαση τους με μόνο ένα είδος αντισώματος, οπότε δεν θα μπορούσε να έχει επικαθίσει κάτι άλλο στην επιφάνεια τους, και
2. μια που αντιστοιχεί στην ένταση φωτεινότητας την οποία αντιστοιχίζουμε στον αριθμό των δευτερευόντων αντισωμάτων. Τα δευτερεύοντα αντισώματα, όμως, εκπέμπουν όλα το ίδιο χρώμα και άρα δεν έχουμε τρόπο να τα ξεχωρίσουμε μεταξύ τους, παρά μόνο βασιζόμενοι στην υπόθεση ότι έγινε η σωστή αντίδραση<sup>11</sup>.

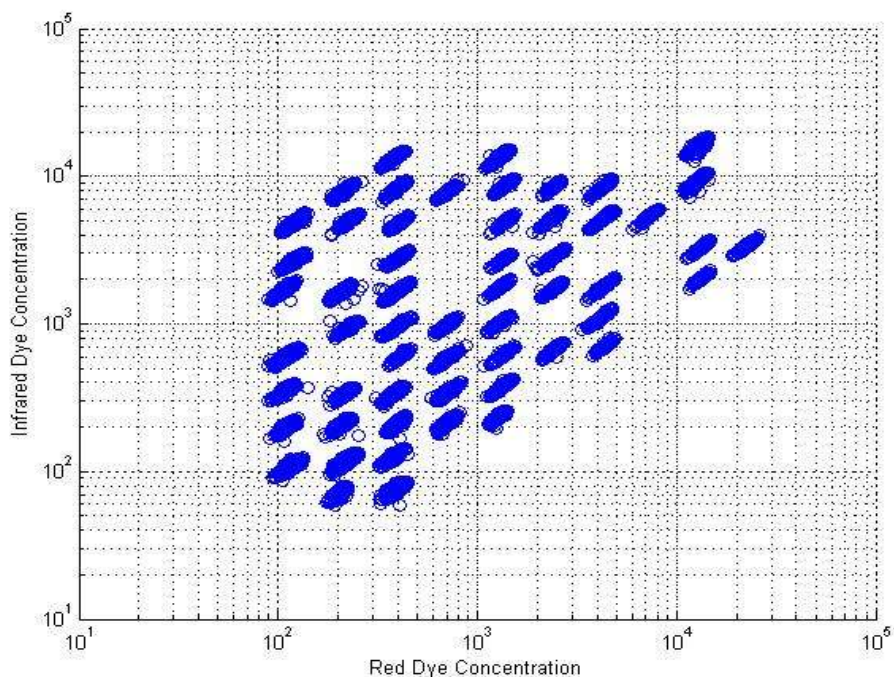
### ***Χρωματική Ταυτότητα Μικροσφαιριδίων***

Η αναγνώριση του χρώματος ενός μικροσφαιριδίου γίνεται μέσω της διέγερσης της βαφής του. Κάθε μικροσφαιρίδιο βάφεται με ένα συγκεκριμένο συνδυασμό συγκεντρώσεων ερυθρής και υπέρυθρης βαφής. Το πρώτο σύστημα ανίχνευσης φωτεινότητας αναγνωρίζει την ένταση φωτεινότητας αυτών των δύο (2) βαφών και τις «χαρτογραφεί» στο χώρο των διαφόρων συνδυασμών. Ο χώρος αυτός χωρίζεται σε ορισμένες περιοχές (γεωμετρικούς τύπους). Κάθε περιοχή διακρίνεται από τις υπόλοιπες μέσω ενός αριθμού-ταυτότητα (περιοχή #1, περιοχή #2 κλπ), ο οποίος χαρακτηρίζει-ονοματίζει και κάθε μικροσφαιρίδιο που ανήκει στην περιοχή αυτή. Έτσι τελικά κάθε μικροσφαιρίδιο που ανήκει στην περιοχή #1 χαρακτηρίζεται ως μικροσφαιρίδιο #1.

**Παρατήρηση:** στην παρούσα εργασία συχνά χρησιμοποιούμε φυσικούς αριθμούς για να ονοματίσουμε οντότητες (μικροσφαιρίδια και περιοχές εν προκειμένω), όταν ένας αριθμός **X** χρησιμοποιείται σαν όνομα θα γράφεται στην μορφή **#X**, όπου το σύμβολο # δηλώνει ότι ο αριθμός X είναι απλά όνομα και διαβάζεται «με αριθμό». Για παράδειγμα η «περιοχή #1» διαβάζεται «περιοχή με αριθμό 1».

---

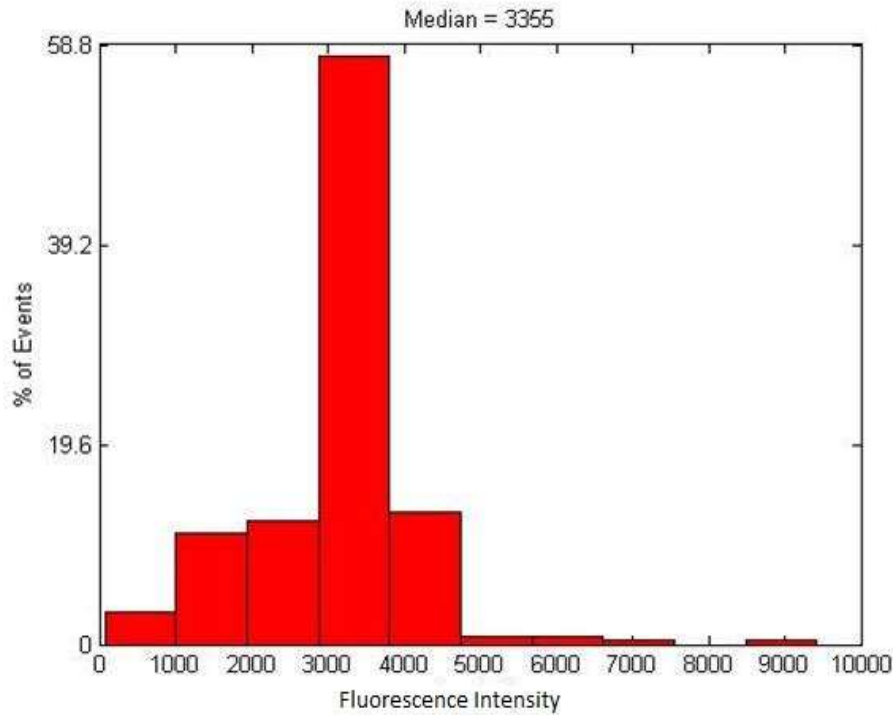
<sup>11</sup> υπόθεση η άρνηση της οποίας αποτελεί το λόγο ύπαρξης της παρούσας εργασίας!



Εικόνα 14: χάρτης χρωματικών ταυτοτήτων

### **Ένταση Φωτεινότητας**

Η ένταση φωτεινότητας αναφέρεται στο σύνολο των μικροσφαιριδίων μιας ομάδας (πχ σε όλα τα μικροσφαιρίδια #1). Τα μικροσφαιρίδια περνάνε από ένα δεύτερο σύστημα ανίχνευσης στο οποίο «διαβάζεται» η ένταση φωτεινότητας της βαφής των αντισωμάτων ανίχνευσης, τα οποία έχουν χρωματιστεί όλα με τον ίδιο τρόπο. Η τελική ένταση φωτεινότητας για κάθε ομάδα μικροσφαιριδίων που δίνει η μέτρηση είναι η διάμεσος τιμή από σύνολο τουλάχιστον N μικροσφαιριδίων της ίδια ομάδας, όπου το N καθορίζεται από τον χρήστη. Που σημαίνει ότι σε περίπτωση που ο χρήστης επιλέξει N=100, το μηχάνημα θα ανιχνεύει μικροσφαιρίδια μέχρι όλες οι ομάδες μικροσφαιριδίων που έχουν δηλωθεί να έχουν μετρημένα τουλάχιστον 100 μικροσφαιρίδια και στη συνέχεια θα επιστρέψει τη Διάμεση Ένταση Φωτεινότητα (Median Fluorescent Intensity-MFI) για κάθε ομάδα.

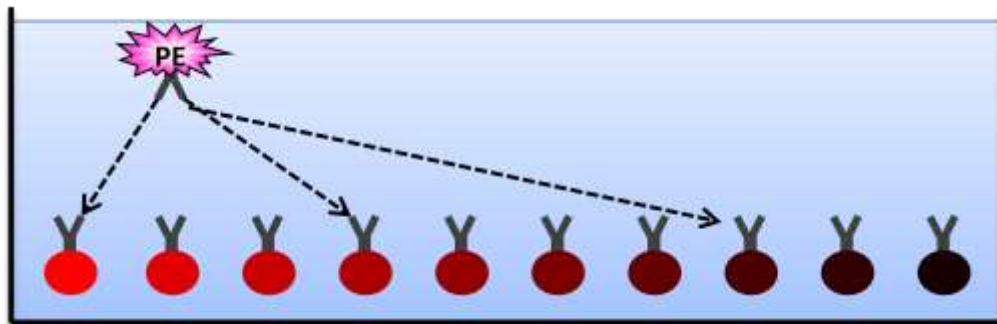


Εικόνα 15: κατανομή εντάσεων φωτεινότητας

## Πειράματα Θορύβου

### Πείραμα 1: Δοκιμή Θορύβου Υποβάθρου

Για να μετρηθεί ο θόρυβος υποβάθρου σχεδιάστηκε μια δοκιμή κατά την οποία σε κάθε βοθρίο χρησιμοποιούνται όλα τα μικροσφαιρίδια<sup>12</sup> και μόνο ένα δευτερεύον αντίσωμα, συμπληρωματικό ενός μόνο μικροσφαιριδίου. Κανένα αντιγόνο δεν χρησιμοποιείται σε αυτή την δοκιμή, έτσι ώστε να μην μπορεί να δημιουργηθεί το sandwich ELISA. Επομένως, ό,τι σήμα μετρηθεί θα αντιστοιχεί αναγκαστικά σε θόρυβο υποβάθρου (οι τιμές του πίνακα θα πρέπει να είναι όλες μηδενικές σε μια τέλεια μέτρηση).



Εικόνα 16: υπόδειγμα βοθρίου δοκιμής θορύβου υποβάθρου

<sup>12</sup> δεν υπάρχει πρόβλημα στον διαχωρισμό τους

Κατά την δοκιμή θορύβου υποβάθρου, κάθε δευτερεύον αντίσωμα δρα χωριστά από τα υπόλοιπα, οπότε ο πίνακας αποτελεσμάτων του πειράματος που ονομάζουμε «Noise Assay» αναπαριστά την «προτίμηση» που έχει κάθε δευτερεύον αντίσωμα σε κάθε υπόβαθρο (μικροσφαιρίδιο + πρωτεύον).

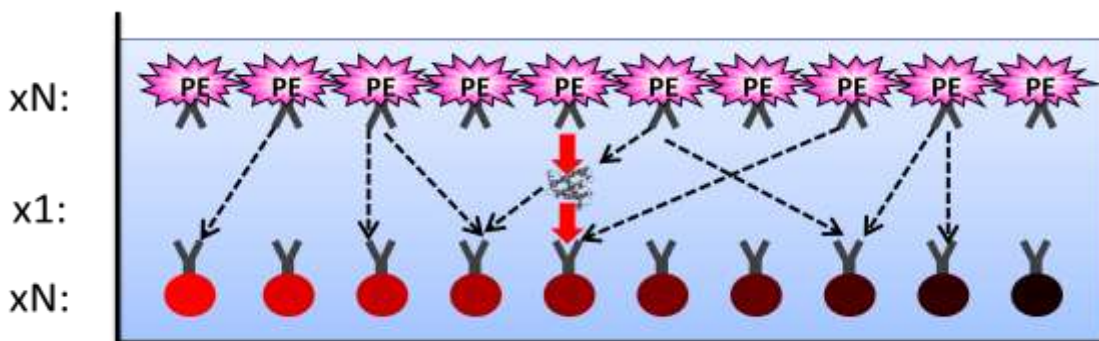
### **Πείραμα 2: Δοκιμή Διασταυρούμενων Αντιδράσεων**

Για την αναπαράσταση του Θορύβου Διασταυρούμενων Αντιδράσεων απαιτείται ένα σχετικά πιο πολύπλοκο πείραμα. Ο θόρυβος υποβάθρου είναι αρκετά απλός και γι' αυτό πολύ δύσκολο να εξαλειφθεί πλήρως, ώστε να μετρήσουμε τα άλλα ήδη θορύβου.

Για να μελετήσουμε τις διασταυρούμενες αντιδράσεις, δηλαδή ποια άλλα αντισώματα μπορεί να αναγνωρίζουν έναν αναλύτη, χρειάζεται ένα πείραμα που να ουδετεροποιεί αυτόν τον θόρυβο υποβάθρου και να απεικονίζει της διακυμάνσεις που προκαλεί κάθε αναλύτης στη μέτρηση.

Σε αυτή την κατεύθυνση σχεδιάστηκε ένα άλλο πείραμα το οποίο αναπαριστά τον θόρυβο διασταυρούμενων αντιδράσεων. Η βασική σύλληψη είναι η εξής:

- το νέο πείραμα είναι πάλι βασισμένο σε μια δοκιμή τρυβλίου
- σε κάθε βοθρίο προστίθενται πάλι όλα τα μικροσφαιρίδια - η διαφορά από το προηγούμενο πείραμα έγκειται στο ότι:
  - σε αυτό το πείραμα, σε κάθε βοθρίο προστίθεται ένας αναλύτης, και
  - όλα τα δευτερεύοντα αντισώματα



Εικόνα 17: υπόδειγμα βοθρίου δοκιμής διασταυρούμενων αντιδράσεων

Με αυτό το τρόπο, χρησιμοποιώντας για όλα τα βοθρία όλους τους συνδυασμούς αντισωμάτων, εξασφαλίζουμε ένα σταθερό θόρυβο υποβάθρου και άρα μπορούμε να παρατηρήσουμε την επίδραση που έχει στους συνδυασμούς αυτούς η παρουσία του κάθε

αναλύτη. Έτσι, κάθε αναλύτης δρα ξεχωριστά από τους άλλους, οπότε μπορούμε να είμαστε σίγουροι για το ποια είναι η επίδραση του σε όλα τα σετ ανίχνευσης.

Σε κάθε βοθρίο αναμένουμε να αναγνωριστεί μόνο ένα σήμα, ενώ οι τιμές όλων των υπόλοιπων μικροσφαιριδίων θα αντιστοιχούν στον θόρυβο του πειράματος. Επομένως, ο πίνακας αποτελεσμάτων που θα προκύψει (CrossReactivity Assay) θα είναι ανομοιογενής, καθώς θα περιέχει τόσο τιμές πραγματικού σήματος όσο και τιμές θορύβου, αλλά θα είναι εφικτό ο διαχωρισμός του σε ομοιογενή σήματα (είτε πραγματικά είτε θορύβου).

Οι πίνακες αποτελεσμάτων και ο σχολιασμός τους είναι στην ενότητα των αποτελεσμάτων.

### ***Καμπύλες Βαθμονόμησης (IC50)***

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, η σχέση που συνδέει την ένταση φωτεινότητας ενός μικροσφαιριδίου με την αρχική συγκέντρωση δεν είναι γνωστή εκ των προτέρων και πρέπει να υπολογίζεται ξεχωριστά για κάθε μηχανήμα ή και κάθε δοκιμή.

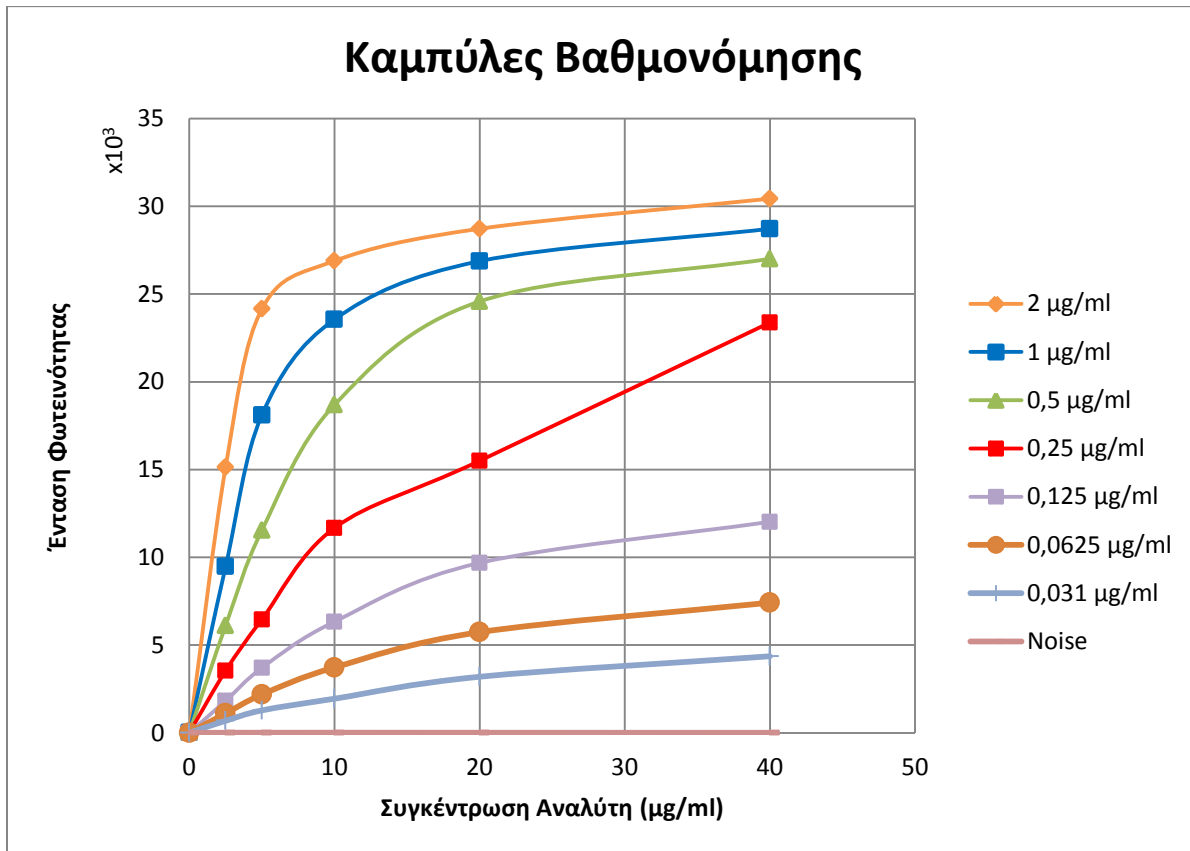
Η καμπύλη βαθμονόμησης προκύπτει αν εκτελέσουμε ένα πείραμα βαθμονόμησης στο οποίο μετράμε εκ των προτέρων γνωστές συγκεντρώσεις αναλύτη στις ίδιες συνθήκες που θα εκτελέσουμε (ή εκτελούμε) το κανονικό πείραμα. Από τα ζεύγη φωτεινότητα-συγκέντρωση που προκύπτουν υπολογίζουμε προσεγγιστικά την καμπύλη βαθμονόμησης συνήθως με λογιστικά μοντέλα 4 ή 5 παραμέτρων, ανάλογα με τη συμμετρία που παρουσιάζουν οι καμπύλες. Συνήθως, όταν η βαθμονόμηση γίνει χωριστά από το κανονικό πείραμα, υπολογίζονται περισσότερες από μια καμπύλες, κάθε μια από τις οποίες αντιστοιχεί σε μια διαφορετική συγκέντρωση αντισώματος ανίχνευσης. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να απεικονιστεί η ευαισθησία της μέτρησης στη συγκέντρωση των αντισωμάτων και να ρυθμιστεί ανάλογα.

Για τις ενδοεργαστηριακές μετρήσεις, πάντως, σπάνια υπολογίζουμε τη συγκέντρωση ενός αναλύτη. Συνήθως αναφερόμαστε κατευθείαν στην τιμή της φωτεινότητας θεωρώντας ότι η μέτρηση έχει μεγαλύτερη συγκριτική σημασία παρά ποσοτική, λόγω της ελλιπούς μοντελοποίησης της μεθόδου.

**Οι καμπύλες βαθμονόμησης μας χρησιμεύουν κυρίως για να εντοπίσουμε τη βέλτιστη συγκέντρωση δευτερεύοντος αντισώματος που πρέπει να χρησιμοποιηθεί για μια μέτρηση.**

Bead #	38	Αναλύτης (ng/ml):					
Name	CSF3	40	20	10	5	2,5	0
2ον Αντίσωμα (μg/ml):	2	30432	28719	26886	24149	15143	26
	1	28714	26873	23553	18112	9476	18
	0,5	27002	24578	18687	11544	6109	16
	0,25	23377	15501	11674	6465	3542	14
	0,125	12023	9686	6339	3704	1829	11
	0,0625	7418	5738	3729	2187	1112	13
	0,031	4366	3199	1950	1284	692	11
	0	8	11	12	11	11	5

Πίνακας 1: πίνακας βαθμονόμησης CSF3



Εικόνα 18: καμπύλες βαθμονόμησης CSF3



## ΜΟΝΤΕΛΟ ΘΟΡΥΒΟΥ

Ο θόρυβος, όπως είδαμε, είναι αναπόφευκτη συνέπεια της μέτρησης καθώς προκύπτει από το γεγονός ότι ορίζουμε «αυθαίρετα» την ισχυρότερη αντίδραση ως επιθυμητή και τις άλλες ως ανεπιθύμητες. Αυτό σημαίνει, όπως παρατηρήσαμε, ότι και ο βιολογικός θόρυβος αποτελεί βιοχημική αντίδραση και άρα μπορεί να μοντελοποιηθεί βάση της αντίδρασης προσρόφησης που περιγράφηκε στην εισαγωγή. Κάθε αντίσωμα, λοιπόν, συμμετέχει σε πολλές αντιδράσεις προσρόφησης μια εκ των οποίων θεωρούμε σήμα και τις υπόλοιπες θόρυβο.

Οι αντιδράσεις που παράγουν θόρυβο καλούνται «αντιδράσεις θορύβου» ή «μη-επιλεκτικές αντιδράσεις» (non-specific binding) και, όπως έχουμε αναφέρει, χωρίζονται σε αντιδράσεις υποβάθρου και διασταυρούμενες αντιδράσεις. Στα πλαίσια αυτής της εργασίας γίνεται η παραδοχή ότι ο θόρυβος προέρχεται κυρίως από αντιδράσεις μεταξύ των αντισωμάτων<sup>13</sup>, δηλαδή από την προσρόφηση ενός αντισώματος ανίχνευσης απευθείας στο πρωτεύον αντίσωμα. Η παραδοχή αυτή, αν και δεν είναι ακριβής, μπορεί να ερμηνεύσει σε μεγάλο βαθμό τον παραγόμενο θόρυβο.

Ως προϊόν αντίδρασης, λοιπόν, το επίπεδο θορύβου εξαρτάται τόσο από το είδος της αντίδρασης όσο και από τις συγκεντρώσεις των αντιδρώντων. Ένα μοντέλο θορύβου λοιπόν πρέπει να εξηγεί, κατά τον δυνατόν, την επίδραση των δύο (2) αυτών παραγόντων στο επίπεδο θορύβου.

### **Συγκέντρωση Αντιδρώντων**

Στην αντίδραση θορύβου που μελετάται ως αντιδρώντα θεωρούνται τα πρωτεύοντα αντισώματα που καλύπτουν την επιφάνεια του μικροσφαιριδίου και τα δευτερεύοντα αντισώματα που κινούνται ελεύθερα στο υγρό που περιβάλλει τα μικροσφαιρίδια.

