
**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΠΕΙΡΑΙΩΣ**



**ΤΜΗΜΑ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΑ και ΔΙΟΙΚΗΣΗ της ΥΓΕΙΑΣ»**

**ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ
ΑΠΟ ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΚΑΙ ΥΠΕΡΕΥΑΙΣΘΗΤΗ
ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΘΡΑΥΣΗΣ DNA ΣΕ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΑ
ΚΥΤΤΑΡΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ
ΤΗΣ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΑΣ
ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΧΑΜΗΛΗΣ ΔΟΣΗΣ**

Τσόκος Δημήτριος

**Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Οικονομικής Επιστήμης
του Πανεπιστημίου Πειραιώς για την απόκτηση
Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης
στα Οικονομικά και Διοίκηση της Υγείας.**

ΠΕΙΡΑΙΑΣ, 2019

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΠΕΙΡΑΙΩΣ**



**ΤΜΗΜΑ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΑ και ΔΙΟΙΚΗΣΗ της ΥΓΕΙΑΣ»**

**ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ
ΑΠΟ ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΚΑΙ ΥΠΕΡΕΥΑΙΣΘΗΤΗ
ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΘΡΑΥΣΗΣ DNA ΣΕ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΑ
ΚΥΤΤΑΡΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ
ΤΗΣ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΑΣ
ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΧΑΜΗΛΗΣ ΔΟΣΗΣ**

**Τσόκος Δημήτριος
Α.Μ.: ΟΔΥ 1649**

Επιβλέπων: Κωνσταντίνος Ε. Βοργιάς, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας Ε.Κ.Π.Α.

**Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Οικονομικής Επιστήμης
του Πανεπιστημίου Πειραιώς για την απόκτηση
Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης
στα Οικονομικά και Διοίκηση της Υγείας.**

ΠΕΙΡΑΙΑΣ, 2019

**UNIVERSITY
of PIRAEUS**



**DEPARTMENT
of ECONOMICS**

M.Sc. in Health Economics and Management

**STATISTICAL ANALYSIS OF EXPERIMENTAL DATA
FROM AN AUTOMATED AND HYPERSENSITIVE
QUANTIFICATION OF DNA DAMAGE IN EUKARYOTIC CELLS
FOR THE BIOLOGICAL ASSESMENT
OF THE LOW DOSE IONIZING RADIATION RISK**

TsokosDimitrios

**Master Thesis submitted to the Department of Economics
of the University of Piraeus in partial fulfillment of the requirements
for the degree of M.Sc. in Health Economics and Management**

Piraeus, Greece, 2019

Στην Ευρυδίκη & στο Νικόλαο

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ τον Κωνσταντίνο Ε. Βοργιά καθηγητή του τμήματος Βιολογίας του Ε.Κ.Π.Α. και το τμήμα Οικονομικής Επιστήμης του Πανεπιστημίου Πειραιώς που μου έδωσαν τη δυνατότητα να πραγματοποιηθεί αυτή η εργασία

**Στατιστική ανάλυση πειραματικών δεδομένων από αυτοματοποιημένη
και υπερευαίσθητη ποσοτικοποίηση θραύσης DNA
σε ευκαρυωτικά κύτταρα για την βιολογική εκτίμηση
της επικινδυνότητας της ιοντίζουσας ακτινοβολίας χαμηλής δόσης**

Σημαντικοί Όροι: Ιοντίζουσα Ακτινοβολία, Ευκαρυωτικά Κύτταρα, Βιολογικοί Δείκτες Δοσιμετρίας, Απεικονιστική Ιατρική Εξέταση, Επίδραση Ακτινοβολίας, Κίνδυνος Ακτινοβολίας, Καρκινογένεση, Πανοραμική Εξέταση, Στατιστική Ανάλυση, Υψηλή Τεχνολογία

Περίληψη

Η εύρυθμη λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού αλλά και συνολικά των ευκαρυωτικών κυττάρων του οργανισμού επηρεάζεται από την αθροιστική έκθεση σε ακτινοβολία και από την στιγμιαία υπερβολική έκθεση σε ακτινοβολία. Η ιοντίζουσα ακτινοβολία σύμφωνα με τη βιβλιογραφία μπορεί να προκαλέσει μεταλλάξεις και σπασίματα του DNA και σαν επακόλουθο συμβάν να επέλθει η καρκινογένεση. Η εργασία αυτή επικεντρώνεται στην έκθεση του ανθρώπινου οργανισμού στην ιοντίζουσα ακτινοβολία, η οποία χρησιμοποιείται σε ιατρικές απεικονιστικές μεθόδους όπως είναι για παράδειγμα η πανοραμική οδοντιατρική απεικόνιση. Δεδομένου πως δεν έχουν ορισθεί ασφαλή όρια για αυτή την ακτινοβολία, ακτινοβολήθηκαν ανθρώπινα στοματικά επιθηλιακά κύτταρα σε πείραμα όπου χρησιμοποιήθηκαν τρεις τιμές ιοντίζουσας ακτινοβολίας, η μηδενική η χαμηλή και η υψηλή δόση ακτινοβολίας. Ακολούθησαν μετρήσεις της γ -H2AXιστόνης, σε δύο χρονικά διαστήματα από τη στιγμή έκθεσης ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων στις διαφορετικές τιμές της ακτινοβολίας. Η γ -H2AX επισημάνθηκε με φθόριο και μετρήθηκε με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού. Η μοριακή βιολογία μας βοηθάει να καταλάβουμε ότι κατά τα δίκλωνα σπασίματα DNA παράγεται αυτή η ιστόνη, και οι μετρήσεις που θα προκύψουν θα αντιστοιχούν σε διπλά σπασίματα DNA των κυττάρων που μελετώνται. Τα δίκλωνα σπασίματα DNA είναι τα πλέον σημαντικά για τη λειτουργία του κυττάρου και αδυναμία επιδιόρθωσής του οδηγεί σε πιθανές καρκινογενέσεις. Στις μετρήσεις που συλλέχθηκαν με τη βοήθεια υψηλής τεχνολογίας, ακολούθησε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου R-Studio. Μέσα από τα

αποτελέσματα που λάβαμε προσπαθήσαμε να εξάγουμε παρατηρήσεις και συμπεράσματα που αφορούν την εκτίμηση της βιολογικής επικινδυνότητας της ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Ο απώτερος σκοπός της μελέτης είναι να αξιολογηθούν οι τιμές της ακτινοβολίας που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα και να μελετηθεί το ρίσκο σε έκθεση ιοντίζουσας ακτινοβολίας, βασιζόμενοι στο σχηματισμό ενός αξιόπιστου δείκτη δοσιμετρίας.

Statistical analysis of experimental data from an automated and hypersensitive quantification of DNA damage in eukaryotic cells for the biological assessment of the low dose ionizing radiation risk

Keywords: Ionizing Radiation, Eukaryotic Cells, Biomarkers, Medical Scanning, Radiation's Effects, Risk of Radiation, Carcinogenicity, Panoramic Scanning, Statistical Study, High Tech Methods

Abstract

The health of humans as well as the proper function of the eukaryotic cells of all organisms are affected by the cumulative radiation exposure and by the instantaneous excessive exposure radiation. The ionizing radiation, according to the global bibliography may cause DNA mutation and DNA breaks, which is possible to result in a possible condition of a carcinogenicity. This master's dissertation focuses on the humans oral cells dysfunction, owing to use of the ionizing radiation to them. This radiation is used to medical scanning methods, such as panoramic dental scanning. Considering that there is not defining official safety limits of the ionizing radiation levels, it takes place an experiment, a trial in which three groups of oral epithelial cells are ionized by three different values of radiation. The radiation defined in zero, low and the high dose of the ionizing radiation. Then, it came up experimental data, of which the number of the γ -H2AX histones in two times after the cell's radiation. The γ -H2AX histones were fluorinated and they detected by the immunofluorescence method. Molecular biology is helpful to understand that after the double strand DNA breaks, in the cell function normally are produced the γ -H2AX histones to restore the DNA breaks. This function is useful for the researchers to estimate the double DNA breaks. Double stranded DNA breaks are the most important for the operational main function of a cell, a possible failure to repair them, it can lead to possible carcinogenesis. The experimental measurements collected with the aid of high technology method. Then, it accomplished a statistical processing of the biodata with the help of the statistical package R-Studio. The trial's data are used for the effort to extrapolate and make useful observations to the correlation and the association between the ionizing radiation, the critical time of the minutes after the radiation moment and the risk of the biological

hazard of the radiation. The ultimate purpose of this study is to evaluate the radiation values which are used in the experiment and to study the risk of exposure to the ionizing radiation, which it will based on the formation of the reliable dosimetry biomarkers.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	ix
Abstract.....	xi
Κατάλογος Εικόνων	xv
Κατάλογος Πινάκων.....	xvii
Κατάλογος Διαγραμμάτων	xix
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Εισαγωγή στο θέμα της εργασίας.....	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Το βιολογικό ερώτημα.....	3
2.1 Τα χαρακτηριστικά της Ο.Υ.Τ., και ο λόγος που οδηγεί σε μελέτη	5
2.2 Η επίδραση της ακτινοβολίας στον άνθρωπο, θεωρητικό υπόβαθρο	7
2.2.1 Ιοντίζουσα ακτινοβολία – χαρακτηριστικά ιοντίζουσας ακτινοβολίας	7
2.2.2 Επιπτώσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας στο DNA.....	8
2.2.3 Επιδιόρθωση δίκλωνης σχάσης του DNA (DNADSBrepair).....	9
2.2.4 Μοριακή βιολογία – Αναφορά στον κυτταρικό κύκλο.....	13
2.2.5 Αναφορά στις ιστόνες	14
2.2.6 Κυτταρική απόπτωση και γονοτοξικότητα	14
2.2.7 Τεχνολογικές προσεγγίσεις.....	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Ο σκοπός της μελέτης.....	19
3.1 Σκοπός.....	19
3.2 Τι μελετάει το πείραμα, που βασίστηκε ο σχεδιασμός του;.....	20
3.3 Διακρίνοντας το πρόβλημα μέσα από πραγματικά δεδομένα. Υπάρχει ασφάλεια των ασθενών και του ιατρικού προσωπικού;	23
3.4 Ο κίνδυνος – Risk.....	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Πείραμα	29
4.1 Παρουσίαση συστήματος, μεθοδολογία.....	29
4.2 Υποθέσεις πειράματος.....	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Αποτελέσματα πειράματος	41

5.1 Ανάλυση πειράματος – Ανάλυση δεδομένων	41
5.2 Περιγραφική στατιστική & επαγωγική στατιστική.....	41
5.3 Οι μεταβλητές.....	41
5.4 Πακέτο R – Studio.....	42
5.5 Τοποθέτηση περιγραφικών στοιχείων και μέτρων & στατιστική μεθοδολογία	43
5.6 Περιγραφική στατιστική.....	50
5.7 Έλεγχος των ερευνητικών υποθέσεων	57
5.8 Καμπύλες αναφοράς.....	68
5.9 Ανάλυση διασποράς για τα διαφορετικά groups κυττάρων	70
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Συμπεράσματα	77
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	83

Κατάλογος Εικόνων

2.2.2	Κύρια είδη επαγόμενων βλαβών DNA (Shikanozo, 2009).....	9
2.2.3α	Μηομόλογησύνδεσητωνάκρων (Non Homologous End-Joining, NHEJ) (Christmann, 2003).....	11
2.2.3β	Επιδιόρθωσηδίκλωνηςσχάσηςτου DNA (DNA Double-Strand Break Repair, DBR) (Christmann, 2003).....	13
3.2	Μηχανισμός επιδιόρθωσης δίκλωνων ρηγμάτων DNA (Li, 2008).....	23
4.1.1	Συσκευή phantom, η οποία έχει τοποθετηθεί σε O.Y.T. Newton 9000 (QRVerontaltaly) που βρίσκεται στην Οδοντιατρική σχολή του Ε.Κ.Π.Α.....	33
4.1.2	FOCISIR20, σε ακτινοβολία 0,2Gy σε χρόνο 20λεπτών	34
4.1.3	FOCISIR240, σε ακτινοβολία 0,2Gy, σε χρόνο 240λεπτών	35
4.1.4	FOCISNC20, σε ακτινοβολία 0,0Gy, σε χρόνο 20λεπτών.....	36
4.1.5	FOCISNC240, σε ακτινοβολία 0,0Gy, σε χρόνο 240λεπτών.....	37
4.1.6	FOCISPC20, σε ακτινοβολία 2,0Gy, σε χρόνο 20λεπτών	38
4.1.7	FOCISPC240, σε ακτινοβολία 2,0Gy, σε χρόνο 240λεπτών	39
5.5	Διαγράμματα συσχέτισης (Τριχόπουλος Δ., Βιοστατιστική, 2000).....	50
5.6.1	Plot IR20.....	55
5.6.2	Plot IR240.....	55
5.6.3	Plot NC20	55
5.6.4	Plot NC240.....	56
5.6.5	Plot PC20.....	56
5.6.6	Plot PC240.....	56

Κατάλογος Πινάκων

2.2.7	Βασικές τεχνολογικές προσεγγίσεις ανάλυσης των βιολογικών φαινομένων, συνοπτική παρουσίαση.....	17
5.6.1	Read.table	51
5.6.2	Head.class	51
5.6.3	Εύρεση ελάχιστης τιμής	52
5.6.4	Περιγραφικά μέτρα μεταβλητών για κάθε group	53
5.7.1	t-test των ($\mu_{ir20} = \mu_{ir240}$).....	58
5.7.2	t-test ($\mu_{nc20} = \mu_{nc240}$).....	59
5.7.3	t-test ($\mu_{pc20} = \mu_{pc240}$).....	60
5.7.4	t-test ($\mu_{nc20} = \mu_{pc20}$).....	62
5.7.5	t-test ($\mu_{nc240} = \mu_{pc240}$)	63
5.7.6	t-test ($\mu_{nc20} = \mu_{ir20}$)	66
5.7.7	t-test ($\mu_{nc240} = \mu_{ir240}$)	67
5.8.1	abline ir20 & pc20 και abline ir240 & pc240	68
5.9.1	dataset2	71
5.9.2	summary dataset2	72
5.9.3	summary aov dataset2 Negative Control	73
5.9.4	summary aov dataset2 IR.....	73
5.9.5	summary aov PC.....	74
5.9.6	ablineIR&PC.....	75

Κατάλογος Διαγραμμάτων

- 5.8.1** Γράφημα 1^ο, καμπύλη αναφοράς για τα κύτταρα του group (PositiveControl) και των κυττάρων του group (IR) που έχουν εκτεθεί σε συνηθισμένη ακτινοβολία διαγνωστικής εξέτασης σε χρόνο είκοσι (20) λεπτών69
- 5.8.2** Γράφημα 2^ο, καμπύλη αναφοράς για τα κύτταρα του group (PositiveControl) και των κυττάρων του group (IR) που έχουν εκτεθεί σε συνηθισμένη ακτινοβολία διαγνωστικής εξέτασης σε χρόνο διακοσίων σαράντα (240) λεπτών 70
- 5.9** Καμπύλη αναφοράς για τα κύτταρα που εκτέθηκαν σε υψηλή ακτινοβολία PositiveControl και των κυττάρων που έχουν εκτεθεί σε συνηθισμένη ακτινοβολία IR για κάθε χρόνο μέτρησης75

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1:

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟ ΘΕΜΑ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Τα ανθρώπινα κύτταρα δέχονται συνεχώς ακτινοβολίες είτε από το περιβάλλον είτε από διάφορες ιατρικές απεικονιστικές πράξεις. Η πλέον σημαντική από τις ακτινοβολίες αυτές είναι η ιοντίζουσα ακτινοβολία και εκτός από τα παράπλευρα χημικά αποτελέσματα στα βιομόρια, προκαλεί γενικώς σοβαρές βλάβες στο γεννητικό υλικό των κυττάρων, γνωστή ως διαδικασία υπό τον γενικό όρο DNA Damages. Οι βλάβες αυτές, αντιμετωπίζονται από τα κύτταρα συνεχώς μέσω των μηχανισμών επισκευής και επιδιόρθωσης του DNA (DNA Repair). Η έκταση των βλαβών εξαρτάται από την ένταση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας και βέβαια από τη δόση την οποία προσλαμβάνει το κύτταρο. Δεν είναι καθόλου εύκολο να προσδιορισθεί η ακριβής δόση ακτινοβολίας η οποία δεν προκαλεί απολύτως κανένα πρόβλημα και να προβλεφθούν με ακρίβεια τα αναμενόμενα βιολογικά αποτελέσματα. Ως εκ τούτου υπάρχει μια γενικότερη προσπάθεια να αναπτυχθούν βιολογικοί δείκτες δοσιμετρίας (biomarkers), για τον επακριβή προσδιορισμό της βιολογικής ασφάλειας των διαφόρων ακτινοβολιών.

Είναι αποδεκτό ότι μεγάλες δόσεις ακτινοβολίας σημαίνει μεγάλες ζημιές στο ευκαρυωτικό κύτταρο και είναι πιθανός ο κυτταρικός θάνατος. Ελάχιστες είναι οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί πάνω στις χαμηλές επαναλαμβανόμενες δόσεις που λαμβάνουν οι άνθρωποι μέσω διαφόρων απεικονιστικών ιατρικών εξετάσεων. Αυτό αφορά και το προσωπικό των διαγνωστικών κέντρων, όμως η αποφυγή έκθεσης του προσωπικού εξασφαλίζεται μέσω των εγκαταστάσεων και των προφυλάξεων που λαμβάνονται σαν μέτρα ασφάλειας. Από τη άλλη πλευρά, ο ασθενής είναι σε άμεση επίδραση στην ακτινοβολία και είναι σημαντικό να εξασφαλιστεί η ασφάλεια του σε κάθε απεικονιστική μέθοδο.

Είναι σημαντικό να βρεθεί σε τι ποσοστό στο άτομο το οποίο έχει δεχθεί ακτινοβολία έχει αλλοιωθεί το DNA των κυττάρων του, να γνωστοποιηθεί σε πόσο καιρό τα κύτταρά του ανακάμπτουν και αν αυτό θέτει σε κίνδυνο την υγεία του μέσω καρκινογένεσης ή άλλες ανεπιθύμητες παρενέργειες στα κύτταρα και στον ανθρώπινο οργανισμό ως επέκταση.

Σε αυτή την εργασία θα μελετηθεί η ιοντίζουσα ακτινοβολία που απορροφάται στον ανθρώπινο οργανισμό από την πανοραμική εξέταση δοντιών, η οποία χρησιμοποιείται σε μεγάλο ποσοστό σαν ακτινοδιαγνωστική μέθοδος. Η ακτινοβολία είναι χαμηλής

έντασης και δεν έχει γίνει μέχρι στιγμής σημαντική εργασία και μελέτη για την αξιολόγηση του κινδύνου έκθεσης σε αυτή με τη χρήση βιοδεικτών, ώστε να υπάρχει έλεγχος στο όποιο ρίσκο έκθεσης στην ακτινοβολία.

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία είναι πιθανώς ένα καρκινογόνο αίτιο για τον άνθρωπο. Δεν είναι γνωστό το κατώφλι κάτω από το οποίο άφοβα μπορεί να χρησιμοποιηθεί και να μην προκύψουν οι επιβλαβείς επιδράσεις της στον ανθρώπινο οργανισμό. Η χρήση της ακτινοβολίας γίνεται για να επιφέρει όφελος στον ασθενή υπερβαίνοντας τους κινδύνους που μπορεί να προκαλέσει. Σημαντικό είναι και το γεγονός πως δεν υπάρχει κανονιστικό πλαίσιο στην Ευρωπαϊκή Ένωση και τις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής με ρητά όρια ιοντίζουσας ακτινοβολίας για την οδοντιατρική απεικόνιση. Η μελέτη των επιδράσεων της συγκεκριμένης ακτινοβολίας σε απεικονιστικό επίπεδο πάντα, στοχεύει στην ανάγκη να οριστούν πρωτόκολλα για την ορθή χρήση της και να μπουν τυχών περιορισμοί στην ένταση και στη συχνότητα χρήσης της, για τη μείωση του κινδύνου αλλά και των ανεπιθύμητων ενεργειών που επιφέρει (AbdelkarimA., 2018).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2:

ΤΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΕΡΩΤΗΜΑ

Το επίκεντρο της μελέτης αυτής είναι τα ευκαρυωτικά κύτταρα, και η αντίδρασή τους σε έκθεση μηδενικής, χαμηλής και πολύ υψηλής ιοντικής ακτινοβολίας. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα που μελετάει το πείραμα, είναι κύτταρα με πλήρως σχηματισμένο πυρήνα σε αντίθεση με τα προκαρυωτικά που δεν συμβαίνει αυτό. Το γενετικό υλικό βρίσκεται στον πυρήνα τους και οι αλλαγές στη δομή του όπως τα σπασίματά του DNA είναι υπεύθυνα για μη φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες όπως για παράδειγμα καρκινογενέσεις και για πολλαπλές δυσλειτουργίες των κυττάρων, οι οποίες έχουν αντίκτυπο στον φαινότυπο της υγείας του ανθρώπινου οργανισμού.

Η έκθεση στην ιοντίζουσα ακτινοβολία, επάγει βλάβες στο DNA το οποίο αποτελεί όπως δείχνουν τα δεδομένα και η διεθνής βιβλιογραφία σημαντικό ενδοκυτταρικό στόχο, λόγω του μεγέθους του και της δομής που φέρει. Οι βλάβες παρουσιάζουν ποικιλία και πολυπλοκότητα. Είναι δυνατόν να έχουν διαφορές στα χαρακτηριστικά τους όπως για παράδειγμα στη θραύση του φωσφοδιεστερικού δεσμού, στο σπάσιμο των κλώνων του DNA, στον έναν ή και στους δύο κλώνους όπου και αποκαλούνται σαν singlestrandbreak(SSB) και doublestrandbreak(DSB) αντίστοιχα, στον τύπο των αλλοιώσεων των βάσεων του DNA καθώς και στην θέση της απώλειας της βάσης DNA που δεν είναι πάντα το ίδιο σημείο.

Οι βλάβες του DNA χωρίζονται σε δύο κατηγορίες λοιπόν, με τις δίκλωνες θραύσεις να αποτελούν και να θεωρούνται ως οι πλέον επιβλαβείς. Η μη επιδιόρθωσή τους θα οδηγήσει σε κρίσιμες καταστάσεις που αφορά την εύρυθμη κυτταρική λειτουργία αλλά και την βιωσιμότητα του κυττάρου. Ο κίνδυνος μεταλλάξεων και καρκινογένεσης είναι υπαρκτός καθώς φέρει ορατή πιθανότητα πραγματοποίησης σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Το κύτταρο διαθέτει μεθόδους για να αντιμετωπίσει τις επαγόμενες βλάβες με μηχανισμούς που αποκαλούνται ως απόκριση σε βλάβη του DNA. Αυτοί οι μηχανισμοί λειτουργούν καθημερινά σε κάθε έκθεση ακτινοβολίας, στη μηδενική, στην ελάχιστη και στην υψηλή ακτινοβολία που δέχεται ο κάθε οργανισμός είτε αυτή πέφτει μέσα στον καθημερινό τρόπο ζωής ή αφορά μία ακτινοδιαγνωστική απεικονιστική ιατρική πράξη.

Ένας από τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης των θραύσεων DNA είναι ο σχηματισμός των γ -H2AXιστόνων (Histones), μέσω ειδικών μονοπατιών, μοριακά στάδια απόκρισης

σε βλάβη του DNA, τα οποία θα αναπτυχθούν στα παρακάτω μέρη της εργασίας. Σαν εργαλείο μέτρησης των βλαβών του DNA από την ιοντίζουσα ακτινοβολία θα χρησιμοποιήσουμε τις γ -H2AXιστόνες, εκμεταλλευόμενοι τον τρόπο δράσης τους που μας τον εξηγεί παρακάτω η μοριακή βιολογία, και θα ακολουθήσει μελέτη και στατιστική ανάλυσή τους για να εκτιμηθεί ο κίνδυνος αλλοιώσεων του γενετικού υλικού αλλά και των βραχυχρόνιων και μακροχρόνιων κυτταρικών δυσλειτουργιών.

Η συμβολή της μοριακής βιολογίας είναι καθοριστική στην ανίχνευση των κυτταρικών βλαβών που προκαλούνται απότηνιοντίζουσα ακτινοβολία σε κυτταρικό επίπεδο. Οι πιο σημαντικές μέθοδοι για την μελέτη των επιδράσεων των βλαπτικών X-Rays ακτινών είναι ο ανοσοφθορισμός, η μέτρηση της κυττατοξικότητας, η μέτρηση του επιπέδου των πρωτεϊνών μέσω των αντισωμάτων, η μέτρηση της γονιδιακής ενεργότητας με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RealTimePCR) και η ανάλυση του καρυότυπου. Μελετώντας κάθε φορά το λόγο δημιουργίας της βλάβης, το βάθος της, αναλόγως τον χρόνο που διαθέτουμε, ή από τον αριθμό των δειγμάτων που θα χρησιμοποιηθούν για να γίνει το πείραμα, και της τεχνολογικής υποστήριξης που διαθέτει ο κάθε ερευνητής αλλά και με βάση των διαθέσιμων οικονομικών πόρων, θα οδηγηθούμε στην κατάλληλη επιλογή της μεθόδου μελέτης και στον σχεδιασμό του πειράματος το οποίο όπως παρατηρούμε είναι μία ιδιαίτερα σύνθετη διαδικασία με υψηλό βαθμό δυσκολίας. Η ύπαρξη όλων αυτών των μεθόδων είναι σίγουρα σημαντική για να μπορέσουμε να βγάλουμε ένα γενικευμένο συμπέρασμα, όμως τα αποτελέσματα αρκετές φορές είναι αντικρουόμενα όπως θα παραθέσουμε και στη συνέχεια.

Καλούμενοι να δώσουμε μία απάντηση για την εκτίμηση του κινδύνου της ακτινοβολίας των ανθρώπινων κυττάρων σε ιοντίζουσα ακτινοβολία (X-Rays), σχεδιάστηκε ένα πείραμα. Σε αυτή τη μελέτη επισυνάψαμε τις γ -H2AXιστόνες με φθορίζουσα χρωστική ουσία η οποία δίνει μετρήσεις στη μέθοδο μέτρησης του ανοσοφθορισμού. Έπειτα, ανθρώπινα κύτταρα του στοματικού βλεννογόνου εκτέθηκαν σε διαφορετικές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας και σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα υποβλήθηκαν σε μετρήσεις των γ -H2AXιστόνων τους, το οποίο για τον ερευνητή είναι μήνυμα - πληροφορία για τα σπασίματα του DNA τα οποία προκύπτουν στα κύτταρα αυτά έπειτα από την έκθεση τους στην ακτινοβολία. Οι τιμές της ακτινοβολίας που χρησιμοποιήθηκαν προσομοιάζουν σε πραγματικές τιμές ακτινοβολίας οδοντιατρικού υπολογιστικού τομογράφου.

Τα αποτελέσματα που θα εξαχθούν από την ανάλυση των δεδομένων, θα βοηθήσουν να γίνει η προσπάθεια για να εκτιμηθεί ο κίνδυνος μεταλλαξιμότητας και των κυτταρικών βλαβών που πιθανόν ακολουθούν μετά από την έκθεση των κυττάρων σε ακτινοβολία. Με τη βοήθεια του εργαλείου της γ-H2AX η οποία έχει ενδιαφέρον στον τρόπο και μηχανισμό δράσης της όπως προκύπτει βάση της μοριακής βιολογίας, θα δείξει κατά πόσο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν βιοδείκτης. Το σενάριο αυτό, θα μπορούσε να δώσει μηνύματα για τις βραχυχρόνιες και μακροχρόνιες κυτταρικές βλάβες που έχουν πιθανότητα να εμφανιστούν στον ανθρώπινο οργανισμό.

2.1 Τα χαρακτηριστικά της Ο.Υ.Τ. (οδοντιατρική υπολογιστική τομογραφία) και ο λόγος που οδηγεί σε μελέτη

Ο λόγος που έχει ξεκινήσει να ερευνάται η επίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας στα κύτταρα είναι το γεγονός πως έχει γίνει ολοένα και συχνότερη η χρήση των πανοραμικών ακτινογραφιών. Είναι αναγκαίο να ακολουθείται αξιολόγηση του κινδύνου. Αυτό προκύπτει από τη βαρύτητα της σχέσης: μέγιστο όφελος προς ελάχιστο ρίσκο (maximumbenefitwithminimumrisk). Ο αριθμός των διαγνωστικών πανοραμικών εξετάσεων είναι αυξημένος και ένας από τους λόγους που συμβαίνει αυτό όπως έχει παρατηρηθεί, είναι η επανάληψη της διαγνωστικής εξέτασης σε ίδιους ασθενείς, καθώς δεν τυχαίνει πάντα να είναι σωστή ή επιτυχημένη η πρώτη λήψη για την απεικόνιση. Αυτό δυστυχώς οδηγεί τον ασθενή σε επαναπρόσληψη δόσης ακτινοβολίας που φαίνεται να είναι επιβλαβής για τον ανθρώπινο οργανισμό (IsoardiP., 2003).

Ο παραπάνω λόγος βάζει ορισμένους περιορισμούς στην πανοραμική ακτινογραφία. Η ορθή διαδικασία απαιτεί από το ιατρικό προσωπικό να τοποθετήσει στην σωστή/κατάλληλη θέση τον ασθενή. Το σημείο, το οποίο είναι κρίσιμο για τη σωστή θέση, αναφέρεται ως εστιακό στόμιο του μηχανήματος από τον κατασκευαστή και είναι διαφορετικό για το εκάστοτε μηχάνημα διάγνωσης. Ο κάθε κατασκευαστής απαιτείται να εκπαιδεύει ορθά τον χειριστή του μηχανήματος. Οι διαφορετικές οδηγίες χρήσης κάθε διαγνωστικού μηχανήματος είναι αναγκαίο να τηρηθούν με τη σωστή κατεύθυνση από τον εκπαιδευτή του, ώστε να διασφαλιστεί η καλύτερη ποιότητα λήψης στην πρώτη ακτινογραφία και να μην απαιτηθεί επανάληψη της εξέτασης που θα οδηγήσει σε επαναπρόσληψη δόσης ακτινοβολίας στον ασθενή (Friedland B., 1998).

Η πανοραμική ακτινογραφία πλεονεκτεί έναντι των υπολοίπων διαγνωστικών εξετάσεων που ανήκουν στο ίδιο σκοπό απεικόνισης και δίνει υψηλή διαγνωστική αξία

στα χέρια του οδοντιάτρου, του ακτινολόγου και κάθε επαγγελματία υγείας. Δεν είναι χρονοβόρος διαδικασία, δίνει πολλές πληροφορίες για την οδοντική ανάπτυξη, κάτι που είναι πολύ σημαντικό ιδιαίτερα για την παιδική ηλικία και στην ορθοδοντική για τη λήψη χρήσιμων πληροφοριών. Επίσης, μας πληροφορεί ξεχωριστά για την κάθε δομή των δοντιών και των κροταφογναθικών αρθρώσεων που βοηθάει στις κλινικές περιπτώσεις των ασθενών με ασυμμετρία γνάθων. Τέλος, είναι εύκολη στην ανάγνωση των αποτελεσμάτων, στην ερμηνεία τους και στην εξήγηση των αποτελεσμάτων και των ευρημάτων του κάθε ασθενή από το ιατρικό προσωπικό (NohadaniN., 2008), (FriedlandB., 1998).

Η Οδοντιατρική Υπολογιστική Τομογραφία (Ο.Υ.Τ.), είναι μία σύγχρονη τεχνολογία με διαφορετική αρχή λειτουργίας σε σχέση με την Αξονική Υπολογιστική Τομογραφία (Υ.Τ.) πολλαπλών τομών. Η μεγαλύτερη διαφορά τους είναι ότι δεν απαιτείται αρχική λήψη εγκάρσιων τομών για την περαιτέρω ανασύνθεση της εικόνας με τις εγκάρσιες τομές να δημιουργούνται ψηφιακά από τον ηλεκτρονικό υπολογιστή του συστήματος αφού πρώτα επεξεργαστεί το ψηφιακό είδωλο που ακτινοβολήθηκε. Έτσι, προκύπτει σημαντικό πλεονέκτημα για τον Ο.Υ.Τ., πως αφενός η δόση της ακτινοβολίας που δέχεται ο ασθενής αντιστοιχεί σε τρεις ή σε τέσσερις πανοραμικές ακτινοβολίες λιγότερο, (δηλαδή σε μικρότερη δόση ακτινοβολίας στον Ο.Υ.Τ. σε σχέση με τον Υ.Τ.) και αφετέρου στη δυνατότητα που έχει στην απεικόνιση των δοντιών και των γνάθων σε τρεις διαστάσεις του χώρου. Όσο μειωμένη και αν εμφανίζεται όπως αναφέρθηκε η δόση της ακτινοβολίας σε σχέση με τον Υ.Τ., η χρήση του Ο.Υ.Τ. πρέπει να είναι πάντα τεκμηριωμένη.

Ο λόγος της μελέτης αυτής είναι να εκτιμηθεί για πρώτη φορά η ασφάλεια χρήσης του Ο.Υ.Τ. σε μοριακό επίπεδο με τη βοήθεια μοντέρνας και υψηλής τεχνολογικής αξίας μοριακής ανάλυσης. Η μελέτη έχει σκοπό να επιτρέψει την εμπεριστατωμένη εκτίμηση των επιπτώσεων της ιοντίζουσας ακτινοβολίας του Ο.Υ.Τ. και να εστιάσει στη μελέτη του κινδύνου που προκύπτει από την χρήση του Ο.Υ.Τ. για διαγνωστικές εξετάσεις, προσδιορίζοντας τις βραχυχρόνιες επιπτώσεις μελετώντας τον βαθμό επιδιόρθωσης των βλαβών.

