

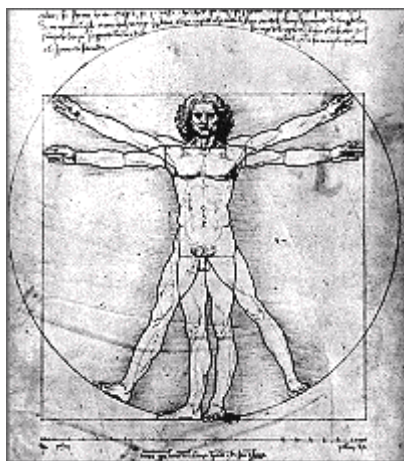


ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ & ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΕΩΝ & ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Προσομοίωση Φυσιολογικών Συστημάτων Εργαστηριακές Ασκήσεις



Κωνσταντίνα Σπ. Νικήτα, Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2019



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ & ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΕΩΝ & ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Προσομοίωση Φυσιολογικών Συστημάτων Εργαστηριακές Ασκήσεις

Κωνσταντίνα Σπ. Νικήτα, Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2019

Πίνακας Περιεχομένων

Άσκηση 1: Μοντέλα Κινητικής Γλυκόζης	1
Άσκηση 2: Εισαγωγή στην Υπολογιστική Νευροεπιστήμη	11
Άσκηση 3: Καρδιαγγειακός Προσομοιωτής	22
Άσκηση 4: Προσομοίωση Εξέλιξης Καρκινικών Όγκων.....	44
Άσκηση 5: Προσομοίωση Αμφιβληστροειδούς	58
Άσκηση 6: Βιοπληροφορική/Υπολογιστική Βιολογία.....	67

Άσκηση 1

Μοντέλα Κινητικής Γλυκόζης

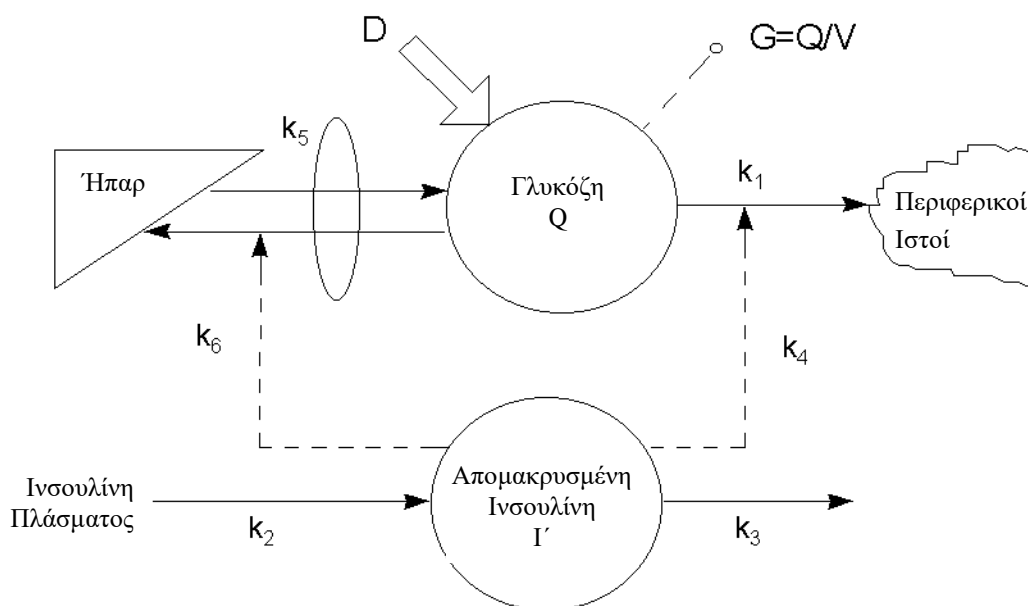
1. Σκοπός

Σκοπός της άσκησης είναι η εξοικείωση του φοιτητή με μοντέλα προσομοίωσης του μεταβολικού συστήματος γλυκόζης-ινσουλίνης καθώς και η πρακτική εξάσκησή του σε θέματα που αφορούν στην ανάπτυξη δυναμικών μοντέλων για την προσομοίωση φυσιολογικών συστημάτων εφαρμόζοντας τεχνικές διαμερισματικής μοντελοποίησης [1]-[3]. Προς αυτή την κατεύθυνση, παρουσιάζονται δύο διαμερισματικά μοντέλα κινητικής της γλυκόζης, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως για τη μελέτη του μεταβολισμού γλυκόζης. Οι φοιτητές συμμετέχουν στην ανάπτυξη λογισμικού και πραγματοποιούν υπολογιστικά πειράματα που προσομοιώνουν την Ενδοφλέβια Δοκιμασία Ανοχής στη Γλυκόζη. Στόχος είναι τόσο η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο λειτουργεί το ήπαρ, το πάγκρεας και οι περιφερικοί ιστοί στο μηχανισμό ρύθμισης της γλυκόζης όσο και η ενασχόληση του φοιτητή με τη δυναμική μοντελοποίηση του μεταβολισμού γλυκόζης καθώς και με τεχνικές προσαρμογής, που επιτρέπουν την ταυτοποίηση των παραμέτρων του μοντέλου με βάση τις ιδιαίτερες μεταβολικές συμπεριφορές που χαρακτηρίζουν κάθε άτομο.

2. Κλασικό Μοντέλο Κινητικής Γλυκόζης

Το κλασικό μοντέλο κινητικής της γλυκόζης χρησιμοποιείται ευρύτατα για τη μελέτη του μεταβολισμού της γλυκόζης *in vivo* σε φυσιολογικές, παθολογικές και επιδημιολογικές μελέτες [2]. Οι μελέτες γίνονται με χρήση της **Ενδοφλέβιας Δοκιμασίας Ανοχής στη Γλυκόζη (Standard IntraVenous Glucose Tolerance Test - standard IVGTT)**. Στο IVGTT χορηγείται σε ενέσιμη μορφή γλυκόζη, κατά τη χρονική στιγμή $t=0$ και για διάστημα 30-60 sec, για να ακολουθήσουν μετρήσεις των συγκεντρώσεων γλυκόζης και ινσουλίνης στο πλάσμα.

Για την ερμηνεία των IVGTT δεδομένων, είναι απαραίτητο να αναφερθεί πως τόσο η απομάκρυνση όσο και η ενδογενής παραγωγή γλυκόζης -ή αλλιώς το ηπατικό ισοζύγιο γλυκόζης (net hepatic glucose balance)- εξαρτώνται από τη συγκεντρωση της γλυκόζης και της ινσουλίνης, αφού οι ενδογενείς πηγές παραγωγής γλυκόζης (ήπαρ και νεφροί) συνεισφέρουν στις μετρούμενες συγκεντρώσεις γλυκόζης πλάσματος.



Συγκεκριμένα, το ψυχρό μοντέλο προσομοίωσης της κινητικής της γλυκόζης (*cold model*) έχει τη μορφή που φαίνεται στο Σχήμα 1, όπου k_i είναι σταθεροί συντελεστές ροής που χαρακτηρίζουν είτε τη ροή ύλης (συνεχείς γραμμές) ή τις λειτουργίες ελέγχου (διακεκομμένες γραμμές).

$$\begin{aligned}\dot{G}(t) &= -[S_G + X(t)]G(t) + S_G G_{ss}, & G(0) &= G_0 \\ \dot{X}(t) &= -p_2 \{X(t) - S_I [I(t) - I_{ss}]\}, & X(0) &= 0\end{aligned}\quad (1)$$
$$\begin{aligned} X(t) &= (k_4 + k_6)I'(t) \\ S_G &= k_1 + k_5 \\ p_2 &= k_3 \\ S_I &= \frac{k_2}{k_3}(k_4 + k_6) \end{aligned} \tag{2}$$

όπου G_{ss} και I_{ss} η συγκέντρωση της γλυκόζης και της ινσουλίνης, αντίστοιχα, σε συνθήκες μόνιμης κατάστασης και k_i είναι σταθεροί συντελεστές ροής. Οι παράμετροι του μοντέλου είναι:

- Η **ενεργότητα της γλυκόζης**, S_G : Μετρά την ικανότητα της γλυκόζης (στη μόνιμη κατάσταση), να διεγείρει την απομάκρυνση της γλυκόζης και να αναστείλει την ενδογενή παραγωγή της. Μετράται σε min^{-1} και υπολογίζεται από τη σχέση:

$$S_G = -\frac{\partial(dG/dt)}{\partial G}$$

όπου G η συγκέντρωση της γλυκόζης στο πλάσμα.

- Η **ευαισθησία της ινσουλίνης**, S_I : Μετρά την ικανότητα της ινσουλίνης (στη μόνιμη κατάσταση) να αυξήσει την απομάκρυνση της γλυκόζης και να αναστείλει την ενδογενή παραγωγή της στη μονάδα του χρόνου. Μετράται σε min^{-1} . Υπολογίζεται από τη σχέση:

$$S_I = \partial S_G / \partial I$$

- Η **παράμετρος δράσης της ινσουλίνης**, p_2 μετράται σε min^{-1} .
- Η **συγκέντρωση της γλυκόζης** G_0 κατά τη χρονική στιγμή $t = 0$. Συνήθως μετράται σε $\text{mg} \cdot \text{dl}^{-1}$ ή mmol/l , ανάλογα με τις μονάδες συγκέντρωσης της γλυκόζης.

Το μοντέλο προσαρμόζεται στα δεδομένα μετρήσεων συγκεντρώσεων γλυκόζης και ινσουλίνης πλάσματος, σαν δυναμική συνάρτηση. Το μοντέλο περιλαμβάνει δύο παραμέτρους μεταβολισμού S_G και S_I που ποσοτικοποιούν την ανοχή γλυκόζης και παίρνουν διαφορετικές τιμές για κάθε ασθενή. Πρέπει να τονιστεί ότι αυτές οι παράμετροι αφορούν στη δράση του ήπατος και των περιφερικών ιστών, δηλαδή ποσοτικοποιούν την επίδραση της γλυκόζης, S_G και της ινσουλίνης, S_I , τόσο στη διέγερση του ρυθμού απομάκρυνσης της γλυκόζης πλάσματος όσο και στην αναστολή της ενδογενούς παραγωγής της γλυκόζης.

Στη συνέχεια παρουσιάζεται η χρήση του προγράμματος SAAM II [4] για την υλοποίηση του μοντέλου κινητικής της γλυκόζης. Στον Πίνακα 1, παρουσιάζεται ένα σύνολο πραγματικών δεδομένων IVGTT.

Ο Πίνακας 1, έχει γραφεί σε μορφή συμβατή με το SAAM II, αποτελεί ένα αντιπροσωπευτικό σύνολο δεδομένων δοκιμασίας IVGTT, το οποίο περιλαμβάνει το χρόνο t (min), μαζί με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις γλυκόζης (mg/dl) και ινσουλίνης (mU/l). Κατά τον υπολογισμό της κινητικής της γλυκόζης με χρήση μοντέλου ενός διαμερίσματος (Σχήμα 1), συνιστάται τα δείγματα που λαμβάνονται κατά τα πρώτα 6-8 min της δοκιμασίας να λαμβάνονται χωρίς συντελεστή βαρύτητας.

Οι βασικές συγκεντρώσεις ινσουλίνης I_{ss} και γλυκόζης G_{ss} εκφράζουν τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις κατά τη μόνιμη κατάσταση, και συνήθως λαμβάνονται ως ο μέσος όρος των τελευταίων 2-3 δειγμάτων.

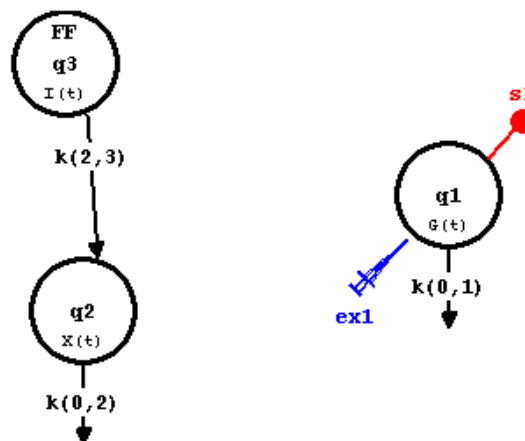
Θεωρούμε πως το σφάλμα κατά τη μέτρηση της γλυκόζης είναι της τάξης 2%, ενώ δεν υπάρχει σφάλμα κατά τη μέτρηση της συγκέντρωσης ινσουλίνης. Το μοντέλο του

Η απώλεια $k(0,1)$ από το διαμέρισμα της γλυκόζης, είναι χρονικά μεταβαλλόμενη και αναπαριστά τη διαφορική εξίσωση 1. Το σύνολο των εξισώσεων του SAAM II φαίνεται στον Πίνακα 2.

```

# Sample IVGTT data
DATA
T                G (FSD 0.02)                I
0                96 (-)                       16
2                312 (-)                      120
3                291 (-)                      101
4                289 (-)                      107
5                271 (-)                      83
7                241 (-)                      49
10               220                          54
15               184                          49
20               170                          38
25               151                          43
30               141                          38
35               121                          25
40               94                           27
50               88                           11
60               80                           11
70               83                           10
80               84                           10
100              90                           12
120              89                           11
140              90                           17
160              91                           18
180              87                           11
210              98                           14
240              94                           9
END
CONST Gss 93
CONST Iss 11.3
CONST D 305

```



Οι είσοδοι του μοντέλου προσδιορίζονται σύμφωνα με το πλαίσιο διάλογου του Σχήματος 3. Η πρώτη εξίσωση $ex1 = G0$ αντιστοιχεί στη στιγμιαία (bolus) έγχυση γλυκόζης και προσδιορίζεται ως η τομή της καμπύλης της συγκέντρωσης γλυκόζης με τον άξονα του χρόνου, ενώ η δεύτερη $ex1 = SG * G_{ss}$ εκφράζει την ενδογενή μεταβολή της συγκέντρωσης γλυκόζης.

Για τα δεδομένα του Πίνακα 1, το πείραμα λήγει μετά την πάροδο 240 min. Τέλος, η συνάρτηση $q3.FF$ εκφράζει τη συνάρτηση επιβολής που προκύπτει από το σύνολο των δεδομένων συγκέντρωσης ινσουλίνης και αντιστοιχεί στη διαφορά της συγκέντρωσης ινσουλίνης από τη βασική της τιμή, η οποία προσδιορίζεται από τα δεδομένα. Η μεταβολή της ινσουλίνης φαίνεται στο Σχήμα 4. Η δράση της ινσουλίνης αντιπροσωπεύεται από το $q2$.

Τυπικές αρχικές τιμές για τη μελετούμενη περίπτωση παρουσιάζονται στο Σχήμα 5 (παράθυρο “Parameters” του SAAM II).

Η εκτίμηση του μοντέλου για τη συγκέντρωση της γλυκόζης με τις παραπάνω αρχικές συνθήκες λαμβάνεται επιλύοντας το μοντέλο (επιλογή solve). Είναι δυνατή η γραφική παράσταση των εκτιμήσεων του μοντέλου ($s1$) σε συνδυασμό με τα δεδομένα μετρήσεων της γλυκόζης (G), ενεργοποιώντας το παράθυρο των γραφημάτων (Σχήμα 6) του SAAM II.

Οι παράμετροι στο αντίστοιχο παράθυρο (“Parameter Windows”) μπορούν να βελτιστοποιηθούν συσχετίζοντας τις εκτιμούμενες με τις μετρούμενες τιμές ($s1$ και G) με προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα (χρήση της εντολής “fit”). Στο σημείο αυτό πρέπει να τονισθεί ότι η εκτίμηση των παραμέτρων του μοντέλου βασίζεται μόνο στα δεδομένα της γλυκόζης, ενώ η συγκέντρωση της ινσουλίνης αποτελεί τη δυναμική συνάρτηση επιβολής (forcing function) του μοντέλου. Μετά τη διαδικασία προσαρμογής, λαμβάνουμε τη γραφική παράσταση του Σχήματος 7 για τον προσδιορισμό της γλυκόζης.

Η ποιότητα της προσαρμογής μπορεί να ελεγχθεί με τον υπολογισμό των σταθμισμένων υπολοίπων (weighted residuals) που εκφράζουν το λόγο της διαφοράς μεταξύ των δεδομένων και των εκτιμήσεων του μοντέλου προς την τυπική απόκλιση των δεδομένων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 8.

Κάποιος θα μπορούσε να ελέγξει τα σταθμισμένα υπόλοιπα με τ assumptions εξαιτίας του μετρούμενου σφάλματος στη συγκέντρωση της γλυκόζης. Αφού το σφάλμα θεωρούμε ότι είναι λευκό, με μηδενική μέση τιμή και γνωστή διακύμανση, τα υπόλοιπα θα αντικατοπτρίζουν αυτή τη θεώρηση.

Πίνακας 2: Η μορφή των εξισώσεων στο Πρόγραμμα SAAM II

```
q3.FF = lin(I)-Iss
flux(2,3) = k(2,3) * q3
k(2,3)=p2*SI
flux(0,2) = k(0,2) * q2
k(0,2)=p2
flux(0,1) = k(0,1) * q1
k(0,1)=SG+q2
ex1.bolus = 0.0
ex1.infusion = 0.0
s1 = q1
```

Exogenous Input

Name: Reference Name: Units:

Type	Initial	Constant	Start	Stop	Repeat	Every	Nr. Repeats
Equation	ex1 = g0		0.000	0.000	-	-	-
Equation	ex1 = SG*gss		0.000	240.000	-	-	-

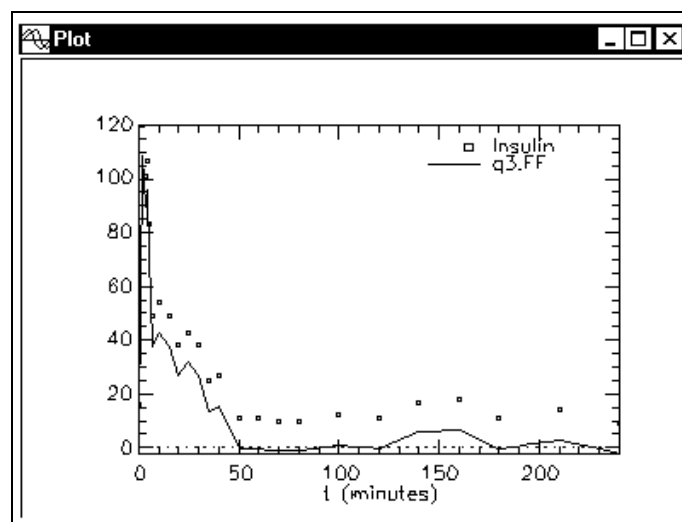
Input Type:

☐ Bolus
☐ Infusion
☐ Primed Infusion
☒ Equation

Initial Amount:
 Constant Rate:
 Event Start:
 Event Stop:
 Repeat Every:
 Nr. of Repeats:

Equation:

Σχήμα 3: Εξισώσεις του μοντέλου για τις εξωγενείς εισόδους.



Σχήμα 4: Γραφική παράσταση δεδομένων πλάσματος και της μορφής της συνάρτησης επιβολής.

Parameters

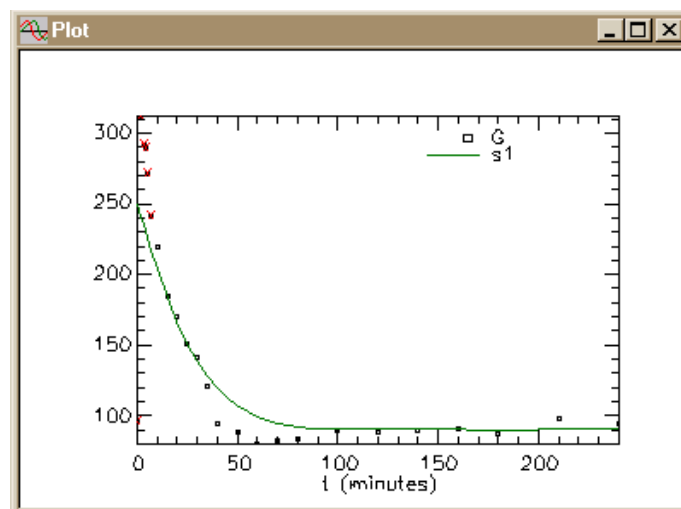
Name	Type	Current	Low Limit	High Limit
G0	Adj	250.0000	10.0000	1000.0000
SG	Adj	0.0300	0.0010	0.1000
SI	Adj	3.000e-004	1.000e-005	0.0010
p2	Adj	0.0300	0.0010	0.1000

Name: Value:

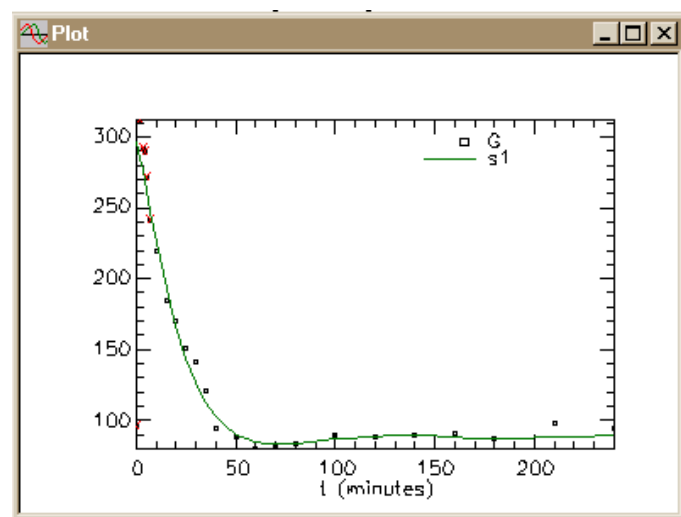
Type: ☐ Fixed ☒ Adjustable

Low Limit: High Limit:

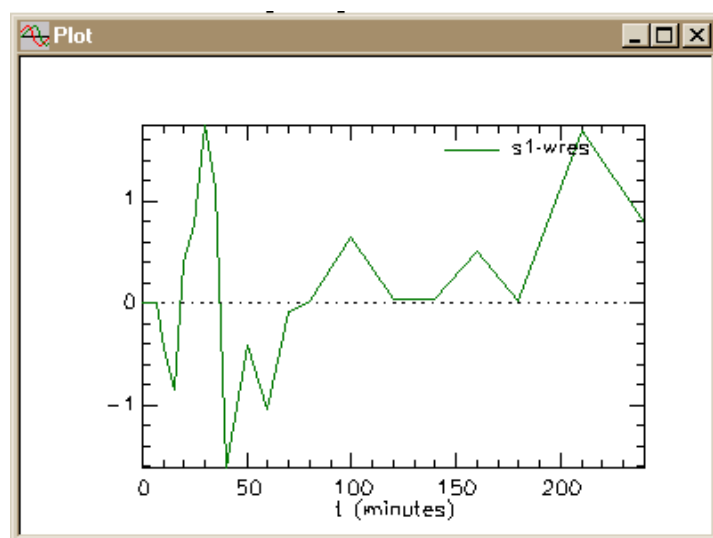
Σχήμα 5: Αρχικές συνθήκες για τις παραμέτρους του ψυχρού μοντέλου.



Σχήμα 6: Προσαρμογή στα δεδομένα της γλυκόζης πριν από τη βελτιστοποίηση των παραμέτρων.



Σχήμα 7: Προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα της γλυκόζης.



Σχήμα 8: Έλεγχος ποιότητας της προσαρμογής.

Είναι δυνατό, ανοίγοντας το παράθυρο της στατιστικής (“Statistic windows”) να δούμε τις προσδιορισμένες τιμές των παραμέτρων, την ακρίβεια τους εκφρασμένη ως ο λόγος μεταξύ σταθερής απόκλισης και μέσης τιμής (FSD ή συντελεστής μεταβλητότητας). Το παράθυρο φαίνεται στο Σχήμα 9.

Σ. Statistics					
Parameter/Variable	Value	Std.Dev.	Coef. of Var.	95% Confidence Interval	
G0	296.75775	2.68020e+001	9.03160e+000	239.27315	354.24235
SG	0.02945	1.65676e-002	5.62599e+001	-0.00609	0.06498
SI	5.87280e-004	7.73692e-005	1.31742e+001	4.21339e-004	7.53220e-004
p2	0.04882	3.25992e-002	6.67687e+001	-0.02109	0.11874
----- Derived Variables -----					
ex1.bolus	296.75775	2.68020e+001	9.03160e+000	239.27315	354.24235
ex1.infusion	2.73870	1.54079e+000	5.62599e+001	-0.56597	6.04337
k(0,2)	0.04882	3.25992e-002	6.67687e+001	-0.02109	0.11874
<input type="radio"/> Correlation Matrix <input type="radio"/> Covariance Matrix <input checked="" type="radio"/> Objective					
	Objective	Scaled Data Variance			
s1 : G	4.440095e+000	8.525265e+000			
Total objective	4.440095e+000				
ΔIC	3.416764e+000				
BIC	3.540427e+000				

Σχήμα 9: Το παράθυρο Statistics του μοντέλου.

Είναι πολύ εύκολο να προσδιοριστούν και άλλες παράμετροι, όπως για παράδειγμα ο όγκος κατανομής της γλυκόζης. Ο όγκος κατανομής V εκφρασμένος σε dl/kg σωματικού βάρους σχετίζεται με την G_0 με τη σχέση $V = D/(G_0 - G_{ss})$ όπου D είναι η χορηγούμενη δόση γλυκόζης (mg/kg). Αν η χορηγούμενη δόση είναι γνωστή, στην περίπτωση μας $300mg/kg$ μπορούμε απλώς να προσθέσουμε στο παράθυρο εξισώσεων (Equation window) την ακόλουθη σχέση:

$$V = D/(G_0 - G_{ss})$$

και να επαναλάβουμε τη διαδικασία προσαρμογής. Τα στατιστικά αποτελέσματα δίνονται στο Σχήμα 9.

2.1. Πρακτική Εξάσκηση

Ερώτηση 1: Υλοποιήστε το παραπάνω μοντέλο, καθώς και τα προαναφερθέντα βήματα, στο SAAM II με δεδομένα που θα σας δοθούν κατά τη διάρκεια του εργαστηρίου (στις παραμέτρους θεωρήστε τις ίδιες αρχικές τιμές και τα ίδια όρια όπως και προηγουμένως).

Ερώτηση 2: Ποιες οι τιμές των παραμέτρων του μοντέλου;

Ερώτηση 3: Δεδομένου ότι ο ρυθμός μεταβολής της γλυκόζης είναι η διαφορά του ηπατικού ισοζυγίου B , που μπορεί να είναι θετικό ή αρνητικό, από την απορρόφηση

της γλυκόζης από τους περιφερειακούς ιστούς U_p , εξηγήστε πως καταλήγουμε στο σύστημα των διαφορικών εξισώσεων (1) και (2). Δίνεται ότι:

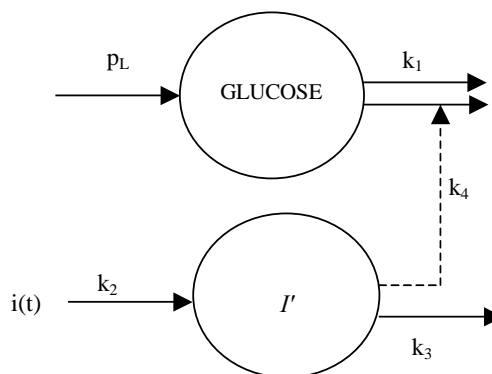
$$B = B_0 - (k_5 + k_6 i')G \text{ και } U_p = (k_1 + k_4 i')G$$

όπου B είναι το ηπατικό ισοζύγιο γλυκόζης και B_0 η βασική τιμή. Το i' αντιστοιχεί στο απομακρυσμένο διαμέρισμα ινσουλίνης (θεωρήστε ότι $G(0) = G_{ss}$).

Ερώτηση 4: Για ποιο λόγο προτιμούνται τα απλοποιημένα μοντέλα από τα πλήρη;

3. Απλοποιημένο Μοντέλο Κινητικής Γλυκόζης

Σε αυτό το μοντέλο η εξαφάνιση της γλυκόζης εξαρτάται από την ινσουλίνη σε ένα απομακρυσμένο διαμέρισμα. Η ινσουλίνη εισέρχεται σε ένα απομακρυσμένο διαμέρισμα συγκέντρωσης I' με αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού εξαφάνισης της γλυκόζης με γραμμικό τρόπο. Η γλυκόζη εξαφανίζεται και ανεξάρτητα από την ινσουλίνη, ενώ η παραγωγή της είναι σταθερή. Η γραφική αναπαράσταση του μοντέλου δίνεται στο Σχήμα 10.



Σχήμα 10: Απλοποιημένο μοντέλο κινητικής της γλυκόζης.

3.1. Πρακτική Εξάσκηση

Ερώτηση 1: Το μοντέλο του Σχήματος 10 περιγράφεται από ένα σύστημα διαφορικών εξισώσεων. Να δώσετε τη μορφή τους. Να εξηγήσετε τη σημασία των παραμέτρων του συστήματος των διαφορικών εξισώσεων.

Ερώτηση 2: Να δώσετε τυπικές τιμές στις παραμέτρους του μοντέλου.

Ερώτηση 3: Να κατασκευάσετε τις γραφικές παραστάσεις της συνάρτησης επιβολής και των δεδομένων ινσουλίνης συναρτήσει του χρόνου καθώς και της γλυκόζης συναρτήσει του χρόνου με τις αρχικές τιμές των παραμέτρων και των μετρούμενων τιμών γλυκόζης, πριν την προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα.

Ερώτηση 4: Να επιλύσετε το μοντέλο και να πραγματοποιήσετε προσαρμογή στα δεδομένα της γλυκόζης. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονισθεί ότι η εκτίμηση των παραμέτρων του μοντέλου βασίζεται μόνο στα δεδομένα της γλυκόζης, ενώ η συγκέντρωση της ινσουλίνης αποτελεί τη δυναμική συνάρτηση επιβολής (forcing function) του μοντέλου.

Ερώτηση 5: Μετά τη διαδικασία προσαρμογής, να δημιουργήσετε την γραφική παράσταση προσδιορισμού της γλυκόζης.

Ερώτηση 6: Να ελέγξετε την ποιότητα της προσαρμογής.

Ερώτηση 7: Να καταγράψετε τα στατιστικά αποτελέσματα.

Ερώτηση 8: Προσδιορίστε τους συντελεστές S_I και S_G

Ερώτηση 9: Να συγκρίνετε τα δύο μοντέλα της γλυκόζης. Ποιο νομίζετε πως είναι καταλληλότερο να χρησιμοποιηθεί σε κλινικές εφαρμογές και γιατί.

Βιβλιογραφία

- [1] Νικήτα Κωνσταντίνα, *Προσομοίωση Φυσιολογικών Συστημάτων*, Εκδόσεις Τζιόλα, 2011.
- [2] R.C. Carson, C. Cobelli, L. Finkelstein, *The mathematical modeling of metabolic and endocrine systems: Model Formulation, Identification, and Validation*, John Wiley and Sons, 1983.
- [3] K. Zarkogianni, A. Vazeou, S.G. Mougiakakou, A. Prountzou, K.S. Nikita, "An insulin infusion advisory system based on autotuning nonlinear model-predictive control," *IEEE Trans Biomed Eng*, 58 (9), pp. 2467-77, 2011.
- [4] SAAM II. User Guide, ver. 1.1.1 for Apple Macintosh, Microsoft Windows 95 and Microsoft Windows NT.

Άσκηση 2

Εισαγωγή στην Υπολογιστική Νευροεπιστήμη

1. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργαστηριακής άσκησης είναι η εισαγωγή του φοιτητή στο ερευνητικό πεδίο της Υπολογιστικής Νευροεπιστήμης και η κατανόηση της δομής και λειτουργίας του νευρικού συστήματος. Για τον σκοπό αυτό επιχειρείται η πρακτική μελέτη του μοντέλου Hodgkin-Huxley με τη βοήθεια του ειδικού εργαλείου “Hodgkin-Huxley Simulator” (HHSIM). Η πειραματική εξάσκηση αποτελείται από ασκήσεις που διενεργούνται με χρήση του HHSIM, ενώ συμπεριλαμβάνονται ερωτήσεις κρίσεως οι οποίες απαντώνται στην εργαστηριακή αναφορά που πρέπει να παραδοθεί.

2. Εισαγωγή

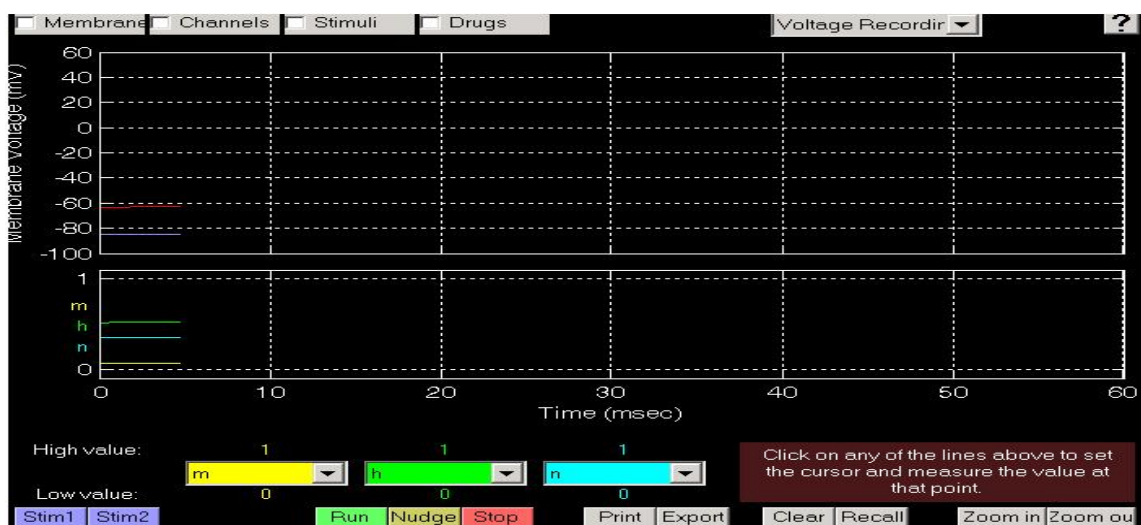
Ο κλάδος της Υπολογιστικής Νευροεπιστήμης (Computational Neuroscience) είναι ένα διεπιστημονικό πεδίο έρευνας που εμπλέκει τους επιστημονικούς τομείς της νευρολογίας, της νευροφυσιολογίας, της πληροφορικής και των εφαρμοσμένων μαθηματικών και φυσικών επιστημών στην προσπάθεια κατανόησης της δομής και λειτουργίας του νευρικού συστήματος. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται μαθηματικές και υπολογιστικές μέθοδοι, όπως μαθηματικά μοντέλα και υπολογιστικές προσομοιώσεις. Πρωτοπόροι στον τομέα της Υπολογιστικής Νευροεπιστήμης υπήρξαν οι Andrew Hodgkin και Alan Huxley, οι οποίοι το 1952 δημοσίευσαν το πρώτο μαθηματικό μοντέλο ενός νευρώνα με στόχο την αναπαραγωγή του δυναμικού ενέργειας (action potential) [1]. Ακόμα και σήμερα, το μοντέλο αυτό εξακολουθεί να είναι θεμελιώδες και χρησιμοποιείται αρκετά ως βάση σε σύγχρονες ερευνητικές εργασίες. Περισσότερες λεπτομέρειες για το μοντέλο Hodgkin-Huxley υπάρχουν στα στοιχεία θεωρίας του 10^{ου} κεφαλαίου του βιβλίου [2].

3. Γραφικός Προσομοιωτής Hodgkin-Huxley: HHSIM

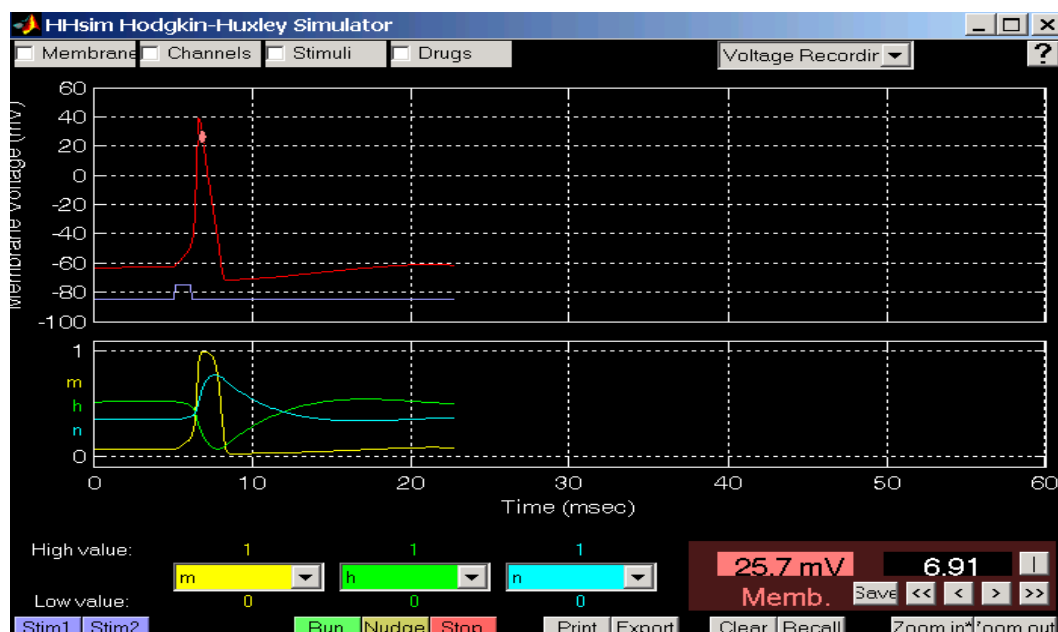
Στο πλαίσιο της εργαστηριακής άσκησης θα μελετηθούν τα αποτελέσματα της επίλυσης των εξισώσεων Hodgkin-Huxley με τη βοήθεια του λογισμικού HHSIM (Hodgkin-Huxley SIMulator). Πρόκειται για ένα ελεύθερα διαθέσιμο λογισμικό που έχει αναπτυχθεί στο Carnegie Mellon University των Ηνωμένων Πολιτειών και είναι ειδικά σχεδιασμένο για γραφική υλοποίηση των εξισώσεων Hodgkin-Huxley. Το λογισμικό αποτελείται από ένα κυρίως παράθυρο εργασίας, στο οποίο παρουσιάζονται οι τιμές των μεταβλητών και των παραμέτρων του μοντέλου, και ιδιαίτερα του δυναμικού στα άκρα της μεμβράνης, καθώς και το εξωτερικά επιβαλλόμενο ρεύμα με το οποίο διεγείρεται ή αναστέλλεται το κύτταρο (Σχήμα 1). Ο χρήστης μπορεί να επιλέξει μεταξύ μεγάλου εύρους τιμών για κάθε παράμετρο του μοντέλου και να εξετάσει την επίδρασή της στο παραγόμενο δυναμικό ενέργειας.

Στο κύριο παράθυρο εργασίας εμφανίζονται δύο γραφήματα. Στο πρώτο (το μεγαλύτερο) παρουσιάζεται η χρονική μεταβολή του δυναμικού της μεμβράνης (κόκκινο χρώμα) και του εξωτερικά επιβαλλόμενου ρεύματος που ερεθίζει το κύτταρο (μωβ χρώμα), ενώ στο δεύτερο εμφανίζεται η χρονική μεταβολή των μεταβλητών των πυλών m , h και n (κίτρινο, πράσινο και γαλάζιο χρώμα, αντίστοιχα). Για το δεύτερο αυτό γράφημα, είναι δυνατή η επιλογή διάφορων ποσοτήτων της λειτουργίας των καναλιών, όπως ρευμάτων, αγωγιμοτήτων και άλλων παραμέτρων, ώστε να εμφανιστεί γραφικά η μεταβολή αυτών στο χρόνο. Στο κατώτερο τμήμα του παραθύρου υπάρχουν διάφορες επιλογές σε σχέση με τη διενέργεια των προσομοιώσεων. Τα “κουμπιά” **Stim1** και **Stim2** εισάγουν, όταν πατηθούν, τα αντίστοιχως ορισμένα ερεθίσματα. Με το πάτημα του κουμπιού **Run** αρχίζει η προσομοίωση του μοντέλου στο χρόνο και με το αντίστοιχο **Stop** σταματάει. Το **Nudge** χρησιμοποιείται για την προσομοίωση του μοντέλου για ένα μικρό χρονικό διάστημα. Τα υπόλοιπα κουμπιά παρέχουν λειτουργίες χειρισμού των αποτελεσμάτων.