### **Συγκέντρωση Αντισωμάτων Παγίδευσης**

Ένα τυπικό πείραμα ELISA με βάση μικροσφαιριδίων (bead-based ELISA) γίνεται με χρήση προ-επικαλυμμένων μικροσφαιριδίων (pre-coated beads). Εναλλακτικά ένα εργαστήριο μπορεί να προμηθευτεί «καθαρά» μικροσφαιρίδια και να τα επικαλύψει (coating) με όποιο αντίσωμα χρειάζεται, μέσω ισχυρών ομοιοπολικών δεσμών, δημιουργώντας έτσι «προσαρμοσμένα μικροσφαιρίδια» (custom beads). Η χρήση προσαρμοσμένων μικροσφαιριδίων, άμα υπάρχει η τεχνογνωσία, είναι οικονομικά πολύ πιο συμφέρουσα και γι' αυτό έχει υιοθετηθεί από το εργαστήριο μας καθώς οι αρνητικές επιπτώσεις που μπορεί να έχει, όπως επιπλέον χρόνος και εργασία για την επικάλυψη και η διακύμανση της συμπεριφορά τους, είναι αμελητέες.

---

<sup>13</sup> Αντίδραση θορύβου υποβάθρου μπορεί να έχουμε και μεταξύ ενός δευτερεύοντος αντισώματος και τις επιφάνειας του μικροσφαιριδίου. Επειδή όμως τα μικροσφαιρίδια χρησιμοποιούνται πάντα με αντίστοιχο πρωτεύον αντίσωμα επιλέγουμε να καταγράψουμε αυτό το θόρυβο στο πρωτεύον

Και στις 2 περιπτώσεις πάντως (εμπορικών και προσαρμοσμένων μικροσφαιριδίων) μπορεί να θεωρηθεί ότι η συγκέντρωση των αντισωμάτων στην επιφάνεια ενός μικροσφαιριδίου είναι σταθερή, διότι για τα «εμπορικά» μικροσφαιρίδια καθορίζεται από τις προδιαγραφές του προϊόντος, ενώ τα «προσαρμοσμένα» συνήθως εμβαπτίζονται σε υγρό με περίσσεια αντισωμάτων κατά την επικάλυψη, ώστε να επιτευχθεί πλήρης κάλυψη της επιφάνειας<sup>14</sup>. Επιπλέον, το εμβαδόν που καταλαμβάνει ένα προσροφημένο αντίσωμα είναι πολύ μικρό σε σχέση με όλη την επιφάνεια του μικροσφαιριδίου και, άρα, οι όποιες διακυμάνσεις κατά την πλήρη κάλυψη μπορούν να θεωρηθούν αμελητέες.

Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι η συγκέντρωση των αντισωμάτων παγίδευσης δεν αποτελεί μεταβλητή του προβλήματος και μπορεί να θεωρηθεί σταθερή για κάθε μέτρηση.

### **Συγκέντρωση Αντισωμάτων Ανίχνευσης**

Αντίθετα, με τη συγκέντρωση του πρωτεύοντος αντισώματος η οποία εντάσσεται στις σταθερές του προβλήματος ( $\Gamma_{max}$ ), καθώς ο πειραματιστής είτε δεν μπορεί είτε δεν έχει λόγο να την μεταβάλλει, η συγκέντρωση του δευτερεύοντος αντισώματος ρυθμίζεται άμεσα από τον πειραματιστή, ο οποίος την προσαρμόζει στις ανάγκες της μέτρησης.

Σε μια αντίδραση θορύβου, μεταβολή της συγκέντρωσης του αντισώματος ανίχνευσης αντιστοιχεί σε μεταβολή του  $c^{bulk}$  μια αντίδρασης προσρόφησης. Ως αποτέλεσμα ο πειραματιστής θα ήθελε να χρησιμοποιήσει όσο το δυνατόν μικρότερη συγκέντρωση καθώς έτσι περιορίζεται ο θόρυβος (λιγότερα ελεύθερα αντισώματα θα δώσουν και λιγότερες προσροφήσεις για τις ίδιες συνθήκες) και γίνεται καλύτερη διαχείριση των αποθεμάτων σε αντισώματα.

Όμως, αν υποθέσουμε ότι μετά το πρώτο βήμα της τεχνικής ELISA τα αντιγόνα είναι σταθερά συνδεδεμένα με τα αντίστοιχα αντισώματα στην επιφάνεια των μικροσφαιριδίων τότε τα συμπλέγματα αντίσωμα-αντιγόνο λειτουργούν, πλέον, ως νέα επιφάνεια η οποία θα προσροφήσει τα αντισώματα ανίχνευσης. Επομένως, μείωση της συγκέντρωσης του αντισώματος ανίχνευσης δε θα οδηγήσει μόνο σε μείωση του θορύβου, αλλά και σε μείωση του μετρούμενου σήματος.

### **Θόρυβος = $\theta(c)$**

Στόχος μας, λοιπόν, είναι να βρούμε μια συνάρτηση  $\theta = \theta(c)$ , η οποία να συνδέει το επίπεδο θορύβου ενός πειράματος με την συγκέντρωση των αντισωμάτων ανίχνευσης που χρησιμοποιούνται σε αυτό το πείραμα. Γνωρίζοντας αυτήν την εξίσωση, μπορεί κανείς στη συνέχεια να

---

<sup>14</sup> πέραν των οικονομικών περιορισμών, δεν υπάρχει λόγος κάποιος να επιδιώξει μικρότερο ποσοστό κάλυψης καθώς κάτι τέτοιο θα είχε συνέπειες στην ευαισθησία της μέτρησης

υπολογίσει ποια είναι η βέλτιστη συγκέντρωση με την οποία πρέπει να πραγματοποιηθεί ένα πείραμα.

Το θεωρητικό μοντέλο της αντίδρασης προσρόφησης που περιγράφηκε στην εισαγωγή είναι μια τέτοια συνάρτηση, όμως έχει μερικά σημαντικά μειονεκτήματα, κυρίως διότι αποτελεί ένα απλουστευτικό μοντέλο. Μερικά από τα σημαντικότερα μειονεκτήματα είναι ότι:

- οι ταχύτητες των αντιδράσεων συνήθως υπολογίζονται πειραματικά και όχι από τις σχέσεις που δόθηκαν, οι οποίες είναι θεωρητικές και ισχύουν μόνο κάτω από ειδικές συνθήκες, όπως για παράδειγμα η αντίδραση να γίνεται σε ένα στάδιο
- η υπόθεση ότι όλες οι αντιδράσεις γίνονται με τον ίδιο μηχανισμό μπορεί να ισχύει για την ειδική αντίδραση-στόχο, δεν μπορούμε, όμως, να πούμε με βεβαιότητα ότι ισχύει για το σύνολο των μη-ειδικών αντιδράσεων θορύβου
- τέλος, θα θέλαμε η ανάλυση μας να καθορίζεται από τα δεδομένα (data-driven) και όχι από κάποιο θεωρητικό μοντέλο, καθώς η εργασία αυτή στοχεύει στην πρακτική εφαρμογή των πορισμάτων της και όχι στη δημιουργία ενός θεωρητικού μοντέλου του θορύβου.

Γι' αυτούς τους λόγους η **μοντελοποίηση της σχέσης του θορύβου με τη συγκέντρωση των αντιδρώντων γίνεται μέσω των καμπυλών βαθμονόμησης.**

Ένας πίνακας βαθμονόμησης, όπως είδαμε, περιέχει τις τιμές έντασης φωτεινότητας ( $\Phi$ ) που δίνουν διάφοροι συνδυασμοί μεταξύ των συγκεντρώσεων των αντισωμάτων ανίχνευσης ( $C_{AS}$ ) και των αντιγόνων ( $C_{AF}$ ), θεωρώντας τη συγκέντρωση του πρωτεύοντος αντισώματος σταθερή. Αποτελεί, δηλαδή, μια απεικόνιση της συνάρτησης  $\Phi = \Phi(C_{AF}, C_{AS})$ .

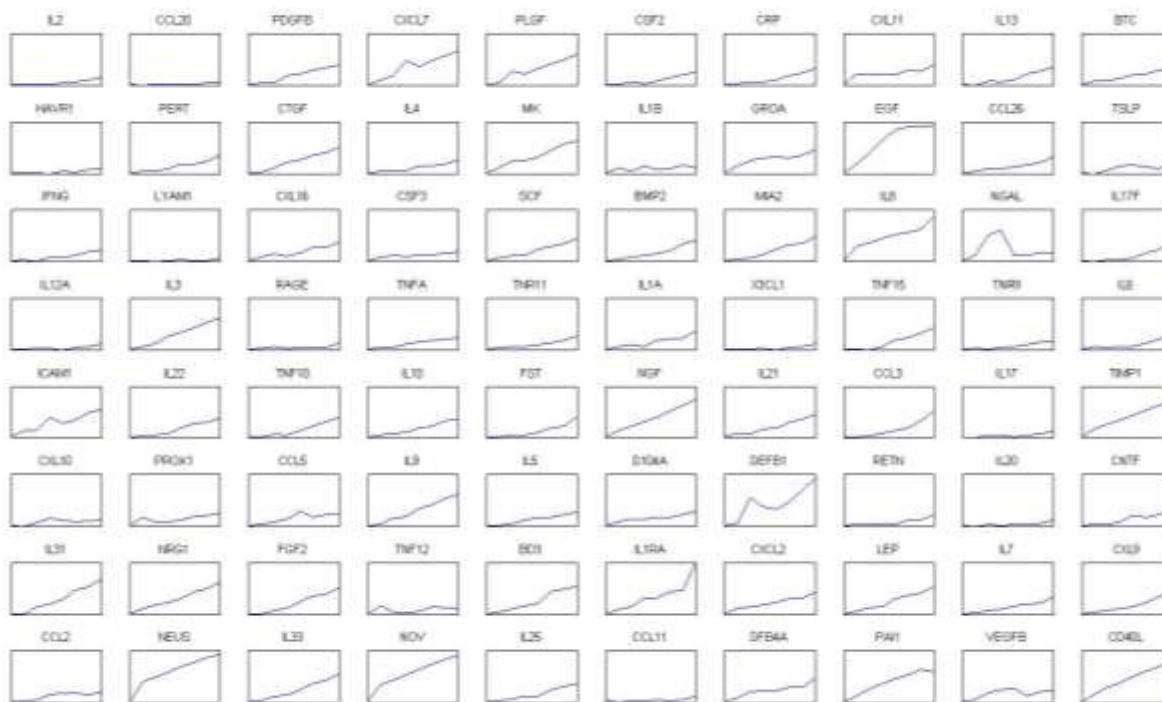
Μία τυπική καμπύλη βαθμονόμησης είναι της μορφής  $C_{AF} = \Phi^{-1}(\Phi, C_{AS} = \text{σταθερό})$  και, ως γνωστόν, αντιστοιχεί τις τιμές φωτεινότητας με τη συγκέντρωση των αντιγόνων στο δείγμα, αφού έχει επιλεγεί μια σταθερή συγκέντρωση αντισωμάτων για να εκτελεστεί το πείραμα. Όμως, μπορεί κανείς να ερμηνεύσει διαφορετικά την πληροφορία του πίνακα και θεωρώντας σταθερή τη συγκέντρωση αντιγόνου να υπολογίσει μια συνάρτηση φωτεινότητας  $\Phi = \Phi(C_{AF} = \text{σταθερό}, C_{AS})$ . Η καμπύλη θορύβου που ζητάμε επομένως προκύπτει αν θεωρήσουμε την συγκέντρωση αντιγόνου σταθερή και ίση με μηδέν, δηλαδή  $\theta(c) = \Phi(C_{AF} = 0, C_{AS})$ .

Να σημειωθεί ότι, όπως φαίνεται και από την εξίσωση, ο θόρυβος παίρνει τιμές φωτεινότητας καθώς για τις ανάγκες του εργαστηρίου δεν μετατρέπουμε τις τιμές αυτές σε συγκεντρώσεις. Για να εκφραστεί ο θόρυβος σε τιμές συγκέντρωσης αρκεί να χρησιμοποιηθούν οι σχέσεις για την μετατροπή της φωτεινότητας σε συγκέντρωση για κάθε τιμή της συγκέντρωσης αντισώματος, δηλαδή την σχέση:

$$\theta(c)|_{\text{συγκέντρωση}} = \Phi^{-1}(\theta(c)|_{\text{φωτεινότητα}}, C_{AS} = \text{σταθερό}).$$

Επιπλέον, πρέπει να τονιστεί ότι οι καμπύλες θορύβου που προκύπτουν δεν απεικονίζουν το συνολικό θόρυβο ενός πειράματος, αλλά τον θόρυβο που παράγει η αντίδραση των δύο (2) αντισωμάτων που χρησιμοποιούνται στο sandwich ELISA. Σε ένα κανονικό πείραμα, όμως, κάθε μικροσφαιρίδιο έρχεται σε επαφή με όλα τα είδη αντισωμάτων στο δείγμα και όχι μόνο το συμπληρωματικό του. Επομένως, οι καμπύλες αυτές αποτελούν στην καλύτερη περίπτωση ενδεικτικές καμπύλες θορύβου. Υπό την προϋπόθεση ότι τα πρωτεύοντα δε δείχνουν κάποια ιδιαίτερη προτίμηση σε κάποιο είδος αντισώματος ανίχνευσης<sup>15</sup>, οι καμπύλες αυτές μπορούν να θεωρηθούν χαρακτηριστικές των μικροσφαιριδίων. Ο βασικός λόγος που αναγκαζόμαστε να περιοριστούμε σε αυτές τις καμπύλες είναι ότι οι πίνακες βαθμονόμησης αποτελούν μια άμεσα προσβάσιμη πηγή πληροφορίας, ενώ μια πιο συστηματική προσέγγιση δεν είναι εφικτή αυτήν την στιγμή λόγω κόστους (οικονομικού και χρονικού).

Οι καμπύλες που προκύπτουν από αυτή την προσέγγιση φαίνονται παρακάτω:



Εικόνα 19: καμπύλες θορύβου

Τα διαγράμματα αυτά είναι όλα στην ίδια (λογαριθμική) κλίμακα και τα πειράματα εκτελέστηκαν στις ίδιες, κατά το δυνατόν, συνθήκες. Είναι εμφανές από τις διαφορές τους ότι γνώση των συνθηκών περιβάλλοντος ενός πειράματος (συγκεντρώσεις, θερμοκρασίες κλπ) δεν αρκεί για να προβλεφθεί το επίπεδο θορύβου ενός πειράματος. Κάτι τέτοιο ήταν αναμενόμενο

<sup>15</sup> υπόθεση που όπως θα δούμε μάλλον δεν ισχύει

καθώς όπως είδαμε η αντίδραση θορύβου δεν εξαρτάται μόνον από τις συνθήκες του περιβάλλοντος, αλλά και από τη φύση των αντιδρώντων. Επομένως, **θα πρέπει ορίσουμε ένα μέγεθος που να δείχνει την ικανότητα ενός αντισώματος να παράγει θόρυβο.**

### **Αναγνωρισιμότητα**

Το μέγεθος αυτό το ονομάζουμε **αναγνωρισιμότητα (dirtiness)**, διότι δείχνει την ικανότητα του αντισώματος να αναγνωρίζει άλλα αντισώματα (ή ουσίες εν γένει) εκτός αυτού που θεωρούμε ότι του αντιστοιχεί (αντίδραση στόχος).

Ο υπολογισμός ενός τέτοιου μεγέθους έχει δυσκολίες, γι' αυτό αρχικά πρέπει να σκεφτούμε τι ιδιότητες θέλουμε να έχει αυτό το μέγεθος. Θέλουμε η αναγνωρισιμότητα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προβλέψει το επίπεδο θορύβου ενός σχεδιαζόμενου πειράματος και, επιπλέον, να υποδείξει ποια αντισώματα ευθύνονται, κατά κύριο λόγο, για αυτόν τον θόρυβο, ώστε να αντικατασταθούν στο μέλλον με άλλα καλύτερης ποιότητας (μικρότερης αναγνωρισιμότητας). Για να εξυπηρετήσει αυτούς τους στόχους θα πρέπει:

- I. να αποτελεί **εσωτερική** του ιδιότητα
- II. ως εσωτερική ιδιότητα να **κατατάσσει** τα αντισώματα από το λιγότερο στο περισσότερο θορυβώδες
- III. τέλος, να μπορεί συνδυαζόμενη με τις άλλες παραμέτρους του προβλήματος **να προβλέπει το θόρυβο** που θα παράγει ένας συνδυασμός αντισωμάτων

Η αναγνωρισιμότητα, στην ουσία, είναι ανοιγμένος θόρυβος. Η δυσκολία στον υπολογισμό της αναγνωρισιμότητας είναι ότι **ο θόρυβος δεν αποτελεί ιδιότητα κάποιου εκ των αντιδρώντων, αλλά της ίδιας της αντίδρασης**, οπότε δεν μπορούμε να τον αποδώσουμε αυθαίρετα σε κάποιο αντιδρών. Θα ήταν σαν να λέγαμε ότι τελικό σύμπλεγμα είναι αποτέλεσμα μόνο ενός αντισώματος και όχι συνδυασμός δύο (2) αντιδρώντων.

Για να εξαλείψουμε τη βασική δυσκολία θεωρούμε ότι κάθε αντίσωμα χαρακτηρίζεται από ένα **διάνυσμα** σε κάθε θέση του οποίου αντιστοιχεί μια αντίδραση θορύβου και η τιμή της κάθε θέσης αντιστοιχεί στη σταθερά ισορροπίας  $K$  της συγκεκριμένης αντίδρασης. Το διάνυσμα αυτό καλούμε αναγνωρισιμότητα. Ο ορισμός αυτός δεν είναι ο τελικός.

Ορίζοντας την αναγνωρισιμότητα ως διανυσματικό μέγεθος μπορούμε να συνοψίσουμε το σύνολο των αντιδράσεων σε ένα μέγεθος και άρα να «μετατρέψουμε» μια εξωτερική ιδιότητα σε εγγενή. Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, η σταθερά  $K$ , μέσω της εξίσωσης Langmuir, συσχετίζει τη συγκέντρωση ενός διαλύματος με την επιφανειακή συγκέντρωση των προσροφημένων μορίων και, κατά συνέπεια, από την στιγμή που το διάνυσμα περιέχει τα  $K$  των αντιδράσεων θορύβου μπορεί συνδυαζόμενο με τις συγκεντρώσεις των αντίστοιχων μορίων να υποδείξει το επίπεδο του θορύβου. Τέλος, χρησιμοποιώντας κάποιο μέτρο του

διανύσματος αυτού μπορούμε να χαρακτηρίσουμε και να κατατάξουμε τα αντισώματα βάσει της τάσης τους να παράγουν θόρυβο.

### **Παρατηρήσεις:**

Η αναγνωρισιμότητα όπως ορίστηκε ίσως έχει κάποια φυσική σημασία, ως το διάνυσμα των συντελεστών αντίδρασης στις οποίες συμμετέχει το συγκεκριμένο αντίσωμα, όμως έχει **μικρή πρακτική αξία**.

- Αρχικά, ακόμα και για σταθερές πειραματικές συνθήκες, ο υπολογισμός του συντελεστή μιας μόνο αντίδρασης είναι μια απαιτητική διαδικασία, πολλώ δε μάλλον για τις «άπειρες» αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχει ένα αντίσωμα.
- Επιπλέον, ο συντελεστής  $K$  αναφέρεται μόνο σε κατάσταση ισορροπίας, η οποία μπορεί να επέρχεται σε χρόνους πολύ μεγαλύτερους από αυτούς του πειράματος.

Σκοπός μας είναι να βρούμε ένα εύχρηστο «λογιστικό» μέγεθος προσαρμοσμένο στις ανάγκες ενός εργαστηρίου το οποίο να υποδεικνύει τα βέλτιστα πειράματα και ποιά αντισώματα χρειάζονται αντικατάσταση. Γι' αυτό και τελικά ο όρος αναγνωρισιμότητα δεν αναφέρεται στο θεωρητικό μέγεθος που περιγράφηκε, αλλά σε μια «εκτίμηση» ή ένα μέτρο της αναγνωρισιμότητας. Η εκτίμηση αυτή πρέπει να μπορεί, μέσω μιας κατάλληλης σχέσης, να προβλέπει το θόρυβο ενός πειράματος και να διατάσσει σωστά τα δοθέντα αντισώματα ως προς την ικανότητα τους να παράγουν θόρυβο.

**Τα βασικό μας εργαλείο για τον υπολογισμό της αναγνωρισιμότητας είναι η Δοκιμή Θορύβου.**

Η αναγνωρισιμότητα δεν μετριέται απευθείας από τη Δοκιμή Θορύβου. Βάσει του ορισμού της αποτελεί εγγενές μέγεθος κάθε αντισώματος, ενώ η Δοκιμή Θορύβου μετράει τον θόρυβο που παράγει ένας συνδυασμός αντισωμάτων (ένα πρωτεύον και ένα δευτερεύον) και άρα συνδυασμούς αναγνωρισιμότητων. Όμως, επειδή ο σκοπός μας τελικώς είναι να ελαχιστοποιήσουμε τον θόρυβο και όχι να υπολογίσουμε τις φυσικές ιδιότητες ενός αντισώματος, οι φαινομενικές αναγνωρισιμότητες που θα προκύψουν από την ανάλυση της Δοκιμής Θορύβου μας αρκούν.

**Ο μετρούμενος θόρυβος δεν αποτελεί αποτέλεσμα ενός μόνο αντισώματος, αλλά ενός πλήθους<sup>16</sup> αντισωμάτων που δρουν ταυτόχρονα.**

Η συσχέτιση του θορύβου με το πλήθος των αντισωμάτων μελετήθηκε στην προηγούμενη ενότητα και εκφράζεται από το γεγονός ότι οι καμπύλες θορύβου δεν είναι παράλληλες στον άξονα συγκεντρώσεων του δευτερεύοντος αντισώματος. Στον ορισμό της αναγνωρισιμότητας,

---

<sup>16</sup> Όταν λέμε πλήθος αναφερόμαστε στη συγκέντρωση

όμως, χρησιμοποιείται η σταθερά  $K$  που είναι ανεξάρτητη των συγκεντρώσεων των αντιδρώντων. Ο τελικός θόρυβος, λοιπόν, είναι το αποτέλεσμα του συνδυασμού διαφόρων αντισωμάτων (αναγνωρισιοτήτων) διαφόρων συγκεντρώσεων.

Το πώς, εν τέλει, θα οριστεί η αναγνωρισιμότητα έχει σημασία για το ποια μορφή θα έχει τελικώς η Συνάρτηση του Θορύβου ενός πειράματος. Όπως αναφέρθηκε, ο θόρυβος αποτελεί συνάρτηση τόσο του είδους όσο και του πλήθους των αντισωμάτων, άρα τελικά θα θέλαμε για κάθε αντίσωμα να προκύψει μια συνάρτηση της αναγνωρισιμότητας ( $\vec{a}$ ) και της συγκέντρωσης ( $\vec{c}$ ) των διαφόρων ουσιών στο περιβάλλον του αντισώματος [ $\theta_i = f(\vec{a}, \vec{c})$ ], η οποία να υπολογίζει τον θόρυβο που θα παράξει το συγκεκριμένο αντίσωμα στο συγκεκριμένο περιβάλλον.

