



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΠΑΤΡΩΝ
UNIVERSITY OF PATRAS

ΑΝΟΙΚΤΑ ακαδημαϊκά
μαθήματα ΠΠ

Βιοϋλικά

Ενότητα 5: Πρωτεΐνες, Κύτταρα, Ιστοί –
Αλληλεπίδραση με Βιοϋλικά

Ελευθέριος Αμανατίδης
Πολυτεχνική Σχολή
Τμήμα Χημικών Μηχανικών

Περιεχόμενα ενότητας

- **Πρωτεΐνες**
 - Δομή και είδη
 - Λειτουργίες πρωτεϊνών
 - Ρόφηση πρωτεϊνών σε επιφάνειες βιοϋλικών
- **Κύτταρα**
 - Δομή και είδη κυττάρων
 - Αλληλεπίδραση κυττάρων – πρωτεϊνών
 - Αλληλεπίδραση κυττάρων – επιφανειών
 - Βιοσυμβατότητα
- **Ιστοί**
 - Είδη ιστών και δομή τους
 - Απόκριση ιστών σε τραυματισμό
 - Αλληλεπίδραση ιστών - βιοϋλικού



Περίληψη μαθήματος

Επιφάνεια βιοϋλικού



Ρόφηση Πρωτεϊνών



Ρόφηση Κυττάρων



Τραυματισμός κυττάρου

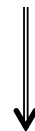
Τοξικότητα, γέκρωση, απόπτωση



Ανάπτυξη Ιστού



Τραυματισμός ιστού



Βιοσυμβατό



Τοξικό

Πρωτεΐνες



Δομή Πρωτεϊνών

Οι **πρωτεΐνες** είναι μεγάλα σύνθετα βιομόρια, με μοριακό βάρος από 10.000 μέχρι πάνω από 1 εκατομμύριο, αποτελούμενα από **αμινοξέα**, τα οποία ενώνονται μεταξύ τους με **πεπτιδικούς δεσμούς** σχηματίζοντας μια γραμμική αλυσίδα, καλούμενη **αλυσίδα πολυπεπτιδίων**. Όλες οι πρωτεΐνες περιέχουν άνθρακα, οξυγόνο και άζωτο και οι περισσότερες εξ αυτών και θείο

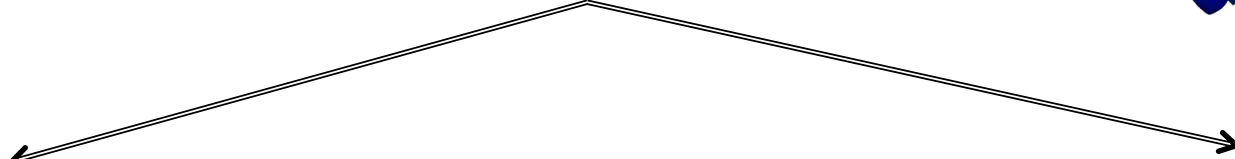
ΠΕΠΤΙΔΙΑ (< 10 αμινοξέα) π.χ οξυτοσίνη



ΠΟΥΛΠΕΠΤΙΔΙΑ (10-100 αμινοξέα) π.χ ινσουλίνη



ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ (100 – 1000 αμινοξέα) π.χ αλβουμίνη

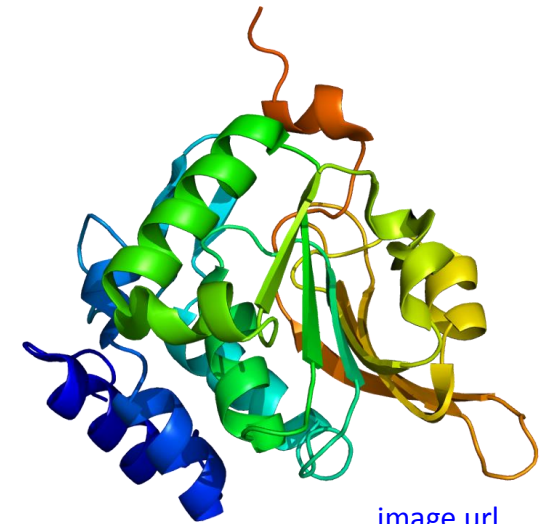


ΣΦΑΙΡΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ

ένζυμα, αιμοσφαιρίνη, αλβουμίνες, ιστόνες

ΙΝΩΔΕΙΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ

κολλαγόνο, ελαστίνη, κερατίνη.



Λειτουργίες Πρωτεϊνών

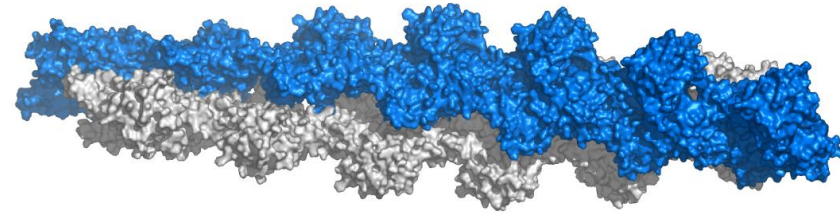
Δομικές λειτουργίες: Συστατικά της εξωκυττάριας θεμελιώδους ουσίας (extracellular matrix) η οποία υποστηρίζει τα κύτταρα

Παραδείγματα:

Κολλαγόνο – Συστατικό Μυών

Ελαστίνη – Ελαστικότητα Μυών

Πρωτεΐνες πρόσδεσης / Λαμινίνη, Βιτρονεκτίνη (πρωτεΐνες που ευνοούν την ρόφηση κυττάρων)



[image url](#)

Ένζυμα που καταλύουν αντιδράσεις:

Ελαττώνουν την ενέργεια ενεργοποίησης βιοχημικών αντιδράσεων μέσω σταθεροποίησης της μεταβατικής κατάστασης

Παραδείγματα:

Ουρεάση – Καταλύει την υδρόλυση της ουρίας



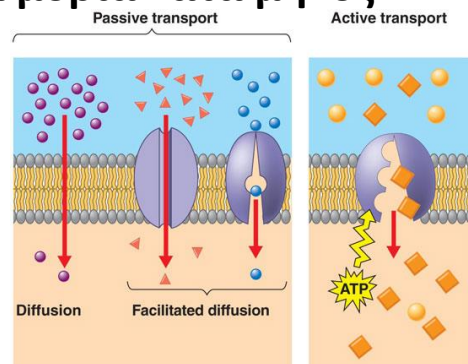
Λειτουργίες Πρωτεϊνών

Μεταφορά: Συνδέονται χημικά και μεταφέρουν μικρά μόρια κατά μήκος μεμβρανών των κυττάρων