Ασφαλής δόση στη διαγνωστική ακτινολογία δεν υπάρχει και κάθε έκθεση στην ιοντίζουσα ακτινοβολία φέρει την πιθανότητα να προκύψει διαφορετική έκβαση στις επιπτώσεις της ακτινοβολίας στην φυσιολογική λειτουργία οποιουδήποτε οργανισμού, το οποίο αποτελεί και το υπό μελέτη ρίσκο. Η χαμηλότερη δόση υποδεικνύει τη

χαμηλότερη πιθανότητα να συμβεί κυτταρική βλάβη. Βέβαια η σοβαρότητα της βλάβης δεν σχετίζεται με το μέγεθος της δόσης της ακτινοβολίας. Είναι σημαντικό να λάβουμε υπόψη πως οι βλάβες που προκαλεί η ιοντίζουσα ακτινοβολία λαμβάνουν χώρα επίσης εγγενώς στον ανθρώπινο οργανισμό. Λόγω της καθημερινής μεταβολικής δραστηριότητας λαμβάνουν χώρα περίπου 240.000 μεταλλάξεις σε κάθε κύτταρο χωρίς να υπάρχει καθόλου ακτινοβολία στο περιβάλλον. Όταν η δόση της ακτινοβολίας είναι δύο (2) Gy, μπορούν να προκληθούν επιπλέον μόλις 4.000 μεταλλάξεις. Αυτό είναι ένα στοιχείο που αποδεικνύει πόσο δύσκολη είναι η μελέτη και τιβαθμό δυσκολίας έχει ο ερευνητής για να εξάγει ένα βέβαιο συμπέρασμα για τον κίνδυνο που προσπαθεί να προσδιορίσει για τις διαφορετικές τιμές δόσης ακτινοβολίας που μελετάει.

2.2 Η Επίδραση της ακτινοβολίας στον άνθρωπο, θεωρητικό υπόβαθρο

2.2.1 Ιοντίζουσα Ακτινοβολία - Χαρακτηριστικά Ιοντίζουσας Ακτινοβολίας

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία είναι μίας μορφής ακτινοβολία υψηλής ενέργειας που μπορεί να προκαλέσει ιονισμό. Μπορεί να φορτίσει δηλαδή την ύλη διώχνοντας ηλεκτρόνια από τα άτομα και με αυτό τον τρόπο να δημιουργούνται τα ιόντα. Από αυτή την ιδιότητά της, παίρνει και το όνομά της 'ιοντίζουσα'. Προκαλεί σπάσιμο των δεσμών των χημικών ενώσεων. Θεωρείται επικίνδυνη για τους ζώντες οργανισμούς καθώς μπορεί να προκαλέσει καρκινογένεση μέσω της αλλοίωσης του DNA (των μορίων του γεννητικού υλικού) που προκαλεί. Οι ακτινοβολίες που προκαλούν ιονισμό είναι οι: Υπεριώδης ακτινοβολία (UV), οι ακτίνες X (X-Rays), οι ακτίνες γ , η ακτινοβολία α , η ακτινοβολία β και τέλος η ακτινοβολία νετρονίων που έχουν υψηλές ταχύτητες. Οι ακτίνες X (X-Rays) χρησιμοποιήθηκαν στην ιατρική ως διαγνωστικό εργαλείο, μέσα από την εφαρμογή τους σε διαγνωστικές ακτινογραφίες. Οι ακτίνες X, ανήκουν στην κατηγορία των ιοντίζουσών ακτινοβολιών. Η ενέργειά τους είναι ικανή να προκαλέσει ιονισμό ατόμων και μορίων από τον αριθμό των εσωτερικών ηλεκτρονίων, και επομένως να παρουσιάσει κινδύνους βλαβών σε ζώντες οργανισμούς.

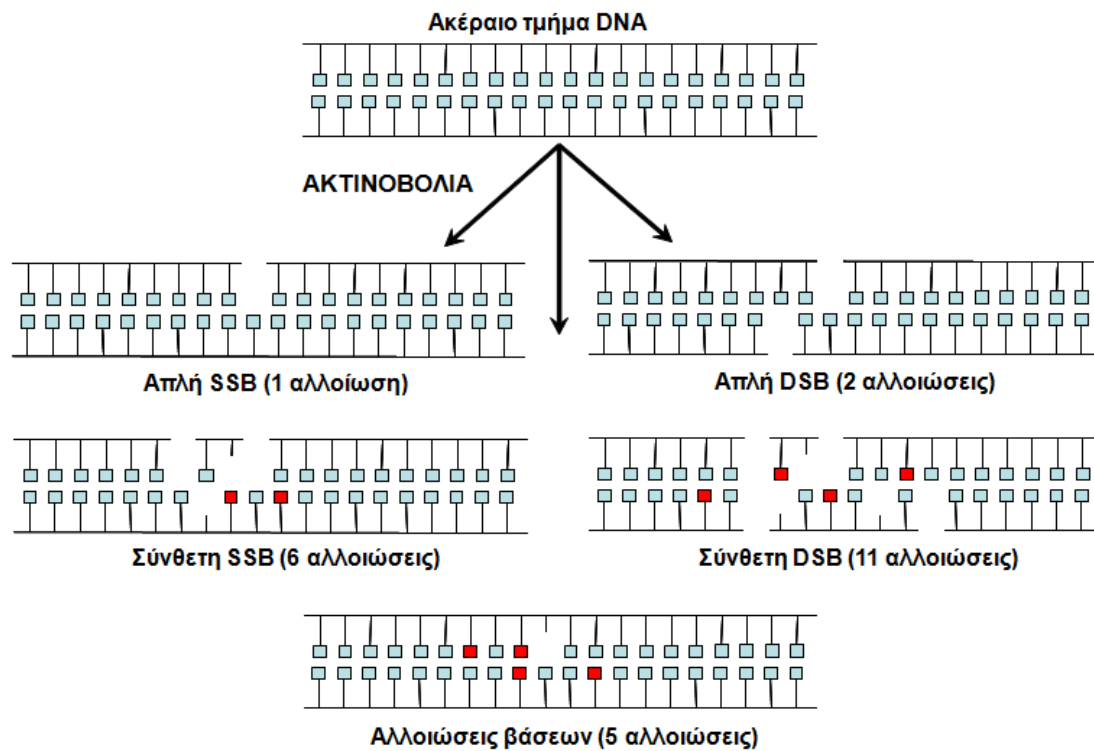
Η έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει στο DNA ποικιλία βλαβών. Τέτοιες είναι η αποσύνθεση, η θραύση (φωσφοδιεστερικού δεσμού) ενός ή δύο κλώνων με χαρακτηριστική ονομασία SingleStrandBreak (SSB) και DoubleStrandBreak (DSB) αντίστοιχα όπως καλούνται στη βιβλιογραφία διεθνώς. Επίσης, μπορεί να προκύψουν οι αλλοιώσεις των βάσεων μέσω της οξειδωσης, της

μεθυλίωσης, της αποπουρίνωσης και της απαμίνωσης, απώλεια βάσης σε αβασικά σημεία της αλυσίδας (APsites) και τέλος ενδοκλωνικές, διακλωνικές και διαμοριακές συνδέσεις με άλλα μόρια DNA ή πρωτεϊνών (Alberts, 2004). Οι υψηλές αυτές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας προκαλούν κυρίως θραύσεις των κλώνων του DNA, τις SSB και τις DSB, ενώ λιγότερο ισχυρές δόσεις ακτινοβολίας θα προκαλέσουν αλλοιώσεις των κλώνων (nicks) και αυτό συμβαίνει με αλλοίωση ή απώλεια βάσης στα αλκαλικά μέρη του κλώνου αλλά και στα ευαίσθητα σημεία του. Η ακτινοβολούμενη δόση της ακτινοβολίας σε αυτά τα κύτταρα προκαλεί, ανά ένα (1) Gυαπορροφούμενης δόσης χαμηλού LET, κατά μέσο όρο περίπου εκατό πέντε (105) ιοντισμούς ανά κύτταρο διαμέτρου 10μm που οδηγούν μέσω της άμεσης και έμμεσης δράσης σε ένα εύρος των πεντακοσίων (500) με χίλιους (1000) SSB, σε είκοσι (20) με τριάντα (30) DSB καθώς και σε χίλιες (1000)- δύο χιλιάδες (2000) βλάβες βάσεων στο DNA οι οποίες βρέθηκαν να έχουν την διάμετρο των 2,3nm κατά μέσο όρο (Georgakilas, 2013). Αξίζει να αναφερθεί ότι καθημερινά σημειώνονται πάνω από 50.000-100.000 βλάβες στο DNA των κυττάρων των θηλαστικών αυθόρμητα ή λόγω της επίδρασης εξωγενών και ενδογενών παραγόντων. Είναι βασικό να κατανοηθεί πως αυτό το περιβάλλον που θα κληθούμε να μελετήσουμε δεν είναι μία σταθερή πλατφόρμα.

2.2.2 Επιπτώσεις Ιοντίζουσας Ακτινοβολίας στο DNA

Από το σύνολο των βλαβών του DNA, εκείνη που σχετίζεται με τα ανεπιθύμητα βιολογικά αποτελέσματα της ιοντίζουσας ακτινοβολίας και ειδικά με τον κυτταρικό θάνατο είναι οι (DSB) δίκλωνες θραύσεις του DNA. Ακόμη και στις ακτινοβολίες χαμηλού LET, η αύξηση της απώλειας ενέργειας των δευτερογενών φορτισμένων ηλεκτρονίων στο τέλος της τροχιάς τους είναι δυνατόν να οδηγήσει σε σύνθετες ή σε ομαδοποιημένες βλάβες του DNA (clustered DNA damage) (Hada, 2008). Σε αυτές περιλαμβάνονται προβλήματα όπως μία ή και περισσότερες θραύσεις του DNA κατά βάση δίκλωνες και μονόκλωνες. Αυτές αντιπροσωπεύουν το 60% με 90% της συνολικής βλάβης του DNA κατά την ακτινοβολία με χαμηλού και υψηλού ποσοστού δόσης ιοντικής ακτινοβολίας. Οι βλάβες αυτές είναι περισσότερο δύσκολο να επιδιορθωθούν σε σχέση με μία μεμονωμένη βλάβη (Shikanozo, 2009). Αυτή η συμπεριφορά υποδεικνύει μία σημαντική διαφορά μεταξύ βλαβών που προκαλούνται στο DNA από την ιοντίζουσα ακτινοβολία και από άλλους παράγοντες όπως είναι οι αυθόρμητες μεταλλάξεις και οι χημικοί ή βιολογικοί παράγοντες. Η συμπεριφορά των

βλαβών των δίκλωνων θραύσεων DNA είναι σύνθετη και η μελέτη τους αρκετά δύσκολη ενώ η δεύτερη αλλοίωση στο γενετικό υλικό είναι τυχαία κατανομημένη και σχετικά απλή (Shikanozo, 2009). Στην εικόνα που ακολουθεί φαίνονται σε μοριακό επίπεδο αυτές οι αλλοιώσεις.



Εικόνα 2.2.2: Κύρια είδη επαγόμενων βλαβών DNA (Shikanozo, 2009)

2.2.3 Επιδιόρθωση δίκλωνης σχάσης του DNA (DNADSBrepair)

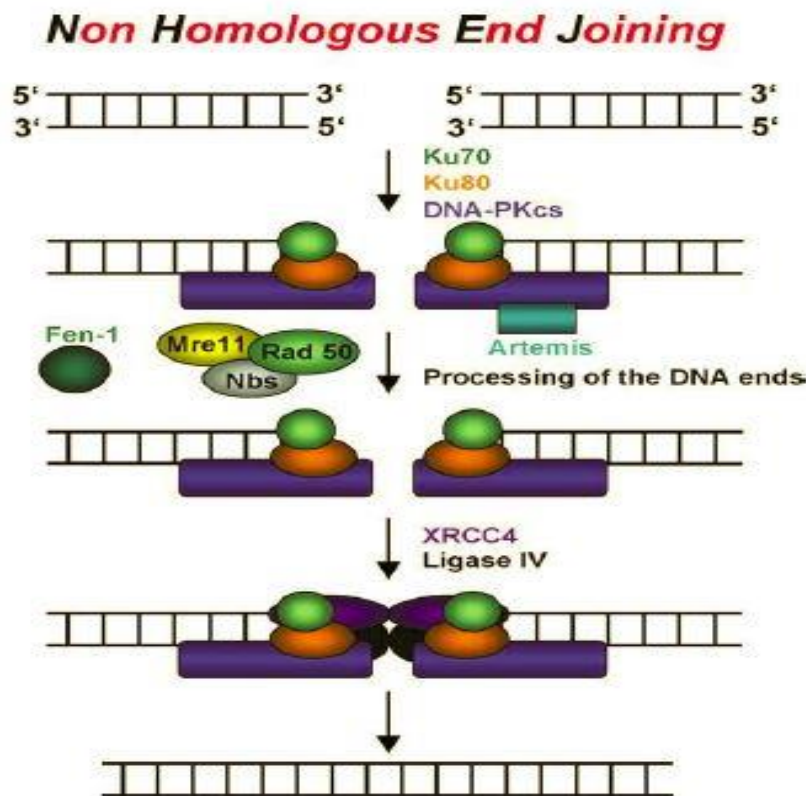
Η θραύση και των δύο αλυσίδων του DNA αποτελεί την πιο επικίνδυνη γενοτοξική βλάβη καθώς σε περίπτωση που δεν επιδιορθωθεί μπορεί να επιφέρει διάφορες χρωμοσωμικές ανωμαλίες ή τον κυτταρικό θάνατο (Pfeiffer, 2000). Όταν υπάρχει έστω και ένα DSB, ο κυτταρικός κύκλος σταματά και ενεργοποιούνται μηχανισμοί επιδιόρθωσης της βλάβης. Υπάρχουν δύο μέθοδοι επιδιόρθωσης αυτών των βλαβών από το κύτταρο, το οποίο θέλει να αποκαταστήσει την φυσιολογική ισοροπία. Οι διπλές θραύσεις του DNA επιδιορθώνονται με δύο τρόπους:

- i) τη μη ομόλογη σύνδεση των άκρων (nonhomologous end-joining, NHEJ) και
- ii) μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού (homologous recombination, HR).

Σημαντικό κριτήριο για την επιλογή του τύπου επιδιόρθωσης είναι η φάση του κυτταρικού κύκλου όπου θα προκείψει η βλάβη. Η μη ομόλογη σύνδεση

πραγματοποιείται κυρίως στη φάση G0 / G1 του κυτταρικού κύκλου, ενώ ο ομόλογος ανασυνδυασμός στο σημείο του τέλους της S ή της G2 φάσης, αφού απαιτείται να έχει προηγηθεί ο αναδιπλασιασμός του DNA και σχηματισμός των δύο αδερφών χρωματιδίων. Καθοριστικός επίσης είναι ο παράγοντας για την επιλογή του επιδιορθωτικού μηχανισμού, ο βαθμός επεξεργασίας των άκρων του DNA καθώς και η NHEJ που δεν απαιτείτηνεκτομή των άκρων (Takata, 1998).

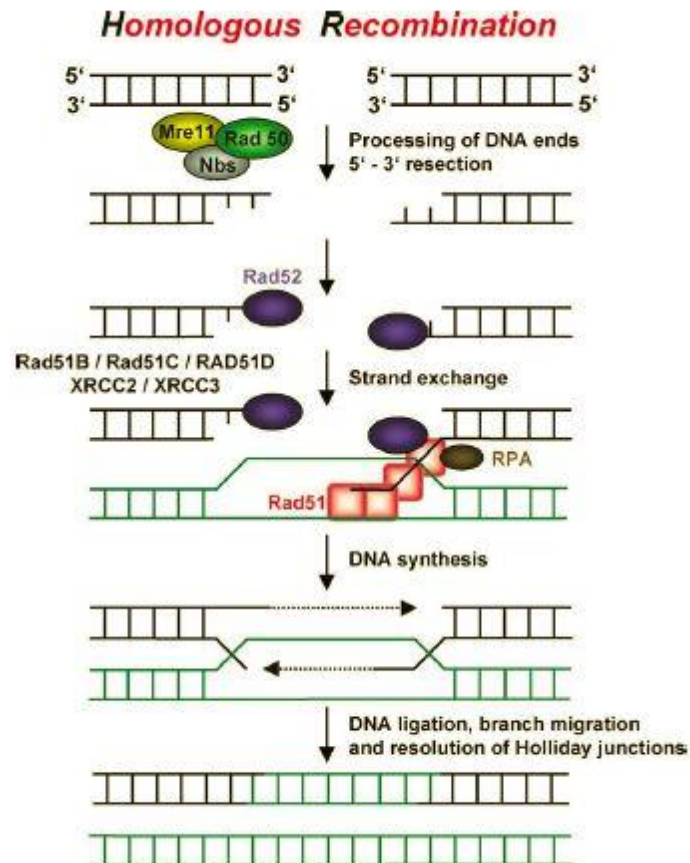
Ο μηχανισμός της NHEJ (μη ομόλογη σύνδεση των άκρων), αποτελεί έναν ταχύ αλλά επιρρεπή στα λάθη μηχανισμό και είναι ο κυρίαρχος επιδιορθωτικός μηχανισμός στα θηλαστικά. Κατά τη μη ομόλογη σύνδεση των άκρων, συνδέονται τα άκρα των αλυσίδων του DNA που έχουν ανοίξει, μία διαδικασία που δεν διασφαλίζει την ομολογία των βάσεων στα σημεία σύνδεσης τους. Το ετεροδιμερές πρωτεϊνικό σύμπλοκοKu70/Ku80 ανιχνεύει τα εκτεθειμένα άκρα του DNA, προσδένεται σε αυτά και επάγει την εκτομή των βάσεων. Στη συνέχεια φέρνει την πρωτεΐνη DNA-PKcs στην περιοχή που είναι η βλάβη και την ενεργοποιεί. Οι DNA-PKcs σταθεροποιούν τα άκρα της διπλής θραύσης του DNA και παρεμποδίζουν την εκτομή των άκρων διαμέσου της φωσφορυλίωσης διαφόρων μορίων. Έπειτα, η δράση της XRCC4-λιγάσης IV θα ολοκληρώσει τη σύνδεσή τους. Η επόμενη εικόνα μας βοηθάει να κατανοήσουμε τη διαδικασία (Christmann, 2003).



Εικόνα 2.2.3α: Μη ομόλογη σύνδεση των άκρων
(NonHomologousEnd-Joining, NHEJ) (Christmann, 2003)

Ο μηχανισμός του ομόλογου ανασυνδυασμού (homologous recombination, HR), συνιστά μια υψηλής πιστότητας επιδιορθωτική διαδικασία για το κύτταρο. Με αυτή την παρέμβαση το τμήμα DNA με την βλάβη υβριδίζεται με το ομόλογο μη κατεστραμμένο τμήμα DNA της αδελφής χρωματίδας, το οποίο λειτουργεί ως πρότυπο για την διαδικασία επιδιόρθωσης. Η διαδικασία του ομόλογου ανασυνδυασμού ρυθμίζεται από τις RAD51 – σχετιζόμενες πρωτεΐνες, που περιλαμβάνουν διάφορα παράγωγα της RAD51 όπως τις RAD52, RAD54 και BRCA2. Ο ομόλογος ανασυνδυασμός ξεκινά με τη νουκλεολυτική εκτομή των δύο σπασμένων αλυσίδων στην κατεύθυνση 5'-3' από το σύμπλοκο MR11-RAD50-NBS1. Κάθε 3' σπασμένο τμήμα του DNA συνδέεται με ένα επταμερές δακτυλιοειδές σύμπλοκο που σχηματίζεται από τις πρωτεΐνες RAD52 και το προστατεύει από περαιτέρω διάσπαση από εξωνουκλεάσες. Κατόπιν το σύμπλοκο RAD52 αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο RAD51 (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 και XRCC3). Αυτό ενεργοποιεί τη διαδικασία ανταλλαγής ομόλογων τμημάτων γενετικού υλικού μεταξύ της κατεστραμμένης και της ακέραιης αδελφής χρωματίδας (Thacker, 1999). Χαρακτηριστικά, μετά από την εναρκτήρια εκτομή των άκρων και την πρόσδεση της

πρωτεΐνης RAD52 στο μονόκλωνο άκρο, η RAD51 σχηματίζει ένα νουκλεοπρωτεϊνικό άκρο. Αυτή η διαδικασία ξεκινάει από το σύμπλοκο RAD51-BRCA2 και είναι σημαντική για την εισβολή της DNA αλυσίδας στον ομόλογο κλώνο και την αξιοποίηση του ως μήτρα για την επανασύνδεση των βάσεων του κλώνου που έχει υποστεί τη βλάβη (Pellegrini, 2002). Η πρωτεΐνη RAD51 αλληλεπιδρά και η RPA. Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία σύνθεσης DNA ακολουθεί η τελική σύνδεση (ligation) και η μεταφορά των επιδιορθωμένων τμημάτων που καλείται branchmigration ή μετανάστευση. Ακολουθεί η εικόνα για να κατανοηθεί καλύτερα ο μηχανισμός που αναφέρθηκε.



Εικόνα 2.2.3β: Επιδιόρθωση δίκλωνης σχάσης του DNA
(DNA Double-Strand Break Repair, DBR) (Christmann, 2003)

2.2.4 Μοριακή Βιολογία, Αναφορά στον κυτταρικό κύκλο

Ο κυτταρικός κύκλος αποτελείται από τα στάδια της μεσόφασης και της μίτωσης. Η μεσόφαση (S) η οποία αποτελεί το 90-95% του συνολικού κύκλου έχει τα στάδια G1, S και G2 ως υποστάδια. Η μίτωση (M) αποτελείται από την πρόφαση, τη μετάφαση, την ανάφαση και τη τελόφαση. Σε ολόκληρο το (S) στάδιο παρατηρείται αντιγραφή του γεννητικού υλικού και η γεννητική πληροφορία διπλασιάζεται. Στο στάδιο της μίτωσης (M), γίνεται η διαίρεση των χρωμοσωμάτων και προκύπτουν δύο αδελφικά κύτταρα. Ενδεικτικά η κυτταρική διαίρεση διαρκεί είκοσι τέσσερις (24) ώρες, όμως υπάρχουν κυτταρικοί κύκλοι με μικρότερη ή μεγαλύτερη διάρκεια όπως των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου που είναι δώδεκα (12) ώρες, των ινοβλαστών στις είκοσι (20) ώρες, στα ηπατοκύτταρα διαρκεί ένα έτος και τέλος δεν συμβαίνει ποτέ κυτταρική διαίρεση σε μυϊκά-νευρικά κύτταρα.

Η αντιγραφή του DNA είναι μία διαδικασία που το γεννητικό υλικό αυτοδιπλασιάζεται προκειμένου να διατηρήσει και να μεταβιβάσει τη γενετική πληροφορία από κύτταρο σε κύτταρο και πραγματοποιείται στον πυρήνα του κυττάρου. Δομικά, ο πυρήνας είναι το μεγαλύτερο οργανίδιο του κυττάρου και εκεί περιέχεται το DNA. Στο φωτομικροσκόπιο ο πυρήνας έχει σφαιρικό ή ωοειδές σχήμα και διάμετρο 5-10 μm. Το πυρηνικό DNA είναι το 20% της μάζας του πυρήνα και συσπειρώνεται μέσω πρόσδεσης του με τις ειδικές πρωτεΐνες, τις νουκλεοπρωτεΐνες και σχηματίζουν τη χρωματίνη. Η χρωματίνη αποτελείται κυρίως από περιελιγμένες ταινίες DNA ενωμένες με βασικές πρωτεΐνες τις ιστόνες (Histones). Με τον τρόπο αυτό σχηματίζονται ακολούθως τα νουκλεοσώματα (Nucleosomes). Στη δομή των νουκλεοσωμάτων βασικό ρόλο παίζουν οι ιστόνες κρατώντας την δομή τους σταθερή. Δύο αντίγραφα από ιστόνη(H2 A), (H2 B), (H3), (H4) περιβάλλονται από 166 ζεύγη βάσεων DNA. Τα νουκλεοσώματα συνδέονται μεταξύ τους με ιστόνες τύπου H1 και H5 και σχηματίζονται οι τελικές δομές που ομοιάζουν με χάντρες κομπολογιού (Alberts, 2004).

2.2.5 Αναφορά στις Ιστόνες

Οι ιστόνες (Histones), H1, H2 A, H2 B, H3, H4, είναι μικρές βασικές πρωτεΐνες, θετικά φορτισμένες και δημιουργούν ιονικούς δεσμούς με το αρνητικά φορτισμένο DNA. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το σύμπλοκο του νουκλεοσώματος αποτελείται από DNA προσδεμένο μετηνιστόνη, που μας κάνουν ως σύνολο τη χρωματίνη. Υπάρχουν μηχανισμοί αποδόμησης της χρωματίνης των νουκλεοσωμάτων που στόχο έχουν την αύξηση της διαθεσιμότητας του DNA στις πρωτεΐνες που ανέλαβαν τη μεταγραφή και άρα τη γονιδιακή έκφραση. Υπάρχουν δύο τρόποι μέσω συμπλόκων αναδόμησης της χρωματίνης χρησιμοποιώντας ATP- chromatinremodelingcomplexes και μέσω ενζυμικής (χημικής) τροποποίησης των ιστόνων με στόχο την προγραμματισμένη έκφραση ή αδρανοποίηση γονιδίων ανταποκρινόμενη σε αναπτυξιακά και περιβαλλοντικά ερεθίσματα και σήματα.

2.2.6 Κυτταρική απόπτωση και Γονοτοξικότητα

Οι παραδοχές πως η κυτταρική απόπτωση υπάρχει εξαιτίας της υψηλής δόσης της ακτινοβολίας υπάρχουν στην βιβλιογραφία. Η κυτταρική απόπτωση βέβαια μπορεί να προκληθεί από εξωκυτταρικούς και ενδοκυτταρικούς παράγοντες όπως οι ιοί, οι

ακτινοβολίες και η αδυναμία επιδιόρθωσης του DNA από τους ίδιους μηχανισμούς του κυττάρου. Αυτό αναφέρεται και σε μία μελέτη του 1992 όπου επιχρίσματα κυττάρων του στοματικού βλεννογόνου προσπάθησαν να τα μελετήσουν έπειτα από έκθεσή τους σε υψηλή δόση ακτινοβολίας. Το συμπέρασμα ήταν να παρατηρηθεί υψηλός ρυθμός κυτταρικής απόπτωσης σε αυτά τα κύτταρα (Tolbert P. E., 1992).

Ο κάθε τύπος κυττάρου επηρεάζεται διαφορετικά στην έκθεση ακτινοβολίας. Σημαντικοί παράγοντες που θα καθορίσουν την κυτταρική βλάβη είναι η ποσότητα της ακτινοβολίας, το είδος της, η απορροφηθείσα δόση, το είδος του κυττάρου, η κυτταρική φάση του κυττάρου, το ήδη στρεσσύρισμα του κυττάρου από το εξωτερικό του περιβάλλον και η ικανότητα του ασθενή να αντέξει τη δράση του γονιδιοτοξικού παράγοντα (J., 1982). Στο συγκεκριμένο πείραμα παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν διαφορετικά την μελέτη των κυττάρων είναι το κάπνισμα, η κατανάλωση τροφής, καθώς επηρεάζει το pH τους στοματικού βλεννογόνου καθώς και βακτηριακές ή άλλου τύπου μολύνσεις ή φλεγμονές. Αυτοί είναι λίγοι μόνο παράγοντες που κάνουν το στοματικό επιθήλιο μία μη σταθερή πλατφόρμα μελέτης.

Αναφερόμενοι τώρα στην γονοτοξικότητα, περιγράφεται η ιδιότητα των χημικών παραγόντων ή ακτινοβολιών να καταστρέφουν τη γενετική πληροφορία. Είναι δυνατόν να προκληθούν μεταλλάξεις που θα οδηγήσουν σε καρκινογένεση. Οι αλλοιώσεις του DNA επάγουν μεταλλάξεις, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε μόνιμες αλλαγές στα σωματικά ή τα γεννητικά κύτταρα. Τα κύτταρα έχουν μηχανισμούς επιδιόρθωσης για να εμποδίσουν την έκφραση της γονιδιοτοξικής μετάλλαξης. Αυτό θα γίνει με επιδιόρθωση από ειδικά ένζυμα ή με απόπτωση του DNA. Δύναται η μη σωστή επιδιόρθωση με επακόλουθο την πιθανότητα μόνιμης βλάβης και τη μεταλλαξιογένεση.

Το DNA αποτελεί έναν κρίσιμο στόχο για τις βιολογικές επιπτώσεις όπως κυτταρική θνησιμότητα, μεταλλάξεις και καρκινογένεση, οξειδωτικές διεργασίες που εξαρτώνται όπως έχει αναφερθεί και από χημικούς παράγοντες εκτός από φυσικούς και αυτό το αίτιο είναι η ιοντίζουσα ακτινοβολία (Georgakilias, 2012). Ακόμη μία σημαντική πηγή οξειδωτικού στρες των κυττάρων είναι η ενδογενής παραγωγή δραστικών οξειδωτικών ενώσεων και ελεύθερων ριζών οξυγόνου και αζώτου (Reactive Oxygen, Nitrogen Species ROS/RNS), λόγω της μεταβολικής δραστηριότητας του κυττάρου.

Μελέτες γονοτοξικότητας και κυττοτοξικότητας έχουν πραγματοποιηθεί σε παιδιατρικές μελέτες καθώς οι μικρές ηλικίες είναι περισσότερο ύποπτες για αναπτυξιακά προβλήματα και παρουσίαση εκφυλιστικών νοσημάτων. Υπήρξε μελέτη

τοξικότητας της επίδρασης της X-Ray ακτινοβολίας σε επιθηλιακά κύτταρα παιδιατρικού πληθυσμού (BuccalEpithelialCells) έπειτα από πανοραμική ακτινογραφία. Ήδη είναι γνωστό πως υπάρχει κίνδυνος σε αυτή την διαγνωστική εξέταση, αλλά για τις παιδικές ομάδες και στις μικρές ηλικίες, εκτιμήθηκε πως υπάρχει ο διπλάσιος κίνδυνος σε σχέση με τους ενήλικες και είναι απαραίτητο να υπάρχει συγκεκριμένη προσοχή ώστε να αποφευχθεί η γονοτοξικότητα (genomicdamage) (AgarwalP., 2015).

2.2.7 Τεχνολογικές Προσεγγίσεις

Θα θέλαμε να μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε την καλύτερη τεχνολογική προσέγγιση για να μελετήσουμε την επίδραση της χαμηλής δόσης της ακτινοβολίας σε κύτταρα και σε ιστό. Το βιολογικό μας υλικό είναι κυτταρικές σειρές οι οποίες έχουν εκτεθεί σε ακτινοβολίες. Η συγκεκριμένη προσέγγιση δεν προσομοιάζει την στοματική κοιλότητα αλλά τα πειραματικά δεδομένα έχουν επιστημονική αξία. Οι μέθοδοι ανάπτυξης των κυτταρικών σειρών που μπορούμε να συναντήσουμε είναι: Οι κυτταρικές σειρές HEK293 (humanembryonickindney), η CV1 (Cercopithecusaethiops) και η CHO (Chinesehamsterovary) σε απλή στειβάδα που έχει ακτινοβοληθεί 2D καλλιέργειες ή σε 3D καλλιέργειες κυττάρων. Η τελευταία μέθοδος είναι νέα τεχνολογία δεν είναι αρκετά διαδεδομένη και το κόστος της είναι αρκετά υψηλό. Βέβαια, πλεονεκτεί γιατί είναι η μέθοδος που προσομοιάζει καλύτερα στον ιστό τόσο σε φυσιολογικό επίπεδο όσο και σε γεωμετρικό.