Η αναγνωρισιμότητα αποτελεί «λογιστικό» μέγεθος και επιδέχεται διάφορους ορισμούς, γιατί ακριβώς δεν μπορεί να οριστεί χωρίς τη συνάρτηση (μοντέλο) θορύβου. Το μόνο φυσικό μέγεθος που μπορεί να μετρηθεί είναι ο θόρυβος και ο μόνος τρόπος να υπολογιστεί η αναγνωρισιμότητα είναι μέσω της συνάρτησης αυτής. Η αναγνωρισιμότητα είναι η επιπλέον παράμετρος που πρέπει να υπολογιστεί για να καλύψει την αδυναμία των «φυσικών» μεγεθών να ερμηνεύσουν τις διαφοροποιήσεις του θορύβου που παράγουν διαφορετικά αντισώματα σε ίδια φαινομενικά περιβάλλοντα.

Εναλλακτικά, λοιπόν, θα μπορούμε να ερμηνεύσουμε το  $K$  ως την πιθανότητα να συμβεί μια αντίδραση θορύβου, αν τα αντιδρώντα βρεθούν στη σωστή αναλογία. Σε αυτή την περίπτωση, η αναγνωρισιμότητα ενός αντισώματος θα οριζόταν ως το διάνυσμα κάθε θέση του οποίου αντιστοιχεί στην πιθανότητα να συμβεί η αντίδραση που αντιστοιχεί η θέση, όπου η πιθανότητα αυτή ορίζεται στο  $[0,1]$ . Τότε θα ίσχυε:

$$\sum (K_{\text{αναγνωρισιμότητας}}) + K_{\text{αντίδρασης στόχος}} + K_{\text{καμία αντίδραση}} = 1$$

Η τελευταία σχέση διαφωτίζει ένα άλλο σημαντικό στοιχείο της αναγνωρισιμότητας. Η αναγνωρισιμότητα είναι η ικανότητα και όχι η δυνατότητα ενός αντισώματος να αναγνωρίζει τα άλλα, γι' αυτό υπάρχει και η πιθανότητα να μη συμβεί καμία αντίδραση. Υπάρχουν πολλοί λόγοι που μια αντίδραση μπορεί να είναι δυνατή, αλλά όχι εφικτή, όπως είναι η σχετική απόσταση και θέση των αντισωμάτων. Για να μπορεί να συμβεί μια αντίδραση πρέπει τα αντισώματα που συμμετέχουν να βρεθούν κοντά και με κατάλληλο προσανατολισμό και όχι απλώς να συνυπάρχουν σε ένα μίγμα με τις σωστές αναλογίες.

Η αντίδραση στόχος πρέπει προφανώς να είναι η αντίδραση με τη μεγαλύτερη πιθανότητα να συμβεί (εξαιρουμένης, ίσως, της πιθανότητας να μη συμβεί καμία αντίδραση), αλλιώς η μέτρηση δεν θα είχε νόημα, αφού ο θόρυβος θα ήταν κατά βάση μεγαλύτερος.

Οι διάφοροι ορισμοί καθορίζουν στην ουσία τη μορφή της συνάρτησης θορύβου. Δηλαδή:

- Ο αρχικός αυστηρός ορισμός προερχόμενος από τη χημική κινηματική χρησιμοποιεί την έννοια της δυναμικής ισορροπίας (το  $K$  αναφέρεται σε κατάσταση ισορροπίας). Η έννοια της δυναμικής ισορροπίας προϋποθέτει το χρόνο και γενικά ένα εξελισσόμενο πολυπαραγοντικό φαινόμενο περιπλέκοντας τη συνάρτηση του θορύβου που, τελικώς, μας ενδιαφέρει.
- Ζητούμενο όπως είπαμε είναι η απλότητα. Γι' αυτό και παρακάμπτεται η αναζήτηση για το «πραγματικό»  $K$  για να υπολογιστεί ένα φαινομενικό  $K$  το οποίο μαζί με τις συγκεντρώσεις των υπολοίπων αντισωμάτων να δίνει μέσω της εξίσωσης του Langmuir  $\theta = \theta_{max} \frac{K C_{A\Sigma}}{1 + K C_{A\Sigma}}$  των συνολικό θόρυβο. Η απλούστευση αυτή εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι οι πειραματικές συνθήκες είναι κατά κανόνα σταθερές, οπότε τα φαινομενικά  $K$  είναι στενά συνδεδεμένα με τα πραγματικά.
- Τέλος, ο ορισμός του  $K$  ως πιθανότητα απλοποιεί ακόμα περισσότερο τη συνάρτηση του θορύβου σε ένα απλό πολλαπλασιασμό του πλήθους των αντισωμάτων με την αντιστοιχεί πιθανότητα:  $\theta = K C_{A\Sigma}$

Ο ορισμός του  $K$  ως πιθανότητα δίνει μια συνεχώς αύξουσα εξίσωση θορύβου (δεν υπάρχει σημείο κορεσμού). Από φυσικής άποψης αυτό σημαίνει ότι ο θόρυβος μπορεί να γίνει άπειρος για άπειρη συγκέντρωση αντισωμάτων, πράγμα αδύνατο διότι τουλάχιστον η πλήρης κάλυψη του μικροσφαιριδίου αποτελεί έναν περιορισμό στην αύξηση του θορύβου. Παρόλα αυτά, για τις συνήθεις τιμές του θορύβου (αυτές που έχει νόημα να αποδεχτεί κάποιος) δεν υπάρχουν αυτοί οι περιορισμοί και επιπλέον οι δύο (2) ορισμοί για μικρές τιμές του  $Kc$  ( $\ll 1$ ) είναι ισοδύναμοι.

Επομένως, λαμβάνοντας υπόψη τόσο την ανάγκη για ακρίβεια όσο και για απλότητα, καταλήγουμε ότι ο ορισμός της αναγνωρισιμότητας μέσω της πιθανότητας είναι καταλληλότερος για τις ανάγκες της μοντελοποίησης μας. Άρα τελικώς:

**Αναγνωρισιμότητα ενός αντισώματος είναι το διάνυσμα κάθε τιμή του οποίου αντιστοιχεί στην πιθανότητα αυτό το αντίσωμα να συμμετέχει σε μια αντίδραση θορύβου, εφόσον όλες οι άλλες προϋποθέσεις της αντίδρασης (όπως πχ συγκεντρώσεις των αντιδρώντων, θερμοκρασία κλπ) πληρούνται.**

**Η αναγνωρισιμότητα δεν ορίζεται για τους αναλύτες γιατί αυτοί αποτελούν εξ ορισμού το μετρούμενο σήμα.**

Αν ορίζαμε την αναγνωρισιμότητα ενός αναλύτη ως την ιδιότητα του να αναγνωρίζεται από διάφορα αντισώματα τότε θα διπλομετρούσαμε τον θόρυβο που παράγεται, μια φορά ως προερχόμενο από τον αναλύτη και μία φορά προερχόμενο από το αντίσωμα.



**Τέλος σημαντικό στοιχείο της αναγνωρισιμότητας είναι ότι δεν αθροίζεται.**

Ένα σύνολο αντισωμάτων δεν έχει αναγνωρισιμότητα ίση με το άθροισμα των επιμέρους αναγνωρισιμότητων. Η αναγνωρισιμότητα ενός συνόλου προκύπτει από κατάλληλο συνδυασμό των διανυσμάτων αναγνωρισιμότητων, έτσι ώστε να λαμβάνονται υπόψη μόνο οι τιμές που συμμετέχουν σε αυτό το σύνολο. Με αυτό το τρόπο, ο θόρυβος που παράγει ένα πολυπλεκτικό πείραμα είναι τελικώς συνάρτηση της αναγνωρισιμότητας του συνόλου και των συγκεντρώσεων των επιμέρους στοιχείων του συνόλου.

Για παράδειγμα, άμα η αναγνωρισιμότητα έχει οριστεί βάσει της πιθανότητας και θεωρήσουμε ότι ο συνολικός θόρυβος μπορεί να προκύψει από άθροιση των επιμέρους θορύβων τότε προκύπτει:

$$\theta_{ολ} = \sum_i \theta_i$$
$$K_{ολ} \sum_i c_i = \sum_i (K_i c_i) \rightarrow K_{ολ} = \frac{\sum_i (K_i c_i)}{\sum_i c_i} \neq \sum_i K_i$$

Αυτή η ιδιαιτερότητα περιπλέκει σημαντικά το πρόβλημα της κατάταξης των αντισωμάτων ενός συνόλου.

### ΘΟΡΥΒΟΣ ΣΥΝΟΛΟΥ ΑΝΑΛΥΤΩΝ

Σε ένα πολυπλεκτικό πείραμα ορίζουμε ως Μέσο Θόρυβο (Average Noise) το θόρυβο που παράγει κατά μέσο όρο κάθε μέτρηση, και ως συνάρτηση μέσου θορύβου την συνάρτηση

$$M\theta(n) = \theta/n$$

όπου

- $\theta$  ο συνολικός θόρυβος του πειράματος, ο θόρυβος δηλαδή που παράγουν όλες οι μετρήσεις μαζί  $\theta = \sum_i \theta_i$ , όπου  $i=1,2,\dots,n$  ο αριθμός της κάθε μέτρησης και
- $n$  ο αριθμός των μετρήσεων.

Σύμφωνα λοιπόν με όσα έχουν αναφερθεί κάνουμε την εξής υπόθεση:

**ο Μέσος Θόρυβος ενός πειράματος αποτελεί αύξουσα συνάρτηση του αριθμού των αναλυτών που μετρώνται σε κάθε πείραμα, με την προϋπόθεση ότι κάθε πείραμα παράγει τον ελάχιστο δυνατό θόρυβο για το συγκεκριμένο σύνολο αναλυτών.**

### **Παρατηρήσεις:**

Αύξηση του συνόλου των αναλυτών δε συνεπάγεται αναγκαστικά πρόσθεση αναλυτών, αλλά απλή αύξηση του πληθυσμού του (cardinality). Μπορεί, δηλαδή, το νέο σύνολο να μην έχει κανένα κοινό στοιχείο με το προηγούμενο, αρκεί απλά να έχει ένα τουλάχιστον στοιχείο παραπάνω και να παράγει τον ελάχιστο θόρυβο από όλα τα πειράματα ίσου πληθυσμού.

Αν δύο (2) πειράματα διαφορετικού πλήθους αναλυτών δεν είναι βέλτιστα δεν μπορούμε εκ των προτέρων να γνωρίζουμε ποιο από τα δύο (2) θα παράγει το λιγότερο θόρυβο. Όμως, αν ξέρουμε ότι τα δύο πειράματα είναι σχεδιασμένα έτσι ώστε να παράγεται ο μικρότερος δυνατός θόρυβος για το καθένα, τότε ο θόρυβος του πειράματος με τους περισσότερους αναλύτες σίγουρα δεν είναι μικρότερος από αυτόν με τους λιγότερους, καθώς αυτό θα σήμαινε ότι τα επιπλέον αντισώματα που προστίθενται αφαιρούν και δεν προσθέτουν θόρυβο και, άρα, έχουν αρνητικές τιμές αναγνωρισιμότητας, πράγμα που είναι αδύνατον εξ ορισμού (δεν υπάρχει αρνητική πιθανότητα).

Πώς ερμηνεύεται, όμως, μια αύξηση του μέσου θορύβου και πώς μπορεί αυτή η υπόθεση να μας βοηθήσει στον καλύτερο σχεδιασμό του πειράματος;

Υπό ιδανικές συνθήκες ο μέσος θόρυβος ενός πειράματος θα έπρεπε να παραμένει ανεπηρέαστος από την αύξηση του αριθμού των αναλυτών καθώς, θεωρητικά, τα αντισώματα είναι πλήρως εξειδικευμένα και η μια μέτρηση δεν επηρεάζει τις άλλες παρά μόνο κατά τυχαίο τρόπο. Σε αυτή την περίπτωση αναμένεται ο πίνακας της Δοκιμής Θορύβου να παρουσιάζει πλήρη ισοτροπία (έναν ενιαίο θόρυβο για όλο το πείραμα) και δεν τίθεται πρόβλημα βελτιστοποίησης, καθώς κανένα πείραμα δε θα διέφερε από τα άλλα.

Μια μικρή αύξηση του μέσου θορύβου ίσως να μπορεί να ερμηνευτεί μέσω της αύξησης των βαθμών ελευθερίας που έχουν τα πειράματα με περισσότερους αναλύτες, αφού περισσότεροι αναλύτες σημαίνει και περισσότερες πιθανές (τυχαίες) αλληλεπιδράσεις και μεγαλύτερη συγκέντρωση αντισωμάτων στο διάλυμα. Επιπλέον, ακόμα και αν μια μέτρηση δεν επηρεάζει τις άλλες, αυτό δεν σημαίνει ότι όλες οι μετρήσεις παράγουν ομοιόμορφο θόρυβο καθώς κάποιες μπορεί να είναι πιο θορυβώδεις από τις άλλες. Όμως, τότε η αύξηση θα πρέπει να ήταν σχεδόν γραμμική με την αύξηση των αναλυτών, τουλάχιστον για τις μετρητικές διατάξεις που έχει νόημα να συζητάμε, και άρα κάθε προσπάθεια για μείωση του θορύβου θα συνοδευόταν από μια αντίστοιχη μείωση του αριθμού των αναλυτών που θα μπορούσαμε να μετρήσουμε. Τέλος, όσο καλύτερη είναι μια μετρητική τεχνική και μεγαλύτερη η ποικιλία των αντισωμάτων που μπορεί να διαλέξει κάποιος, τόσο μικρότερη θα είναι και η κλίση της συνάρτησης θορύβου και άρα μικρή μείωση του θορύβου θα συνεπαγόταν μεγάλη μείωση του αριθμού των σημάτων που μετράμε. Οπότε, σε αυτή την περίπτωση, της μερικής ισοτροπίας, το πρόβλημα της βελτιστοποίησης αν και υπαρκτό οδηγεί σε τετριμμένες λύσεις λόγω της

μεγάλης ευαισθησίας της συνάρτησης θορύβου και έτσι πρακτικά ο μόνος τρόπος να βελτιωθούν οι μετρήσεις θα ήταν με καλύτερο έλεγχο των συνθηκών του πειράματος.

Όμως, αν η πρόσθεση νέων αναλυτών στο πείραμα δεν αφήνει ανεπηρέαστες τις υπόλοιπες μετρήσεις τότε θα προκύψει μια συνάρτηση θορύβου αύξουσας κλίσης (περίπτωση ανισοτροπίας). Ως εκ τούτου, υπάρχει χώρος για βελτιστοποίηση όχι μέσω του ελέγχου των συνθηκών του πειράματος, ο οποίος για κάθε καλά σχεδιασμένη τεχνική είναι αρκετά δύσκολος, αλλά μέσω κατάλληλου σχεδιασμού του πειράματος, ώστε να επιτυγχάνεται η μικρότερη δυνατή αλληλεπίδραση μεταξύ των μετρήσεων των αναλυτών (ισοδύναμα μεγαλύτερη δυνατή ισοτροπία).

# ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ

## ΜΟΝΤΕΛΟ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

Το μοντέλο βελτιστοποίησης μας θα βασιστεί στην εξάλειψη της ανισοτροπίας του Noise Assay σε συνδυασμό με την εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης αντισωμάτων για την ανίχνευση ενός σήματος.

**Στόχος μας είναι να σχεδιάσουμε ένα πολυπλεκτικό πείραμα στο οποίο η μέτρηση κάθε αναλύτη θα επηρεάζει όσο το δυνατόν λιγότερο τις μετρήσεις των υπολοίπων.**

Ο θόρυβος υποβάθρου είναι ο πιο «απλός» θόρυβος που μπορούμε να συναντήσουμε και δεν υπάρχει τρόπος σχεδιασμού του πειράματος που να τον εξαλείφει, θα υπάρχει ακόμα και στην απλή ELISA. Επιπλέον, λόγω του ότι η αναγνωριστικότητα αποτελεί εσωτερικό μέγεθος που συνοψίζει κάθε αντίδραση θορύβου, αναμένουμε μείωση του θορύβου υποβάθρου θα οδηγήσει και σε μείωση του θορύβου παράπλευρων αντιδράσεων. Με άλλα λόγια ο θόρυβος υποβάθρου αποτελεί μια καλή εκτίμηση του συνολικού θορύβου ειδικά για μεγάλα πειράματα που ιδιαιτερότητες λίγων αντισωμάτων δεν επηρεάζουν πολύ το σύνολο.

Βασικό εργαλείο σε αυτή την προσπάθεια είναι η Δοκιμή Θορύβου Υποβάθρου. Στόχος είναι να χρησιμοποιηθεί η πληροφορία που περιέχει η Δοκιμή Θορύβου Υποβάθρου, σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις των αντισωμάτων, για να σχεδιαστεί ένα βέλτιστο πείραμα.

Η χρήση μόνο του Noise Assay, έχει κάποια μειονεκτήματα, όπως η μη-προφανής συσχέτιση του με τον πίνακα CrossReactivity ή ένα πραγματικό πείραμα, όμως προσφέρει μερικά σημαντικά πλεονεκτήματα στην ανάλυση. Τα σημαντικότερα από αυτά είναι:

1. ο πίνακας Noise Assay είναι το μοναδικό, μέχρι στιγμής, εργαλείο που επιτρέπει την αποσύμπλεξη του θορύβου μιας μέτρησης και την αξιολόγηση της συμπεριφοράς ενός μόνο δευτερεύοντος αντισώματος.
2. σε σχέση με τον CrossReactivity ο Noise Assay παρέχει μια ομοιογενή πληροφορία (κάθε τιμή του είναι θόρυβος) και, επομένως, η βελτιστοποίηση είναι πολύ ευκολότερη καθώς μπορεί να αντιμετωπιστεί ως ενιαίο σύνολο
3. τέλος, ακόμα και για μια συνολικά βέλτιστη λύση, ο θόρυβος υποβάθρου θα πρέπει να ληφθεί υπόψη αν και δεν είναι ανάγκη να ελαχιστοποιείται

## ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΒΕΛΤΙΣΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

### Ορισμός «Βέλτιστου» Πειράματος

Γενικά κάθε σε κάθε βιολογικό πείραμα θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι εξής παράμετροι<sup>17</sup>:

1. **Ειδικευση (specificity)**: τα αντισώματα πρέπει να αντιδρούν ειδικά με το αντιγόνο, ώστε να εξασφαλίζεται ότι το μετρούμενο σήμα αντιστοιχεί όντως στη συγκέντρωση του συγκεκριμένου αντιγόνου.
2. **Ευαισθησία (sensitivity)**: μια μέτρηση πρέπει να μπορεί να αναγνωρίζει όσο το δυνατόν μικρότερες ποσότητες πρωτεϊνών, ώστε να είναι εφικτή και η μείωση του δείγματος.
3. **Απλότητα**: όσο πιο απλή είναι η διαδικασία τόσο λιγότερα πράγματα μπορούν να πάνε στραβά
4. **Αξιοπιστία-Επαναληψιμότητα**: ώστε να μπορούν να συγκριθούν μετρήσεις που έχουν γίνει σε διαφορετικούς χρόνους ή και από διαφορετικά εργαστήρια
5. **Κόστος**
6. **Χρόνος**
7. **Δυνατότητες Πολυπλεξίας (multiplexing capabilities)**: η παράμετρος με την οποία ασχολούμαστε

Στην παρούσα φάση, στόχος είναι να σχεδιαστεί ένα πολυπλεκτικό πείραμα που να έχει το βέλτιστο δυνατό θόρυβο υποβάθρου.

Σχεδιασμός του πειράματος συνήθως αναφέρεται τόσο στον αρχικό σχεδιασμό, τί θέλουμε να υπολογίσουμε με το πείραμα, όσο και στο σχεδιασμό της πειραματικής διαδικασίας, πώς θα το υπολογίσουμε. Στην παρουσία εργασία ο όρος χρησιμοποιείται με την στενή έννοια του αρχικού σχεδιασμού, δηλαδή τι θέλουμε να υπολογίσουμε με το πείραμα.

Σε ένα βέλτιστα σχεδιασμένο πείραμα θέλουμε, λοιπόν, να αποφύγουμε τον περιττό θόρυβο που έχουν οι «κρίσιμες» μετρήσεις μας από τις «περιττές» μετρήσεις που μπορεί να υπάρχουν σε ένα μη-βέλτιστα σχεδιασμένο πείραμα.

Βάσει της υπόθεσης για τη συνάρτηση μέσου θορύβου είναι φανερό ότι όσο λιγότερους αναλύτες περιλαμβάνει το πείραμα τόσο λιγότερο θόρυβο υποβάθρου θα έχουμε. Γι' αυτό το λόγο, ο βέλτιστος θόρυβος δεν ταυτίζεται με τον ελάχιστο, διότι τότε το βέλτιστο πείραμα θα προέκυπτε ως η τετριμμένη λύση του να μην γίνει το πείραμα, αφού τότε δεν θα υπάρχει και θόρυβος.

---

<sup>17</sup> Όπως του παραθέτει ο Vignali στο «Multiplexed particle-based flow cytometric assays» (Review)

Το πώς ορίζεται ο βέλτιστος θόρυβος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τους στόχους του πειράματος. Γενικά, βέλτιστος θόρυβος είναι ο ελάχιστος δυνατός θόρυβος δεδομένης της πλήρους επίτευξης των στόχων του πειράματος. Αν, για παράδειγμα, στόχος είναι η μέτρηση  $N$  αριθμού πρωτεϊνών, τότε ο ελάχιστος δυνατός θόρυβος για ένα πείραμα  $N$  αναλυτών είναι και ο βέλτιστος. Οι στόχοι (συνθήκες) του πειράματος με τη σειρά τους καθορίζονται, εν πολλοίς, από τις ανάγκες του μοντέλου στο οποίο εντάσσεται.

Βάσει αυτών των παρατηρήσεων προκύπτει ότι ο βέλτιστος θόρυβος ταυτίζεται με το θόρυβο που παράγει ένα βέλτιστα σχεδιασμένο πείραμα. Ένα πείραμα, δηλαδή, που καλύπτει πλήρως και μόνο τις ανάγκες του μοντέλου που θα το χρησιμοποιήσει και δε δίνει καμία επιπλέον πληροφορία, αφού επιπλέον πληροφορία συνεπάγεται και επιπλέον θόρυβο για όλο το πείραμα.

Η παρούσα εργασία, επειδή δεν εντάσσεται άμεσα σε κάποιο βιολογικό μοντέλο δεν έχει εξειδικευμένους στόχους. Γι' αυτό η βελτιστοποίηση γίνεται στη βάση μιας «συνολικά βέλτιστης λύσης», που δεν υπάγεται δηλαδή σε συγκεκριμένους περιορισμούς-συνθήκες. Εν τούτοις, η λογική της βελτιστοποίησης μπορεί εύκολα να τροποποιηθεί για να καλύψει όλο σχεδόν το εύρος των απαιτήσεων που θα μπορούσε κάποιος να έχει από ένα πείραμα.

Το πρώτο λοιπόν βήμα για να βρούμε ποιο πείραμα αντιστοιχεί στο βέλτιστο θόρυβο είναι να υπολογίσουμε τη σχέση θορύβου με τον αριθμό των αναλυτών, τη συνάρτηση μέσου θορύβου όπως αυτή ορίστηκε προηγουμένως δηλαδή. Η συνάρτηση αυτή θα προκύψει αν υπολογίσουμε για όλα τα πιθανά πλήθη αναλυτών τον ελάχιστο θόρυβο. Το πρόβλημα μας, άρα, είναι να βρούμε από τη συνολική λίστα των 80 διαθέσιμων αναλυτών που συμμετείχαν στη Δοκιμή Θορύβου Υποβάθρου, ποιοι είναι αυτοί οι αναλύτες που συνθέτουν το καλύτερο δυνατό πείραμα  $\#n$  αναλυτών, όπου  $n=1,2,..80$  το πλήθος των αναλυτών και ο αριθμός-όνομα του κάθε πειράματος.