Παραδείγματα:

Αιμογλοβίνη – Μεταφέρει οξυγόνο στους ιστούς

Αλβουμίνη – Μεταφέρει λιπαρά οξέα



[image url](#)

Κινητικότητα κυττάρων:

Υπεύθυνες για την κίνηση των κυττάρων μέσω πολυμερισμού

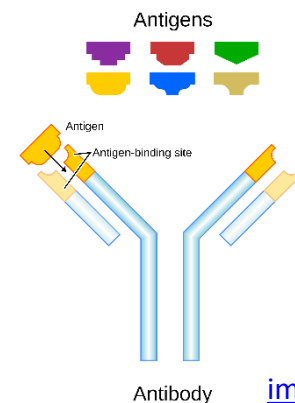
Παραδείγματα:

Ακτίνη / Μυοσίνη – Κίνηση Μυών

Άμυνα: Συνεισφέρουν στην αντίδραση του ανοσοποιητικού

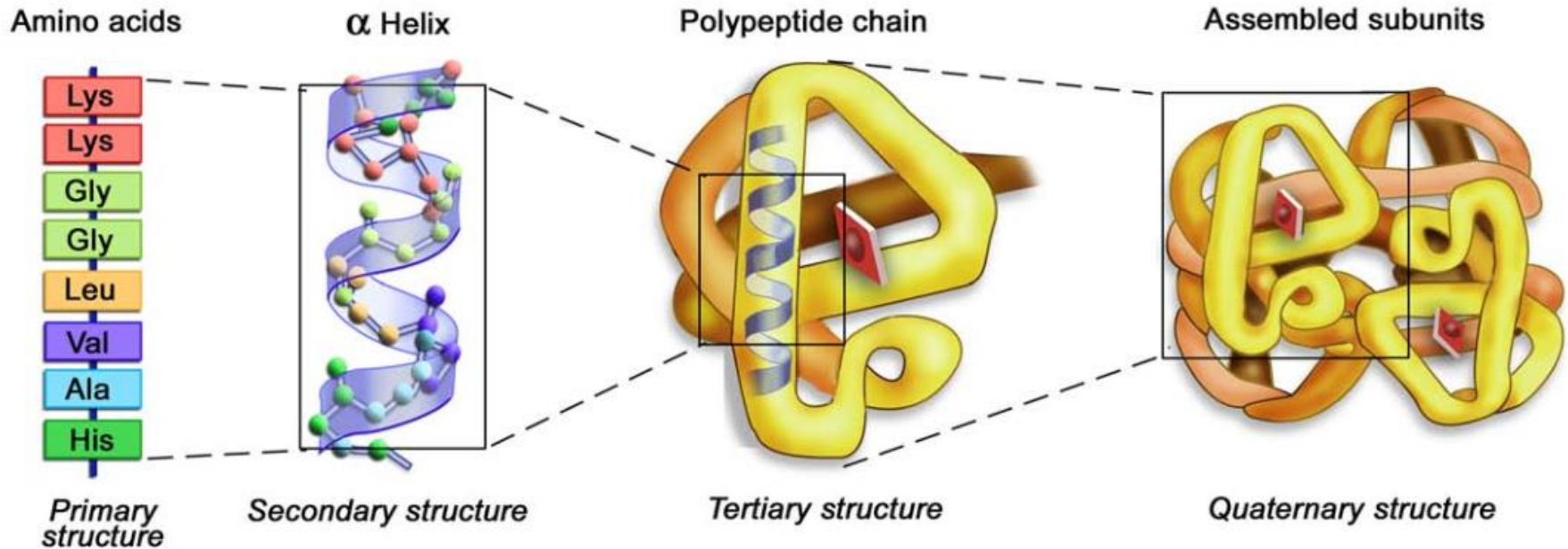
Παραδείγματα:

Γλοβουλίνες (αντισώματα) – Πρωτεΐνες Y – δομής που συνδέονται χημικά με πρωτεΐνες εκτός οργανισμού



[image url](#)

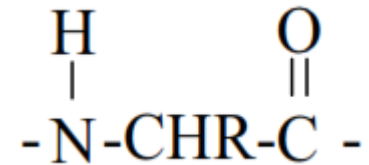
Δομή Πρωτεϊνών



[image url](#)

Πρωτοταγής Δομή

- A. Γραμμική αλληλουχία αμινοξέων
- B. Πεπτιδικός δεσμός CONH (συνδέει καρβοξυλομάδα ενός αμινοξέος με καρβοξυλομάδα άλλου αμινοξέος) επίπεδος και εξαιρετικά σταθερός
- C. Πλευρικές ομάδες R διαφορετικού χαρακτήρα



[image url](#)

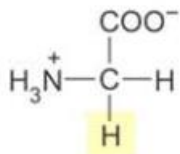


Δομή Πρωτεϊνών

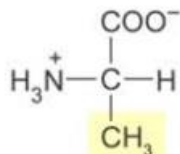
Πλευρικές ομάδες R διαφορετικού χαρακτήρα

Nonpolar, aliphatic R groups [image url](#)

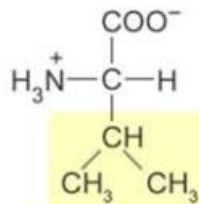
Glycine G



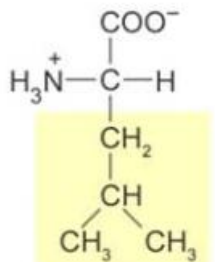
Alanine A



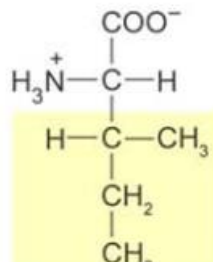
Valine V



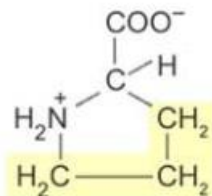
Leucine L



Isoleucine I

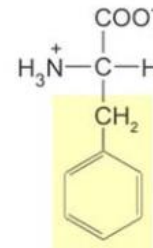


Proline P

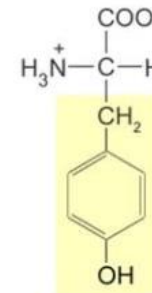


Aromatic R groups [image url](#)