Επιλέγοντας με το ποντίκι οποιοδήποτε σημείο των καμπυλών που παράγονται από την προσομοίωση εμφανίζεται στο κάτω δεξιά μέρος του παραθύρου η τιμή της αντίστοιχης μεταβλητής την αντίστοιχη χρονική στιγμή (Σχήμα 2).



Σχήμα 1: Κύριο παράθυρο του γραφικού προσομοιωτή Hodgkin-Huxley.



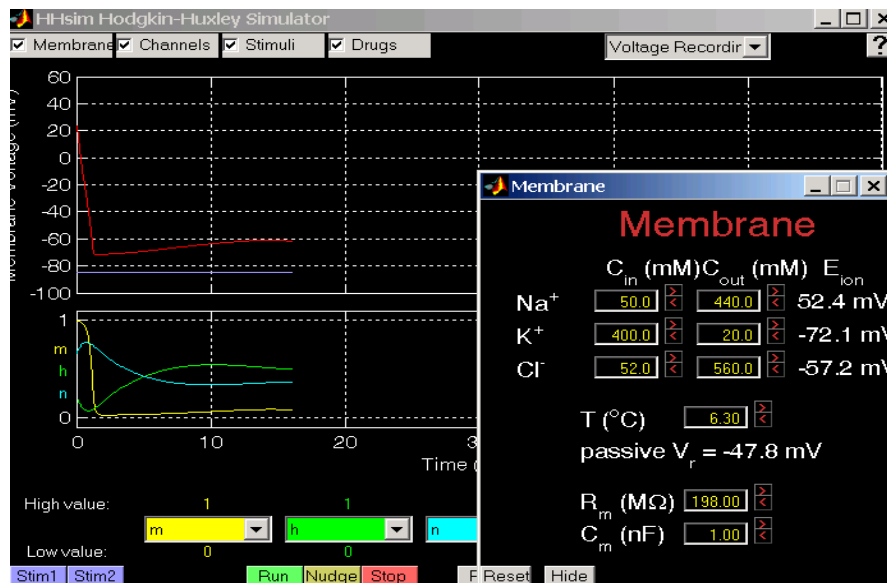
Σχήμα 2: Λήψη της τιμής του δυναμικού σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή επιλέγοντας με το ποντίκι στην αντίστοιχη καμπύλη.

Υπάρχουν δύο καταστάσεις διενέργειας των πειραμάτων. Με την επιλογή κατάστασης **voltage recording**, στο πάνω δεξιά κυλιόμενο μενού επιλογών, καθορίζεται εξωτερικά το ρεύμα και προσομοιώνεται η τιμή του δυναμικού. Η επιλογή **voltage clamp**, αντίθετα, διατηρεί σταθερό το δυναμικό στα άκρα της μεμβράνης και το κυρίως παράθυρο γραφικής αναπαράστασης παρουσιάζει την τιμή του ρεύματος σε κάθε χρονική στιγμή. Στο πλαίσιο αυτής της εργαστηριακής άσκησης θα ασχοληθούμε μόνο με την κατάσταση λειτουργίας **voltage recording**.

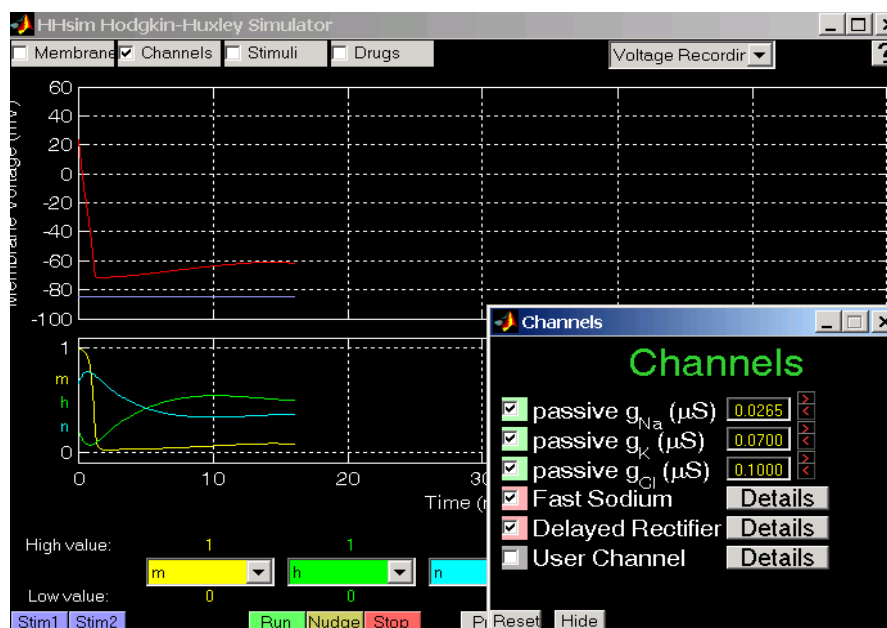
Στο ανώτατο σημείο του παραθύρου και αριστερά, υπάρχουν τέσσερα κουτιά επιλογής. Η επιλογή του καθενός από αυτά προκαλεί την εμφάνιση υποπαραθύρων, στα οποία καθορίζονται οι τιμές των παραμέτρων του μοντέλου Hodgkin-Huxley. Συγκεκριμένα, εμφανίζονται πεδία επιλογών των τιμών των παραμέτρων της μεμβράνης (**Membrane**), των καναλιών ιόντων (**channels**), των εξωτερικών ερεθισμάτων (**Stimuli**) και των εξωτερικών φαρμακευτικών επιδράσεων (**Drugs**).

Στο παράθυρο χειρισμού των παραμέτρων της μεμβράνης (Σχήμα 3), οι επιλογές που παρέχονται αφορούν τις συγκεντρώσεις των διάφορων τύπων ιόντων εντός και εκτός του κυττάρου, τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος του κυττάρου και τη συνολική αντίσταση και χωρητικότητα του ισοδύναμου ηλεκτρικού κυκλώματος της μεμβράνης. Παρέχονται ακόμα πληροφορίες για το δυναμικό ηρεμίας για κάθε ιόν και το συνολικό δυναμικό ηρεμίας (resting potential- V_r) της μεμβράνης.

Στο παράθυρο χειρισμού των καναλιών (Σχήμα 4) υπάρχουν πέντε προκαθορισμένα κανάλια και μία επιλογή για καθορισμό ενός καναλιού από το χρήστη. Τα τρία πρώτα κανάλια είναι παθητικά και γι' αυτά δίνονται μόνο οι αγωγιμότητές τους στα αντίστοιχα ιόντα. Τα δύο επόμενα κανάλια είναι τα ενεργητικά κανάλια Na^+ και K^+ που υπεισέρχονται στις εξισώσεις Hodgkin-Huxley. Για τα κανάλια αυτά υπάρχει δυνατότητα μεταβολής των συναρτησιακών εκφράσεων και των παραμέτρων που σχετίζονται με τις συναρτήσεις a και b . Συγκεκριμένα, δίνεται η δυνατότητα να επιλεγούν οι εκθετικές μορφές των συναρτήσεων που δίνουν τις τιμές των a και b , καθώς και οι τιμές των παραμέτρων των συναρτήσεων που έχουν σχέση με τις παραμέτρους των εκθετικών.

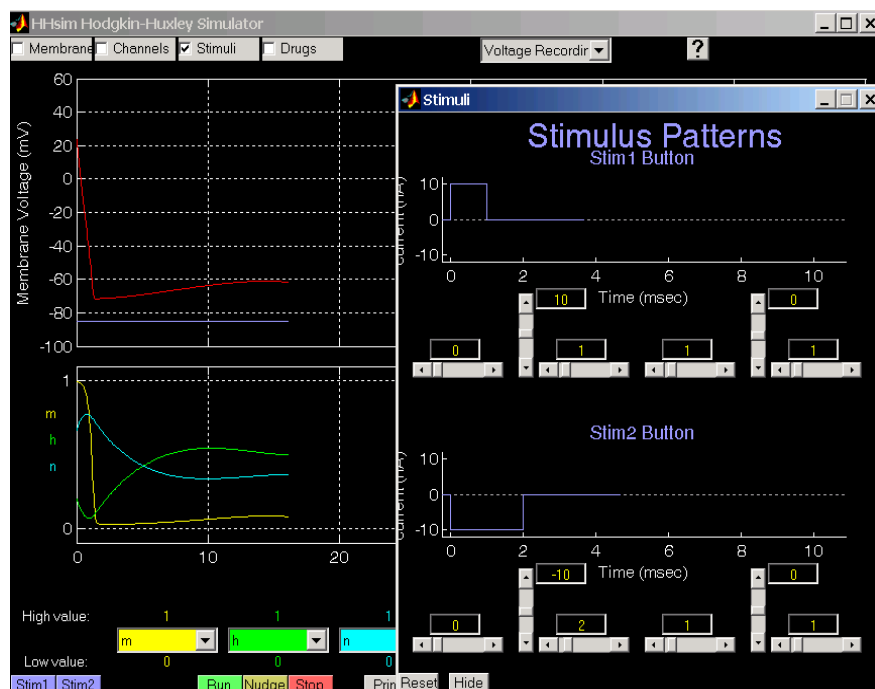


Σχήμα 3: Παράθυρο χειρισμού των παραμέτρων της μεμβράνης.



Σχήμα 4: Παράθυρο χειρισμού των παραμέτρων των καναλιών.

Στο παράθυρο χειρισμού των ερεθισμάτων (Σχήμα 5) ορίζονται τα ερεθίσματα ρεύματος που μπορούν να εισαχθούν στον υπό μελέτη νευρώνα με πάτημα των κουμπιών **Stim1** και **Stim2**, αντίστοιχα, του κυρίως παραθύρου. Τα ερεθίσματα μπορεί να αποτελούνται από έναν ή δύο στη σειρά παλμούς, θετικούς ή αρνητικούς, με οποιοδήποτε πλάτος. Η διάρκεια των παλμών καθορίζεται επίσης από το χρήστη με εισαγωγή των επιθυμητών τιμών. Περισσότερες λεπτομέρειες και πληροφορίες σχετικά με τον προσομοιωτή HHSIM μπορούν να αναζητηθούν στο [3].



Σχήμα 5: Παράθυρο δημιουργίας ερεθισμάτων.

4. Πρακτική Εξάσκηση

Οι τιμές των παραμέτρων για την πρακτική εξάσκηση είναι διαφορετικές για κάθε φοιτητή και καθορίζονται από τον αριθμό μητρώου (AM) του. Κάθε AM αντιστοιχεί σε μια σειρά μεταβλητών 031abcde, οι οποίες και εμφανίζονται στις παραμέτρους. Στη συνέχεια, δίνονται παραδείγματα όλων των παραμέτρων για τυχαία επιλεγμένο AM: 03104041 (a=0, b=4, c=0, d=4, e=1).

$P1.2 = 4a.2 \text{ mV}$ (Στο παράδειγμα μας $P1.2 = 40.2 \text{ mV}$)

$P1.3 = 9.b5 \%$ (Στο παράδειγμα μας $P1.3 = 9.45\%$)

$P1.4 = -(c+1) \text{ mV}$ (Στο παράδειγμα μας $P1.4 = -1 \text{ mV}$)

$P2.2 = -4d.5 \text{ mV}$ (Στο παράδειγμα μας $P2.2 = -44.5 \text{ mV}$)

$P2.3 = -3e.3 \text{ mV}$ (Στο παράδειγμα μας $P2.3 = -31.3 \text{ mV}$)

$P3.3 = 6b \text{ nA}$ (Στο παράδειγμα μας $P3.3 = 64 \text{ nA}$)

$P3.4 = -5.c5 \text{ nA}$ (Στο παράδειγμα μας $P3.4 = -5.05 \text{ nA}$)

$P4.3 = (-)^d45 \text{ mV}$ (Στο παράδειγμα μας $P4.3 = 45 \text{ mV}$)

$P5.4 = 0.(e+1) \text{ ms}$ (Στο παράδειγμα μας $P5.4 = 0.2 \text{ ms}$)

4.1. Δυναμικό Ηρεμίας

Στον προσομοιωτή HHSIM περιλαμβάνονται τρία παθητικά και δύο ενεργητικά κανάλια. Τα παθητικά κανάλια εξαρτώνται μόνο από την αγωγιμότητα της μεμβράνης σε κάθε ιόν (παθητικό Na^+ , παθητικό K^+ , Cl^-), ενώ τα ενεργητικά (ενεργητικό Na^+ -fast sodium, ενεργητικό K^+ - delayed rectifier) εξαρτώνται και από το δυναμικό στα άκρα της μεμβράνης του νευρώνα. Στην παράγραφο αυτή θα μελετηθεί το δυναμικό ηρεμίας (resting potential) ενός κυττάρου με ένα μόνο, παθητικό, κανάλι ιόντων. Για το σκοπό αυτό εμφανίστε το παράθυρο χειρισμού των καναλιών με επιλογή του κουμπιού

Channels και απενεργοποιείτε όλα τα κανάλια εκτός από το πρώτο (παθητικό Na^+ - passive sodium). Παρατηρείται ότι το δυναμικό ηρεμίας **Vr** που αναπαρίσταται γραφικά στο παράθυρο **Membrane** έχει πλέον τιμή ίση με το αντίστροφο δυναμικό για το Na^+ , δηλαδή 52.4mV. Επιλέγοντας με το ποντίκι την κόκκινη γραμμή στο μεγάλο γράφημα, μπορεί να βρεθεί η ακριβής τιμή του δυναμικού στα άκρα της μεμβράνης, **Vm**.

Ερώτηση 1: Ποια είναι η επίδραση του υποδιπλασιασμού της εξωτερικής συγκέντρωσης του Na^+ ; Θυμηθείτε ότι υπάρχει μόνο ένα κανάλι ιόντων Na^+ . Επιβεβαιώστε την απάντησή σας με τη βοήθεια του προσομοιωτή.

Ερώτηση 2: Υπολογίστε την εξωτερική συγκέντρωση του Na^+ που απαιτείται για να γίνει το **Vr** ίσο με 1.2 mV. Επιβεβαιώστε την απάντησή σας με χρήση του προσομοιωτή.

Επιλέξτε το κουμπί **Reset** για να επαναφέρετε τις παραμέτρους στις αρχικές τους τιμές.

Ερώτηση 3: Ποιος είναι ο ρόλος της θερμοκρασίας στην τελική τιμή του **Vr**; Πόσο πρέπει να μεταβληθεί η θερμοκρασία ώστε να αυξηθεί το **Vr** κατά 1.3%;

Ερώτηση 4: Απαριθμήστε όλους τους βασικούς παράγοντες που συμμετέχουν στη διαμόρφωση της τελικής τιμής του **Vr**, πάντα με ένα παθητικό κανάλι ιόντων. Επιλέξτε ένα από τα τρία διαθέσιμα παθητικά κανάλια και συγκεκριμένες ποσοτικές τιμές για όλους τους παράγοντες, ώστε το **Vr** να πάρει την τιμή 1.4.

Να σημειωθεί ότι χρειάζεται πολύ μεγάλη προσοχή στην τήρηση της ακρίβειας των πράξεων. Με διαδοχικούς υπολογισμούς και στρογγυλοποιήσεις στον καθένα συσσωρεύεται σφάλμα που γρήγορα παίζει εμφανή ρόλο στο τελικό αποτέλεσμα.

3.2. Δυναμικό Μεμβράνης

Στην παράγραφο αυτή θα εξετάσουμε το δυναμικό μεμβράνης σε κύτταρα με περισσότερα από ένα κανάλια, μόνο παθητικά. Αφού σταματήσετε οποιαδήποτε προσομοίωση πατώντας το κουμπί **Stop**, κλείστε το HHSIM και εκκινήστε το ξανά. Έπειτα, απενεργοποιείτε το κίτρινο και πράσινο γράφημα από το κύριο παράθυρο επιλέγοντας **blank** στο αντίστοιχο αναδιπλούμενο μενού. Θέστε το γαλάζιο γράφημα στην τιμή **I_{leak}**, το ρεύμα διαρροής που αντιστοιχεί στη ροή ρεύματος μέσα από τα παθητικά κανάλια. Το εύρος του ρεύματος διαρροής εμφανίζεται στον κατακόρυφο άξονα και είναι από -0.05 έως 0.05 pA.

Ανοίξτε τώρα τα παράθυρα των καναλιών και της μεμβράνης. Διατηρείστε ενεργά στο πρώτο μόνο τα παθητικά κανάλια (τα τρία πρώτα κατά σειρά). Σημειώστε ότι το δυναμικό της μεμβράνης (κόκκινη γραμμή) αυξάνεται από την προηγούμενη τιμή των -62 mV σε -48 mV. Ο προσομοιωτής σταματάει όταν το δυναμικό της μεμβράνης σταθεροποιηθεί. Για να ληφθεί μία ακριβής τιμή του δυναμικού ηρεμίας πατήστε το κουμπί **Nudge** μερικές φορές ώσπου να σταματήσει να αλλάζει η τιμή για το δυναμικό **Vm**.

Ερώτηση 1: Γράψτε την εξίσωση παράλληλης αγωγιμότητας για το δυναμικό ηρεμίας σαν συνάρτηση του δυναμικού ισορροπίας και των αγωγιμοτήτων των καναλιών. Με

δεδομένα τα τελευταία από τις τιμές που δίνονται στα παράθυρα των καναλιών και της μεμβράνης του προσομοιωτή, υπολογίστε την τιμή του δυναμικού ηρεμίας.

Ερώτηση 2: Στο παράθυρο των καναλιών μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι η αγωγιμότητα για τα ιόντα καλίου (G_K) είναι $0.070 \mu S$. Υπολογίστε με ακρίβεια δύο ψηφίων την τιμή στην οποία πρέπει να μειωθεί η G_K για να γίνει $V_r = -2.2 mV$. Επιβεβαιώστε την απάντησή σας με τη βοήθεια του προσομοιωτή.

Ερώτηση 3: Μπορούμε επίσης να μεταβάλουμε το δυναμικό ηρεμίας με αλλαγή των ιοντικών συγκεντρώσεων. Προφανώς, είναι πιο εύκολο να αλλάξουμε τις συγκεντρώσεις έξω από το κύτταρο παρά μέσα σε αυτό. Υποθέτουμε ότι θέλουμε να έχουμε $V_r = -2.3 mV$, διατηρώντας σταθερή την ώσμωση και μη διαταράσσοντας την ισορροπία του φορτίου. Ποιες ιοντικές συγκεντρώσεις πρέπει να αλλάξουμε και ποιες πρέπει να είναι οι νέες τους τιμές; Χρησιμοποιείτε τον προσομοιωτή για να βρείτε την απάντηση εμπειρικά.

Ερώτηση 4: Απενεργοποιείτε το ένα από τα τρία παθητικά κανάλια και επιλέξτε τις παραμέτρους των δύο που μένουν ώστε το V_r να είναι ακριβώς ίσο με $0 mV$.

3.3. Δυναμικό Δράσης

Αφού κλείσετε και εκκινήσετε για άλλη μία φορά τον προσομοιωτή, πατήστε το κουμπί **Stim1** στο κυρίως παράθυρο για να εισαχθεί ένα ερέθισμα (από προεπιλογή πρόκειται για ερέθισμα αποπόλωσης) στο κύτταρο και να παραχθεί ένα δυναμικό ενέργειας. Υπενθυμίζουμε ότι το ερέθισμα παρουσιάζεται με μωβ χρώμα, ενώ το δυναμικό μεμβράνης με κόκκινο. Στη συνέχεια επιλέξτε το κουμπί **Stim2**, το οποίο από προεπιλογή δίνει ερέθισμα που υπερπολώνει το κύτταρο. Παρατηρείστε ότι και αυτό καταλήγει στην παραγωγή αιχμής.

Ερώτηση 1: Γιατί η υπερπόλωση προκαλεί αιχμή;

Επιλέξτε, έπειτα, το κουμπί **Stimuli** του κυρίως παραθύρου ώστε να εμφανιστεί το παράθυρο επιλογής παραμέτρων για τα ερεθίσματα. Παρατηρείστε ότι το ερέθισμα που παράγεται με το κουμπί **Stim1** είναι ένας παλμός πλάτους $10 nA$ και διάρκειας $1 msec$. Χρησιμοποιώντας τις μπάρες κύλισης προσθέστε ένα δεύτερο παλμό στο πρώτο ερέθισμα (σαν σύνολο). Συγκεκριμένα, προσθέστε έναν δεύτερο παλμό πλάτους $10 nA$ και χρονικής διάρκειας $1 msec$ και μετά παρατηρήστε ότι δύο παλμοί ρεύματος που απέχουν $1 msec$ δεν προκαλούν δύο αιχμές στο δυναμικό όταν το ερέθισμα εφαρμοστεί στο κύτταρο.

Ερώτηση 2: Γιατί ο δεύτερος παλμός δεν προκαλεί μία δεύτερη αιχμή;

Ερώτηση 3: Πόσος χρόνος πρέπει να περάσει μεταξύ του τέλους του πρώτου παλμού και της αρχής του δεύτερου ώστε ο δεύτερος παλμός να παράγει μία δεύτερη αιχμή, όταν το πλάτος του δεύτερου παλμού είναι $3.3 nA$; (να γίνει χρήση του προσομοιωτή για πειραματισμό)

Ένας αρνητικός παλμός που συμβαίνει σύντομα έπειτα από έναν θετικό παλμό μπορεί να αποτρέψει την εμφάνιση αιχμής. Ρυθμίστε τις παραμέτρους του πρώτου ερεθίσματος

ώστε να δημιουργεί έναν παλμό ρεύματος 5 nA που να ακολουθείται έπειτα από 1 msec, από έναν αρνητικό παλμό ρεύματος -5 nA. Θα παρατηρήσετε ότι το διάστημα του 1 msec είναι πολύ μεγάλο για να αποτρέψει την αιχμή. Μικρότερα χρονικά διαστήματα μεταξύ των παλμών μπορούν να τεθούν πληκτρολογώντας την επιθυμητή τιμή (π.χ. 0.9 msec) στο αντίστοιχο πλαίσιο κειμένου.

Ερώτηση 4: Με ακρίβεια δεκαδικού ψηφίου στην τάξη του msec, ποια είναι η μεγαλύτερη καθυστέρηση με την οποία μπορεί να παρουσιαστεί αρνητικός παλμός χρονικού εύρους 1 msec και πλάτους $-P3.4$ nA, μετά από 1 msec θετικού παλμού 5 nA ώστε να μην εμφανιστεί αιχμή;

3.4. Κανάλι Νατρίου

Στην παράγραφο αυτή θα επικεντρωθούμε μόνο στο ενεργητικό κανάλι Na^+ , το οποίο αποτελείται από μία πύλη ενεργοποίησης και μία πύλη απενεργοποίησης. Για να υπάρχει ροή ρεύματος πρέπει και οι δύο πύλες να είναι ανοιχτές. Ο όρος m^3 περιγράφει την κατάσταση της πύλης ενεργοποίησης, ενώ ο όρος h την κατάσταση της πύλης απενεργοποίησης. Όσο πιο κοντά είναι οι τιμές αυτές στο 1 τόσο πιο «ανοιχτές» είναι οι πύλες.

Η κίτρινη, πράσινη και γαλάζια γραμμή στο κάτω γράφημα αναπαριστούν τις μεταβλητές m , h , n που περιλαμβάνονται στο μοντέλο των Hodgkin και Huxley, σύμφωνα με προεπιλογή του HHSIM. Στο μενού της γαλάζιας γραμμής επιλέξτε να απεικονίζεται η αγωγιμότητα των ιόντων νατρίου, g_{Na} . Το εύρος της είναι από 0 έως 30 pS. Όπως μπορείτε να παρατηρήσετε, η μεταβλητή της πύλης απενεργοποίησης h έχει τιμή ηρεμίας 0.5, που σημαίνει ότι τότε είναι κατά το ήμισυ ανοιχτή. Αντίθετα, η μεταβλητή της πύλης ενεργοποίησης είναι κοντά στο μηδέν στην ηρεμία, το οποίο εξηγεί γιατί η αγωγιμότητα του ενεργητικού καναλιού Na^+ είναι σχεδόν μηδενική στην ηρεμία.

Όταν ένα ερέθισμα αποπολώνει ελαφρά το κύτταρο, η πύλη ενεργοποίησης ανοίγει (ανεβαίνει η κίτρινη γραμμή), η αγωγιμότητα του Na^+ αυξάνεται και το κύτταρο αποπολώνεται περισσότερο. Ωστόσο, καθώς αυξάνεται το δυναμικό της μεμβράνης, η πύλη απενεργοποίησης αρχίζει να κλείνει κι αυτό προκαλεί τη μείωση της συνολικής αγωγιμότητας. Αυτό που πραγματικά προκαλεί την πτώση της κίτρινης γραμμής είναι η επαναπόλωση της μεμβράνης (μείωση του δυναμικού-πτώση κόκκινης γραμμής στο μεγάλο γράφημα) καθώς ανοίγουν τα ενεργητικά κανάλια του K^+ . Αυτό φυσικά ισχύει όταν συμπεριλαμβάνουμε και το κανάλι K^+ . Εδώ, με μόνο το κανάλι Na^+ , το κύτταρο θα παραμείνει αποπολωμένο. Αυτό θα φανεί με τη βοήθεια του παρακάτω πειράματος.

Από το παράθυρο επιλογής καναλιών απενεργοποιούμε το ενεργητικό κανάλι K^+ . Σε συνθήκες ηρεμίας υπάρχει ρεύμα διαρροής μέσα από το κανάλι αυτό που συγκρατεί το μηχανισμό της αντλίας K^+-Na^+ . Αφαιρώντας το κανάλι, άρα και το ρεύμα, παράγεται μία αιχμή. Το κύτταρο αποπολώνεται (το δυναμικό της μεμβράνης φτάνει σε θετικές τιμές), μα δεν είναι δυνατόν να επαναπολωθεί και να επιστρέψει στην ηρεμία. Έτσι, το δυναμικό της μεμβράνης παραμένει υψηλό και η κίτρινη γραμμή παραμένει σε υψηλές τιμές.

Η κορυφή της αιχμής είναι σχεδόν +50 mV. Χωρίς το κανάλι του K^+ το κύτταρο δεν επαναπολώνεται πλήρως, αλλά παρόλα αυτά το δυναμικό της μεμβράνης μειώνεται λίγο σε σχέση με τη μέγιστη τιμή. Παρατηρείστε ότι αν το δυναμικό αλλάξει από ένα νέο ερέθισμα (είτε αποπολωτικό είτε υπερπολωτικό), επιστρέφει στη νέα αυτή τιμή

δυναμικού ηρεμίας (και όχι στη συνηθισμένη τιμή -65 mV που παρατηρείται όταν υπάρχει και το κανάλι K^+).

Η νέα τιμή του δυναμικού καθορίζεται από δύο τύπους καναλιών, τα παθητικά κανάλια (με σταθερές αγωγιμότητες για τα ιόντα Na^+ , K^+ , Cl^-) και το (όχι εντελώς κλειστό) ενεργητικό κανάλι Na^+ . Παρότι μπορεί να φαίνεται ότι στην κατάσταση αυτή είναι $h=0$, που σημαίνει $g_{\text{Na}}=0$, στην πραγματικότητα η πύλη h έχει ελαφρώς θετικές τιμές. Επειδή η αγωγιμότητα διαρροής είναι πολύ μικρή, η ελαφρά ενεργοποίηση των καναλιών Na^+ σε κατάσταση ηρεμίας έχει σημαντική επίδραση στο δυναμικό ηρεμίας.

Ερώτηση 1: Παρατηρώντας την έξοδο του προσομοιωτή, σε ποιο δυναμικό ηρεμεί το κύτταρο αφού έχει παρέλθει η αιχμή; Χρησιμοποιώντας την εξίσωση παράλληλης αγωγιμότητας, υπολογίστε την αγωγιμότητα του ενεργητικού καναλιού Na^+ στη νέα κατάσταση ηρεμίας.

Ερώτηση 2: Ερεθίζοντας το κύτταρο ξανά στη νέα κατάσταση ηρεμίας δεν παράγεται άλλη αιχμή. Ακόμα κι αν η ένταση αυξηθεί σε 20 nA και η διάρκεια σε 10 msec , το κύτταρο δεν θα παραγάγει αιχμή. Ποια είναι η εξήγηση γι' αυτό;

Για το ενεργητικό κανάλι Na^+ ενεργοποιείτε την επιλογή **Details**. Εμφανίζεται ένα παράθυρο που δείχνει τις παραμέτρους του καναλιού από τις οποίες καθορίζεται η συμπεριφορά του. Βλέπουμε ότι το κανάλι αυτό έχει μέγιστη αγωγιμότητα σε ιόντα νατρίου $120\text{ }\mu\text{S}$.

Το αριστερό μισό του παραθύρου “Details” περιγράφει την πύλη ενεργοποίησης ενώ το δεξιό μισό την πύλη απενεργοποίησης. Η συμπεριφορά της πύλης ενεργοποίησης ελέγχεται από δύο ρυθμούς: a είναι ο ρυθμός με τον οποίο η πύλη περνάει από την κλειστή στην ανοιχτή κατάσταση (προκαλώντας αύξηση του m), ενώ b είναι ο ρυθμός με τον οποίο περνάει από την ανοιχτή στην κλειστή κατάσταση (προκαλώντας μείωση του m). Οι δύο αυτοί ρυθμοί a και b καθορίζονται από εκθετικές συναρτήσεις των οποίων οι παράμετροι φαίνονται στο παράθυρο “Details”. Οι εξισώσεις αυτές είναι συνάρτηση του δυναμικού της μεμβράνης V_m . Στο γράφημα στο κάτω μέρος, ο ρυθμός a δείχνεται με κόκκινο, ενώ ο b με μπλε.

Από το γράφημα, παρατηρούμε ότι όταν $V_m = -50\text{ mV}$ είναι $a \ll b$. Αυτό σημαίνει ότι τμήματα θα μεταφερθούν από την ανοιχτή στην κλειστή κατάσταση με μεγαλύτερο ρυθμό απ' ό,τι αντίστροφα. Το αποτέλεσμα αυτού θα είναι μείωση στην τιμή του m .

Ερώτηση 3: Ποια σχέση πρέπει να υπάρχει μεταξύ της κόκκινης και μπλε γραμμής ώστε να αυξηθεί το m και ποια είναι περίπου η τιμή του V_m στην οποία συμβαίνει αυτή η κατάσταση (εφόσον δεν υπάρχουν άλλοι παράγοντες που να επηρεάζουν το κύτταρο); Ποια η επίδραση της σχέσης των ρυθμών a και b στην τιμή του m , όταν το V_m είναι $P4.3\text{ mV}$;

Ερώτηση 4: Με βάση την απάντηση στην ερώτηση 2, οι τιμές ποιών ιδιοτήτων της πύλης h αλλά και συνολικά του καναλιού Na^+ πρέπει να μεταβληθούν και πώς, ώστε το κύτταρο να είναι σε θέση να παραγάγει αιχμή; Για την πληρότητα της απάντησης πρέπει να δοθεί προσοχή στις ποιοτικές διαφορές μεταξύ μίας αιχμής και μίας παθητικής απόκρισης σε παλμικό ερέθισμα.

3.5. Κανάλι Καλίου

Κλείστε και εκκινήστε ξανά τον προσομοιωτή και δώστε το ερέθισμα **Stim1** ώστε να παραχθεί μία αιχμή. Στο παράθυρο επιλογής καναλιών απενεργοποιείτε το ενεργητικό κανάλι Na^+ . Το δυναμικό ηρεμίας τότε υπερπολώνεται ελαφρά μόνο, γεγονός που δείχνει ότι πολύ λίγα κανάλια Na^+ είναι ανοιχτά κάτω από κανονικές συνθήκες ηρεμίας.

Στο μικρό πλαίσιο γραφημάτων απενεργοποιείτε την κίτρινη γραμμή (επιλέξτε *blank*) και από το αναδιπλούμενο μενού επιλογής επιλέξτε στην πράσινη γραφική παράσταση την παρουσίαση του ρεύματος καλίου **I_K**. Ανοίξτε το παράθυρο επιλογής των ερεθισμάτων και επιλέξτε ένταση 100 nA και διάρκεια 5 msec για το πρώτο ερέθισμα. Επιλέξτε το κουμπί **Stim1** στο κύριο παράθυρο για να αποπολωθεί το κύτταρο και παρατηρήσετε τι συμβαίνει.

Ερώτηση 1: Με βάση το γράφημα του δυναμικού (κόκκινη γραμμή στο μεγάλο πλαίσιο), ποια είναι η μέγιστη τιμή που φτάνει το δυναμικό;

Ερώτηση 2: Αφού φτάσει τη μέγιστη τιμή, το δυναμικό μειώνεται πάλι γρήγορα ενώ το ερέθισμα είναι ακόμα ενεργό. Πού οφείλεται αυτό;

Ερώτηση 3: Όταν το ερέθισμα τελειώσει, το κύτταρο δεν επιστρέφει απλά στην τιμή της κατάστασης ηρεμίας μα την ξεπερνάει προς τα κάτω και στη συνέχεια την προσεγγίζει από κάτω. Γιατί δεν επιστρέφει απευθείας στην τιμή ηρεμίας;

Στο σημείο αυτό ενεργοποιείτε και το ενεργητικό κανάλι Na^+ ώστε να είναι ενεργά και τα πέντε κανάλια, τρία παθητικά και δύο ενεργητικά. Πατήστε τώρα το κουμπί **Stim1** (αφού κάνετε **Reset** για να επανέλθουν οι προεπιλεγμένες τιμές) για να παραχθεί μία αιχμή που θα χρησιμοποιηθεί ως αναφορά. Η κατάσταση της πύλης n του καναλιού καλίου φαίνεται από τη μεταβλητή n , της οποίας οι παράμετροι φαίνονται στο αριστερό μισό του ενεργού παραθύρου. Υποθέτοντας ότι θέλουμε να αυξήσουμε τη διάρκεια μίας αιχμής, μπορούμε να το πετύχουμε ελαττώνοντας το ρυθμό με τον οποίο ανοίγουν οι πύλες n , έτσι ώστε το ενεργητικό κανάλι K^+ να χρειαστεί περισσότερο χρόνο να ανοίξει. Ο ρυθμός α καθορίζει το ρυθμό με τον οποίο η πύλη n θα ανοίξει.

Ερώτηση 4: Αλλάζτε την κλίση του ρυθμού α σε τιμή τέτοια που για το ίδιο ερέθισμα, η διάρκεια της αιχμής να αυξηθεί κατά περίπου 5.4 ms.

Όπως μπορείτε να παρατηρήσετε, το κύτταρο είναι αρκετά ευαίσθητο στις αλλαγές των παραμέτρων. Η αλλαγή μίας μόνο τιμής μπορεί να οδηγήσει σε ένα πολύπλοκο σύνολο αποτελεσμάτων. Μπορούμε να συμπεράνουμε ότι τα κανάλια που ελέγχουν τη συμπεριφορά ενός κυττάρου σχηματίζουν ένα ρυθμισμένο σύστημα. Να σημειωθεί ότι εδώ αναφερόμαστε μόνο σε δύο ενεργητικά κανάλια, ενώ υπάρχουν κύτταρα που διαθέτουν δώδεκα.

Λεξικό Όρων

Action potential: δυναμικό δράσης
Active channel: ενεργητικό κανάλι (εξαρτώμενο από τάση)
Axon: άξονας
Computational neuroscience: υπολογιστική νευροεπιστήμη
Depolarization: αποπόλωση
Equilibrium potential: δυναμικό ισορροπίας
Firing probability: πιθανότητα εκφόρτισης
Firing rate: ρυθμός εκφόρτισης
Hyperpolarization: υπερπόλωση
Ion channel: κανάλι ιόντων
Neuron: νευρώνας
Passive channel: παθητικό κανάλι
Potassium: κάλιο
Refractory period: ανερέθιστη περίοδος
Resting potential: δυναμικό ηρεμίας
Repolarization: επαναπόλωση
Simulation: προσομοίωση
Sodium: νάτριο
Spike: αιχμή
Spike train: ακολουθία αιχμών
Stimulus: ερέθισμα (Stimuli: ερεθίσματα)
Voltage clamp: συνδετήρας τάσης

Βιβλιογραφία

- [1] Hodgkin A.L., Huxley A.F., A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve, *Journal of Physiology*, 117, 500-544, 1952.
- [2] Νικήτα Κωνσταντίνα, *Προσομοίωση Φυσιολογικών Συστημάτων*, Εκδόσεις Τζιόλα, 2011.
- [3] HHsim: Graphical Hodgkin-Huxley Simulator
<http://www.cs.cmu.edu/~dst/HHsim/>, Ιούλιος 2009.

Άσκηση 3

Καρδιαγγειακός Προσομοιωτής

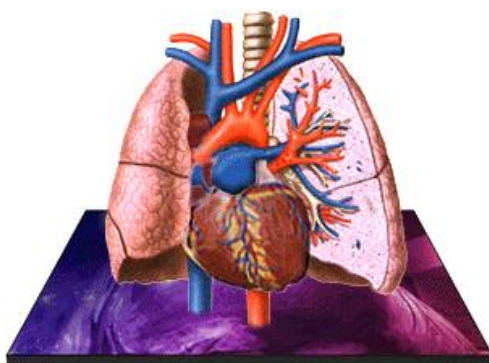
1. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργαστηριακής άσκησης είναι η μελέτη του καρδιαγγειακού συστήματος μέσω του μη-γραμμικού μαθηματικού μοντέλου PHYSBE (PHYsiological Simulation BEnchmark). Η πειραματική εξάσκηση αποτελείται από τη μελέτη της φυσιολογικής λειτουργίας της καρδιάς, παρατηρώντας την πίεση και τον όγκο αίματος, με τη βοήθεια του μοντέλου PHYSBE. Στη συνέχεια, το μοντέλο χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της πίεσης του αίματος σε διαφορετικά σημεία του καρδιαγγειακού συστήματος και τη μέτρηση του έργου της καρδιάς. Στο τελευταίο μέρος της πρακτικής εξάσκησης το μοντέλο τροποποιείται κατάλληλα, ώστε να γίνει προσομοίωση των καταστάσεων της έντονης άσκησης και της πέψης.

2. Εισαγωγή

Το ανθρώπινο καρδιαγγειακό σύστημα αποτελείται από τρία διακριτά υποσυστήματα: την πνευμονική κυκλοφορία, την καρδιακή κυκλοφορία και τέλος τη συστηματική κυκλοφορία. Θα μπορούσαμε να αναφερθούμε σε αυτά ως τους πνεύμονες, την καρδιά και το υπόλοιπο σώμα. Τα τρία αυτά υποσυστήματα δημιουργούν έναν κλειστό βρόχο κυκλοφορίας παρέχοντας αίμα πλούσιο σε οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά στους ιστούς και τα όργανα του σώματος και απομακρύνοντας τα άχρηστα προϊόντα του μεταβολισμού από αυτά.

Στο Σχήμα 1 φαίνεται το καρδιαγγειακό σύστημα στην περιοχή της καρδιάς και των πνευμόνων. Πνευμονική κυκλοφορία καλείται η ροή του αίματος από την καρδιά προς τους πνεύμονες και πίσω στην καρδιά. Οι φλέβες οδηγούν το φλεβικό αίμα στο δεξιό γεμίζει με το αίμα και στη συνέχεια συστέλλεται ωθώντας το στη δεξιά κοιλία μέσω της τριγλώχινας βαλβίδας. Η δεξιά κοιλία γεμίζει και στη συνέχεια συστέλλεται ωθώντας το αίμα στην πνευμονική αρτηρία η οποία το οδηγεί στους πνεύμονες. Στα τριχοειδή αγγεία των πνευμόνων γίνεται η ανταλλαγή διοξειδίου του άνθρακα και οξυγόνου. Στη



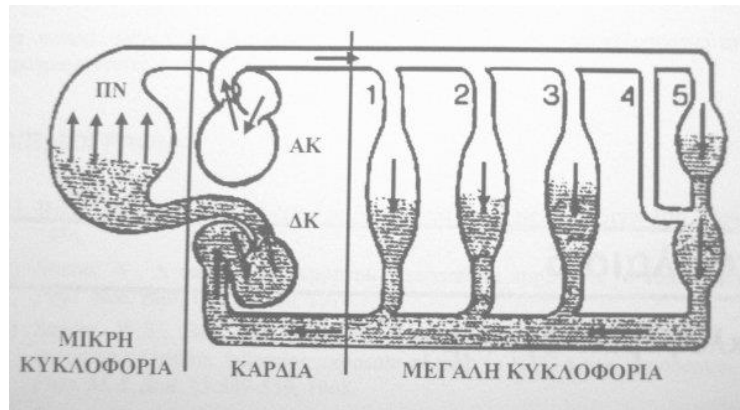
Σχήμα 1: Καρδιαγγειακό σύστημα στην περιοχή των πνευμόνων και της καρδιάς.

συνέχεια, το πλούσιο σε οξυγόνο αίμα εισέρχεται στις πνευμονικές φλέβες και οδηγείται στον αριστερό κόλπο της καρδιάς. Με τη συστολή του αριστερού κόλπου, το αίμα περνάει στην αριστερή κοιλία μέσω της μιτροειδούς βαλβίδας. Τέλος με τη συστολή της αριστερής κοιλίας το αίμα εξέρχεται στην αορτή την κύρια αρτηρία που τροφοδοτεί με αίμα το σώμα μας. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι το ανθρώπινο καρδιαγγειακό σύστημα είναι ένα δίκτυο μονόδρομης ροής. Οι κολποκοιλιακές βαλβίδες (μιτροειδής και τριγλώχινα) επιτρέπουν τη ροή του αίματος μετά από τους κόλπους προς τις κοιλίες και όχι το αντίστροφο.

Η συστηματική κυκλοφορία παρέχει τα θρεπτικά συστατικά τα οποία χρειάζονται οι ιστοί και τα όργανα του σώματος για να λειτουργήσουν. Εξαιρούνται από τη συστηματική κυκλοφορία η καρδιά και οι πνεύμονες που έχουν το δικό τους κυκλοφορικό σύστημα. Τα αιμοφόρα αγγεία (αρτηρίες, φλέβες και τριχοειδή αγγεία) είναι υπεύθυνα για την παροχή θρεπτικών συστατικών στους ιστούς. Αίμα πλούσιο σε οξυγόνο εισέρχεται στα αγγεία μέσω της κύριας αρτηρίας του σώματος, της αορτής. Οι έντονες συστολές της καρδιάς δημιουργούν ικανές πιέσεις στην αορτή ώστε να τροφοδοτούνται ακόμη και τα ακροτελεύτια αγγεία του σώματος. Το εσωτερικό των αγγείων είναι ιδιαίτερα λείο ώστε να μη δημιουργούνται σημαντικές αντιστάσεις κατά τη ροή του αίματος. Το αίμα εισέρχεται στα τριχοειδή αγγεία των οργάνων όπου το οξυγόνο και τα θρεπτικά συστατικά μεταφέρονται στο υγρό των ιστών και παράλληλα συλλέγονται τα άχρηστα προϊόντα του μεταβολισμού των ιστών. Στη συνέχεια το αίμα εισέρχεται στις φλέβες και οδηγείται προς την καρδιά και από εκεί στους πνεύμονες για να εμπλουτιστεί και πάλι με οξυγόνο. Η συστηματική κυκλοφορία του αίματος περιλαμβάνει διέλευσή του από τους νεφρούς, οι οποίοι απομακρύνουν τα άχρηστα συστατικά που περιέχονται στο αίμα.

Η καρδιακή κυκλοφορία αποτελεί σημαντικό υποσύστημα του καρδιαγγειακού συστήματος και η αποστολή της συνίσταται στην τροφοδοσία των ιστών της καρδιάς με αίμα πλούσιο σε οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά, που χρησιμεύουν για την εξασφάλιση της απαραίτητης για τη λειτουργία της καρδιάς ενέργειας.

Μπορούμε να θεωρήσουμε ότι το κυκλοφορικό σύστημα αποτελείται από δύο συστήματα αγγείων (συστηματική και καρδιακή κυκλοφορία και πνευμονική κυκλοφορία) με ιδιαίτερη το καθένα αντλία που συνδέονται σε σειρά. Η παροχή στο ένα σύστημα υποχρεωτικά περνάει από το τέλος του στην αρχή του άλλου συστήματος, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 2. Έτσι το αίμα εκτοξευόμενο από την αριστερή κοιλία της καρδιάς (αρχή της μεγάλης κυκλοφορίας) διοχετεύεται στην αορτή και στη συνέχεια με τις αρτηρίες φέρεται στα τριχοειδή σε όλους τους ιστούς του σώματος. Από εκεί με τις φλέβες διοχετεύεται στο δεξιό κόλπο της καρδιάς (τέλος της μεγάλης κυκλοφορίας) και τέλος στα τριχοειδή των πνευμόνων. Από τους πνεύμονες με τις



Σχήμα 2: Σχεδιαγραμματική παράσταση της μεγάλης και της μικρής κυκλοφορίας. ΑΚ= Αριστερή καρδιά, ΔΚ=Δεξιά καρδιά, ΠΝ=Πνεύμονες. Η μεγάλη (συστηματική) κυκλοφορία αποτελείται από μεγάλο αριθμό παρακυκλωμάτων (1, 2, 3, 4, 5, ...). Το (4) παριστά την ηπατική αρτηρία και το (5) την κυκλοφορία κοιλιακών σπλάγχων – ήπατος. Το τμήμα της κυκλοφορίας που περιέχει φλεβικό αίμα υποσημαίνεται με σκιερότητα.

πνευμονικές φλέβες φέρεται στον αριστερό κόλπο (τέλος της μικρής κυκλοφορίας) και επανέρχεται στην αριστερή κοιλία, στην αορτή κ.ο.κ.

Το συνολικό εύρος, καθώς και η ταχύτητα ροής του αίματος στα διάφορα τμήματα της μεγάλης και της μικρής κυκλοφορίας μεταβάλλεται σημαντικά. Έτσι στο επίπεδο των τριχοειδών της μεγάλης κυκλοφορίας η συνολική διατομή είναι 800 φορές μεγαλύτερη από τη διατομή της αορτής στην αρχή της μεγάλης κυκλοφορίας. Πιο πέρα από τα τριχοειδή (φλεβίδια, φλέβες) το συνολικό εύρος ελαττώνεται και κατά την εκβολή των φλεβών στο δεξιό κόλπο η διατομή είναι διπλάσια από αυτή της αορτής. Ανάλογες μεταβολές παρατηρούνται και στην ταχύτητα ροής του αίματος μέσα στα διάφορα αγγεία. Η μέγιστη ταχύτητα ροής παρατηρείται στην αορτή και η ελάχιστη στα τριχοειδή. Η μικρή ταχύτητα ροής στα τριχοειδή είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την επαρκή ανταλλαγή των αναπνευστικών αερίων (O_2 και CO_2) και όλων των άλλων ουσιών μεταξύ του αίματος και του υγρού των ιστών. Πέρα από τα τριχοειδή αυξάνεται και κατά την εκβολή των φλεβών στο δεξιό κόλπο η ταχύτητα αιματικής ροής είναι διπλάσια από αυτή που παρατηρείται στην αορτή.

2.1. Ανάλυση της Λειτουργίας του Καρδιαγγειακού Συστήματος

Κατά την ανάλυση της λειτουργίας του καρδιαγγειακού συστήματος, είναι συχνά χρήσιμο να παριστάνονται οι υδραυλικές ιδιότητες των διαφόρων στοιχείων με ηλεκτρικά ανάλογα. Αυτή η διαδικασία είναι έγκυρη εφόσον υπάρχει ένα προς ένα αντιστοιχισμό μεταξύ των υδραυλικών και των ηλεκτρικών ποσοτήτων και εφόσον η μαθηματική συμπεριφορά των υδραυλικών και των ηλεκτρικών στοιχείων είναι η ίδια. Στη συνέχεια θα οριστούν οι υδραυλικές ιδιότητες των διαφόρων στοιχείων του κυκλοφορικού συστήματος. Η αντιστοιχισμός υδραυλικών παραμέτρων και παραμέτρων ηλεκτρικών κυκλωμάτων φαίνεται στον Πίνακα 1.

Η υδραυλική αντίσταση R είναι ο λόγος της διαφοράς πίεσης κατά μήκος ενός στοιχείου, προς το ρυθμό ροής του ρευστού(αίματος) διαμέσου του στοιχείου, στη μόνιμη κατάσταση. Για παράδειγμα, η ροή ενός ρευστού διαμέσου ενός άκαμπτου σωλήνα μπορεί να περιγραφεί από τη σχέση $\Delta P = f \cdot R$, όπου ΔP είναι η διαφορά πίεσης στα δύο άκρα του σωλήνα, f είναι ο ρυθμός ροής του ρευστού διαμέσου του

σωλήνα και R η αντίσταση του σωλήνα. Η αντίσταση R εξαρτάται από το ιξώδες μ του ρευστού, το μήκος l , και την ακτίνα r του σωλήνα, σύμφωνα με τη σχέση,

$$R = \frac{8 \mu l}{\pi r^4}$$

Αν η σχέση ανάμεσα στην πτώση πίεσης και στη ροή δεν είναι γραμμική για ένα δεδομένο στοιχείο, τότε η διαφορική αντίσταση που συσχετίζει μικρές μεταβολές ροής και πίεσης δίνεται από τη σχέση

$$R = \frac{d\Delta P}{df}$$

Η χωρητικότητα ενός στοιχείου είναι ο λόγος του όγκου του ρευστού που περιέχεται σε ένα στοιχείο προς τη διαφορά πίεσης κατά μήκος αυτού του στοιχείου. Για παράδειγμα, έστω μια δεξαμενή διατομής A , που είναι γεμάτη με ρευστό σε ύψος h . Η διαφορά πίεσης ανάμεσα στον πυθμένα της δεξαμενής και στην ατμοσφαιρική πίεση στην επιφάνεια του ρευστού είναι:

$$\Delta P = \rho g h$$

όπου ρ είναι η πυκνότητα του ρευστού και g η επιτάχυνση βαρύτητας. Ο όγκος του ρευστού στη δεξαμενή είναι:

$$Q = A h$$

ενώ η χωρητικότητα της δεξαμενής δίνεται από τη σχέση:

$$C = \frac{Q}{\Delta P} = \frac{A}{\rho g}$$

Πρέπει να σημειωθεί ότι η σχετική διαφορά πίεσης αφορά στη διαφορά ανάμεσα στο ρευστό του σωλήνα και στην εξωτερική ατμόσφαιρα και όχι στη διαφορά πίεσης μεταξύ των σωλήνων εισόδου και εξόδου του ρευστού, η οποία είναι μηδέν. Όμοια, κατά την ανάλυση της χωρητικότητας των αγγείων στο αγγειακό σύστημα, η σχετική διαφορά πίεσης αναφέρεται στη διαφορά μεταξύ της ενδοαυλικής πίεσης και της εξωτερικής (εξωαυλικής) πίεσης.

Πίνακας 1: Αντιστοίχιση υδραυλικών – ηλεκτρικών παραμέτρων.

ΥΔΡΑΥΛΙΚΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΗΛΕΚΤΡΙΚΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ
Πίεση P	Δυναμικό V
Ροή $f = \mathcal{Q}$	Ρεύμα I
Όγκος Q	Φορτίο q
Αντίσταση $R = \Delta P / f$	Αντίσταση $R = \Delta V / I$
Χωρητικότητα $C = \Delta Q / \Delta P$	Χωρητικότητα $C = \Delta q / \Delta V$

Αν η σχέση ανάμεσα στην πίεση και στον όγκο ενός συγκεκριμένου στοιχείου δεν είναι γραμμική, η διαφορική χωρητικότητα που συνδέει μικρές μεταβολές του όγκου και της πίεσης δίνεται από τη σχέση:

$$C = \frac{dQ}{d\Delta P}$$

Με βάση τις αντιστοιχίες του Πίνακα 1, η μοντελοποίηση του καρδιαγγειακού συστήματος μπορεί να βασιστεί στην επίλυση κατάλληλων διαφορικών εξισώσεων για κάθε υποσύστημα που μελετάμε, αν αυτό θεωρηθεί ως ένα δίκτυο αντιστάσεων και πυκνωτών.

3. PHYSiological Simulation BEnchmark – PHYSBE

3.1. Θεωρητικό Υπόβαθρο

Το PHYSBE αποτελεί ένα μαθηματικό μοντέλο του καρδιαγγειακού συστήματος. Τα χαρακτηριστικά του μοντέλου έχουν δημοσιευτεί στο άρθρο του John McLeod με τίτλο “PHYSBE A physiological simulation benchmark” [1]. Αρχικός στόχος του μοντέλου ήταν η προσομοίωση της ροής του οξυγόνου και των θρεπτικών συστατικών στο ανθρώπινο σώμα, καθώς και ο υπολογισμός της κατανομής της θερμότητας στο καρδιαγγειακό σύστημα. Το μοντέλο αποτελεί ένα σημαντικό μη – γραμμικό συνεχές σύστημα. Πολύ αργότερα από τη δημοσίευση του μαθηματικού μοντέλου και με την εμφάνιση σημαντικών πακέτων προσομοίωσης, όπως το Simulink, αναπτύχθηκε αντίστοιχο υπολογιστικό μοντέλο προσομοίωσης του καρδιαγγειακού συστήματος, με το οποίο θα ασχοληθούμε στο πλαίσιο αυτής της εργαστηριακής άσκησης.

3.2. Υποσυστήματα του Μοντέλου PHYSBE

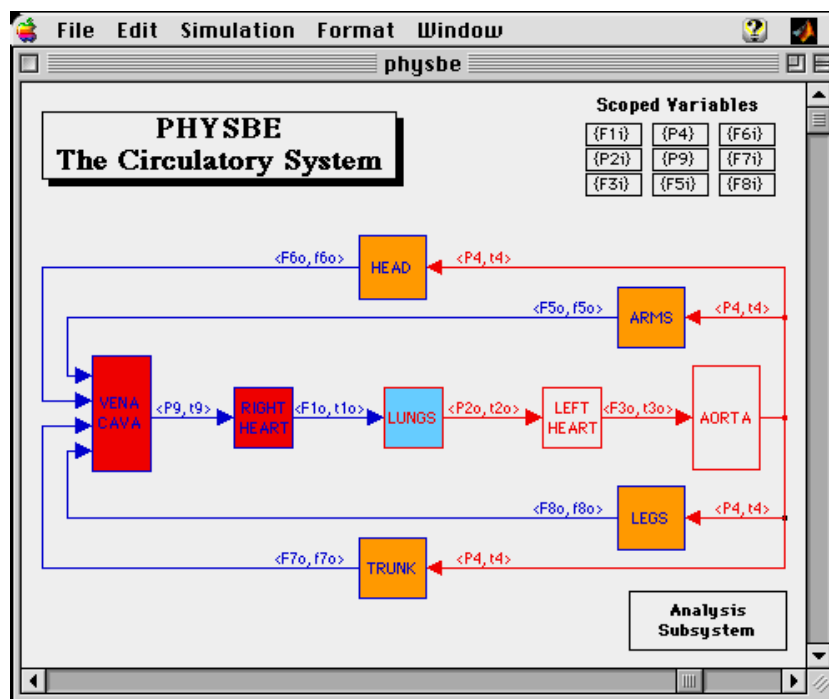
Το μοντέλο χωρίζει το ανθρώπινο καρδιαγγειακό σύστημα σε τρία κύρια υποσυστήματα: τους πνεύμονες και την πνευμονική κυκλοφορία, την καρδιά και την καρδιακή κυκλοφορία και το υπόλοιπο σώμα, δηλαδή τη συστηματική κυκλοφορία. Η καρδιακή κυκλοφορία υποδιαιρείται περαιτέρω σε τέσσερα υποσυστήματα, την αριστερή και τη δεξιά κοιλία, την κοίλη φλέβα και την αορτή. Η συστηματική κυκλοφορία υποδιαιρείται σε τέσσερα υποσυστήματα: το κεφάλι, τον κορμό, τα άνω και τα κάτω άκρα. Η διαγραμματική απεικόνιση του μοντέλου σε Simulink φαίνεται στο Σχήμα 3.

Το σύνολο των εννέα (9) υποσυστημάτων, όπως αυτά παρουσιάζονται στο υπολογιστικό μοντέλο είναι:

1. Πνευμονική κυκλοφορία
 - a. Πνεύμονες – Lungs
2. Καρδιακή κυκλοφορία
 - a. Κοίλη φλέβα -Vena Cava
 - b. Δεξιά καρδιά - Right Heart
 - c. Αριστερή καρδιά - Left Heart
 - d. Αορτή - Aorta

3. Συστηματική κυκλοφορία
 - a. Άνω άκρα - Arms
 - b. Κεφάλι - Head
 - c. Κορμός - Trunk
 - d. Κάτω άκρα - Legs

Εκτός από τα παραπάνω εννέα υποσυστήματα, βασικές οντότητες του μοντέλου PHYSBE αποτελούν: α) το κέντρο διαχείρισης παραμέτρων και β) το κέντρο ανάλυσης δεδομένων.



Σχήμα 3: Το σχεδιάγραμμα του PHYSBE.

3.2.1. Παράμετροι του Μοντέλου

Κάθε υποσύστημα του μοντέλου δέχεται τέσσερις βασικές παραμέτρους εισόδου, όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Καρδιαγγειακές παράμετροι εισόδου.

Χαρακτηριστικό	Μονάδες	Μεταβλητή
Αντίσταση	mmHg/ml/sec	R
Χωρητικότητα	ml / sec	C
Ενεργή διατομή	cm ²	A
Βάρος	g	W

Κάθε υποσύστημα παρέχει τέσσερις παραμέτρους εξόδου όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Καρδιαγγειακές παράμετροι εξόδου.

Χαρακτηριστικό	Μονάδες	Μεταβλητή
Πίεση	mmHg	P
Ροή	ml/sec	F
Ροή θερμότητας	cal/sec	f
Θερμοκρασία	kelvin	t
Όγκος	ml	V
Ολική θερμότητα	cal	h

3.2.2. Έξοδος του Μοντέλου

Οι ακόλουθες μεταβλητές αποτελούν την έξοδο του μοντέλου: πίεση, ροή αίματος, όγκος αίματος, θερμοκρασία και ροή θερμότητας. Το μοντέλο PHYSBE έχει τη δυνατότητα ταυτόχρονης απεικόνισης οποιασδήποτε παραμέτρου σαν συνάρτηση του χρόνου ή κάποιας άλλης παραμέτρου. Η γραφική απεικόνιση ρυθμίζεται από το κέντρο ανάλυσης δεδομένων με χρήση κατάλληλων εργαλείων όπως GRAPHXY, SCOPE και FLOATING SCOPE (βλ. Πρακτική Εξάσκηση). Σημειώνεται ότι η έξοδος του μοντέλου απεικονίζεται στη μόνιμη κατάσταση στην οποία φτάνει το μοντέλο μετά την πάροδο 10 -15 sec προσομοίωσης.

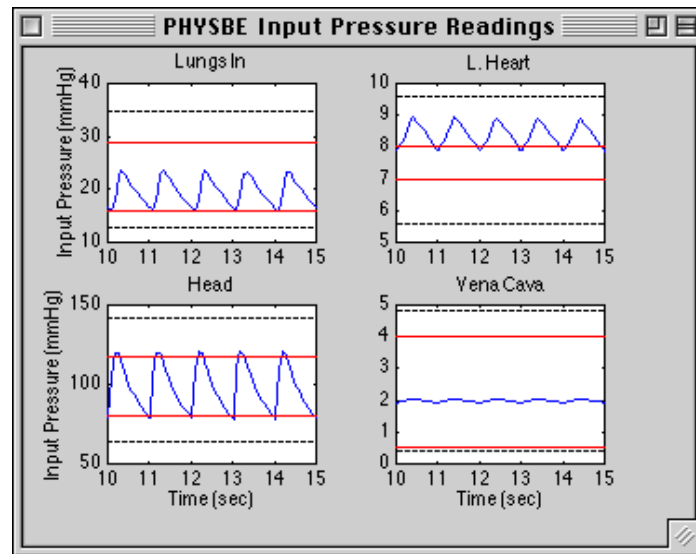
Πίεση Εισόδου

Η πίεση εισόδου αντιστοιχεί στην παράμετρο P_{ni} για κάθε υποσύστημα του μοντέλου. Η πίεση εισόδου κάθε υποσυστήματος ταυτίζεται με την πίεση εξόδου του υποσυστήματος που προηγείται. Στα διαγράμματα του Σχήματος 5 παρουσιάζονται οι πιέσεις εισόδου των πνευμόνων, της αριστερής και δεξιάς καρδιάς καθώς και της κοίλης φλέβας σε μπλε χρώμα. Οι κόκκινες ευθείες αναπαριστούν τις μέγιστες και τις ελάχιστες φυσιολογικές τιμές όπως αυτές έχουν οριστεί από τους δημιουργούς του μοντέλου. Οι διακεκομμένες γραμμές αναπαριστούν μια διαφοροποίηση κατά 20% από το εύρος των φυσιολογικών τιμών που θεωρείται αποδεκτή αν ληφθεί υπόψη η ακρίβεια της προσομοίωσης.

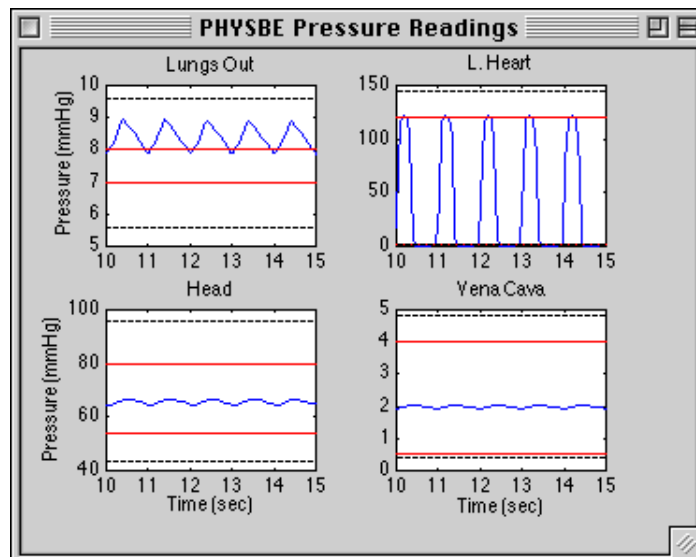
Παρατηρούμε ότι το γράφημα της αριστερής καρδιάς ξεφεύγει από το φυσιολογικό εύρος τιμών. Ωστόσο επειδή πρόκειται μονάχα για μια μετατόπιση του γραφήματος και μάλιστα μέσα στα όρια του αναμενόμενου σφάλματος δεν γίνεται καμία διορθωτική κίνηση.

Εσωτερική Πίεση

Η εσωτερική πίεση συμβολίζεται στο μοντέλο με την παράμετρο P_n για κάθε υποσύστημα n. Για την αορτή και την κοίλη φλέβα, οι οποίες έχουν σχεδόν μηδενική αντίσταση, οι εσωτερικές και εξωτερικές πιέσεις ταυτίζονται. Στο Σχήμα 6, με μπλε απεικονίζονται οι εσωτερικές πιέσεις του καρδιαγγειακού συστήματος, ενώ με τις κόκκινες ευθείες απεικονίζονται τα άνω και κάτω φυσιολογικά όρια. Τέλος με διακεκομμένες γραμμές απεικονίζονται τα ανεκτά σφάλματα. Σε αντιστοιχία με τα διαγράμματα πίεσης εισόδου, η εσωτερική πίεση στα υποσυστήματα βρίσκεται εντός φυσιολογικών ορίων με εξαίρεση τους πνεύμονες, το οποίο είναι αναμενόμενο αν ληφθεί υπόψη ότι η εσωτερική πίεση των πνευμόνων ταυτίζεται με την εξωτερική πίεση της αριστερής καρδιάς.



Σχήμα 5: Διαγράμματα πιέσεων εισόδου.



Σχήμα 6: Διαγράμματα εσωτερικών πιέσεων.

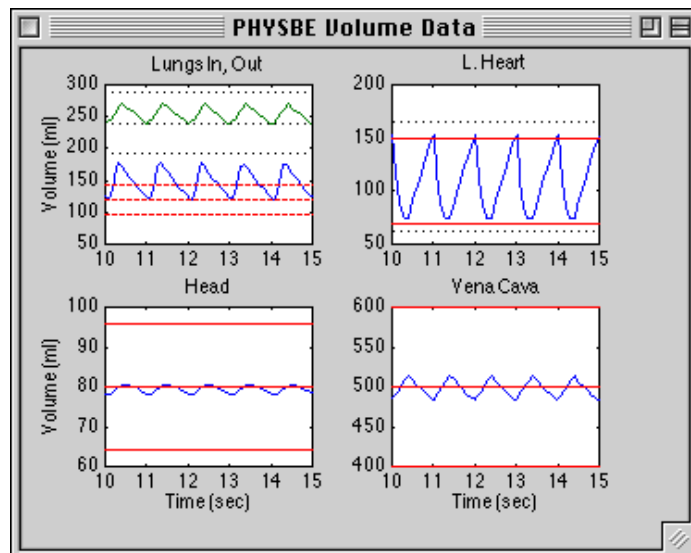
Διαγράμματα Όγκου

Ο όγκος κάθε υποσυστήματος αντιστοιχεί στη μεταβλητή V_n . Για τους πνεύμονες υπάρχουν δύο μεταβλητές όγκου στο μοντέλο, εισόδου και εξόδου, γεγονός που φαίνεται και από τα διαγράμματα του υποσυστήματος των πνευμόνων (βλ. στο εργαστηριακό μέρος της άσκησης). Στα διαγράμματα του Σχήματος 7 φαίνονται επίσης φυσιολογικά και ανεκτά όρια για τις τιμές των μεταβλητών όγκου.

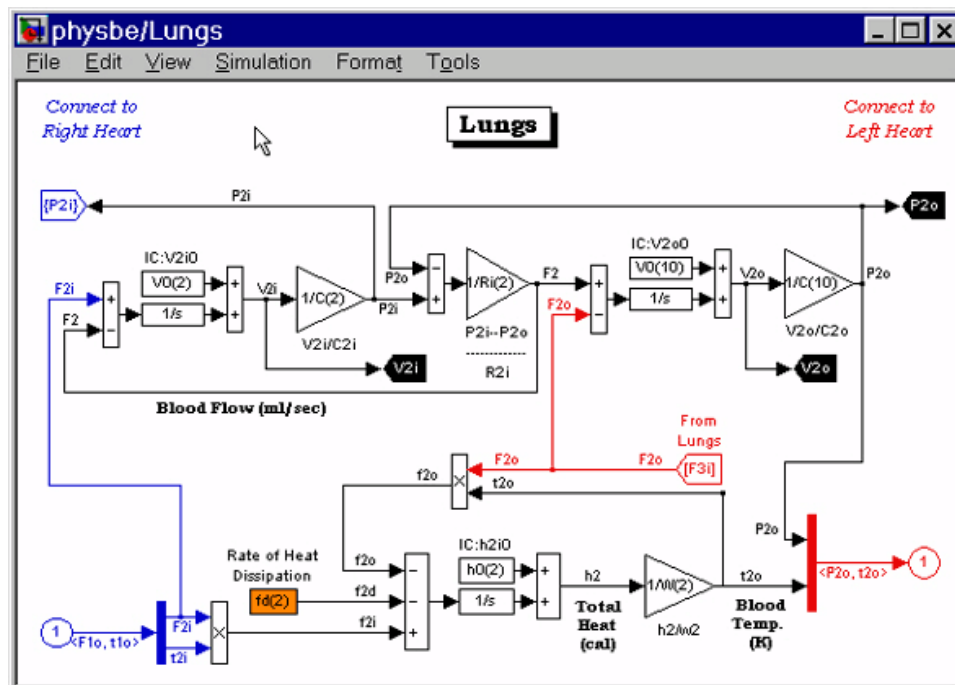
3.2.3. Πνευμονική κυκλοφορία - Οι Πνεύμονες

Στο Σχήμα 8 παρουσιάζεται το υποσύστημα που επιλύει τις εξισώσεις για τους πνεύμονες. Η προσομοίωση των πνευμόνων βασίζεται σε ελαφρώς διαφορετικές εξισώσεις από αυτές των άλλων υποσυστημάτων διότι οι μετρήσεις της αρτηριακής και φλεβικής ροής και πίεσης είναι ευκολότερες από τις μετρήσεις αντιστάσεων.

Οι συνδέσεις $P2_o$, $V2_i$ και $V2_o$ οδηγούν κρίσιμη πληροφορία για την πίεση και τον όγκο προς το υποσύστημα ανάλυσης του μοντέλου. Η σύνδεση $P2_i$ αποτελεί έξοδο πίεσης του υποσυστήματος προς τη δεξιά καρδιά. Τέλος, ο μπλε κόμβος 1 αποτελεί σημείο σύνδεσης του υποσυστήματος με τη δεξιά καρδιά ενώ ο κόκκινος κόμβος 1 είναι το σημείο σύνδεσης με την αριστερή καρδιά.



Σχήμα 7: Διαγράμματα όγκων.



Σχήμα 8: Διαγραμματική παράσταση του μοντέλου των πνευμόνων σε Simulink.

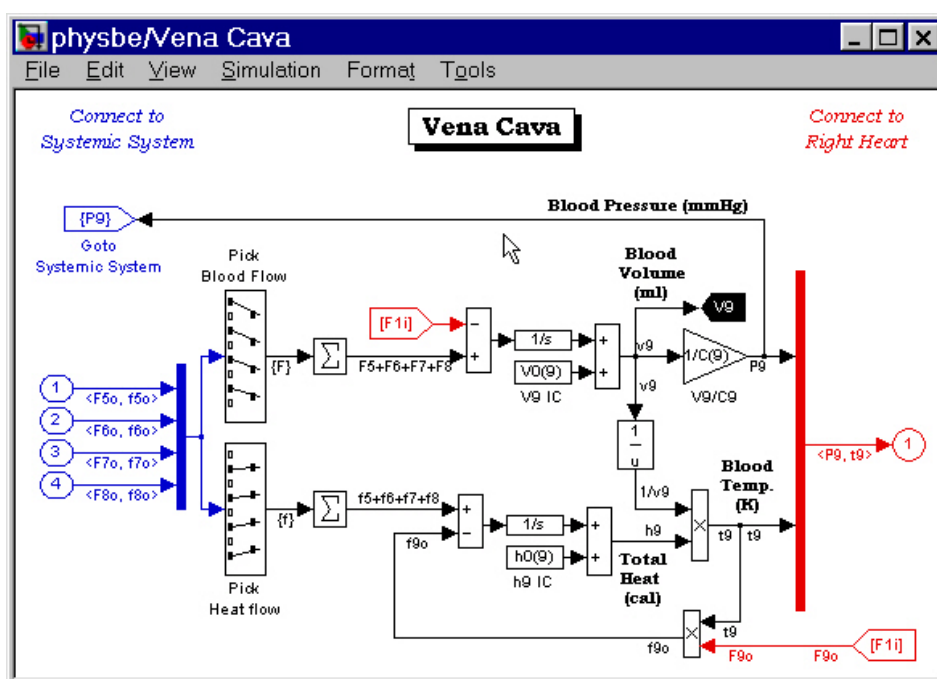
3.2.4. Καρδιακή Κυκλοφορία – Κοίλη Φλέβα

Η διαγραμματική παράσταση του υποσυστήματος που επιλύει τις εξισώσεις για το φλεβικό σύστημα φαίνεται στο Σχήμα 9. Στο υποσύστημα αυτό, η αντίσταση εισόδου θεωρείται ίση με την αντίσταση εξόδου των άνω άκρων, του κορμού, των κάτω άκρων και του κεφαλιού. Η αντίσταση εξόδου θεωρείται ίση με την αντίσταση εισόδου της δεξιάς καρδιάς. Το βάρος του υποσυστήματος θεωρείται ίσο με τον όγκο του αίματος σε αυτό. Τα εργαλεία PICK FLOW λειτουργούν ως φίλτρο πολυπλεγμένων σημάτων επιτρέποντας τη διέλευση μέσω αυτών συγκεκριμένων συνιστωσών του σήματος εισόδου. Το σήμα εισόδου του συστήματος αποτελείται από τις συνιστώσες της ροής αίματος (κανάλια 1, 4, 5 και 7) και της ροής θερμότητας (κανάλια 2, 4, 6 και 8). Τα εργαλεία PICK FLOW αναλαμβάνουν το διαχωρισμό των δύο αυτών ομάδων σημάτων. Η έξοδος του υποσυστήματος οδηγεί τη δεξιά καρδιά.

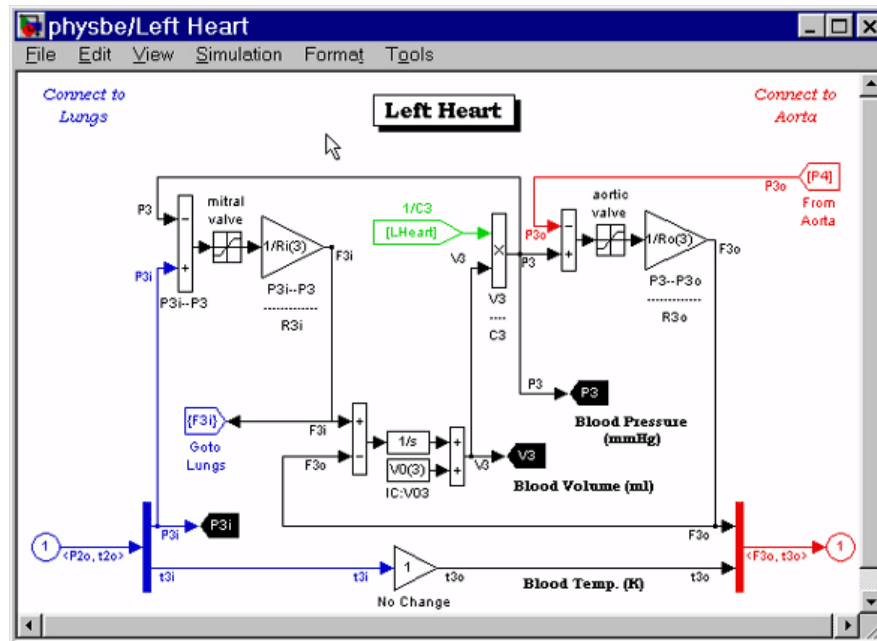
3.2.5. Καρδιακή Κυκλοφορία - Αριστερή και Δεξιά Καρδιά

Οι εξισώσεις που προσομοιώνουν την αριστερή και τη δεξιά καρδιά είναι πανομοιότυπες. Έτσι, τα διαγραμματικά μοντέλα των δύο υποσυστημάτων ταυτίζονται, με τη διαφορά ότι η αριστερή καρδιά δέχεται πληροφορία εισόδου από τους πνεύμονες και δίνει πληροφορία εξόδου στην αορτή, ενώ η δεξιά καρδιά δέχεται είσοδο από την κοίλη φλέβα και δίνει έξοδο στους πνεύμονες. Στο Σχήμα 10 μπορούμε να δούμε το διάγραμμα του υποσυστήματος της αριστερής καρδιάς.

Η φύση του μοντέλου PHYSBE δίνει μεγαλύτερη βαρύτητα στην αριστερή κοιλία παρά στα αποτελέσματα της χαμηλότερης ροής στον αριστερό κόλπο. Η χρήση του νέου στοιχείου ολοκληρωτή του Simulink για την προσομοίωση των βαλβίδων του μοντέλου (μιτροειδούς, αορτικής, τριγλώχινος, πνευμονικής), οι οποίες παρουσιάζουν γραμμική συμπεριφορά, παρέχει βελτιωμένη ακρίβεια. Έτσι προσομοιώνεται η διακοπή της ανάστροφης ροής παρά τις διαφορές πίεσης. Η θερμοκρασία του αίματος θεωρείται σταθερή στην καρδιά καθόλη τη διάρκεια της προσομοίωσης.



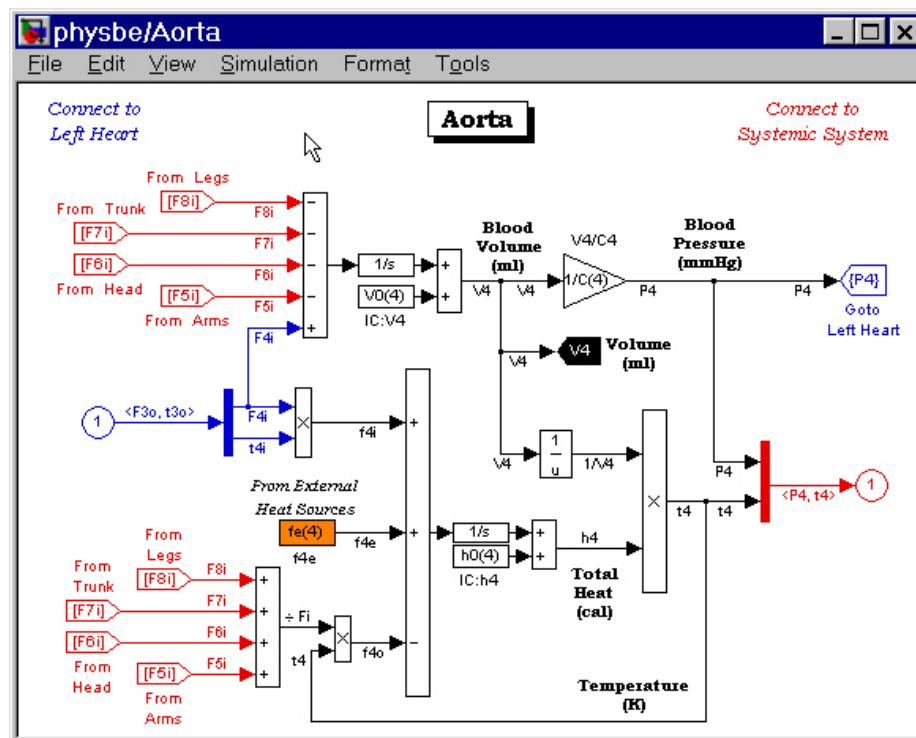
Σχήμα 9: Διαγραμματική παράσταση του μοντέλου της κοίλης φλέβας σε Simulink.



Σχήμα 10: Διαγραμματική παράσταση του μοντέλου της αριστερής καρδιάς σε Simulink.

3.2.6. Καρδιακή Κυκλοφορία - Αορτή

Στο διάγραμμα του Σχήματος 11 αποτυπώνεται το μαθηματικό μοντέλο της αορτής που αποτελεί την κυριότερη αρτηρία του ανθρώπινου σώματος.



Σχήμα 11: Διαγραμματική παράσταση του μοντέλου της αορτής σε Simulink.

Η απεικόνιση εισόδου ταυτίζεται με την αντίσταση εξόδου της δεξιάς κοιλίας. Η αντίσταση εξόδου ταυτίζεται με την αντίσταση των άνω και κάτω άκρων, του κεφαλιού και του κορμού. Το βάρος της αορτής θεωρείται ίσο με τον όγκο του αίματος V που περιέχει. Σημαντική πληροφορία εξόδου για τον όγκο V_4 μπορεί να ληφθεί απευθείας στο κέντρο ανάλυσης δεδομένων.

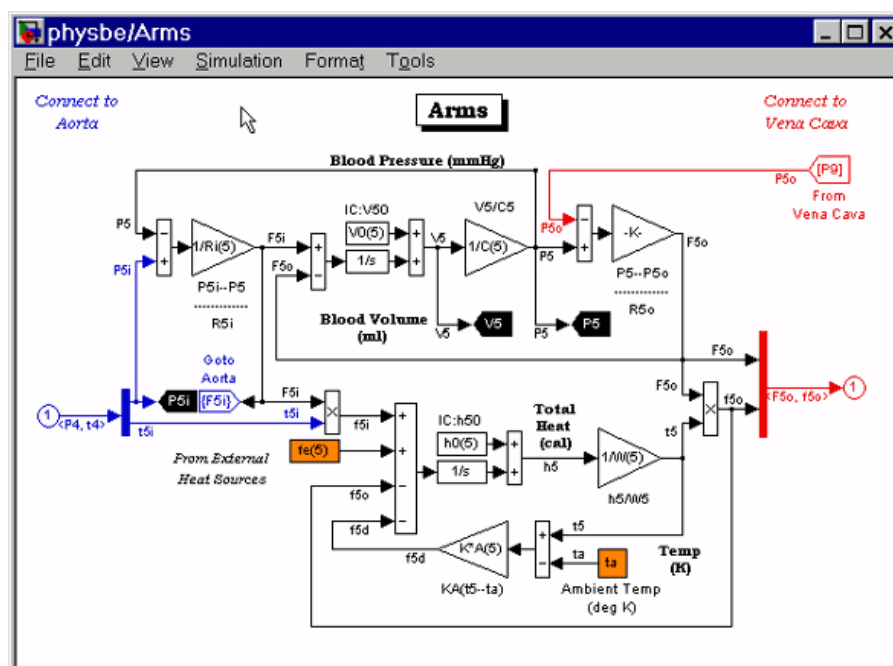
3.2.7. Συστηματική Κυκλοφορία - Άνω Άκρα

Το υπολογιστικό ανάλογο του μαθηματικού μοντέλου που προσομοιώνει την αγγειακή κυκλοφορία των άνω άκρων φαίνεται στο Σχήμα 12. Είναι όμοιο με αυτό των κάτω άκρων.

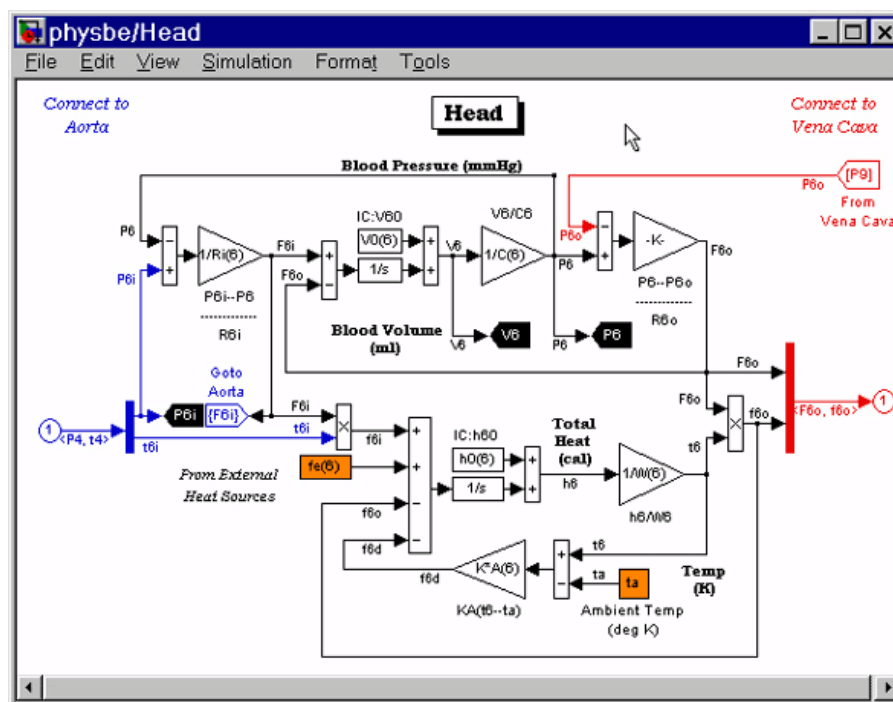
Η λειτουργία του αγγειακού συστήματος των άνω άκρων μπορεί να επηρεαστεί από την παραγωγή θερμότητας από εξωτερικές πηγές κατά τη λειτουργία των μυών. Η κατάσταση αυτή λαμβάνεται υπόψη μέσω της παραμέτρου f_e την οποία μπορεί να ορίσει ο χρήστης. Σημειώνεται ότι στο βασικό μοντέλο $f_e=0$. Η θερμοκρασία του περιβάλλοντος εισάγεται στο μοντέλο με την μεταβλητή t_a και η επίδρασή της είναι ανάλογη της επιφάνειας των άνω άκρων A και μιας θερμικής σταθεράς K . Το σύστημα των άνω άκρων συνδέεται με την αορτή μέσω του μπλε κόμβου 1 και με την κοίλη φλέβα μέσω του κόκκινου κόμβου 1. Οι κόμβοι P5_i, V5 και P5 παρέχουν πληροφορία εξόδου απευθείας στο κέντρο ανάλυσης δεδομένων.

3.2.8. Συστηματική Κυκλοφορία - Κεφαλή

Στο Σχήμα 13 παρουσιάζεται το υποσύστημα που επιλύει τις εξισώσεις για τη ροή του αίματος στο κεφάλι. Η λειτουργία του αγγειακού συστήματος του κεφαλιού μπορεί να επηρεαστεί από εξωτερικές πηγές θερμότητας μέσω της παραμέτρου f_e , αν και για το βασικό μοντέλο αυτές οι πηγές αγνοούνται ($f_e=0$). Το μοντέλο λαμβάνει υπόψη τη



Σχήμα 12: Διαγραμματική παράσταση του μαθηματικού μοντέλου των άνω άκρων σε Simulink.



Σχήμα13: Διαγραμματική παράσταση του μοντέλου της κεφαλής σε Simulink.

θερμοκρασία περιβάλλοντος (μέσω του όρου t_a και η επίδρασή της είναι ανάλογη της επιφάνειας του κεφαλιού A και μιας θερμικής σταθεράς, K). Τα μπλοκ P_{6i} , V_6 και P_6 επιτρέπουν τη μετάδοση πληροφορίας προς το κέντρο ανάλυσης δεδομένων. Ο μπλε κόμβος 1 μεταφέρει πληροφορία από την αορτή και ο κόκκινος κόμβος 1 μεταφέρει πληροφορία προς την κοίλη φλέβα.

3.2.9. Συστηματική Κυκλοφορία – Κορμός

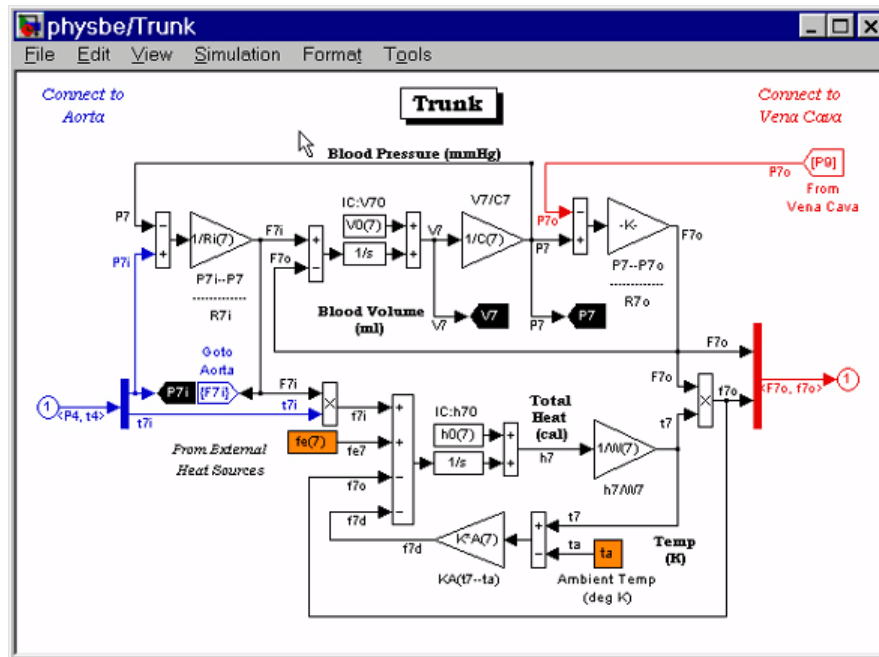
Το μαθηματικό μοντέλο το οποίο εξομοιώνει το κορμό του σώματος παρουσιάζεται διαγραμματικά στο Σχήμα 14 και είναι σχεδόν ταυτόσημο με αυτά των άνω και κάτω άκρων και του κεφαλιού.

Το αγγειακό σύστημα του κορμού μπορεί να επηρεαστεί από εξωτερικές πηγές θερμότητας όπως είναι οι εργαζόμενοι μύες μέσω της μεταβλητής f_e , ωστόσο στο αρχικό μοντέλο ισχύει $f_e=0$. Η θερμοκρασία περιβάλλοντος εισάγεται στο μοντέλο μέσω του όρου t_a και οι επιδράσεις της είναι ανάλογες του εμβαδού του κορμού. Στα άκρα της θερμικής παραμέτρου K , η έξοδος του υποσυστήματος συνδέεται με την κοίλη φλέβα μέσω των μεταβλητών F_{7o} και f_{7o} . Η μεταβλητή P_{7o} συμβολίζει έξοδο προς την κοίλη φλέβα και οι (P_4, t_4) αποτελούν εισόδους από την αορτή.

3.2.10. Κέντρο Διαχείρισης Παραμέτρων

Όλες οι τιμές των κρίσιμων παραμέτρων του συστήματος μπορούν να τροποποιηθούν χρησιμοποιώντας το κέντρο ελέγχου PHYSBE το οποίο φαίνεται στο Σχήμα 15.

Τα ονόματα των παραμέτρων φαίνονται στην πρώτη γραμμή της διεπιφάνειας ενώ τα υποσυστήματα στα οποία ανήκουν αυτές φαίνονται στην πρώτη στήλη.



Σχήμα 14: Διαγραμματική παράσταση του μαθηματικού μοντέλου του κορμού.

PHYSBE Control Center									
	Ri	Ro	C	W	A	Y0	h0	fe	fd
R.Heart	0.003	0.003	75	600	0	150	0	0	0
Lung	0.187	0	5.33	1000	0	120	0	0	0
L.Heart	0.000	0.006	75	600	0	150	0	0	0
Aorta	0	0	1.01	0	0	100	0	0	0
Arms	5.15	10	4.25	7000	3670	280	0	0	0
Head	2.58	5	1.21	4500	1400	80	0	0	0
Trunk	0.67	1.42	34	53000	6000	2250	0	0	0
Legs	2.58	5	11.1	18500	7000	730	0	0	0
V.Cava	0	0	250	0	0	500	0	0	0
Lung2*	0	0	32.5	0	0	240	0	0	0

Σχήμα 15: Το κέντρο διαχείρισης παραμέτρων του PHYSBE.

υποχώρους: Lung και Lung2 που αντιστοιχούν στην αρτηριακή και φλεβική κυκλοφορία των πνευμόνων. Οι χρωματισμένες με μπλε παράμετροι αποτελούν κρίσιμες παραμέτρους για τη λειτουργία του συστήματος και πρέπει να παραμένουν σταθερές. Η μεταβλητή της ροής θερμότητας υποδιαιρείται σε δυο μεταβλητές f_e και f_d που αντιστοιχούν σε θερμότητα από εξωτερικές πηγές και σε ροή θερμότητας στους πνεύμονες. Μια ακόμη κρίσιμη για τη λειτουργία του συστήματος παράμετρος είναι ο καρδιακός ρυθμός που όπως θα δούμε ρυθμίζεται από το κέντρο ανάλυσης δεδομένων.

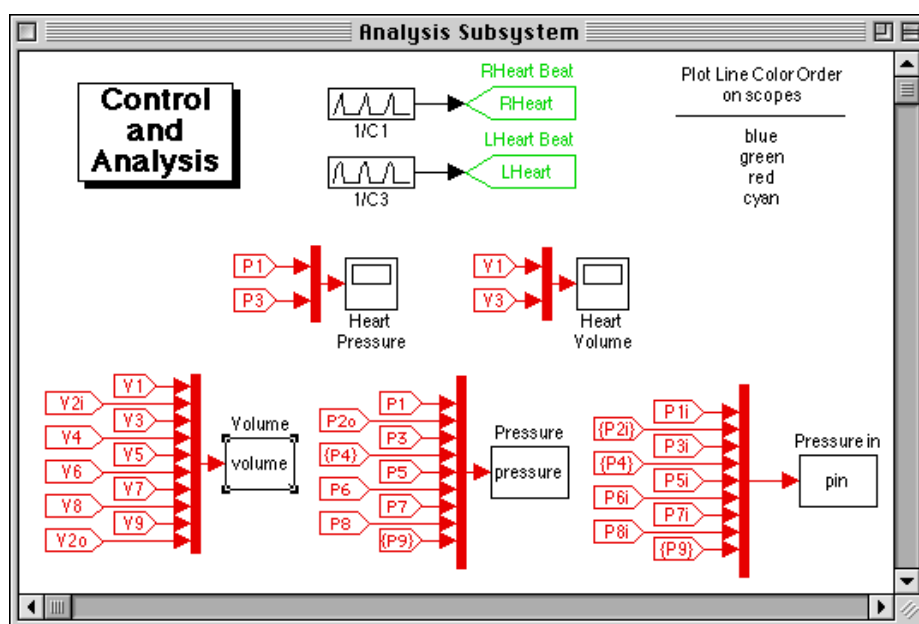
3.2.11. Κέντρο Ανάλυσης Δεδομένων

Από την διεπιφάνεια του υποσυστήματος ανάλυσης δεδομένων, η οποία φαίνεται στο Σχήμα 16, ο χρήστης έχει πρόσβαση στις κρίσιμότερες παραμέτρους του συστήματος. Παρέχεται έτσι η δυνατότητα μελέτης των τιμών των παραμέτρων κατά τη διάρκεια εκτέλεσης του μοντέλου χρησιμοποιώντας τα εργαλεία απεικόνισης του Simulink, όπως FLOATING SCOPE, SCOPE, GRAPHXY. Στο υποσύστημα αυτό επίσης δημιουργούνται τα σήματα χρονισμού που εξομοιώνουν τους παλμούς της αριστερής

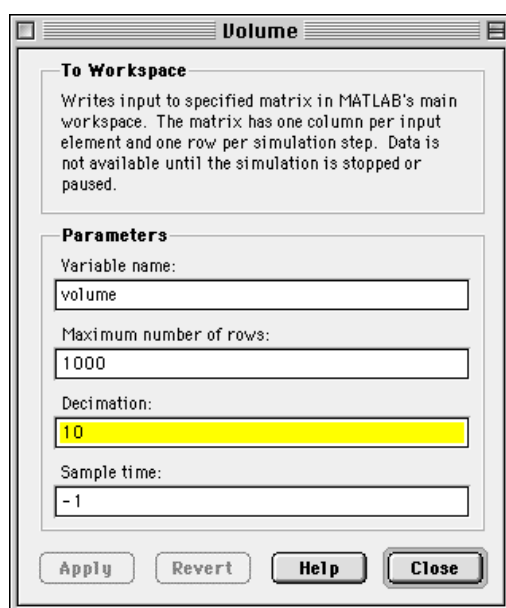
και δεξιάς καρδιάς. Στο κάτω μέρος της διεπιφάνειας, με τη χρήση των τριών εργαλείων TO WORKSPACE, δεδομένα για τον όγκο του αίματος, την εσωτερική πίεση και την πίεση εισόδου αποθηκεύονται σε πίνακες του Matlab για περαιτέρω επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Τα δεδομένα αυτά αποθηκεύονται στις μεταβλητές volume, pressure και P_{in} αντίστοιχα.

Σημειώνεται ότι για τον περιορισμό του όγκου των δεδομένων, το εργαλείο TO WORKSPACE εκτελεί δειγματοληψία στα σήματα εξόδου με παραμέτρους που ορίζονται από τη διαδραστική επιφάνεια του Σχήματος 17.

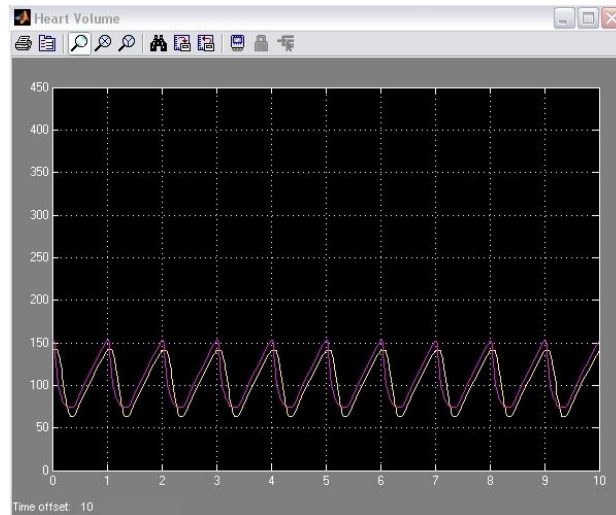
Για την προβολή γραφικών παραστάσεων παραμέτρου σε συνάρτηση με το χρόνο χρησιμοποιούνται τα εργαλεία SCOPE τα οποία παρέχουν ποικίλες δυνατότητες μορφοποίησης της εξόδου τους. Ένα παράδειγμα εξόδου SCOPE φαίνεται στο Σχήμα 18 όπου απεικονίζεται ο καρδιακός όγκος σε συνάρτηση με το χρόνο.



Σχήμα 16: Διαγραμματική παράσταση υποσυστήματος ανάλυσης δεδομένων στο Simulink.



Σχήμα 17: Διεπιφάνεια ορισμού παραμέτρων δειγματοληψίας.



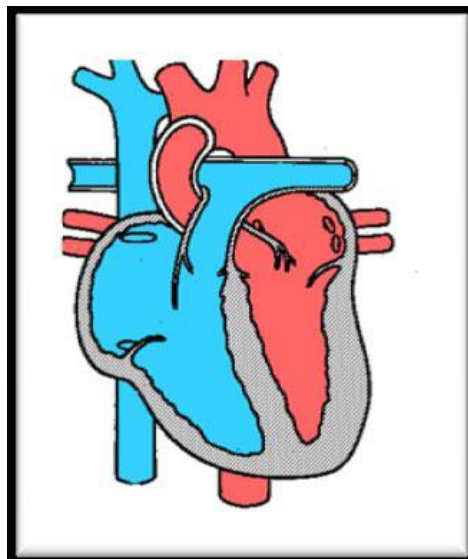
Σχήμα 18: Έξοδος SCOPE για τη μέτρηση του καρδιακού όγκου.

4. Πρακτική Εξάσκηση

4.1. Θεωρία

Ερώτηση 1: Στο διάγραμμα της καρδιάς που φαίνεται στο Σχήμα 19, ονοματίστε την αριστερή και τη δεξιά κοιλία, τον αριστερό και το δεξιό κόλπο, τη μιτροειδή και την πνευμονική βαλβίδα, την αορτή, την άνω κοίλη φλέβα (superior vena cava), την κάτω κοίλη φλέβα (inferior vena cava), την πνευμονική αρτηρία και την πνευμονική φλέβα.

Επίσης, χρησιμοποιώντας βέλη, δείξτε τη φορά του αίματος καθώς περνά μέσα από την καρδιά, επιστρέφοντας με τις κοίλες φλέβες.



Σχήμα 19: Διάγραμμα καρδιάς.

Πριν προχωρήσετε με το μοντέλο, πρέπει να κατανοήσετε τη σχέση που συνδέει την **πίεση**, τη **ροή** και την **αντίσταση** του αίματος. Η ροή του αίματος μεταξύ δύο σημείων, F είναι ίση με το πηλίκο της διαφοράς πίεσης P μεταξύ των δύο σημείων προς την αγγειακή αντίσταση R : $F = (P_1 - P_2) / R$. Η εξίσωση αυτή αποτελεί το υδροδυναμικό ανάλογο του Νόμου του Ohm. Σε αυτό το μοντέλο, η καρδιά διατηρεί την πίεση (P_1) καθώς συστέλλεται και στέλνει το αίμα στην αορτή κάτω από σχετικά μεγάλη πίεση. Η πίεση αυτή μειώνεται καθώς το αίμα ρέει διαμέσου του υπόλοιπου κυκλοφορικού συστήματος γιατί τα αγγεία προβάλλουν αντίσταση (R) προς τη ροή. Η αντίσταση εξαρτάται σημαντικά από τη διατομή των αγγείων: *Όσο πιο μεγάλη είναι η διάμετρος του αγγείου τόσο πιο μικρή είναι η αντίσταση που προβάλλει στη ροή του αίματος.*

Ερώτηση 2: Με βάση την παραπάνω εξίσωση, περιγράψτε τους δύο τρόπους με τους οποίους μπορεί να αυξηθεί η ροή του αίματος σε ένα συγκεκριμένο ιστό/όργανο/σύστημα του σώματος.

4.2. Βασική Εξάσκηση με το Μοντέλο PHYSBE και το Περιβάλλον SIMULINK

Καλείστε να εκτελέσετε τα παρακάτω βήματα:

1. Εισαγωγή στο περιβάλλον MatLab.
2. Μετάβαση στον κατάλογο ο οποίος περιέχει το Μοντέλο PHYSBE.
3. Πληκτρολόγηση της εντολής `slCharacterEncoding('ISO-8859-1')` για συμβατότητα με τη γραμματοσειρά που έχει επιλεγεί από το μοντέλο PHYSBE.
4. Πληκτρολόγηση στο περιβάλλον εργασίας MatLab της εντολής `physbe` για είσοδο στον εξομοιωτή.

Κατά την είσοδο στον εξομοιωτή, εμφανίζονται 5 παράθυρα.

1. Το κύριο παράθυρο που περιλαμβάνει το μοντέλο PHYSBE (υλοποίηση σε SIMULINK).
2. Το παράθυρο “PHYSBE Control Center” για την τροποποίηση των τιμών των κρίσιμων παραμέτρων του συστήματος
3. Το παράθυρο “Heart Volume”.
4. Το παράθυρο “Heart Pressure”.
5. Το παράθυρο “Floating Scope”.

Πειραματιστείτε με το μοντέλο PHYSBE για 2 λεπτά: Ανοίξτε τα επί μέρους συστήματα και αναγνωρίστε τις εισόδους και εξόδους τους.

Με διπλό click στο “Analysis Subsystem” μεταφέρεστε στο παράθυρο ανάλυσης δεδομένων του μοντέλου, από το οποίο είναι δυνατή η πρόσβαση στις κρισιμότερες παραμέτρους του συστήματος. Αναγνωρίστε τα `Goto Tags` τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για εξαγωγή των επιθυμητών σημάτων και παρατηρήστε την ύπαρξη τριών παλμογράφων `Scopes` με ονόματα “Heart Volume”, “Heart Pressure” και “Floating Scope”.

Εκτελέστε το μοντέλο PHYSBE (από τη γραμμή εντολών “Simulation” επιλέγετε “Start”) και παρατηρήστε τις εξόδους του μοντέλου στα παράθυρα “Heart Volume” και “Heart Pressure”. Προσπαθήστε να εξοικειωθείτε με το περιβάλλον αυτών των

παραθύρων καθώς και με τα βασικά εργαλεία Zoom In, Zoom Out και Autoscale (επιλέγεται με δεξί click πάνω στο παράθυρο).

Ερώτηση 1: Παρατηρήστε και σχολιάστε το παράθυρο “Heart Volume” στο τέλος της προσομοίωσης. Αν χρειαστεί εφαρμόστε Autoscale για καλύτερη παρουσίαση των αποτελεσμάτων. Τι απεικονίζεται στο παράθυρο αυτό; Τι μπορεί να συμβεί όταν η δεξιά καρδιά εξωθεί μεγαλύτερο όγκο αίματος από ό,τι η αριστερή καρδιά;

Ερώτηση 2: Παρατηρήστε και σχολιάστε το παράθυρο “Heart Pressure” στο τέλος της προσομοίωσης. Αν χρειαστεί εφαρμόστε Autoscale για καλύτερη παρουσίαση των αποτελεσμάτων. Συγκρίνετε τις συστολικές πιέσεις της δεξιάς και της αριστερής κοιλίας. Γιατί είναι τόσο διαφορετικές; Πώς η διαφορά πίεσης επηρεάζει το πάχος του τοιχώματος καθεμιάς εκ των κοιλιών;

4.3. Προχωρημένη Εξάσκηση στο Περιβάλλον SIMULINK

Η ροή και η πίεση του αίματος μπορούν να μετρηθούν ή να υπολογιστούν σε διάφορα μέρη του καρδιαγγειακού συστήματος: στους πνεύμονες, την αορτή, διάφορα μέρη του σώματος (κεφαλή, άκρα) και στην ίδια την καρδιά. Αυτό το μέρος της άσκησης, αναφέρεται στην παρουσίαση της διαθέσιμης από το μοντέλο PHYSBE πληροφορίας σε ένα νέο παράθυρο, χρησιμοποιώντας τα εργαλεία που παρέχει το περιβάλλον SIMULINK.

Θα δημιουργήσετε ένα νέο παράθυρο παρατήρησης μεταβλητών (scope) του μοντέλου. Για το σκοπό αυτό καλείστε να εκτελέσετε τα παρακάτω βήματα:

1. Στο παράθυρο “rphysbe” κάνετε διπλό click στο εικονίδιο “Analysis Subsystem” για να ανοίξετε τη διεπιφάνεια του υποσυστήματος ανάλυσης δεδομένων.
2. Στο νέο παράθυρο (“Analysis Subsystem”) ανοίγετε το Library Browser της Simulink από τη γραμμή εντολών (View → Library Browser).
3. Στο παράθυρο με τα εργαλεία της Simulink που ανοίγει, κατευθύνεστε στην πρώτη ομάδα εργαλείων (Simulink → Commonly Used Blocks) και επιλέγετε το Scope. Κάνετε “drag ‘n drop” για να τοποθετήσετε το Scope σας εντός του παραθύρου “Analysis Subsystem”.
4. Κάντε το ίδιο με το (3) αλλά αυτή τη φορά τοποθετήστε έναν πολυπλέκτη MUX δίπλα στο Scope που έχετε δημιουργήσει. Ο πολυπλέκτης έχει ως προεπιλογή δύο εισόδους και μία έξοδο. Ενώστε την έξοδό του με την είσοδο του Scope. Ο αριθμός των εισόδων μπορεί να προσαρμοστεί στις ανάγκες σας κάνοντας διπλό click πάνω στον πολυπλέκτη. Προς το παρόν, διατηρήστε τον αριθμό των εισόδων σε 2.
5. Οι μεταβλητές εισόδου και εξόδου (πίεσης και όγκου αίματος) του μοντέλου μπορούν να προσπελαστούν από τα αντικείμενα From Tags. Μπορείτε να δημιουργήσετε τα αντικείμενα αυτά εξ αρχής (στον Library Browser επιλέγετε Simulink → Signal Routing → From) ή μπορείτε να χρησιμοποιήσετε κάποιο από αυτά που έχουν ήδη δημιουργηθεί (με χρήση copy – paste). Το όνομα του tag (και άρα η μεταβλητή πίεσης/όγκου) που έχει δημιουργηθεί μπορεί να αλλάξει με διπλό click πάνω στο tag. Δημιουργήστε δύο τέτοιες μεταβλητές πίεσης, τις P3 και P4.
6. Από την κεντρική οθόνη διαχείρισης του μοντέλου εκτελέστε την εφαρμογή (Simulation→Start) και παρατηρήστε το παράθυρο “scope”. Αν θελήσετε να

αποθηκεύσετε το νέο μοντέλο, επιλέξτε “Save as” και δώστε ως όνομα το “Physbel”.

Ερώτηση 1: Παρατηρώντας το μοντέλο, βρείτε σε ποιών υποσυστημάτων τις πιέσεις εξόδου αντιστοιχούν οι P3 και P4. Σχολιάστε τις ομοιότητες και τις διαφορές των δύο πιέσεων: Γιατί η πίεση P4 έχει αυτή τη συμπεριφορά;

Επιστρέφοντας στο παράθυρο ανάλυσης υποσυστημάτων, αυξήστε τον αριθμό των εισόδων του πολυπλέκτη σε 3. Ως εισόδους ορίστε τις μεταβλητές P4, P7 και P9.

Ερώτηση 2: Εκτελέσετε πάλι το μοντέλο. Αφού βρείτε σε ποιο υποσύστημα αντιστοιχεί η κάθε πίεση, περιγράψτε και εξηγήστε τι παρατηρείτε ως προς τη μέγιστη τιμή τους. Πώς μπορούν οι βαλβίδες και οι μύες του σώματος να βοηθήσουν στην επιστροφή του αίματος στην καρδιά; Τι παρατηρείτε ως προς την peak-to-peak τιμή των τριών πιέσεων; Εξηγήστε.

Το έργο που εκτελεί η καρδιά ανά παλμό μπορεί να υπολογιστεί με τη βοήθεια μιας γραφικής παράστασης. Συγκεκριμένα, το έργο των κοιλιών μπορεί να προσεγγιστεί με σχετική ακρίβεια από το εμβαδό της γραφικής παράστασης όγκου – πίεσης του αίματος που είναι μια κλειστή κυκλοειδής γραμμή. Το κοιλιακό έργο ισούται με το γινόμενο του όγκου παλμού και της μέσης αορτικής ή πνευμονικής αρτηριακής πίεσης, ανάλογα με την υπό μελέτη κοιλία. Το εμβαδό με τη σειρά του μπορεί να προσεγγιστεί από το εμβαδό του εγγεγραμμένου ορθογωνίου τετραπλεύρου.

Στο περιβάλλον “Analysis Subsystem” δημιουργήστε ένα νέο αντικείμενο ως εξής:

1. Στον Library Browser επιλέγουμε Simulink → Sinks → XY Graph.
2. Δημιουργήστε ένα αντικείμενο – μεταβλητή εξόδου του μοντέλου, V1 και ένα ακόμη, P1, με τον τρόπο που έχει ήδη περιγραφεί. Ενώστε την μεταβλητή V1 με την πάνω είσοδο και την μεταβλητή P1 με την κάτω είσοδο του αντικειμένου XY Graph.
3. Με διπλό click πάνω στο XY Graph οριοθετήστε την περιοχή απεικόνισης του γραφήματος ως εξής: $[xmin, xmax, ymin, ymax] = [60, 160, 0, 30]$.
4. Από την κεντρική οθόνη διαχείρισης του μοντέλου εκτελέστε την εφαρμογή (Simulation → Start) και παρατηρήστε το παράθυρο “XY Graph”.
5. Εκτελέστε τα βήματα (1) –(4) αυτή τη φορά για την αριστερή κοιλία και με οριοθέτηση της περιοχής απεικόνισης του XY γραφήματος $[xmin, xmax, ymin, ymax] = [60, 160, 0, 140]$. Για διευκόλυνσή σας, δώστε διαφορετικά ονόματα στα δύο XY γραφήματα.

Ερώτηση 3: Περιγράψτε το γράφημα όγκου – πίεσης με τη βοήθεια της φυσιολογικής λειτουργίας της καρδιάς: Ποια σημεία της γραφικής παράστασης αντιστοιχούν σε συστολή, διαστολή, εξώθηση του αίματος από την καρδιά. Δικαιολογήστε την απάντησή σας.

Ερώτηση 4: Προσεγγίστε το κοιλιακό έργο ως το εμβαδό των δύο γραφημάτων που προκύπτουν. Συγκρίνετε τα δύο έργα μεταξύ τους. Πόσες φορές μεγαλύτερο είναι το ένα του άλλου. Δώστε μια σύντομη εξήγηση.

Ερώτηση 5: Δώστε τουλάχιστον τρεις λόγους για τους οποίους η συγκεκριμένη μέθοδος υπολογισμού του εμβαδού παρέχει μια μη ασφαλή εκτίμηση του καρδιακού έργου.

4.4. Προσομοίωση Φυσιολογικών Καταστάσεων

Ας θεωρήσουμε ότι μελετούμε το καρδιαγγειακό σύστημα ενός αθλητή κατά την άσκηση. Σε αυτή την περίπτωση, υπάρχει έντονη ανάγκη αυξημένης ροής αίματος στους μύς προκειμένου να μεταφερθεί O_2 και να απομακρυνθεί CO_2 . Θα υπολογίσουμε πόσο μπορεί να αυξηθεί η ροή του αίματος προς τους μύς με μεταβολή μόνο του καρδιακού ρυθμού.

Ο καρδιακός ρυθμός στο μοντέλο PHYSBE μπορεί να προσπελαστεί από το παράθυρο “Analysis Subsystem” και είναι διαφορετικός για τις δύο κοιλίες (Heart Beat Right Ventricle και Heart Beat Left Ventricle). Υπάρχουν δύο μεταβλητές (CI και Cr) στο περιβάλλον εργασίας MatLab οι οποίες περιέχουν τις χρονικές στιγμές των καρδιακών παλμών και άρα καθορίζουν τον καρδιακό ρυθμό.

Για τη μεταβολή του καρδιακού ρυθμού ακολουθήστε τα παρακάτω βήματα:

1. Επειδή θα επέμβετε σε δομικές μεταβλητές του φυσιολογικού μοντέλου, αποθηκεύστε τις αρχικές τιμές των μεταβλητών CI και Cr σε δύο βοηθητικούς καταχωρητές, CI_buf και Cr_buf πληκτρολογώντας στην γραμμή εντολών του MatLab τα εξής:

```
>> CI_buf = CI;  
>> Cr_buf = Cr;
```
2. Μεταβάλλετε τον καρδιακό ρυθμό των δύο κοιλιών ταυτόχρονα πληκτρολογώντας τα εξής:

```
>> n = 0.5;  
>> CI = n*CI;  
>> Cr = n*Cr;
```

Σημείωση: Προκειμένου να διπλασιάσουμε τον καρδιακό ρυθμό, υποδιπλασιάζουμε τους καταχωρητές που δείχνουν τη διάρκεια του καρδιακού παλμού.

Ερώτηση 1: Εκτελέστε το μοντέλο. Πώς μεταβάλλεται η καρδιακή πίεση και ο καρδιακός όγκος; Ποιο αυξάνεται, ποιο μειώνεται και πώς μπορείτε να εξηγήσετε τη μεταξύ τους σχέση; Αν αυξήσετε αυθαίρετα τον καρδιακό ρυθμό, εμφανίζει το μοντέλο κάποιο άνω όριο αιματικού όγκου; Αν ναι, υπό ποια πίεση συμβαίνει αυτό;

Υπόδειξη 1: Λάβετε υπόψη τη φυσιολογία της καρδιάς: Για να εξωθήσει το αίμα στο σώμα, πρέπει πρώτα οι κοιλίες να πληρωθούν με αίμα.

Υπόδειξη 2: Τα συμπεράσματα για το μοντέλο και τις μεταβλητές εξάγονται μόνο όταν αυτό έχει σταθεροποιηθεί στο χρονικό παράθυρο της εξομοίωσης σε κατάσταση S-S (“steady-state”).

Μετά το γεύμα, τα όργανα του πεπτικού συστήματος χρειάζονται επιπλέον αίμα για τη λειτουργία της πέψης. Για να μελετήσετε αυτή τη διαδικασία, θεωρήστε ότι αυξάνεται η ροή του αίματος με τη μεταβολή της αντίστασης του κορμού (trunk) στη ροή του αίματος. Σε όλα τα πειράματα που θα πραγματοποιήσετε στη συνέχεια, αγνοήστε το πρώτο διάστημα της εξομοίωσης – μεταβατική περίοδος- που χρειάζεται το μοντέλο για να φτάσει σε μόνιμη κατάσταση (steady state).

Για την προσομοίωση της διαδικασίας της πέψης, ακολουθήστε τα παρακάτω βήματα:

1. Καταχωρίστε τις αρχικές τιμές Cl_{buf} και Cr_{buf} στις μεταβλητές χρονισμού της κοιλιακής σφίξης της αριστερής και της δεξιάς καρδιάς πληκτρολογώντας

```
>> Cr = Cr_buf;  
>> Cl = Cl_buf;
```

και κατόπιν πληκτρολογήστε:

```
>> Cr = 0.4*Cr;  
>> Cl = 0.4*Cl;
```

για να αυξήσετε εκ νέου τον καρδιακό ρυθμό. Με αυτό το ρυθμό παροχής αίματος στο σώμα, προσπαθήστε να απαντήσετε στο ερώτημα που ακολουθεί.
2. Δημιουργήστε ένα νέο Scope στο οποίο θα παρατηρείτε την αιματική ροή εισόδου στο σώμα, $F7i$.

Ερώτηση 2: Πώς μπορείτε να μεγιστοποιήσετε την αιματική ροή στο σώμα, αν έχετε τη δυνατότητα να μεταβάλετε μόνο την αντίσταση εισόδου (R_i) του κοσμού (trunk); (Προσοχή, μην αποσταθεροποιήσετε το μοντέλο με τη μεταβολή της αντίστασης εισόδου). Ποιά είναι η βέλτιστη τιμή της αντίστασης για να προσομοιωθεί η αύξηση της αιματικής ροής; Ποια είναι τότε η πίεση και ποιος ο αιματικός όγκος; Πώς μεταβάλλονται με την αντίσταση; Με βάση τα μέχρι τώρα αποτελέσματα του τρίτου μέρους της άσκησης, γιατί δεν θα συνιστούσατε φυσική άσκηση αμέσως μετά το γεύμα;

Ερώτηση 3: Αν υποθέσουμε ότι η αρτηριακή πίεση δεν πρέπει να πέσει κάτω από 105 mm Hg για να διατηρείται η αιματική ροή στον εγκέφαλο, ποια θα ήταν η απάντησή σας στην Ερώτηση 2.

Ο εγκέφαλος έχει μερικές πολύ ενδιαφέρουσες φυσιολογικές ιδιότητες που τον διαφοροποιούν από τα όργανα του πεπτικού συστήματος ή τους μυς. Σε αντίθεση με το στομάχι για παράδειγμα, ο εγκέφαλος δεν μπορεί να σταματήσει να λειτουργεί ούτε καν στιγμιαία, π.χ. σε καταστάσεις εντατικής σωματικής άσκησης. Αυτή η ιδιαιτερότητα δημιουργεί μερικά σημαντικά προβλήματα στο καρδιαγγειακό σύστημά μας καθώς ο εγκέφαλος χρειάζεται μια σχεδόν συνεχή παροχή αίματος. Κάτι που δημιουργεί ακόμη περισσότερα προβλήματα είναι το γεγονός ότι ο εγκέφαλός μας είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος σε αλλαγές της πίεσης. Τα αγγεία του εγκεφάλου είναι ευαίσθητα στη χαμηλή πίεση καθώς το κεφάλι μας βρίσκεται συνήθως πιο ψηλά από την καρδιά μας και η αορτική πίεση πρέπει να είναι αρκετά υψηλή προκειμένου να εξωθεί το αίμα αντίθετα από τη φορά της βαρύτητας. Διαφορετικά, θα λυποθυμούσαμε. Ωστόσο, αν η πίεση είναι υπερβολικά υψηλή, περισσότερο αίμα θα εξαγγειώνεται από τα τριχοειδή αγγεία προς το διάμεσο χώρο, κάτι που επίσης δεν θα αρέσει στον εγκέφαλό μας. Δεν είναι τυχαίο ότι ο άνθρωπος μπορεί να περπατά με το κεφάλι προς το πάτωμα και τα πόδια ψηλά για σύντομο χρονικό διάστημα. Επομένως χρειαζόμαστε ένα σύστημα που θα πρέπει να μπορεί να ανακατανέμει γρήγορα τη ροή αίματος μεταξύ των μυών και των οργάνων του πεπτικού συστήματος, ενώ θα παρέχει σχεδόν σταθερή αιματική ροή στον εγκέφαλο, φροντίζοντας παράλληλα να διατηρείται η πίεση εντός στενών φυσιολογικών ορίων.

Ερώτηση 4: Κατά τη διάρκεια έντονης σωματικής άσκησης, πώς μπορεί να μεγιστοποιηθεί η αιματική ροή στους μυς του σώματος με διατήρηση της αρτηριακής πίεσης μεταξύ 105 και 150 mmHg και της αιματικής ροής προς τον εγκέφαλο μεταξύ 12-13 ml/sec; Στην ουσία σας ζητείται να επαναλάβετε την **Ερώτηση 3** αφού θεωρήσετε ότι πρέπει να κρατήσετε ικανοποιημένο τον εγκέφαλο. Δώστε αριθμούς και γραφήματα από τις προσομοιώσεις σας που θα υποστηρίζουν τις απαντήσεις σας.

Υπόδειξη: Επαναφέρετε όλες τις τιμές των αντιστάσεων στις αρχικές τιμές τους και έπειτα προσπαθήστε να βρείτε ένα βέλτιστο συνδυασμό τιμών για τις αντιστάσεις Trunk, Legs, Arms και Head.

Προκειμένου να επιτύχουμε υψηλή ροή, η αρτηριακή πίεση πέφτει αρκετά (έχετε ήδη μελετήσει το λόγο για τον οποίο συμβαίνει αυτό, στην **Ερώτηση 1**). Η χαμηλή πίεση όμως, μπορεί να προκαλέσει προβλήματα, ιδιαίτερα αν σκεφτούμε τη διοχέτευση αίματος σε όργανα και ιστούς πάνω από το επίπεδο της καρδιάς – για παράδειγμα στον εγκέφαλο.

Ερώτηση 5: Ποιες μεταβολές θα περιμένατε στον όγκο του αίματος στο σώμα σας, αν σας τοποθετούσαν σε δορυφόρο, εκτός του βαρυτικού πεδίου της γης; Εξηγήστε σε μια παράγραφο το σκεπτικό σας.

Ερώτηση 6: Με βάση ό,τι κατανοήσατε στο πλαίσιο της άσκησης, μπορείτε να αναφέρετε μερικούς τρόπους αντιμετώπισης της ορθοστατικής υπότασης συμπεριλαμβανομένων μηχανικών, φαρμακευτικών και άλλων μεθόδων;

Βιβλιογραφία

- [1] McLeod J, *PHYSBE: A physiological simulation benchmark experiment*, *SIMULATION*, 324-329, vol.7, no.6.
- [2] McLeod J, *PHYSBE: A year later*, *SIMULATION*, 37-45, vol.10, no.1.
- [3] [The Heart, An Online Exploration](#) (particularly [the circulatory system](#)). Διαδικτυακός τόπος του Franklin Institute Science Museum © 1996
- [4] Korn G, McLeod J, Wait J, *DARE/PHYSBE*, *SIMULATION*, 229-231.
- [5] McLeod J., *Toward uniform documentation--PHYSBE and CSMP*, *SIMULATION*, 215-220, vol.14, no.5.
- [6] Benham R., *An ISL-8 and ISL-15 study of the physiological simulation benchmark experiment*, *SIMULATION*, 152-156.
- [7] [Vesalius Interactive Anatomy](#). Διαδικτυακός τόπος με σκοπό την ενημέρωση της χειρουργικής ιατρικής κοινότητας. © [Lion Reef Software](#), 7831 Woodmont Avenue Bethesda, MD 20814
- [8] <http://www.mathworks.com/products/demos/simulink/physbe/>

Άσκηση 4

Προσομοίωση Εξέλιξης Καρκινικών Όγκων

1. Σκοπός

Σκοπός της άσκησης είναι αφενός μεν η εξοικείωση του φοιτητή με έννοιες της βιοπληροφορικής, οι οποίες αναφέρονται κυρίως στο μοριακό και κυτταρικό επίπεδο οργάνωσης της ζωής, αφετέρου δε η ενημέρωση και πρακτική εξάσκησή του σε θέματα ανάπτυξης υπολογιστικών προσομοιωτικών προτύπων βιολογικών συστημάτων. Για το σκοπό αυτό παρουσιάζεται ένα τετραδιάστατο υπολογιστικό προσομοιωτικό πρότυπο της εξέλιξης συμπαγών καρκινικών όγκων και της απόκρισής τους σε ακτινοθεραπευτικά σχήματα, που αναπτύχθηκε στο πλαίσιο διδακτορικών διατριβών του Εργαστηρίου Βιοϊατρικών Προσομοιώσεων και Απεικονιστικής Τεχνολογίας, Ε.Μ.Π. [1-10]. Επιπρόσθετα, οι φοιτητές συμμετέχουν στην ανάπτυξη τμημάτων λογισμικού για την προσομοίωση της ανάπτυξης όγκων και της απόκρισής τους στην ακτινοθεραπεία. Στόχος είναι τόσο η καλύτερη κατανόηση της ασθένειας του καρκίνου σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο, όσο και η επαφή των φοιτητών με τη βελτιστοποίηση και εξατομίκευση της ακτινοθεραπευτικής αγωγής.

2. Προετοιμασία Άσκησης

Ανατρέχοντας σε κατάλληλες βιβλιογραφικές πηγές, π.χ. βιβλία Βιολογίας Λυκείου, αναζήτηση στο διαδίκτυο για συγκεκριμένα λήμματα («cell cycle», «DNA», «cancer biology», «radiation therapy»), σύνδεση με δικτυακούς τόπους (όπως τον ακόλουθο <http://www.nobel.se/medicine/educational/2001/cellcycle.html>), γενική βιβλιογραφία Βιολογίας κ.λπ, βεβαιωθείτε ότι έχετε κατανοήσει πλήρως τους ακόλουθους όρους. Η κατανόηση των όρων αυτών είναι απαραίτητη για την επιτυχή διεξαγωγή της άσκησης και κατά συνέπεια θα πρέπει να έχει ολοκληρωθεί ΠΡΙΝ τη διεξαγωγή της.

- α. κύτταρο και δομή του κυττάρου
- β. DNA (χημική δομή, πληροφοριακό περιεχόμενο)
- γ. ανθρώπινο γονιδίωμα

- δ. πρωτεΐνες
- ε. αμινοξέα
- στ. γενετικός κώδικας
- ζ. μετάλλαξη
- η. μεταβολισμός του κυττάρου
- θ. κυτταρικός θάνατος
- ι. φαγοκύτωση
- ια. κυτταρικός κύκλος
- ιβ. ακτινοθεραπεία

3. Θεωρητικό Μέρος

3.1. Εισαγωγή

Ο καρκίνος είναι η δεύτερη σε συχνότητα αιτία θανάτου στις αναπτυγμένες χώρες [4-7]. Περίπου το 60% όλων των καρκινοπαθών στην Ευρώπη και στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής υποβάλλεται σε ακτινοθεραπεία (εξωτερική ακτινοβολήση ή βραχυθεραπεία) είτε ως τη βασική μέθοδο αντιμετώπισης του καρκίνου, είτε ως συμπλήρωμα στη χημειοθεραπεία ή τη χειρουργική επέμβαση.

Η βελτιστοποίηση του σχεδιασμού της ακτινοθεραπείας πραγματοποιείται πριν την ακτινοβολήση του ασθενούς και μέχρι σήμερα στηρίζεται κυρίως στη χωρική κατανομή της απορροφώμενης δόσης. Συγκεκριμένα, ο σχεδιασμός της ακτινοθεραπείας γίνεται έτσι ώστε ο καρκινικός ιστός να λαμβάνει τη μεγαλύτερη δυνατή δόση, ενώ συγχρόνως να ελαχιστοποιείται η δόση που απορροφούν τα όργανα ζωτικής σημασίας και οι παρακείμενοι φυσιολογικοί ιστοί. Η διαδικασία αυτή, ο «φυσικός» σχεδιασμός της ακτινοθεραπείας, σχετίζεται με διάφορα φυσικά μεγέθη που χαρακτηρίζουν τους ιστούς, όπως οι συντελεστές σκέδασης της ιοντίζουσας ακτινοβολίας.

Παράλληλα, τα τελευταία χρόνια αναπτύσσεται μια προσπάθεια βελτιστοποίησης της χρονικής κατανομής ή του «κερματισμού» της δόσης, βασιζόμενη στην αξιοποίηση γνώσεων που αναφέρονται σε βιολογικούς μηχανισμούς του κυτταρικού και μοριακού επιπέδου («βιολογικός» σχεδιασμός της ακτινοθεραπείας). Στόχος της προσέγγισης που παρουσιάζεται στη συγκεκριμένη άσκηση είναι ακριβώς η μαθηματική έκφραση και η ενσωμάτωση των παραπάνω βιολογικών μηχανισμών σε ένα πρωτότυπο υπολογιστικό πρότυπο ανάπτυξης καρκινικών όγκων και απόκρισής τους σε διάφορα ακτινοθεραπευτικά σχήματα [9]. Το ζητούμενο είναι η - κατά το δυνατό - τετραδιάστατη πρόβλεψη της εξέλιξης του όγκου με βάση τα απεικονιστικά, ιστοπαθολογικά και γενετικά δεδομένα του ασθενούς και η συνακόλουθη εκτίμηση της καλύτερης δυνατής αντιμετώπισης. Τονίζεται ωστόσο ότι ο όρος «πρόβλεψη» δε χρησιμοποιείται με απόλυτη έννοια. Λόγω της πολυπλοκότητας και του στοχαστικού χαρακτήρα των σχετικών βιολογικών φαινομένων, κάποια αβεβαιότητα θα υπεισέρχεται πάντοτε στις προβλέψεις οποιασδήποτε ογκολογικής προσομοίωσης.

3.2. Συλλογή Ατομικών Δεδομένων Ασθενούς

Αρχικά, συλλέγονται τα ατομικά απεικονιστικά (π.χ. αξονική τομογραφία - CT, μαγνητική τομογραφία - MRI, τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίου - PET), ιστοπαθολογικά (π.χ. τύπος καρκινικών κυττάρων) και γενετικά δεδομένα (π.χ. κατάσταση ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53) του ασθενούς. Ο ειδικευμένος γιατρός

χαράζει τα περιγράμματα του όγκου και άλλων ανατομικών περιοχών ενδιαφέροντος, με χρήση κατάλληλου υπολογιστικού εργαλείου που έχει αναπτυχθεί για το σκοπό αυτό (Σχήμα 1). Με βάση τα απεικονιστικά δεδομένα, πραγματοποιείται η τρισδιάστατη ανακατασκευή των ανατομικών περιοχών ενδιαφέροντος.

3.3. Αλγόριθμοι Ανάπτυξης και Απόκρισης Όγκου στην Ακτινοθεραπεία

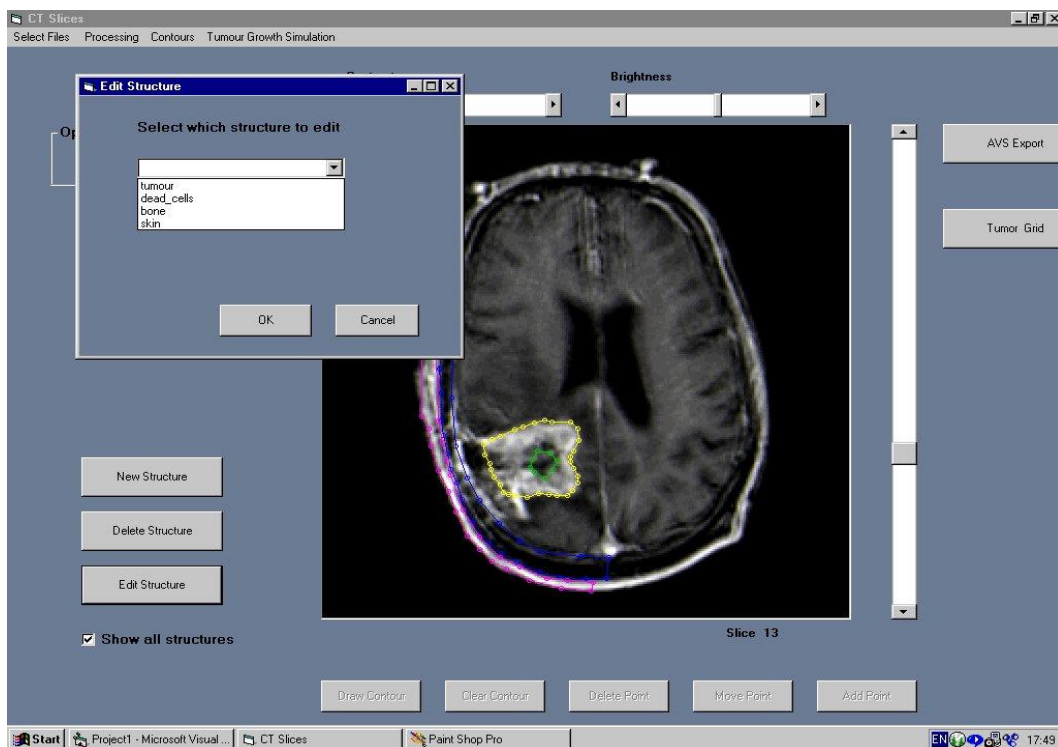
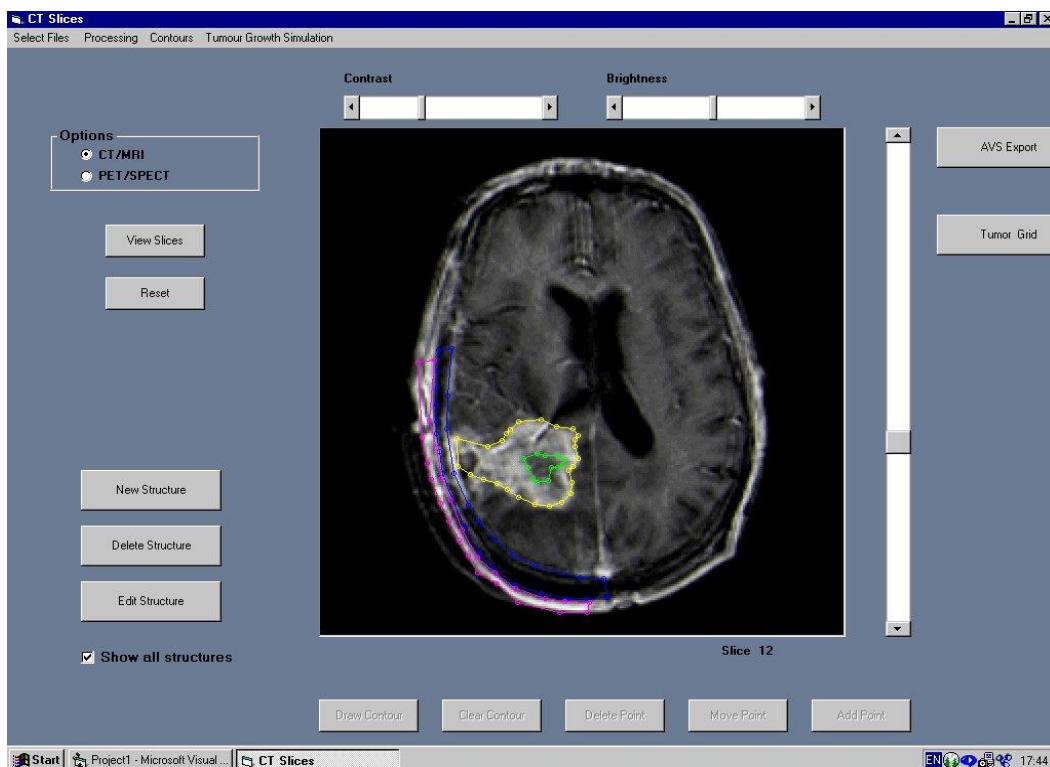
Ένα τρισδιάστατο πλέγμα διακριτοποίησης «υπερτίθεται» στην ανατομική περιοχή στόχο (όγκο). Υιοθετείται η απλουστευτική παραδοχή ότι σε κάθε γεωμετρική κυψέλη του πλέγματος περιέχεται αρχικά ένας σταθερός αριθμός βιολογικών κυττάρων (ABK). Επιδιώκεται η υπολογιστική περιγραφή (μοντελοποίηση) της βιολογικής δραστηριότητας των κυττάρων αυτών (π.χ. του μηχανισμού πολλαπλασιασμού τους) και των φαινομένων που λαμβάνουν χώρα κατά την ακτινοβολή τους. Για το συγκεκριμένο σκοπό προτείνονται και υλοποιούνται οι παρακάτω βασικές υποθέσεις (ο ενδιαφερόμενος αναγνώστης παραπέμπεται για λεπτομέρειες στη σχετική βιβλιογραφία [1-10]):

1. Τα βιολογικά κύτταρα ακολουθούν το κυτταροκινητικό πρότυπο του Σχήματος 2.
2. Κάθε γεωμετρική κυψέλη του πλέγματος στην περιοχή του όγκου περιλαμβάνει έναν αριθμό «διαμερισμάτων», σε καθένα από τα οποία βρίσκονται βιολογικά κύτταρα που ανήκουν σε συγκεκριμένη φάση εντός ή εκτός του κυτταρικού κύκλου (Εικόνα 3). Η αρχική κατανομή των βιολογικών κυττάρων σε κάθε διαμέρισμα εκτιμάται με βάση τη θέση της αντίστοιχης γεωμετρικής κυψέλης στον όγκο, δηλαδή με πρωταρχικό κριτήριο την αναμενόμενη τροφοδοσία σε οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά στο υπό εξέταση σημείο (π.χ. πληροφορίες για τη μεταβολική δραστηριότητα του όγκου προκύπτουν από τομές PET).
3. Ο θάνατος των κυττάρων λόγω της ακτινοβολήσης περιγράφεται με βάση το Γραμμικό Τετραγωνικό Πρότυπο (Linear Quadratic Model, LQ Model):

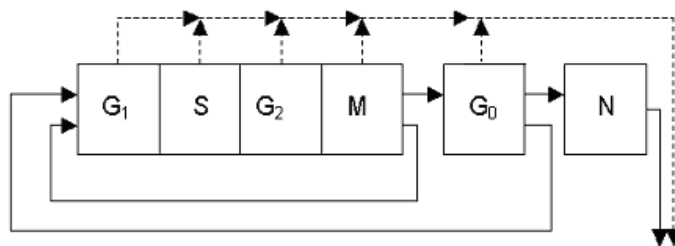
$$S = \exp[-(\alpha D + \beta D^2)] \quad (1)$$

όπου S είναι η πιθανότητα επιβίωσης ενός κυττάρου μετά από την ακτινοβολήσή του με δόση ακτινοβολίας D (Gy). Οι παράμετροι α (Gy^{-1}) και β (Gy^{-2}) σχετίζονται με την ακτινευσαισθησία του κυττάρου.

4. Η προσομοίωση της διόγκωσης και της συρρίκνωσης του καρκινικού όγκου πραγματοποιείται με βάση τους παρακάτω κανόνες:
 - 4.a. Εάν ο τρέχων Αριθμός των Βιολογικών Κυττάρων (ABK) σε μια κυψέλη υπερβεί την τιμή $ABK + ABK/2$, τότε δημιουργείται μια νέα γεωμετρική κυψέλη που περιέχει τα πλεονάζοντα βιολογικά κύτταρα. Η δημιουργία της καινούριας κυψέλης προκαλεί τη μεγέθυνση του καρκινικού όγκου.
 - 4.b. Αντίστοιχα, εάν ο τρέχων αριθμός των βιολογικών κυττάρων βρεθεί κάτω από το όριο $ABK/2$, λόγω π.χ. της ακτινοβολήσης, η αντίστοιχη γεωμετρική κυψέλη εξαφανίζεται και ο καρκινικός όγκος συρρικνώνεται.
5. Η στοχαστικότητα των διαφόρων βιολογικών φαινομένων και μηχανισμών ενδιαφέροντος προσομοιώνεται με τη βοήθεια γεννήτριας τυχαίων αριθμών. Για το λόγο αυτό όλη η προσομοίωση θεωρείται ότι ανήκει στην κατηγορία των στοχαστικών προσομοιώσεων Monte Carlo.

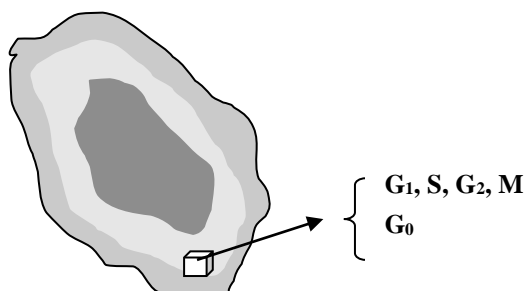


Σχήμα 1: Ειδικό υπολογιστικό «εργαλείο» για την εμφάνιση των απεικονιστικών δεδομένων του ασθενούς και τη χάραξη των περιοχών ενδιαφέροντος από τον ειδικευμένο γιατρό.



Κυτταρική Λύση

Σχήμα 2: Απλοποιημένο κυτταροκινητικό πρότυπο. G_1 : φάση G_1 , S : φάση σύνθεσης DNA, G_2 : φάση G_2 , M : μίτωση, G_0 : φάση ανάπαυσης, N : νέκρωση. Διακεκομμένες γραμμές: απόπτωση.

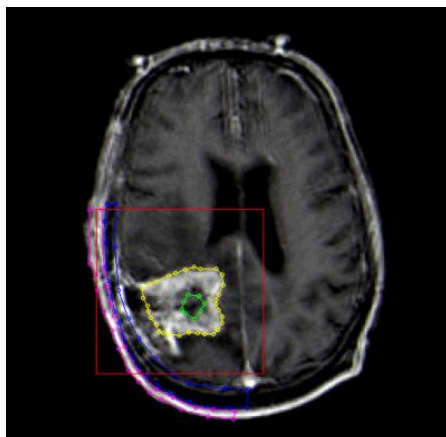


Σχήμα 3: Κυβική κυψέλη του τρισδιάστατου πλέγματος.

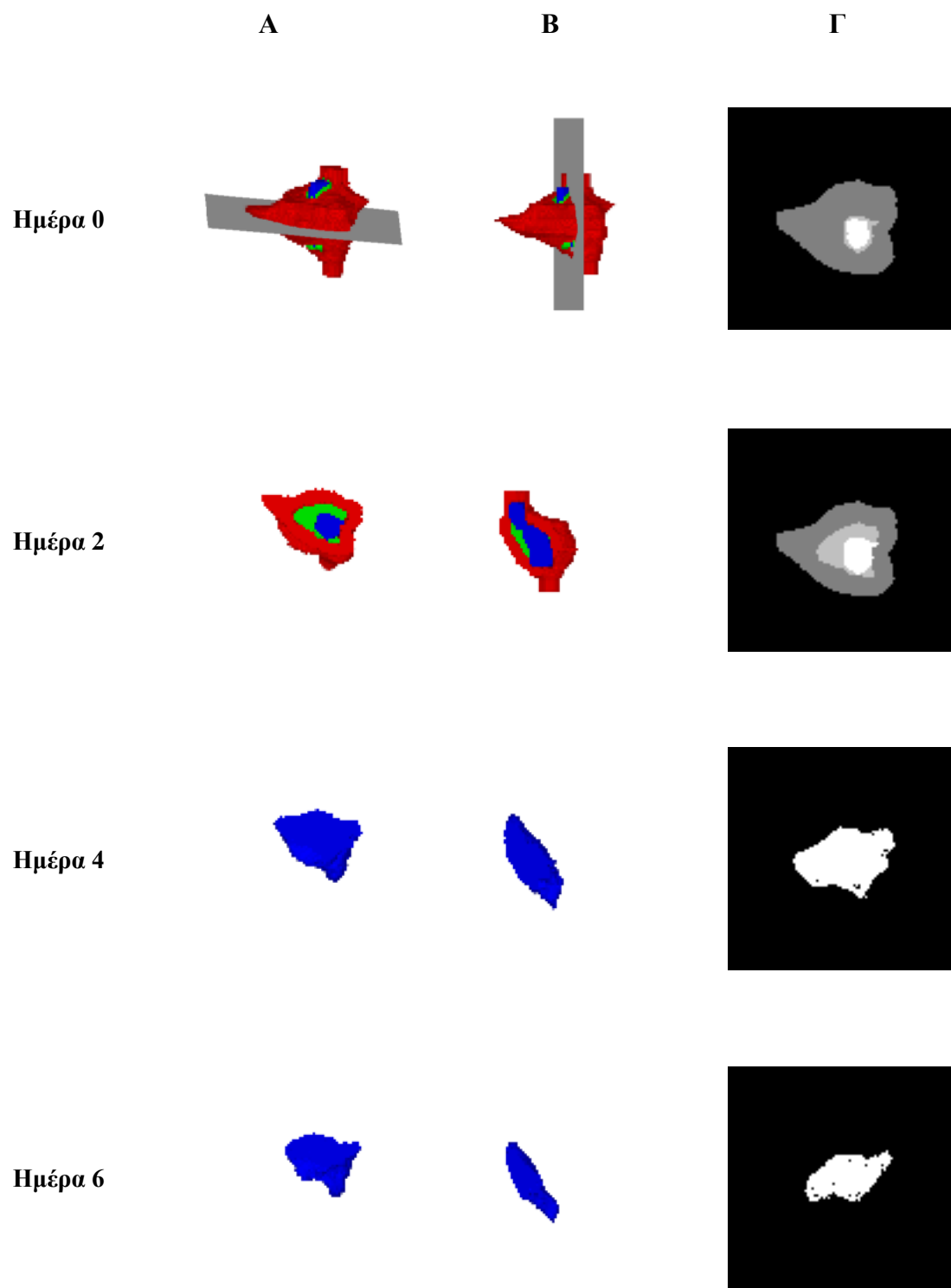
3.4. Χωροχρονική Προσομοίωση

Το τρισδιάστατο πλέγμα που καλύπτει την περιοχή ενδιαφέροντος σαρώνεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα (μπορεί να χρησιμοποιηθεί χρονικό βήμα διάρκειας μιας ώρας ή και παραπάνω, ανάλογα με το επιθυμητό επίπεδο διακριτοποίησης και την διαθέσιμη υπολογιστική ισχύ). Σε κάθε κυψέλη εφαρμόζονται οι αλγόριθμοι προσομοίωσης των επιμέρους βιολογικών μηχανισμών που περιγράφηκαν παραπάνω και έτσι προκύπτει η «πρόβλεψη» της χωροχρονικής εξέλιξης του όγκου.

Το τετραδιάστατο προσομοιωτικό πρότυπο, που περιγράφηκε προηγουμένως [9] εφαρμόστηκε σε κλινική περίπτωση γλοιοβλάστωματος στον εγκέφαλο (Σχήμα 4). Στο Σχήμα 5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα προσομοίωσης της απόκρισης όγκου στο συνήθη κεραματισμό της ακτινοθεραπείας (2 φορές την ημέρα από 2 Gy, 5 ημέρες ανά εβδομάδα, 60 Gy συνολικά).



Σχήμα 4: Τομή MRI: Πολύμορφο γλοιοβλάστωμα στον εγκέφαλο. Διακρίνονται το περίγραμμα του όγκου και εκείνο της κεντρικής νεκρωτικής περιοχής.



Ημέρα 8



Ημέρα 10



Ημέρα 20



Σχήμα 5: Προσομοίωση της απόκρισης καρκινικού όγκου στο συνήθη κερματισμό της ακτινοθεραπείας. Οι στήλες A και B δείχνουν στις τρεις διαστάσεις δύο διαφορετικές δυνατότητες τομής του όγκου (οριζόντια και κατακόρυφη αντίστοιχα), ενώ η στήλη Γ παρουσιάζει μια διδιάστατη κεντρική τομή. Οι τιμές ορισμένων παραμέτρων έχουν σκοπίμως υπερτιμηθεί, ώστε να δοθεί έμφαση στην ικανότητα του μοντέλου να προσομοιώνει το φαινόμενο της συρρίκνωσης λόγω ακτινοβολήσης. Χρωματικός κώδικας → Κόκκινο/Σκούρο γκριζο: στρώμα πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων, Πράσινο/ ανοιχτό γκριζο: στρώμα αναπαυόμενων κυττάρων, Μπλε/ άσπρο: στρώμα νεκρωτικών κυττάρων.

4. Πρακτική Εξάσκηση

A) Σε σχέση με το τετραδιάστατο υπολογιστικό προσομοιωτικό πρότυπο που παρουσιάστηκε από τον υπεύθυνο της άσκησης

Ως παράδειγμα υπολογιστικής προσομοίωσης θεωρήστε την κλινική περίπτωση ενός ασθενούς με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα (αστροκύττωμα του εγκεφάλου, τετάρτου βαθμού κακοήθειας). Με τη βοήθεια του υπεύθυνου της άσκησης μελετήστε τα αποτελέσματα της προσομοίωσης της απόκρισης στην ακτινοθεραπεία για τη συγκεκριμένη κλινική περίπτωση. Συγκρίνετε τα αποτελέσματα για διαφορετικά ακτινοθεραπευτικά συστήματα (**υπερκερματισμός**: ακτινοβολήση 2 φορές την ημέρα,

5 ημέρες την εβδομάδα, συνολική δόση: 72 Gy , **συνήθης κερματισμός:** ακτινοβολήση 1 φορά την ημέρα, 5 ημέρες την εβδομάδα, συνολική δόση: 60 Gy) και για διαφορετικές τιμές των παραμέτρων του προβλήματος (π.χ. διαφορετικές τιμές των παραμέτρων του Γραμμικού Τετραγωνικού Προτύπου).

B) Σε σχέση με το πρόγραμμα προσομοίωσης ανάπτυξης και απόκρισης του όγκου σε ακτινοθεραπεία, στην υλοποίηση του οποίου θα συμμετάσχουν οι φοιτητές

Στο πλαίσιο της εργαστηριακής άσκησης, οι φοιτητές θα συμμετάσχουν στην ολοκλήρωση κατάλληλου λογισμικού, το οποίο προσομοιώνει την ανάπτυξη όγκων και την απόκριση τους στην ακτινοθεραπεία. Το λογισμικό έχει αναπτυχθεί για τις ανάγκες της άσκησης σε περιβάλλον Matlab. Οι φοιτητές καλούνται να συμμετάσχουν στη συμπλήρωση κρίσιμων τμημάτων του κώδικα στα m. αρχεία που υπάρχουν σε υπεύθυνος της άσκησης. Επίσης, θα συνθέσουν ακτινοθεραπευτικά σχήματα, θα τα εφαρμόσουν *in silico* σε όγκο που θα δημιουργήσουν και θα αναλύσουν τα αποτελέσματα. Πρέπει να σημειωθεί εδώ, ότι ο κώδικας που θα αναπτυχθεί, στόχο έχει την εξάσκηση των φοιτητών και σε καμία περίπτωση δε μπορεί να αντικαταστήσει σε αρτιότητα και αξιοπιστία αποτελεσμάτων το ολοκληρωμένο τετραδιάστατο προσομοιωτικό πρότυπο που παρουσιάστηκε.

Το λογισμικό που οι φοιτητές καλούνται να συμπληρώσουν με δικό τους κώδικα και στη συνέχεια να εκτελέσουν, έχει αναπτυχθεί σύμφωνα με τις παρακάτω αρχές:

- i) **Γεωμετρικές Κυψέλες:** Θεωρούμε ότι ο όγκος βρίσκεται σε ένα γεωμετρικό πλέγμα του τρισδιάστατου χώρου που αποτελείται από στοιχειώδεις Γεωμετρικές Κυψέλες (ΓΚ). Κάθε ΓΚ έχει διαστάσεις $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ και περιέχει 10^6 κύτταρα, τα οποία μπορούν να ανήκουν σε οποιαδήποτε από τις φάσεις του κυτταροκινητικού προτύπου (G_1 , S, G_2 , M, G_0 , N). Ο ιστός που περιέχεται σε κάθε ΓΚ του όγκου, και κατά συνέπεια και η ΓΚ ως σύνολο, ταξινομείται, με βάση την κατανομή των κυττάρων της στις διάφορες καταστάσεις του κυτταροκινητικού προτύπου, σε μια τις τρεις κατηγορίες: νεκρωτική, ανάπαυσης και πολλαπλασιασμού. Έτσι, μία ΓΚ χαρακτηρίζεται ως νεκρωτική όταν τουλάχιστον το 90% των κυττάρων που περιέχει είναι στη φάση νέκρωσης (N) του κυτταροκινητικού προτύπου. Όταν δεν ισχύει το παραπάνω, θεωρούμε ότι η ΓΚ βρίσκεται στη φάση ανάπαυσης όταν τα κύτταρα που είναι στη φάση ανάπαυσης (G_0) είναι περισσότερα από αυτά που βρίσκονται σε μία από τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου (φάσεις G_1 , S, G_2 , M), ενώ θεωρούμε ότι η ΓΚ βρίσκεται στη φάση πολλαπλασιασμού σε αντίθετη περίπτωση (Σχήμα 6).

αν	$\frac{\# \text{ κυττάρων στην N φάση}}{\text{συνολικός} \# \text{ κυττάρων της ΓΚ}} \geq 0.9$
	η ΓΚ χαρακτηρίζεται ως “νεκρωτική”
αλλιώς	
αν	$(\# \text{ κυττάρων στη φάση } G_0) \geq (\# \text{ κυττάρων στις φάσεις } G_1, S, G_2, M)$
	η ΓΚ χαρακτηρίζεται ως “ανάπαυσης”
αλλιώς	
	η ΓΚ χαρακτηρίζεται ως “πολλαπλασιασμού”
τέλος	

Σχήμα 6: Ψευδοκώδικας για την ταξινόμηση των ΓΚ (με “# κυττάρων” συμβολίζεται ο αριθμός των κυττάρων).

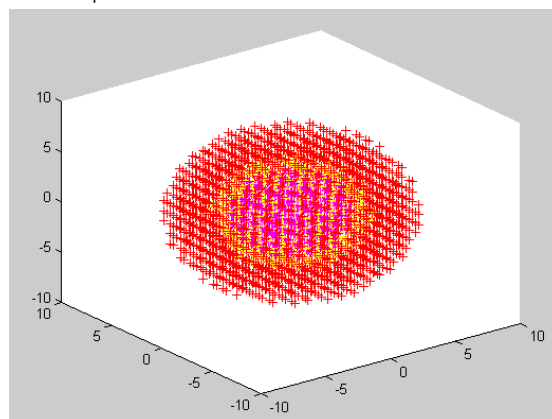
Ο διαχωρισμός των ΓΚ στις παραπάνω κατηγορίες χρησιμεύει τόσο στην οπτικοποίηση του όγκου όσο και στον καθορισμό των πιθανοτήτων μετάβασης από μια φάση του κυτταρικού κύκλου σε άλλη, όπως θα γίνει φανερό παρακάτω.

- ii) Θεωρούμε ότι ο όγκος, αρχικά, αποτελείται από μία εσωτερική σφαιρική περιοχή που αντιστοιχεί στο νεκρωτικό τμήμα, που αποτελείται, δηλαδή, από ΓΚ που χαρακτηρίζονται ως νεκρωτικές σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν παραπάνω. Κινούμενοι προς το εξωτερικό του όγκου συναντάμε την περιοχή με κύτταρα που βρίσκονται σε φάση ανάπαυσης, η οποία αντιστοιχεί σε ένα ομόκεντρο δακτύλιο με τη νεκρωτική περιοχή. Ακόμα πιο έξω υπάρχει δεύτερος ομόκεντρος δακτύλιος που αντιστοιχεί στη περιοχή των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση του πολλαπλασιασμού (δηλαδή σε μία από τις φάσεις G_1 , S , G_2 , M). Η αρχικοποίηση αυτή σχετίζεται με την υπόθεση ότι οι συνθήκες (διαθεσιμότητα γλυκόζης και οξυγόνου) δεν είναι ευνοϊκές στο εσωτερικό του όγκου, ενώ γίνονται πιο ευνοϊκές όσο κινούμαστε προς την εξωτερική του επιφάνεια. Η συνάρτηση `initialize_tumour.m` είναι η συνάρτηση που αρχικοποιεί τον όγκο στον τρισδιάστατο χώρο (το αντίστοιχο αρχείο μπορεί να βρεθεί στον κατάλογο που θα σας υποδείξει ο υπεύθυνος της άσκησης). Η συνάρτηση δέχεται ως εισόδους τις ακτίνες που ορίζουν τα όρια των τριών περιοχών του όγκου, ενώ επιστρέφει ένα τρισδιάστατο πίνακα (array) από δομές (structs) του Matlab. Κάθε δομή περιέχει όλες τις χρήσιμες πληροφορίες για μία από τις ΓΚ του γεωμετρικού πλέγματος που περιέχει τον όγκο.

Π.χ. πληκτρολογώντας

```
>> tumour_in_GC = initialize_tumour(Rπολλ., Rανap., Rνεκp.)1
```

στο command line του Matlab επιστρέφεται στη μεταβλητή ένας πίνακας από δομές σχετικές με τον όγκο που μόλις δημιουργήθηκε. Ο όγκος αυτός (Σχήμα 7) περιέχει μια νεκρωτική περιοχή που αντιστοιχεί σε σφαίρα με κέντρο το σημείο (0,0,0) και ακτίνα $R_{νεκp.}$, μια περιοχή ανάπαυσης που αντιστοιχεί σε δακτύλιο με εσωτερική ακτίνα $R_{νεκp.}$ και εξωτερική $R_{ανap.}$, και μια περιοχή πολλαπλασιασμού που αντιστοιχεί σε δακτύλιο με εσωτερική ακτίνα $R_{ανap.}$ και εξωτερική $R_{πολλ.}$. Οι ακτίνες $R_{πολλ.}$, $R_{ανap.}$, $R_{νεκp.}$ μετρούνται σε *mm*.



Σχήμα 7: Όγκος με νεκρωτική περιοχή ακτίνας $R_{νεκp.} = 4$ (ροζ χρώμα), περιοχή ανάπαυσης με εξωτερική ακτίνα $R_{ανap.} = 5$ (κίτρινο χρώμα) και περιοχή πολλαπλασιασμού με εξωτερική ακτίνα $R_{πολλ.} = 8$ (κόκκινο χρώμα).

¹ Οι τιμές $R_{πολλ.}$, $R_{ανap.}$, $R_{νεκp.}$ αναφέρονται εδώ συμβολικά. Ο χρήστης εισάγει τις επιθυμητές ακτίνες των τριών περιοχών του όγκου $R_{πολλ.}$, $R_{ανap.}$, $R_{νεκp.}$ ως θετικούς ακεραίους αριθμούς.

Κατά την αρχικοποίηση του όγκου αρχικοποιείται και το γεωμετρικό πλέγμα, το οποίο θεωρούμε ότι είναι ένας κύβος με κέντρο το σημείο (0,0,0) και πλευρά το τετραπλάσιο της εξωτερικής ακτίνας της περιοχής πολλαπλασιασμού αυξημένο κατά 1. Η εντολή

```
>> tumour_in_GCs=initialize_tumour( Rπολλ., Rανap., Rνεκp. )
```

αρχικοποιεί το γεωμετρικό πλέγμα ως κύβο με κέντρο το (0,0,0) και πλευρά ίση με $4 * R_{\text{πολλ.}} + 1$. Το γεωμετρικό πλέγμα περιλαμβάνει ΓΚ που αντιστοιχούν σε σημεία

$P(x, y, z)$ με ακέραιες συντεταγμένες (x, y, z) για τις οποίες ισχύει:
 $-2R_{\text{πολλ.}} \leq x \leq 2R_{\text{πολλ.}}$, $-2R_{\text{πολλ.}} \leq y \leq 2R_{\text{πολλ.}}$ και $-2R_{\text{πολλ.}} \leq z \leq 2R_{\text{πολλ.}}$

Προφανώς, περιλαμβάνονται και ΓΚ οι οποίες απέχουν απόσταση μεγαλύτερη από $R_{\text{πολλ.}}$ από το κέντρο και είναι εκτός του όγκου (μπορούν όμως κατά τη διαδικασία της προσομοίωσης να αποτελέσουν μέρος του όγκου σε περίπτωση διόγκωσης του). Η εντολή

```
>> tumour_in_GCs=initialize_tumour ( Rπολλ., Rανap., Rνεκp. )
```

επιστρέφει ένα τρισδιάστατο πίνακα από δομές (tumour_in_GCs) που περιέχει $(4R_{\text{πολλ.}} + 1) * (4R_{\text{πολλ.}} + 1) * (4R_{\text{πολλ.}} + 1)$ δομές, καθεμία από τις οποίες αντιστοιχεί σε μία ΓΚ. Κατά τη διαδικασία της προσομοίωσης τα στοιχεία της δομής για κάθε ΓΚ ανανεώνονται. Αναλυτικά, τα στοιχεία της κάθε δομής περιγράφονται στο παράρτημα της άσκησης.

- iii) **Προσομοίωση:** Ως μονάδα χρόνου θεωρούμε τις 6 ώρες, ώστε να είναι δυνατή η προσομοίωση και η εξαγωγή των αποτελεσμάτων σε λογικά χρονικά πλαίσια. Με αυτή την υπόθεση, η διάρκεια των φάσεων του κυτταρικοκινητικού προτύπου σε χρονικά βήματα (ts: time steps) ορίζονται σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

Φάση	Διάρκεια (ts)
G ₁	2
S	2
G ₂	1
M	1
G ₀	4
N	8

Για κάθε χρονικό βήμα, σαρώνονται όλες οι ΓΚ του γεωμετρικού πλέγματος, ώστε σε κάθε μια από αυτές να προσομοιωθούν τα φαινόμενα της ακτινοβόλησης και της επακόλουθης νέκρωσης των κυττάρων, της απόπτωσης, της μετάβασης από φάση σε φάση του κυτταρικοκινητικού προτύπου, της συρρίκνωσης και της διόγκωσης του όγκου. Τα κύρια σημεία της διαδικασίας της προσομοίωσης περιγράφονται παρακάτω:

- Θεωρούμε ότι τα κύτταρα που δεν επιβιώνουν κατά την ακτινοβόληση νεκρώνονται και μένουν νεκρωμένα στον όγκο για διάρκεια δυο μιτωτικών διαιρέσεων (δηλαδή για 12 ts). Στη συνέχεια εξαφανίζονται (λύση του κυττάρου). Υπενθυμίζεται, εδώ, ότι ο αριθμός των κυττάρων που επιβιώνουν κατά την ακτινοβόληση ακολουθεί το Γραμμικό Τετραγωνικό Πρότυπο (Εξίσωση (1)).

- Όσον αφορά στο φαινόμενο της απόπτωσης, θεωρούμε ότι σε κάθε χρονικό βήμα ένα ποσοστό ίσο με $1/10^6$ των κυττάρων που βρίσκονται στις φάσεις G_1 , S , G_2 , M και G_0 μεταβαίνουν κατευθείαν στη λύση.
- Σε κάθε χρονικό βήμα, αφού υπολογιστούν ο αριθμός των κυττάρων που Σε κάθε χρονικό βήμα, αφού υπολογιστούν ο αριθμός των κυττάρων που νεκρώνονται λόγω ακτινοβόλησης ή μεταβαίνουν στη λύση λόγω απόπτωσης ή προηγούμενης ακτινοβόλησης υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων που μεταβαίνουν από φάση σε φάση σύμφωνα με το κυτταροκινητικό πρότυπο. Όσον αφορά στις μεταβάσεις από τη φάση M στις φάσεις G_0 ή G_1 και από τη φάση G_0 στις φάσεις G_1 ή N ορίζονται αντίστοιχες πιθανότητες με βάση την κατάσταση στην οποία βρίσκεται η ΓΚ, η οποία και αντικατοπτρίζει τις συνθήκες (διαθεσιμότητα γλυκόζης και οξυγόνου) στις οποίες βρίσκονται τα αντίστοιχα καρκινικά κύτταρα. Σημειώνουμε εδώ, ότι ως κατάσταση της ΓΚ λαμβάνεται η κατάσταση της κατά το προηγούμενο χρονικό βήμα. Οι πιθανότητες αυτές φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Μετάβαση	Κατάσταση Πολλαπλασιασμού	Κατάσταση Ανάπαυσης	Κατάσταση Νέκρωσης
$M \rightarrow G_1$	70%	30%	20%
$M \rightarrow G_0$	30%	70%	80%
$G_0 \rightarrow M$	80%	10%	2%
$G_0 \rightarrow N$	20%	90%	98%

- Μετά τις μεταβάσεις από φάση σε φάση σε κάθε ΓΚ, όπως υποδεικνύει το κυτταροκινητικό πρότυπο, ακολουθεί σάρωμα όλων των ΓΚ, ώστε να επιτευχθεί η συρρίκνωση ή η διόγκωση του όγκου, σύμφωνα με την αρχή που έχει ήδη περιγραφεί.
- Τέλος, κάθε ΓΚ χαρακτηρίζεται ως ΓΚ πολλαπλασιασμού, ανάπαυσης και νέκρωσης σύμφωνα με όσα έχουν ήδη περιγραφεί.

Ο κώδικας που προσομοιώνει την ανάπτυξη του όγκου και την απόκριση στην ακτινοθεραπεία περιέχεται στη συνάρτηση `simulate.m`, που οι φοιτητές θα έχουν την ευκαιρία να βρουν σε συγκεκριμένο κατάλογο των υπολογιστών τους. Πέρα από όσα έχουν συμπεριληφθεί στο παρόν κείμενο, οι φοιτητές θα έχουν την ευκαιρία να δουν τον τρόπο λειτουργίας της `simulate.m` διαβάζοντας και τα εκτενή σχόλια (comments) που υπάρχουν στο αρχείο `simulate.m`. Για να είναι δυνατή η έναρξη της προσομοίωσης με χρήση της `simulate.m`, στο χώρο εργασίας (workspace) της Matlab θα πρέπει να είναι φορτωμένα τα εξής:

1. Ο τρισδιάστατος πίνακας (array) των δομών που περιέχει τις απαραίτητες πληροφορίες για την αρχική κατάσταση του όγκου (π.χ. `tumour_in_GC`s). Αυτό μπορεί να επιτευχθεί, όπως προαναφέρθηκε πληκτρολογώντας π.χ. `tumour_in_GC=initialize_tumour (Rπολλ., Rανap., Rνεκp.)`.
2. Δύο μονοδιάστατοι πίνακες, α και β , που δίνουν την ακτινευσαισθησία του όγκου. Οι πίνακες αυτοί έχουν τη μορφή $\alpha = [\alpha_1 \ \alpha_2 \ \alpha_3]$ και $\beta = [\beta_1 \ \beta_2 \ \beta_3]$,

όπου $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$ είναι οι τιμές της παραμέτρου α της ακτινευαισθησίας στις φάσεις G_1 ή G_2 ή M (α_p), στη φάση S (α_s) και στη φάση G_0 (α_{Go}) αντίστοιχα, και $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ είναι οι τιμές της παραμέτρου της β ακτινευαισθησίας στις φάσεις G_1 ή G_2 ή M (β_p), στη φάση S (β_s) και στη φάση G_0 (β_{Go}) αντίστοιχα.

3. Ένας μονοδιάστατος πίνακας, στον οποίο θα έχει εκχωρηθεί το σχήμα ακτινοβολήσης που θα εφαρμοστεί. Π.χ πληκτρολογώντας
`>> radiotherapy_scheme=[0 2 0 0 0 2...]` ;
 δημιουργούμε ακτινοθεραπευτικό σχήμα κατά το οποίο ο όγκος ακτινοβολείται με 2 Gy κατά το δεύτερο και έκτο χρονικό βήμα.
4. Μια μεταβλητή στην οποία έχει εκχωρηθεί η διάρκεια της προσομοίωσης σε χρονικά βήματα (η οποία, βέβαια, πρέπει να είναι ίση με το μήκος του μονοδιάστατου πίνακα που περιέχει το ακτινοθεραπευτικό σχήμα). Π.χ. μπορούμε να πληκτρολογήσουμε
`>> duration=60;`
 (αντιστοιχεί σε 360 ώρες, ή αλλιώς σε 15 ημέρες) ή απλά
`>> [anything, duration]=size(radiotherapy_scheme);`

Οι φοιτητές στο πλαίσιο της άσκησης καλούνται να:

1. Ολοκληρώσουν τον κώδικα που θα βρουν σε συγκεκριμένο κατάλογο ώστε να είναι δυνατή η προσομοίωση της ανάπτυξης του όγκου και της απόκρισης του στην ακτινοθεραπεία. Συγκεκριμένα θα:
 - i. Συμπληρώσουν τον κώδικα που υπολογίζει τον αριθμό των κυττάρων που επιβιώνουν από την ακτινοβολήση και εκείνων που χάνονται λόγω απόπτωσης, καθώς και τον κώδικα που ανανεώνει τον αριθμό των κυττάρων ύστερα από τις μεταβάσεις στις διάφορες φάσεις του κυτταροκινητικού προτύπου
 - ii. Γράψουν δικιά τους συνάρτηση που να σχεδιάζει τον όγκο και να κωδικοποιεί με διαφορετικό χρώμα τις κυψέλες, ανάλογα με την κατάσταση στην οποία βρίσκονται (πολλαπλασιασμού, ανάπαυσης ή νέκρωσης).
2. Χρησιμοποιήσουν τον ολοκληρωμένο κώδικα για την προσομοίωση της εξέλιξης όγκου με τα παρακάτω στοιχεία: ακτίνα νεκρωτικής περιοχής $R_{\text{πολλ.}} = 4 \text{ mm}$, εξωτερική ακτίνα περιοχής ανάπαυσης $R_{\text{αν.}} = 5 \text{ mm}$ και εξωτερική ακτίνα περιοχής πολλαπλασιασμού $R_{\text{πολλ.}} = 8 \text{ mm}$. Στη συνέχεια θα εφαρμόσουν σε αυτόν σχήμα ακτινοθεραπείας συνήθους κερματισμού (ακτινοβολήση 1 φορά την ημέρα με 2 Gy, για 2 εβδομάδες) θεωρώντας όγκο ακτινευαίσθητο ($\alpha_p = 0.6 \text{ Gy}^{-1}$, $\alpha_s = 0.5 \text{ Gy}^{-1}$, $\alpha_{Go} = 0.4 \text{ Gy}^{-1}$, $\beta_p = 0.06 \text{ Gy}^{-2}$, $\beta_s = 0.05 \text{ Gy}^{-2}$, $\beta_{Go} = 0.04 \text{ Gy}^{-2}$) και μέτρια ακτινευαίσθητο ($\alpha_p = 0.4 \text{ Gy}^{-1}$, $\alpha_s = 0.3 \text{ Gy}^{-1}$, $\alpha_{Go} = 0.2 \text{ Gy}^{-1}$, $\beta_p = 0.04 \text{ Gy}^{-2}$, $\beta_s = 0.03 \text{ Gy}^{-2}$, $\beta_{Go} = 0.02 \text{ Gy}^{-2}$). Επίσης, οι φοιτητές, για λόγους σύγκρισης καλούνται να εφαρμόσουν στον μέτρια ακτινευαίσθητο όγκο σχήμα υπερκερματισμού (ακτινοβολήση 2 φορές την ημέρα με 1.2 Gy τη φορά, για 2 εβδομάδες) αλλά και να προσομοιώσουν την ανάπτυξη του χωρίς ακτινοθεραπεία για μια εβδομάδα. Τέλος, για τις παραπάνω προσομοιώσεις θα πρέπει να σχεδιαστούν τα γραφήματα μεταβολής του συνολικού αριθμού των κυττάρων, των κυττάρων που βρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού, ανάπαυσης και νέκρωσης ως

προς το χρόνο, καθώς και η τρισδιάστατη απεικόνιση του όγκου σε διάφορες χρονικές στιγμές κατά την προσομοίωση. Τέλος, οι φοιτητές καλούνται να συγκρίνουν και να σχολιάσουν τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων.

Παράρτημα

Τα στοιχεία της δομής που περιγράφει κάθε ΓΚ του κυβικού πλέγματος που διακριτοποιεί την περιοχή του όγκου περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

.coords	Είναι μονοδιάστατος πίνακας 3 στοιχείων και δίνει τις συντεταγμένες της ΓΚ.
.state_per_time	Είναι μονοδιάστατος πίνακας και δίνει την κατάσταση της ΓΚ όπως αλλάζει στο χρόνο (το 0 αντιστοιχεί σε θέση εκτός όγκου, το 1 αντιστοιχεί σε κατάσταση πολλαπλασιασμού, το 2 αντιστοιχεί σε κατάσταση ανάπαυσης και το 3 σε νεκρωτική κατάσταση). Π.χ αν state_per_time(3)=1, η ΓΚ βρίσκεται σε κατάσταση πολλαπλασιασμού κατά το 3 ^ο χρονικό βήμα.
.num_of_cells_in_G1(S,G2,M,G0,N)_per_time	Είναι μονοδιάστατος πίνακας και δίνει των αριθμό των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση G ₁ (S,G ₂ ,M,G ₀ ,N) κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης. Το .num_of_cells_in_N_per_time δίνει τον αριθμό των κυττάρων που έχουν εισέλθει στη φάση N μετά τη φάση τη G ₀ , και όχι αυτών που έχουν νεκρωθεί λόγω της ακτινοβολήσης.
.num_of_cells_in_necrotic_per_time	Είναι μονοδιάστατος πίνακας και δίνει το άθροισμα των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση N (αυτών που έχουν εισέλθει στη φάση N μετά τη φάση G ₀) και αυτών που έχουν νεκρωθεί λόγω ακτινοβολήσης κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης.
.num_of_all_cells_per_time	Είναι μονοδιάστατος πίνακας και δίνει το άθροισμα όλων των κυττάρων της ΓΚ κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης.
.num_of_prolif_cells_per_time	Είναι μονοδιάστατος πίνακας και δίνει των αριθμό των κυττάρων που βρίσκονται στις φάσεις G ₁ , S, G ₂ , M κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης.
.available_space_per_time	Είναι μονοδιάστατος πίνακας και δίνει το διαθέσιμο χώρο της ΓΚ κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης. Π.χ για το i χρονικό βήμα είναι available_space_per_time(i)=10 ⁶ -num_of_all_cells_per_time(i)
.prof_to_all	Είναι μονοδιάστατος πίνακας και δίνει το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται στις φάσεις (G ₁ , S, G ₂ , M) κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης.
.rest_to_all	Είναι μονοδιάστατος πίνακας και δίνει το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση G ₀ κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης.
.dead_to_all	Είναι μονοδιάστατος πίνακας και δίνει το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση N ή έχουν νεκρωθεί λόγω ακτινοβολήσης κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης.
.time_spent_in_G1(S,G2,M,G0,N)_per_time	Είναι μονοδιάστατος πίνακας και δίνει το χρόνο για τον οποίο τα κύτταρα που βρίσκονται στη φάση G ₁ (S,G ₂ ,M,G ₀ ,N) έχουν μείνει στη φάση αυτή κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης.

Καθένα από τα στοιχεία της δομής του πίνακα δομών ο οποίος έχει εκχωρηθεί στη μεταβλητή που περιγράφει τον όγκο μπορούν να προσπελαστούν, όπως προσπελάσσεται ένα στοιχείο μιας δομής στη Matlab: π.χ. αν πληκτρολογήσουμε:

```
>> tumour_in_GCs=initialize_tumour(8,5,4)
```

και στη συνέχεια

```
>> tumour_in_GCs(17,17,17).coords
```

λαμβάνουμε [0 0 0] στην οθόνη εντολών του Matlab.

Βιβλιογραφία

- [1] G. Stamatakos, E. Zacharaki, M. Makropoulou, N. Mouravliansky, A. Marsh, K. Nikita, and N. Uzunoglu, Modeling tumour growth and irradiation response in vitro-a combination of high-performance computing and web based technologies including VRML visualization, *IEEE Trans. Inform. Technology Biomedicine*, 5(4), 279-289, 2001.
- [2] D.D. Dionysiou, G.S. Stamatakos, N.K. Uzunoglu, K.S. Nikita, Simulation of solid tumour growth in vivo and tumour response to radiation therapy, in D.I. Fotiadis, C.V. Massalas (Eds), *Scattering Theory and Biomedical Engineering Modelling and Applications*, World Scientific, River Edge, 2002.
- [3] G.S. Stamatakos, D.D. Dionysiou, E.I. Zacharaki, N.A. Mouravliansky, K. Nikita and N. Uzunoglu, In silico radiation oncology: combining novel simulation algorithms with current visualization techniques, *Proceedings of the IEEE*, 90 (11), pp. 1764-1777, 2002.
- [4] H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. Zipursky, P. Matsudaira, J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, New York, NY: Scientific American Books, 1995.
- [5] J. Watson, N. Hopkins, J. Roberts, J. Steitz, A. Weiner, *Molecular Biology of the Gene*, 4th Edition, Menlo Park, CA: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1987.
- [6] G. Steel, Ed., *Basic Clinical Radiobiology*. London, UK: Arnold, 1997.
- [7] C. Perez and L. Brady, *Principles and Practice of Radiation Oncology*, Philadelphia, Lippincott-Raven, 1998.
- [8] Ε. Ζαχαράκη, Ανάπτυξη αλγορίθμων για την ευθυγράμμιση απεικονιστικών δεδομένων και υπολογιστικής προσομοίωσης της εξέλιξης καρκινικών όγκων με στόχο την υποστήριξη κλινικών αποφάσεων ακτινο-ογκολογίας, *Διδακτορική Διατριβή*, Ε.Μ.Π., Απρίλιος 2004
- [9] Δ. Διονυσίου, Υπολογιστική προσομοίωση της ανάπτυξης καρκινικών όγκων in vivo και της απόκρισής τους σε ακτινοθεραπευτικά σχήματα. Βιολογική βελτιστοποίηση της ακτινοθεραπείας μέσω της διεξαγωγής in silico πειραμάτων, *Διδακτορική Διατριβή*, Ε.Μ.Π. Απρίλιος 2004
- [10] D. Dionysiou, G. Stamatakos, N. Uzunoglou, K. Nikita, Antigoni Marioli, A four dimensional simulation model of tumour response to radiotherapy in vivo: parametric validation considering radiosensitivity, genetic profile and fractioning, *Journal of Theoretical Biology* 230, pp. 1-20, 2004.

Άσκηση 5

Προσομοίωση Αμφιβληστροειδούς

1. Εισαγωγή: Οργάνωση και λειτουργία αμφιβληστροειδούς

1.1. Δομή του αμφιβληστροειδούς και η λειτουργία της όρασης

Σε έναν φυσιολογικό αμφιβληστροειδή, τα φωτεινά ερεθίσματα γίνονται αντιληπτά μέσω ειδικών κυττάρων, των φωτοϋποδοχέων. Οι φωτοϋποδοχείς, διαθέτουν φωτοευαίσθητα μόρια και μετατρέπουν τα φωτεινά σήματα σε νευρικά δυναμικά, που μεταβιβάζονται σε άλλα κύτταρα του αμφιβληστροειδή, ξεκινώντας έτσι μια αλληλουχία νευρωνικής μεταβίβασης που καταλήγει στην μεταγωγή ερεθισμάτων στον εγκέφαλο. Έτσι, τα εγκεφαλικά ερεθίσματα δημιουργούν την αίσθηση της όρασης.

Στο Σχ. 1, απεικονίζεται η κυτταρική οργάνωση του αμφιβληστροειδή. Παρατηρούμε ότι στον άνθρωπο υπάρχουν δύο είδη φωτοϋποδοχέων, τα κωνία και τα ραβδία. Τα ραβδία είναι υπεύθυνα για την σκοτοπική όραση, δηλαδή την ασπρόμαυρη όραση σε χαμηλό φωτισμό. Τα κωνία είναι υπεύθυνα για την αντίληψη του χρώματος και για αυτό τον σκοπό υπάρχουν τρία διαφορετικά είδη κωνίων, με ευαισθησία αιχμής σε διαφορετικά μήκη κύματος. Η ιδιότητα αυτή παρουσιάζεται στο Σχ. 2.

Τα υπόλοιπα κύτταρα του Σχ. 1, δηλαδή τα Horizontal Cells (HC), Bipolar Cells (BC), Amacrine Cells (AC), Ganglion Cells (GC), είναι νευρικά κύτταρα. Το δίκτυο των διασυνδέσεων των κυττάρων αυτών, είναι το βιολογικό υπόστρωμα των υπολογισμών που πραγματοποιούνται στον αμφιβληστροειδή.

Τελικά, τα γαγγλιακά κύτταρα μεταφέρουν την οπτική πληροφορία με την μορφή νευρωνικών spikes στο οπτικό νεύρο, προς τον εγκέφαλο. Το οπτικό νεύρο σχηματίζεται από τους νευράξονες των GCs, που συγκλίνουν σε κοινό σημείο και εξέρχονται σαν δέσμη από τον οφθαλμό.

Αξίζει να τονίσουμε, ότι στον αμφιβληστροειδή η πληροφορία κινείται σε αντίθετη κατεύθυνση από το φως. Δηλαδή, η προσπίπτουσα στον αμφιβληστροειδή φωτεινή ακτινοβολία, διαπερνάει όλες τις στιβάδες του αμφιβληστροειδή, προκειμένου να φτάσει στην εσώτατη στοιβάδα που βρίσκονται οι φωτοϋποδοχείς. Αντίθετα, η πληροφορία μεταφέρεται από την εσώτατη στοιβάδα και τους φωτοϋποδοχείς, στην εξώτατη στοιβάδα και τα GCs.

1.2. Δυναμικά νευρικών κυττάρων

Ως απόκριση σε ερεθίσματα, δημιουργούνται δυναμικά στην μεμβράνη των κυττάρων που ταξινομούνται στις δύο επόμενες κατηγορίες:

1. Βαθμωτά δυναμικά (Σχ. 3): Το μέγεθος των βαθμωτών δυναμικών είναι ανάλογο του ερεθίσματος, δηλαδή ισχυρότερα ερεθίσματα προκαλούν μεγαλύτερα δυναμικά. Περιορίζονται τοπικά, επειδή εξασθενούν κατά την διάδοση.

2. Δυναμικά δράσης (Σχ. 4): Ένα δυναμικό δράσης δημιουργείται όταν το ερέθισμα ξεπεράσει ένα κατώφλι, ειδικό για κάθε κύτταρο. Όταν προκαλείται ένα δυναμικό δράσης, η μορφή του είναι πάντα ίδια, ανεξάρτητα από το μέγεθος του ερεθίσματος που το προκάλεσε. Διαδίδονται σε μεγάλες αποστάσεις στο νευρικό σύστημα, χωρίς εξασθένηση.

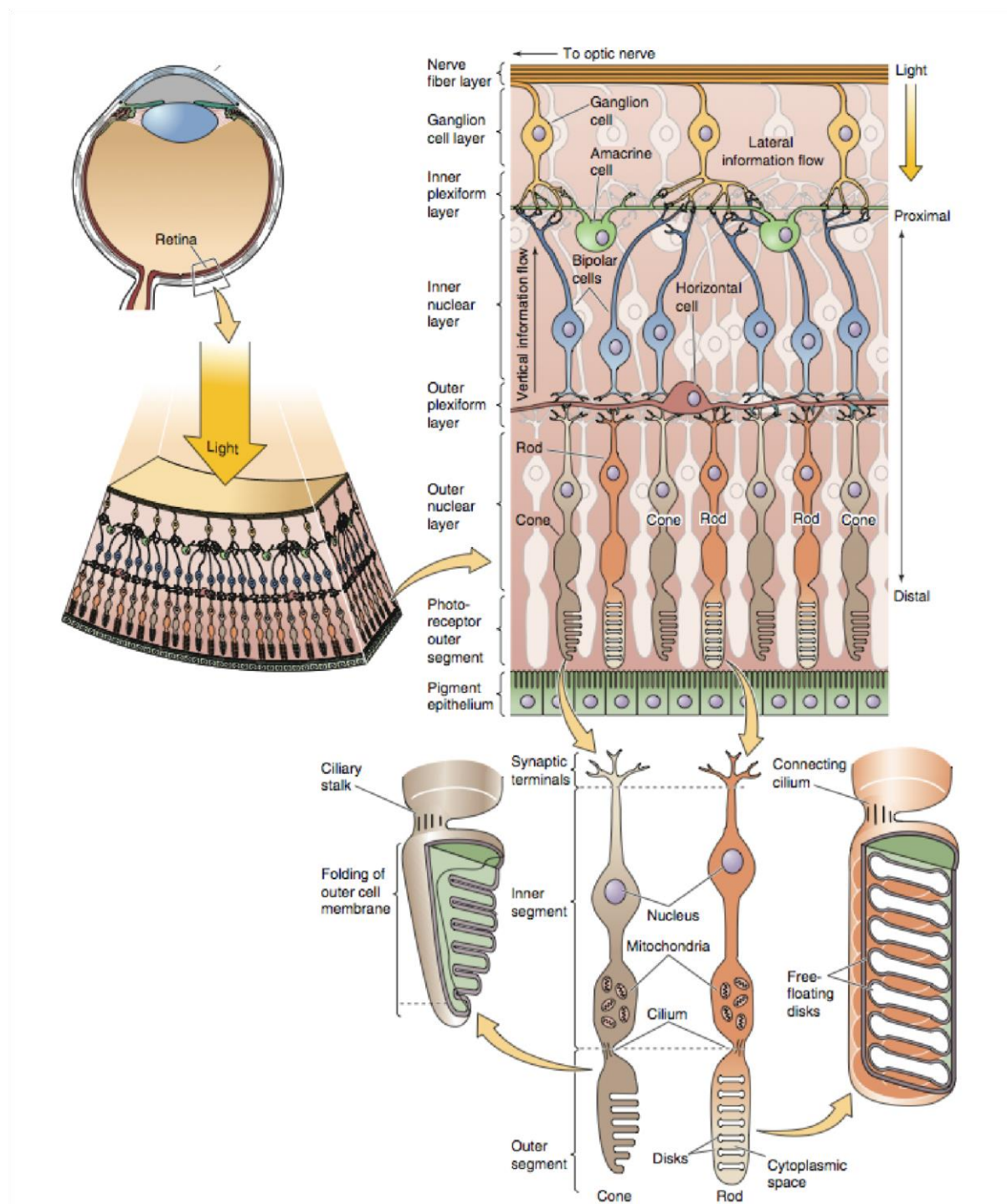
Η απόκριση ενός κυττάρου που παράγει δυναμικά ενέργειας, όπως φαίνεται στο Σχ. 5, μπορεί να παρασταθεί με μια ακολουθία αιχμών (spike train).

Στον αμφιβληστροειδή, δυναμικά δράσης παρατηρούνται στα GC και σε ορισμένους τύπους AC.

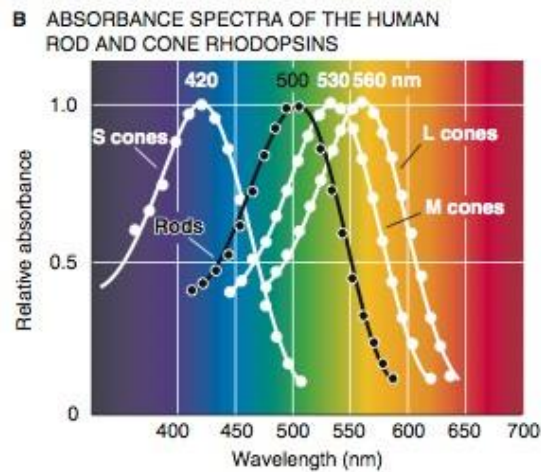
1.3. Σύνοψη κυττάρων αμφιβληστροειδούς και των λειτουργιών τους

Σε αυτή την ενότητα, συνοψίζονται τα είδη κυττάρων του αμφιβληστροειδούς (βλ. Ενότητα 1.1) και σχολιάζονται σύντομα οι λειτουργίες τους.

- Φωτοϋποδοχείς (PR): είναι τα φωτοευαίσθητα κύτταρα, αποκρίνονται δηλαδή σε φωτεινά ερεθίσματα
- Horizontal Cells (HC): Αντιλαμβάνονται την μέση φωτεινότητα σε μια περιοχή και συμβάλλουν ώστε η απόκριση του αμφιβληστροειδούς να μην επηρεάζεται από την μέση φωτεινότητα της σκηνής
- Bipolar Cells (BC): Συγκρίνουν την τοπική φωτεινότητα (σήμα από PR) με την μέση φωτεινότητα της περιοχής (σήμα από HC)
- Amacrine Cells (AC): εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία. Διαμορφώνουν την χρονική απόκριση του αμφιβληστροειδούς και τον συγχρονισμό της απόκρισης απομακρυσμένων GC
- Ganglion Cells (GC): Αποτελούν την έξοδο του αμφιβληστροειδή, που μεταφέρεται προς τον εγκέφαλο



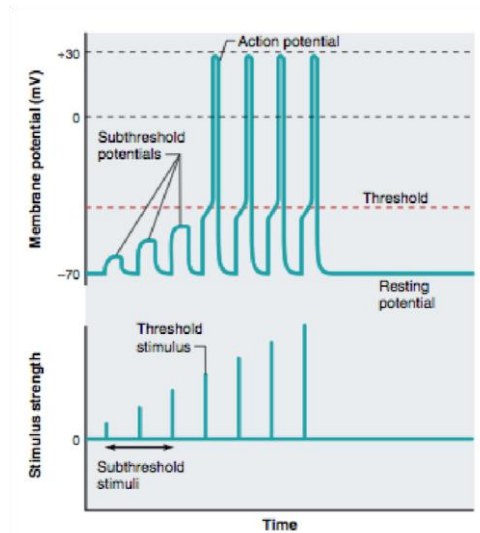
Σχήμα 1: Ο αμφιβληστροειδής-τα νευρωνικά κυκλώματα στον αμφιβληστροειδή των πρωτεύοντων θηλαστικών. Παρατηρούμε ότι το εισερχόμενο φως προσπίπτει στους φωτοϋποδοχείς αφού διέλθει από πολλαπλές, διάφανες στιβάδες νευρικών κυττάρων. Το μελαγχρωματικό επιθήλιο απορροφά το φως που δεν απορροφήθηκε στους φωτοϋποδοχείς και ελαχιστοποιεί αντανάκλασεις του φωτός. Τα γαγγλιακά κύτταρα επικοινωνούν με τον θάλαμο στον εγκέφαλο με νευρικά δυναμικά που μεταφέρονται στους νευράξονές τους. Οι φωτοϋποδοχείς και τα υπόλοιπα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς επικοινωνούν μεταξύ τους με βαθμωτά δυναμικά. Αναπαραγωγή από [2]



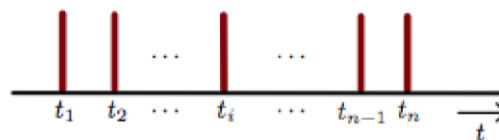
Σχήμα 2: Ευαισθησία των φωτοϋποδοχέων του ανθρώπου σε διαφορετικά μήκη κύματος φωτός. Η φωτοευαισθησία των ραβδίων, που είναι υπεύθυνα για την σκοτοπική όραση, έχει αιχμή στα 500 nm. Τα κωνία είναι υπεύθυνα για την φωτοπική, έγχρωμη, όραση. Οι αιχμές των τριών ειδών κωνίων βρίσκονται στα 420 nm για τα S (μπλε) κωνία, στα 530 nm για τα M (πράσινα) κωνία και στα 560 nm για τα L (κόκκινα) κωνία. Αναπαραγωγή από [2]



Σχήμα 3: Βαθμωτά δυναμικά. Ισχυρότερα ερεθίσματα προκαλούν μεγαλύτερα δυναμικά. Αναπαραγωγή από [1]



Σχήμα 4: Δυναμικά ενέργειας. Εκλύονται μόνο όταν το ερέθισμα υπερβεί ένα κατώφλι. Έχουν πάντα την ίδια μορφή, ανεξάρτητα από το μέγεθος του ερεθίσματος που τα προκάλεσε. Αναπαραγωγή από [1]

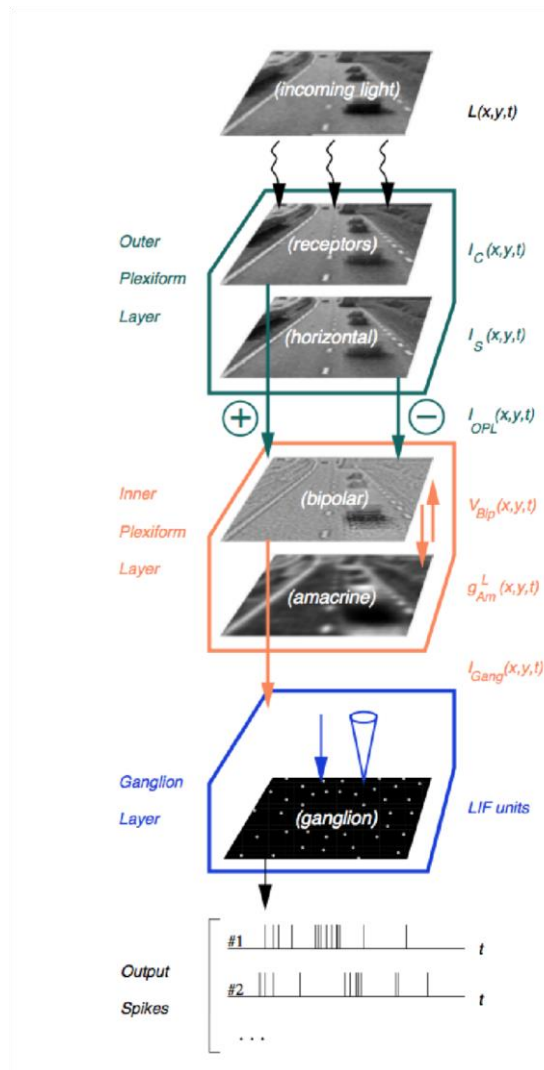


Σχήμα 5: Spike trains: κάθε αιχμή συμβολίζει ένα δυναμικό ενέργειας. Αναπαραγωγή από [3]

2. Προσομοίωση αμφιβληστροειδούς

Σε αυτή την Ενότητα αναλύονται ο προσομοιωτής Virtual Retina [5]. Αρχικά παρουσιάζονται οι αρχές λειτουργίας του (Ενότητα 2.1) και (Ενότητα 2.2) ακολουθεί το πρακτικό μέρος της Άσκησης.

2.1. Θεωρητική παρουσίαση προσομοιωτή *Virtual Retina*



Σχήμα 6: Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου *Virtual Retina*. Στην αριστερή πλευρά, σημειώνονται τα αντίστοιχα βιολογικά στάδια. Κάθε στάδιο, με εξαίρεση το τελευταίο (GC), παράγει ένα χωρικά συνεχές σήμα, με διαστάσεις ίσες με αυτές της εισόδου L . Από [5]

Τα βασικά στάδια του προσομοιωτή παρουσιάζονται στο Σχ. 6. Για την καλύτερη κατανόηση του μοντέλου, εξετάστε το σε αντιπαράβολή με την οργάνωση του αμφιβληστροειδή που δίνεται στο Σχ. 1. Η έξω δικτυωτή στιβάδα (Outer Plexiform layer-OPL), περιέχει τις συναπτικές συνδέσεις μεταξύ των PR και των τοπικών νευρώνων. Αντίστοιχα, η έσω δικτυωτή στιβάδα (Inner Plexiform Layer-IPL), περιέχει τις συναπτικές συνδέσεις μεταξύ των GC και των τοπικών νευρώνων.

Στον αμφιβληστροειδούς, πρέπει να μοντελοποιήσουμε τόσο τις χωρικές (spatial) σχέσεις, δηλαδή την εξάρτηση της απόκρισης ενός GC από την περιοχή που εντοπίζεται, όσο και τις χρονικές (temporal) σχέσεις, δηλαδή την χρονική εξέλιξη της απόκρισης ενός GC και την εξάρτηση της απόκρισης από προηγούμενες χρονικές στιγμές.

Για την μοντελοποίηση των χωρικών σχέσεων, χρησιμοποιούνται φίλτρα Γκαουσιανών συναρτήσεων. Τα Γκαουσιανά φίλτρα προσδιορίζονται πλήρως από την τυπική

απόκλιση τους, σ . Όσο αυξάνεται το σ , αυξάνεται η περιοχή στην οποία εκτείνεται το Γκαουσιανό φίλτρο.

Αντίστοιχα, για την μοντελοποίηση των χρονικών σχέσεων, χρησιμοποιούνται εκθετικά φίλτρα, που προσδιορίζονται πλήρως από την σταθερά χρόνου τ . Τελικά, το χρονικό και χωρικό φιλτράρισμα που περιγράψαμε έχει την μορφή:

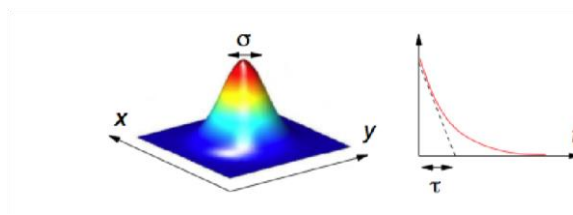
$$G_{\sigma}(x, y) \cdot \frac{\exp(-t/\tau)}{\tau}$$

Η περιγραφή των φίλτρων συμπληρώνεται με το Σχ. 7, στο οποίο δίνεται η γραφική παράσταση των χωρικών και χρονικών φίλτρων.

Ακόμα, για να εκφραστούν σχέσεις χρονικής εξάρτησης, χρησιμοποιούνται στον προσομοιωτή διαφορικές εξισώσεις (ΔΕ) πρώτης τάξης. Οι ΔΕ μπορεί να έχουν σταθερούς συντελεστές, ή μεταβαλλόμενους ως συνάρτηση άλλων παραμέτρων και εισόδων του προσομοιωτή.

Εξετάζοντας πάλι τον προσομοιωτή του Σχ. 6, έχουμε για κάθε στάδιο επεξεργασίας:

- Αρχικά, στο OPL πραγματοποιείται φιλτράρισμα της εικόνας εισόδου. Το στάδιο έχει center-surround οργάνωση, δηλαδή λαμβάνεται η διαφορά δύο Γκαουσιανών, μιας χωρικά ευρείας (surround) και μιας χωρικά περιορισμένης (center)
- Στο IPL, υπάρχουν δύο διακριτές συνιστώσες. Για το σήμα των κυττάρων AC, εφαρμόζεται ξανά φιλτράρισμα με Γκαουσιανά χωρικά και εκθετικά χρονικά φίλτρα. Για το σήμα των κυττάρων BC, χρησιμοποιείται ΔΕ, με συντελεστές που μεταβάλλονται χρονικά, ως συνάρτηση του σήματος AC. Επομένως σε αυτό το στάδιο εφαρμόζεται ανάδραση
- Τέλος, στο στάδιο GC, χρησιμοποιείται ΔΕ με σταθερούς συντελεστές και παράγονται τα τελικά spikes



Σχήμα 7: Γκαουσιανή συνάρτηση με τυπική απόκλιση σ (αριστερά) και εκθετική συνάρτηση με σταθερά τ (δεξιά). Οι συναρτήσεις χρησιμοποιούνται για το χωρικό και χρονικό φιλτράρισμα αντίστοιχα. Από [5]

2.2. Πρακτικό μέρος

Ο προσομοιωτής Virtual Retina μπορεί να χρησιμοποιηθεί από την γραμμή εντολών, για την προσομοίωση της απόκρισης του αμφιβληστροειδούς σε δοσμένη ακολουθία εικόνων. Για την χρήση του, είναι απαραίτητη η περιγραφή των παραμέτρων του αμφιβληστροειδούς, που συγκεντρώνονται σε κατάλληλο αρχείο XML.

2.2.1. Παράμετροι μοντέλου αμφιβληστροειδούς

1. Παρατηρήστε τα γενικά χαρακτηριστικά της προσομοίωσης, που ορίζονται πρώτα στο αρχείο XML. Πώς αντιστοιχίζονται μεγέθη της εικόνας, η οποία

απαρτίζεται από pixels, σε μεγέθη ειδώλων στον αμφιβληστροειδή, που περιγράφονται με την οπτική γωνία (visual angle). Δώστε την σχετική παράμετρο και εξηγήστε σύντομα την έννοια της οπτικής γωνίας

2. Με ποιά σύνταξη ορίζονται τα στάδια (layers) του αμφιβληστροειδή; Ονομάστε τα layers που αναγνωρίζετε, αφού συμβουλευτείτε τις προηγούμενες ενότητες.
3. Πώς μπορείτε να εντοπίσετε παραμέτρους που περιγράφουν χωρικά (Γκαουσιανά) και χρονικά (εκθετικά) φίλτρα; Δώστε τις παραμέτρους που αναγνωρίζετε και αναφέρετε το layer που βρίσκεται κάθε φίλτρο. Για τα χωρικά φίλτρα, δώστε το μέγεθος των Γκαουσιανών σε pixels.
4. Μπορείτε να εντοπίσετε λειτουργίες του μοντέλου αμφιβληστροειδούς που δεν εξηγήθηκαν στην απλοποιημένη, συνοπτική παρουσίαση του προσομοιωτή; Δώστε παραδείγματα.

2.2.2. Δεδομένα προσομοίωσης

Στην συνέχεια, επεξεργαζόμαστε δεδομένα που παράγονται από το μοντέλο του αμφιβληστροειδούς. Στα δεδομένα που δίνονται, εξερευνήστε την δομή (struct) Data και τα πεδία αυτής.

1. Στο συγκεκριμένο μοντέλο, ποιος είναι ο αριθμός των κυττάρων που παράγουν την έξοδο του μοντέλου; Αιτιολογήστε την απάντησή σας.
2. Ποιά μορφή έχει η έξοδος του αμφιβληστροειδή; Τι συμπεραίνουμε για τον τύπο των κυττάρων εξόδου του μοντέλου; Αναφέρετε το πεδίο (field) όπου αποθηκεύεται η έξοδος του μοντέλου.
3. Σε ποιο πεδίο αποθηκεύεται η ακολουθία που διεγείρει τον αμφιβληστροειδή; Ποσά καρέ αποτελούν την ακολουθία εισόδου; Τι απεικονίζεται σε αυτήν; Ζητούνται ο κώδικας για την επισκόπηση της ακολουθίας εισόδου και χαρακτηριστικά στιγμιότυπα της ακολουθίας εικόνων. Σχετικές συναρτήσεις: imshow, implay
4. Κάθε κύτταρο του μοντέλου, διεγείρεται από μια συγκεκριμένη υποπεριοχή της εικόνας (Receptive Field-RF). Εξηγήστε πως μπορούμε να βρούμε το RF κάθε κυττάρου του μοντέλου. Επιλέξτε ένα κύτταρο και παρουσιάστε το RF του. Ζητούνται ο κώδικας για την επισκόπηση της ακολουθίας εισόδου και χαρακτηριστικά στιγμιότυπα της ακολουθίας εικόνων. Σχετικές συναρτήσεις: imshow, implay
5. Πώς μπορούμε να προσδιορίσουμε τις θέσεις των κυττάρων στην εικόνα εισόδου; Τι σχήμα έχει το πλέγμα στο οποίο διατάσσονται τα κύτταρα; Ζητείται ο κώδικας για την παρουσίαση των θέσεων των κυττάρων. Σχετικές συναρτήσεις: imshow, scatter

Βιβλιογραφία

- [1] J Arthur, Dorothy-Sherman Luciano, et al. Human physiology. The mechanisms of body function. Boston, MA: McGraw-Hil Higher Education, 2001, 8th edition, 2001.

- [2] Walter F Boron and Emile L Boulpaep. Medical Physiology, 1e Updated Edition E-Book. Elsevier Health Sciences, 2004.
- [3] Leonel Augusto Sousa et al. Bioelectronic vision: retina models, evaluation metrics, and system design, volume 3. World Scientific, 2009.
- [4] Adrien Wohrer. Virtual retina - tutorial, 2010.
- [5] Adrien Wohrer and Pierre Kornprobst. Virtual retina: a biological retina model and simulator, with contrast gain control. Journal of computational neuroscience, 26(2):219--249, 2009.

Άσκηση 6

Βιοπληροφορική/Υπολογιστική Βιολογία

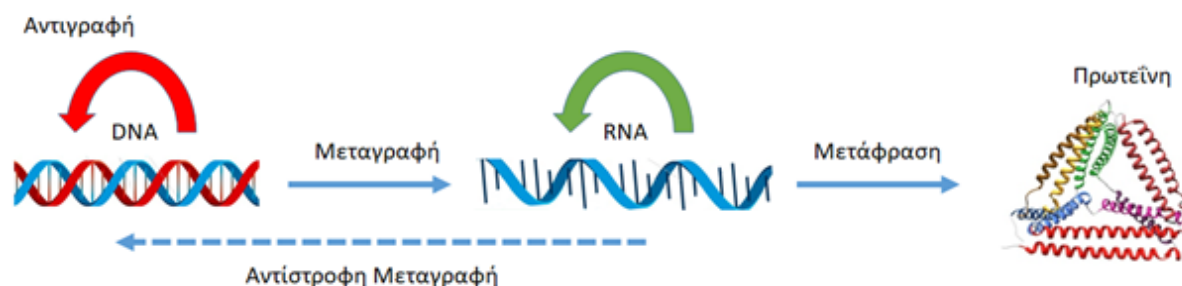
Γονίδια και μεταβολικές ασθένειες – Εύρεση θέσεων αναπαραγωγής του DNA για τη γονιδιακή θεραπεία μεταβολικών ασθενειών - Ανάλυση δεδομένων γονιδιακής έκφρασης από μικροσυστοιχίες DNA και πρακτική εξάσκηση στο πεδίο της Διατροφογενωμικής

1. Σκοπός Άσκησης

Σκοπός της άσκησης είναι να εξοικειώσει τους φοιτητές με έννοιες της Βιοπληροφορικής και της Υπολογιστικής Βιολογίας, καθώς και να τους ενημερώσει για τις βασικές τεχνικές ανάλυσης που χρησιμοποιούνται. Το θεωρητικό μέρος της άσκησης περιλαμβάνει εισαγωγικά στοιχεία, περιγραφή του ρόλου συγκεκριμένων γονιδίων στην εμφάνιση μεταβολικών ασθενειών, θεωρητικά στοιχεία για την εύρεση θέσεων αναπαραγωγής του DNA, περιγραφή τεχνολογιών για τη μέτρηση γονιδιακής έκφρασης (gene expression profiling) με έμφαση στις μικροσυστοιχίες DNA, καθώς και βασικά βήματα της ανάλυσης δεδομένων από πειράματα με μικροσυστοιχίες. Ένας από τους βασικούς στόχους της ανάλυσης είναι η εύρεση γονιδίων που παρουσιάζουν τη λεγόμενη διαφορική έκφραση (differential expression) μεταξύ καταστάσεων του πειράματος. Περιγράφονται τεχνικές κανονικοποίησης των δεδομένων, στατιστικών ελέγχων που εφαρμόζονται στα δεδομένα, καθώς και ανάλυσης των δεδομένων με ομαδοποίηση (clustering). Στο πρακτικό μέρος της άσκησης, οι φοιτητές έχουν τη δυνατότητα να εξασκηθούν σε βασικά βήματα της ανάλυσης βιολογικών δεδομένων. Η ανάλυση πραγματοποιείται με το περιβάλλον προγραμματισμού MATLAB καθώς και με τη γλώσσα R, η οποία είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη στο πεδίο της Επιστήμης Δεδομένων (Data Science), καθώς και με κατάλληλα διαδικτυακά αναλυτικά εργαλεία και βάσεις δεδομένων, που προσφέρονται από οργανισμούς όπως το National Center for Biotechnology Information (NCBI).

2. Προετοιμασία Άσκησης

Για την κατανόηση της άσκησης είναι απαραίτητες βασικές γνώσεις Βιολογίας, σχετικά με την οργάνωση της γενετικής πληροφορίας στο κύτταρο και τη μετάδοσή της. Μπορείτε να ανατρέξετε σε κατάλληλες πηγές στο διαδίκτυο σχετικά με όρους όπως DNA, RNA, πρωτεΐνες, μεταγραφή, μετάφραση, κεντρικό δόγμα της Μοριακής Βιολογίας, γονιδίωμα, μεταγράφομα κ.ά. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1, με βάση το κεντρικό δόγμα της Μοριακής Βιολογίας, η κωδικοποιημένη πληροφορία στα γονίδια μεταφέρεται στις πρωτεΐνες με την ακόλουθη ροή: DNA → RNA → πρωτεΐνες. Η σύνθεση ενός RNA αντιγράφου από το DNA ονομάζεται μεταγραφή, ενώ η σύνθεση πρωτεΐνης με βάση το RNA ονομάζεται μετάφραση.



Εικόνα 1: Το κεντρικό δόγμα της Μοριακής Βιολογίας

3. Γονίδια και μεταβολικές ασθένειες

3.1 Εισαγωγικά

Το DNA περιέχεται στον πυρήνα των κυττάρων, περιέχει γονίδια και αποτελεί το πρότυπο για τη σύνθεση των πρωτεϊνών καθώς και το μέσο μεταφοράς της κληρονομούμενης από γενιά σε γενιά πληροφορίας. Το DNA είναι ένα μακρομόριο, που αποτελείται από νουκλεοτίδια. Κάθε νουκλεοτίδιο αποτελείται από ένα μόριο σακχάρου, τη δεοξυριβόζη, ενωμένη με μία φωσφορική ομάδα και μία αζωτούχο βάση. Στα νουκλεοτίδια του DNA η αζωτούχος βάση μπορεί να είναι μία από τις: αδενίνη (A), γουανίνη (G), κυτοσίνη (C) και θυμίνη (T). Κάθε γονίδιο αποτελεί μία υποακολουθία του DNA και αποτελείται από κωδικοποιούσες περιοχές, τα εξώνια, και μη κωδικοποιούσες περιοχές, τα εσώνια.

Μικρές μεταβολές στο DNA, όπως η μετάλλαξη ενός μόνο νουκλεοτιδίου, ή και μεγάλες μεταβολές, όπως η ταυτόχρονη μετάλλαξη πολλών γονιδίων ή ακόμα και ο μη φυσιολογικός αριθμός των χρωμοσωμάτων, σε συνδυασμό με περιβαλλοντικούς παράγοντες και παράγοντες που αφορούν τον τρόπο ζωής ενός ατόμου μπορούν να αποτελέσουν προδιαθεσικό παράγοντα ή και να προκαλέσουν την εμφάνιση μίας ή περισσότερων ασθενειών.

3.2 Γονίδια του βιολογικού ρολογιού και μεταβολικές ασθένειες

Το εσωτερικό βιολογικό ρολόι καθορίζει κιρκαδιανές μεταβολές στη συμπεριφορά και τη φυσιολογία, και ρυθμίζεται ανάλογα με το φως ή το σκοτάδι στο περιβάλλον, διατροφικές διαταραχές καθώς και άλλα ορμονικά σήματα. Ο όρος κιρκαδιανός προέρχεται από τις λατινικές λέξεις «circa» και «dies», που σημαίνουν «περίπου» και «ημέρα», αντίστοιχα. Οι κιρκαδιανοί ρυθμοί υπάρχουν στους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς, από τους μονοκύτταρους ως τα θηλαστικά, είναι εικοσιτετράωροι και επιτρέπουν στους ζωντανούς οργανισμούς να συγχρονίζονται με τον εξωτερικό κύκλο φωτός-σκοταδιού. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι το φως, το οποίο γίνεται αντιληπτό από ειδικά φωτοευαίσθητα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς που προσεκβάλλουν στον υπερχιασματικό πυρήνα, είναι ο κύριος συντονιστής του κιρκαδιανού ρυθμού στον άνθρωπο [1]. Το κιρκαδιανό σύστημα εκτός από τον κύκλο ύπνου/εγρήγορσης και τους κύκλους λήψης γεύματος/νηστείας ρυθμίζει και φυσιολογικές διαδικασίες όπως είναι ο μεταβολισμός λιπιδίων και γλυκόζης, η θερμοκρασία του σώματος και η έκκριση ορμονών, επιτρέποντας τη βελτιστοποίηση της λήψης, χρήσης και αποθήκευσης της ενέργειας κατά τη διάρκεια της ημέρας.

Πολλές παράμετροι που σχετίζονται με το μεταβολισμό της γλυκόζης, όπως η ανοχή στη γλυκόζη, η ευαισθησία της ινσουλίνης, καθώς και τα επίπεδα γλυκόζης, γλυκαγόνης και ινσουλίνης στο πλάσμα παρουσιάζουν κιρκαδιανές μεταβολές. Στον άνθρωπο, το μέγιστο της έκκρισης της ινσουλίνης παρατηρείται κατά τη διάρκεια της ημέρας, ενώ κατά τη διάρκεια της νύχτας παρατηρείται μείωση της έκκρισης της ινσουλίνης και αύξηση της παραγωγής της γλυκόζης. Στα τρωκτικά, αυτό το μοτίβο

έκκρισης της ινσουλίνης μετατοπίζεται χρονικά κατά 12 ώρες σύμφωνα με τη νυχτερινή τους δραστηριότητα.

Ο κίρκαδιανός ρυθμός μπορεί να απορρυθμιστεί εξαιτίας της μη φυσιολογικής λειτουργίας του βιολογικού ρολογιού ή εξαιτίας του αποσυγχρονισμού ανάμεσα στον υπερχιασματικό πυρήνα και το εξωτερικό περιβάλλον ή εξαιτίας του αποσυγχρονισμού ανάμεσα στον υπερχιασματικό πυρήνα και τα περιφερικά ρολόγια. Η αποδιοργάνωση του κίρκαδιανού ρυθμού μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση ασθενειών όπως το Μεταβολικό Σύνδρομο, η Παχυσαρκία και ο Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2. Ο σημερινός τρόπος ζωής και συνήθειες, όπως η εργασία και η λήψη γεύματος κατά τη διάρκεια της νύχτας, η έκθεση σε τεχνητό φως κατά τη διάρκεια της νύχτας, και τροποποιημένα ωράρια ύπνου αποτελούν τους σημαντικότερους παράγοντες απορύθμισης του κίρκαδιανού ρυθμού. Στους εργαζόμενους σε βάρδιες, οι οποίοι αποτελούν και το κατεξοχήν παράδειγμα απορύθμισης του κίρκαδιανού ρυθμού, παρατηρούνται μεταβολές στην απόκριση των β-κυττάρων του παγκρέατος και στο μεταβολισμό των λιπιδίων και της γλυκόζης, καθώς και αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης Μεταβολικού Συνδρόμου, Καρδιαγγειακών Παθήσεων, Καρκίνου, Παχυσαρκίας και Σακχαρώδους Διαβήτη Τύπου 2. Άτομα με τροποποιημένα ή μειωμένα ωράρια ύπνου εμφανίζουν αυξημένο Δείκτη Μάζας Σώματος, μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη και αυξημένη αντίσταση στην ινσουλίνη. Σε παχύσαρκα άτομα ή άτομα με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 1 ή Τύπου 2 εμφανίζονται διαταραχές στο κίρκαδιανό ρυθμό, στην έκκριση της ινσουλίνης καθώς και στην ανοχή στη γλυκόζη. Ορισμένες από αυτές τις διαταραχές έχουν παρατηρηθεί σε άτομα με Σακχαρώδη Διαβήτη που έχουν στερηθεί τον ύπνο τους.

Πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί σε πειραματόζωα με τροποποιημένα τα γονίδια του βιολογικού ρολογιού έχουν αποκαλύψει ότι ο κίρκαδιανός ρυθμός παίζει κεντρικό ρυθμιστικό ρόλο στο μεταβολισμό και την ομοιόσταση της γλυκόζης, και πιο συγκεκριμένα ότι η μη φυσιολογική λειτουργία των γονιδίων του βιολογικού ρολογιού μπορεί να οδηγήσει σε προδιαβήτη ή διαβήτη. Μελέτες της αλληλεπίδρασης των γονιδίων του βιολογικού ρολογιού με το μεταβολισμό της γλυκόζης στον άνθρωπο έδειξαν ότι γενετικές παραλλαγές του γονιδίου CLOCK συσχετίζονται με αυξημένη ευαισθησία (susceptibility) στην Παχυσαρκία και το Μεταβολικό Σύνδρομο. Γενετικές παραλλαγές (Genetic variants) του γονιδίου BMAL1 συσχετίζονται με την Υπέρταση, το Διαβήτη Κύησης και τον ΣΔΤ2, ενώ μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί του γονιδίου PER2 έχουν συσχετιστεί με υψηλά επίπεδα γλυκόζης νηστείας και κοιλιακής παχυσαρκίας. Γενετικές παραλλαγές (Genetic variants) του γονιδίου CRY2 συσχετίζονται με το ΣΔΤ2. Ένας γενετικός πολυμορφισμός του υποδοχέα της μελατονίνης, μίας ουσίας η οποία παίζει καθοριστικό ρόλο στον καθορισμό των κίρκαδιανών ρυθμών, επίσης συσχετίζεται με μειωμένη έκκριση ινσουλίνης, διαβήτη κύησης και ΣΔΤ2. Συνοψίζοντας, υπάρχουν πολλές μελέτες οι οποίες υποδεικνύουν την ύπαρξη στενού δεσμού μεταξύ της δυσλειτουργίας των γονιδίων του βιολογικού ρολογιού και μεταβολικών ασθενειών, όπως το Μεταβολικό Σύνδρομο, η Παχυσαρκία και ο ΣΔΤ2 [2].

3.3 Φυλετικά γονίδια και Σακχαρώδης Διαβήτης

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης (ΣΔ) αποτελεί σημαντικό πρόβλημα υγείας παγκοσμίως, με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας να προειδοποιεί ότι περισσότεροι από 400 εκατομμύρια άνθρωποι θα νοσούν από ΣΔ το 2030. Ο ΣΔ Τύπου 2 (ΣΔΤ2), που αποτελεί την επικρατέστερη μορφή του ΣΔ, χαρακτηρίζεται από υψηλές τιμές συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα, οι οποίες οφείλονται είτε στην ελλιπή έκκριση της ορμόνης ινσουλίνης από το πάγκρεας είτε στην ινσουλινοαντίσταση των ιστών. Ο

ΣΔΤ2 είναι αποτέλεσμα της πολύπλοκης αλληλεπίδρασης παραγόντων που αφορούν τον τρόπο ζωής του ατόμου και του γονιδιώματος που έχει κληρονομήσει.

Διαβητογενείς περιβαλλοντικοί παράγοντες επιδρούν διαφορετικά σε άτομα με διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο. Έτσι, για τη μεγαλύτερη επιτυχία της πρόληψης και της θεραπείας του ΣΔΤ2 είναι απαραίτητη η κατανόηση των μηχανισμών αλληλεπίδρασης γονιδίου με γονίδιο και γονιδίου με το περιβάλλον.

Η μελέτη της εμφάνισης και εξέλιξης του ΣΔΤ2 στους Ινδιάνους της φυλής Πίμα στην Αριζόνα των ΗΠΑ έχει συμβάλει σημαντικά στην κατανόησή μας για το διαβήτη. Οι Ινδιάνοι της φυλής Πίμα, όπως πολλοί άλλοι γηγενείς πληθυσμοί, εκτοπίστηκαν από τα εδάφη τους με το Νόμο του 1902 (Reclamation Act). Η μεταβολή από τον αγροτικό τρόπο ζωής στον φτωχότερο οικονομικά και διατροφικά αστικό τρόπο ζωής οδήγησε στην έξαρση της εμφάνισης της παχυσαρκίας και του ΣΔΤ2 στον πληθυσμό αυτό. Τα πολύ ψηλά ποσοστά εμφάνισης του ΣΔΤ2 (>50%) και η πολύ πρόωμη έναρξή του, ακόμα και στην εφηβεία, στους Ινδιάνους της φυλής Πίμα σε αντίθεση με τους άλλους πληθυσμούς στην περιοχή με Ευρωπαϊκή καταγωγή και με παρόμοιο τρόπο ζωής, υποδεικνύουν την καταλυτική επίδραση των γονιδίων στην εμφάνιση του ΣΔΤ2 [3].

3.4 Πρακτικό μέρος

Ζητούμενο 3.1.: Βρείτε πληροφορίες για τα γονίδια INS και CLOCK χρησιμοποιώντας κατάλληλες διαδικτυακές πηγές (<http://www.genenames.org/> και <http://omim.org/>) και επιβεβαιώστε ότι ο Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2 συνδέεται με το γονίδιο INS.

Ζητούμενο 3.2.: Βρείτε σε ποιο χρωμόσωμα και σε ποια γονιδιωματική περιοχή βρίσκεται το γονίδιο CLOCK χρησιμοποιώντας κατάλληλες διαδικτυακές πηγές (<http://genome.ucsc.edu/>).

Ζητούμενο 3.3.: Ανακτήστε την αλληλουχία του DNA του γονιδίου INS και της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί, καθώς επίσης και των ορθόλογων γονιδίων στον χιμπαντζή και τον ποντικό.

Στην αναφορά σας θα πρέπει να απαντήσετε σε όλα τα παραπάνω Ζητούμενα 3.1. έως 3.3., καθώς και να συμπεριλάβετε τα απαραίτητα γραφήματα (screenshots) που αιτιολογούν τις απαντήσεις σας.

4. Εύρεση θέσεων αναπαραγωγής του DNA για τη γονιδιακή θεραπεία μεταβολικών ασθενειών

4.1 Εισαγωγικά

Η αναπαραγωγή του γονιδιώματος αποτελεί μία από τις πιο σημαντικές λειτουργίες του κυττάρου. Πριν τη διαίρεση του κυττάρου, επιτελείται η αναπαραγωγή του γονιδιώματος, ώστε κάθε ένα από τα θυγατρικά κύτταρα να κληρονομήσει το δικό του αντίτυπο του γονιδιώματος. Οι Watson και Crick στη μελέτη τους το 1953 περιέγραψαν τη διαδικασία της αναπαραγωγής του γονιδιώματος ως εξής: Οι δύο έλικες του αρχικού μορίου DNA ξετυλίγονται και η κάθε αλυσίδα αποτελεί πρότυπο για τη σύνθεση του νέου μορίου για κάθε ένα από τα θυγατρικά κύτταρα.

Η αναπαραγωγή του DNA ξεκινάει σε συγκεκριμένες γονιδιωματικές περιοχές που ονομάζονται περιοχές αναπαραγωγής (replication origin – ori) και πραγματοποιούνται από μοριακές μηχανές αντιγράφου (molecular copy machines) που ονομάζονται DNA πολυμεράσες.

4.2 Εύρεση θέσεων αναπαραγωγής του DNA

Η εύρεση των περιοχών αναπαραγωγής είναι ιδιαίτερης σημασίας όχι μόνο για την κατανόηση της λειτουργίας της αναπαραγωγής των κυττάρων αλλά και για την επίλυση σημαντικών βιοϊατρικών προβλημάτων με μεθόδους γονιδιοματικής θεραπείας. Οι μέθοδοι γονιδιοματικής θεραπείας χρησιμοποιούν γενετικά τροποποιημένα μινι-γονιδιώματα, που ονομάζονται διανύσματα ιών (viral vectors) και μπορούν να διαπεράσουν τις κυτταρικές μεμβράνες, όπως οι πραγματικοί ιοί. Το 1990, η γονιδιοματική θεραπεία εφαρμόστηκε πρώτη φορά σε άνθρωπο για να αντιμετωπιστεί η Βαριά Συνδυασμένη Ανοσοανεπάρκεια σε ένα τετράχρονο κοριτσάκι.

Η κεντρική ιδέα της γονιδιοματικής θεραπείας είναι η μόλυνση ενός ατόμου με έλλειψη σε ένα κρίσιμο γονίδιο με ένα διάνυσμα ιών που περιέχει ένα τεχνητό γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί τη θεραπευτική πρωτεΐνη για την υπό μελέτη ασθένεια. Για να βεβαιωθούν οι βιολόγοι ότι το διάνυσμα των ιών αναπαράγεται σωστά μέσα στο κύτταρο, πρέπει να γνωρίζουν τις ακριβείς περιοχές αναπαραγωγής του DNA.

4.3 Πρακτικό μέρος

Στη συνέχεια της άσκησης θα επικεντρωθούμε στο πρόβλημα της εύρεσης περιοχών αναπαραγωγής στο γονιδίωμα βακτηρίων. Θα πρέπει να υπάρχει κάποιο «κρυφό μήνυμα» στην περιοχή αναπαραγωγής που να καθορίζει ότι εκεί πρέπει να ξεκινήσει η διαδικασία της αναπαραγωγής. Πράγματι γνωρίζουμε ότι η έναρξη της αναπαραγωγής υλοποιείται με τη βοήθεια της DnaA, μίας πρωτεΐνης που συνδέεται σε ένα σύντομο τμήμα μέσα στην περιοχή αναπαραγωγής που ονομάζεται DnaA box.

Βασιζόμενοι στην υπόθεση ότι το DNA είναι μία γλώσσα, θα ψάξουμε για συχνές «λέξεις» μέσα στην περιοχή αναπαραγωγής του γονιδιώματος του βακτηρίου. Θεωρούμε ότι αυτές οι συχνές «λέξεις» μπορεί να αποτελούν τις θέσεις που συνδέεται η πρωτεΐνη DnaA. Για παράδειγμα η «λέξη» ACTAT εμφανίζεται πολύ συχνά στην ακόλουθη συμβολοακολουθία:

```
ACAACTATGCATACTATCGGGAACTATCCT
```

Ζητούμενο 4.1.: Υλοποιήστε συνάρτηση στο περιβάλλον προγραμματισμού MATLAB που να βρίσκει πόσες φορές εμφανίζεται μία δοσμένη «λέξη» σε ένα τμήμα γονιδιώματος και δοκιμάστε στη συνέχεια με τη βοήθεια αυτής της συνάρτησης να υπολογίσετε πόσες φορές εμφανίζεται η «λέξη» ATC στο ακόλουθο τμήμα γονιδιώματος.

```
atcaatgatcaacgtaagcttctaagcatgatcaagggtgctcacacagtttatccacaac  
ctgagtgatgacatcaagataggtcggttgatatctccttcctcctcgactctcatgacca  
cggaagatgatcaagagaggatgatttcttggccatatcgcaatgaatacttgtgactt  
gtgcttccaattgacatcttcagcgccatattgcgctggccaagggtgacggagcgggatt  
acgaaagcatgatcatggctggttgttctgtttatcttgttttgactgagacttgttagga  
tagacggttttttcatcactgactagccaaagccttactctgcctgacatcgaccgtaa  
tgataatgaatttacatgcttccgcgacgatttacctcttgatcatcgatccgattgaag  
atcttcaattgttaattctcttgcctcgactcatagccatgatgagctcttgatcatggtt  
tccttaaccctctattttttacggaagaatgatcaagctgctgctcttgatcatcggtt
```

Ζητούμενο 4.2.: Υλοποιήστε συνάρτηση στο περιβάλλον προγραμματισμού MATLAB που να υπολογίζει ποιες είναι οι συχνότερα εμφανιζόμενες «λέξεις» μήκους k χαρακτήρων σε ένα τμήμα γονιδιώματος και έπειτα δοκιμάστε να βρείτε τις

συχνότερα εμφανιζόμενες «λέξεις» μήκους 9 χαρακτήρων στο παραπάνω τμήμα του γονιδιώματος του βακτηρίου.

Στην αναφορά σας θα πρέπει να συμπεριλάβετε τις απαντήσεις σας στα παραπάνω Ζητούμενα 4.1. και 4.2., καθώς και τον κώδικα σε MATLAB που υλοποιήσατε.

5. Ανάλυση δεδομένων γονιδιακής έκφρασης από μικροσυστοιχίες DNA και πρακτική εξάσκηση στο πεδίο της Διατροφογενωμικής

5.1 Εισαγωγικά

Η μελέτη του γονιδιώματος και του τρόπου κωδικοποίησης και οργάνωσής του αποτελούν αντικείμενο της Γονιδιωματικής (Genomics). Στο πεδίο των λεγόμενων “omics” περιλαμβάνεται επίσης η Μεταγραφωμική (Transcriptomics), που μελετά τα μόρια τα οποία προκύπτουν από τη μεταγραφή του γονιδιώματος, όπως το mRNA. Η μελέτη των πρωτεϊνών, ως λειτουργικών μορίων που παράγονται με βάση το RNA, αποτελεί αντικείμενο του πεδίου της Πρωτεωμικής (Proteomics).

Τα γονίδια που περιλαμβάνονται στο γονιδίωμα ενός οργανισμού δεν είναι διαρκώς ενεργοποιημένα. Κάθε κύτταρο του οργανισμού, σε κάθε στιγμή και υπό συγκεκριμένες συνθήκες, παράγει διαφορετικούς συνδυασμούς και ποσότητες πρωτεϊνών, μέσω της έκφρασης (μεταγραφής) των σχετικών γονιδίων. Είναι πρακτικό και ταυτόχρονα αξιόπιστο να γίνεται ποσοτική μέτρηση του επιπέδου του mRNA που εκφράζεται στα κύτταρα, αντί των πρωτεϊνών. Για τη μελέτη του μεταγραφώματος (transcriptome), χρησιμοποιούνται πειράματα μεγάλης κλίμακας, στα οποία μελετάται η έκφραση των γονιδίων, πιθανές μεταβολές σε αυτήν (ενεργοποίηση/καταστολή γονιδίων) και η βιολογική σημασία των μεταβολών αυτών.

5.2 Τεχνολογίες για την καταγραφή της γονιδιακής έκφρασης

Οι κύριες τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση του εκφραζόμενου mRNA σε μεγάλη κλίμακα (genome-wide survey of the transcriptome) είναι κυρίως οι μικροσυστοιχίες DNA και η αλληλούχιση RNA (RNA sequencing). Κάθε μια από αυτές παρουσιάζει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Η αλληλούχιση RNA φαίνεται πως έχει πλέον επικρατήσει των μικροσυστοιχιών DNA, ωστόσο οι μικροσυστοιχίες DNA είναι μία ώριμη τεχνολογία για την οποία υπάρχει μεγάλη εμπειρία και γνώση ως προς την ανάλυση δεδομένων. Επιπλέον, υπάρχει πληθώρα διαθέσιμων δεδομένων προς ανάλυση σε δημόσια αποθετήρια. Η αλληλούχιση RNA είναι ακόμη μια ακριβή τεχνολογία και η ανάλυση των δεδομένων που προκύπτουν είναι απαιτητική. Από την άλλη, η αλληλούχιση RNA παρέχει μεγάλη ευελιξία ως προς τον εντοπισμό ακολουθιών. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρά τον διαφορετικό τύπο δεδομένων που παράγουν οι δυο τεχνολογίες, η προσέγγιση της ανάλυσης για την εξαγωγή βιολογικών συμπερασμάτων εμφανίζει κοινά χαρακτηριστικά.

5.3 Σύνοψη εισαγωγή στην τεχνολογία των μικροσυστοιχιών

Η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών DNA χρησιμοποιείται για την παράλληλη μέτρηση ενός μεγάλου αριθμού μεταγράφων (transcripts) RNA σε ένα κυτταρικό δείγμα. Στη συνέχεια θα εξηγηθεί αδρά πώς γίνεται η ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων. Η παρουσίαση περισσότερων τεχνικών λεπτομερειών ξεφεύγει από τους σκοπούς της άσκησης. Η λειτουργία των μικροσυστοιχιών βασίζεται στην ιδιότητα του DNA να υβριδοποιείται, δηλαδή μονόκλωνα νουκλεϊκά οξέα μπορούν να αλληλεπιδράσουν με

συμπληρωματικές σε αυτά ακολουθίες, προς δημιουργία δίκλωνου συμπλόκου. Οι μικροσυστοιχίες είναι ουσιαστικά μικρο-πλακίδια στα οποία έχουν τοποθετηθεί, σε διάταξη πλέγματος, ορισμένα μόρια νουκλεϊκών οξέων. Το κάθε πλακίδιο σχεδιάζεται έτσι ώστε να περιλαμβάνει ακολουθίες από χαρακτηριστικά γονίδια του μελετώμενου οργανισμού. Αυτά τα ακινητοποιημένα πάνω στο πλακίδιο τμήματα DNA ονομάζονται ανιχνευτές (probes). Για τη μέτρηση του εκφραζόμενου mRNA ακολουθούνται τα εξής: πρώτα απομονώνεται το mRNA από το κυτταρικό δείγμα και έπειτα δημιουργείται, μέσω αντίστροφης μεταγραφής, το συμπληρωματικό DNA (cDNA), το οποίο σημαίνεται με κατάλληλη φθορίζουσα χρωστική ουσία. Στη συνέχεια, διάλυμα με το cDNA περνάει πάνω από το πλακίδιο και υβριδοποιείται με τους αντίστοιχους συμπληρωματικούς ανιχνευτές πάνω στη μικροσυστοιχία. Όταν έχει γίνει η υβριδοποίηση, ενεργοποιείται ο φθορισμός και μέσω της μέτρησης του επιπέδου φθορισμού μπορούμε να ποσοτικοποιήσουμε το εκφραζόμενο mRNA [4].

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων σε πείραμα γονιδιακής έκφρασης με μικροσυστοιχίες έχουν τη μορφή δισδιάστατου πίνακα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2. Οι γραμμές του πίνακα αντιστοιχούν στους διαφορετικούς ανιχνευτές της μικροσυστοιχίας, ενώ οι στήλες του πίνακα αντιστοιχούν στα διαφορετικά δείγματα που έχουν καταμετρηθεί με τον ίδιο τύπο μικροσυστοιχίας στο πείραμα. Κάθε κελί του πίνακα περιλαμβάνει τη μέτρηση που έχει καταγραφεί για τον αντίστοιχο ανιχνευτή (γονίδιο) και για το αντίστοιχο δείγμα του πειράματος.

ID_REF	GSM16295 4	GSM16295 6	GSM16295 7	GSM16295 8	GSM16295 9
1007_s_at	218,27	255,46	137,36	254,60	121,07
1053_at	92,81	121,42	51,46	119,53	85,78
117_at	53,72	64,33	49,31	59,87	42,92
121_at	225,12	208,08	279,43	208,61	246,80
1255_g_at	11,71	11,62	12,69	12,15	13,14
1294_at	243,61	277,53	170,93	312,98	316,07
1316_at	52,19	52,38	54,02	49,59	51,79
1320_at	50,09	51,02	43,81	44,33	51,06
1405_i_at	112,19	87,33	114,67	405,02	136,76
1431_at	12325,61	11801,22	6845,59	10051,77	11614,58
1438_at	55,71	48,14	69,34	47,41	50,05
1487_at	337,21	441,02	222,22	382,95	328,81
1494_f_at	8941,16	7506,00	3975,62	6156,13	8837,92
1552256_a_a t	954,65	1291,16	717,29	1354,82	1614,45
1552257_a_a t	133,61	243,35	127,39	148,38	187,68

Εικόνα 2: Μέρος μετρήσεων πειράματος γονιδιακής έκφρασης με μικροσυστοιχίες DNA (μετά από σχετική προ-επεξεργασία των δεδομένων)

5.4 Ανάλυση ενός πειράματος γονιδιακής έκφρασης με μικροσυστοιχίες DNA

Σε αδρές γραμμές, τα στάδια που ακολουθούνται σε ένα πείραμα με μικροσυστοιχίες DNA περιλαμβάνουν: α) τον ορισμό του βιολογικού ερωτήματος που εξετάζεται, β) τον

σχεδιασμό κατάλληλου πειράματος ώστε να διερευνηθεί το βιολογικό ερώτημα και τον προσδιορισμό του τύπου μικροσυστοιχίας που θα χρειαστεί για τις μετρήσεις, γ) την κατάλληλη επεξεργασία των δειγμάτων και την υβριδοποίηση, δ) την ανάγνωση των μετρήσεων από τη μικροσυστοιχία, ώστε να εξαχθεί το επίπεδο έκφρασης με βάση τις τιμές φθορισμού, και τέλος, ε) την επεξεργασία και ανάλυση δεδομένων με κατάλληλες μεθόδους για την εξαγωγή συμπερασμάτων. Στο πλαίσιο αυτής της εργαστηριακής άσκησης το ενδιαφέρον εστιάζεται στο στάδιο της ανάλυσης των δεδομένων.

Για τον σκοπό αυτό, οι ποσοτικοποιημένες μετρήσεις που έχουν προκύψει από τη μικροσυστοιχία πρέπει να υποστούν κατάλληλη προ-επεξεργασία, που περιλαμβάνει «καθαρισμό δεδομένων», έλεγχο ποιότητας και κανονικοποίηση. Στη συνέχεια, μπορούν να εφαρμοστούν βασικές τεχνικές ανάλυσης δεδομένων μικροσυστοιχιών, όπως ο προσδιορισμός γονιδίων που εμφανίζουν διαφορετική έκφραση και ο εντοπισμός ομάδων γονιδίων με κοινά πρότυπα έκφρασης.

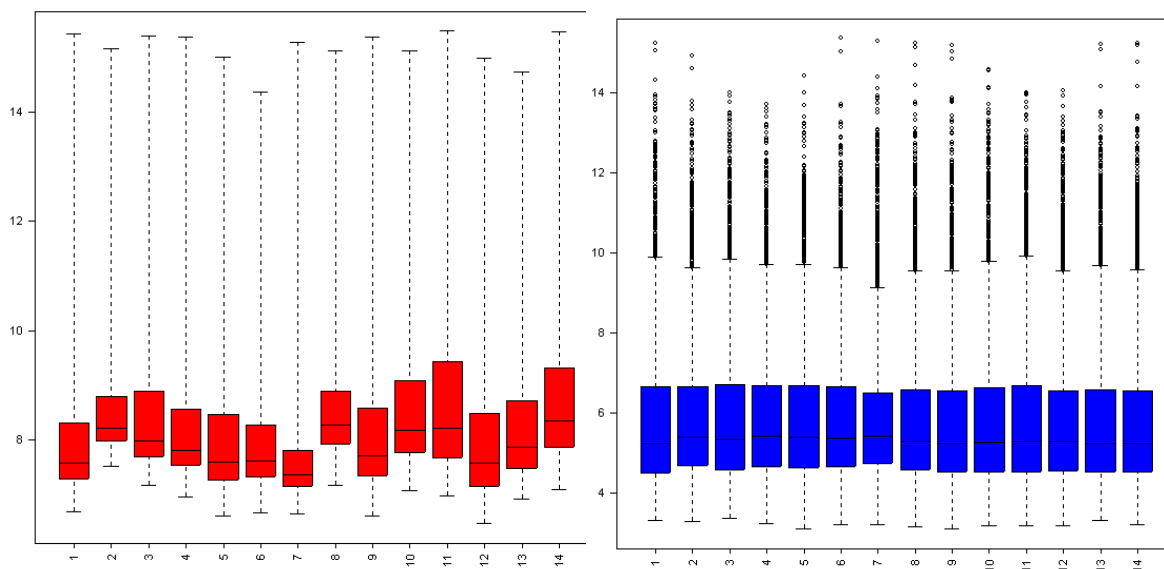
Κανονικοποίηση δεδομένων

Η κανονικοποίηση των δεδομένων μικροσυστοιχιών είναι πολύ σημαντική. Με την κανονικοποίηση μπορούμε να μετατρέψουμε τα δεδομένα από όλα τα δείγματα ενός πειράματος σε κοινή κλίμακα, ώστε να είναι δυνατή η σύγκρισή τους. Με αυτόν τον τρόπο αφαιρούνται συστηματικά σφάλματα που μπορεί να έχουν προκύψει από τεχνικούς λόγους και μη. Οι αρχικές μετρήσεις από ένα πείραμα με μικροσυστοιχία (μετρήσεις φθορισμού) μετασχηματίζονται με την εφαρμογή λογαρίθμου (συνήθως λογαρίθμου με βάση το 2). Οι αρχικές τιμές έντασης φθορισμού παρουσιάζουν μεγάλη διασπορά, ενώ με την κανονικοποίηση οι τιμές κατανέμονται ομοιόμορφα και έτσι μπορούν να συγκριθούν τα διάφορα δείγματα του πειράματος μεταξύ τους. Σε περίπτωση που θέλουμε να συγκρίνουμε δεδομένα από διαφορετικά πειράματα, τότε πρέπει να χρησιμοποιηθούν πιο «εξελιγμένες» μορφές κανονικοποίησης [4].

Θηκογράμματα (Boxplots)

Τα θηκογράμματα χρησιμοποιούνται στη στατιστική για να παρουσιάσουν με γραφικό τρόπο τα περιληπτικά μέτρα μια κατανομής και βοηθούν στη σύγκριση κατανομών μεταξύ τους. Στα πειράματα γονιδιακής έκφρασης χρησιμοποιούμε τα θηκογράμματα για να διαπιστώσουμε αν τα δεδομένα χρειάζονται κανονικοποίηση ή αν έχουν κανονικοποιηθεί με επιτυχία. Για κάθε δείγμα του πειράματος σχεδιάζεται το θηκόγραμμα της κατανομής των δεδομένων που έχουν μετρηθεί για όλα τα γονίδια στο δείγμα. Αυτό που αναμένεται είναι ότι για κανονικοποιημένα δεδομένα τα θηκογράμματα θα είναι συγκρίσιμα για όλα τα δείγματα. Μεγάλη απόκλιση στα θηκογράμματα αποτελεί ένδειξη ότι τα δεδομένα δεν είναι ισορροπημένα.

Στην Εικόνα 3 φαίνονται τα θηκογράμματα που έχουν προκύψει από ένα πείραμα γονιδιακής έκφρασης πριν και μετά την κανονικοποίηση των δεδομένων. Σε κάθε θηκόγραμμα σημειώνεται ένα ορθογώνιο, η κάτω πλευρά του οποίου δείχνει το πρώτο τεταρτημόριο και η άνω πλευρά δείχνει το τρίτο τεταρτημόριο της κατανομής. Η οριζόντια γραμμή εντός του ορθογωνίου δείχνει τη διάμεσο. Επιπλέον, είναι σημειωμένες η ελάχιστη και η μέγιστη τιμή της κατανομής (που υπολογίζονται αφού εξαιρεθούν οι ακραίες τιμές – outliers). Εφόσον το επιλέξουμε, τα θηκογράμματα μπορούν να εμφανίζουν και τις ακραίες τιμές. Αν οι τιμές της διαμέσου των κατανομών σε όλα τα δείγματα είναι στο ίδιο επίπεδο, αυτό είναι ένδειξη ότι τα δεδομένα είναι κανονικοποιημένα και κατά συνέπεια τα δείγματα μπορούν να συγκριθούν μεταξύ τους.



Εικόνα 3: Θηκογράμματα για κάθε δείγμα του πειράματος πριν την κανονικοποίηση (αριστερή εικόνα) και μετά την κανονικοποίηση (δεξιά εικόνα) των μετρήσεων [5]

Προσδιορισμός γονιδίων με διαφορετική έκφραση και έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας

Στη συνέχεια εξετάζεται πώς ορίζονται τα γονίδια που εμφανίζουν διαφορετική έκφραση μεταξύ καταστάσεων ενός πειράματος και πώς χρησιμοποιείται η στατιστική ανάλυση για να ελεγχθεί αν μια τέτοια διαφορετική έκφραση είναι στατιστικά σημαντική. Ως διαφορετικές καταστάσεις σε ένα πείραμα μπορούν να οριστούν, για παράδειγμα: δείγματα φυσιολογικών κυττάρων έναντι παθολογικών, κυτταρικά δείγματα πριν και μετά την επίδραση κάποιου παράγοντα (π.χ. σε μελέτες Διατροφογενωμικής, αυτός ο παράγοντας μπορεί να είναι κάποιο διατροφικό στοιχείο), διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου του ίδιου δείγματος κυττάρων κ.ά. Ο προσδιορισμός των διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων είναι ιδιαίτερα χρήσιμος. Για παράδειγμα, σε πειράματα στα οποία οι μελετώμενες καταστάσεις είναι «φυσιολογικός ιστός» και «καρκινικός ιστός», η εύρεση στατιστικά σημαντικής διαφορετικής έκφρασης μεταξύ των καταστάσεων μπορεί να υποδείξει γονίδια ως χαρακτηριστικά (features), που είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν διαγνωστικά με χρήση τεχνικών ταξινόμησης. Να σημειωθεί ότι ο στατιστικός έλεγχος υποθέσεων αποτελεί κατάλληλη προσέγγιση ανάλυσης για να αντιμετωπιστούν ιδιαιτερότητες των δεδομένων μικροσυστοιχιών, όπως ο τυχαίος θόρυβος. Όταν μια διαφορά είναι στατιστικά σημαντική, αυτό σημαίνει ότι δεν οφείλεται στην τυχαιότητα, αλλά έχει βιολογικό υπόβαθρο.

Για τον υπολογισμό της διαφορετικής έκφρασης ενός γονιδίου μεταξύ δύο καταστάσεων (συνθηκών) του πειράματος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο λογάριθμος (με βάση το 2) του λόγου των τιμών έκφρασης του γονιδίου στις δύο συνθήκες που συγκρίνονται (γνωστό και ως $\log FC$ – \log fold change). Χρησιμοποιώντας όρους στατιστικής, η μία από τις συνθήκες ονομάζεται συνθήκη μελέτης (test), και η τιμή έκφρασης σε αυτήν τη συνθήκη τοποθετείται στον αριθμητή του λόγου, ενώ η άλλη είναι η συνθήκη ελέγχου (control), και η τιμή έκφρασης σε αυτή τη συνθήκη τοποθετείται στον παρονομαστή. Ανάλογα με την τιμή του λογαρίθμου προσδιορίζουμε τις σχετικές μεταβολές στην έκφραση π.χ. ενεργοποίηση, καταστολή έκφρασης γονιδίου [4].

Υπάρχουν διάφορες τεχνικές στατιστικής ανάλυσης που χρησιμοποιούνται για την εύρεση των γονιδίων με στατιστικά σημαντική διαφορετική έκφραση ανάμεσα στις

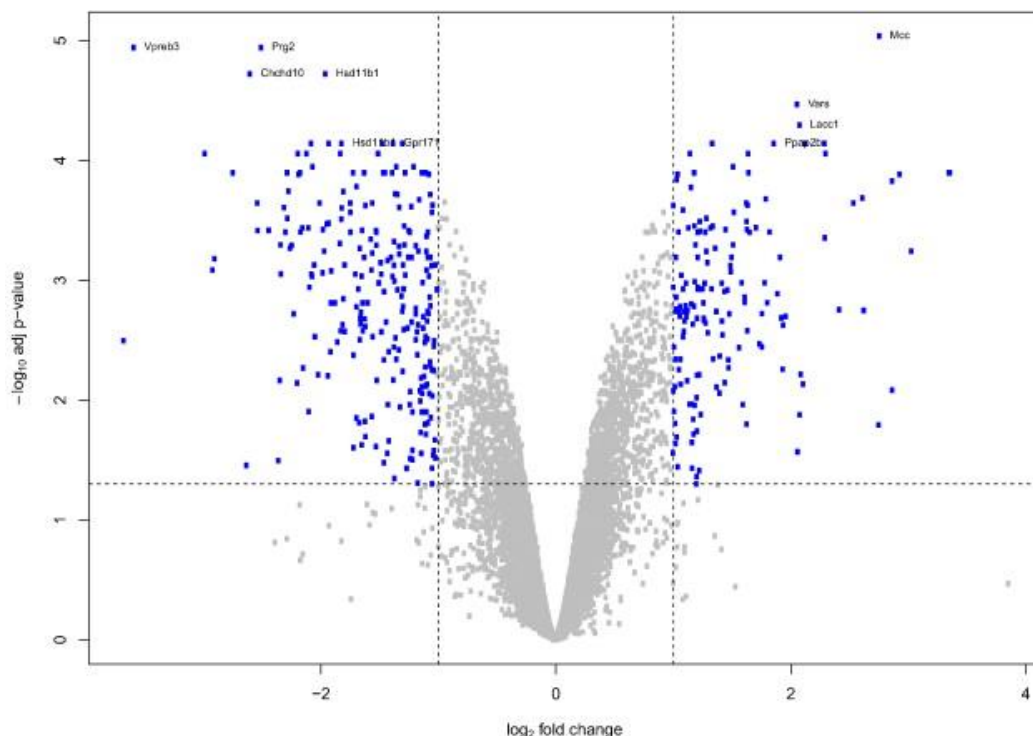
καταστάσεις του πειράματος. Προκειμένου να προσδιορίσουμε τα γονίδια που παρουσιάζουν διαφορική έκφραση μεταξύ δύο συνθηκών ενός πειράματος έκφρασης (συνθήκη μελέτης/συνθήκη ελέγχου) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο έλεγχος στατιστικών υποθέσεων, με χρήση του ελέγχου t (Student's t -test ή απλά t -test). Για παράδειγμα, με t -test μπορεί να αναλυθεί ένα πείραμα με το οποίο μελετάμε τη γονιδιακή έκφραση στον ιστό πριν και μετά τη λήψη συγκεκριμένου διατροφικού στοιχείου. Για περισσότερες από δύο συγκρινόμενες συνθήκες στο πείραμα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η Ανάλυση Διακύμανσης (ANOVA – Analysis of Variance).

Η διαδικασία για τον έλεγχο στατιστικής υπόθεσης με t -test περιλαμβάνει: τον ορισμό της στατιστικής υπόθεσης, με τον προσδιορισμό της μηδενικής και της εναλλακτικής υπόθεσης, τον υπολογισμό της στατιστικής ελέγχου t και τέλος, την απόφαση για την απόρριψη ή όχι της μηδενικής υπόθεσης για το επίπεδο σημαντικότητας που έχει επιλεγεί. Στον έλεγχο υποθέσεων, ως μηδενική υπόθεση επιλέγουμε την υπόθεση που αντιπροσωπεύει ότι δεν υπάρχει αλλαγή στην παράμετρο που μελετάμε. Για παράδειγμα, στην ανάλυση πειραμάτων γονιδιακής έκφρασης, μπορούμε να θεωρήσουμε ως μηδενική υπόθεση (H_0) την υπόθεση ότι η μέση τιμή της έκφρασης του γονιδίου στις δύο συγκρινόμενες συνθήκες δεν αλλάζει. Η εναλλακτική υπόθεση (H_a) από την άλλη πλευρά, είναι το λογικό αντίθετο της μηδενικής υπόθεσης, ότι δηλαδή η μέση τιμή έκφρασης του γονιδίου στις δύο συνθήκες είναι διαφορετική. Όταν η εναλλακτική υπόθεση διατυπώνεται με αυτόν τον τρόπο, ο έλεγχος στατιστικής υπόθεσης καλείται δίπλευρος έλεγχος. Αν η εναλλακτική υπόθεση οριστεί ως η υπόθεση η μέση τιμή έκφρασης του γονιδίου στη συνθήκη μελέτης να είναι μόνο μεγαλύτερη ή μόνο μικρότερη της μέσης τιμής έκφρασης του γονιδίου στη συνθήκη ελέγχου, ο έλεγχος καλείται μονόπλευρος.

Στη συνέχεια της διαδικασίας ελέγχου στατιστικής υπόθεσης, εφαρμόζεται η στατιστική έλεγχου t -test και υπολογίζεται η τιμή του μεγέθους t , με βάση τα δείγματα που έχουμε και θεωρώντας ως δεδομένο ότι η μηδενική υπόθεση ισχύει. Με βάση την τιμή της στατιστικής ελέγχου t που υπολογίστηκε, μπορεί να βρεθεί από κατάλληλους στατιστικούς πίνακες μια πιθανότητα p (probability), που είναι γνωστή ως p -τιμή (p -value). Η p -τιμή ορίζεται ως η πιθανότητα η τιμή της στατιστικής ελέγχου t να είναι ίση ή πιο «ακραία» από την τιμή που υπολογίστηκε με βάση την υπόθεση ότι ισχύει η μηδενική υπόθεση (ο ορισμός του τι αποτελεί ακραία τιμή εξαρτάται από το αν έλεγχος υπόθεσης είναι μονόπλευρος ή δίπλευρος). Σε περίπτωση που η p -τιμή είναι μικρότερη ή ίση από το επιλεγμένο επίπεδο σημαντικότητας, αυτό υποδηλώνει ότι είναι μικρή η πιθανότητα τα δεδομένα που παρατηρήθηκαν στα δείγματα να είναι σε συμφωνία με τη μηδενική υπόθεση και έτσι, η μηδενική υπόθεση μπορεί να απορριφθεί. Συνεπώς, δεχόμαστε την εναλλακτική υπόθεση (στο παράδειγμα μας, δεχόμαστε ότι υπάρχει διαφορά στη μέση τιμή έκφρασης του γονιδίου μεταξύ των δύο μελετώμενων συνθηκών). Διαφορετικά, η μηδενική υπόθεση δεν μπορεί να απορριφθεί.

Στα πειράματα στα οποία μελετάται η διαφορική έκφραση μεταξύ δύο καταστάσεων του πειράματος, χρησιμοποιούνται συχνά τα διαγράμματα «κρατήρα ηφαιστείου» (volcano plots), τα οποία ονομάζονται έτσι λόγω του χαρακτηριστικού σχήματός τους. Σε αυτά τα διαγράμματα, κάθε σημείο αναφέρεται σε ένα συγκεκριμένο γονίδιο και έχει συντεταγμένες, στον οριζόντιο άξονα, το λογάριθμο του λόγου έκφρασης που αναφέρθηκε πιο πάνω (\log_2FC), και στον κατακόρυφο άξονα, τον αρνητικό δεκαδικό λογάριθμο του p -value ($-\log_{10}p$ -value). Όσο μεγαλύτερη είναι η (απόλυτη) τιμή της τετμημένης ενός σημείου, τόσο μεγαλύτερη διαφορική έκφραση εμφανίζει το γονίδιο αυτό, ενώ όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή της τεταγμένης, τόσο πιο στατιστικά σημαντική είναι αυτή η διαφορική έκφραση. Με βάση τη βιβλιογραφία, υπάρχουν όρια που θεωρούνται αποδεκτά ως όρια διαφορικής έκφρασης και

στατιστικής σημαντικότητας (για παράδειγμα, αποδεκτά όρια μπορεί να είναι τα $|\log_2FC| > 1,5$ και $p\text{-value} \leq 0,05$). Μπορούμε έτσι να θεωρήσουμε ως διαφορικά εκφραζόμενα (differentially expressed genes) τα γονίδια που πληρούν και τις δύο προϋποθέσεις ως προς αυτά τα όρια [4].

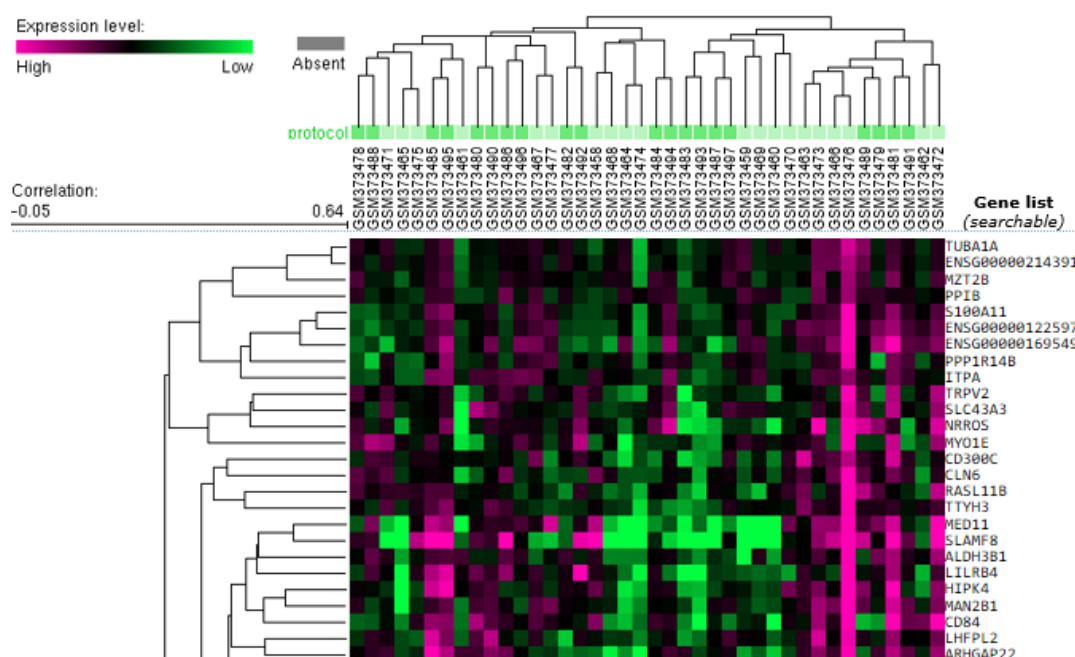


Εικόνα 4: Διάγραμμα «κρατήρα ηφαιστείου» από δεδομένα μικροσυστοιχίας. Τα όρια που έχουν επιλεγεί ως προς τη διαφορική έκφραση και τη στατιστική σημαντικότητα φαίνονται με τις διακεκομμένες γραμμές. Ως σημαντικά προς ανάλυση θεωρούνται τα γονίδια που εμφανίζονται με μπλε σημεία στο γράφημα. Για τα δέκα πιο σημαντικά γονίδια απεικονίζεται και το σύμβολο του γονιδίου. [6]

Ανάλυση ομαδοποίησης (cluster analysis)

Η ομαδοποίηση των δεδομένων γονιδιακής έκφρασης που βρίσκονται στη μορφή που παρουσιάστηκε στην Εικόνα 2, χρησιμεύει στον εντοπισμό προτύπων στα δεδομένα. Για παράδειγμα, η ομαδοποίηση μπορεί να γίνει στο επίπεδο των δειγμάτων (στήλες του πίνακα) και να μας επιτρέψει να εντοπίσουμε άγνωστες/καινούργιες κατηγορίες που υπάρχουν στα δείγματά μας (π.χ. αν τα δείγματα είναι από καρκινικούς ιστούς, να εντοπίσουμε διαφορετικές κατηγορίες τύπων καρκίνου στα δεδομένα γονιδιακής έκφρασης). Ομαδοποίηση μπορεί επίσης να γίνει στο επίπεδο των γονιδίων (γραμμές του πίνακα). Αυτό μπορεί να έχει εφαρμογή στην επιλογή γονιδίων ως χαρακτηριστικών (feature selection), που μπορούν έπειτα να χρησιμοποιηθούν σε μοντέλα πρόβλεψης. Ακόμη, μία τέτοια ομαδοποίηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό ομάδων γονιδίων που εμφανίζουν συν-έκφραση [7]. Ως συνέκφραση χαρακτηρίζουμε τη συμμεταβολή της έκφρασης των γονιδίων υπό διαφορετικές πειραματικές καταστάσεις. Η εύρεση ομάδων γονιδίων που συνεκφράζονται είναι ιδιαίτερα σημαντική, γιατί μπορεί να θεωρηθεί ως ένδειξη κοινής λειτουργικότητας των γονιδίων. Μπορούμε έτσι να εκτιμήσουμε ποια είναι η άγνωστη λειτουργία ενός γονιδίου, παρατηρώντας με ποια άλλα γονίδια αυτό συνεκφράζεται, εφόσον γνωρίζουμε ήδη τη λειτουργία των άλλων γονιδίων (το επονομαζόμενο και «guilt by association»).

Πολύ χρήσιμο στην ανάλυση ομαδοποίησης είναι το γράφημα που ονομάζεται θερμικός χάρτης (clustered heatmap), γνωστό και ως διπλό δενδρόγραμμα, το οποίο μπορεί να προκύψει και με ιεραρχική ομαδοποίηση (hierarchical clustering). Οι θερμικοί χάρτες χρησιμοποιούνται συχνά στην ανάλυση και οπτικοποίηση πολυδιάστατων δεδομένων και η χρήση τους είναι συχνή στα πειράματα μεγάλης κλίμακας με μικροσυστοιχίες, καθώς διευκολύνουν την εύρεση τάσεων και προτύπων. Πιο συγκεκριμένα, ο θερμικός χάρτης είναι ένας πίνακας που σε κάθε κελί του απεικονίζεται το επίπεδο έκφρασης του αντίστοιχου γονιδίου στο αντίστοιχο δείγμα, με χρήση χρωματικής κλίμακας. Επιπλέον, οι στήλες και οι γραμμές του πίνακα είναι διατεταγμένες έτσι ώστε τα γονίδια και τα δείγματα που παρουσιάζουν παρόμοια πρότυπα να είναι ομαδοποιημένα το ένα δίπλα στο άλλο. Με αυτόν τον οπτικό τρόπο μπορούμε να εντοπίσουμε πιθανούς συσχετισμούς μεταξύ πειραματικών καταστάσεων και προτύπων έκφρασης, καθώς και ομάδες γονιδίων με κοινά πρότυπα έκφρασης.



Εικόνα 5: Λεπτομέρεια θερμικού χάρτη πειράματος μικροσυστοιχίας, που έχει προκύψει με χρήση της διαδικτυακής εφαρμογής GDSbrowser του NCBI.

5.5 Διατροφογενετική (Nutrigenetics) /Διατροφογενωμική (Nutrigenomics) και ανάλυση δεδομένων γονιδιακής έκφρασης

Ως Διατροφογενετική (Nutrigenetics) ορίζεται το ερευνητικό πεδίο που μελετά πώς τα διαφορετικά γενετικά χαρακτηριστικά των ατόμων μπορούν να οδηγήσουν σε διαφορετική απόκριση στο διαιτολόγιο και κατ' επέκταση σε διαφορετικό φαινότυπο. Για παράδειγμα, άτομα που ακολουθούν την ίδια διατροφή μπορεί, λόγω διαφορετικού γενετικού υλικού, να ανταποκριθούν διαφορετικά ως προς τα επίπεδα χοληστερόλης ορού [8].

Ο όρος Διατροφογενωμική (Nutrigenomics) από την άλλη, αναφέρεται στο ερευνητικό πεδίο που «ασχολείται με τον χαρακτηρισμό όλων των προϊόντων γονιδίων που επηρεάζονται από διατροφικά στοιχεία και τις μεταβολικές τους συνέπειες» [9]. Με άλλα λόγια, ασχολείται με το πώς τα προσλαμβανόμενα διατροφικά στοιχεία

επηρεάζουν τη γονιδιακή απόκριση: τη μεταγραφή σε RNA, τις κωδικοποιούμενες πρωτεΐνες κ.ά.

Η Διατροφογενετική και η Διατροφογενωμική (Nutrigenetics/Nutrigenomics) μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο πλαίσιο της λεγόμενης εξατομικευμένης διατροφής, όπου το προσωπικό διαιτολόγιο επιλέγεται με βάση το γονιδίωμα του ατόμου, με στόχο την προώθηση της υγείας και την πρόληψη/διαχείριση χρόνιων ασθενειών [8]. Για τον σκοπό αυτό, χρειάζεται κατανόηση του τρόπου με τον οποίο οι πολυάριθμες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διατροφικών στοιχείων, γονιδίων, πρωτεϊνών και μεταβολικών μονοπατιών, επηρεάζουν τα βιολογικά μονοπάτια ασθενειών (disease pathways).

Στο πλαίσιο της Διατροφογενωμικής μπορούν να σχεδιαστούν κατάλληλες μελέτες με πειράματα που εξετάζουν την επίδραση διατροφικών παραγόντων στη γονιδιακή έκφραση. Η μέτρηση της γονιδιακής έκφρασης μπορεί να γίνει με μικροσυστοιχίες DNA και η ανάλυση να ακολουθήσει τα στάδια που περιγράφηκαν στην παράγραφο 3.4 της άσκησης.

5.6 Πρακτικό μέρος

Στο πλαίσιο της εργαστηριακής άσκησης θα αναλυθούν δεδομένα από μικροσυστοιχίες DNA, που έχουν ανακτηθεί από το δημόσιο αποθετήριο Gene Expression Omnibus (GEO) του NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo). Η ανάλυση πραγματοποιείται με χρήση της γλώσσας προγραμματισμού R και συγκεκριμένα μέσω του γραφικού περιβάλλοντος χρήστη (graphical user interface) RGui. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται ορισμένα εργαλεία που είναι διαθέσιμα στον διαδικτυακό τόπο του NCBI.

Προκειμένου να απαντήσετε στα ζητούμενα που αναφέρονται στη συνέχεια, θα χρειαστεί να συμβουλευτείτε και τον κώδικα/σχόλια που δίνονται στο αρχείο Exercise6.R, που βρίσκεται στη σελίδα της άσκησης στο MyCourses.

Η γλώσσα προγραμματισμού R

Η γλώσσα προγραμματισμού R είναι ελεύθερο λογισμικό/λογισμικό ανοικτού κώδικα που χρησιμοποιείται ευρέως στο πεδίο της Βιοπληροφορικής/Υπολογιστικής Βιολογίας, καθώς υπάρχει πληθώρα διαθέσιμων πακέτων/βιβλιοθηκών στην R ειδικά για την επεξεργασία βιολογικών δεδομένων. Επίσης, η χρήση της R είναι πολύ διαδεδομένη γενικότερα στο πεδίο της Επιστήμης Δεδομένων (Data Science).

Μπορείτε να «κατεβάσετε» την R από τη σελίδα www.r-project.org/. Η πιο πρόσφατη έκδοση της R είναι η 3.5.1. Στο διαδίκτυο υπάρχει πληθώρα οδηγιών για την R, καθώς και πληροφορίες που μπορείτε να βρείτε από εγχειρίδια χρήσης για κάθε πακέτο και συνάρτηση. Ιδιαίτερα χρήσιμος είναι ο σύνδεσμος www.rdocumentation.org. Μπορείτε επίσης να συμβουλευτείτε τον εισαγωγικό οδηγό από την επίσημη σελίδα, στον σύνδεσμο cran.r-project.org/doc/manuals/r-release/R-intro.pdf. Είναι χρήσιμο να εξοικειωθείτε με το γραφικό περιβάλλον και με λειτουργίες όπως:

- ορισμός του working directory με την `setwd()`,
- εγκατάσταση και «φόρτωση» πακέτων (packages). Υπάρχουν πολλά διαθέσιμα πακέτα στο CRAN - Comprehensive R Archive Network. Η εγκατάσταση ενός πακέτου μπορεί να πραγματοποιηθεί με την εντολή `install.packages("thepackagename")`. Για να χρησιμοποιηθεί το πακέτο μετά την εγκατάστασή του, πρέπει να φορτωθεί με χρήση της εντολής `library("thepackagename")`,
- διαχείριση διανυσμάτων και πινάκων στην R,
- χρήση δομών επανάληψης (βρόχοι – loops) στην R.

Ανάλυση δεδομένων πειράματος γονιδιακής έκφρασης

Τα δεδομένα που θα αναλυθούν προέρχονται από πείραμα γονιδιακής έκφρασης με μικροσυστοιχία DNA. Πρόκειται για το πείραμα με GEO id: **GSE7117** και τίτλο «Γονιδιακή έκφραση στο ήπαρ μετά από υποθερμιδική δίαιτα με χαμηλά λιπαρά, σε παχύσαρκες γυναίκες και σε μάρτυρες (controls)». Το πείραμα αυτό εντάσσεται στο πεδίο της Διατροφογενωμικής (Nutrigenomics), καθώς ασχολείται με το πώς μία συγκεκριμένη δίαιτα μπορεί να επηρεάσει το μεταβολικό προφίλ και την ηπατική γονιδιακή έκφραση στον άνθρωπο.

Ανάκτηση και επισκόπηση δεδομένων

Τα δεδομένα για το πείραμα GSE7117 που θα αναλυθούν είναι αποθηκευμένα με τη μορφή αρχείου δεδομένων μικροσυστοιχιών που λέγεται «Series Matrix File» (.txt αρχείο). Αυτή η μορφή είναι ιδιαίτερα εύχρηστη, καθώς τα δεδομένα έχουν ήδη υποστεί προ-επεξεργασία και κανονικοποίηση και είναι έτοιμα για περαιτέρω ανάλυση. Βέβαια, για κάθε πείραμα στο GEO υπάρχουν διαθέσιμα πειραματικά δεδομένα σε διάφορες μορφές, όπως και τα αρχικά ανεπεξέργαστα (raw) δεδομένα.

Ζητούμενο 5.1.: Να αναζητήσετε στην ηλεκτρονική σελίδα του Gene Expression Omnibus του NCBI, στην υπηρεσία Accession Display, το πείραμα με GEO accession id: GSE7117 (στον σύνδεσμο www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi). Αφού διαβάσετε τη σύνοψη του πειράματος (Summary) να αναφέρετε πόσα δείγματα μετρήθηκαν, ποιες είναι οι συγκρινόμενες καταστάσεις στο πείραμα και πόσα δείγματα ανήκουν σε κάθε κατάσταση. Να αναφέρετε επίσης τον τύπο της πλατφόρμας μικροσυστοιχίας DNA με την οποία έγιναν οι μετρήσεις.

Ζητούμενο 5.2.: Να «κατεβάσετε» από τη σελίδα της άσκησης στο MyCourses το αρχείο GSE7117_series_matrix.txt. Όπως αναφέρθηκε, τα δεδομένα που είναι διαθέσιμα στη μορφή Series Matrix File έχουν ήδη υποστεί κανονικοποίηση. Να ανοίξετε το .txt αρχείο με ένα πρόγραμμα επεξεργασίας .txt αρχείων και να παραθέσετε τις ακόλουθες πληροφορίες για το πείραμα:

- i. Ποιος είναι ο τίτλος κάθε δείγματος και ποιο το Sample_geo_accession id του;
- ii. Από τι είδους οργανισμό προέρχονται τα δείγματα;
- iii. Σε ποια από τις δύο συγκρινόμενες συνθήκες του πειράματος ανήκει κάθε δείγμα;

Να χρησιμοποιήσετε τη συνάρτηση `read.table()` που παρατίθεται στο αρχείο `Excercise6.R` για το Ζητούμενο 2, προκειμένου να εκχωρήσετε το τμήμα του .txt αρχείου που περιέχει τις πειραματικές μετρήσεις στο data frame (matrix-like object) με όνομα `x`.

- iv. Να εξηγήσετε τι σημαίνουν τα ορίσματα που έχουν δοθεί στον κώδικα για την `read.table()`.
- v. Να χρησιμοποιήσετε κατάλληλη εντολή και να παραθέσετε ποιες είναι οι διαστάσεις του `x`.
- vi. Να χρησιμοποιήσετε κατάλληλη εντολή και να παραθέσετε τα ονόματα κάθε στήλης του `x`. Σε τι αντιστοιχούν οι διαφορετικές στήλες;
- vii. Να χρησιμοποιήσετε κατάλληλη εντολή και να παραθέσετε τα ονόματα των 15 πρώτων γραμμών του `x`. Σε τι αντιστοιχούν οι διαφορετικές γραμμές του `x`;
- viii. Ποια είναι η τιμή που έχει καταγραφεί για το στοιχείο `x[3,5]` και τι περιγράφει η τιμή αυτή;
- ix. Τι πληροφορίες μας δίνει η 200η γραμμή και τι η 7η στήλη του πίνακα `x`;

- x. Να χρησιμοποιήσετε κατάλληλη συνάρτηση της R για να σχεδιάσετε το ιστόγραμμα συχνοτήτων για τις μετρήσεις που έχουν καταγραφεί για το πρώτο και το τρίτο δείγμα του πειράματος.

Κανονικοποίηση δεδομένων

Ζητούμενο 5.3.:

- Να εφαρμόσετε την εντολή που αναφέρεται στον κώδικα για το Ζητούμενο 3-i και να παραθέσετε το αποτέλεσμα. Τι δείχνει το αποτέλεσμα; Να εξηγήσετε τις συναρτήσεις και τα ορίσματα που χρησιμοποιούνται σε αυτή τη γραμμή κώδικα.
- Να ελέγξετε αν τα δεδομένα είναι όντως κανονικοποιημένα, δημιουργώντας θηκογράμματα (boxplots) για τις μετρήσεις κάθε δείγματος. Συμβουλευτείτε τα σχόλια που παρατίθενται στον κώδικα γι' αυτό το ζητούμενο. Να παραθέσετε το διάγραμμα που προέκυψε και να σχολιάσετε.

Προσδιορισμός διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων

Ζητούμενο 5.4.: Στο ζητούμενο αυτό θα κάνετε έλεγχο στατιστικής υπόθεσης με t-test για τον προσδιορισμό των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων μεταξύ των δειγμάτων χωρίς διαιτητική παρέμβαση (controls) και με διαιτητική παρέμβαση (diet intervention), συμπληρώνοντας κατάλληλα τον κώδικα για το ζητούμενο.

- Να συμπληρώσετε κατάλληλα τη συνάρτηση `c()`, η οποία εκχωρεί στο διάνυσμα (vector) “`xsamplelabels`” τιμές που δίνουν την πειραματική συνθήκη για κάθε δείγμα. Χρησιμοποιήστε το 0 για τα δείγματα ελέγχου και το 1 για τα δείγματα με διαιτητική παρέμβαση.
- Να χρησιμοποιήσετε τη συνάρτηση `t.test()` της R και να γράψετε κώδικα για να κάνετε έλεγχο υπόθεσης t-test για κάθε ανιχνευτή για τις δύο πειραματικές συνθήκες που αναφέρθηκαν. Να υπολογίσετε την τιμή του p-value για κάθε ανιχνευτή (γονίδιο) και να παραθέσετε στην αναφορά σας τις τιμές του p-value για τους 15 πρώτους ανιχνευτές της μικροσυστοιχίας.
- Να γράψετε κώδικα και να παραθέσετε τους ανιχνευτές για τους οποίους το p-value που υπολογίσατε με το t-test ήταν μικρότερο από την τιμή 0,001. Επίσης, να βρείτε τον ανιχνευτή με το μικρότερο p-value.

Ζητούμενο 5.5.: Να κάνετε ανάλυση διαφορικής έκφρασης χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά την υπηρεσία GEO2R του NCBI στον σύνδεσμο www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/?acc=GSE7117. Μπορείτε να βρείτε τις οδηγίες χρήσης στη σελίδα του GEO2R (σύνδεσμος www.youtube.com/watch?v=EUPmGWS8ik0). Να ορίσετε πρώτα ποια δείγματα αντιστοιχούν στις δύο καταστάσεις του πειράματος: χωρίς διαιτητική παρέμβαση (control group)/με διαιτητική παρέμβαση (diet intervention group), και να προσδιορίσετε τα 250 πρώτα πιο σημαντικά γονίδια που εκφράζονται διαφορικά, χρησιμοποιώντας τη σχετική υπηρεσία που προσφέρεται.

- Να παραθέσετε όλα τα αποτελέσματα που εξάγονται για τα δυο πρώτα πιο σημαντικά γονίδια που προκύπτουν. Τι έχετε να σχολιάσετε ως προς τις τιμές p-value και logFC που έχουν, με βάση και τα αναφερόμενα στο θεωρητικό μέρος; Η έκφραση των δύο γονιδίων καταστέλλεται ή ενισχύεται; Επιλέξτε πάνω στη

- γραμμή για τον πρώτο ανιχνευτή (γονίδιο) και παραθέστε το γράφημα που εικονίζεται. Τι ακριβώς δείχνει;
- ii. Να παραθέσετε ορισμένες συνοπτικές πληροφορίες για το γονίδιο το οποίο βρήκατε ότι εκφράζεται διαφορετικά σε στατιστικά σημαντικότερο βαθμό με το GEO2R, κάνοντας αναζήτηση στην υπηρεσία Gene του NCBI, στον σύνδεσμο <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>. Αναζητήστε πληροφορίες σχετικές με το γονίδιο στον άνθρωπο (Homo Sapiens).

Ομαδοποίηση δεδομένων

Ζητούμενο 5.6.: Να δημιουργήσετε θερμικό χάρτη (heatmap) με τα δεδομένα του πειράματος GSE7117, χρησιμοποιώντας την υπηρεσία Dataset Browser που προσφέρεται από το NCBI στον σύνδεσμο www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/GDSbrowser (επιλογή Cluster Analysis).

- i. Πόσες γραμμές και πόσες στήλες έχει ο πλήρης θερμικός χάρτης;
Να εστιάσετε στο πάνω μέρος του θερμικού χάρτη, ώστε να φαίνονται οι λεπτομέρειες, ακολουθώντας τις οδηγίες που αναφέρονται στην ιστοσελίδα.
- ii. Να παραθέσετε τμήμα της λεπτομέρειας του θερμικού χάρτη που προέκυψε, ώστε να φαίνονται οι βασικές πληροφορίες που αυτός περιλαμβάνει. Τι απεικονίζεται σε κάθε γραμμή και στήλη και τι επιπλέον πληροφορίες δίνονται;
- iii. Με βάση τον χρωματικό κώδικα που δίνεται, πώς θα χαρακτηρίζατε την τιμή έκφρασης στο πρώτο γονίδιο στη λίστα για το πρώτο δείγμα;
- iv. Με βάση την ομαδοποίηση που προέκυψε, μπορείτε να κάνετε κάποιες παρατηρήσεις σχετικά με πιθανούς συσχετισμούς μεταξύ των καταστάσεων του πειράματος και των προτύπων έκφρασης ομάδων γονιδίων; Να αιτιολογήσετε το σκεπτικό σας.

Στην αναφορά σας θα πρέπει να συμπεριλάβετε τις απαντήσεις σε όλα τα παραπάνω Ζητούμενα 5.1. έως 5.6. και τα υποερωτήματά τους, τα σχετικά γραφήματα που ζητούνται, καθώς και τον συμπληρωμένο κώδικα του αρχείου Exercise6.R.

Βιβλιογραφία

- [1] Τσαούσογλου, Μ., Μπερή, Δ., Βγόντζας, Α., Χρούσος, Γ., «Μοριακοί μηχανισμοί κιρκάδιων ρυθμών: μελέτη σε πειραματόζωα και οι πρώτες ενδείξεις στον άνθρωπο», Δελτία Α' Παιδιατρικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών, νο. 53, 2006.
- [2] Vieira, E., Burris, T., Quesada, I., "Clock genes, pancreatic function, and diabetes", Trends in Molecular Medicine, vol. 20, no. 12, 2014.
- [3] Franks, P., Merino, J., "Gene-lifestyle interplay in type 2 diabetes", Current Opinion in Genetics & Development, no. 50, pp.35-40, 2018.
- [4] Νικολάου, Χ., Χουβαρδάς, Π., "Υπολογιστική βιολογία", Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, 2015. [ηλεκτρ. βιβλ.] Διαθέσιμο στο: <http://hdl.handle.net/11419/1577>

- [5] www.bioconductor.org, “MalariaLifeCycle - Statistical Microarray Analysis using affyLmGUI” Available from:
www.bioconductor.org/packages/devel/bioc/vignettes/affyLmGUI/inst/doc/LifeCycle/MalariaLifeCycle.html#RawIntensityBoxPlot
- [6] Xie, Ping & Moore, Carissa & R. Swerdel, Mavis & Hart, Ronald, “Transcriptomic profiling of splenic B lymphomas spontaneously developed in B cell-specific TRAF3-deficient mice», *Genom Data*. 2. 386-388. 10.1016/j.gdata.2014.10.017, 2014.
- [7] Cancer Research UK Cambridge Institute, “Microarray-analysis, Materials on the analysis of microarray expression data; focus on re-analysis of public data”, 2018. [online] Available from: <http://bioinformatics-core-shared-training.github.io/microarray-analysis/>
- [8] Simopoulos A. P., “Nutrigenetics/Nutrigenomics,” *Annu. Rev. Public Health*, vol. 31, no. 1, pp. 53–68, 2010.
- [9] Ordovas J. M., Ferguson L. R., Tai E. S., Mathers J. C., “Personalised nutrition and health,” *BMJ*, vol. 361, pp. 1–7, 2018.
- [10] Universitat de Barcelona, “Introduction to Microarray and Next Generation Sequencing Data Analysis, Practicals”, 2018. [online] Available from: <http://www.ub.edu/stat/docencia/bioinformatica/microarrays/ADM/>