### **Αλγόριθμος Βελτιστοποίησης**

Όπως κάθε αλγόριθμος βελτιστοποίησης χρειάζεται μια συνάρτηση στόχο, την οποία θα προσπαθεί να ελαχιστοποιήσει ή μεγιστοποιήσει, και κάποιους περιορισμούς. Έστω, λοιπόν, ότι θέλουμε να **βελτιστοποιήσουμε το πείραμα  $\#n$** .

Μιας και το πρόβλημα είναι κατ' ουσία πρόβλημα επιλογής, εισάγουμε για τη λύση του ένα διάνυσμα επιλογής  $\mathbf{x}$  με 80 τιμές, όπου κάθε τιμή  $i$  αντιστοιχεί σε έναν αναλύτη από 1 έως 80, για το οποίο ισχύει  $x_i=1$ , αν το αντίσωμα που αντιστοιχεί στην θέση  $i$  επιλεγεί για τον πείραμα  $\#n$  και  $x_i=0$  αν δεν επιλέγει.

Επειδή για την ανίχνευση κάθε αναλύτη χρειάζονται δύο (2) αντισώματα, πρωτεύον και δευτερεύον, χρειάζονται θεωρητικά και δύο (2) διανύσματα επιλογής, όμως, επειδή δεν έχει

νόημα να χρησιμοποιηθεί ένα αντίσωμα χωρίς το συμπληρωματικό του, καθώς αυτό θα προσέθετε θεωρητικά μόνο θόρυβο και όχι σήμα, τα δύο (2) διανύσματα ταυτίζονται.

Το διάνυσμα  $x$  αντιστοιχεί απεικονίζει ποιες σειρές ( $2^{0v}$  αντίσωμα) και στήλες ( $1^{0v}$  αντίσωμα) του πίνακα Noise Assay πρέπει να επιλεγούν για το νέο πείραμα και οι οποίες θα συνθέτουν έναν νέο μικρότερο πίνακα θορύβου.

Επομένως, η συνάρτηση στόχος είναι να ελαχιστοποιηθεί ο Μέσος Θόρυβος καινούργιου πειράματος, δηλαδή ο νέος πίνακας που θα προκύψει από τα τελικώς επιλεγμένους αναλύτες (και άρα σετ αντισωμάτων) να έχει το μικρότερο δυνατό άθροισμα στοιχείων<sup>18</sup>. Δηλαδή αν  $C_{i,j}$  συμβολίζει το στοιχείο της  $i$  σειράς και  $j$  στήλης του πίνακα Noise Assay η συνάρτηση στόχος που πρέπει να ελαχιστοποιηθεί είναι η:

$$\sum_{i=1}^{80} \sum_{j=1}^{80} x_i x_j C_{i,j}$$

Και ο περιορισμός που πρέπει να ικανοποιεί είναι ο συνολικός αριθμός των επιλεγμένων σετ να είναι ίσο με τον αριθμό του πειράματος  $n$  στο οποίο αντιστοιχεί. Δηλαδή:

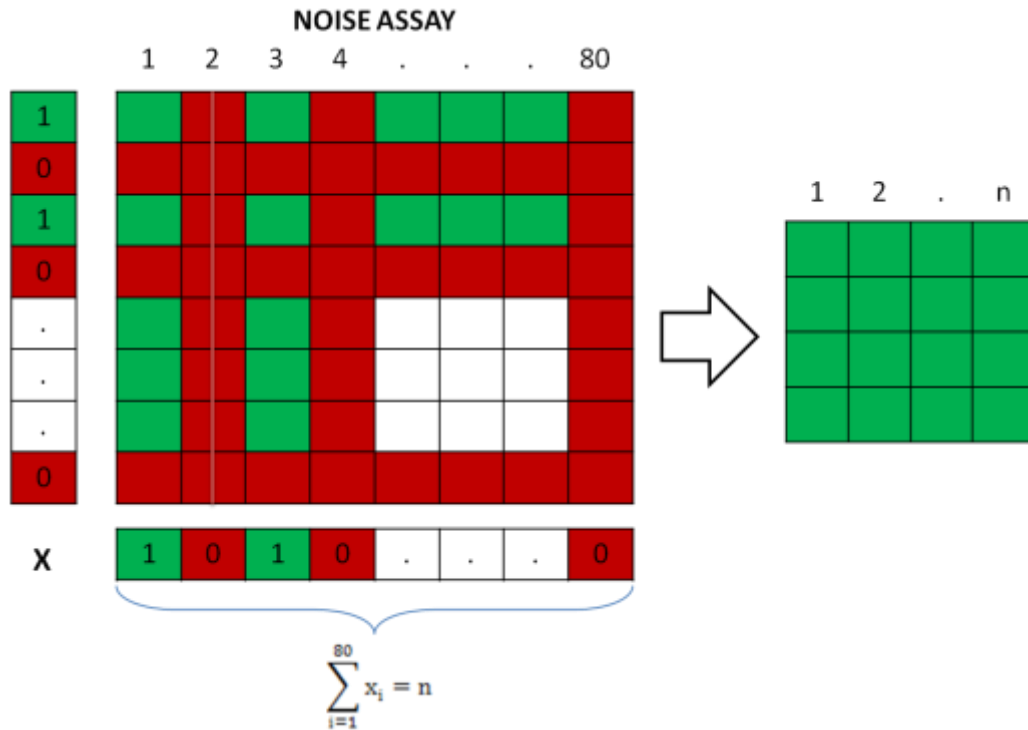
$$\sum_{i=1}^{80} x_i = n$$

Η συνάρτηση στόχος με τον περιορισμό της μπορούν να επιλυθούν μέσω της πλατφόρμας GAMS χρησιμοποιώντας τον επιλυτή BARON ως πρόβλημα μεικτών ακεραίων διονυμικά περιορισμένο (MIQCP – Mixed Integer Quadratic Constrained Problem).

Παρόλα αυτά, η επίλυση του συγκεκριμένου προβλήματος μπορεί να γίνει υπολογιστικά πολύ απαιτητική, όταν οι πιθανοί συνδυασμοί αντισωμάτων αυξηθούν. Ο αριθμός συνδυασμών προκύπτει από τη γνωστή σχέση  $\binom{80}{n}$  και γίνεται μέγιστος για το πείραμα #40, όμως στην πράξη οι μέγιστοι χρόνοι υπολογισμού εμφανίστηκαν για τα πειράματα #11 έως #35 λόγω των ιδιομορφιών του πίνακα<sup>19</sup>.

<sup>18</sup> για κάθε (ξεχωριστό) πρόβλημα βελτιστοποίησης #n ο παρονομαστής είναι σταθερός (=n) επομένως αρκεί να ελαχιστοποιηθεί μόνο το άθροισμα του αριθμητή

<sup>19</sup> Αν σκεφτούμε το πρόβλημα σαν πρόβλημα πίσω διαγραφής (κάθε φορά αφαιρείται ο χειρίστος αναλύτης) τότε όσο πιο ομοιόμορφος είναι ο πίνακας που αντιμετωπίζουμε τόσο δυσκολότερα μπορούμε να τον εντοπίσουμε. Επομένως σε αυτό το διάστημα οι πιθανοί χειρίστοι αναλύτες ήταν εν πολλοίς ίδιοι οπότε ο αλγόριθμος έπρεπε να κάνει πολλές δοκιμές για να τους εντοπίσει.



Εικόνα 20: γραφική αναπαράσταση αλγορίθμου

### Γραμμικοποίηση

Για να επιταχυνθεί η διαδικασία αποφασίστηκε να γραμμικοποιηθεί το πρόβλημα, ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν πιο γρήγοροι επιλυτές. Η γραμμικοποίηση γίνεται υπολογίζοντας το γινόμενο  $x_i \cdot x_j$ .

Το πρόβλημα θα γινόταν γραμμικό αν μπορούσαμε να χρησιμοποιήσουμε, αντί για τον γινόμενο  $x_i \cdot x_j$ , ένα πίνακα  $x_{i,j}$  ο οποίος να ταυτιζόταν με το εξωτερικό γινόμενο του διανύσματος  $x$  με τον ανάστροφο του, έτσι ώστε κάθε στοιχείο του αρχικού πίνακα να συμμετέχει στον καινούργιο αν και μόνο αν και η σειρά του και η στήλη του έχουν επιλεγεί. Η αλλαγή αυτή γίνεται με χρήση κατάλληλων περιορισμών, ώστε ο πίνακας να αποκτήσει τις κατάλληλες ιδιότητες, δηλαδή για κάθε γραμμή που επιλέγεται, να επιλέγεται και η αντίστοιχη στήλη και η κύρια διαγώνιος να έχει άθροισμα ίσο με τον αριθμό του πειράματος  $\#n$ .

Οι περιορισμοί που ικανοποιούν αυτές τις απαιτήσεις είναι οι εξής

1.  $\sum_i x_{i,i} = n$ , το ίχνος της διαγωνίου ισούται με τον αριθμό του πείραματος και έτσι εξασφαλίζεται ότι θα επιλεγεί ο σωστός αριθμός αναλυτών
2.  $\sum_i x_{i,j} = n \cdot x_{j,j}$ , το άθροισμα των στοιχείων μιας στήλης πρέπει να είναι ίσο με τον αριθμό των αναλυτών  $n$  αν η σειρά έχει επιλεγεί, αλλιώς πρέπει να είναι μηδέν. Έτσι εξασφαλίζεται ότι κάθε μικροσφαιρίδιο που επιλέγεται, επιλέγεται για όλους τους συνδυασμούς του πειράματος



3.  $\sum_j x_{i,j} = n \cdot x_{i,i}$ , ομοίως για κάθε δευτερεύον αντίσωμα.

### Τελική Μορφή

Όποτε το πρόβλημα μπορεί να γραφεί στη γραμμική του μορφή:

**Να υπολογιστεί πίνακας  $x$  τέτοιος ώστε να ελαχιστοποιεί τη συνάρτηση:**

$$\sum_{i=1}^{N=80} \sum_{j=1}^{N=80} x_{i,j} C_{i,j}$$

**Υπόψη των περιορισμών:**

$$\sum_i x_{i,i} = n$$

$$\sum_i x_{i,j} = n \cdot x_{j,j}$$

$$\sum_j x_{i,j} = n \cdot x_{i,i}$$

την οποία και επιλύουμε ως πρόβλημα μικτών ακεραίων (Mixed Integer Problem-MIP) πάλι μέσω της πλατφόρμας GAMS χρησιμοποιώντας τον επιλυτή CPLEX. Η διαγώνιος του πίνακα  $x_{i,j}$  ισούται με το διάνυσμα  $x_i$  της αρχικής μορφής.

### ΒΕΛΤΙΣΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ

Σε αντίθεση με τον σχεδιασμό του πειράματος, στον υπολογισμό της βέλτιστης συγκέντρωσης αντισωμάτων ανίχνευσης μπορεί να γίνει χρήση μιας συνάρτησης καθαρού κέρδους. Αυτή τη δυνατότητα υπάρχει επειδή οι πίνακες βαθμονόμησης, που χρησιμοποιούνται στον υπολογισμό, εκτός από τον θόρυβο περιέχουν και μετρήσεις πραγματικού σήματος.

Και σε αυτή την περίπτωση, βέβαια, δεν μπορούμε να μιλήσουμε για «αντικειμενικά» κριτήρια καθώς οι ανάγκες του πειράματος πάντα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη, όμως οι επιλογές είναι πολύ λιγότερες και σαφώς καθορισμένες σε σχέση με το σχεδιασμό του πειράματος ο οποίος εξαρτάται κυρίως από τις ανάγκες της μοντελοποίησης και όχι της μέτρησης. Η επιλογή μιας «συνάρτησης κέρδους» πρέπει να έχει στόχο να περιορίσει τα πιθανά σφάλματα μιας μέτρησης και όχι απλά να ελαχιστοποιήσει το θόρυβο ή να μεγιστοποιήσει το σήμα. Για παράδειγμα, η μεγιστοποίηση της διαφοράς σήματος-θορύβου δεν εξασφαλίζει ότι κατά την μέτρηση θα αποφύγουμε να θεωρήσουμε κάποιο θόρυβο σαν υπαρκτό σήμα, και αυτό διότι επιτρέπει στον θόρυβο να πάρει αρκετά μεγάλες τιμές, αν η διαφορά μένει μεγάλη.

Στο δικό μας μοντέλο, η βέλτιστη συγκέντρωση υπολογίζεται με βάση τον λόγο Σήματος προς Θόρυβο (SNR- Signal to Noise Ratio). Η μεγιστοποίηση του λόγου αυτού εξασφαλίζει ότι το σήμα θα είναι πάντα πολλαπλάσια μεγαλύτερο του θορύβου. Εναλλακτικά θα μπορούσαμε να χρησιμοποιήσουμε ένα πιο σύνθετο κριτήριο το οποίο να εξασφαλίζει πάντα πολύ μικρές τιμές του θορύβου, όπως για παράδειγμα τη μεγιστοποίηση του λόγου ή της διαφοράς, αλλά με την επιπλέον συνθήκη ότι ο θόρυβος πρέπει να είναι κάτω από μια τιμή. Ο λόγος που δεν επιλέγεται ένα σύνθετο κριτήριο είναι ότι κάτι τέτοιο θα οδηγούσε και σε μικρότερα σήματα και άρα μικρότερη ευαισθησίας στις διαφοροποιήσεις της συγκέντρωσης. Πάντως, πολλά βιολογικά μοντέλα βασίζονται σε Boolean λογική, στην οποία δε χρειάζεται η μέτρηση να διαχωρίζει ανάμεσα στις διάφορες συγκεντρώσεις, απλά να απαντά στο ερώτημα αν υπάρχει ή όχι ο συγκεκριμένος αναλύτης στο δείγμα.

Η διαδικασία επιλογής της βέλτιστης συγκέντρωσης είναι η εξής:

1. Διαιρούμε κάθε στήλη του πίνακα βαθμονόμησης με τη στήλη θορύβου (μηδενική συγκέντρωση αντιγόνου) και έτσι προκύπτει ο πίνακας των SNR.
2. Για κάθε σειρά του πίνακα SNR, υπολογίζουμε τον μέσο όρο. Έτσι προκύπτει το μέσο SNR για κάθε συγκέντρωση δευτερεύοντος αντισώματος.
3. Τέλος επιλέγουμε τη συγκέντρωση (σειρά) που δίνει τον μεγαλύτερο μέσο όρο προσέχοντας, όμως, αυτός να μην οφείλεται σε εμφανώς λάθος μετρήσεις

Η λογική της βελτιστοποίησης είναι ότι, εφόσον στην πραγματική μέτρηση δε θα είναι γνωστή εκ των προτέρων η συγκέντρωση του αντιγόνου, στο δείγμα επιλέγεται η συγκέντρωση αντισώματος που δίνει για όλες τις πιθανές συγκεντρώσεις τον καλύτερο μέσο όρο. Και εδώ θα είναι δυνατή η χρήση πιο σύνθετων κριτηρίων, για παράδειγμα περιορισμούς στο ελάχιστο SNR ή επιλογή με βάση κάποια εκ των προτέρων εκτίμηση της συγκέντρωσης, όμως και πάλι κρίθηκε ότι η αποτελεσματικότητα αυτών των κριτηρίων δε δικαιολογεί τη «θυσία» σε απλότητα που απαιτούν από το μοντέλο.

### Πίνακας Βαθμονόμησης

μΕΡΚ #01	Standard (µg/ml)												
	400000	200000	100000	50000	25000	12500	6250	3125	1563	781	391	0	
Zndary (ng/ml)	4000	23748	13133	23256	15678	11604	8061	3915	2013	1095	436	272	100
	2000	11516	23183	20002	15619	10958	6089	4160	1935	1013	411	269	51
	1000	22961	10186	10737	15006	11302	6083	3469	1429	775	284	107	24
	500	23204	14515	17679	14664	10967	7050	3411	1254	825	337	111	19
	250	20261	17717	16840	11591	8062	6488	2589	1769	583	117	150	10
	125	11900	12749	15229	8067	7088	4299	3834	1808	451	196	94	16
	63	4077	10039	9207	7906	5798	3183	1987	828	172	175	88	13
	0	58	44	42	52	44	38	38	25	11	12	11	9

### Πίνακας SNR

μΕΡΚ #02	Standard (µg/ml)												
	100000	50000	25000	12500	6250	3125	1563	781	391	195	98	0	
Zndary (ng/ml)	4000	232	226	207	153	113	79	38	20	11	4	3	1
	2000	453	444	385	300	211	117	80	37	19	8	5	1
	1000	957	841	781	629	463	287	145	60	32	12	4	1
	500	1254	785	956	793	593	381	184	68	44	18	6	1
	250	2026	1772	1684	1159	866	641	259	177	58	32	15	1
	125	869	797	952	567	443	269	115	63	28	12	6	1
	63	694	803	737	632	464	248	153	66	30	14	7	1
	0	6	5	5	6	5	4	4	3	1	1	1	1

Μέγιστο Μέσο SNR

Εικόνα 21: γραφική αναπαράσταση αλγορίθμου

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

Η βάση του αλγορίθμου είναι τα δύο (2) πειράματα που περιγράφηκαν, η Δοκιμή Θορύβου και η Δοκιμή Διασταυρούμενων Αντιδράσεων. Τα δύο (2) αυτά πειράματα σχεδιάστηκαν για να μετρήσουν κάποια ήδη θορύβου, σε ένα κανονικό πείραμα όμως τα διάφορα ήδη θορύβου συνδυάζονται με άγνωστο τρόπο, ώστε να δώσουν τον τελικό θόρυβο ενός πειράματος. Κρίσιμο, επομένως, σημείο της μοντελοποίησης μας είναι να δούμε πώς συνδέονται αυτά τα πειράματα και πώς, τελικά, από αυτά μπορούμε να προβλέψουμε και, εν τέλει, να βελτιστοποιήσουμε τον συνολικό θόρυβο ενός πειράματος



Εικόνα 22: Πειράματα

### Παρατηρήσεις για τα 2 Πειράματα Θορύβου

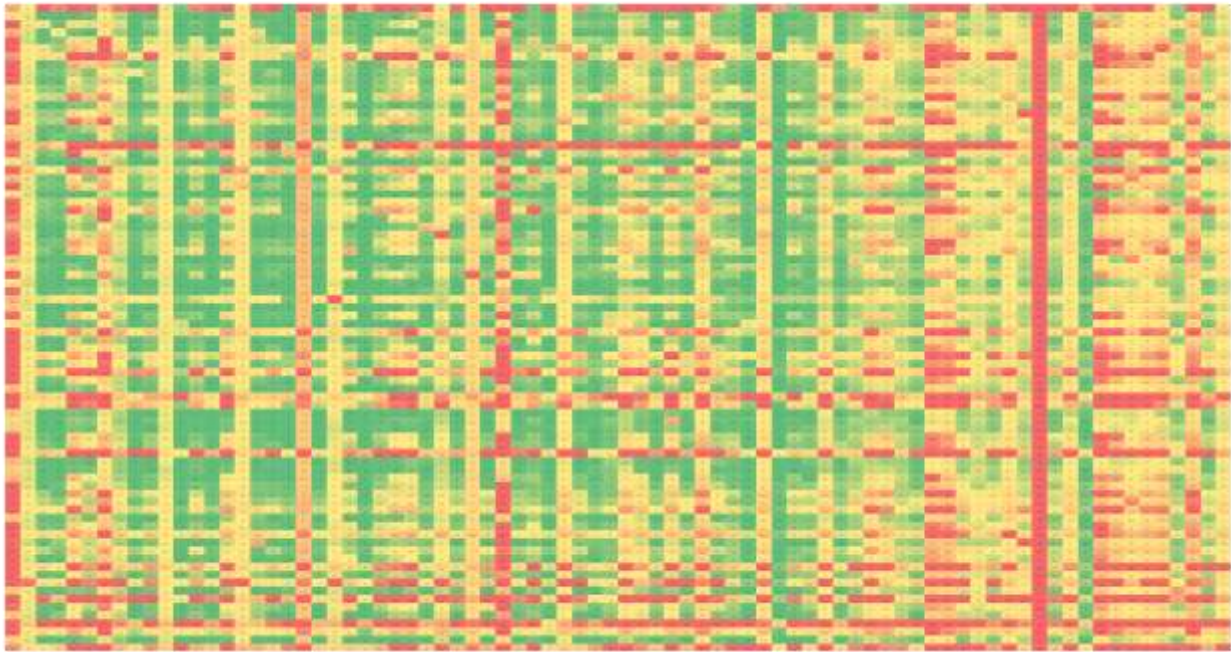
Επειδή το τελικό πείραμα θα πραγματοποιηθεί στις βέλτιστες συγκεντρώσεις αντισωμάτων πρέπει και τα αντίστοιχα πειράματα θορύβου που το ερμηνεύουν να είναι στις βέλτιστες συγκεντρώσεις. Έτσι, οι συγκεντρώσεις των αντισωμάτων για τα δύο (2) πειράματα θορύβου είναι οι βέλτιστες, βάσει της ανάλυσης που προηγήθηκε (κριτήριο SNR). Η λίστα με τις βέλτιστες συγκεντρώσεις αντισωμάτων για κάθε αναλύτη παρατίθεται στο παράρτημα.

### Πίνακας *Noise Assay*

Η Δοκιμή Υποβάθρου επιστρέφει, τελικά, ως αποτέλεσμα ένα πίνακα 80x80, τον «*Noise Assay*». Κάθε στήλη του *Noise Assay* αντιστοιχεί σε ένα μικροσφαιρίδιο και κάθε σειρά του σε ένα αντισώμα ανίχνευσης. Επομένως, κάθε στοιχείο του *Noise Assay*  $C_{i,j}$  απεικονίζει την ένταση θορύβου που δίνει ο συνδυασμός του  $i$  αντισώματος με το  $j$  μικροσφαιρίδιο.