Η επίδραση της ακτινοβολίας χαμηλής δόσης σε κύτταρα μπορεί να μελετηθεί σε πολλά επίπεδα. Το κάθε ένα επίπεδο εξαρτάται από το τι έχουμε σκοπό να απαντήσουμε στο βιολογικό ερώτημα που διαχειριζόμαστε κάθε φορά, για ποιο λόγο να το πραγματοποιήσουμε και για το μηχανιστικό βάθος που θα χρησιμοποιηθεί στο πείραμα. Για τον σχεδιασμό της μελέτης και την τελική επιλογή της τεχνολογικής προσέγγισης που θα χρησιμοποιηθεί παίζει ρόλο ο διαθέσιμος χρόνος του ερευνητή ή του ερευνητικού προγράμματος, ο αριθμός των διαθέσιμων δειγμάτων από κύτταρα ή από ασθενείς και τέλος η υφιστάμενη τεχνολογική και οικονομική υποστήριξη. Παρακάτω θα προστεθεί ένας ενδεικτικός πίνακας που δίνει συνοπτικές πληροφορίες για τις υπάρχουσες μεθόδους:

Πίνακας 2.2.7: Βασικές Τεχνολογικές Προσεγγίσεις Ανάλυσης των Βιολογικών Φαινομένων, Συνοπτική Παρουσίαση

Τεχνολογική προσέγγιση	Τι πληροφορία μπορούμε να αποκομίσουμε	Πόσο εφικτή είναι σε ένα καλό εργαστήριο	Βαθμός δυσκολίας της μεθόδου	Πόσο κοστοβόρος είναι η μέθοδος
Μέτρηση κυτταροτοξικότητας MTT	Το βαθμό στον οποίο ένας παράγοντας εμφανίζει καταστροφική δράση σε συγκεκριμένα κύτταρα	Απαιτεί κατάλληλο εξοπλισμό	Απλή μέθοδος	Δεν απαιτεί μεγάλο κόστος
Ανοσοφθορισμός	Ανίχνευση και εντόπιση ενός αντιγόνου - μορίου που μας ενδιαφέρει στα καλλιεργούμενα κύτταρα	Απαιτεί κατάλληλο εξοπλισμό	Απλή μέθοδος	Εξαρτάται το κόστος των αντισωμάτων
Ανοσοστύπωμα Western	Εντοπισμός και μέτρηση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών που μας ενδιαφέρουν σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων	Εφικτή σε οποιοδήποτε καλό εργαστήριο	Απλή μέθοδος	Εξαρτάται το κόστος των αντισωμάτων
Πρωτεομική ανάλυση κυττάρων	Ανάλυση των εκφραζόμενων πρωτεϊνών των κυττάρων με σκοπό τη μελέτη επιπέδων έκφρασης και τη μελέτη μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων	Απαιτεί εργαστήριο με ειδικά μηχανήματα	Χρονοβόρα πειράματα	Υψηλό κόστος
Μεταβολομική ανάλυση κυττάρων	Ανάλυση των εκφραζόμενων πρωτεϊνών των κυττάρων με σκοπό το σχηματισμό συμπλεγμάτων (interactomes) και τον καθορισμό της ενζυμικής ενεργότητας (kinomes)	Απαιτεί εργαστήριο με ειδικά μηχανήματα	Υψηλός βαθμός δυσκολίας	Υψηλό κόστος
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)	Ποιοτική και ποσοτική μέτρηση της έκφρασης γονιδίων σε πραγματικό χρόνο	Εφικτή αν υπάρχει το κατάλληλο μηχάνημα	Απλή μέθοδος	Αρκετά υψηλό κόστος
Μέτρηση της συνολικής γονιδιακής	η μέτρηση του επιπέδου έκφρασης πολλών γονιδίων, μέσω του	Απαιτεί εργαστήριο με ειδικά	Υψηλός βαθμός δυσκολίας	Υψηλό κόστος

έκφρασης με genearrays	υπολογισμού της ποσότητας του mRNA που είναι παρούσα στο κύτταρο για κάθε γονίδιο, σε διάφορες καταστάσεις και διάφορες χρονικές στιγμές.	μηχανήματα		
Πλήρη γενωμική ανάλυση μετά από 2-3 γενιές των κυττάρων μετά την ακτινοβολία	Ταυτοποίηση, μέτρηση και σύγκριση γενωμικών χαρακτηριστικών όπως η αλληλουχία του DNA, η γονιδιακή έκφραση και δομικές παραλλαγές.	Απαιτεί εργαστήριο με ειδικά μηχανήματα	Υψηλός βαθμός δυσκολίας	Υψηλό κόστος
Πλήρη επιγενετική ανάλυση μετά από 2-3 γενιές	Μελέτη αλλαγών στη λειτουργία των γονιδίων που εμφανίζονται χωρίς κάποια αλλαγή στην αλληλουχία του DNA αλλά αφορούν τη μεθυλίωση του DNA, τροποποίηση ιστονών και ρυθμιστικά RNA.	Απαιτεί κατάλληλο εξοπλισμό	Υψηλός βαθμός δυσκολίας	Υψηλό κόστος
Ανάλυση καρυοτύπου	Έλεγχος για τυχόν χρωμοσωμικές ανωμαλίες, δομικές ή αριθμητικές μέσω της απεικόνισης των μεταφασικών χρωμοσωμάτων ενός οργανισμού, όπου διακρίνονται μέγεθος, αριθμός, σχήμα, θέση του κεντρομεριδίου και οι χαρακτηριστικές χρωμοφόρες περιοχές τους	Εφικτή σε οποιοδήποτε καλό εργαστήριο	Απλή μέθοδος	Χαμηλό κόστος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3:

Ο ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

3.1 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να εκτιμηθούν σε μοριακό επίπεδο οι επιπτώσεις της απορροφούμενης ιοντίζουσας ακτινοβολίας από τον οδοντιατρικό υπολογιστικό τομογράφο (Ο.Υ.Τ.) στο στοματικό επιθήλιο. Ως γνωστόν, η απορρόφηση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας από ζωντανό ιστό προκαλεί άμεσα και έμμεσα βλάβες στο γενετικό υλικό του κυττάρου. Το κύτταρο ανταποκρίνεται στο συγκεκριμένο στρες επάγοντας μία σειρά ανιχνευτικών και επιδιορθωτικών μηχανισμών οι οποίοι κάτω από φυσιολογικές συνθήκες θα αποκαταστήσουν τις βλάβες του γονιδιώματος και θα επιτρέψουν τον περαιτέρω πολλαπλασιασμό του συγκεκριμένου κυττάρου. Σε περίπτωση ανεπαρκούς επιδιόρθωσης, επάγονται μηχανισμοί που οδηγούν το κύτταρο σε κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης, εξασφαλίζοντας πως τα γενετικά τροποποιημένα κύτταρα απομακρύνονται από τον οργανισμό και δεν μετατρέπονται σε νεοπλασματικά.

Ο οδοντιατρικός υπολογιστικός τομογράφος (Ο.Υ.Τ., dentalCBCT) χρησιμοποιεί ιοντίζουσα ακτινοβολία και σαν αποτέλεσμα εμπεριέχει πιθανό βαθμό βιολογικής επικινδυνότητας κατά τη χρήση του. Η υπόθεση της μελέτης είναι πως με την χρήση του Ο.Υ.Τ. δεν προκαλούνται μόνιμες βραχυχρόνιες βλάβες στο γένωμα των ακτινοβολούμενων κυττάρων του στοματικού επιθηλίου. Επομένως, με τη χρήση του Ο.Υ.Τ. να μην υπάρχει η πιθανότητα σχηματισμού νεοπλασματικών κυττάρων ή η ύπαρξη αυτής της πιθανότητας να είναι πολύ μικρή.

Η εκτίμηση της μεταλλαξιμότητας των χρησιμοποιούμενων δόσεων του Ο.Υ.Τ. θα πραγματοποιηθεί με τη βοήθεια των ειδικών ιστονών γ -H2AX, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν σαν εργαλεία εντοπισμού των DNA βλαβών για τη μελέτη, και τη μέθοδο του φθορισμού καθώς έχουν επισημανθεί με φθόριο όπου εκπέμπουν σήμα με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού όταν υπάρχει σπάσιμο του DNA και τα οποία αντιστοιχούν σε δίκλιωνα σπασίματα DNA, όπως ήδη έχει αναφερθεί από τη βιβλιογραφία. Αυτές οι μετρήσεις βάση μελετών έχει αποδειχθεί πως σχετίζονται με τις βραχυχρόνιες βλάβες του γενετικού υλικού.

Αναλυτικότερα, σκοπός της μελέτης είναι να προσδιοριστεί σε ανθρώπινη κυτταρική σειρά, σε συνθήκες και δοσολογία που είναι πολύ κοντά στις πραγματικές συνθήκες

ακτινοβόλησης και δοσολογίας που λαμβάνουν τα ανθρώπινα κύτταρα του στοματικού επιθηλίου των εξεταζόμενων, η επίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Οι μετρήσεις της μελέτης του σπασίματος «breaks» του DNA έγιναν σε μηχάνημα υψηλής τεχνολογίας σε τρεις (3) διαφορετικές δόσεις ακτινοβολίας και σε δύο (2) διαφορετικές χρονικές στιγμές. Ως σήμα ανίχνευσης των θραύσεων της διπλής έλικας του DNA έχει χρησιμοποιηθεί ο ανοσοφθορισμός. Αρχικά έχουν επισημανθεί με φθόριο οι ειδικές μορφές ιστόνης γ -H2AX οι οποίες ανιχνεύονται όταν δημιουργούνται σπασίματα στο DNA, και η επισημάνσή τους με φθόριο θα μας δίνει σήμα και στοιχεία μετρήσεων του αριθμού των DNAbreaks για τις επιλεγμένες χρονικές στιγμές των μετρήσεων του πειράματος μετά από την έκθεση των κυττάρων σε τρεις δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας.

3.2 Τι μελετάει το Πείραμα, που Βασίστηκε ο σχεδιασμός του;

Στο πείραμα σκοπός είναι η μελέτη των επιδράσεων της ιοντίζουσας ακτινοβολίας στις εύρυθμες λειτουργίες των κυττάρων. Όσον αφορά στις βιολογικές επιδράσεις της ιοντίζουσας ακτινοβολίας, το DNA αποτελεί το σημαντικότερο ενδοκυτταρικό στόχο, κυρίως λόγω του μεγέθους, της πολυπλοκότητας που φέρει στο σύνολο των λειτουργιών του καθώς και λόγω της δομής του (Prasad, 1984) (Lett, 1992) (Murno, 1958).

Για να γίνει ο τελικός σχεδιασμός του πειράματος, έγινε η μελέτη απόκρισης στην κυτταρική βλάβη έπειτα από την έκθεση του κυττάρου σε ακτινοβολία. Το σύστημα απόκρισης σε βλάβη του DNA, όπως είναι οι DDR, αποτελεί ένα σηματοδοτικό μονοπάτι το οποίο ανιχνεύει τις βλάβες στο DNA. Αξίζει να αναφερθεί πως καθημερινά λόγω του στρες που λαμβάνει χώρα στα κύτταρα κατά την αντιγραφή, ενεργοποιείται αυτή η διαδικασία η οποία είναι ο μηχανισμός προστασίας για το κύτταρο. Δύο οικογένειες πρωτεϊνών συμμετέχουν στην ρύθμιση της απόκρισης σε βλάβη του DNA του κυττάρου. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας PIKKs (Phosphatidylinositol 3- kinase-likekinases) οι οποίες ενεργοποιούνται από παράγοντες που προκαλούν διπλές θραύσεις DNA περιλαμβάνοντας τις ATM, ATR και DNA-PKc καθώς και μέλη της οικογένειας των Poly – ADPriboseπολυμερασών (PARP) (Harper).

Η κυτταρική απόκριση σε βλάβη στο γενετικό υλικό ενεργοποιείται με την ανίχνευση της βλάβης από συγκεκριμένες πρωτεΐνες, που στρατολογούν άλλες με τη σειρά τους στην περιοχή της βλάβης (Zhou, 2000). Πιο αναλυτικά, υπάρχουν δύο

βασικά σημεία σε αυτό το μονοπάτι. Αρχικά, το σύμπλοκο Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) ανιχνεύει τις διπλές θραύσεις του DNA και στρατολογεί την ATM η οποία φωσφορυλιώνει το MRN που αυτοφωσφορυλιώνεται και στη συνέχεια εκεί που υπάρχουν διπλές θραύσεις του DNA, η ιστόνη H2AX φωσφορυλιώνεται στη σερίνη 139 σε γ-H2AX από τις κινάσες ATM, ATR και DNAPKc (Rogakou). Η γ-H2AX ακολούθως ενεργοποιεί επιπλέον παράγοντες στην περιοχή της βλάβης.

Οι *μηχανισμοί* του κυττάρου που ενεργοποιούνται για να αντεπεξέλθει στην αντιμετώπιση των βλαβών είναι:

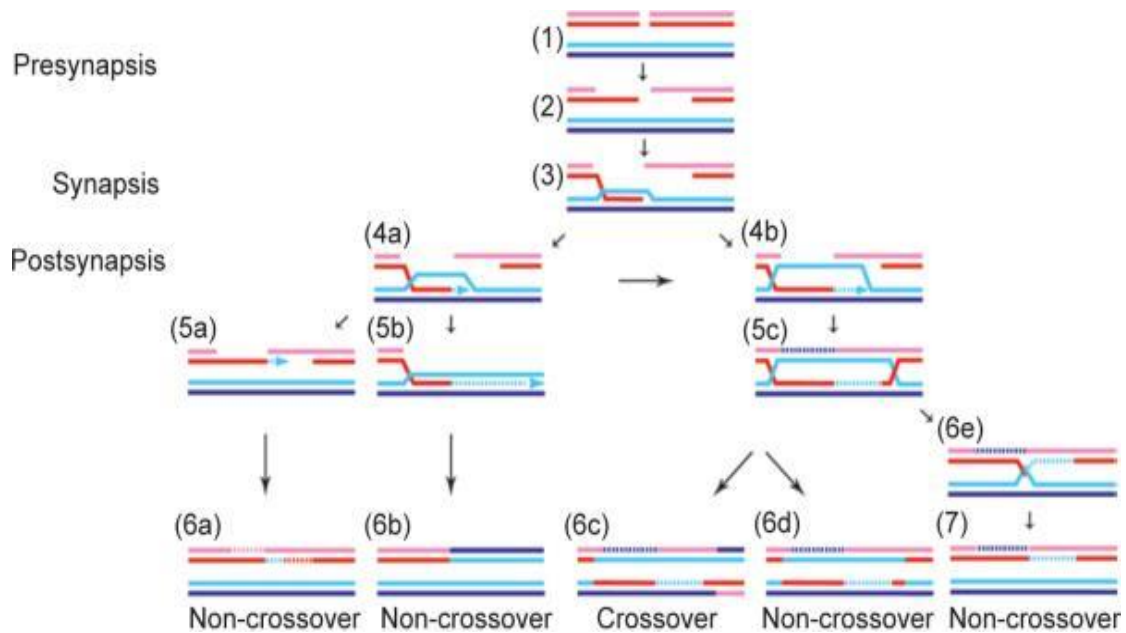
- i) Αφαίρεση της βλάβης του DNA και αποκατάσταση της συνέχειας της διπλής έλικας του DNA
- ii) Ενεργοποίηση ενός σημείου ελέγχου για την βλάβη του DNA, το οποίο αναστέλλει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου έτσι ώστε να αποτραπεί η διαβίβαση των χρωμοσωμάτων που έχουν αντιγραφεί ελλιπώς ή λανθασμένα στην επόμενη κυτταρική γενιά και να επιτραπεί η επισκευή τους
- iii) Μεταγραφική ρύθμιση, η οποία προκαλεί αλλαγές στο προφίλ της μεταγραφής που μπορεί να είναι ευεργετικές για το κύτταρο
- iv) Ενεργοποίηση της διαδικασίας απόπτωσης, η οποία εξαλείφει κύτταρα με συσσωρευμένες βλάβες στο γενωμικό τους DNA σε μεγάλο βαθμό.

Για να μελετηθούν σε καλύτερο επίπεδο αυτοί οι μηχανισμοί υπήρξαν δυσκολίες και χρειάστηκε και αρκετός χρόνος καθώς υπήρχαν δυσκολίες στο να κατανοηθούν πλήρως. Μέχρι το 2001 είχαν ανακαλυφθεί και χαρακτηριστεί ως προς την αλληλουχία τους περίπου 130 γονίδια που συμμετέχουν στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του DNA. Μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη καρκίνου, καθώς και με διάφορα κληρονομικά νοσήματα όπως η αταξία – τηλεαγγειεκτασία και η αναιμία Fanconi (Boutou, 2011). Οι πέντε μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA είναι η ανάταξη (Reversion Repair-RR), η επιδιόρθωση με εκτομή βάσης (Base Excision Repair-BER), η επιδιόρθωση μη συμπληρωματικής βάσης (Mismatch Repair-MMR), η επιδιόρθωση με εκτομή νουκλεοτιδίου (Nucleotide Excision Repair- NER) και η επιδιόρθωση δίκλωνης σχάσης του DNA (DNA Double-Strand Break Repair). Αυτά τα δεδομένα είναι τα πιο πρόσφατα στην διεθνή βιβλιογραφία και βρίσκονται υπό μελέτη. Είναι πράγματι μοριακά βιολογικά μονοπάτια τα οποία έχουν επιβεβαιωθεί και αποδειχθεί.

Η κυτταρική βλάβη ανιχνεύεται και έπειτα ενεργοποιούνται οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης με φωσφορυλίωση της ιστόνης H2AX. Η ιστόνη H2AX είναι ισόμορφη – ποικιλομορφία της ιστόνης H2A. Στους θηλαστικούς οργανισμούς αντιπροσωπεύει το 10% της H2A. Μόλις προκληθεί η βλάβη τύπου DSBs η οποία είναι και αυτή που θα επικεντρωθούμε στο πείραμα όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η ιστόνη H2AX φωσφορυλιώνεται στη σερίνη 139 στο C τελικό άκρο της πρωτεΐνης. Η φωσφορυλιωμένη μορφή της H2AX ονομάζεται γ -H2AX και με τη βοήθεια αυτής μελετάμε την βλάβη που προκύπτει στο DNA στο παρόν πείραμα. Μελετάμε την απόκριση στην βλάβη με τη βοήθεια της γ -H2AX, εκμεταλλευόμενοι τις ιδιότητές της. Η φωσφορυλίωση της ιστόνης H2AX είναι από τα πρώτα στάδια αναγνώρισης DSBs και πραγματοποιείται από κινάσες όπως οι ATM και ATR.

Το γενικό μοντέλο της επιδιόρθωσης της διπλής έλικας του DNA με ομόλογο ανασυνδυασμό περιλαμβάνει τρεις φάσεις. Αυτές είναι η προσύναψη (presynapsis), η σύναψη (synapsis) και η μετασύναψη (postsynapsis) οι οποίες και θα αναλυθούν συνοπτικά. Σχετικά με το α' στάδιο της προσύναψης, το πρώτο βήμα στην επιδιόρθωση της δίκλωνης σχάσης του DNA με τον ομόλογο ανασυνδυασμό, είναι η επεξεργασία του DNA ώστε να προκύψουν 3' άκρα τα οποία να προεξέχουν και εκεί θα ξεκινήσει η συγκρότηση του ινιδίου της RAD51. Η εκτομή του 5' άκρου που συμβαίνει στο στάδιο αυτό για να προκύψουν ελεύθερα 3' άκρα, απαιτεί το σύμπλοκο πρωτεϊνών MRN (Mre11-Rad50-Nbs1), καθώς επίσης και την 5'-3' εξωνουκλεάση Exo1 και το προϊόν του γονιδίου SAE2. Στο β' στάδιο της σύναψης, η αναζήτηση της ομολογίας στο δίκλωνο DNA και η διείσδυση στον ομόλογο κλώνο του DNA, αποτελούν το στάδιο της σύναψης και θα πραγματοποιηθεί με τη βοήθεια των πρωτεϊνών της RAD51. Σε αυτό το σημείο φτιάχνεται μία «θηλιά» D, όπου το 3' άκρο του κλώνου που διεισδύει αρχίζει τη σύνθεση του DNA με μήτρα το δίκλωνο μόριο στο οποίο έχει διεισδύσει. Τέλος, στη μετασύναψη γίνεται η εκκίνηση της DNA σύνθεσης μέσω της αλυσίδας «μήτρας». Κατά τη μετασύναψη μπορούν να λάβουν χώρα τρεις πιθανοί μηχανισμοί: i) Το δεύτερο άκρο του DNA μπορεί να δεσμευτεί στην περιοχή του δίκλωνου ρήγματος και να αρχίσει η σύνθεση του DNA στην περιοχή αυτή. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία μίας διπλής έλικας ή διακλάδωσης που ονομάζεται Holliday (doubleHollidayjunction), η οποία θα διαλυθεί είτε από την τοποισομεράση III σε προϊόντα χωρίς επιχiasμό ή από μία ενδονουκλεάση σε προϊόντα με και χωρίς επιχiasμό ii) Σε μία άλλη πορεία του μηχανισμού η D «θηλιά» που σχηματίζεται,

διαλύεται αφού πρώτα το ένα άκρο πραγματοποιεί μία μικρή έκταση DNA και στη συνέχεια αποδεσμεύεται και υβριδοποιείται πάλι με το άλλο άκρο του DNA που έχει υποστεί τη βλάβη. Τα προϊόντα σε αυτή τη διαδικασία προκύπτουν με επιχιασμό. Τέλος στη iii) περίπτωση η τρίτη πιθανή πορεία που μπορεί να ακολουθήσει ο μηχανισμός επιδιόρθωσης δίκλωνων σχάσεων με ομόλογο ανασυνδυασμό είναι όταν ο κλώνος δημιουργεί μία διχάλα αντιγραφής και αντιγράφει όλο το DNA που χρησιμεύει ως μήτρα από το σημείο της σχάσης. Το αποτέλεσμα είναι να υπάρχει απώλεια ετεροζυγωτίας από το σημείο της σχάσης και μετά που ακολούθως δίνει μήνυμα σε ενεργοποίηση ογκογονιδίων και απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων (Li, 2008). Οι μηχανισμοί απεικονίζονται στο επόμενο σχήμα εν συντομία:



Εικόνα 3.2: Μηχανισμός επιδιόρθωσης δίκλωνων ρηγμάτων DNA (Li, 2008)

3.3 Διακρίνοντας το Πρόβλημα, μέσα από τα Πραγματικά Δεδομένα.

Υπάρχει ασφάλεια των ασθενών και του ιατρικού προσωπικού;

Σε αυτό το σημείο θα γίνει μία προσπάθεια από πραγματικά δεδομένα ιστορικά και βιβλιογραφικά να διαπιστωθεί κατά πόσο υπάρχει διασφαλισμένη η πιστοποίηση της υγείας των ασθενών που υπόκεινται σε διαγνωστικές εξετάσεις και των ανθρώπων που εργάζονται με διάφορες ειδικότητες σε διαγνωστικά κέντρα. Το 2007 λήφθηκαν τα τελικά αποτελέσματα από τη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο

Federal University of Rio Grande do Sul, στο Porto Alegre στη Βραζιλία, όπου και μελετήθηκε το αποτέλεσμα της επίδρασης της ακτινοβολίας σε κύτταρα του στοματικού βλεννογόνου έπειτα από πανοραμική ακτινογραφία. Έγινε προσπάθεια να αξιολογηθούν οι πυρηνικές αλλαγές των κυττάρων. Συνολικά, συμμετείχαν σαράντα δύο (42) ασθενείς εκ των οποίων οι είκοσι δύο (22) υποβλήθηκαν σε μία ακτινογραφία και οι είκοσι (20) και σε μία δεύτερη διαγνωστική ακτινογραφία λόγω αποτυχίας της πρώτης απεικονιστικής μεθόδου. Τα κυτταρικά δεδομένα συλλέχθηκαν πριν την διαγνωστική εξέταση και μετά την πάροδο δέκα ημερών. Τα αποτελέσματα μελετήθηκαν με τη βοήθεια μικροσκοπίου εξετάζοντας τα δομικά συστατικά των κυττάρων. Παρατηρήθηκαν ανωμαλίες στον πυρήνα των κυττάρων και τα δεδομένα από τα κύτταρα των ασθενών που είχαν λάβει διπλή ακτινοβολία είχαν σαφώς περισσότερες αλλοιώσεις σε επίπεδο σημαντικότητας $p = 0,01$. Μας απασχολεί η υψηλή επίπτωση στην καρκινογένεση και υπάρχουν ενδείξεις πως επαναλαμβανόμενες εκθέσεις σε ακτινοβολίες είναι περισσότερο επιβλαβείς και ύποπτες για τέτοιο συμβάν. Αυτό ήταν το συμπέρασμα της μελέτης με σκοπό να ακολουθήσει περαιτέρω μελέτη. (DaSilva A. E., 2007).

Η αιτία ύπαρξης δεύτερης ακτινογραφίας στον ασθενή εκτός από κλινική αναγκαιότητα μπορεί να αποτελέσει και η λάθος τοποθέτηση του ασθενή. Αυτό, δεν δίνει ξεκάθαρα αποτελέσματα και κρίνεται αναγκαία και δεύτερη επανάληψη. Βάση και της προηγούμενης μελέτης αυτό είναι περισσότερο επικίνδυνο για την υγεία και τη λειτουργία των κυττάρων. Η εξαρχής σωστή τοποθέτηση της κεφαλής του ασθενούς είναι αναγκαία από το ιατρικό προσωπικό και απαιτείται να είναι εκπαιδευμένο ώστε να μην απαιτηθεί δεύτερη επανάληψη της απεικονιστικής μεθόδου (Langland O. E., 2002).

Η μελέτη στην επίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας αφορά το επάγγελμα του οδοντιάτρου και κάθε επαγγελματία υγείας που σχετίζεται άμεσα ή έμμεσα γύρω από αυτή πέρα των ασθενών. Οι επιδημιολογικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για τους οδοντιάτρους είναι ελάχιστες και δεν έχει εξετασθεί πλήρως αυτό το κεφάλαιο για να βγει ένα συμπέρασμα σχετικά με την επαγγελματική έκθεση στην ακτινοβολία. Μία από τις λίγες μελέτες είναι αυτή που πραγματοποιήθηκε το διάστημα από τον Απρίλιο του 2012 έως και το Μάιο του 2013 και δημοσιεύτηκε τον Απρίλιο του 2016 στην Κορέα. Ίσως η πιο πλήρης μελέτη που αφορά οδοντιάτρους στην βιβλιογραφία, η οποία μελέτησε την επίδραση της συνολικής ακτινοβολίας σε 658 οδοντιάτρους. Η δόση της ακτινοβολίας αφορούσε τα 0,18 mSv για άνδρες και τα 0,13 mSv για τις γυναίκες. Τα

αποτελέσματα σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$ έδειξαν να περιέχεται επαγγελματικό ρίσκο και για τις δύο ομάδες ιατρικού προσωπικού, και αυτό είναι ένα στοιχείο για περαιτέρω μελέτη με ύπαρξη θετικής τιμής ρίσκου έκθεσης σε ιοντίζουσα ακτινοβολία από κάθε επαγγελματία υγείας εκτός από την ειδικότητα του οδοντίατρου. Η συγκεκριμένη μελέτη εξάγει στο συμπέρασμα της, ότι είναι αναγκαίο να αναπτυχθεί στρατηγική προστασίας των οδοντιάτρων σε επαγγελματική έκθεση τους στην ιοντίζουσα ακτινοβολία (KimY. J., 2016).

Στην προηγούμενη μελέτη, η οποία μέτρησε τη αθροιστική πρόσληψη της δόσης της ακτινοβολίας μέσω του TLD (thermoluminescentdosimeter), απέδειξε πως άνδρες και γυναίκες που δουλεύουν περισσότερα έτη, ανεξαρτήτως φύλου, έχουν λάβει συνολικά / αθροιστικά περισσότερη ακτινοβολία. Είναι γνωστό πως σε κάθε χώρα υπάρχουν διαφορετικές συνήθειες και όχι καθορισμένα πρωτόκολλα στο πως χειρίζονται και χρησιμοποιούν την ιονίζουσα ακτινοβολία μέσα από τις πανοραμικές ακτινογραφίες οι εκάστοτε οδοντίατροι ή οιακτινοδιαγνώστες. Για παράδειγμα στην Ουαλία και στην Αγγλία χρησιμοποιείται στο ποσοστό του 61% για τις πανοραμικές ακτινοβολίες σαν μέθοδο απεικόνισης (TuguitA., 2003). Στη Νότια Κορέα το 79,9% των συνολικών απεικονιστικών μεθόδων είναι οι πανοραμικές ακτινογραφίες. Στην Τουρκία υπάρχει διαθέσιμος εξοπλισμός για πανοραμικές ακτινογραφίες μόνο στο 39,4% των νοσοκομείων και οι οδοντίατροι περιορίζονται στον αριθμό των 10 ακτινογραφιών ανά εβδομάδα κατά μέσο όρο, ένα νούμερο ιδιαίτερα χαμηλό και μπορεί να δείχνει ακίνδυνο. Οι βέλγοι οδοντίατροι χρησιμοποιούν κατά μέσο όρο 40 – 80 πανοραμικές ακτινογραφίες το μήνα για ασθενείς τους (JacobsR., 2004). Οι διαφορές από χώρα σε χώρα είναι υπαρκτές και η ποικιλία που θα συναντήσουμε αφορά ξεκάθαρα όχι ένα επιστημονικό πρωτόκολλο αλλά διαφορές μεταξύ των συστημάτων υγείας των διαφόρων χωρών και από τις «συνηθισμένες» πρακτικές, βάση εμπειρίας που έχουν καθιερωθεί και όχι βάση επιστημονικής τεκμηρίωσης, ανά τα έτη εμπειρίας των ιατρών. Πέρα από τις «συνήθειες» τις κάθε χώρας έχει διαπιστωθεί πως αυξάνονται τα περιστατικά των καρκίνων σε ιατρικό προσωπικό και ιατρούς ή οδοντίατρος που είναι σε συνεχή έκθεση σε ιοντικές ακτινοβολίες έναντι αυτών που δεν εκτίθενται σε ακτινοβολία. Περιστατικά όπως αύξηση των αριθμών καρκίνων σε μαστό, στομάχι (LinJ.J., 2014), θυρεοειδή αδένια (ChoiK.H., 2013), (Aschebrook-KilfoyB., 2014), εντέρου, εγκεφάλου, λευχαιμίας (MuirheadC. R., 2009), λεμφώματα αλλά και ραδιογενή καταρράκτη (ChodickG., 2008) έχουν εντοπιστεί σε ορισμένες

μελέτες. Οι ίδιες μελέτες έδειξαν ότι είναι σημαντικές οι εργασιακές συνθήκες όπως ο εξοπλισμός και οι εγκαταστάσεις για την απορρόφηση της ακτινοβολίας.

Όσο αφορά την Ελλάδα, έχει πραγματοποιηθεί μία ανασκόπηση από το Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών στην μελέτη των Μανουσαρίδης και λοιπώνσυνεργατών(ManousaridisG., 2015), ώστε να παρουσιαστούν εγκεκριμένα επίπεδα αναφοράς των ορίων των τιμών της ακτινοβολίας στις πανοραμικές ακτινοβολίες. Για να προσδιοριστούν αυτά τα DRL (diagnosticreferencelevels) κατηγοριοποιήθηκαν τρεις ομάδες : παιδιά-children, ενήλικες μικρής ηλικίας-smalladults και ενήλικες μεγαλύτερης ηλικίας-averageadults. Προτάθηκαν οι ακτινοβολίες των 2,2 mGy, 3,3mGy και 4,1mGy αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές βρέθηκαν και προτάθηκαν έπειτα από ανασκόπηση οδηγιών κορυφαίων επιτροπών και εισήχθησαν από την επιτροπή «InternationalCommisiononRadiological» (InternationalCommissiononradiologicalProtection. Recommendations of the annuals of the ICRP 1991, 1990) «Protection in Publication 60/73» (International Commission on Radiological Protection. Radiological protection and safety medicine, 1996)καιαπότηνΕυρωπαϊκήεπιτροπή «European Directive 97/43 Euratom» (European Commision Council Directive 97/43 EURATOM of 30 June 1997 on health protection of individuals against the danger of ionizing radiation in relation to medical exposure, 1997).

Έχει ξεκινήσει να γίνεται αντιληπτό πως θα πρέπει να αναπτυχθούν μία σειρά από βιοδείκτες ώστε να βελτιωθεί η εφαρμογή της βιολογικής παρακολούθησης (biomonitoring) στα άτομα που υπάρχει πιθανότητα να κινδυνεύουν από υψηλή λήψη ακτινοβολίας. Αυτό θα βοηθήσει την επιστημονική κοινότητα να κάνει έγκαιρη διάγνωση κυτταρικών δυσλειτουργιών ή καρκινογενέσεων και να ξεκινάει έγκαιρα η θεραπεία εάν αυτό κριθεί απαραίτητο. Μέχρι πρόσφατα μελετούσαν τους μικροπυρηνικούς δείκτες μέσω ορισμένων δομών των κυττάρων που τις παρατηρούσαν με τη βοήθεια μικροσκοπίου (micronucleimeasures), και οι τιμές τους καθόριζαν τη γονιδιοματική αστάθεια. Η τιμές των micronucleans αντικατόπτριζαν τη γενετική βλάβη στα κύτταρα. Έγινε γνωστό πως υπάρχει συσχέτιση σε μη φυσιολογικές τιμές αυτών των δεικτών με κυτταρικές ανωμαλίες και αύξηση του κινδύνου της καρκινογένεσης (NeriM., 2003). Η εφαρμογή βιολογικών ελέγχων μέσω βιοδεικτών είναι δύσκολη διαδικασία καθώς οι ανθρώπινοι πληθυσμοί εκτίθενται καθημερινά σε

διαφορετικές ακτινοβολίες σε ποσότητα και σε είδος και ο καθορισμός των ορίων τους δεν είναι καθόλου εύκολος.

3.4 Ο Κίνδυνος - Risk

Καλούμαστε να εκτιμήσουμε τον κίνδυνο έκθεσης στην ιοντίζουσα ακτινοβολία μέσα από τη μελέτη της λειτουργίας του κυττάρου για την επιδιόρθωση του DNA και την αποφυγή εκδήλωσης καρκίνου. Η αλληλουχία DNA μπορεί να μεταβληθεί από λάθος (σφάλματα) των DNA πολυμερασών κατά τη διαδικασία της αντιγραφής ή από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως χημικά μεταλλοξογόνα και από ορισμένους τύπους ακτινοβολίας. Αυτόν τον κίνδυνο μελετάει αυτό το πείραμα, όπου από την εφαρμογή ιοντικής ακτινοβολίας στα κύτταρα, αυτά καλούνται να αντιμετωπίσουν τις βλάβες που προκύπτουν στο DNA τους με τον τύπο της διπλής θραύσης DNA που θα υποστούν.

Αν η αλληλουχία DNA μεταλλαχθεί, ανεξάρτητα από την αιτία της μετάλλαξης, και τα λάθη που προκύπτουν δεν διορθωθούν, τότε πιθανόν να συσσωρευτούν πολλές μεταλλάξεις στα σωματικά κύτταρα με αποτέλεσμα την απώλεια λειτουργιών. Επίσης, αν στο DNA των γεννητικών κυττάρων συσσωρευτούν πολλές μεταλλάξεις τότε πιθανόν να μην προκύψει βιώσιμος απόγονος. Συνεπώς, η διόρθωση των σφαλμάτων στην αλληλουχία του DNA σε όλους τους τύπους κυττάρων είναι σημαντική για την επιβίωση (Lodish, 2000).