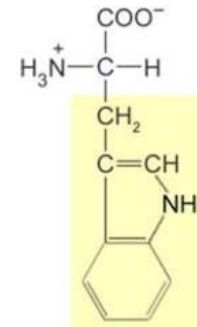
Phenylalanine F



Tyrosine Y

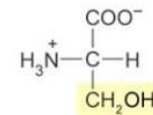


Tryptophan W

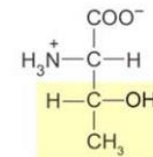


Polar, uncharged R groups [image url](#)

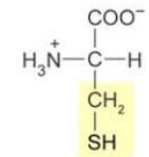
Serine S



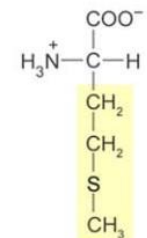
Threonine T



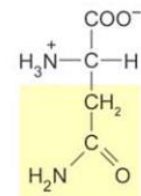
Cysteine C



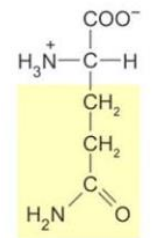
Methionine M



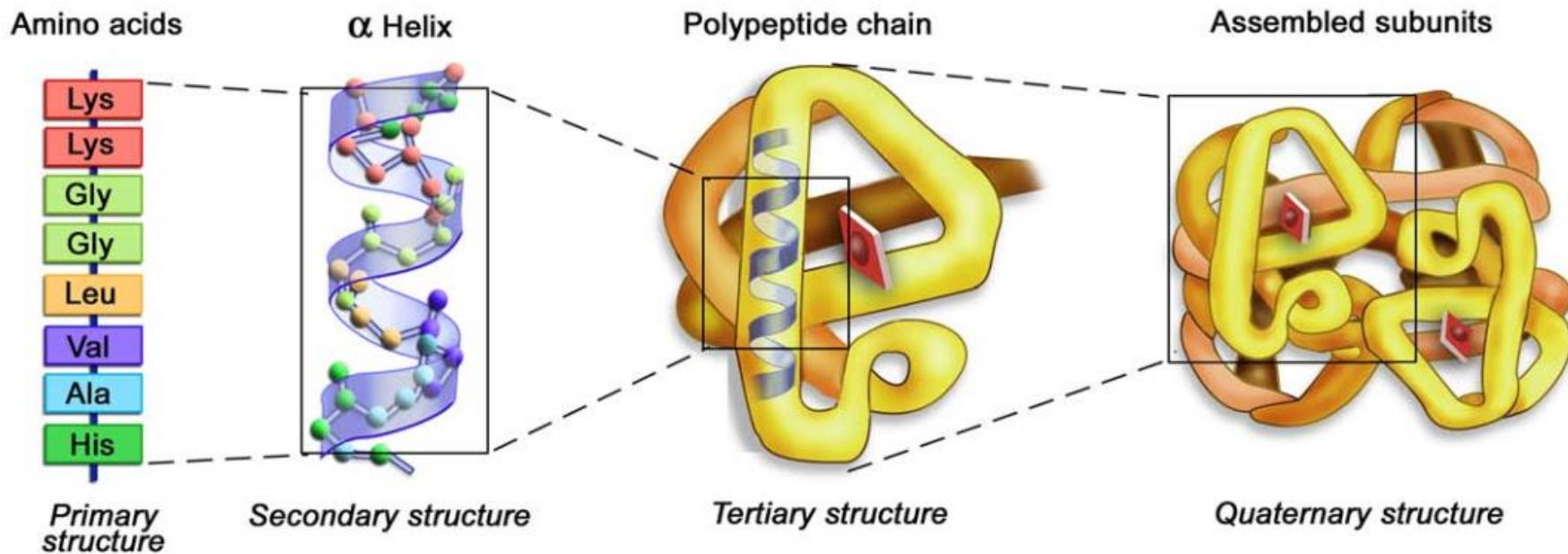
Asparagine N



Glutamine Q



Δομή Πρωτεϊνών

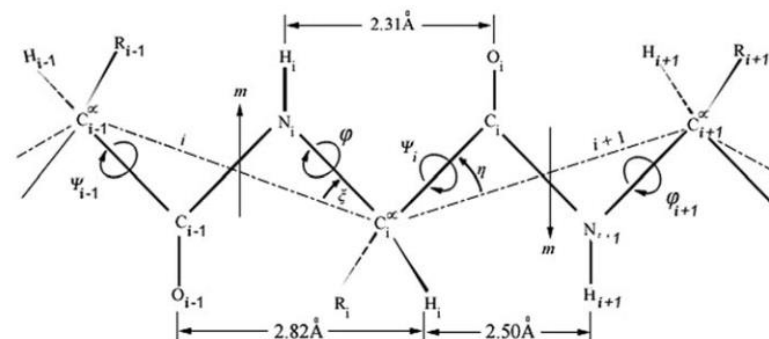


[image url](#)

Δευτεροταγής Δομή

Α. Κατανομή τους στο χώρο: Γωνίες ϕ και ψ

Φυσική διαμόρφωση, β -sheets και β -helices



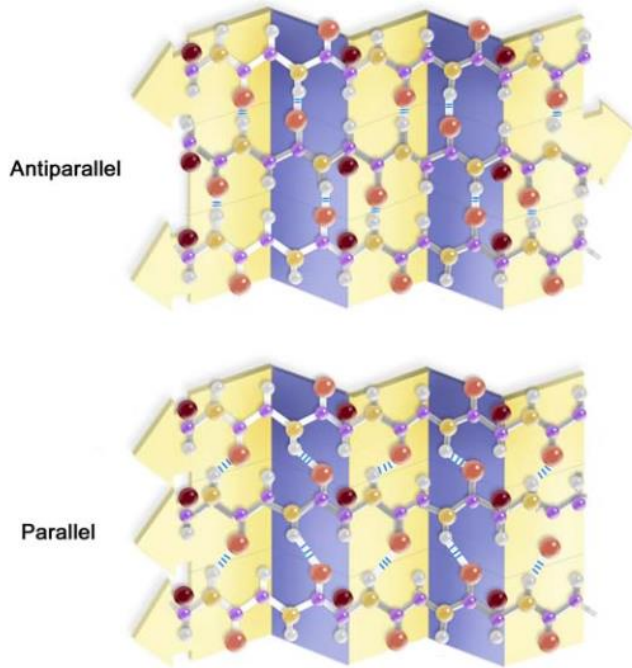
[image url](#)