Για να είναι πιο άμεσα προσβάσιμη η πληροφορία που εμπεριέχεται στον πίνακα και επειδή στόχος είναι να γίνει μια συγκριτική μελέτη των αντισωμάτων, ο *Noise Assay* χρωματίζεται. Ο χρωματισμός γίνεται στη βάση μιας τρι-χρωματικής κλίμακας κατά την οποία η διάμεσος τιμή του πίνακα χρωματίζεται «κίτρινη», ενώ οι 640 μεγαλύτερες τιμές (10% του συνόλου)

χρωματίζονται «κόκκινες» και οι 640 μικρότερες χρωματίζονται «πράσινες». Κάθε τιμή μεταξύ της διάμεση τιμής και του 90<sup>ου</sup> εκατοστημορίου χρωματίζεται με ένα συνδυασμό κίτρινου και κόκκινου. Η αναλογία των δύο (2) χρωμάτων καθορίζεται από το λόγο των αποστάσεων των 2 ακραίων περιπτώσεων (μέση και 90<sup>η</sup> τιμή) από την συγκεκριμένη τιμή. Για παράδειγμα, το ημίθροισμα της διαμέσου τιμής και του 90<sup>ου</sup> εκατοστημορίου θα χρωματιστεί καθαρά πορτοκαλί, διότι θα πρέπει να περιέχει ίση ποσότητα κόκκινου και κίτρινου χρώματος. Αντίστοιχα χρωματίζονται και οι τιμές που βρίσκονται μεταξύ του 10<sup>ου</sup> εκατοστημορίου και της διάμεσου τιμής (50<sup>ου</sup> εκατοστημορίου). Το αποτέλεσμα φαίνεται παρακάτω:



Εικόνα 23: Πίνακας Noise Assay

Όπως αναφέρθηκε, κάθε στήλη του πίνακα αντιστοιχεί σε ένα αντίσωμα παγίδευσης και κάθε σειρά σε ένα αντίσωμα ανίχνευσης τα οποία αντιστοιχούν σε κάποιο αναλύτη. Οι αναλύτες που παρατίθενται με την αντίστοιχη σειρά παράθεσης και τους αριθμούς μικροσφαιριδίων που τους χαρακτηρίζουν είναι οι εξής:

Πίνακας 2: Αναλύτες

1	#7	IL2	21	#35	IFNG	41	#58	ICAM1	61	#80	IL31
2	#8	CCL20	22	#36	LYAM1	42	#59	IL22	62	#81	NRG1
3	#9	PDGFB	23	#37	CXL16	43	#61	TNF10	63	#82	FGF2
4	#12	CXCL7	24	#38	CSF3	44	#62	IL10	64	#83	TNF12
5	#13	PLGF	25	#39	SCF	45	#63	FST	65	#84	BD3
6	#14	CSF2	26	#42	BMP2	46	#64	NGF	66	#85	IL1RA
7	#15	CRP	27	#43	MIA2	47	#65	IL21	67	#86	CXCL2
8	#18	CXL11	28	#44	IL8	48	#66	CCL3	68	#87	LEP
9	#19	IL13	29	#45	NGAL	49	#67	IL17	69	#88	IL7
10	#20	BTC	30	#46	IL17F	50	#68	TIMP1	70	#89	CXL9
11	#21	HAVR1	31	#47	IL12A	51	#69	CXL10	71	#90	CCL2
12	#22	PERT	32	#48	IL3	52	#70	PROK1	72	#91	NEUS
13	#25	CTGF	33	#49	RAGE	53	#72	CCL5	73	#93	IL33
14	#26	IL4	34	#51	TNFA	54	#73	IL9	74	#94	NOV
15	#27	MK	35	#52	TNR11	55	#74	IL5	75	#95	IL25
16	#28	IL1B	36	#53	IL1A	56	#75	D104A	76	#96	CCL11
17	#29	GROA	37	#54	X3CL1	57	#76	DFB1	77	#97	DFB4A
18	#30	EGF	38	#55	TNF15	58	#77	RETN	78	#98	PAI1
19	#33	CCL26	39	#56	TNR9	59	#78	IL20	79	#99	VEGFB
20	#34	TSLP	40	#57	IL6	60	#79	CNTF	80	#100	CD40L

Επομένως η 1<sup>η</sup> στήλη και η 1<sup>η</sup> σειρά του πίνακα αντιστοιχούν στα αντισώματα παγίδευσης και ανίχνευσης του αναλύτη IL2 τον οποίο αναγνωρίζει το μικροσφαιρίδιο #7, ενώ για παράδειγμα το στοιχείο της 2<sup>ης</sup> στήλης και 15<sup>ης</sup> σειράς αντιστοιχεί στο συνδυασμό του αντισώματος παγίδευσης του CCL20 (#8) και του αντισώματος ανίχνευσης του MK (που κανονικά αναγνωρίζεται από το μικροσφαιρίδιο #27).

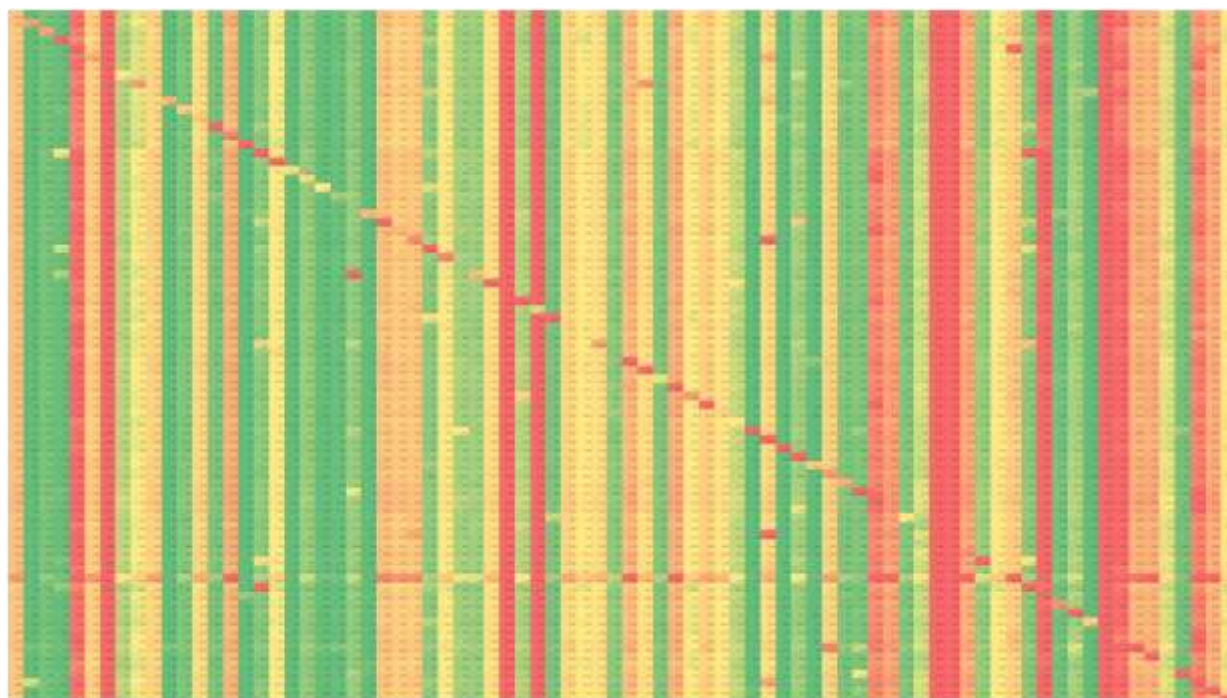
### Πίνακας CrossReactivity

Η δοκιμή Διασταυρούμενων Αντιδράσεων επιστρέφει και αυτή έναν πίνακα 80x80 τον «CrossReactivity». Όπως και στον Noise Assay, κάθε στήλη του CrossReactivity αντιστοιχεί σε ένα μικροσφαιρίδιο, όμως κάθε σειρά δεν αντιστοιχεί ένα αντίσωμα ανίχνευσης (σε κάθε βοθρίο υπάρχουν όλα τα αντισώματα ανίχνευσης), αλλά ένας αναλύτης.



Η αναμενόμενη μορφή του πίνακα, σε ιδανικές συνθήκες, είναι διαγώνια (μεγάλες τιμές στην διαγώνιο και σχεδόν μηδενικές τιμές στα μη-διαγώνια στοιχεία), διότι μόνο τα σημεία της διαγωνίου αντιστοιχούν σε υπαρκτό σήμα, αφού βάσει της δομής του πίνακα σε αυτά αναμένεται να σχηματιστεί το sandwich ELISA<sup>20</sup>.

Η τελική μορφή του πίνακα CrossReactivity φαίνεται παρακάτω χρωματισμένη με βάση την ίδια τρι-χρωματικής κλίμακας που χρησιμοποιήθηκε για τον Noise Assay.



Εικόνα 24: Πίνακας CrossReactivity

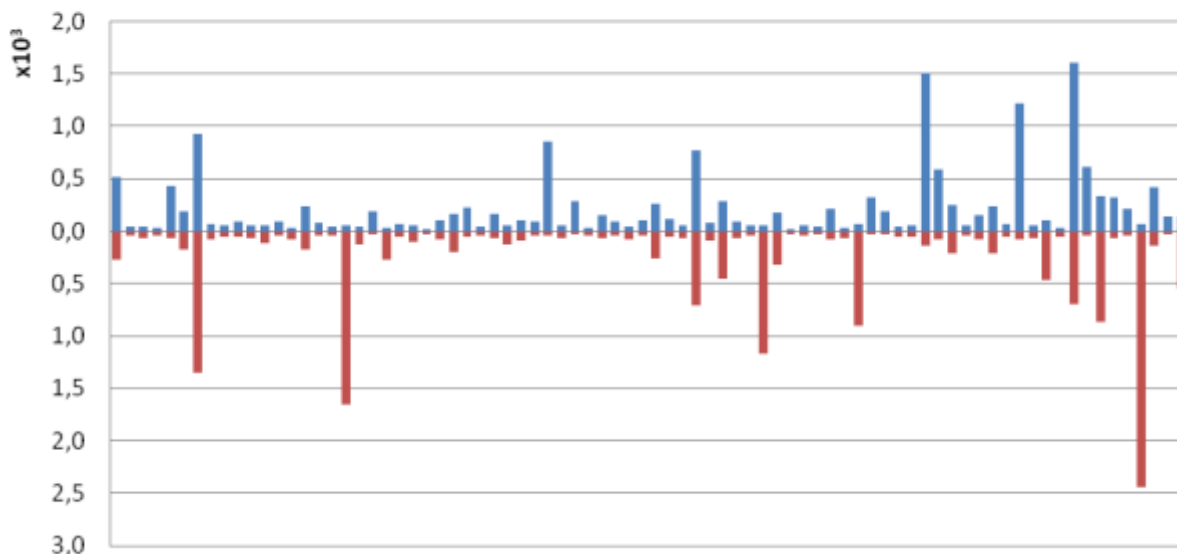
### **Σχολιασμός-Σύγκριση Πινάκων**

Ο Noise Assay δεν παρουσιάζει ενιαία (ομοιόμορφη) συμπεριφορά, όπως θα όφειλε αν ήταν αποτέλεσμα τυχαίων αντιδράσεων, ούτε κάποια ευδιάκριτη «χρωματική πατέντα», σε αντίθεση με τον CrossReactivity για τον οποίο εύκολα γίνεται αντιληπτό ότι ο θόρυβος διαφοροποιείται κυρίως κατά στήλες.

Οι μέσες τιμές κάθε στήλης και σειράς του Noise Assay φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα με μπλε και κόκκινο χρώμα αντίστοιχα.

<sup>20</sup> ο κάθε αναλύτης, που αντιστοιχεί σε μια σειρά  $R_i$ , ανιχνεύεται από το πρωτεύον αντίσωμα, της στήλης  $C_i$ , και το αντίστοιχο δευτερεύον, το οποίο είναι παρόν σε όλα τα κελιά. Επομένως, κάθε στοιχείο που ανήκει ταυτόχρονα σε μια σειράς  $R_i$  και την αντίστοιχη στήλη  $C_i$  (ανήκει δηλαδή στη διαγώνιο) αντιστοιχεί σε υπαρκτό σήμα, ενώ τα υπόλοιπα στοιχεία αντιστοιχούν σε θόρυβο

## Μέσες Τιμές Noise Assay

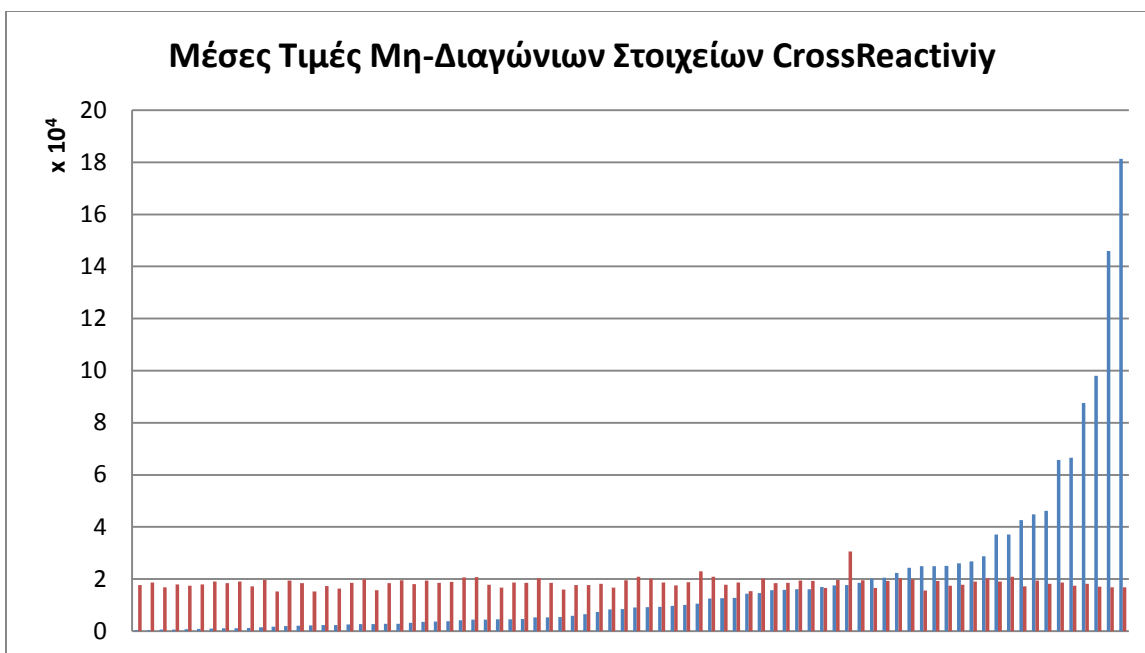


Εικόνα 25: Διάγραμμα μέσων τιμών Noise Assay

Η δοκιμή Θορύβου Υποβάθρου δείχνει ότι τα αντισώματα (πρωτεύοντα ή δευτερεύοντα) δεν έχουν όλα κοινή συμπεριφορά. Για παράδειγμα, από τον πίνακα και το διάγραμμα γίνεται αντιληπτό ότι μερικές γραμμές και στήλες έχουν σαφώς ανεβασμένες τιμές σε σχέση με τις υπόλοιπες πράγμα που δηλώνει γενικώς θορυβώδη συμπεριφορά ενός αντισώματος. Επιπλέον, φαίνεται ότι ορισμένα κελιά ξεχωρίζουν από στη στήλη ή τη γραμμή τους, γεγονός που μπορεί να υποδεικνύει κάποια ιδιαίτερη αλληλεπίδραση. Οι συμπεριφορές αυτές μπορεί να οφείλονται, βάσει των όσων έχουμε αναφέρει, στο ότι τα συγκεκριμένα αντισώματα έχουν επιτόπους οι οποίοι είναι γενικά ή ειδικά εύκολα αναγνωρίσιμοι από άλλα αντισώματα. Όλα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο θόρυβος δεν οφείλεται σε τυχαία γεγονότα, αλλά ότι υπάρχουν λόγοι πίσω από αυτή την ανισοτροπία του πίνακα (η οποία με τη σειρά της αποτελεί τη βάση του μοντέλου βελτιστοποίησης) .

Αντίστοιχα με το διάγραμμα μέσων τιμών του Noise Assay, οι μέσες τιμές των μη-διαγώνιων στοιχείων του CrossReactiviy, διατεταγμένες από την στήλη με την μικρότερη μέση τιμή στη στήλη με την μεγαλύτερη, φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα:





Εικόνα 26: Διάγραμμα μέσων τιμών μη-διαγώνιων στοιχείων CrossReactivity

Από το διάγραμμα προκύπτει ότι ο θόρυβος κάθε σειράς είναι εν πολλοίς σταθερός και έτσι οι όποιες διαφοροποιήσεις υπάρχουν είναι κατά στήλη. Η συμπεριφορά αυτή του CrossReactivity είναι αναμενόμενη, από μian άποψη, καθώς όλα τα κελιά μιας στήλης έχουν ενιαία σύσταση και το μόνο που διαφοροποιείται από γραμμή σε γραμμή είναι το αντιγόνο. Εναλλακτικά μπορούμε να πούμε ότι κάθε βοθρίο έχει κατά βάση ίδια σύσταση με τα υπόλοιπα και γι' αυτό δεν περιμένουμε να υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση του θορύβου από βοθρίο σε βοθρίο.

Η παρατήρηση αυτή δε δείχνει αναγκαστικά ότι το αντιγόνο (αναλύτης) δεν έχει τη δυναμική να διαφοροποιήσει το θόρυβο μιας μέτρησης, αλλά ότι το αντιγόνο *στη συγκεκριμένη αναλογία* (χονδρικά η συγκέντρωση του είναι 1/80 σε σχέση με όλα τα δευτερεύοντα αντισώματα) δεν έχει τη δυνατότητα να διαφοροποιήσει σημαντικά το θόρυβο μιας μέτρησης<sup>21</sup>. Σε αντίθεση με την αντίδραση στόχο, όπου το αντιγόνο αντιδρά ειδικά με το αντίσωμα, οι αντιδράσεις θορύβου είναι μη-ειδικές αντιδράσεις, επομένως, δεν υπάρχει κάποιος λόγος διαφοροποίησης των αντιγόνων από τα αντισώματα. Αυτή η παρατήρηση οδήγησε και στο σχηματισμό της αρχικής υπόθεσης ότι ο θόρυβος προέρχεται κυρίως από τις αλληλεπιδράσεις των αντισωμάτων.

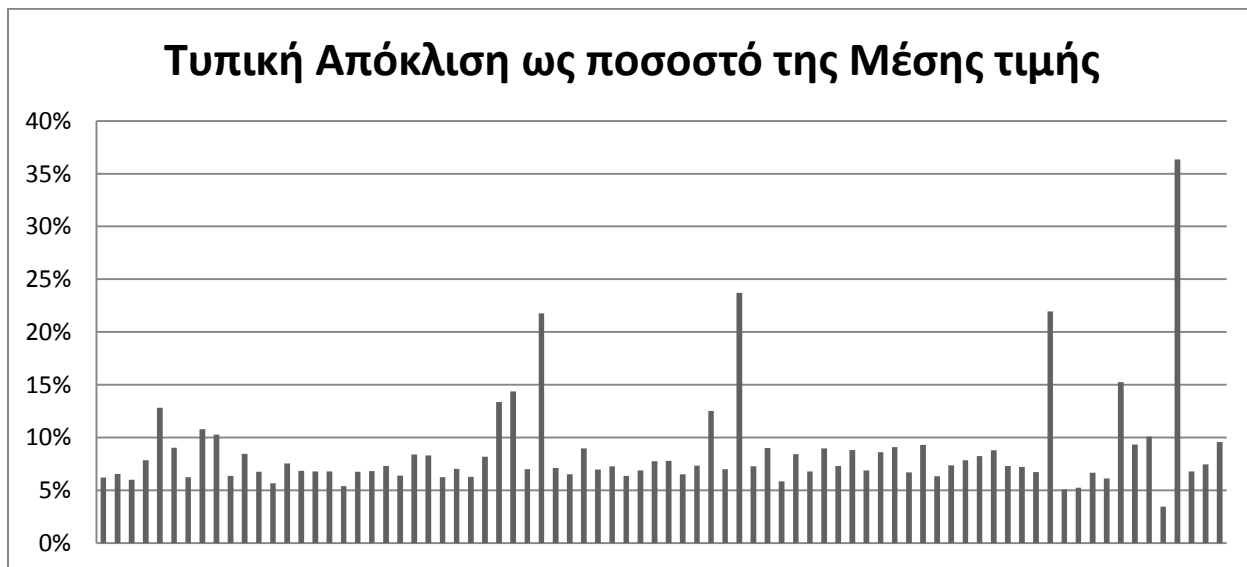
<sup>21</sup> Γενικά, η συγκέντρωση ενός αναλύτη δεν είναι εκ των προτέρων γνωστή, όμως, όπως είδαμε και στα πειράματα βαθμονόμησης, οι μετρούμενες συγκεντρώσεις αναλυτών είναι της τάξης των ng/ml ενώ των αντισωμάτων ανίχνευσης είναι της τάξης των mg/ml

## Σύνδεση Πειραμάτων

Σε κάθε κελί του CrossReactivity συνυπάρχουν όλοι οι πιθανοί συνδυασμοί αντισωμάτων με το μικροσφαιρίδιο στο οποίο αντιστοιχεί, είναι επί της ουσίας μια συμπύκνωση της αντίστοιχης στήλης του Noise Assay. Αυτός είναι και ο λόγος που οι τιμές του CrossReactivity είναι τόσο μεγαλύτερες από τις τιμές του Noise Assay, αφού ο τελευταίος αποτελεί στην ουσία «απλοποίηση» του πρώτου. Στόχος, επομένως, είναι να βρεθεί ένας τρόπος ώστε από τις τιμές μιας στήλης του Noise Assay να μπορεί να προβλεφθεί η μέση τιμή των μη-διαγώνιων στοιχείων της στήλης του πίνακα CrossReactivity.

Λόγω του ότι η ο CrossReactivity εμφανίζει σταθερή συμπεριφορά ανά στήλη, η μέση τιμή των μη-διαγώνιων στοιχείων είναι μια καλή αντιπροσωπευτική τιμή για τη στήλη.

Αυτό φαίνεται ενδεικτικά και από το παρακάτω διάγραμμα το οποίο απεικονίζει την διακύμανση των τιμών μιας στήλης του CrossReactivity σαν ποσοστό της μέσης τιμής της. Επειδή ζητούμενο σε αυτή τη φάση είναι να εντοπιστούν «γενικές» συμπεριφορές, στον υπολογισμό των μέσων τιμών και των τυπικών αποκλίσεων που χρειάζονται για το παρακάτω διάγραμμα οι 4 πιο απομακρυσμένες τιμές μιας στήλης δε λήφθηκαν υπόψη<sup>22</sup>. Με αυτή την «ομαλοποίηση» εξαλείφθηκαν μερικές ακραίες εκτιμήσεις που οφείλονται στα ακρότατα μιας στήλης χωρίς να επηρεαστεί σημαντικά η συνολική συμπεριφορά της στήλης, αφού από κάθε στήλη αφαιρέθηκε μόνο το 5% των τιμών της.



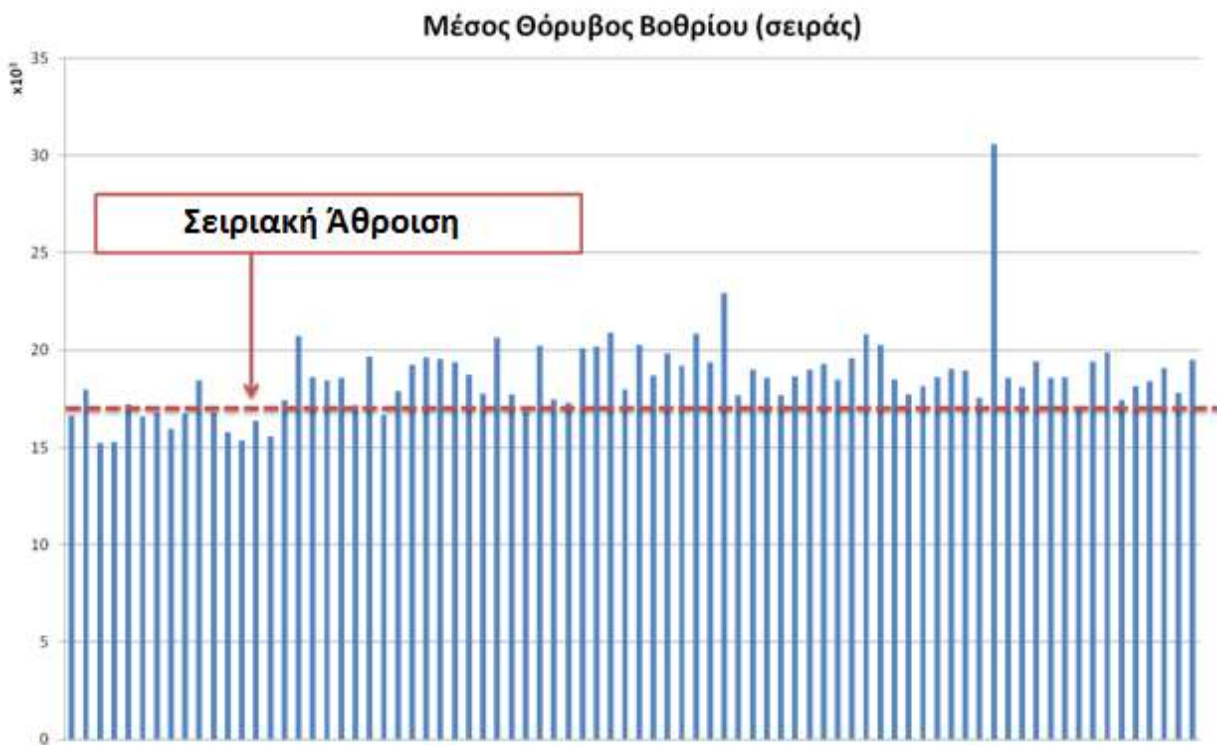
Εικόνα 27: διακύμανση στηλών CrossReactivity

Από το διάγραμμα γίνεται εμφανές ότι στην πλειονότητα τους οι τιμές μιας στήλης αντιπροσωπεύονται πολύ καλά από τη μέση τιμή της στήλης, καθώς παρουσιάζουν

<sup>22</sup> μπορεί να οφείλονται σε διασταυρούμενη αντίδραση και άρα να μην ανήκουν από στατιστικής άποψης στο θόρυβο

ποσοστιαία απόκλιση από αυτή μικρότερη ή ίση με 10% (μέσος όρος είναι 9%), τιμή που για βιολογικές μετρήσεις δε θεωρείται σημαντική. Το ίδιο ισχύει και για τις σειρές του CrossReactivity, δηλαδή για τον μέσο θόρυβο του κάθε βοθρίου της δοκιμής (βλέπε επόμενο διάγραμμα – τυπική απόκλιση =10% της μέσης τιμής).