Η σύνδεση των βλαβών του DNA και της επισκευής τους με την δημιουργία καρκίνου έγινε εμφανής όταν αναγνωρίστηκε ότι όλοι οι παράγοντες που προκαλούν καρκίνο είναι επίσης μεταλλαξογόνοι, αφού προκαλούν αλλαγές στην αλληλουχία του DNA. Όπως αναφέρθηκε λοιπόν η καρκινογένεση συσχετίζεται με τη συσσώρευση μεταλλάξεων σε διάφορα γονίδια. Αυτά τα γονίδια χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τα ογκογονίδια που προωθούν την ανάπτυξη του ιστού και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη διακοπή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Για να εμφανιστεί ένας καρκίνος απαιτούνται συνήθως μεταλλάξεις σε πολλά γονίδια. Με τις έρευνες που έχουν γίνει οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι ο καρκίνος σε γενετικό επίπεδο είναι το αποτέλεσμα:

- Μετατροπής πρωτο-ογκογονιδίων σε ογκογονίδια
- Απουσίας της λειτουργικότητας ογκοκατασταλτικών γονιδίων
- Αδρανοποίηση των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4:

ΠΕΙΡΑΜΑ

4.1 Παρουσίαση συστήματος, Μεθοδολογία

Ξεκινώντας με το σύστημα ανίχνευσης των γ -H2AX ιστονών, η μέθοδος του ανοσοφθορισμού είναι μία εύκολη και πρακτική διαδικασία. Η φασματοσκοπία φθορισμού εντάσσεται στις ηλεκτρονικές φασματοσκοπίες καθώς και στις φασματοσκοπίες εκπομπής. Είναι διαδικασία εκπομπής ακτινοβολίας κατά την αποδιέγερση ενός ηλεκτρονίου e^- που έχει βρεθεί σε διεγερμένη ηλεκτρονική κατάσταση / στάθμη του συστήματος που ανήκει. Αρκετά συχνά χρησιμοποιείται ο φθορισμός σε βιολογικές εφαρμογές με τη μορφή επισημαντών (markers) στην ανάλυση και τον προσδιορισμό του DNA.

Ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης της ιονίζουσας ακτινοβολίας με το βιολογικό υλικό, είναι η επαγωγή ποικίλων βλαβών στο δίκλωνο μόριο του DNA όπως αλλοιώσεις (οξειδώσεις) βάσεων του DNA, μονόκλωνες (SSBs Single Strand Breaks) και δίκλωνες (DSBs Double Strand Breaks) θραύσεις κ.α. Το κύτταρο προστατεύεται από τη βοήθεια αντιοξειδωτικών και επιδιορθωτικών ενζύμων, τα οποία είναι ειδικευμένα αφενός για την εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών και τοξικών παραγόντων και αφετέρου για τις αλλοιώσεις του DNA. Σε στιγμή μη επιδιόρθωσης ή λανθασμένης επιδιόρθωσης του DNA ακολουθεί κυτταρικός θάνατος ή και χρωμοσωματική αστάθεια και ανευπλωειδία που αποτελούν τον κυτταρικό μηχανισμό καρκινογένεσης μετά από έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία.

Η παρουσία των βλαβών του DNA μπορεί να προσδιοριστεί με μία ευαίσθητη μέθοδο ποσοτικής ανάλυσης που βασίζεται στην ανίχνευση της φωσφορυλιωμένης ιστόνης H2AX στη δομή της χρωματίνης. Η φωσφορυλιωμένη ιστόνη γ -H2AX αποτελεί παράγοντα κομβικής σημασίας στην απόκριση σε βλάβη του DNA. Η ιστόνη H2AX (14kDa) είναι μέλος της H2 A οικογένειας ιστονών και στα θηλαστικά η H2AX αντιπροσωπεύει το 10% της H2 A. Η ιστόνη φωσφορυλιώνεται στη σερίνη 139 αμέσως μετά την επαγωγή των DNA Double Strand Breaks και δημιουργείται η γ -H2AX. Αυτός ο μηχανισμός είναι χρήσιμος για τον προσδιορισμό του σπασίματος του DNA στο πείραμα που πραγματοποιήθηκε. Η χρήση φθορίζουσών αντισωμάτων ειδικών για τη γ -H2AX μας δίνει την ευχέρεια ανίχνευσης των δίκλωνων σπασμάτων DNA στον πυρήνα του κυττάρου μέσω γ -H2AX εστιών φθορισμού, τα οποία καλούνται ως γ -

H2AXFoci. Αυτή η οπτικοποίησή της και η ποσοτικοποίησή της με ανοσοφθορισμό (εστίες foci, γ -H2AX) μας δίνει δυνατότητα να εκτιμήσουμε τη βλάβη. Το μηχάνημα υψηλής τεχνολογίας που χρησιμοποιήθηκε, όπως θα δούμε και στη συνέχεια, έδωσε τιμές μέτρησης αυτών ακριβώς των εστιών και θα ονομάζονται ως αριθμός *focis*.

Οι εστίες των γ -H2AX μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες των DSB του DNA. Η ύπαρξη σταδιακής μείωσής τους με το πέρασμα του χρόνου θεωρείται ένδειξη της επιδιόρθωσης των τμημάτων DNA που έχουν υποστεί σπασίματα. Αυτό είναι και η πλέον σημαντική προτεραιότητα των κυττάρων. Σύμφωνα και με τους *Saka*, και *RothkammK.*, από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας προκύπτει πως η εκτίμηση των εστιών γ -H2AX με ανοσοφθορισμό είναι ένα εξαιρετικά ευαίσθητο εργαλείο για να ανιχνευθούν δίκλωνες θραύσεις του DNA έπειτα από έκθεση κυττάρων σε δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας (Rothkamm, 2003) και (Sak, 2010). Στις ίδιες μελέτες αναφέρεται πως οι βιοδείκτες της γ -H2AXιστόνης έχουν ένα σημαντικό πρακτικό και κλινικό μειονέκτημα ως βιοδοσίμετρο στο ότι παρατηρείται άμεση μείωση των εστιών με το πέρασμα λίγων ωρών, λόγω της ενεργότητας των επιδιορθωτικών μηχανισμών αλλά και εξασθένηση του σήματος φθορισμού που οφείλεται σε εξασθένηση των χρωμοφόρων ομάδων που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά την επισήμανση των μορίων.

Ο αριθμός των επαγόμενων από την ακτινοβολία των DSBs σχετίζεται με τον αριθμό των πυρηνικών περιοχών γ -H2AX που στέλνουν σήμα, ο οποίος αυξάνεται γραμμικά με τη δόση της ακτινοβολίας μετά από έκθεση του οργανισμού στην ακτινοβολία. Σκοπός της μελέτης είναι η ανίχνευση των εστιών γ -H2AX με τη βοήθεια χρήσης υψηλής τεχνολογίας εξοπλισμού, οι οποίες σχετίζονται με δίκλωνες θραύσεις DNA (DSBS). Σημαντική είναι και η μελέτη της επιδιόρθωσης αυτών των βλαβών μετά από έκθεση των κυττάρων σε ιοντίζουσα ακτινοβολία. Η μελέτη θέλει να αντικατοπτρίσει αυτόν τον κίνδυνο με ασθενείς και ιατρικό προσωπικό που εκτίθεται σε τέτοια ακτινοβολία κατά τη διάρκεια των πράξεων ακτινογραφίας πανοραμικών οδοντιατρικών διαγνωστικών εξετάσεων.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω θεωρητικά δεδομένα, έχουν πραγματοποιηθεί μετρήσεις, οι οποίες βασίζονται στην ποσοτικοποίηση της εκπομπής φθορίζουσας ακτινοβολίας από κύτταρα τα οποία έχουν ακτινοβοληθεί με ιοντίζουσα και έχουν υποστεί διπλό σπάσιμο του DNA τους. Η φθορίζουσα ακτινοβολία εκπέμπεται από αντισώματα τα οποία έχουν επισημασθεί με φθορίζουσες χρωστικές, και αναγνωρίζουν τα διπλόκλινα σπασίματα του DNA σε κάθε κύτταρο. Με αυτή τη σύντομη περιγραφή

θα οριστεί η μέτρηση των *foci*, στο πείραμά μας που όπως είδαμε έχει περισσότερα θετικά χαρακτηριστικά παρά από τα αρνητικά σύμφωνα με τη βιβλιογραφία και για αυτό το λόγο επιλέχθηκε.

Αναλυτικά, θα πραγματοποιηθεί επεξεργασία των εικόνων φθορισμού από τα κύτταρα τα οποία ανήκουν σε τρία (3) διαφορετικά στάδια-γκρούπς. Αρχικά σε κύτταρα τα οποία δεν έχουν λάβει καθόλου ακτινοβολία (Control) και θα ακολουθήσει ποσοτικοποίηση των δίκλωνων σπασμάτων του DNA σε χρονικές στιγμές των είκοσι(20) και διακοσίων σαράντα(240) λεπτών μετά την ακτινοβόληση. Σε κύτταρα τα οποία έχουν λάβει χαμηλή δόση ακτινοβολίας (IR) και θα ακολουθήσει ποσοτικοποίηση των δίκλωνων σπασμάτων του DNA σε χρονικές στιγμές των είκοσι(20) και διακοσίων σαράντα(240) λεπτών μετά την ακτινοβόληση. Το τρίτο στάδιο αφορά τα κύτταρα τα οποία έχουν λάβει υψηλή δόση ακτινοβολίας και ακολουθεί ποσοτικοποίηση των δίκλωνων σπασμάτων του DNA σε χρονικές στιγμές των είκοσι (20) και διακοσίων σαράντα(240) λεπτών μετά από την ακτινοβόληση. Η ακτινοβολία η οποία εφαρμόστηκε στο control είναι 0Gy, στο IR 0,2Gy και στο positivecontrol 2Gy.

Η μονάδα μέτρησης της ακτινοβολίας που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα είναι το Gray (Gy). Σε πολλές βιβλιογραφικές αναφορές η ίδια ακτινοβολία μετράται σε microsievert (μSv), και η σχέση ανάμεσα σε αυτά τα δύο μεγέθη είναι: 1 gray [Gy] = 1.000.000 microSievert [μSv].

Ακολούθως, με τη βοήθεια στατιστικών πακέτων θα πραγματοποιηθεί στατιστική ανάλυση και θα γίνει προσπάθεια για εξαγωγή συμπερασμάτων για τις 4 υποθέσεις εργασίας. Το στατιστικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για να επέλθει η ανάλυση των μετρήσεων – δεδομένων είναι η RStudio.

Το μηχάνημα που μέτρησε, η υψηλή τεχνολογία που χρησιμοποιήθηκε

Η ύπαρξη της δυσκολίας να προσομοιαστεί η πειραματική διαδικασία με τις πραγματικές συνθήκες περιβάλλοντος και ακτινοβολήσης ήταν δεδομένη. Για να οδηγηθεί η συγκεκριμένη μελέτη στον τελικό πειραματικό σχεδιασμό και στις συνθήκες ακτινοβολήσης πραγματοποιήθηκαν μελέτες που αφορούσαν τη σταθεροποίηση των συνθηκών ακτινοβολήσης με ακρίβεια. Η δοσιμετρία επιβεβαιώνεται σε αυτή τη μελέτη αλλά και σε κάθε πειραματική διαδικασία με τη χρήση ειδικών δοσιμετρικών ανιχνευτών. Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ανιχνευτές που διατίθενται από το Ινστιτούτο Ραδιοϊσοτόπων της Ε.Ε.Α.Ε. (Ελληνική Επιτροπή Ατομικής Ενέργειας). Οι μετρήσεις αυτές γίνονται πάντα σε διαφορετικές θέσεις του συστήματος ακτινοβολήσης κάτω από διαφορετικές συνθήκες ελέγχου της δόσης ακτινοβολήσης.

Η πολύ σημαντική πλέον σταθεροποίηση της διαδικασίας ακτινοβολήσης έγινε ώστε οι μετρήσεις να είναι αξιολογήσιμες. Οι δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας σε μεγάλο αριθμό κυττάρων πραγματοποιήθηκαν σε τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες χρονικές στιγμές.

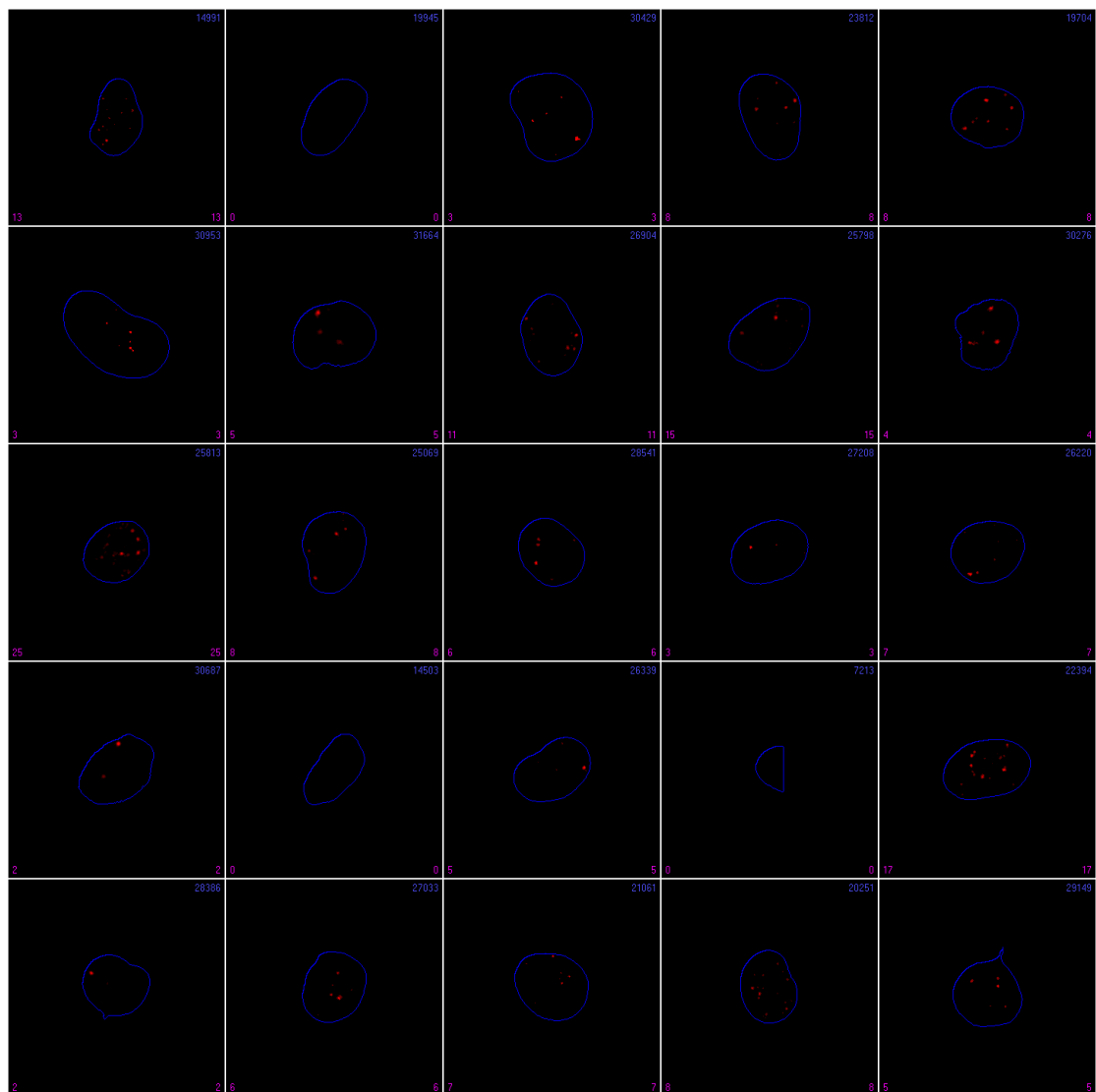
Για την ακτινοβολήση των κυττάρων σχεδιάστηκε και κατασκευάστηκε μία ειδική συσκευή η οποία πήρε το όνομα *phantom* στην οποία οι συνθήκες προσομοιάζουν τις πραγματικές συνθήκες ακτινοβολήσης του ασθενή που υπόκειται στην ακτινοδιαγνωστική εξέταση. Η κατασκευή προσομοιώνει το ανθρώπινο κεφάλι. Αποτελείται από δύο ομόκεντρους κυλίνδρους μεταξύ των οποίων υπάρχει απιονισμένο νερό. Στο *phantom* υπάρχει η υποδοχή για να υποδεχθεί ένα τρυβλίο διαμέτρου οκτώ εκατοστών ή ένα κυτίο κυτταροκαλλιέργειας, όπου θα τοποθετούνται τα κύτταρα, δηλαδή η κάθε ομάδα/ groups κυττάρων της κάθε κυτταρικής σειράς που θα εκτεθεί στην ιοντίζουσα ακτινοβολία στην μελέτη. Αυτή η διαδικασία θα γίνει σύμφωνα με τις τιμές που έχουν ορισθεί για μελέτη στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία. Οι διαφορετικές τιμές θα αφορούν τη μηδενική ιοντίζουσα ακτινοβολία, την αυξημένη δόση ιοντίζουσας ακτινοβολίας και την ακτινοβολία που προσομοιάζει τις κανονικές δόσεις ακτινοβολίας. Ακολουθεί η προσθήκη εικόνας, που δείχνει το *phantom* το οποίο κατασκευάστηκε για τις ανάγκες του πειράματος:



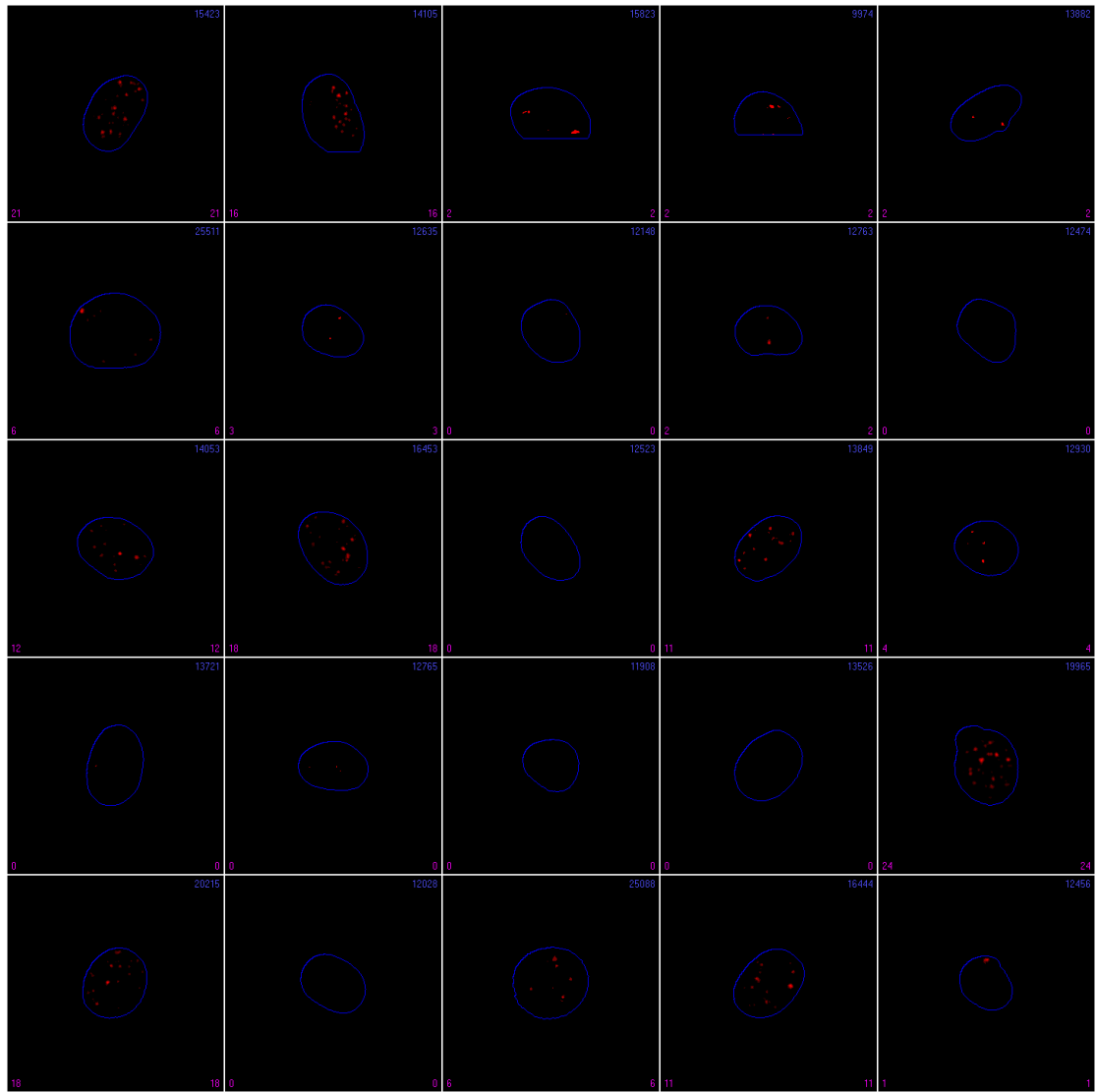
***Εικόνα 4.1.1:** Συσκευή phantom, η οποία έχει τοποθετηθεί σε O.Y.T. Newton 9000 (QRVerontaltaly) που βρίσκεται στην Οδοντιατρική σχολή του Ε.Κ.Π.Α.*

Το μηχάνημα υψηλής τεχνολογίας που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις, μας έδωσε εικόνες όπως θα παραθέσουμε παρακάτω. Σε αυτά τα εικονίδια που πήραμε φαίνονται τα FOCIS που εκπέμπονται από κάθε κύτταρο (κόκκινα σημεία μέσα στο κύτταρο) το οποίο έχει τη μορφή που φαίνεται στο σχήμα σε κάθε ξεχωριστή πλάκα, καθώς και ο μοναδικός του κωδικός αριθμός. Αυτές τις τιμές των FOCIS που μας δείχνει κάθε πλακίδιο τις μετρήσαμε για όλα τα κύτταρα και τα χρησιμοποιήσαμε για να κατασκευάσουμε το αρχείο των δεδομένων το οποίο και χρησιμοποιήθηκε για την στατιστική επεξεργασία.

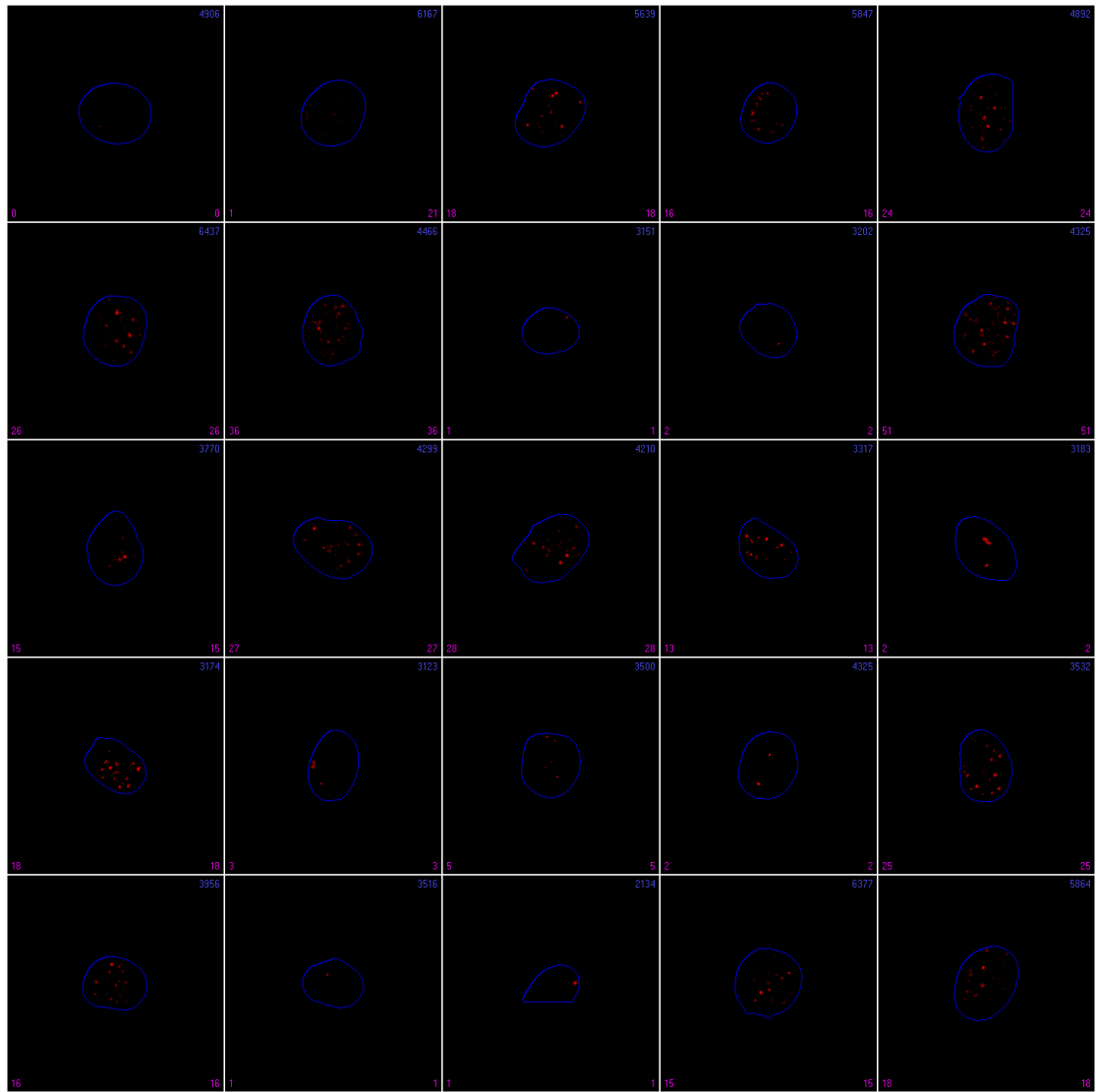
Παραθέτουμε τις εικόνες μέτρησης των FOCIS (ενδεικτικά μία εικόνα από κάθε γκρούπ μετρήσεων κυτταρικών σειρών) τα οποία και σχετίζονται με τα σπασίματα του DNA στο κάθε κύτταρο:



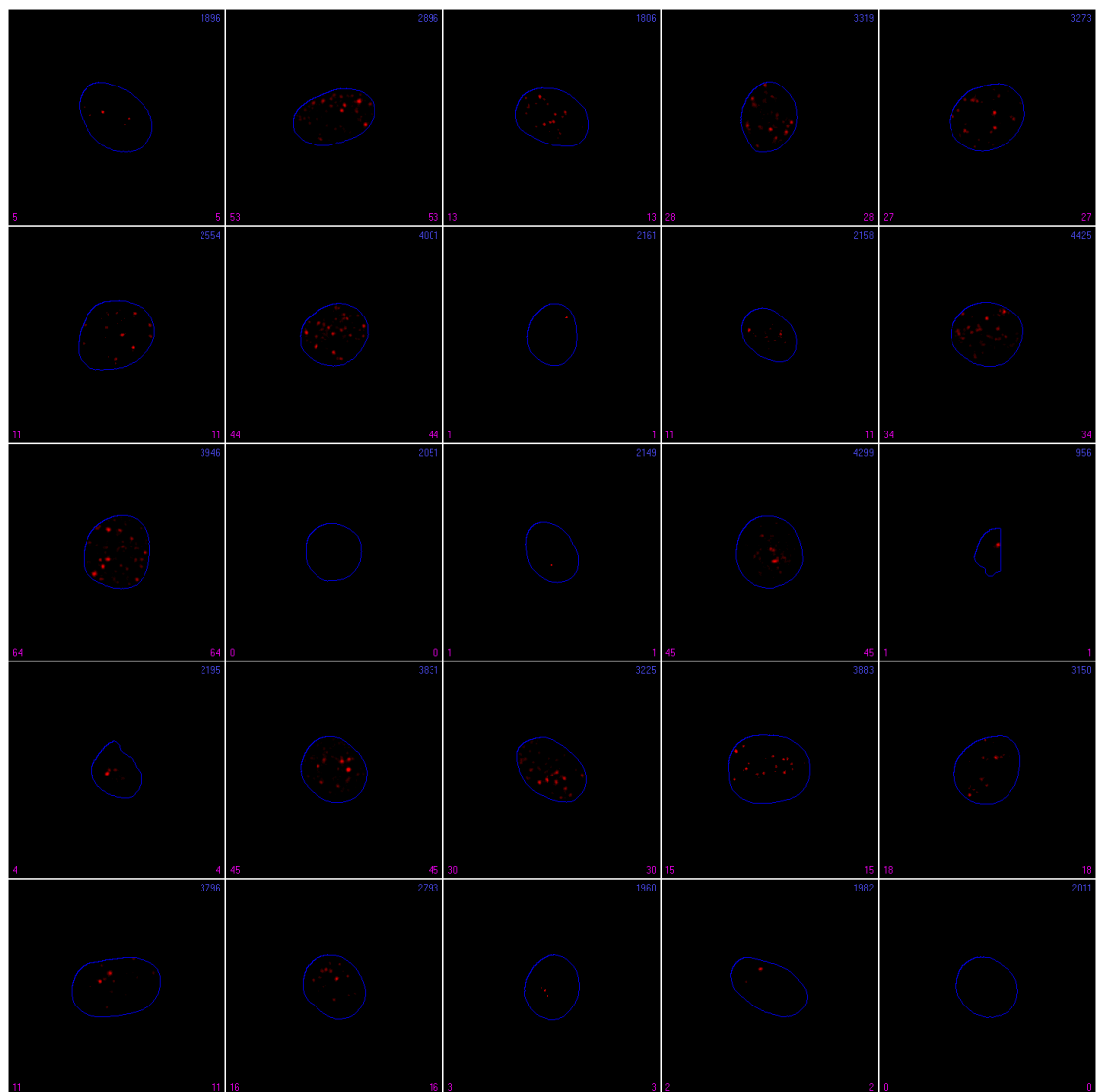
Εικόνα 4.1.2: FOCISIR20, σε ακτινοβολία 0,2Gy σε χρόνο 20λεπτών



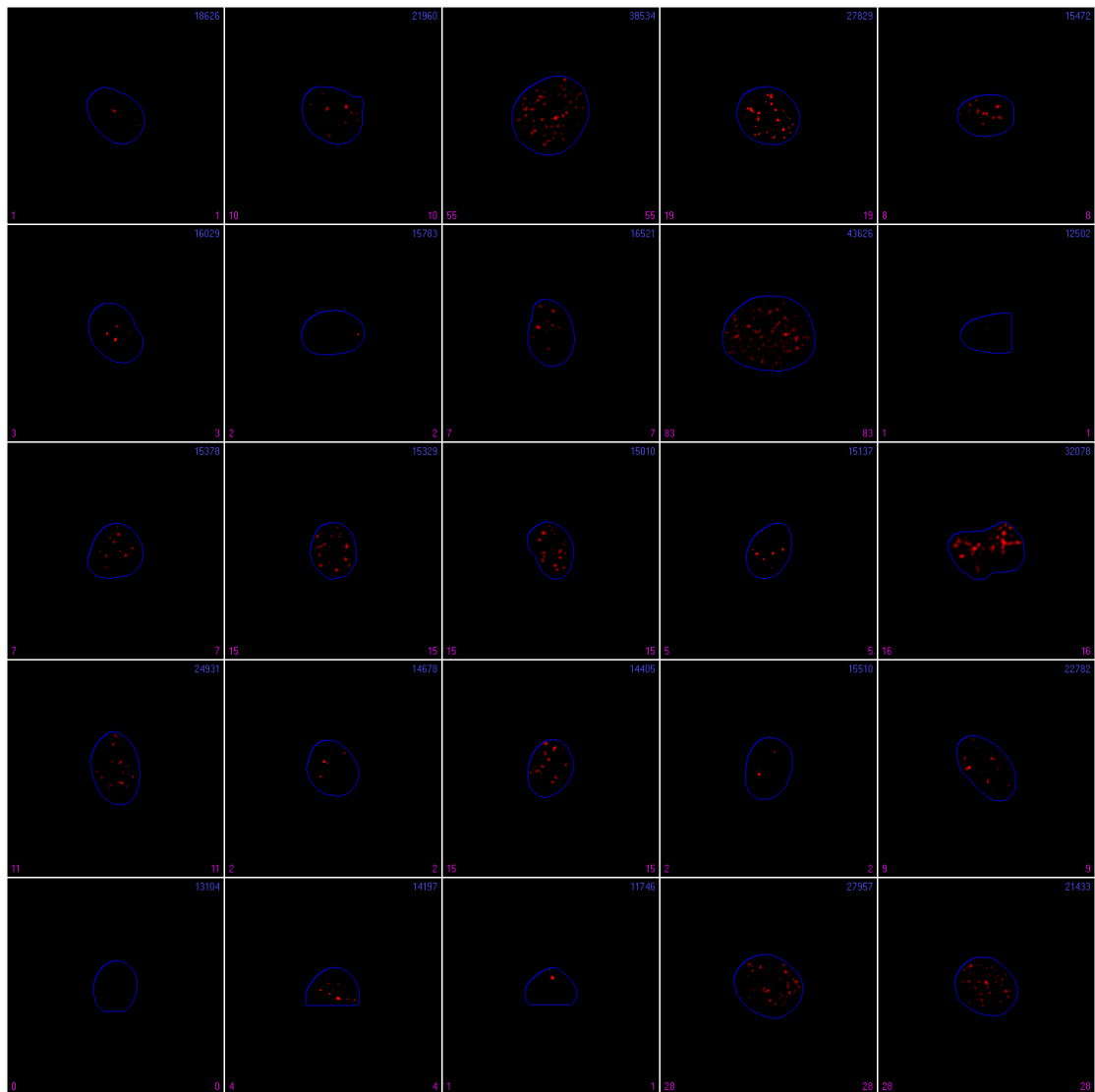
Εικόνα 4.1.3: FOCISIR240, σε ακτινοβολία 0,2Gy, σε χρόνο 240λεπτών