Δομή Πρωτεϊνών

Δευτεροταγής Δομή

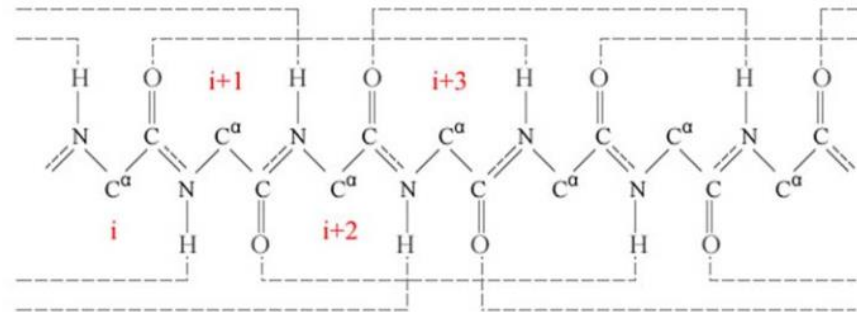
β-sheets



zig – zag δομές

[image url](#)

β-helices H-bonding

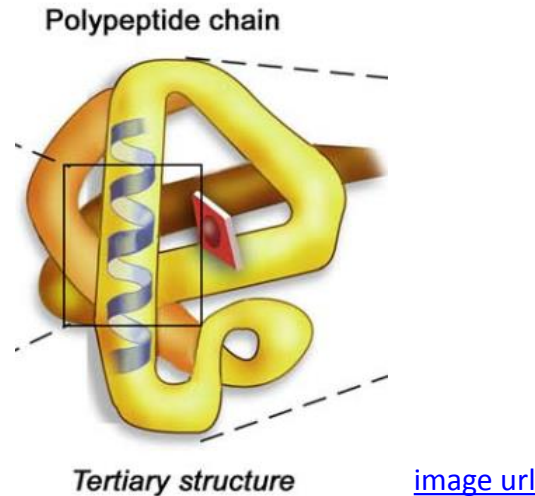


[image url](#)

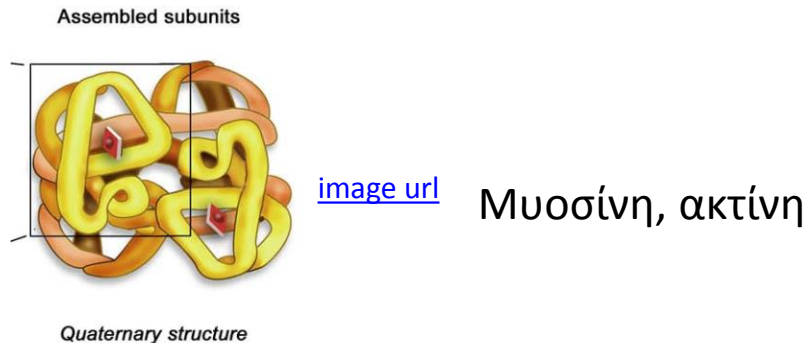


Δομή Πρωτεϊνών

Τριτοταγής Δομή: Διαφορετικές διευθετήσεις 2ταγούς δομής
Τελικό και λειτουργικό σχήμα που αποκτά η πρωτεΐνη μετά κι από την αλληλεπίδραση των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων



Τεταρτοταγής Δομή: Διαφορετικές διευθετήσεις πολυπεπτιδικών αλυσίδων



Δομικές ιδιότητες πρωτεϊνών

Πρωτεΐνη	MB (daltons)	Τύπος: Σφαιρική (G) Ινώδης (F) Ελικοειδής (RC)	Δευτεροταγής Δομή		Αριθμός Αμινοξέων	Αριθμός S-S	Αριθμός SH	pI	Αριθμός υπομονάδων	Αλληλουχία γνωστή (Γ) άγνωστη (Α)	Προσθετική ομάδα (% w/w)	Μέση υδροφοβικότητα (kJ/mol)
			α-έλικα (%)	β- πτυχωτό φύλλο (%)								
Μυοσΐνη	475.000	F	Υψηλό		4500	0	40	4 – 5	6	Γ μερικώς	Φωσφόρος	4,25 (κουνέλι)
Ακτίνη	42.000	G→F				0	5-6	4 – 5	1 – 300			4,4 (κουνέλι)
Κολλαγόνο (τροποκολλαγόνο)	300.000	F	Έλικα κολλαγόνου					~9	3	Γ μερικώς		4,5 (κοτόπουλο)
αS ₁ -Καζεΐνη Β	23.500	RC			199	0	0	5,1	1	Γ	Φωσφόρος 1,1	5,0
β-Καζεΐνη Β	24.000	RC			209	0	0	5,3	1	Γ	Φωσφόρος 0,56	
Κ-Καζεΐνη Β	19.000	RC			169	0	2	4, 1 – 4, 5	1	Γ	Υδρογονάνθρακες 5 Φωσφόρος 0,22	
β-Λακτογλοβουλίνη	18.400	G	10	30	162	2	1	5,2		Γ		5,15
α-Λακτογλοβουλίνη Β	14.000	G	26	14	123	4	0	5,1		Γ		4,8
Οβαλβουμίνη	45.000	G				1 ή 2	4	4,6			Υδρογονάνθρακες 3,3 Φωσφόρος	4,65
Αλβουμίνη ορού	69.000	G				17	1	4,8	1	Γ		4,7
Γλυαδίνη (α,β,γ)	30.000-45.000	G→F	30			2 – 4			15	Γ μερικώς		4,5
Γλουτεΐνη	1.000.000	F	15			50			12			
Γλυκινίνη	350.000	G	5	35		23	2	4,6	9	Α		
Κογγλυκινίνη	200.000	G	5	35		2		4,6		Α	Υδρογονάνθρακες 4	



Ρόφηση Πρωτεϊνών

Σημασία Αλληλεπίδρασεις Πρωτεϊνών με επιφάνειες

Επηρεάζουν - Μεταβάλλουν τη ρόφηση κυττάρων

Εκκινούν βιολογικές αντιδράσεις στη προσθήκη «ξένου σώματος»

Αποτελούν το κεντρικό σημείο σχεδιασμού βιοαισθητήρων και διαγνωστικών συσκευών ανάγνωσης βιομορίων

Εκκινούν την έναρξη άλλων βιο-αλληλεπιδράσεων με την επιφάνεια π.χ προσκόλληση βακτηρίων

Ήδη ροφημένες πρωτεΐνες προκαλούν την βιολογική αντίδραση στα βιοϋλικά

Μηχανισμοί συσσωμάτωσης πρωτεϊνών

Εναλλακτικοί χημικοί δρόμοι όπως αντιδράσεις ανοσοποιητικού μέσω αλληλεπίδρασεις αντί – αντί (antigens – antibodies)

In – vitro δοκιμές ρόφησης πρωτεϊνών αποτελούν την 1^η δοκιμή βιοσυμβατότητας βιοϋλικού



Ρόφηση Πρωτεϊνών

Μοντέλο Langmuir

Η απλούστερη περιγραφή αντιστρεπτής ρόφησης

Αναλογία με κινητική χημικών ατιδράσεων



Υποθέτουμε ότι 1 πρωτεΐνη συνδέεται με μια επιφανειακή θέση

[P] = συγκέντρωση πρωτεΐνης στο διάλυμα (# / όγκο)

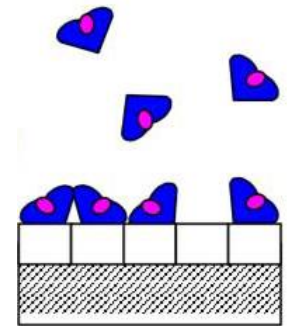
[S] = πυκνότητα ελεύθερων θέσεων στην επιφάνεια (#/επιφάνεια)

[PS] = πυκνότητα επιφανειακών θέσεων που έχουν καταλειφθεί από τη πρωτεΐνη (#/επιφάνεια)

Υποθέτουμε ότι η αντίδραση είναι 1^{ης} τάξης

Ρυθμός ρόφησης = $k_a * [P] * [S]$

Ρυθμός εκρόφησης = $k_d * [PS]$



[image url](#)



Ρόφηση Πρωτεϊνών

$$\text{Ρυθμός ρόφησης} = K_a [P][S] = \text{Ρυθμός εκρόφησης} = K_d [PS]$$

Στην Ισορροπία

$$\text{Ρυθμός ρόφησης} = k_a * [P] * [S] = \text{Ρυθμός εκρόφησης} = k_d * [PS]$$

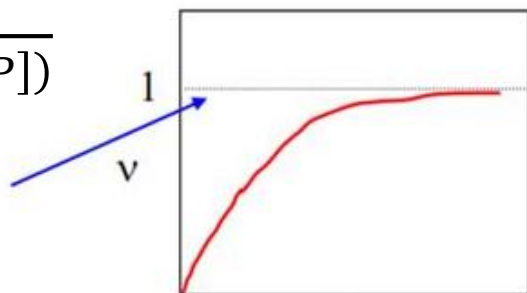
Με βάση την υπόθεση της αντιστρεψιμότητας αντίδρασης ορίζουμε

«Σταθερά Ισορροπίας»
$$K = \frac{K_a}{K_d} = \frac{[PS]}{[P][S]}$$

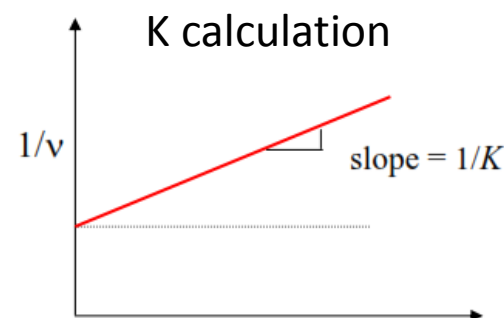
Η σταθερά K υπολογίζεται πειραματικά με μέτρηση του ποσοστού των θέσεων που καταλαμβάνεται από πρωτεΐνες $v = \#/\text{θέσεις που καταλήφθηκαν} / \text{συνολικές θέσεις}$

$$v = \frac{[PS]}{([S] + [PS])} = \frac{K[P]}{1 + K[P]}$$

Binding plateaus at $v=1$,
monolayer coverage.



[P] [image url](#)

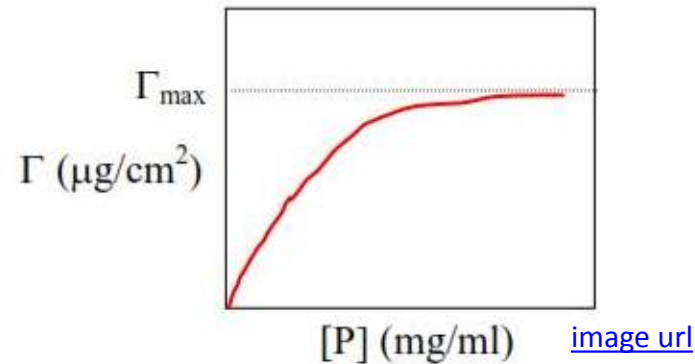


1/[P] [image url](#)



Ρόφηση Πρωτεϊνών

Στα πειράματα ρόφησης αυτό που μετράμε συνήθως είναι η επιφανειακή συγκέντρωση σε ng/cm^2 ή $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ το οποίο το συμβολίζουμε με Γ ή θ



Στο Γ_{max} θεωρούμε ότι έχουμε πλήρη κάλυψη και υπολογίζουμε την αποτελεσματική επιφάνεια A_{eff} ενός μόριου πρωτεΐνης στην επιφάνεια

$$A_{\text{eff}} = \frac{M_{\text{protein}}}{N_{\text{Av}} \Gamma_{\text{max}}}$$

M = μοριακό βάρος πρωτεΐνης, N_{av} = αριθμός Avogardo



Παράδειγμα Ρόφησης Πρωτεϊνών

Υποθέτοντας μοντέλο ρόφησης τύπου Langmuir, να υπολογίσετε τη σταθερά ισορροπίας K_a (ή σταθεράς χημικής συγγένειας) για τη ρόφηση της πρωτεΐνης μυοσΐνης σε επιφάνεια πολυαιθυλενοξειδίου διαστάσεων $1 \times 1 \text{ cm}^2$. Επιπλέον, να υπολογίσετε την επιφάνεια που καταλαμβάνει ένα ροφημένο μόριο της πρωτεΐνης θεωρώντας ότι η μέγιστη ποσότητα που μπορεί να ροφηθεί ανά μονόστρωμα είναι 0.04 mg . Για τους υπολογισμούς δίνονται μοριακό βάρος της πρωτεΐνης (460.000 gr/mol), ο αριθμός Avogadro ($6.023 \times 10^{23} \text{ molec/mol}$) καθώς επίσης και τα κάτωθι δεδομένα από πειράματα ρόφησης:

Συγκέντρωση πρωτεΐνης (mg/ml)	Ποσοστό κάλυψης επιφάνειας (%)
0.01	0.04
0.11	0.32
0.59	0.71
3.8	0.94
4.12	0.95



Λύση παραδείγματος Ρόφησης Πρωτεϊνών

$$v = \frac{[PS]}{([S]+[PS])} = \frac{K[P]}{(1+K[P])}$$

$$K = \frac{v}{([P] - v[P])}$$

Συγκέντρωση πρωτεΐνης (mg/ml)	Ποσοστό κάλυψης επιφάνειας (%)	K
0.01	0.04	4.17
0.11	0.32	4.28
0.59	0.71	4.15
3.8	0.94	4.12
4.12	0.95	3.80

$$A_{eff} = \frac{M_{protein}}{N_{Av}\Gamma_{max}}$$

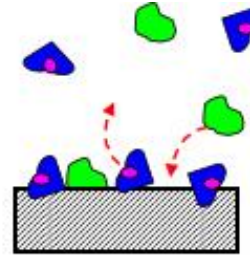
$$A_{eff} = 1.91E-14 \text{ cm}^2$$



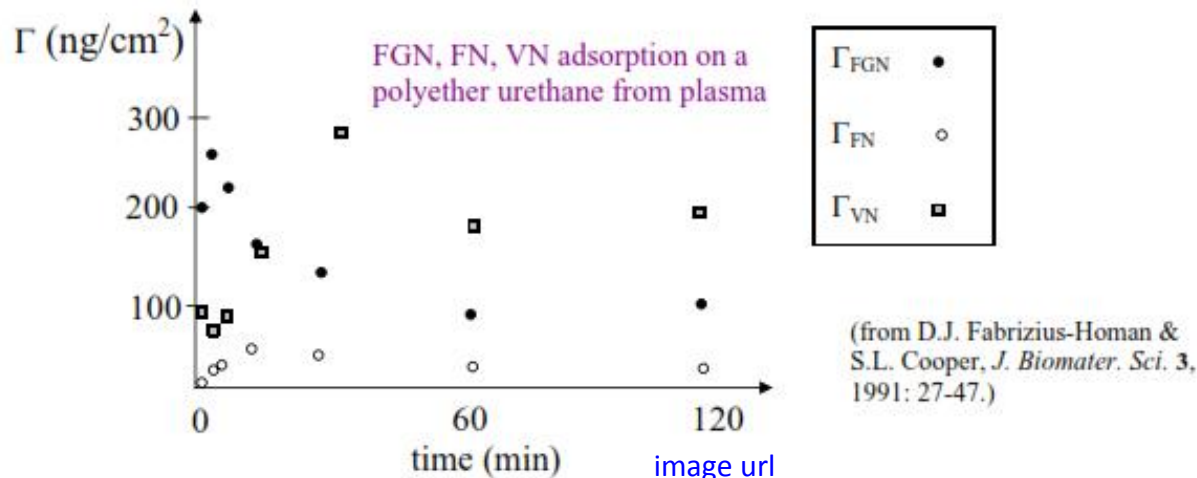
Άλλα μοντέλα ρόφησης πρωτεϊνών

Ανταγωνιστική ρόφηση

Στο βιολογικό περιβάλλον περισσότερες από 1 πρωτεΐνες
Κατανομή τους στην επιφάνεια εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους
και το χρόνο



Αντικατάσταση μιας ήδη ροφημένης πρωτεΐνης από άλλη ονομάζεται φαινόμενο
Vroman



Ανταγωνιστική ρόφηση

Φαινόμενο Vroman

Αντικατάσταση πρωτεΐνης
με άλλη

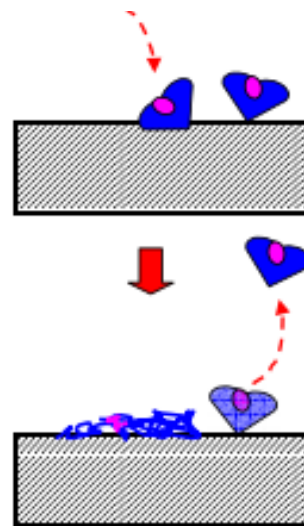
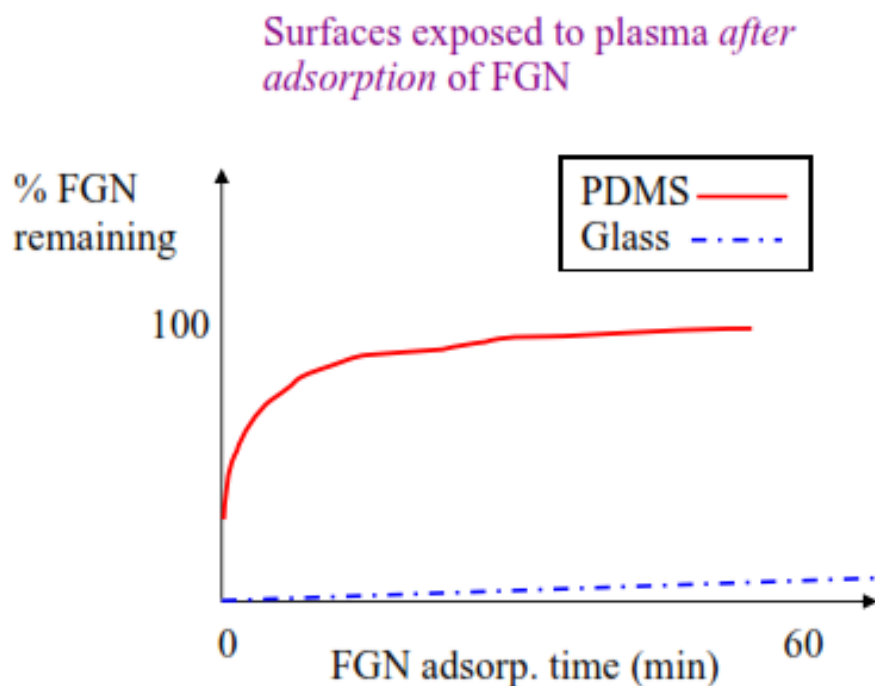
Protein	Plasma conc. (mg/ml)	MW (Daltons)
Human serum albumin	42	68,500
Immunoglobulins	28	145,000 (IgG)
Fibrinogen	3.0	340,000
Fibronectin	0.3	240,000
Vitronectin	0.2	60,000

Ρόφηση Πρωτεϊνών

Μη αντιστρεπτή ρόφηση

Συμβαίνει τόσο σε in-vitro όσο και σε in-vivo πειράματα με μακροχρόνια παραμονή της επιφάνειας στο διάλυμα πρωτεϊνών

Πολύπλοκη επίλυση – Σημαντική εξάρτηση από επιφάνεια



Μη αντιστρεπτή ρόφηση

Εξαρτάται από την επιφάνεια

[image url](#)

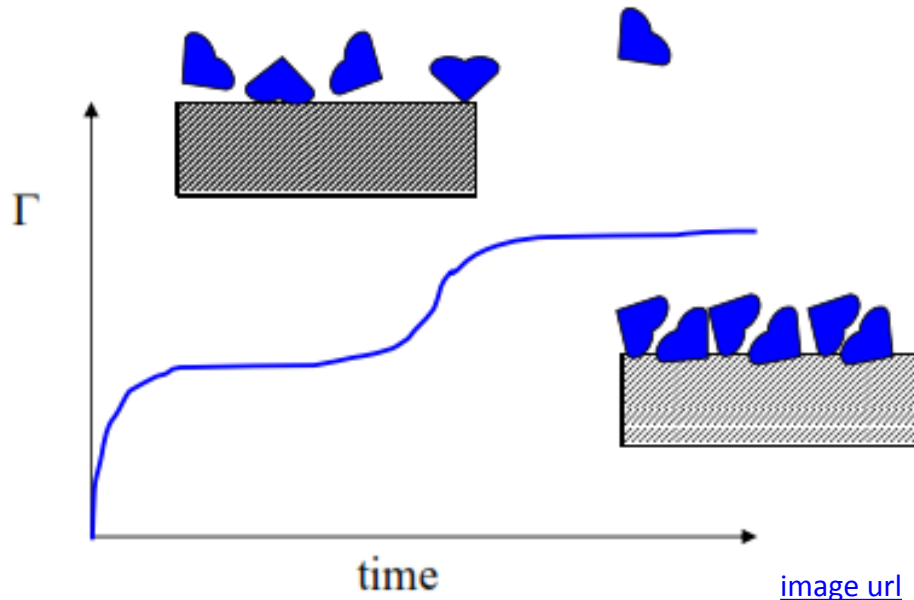
(from S.M. Slack and T.A. Horbett, *J. Colloid & Intfc Sci.* 133, 1989: 148.)



Ρόφηση Πρωτεϊνών

Αναδόμηση

Μετά το σχηματισμό μονοστρώματος ακολουθεί αναδιοργάνωση της επιφάνειας και μεταβολή της ισόθερμου ρόφησης



Αυτο-οργάνωση
σχηματισμός
μονοστρώματος

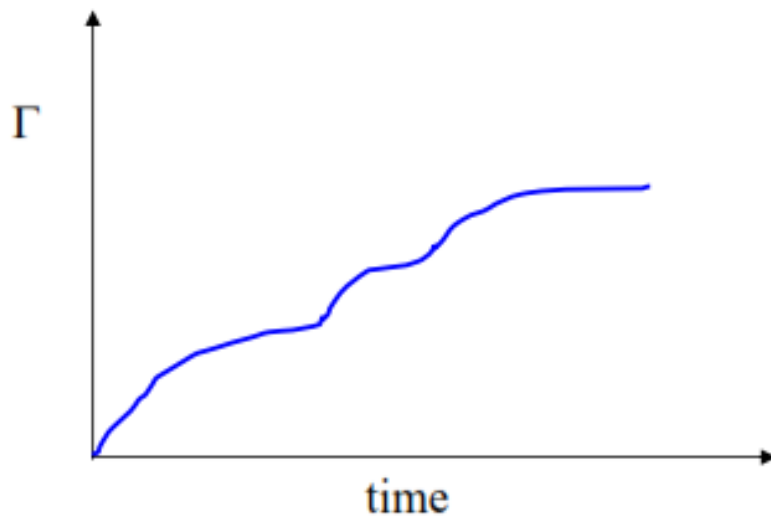
Χαρακτηριστικές
βηματικές ισόθερμες



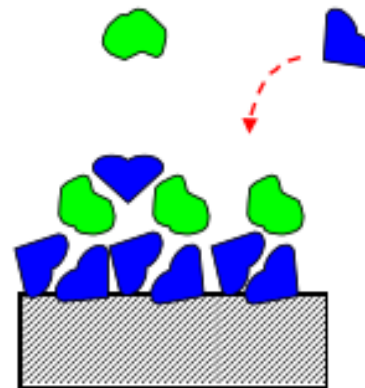
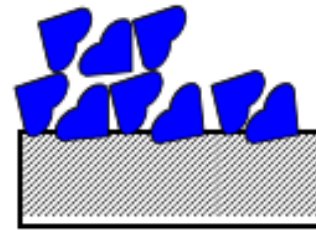
Ρόφηση Πρωτεϊνών

Σχηματισμός πολλαπλών στρωμάτων

Πριν δημιουργηθεί μονόστρωμα και καλυφθεί πλήρως η επιφάνεια σχηματίζεται νέο μονόστρωμα. Πολύπλοκες καμπύλες ρόφησης



[image url](#)



Σχηματισμός
πολυστοιβάδων

Εξάρτηση από
υπόστρωμα



Μετρήσεις Ρόφησης Πρωτεϊνών

Μέθοδος σήμανσης: Μαρκάρισμα πρωτεΐνης για ποσοτικά αποτελέσματα

A. Χρήση ραδιο-ισότοπων

Πρωτεΐνες σημαδεύονται με κάποιο ισότοπο που συμμετέχει στην αντίδραση

e.g., tyrosine labeling with ^{125}I ; ^{131}I ; ^{32}P



[image url](#)

- Small % radioactive proteins added to unlabelled protein
- γ counts measured and calibrated to give cpm/ μg

Πλεονέκτημα: Ανίχνευση πολύ μικρών ποσοτήτων

Μειονέκτημα: Επικινδυνότητα – Εκπομπή ακτίνων γ

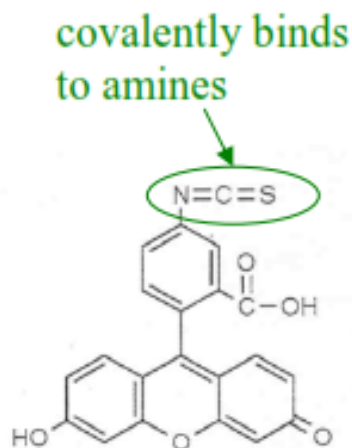


Μετρήσεις Ρόφησης Πρωτεϊνών

Β. Σήμανση με μόρια που φθορίζουν

Μέτρηση φθορισμού μορίων τα οποίο έχουν συδεθεί με πρωτεΐνη

e.g., fluorescein isothiocyanate (FITC)



Φθορισμός

Ασφαλής τεχνική
– όχι πολύ
μεγάλη ακρίβεια

Πλεονέκτημα: Εύκολη τεχνική – απλή χημεία

Μειονεκτήματα: Μπορεί να επηρεάσει τη ρόφηση, απαιτεί απομόνωση πρωτεϊνών, χαμηλή διακριτική ικανότητα, μέτρηση μεγάλων ποσοτήτων

[image url](#)



Μετρήσεις Ρόφησης Πρωτεϊνών

Οπτικές τεχνικές: Ελλειψομετρία

1. linearly polarized light ...

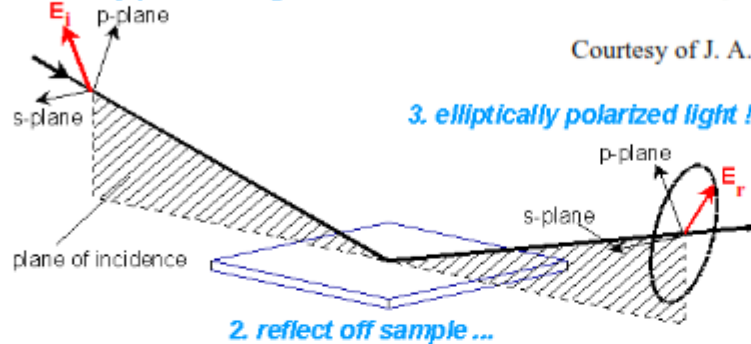


Figure from:

http://www.jawoollam.com/tutorial_1.html

Courtesy of J. A. Woollam Co., Inc. Used with permission.

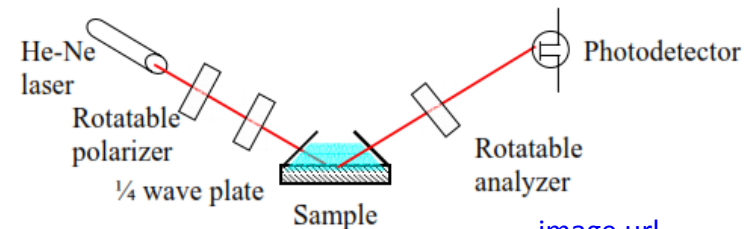
Ελλειψομετρία

Οπτική μέθοδος
δεν απαιτεί
καταστροφή
επιφάνειας

➤ Experimental set-up

Πολωμένο φως ανακλάται από την επιφάνεια
Αλλαγή τόσο στο πλάτος όσο και στη φάση του

[image url](#)



[image url](#)

E_i, E_r = incident/reflected E-field

reflection coefficients: $r_p = \frac{E_{rp}}{E_{ip}} = |r_p| \cdot e^{i\delta_p}$ and $r_s = \frac{E_{rs}}{E_{is}} = |r_s| \cdot e^{i\delta_s}$

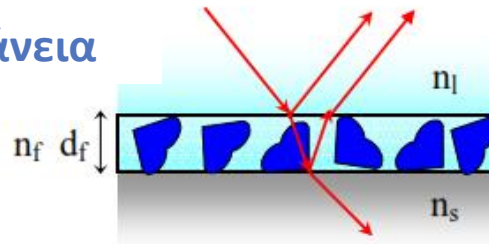
ratio of amplitudes: $\tan \Psi = \frac{|r_p|}{|r_s|}$

phase difference: $\Delta = \delta_p - \delta_s$



Μετρήσεις Ρόφησης Πρωτεϊνών

Πρωτεΐνες στην επιφάνεια



[image url](#)

Οι ροφημένες πρωτεΐνες μεταβάλλουν το δείκτη διάθλασης της επιφάνειας

Η μεταβολή των ελλειψομετρικών δεδομένων συσχετίζεται με το πάχος d_f και το δείκτη διάθλασης n_f της πρωτεΐνης υϊοθετόντας μοντέλο 3 στρωμάτων και ανάκλαση τύπου Fresnel

Ελλειψομετρία

Υπολογισμός πάχους και δείκτη διάθλασης υλικού

Ροφημένη ποσότητα : $\Gamma = d_f \frac{n_f - n_l}{dn/dc}$

R.I. increment of protein solution vs. protein conc. (~0.2 ml/g)

Πλεονεκτήματα: Γρήγορη, Εύκολη, πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της ρόφησης δεν απαιτεί απομόνωση πρωτεΐνης

Μειονέκτημα: Ποσοτικοποίηση απαιτεί κάποιο μοντέλο, απαιτούνται λύες επιφάνειες και δε μπορεί να γίνει διαχωρισμός πρωτεϊνών



Τέλος Ενότητας

Σε περίπτωση που δεν αναφέρεται πηγή, το υλικό έχει δημιουργηθεί από τον ίδιο τον διδάσκοντα.



Σημείωμα Αναφοράς

Copyright Πανεπιστήμιο Πατρών, Όνομα μέλους ή μελών ΔΕΠ 2014:
Ελευθέριος Αμανατίδης. «Βιοϋλικά». Έκδοση: 1.0. Πάτρα 2014. Διαθέσιμο
από τη δικτυακή διεύθυνση: <https://eclass.upatras.gr/courses/CMNG2117/>.



Χρηματοδότηση

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στο πλαίσιο του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα.
- Το έργο «**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο Πανεπιστήμιο Αθηνών**» έχει χρηματοδοτήσει μόνο την αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού.
- Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.



Σημείωμα Αδειοδότησης

Το παρόν υλικό διατίθεται με τους όρους της άδειας χρήσης Creative Commons Αναφορά, Μη Εμπορική Χρήση Παρόμοια Διανομή 4.0 [1] ή μεταγενέστερη, Διεθνής Έκδοση. Εξαιρούνται τα αυτοτελή έργα τρίτων π.χ. φωτογραφίες, διαγράμματα κ.λ.π., τα οποία εμπεριέχονται σε αυτό και τα οποία αναφέρονται μαζί με τους όρους χρήσης τους στο «Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων».



[1] <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Ως **Μη Εμπορική** ορίζεται η χρήση:

- που δεν περιλαμβάνει άμεσο ή έμμεσο οικονομικό όφελος από την χρήση του έργου, για το διανομέα του έργου και αδειοδόχο
- που δεν περιλαμβάνει οικονομική συναλλαγή ως προϋπόθεση για τη χρήση ή πρόσβαση στο έργο
- που δεν προσπορίζει στο διανομέα του έργου και αδειοδόχο έμμεσο οικονομικό όφελος (π.χ. διαφημίσεις) από την προβολή του έργου σε διαδικτυακό τόπο

Ο δικαιούχος μπορεί να παρέχει στον αδειοδόχο ξεχωριστή άδεια να χρησιμοποιεί το έργο για εμπορική χρήση, εφόσον αυτό του ζητηθεί.