Για τη σύνδεση των δύο (2) πειραμάτων, η πιο απλή υπόθεση που μπορεί να γίνει είναι αυτή της «σειριακής άθροισης». Δηλαδή η μέση τιμή μιας στήλης του CrossReactivity προκύπτει ως άθροισμα των τιμών της αντίστοιχης στήλης του Noise Assay<sup>23</sup>. Η «σειριακή άθροιση» των τιμών του θορύβου βασίζεται στις παραδοχές ότι οι διάφορες αντιδράσεις θορύβου είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους (δεν ανταγωνίζονται για κοινές θέσεις) και ότι για μικρές τιμές θορύβου δεν υπάρχουν προβλήματα χωρικού κορεσμού (στερικά φαινόμενα). Το μοντέλο αυτό αν και απλοϊκό δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα, κυρίως ως προς την πρόβλεψη του μέσου θορύβου ενός πειράματος (σειράς). Τέλος, πρέπει να έχουμε υπόψη ότι το επίπεδο θορύβου του CrossReactivity είναι προσαυξημένο σε σχέση με αυτό του Noise Assay με τον θόρυβο που προκαλούν οι διασταυρούμενες αντιδράσεις. Ως εκ τούτου, κανένα μοντέλο που βασίζεται αποκλειστικά στην πληροφορία που παρέχει ο Noise Assay δεν μπορεί να προβλέψει επακριβώς το επίπεδο θορύβου ενός πειράματος, αλλά μπορεί να αποτελέσει μια οριακή εκτίμηση, κάτω από την οποία δεν θα ήταν λογικό να πέσει ο πραγματικός θόρυβος.



Εικόνα 28: Μέσος θόρυβος βοθρίου

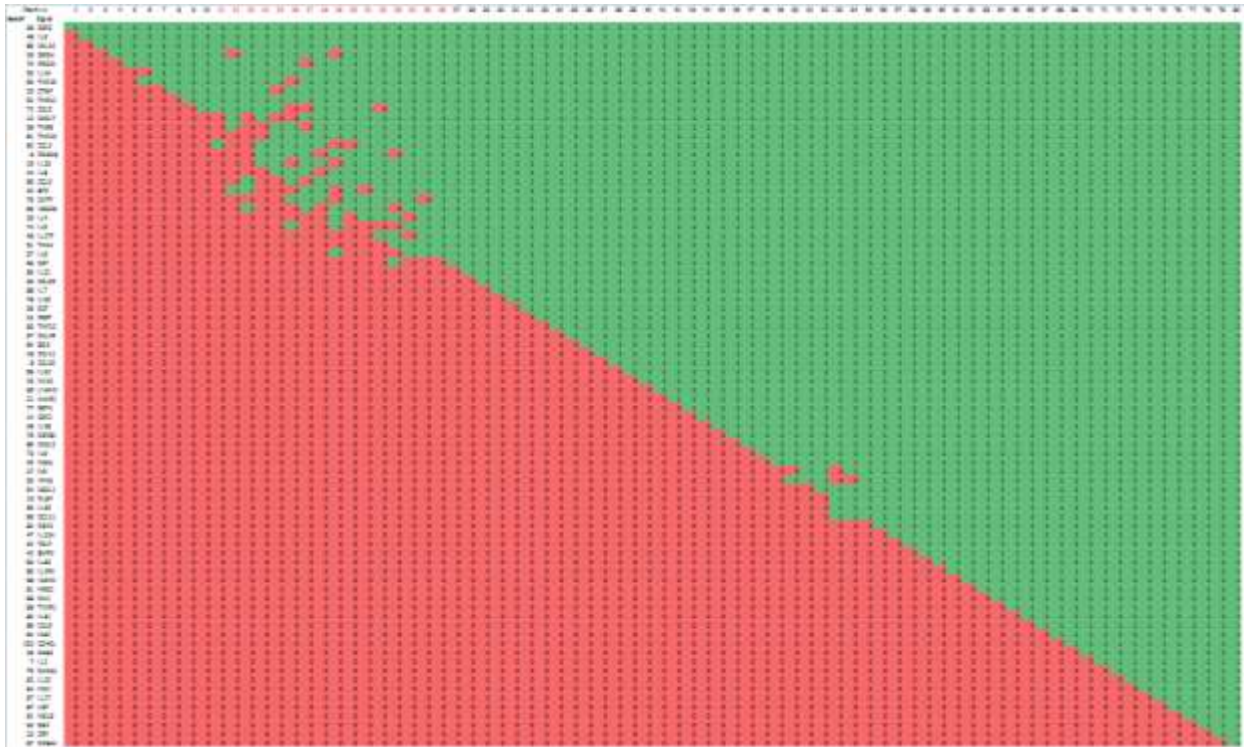
<sup>23</sup> Σαν να είναι αντιστάσεις εν σειρά

Το επίπεδο του μέσου θορύβου είναι μια πολύ σημαντική πληροφορία, καθώς μέσω αυτού μπορεί να προσδιοριστεί η ευαισθησία του πειράματος. Ευαισθησία ενός πειράματος είναι η δυνατότητα του να αναγνωρίζει τους αναλύτες. Όπως φαίνεται από τον πίνακα CrossReactivity, ένας αναλύτης αναγνωρίζεται μέσω της σύγκρισης του με το μέσο θόρυβο της μέτρησης. Όσο χαμηλότερος είναι ο μέσος θόρυβος μιας μέτρησης τόσο περισσότερες συγκεντρώσεις δύνανται να αναγνωρισθούν. Περισσότερα για τη σχέση σήματος θορύβου αναφέρονται στην ενότητα «Επικύρωση».

Βάσει αυτών των παρατηρήσεων μπορούν να συνδεθούν τα διάφορα πειράματα και έτσι με κατάλληλη επεξεργασία των δεδομένων του πειράματος Θορύβου Υποβάθρου να ελεγχθεί το επίπεδο θορύβου του «κανονικού πειράματος». Να σημειωθεί ότι στην παρούσα εργασία το τελικό στάδιο ταυτίζεται με το πείραμα Διασταυρούμενων Αντιδράσεων. Δεν υπάρχει, δηλαδή, κάποιο «κανονικό πείραμα» με περισσότερους αναλύτες για να επιβεβαιώσει το μοντέλο.

### **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΥ**

Άμεσο αποτέλεσμα του αλγορίθμου, αν τον τρέξουμε επαναληπτικά για κάθε βέλτιστο πείραμα #n, είναι ένας «χάρτης» που υποδεικνύει για κάθε πείραμα #n ποιοι αναλύτες δίνουν τον ελάχιστο πίνακα θορύβου υποβάθρου. Ο χάρτης αυτός φαίνεται παρακάτω στην ταξινομημένη του μορφή, από τον αναλύτη που συμμετέχει στα περισσότερα πειράματα έως αυτόν που συμμετέχει στα λιγότερα. Αυτό το κριτήριο ταξινόμησης, δηλαδή σε πόσα βέλτιστα πειράματα συμμετέχει κάθε αναλύτης αποτελεί μέχρι στιγμής και το καλύτερο μέτρο για την κατάταξη των σημάτων σε καθαρά και θορυβώδη. Ο χάρτης αυτός έχει σε κάθε σειρά έναν αναλύτη (αριθμό μικροσφαιριδίου και όνομα) και σε κάθε στήλη το μέγεθος του πλέγματος (n). Για κάθε πείραμα που επιλέγεται ένας αναλύτης το αντίστοιχο κελί παίρνει την 1 (πράσινο), ενώ όταν δεν επιλέγεται παίρνει την τιμή 0 (κόκκινο). Κάθε στήλη, επομένως, του χάρτη αντιστοιχεί στο διάνυσμα επιλογής x που περιγράφηκε προηγουμένως, αν οι τιμές του x έχουν διαταχθεί με τον αντίστοιχο τρόπο, ώστε η πρώτη θέση να αντιστοιχεί στον αναλύτη που συμμετέχει στα περισσότερα πειράματα και η τελευταία σε αυτόν με τα λιγότερα.



Εικόνα 29: Χάρτης Βέλτιστων Πειραμάτων

Για μερικές τιμές του  $n$  ο αλγόριθμος δεν τερμάτισε στο χρονικό όριο που δόθηκε (4000s). Όμως επειδή:

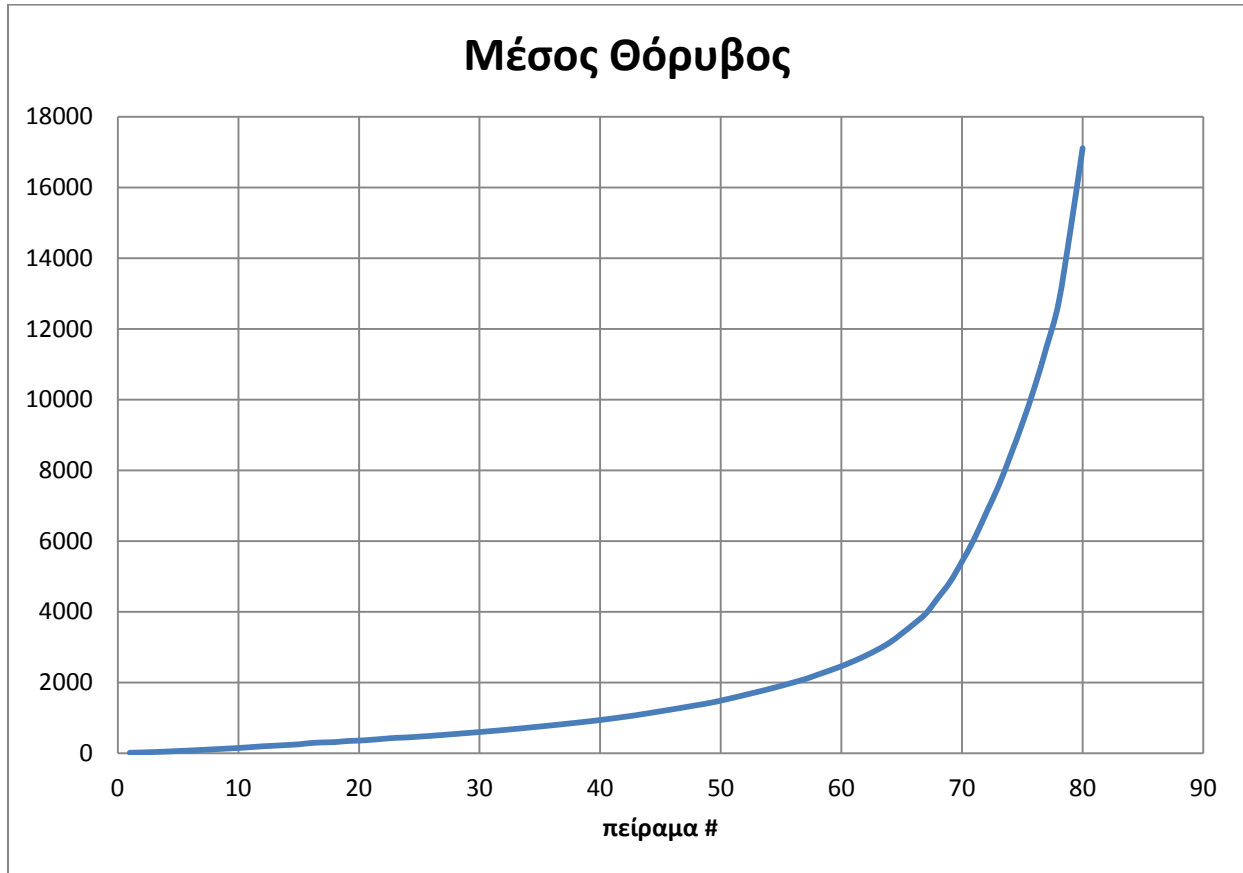
1. ο επιλυτής CPLEX λειτουργεί με τέτοιο τρόπο, ώστε να πλησιάζει σταδιακά τη βέλτιστη λύση (υπολογίζει μία λύση και μετά το μεγαλύτερο κομμάτι αφιερώνεται στο να αποδείξει ότι αποτελεί ολικό ελάχιστο της συνάρτησης), ακόμα και αν δεν τερματίσει η λύση που επιστρέφει είναι κοντά στη βέλτιστη,
2. επιπλέον το πιο σημαντικό κριτήριο για να παρακάμψουμε το πρόβλημα τερματισμού είναι ότι η αδυναμία τερματισμού εμφανίζεται σε μια περιοχή των  $n$  (11-26) πολύ μακριά από την περιοχή ενδιαφέροντος, καθώς κανένας αναλυτής δε θα αποδεχόταν ένα πείραμα με μόνο 20 αναλύτες για την τάξη θορύβου που μιλάμε (μέσος θόρυβος <20, πρακτικά μηδενικός για τις συνήθεις τιμές σήματος),

και γι' αυτό το λόγο κρίναμε ότι το υπολογιστικό κόστος υπολογισμού μιας ακριβής λύσης δεν είναι αποδεκτό και αποδεχτήκαμε τις πιθανά μη-βέλτιστες τιμές<sup>24</sup>.

<sup>24</sup> Αρκεί να σκεφτεί κανείς ότι το χρονικό όριο των 4000sec επιλέχθηκε αρχικά ως εξαιρετικά χαλαρό καθώς θα μπορούσε να οδηγήσει σε διάρκεια τρεξίματος 3,7 ημερών!

### Διάγραμμα Μέσου Θορύβου

Χρησιμοποιώντας αυτόν τον χάρτη μπορούμε να υπολογίσουμε θεωρητικά τον θόρυβο για όλα τα βέλτιστα πειράματα. Υπολογίζοντας το μέσο θόρυβο που παράγει κάθε πείραμα #n μπορούμε να σχεδιάσουμε την καμπύλη της συνάρτησης μέσου θορύβου  $M\Theta(n)$



Εικόνα 30: Διάγραμμα Μέσου θορύβου πειραμάτων

Παρατηρούμε ότι η μορφή της καμπύλης επαληθεύει τις θεωρητικές παρατηρήσεις που είχαν γίνει, ότι δηλαδή η αύξηση των αναλυτών οδηγεί σε μια αρχικά γραμμική αύξηση του μέσου θορύβου, περίπτωση (μερικής) ιστροπίας, και από ένα σημείο και μετά (μετά τους 60 αναλύτες περίπου) η κλίση της καμπύλης μεγαλώνει με αύξοντα ρυθμό, περίπτωση ανιστροπίας.

Γραφικά η παρατήρηση αυτή μπορεί να αναπαρασταθεί με τα εξής διαγράμματα:

## Διάγραμμα Οριακού Θορύβου

Ο οριακός (μέσος) θόρυβος προκύπτει αν υπολογίσουμε την παράγωγο της καμπύλης μέσου θορύβου με την μέθοδο των πεπερασμένων διαφορών από τα δοσμένα σημεία<sup>25</sup>. Από το διάγραμμα αυτό αναμένουμε ένα αρχικά σταθερό τμήμα (παράλληλο στον άξονα x) και, εν συνεχεία, μετά την τιμή η κλίση του να γίνεται θετική.



Εικόνα 31: Διάγραμμα Οριακού θορύβου πειραμάτων

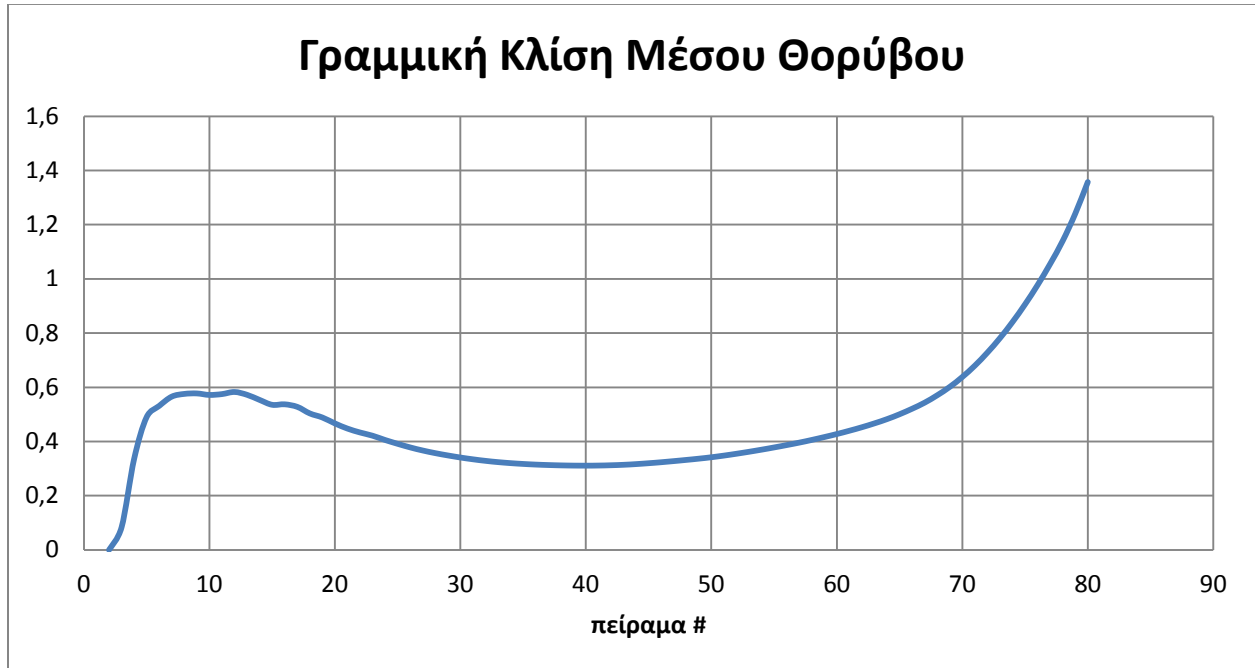
## Διάγραμμα Γραμμικών/Κινούμενων Κλίσεων Μέσου Θορύβου

Ένα άλλο ενδιαφέρον διάγραμμα που μπορεί να εξαχθεί είναι το **Διάγραμμα Γραμμικών Κλίσεων του Μέσου Θορύβου**. Αυτό προκύπτει αν για κάθε πείραμα #n υπολογιστεί η κλίση της ευθείας που προσεγγίζει καλύτερα όλα τα πειράματα μέχρι αυτό το σημείο (από 1 μέχρι n). Δηλαδή, αν η υπόθεση της γραμμικής αύξησης του μέσου θορύβου (μερική ιστροπία) γίνει εκ των προτέρων αποδεκτή, τότε από το πείραμα n=2 και μετά, μπορεί να υπολογιστεί η

<sup>25</sup>  $OM\theta = \frac{\Delta y}{\Delta x}$ , το οποίο καταλήγει τελικώς επειδή το  $\Delta x=1$  κάθε φορά στο  $OM\theta=\Delta y$

κλίση της ευθείας με την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων<sup>26</sup>. Κάθε επιπλέον σημείο που υπολογίζουμε (κάθε επιπλέον πείραμα  $n$ ) θα μας επιτρέψει κάνουμε μια καλύτερη εκτίμηση αυτής της κλίσης και έτσι για κάθε πείραμα  $\#n$  θα έχουμε μια εκτίμηση της κλίσης.

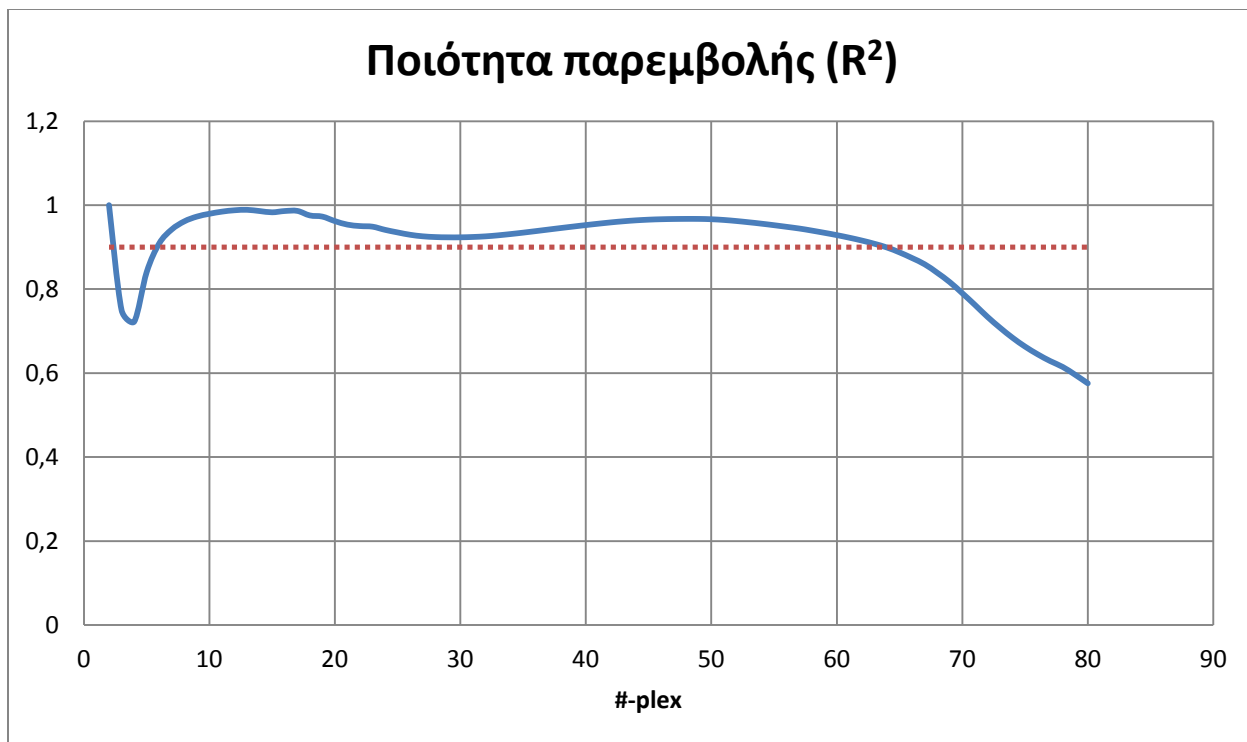
Το διάγραμμα γραμμικών κλίσεων μαζί με το διάγραμμα των  $R^2$  της κάθε παρεμβολής φαίνονται παρακάτω:



Εικόνα 32: Γραμμική Κλίση Μέσου Θορύβου πειραμάτων

<sup>26</sup> απαιτούνται 2 σημεία για να υπολογιστεί 1 ευθεία και το (0,0) δεν θεωρείται σημείο





Εικόνα 33: Ποιότητα Γραμμικής Παρεμβολής

Το σημαντικότερο μειονέκτημα αυτού του διαγράμματος είναι ότι η ευαισθησία του στα καινούργια σημεία θα φθίνει με την αύξηση του αριθμού των πειραμάτων-σημείων. Κάθε νέο σημείο θα προστίθεται σε ένα όλο και αυξανόμενο σύνολο σημείων και, κατά συνέπεια, αναλογικά θα έχει πολύ μικρότερη επίδραση από τα προηγούμενα σημεία.