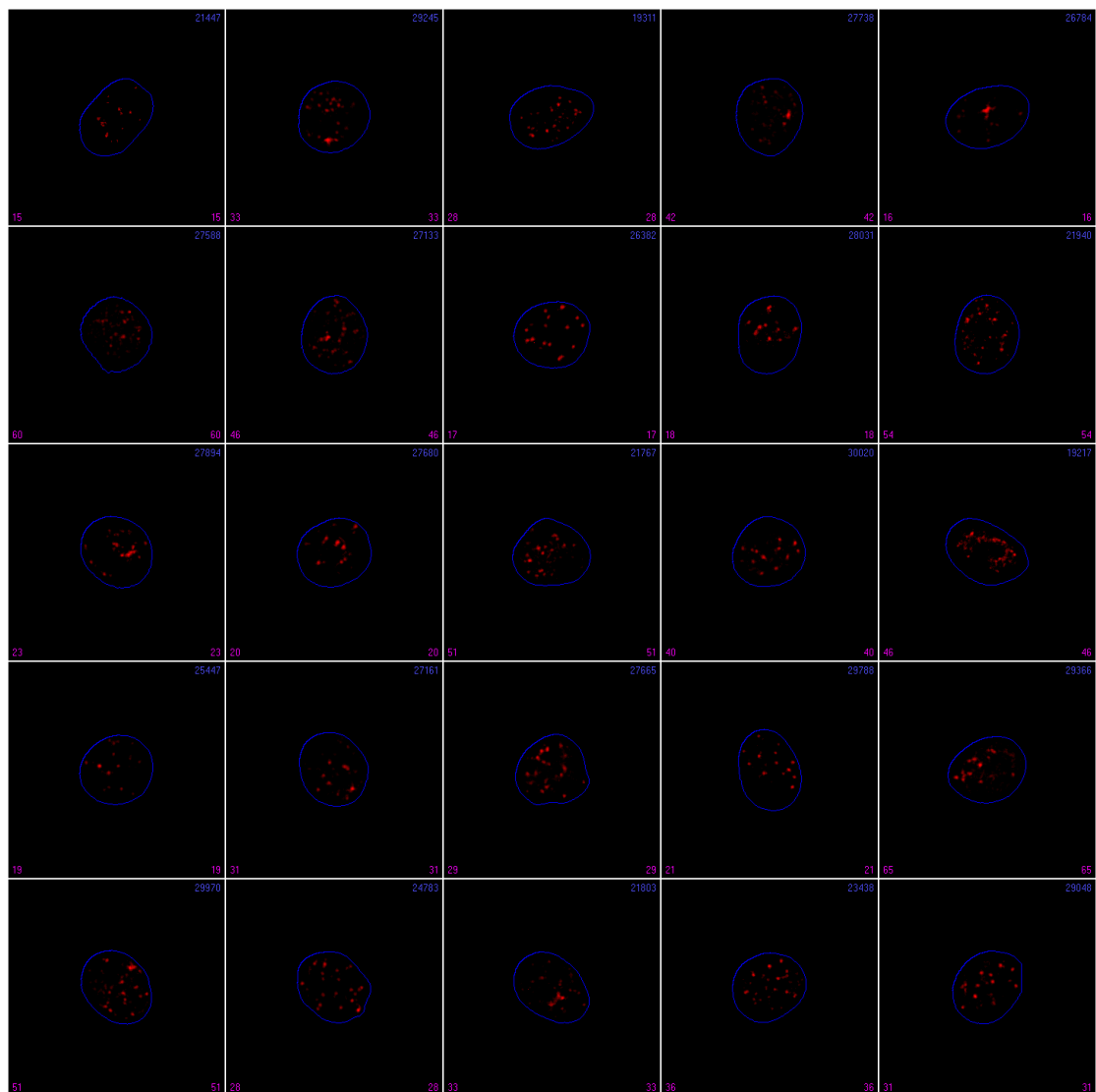
Εικόνα 4.1.4: FOCISNC20, σε ακτινοβολία 0,0Gy, σε χρόνο 20λεπτών



Εικόνα 4.1.5: FOCISNC240, σε ακτινοβολία 0,0Gy, σε χρόνο 240λεπτών



Εικόνα 4.1.6: FOCISPC20, σε ακτινοβολία 2,0Gy, σε χρόνο 20λεπτών



Εικόνα 4.1.7: FOCISPC240, σε ακτινοβολία 2,0Gy, σε χρόνο 240λεπτών

Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία καταμέτρησης των δεδομένων και ολοκληρώθηκε η κατασκευή του dataset, ξεκίνησε η διαδικασία της στατιστικής επεξεργασίας των δεδομένων. Κάτι τέτοιο όμως φέρει την ύπαρξη ενδογενών δυσκολιών του συστήματος. Μελετάται ένα σύστημα το οποίο αντιπροσωπεύει έναν ιστό. Αυτό όπως έχει διαπιστωθεί και από τη βιβλιογραφία σημαίνει πως δεν υπάρχει ομοιομορφία την πλατφόρμα των δεδομένων, καθώς το περιβάλλον είναι ιδιαίτερα περίπλοκο στην λειτουργία του. Οι καθημερινές συνήθειες του ανθρώπου όπως το κάπνισμα, η κατανάλωση όξινης ή βασικής τροφής και μία πιθανή στοματική μόλυνση ή ένα στοματικό έλκος αλλάζουν δραματικά τις συνθήκες του στοματικού επιθηλίου. Το εύρος των δύο μικρών ακτινοβολιών που μετράμε, αυτής της μηδενικής και της

μικρής δόσης ιοντίζουσας ακτινοβολίας, επηρεάζεται συντριπτικά μέσα από αυτές τις συνθήκες και αυτό είναι σημαντικό να σημειωθεί.

Αρχικά, τα κύτταρα των ιστών άρα και του στοματικού βλεννογόνου βρίσκονται σε διαφορετικές κυτταρικές φάσεις κατά τη φυσιολογική στιγμή λειτουργίας τους, επομένως δεν θα αποσκοπούσε κάπου να ρυθμιστούν στην ίδια κυτταρική φάση όλα τα κύτταρα τα οποία μελετούμε. Ένα δεύτερο πολύ σημαντικό γεγονός είναι πως κάθε κύτταρο στρεσάρεται. Αυτό ανάλογα από το βαθμό του στρεσαρίσματος δίνει διαφορετικές μετρήσεις γ -H2AX ιστονών κάθε στιγμή σε επίπεδο μηδενικής ακτινοβολίας, και είναι κάτι το οποίο δεν είναι σταθερό. Τέλος, οι διαφορές ανάμεσα στην μηδενική ακτινοβολία 0,0Gy και στην χαμηλή δόση ακτινοβολίας 0,2Gy είναι ελάχιστες ώστε να παρατηρηθούν ουσιαστικές μεταβολές ανάμεσα στην παραγωγή γ -H2AX ιστονών καθώς παρεμβάλλονται τα στρεσαρισμένα κύτταρα που επηρεάζουν σαφώς τις μετρήσεις.

4.2 Υποθέσεις Πειράματος

Κάτω από τις πειραματικές συνθήκες που περιγράφηκαν, έγιναν ορισμένες υποθέσεις εργασίας στη μελέτη του πειράματος. Η πρώτη υπόθεση είναι να θεωρήσουμε ότι η ιοντίζουσα ακτινοβολία στον χρόνο και στην ένταση έκθεσης σε αξονικό τομογράφο που χρησιμοποιείται στην οδοντιατρική απεικόνιση δεν έχει ουσιαστικές επιπτώσεις στο DNA των κυττάρων του βλεννογόνου της στοματικής κοιλότητας. Η δεύτερη υπόθεση είναι στο πως εάν υπάρχουν κάποιες αμελητέες επιδράσεις στο DNA του βλεννογόνου της στοματικής κοιλότητας, τότε τα κύτταρα τις επιδιορθώνουν σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα. Τρίτη υπόθεση είναι στην παραδοχή πως η επίδραση υψηλών δόσεων ιοντικής ακτινοβολίας είναι στατιστικά υψηλότερη σε σχέση με την επίδραση χαμηλής δόσης και η τέταρτη υπόθεση αφορά την ακτινοβολία του περιβάλλοντος που θεωρείται στατιστικά όμοια με την επίδραση της χαμηλής δόσης ιοντίζουσας ακτινοβολίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5:

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

5.1 Ανάλυση πειράματος - Ανάλυση δεδομένων

Προτού ξεκινήσουμε την παράθεση των αποτελεσμάτων της πειραματικής διαδικασίας, θα παραθέσουμε ορισμένα θεωρητικά στοιχεία τα οποία μας έδωσαν βοήθεια στην επεξεργασία των δεδομένων και στην εξαγωγή των αποτελεσμάτων της πειραματικής διαδικασίας. Η βιοστατιστική επιστήμη, βρίσκεται στο επίκεντρο της έρευνας της σύγχρονης ιατρικής και των παράλληλων προς αυτήν επιστημών όπως είναι η βιολογία η φαρμακευτική και η οδοντιατρική. Οι βιοστατιστικές έννοιες και οι βιοστατιστικές μέθοδοι δίνουν τη βοήθειά τους σε σημαντικά βιολογικά ερωτήματα τα οποία μπορούν να μελετηθούν, να απαντηθούν και να δοθούν στατιστικά αποδεκτές λύσεις και συμπεράσματα. Το κοινό χαρακτηριστικό των διαδικασιών κρίσης όλων των δεδομένων για την εξαγωγή σημαντικών διαπιστώσεων είναι ο στατιστικός έλεγχος.

5.2 Περιγραφική στατιστική & Επαγωγική στατιστική

Οι στατιστικές μέθοδοι είναι το εργαλείο για την περιγραφή των αποτελεσμάτων μας και την εξαγωγή των συμπερασμάτων. Με τις στατιστικές μεθόδους επιδιώκεται αφενός η συνοπτική αλλά εμπειριστατωμένη παρουσίαση των ευρημάτων μίας μελέτης που αυτή η διαδικασία αποτελεί την περιγραφική στατιστική και αφετέρου η συναγωγή των συμπερασμάτων που βασίζονται στα παραπάνω ευρήματα κάτι το οποίο αποτελεί και είναι μέρος της συμπερασματικής στατιστικής. Αν από κάποιο δείγμα δεδομένων μας ενδιαφέρει να εξάγουμε ένα γενικευμένο συμπέρασμα για έναν ολόκληρο πληθυσμό, διατυπώνουμε τις υποθέσεις με βάση το δείγμα, πιθανολογώντας τον βαθμό ακρίβειας της πρόβλεψής μας, με τη χρήση διαστημάτων εμπιστοσύνης ή επιπέδων σημαντικότητας και αυτό αποτελεί μεθόδους της επαγωγικής στατιστικής (Κονδύλης, 1999).

5.3 Οι Μεταβλητές

Υπάρχουν δύο ειδών μεταβλητών. Οι μεταβλητές μπορεί να είναι μεγέθη χαρακτηριστικά και variables, διακρίνονται σε ποιοτικές (qualitative or categorical) και ποσοτικές (quantitative or numerical). Οι ποιοτικές μεταβλητές δεν επιδέχονται αριθμητικές μετρήσεις και οι τιμές τους δεν είναι αριθμοί π.χ. χρώμα, φύλλο και

παρουσία ή απουσία ενός χαρακτηριστικού ενώ οι ποσοτικές μεταβλητές είναι εκείνες οι οποίες επιδέχονται αριθμητικές μετρήσεις και οι τιμές τους είναι αριθμοί π.χ. βάρος, ύψος και τιμές βιολογικών μεγεθών (Τριχόπουλος Δ., 2000).

Τα δεδομένα μπορούν να παρουσιαστούν και να απεικονιστούν με ποικιλία τρόπων. Οι τρόποι απεικόνισης των δεδομένων μπορεί να είναι πίνακες και γραφικές παραστάσεις. Τα ποσοτικά δεδομένα απεικονίζονται με διαγράμματα συχνοτήτων (linecharts), με κυκλικά διαγράμματα συχνοτήτων (piecharts), με διαγράμματα διασποράς (scatterplots), με σημειογράμματα (dotdiagrams) καθώς και με γραφικά ιστογράμματα. Οι ποιοτικές μεταβλητές μπορούν να απεικονιστούν με ραβδογράμματα (barcharts), κυκλικά διαγράμματα συχνοτήτων, με θηκογράμματα (boxplots) καθώς και με ιστόγραμμα.

5.4 Πακέτο R-Studio

Η επεξεργασία των πειραματικών ευρυμάτων μπορεί να γίνει πιο εύκολη με την χρήση ενός στατιστικού πακέτου, το οποίο μπορεί να επεξεργαστεί μεγάλο αριθμό δεδομένων πιο γρήγορα και με επιπλέον χρήσιμα στατιστικά χαρακτηριστικά. Η ανάπτυξη των γλωσσών προγραμματισμού οδήγησε σταδιακά στην ανάπτυξη εργαλείων για τη συγγραφή πιο σύνθετων προγραμμάτων και αυτή με τη σειρά της επέφερε την ανάπτυξη εξειδικευμένων προγραμμάτων που ειδικεύονταν σε συγκεκριμένα προβλήματα. Τα πρώτα στατιστικά πακέτα εμφανίζονται το 1940 λόγω των αναγκών ανάπτυξης προγραμμάτων στατιστικής προσομοίωσης. Με την πάροδο των ετών τα στατιστικά πακέτα έγιναν ολοένα και πιο φιλικά προς τον απλό χρήστη χωρίς ιδιαίτερες γνώσεις και μετά την ευρεία είσοδο παραθυρικών εφαρμογών οι προγραμματιστικές τους ικανότητες παραμελήθηκαν. Σήμερα, πολλά από τα στατιστικά πακέτα προσφέρουν τη δυνατότητα προγραμματισμού με τη χρήση ομάδων εντολών. Κάτι τέτοιο είναι πολύ χρήσιμο στις πραγματικές εφαρμογές, αφού για εκπαιδευτικούς σκοπούς μπορεί ο στατιστικός να αναπτύξει και να εφαρμόσει τεχνικές στα δικά του μέτρα έχοντας τον πλήρη χειρισμό των δεδομένων.

Το πακέτο R-Studio έχει να προσφέρει σημαντικές δυνατότητες προγραμματισμού και συγγραφής προγραμμάτων για την επίλυση πολύπλοκων στατιστικών προβλημάτων. Πλεονεκτεί στο να ενσωματώνει μία σειρά από τεχνικές που είναι ιδιαίτερα σύγχρονες και επομένως προσφέρει εργαλεία για στατιστικές αναλύσεις με τη χρήση των πιο σύγχρονων μεθόδων. Ο Πρόγονος της γλώσσας R, υπήρξε η γλώσσα

προγραμματισμού S η οποία αναπτύχθηκε από τον John Chambers στα εργαστήρια της Bell Labs. Αν και βασίστηκε στη S γλώσσα έχει σημαντικές διαφορές στον τρόπο που διαχειρίζεται τα δεδομένα και τη διαθέσιμη μνήμη του υπολογιστή. Οι Ross Ihaka και Robert Gentleman στο πανεπιστήμιο του Auckland της Νέας Ζηλανδίας ανέπτυξαν την γλώσσα R το 1990. Μέχρι το 1994 η γλώσσα R είχε μετατραπεί σε εμπορικό πακέτο.

Μέχρι σήμερα αποτελεί γλώσσα ελεύθερου κώδικα και είναι δωρεάν. Αυτό βέβαια δημιουργεί και κάποιους περιορισμούς στη χρήση της από εταιρείες καθώς η νομική ευθύνη δεν είναι ξεκάθαρο σε ποιον ανήκει. Το τελευταίο διάστημα μεγάλοι οργανισμοί και εταιρείες προσφέρουν πιστοποίηση και άρα αναλαμβάνουν αυτές τις ευθύνες, οδηγώντας σε ολοένα και μεγαλύτερη χρήση πχ FDA. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η ανάπτυξη της R έχει σημειωθεί σαν μία γλώσσα εντολών, δηλαδή ο χρήστης δε χρησιμοποιεί παράθυρα αλλά δίνει τις δικές του εντολές και μόνο τα τελευταία χρόνια υπάρχουν γραφικά περιβάλλοντα της R που υποστηρίζουν τη γλώσσα και προσφέρουν εντολές μέσω παραθύρων για μεγαλύτερη ευκολία στη χρήση.

Το Μάρτιο του 2015 έφτασαν τα 6200 τα πακέτα που ήταν διαθέσιμα στην R-Studio τα οποία χρήστες είχαν γράψει. Καινούριες μεθοδολογίες είναι διαθέσιμες στον τελικό χρήστη σχεδόν ταυτόχρονα με τη δημοσίευσή τους κάτι που στο παρελθόν ήταν ανέφικτο. Κλείνοντας την σύντομη περιγραφή της R-Studio, αξίζει να σημειωθεί ότι η R αποτελεί σημαντική επιλογή για τη μετάβαση σε αυτό που είναι γνωστό ως «η πρόκληση των μεγάλων δεδομένων». Επειδή έχει παρατηρηθεί την τελευταία δεκαετία αύξηση του όγκου των δεδομένων και τα δεδομένα προς επεξεργασία συνεχώς αυξάνουν, η R-Studio προς αυτή την κατεύθυνση έχει στη διάθεσή της παράλληλες βιβλιοθήκες (parallel computing) που επιτρέπουν παράλληλη επεξεργασία των δεδομένων, ενώ το γεγονός ότι ο καθένας μπορεί να πάρει έτοιμο κώδικα και να τον τροποποιήσει το καθιστά εύκολο το να δουλέψει κάποιος με τεράστιους όγκους δεδομένων σε αυτό το στατιστικό πακέτο (Καρλής Δ., 2015).

5.5 Τοποθέτηση περιγραφικών στοιχείων, μέτρων και στατιστική μεθοδολογία

Υπάρχουν στατιστικά δεδομένα τα οποία μπορούν να μας δώσουν μία γρήγορη εικόνα για τα δεδομένα που πρόκειται να μελετήσουμε. Τα αριθμητικά περιληπτικά μέτρα διακρίνονται στα μέτρα θέσης ή κεντρικής τάσης, που περιλαμβάνουν τη μέση τιμή ή μέσο (mean), τη διάμεσο (median) και την επικρατούσα τιμή (mode). Επίσης υπάρχουν και τα μέτρα μεταβλητότητας ή διασποράς που περιλαμβάνουν το εύρος (range), τη

διασπορά (variance), την τυπική απόκλιση (standard deviation) και τέλος το συντελεστή μεταβλητότητας (coefficient of variance) (Dawson B., 2004).

Με το σύμβολο (N), αναφερόμαστε στο πλήθος των παρατηρήσεων που υπάρχουν στο δείγμα. Η ελάχιστη τιμή (min) ορίζεται ως η μικρότερη αριθμητική τιμή που παρατηρείται στο δείγμα. Η μέγιστη τιμή (max) ορίζεται ως η μέγιστη αριθμητική τιμή που παρατηρείται στο δείγμα. Οι ακραίες τιμές προσδιορίζουν το εύρος της κατανομής (range) από την οποία προέρχονται. Επίσης υπάρχει η έννοια της μέσης τιμής (μέσος όρος, mean) που ορίζεται ως το αλγεβρικό άθροισμα όλων των μετρήσεων διαιρεμένο με το πλήθος των μετρήσεων αυτών.

Η σταθερή απόκλιση (πρότυπη απόκλιση, standard deviation) αποτελεί αξιόλογο μέτρο του βαθμού διασποράς των παρατηρήσεων και είναι σημαντικό στοιχείο για την βιοστατιστική. Ως μέτρο του βαθμού της διασποράς χρησιμοποιείται η μεταβλητότητα (διακύμανση, variance), η οποία συμβολίζεται με V και ορίζεται ως η μέση τιμή των τετραγώνων των αποκλίσεων των μετρήσεων από την αντίστοιχη μέση τιμή. Η σταθερή απόκλιση ορίζεται ως η τετραγωνική ρίζα της μεταβλητότητας και συμβολίζεται με S ή SD (Standard Deviation). Τα μεγέθη της μεταβλητότητας και της σταθερής απόκλισης αποτελούν μεγέθη εννοιολογικά όμοια.

Ως βαθμοί ελευθερίας ορίζεται ο αριθμός των παρατηρήσεων στα δεδομένα ο οποίος μπορεί να λάβει οποιαδήποτε τιμή όταν εκτιμάται μία στατιστική παράμετρος. Η μεταβλητότητα εντός του πληθυσμού (within group Variation), εκφράζει το πόσο διαφέρουν οι τιμές των επιμέρους παρατηρήσεων ενός πληθυσμού από τη μέση τιμή ενός πληθυσμού. Η μεταβλητότητα ανάμεσα στους διαφορετικούς πληθυσμούς (between group Variation) εκφράζει το πόσο διαφορετική είναι η μέση τιμή ενός πληθυσμού από το συνολικό μέσο.

Αρκετά χρήσιμη έννοια για τις στατιστικές αναλύσεις των δεδομένων είναι και η εύρεση της πιθανότητας p - value το οποίο χρησιμοποιείται κυρίως σε στατιστικούς ελέγχους. Το p - value, είναι μία πιθανότητα. Αποτελεί το μικρότερο παρατηρούμενο επίπεδο σημαντικότητας, για το οποίο απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση H_0 , και ονομάζεται p-value, όταν ένας στατιστικός έλεγχος χρησιμοποιείται σε δεδομένο δείγμα. Διαφορετικά σαν πιθανότητα p-value ονομάζουμε την πιθανότητα να παρατηρήσουμε ένα αποτέλεσμα τόσο ή περισσότερο ακραίο όσο το αποτέλεσμα ενός συγκεκριμένου δείγματος δεδομένου ότι ισχύει η μηδενική υπόθεση H_0 . Εάν το αποτέλεσμα του δείγματος δεν είναι στο 5%, έχοντας θέσει επίπεδο σημαντικότητας α

= 0,05, των πιο ακραίων τιμών, τότε το εύρημα θεωρείται μη σημαντικό και δεν απορρίπτεται. Εάν βρίσκεται στο 5% τότε είμαστε σε θέση να απορρίψουμε την μηδενική αρχική υπόθεση. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το 5% επίπεδο σημαντικότητας είναι αυτό που χρησιμοποιείται κυρίως σε βιολογικά συστήματα μελέτης. Σε αυτή τη μελέτη θα χρησιμοποιηθεί το επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$. Η πιθανότητα που επιτρέπεται να εκτιμηθεί ως λάθος όταν εκτιμούμε μία παράμετρο με ένα διάστημα εμπιστοσύνης ονομάζεται επίπεδο σημαντικότητας και συμβολίζεται ως: (α). Άρα αν υποθέσουμε ότι μελετάμε σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$ τότε $1 - 0,05 = 0,95$ και ονομάζεται το διάστημα εμπιστοσύνης ως 95% Δ.Ε.

Η δοκιμασία ελέγχου είναι ένας κανόνας που βασίζεται στα δεδομένα που έχουμε συλλέξει. Με βάση αυτά θα αποφασιστεί εάν θα απορρίψουμε ή δεν θα είμαστε σε θέση να απορρίψουμε την αρχική μηδενική υπόθεση H_0 . Ο στατιστικός έλεγχος (teststatistic) είναι μία συνάρτηση επάνω στην οποία βασίζεται η απόφαση που θα ληφθεί. Η περιοχή απόρριψης (Rejectionregion) αποτελείται από το σύνολο των τιμών της στατιστικής δοκιμής για τις οποίες η αρχική μηδενική υπόθεση απορρίπτεται.

Μία από τις μεθόδους στατιστικού ελέγχου είναι το t-test έλεγχος. Το t-test πραγματοποιείται για κανονικές κατανομές και για συνεχή δεδομένα. Αναφέρεται μόνο σε δύο ομάδες δεδομένων. Κατά το t-test μπορώ να εκτιμήσω την τυπική απόκλιση s και η στατιστική συνάρτηση ελέγχου είναι η $t = \frac{x - \mu_0}{s/\sqrt{n}}$. Το τεστ αυτό έχει τα εξής στάδια: α) Διατύπωση της αρχικής μηδενικής υπόθεσης H_0 και της εναλλακτικής H_1 , β) την επιλογή του επιπέδου σημαντικότητας (α), γ) τον υπολογισμό των κρίσιμων τιμών για $(n-1)$ βαθμούς ελευθερίας, δ) τον υπολογισμό του στατιστικού t και ε) τέλος εάν βρεθεί πως η τιμή t είναι εντός της περιοχής απόρριψης να είμαστε σε θέση να απορρίψουμε την αρχική μηδενική υπόθεση H_0 , διαφορετικά δεν θα μπορέσουμε να απορρίψουμε την H_0 για το επίπεδο σημαντικότητας που μελετάμε το συγκεκριμένο test.

Για τον έλεγχο της μηδενικής υπόθεσης, συγκρίνεται η τιμή p με την τιμή α , η οποία είναι αυθαίρετη και καθορίζεται από τον ερευνητή. Συχνά δεν αναφέρεται στις μελέτες η ακριβής τιμή p , παρά μόνο αν η τιμή αυτή είναι μεγαλύτερη ή μικρότερη από την τιμή α . Δεν υπάρχει κανένας λόγος ένα συνεχές μέτρο όπως η p -value τιμή να μετατρέπεται σε διχότομο μέτρο, διότι με τέτοιο συμβάν χάνεται πολύτιμη πληροφορία. Όταν ορίζεται $\alpha = 0,05$, τότε τιμές $p = 0,001$ ή $p = 0,049$ οδηγούν σε απόρριψη της H_0 . Η διαφορά που παρατηρείται από το σημείο 0,001 έως το 0,049 είναι πολύ μεγάλη. Για

αυτό το λόγο, πρέπει να εφαρμοστεί η αναφορά της ακριβούς τιμής της p και όχι απλά να παρατεθεί αν είναι μεγαλύτερη ή μικρότερη από το α (Σπάρος Λ., 2006).

Όσο αφορά τη μέθοδο λήψης αποφάσεων καλείται έλεγχος της μηδενικής υπόθεσης H_0 , και σε κάθε τέτοιο έλεγχο μπορούν να προκύψουν δύο τύποι σφάλματος. Το σφάλμα τύπου (I), όπου σε αυτή την περίπτωση έχουμε απορρίψει ή καλύτερα υπάρχει η πιθανότητα να απορρίψουμε την μηδενική υπόθεση ενώ αυτή ισχύει. Αυτή η πιθανότητα ονομάζεται (α) . Ο δεύτερος τύπος σφάλματος είναι το σφάλμα τύπου (II). Αυτό αναφέρεται στην πιθανότητα που υπάρχει να μην απορρίψω την μηδενική υπόθεση H_0 , ενώ αυτή δεν ισχύει και αυτή η πιθανότητα ονομάζεται πιθανότητα (β) . Η πιθανότητα του ελέγχου έγκειται στο κατά πόσο η πιθανότητα πραγματοποίησης των σφαλμάτων τύπου (I) ή τύπου (II) είναι η μικρότερη δυνατή. Η ισχύς του κάθε ελέγχου ορίζεται ως (Power) και αναφέρεται στην πιθανότητα $p=1-\beta$, η οποία είναι στην πραγματικότητα η πιθανότητα να απορρίψω την H_0 , ενώ ισχύει η H_1 υπόθεση.

Έχοντας αναφερθεί στην μεταβλητότητα η οποία μπορεί να είναι $Variation\ between\ sample\ means\ MSR$ (εκφράζει το πόσο διαφέρει η μέση τιμή ενός πληθυσμού από το συνολικό μέσο) και $Variation\ within\ sample\ means\ MSE$ (εκφράζει το πόσο διαφέρουν οι μέσες τιμές των επιμέρους παρατηρήσεων ενός πληθυσμού από τη μέση τιμή του πληθυσμού), μπορεί να οριστεί το F-Statistic ως : $F-Statistic = \frac{MSR}{MSE}$. Ο

αριθμητής και ο παρονομαστής είναι απλοί εκτιμητές της διασποράς μεταξύ τους και εντός των πληθυσμών οι οποίοι λαμβάνουν υπόψη τους, τους βαθμούς ελευθερίας που χρησιμοποιήσαμε για να κάνουμε την εκτίμηση.

Στην περίπτωση που καλούμαστε να μελετήσουμε και να συγκρίνουμε μεταβλητές από περισσότερα των δύο γκρούπς θα χρησιμοποιηθεί η ANOVA για τη μελέτη αυτή. Η διαδικασία της ανάλυσης διασποράς (ANOVA – analysis of variation), ελέγχει την ισότητα όλων των μέσων τιμών που προέρχονται από περισσότερα από τρία γκρούπς συλλογής δεδομένων. Δίνει απάντηση συγκρίνοντας το F-Statistic που προκύπτει και συγκρίνεται με το P σημαντικό που μελετάμε σε κάθε περίπτωση. Ένα t-test δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μία τέτοια περίπτωση που ελέγχονται τιμές από περισσότερα των 3 γκρούπς καθώς είναι επίπονο.

Για να ολοκληρωθεί η διαδικασία της εφαρμογής της μεθόδου ANOVA, θα πρέπει να ελέγξω τη συνέχεια των μεταβλητών που μελετώ (εξαρτημένης μεταβλητής), η ύπαρξη άνω των τριών συστημάτων- ομάδων μελέτης, οι μετρήσεις να είναι

ανεξάρτητες μεταξύ τους, να μην υπάρχουν ακραίες τιμές (outliers) οι οποίες μπορούν να ελεγχθούν με boxplots. Επίσης, η μεταβλητή θα πρέπει να ακολουθεί κανονική κατανομή για κάθε κατηγορία ανεξάρτητης μεταβλητής κάτι το οποίο μπορεί να ελεγχθεί με γραφικό έλεγχο ή με ShapiroWilk'sTest. Τέλος, θα πρέπει να υπάρχει ομοιογένεια στη διακύμανση, το οποίο μπορούμε να το ελέγχουμε με τον έλεγχο της ομοσκεδαστικότητας με το Lavene'sTest. Στην περίπτωση που αποτύχει το Lavene'sTest οδηγούμαστε σε WelchAnova και όχι σε onewayAnova, πραγματοποιώντας όμως διαφορετικό PostHocTest.

Πέρα από τις προϋποθέσεις εφαρμογής της μεθόδου ANOVA, υπάρχουν και διαγνωστικοί έλεγχοι οι οποίοι θα εφαρμοστούν. Οι διαγνωστικοί έλεγχοι (diagnostics) έχουν ως εξής: Αρχικά πραγματοποιείται ο έλεγχος κανονικότητας, ο οποίος πραγματοποιείται με γραμμικό έλεγχο ή ShapiroWilk'sTest. Αν η κανονικότητα δε ακολουθείται θα πρέπει να πραγματοποιηθούν μετασχηματισμοί. Στη συνέχεια υπάρχει ο έλεγχος ομοσκεδαστικότητας για να ελεγχθεί η διακύμανση και πραγματοποιείται με το Lavene'sTest. Θεωρούμε ως μηδενική υπόθεση H_0 το να έχουν οι δύο μεταβλητές την ίδια διακύμανση. Αν το p -value > 0,05 δεν απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση και συνεπώς δεν παραβιάζεται η προϋπόθεση αυτή. Ο τρίτος έλεγχος αφορά τις ακραίες τιμές (outliers), τα οποία ελέγχονται με boxplots ή με KruskalWalisTest το οποίο είναι μη παραμετρική υπόθεση σε περίπτωση που υπάρχουν outliers. Στο KruskalWalisTest θέτω όπου μηδενική υπόθεση H_0 ότι τα δείγματα προέρχονται από τον ίδιο πληθυσμό και την εναλλακτική H_1 υπόθεση ότι προέρχονται τουλάχιστον από έναν διαφορετικό πληθυσμό (Διαμαντόπουλος, 2012).

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων γίνεται για τον σκοπό που είναι να φτιαχτεί ένα γραμμικό μοντέλο. Η κατασκευή μίας συνάρτησης ή σχέσης που χρησιμοποιώντας τη θα είναι δυνατό να γίνουν προβλέψεις. Αυτό προκύπτει μέσα από τη μελέτη της σχέσης ανάμεσα σε δύο μεταβλητές. Την (x) η οποία είναι ο προγνωστικός δείκτης ή επεξηγηματική μεταβλητή ή ανεξάρτητη μεταβλητή και από την άλλη πλευρά η (y) η οποία είναι η απαντητική μεταβλητή ή η έκβαση ή εξαρτημένη μεταβλητή. Το γραμμικό μοντέλο θα στοχεύει στο να μπορεί να κάνει την πρόβλεψη με το μικρότερο σφάλμα. Συγκρίνει την προκύπτουσα τιμή με τη στατιστικά σημαντική στιγμή F-Statistic. Η ερμηνεία που θα δοθεί αφορά την ύπαρξη ή μη γραμμικής σχέσης, την ύπαρξη καταλοίπων, αν έχουμε ανεξαρτησία των δεδομένων και τέλος πληροφορίες για τη διακύμανση. Για να τεσταριστεί πλήρως ένα τέτοιο μοντέλο είναι σημαντικό να

παρατηρήσουμε τι ποσοστό της μεταβλητότητας ερμηνεύει (R^2), καθώς και να μην γίνεται overfitting (από τις πολλές μεταβλητές που έχουν εισαχθεί) (Rice, 2007).

Η ανάλυση παλινδρόμησης προσπαθεί να καταγράψει τον τρόπο με τον οποίο μεταβάλλεται η αναμενόμενη μέση τιμή μίας εξαρτημένης μεταβλητής όταν αλλάζει η τιμή μίας ή περισσότερων ανεξάρτητων μεταβλητών. Προβλέπει και βγάζει τη σχέση με την οποία προκύπτει η στοχαστική σχέση ανάμεσα στις (x) και (y), (x) ανεξάρτητης μεταβλητής, δείκτης ή επεξηγηματική μεταβλητή και της (y) εξαρτημένης μεταβλητής, απαντητικής μεταβλητής ή outcome. Η γραμμική παλινδρόμηση (LinearRegression) είναι η σύγκριση δύο μοντέλων. Το (α) είναι ένα μοντέλο στο οποίο η ανεξάρτητη μεταβλητή δε συμπεριλαμβάνεται και το (β) ένα μοντέλο στο οποίο χρησιμοποιείται η καλύτερη ευθεία παλινδρόμησης. Η διαφορά μεταξύ της καλύτερης ευθείας (bestfitted) και των παρατηρούμενων τιμών λέγεται κατάλοιπα (residuals) ή σφάλμα (error) (Rice, 2007).

Δεν είναι όμως πάντα εφικτό να εφαρμοστεί η ανάλυση παλινδρόμησης. Οι προϋποθέσεις εφαρμογής της ανάλυσης παλινδρόμησης είναι οι εξής: Οι μεταβλητές να έχουν μελετηθεί σε συνεχές επίπεδο, να υπάρχει γραμμική σχέση ανάμεσα στις δύο μεταβλητές, το οποίο μπορώ να το ελέγξω με γραμμική σχέση, να μην υπάρχουν outliers/ υπερβολικά ακραίες τιμές, να έχω ένα σύνολο από ανεξάρτητες παρατηρήσεις το οποίο ελέγχεται με έλεγχο ανεξαρτησίας ή με έλεγχο DurbinWatsonStatistic, τα δεδομένα να έχουν και να δείχνουν καλή ομοσκεδαστικότητα (homoscedasticity), το οποίο μπορεί να ελέγχεται με τον έλεγχο σταθερής μεταβλητότητας των (x) και (y) και τέλος τα κατάλοιπα (residuals) πρέπει να είναι κανονικά κατανομημένα κάτι το οποίο μπορεί να ελεγχθεί με το τεστ κανονικότητας P-PPlotNormal (Rice, 2007).

Στην απλή γραμμική παλινδρόμηση, η σχέση μεταξύ των δύο μεταβλητών περιγράφεται από μία ευθεία γραμμή σύμφωνα με την ισότητα:

$$Y = A_0 + A_1 X_1 + \varepsilon (I)$$

Στην ισότητα (1), το Y είναι η εξαρτημένη μεταβλητή της απλής γραμμικής παλινδρόμησης, ενώ το X_1 είναι η ανεξάρτητη μεταβλητή. Το Y αντιστοιχεί στη μελετώμενη έκβαση, ενώ το X_1 αντιστοιχεί στο μελετώμενο προσδιοριστή. Το A_0 είναι η σταθερά της απλής γραμμικής παλινδρόμησης και είναι η μέση τιμή που λαμβάνει η μεταβλητή Y όταν η μεταβλητή X_1 ισούται με 0. Το A_1 περιγράφει

την κλίση της ευθείας γραμμής που σχετίζει το X_1 με το Y . Το A_1 είναι ο αριθμός των μονάδων που μεταβάλλεται το Y κάθε φορά που η τιμή του X_1 μεταβάλλεται κατά μία μονάδα. Το ε είναι το τυχαίο σφάλμα που αντιπροσωπεύει την τυχαία απόκλιση από την αναμενόμενη τιμή της εξαρτημένης μεταβλητής Y . Η μέση τιμή του τυχαίου σφάλματος θεωρείται ίση με το 0. Επίσης οι τιμές των A_0 και A_1 κυμαίνονται από μείον άπειρο έως συν άπειρο (Σπάρος Λ., 2006).

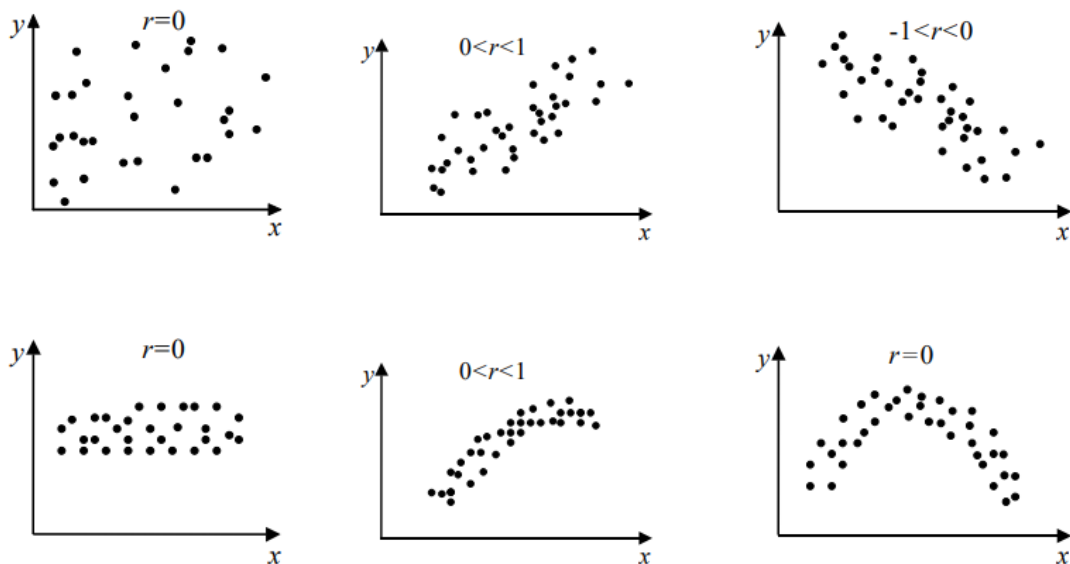
Ο συντελεστής συσχέτισης του Pearson συμβολίζεται με ρ όταν αφορά ολόκληρο πληθυσμό και με r όταν υπολογίζεται για ένα δείγμα, είναι το κατάλληλο στατιστικό στοιχείο για να ανιχνευτεί η ύπαρξη ή μη ύπαρξης γραμμικής συσχέτισης ή σχέσης ανάμεσα σε δύο μεταβλητές (ποσοτικές ή συνεχείς ή αριθμητικές διακριτές). Ο συντελεστής συσχέτισης στερείται φυσικών διαστάσεων και λαμβάνει τιμές από [-1, +1]. Η τιμή μείον ένα (-1) δείχνει ισχυρή αρνητική ευθύγραμμη συσχέτιση μεταξύ δύο ποσοτικών μεταβλητών και η τιμή ένα (+1) δείχνει ισχυρή θετική συσχέτιση. Στην περίπτωση που ο συντελεστής συσχέτισης λάβει την μηδενική τιμή (0), δηλώνει την απουσία ευθύγραμμης σχέσης. Σαν υπόμνημα μπορεί να θεωρηθεί ότι για τιμές [0,7-1] υπάρχει καλή γραμμική σχέση (ισχυρή). Από τις τιμές [0,3-0,7] υπάρχει ασθενής γραμμική σχέση και στο διάστημα των τιμών [0-0,3] δεν υπάρχει γραμμική σχέση. Στο παράδειγμα που υπάρχουν δύο μεταβλητές x και y και ο συντελεστής συσχέτισης ορίζεται ως ρ , θα μπορεί να προκύψει από το κλάσμα:

$$\rho = \frac{\text{Covariance}(x,y)}{\sqrt{\text{Variance}(x)\text{Variance}(y)}}.$$

Το διάγραμμα συσχέτισης, το οποίο λέγεται επίσης και στικτόγραμμα (ScatterDiagram), αποτελεί απλή αλλά πολύ χρήσιμη μέθοδο μελέτης της συσχέτισης δύο μεταβλητών, ή της εξάρτησης της μίας απ' αυτές από την άλλη. Ο οριζόντιος άξονας του διαγράμματος αναφέρεται στη μία μεταβλητή και ο κάθετος στην άλλη μεταβλητή. Εάν πρόκειται για πρόβλημα εξάρτησης, τότε η ανεξάρτητη μεταβλητή τοποθετείται συνήθως στον οριζόντιο άξονα των x ' x και η εξαρτημένη στον κάθετο άξονα των y ' y . Τόσο ο οριζόντιος όσο και ο κάθετος άξονας (κλίμακες) μπορεί να αρχίζουν από οποιαδήποτε τιμή και όχι υποχρεωτικά από την τιμή του μηδενός (0). Στο διάγραμμα συσχέτισης, κάθε παρατήρηση ή ερευνητική μονάδα παριστάνεται με ένα

σημείο (κηλίδα) του οποίου οι συντεταγμένες αντιστοιχούν στις μετρήσεις x και y αντίστοιχα της μονάδας αυτής.

Ο τρόπος με τον οποίο κατανέμονται τα στοιχεία αυτά στο στικτόγραμμα, δείχνει την ύπαρξη ή μη ύπαρξη συσχέτισης. Επίσης μας δείχνει και το είδος της συσχέτισης των μεταβλητών το οποίο εξηγείται με τη βοήθεια της επόμενης εικόνας:



Εικόνα 5.5: Διαγράμματα συσχέτισης (Τριχόπουλος Δ., Βιοστατιστική, 2000)

Περνώντας στην ερμηνεία της παραπάνω εικόνας, δίνουμε σαν γενική εικόνα ή γενικό ορισμό ότι τα παραπάνω διαγράμματα που περιέχουν τιμές ($r = 0$), δηλώνουν απουσία συσχέτισης, ενώ τιμές εύρους ($-1 < r < 0$) δηλώνουν αρνητική συσχέτιση και τιμές εύρους ($0 < r < 1$) δείχνουν την θετική συσχέτιση των δύο μεταβλητών (Τριχόπουλος Δ., Βιοστατιστική, 2000).

5.6 Περιγραφική Στατιστική

Στο παρόν κομμάτι θα αναλυθεί η ιοντίζουσα ακτινοβολία που απορροφάται στον ανθρώπινο οργανισμό από την πανοραμική εξέταση δοντιών, η οποία χρησιμοποιείται σε μεγάλο ποσοστό σαν ακτινοδιαγνωστική μέθοδος για κάθε διαφορετική κατηγορία κυττάρων, και στην συνέχεια θα κατασκευαστεί η καμπύλη αναφοράς των κυττάρων που έχουν δεχθεί υψηλή ακτινοβολία και της χαμηλής φυσιολογικής ακτινοβολίας, ενώ το πακέτο που θα χρησιμοποιηθεί για την διαλεύκανση των ερευνητικών υποθέσεων θα είναι το R-STUDIO.

Αρχικά, ανοίγουμε τα δεδομένα, τα οποία είναι στο αρχείο FOCIS στο πακέτο R-STUDIO. Υπάρχουν αρκετοί τρόποι με τους οποίους μπορεί να ανοίξει ένα αρχείο, για παράδειγμα αν είναι σε μορφή κειμένου (.txt), μπορούμε να το ανοίξουμε μέσω της εντολής **read.table**, ενώ αν είναι σε αρχείο excel (.xlsx) χρησιμοποιούμε αντίστοιχα την εντολή **read.csv**. Για την ανάλυσή μας, μετονομάζουμε το αρχείο δεδομένων σε dataset, ενώ με την εντολή **attach** μας δίνεται η δυνατότητα να επεξεργαστούμε αυτό το αρχείο, το οποίο ανοίγουμε μέσω των εντολών. Στη δεδομένη περίπτωση χρησιμοποιούμε την εντολή **read.table**:

Πίνακας 5.6.1: ReadTable

```
Dataset<-read.table("/(Διαδρομή της θέσης στον υπολογιστή που είναι το  
αρχείο)/(Όνομα αρχείου).txt/,header=TRUE);dataset  
attach(dataset)
```

Τα δεδομένα μας είναι αριθμητικές τιμές, κάτι το οποίο το διαπιστώνουμε εύκολα μέσω της εντολής **class**, ενώ μέσα από την εντολή **head** μας δίνεται η δυνατότητα να εμφανίσουμε τις έξι πρώτες στήλες των δεδομένων των εξεταζόμενων μεταβλητών. Έχουμε συνολικά n=2002 παρατηρήσεις για κάθε μεταβλητή, και στην συνέχεια θα αναλύσουμε τις διάφορες ερευνητικές υποθέσεις.

Πίνακας 5.6.2: Head, Class

```
> head(dataset)  
  ir20 ir240 nc20 nc240 pc20 pc240  
1  26   0   3   30  22   6  
2   0   1   1   30  33  37  
3   7   0  22   23  15  46  
4   4   0  25   50  47  24  
5   0   1  19   0  12  78  
6   3   0   6   43  14  37  
  
> class(ir20)  
[1] "numeric"
```

Προτού προχωρήσουμε στην ανάλυση των ερευνητικών υποθέσεων, θα παραθέσουμε κάποια περιγραφικά μέτρα για τις μεταβλητές μας, οι οποίες είναι οι ακόλουθες:

IR20: Ο αριθμός των FOCIS των ιστόνων (έχουν επισημανθεί με φθόριο) που φθορίζουν όταν υπάρχει σπάσιμο DNA στα κύτταρα με φυσιολογική ακτινοβολία (0,2Gy) που έχουν μετρηθεί στο χρόνο είκοσι (20) λεπτά.

IR240: Ο αριθμός των FOCIS των ιστόνων που φθορίζουν όταν υπάρχει σπάσιμο DNA στα κύτταρα με φυσιολογική ακτινοβολία (0,2Gy) που έχουν μετρηθεί στο χρόνο τεσσάρων ωρών, διακόσια σαράντα (240) λεπτά.

NC20: Ο αριθμός των FOCIS των ιστόνων που φθορίζουν όταν υπάρχει σπάσιμο DNA στα κύτταρα με χαμηλή μηδενική ακτινοβολία (0Gy) που έχουν μετρηθεί στο χρόνοείκοσι(20) λεπτά.

NC240: Ο αριθμός των FOCIS των ιστόνων που φθορίζουν όταν υπάρχει σπάσιμο DNA στα κύτταρα με χαμηλή μηδενική ακτινοβολία (0Gy) που έχουν μετρηθεί στο χρόνο τεσσάρων ωρών, διακόσια σαράντα (240) λεπτά.

PC20: Ο αριθμός των FOCIS των ιστόνων που φθορίζουν όταν υπάρχει σπάσιμο DNA στα κύτταρα με υψηλή ακτινοβολία (2Gy) που έχουν μετρηθεί στο χρόνοείκοσι(20) λεπτά.

PC240: Ο αριθμός των FOCIS των ιστόνων που φθορίζουν όταν υπάρχει σπάσιμο DNA στα κύτταρα με υψηλή ακτινοβολία (2Gy) που έχουν μετρηθεί στο χρόνο τεσσάρων ωρών, διακόσια σαράντα (240) λεπτά.

Με βάση τα δεδομένα μας, κατασκευάζουμε τον ακόλουθο πίνακα περιγραφικών μέτρων (έχουμε συνολικά 2002 κύτταρα σε κάθε group ξεχωριστών μετρήσεων), τα οποία προκύπτουν μέσω των εντολών που θα δοθούν στο στατιστικό πακέτο ως: min, max, mean και sd αντίστοιχα. Για παράδειγμα υπολογίζουμε την ελάχιστη τιμή (min) για τον αριθμό των FOCIS των ιστόνων στο DNA των κυττάρων για την χαμηλή ακτινοβολία (0Gy) με τον τρόπο που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5.6.3: Εύρεση ελάχιστης τιμής, min

```
> min(ir20)
[1] 0
> min(ir240)
```

Στη συνέχεια προχωρήσαμε στον υπολογισμό των περιγραφικών μέτρων για το κάθε group μετρήσεων και κατασκευάστηκε ο παρακάτωπίνακας. Με μια πρώτη ματιά παρατηρούμε πως τα κύτταρα που υποβλήθηκαν σε υψηλότερη ακτινοβολία έχουν πολύ μεγαλύτερο αριθμό μετρούμενων ιστονών το οποίο συνεπάγεται με μεγάλο αριθμό DNA breaks (σπασίματα του DNA) , με βάση τον αντίστοιχο μέσο όρο που προκύπτει στους χρόνους μετρήσεων των είκοσι(20) και διακοσίων σαράντα(240) λεπτών. Αναλυτικά, για κάθε ένα group μετρήσεων κυττάρων *ir20*, *ir240*, *nc20*, *nc240*, *pc20* και *pc240*, όπως έχουν ονομαστεί στη συγκεκριμένη μελέτη, φαίνονται υπολογισμένα οι ελάχιστες τιμές (*min*), οι μέγιστες τιμές (*max*), η μέση τιμή (*mean*), η τυπική απόκλιση (*sd*) και το πλήθος των κυττάρων που συμμετείχαν για κάθε ομάδα μετρήσεων (*N*).

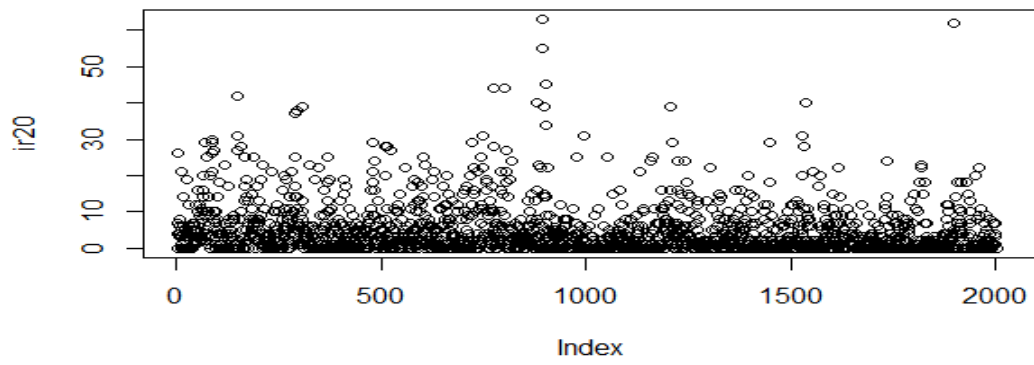
Πίνακας 5.6.4: Περιγραφικά μέτρα μεταβλητών για κάθε group

Περιγραφικά μέτρα μεταβλητών					
	Πλήθος κυττάρων (<i>N</i>)	Ελάχιστη τιμή (<i>min</i>)	Μέγιστη τιμή (<i>max</i>)	Μέση τιμή (<i>mean</i>)	Τυπική απόκλιση (<i>sd</i>)
ir20	2002	0	63	4,66	6,794
ir240	2002	0	86	7,66	10,014
nc20	2002	0	68	8,72	10,852
nc240	2002	0	97	13,57	15,205
pc20	2002	0	91	23,87	13,497
pc240	2002	0	121	23,45	13,798
Valid N (listwise)	2002				

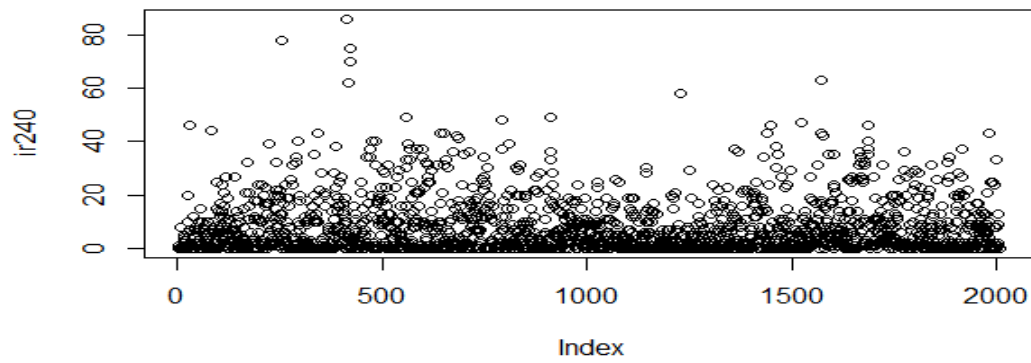
Για τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου R-Studio, εξάγουμε τα διαγράμματα *plots* για κάθε ξεχωριστό γκρουπ μετρήσεων. Αυτά τα διαγράμματα μας δίνουν βοήθεια μόνο όσο αφορά την πρώτη εικόνα των δεδομένων. Είμαστε σε θέση να αξιολογήσουμε με οπτική επαφή την κάθε ομάδα ξεχωριστά και να

κάνουμε πρόχειρα αξιολόγηση του κινδύνου που έχει προκύψει σε κάθε μία ομάδα κυττάρων έπειτα από την ακτινοβολήσή τους στις δύο ξεχωριστές στιγμές.

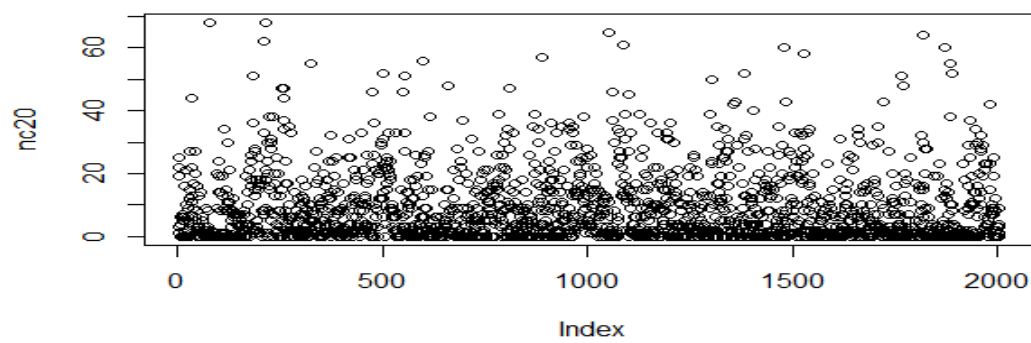
Στο στατιστικό πακέτο R-Studio, θα δίνονται οι εντολές: `>plot(ir20)` , `>plot(ir240)`
`>plot(pc240)`, από όπου και προέκυψαν τα ακόλουθα διαγράμματα και τα παραθέτουμε στις επόμενες εικόνες:



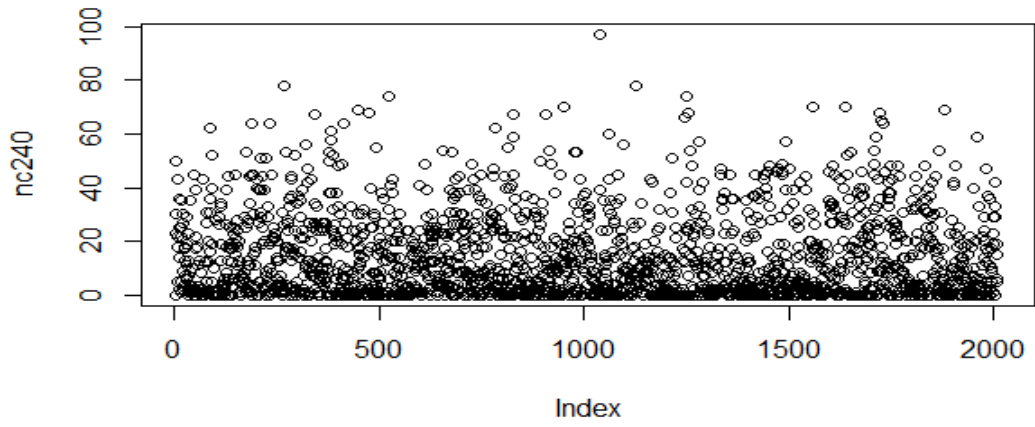
Εικόνα 5.6.1: Plot IR20



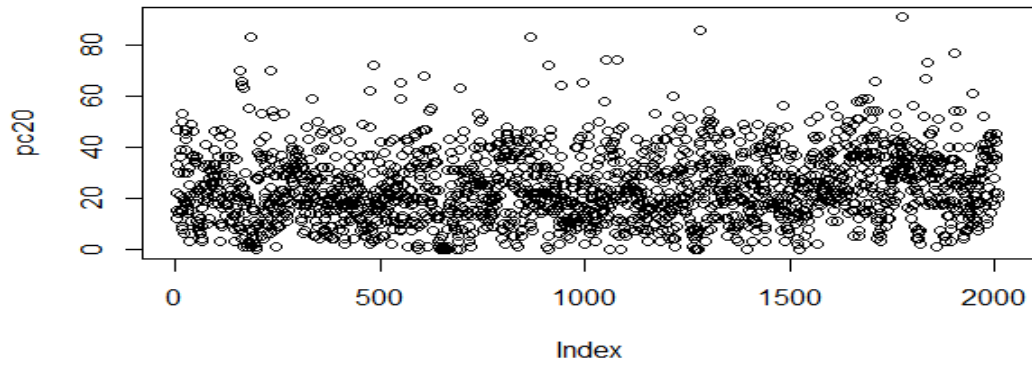
Εικόνα 5.6.2: Plot IR240



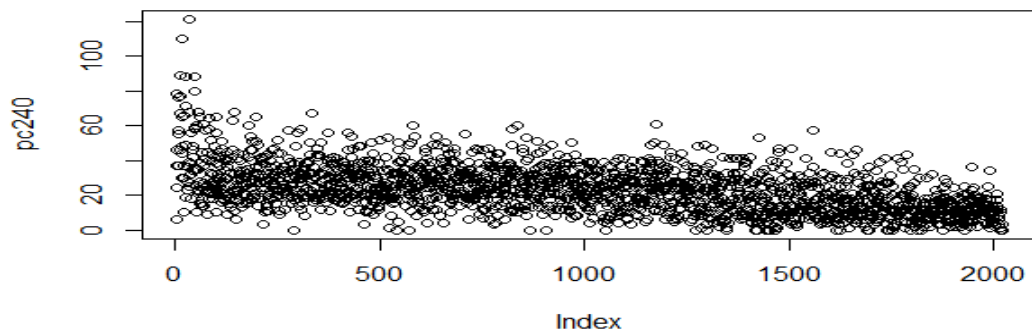
Εικόνα 5.6.3: Plot NC20



Εικόνα 5.6.4: Plot NC240



Εικόνα 5.6.5: Plot PC20



Εικόνα 5.6.6: PlotPC240

5.7 Έλεγχος των ερευνητικών υποθέσεων

Στη συνέχεια διατυπώνονται οι υποθέσεις εργασίας που έγιναν για την μελέτη του κινδύνου της ιοντίζουσας ακτινοβολίας σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα:

Υπόθεση #1: Θεωρούμε ότι η ιοντίζουσα ακτινοβολία για τον χρόνο και της έντασης έκθεσης σε αξονικό τομογράφο που χρησιμοποιείται στην οδοντιατρική απεικόνιση δεν έχει ουσιαστικές επιπτώσεις στο DNA των κυττάρων του βλεννογόνου της στοματικής κοιλότητας.

Υπόθεση #2: Εάν υπάρχουν κάποιες αμελητέες επιδράσεις στο DNA του βλεννογόνου της στοματικής κοιλότητας, τότε τα κύτταρα τις επιδιορθώνουν σχετικά σύντομα.

Ουσιαστικά, θέλουμε να ελέγξουμε αν η ιοντίζουσα ακτινοβολία δεν έχει καμία επίδραση στο DNA των κυττάρων του βλεννογόνου της στοματικής κοιλότητας ανεξάρτητα από τον χρόνο και την ένταση της ακτινοβολίας. Επίσης να ελεγχθεί αν υπάρχουν κάποιες αμελητέες επιδράσεις στο DNA του βλεννογόνου της στοματικής κοιλότητας κατά πόσο τα κύτταρα μπορούν να τις επιδιορθώνουν σχετικά σύντομα, και ανάλογα με τον χρόνο επιδιόρθωσης θα υπάρχουν καιπιθανώςστατιστικά σημαντικές διαφορές από ομάδα σε ομάδα. Πιο ειδικά, θα ελέγξουμε αν διαφέρουν οι μέσες τιμές των μεταβλητών της χαμηλής, της φυσιολογικής και της υψηλής έντασης της ακτινοβολίας ανά τον χρόνο, δηλαδή θα ελεγχθούν οι ακόλουθες υποθέσεις:

$H_1(1)$: Η μέση τιμή του αριθμού των FOCISτων ιστόνων που φθορίζουν όταν υπάρχει σπάσιμο DNA στα κύτταρα με φυσιολογική ιοντίζουσα ακτινοβολία στα είκοσι(20) λεπτά (IR_{20}) είναι ίδια με την μέση τιμή του αριθμού των FOCISτων ιστόνων που φθορίζουν όταν υπάρχει σπάσιμο DNA στα κύτταρα με φυσιολογική ιοντίζουσα ακτινοβολία στα διακόσια σαράντα(240) λεπτά (IR_{240}), ($\mu_{ir_{20}} = \mu_{ir_{240}}$)έναντι της εναλλακτικής υπόθεσης.

$H_{1\epsilon}(1)$: Αλλιώς η εναλλακτική(οι μέσες τιμές διαφέρουν).

Για τον έλεγχο αυτής της υπόθεσης θα χρησιμοποιηθεί το στατιστικό κριτήριο t -testγια τον (δίπλευρο) έλεγχο των μέσων τιμών των δύο (2) πληθυσμών σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=5\%$, και αν το p -value του ελέγχου βρεθεί πάνω από 5%, τότε δεν μπορούμε να απορρίψουμε την αρχική υπόθεση. Στο R-Studio, αυτό γίνεται μέσα από την εντολή $t.test$ με το επόμενο σετ εντολών, όπου εκτελείται δίπλευρος έλεγχος υπό την υπόθεση της ισότητας των διακυμάνσεων.

Πίνακας 5.7.1: t-test των ($\mu_{ir20} = \mu_{ir240}$)

```
>t.test(ir20, ir240, alternative="two.sided",var.equal=TRUE)) # Έλεγχος
ισότητας των μέσων τιμών για το σπάσιμο του DNA στα κύτταρα με κανονική
ιονίζουσα ακτινοβολία για χρόνους 20 και 240 λεπτών, δηλαδή τα (IR20) και
(IR240)#

Two Sample t-test

data: ir20 and ir240
t = -11.109, df = 4002, p-value < 2.2e-16
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-3.534744 -2.474247
sample estimates:
mean of x mean of y
4.658342 7.662837
```

Η τιμή του στατιστικού εκτιμήθηκε σε $t=-11.109$, με συνολικά 4002 βαθμούς ελευθερίας, ενώ το p-value εκτιμήθηκε πολύ κοντά στο 0 (μικρότερο $2.2 \cdot 10^{-16}$) δηλαδή μικρότερο του 5%, το οποίο σημαίνει ότι απορρίπτουμε την μηδενική υπόθεση $H_1(1)$ και οι τιμές διαφέρουν, δηλαδή συμπεραίνουμε ότι υπάρχει στοιχειώδη διαφορά ανάμεσα στον αριθμό των FOCISτων ιστόνων που φθορίζουν σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=5\%$, άρα υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στο σπάσιμο DNA στα κύτταρα που έχουν υποστεί φυσιολογική ακτινοβολία 0,2Gy ανάλογα με τους χρόνους των είκοσι(20) λεπτών και διακοσίων σαράντα(240) λεπτών από τη στιγμή της ακτινοβολήσης. Το R-Studio παρέχει επίσης τις αντίστοιχες μέσες τιμές και το 95% διάστημα εμπιστοσύνης για την εξεταζόμενη παράμετρο (διαφορά των μέσων τιμών).

Θα εκτελεστούν παρόμοιες αναλύσεις και για τα κύτταρα με χαμηλή-μηδενική ακτινοβολία (NC) και σε αυτά με δόση υψηλής ακτινοβολίας (PC), και θα ακολουθήσουν οι επόμενοι έλεγχοι υποθέσεων:

$H_1(2)$: Η μέση τιμή του αριθμού των FOCISτων ιστόνων που φθορίζουν όταν υπάρχει σπάσιμο DNA στα κύτταρα με χαμηλή ακτινοβολία 0,0 Gy στα

είκοσι(20)λεπτά (NC20) είναι ίδια με την μέση τιμή του αριθμού των FOCISτων ιστόνων που φθορίζουν όταν υπάρχει σπάσιμο DNA στα κύτταρα με χαμηλή-μηδενική ακτινοβολία στα διακόσια σαράντα(240) λεπτά (NC240), ($\mu_{nc20} = \mu_{nc240}$)έναντι της εναλλακτικής.

$H_{1\epsilon}(2)$: Αλλιώς η εναλλακτική (οι μέσες τιμές διαφέρουν).

Θα ελεγχθεί και η μηδενική υπόθεση: $H_1(3)$: Η μέση τιμή του αριθμού των FOCISτων ιστόνων που φθορίζουν όταν υπάρχει σπάσιμο DNA στα κύτταρα με υψηλή ακτινοβολία 2,0 Gy στα είκοσι(20) λεπτά (PC20) είναι ίδια με την μέση τιμή του αριθμού των FOCISτων ιστόνων που φθορίζουν όταν υπάρχει σπάσιμο DNA στα κύτταρα με υψηλή ακτινοβολία 2,0 Gy στα διακόσια σαράντα(240) λεπτά (PC240). ($\mu_{pc20} = \mu_{pc240}$)έναντι της εναλλακτικής.

$H_{1\epsilon}(3)$: Αλλιώς η εναλλακτική (οι μέσες τιμές διαφέρουν).

Εκτελούνται πάλι τα t-test για τα κύτταρα με χαμηλή-μηδενική ακτινοβολία (control- negativecontrol) υποθέτοντας και πάλι ισότητα των διακυμάνσεων.

Πίνακας 5.7.2: t-test ($\mu_{nc20} = \mu_{nc240}$)

```
>t.test(nc20,nc240,alternative="two.sided",var.equal=TRUE)
#Ελεγχος ισότητας των μέσων τιμών για το σπάσιμο του DNA στα κύτταρα με
χαμηλή-μηδενική ακτινοβολία για χρόνους 20 και 240 λεπτών#

Two Sample t-test

data: nc20 and nc240
t = -11.628, df = 4002, p-value < 2.2e-16
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-5.673161 -4.036129
sample estimates:
mean of x mean of y
8.71978 13.57443
```

Η τιμή του στατιστικού εκτιμήθηκε σε $t=-11.628$, με συνολικά 4002 βαθμούς ελευθερίας, ενώ το p-value εκτιμήθηκε πολύ κοντά στο 0 (μικρότερο $2.2 \cdot 10^{-16}$), το οποίο σημαίνει ότι απορρίπτουμε την μηδενική υπόθεση $H_1(2)$ και οι τιμές διαφέρουν, δηλαδή υπάρχει στοιχειώδη διαφορά ανάμεσα στον αριθμό των FOCISτων ιστόνων που φθορίζουν όταν υπάρχει σπάσιμο DNA στα κύτταρα με χαμηλή ακτινοβολία 0,0Gy ανάλογα με τους χρόνους των 20 και 240 λεπτών σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$ μετά την ακτινοβόληση των κυττάρων, άρα παρατηρούνται διαφορετικά αποτελέσματα ανάλογα με τον χρονικό διάστημα που βρισκόμαστε μετά την ακτινοβόληση των κυττάρων.