Αυτό το πρόβλημα, μπορεί να παρακαμφθεί με το **διάγραμμα «Κινούμενων Κλίσεων»<sup>27</sup>**, στο οποίο κάθε νέο σημείο προστίθεται σε ένα σταθερού πλήθους, αλλά κινούμενο σύνολο σημείων.

Για παράδειγμα, έστω ότι επιλέγεται για πλήθος συνόλου (περίοδος), τα 20 σημεία τότε για το 1<sup>ο</sup> σημείο του διαγράμματος η κλίση υπολογίζεται από τα 20 πρώτα σημεία (από 1 έως 20) του διαγράμματος Μέσου θορύβου, για το 2<sup>ο</sup> σημείο το σύνολο των σημείων που συμμετέχει στον υπολογισμό της κλίσης μετακινείται μια θέση δεξιά και ενώ εξακολουθεί να έχει πληθυσμό 20 σημείων αυτά τα σημεία πλέον είναι τα σημεία 2 έως 21 του διαγράμματος μέσου θορύβου κοκ. Το τελικό διάγραμμα φαίνεται παρακάτω:

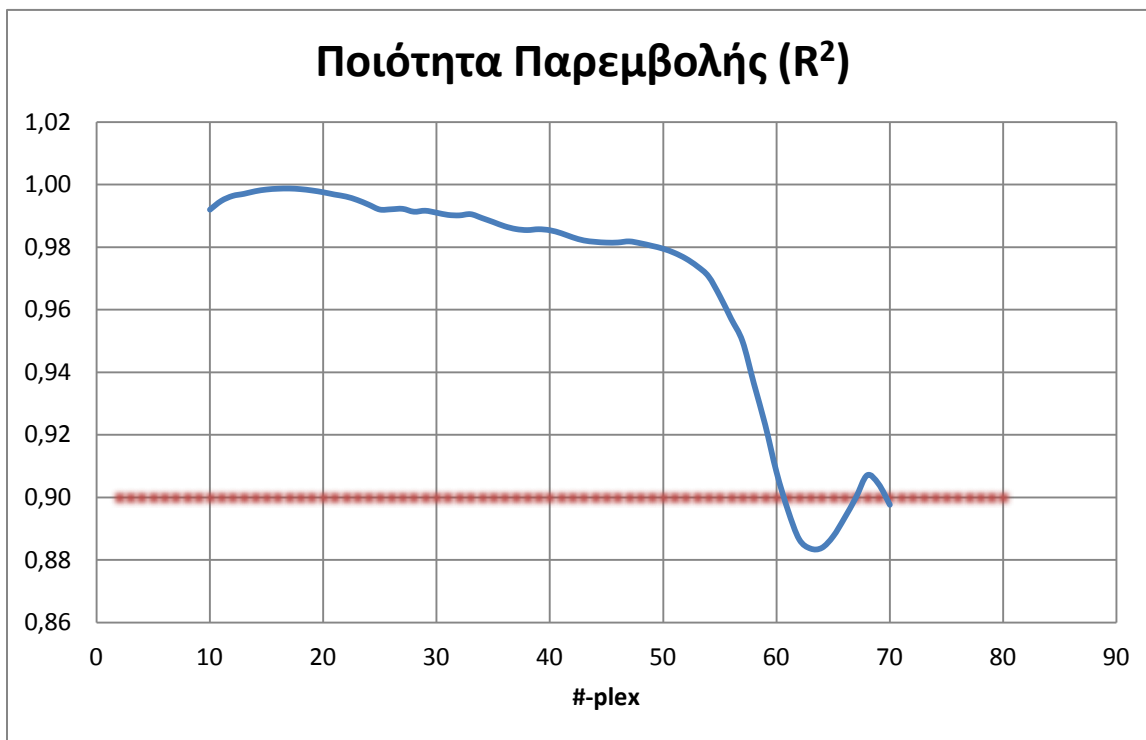
<sup>27</sup> παραλλαγή της μεθόδου κινούμενων μέσων όρων



Εικόνα 34: Διάγραμμα Κινούμενων Κλίσεων

Η μέθοδος απαιτεί να «θυσιαστούν» 20 σημεία από την αρχή ή το τέλος του συνόλου των διαθέσιμων σημείων για να εξασφαλιστεί η πλήρης ομοιομορφία της ευαισθησίας. Στη παρούσα περίπτωση η κλίση υπολογίστηκε κεντρικά, οπότε χρειάστηκε να θυσιαστούν τα 10 πρώτα και τα 10 τελευταία σημεία. Η επιλογή του 20 ως κατάλληλου πλήθους σημείων (περιόδου) έγινε παρατηρώντας την καμπύλη μέσου θορύβου. Η γραμμικότητα της καμπύλης φαίνεται να χαλάει στην περιοχή των 60 αναλυτών, οπότε θεωρώντας ότι για σημεία κάτω των 10 αναλυτών η υπόθεση της ισοτροπίας ισχύει σίγουρα και αντίστοιχα για τα σημεία πέραν των 70 αναλυτών και την υπόθεση ανισοτροπία, κρίθηκε ότι στο εύρος 50-70 αναλυτών θα φανεί η αδυναμία της υπόθεσης γραμμικότητας.

Κριτήριο για την ισχύ της υπόθεσης είναι το διάγραμμα των  $R^2$ , που δείχνει την ποιότητα της παρεμβολής. Το διάγραμμα αυτό έχει την ακόλουθη μορφή:



Εικόνα 35: Ποιότητα Παρεμβολής Κινούμενων Κλίσεων

Η κόκκινη γραμμή δείχνει την τιμή 0,9 στην οποία θεωρούμε ότι η υπόθεση της γραμμικότητας καταρρέει. Από το διάγραμμα προκύπτει ότι η περιοχή γύρω από το πείραμα #60 είναι η περιοχή μεγαλύτερης επικινδυνότητας ως προς την ισχύ της υπόθεσης.

Η μέθοδος των Κινούμενων Κλίσεων αποτελεί παραλλαγή της μεθόδου πεπερασμένων διαφορών για τον υπολογισμό της παραγώγου. Συγκεκριμένα, η μέθοδος των κινούμενων κλίσεων χρησιμοποιεί τα διακριτά σημεία μιας συνάρτησης για να περάσει από αυτά μια ευθεία βάσει της μεθόδου των ελάχιστων τετραγώνων, ενώ η μέθοδος των πεπερασμένων διαφορών υπολογίζει για τα ζεύγη των διακριτών σημείων τις κλίσεις, ο μέσος όρος των οποίων αποτελεί την εκτίμηση της κλίσης. Για περίοδο δύο (2) σημείων, οι δύο (2) μέθοδοι είναι ισοδύναμες.

Η διαφορά των δύο (2) διαγραμμάτων (γραμμικών και κινούμενων κλίσεων) οφείλεται στο ότι ο οριακός θόρυβος προκύπτει μόνο βάσει της τελευταίας τιμής, οπότε είναι πιο ευαίσθητος στις αλλαγές της κλίσης από το διάγραμμα κλίσεων, το οποίο λαμβάνει υπόψη του το σύνολο των σημείων πριν υπολογίσει την κλίση.

## ΒΕΛΤΙΣΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑ

Όπως αναφέρθηκε και στο θεωρικό κομμάτι, είναι πολύ δύσκολο να υπολογιστεί με σαφή τρόπο το βέλτιστο πείραμα. Αυτό συμβαίνει διότι μέχρι τώρα δεν έχει υπολογιστεί καμία συνάρτηση σήματος, οπότε δεν μπορεί να γραφεί ένας αλγόριθμος βελτιστοποίησης, διότι δεν υπάρχει μια συνάρτηση καθαρού κέρδους την οποία ο αλγόριθμος να μεγιστοποιεί. Η ανάλυση ως τώρα βασίζεται μόνο στο θόρυβο και ως εκ τούτου η βέλτιστη λύση εξαρτάται κυρίως από τη «διάθεση» του πειραματιστή.

Για παράδειγμα από τα διαγράμματα κρίθηκε ότι η τιμή 60 είναι η βέλτιστη λύση, γιατί εκεί ξεκινάει η αύξηση της κλίσης και στα δύο (2) διαγράμματα περίπου ή το  $R^2$  πέφτει κάτω από την τιμή 0,9. Όμως, η τιμή 60 αποτελεί προσωπική εκτίμηση, ένας πιο «ριψοκίνδυνος» πειραματιστής μπορεί να επέλεγε μια μεγαλύτερη τιμή, γιατί γι' αυτόν το κέρδος που του προσφέρουν τα επιπλέον σήματα είναι πιο σημαντικός από τον επιπρόσθετο θόρυβο, ενώ το αντίστροφο θα ίσχυε για έναν πιο «επιφυλακτικό» πειραματιστή. Συνεπώς, δεν μπορεί να υπάρξει σαφής λύση στο πρόβλημα του βέλτιστου πειράματος χωρίς κάποια συνάρτηση κέρδους (και άρα καθαρού κέρδους). Ακόμα και αν υπήρχε σαφής λύση αυτό δεν θα συνεπαγόταν αναγκαστικά ότι αυτή είναι καθολικά η βέλτιστη λύση, διότι η συνάρτηση κέρδους που επιλέχθηκε εξαρτάται με τη σειρά της από τις ανάγκες του πειραματιστή ή της μοντελοποίησης (άρα μια καθολικά βέλτιστη λύση θα απαιτούσε ένα καθολικά αποδεκτό μοντέλο).

Παρόλα αυτά, για τους 60 αναλύτες του πειράματος #60 προκύπτει ένας αρκετά ισότροπος πίνακας, πράγμα που συνεπάγεται μικρή ευαισθησία στη μεταβολή του αριθμού των αναλυτών, οπότε ακόμα και αν δεν είναι η βέλτιστη λύση είναι στην περιοχή της. Ακόμα, ο μέσος θόρυβος του πειράματος είναι σε σχετικά αποδεκτό επίπεδο μέσου θορύβου ( $\approx 2000$ ), πράγμα που σημαίνει ότι η ευαισθησία του πειράματος είναι σε αποδεκτά επίπεδα. Τέλος, αν για μια πραγματικά συστημική προσέγγιση, 60 αναλύτες ίσως δεν αρκούν για να παραμετροποιήσουν ένα βιολογικό σύστημα, όμως αυτή τη στιγμή ένα τυπικό πείραμα ELISA, που γίνεται στα πλαίσια της συστημικής ανάλυσης, αποτελείται περίπου από 20-30 αναλύτες. Ως εκ τούτου, η τιμή 60 που επιλέχθηκε δύσκολα μπορεί να θεωρηθεί «συμβιβασμός» για το παρόν επίπεδο τεχνογνωσίας.

# ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ

## Τελικό Πείραμα

Για τη δοκιμή-επικύρωση της μεθόδου, εκτελέστηκε η δοκιμή Διασταυρούμενων Αντιδράσεων για το προβλεπόμενο βέλτιστο πείραμα των 60 αναλυτών. Το πείραμα, τελικά, περιορίστηκε στους 56 αναλύτες είτε για τεχνικούς λόγους - το μηχάνημα δεν μπόρεσε να εντοπίσει τα 100 απαιτούμενα μικροσφαιρίδια για έναν αναλύτη, είτε για λόγους «ασφαλείας», καθώς 3 από τους αναλύτες που ανήκαν στο βέλτιστο σύνολο εμφάνισαν καμπύλες θορύβου μεγάλης κλίσης κατά τη διαδικασία της βαθμονόμησης. Οι αναλύτες που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα με πράσινο και με τη σειρά που χρησιμοποιήθηκαν (κόκκινοι είναι οι αναλύτες που κόπηκαν).

Πίνακας 3: Χάρτης Βέλτιστου Πειράματος #56

1	#7	IL2	21	#35	IFNG	41	#58	ICAM1	61	#80	IL31
2	#8	CCL20	22	#36	LYAM1	42	#59	IL22	62	#81	NRG1
3	#9	PDGFB	23	#37	CXL16	43	#61	TNF10	63	#82	FGF2
4	#12	CXCL7	24	#38	CSF3	44	#62	IL10	64	#83	TNF12
5	#13	PLGF	25	#39	SCF	45	#63	FST	65	#84	BD3
6	#14	CSF2	26	#42	BMP2	46	#64	NGF	66	#85	IL1RA
7	#15	CRP	27	#43	MIA2	47	#65	IL21	67	#86	CXCL2
8	#18	CXL11	28	#44	IL8	48	#66	CCL3	68	#87	LEP
9	#19	IL13	29	#45	NGAL	49	#67	IL17	69	#88	IL7
10	#20	BTC	30	#46	IL17F	50	#68	TIMP1	70	#89	CXL9
11	#21	HAVR1	31	#47	IL12A	51	#69	CXL10	71	#90	CCL2
12	#22	PERT	32	#48	IL3	52	#70	PROK1	72	#91	NEUS
13	#25	CTGF	33	#49	RAGE	53	#72	CCL5	73	#93	IL33
14	#26	IL4	34	#51	TNFA	54	#73	IL9	74	#94	NOV
15	#27	MK	35	#52	TNR11	55	#74	IL5	75	#95	IL25
16	#28	IL1B	36	#53	IL1A	56	#75	D104A	76	#96	CCL11
17	#29	GROA	37	#54	X3CL1	57	#76	DEFB1	77	#97	DFB4A
18	#30	EGF	38	#55	TNF15	58	#77	RETN	78	#98	PAI1
19	#33	CCL26	39	#56	TNR9	59	#78	IL20	79	#99	VEGFB
20	#34	TSLP	40	#57	IL6	60	#79	CNTF	80	#100	CD40L

Η δοκιμή Διασταυρούμενων Αντιδράσεων, όπως αναφέρθηκε, χρησιμοποιείται ως απλοποίηση ενός πραγματικού πειράματος. Ο σημαντικότερος, όμως, λόγος για τον οποίο

επιλέγουμε αυτήν τη δοκιμή ως κριτήριο για την απόδοση της μεθόδου είναι ότι μπορεί να δώσει μια εκτίμηση της ευαισθησίας της κάθε μέτρησης.

### SNR Πολυπλεκτικής Μέτρησης

Όπως είδαμε, ο CrossReactivity αποτελείται από δύο (2) ειδών σήματα, το κανονικό σήμα που μετράται από τους συνδυασμούς που αντιστοιχούν στην κύρια διαγώνιο και τον θόρυβο που μετράται στον υπόλοιπο πίνακα. Αυτή η ιδιαιτερότητα μας επιτρέπει να υπολογίσουμε τον λόγο σήματος προς θόρυβο (Signal to Noise Ratio-SNR) μιας μέτρησης ως τον λόγο του στοιχείου της κύριας διαγώνιου προς τον μέσο όρο των μη-διαγώνιων στοιχείων μιας στήλης. Επομένως, ο λόγος SNR της μέτρησης κάθε αναλύτη προκύπτει από τη σχέση:

$$SNR_i = \frac{(N - 1)R_{i,i}}{\sum_{j=1}^N [R_{j,i}(1 - \delta_{j,i})]}$$

όπου  $R_{i,j}$  το στοιχείο του πίνακα CrossReactivity και  $\delta_{i,j}$  το δέλτα του Kronecker.

Αυτός ο λόγος SNR διαφέρει από το λόγο που υπολογίστηκε κατά τη διαδικασία της βελτιστοποίησης της συγκέντρωσης (από τους πίνακες βαθμονόμησης), διότι ο θόρυβος που χρησιμοποιήθηκε εκεί ήταν ο θόρυβος που παραγόταν από την αντίδραση του αντισώματος ανίχνευσης με το αντίστοιχο του μικροσφαιρίδιο (αντίσωμα παγίδευσης), ενώ κατά τη δοκιμή διασταυρούμενων αντιδράσεων ο θόρυβος παράγεται από το σύνολο των πιθανών παράπλευρων αντιδράσεων. Για να ξεχωρίζουν:

- ονομάζουμε τον λόγο SNR που υπολογίζεται από τη δοκιμή βαθμονόμησης *i*SNR (intrinsic-SNR, ιδιο-SNR), γιατί αποτελεί την αναλογία σήματος και θορύβου την οποία θα είχαμε αν αποφασίζαμε πραγματοποιήσουμε μόνο μια μέτρηση, ενώ
- ονομάζουμε τον λόγο SNR που υπολογίζεται από τη δοκιμή διασταυρούμενων αντιδράσεων *a*SNR (actual-SNR, πραγματικό-SNR), διότι αποτελεί την αναλογία σήματος και θορύβου με την οποία μετράμε έναν αναλύτη σε ένα δεδομένο πολυπλεκτικό πείραμα

Ο *i*SNR χρησιμοποιήθηκε μόνο κατά την βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης των αντισωμάτων ανίχνευσης. Από εδώ και στο εξής (για την επικύρωση), όταν γίνεται αναφορά στο SNR εννοείται μόνο το *a*SNR.

Ο SNR, λοιπόν, αποτελεί το ζητούμενο μέτρο ευαισθησίας της μέτρησης. Όπως αναφέρθηκε, κάθε στήλη του CrossReactivity χαρακτηρίζεται από μια μέση τιμή, με άλλα λόγια, κάθε σήμα χαρακτηρίζεται από ένα μέσο θόρυβο. Πρακτικά αυτό σημαίνει ότι, όταν σε ένα πραγματικό πείραμα 80 αναλυτών η μετρούμενη τιμή φωτεινότητας ενός αναλύτη είναι μικρότερη ή ίση της μέσης τιμής της αντίστοιχης στήλης του CrossReactivity, τότε δε γίνεται να αποφανθεί αν αυτή η μέτρηση αντιστοιχεί σε πραγματικό σήμα ή απλά σε θόρυβο. Αν θέλουμε να κάνουμε

για σύνδεση με την συνήθη έννοια της ευαισθησίας του οργάνου, αρκεί να αντιστοιχίσουμε τον μέσο θόρυβο ενός αναλύτη σε κάποια συγκέντρωση μέσω της καμπύλης βαθμονόμησης του. Η συγκέντρωση αυτή είναι η μικρότερη δυνατή συγκέντρωση που μπορεί να μετρηθεί για αυτόν τον αναλύτη στο συγκεκριμένο πολυπλεκτικό πείραμα.

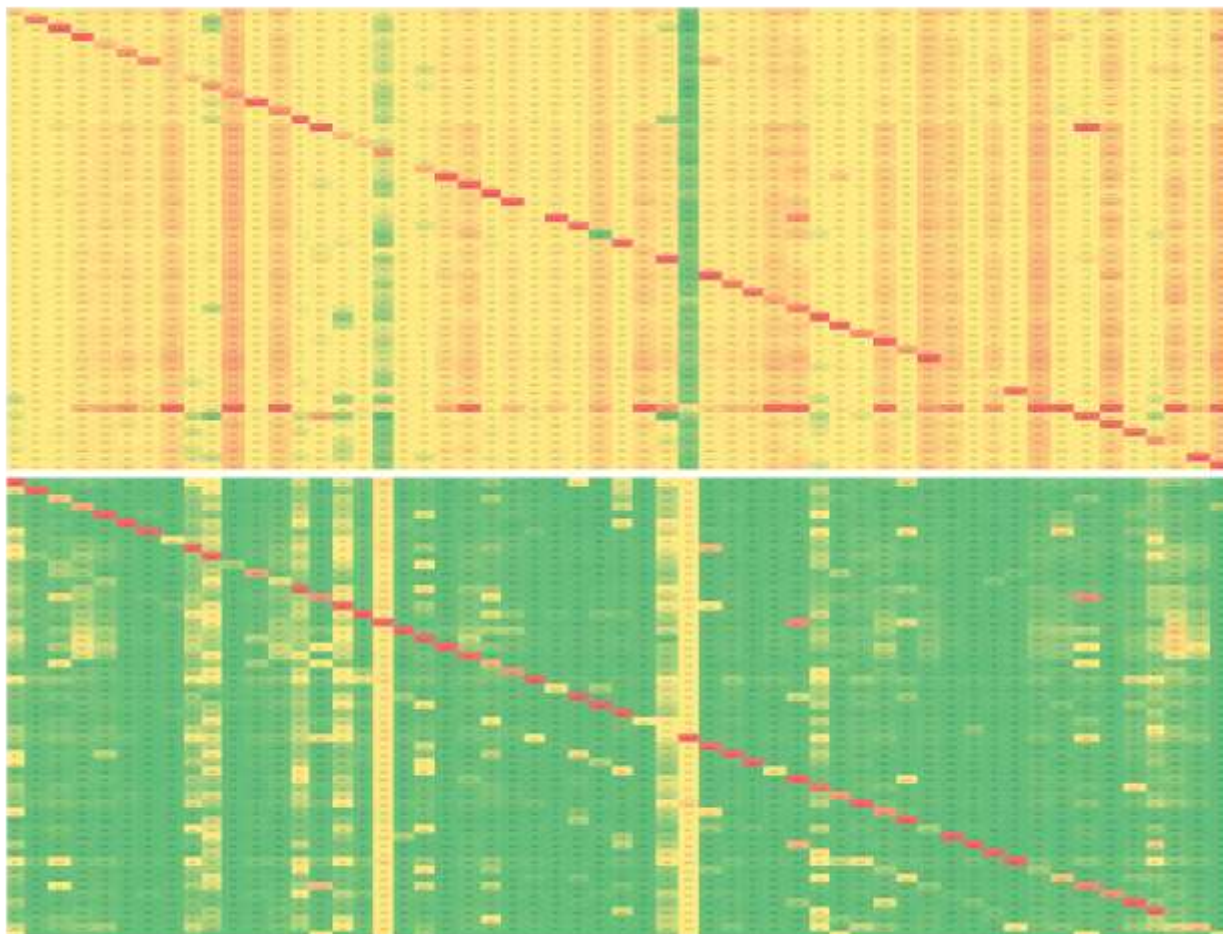
Επομένως, ο SNR για κάθε αναλύτη να είναι οριακά μεγαλύτερος του 1. Πρακτικά ο SNR πρέπει να είναι αρκετά μεγαλύτερος του 1 διότι

- ο θόρυβος υπολογίζεται ως μέση τιμή, επομένως, χρειάζεται να ληφθεί υπόψη και η διακύμανση του
- επιπλέον, μικροί λόγοι SNR μπορεί να οφείλονται σε περιορισμό του δυναμικού εύρους της μέτρησης.

Το σήμα εξόδου μιας μέτρησης δεν μπορεί να πάρει αυθαίρετα μεγάλες τιμές, καθώς φράσσεται είτε από τη γραμμή κορεσμού ( $\theta_{eq}$ ) της αντίδρασης προσρόφησης είτε από το μέγεθος της επιφάνειας του μικροσφαιριδίου. Επομένως, ακόμα και αν μπορούμε να αποφανθούμε ότι ένας αναλύτης όντως υπάρχει, μικροί λόγοι SNR θα δυσκολέψουν την ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης του, καθώς θα αφήσουν ένα πολύ μικρό αξιοποιήσιμο εύρος τιμών.

### **Σύγκριση Αρχικού και Τελικού Πειράματος**

Για την επικύρωση της μεθόδου, κατά συνέπεια, πρέπει να αξιολογηθεί πώς η νέα μέτρηση των 56 αναλυτών επηρέασε τους παράγοντες αυτούς. Οι πίνακες με τα αποτελέσματα της δοκιμής πριν και μετά τη βελτιστοποίηση φαίνονται παρακάτω:



Εικόνα 36: "Εικόνα" 56 αναλυτών πριν και μετά

Ο πρώτος πίνακας (πάνω) αποτελεί κομμάτι του αρχικού πειράματος με όλους τους αναλύτες και δείχνει την εικόνα που υπήρχε για τους συγκεκριμένους αναλύτες στο αρχικό πείραμα. Ο δεύτερος πίνακας (κάτω) αποτελεί την εικόνα του νέου πειράματος (των 56 αναλυτών).

Οι πίνακες είναι χρωματισμένοι κατά στήλες, δηλαδή οι μετρήσεις ενός μικροσφαιριδίου και στους δύο (2) πίνακες (οι 2 αντίστοιχες στήλες) αντιστοιχίζονται σε μια τρι-χρωματική κλίμακα, όπου η μέγιστη τιμή αντιστοιχεί σε κόκκινη ένδειξη, η ελάχιστη σε πράσινη και η διάμεση σε κίτρινη όπως εξηγήθηκε προηγουμένως.

Είναι φανερό, εκ πρώτης όψεως, ότι στο καινούργιο πείραμα ο θόρυβος υποβάθρου (μη-διαγώνια στοιχεία) είναι σημαντικά χαμηλότερος από το αρχικό (με εξαίρεση τις μετρήσεις 2 αναλυτών), ενώ οι τιμές των πραγματικών σημάτων (διαγώνια στοιχεία) έχουν μείνει, εν πολλοίς, ανεπηρέαστες.

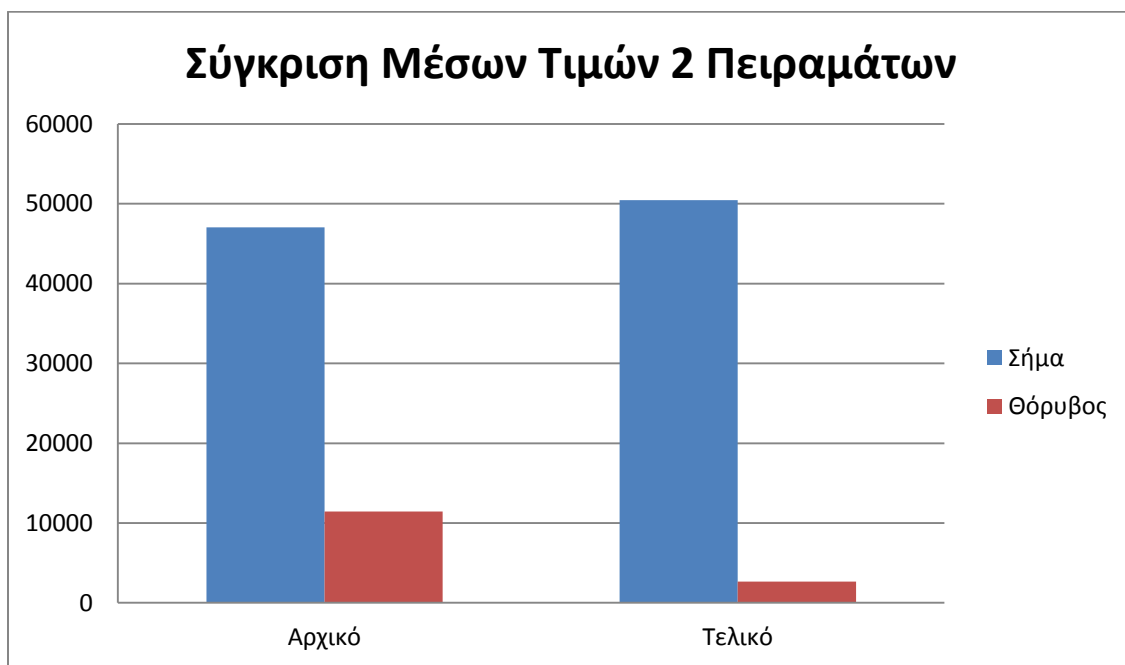
Όμως, ακόμα και χωρίς καμία ανάλυση, μείωση των μετρούμενων σημάτων θα οδηγούσε σε παρόμοια αποτελέσματα. Η σημασία της ανάλυσης, επομένως, δεν έγκειται στο είδος των



μεταβολών, αλλά στην ένταση τους σε σχέση με τον αριθμό των σημάτων που χρειάστηκε να θυσιαστούν.

Το καινούργιο πείραμα προέκυψε με κόστος το 30% των μετρούμενων σημάτων (από 80 μειώθηκαν στα 56). Μερικά ενδεικτικά μεγέθη που απεικονίζουν την βελτίωση της ποιότητας των μετρήσεων είναι:

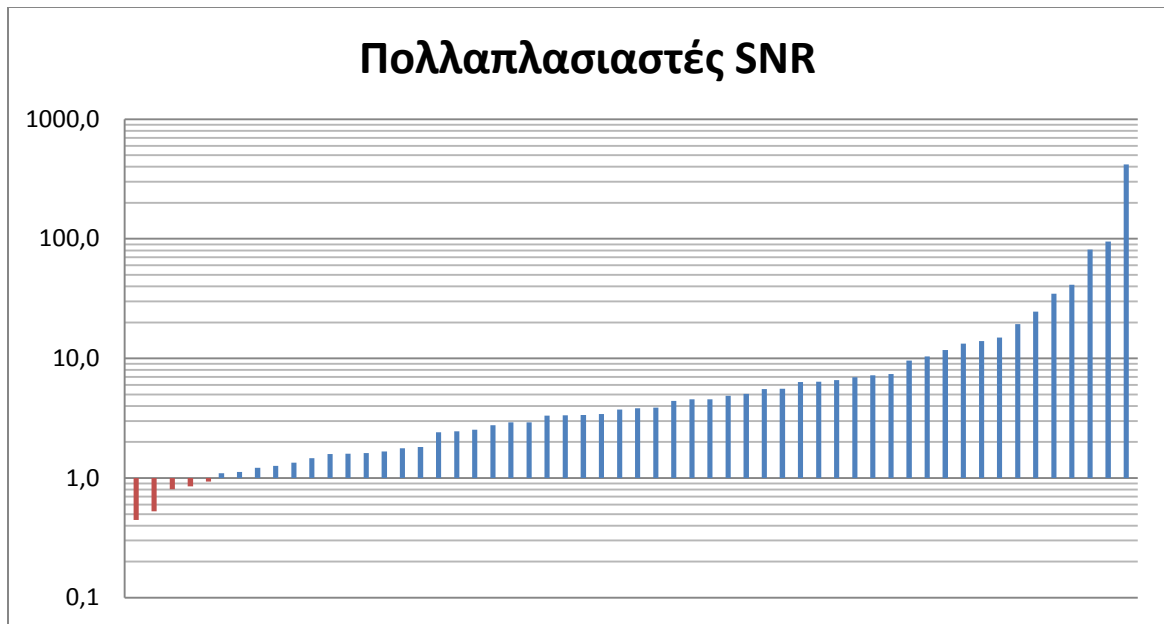
- η μέση τιμή ενός μη-διαγώνιου στοιχείου: στον αρχικό πίνακα ήταν 11.426, ενώ στο νέο πίνακα είναι 2.627 (14,4% του αρχικού), ενώ
- η μέση τιμή ενός διαγώνιου στοιχείου: ήταν 47.038 στον αρχικό πίνακα, ενώ στον τελικό είναι 50.442 (αύξηση 7%).



Εικόνα 37: Αποτελέσματα Βελτιστοποίησης (1)

- οι μεταβολές αυτές οδηγούν σε αύξηση του **λόγου μέσου σήματος προς μέσο θορύβου** κατά 3,5 φορές (από 4,1 σε 18,9)
- ενώ για κάθε μέτρηση ξεχωριστά ο **λόγος σήματος προς θορύβου (SNR)** αυξήθηκε 16,6 φορές κατά μέσο όρο. Παρακάτω φαίνεται το διάγραμμα (σε λογαριθμική κλίμακα) με τους πολλαπλασιαστές του  $SNR^{28}$  διατεταγμένους από τον μικρότερο στον μεγαλύτερο.

<sup>28</sup> ο αριθμός με τον οποίο αν πολλαπλασιάσουμε το SNR του αρχικού πίνακα θα προκύψει το SNR του τελικού



Εικόνα 38: Αποτελέσματα Βελτιστοποίησης (2)

Όπως φαίνεται, μόνο σε 4 σήματα παρατηρήθηκε πτώση του SNR η οποία, όμως, δεν ήταν ιδιαίτερα σημαντική. Τα σήματα αυτά ήταν τα:

Πίνακας 4: Μεταβολή SNR (1)

#	Αναλύτης	Από	Σε
56	TNR9	2,4	1,1
12	CXCL7	45,5	23,9
69	CXL10	448,2	361,0
44	IL8	34,5	29,3
76	DEFB1	2,4	2,2

Ενώ, επιπλέον, μόνο ένα σήμα έχει πλέον SNR μικρότερο του 1, ενώ πριν ήταν εφτά.

Πίνακας 5: Μεταβολή SNR (2)

#	Αναλύτης	Από	Σε
52	TNR11	0,10	42,41
79	CNTF	0,78	26,99
93	IL33	0,83	<b>0,91</b>
57	IL6	0,95	23,44
46	IL17F	0,96	90,40
20	BTC	0,98	9,35
37	CXL16	0,99	80,50

Τα αποτελέσματα αυτά κρίνονται ιδιαίτερως ενθαρρυντικά καθώς, δεχόμενοι ότι όλα τα σήματα είναι της ίδιας σημασίας, το ποσοστιαίο κέρδος σε κάθε παράγοντα από τη μείωση του αριθμού των σημάτων είναι πολλαπλάσιο της ποσοστιαίας μείωσης των σημάτων.

## ΣΥΝΟΨΗ - ΕΠΕΚΤΑΣΗ

Συνολικά, σε αυτή την εργασία:

Περιγράφηκαν τα δύο (2) ήδη θορύβου, τεχνικός και βιολογικός, που παρατηρούνται σε ένα βιοχημικό πείραμα. Στη συνέχεια ο βιολογικός θόρυβος χωρίστηκε σε «τυχαίο» και «μη-τυχαίο», ανάλογα με τον «βαθμό τυχειότητας» που εμφανίζει. Ο βιολογικός θόρυβος που είναι (σχετικά) μεγάλης ισχύος και συνέπειας, θεωρήθηκε ότι προέρχεται από κάποια αντίδραση θορύβου και άρα δεν αποτελεί τυχαίο γεγονός. Τέλος, ο βιολογικός θόρυβος διαχωρίστηκε περαιτέρω βάσει της αντίδρασης θορύβου που τον προκαλεί σε Θόρυβο Υποβάθρου, όταν η αντίδραση είναι μεταξύ των αντισωμάτων ή/και της επιφάνειας του μικροσφαιριδίου, και σε Θόρυβο Διασταυρούμενων Αντιδράσεων, αν στα αντιδρώντα περιλαμβάνονται και τα αντιγόνα-αναλύτες.

Για την κατανόηση του μηχανισμού που παράγει τον βιολογικό θόρυβο αναπτύχθηκε ένα μοντέλο θορύβου. Το μοντέλο βασίζεται σε δύο (2) παράγοντες, α) τη συγκέντρωση των αντισωμάτων σε ένα δείγμα και β) την τάση τους να παράγουν θόρυβο (η οποία ονομάστηκε αναγνωρισιμότητα). Αν και αρχικά θεωρήθηκε ότι ο θόρυβος είναι το αποτέλεσμα μιας αντίδρασης θορύβου, ο μηχανισμός που χρησιμοποιήθηκε για να περιγραφεί αυτή η αντίδραση βασίστηκε στη θεωρία πιθανοτήτων και όχι σε κάποιο βιοχημικό μοντέλο. Η επιλογή αυτή περιόρισε το εύρος εφαρμογής του μοντέλου, διατηρώντας όμως το κρίσιμο εύρος στο οποίο πραγματοποιούνται τα πειράματα.

Η βασική λειτουργία του μοντέλου θορύβου δεν ήταν να περιγράψει τον μηχανισμό παραγωγής θορύβου, αλλά να προβλέψει το επίπεδο θορύβου ενός πειράματος αν υπάρχουν τα κατάλληλα δεδομένα. Η ικανότητα πρόβλεψης του θορύβου ενός πειράματος βάσει άλλων πειραμάτων επιτρέπει την ανάπτυξη ενός μοντέλου βελτιστοποίησης για την εύρεση του βέλτιστου πειράματος.

Η βελτιστοποίηση γίνεται σε δύο (2) ξεχωριστά βήματα (ένα για κάθε παράγοντα του μοντέλου). Στο 1<sup>ο</sup> βήμα υπολογίζονται οι βέλτιστες συγκεντρώσεις αντισωμάτων μέσω των καμπυλών βαθμονόμησης με κριτήριο το λόγο σήματος προς θόρυβο. Στο 2<sup>ο</sup> βήμα, υπολογίστηκε ποιο είναι το βέλτιστο πείραμα με βάση τον μέσο θόρυβο που αυτό παράγει.

Κριτήρια για την επιτυχία της ανάλυσης ήταν ο μέσος θόρυβος και η μέση τιμή του λόγου σήματος προς θόρυβο του «βέλτιστου πειράματος». Αν και το βέλτιστο πείραμα εκτελέστηκε σε απλές συνθήκες (1ας αναλύτης ήταν παρών σε κάθε βοθρίο), τα δύο (2) κριτήρια δείξαν ότι η ανάλυση δίνει πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα, γεγονός που δικαιολογεί την αισιοδοξία ότι θα έχει ικανοποιητικά αποτελέσματα και σε πιο «ρεαλιστικά» πειράματα.

Αν και η ανάλυση είναι ακόμα σε αρχικό στάδιο, τα πρώτα αποτελέσματα δείχνουν ότι υπάρχουν ακόμα μεγάλες προοπτικές τόσο στον τομέα της βελτιστοποίησης όσο και στον τομέα της κατανόησης των πειραμάτων ELISA. Σημαντικά επόμενα βήματα κατά την άποψη μας πρέπει να είναι:

- Πρώτον η «σύμπλεξη» των 2 βημάτων της βελτιστοποίησης. Αυτήν τη στιγμή τα βήματα λογίζονται ως τελείως διαφορετικά. Όμως, μια πιο ολοκληρωμένη ανάλυση πρέπει να λαμβάνει υπόψη και τις καμπύλες βαθμονόμησης στο σχεδιασμό ενός βέλτιστου πειράματος, εξαλείφοντας έτσι το βασικό μειονέκτημα της παρούσας ανάλυσης που είναι η ομοιόμορφη αντιμετώπιση όλων των σημάτων.
- Στην ίδια λογική, ένα ολοκληρωμένο σύστημα βελτιστοποίησης πρέπει να λαμβάνει υπόψη τους στόχους της συνολικής ανάλυσης. Σε αυτή την κατεύθυνση, η ανάλυση πρέπει να στοχεύει σε μια συνολικά βέλτιστη-εξατομικευμένη λύση, μια λύση δηλαδή η οποία θα καλύπτει με βέλτιστο τρόπο όλους τους στόχους που μπορεί να έχει κάποιος πειραματιστής. Για κάτι τέτοιο, όπως αναφέρθηκε, χρειάζεται να οριστούν συναρτήσεις κέρδους και οι αντίστοιχοι συντελεστές βαρύτητας τους ως προς την συνολική λύση.
- Τέλος, στόχος μιας τέτοιας ανάλυσης θα πρέπει να είναι ο εντοπισμός των προβληματικών στοιχείων που δυσκολεύουν ένα πείραμα. Με αυτό το τρόπο θα μπορούμε να βελτιώνουμε συνεχώς τον πειραματικό εξοπλισμό είτε πρόκειται για μηχανήματα είτε κυρίως αναλώσιμα όπως αντισώματα. Με άλλα λόγια, θα πρέπει να προχωρήσει στο βήμα που φανερά λείπει από το παρόν στάδιο που είναι ο υπολογισμός της αναγνωρισιμότητας των αντισωμάτων.

# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

## ΑΡΘΡΑ

- Colina M. et al., *Adsorption behavior of model proteins on surfaces*, 2011, *Fluid Phase Equilibr.*, 302: 48–54.
- Dasso J. et al, *A comparison of ELISA and flow microsphere-based assays for quantification of immunoglobulins*, *J. Immunol. Methods*, 263 (1–2) (2002), pp. 23–33
- W. de Jager, G.T. Rijkers, *Solid-phase and bead-based cytokine immunoassay: a comparison*, *Methods*, 38 (2006), pp. 294–303
- Daly D.S. et a, *Evaluating concentration estimation errors in ELISA microarray experiments*, *BMC Bioinformatics*, Volume 6, 26 January 2005, Article number 17, 11p
- Joos T.O., *Protein Microarrays: catching the proteome*, *Mechanisms of Ageing and Development*, Volume 126, Issue 1, January 2005, Pages 161-170
- MacBeath G., *Protein microarrays and proteomics*, *Nature Genetics*, Volume 32, Issue 5 SUPPL. DEC., 1 December 2002, Pages 526-532
- Nielsen U.B. & Geierstanger B.H., *Multiplexed sandwich assays in microarray format*, *Journal of Immunological Methods*, Volume 290, Issue 1-2, July 2004, Pages 107-120
- Pandey A. & Mann M., *Proteomics to study genes and genomes*, *Nature*, Volume 405, Issue 6788, 15 June 2000, Pages 837-846
- Patterson S.D. & Aedersold R.H., *Proteomics: the first decade and beyond*, *Nature Genetics*, Volume 33, Issue SUPPL., 1 March 2003, Pages 311-323
- Poetz O. et al, *Protein microarrays for antibody profiling: Specificity and affinity determination on a chip*, *Proteomics*, Volume 5, Issue 9, June 2005, Pages 2402-2411
- Remick D.G. et al, *Development and optimization of cytokine ELISAs using commercial antibody pairs*, *Journal of Immunological Methods*, Volume 255, Issue 1-2, 1 September 2001, Pages 149-157
- Rodman T.C. et al, *Caveats and suggestions for the ELISA*, *Journal of Immunological Methods*, Volume 137, Issue 1, 1991, Pages 27-35
- Schweitzer B. et al, *Multiplexed protein profiling on microarrays by rolling-circle amplification*, *Nature Biotechnology*, Volume 20, Issue 4, 2002, Pages 359-365
- Schwenk J.M. et al, *Determination of Binding Specificities in Highly Multiplexed Bead-based Assays for Antibody Proteomics*, *Molecular and Cellular Proteomics*, Volume 6, Issue 1, January 2007, Pages 125-132
- Sittampalam S.G. et al, *Application of experimental design techniques to optimize a competitive ELISA*, *Journal of Immunological Methods*, Volume 190, Issue 2, 19 April 1996, Pages 151-161

- Vignali D.A., *Multiplexed particle-based flow cytometric assays*, Journal of Immunological Methods, Volume 243, Issue 1-2, 21 September 2000, Pages 243-255
- Vogt R.F. et al, *Quantitative differences among various proteins as blocking agents for ELISA microtiter plates*, Journal of Immunological Methods, Volume 101, Issue 1, 1987, Pages 43-50

## ΠΑΡΑΔΟΣΕΙΣ - ΒΙΒΛΙΑ

- Diffusion Adsorption Affinity sensors by Hubert H. Girault & Niels Lion (EPFL - 2011)
- Εμβιομηχανική Λ. Αλεξόπουλος (ΕΜΠ – 2011)
- Kitano H, "Foundations of Systems Biology" (MIT - 2001)

## ΙΣΤΟΤΟΠΟΙ

- [www.luminexcorp.com/](http://www.luminexcorp.com/)
- [www.Wikipedia.org/](http://www.Wikipedia.org/)

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ

Πίνακας 1: Πίνακας βαθμονόμησης CSF3 .....	31
Πίνακας 2: Αναλύτες.....	53
Πίνακας 3: Χάρτης Βέλτιστου Πειράματος #56 .....	68
Πίνακας 4: Μεταβολή SNR (1) .....	73
Πίνακας 5: Μεταβολή SNR (2) .....	73
Εικόνα 1: Γραφική απεικόνιση Κεντρικού Δόγματος Βιολογίας .....	4
Εικόνα 2: "Φάσμα" Πρωτεϊνικής Ανάλυσης .....	6
Εικόνα 3: Υπόδειγμα "μονοπατιών" μετάδοσης σήματος .....	7
Εικόνα 4: Αρχή λειτουργίας ELISA .....	9
Εικόνα 5: Σετ μικροσφαιριδίων .....	10
Εικόνα 6: Ορολογία ELISA μικροσφαιριδίων.....	11
Εικόνα 7: Υπόδειγμα συστήματος ανίχνευσης.....	12
Εικόνα 8: Προσρόφηση σε επιφάνεια.....	13
Εικόνα 9: Καμπύλη ποσοστού κάλυψης - συγκέντρωσης επιφανείας .....	16
Εικόνα 10: Αντίσωμα-Αντιγόνα (σχηματικά).....	23
Εικόνα 11: Επίτοποι στην πολυπεπτιδική αλυσίδα.....	23
Εικόνα 12: Αντίδραση υποβάθρου.....	25

Εικόνα 13: Διασταυρούμενη αντίδραση .....	25
Εικόνα 14: Χάρτης χρωματικών ταυτοτήτων.....	27
Εικόνα 15: Κατανομή εντάσεων φωτεινότητας .....	28
Εικόνα 16: Υπόδειγμα βοθρίου δοκιμής θορύβου υποβάθρου .....	28
Εικόνα 17: Υπόδειγμα βοθρίου δοκιμής διασταυρούμενων αντιδράσεων.....	29
Εικόνα 18: Καμπύλες βαθμονόμησης CSF3.....	31
Εικόνα 19: Καμπύλες θορύβου.....	35
Εικόνα 20: Γραφική αναπαράσταση αλγορίθμου .....	47
Εικόνα 21: Γραφική αναπαράσταση αλγορίθμου .....	50
Εικόνα 22: Πειράματα.....	51
Εικόνα 23: Πίνακας Noise Assay .....	52
Εικόνα 24: Πίνακας CrossReactivity.....	54
Εικόνα 25: Διάγραμμα μέσων τιμών Noise Assay .....	55
Εικόνα 26: Διάγραμμα μέσων τιμών μη-διαγώνιων στοιχείων CrossReactivity.....	56
Εικόνα 27: Διακύμανση στηλών CrossReactivity.....	57
Εικόνα 28: Μέσος θόρυβος βοθρίου.....	58
Εικόνα 29: Χάρτης Βέλτιστων Πειραμάτων .....	60
Εικόνα 30: Διάγραμμα Μέσου θορύβου πειραμάτων .....	61
Εικόνα 31: Διάγραμμα Οριακού θορύβου πειραμάτων .....	62
Εικόνα 32: Γραμμική Κλίση Μέσου Θορύβου πειραμάτων .....	63
Εικόνα 33: Ποιότητα Γραμμικής Παρεμβολής.....	64
Εικόνα 34: Διάγραμμα Κινούμενων Κλίσεων .....	65
Εικόνα 35: Ποιότητα Παρεμβολής Κινούμενων Κλίσεων.....	66
Εικόνα 36: "Εικόνα" 56 αναλυτών πριν και μετά .....	71
Εικόνα 37: Αποτελέσματα Βελτιστοποίησης (1) .....	72
Εικόνα 38: Αποτελέσματα Βελτιστοποίησης (2) .....	73