Τέλος, εκτελείται η ίδια διαδικασία για τα κύτταρα με υψηλή ακτινοβολία 2,0 Gy, υποθέτοντας πάλι ισότητα των διακυμάνσεων.

Πίνακας 5.7.3: $t - test (\mu_{pc20} = \mu_{pc240})$

```
>t.test (pc20, pc240, alternative="two.sided", var. equal=TRUE)
#Έλεγχος ισότητας των μέσων τιμών για το σπάσιμο του DNA στα κύτταρα με
κανονική ακτινοβολία για χρόνους 20 και 240 λεπτών#

Two Sample t-test

data: pc20 and pc240
t = 0.97727, df = 4002, p-value = 0.3285
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.4241721  1.2673289
sample estimates:
mean of x mean of y
23.86863  23.44705
```

Εδώ, σε αυτό τον έλεγχο, η τιμή του στατιστικού εκτιμήθηκε σε $t=0,97727$, με συνολικά 4002 βαθμούς ελευθερίας, ενώ το p-value εκτιμήθηκε $0.3285 > 0.05$, μεγαλύτερη τιμή από το 0,05, οπότε δεν μπορούμε να απορρίψουμε την υπόθεση ισότητας $H_1(3)$ των μέσων τιμών, δηλαδή η επίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας στο

DNA των κυττάρων σε υψηλή ένταση ακτινοβολίας 2,0 Gy δεν διαφέρει ανάλογα με τον χρόνο που θα περάσει μετά την ακτινοβόληση των κυττάρων σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$, κάτι το οποίο δεν ισχύει για τα κύτταρα με χαμηλή-μηδενική ή φυσιολογική ένταση ακτινοβολίας, ανάλογα με το πέρασμα του χρόνου μετά τη στιγμή της ακτινοβόλησης των κυττάρων του βλεννογόνου της στοματικής κοιλότητας.

Οπότε, η ένταση της ακτινοβολίας έχει σημαντική επίδραση στο σπάσιμο των DNA των κυττάρων, αλλά σε υψηλή ένταση ακτινοβολίας δεν παρατηρούνται σημαντικές στατιστικές διαφορές ανάλογα με τον χρόνο που θα κυλίσει από τη στιγμή της ακτινοβόλησης των κυττάρων. Εδώ μπορούμε να σχολιάσουμε πως η υψηλή δόση ακτινοβολίας είναι μη διαχειρίσιμη για τις κυτταρικές λειτουργίες επιδιόρθωσης και δεν προλαβαίνουν να βελτιώσουν τις όποιες βλάβες και να επέμβουν αποτελεσματικά στα σπασίματα DNA το οποίο αποδεικνύει και την επικινδυνότητα της κατάστασης. Επίσης, παρατηρούνται κάποιες αμελητέες αντιδράσεις, τις οποίες τα κύτταρα είναι σε θέση να επιδιορθώσουν σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα και αυτό αφορά τις χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας, δηλαδή της μηδενικής ακτινοβολίας 0,0Gy και αυτή της χαμηλής ακτινοβολίας 0,2 Gy.

Έπειτα, θα γίνει ο έλεγχος της τρίτης κατά σειρά υπόθεσης:

Υπόθεση #3: Η επίδραση υψηλών δόσεων ιοντικής ακτινοβολίας 2,0 Gy είναι στατιστικά υψηλότερη σε σχέση με την επίδραση της χαμηλής δόσης ακτινοβολίας 0,0 Gy.

Στην συνέχεια λοιπόν θα εξεταστεί αν η ένταση της ιοντικής ακτινοβολίας που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα, είναι σημαντικά υψηλότερη από την επίδραση της χαμηλής δόσης ακτινοβολίας, και ουσιαστικά θα ελεγχθεί η υπόθεση της ισότητας του μέσου του αριθμού των FOCIS των ιστόνων που φθορίζουν όταν υπάρχει σπάσιμο DNA στα κύτταρα με χαμηλή ακτινοβολία 0,0Gy και στα κύτταρα με υψηλή ακτινοβολία 2,0Gy, για κάθε χρόνο μέτρησης είκοσι (20) και διακοσίων σαράντα λεπτών (240) μετά την ακτινοβόληση, και ουσιαστικά θα ελεγχθούν οι ακόλουθες υποθέσεις:

$H_3(1)$: Η μέση τιμή του αριθμού των FOCISτων ιστόνων που φθορίζουν όταν υπάρχει σπάσιμο DNA στα κύτταρα με χαμηλή-μηδενική ακτινοβολία (NC) στα 20 λεπτά είναι ίδια με την μέση τιμή του αριθμού των FOCISτων ιστόνων που φθορίζουν όταν υπάρχει σπάσιμο DNA στα κύτταρα με υψηλή ακτινοβολία (PC) στα 20 λεπτά. ($\mu_{nc20} = \mu_{pc20}$)έναντι της εναλλακτικής.

$H_{3\varepsilon}(1)$: Αλλιώς η εναλλακτική υπόθεση (οι μέσες τιμές διαφέρουν).

Με τον ίδιο τρόπο θα ελεγχθεί το:

$H_3(2)$: Η μέση τιμή του αριθμού των FOCISτων ιστόνων που φθορίζουν όταν υπάρχει σπάσιμο DNA στα κύτταρα με χαμηλή-μηδενική ακτινοβολία στα 240 λεπτά (NC) είναι ίδια με την μέση τιμή του αριθμού των FOCISτων ιστόνων που φθορίζουν όταν υπάρχει σπάσιμο DNA στα κύτταρα με υψηλή ακτινοβολία στα 240 λεπτά (PC). ($\mu_{nc240} = \mu_{pc240}$) έναντι της εναλλακτικής.

$H_{3\varepsilon}(2)$: Αλλιώς η εναλλακτική υπόθεση (οι μέσες τιμές διαφέρουν).

Χρησιμοποιώντας το στατιστικό πακέτο R-Studio, θα πάρουμε τα αποτελέσματα (διατηρείται το ίδιο επίπεδο σημαντικότητας ($\alpha = 0,05$) και η υπόθεση ισότητας των διακυμάνσεων).

Πίνακας 5.7.4: *t-test* ($\mu_{nc20} = \mu_{pc20}$)

```
>t.test(nc20,pc20,alternative="two.sided",var.equal=TRUE)
#Έλεγχος ισότητας των μέσων τιμών για το σπάσιμο του DNA στα κύτταρα με
χαμηλή-μηδενική και υψηλή ακτινοβολία για χρόνο 20 λεπτών#

Two Sample t-test

data: nc20 and pc20
t = -39.139, df = 4002, p-value < 2.2e-16
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -15.90769 -14.39001
sample estimates:
mean of x mean of y
8.71978 23.86863
```

Η τιμή του στατιστικού εκτιμήθηκε σε $t = -39,139$, με συνολικά 4002 βαθμούς ελευθερίας, ενώ το p-value εκτιμήθηκε πολύ κοντά στο 0 (μικρότερο $2.2 \cdot 10^{-16}$), το οποίο σημαίνει ότι έχουμε τη δυνατότητα να απορρίπτουμε την μηδενική υπόθεση $H_3(1)$ σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$ και να συμπεράνουμε πως οι τιμές

διαφέρουν στατιστικά σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$, δηλαδή υπάρχει στοιχειώδης -στατιστική διαφορά ανάμεσα στον αριθμό των FOCISτων ιστόνων που φθορίζουν όταν υπάρχει σπάσιμο DNA στα κύτταρα με χαμηλή-μηδενική ακτινοβολία (NC) και στα κύτταρα με υψηλή δόση ιοντίζουσας ακτινοβολίας (PC) στη χρονική στιγμή των είκοσι (20) λεπτών μετά την ακτινοβόληση των δύο αυτών ομάδων κυττάρων.

Στη συνέχεια θα ελέγξουμε εάν το ίδιο συμβαίνει και με τη χρονική στιγμή των διακοσίων σαράντα(240) λεπτών από την χρονική στιγμή της ακτινοβόλησης των ίδιων ομάδων κυττάρων:

Πίνακας 5.7.5: *t-test* ($\mu_{nc240} = \mu_{pc240}$)

```
>t.test(nc240,pc240,alternative="two.sided",var.equal=TRUE)
#Ελεγχος ισότητας των μέσων τιμών για το σπάσιμο του DNA στα κύτταρα με
χαμηλή-μηδενική και υψηλή ακτινοβολία για χρόνο240 λεπτών#
Two Sample t-test

data: nc240 and pc240
t = -21.514, df = 4002, p-value < 2.2e-16
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -10.772306 -8.972948
sample estimates:
mean of x mean of y
13.57443 23.44705
```

Ανάλογα συμπεράσματα βγάζουμε και για τον χρόνο στα διακόσια σαράντα(240) λεπτά, όπου η τιμή του στατιστικού εκτιμήθηκε σε $t=-21.514$ με συνολικά 4002 βαθμούς ελευθερίας, ενώ το p-value εκτιμήθηκε πολύ κοντά στο 0 (μικρότερο $2.2 \cdot 10^{-16}$), το οποίο σημαίνει ότι απορρίπτουμε την μηδενική υπόθεση $H_3(2)$ και οι τιμές διαφέρουν στατιστικά σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$. Σαν γενικό συμπέρασμα που προκύπτει είναι πως πράγματι η επίδραση υψηλών δόσεων ιοντικής ακτινοβολίας είναι στατιστικά υψηλότερη σε σχέση με την επίδραση χαμηλής-μηδενικής δόσης ιοντίζουσας ακτινοβολίας, καθώς παρατηρείται μεγαλύτερος αριθμός FOCIS των ιστόνων που

φθορίζουν, που συνεπάγεται σε υψηλότερο βαθμό σπασίματος DNA στην υψηλή ένταση ακτινοβολίας (PC), ανεξάρτητα από τον χρόνο μέτρησης από τη στιγμή της ακτινοβόλησης των κυττάρων, οπότε η υπόθεση αυτή ευσταθεί.

Στην συνέχεια θα προχωρήσουμε στην διερεύνηση της τέταρτης κατά σειρά υπόθεσης, η οποία είναι:

Υπόθεση #4: Η ακτινοβολία του περιβάλλοντος κατά την διαγνωστική εξέταση, ακτινοβολίας ιονισμού (0,2Gy), είναι στατιστικά όμοια με την επίδραση της χαμηλής δόσης - μηδενικής ιονίζουσας ακτινοβολίας (0Gy).

Τέλος λοιπόν, θα εξεταστεί αν η ακτινοβολία του περιβάλλοντος κατά την πραγματοποίηση της διαγνωστικής εξέτασης, δηλαδή σε έκθεση ακτινοβολίας ιονισμού 0,2 Gy, είναι στατιστικά όμοια με την επίδραση της χαμηλής δόσης ακτινοβολίας 0Gy δηλαδή της μηδενικής ακτινοβολίας κατά την πραγματοποίηση του πειράματος, και θα εξεταστούν οι υποθέσεις:

$H_4(1)$: Η μέση τιμή του αριθμού των FOCISτων ιστόνων που φθορίζουν όταν υπάρχει σπάσιμο DNA στα κύτταρα που εκτέθηκαν σε χαμηλή-μηδενική ακτινοβολία 0Gy στα είκοσι(20) λεπτά είναι ίδια με την μέση τιμή του αριθμού των FOCISτων ιστόνων που φθορίζουν όταν υπάρχει σπάσιμο DNA στα κύτταρα με φυσιολογική ακτινοβολία ιονισμού 0,2Gy στα είκοσι(20) λεπτά. ($\mu_{nc20} = \mu_{ir20}$)έναντι της εναλλακτικής.

$H_{4\varepsilon}(1)$: Αλλιώς η εναλλακτική υπόθεση (οι μέσες τιμές διαφέρουν).

Καθώς πραγματοποιείται ο στατιστικός έλεγχος και για τον χρόνο των διακοσίων σαράντα λεπτών(240), ακολουθούν οι εξής υποθέσεις:

$H_4(2)$: Η μέση τιμή του αριθμού των FOCISτων ιστόνων που φθορίζουν όταν υπάρχει σπάσιμο DNA στα κύτταρα με χαμηλή-μηδενική ακτινοβολία 0Gy στα διακόσια σαράντα(240) λεπτά είναι ίδια με την μέση τιμή του αριθμού των FOCISτων ιστόνων που φθορίζουν όταν υπάρχει σπάσιμο DNA στα κύτταρα με φυσιολογική ακτινοβολία ιονισμού 0,2Gy στα διακόσια σαράντα(240) λεπτά, ($\mu_{nc240} = \mu_{ir240}$)έναντι της εναλλακτικής.

$H_{4\varepsilon}(2)$: Αλλιώς η εναλλακτική (οι μέσες τιμές διαφέρουν).

Υποθέτουμε πάλι την ισότητα των διακυμάνσεων και το ίδιο επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$, και εκτελείται αρχικά ο έλεγχος για τα είκοσι(20) λεπτά:

Πίνακας 5.7.6: *t*-test ($\mu_{nc20} = \mu_{ir20}$)

```
>t.test(ir20,nc20,alternative="two.sided",var.equal=TRUE)
#Έλεγχος ισότητας των μέσων τιμών για το σπάσιμο του DNA στα κύτταρα με
χαμηλή-μηδενική και φυσιολογική ακτινοβολία ιονισμού για χρόνο 20 λεπτών#

Two Sample t-test

data: ir20 and nc20
t = -14.194, df = 4002, p-value < 2.2e-16
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -4.622441 -3.500436
sample estimates:
mean of x mean of y
4.658342 8.719780
```

Η τιμή του στατιστικού εκτιμήθηκε σε $t = -14.194$, με συνολικά 4002 βαθμούς ελευθερίας, ενώ το p-value εκτιμήθηκε πολύ κοντά στο 0 (μικρότερο $2.2 \cdot 10^{-16}$), το οποίο σημαίνει ότι είμαστε σε θέση να απορρίπτουμε την μηδενική υπόθεση $H_0(1)$ και οι τιμές να διαφέρουν στατιστικά σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$, δηλαδή υπάρχει στοιχειώδης -στατιστική διαφορά ανάμεσα στον αριθμό των FOCISτων ιστόνων που φθορίζουν όταν υπάρχει σπάσιμο DNA στα κύτταρα με χαμηλή-μηδενική ακτινοβολία 0Gy και στα κύτταρα με φυσιολογική ακτινοβολία ιονισμού κατά την διαγνωστική εξέταση στα 0,2Gy για τη χρονική στιγμή των είκοσι(20) λεπτών σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$. Εκτελείται στην συνέχεια και το t-test για τα διακόσια σαράντα(240) λεπτά:

Πίνακας 5.7.7: t-test ($\mu_{nc240} = \mu_{ir240}$)

```
>t.test(ir240,nc240,alternative="two.sided", var.equal=TRUE)
#Έλεγχος ισότητας των μέσων τιμών για το σπάσιμο του DNA στα κύτταρα με
χαμηλή και φυσιολογική ακτινοβολία ιονισμού για χρόνο 240 λεπτών#

Two Sample t-test

data: ir240 and nc240
t = -14.528, df = 4002, p-value < 2.2e-16
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -6.709341 -5.113836
sample estimates:
mean of x mean of y
 7.662837 13.574426
```

Η τιμή του στατιστικού εκτιμήθηκε σε $t = -14.528$, με συνολικά 4002 βαθμούς ελευθερίας, ενώ το p-value εκτιμήθηκε πολύ κοντά στο 0 (μικρότερο $2.2 \cdot 10^{-16}$), το οποίο σημαίνει ότι απορρίπτουμε την μηδενική υπόθεση $H_0(2)$ και οι τιμές διαφέρουν στατιστικά σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$, δηλαδή υπάρχει στοιχειώδης διαφορά ανάμεσα στον αριθμό των FOCISτων ιστόνων που φθορίζουν όταν υπάρχει σπάσιμο DNA στα κύτταρα με χαμηλή-μηδενική ακτινοβολία 0Gy και στα κύτταρα με φυσιολογική ακτινοβολία ιονισμού κατά τη διάρκεια της διαγνωστικής εξέτασης σε ακτινοβολία ιονισμού στην τιμή των 0.2Gy για τον χρόνο των διακοσίων σαράντα(240) λεπτών μετά την έκθεση των ομάδων κυττάρων στην ακτινοβολία. Με βάση τα παραπάνω, δεν υπάρχει στατιστικά όμοια επίδραση της ακτινοβολίας του περιβάλλοντος κατά την εξέταση σε σχέση με την χαμηλή-μηδενική δόση ακτινοβολίας στο DNA των κυττάρων σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$, και άρα η τελευταία υπόθεση δεν ευσταθεί.

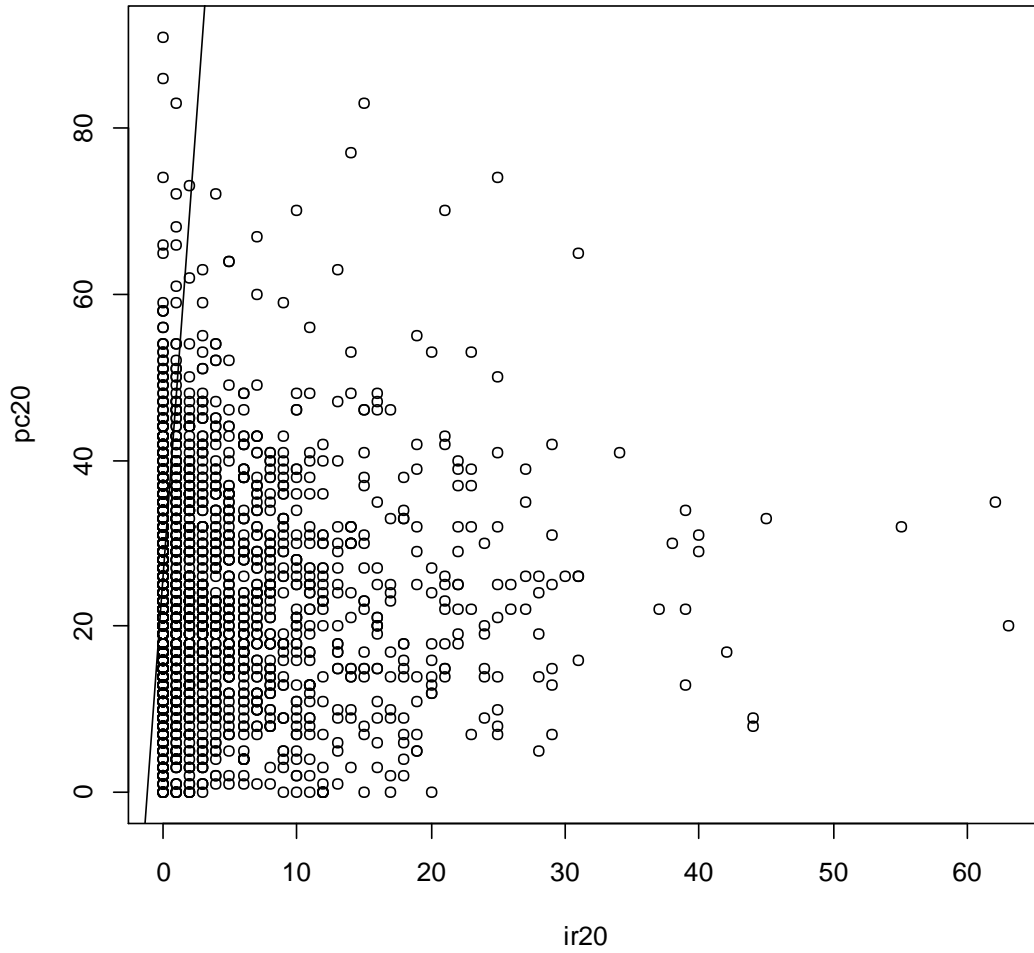
5.8 Καμπύλες αναφοράς

Τέλος, με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου θα προχωρήσουμε στην προσπάθεια να κατασκευάσουμε τις αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς για τα κύτταρα με υψηλή ακτινοβολία (PositiveControl) και για τα κύτταρα με φυσιολογική (συνηθισμένη) ακτινοβολία ιονισμού (IR) που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της ακτινοβολίας της διαγνωστικής εξέτασης σύμφωνα με αυτό το πείραμα. Η συγκεκριμένη καμπύλη αποτελεί ουσιαστικά το γράφημα διασποράς για τα κύτταρα που έχουν υποβληθεί σε υψηλή ακτινοβολία και για τα κύτταρα που είναι εκτεθειμένα σε συνηθισμένη ακτινοβολία ιονισμού, όπως δηλαδή συμβαίνει στις συνθήκες μίας απεικονιστικής μεθόδου εξέτασης. Παρατίθενται δύο γραφήματα, ένα που περιγράφει την σχέση μεταξύ των δύο κατηγοριών κυττάρων για τον πρώτο χρόνο μέτρησης είκοσι (20) λεπτά και ένα που περιγράφει την σχέση μεταξύ των δύο κατηγοριών κυττάρων για τον δεύτερο χρόνο μέτρησης διακόσια σαράντα (240) λεπτά από τη στιγμή της ακτινοβολήσης. Αυτό γίνεται στο στατιστικό πακέτο R-Studio με την εντολή `abline` (προστίθεται και η γραμμή).

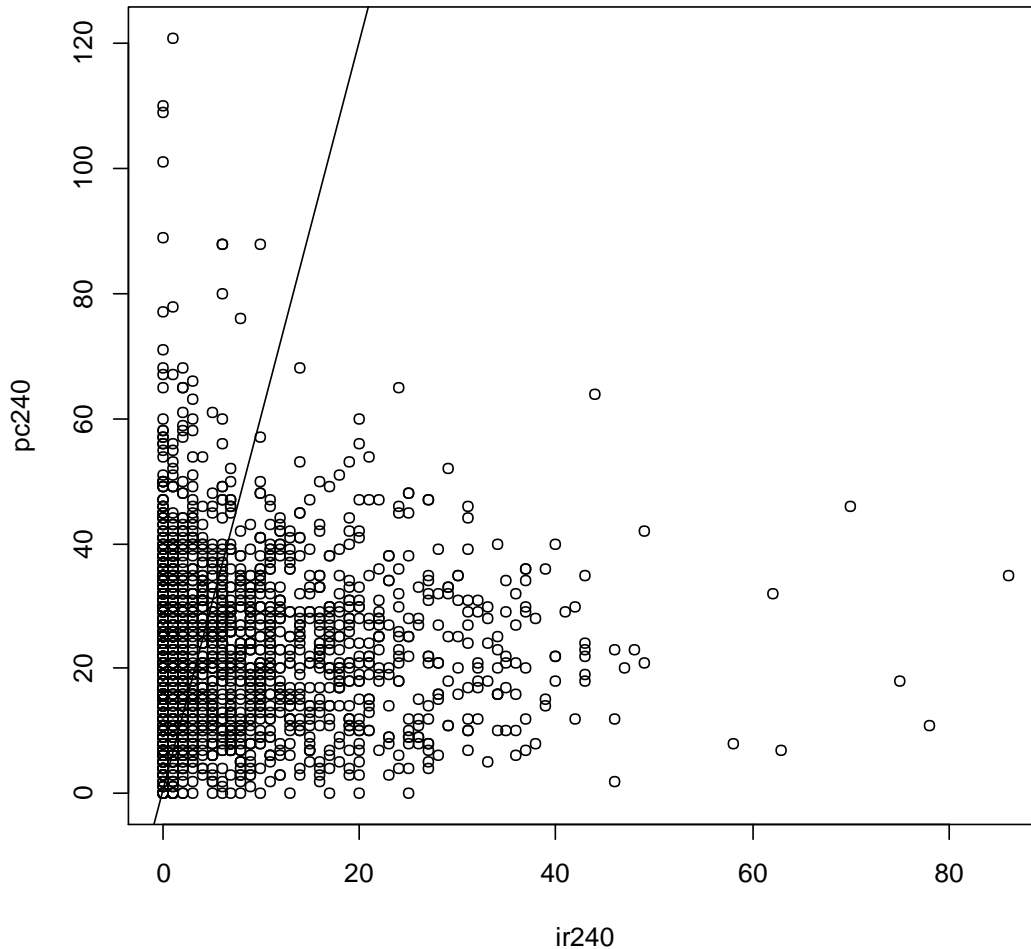
Πίνακας 5.8.1: `abline ir20, pc20` και `abline ir240, pc240`

```
>plot(ir20,pc20)
>abline(ir20,pc20)
#Καμπύλη αναφοράς μεταξύ των PositiveControl και IRgroups κυττάρων στα
είκοσι(20) λεπτά από τη στιγμή της ακτινοβολήσης#
>plot(ir240,pc240)
>abline(ir240,pc240)
#Καμπύλη αναφοράς μεταξύ των PositiveControl και IRgroups κυττάρων στα
διακόσια σαράντα(240) λεπτά από τη στιγμή της ακτινοβολήσης#
```

Με βάση την παράθεση των επόμενων γραφημάτων, είναι σαφές πως η σχέση που συνδέει τις δύο μεταβλητές δεν μπορεί να είναι γραμμική, ούτε για την περίπτωση των είκοσι (20) ούτε και για την περίπτωση των διακοσίων σαράντα (240) λεπτών από την στιγμή που εκτέθηκαν οι διαφορετικές κυτταρικές ομάδες σε δόση ιονίζουσας ακτινοβολίας στις συγκεκριμένες συνθήκες του πειράματος.



Διάγραμμα 5.8.1: Γράφημα 1^ο, καμπύλη αναφοράς για τα κύτταρα του group(PositiveControl) και των κυττάρων του group (IR) που έχουν εκτεθεί σε συνηθισμένη ακτινοβολία διαγνωστικής εξέτασης σε χρόνο είκοσι(20) λεπτών.



Διάγραμμα 5.8.2: Γράφημα 2^ο, καμπύλη αναφοράς για τα κύτταρα του group(PositiveControl) και των κυττάρων του group (IR) που έχουν εκτεθεί σε συνηθισμένη ακτινοβολία διαγνωστικής εξέτασης σε χρόνο διακοσίων σαράντα(240) λεπτών.

5.9 Ανάλυση διασποράς για τα διαφορετικά group κυττάρων

Από την προηγούμενη ανάλυση αποδείχθηκε πως υπάρχει πράγματι στατιστική διαφορά ανάλογα με τον χρόνο που θα βρεθούμε από τη στιγμή της ακτινοβολήσης των κυττάρων, ωστόσο τίθεται το ερώτημα αν ο αριθμός των FOCIS μεταβάλλεται σημαντικά κατά την διάρκεια του χρόνου για κάθε μια κατηγορία (δόση ακτινοβολίας) που υποβάλλονται τα κύτταρα. Προκειμένου να απαντήσουμε σε αυτό το ερώτημα, θα εκτελέσουμε την ανάλυση κατά παράγοντες με βάση τις επαναλαμβανόμενες καταστάσεις (*ANOVA Repeated Measures*).

Σκοπός μας είναι να ελέγξουμε αν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές στον αριθμό των FOCIS για κάθε group κυττάρων ανάλογα με τον χρόνο που περνάει

μετά την ακτινοβολήση, (δηλαδή αν ο αριθμός των FOCIS τους μεταβάλλεται σημαντικά με την πάροδο του χρόνου), οπότε από εδώ και πέρα δουλεύουμε ως εξής: Δημιουργούμε μια ποιοτική (κατηγορική) μεταβλητή και την ονομάζουμε ως (TIME), η οποία παίρνει την τιμή ένα(1) ένα όταν έχουμε το χρόνο των είκοσι(20) λεπτών και την τιμή δύο (2), για τον χρόνο των διακοσίων σαράντα(240) λεπτών από την στιγμή έκθεσης των κυτταρικών σειρών στην ιοντίζουσα ακτινοβολία. Αντίστοιχα, οι υπόλοιπες μεταβλητές κωδικοποιούνται ως εξής, με τον ορισμό των όρων:

NC0GY:Συνολικός αριθμός κυττάρων που έχουν εκτεθεί σε μηδενική ακτινοβολία (0Gy) για είκοσι(20) και διακόσια σαράντα(240) λεπτά αντίστοιχα.

IR02GY:Συνολικός αριθμός κυττάρων που έχουν εκτεθεί σε κανονική ακτινοβολία υπό τις συνθήκες της διαγνωστικής εξέτασης στα (0,2Gy) για είκοσι(20) και διακόσια σαράντα(240) λεπτά αντίστοιχα.

PC2GY:Συνολικός αριθμός κυττάρων που έχουν εκτεθεί σε υψηλή ακτινοβολία (2Gy) για είκοσι(20) και διακόσια σαράντα(240) λεπτά αντίστοιχα.

Μέσα από την ανάλυση διασποράς θα εξετάσουμε αν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στον αριθμό με τον FOCIS ανάλογα με τον χρόνο. Με την δημιουργία των νέων μεταβλητών εισάγονται τα δεδομένα στο στατιστικό πακέτο R-Studio(το νέο σετ δεδομένων ορίζεται σαν dataset2, στο στατιστικό πακέτο R-Studio) και εκτελείται η ανάλυση των δεδομένων (σημειώνεται πως εδώ έχουμε συνολικά $n=2*2002=4004$ παρατηρήσεις καθώς περιλαμβάνονται οι μετρήσεις των είκοσι(20) και διακοσίων σαράντα(240) λεπτών για κάθε ποσότητα - τιμή ακτινοβολίας.

Πίνακας 5.9.1: dataset 2

```

> attach(dataset2)
> head(dataset2)
xronos IR02GY PC2GY NC0GY   time  ID
1 20Ε»    26   22   3 20 minutes ID1
2 20Ε»     0   33   1 20 minutes ID2
3 20Ε»     7   15  22 20 minutes ID3
4 20Ε»     4   47  25 20 minutes ID4
5 20Ε»     0   12  19 20 minutes ID5
6 20Ε»     3   14   6 20 minutes ID6

```

Στο σετ δεδομένων περιλαμβάνονται συνολικά πέντε(5) μεταβλητές, καθώς έχει προστεθεί η μεταβλητή ID (κάθε μέτρηση), οι μεταβλητές IR02GY, PC2GY, NCOGY και η μεταβλητή time.

Εδώ σημειώνεται πως εδώ έχουμε συνολικά $n=2*2002=4004$ παρατηρήσεις καθώς περιλαμβάνονται οι μετρήσεις των (20) είκοσι και (240) διακοσίων σαράντα λεπτών για κάθε τιμή ποσότητας ακτινοβολίας. Μέσω της εντολής “>summary” παίρνουμε ορισμένα περιγραφικά μέτρα των μεταβλητών του συνόλου των δεδομένων (μέση τιμή, ελάχιστη τιμή και μέγιστη τιμή, αλλά και τις τιμές της διαμέσου, και των τεταρτημορίων).

Πίνακας 5.9.2: Summary dataset 2

```
>summary(dataset2)
#Περιγραφικά μέτρα δεδομένων
xronosIR02GYPC2GYNCOGY
20Ξ»:2002 Min. : 0.000 Min. : 0.00 Min. : 0.00
240Ξ»:2002 1st Qu.: 0.000 1st Qu.: 14.00 1st Qu.: 1.00
Median : 3.000 Median : 22.00 Median : 6.00
      Mean : 6.161 Mean : 23.66 Mean : 11.15
      3rd Qu.: 8.000 3rd Qu.: 32.00 3rd Qu.: 17.00
      Max. : 86.000 Max. : 121.00 Max. : 97.00

time      ID
20 minutes :2002 ID1   : 1
240 minutes:2002 ID10  : 1
           ID100 : 1
           ID1000: 1
           ID1001: 1
           ID1002: 1
           (Other):3998
```

Ως επίπεδο εμπιστοσύνης θα ορίζουμε το $\alpha= 0,01$. Για να εκτελεστεί η ανάλυση διακύμανσης χρησιμοποιείται η εντολή aov με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου R-

Studio, χρησιμοποιώντας το Error για να δηλώσουμε και την μεταβολή του σφάλματος. Αρχικά, εκτελούμε την ANOVA repeated measures για την μεταβλητή NC0GY, μέσω του παρακάτω συνόλου εντολών, θεωρώντας ωστόσο πως οι τιμές που παίρνουμε για τις ομάδες των negative control στα κύτταρα (δηλαδή τα κύτταρα που έχουν υποστεί μηδενική ακτινοβολία (NC) των 0Gy.), έχουμε αντίστοιχο μηδενικό χρόνο τον $t_0 = 0$.

Πίνακας 5.9.3: Summary aov dataset 2, Negative Control

```
>summary(aov(NC0GY~time+Error(time),data=dataset2))
Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
time      1  23591   23591  135.2 <2e-16 ***
Residuals 4002 698243    174
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Εδώ, το μέσο τετραγωνικό σφάλμα υπολογίστηκε σε 23591, ενώ η τιμή της στατιστικής συνάρτησης του ελέγχου στην τιμή $F=135$, και το p-value του ελέγχου (για τον έλεγχο της υπόθεσης πως οι μέσοι των FOCIS των κυττάρων που εκτίθενται σε μηδενική ακτινοβολία είναι ίδιοι για τα είκοσι(20) και διακόσια σαράντα(240) λεπτά) είναι μικρότερο από $2 * 10^{-16} < 0,01$, οπότε απορρίπτεται αυτή η υπόθεση, και υπάρχει εξαιρετικά στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα χρόνου για τα κύτταρα που έχουν εκτεθεί σε τιμή 0Gy, μηδενικής ακτινοβολίας.

Εκτελούμε την ίδια διαδικασία και για τα κύτταρα με φυσιολογικά επίπεδα και υψηλά επίπεδα ακτινοβολίας και θα έχουμε τους παρακάτω πίνακες (Ο πρώτος είναι για τα FOCIS των κυττάρων σε κανονικά επίπεδα ακτινοβολίας)

Πίνακας 5.9.4: Summary aov dataset 2, IR

```
summary(aov(IR02GY~time+Error(ID/time), data=dataset2))
Df SumSq Mean Sq F value Pr(>F)
time      1   9036  9036123.4 <2e-16 ***
Residuals 4002 293030    73
---
```

Εδώ, το μέσο τετραγωνικό σφάλμα υπολογίστηκε σε 9036, ενώ η τιμή της στατιστικής συνάρτησης του ελέγχου είναι η τιμή $F=123.4$, και το p-value του ελέγχου (για τον έλεγχο της υπόθεσης πως οι μέσοι των FOCISτων κυττάρων που εκτίθενται σε κανονική-φυσιολογική ακτινοβολία (IR) στα 0,2Gy είναι ίδιοι για τα διαστήματα των είκοσι (20) και διακοσίων σαράντα(240) λεπτών) είναι μικρότερο από $2 * 10^{-16} < 0,01$, οπότε απορρίπτεται αυτή η υπόθεση, και υπάρχει εξαιρετικά στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα χρόνου για τα κύτταρα που εκτέθηκαν σε κανονική ακτινοβολία υπό τις συνθήκες της διαγνωστικής εξέτασης.

Για τα FOCISτων κυττάρων που εκτίθενται σε υψηλή ακτινοβολία (PC) έχουμε τον επόμενο πίνακα:

Πίνακας 5.9.5: Summary aov PC

```
summary(aov(PC2GY~time+Error(ID/time), data=dataset2))
```

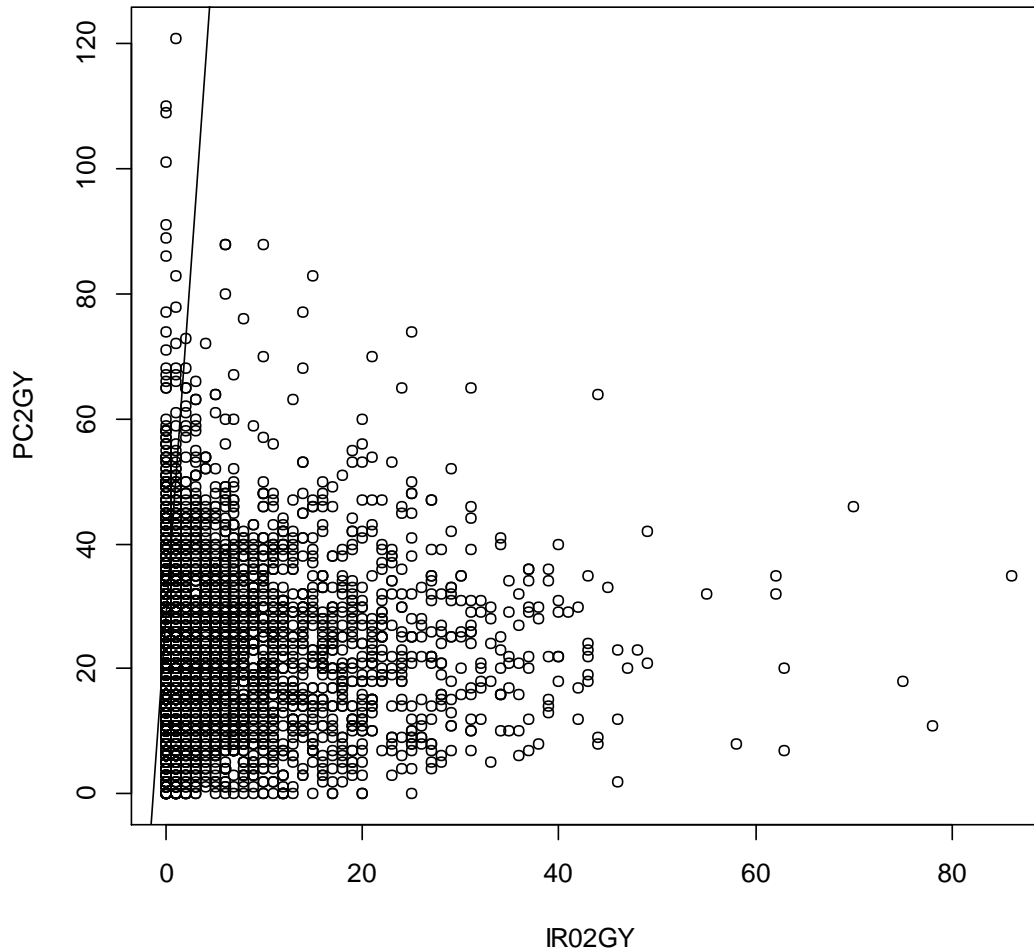
Df	Sum	SqMean	Sq	F value	Pr(>F)
time	1	178	177.9	0.955	0.328
Residuals	4002	745481	186.3		

Εδώ, το μέσο τετραγωνικό σφάλμα υπολογίστηκε σε 177.9, ενώ η τιμή της στατιστικής συνάρτησης του ελέγχου $F=0.955$, και το p-value του ελέγχου (για τον έλεγχο της υπόθεσης πως οι μέσοι των FOCISτων κυττάρων που εκτίθενται σε υψηλή ακτινοβολία (PC) 2Gy είναι ίδιοι για τις στιγμές των είκοσι(20) και διακοσίων σαράντα(240) λεπτών) είναι $0.328 > 0,05$, οπότε η υπόθεση ισότητας των μέσων δεν μπορεί να απορριφθεί, και δεν παρατηρείται εξαιρετικά στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα χρόνου για τα κύτταρα που εκτέθηκαν στα επίπεδα υψηλής ακτινοβολίας (PC).

Αυτό πρακτικά σημαίνει πως ενώ ο αριθμός των FOCIS μεταβάλλεται σημαντικά με την πάροδο του χρόνου, όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε μηδενική ή κανονική ακτινοβολία, κάτι τέτοιο δεν ισχύει όμως για τα κύτταρα που εκτίθενται σε υψηλότερη ακτινοβολία. Τέλος, κατασκευάζουμε πάλι την καμπύλη αναφοράς για τα FOCISτων κυττάρων που έχουν εκτεθεί σε κανονική (IR) και υψηλή ακτινοβολία (PC) αντίστοιχα.

Πίνακας 5.9.6: Abline IR & PC

```
>plot(IR02GY,PC2GY)  
>abline(IR02GY,PC2GY)
```



Διάγραμμα 3: Καμπύλη αναφοράς για τα κύτταρα που εκτέθηκαν σε υψηλή ακτινοβολία PositiveControl και των κυττάρων που έχουν εκτεθεί σε συνηθισμένη ακτινοβολία IR για κάθε χρόνο μέτρησης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6:

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την στατιστική ανάλυση προέκυψαν διάφορα ενδιαφέροντα αποτελέσματα ως προς την ευστάθεια των ερευνητικών υποθέσεων και την επίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας στα ευκαρυωτικά κύτταρα ανά διαφορετική ποσότητα δόσης έκθεσης ακτινοβολίας, όπου τα αποτελέσματα που διαφέρουν ανάλογα με τον χρόνο που βρισκόμαστε μετά τη στιγμή της ακτινοβόλησης αλλά και την ένταση της ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται με βάση τις κατηγορίες - groups των κυττάρων.

Αρχικά, ως προς την πρώτη ερευνητική υπόθεση σχετικά με το αν δηλαδή υπάρχει στοιχειώδης διαφορά ανάμεσα στον αριθμό των FOCISτων ιστόνων που φθορίζουν όταν υπάρχει σπάσιμο DNA στα κύτταρα με φυσιολογική ακτινοβολία κατά την διεξαγωγή μίας απεικονιστικής εξέτασης (IR) ανάλογα με τη χρονική στιγμή μετά την ακτινοβόληση και την ένταση της ακτινοβολίας, διαπιστώθηκε πως όταν τα κύτταρα υποβάλλονται σε χαμηλή-μηδενική ακτινοβολία (0Gy) και σε φυσιολογικής έντασης ακτινοβολίας ιοντισμού (IR) (0,2Gy) τα αποτελέσματα διαφέρουν ανάλογα με τον χρόνο που έχει περάσει από την χρονική στιγμή που τα κύτταρα του στοματικού βλεννογόνου δέχονται την ακτινοβολία, καθώς είναι μεγαλύτερος ο αριθμός των FOCIS των ιστόνων που φθορίζουν και αποτυπώνεται το σπάσιμο του DNA το οποίο έχει και μεγαλύτερο βαθμό ανάλογα με τη χρονική στιγμή που βρισκόμαστε. Περισσότερος χρόνος συνεπάγεται αυτόματα μεγαλύτερη επίδραση της ακτινοβολίας στο κύτταρο και αυτό αποτυπώνεται με τον αριθμό των FOCIS που αντικατοπτρίζει τα σπασίματα DNA των κυττάρων, ωστόσο αυτό δεν ισχύει στην περίπτωση της υψηλής έντασης, όπου τα αποτελέσματα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ανάλογα με τον χρόνο που θα βρεθούμε από τη στιγμή της ακτινοβόλησης των κυττάρων, κάτι το οποίο διαπιστώθηκε τόσο από την περιγραφική στατιστική (εκτιμήσεις των μέσων τιμών), όσο και από την επαγωγική στατιστική (t-test) που πραγματοποιήθηκε.

Η παρατήρηση για τα αποτελέσματα της επίδρασης της ιοντίζουσας ακτινοβολίας στα ευκαρυωτικά κύτταρα σε μέτρια και χαμηλής έντασης ακτινοβολίας διαφοροποιούνται ανάλογα με τους δύο χρόνους που μελετήθηκαν στο πείραμα, ενώ στην υψηλής έντασης ακτινοβολίας δεν παρατηρείται κάτι ανάλογο. Οι επιδράσεις που παρατηρούνται στο DNA των κυττάρων του βλεννογόνου στις υψηλής έντασης ιοντίζουσας ακτινοβολίας δεν επιδιορθώνονται σχετικά σύντομα με βάση την δεύτερη

ερευνητική υπόθεση. Αυτό είναι η απόδειξη ότι η υψηλή δόση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας είναι πράγματι επικίνδυνη για την εύρυθμη λειτουργία των κυττάρων, όμως μέσα από τα αποτελέσματα παραμένει ακόμη θολό το τοπίο σχετικά με την οριακή δόση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας.

Ως προς την ευστάθεια της τρίτης ερευνητικής υπόθεσης, πως η επίδραση των υψηλότερων δόσεων ιοντίζουσας ακτινοβολίας είναι αρκετά σε επίπεδο κινδύνου - ρίσκου υψηλότερη συγκριτικά με τις χαμηλότερες δόσεις, από τον έλεγχο του t-testπου πραγματοποιήθηκε διαπιστώθηκε πως κάτι τέτοιο ισχύει και στους δύο χρόνους μέτρησης μετά από την στιγμή ακτινοβόλησης των κυττάρων, στα είκοσι(20) και στα διακόσια σαράντα(240) λεπτά αντίστοιχα, κάτι που επιβεβαιώνεται και μέσω του πίνακα των περιγραφικών μέτρων. Δηλαδή, όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε υψηλότερη ακτινοβολία παρατηρείται μεγαλύτερος αριθμός FOCIS, που μας δείχνει ότι υπάρχουν σε αριθμό περισσότερα σπασίματα του DNA των κυττάρων που μελετήθηκαν και μετρήθηκαν σε υψηλή ιοντίζουσα ακτινοβολία συγκριτικά με τα χαμηλότερα επίπεδα της ακτινοβολίας. Επομένως η υψηλή ακτινοβολία, η οποία έχει την τιμή των δύο Grey(2Gy), και αντιστοιχεί στην ομάδα κυττάρων PC σε αυτό το πείραμα. Στο πείραμα μας, έχει μεγαλύτερη επίδραση στα κύτταρα του στοματικού βλεννογόνου και αυτό μπορεί να μας οδηγήσει σε μία επαγωγή ότι αντιστοιχεί σε περισσότερα κυτταρικά προβλήματα και ίσως και σε πολλές δυσλειτουργίες και σε επίπεδο ανθρώπινων λειτουργιών όπως η διεθνής βιβλιογραφία μας επισημαίνει.

Επίσης, σχετικά με την τέταρτη ερευνητική υπόθεση, διαπιστώθηκε μέσα από τους ελέγχους και τα t-test που έγιναν μέσα από τα πειραματικά δεδομένα *dataset*, πως δεν υπάρχει στατιστικά όμοια επίδραση της ακτινοβολίας του περιβάλλοντος σε συνθήκες διαγνωστικής εξέτασης της τάξεως των (0,2Gy) με την χαμηλή δόση - μηδενική ακτινοβολία (0Gy) στο DNA των κυττάρων. Δηλαδή παρατηρείται πως υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα 0Gy και 0,2Gy και άρα η τελευταία υπόθεση δεν ευσταθεί. Κοινώς, η επίδραση της ακτινοβολίας σε φυσιολογικά επίπεδα ακτινοβολίας διαγνωστικής εξέτασης, *ομάδα κυττάρων (IR)*, διαφέρει από την αντίστοιχη επίδρασή της στα χαμηλά-μηδενικά επίπεδα ιοντίζουσας ακτινοβολίας, *ομάδα κυττάρων (NC)*. Αυτή η διαπίστωση η οποία φαίνεται και σαν παράδοξο σε επίπεδο θεωρητικών αρχικών υποθέσεων χωρίς να υπάρχουν κυτταρικά πραγματικά πειραματικά δεδομένα, αξίζει περεταίρω μελέτη στο προσεχές μέλλον. Είναι σημαντικό να μελετηθεί η επίδραση της μηδενικής ακτινοβολίας και αυτή της φυσιολογικής τιμής

της ακτινοβολίας κατά την πραγματοποίηση μίας διαγνωστικής εξέτασης όπως αυτή που ακτινοβολείται σε πανοραμικές διαγνωστικές απεικονιστικές εξετάσεις, καθώς δεν έχει διαλευκανθεί η υπόθεση αυτή σε αυτό το πείραμα αλλά ούτε και βιβλιογραφικά. Σε αυτό τη σημείο αξίζει να αναφερθούν και οι απόψεις αρκετών βιοχημικών και βιολόγων ότι η χαμηλή δόσης της ιοντίζουσας ακτινοβολίας ίσως έχει και θεραπευτική αξία, χωρίς όμως να έχει οριστεί σαφές όριο. Ένα θεραπευτικό όριο σαφώς θα διαφέρει από οργανισμό σε οργανισμό και είναι πραγματικά εξαιρετικά πολύπλοκο και δύσκολο να οριστεί με ένα όριο τιμής ιοντίζουσας ακτινοβολίας και τη χρησιμοποίηση ενός βιοδείκτη όπως είναι η ιστόνη (*Histones*). Χαρακτηριστικά να παραθέσουμε την μελέτη των *Frey, B. et al*, η οποία αναφέρεται στην χρήση της ακτινοβολίας για βελτίωση της θεραπείας σε κλινικές περιπτώσεις φλεγμονωδών αντιδράσεων, σε οιδήματα και σε καλοήθεις όγκους αλλά και στην βελτίωση των αντιδράσεων του ανοσοποιητικού συστήματος. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε το 2017 και κλείνει με το συμπέρασμα της γέννησης νέων προκλήσεων και οράματος για τον σχεδιασμό ραδιο – ανοσοθεραπείας καρκίνου και καλοήθων φλεγμονωδών ασθενειών και αντιδράσεων (*Frey, 2017*).

Τέλος, με βάση την ανάλυση διασποράς *ANOVA Repeated Measures*, αποδείχθηκε πως ο αριθμός των FOCISτων κυττάρων που εκτίθενται σε μηδενική ιοντική ακτινοβολία (0,0Gy) και σε κανονική – φυσιολογική δόση διαγνωστικής εξέτασης (0,2Gy) ακτινοβολίας μεταβάλλεται συνολικά σε σχέση με τον χρόνο που θα περάσει από την στιγμή της ακτινοβολήσης, ωστόσο δεν ισχύει κάτι ανάλογο για τον αριθμό των FOCISτων κυττάρων όταν αυτά εκτίθενται σε υψηλή δόση ιοντίζουσας ακτινοβολίας της τάξης των 2Gy. Δηλαδή, όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε υψηλή ακτινοβολία ιοντισμού, δεν έχει σημασία ο χρόνος μετά την έκθεση στην ακτινοβολία αλλά μόνο η ποσότητα ακτινοβολίας που έχει δεχθεί το κύτταρο. Έτσι και η επίδραση στα κύτταρα είναι διαφορετική σε αυτές τις τιμές κάτι το οποίο δείχνει ιδιαίτερα επικίνδυνο για τη υγεία των κυττάρων, επιβεβαιώνοντας και τα αντίστοιχα αποτελέσματα που προέκυψαν μέσω των t-tests που αναφέρθηκαν ήδη.

Γενικότερα, θέλοντας να ολοκληρώσουμε και να κλείσουμε αυτή τη μελέτη που πραγματοποιήσαμε, θα οδηγηθούμε σε ορισμένα χρήσιμα συμπεράσματα. Αρχικά, βλέπουμε ότι τα κύτταρα ανακτούν γρήγορα την φυσιολογική τους λειτουργία σε χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας κάτι το οποίο δεν συμβαίνει σε υψηλή δόση ακτινοβολίας η οποία όπως μας δείχνουν τα δεδομένα του πειράματος είναι καταστροφική για το

κύτταρο το οποίο αδυνατεί να διαχειριστεί μία τέτοια κατάσταση. Η ιοντίζουσα ακτινοβολία ακόμη και σε χαμηλές δόσεις, όπως αυτή διανέμεται στις διαγνωστικές πράξεις της πανοραμικής εξέτασης – διάγνωσης, είναι σημαντική χωρίς να εξαλείφεται ο κίνδυνος. Μάλιστα στα δικά μας δεδομένα παρατηρήσαμε ότι η χαμηλή δόση ακτινοβολίας είχε καλύτερα αποτελέσματα στο επίπεδο του κινδύνου - risk. Ο κίνδυνος – risk, συσχετίζεται με τα δίκλιωνα σπασίματα του DNA που μελετήθηκαν στο πείραμα μας με τις μετρήσεις των ιστόνων και συνδέονται με την καρκινογένεση όπως γίνεται αποδεκτό και με την υπάρχουσα βιβλιογραφία που έχει αναλυθεί. Οι βλάβες έχουν ανιχνευθεί με την μέθοδο των φωσφορυλιωμένων ιστόνων γ -H2AX μετά την έκθεση των κυττάρων στη ιοντίζουσα ακτινοβολία X-RAY.

Παρατηρώντας αυτά τα στατιστικά αποτελέσματα τα οποία δεν ήταν και τα αναμενόμενα ανατρέξαμε στην βιβλιογραφία για να δούμε αντίστοιχα αποτελέσματα που έδειχναν ότι η χαμηλή οριακή ιοντίζουσα ακτινοβολία ίσως φέρει θεραπευτική αξία, χωρίς να είναι καθορισμένο αυτό το όριο. Πολλοί ερευνητές ασχολούνται με αυτό το θέμα και είναι σημαντικά τα ευρήματα της έρευνάς τους. Επίσης, όπως ήταν γνωστό από την αρχή της διεξαγωγής του πειράματος υπάρχει ένα πολύ δύσκολο βιολογικό περιβάλλον το οποίο πρέπει να μελετηθεί. Το στοματικό επιθήλιο είναι ένα πολύπλοκο περιβάλλον το οποίο ανάλογα με τις συνθήκες του κάθε ανθρώπου όπως το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ η κατανάλωση όξινων τροφών αλλά και η πιθανή ύπαρξη φλεγμονής ή πολύ συχνή ύπαρξη μίας στοματικής μόλυνσης ή η μικροβιακή επιβάρυνση θα αλλάξει στατιστικά σημαντικά τα αποτελέσματα του πειράματος σε *negativecontrol* συνθήκες ακτινοβολίας. Σε προβληματικές καταστάσεις τέτοιου βαθμού τα αποτελέσματα της μηδενικής ακτινοβολίας δεν διαφέρουν στατιστικά με την μελέτη της ομάδας κυττάρων που θα δεχθούν οριακή ιοντίζουσα ακτινοβολία που προσομοιάζει την δόση της ακτινοβολίας κατά τη διαγνωστική εξέταση. Ένα τελευταίο πρόβλημα που πρέπει να αναφερθεί είναι η μεταφορά των κυτταρικών καλλιιεργειών κατά την πραγματοποίηση της μελέτης αυτής. Σε τέτοιες καταστάσεις το οξειδωτικό stress των κυττάρων ίσως να είναι πιο ισχυρό και ικανό να φέρει σημαντικότερα προβλήματα στην λειτουργία των κυττάρων από ότι η οριακή ιοντίζουσα ακτινοβολία.

Η μελέτη της ιοντίζουσας ακτινοβολίας σε αυτό το πείραμα δείχνει τόσο οριακή διότι μελετάται η ακτινοβολία σε μία μόνο φορά. Η βιβλιογραφία δείχνει ότι σε επαναλαμβανόμενες ακτινοβολήσεις των κυττάρων σαφώς και η κατάσταση είναι πιο καθαρή. Τα κυτταρικά προβλήματα είναι εμφανή και στατιστικά σημαντικά τα

ευρήματά τους σε αντίστοιχα πειράματα σε καταστάσεις επαναλαμβανόμενων ακτινοβολήσεων κυτταρικών καλλιιεργειών. Ο απότερος στόχος της μελέτης ήταν να κατασκευαστεί μία καμπύλη αναφοράς που θα δίνει μηνύματα για τον κίνδυνο που διατρέχει ο ασθενής ή ο επαγγελματίας υγείας μετά από την έκθεσή του σε ιοντίζουσα ακτινοβολία. Ο βιοδείκτης της ιστόνης θεωρούμε πως δεν μπορεί να κατασκευαστεί και να χρησιμοποιηθεί μόνο μέσα από αυτή τη μελέτη καθώς απαιτείται περαιτέρω έρευνα και μελέτη. Οι καμπύλες αναφοράς που λάβαμε είναι ιδιαίτερα χρήσιμες και σίγουρα μπορούν να βελτιωθούν με την πραγματοποίηση επόμενων πειραμάτων.

Με βεβαιότητα θα απαντήσουμε ότι δεν υπάρχει *zerorisk* για την φυσιολογική λειτουργία των ιστών κατά την ακτινοβολήσή τους, αλλά το *verylowrisk* όταν αυτά θα είναι σε έκθεση ακτινοβολίας. Ο κίνδυνος δεν θα πρέπει να μας απασχολήσει εν τέλει στην επίδραση του χρόνου μόνο για μικρά χρονικά διαστήματα π.χ. των είκοσι (20) λεπτών ή των διακοσίων σαράντα (240) λεπτών. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η έκθεση σε ακτινοβολία έχει δευτερογενείς επιδράσεις στη βασική λειτουργία του κυττάρου. Φαίνεται τα κύτταρα να λειτουργούν με βάση τη μνήμη τους στη καταστροφή του DNA τους (*memorydamage*). Είναι σημαντικό να μπορούμε να ελέγξουμε την κατάσταση λειτουργίας τους έπειτα από διάστημα ενός έτους. Η κατάληξη της μελέτης δεν δίνει καθαρό αποτέλεσμα στην ύπαρξη *zerorisk*. Υπάρχει δυσκολία για τον ίδιο ανθρώπινο οργανισμό να υπάρξει τέτοια παραδοχή σε έκθεσή του σε ιοντίζουσα ακτινοβολία μία μόνο στιγμή κατά τη διάρκεια της ζωής του.

Όπως έδειξε και η μελέτη του πανεπιστημίου FederalUniversityofRioGradedoSol (Da Silva A. E., 2007), οι κίνδυνοι που σχετίζονται με τις ακτινογραφίες στο στοματικό βλεννογόνο (*dentalradiographs*) είναι μικροί αλλά σε καμία περίπτωση δεν θα παραβλέπονται. Η ένδειξη της αύξησης του αριθμού των μεταβολών στο σπάσιμο του DNA σε υψηλές δόσεις ακτινοβολίας είναι αρκετά σημαντικό για να μην μηδενίσουμε τον κίνδυνο που προκύπτει από την διαγνωστική εξέταση (*risk*). Το συγκεκριμένο επιστημονικό ερώτημα είναι ανοιχτό και περαιτέρω μελέτη ενδείκνυται για καλύτερο συμπέρασμα καθώς η τιμή του *risk* δεν μηδενίζει με τις έως τώρα μελέτες.

Σίγουρα είναι αναγκαία η συνέχεια των μελετών για μία εμπειριστατωμένη εκτίμηση των επιπτώσεων της ιοντίζουσας ακτινοβολίας του αξονικού υπολογιστικού τομογράφου όσον αφορά τις μακροχρόνιες επιπτώσεις στα κύτταρα και την πιθανότητα δημιουργίας μόνιμων βλαβών. Πέρα από τα προβλήματα και τις βλάβες που προκύπτουν στο κύτταρο και στο DNA του τη στιγμή της ακτινοβολήσης είναι αρκετά

σημαντικές και οι μακροχρόνιες βλάβες που δύναται να προκληθούν. Αυτές οι βλάβες στα κύτταρα δε θα έχουν πλέον τη δυνατότητα να επιδιορθωθούν. Προς αυτή την κατεύθυνση στρέφονται και μελέτες για να προσδιορίσουν και να εκτιμήσουν αυτό τον κίνδυνο μακροχρόνιων μόνιμων βλαβών από τη χρήση Ο.Υ.Τ. Στην Ελλάδα υπάρχει συνεργασία μεταξύ της Οδοντιατρικής σχολής Αθηνών ΕΚΠΑ και του εργαστηρίου του τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιολογίας Αθηνών ΕΚΠΑ, για να εξαχθούν νέα χρήσιμα στοιχεία στις επόμενες μελέτες. Η συνεργασία αυτή είναι σημαντική καθώς πέρα από τη δυνατότητα μεταφοράς τεχνογνωσίας επιτρέπει και τη δημιουργία επιστημονικού δικτύου που συνδέει την βασική έρευνα με την κλινική εφαρμογή στα πλαίσια της ενότητας της Βίο ιατρικής επιστήμης με οφέλη και στα δύο επιστημονικά πεδία.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdelkarim A., J. L. (2018). Clinical considerations and potential liability associated with the use of ionizing radiation in orthodontics. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* , σσ. 154(1), 15-25.
- Agarwal P., V. D. (2015). Genotoxic and cytotoxic effects of X -ray on buccal epithelial cells following panoramic radiography: A pediatric study. *J. Cytol* , σσ. 32: 102-6.
- Alberts, B. e. (2004). *Essential cell biology, Second edition*. Garland Science.
- Aschebrook- Kilfoy B., W. M. (2014). Occupation and thyroid cancer. *Occup Environ Med* , σσ. 71: 366-80.
- Boutou, E. P.-W. (2011). Structure-Function Relationship of DNA Repair Proteins: Lessons from BRCA1 and RAD51 Studies.
- Chodick G., B. N. (2008). Risk of cataract after exposure to low doses of ionizing radiation. A 20 - year prospective cohort study among radiologic technologists. *Am J. Epidemiol.* , σσ. 168: 620-31.
- Choi K.H., H. M. (2013). Cancer Risk in diagnostic radiation workers in Korea from 1996-2002. *Int. J. Environ. Res. Public Health* , σσ. 10: 314-27.
- Christmann, M. T. (2003). Mechanisms of human DNA repair: An update. *Toxicology* , σσ. 193, 3-34.
- Da Silva A. E., R. P. (2007, April). Nuclear changes in tongue epithelial cells following panoramic radiography mutation research. *Toxicology and Environmental Mutagenesis* , σσ. 121-125.
- Dawson B., T. R. (2004). *Basic and Clinical Biostatistics 4th ed*. New York: Mc-Graw-Hill.
- European Commission Council Directive 97/43 EURATOM of 30 June 1997 on health protection of individuals against the danger of ionizing radiation in relation to medical exposure. (1997). Official Journal of the European Commission, no L 180.
- Frey, B. R. (2017). *Immunomodulation by ionizing radiation impact for design of radio immunotherapies and for treatment of inflammatory diseases*. Department of Radiation Oncology, Erlangen, Nurnberg, Germany: Immunological Reviews, p.p. 280(1), 231-248.

- Friedland, B. (1998). Clinical radiological issues in orthodontic practice. *Semin Orthod.* , σσ. 64-78.
- Georgakilas, A. P. (2013). Induction and repair of clustered DNA lesions: What do we know so far? *Rad Res* , σσ. 180(1): p. 100-109.
- Georgakilas, A. (2012). Oxidative stress, DNA damage and repair in carcinogenesis: Have we established a connection? *Cancer Lett.* , σ. in press.
- Gibbs, S. (1982). Biological effects of radiation from dental radiography. Council on dental materials, instruments and equipment. *J. Am. Dent. Assoc.* , σσ. 275-281.
- Hada, M. &. (2008). Formation of clustered DNA Damage after high-LET irradiation: A review. *J. Radiat. Res.* , σσ. 49: p.203-210.
- Harper, J. W. *The DNA damage response: ten years after.* Mol. Cell.
- International Commission on Radiological Protection. Radiological protection and safety medicine. (1996). International Commission on Radiological Protection.
- International Commission on radiological Protection. Recommendations of the annuals of the ICRP 1991. (1990). International Commission on radiological Protection.
- Isoardi P., R. R. (2003). Measurement of dose width product in panoramic dental radiology. *Radiol Br. J.* , σσ. 29-31.
- Jacobs R., V. M. (2004). Attitude of the Belgian dentist population toward radiation protection. *Dentomaxillofac Radiol* , σσ. 33: 334-9.
- Kim Y. J., C. E. (2016, April). Occupational radiation procedures and doses in South Korean dentists. *Community Dentistry and Oral Epidemiology* , σσ. 44 (5), 476-484.
- Langland O. E., L. R. (2002). *Principles of Dental Imaging.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Lett, J. (1992). Damage to cellular DNA from particulate radiations, the efficacy of its processing and the radiosensitivity of mammalian cells. Emphasis on DNA double strand breaks and chromatin breaks. *Radiat Environ Biophys* , σσ. 257-277.
- Li, X. &. (2008). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res* , σσ. 18, 99-113.
- Lin J.J., F. D. (2014). Work History and Mortality Risks in 90, 268 radiological technologists. *Occup. Environ. Med.* , σσ. 71: 819-35.
- Lodish, H. B. (2000). *DNA Damage and Repair and Their Role in Carcinogenesis.* Molecular Cell Biology 4th Edition, Section 12.4.

- Manousaridis G., K. C. (2015). Establishment of diagnostic reference levels for dental panoramic radiography in Greece. *Radiation Protection Dosimetry* , σσ. 165 : (1-4), 111-114.
- Muirhead C. R., O. H. (2009). Mortality and cancer incidence following occupational radiation exposure. Third analysis of the national registry for radiation workers. *Br. J. Cancer* , σσ. 100: 206-12.
- Murno, T. R. (1958). *Alpha irradiation of parts of single cells in tissue cultures*. Experimental Cell Research 15(3) p.529-536.
- Neri M., F. A. (2003). Micronuclei frequency in children exposed to environmental mutagens: A review. *Mutat Res.* , σσ. 544 : 243 -54.
- Nohadani N., R. S. (2008). Assessment of vertical facial and dentoalveolar changes using panoramic radiography. *Eur. J. Orthod.* , σσ. 262-8.
- Pellegrini, L. Y. (2002). Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature* , σσ. 420, 287-293.
- Pfeiffer, P. G. (2000). Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* , σσ. 15, 289-302.
- Prasad, N. (1984). *Handbook of radiology*. CRC Press.
- Rice, J. A. (2007). *Mathematical Statistics and Data Analysis 3rd Edition*. Belmont: Duxbury Press.
- Rogakou, E. P. (n.d.). DNA double -stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* , σσ. 273, 5858-68.
- Rothkamm, K. K. (2003). *Pathways of DNA Double Strand Break Repair during the Mammalian Cell Cycle*. Molecular and Cellular Biology, (23) 16, 5706-5715.
- Sak, A. S. (2010). Use of γ -H2AX and other Biomarkers of Double Strand Breaks during Radiotherapy. *Seminars in Radiation Oncology* , σσ. 20(4), 223-231.
- Shikanozo, N. e. (2009). The Yield, Processing, and Biological Consequences of Clustered DNA Damage Included by Ionizing Radiation. *J. Radiat. Res.* , σσ. 50(1) : p.27-36.
- Takata, M. S.-I. (1998). Homologous recombination and non-homologous end -joining pathways of DNA double- strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *Embo J.* , σσ. 17, 5497-508.
- Thacker, J. (1999). A surfeit of RAD51-like genes. *Trends Genet.* , σσ. 15, 166-8.

- Tolbert P. E., S. C. (1992). Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears, methods development. *Mutat. Res.* , σσ. 69-77.
- Tuguait A., C. V. (2003). Radiographic equipment and techniques used in general dental practise: a survey of general dental practitioners in England and Wales. *J. Dent* , σσ. 31: 197-203.
- Zhou, B. S. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* , σσ. 408, 433-439.
- Διαμαντόπουλος, Ε. (2012). *Σημειώσεις Στατιστικής*. Ξάνθη:
<http://users.sch.gr/epdiaman/>.
- Καρλής Δ., Ν. Ι. (2015). *Εισαγωγή στον προγραμματισμό και στη στατιστική ανάλυση με R*. Αθήνα: Ελληνικά Ακαδημαϊκά Συγγράμματα Kallipos.
- Κονδύλης, Ε. (1999). *Στατιστικές Τεχνικές Διοίκησης Επιχειρήσεων*. Αθήνα: Interbook.
- Σπάρος Λ., Γ. Π. (2006). *Δοκίμια Επιδημιολογίας*. Αθήνα: Εκδόσεις Παρισιάνου.
- Τριχόπουλος Δ., Τ. Α. (2000). *Βιοστατιστική*. Αθήνα: Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου.
- Τριχόπουλος Δ., Τ. Α. (2000). *Βιοστατιστική*. Αθήνα: Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου.