ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΜΕ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΣΤΙΣ ΦΥΣΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ
ΚΑΙ ΡΟΕΣ ΠΥΡΗΝΙΚΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ & ΣΤΟΙΧΕΙΩΔΩΝ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ
ΚΑΙ ΟΠΤΟΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ & ΛΕΪΖΕΡ

ΒΙΟΔΟΣΙΜΕΤΡΙΑ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗ FDXR

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
του
ΑΛΑΦΟΓΙΑΝΝΗ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗ

Ακαδημαϊκή επιβλέπουσα: Μυρσίνη Μακροπούλου
Ομότιμη Καθηγήτρια του Τομέα Φυσικής, ΣΕΜΦΕ-ΕΜΠ.
Συν-επιβλέπουσα: Δρ. Σπυράτου Ελλάς
(Επιστημονική συνεργάτιδα του Β΄ Εργαστηρίου Ακτινολογίας Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ)

Αθήνα, Ιούνιος 2021

NATIONAL TECHNICAL UNIVERSITY OF ATHENS

DEPARTMENT OF APPLIED MATHEMATICAL AND PHYSICAL SCIENCES

BIODOSIMETRY OF RADIATION EXPOSURE IN PEDIATRIC PATIENTS BASED ON THE BIOMARKER FDXR

DIPLOMA THESIS

of

ALAFOGIANNIS PANAGIOTIS

Athens, June 2021

Ευχαριστίες

Η έρευνα αυτή δεν θα είχε πραγματοποιηθεί χωρίς την συμβολή αυτών που μοιράστηκαν με γενναιοδωρία τις γνώσεις τους ή με διευκόλυναν σημαντικά πάνω σε αυτό το ερευνητικό πεδίο. Θα ήθελα λοιπόν να ευχαριστήσω ιδιαίτερα:

1. Την κυρία Μακροπούλου Μυρσίνη, Ομότιμη Καθηγήτρια του Τομέα Φυσικής της σχολής ΣΕΜΦΕ, ΕΜΠ για την όλη ακαδημαϊκή επίβλεψη της εργασίας και τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω μία πολύ ενδιαφέρουσα διπλωματική-εργασία.

2. Τον κύριο Ευσταθόπουλο Ευστάθιο, Καθηγητή Ιατρικής Φυσικής της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, που επίσης μου έδωσε την δυνατότητα να εκπονήσω αυτήν την ενδιαφέρουσα εργασία και φρόντισε για τη συνεργασία μας με το Ωνάσειο Καρδιολογικό Κέντρο (ΩΚΚ), όπου έγινε η δειγματοληψία του πειράματος.

3. Την κυρία Γαζούλη Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ και την ομάδα της, που στο εργαστήριο της υλοποιήθηκε η μέθοδος PCR και μας παρείχαν τις εκφράσεις του γονιδίου FDXR.

4. Τον διευθυντή του καρδιολογικού τμήματος παίδων και συγγενών καρδιοπαθειών ανηλίκων κύριο Παπαγιάννη, τους παιδοκαρδιολόγους του ΩΚΚ [κυρία Αποστολοπούλου, κύριο Ράμμο και κύριο Βαγιεννάκη] που φρόντισαν για όλες τις απαραίτητες διαδικασίες για την διεξαγωγή των αιμοληψιών πριν και μετά την ακτινοσκόπηση των ασθενών και παρείχαν όλες τις απαραίτητες πληροφορίες των ιατρικών πράξεων και των ασθενών, κατόπιν συγκατάθεσης των γονέων των ασθενών τους.

5. Την Δρ. Σπυράτου Ελλάς (επιστημονική συνεργάτιδα του Β΄ Εργαστηρίου Ακτινολογίας Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ), για την καθοδήγηση, τις γνώσεις και το χρόνο που μου διέθεσε σε όλη τη διάρκεια πραγματοποίησης της διπλωματικής μου εργασίας.

6. Την ακτινοφυσικό Αγάπη Πλουσσή, επιστημονική συνεργάτιδα του Β΄ Εργαστηρίου Ακτινολογίας Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ, για την βοήθειά της στον υπολογισμό των ενεργών δόσεων των παιδιατρικών ασθενών.

ΒΙΟΔΟΣΙΜΕΤΡΙΑ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗ FDXR

Περίληψη

Είναι ευρέως αποδεκτό πια πως η χρήση ιοντιζουσών ακτινοβολιών (Ι.Α.), ειδικά των ακτίνων Χ, αποτελεί ένα αναπόσπαστο κομμάτι του κλάδου της υγείας, τόσο στον τομέα της διάγνωσης όσο και της θεραπείας των ασθενών. Παρόλα αυτά δεν μπορεί να αγνοηθεί το γεγονός ότι κατά την διάρκεια όλων των ιατρικών πράξεων ένα μέρος της Ι.Α. επηρεάζει με αρνητικό τρόπο τον οργανισμό μας, προκαλώντας πολλών ειδών βιολογικές βλάβες. Στόχος λοιπόν όλων των μεθόδων βιοδοσιμετρίας και γενικότερα της δοσιμετρίας είναι η εκτίμηση των κατάλληλων δόσεων Ι.Α. που απαιτούν σε μία ιατρική πράξη προκειμένου να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα, με την κατά το δυνατόν μικρότερη επιβάρυνση του οργανισμού από την λεγόμενη τοξικότητα της ακτινοβολίας. Πιο συγκεκριμένα, ο όρος βιοδοσιμετρία αναφέρεται στις μεθόδους δοσιμετρίας που βασίζονται σε βιολογικούς παράγοντες, όπως οι βιοδείκτες και χρησιμοποιείται συνήθως όταν δεν είναι εφικτή ή χρειάζεται επιβεβαίωση μία μέθοδος φυσικής δοσιμετρίας. Είναι τόσο εκτεταμένη και αξιόπιστη η εφαρμογή της που χρησιμοποιείται ακόμα και για την εκτίμηση της απορροφημένης δόσης Ι.Α., η οποία προκαλεί βιολογικές αλλαγές στους οργανισμούς των αστροναυτών κατά την διάρκεια των αποστολών τους στο διάστημα (Brooks An. L., 2012). Μία ακόμα αξιοσημείωτη εφαρμογή είναι αυτή του ελέγχου πιθανών θυμάτων μετά από κάποιο πυρηνικό ατύχημα ή μετά από κάποια τρομοκρατική ή στρατιωτική ενέργεια όπου έγινε χρήση πυρηνικών-βιολογικών όπλων (Tichy Al., et al., 2018).

Οι ήδη υπάρχουσες μέθοδοι πάνω σε αυτόν τον τομέα, όπως η καταμέτρηση χρωμοσωματικών αλλαγών-βλαβών από δείγματα ακτινοβολημένου αίματος παρέχουν πολλές και ακριβείς πληροφορίες για την εκάστοτε δόση Ι.Α. Παραμένουν όμως ανεπαρκείς στην περίπτωση υψηλών δόσεων λόγω της απουσίας μεγάλου πλήθους δειγμάτων και της απαίτησης χρονοβόρων διαδικασιών για την μελέτη τους. Εκεί ήρθε για να ανατρέψει αυτήν την κατάσταση η χρήση και μελέτη της έκφρασης ακτινοευαίσθητων γονιδίων που βρίσκονται στο αίμα μας, όπως το FDXR. Έτσι με την χρήση αυτών των γονιδίων ως βιοδείκτες είμαστε πια σε θέση να αναπτύξουμε μεθόδους βιοδοσιμετρίας, οι οποίες θα είναι πιο γρήγορες και εξίσου αξιόπιστες συγκριτικά με τις παλαιότερες (Polozov S., et al., 2019).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετάται για πρώτη φορά η μεταβολή στην έκφραση του βιοδείκτη FDXR σε παιδιατρικούς ασθενείς που υποβάλλονται σε επεμβατικές καρδιολογικές πράξεις που αφορούν στη διάγνωση ή/και θεραπεία των πιο συχνών συγγενών καρδιοπαθειών που εμφανίζονται στα παιδιά όπως είναι η σύγκλειση μεσοκολπικής επικοινωνίας, η στένωση πνευμονικής και αορτικής βαλβίδας και ο ανοιχτός αρτηριακός πόρος. Η αύξηση που παρατηρείται τα τελευταία

χρόνια στον αριθμό των παιδιατρικών επεμβατικών διαδικασιών με τη χρήση ιοντίζουσας ακτινοβολίας σε συνδυασμό με τις βιολογικές βλάβες που προκαλεί η ιοντίζουσα ακτινοβολία σε επίπεδο κυττάρων και ιστών καθώς και η ιδιαίτερα αυξημένη ακτινοευαισθησία που παρουσιάζουν τα παιδιά καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμη τη μελέτη αυτή. Απώτερος στόχος της είναι η διεξαγωγή εξατομικευμένης δοσιμετρίας σε παιδιατρικούς ασθενείς που υποβάλλονται σε επεμβατικές καρδιολογικές διαδικασίες με τη χρήση ιοντίζουσας ακτινοβολίας, η οποία θα μπορεί να εφαρμοστεί αποτελεσματικά και εύκολα στην κλινική πράξη συνδυάζοντας τη φυσική με τη βιολογική δοσιμετρία (υβριδική δοσιμετρία).

Συγκεκριμένα, στην παρούσα έρευνα αναλύεται πρώτα όλο το θεωρητικό υπόβαθρο, το οποίο αφορά: την έννοια του βιοδείκτη και συγκεκριμένα του FDXR, τις ιοντίζουσες ακτινοβολίες, το πώς επηρεάζουν τους βιολογικούς οργανισμούς, καθώς και τις βασικές απεικονιστικές μεθόδους των ακτίνων X, οι οποίες είναι και οι ακτίνες ενδιαφέροντος αυτής της μελέτης. Επίσης, αναπτύσσονται αναλυτικά οι βασικές αρχές δοσιμετρίας και ακτινοπροστασίας, καθώς και η ιδιαίτερα σημαντική, για την υλοποίηση του πειραματικού σκέλους της εργασίας, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Στην συνέχεια μελετήσαμε την έκφραση του γονιδίου FDXR από δείγματα αίματος παιδιατρικών ασθενών του Ωνάσειου Καρδιολογικού Κέντρου (ΩΚΚ), που ως επί το πλείστον έπασχαν από καρδιαγγειακές νόσους και αναγκάστηκαν να υποβληθούν σε επεμβατικές καρδιολογικές διαδικασίες. Αυτή η έκφραση προέκυψε από την ανάλυση των δειγμάτων μέσω της μεθόδου SYBR Green q-PCR από τα δείγματα αίματος που λαμβάνονταν πριν και 24 ώρες μετά την ακτινοβόληση των ασθενών. Η αλλαγή στην έκφραση του γονιδίου FDXR συσχετίστηκε με την ενεργό δόση που λαμβάνει ο κάθε παιδιατρικός ασθενής, η οποία υπολογίστηκε με τη χρήση κατάλληλων παραγόντων μετατροπής k-factor που συνυπολογίζουν το μέγεθος, την ηλικία και το φύλο του ασθενούς.

Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί ότι ανεξαρτήτως των δυσκολιών και των συνεχών καθυστερήσεων που αντιμετωπίσαμε λόγω του Covid-19 και των συνεπειών που έχει επιφέρει η πανδημία στις ζωές μας, κατορθώσαμε να ολοκληρώσουμε επιτυχώς την έρευνα, της οποίας τα αποτελέσματα έχουν ιδιαίτερη σημασία για το λόγο του ότι δεν έχει επαναληφθεί στο παρελθόν τέτοιου είδους μελέτη με δείγματα από ασθενείς κάτω των 18 ετών και για εξατομικευμένη ενεργό δόση ασθενούς.

Τα συμπεράσματα στα οποία καταλήξαμε μετά την ολοκλήρωσης της μελέτης είναι τα εξής:

1) Η εξάρτηση της έκφρασης του γονιδίου FDXR από την εκάστοτε ενεργό δόση στην εκτέθηκε ο κάθε ασθενής.
2) Η πιθανή μεγαλύτερη ακτινοευαισθησία των ασθενών θηλυκού γένους συγκριτικά με αυτήν των ασθενών αρσενικού γένους.

3) Η μεγαλύτερη ακτινοευαισθησία που παρουσιάστηκε στους ασθενείς μικρών ηλικιών.

Τέλος, οφείλουμε να αναφέρουμε ότι η παρακάτω διπλωματική εργασία αγγίζει εκτός της φυσικής ιοντιζουσών ακτινοβολιών και άλλους επιστημονικούς κλάδους, όπως αυτόν της πυρηνικής φυσικής, της ιατρικής, της βιολογία, της γενετικής και της χημείας. Συνεπώς, με την βοήθεια παραπομπών που υπάρχουν μέσα στο κείμενο ορίζονται στο Παράρτημα Ι κάποιες στοιχειώδεις έννοιες που θεωρούνται απαραίτητες για την κατανόηση του θεωρητικού σκέλους.

Abstract

It is well known that, everyone either occupationally or accidently can be exposed to ionizing radiation (I.R.). Moreover, it is an undeniable fact that, ionizing radiation nowadays, especially X-rays, play a role of huge significance in the field of medicine. Combining the two aforementioned facts, we can easily understand that, both adults and children are in need of a mean, which will be able to estimate the dose of I.R. they have been exposed to. The role of this mean can be played by biomarkers, which have shown during the recent years an interesting response after their exposure to ionizing radiation. Speaking more specifically, biomarkers are not only useful for personalized radiation dose assessment in medical management, but also for the prediction of delayed stochastic effects, such as genomic instability and cancer. Many successful attempts have been made to produce both accurate and reliable I.R. dose estimations on adults by the use of biomarkers, but not many people used them in an equal way in any biodosimetry method to do the same for children. For this reason, in this innovative study, we will examine how the expression of the biomarker-gene FDXR will respond after its irradiation (by small doses of X-rays) on pediatric patients. Our main goal is to confirm that, the biomarkers, especially FDXR, are suitable for dose estimation for underage people, too. Last but not least, we would like also to set a good example, as the first ones, and inspire more scientists to carry out experiments on child-biodosimetry, because is widely accepted that the new generation is directly connected with our future.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες……...3
Περίληψη……...4-6
Abstract……6

Α' Μέρος : Θεωρητικό

Κεφάλαιο 1ο : Εισαγωγικές έννοιες για την *in vivo* διαδικασία και τους βιοδείκτες

1.1 Ορισμός *in vivo* διαδικασίας……11
1.2 Βιοδείκτες……11-13
1.2.1 Εισαγωγή……...…11-12
1.2.2 Είδη βιοδεικτών…….....12-13
1.3 Βιοδείκτες έκθεσης στην ιοντίζουσα ακτινοβολία……...13-15
1.4 Γονίδιο FDXR……..….16

Κεφάλαιο 2ο : Στοιχεία για την βιολογική δράση των ιοντιζουσών ακτινοβολιών

2.1Εισαγωγή……17
2.2Βιολογικά αποτελέσματα ιοντιζουσών ακτινοβολιών…….....17-23
2.2.1 Μοριακό επίπεδο……..18
2.2.2 Κυτταρικό επίπεδο……..19-21
2.2.3 Επίπεδο ιστών-οργάνων-οργανισμών……21-23
2.2.4. Παράγοντες που επηρεάζουν τα βιολογικά αποτελέσματα ……23
2.3 Ακτίνες Χ……..24-30
2.3.1 Ορισμός και Ιστορικά στοιχεία……..24-25
2.3.2 Παραγωγή ακτίνων Χ και φαινόμενα κατά την αλληλεπίδρασή τους με την ύλη……25-27
2.3.3 Απεικονιστικές μέθοδοι με χρήση ακτίνων Χ……...27-30

Κεφάλαιο 3^{ο} : Στοιχεία δοσιμετρίας και ακτινοπροστασίας

3.1 Μεγέθη Δοσιμετρίας……...31-34
3.2 Δοσίμετρο και τα χαρακτηριστικά επιλογής του…….34-35
3.3 Ακτινοπροστασία…….35-38
3.3.1 Βασικές αρχές και πρακτικές ακτινοπροστασίας……..35-37
3.3.2 Μέτρα ακτινοπροστασίας που λαμβάνονται στο αιμοδυναμικό εργαστήριο του ΩΚΚ……..37-38

Κεφάλαιο 4^{ο}: Εισαγωγή στην τεχνική PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης) και σχετική ανάλυση

4.1 Εισαγωγή……...39
4.2 Κλασική PCR (Polymerase Chain Reaction)…….……..39-40
4.3 Ποσοτική PCR (real time-PCR ή q-PCR)……41-44
4.3.1 Γενικά στοιχεία q-PCR…….…41
4.3.2 Βασικές αρχές της q-PCR……41-42
4.3.3 Απόλυτη ποσοτικοποίηση, πρότυπη καμπύλη και γονίδιο αναφοράς……42-43
4.3.4 Φθορίζουσες χρωστικές και SYBR Green q-PCR……43-44

4.4 Εκκινητές γονιδίου FDXR και αλγόριθμος που έδωσε την έκφρασή του……..45-46

Β' Μέρος: Πειραματικό

Κεφάλαιο 5^{ο} : Περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας

5.1 Εισαγωγή……..……48
5.2 Αιμοδυναμικό εργαστήριο και Αγγειογράφος……..49-51
5.3 Περιγραφή του πειράματος……52-53

Κεφάλαιο 6^{ο} : Παρουσίαση και επεξεργασία πειραματικών δεδομένων

…….54-58

Κεφάλαιο 7^{ο} : Αποτελέσματα και συμπεράσματα

7.1 Παρουσίαση γραφικών παραστάσεων..……..……59-63
7.2 Σχολιασμός Αποτελεσμάτων…….……...……64
7.3 Σύγκριση αποτελεσμάτων με αυτά της βιβλιογραφίας……64-65
7.4 Προτάσεις για μελλοντική έρευνα…….66-66

Παραρτήματα και Βιβλιογραφία

Παράρτημα Ι - Ευρετήριο Όρων…..……...67-70
Βιβλιογραφία…….71-75
Παράρτημα ΙΙ - Έντυπο συγκατάθεσης σε συμμετοχή σε ερευνητική μελέτη…….76-80

Α’ Μέρος : Θεωρητικό

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Εισαγωγικές έννοιες για την *in vivo* διαδικασία και τους βιοδείκτες

1.1 Ορισμός *In vivo* διαδικασίας

Η φράση *in vivo* προέρχεται από τα λατινικά και σημαίνει ‘‘εν ζωή’’ και αναφέρεται σε ότι λαμβάνει χώρα μέσα σε έναν έμβιο οργανισμό. Ιδιαίτερα στην επιστημονική κοινότητα και πιο συγκεκριμένα στον κλάδο της βιολογίας ο όρος αναφέρεται σε πειράματα που πραγματοποιούνται σε ιστούς εντός ζώντος οργανισμού σε αντιδιαστολή με τον όρο *in vitro* (‘‘στο γυαλί’’ ή "σε δοκιμαστικό σωλήνα"), που αναφέρεται σε αντίστοιχα πειράματα αποσπασμένων μερών εκτός του ζωντανού οργανισμού, καθώς και σε έρευνες και πειράματα *ex vivo* (‘‘εκτός ζωής’’) (Lipinski C., et al., 2004). Γενικά οι κλινικές δοκιμές και μελέτες είναι μορφές έρευνας *in vivo*. Ο τύπος αυτός έρευνας αποτελεί έναν ολιστικό τρόπο πειραματισμού. Προσφέρεται για μελέτες περισσότερο από τις *in vitro* μελέτες, λόγω του ότι δίνει πιστότερα, και πλέον ασφαλή και αξιόπιστα σε χρήση αποτελέσματα σε ένα πείραμα. Οι μελέτες *in vivo* είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη ιατρικών συσκευών, χειρουργικών εργαλείων, διαδικασιών και νέων θεραπευτικών μεθόδων. Παρόλα αυτά, εκτός του ότι τα πειράματα του είδους αυτού έχουν υψηλότερο κόστος πραγματοποίησης, είναι χρονοβόρα και απαιτούν μεγάλο όγκο εργασίας δεδομένου του ότι τα ζωντανά μοντέλα είναι πολύπλοκα σε πολλές περιπτώσεις, πολύ συχνά (ιδιαίτερα πρόσφατα) συναντούν και τεράστιες δυσκολίες εκτέλεσης λόγω αναφυομένων θεμάτων βιο-ηθικής και δεοντολογίας (Spencer et.al., 2017). Η συγκεκριμένη ερευνητική εργασία χαρακτηρίζεται *in vivo* γιατί όλα της τα αποτελέσματα και πορίσματα προέρχονται από την ανάλυση δειγμάτων αίματος παιδιατρικών ασθενών και λήφθηκαν αφότου οι ασθενείς είχαν υποβληθεί σε κάποια διαγνωστική εξέταση ή θεραπεία που εμπεριείχε την ακτινοβόλησή τους.

1.2 Βιοδείκτες

1.2.1Εισαγωγή

Ο όρος βιοδείκτης (= biomarker) είναι ένας όρος που χρησιμοποιείται συχνά σε πολλές βιοϊατρικές επιστήμες, π.χ. στην τοξικολογία και στην ιατρική, αποτελεί δε ένα σχετικά νέο κλινικό εργαλείο που παρέχει μεγαλύτερη ακρίβεια στις διαγνώσεις ακόμα και στις θεραπείες που βασίζονται σε αυτό. Είναι μετρήσιμες ουσίες ενός βιολογικού συστήματος που παράγονται από φυσιολογικά, παθολογικά ή καρκινικά κύτταρα και εντοπίζονται στο αίμα, στους ιστούς και στα υγρά του συστήματος (Science Lab.Gr, 2018). Ο λόγος για τον οποίο είναι ιδιαίτερα σημαντικοί είναι γιατί οι διαφορές στις συγκεντρώσεις τους αντανακλούν στην φυσιολογική ή παθολογική λειτουργία του συστήματος. Με πιο απλά λόγια σηματοδοτούν μια φυσιολογική ή παθολογική διαδικασία (Biomarkers Definitions Working Group, 2001, Siderowf A. etal., 2018, Micro Diagnostics)

Η ευρεία χρήση του όρου ΄΄βιοδείκτης΄΄ χρονολογείται από το 1980, όπου τότε χρησιμοποιούνταν κυρίως στους τομείς της χημείας και γεωλογίας για να δειχθεί η ύπαρξη, το παρελθόν ή το μέλλον ενός μορίου ενός ζωντανού οργανισμού μέσα σε ένα οικοσύστημα. Στη συνέχεια, μόλις το 1996 οι επιστήμονες Van Gestel και Van Brummelen έκαναν το διαχωρισμό και είπαν πως η χρήση που μόλις αναφέρθηκε αφορά βιοδείκτες περιβάλλοντος (=bioindicators) και αυτοί που χρησιμοποιήθηκαν ύστερα στο κλάδο της ιατρικής θα πρέπει να καλούνται βιοδείκτες υγείας (=biomarkers), πράγμα το οποίο επισημοποιήθηκε το 1998 από το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας (= National Institute of Health – NIH) που έδωσε στους βιοδείκτες υγείας τον ορισμό που αναφέραμε στην αρχή, δηλαδή των ουσιών που παράγονται σε φυσιολογικά ή καρκινικά κύτταρα, βρίσκονται σε βιολογικά υγρά (αίμα, ούρα πτύελα κλπ.) και ιστούς και υποδεικνύουν φυσιολογικές ή παθολογικές διαδικασίες (Biomarkers Definitions Working Group, 2001, Siderowf A. et al., 2018, Λέτσα Ι.,2018).

1.2.2 Είδη βιοδεικτών

Οι βιοδείκτες διακρίνονται σε τρεις βασικές κατηγορίες, τους προγνωστικούς, τους διαγνωστικούς και τους προβλεπτικούς. Πιο αναλυτικά:

a) Προγνωστικοί βιοδείκτες: Οι προγνωστικοί βιοδείκτες χρησιμεύουν ως μέθοδος πρόβλεψης κλινικών αποτελεσμάτων, δηλαδή για τη βελτιστοποίηση των ιδανικών θεραπειών για τον εκάστοτε ασθενή και συχνά υποδηλώνουν την πιθανότητα ο ασθενής να επωφεληθεί από μία συγκεκριμένη θεραπεία. Για παράδειγμα, σε μεταστατικούς καρκίνους του παχέος εντέρου, οι προγνωστικοί βιοδείκτες μπορούν να χρησιμεύσουν ως τρόπος αξιολόγησης και βελτίωσης των ποσοστών επιβίωσης των ασθενών. Σε μεμονωμένες δε περιπτώσεις, μπορούν να χρησιμεύσουν ως τρόπος για την προφύλαξη των ασθενών από άσκοπη τοξικότητα που προκύπτει από τα πρωτόκολλα θεραπείας του καρκίνου.(FDA-NIH Biomarker Working Group,2016)

b) Διαγνωστικοί βιοδείκτες: Οι διαγνωστικοί βιοδείκτες συμβάλλουν στη μείωση του χρόνου που απαιτείται για την διάγνωση, πράγμα το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε διάγνωση που είναι πολύ πιο συγκεκριμένη για μεμονωμένους ασθενείς. Ένας τέτοιος βιοδείκτης μπορεί να είναι μια ανιχνεύσιμη ουσία που εισάγεται σε έναν οργανισμό ως μέσο για την εξέταση της λειτουργίας των οργάνων ή άλλων πτυχών της υγείας. Για παράδειγμα, το χλωριούχο ρουβίδιο χρησιμοποιείται ως ραδιενεργό ισότοπο για την αξιολόγηση της διάχυσης του καρδιακού μυός. Μπορεί επίσης να είναι μια ουσία της οποίας η ανίχνευση υποδεικνύει μια συγκεκριμένη κατάσταση ασθένειας, για παράδειγμα, η παρουσία ενός αντισώματος μπορεί να υποδηλώνει μια λοίμωξη . Πιο συγκεκριμένα, ένας διαγνωστικός βιοδείκτης υποδεικνύει μια αλλαγή στην έκφραση ή την κατάσταση μιας πρωτεΐνης που σχετίζεται με τον κίνδυνο εμφάνισης ή την εξέλιξη μιας ασθένειας ή με την ευαισθησία της νόσου σε μια δεδομένη θεραπεία. Ένα παράδειγμα ενός κοινώς χρησιμοποιούμενου βιοδείκτη στην ιατρική για αυτόν τον σκοπό είναι το αντιγόνο το ειδικό για

τον προστάτη (Prostate Specific Antigen - PSA). Αυτός ο δείκτης μπορεί να μετρηθεί ως αντιπροσωπευτικός του μεγέθους του προστάτη με γρήγορες αλλαγές που ενδεχομένως υποδηλώνουν καρκίνο. (FDA-NIH Biomarker Working Group, 2016)

c) Προβλεπτικοί βιοδείκτες: Ένας προβλεπτικός βιοδείκτης παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη συνολική έκβαση της νόσου των ασθενών, ανεξάρτητα από τη θεραπεία. Αναλυτικότερα, υποδηλώνει την αυξημένη (ή μειωμένη) πιθανότητα μελλοντικού κλινικού συμβάντος, υποτροπής της νόσου ή εξέλιξής της σε έναν αναγνωρισμένο πληθυσμό. Συχνά οι προβλεπτικοί βιοδείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως προγνωστικοί, αλλά χωρίς να ισχύει το αντίστροφο. Οι προβλεπτικοί βιοδείκτες μετρούνται σε μία καθορισμένη γραμμή αναφοράς, η οποία μπορεί να περιλαμβάνει μία βασική θεραπεία. Πολλά γνωστά παραδείγματα προβλεπτικών βιοδεικτών εμφανίζονται σε κλινικά πλαίσια όπου ένα άτομο διαγιγνώσκεται με νόσο ή πάθηση και υπάρχει ενδιαφέρον για την εκτίμηση της πιθανότητας μελλοντικού κλινικού συμβάντος (θάνατος, εξέλιξη της νόσου, υποτροπή της νόσου ή ανάπτυξή της σε μία νέα ιατρική πάθηση). Παραδείγματος χάριν για ασθενείς που προηγουμένως είχαν υποστεί καρδιακή προσβολή, αυξημένη αρτηριακή πίεση, ενδείξεις διαβήτη, αυξημένη χοληστερόλη LDL και χαμηλή χοληστερόλη HDL υπάρχουν βιοδείκτες που υποδηλώνουν αυξημένο κίνδυνο για άλλη καρδιακή προσβολή. Και για άτομα με υπέρταση ή ταυτόχρονη ένδειξη διαβήτη έχουμε βιοδείκτες που δείχνουν αυξημένη την πιθανότητα καρδιαγγειακών επεισοδίων. Τέλος, οι προβλεπτικοί βιοδείκτες χρησιμοποιούνται συχνά ως κριτήρια επιλεξιμότητας σε κλινικές δοκιμές για τον εντοπισμό ασθενών που είναι πιο πιθανό να έχουν κλινικά συμβάντα ή εξέλιξη της νόσου. (FDA-NIH Biomarker Working Group,2016)

1.3 Βιοδείκτες έκθεσης στην ιοντίζουσα ακτινοβολία

Υπάρχουν αρκετές ουσίες μέσα στο ανθρώπινο σώμα που λειτουργούν ως βιοδείκτες. Πολλοί εκ των οποίων αντιδρούν κατά την απορρόφηση ιοντίζουσας ακτινοβολίας (Ι.Α.). Αυτό τους το χαρακτηριστικό αποτέλεσε θεμέλιο στην εύρεση πολλών μεθόδων βιοδοσιμετρίας, δηλαδή της εκτίμησης της απορροφηθείσας δόσης ιοντίζουσας ακτινοβολίας μετά την έκθεση ενός ατόμου σε αυτήν. Για να μπορέσει όμως ένας βιοδείκτης να θεωρηθεί κατάλληλος για μια τέτοια διαδικασία αρκεί ο τρόπος με τον οποίο αντιδρά μετά την απορρόφηση της ακτινοβολίας να μην παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις για την εκάστοτε δόση, να δείχνει από ποιους παράγοντες (όπως ηλικία, φύλο, βάρος κλπ.) εξαρτάται και να παρουσιάζει μία σταθερότητα μετά το πέρας ενός συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος. Επιπλέον, απαραίτητα χαρακτηριστικά ενός βιοδείκτη Ι.Α. θα μπορούσαν να θεωρηθούν η δυνατότητα παροχής εύκολα αναπαραγώγιμων αποτελεσμάτων, καθώς και η δυνατότητα ανίχνευσης του ακόμα και σε μικρές δόσεις Ι.Α., όπως αυτές που χρησιμοποιούνται συχνά στις μεθόδους ιατρικής απεικόνισης (Badie C., et al, 2016).

Όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά πληρούνται από ορισμένες πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, αμινοξέα, το σμάλτο των δοντιών, τα νύχια και από τις εκφράσεις κάποιων γονιδίων. Πιο αναλυτικά:

- Βιοδείκτες πρωτεϊνών: Μετά από την έκθεση σε Ι.Α. ο αριθμός ορισμένων πρωτεϊνών αυξάνεται ή μειώνεται. Αυτές οι αλλαγές μπορούν να οδηγήσουν σε ακριβείς εκτιμήσεις της εκάστοτε απορροφημένης δόσης, ακόμα και σε ορισμένες διαγνώσεις όπως η έκταση μίας πιθανής μόλυνσης. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι η απολιποπρωτεϊνη, η πρωτεΐνη γ-H2AX, τα συμπληρωματικά στοιχεία των C3 και C9 και η α1-αντιτρυψίνη (Rana S., et al, 2010). Πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν ότι ο βιοδείκτης-πρωτεΐνη γ-H2AX είναι χρήσιμος για την ποσοτικοποίηση των επαγόμενων δίκλωνων βλαβών του DNA από Ι.Α. ακόμα και σε χαμηλές δόσεις ακτίνων Χ σε παιδιατρικούς ασθενείς, οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε επεμβατικές καρδιολογικές πράξεις (Brunhild M., et al, 2014 και Lodrich M., et al, 2005).

- Βιοδείκτες νουκλεϊκών οξέων: Οι βλάβες που προκαλούνται στα δύο βασικά νουκλεϊκά οξέα του οργανισμού μας, το DNA και το RNA, μετά την έκθεση σε Ι.Α. τα καθιστούν πολύ χρήσιμους βιοδείκτες. Για παράδειγμα, η μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης επιδιόρθωσης (53BP1) του DNA, μετά την έκθεση σε ακτινοβολία γ αποτελεί αποτελεσματικό βιοδείκτη για την ανίχνευση των διασπάσεων στου DNA διπλής έλικας (Rana S., et al, 2010).

- Βιοδείκτες αμινοξέων: Οι συγκεντρώσεις διάφορων αμινοξέων όπως η κρεατίνη, η ισταμίνη και η ταυρίνη αυξάνονται μετά από έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία. Με αποτέλεσμα να μπορούν να χαρακτηριστούν βιοδείκτες ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Παρόλα αυτά κάποιοι από αυτούς δεν είναι 100% αξιόπιστοι, διότι συχνά οι αυξήσεις των συγκεντρώσεών τους εξαρτώνται και από άλλους παράγοντες εκτός της ακτινοβολίας. Για παράδειγμα, η συχνή άσκηση, η μυϊκή ατροφία, τα τραύματα και η πείνα μπορούν να οδηγήσουν σε αύξηση των ποσοστών κρεατίνης στα ούρα δίχως κάποιος να έχει εκτεθεί προηγουμένως σε Ι.Α. (Rana S., et al, 2010).

- Βιοδείκτες σμάλτου δοντιών και νυχιών: Ένα πιθανό αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης της Ι.Α. με έναν βιολογικό ιστό είναι η δημιουργία ελεύθερων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες είναι στην ουσία ασύζευκτα ηλεκτρόνια, των οποίων ο χρόνος ζωής στην πλειοψηφία των ιστών του ανθρωπίνου σώματος είναι της τάξης των nanosecond (10^{-9}second). Αυτός ο χρόνος ζωής δεν ισχύει όμως στις περιπτώσεις του σμάλτου των δοντιών και των νυχιών μας. Το σμάλτο των δοντιών θεωρείται το σκληρότερο ανόργανο συστατικό του σώματός μας, αφού αποτελείται κατά 97% από υδροξυαπατίτη, 2% από νερό και 1% από οργανικές ενώσεις. Λόγω του μεγάλου ποσοστού υδροξυαπατίτη το σμάλτο μπορεί και παγιδεύει τις ελεύθερες ρίζες, που

προκύπτουν μετά την έκθεση σε Ι.Α., από μήνες έως και χρόνια. Όμοια συμπεριφορά παρατηρείται και στα νύχια λόγω της α-κερατίνης. Εφαρμόζοντας σε αυτούς τους δύο ιστούς την τεχνική δοσιμετρίας παραμαγνητικού συντονισμού ηλεκτρονίων (Electron Paramagnetic Resonance dosimetry technique – EPR dosimetry technique) μπορεί να μετρηθεί η συγκέντρωση των ελεύθερων ριζών, η οποία με την σειρά της αποδίδει ακριβείς εκτιμήσεις των εκάστοτε δόσεων ακτινοβολίας (Rana S., et al, 2010).

- Βιοδείκτες έκφρασης γονιδίων: Μετά την έκθεση των κυττάρων σε παράγοντες που βλάπτουν το γενετικό τους υλικό, όπως η Ι.Α. αυξάνεται μία πολύ περίπλοκη μοριακή απόκριση, η οποία προκαλείται μέσω αλλαγών στις εκφράσεις κάποιων γονιδίων. Παραδείγματος χάρη, τέτοιες αλλαγές σε εκφράσεις γονιδίων του mRNA συμβαίνουν σε δόσεις μικρότερες του 1Gy και παρουσιάζουν γραμμική εξάρτηση ανάμεσα σε δόσεις Ι.Α. και εκφράσεις γονιδίων (Rana S., et al, 2010).

Όλοι οι προαναφερθέντες βιοδείκτες έχουν την δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν σε όλους τους κλάδους, οι οποίοι εμπεριέχουν την χρήση ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Βέβαια ο σημαντικότερος αυτών είναι ο κλάδος της υγείας, όπου εκεί οι βιοδείκτες δεν χρησιμοποιούνται μονάχα για την εκτίμηση δόσεων, αλλά και για την πρόβλεψη πιθανών παρενεργειών και δυσμενών αποτελεσμάτων που μπορούν να προκύψουν μετά από κάποια θεραπεία που βασίζεται στην Ι.Α., όπως κάποια πιθανή μόλυνση ή μετάσταση ενός καρκίνου (Badie C., et al, 2016).

Έχοντας λοιπόν περιγράψει την σημαντικότητα, τα είδη και τα χαρακτηριστικά των βιοδεικτών έκθεσης σε ιοντίζουσα ακτινοβολία μπορούμε πια να επικεντρωθούμε στον βιοδείκτη-γονίδιο FDXR, το οποίο κατέχει πρωταγωνιστικό ρόλο στην παρούσα έρευνα.

1.4 Γονίδιο FDXR

Έχοντας πλέον αναλύσει τι είναι οι βιοδείκτες και σε ποιες κατηγορίες διακρίνονται, μπορούμε να επικεντρωθούμε στον βιοδείκτη πάνω στον οποίο βασίστηκε η μελέτη μας. Στο πείραμά μας έγινε μελέτη του γονιδίου FDXR(= Ferodoxin Reductase). Αυτό το γονίδιο όντας ιδιαίτερα ακτινοευαίσθητο, βρίσκεται στο αίμα και αποκωδικοποιεί μια πρωτεΐνη παράγωγο της $ριβοφλαβίνης^{*1}$ στα μιτοχόνδρια του κυττάρου με σκοπό την έναρξη μεταφοράς ηλεκτρονίων από το συνένζυμο $NADPH^{*2}$ στο κυτταρόχρωμα $P450^{*3}$ (Coghlan V.M. et. al., WikiGenes). Με βάση όλα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω για τις κατηγορίες των βιοδεικτών, το FDXR μπορεί να χαρακτηριστεί ως προβλεπτικός βιοδείκτης, διότι η έκφρασή του εξαρτάται άμεσα από την απορροφημένη σε αυτό ακτινοβολία. Η έκφραση αυτή με τη σειρά της μπορεί να δώσει σημαντικά στοιχεία για ακριβέστερη δημιουργία μίας καμπύλης δοσιμετρίας για ένα μεγάλο εύρος ασθενών. Με την έννοια ‘‘έκφραση γονιδίου’’ εννοούμε στη γενετική και ειδικότερα στη γονιδιολογία τη διαδικασία εκείνη που προκαλεί τη μεταφορά κωδικοποιημένων πληροφοριών (του γονιδίου) στο λειτουργικό προϊόν του γονιδίου (πρωτεΐνη ή RNA). Γενικά η έκφραση γονιδίων εξισώνεται με τη διαδικασία της $μεταγραφής^{*4}$ και της $μετάφρασης^{*5}$. Στη περίπτωση όμως που το προϊόν είναι μόνο RNA τότε εμπλέκεται η μεταγραφή. Έτσι όταν λέμε ότι ένα «γονίδιο εκφράζεται» αυτό σημαίνει πως πρόκειται για ενεργό γονίδιο (Anthony J.F. Griffiths et.al.,2000). Επιπλέον, το FDXR έχει αναφερθεί ως το μόνο γονίδιο που διαφοροποιεί την έκφρασή του ύστερα από την έκθεση των κυττάρων στα 6 από τα 7 τεστ αντικαρκινικών φαρμάκων που έχουν γίνει. Η μεταγραφική ρυθμιστική του αύξηση μπορεί να θεωρηθεί ως μία γενικευμένη απόκριση βλάβης DNA. Συνοψίζοντας, σε συνδυασμό με τα παραπάνω και μελέτες σε *ex vivo* δείγματα αίματος έχει αναφερθεί ότι το FDXR αποτελεί το καλύτερο γονίδιο για εκτίμηση της δόσης (dose estimation), κάτι το οποίο μας ώθησε και στην πραγματοποίηση αυτής της έρευνας ειδικά για παιδιατρικούς ασθενείς. Βέβαια οφείλουμε να ενημερώσουμε ότι, παρά τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου μετά την απορρόφηση ιοντίζουσας ακτινοβολίας και τα παράλληλα χαμηλά επίπεδα ενδογενούς έκφρασης, δεν έχουμε γνώση για συμβολή παραγόντων όπως ηλικία, φύλο, κάπνισμα, περιβαλλοντικοί παράγοντες και πιθανή μόλυνση (O'Brien, Gráinne, et al., 2018), στον γενικό πληθυσμό. Για τους παράγοντες αυτούς ξέρουμε ότι μπορούν να επηρεάσουν την ενδογενή έκφραση, συνεπώς να προκαλέσουν και κάποια στατιστικά σφάλματα στην έρευνα. Δεδομένου όμως του ότι δεν έχει πραγματοποιηθεί τέτοιου είδους πείραμα στο παρελθόν για παιδιατρικούς ασθενείς, τα αποτελέσματα αυτού πιστεύουμε ότι θα φανούν χρήσιμα στην επιστημονική κοινότητα, παρόλη την πιθανή ύπαρξη μικρών σφαλμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Στοιχεία για την βιολογική δράση των ιοντιζουσών ακτινοβολιών

2.1 Εισαγωγή

Η ενέργεια που διαδίδεται στο κενό ή στην ύλη ονομάζεται ακτινοβολία. Υπάρχουν δύο είδη ακτινοβολίας η ηλεκτρομαγνητική (Η/Μ) και η σωματιδιακή. Η Η/Μ ακτινοβολίας μπορεί να είναι ιοντίζουσα ή μη ιοντίζουσα, ανάλογα με την ενέργειά της. Ιοντισμός του ατόμου είναι η βίαιη απομάκρυνση ενός ή περισσοτέρων ηλεκτρονίων από τις στιβάδες ηλεκτρονίων του ατόμου, με αποτέλεσμα την παραγωγή αντίθετα φορτισμένων ιόντων, λόγω της δράσης κάποιου εξωτερικού αιτίου. Τα ιόντα αυτά αφορούν αφενός τα αρνητικά ηλεκτρόνια που απομακρύνθηκαν από το άτομο και αφετέρου στα ελλειμματικά σε ηλεκτρόνια θετικά φορτισμένα άτομα που απέμειναν μετά την αλληλεπίδραση. Για να εκδιωχθεί ένα ηλεκτρόνιο από τις στιβάδες του, απαιτείται ενέργεια η οποία προσδίδεται στο άτομο από κάποιον εξωτερικό παράγοντα (π.χ. πρόσπτωση ακτινοβολίας). Η ενέργεια αυτή πρέπει προφανώς να είναι μεγαλύτερη από την ενέργεια σύνδεσης του ηλεκτρονίου ^{*6}στο άτομο, η οποία εξαρτάται από την ταυτότητα του ατόμου και τη θέση της στιβάδας στην οποία είναι συνδεδεμένο το συγκεκριμένο ηλεκτρόνιο. Μεταξύ των αιτίων που μπορούν να προκαλέσουν ιοντισμό, είναι, όπως προαναφέρθηκε, και οι ακτινοβολίες υψηλής ενέργειας, οι οποίες για την ικανότητά τους αυτήν αποκαλούνται ιοντίζουσες ακτινοβολίες. Οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες σωματιδιακής φύσεως είναι συνήθως σωματίδια α, β και νετρόνια, ενώ οι αντίστοιχες ηλεκτρομαγνητικές ακτινοβολίες (φωτόνια) είναι, κατά κύριο λόγο, οι ακτινοβολίες Χ και γ.

2.2 Βιολογικά αποτελέσματα Ιοντιζουσών Ακτινοβολιών

Η απορρόφηση ιοντίζουσας ακτινοβολίας (Ι.Α.) από έναν έμβιο οργανισμό έχει ως επί το πλείστον αρνητικά αποτελέσματα με το χείριστο όλων, τον θάνατο. Παρόλα αυτά με τη βοήθεια της ραγδαίας εξέλιξης των επιστημών και της τεχνολογίας έχουμε καταφέρει αυτά τα δυσμενή αποτελέσματα να τα χρησιμοποιήσουμε προς όφελος μας, ενσωματώνοντάς τα σε διαγνωστικές και θεραπευτικές μεθόδους για την αύξηση του μέσου όρου και της ποιότητας ζωής. Παρακάτω θα αναλυθεί η επίδραση μίας ιοντίζουσας ακτινοβολίας κατά την πρόσπτωσή της αρχικά σε μοριακό επίπεδο, ύστερα σε κυτταρικό και τέλος σε επίπεδο ιστών, οργάνων και εν γένει του οργανισμού. Επιλέξαμε να μελετήσουμε σταδιακά την επίδραση των ιοντιζουσών ακτινοβολιών αυξάνοντας κλιμακωτά το μέγεθος του έμβιου στόχου κάθε φορά, προκειμένου να κατανοήσουμε καλύτερα τα βιολογικά τους αποτελέσματα.

2.2.1 Μοριακό επίπεδο

Ξεκινώντας τη μελέτη μας αρχικά σε μοριακό επίπεδο μπορούμε να διακρίνουμε τα αποτελέσματα της απορρόφησης ιοντίζουσας ακτινοβολίας σε άμεσα και έμμεσα.

a) Τα άμεσα αποτελέσματα αφορούν αλληλεπιδράσεις της Ι.Α. με άτομα σημαντικών οργανικών πολυμερών μορίων του κυττάρου, όπως ενζυμικές και δομικές πρωτεΐνες, το RNA, και κυρίως το DNA. Ως αποτέλεσμα έχουμε θραύση χημικών δεσμών και παραγωγή μη λειτουργικών μορίων με φυσικές και χημικές ιδιότητες διαφορετικές από των αντίστοιχων αρχικών. Υπολογίζεται ότι η άμεση δράση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας αποτελεί περίπου το 30% της συνολικής βιολογικής βλάβης που μπορεί να προκληθεί (Στυλιάρης, Παπαγιάννης, ΕΚΠΑ, 2019).

b) Τα έμμεσα αποτελέσματα με τη σειρά τους προκαλούν σημαντικές βιολογικές βλάβες λόγω της χημικής αντίδρασης σημαντικών οργανικών μορίων του κυττάρου με δραστικές ελεύθερες ρίζες*[7] που σχηματίζονται κατά τη ραδιόλυση*[8] του νερού, την αλληλεπίδραση δηλαδή της ακτινοβολίας με άτομα των μορίων του νερού που αφθονεί στα βιολογικά συστήματα. Με τον όρο ραδιόλυση εννοούμε την παρακάτω αλληλουχία χημικών αντιδράσεων:

$$H_2O + \alpha\kappa\tau\iota\nu o\beta o\lambda\acute{\iota}\alpha \rightarrow H_2O^+ + e^- \quad [1]$$

$$H_2O^+ + H_2O \rightarrow OH^- + H_3O^+ \quad [2]$$

$$e^- + H_2O \rightarrow H^+ + OH^- \quad [3]$$

$$e^- + H_2O \rightarrow e_{\acute{\varepsilon}\nu\upsilon\delta\rho.} \quad [4]$$

$$HO^- + HO^- \rightarrow H_2O_2 \quad [5]$$

(Tsipolitis, 2011, Στυλιάρης, Παπαγιάννης, ΕΚΠΑ, 2019)

Πιο αναλυτικά, με την πρόσπτωση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας σε μόριο νερού προκύπτει ένα διεγερμένο μόριο νερού (θετικό ιόν) και μία ελεύθερη ρίζα (εξίσωση [1]) . Στη συνέχεια τα προϊόντα της παραπάνω αντίδρασης σε συνδυασμό με άλλα μόρια νερού θα δώσουν υδροξυλικές ρίζες , οι οποίες είναι ρίζες μεγάλης δραστικότητας (λόγω των ασύζευκτων ηλεκτρονίων τους) που μπορούν να διαχέονται στο ‘‘περιβάλλον’’ και να προκαλούν βλάβες στο DNA. (εξισώσεις [2] και [3]). Τέλος, υπάρχουν και οι λιγότερο πιθανές, αλλά χειρότερες σε ότι αφορά τα αποτελέσματα περιπτώσεις, όπου πρώτον η ελεύθερη ρίζα με νερό θα δώσει ένα ηλεκτρόνιο που δεν αντιδρά πάλι με το νερό αλλά σταθεροποιείται σε μία ένυδρη μορφή και αντιδρά μόνο με τα βιομόρια. Και δεύτερον η περίπτωση όπου δύο υδροξυλικές ρίζες θα δώσουν μόριο υπεροξειδίου του υδρογόνου (το κοινώς γνωστό οξυζενέ) το οποίο είναι ιδιαίτερα τοξικό για τον οργανισμό (εξισώσεις [4] και [5]).

2.2.2 Κυτταρικό επίπεδο

2.2.2.a) Πολλά πειράματα έχουν δείξει ότι ο κύριος βιολογικός στόχος, σε ότι αφορά την επίδραση των ιοντιζουσών ακτινοβολιών στους έμβιους οργανισμούς, είναι ο κυτταρικός πυρήνας, και κατ' επέκταση το DNA. Σύμφωνα λοιπόν με όσα ειπώθηκαν παραπάνω για τα έμμεσα και άμεσα αποτελέσματα των Ι.Α. σε μοριακό επίπεδο, όταν απορροφηθεί μία τέτοιου είδους ακτινοβολία από το DNA μπορούν να προκληθούν διαφόρων ειδών βλάβες όπως: αποσύνθεση, ενδο-κλωνική, δια-κλωνική ή και δια-μοριακή σύνδεση (με άλλα μόρια DNA ή πρωτεϊνών), βλάβη ή απώλεια βάσεων, και θραύση του ενός ή και των δύο κλώνων (Single Strand Break-SSB και Double Strand Break-DSB). Αξίζει να αναφερθεί ότι ανά 1 Gy απορροφούμενης δόσης από ιοντίζουσα ακτινοβολία φωτονίων προκαλούνται κατά μέσο όρο περίπου 10^5 ιονισμοί ανά κύτταρο που οδηγούν, μέσω της άμεσης ή έμμεσης δράσης, κατά μέσο όρο σε περίπου 1000 SSB, 40 DSB και 1000 βλάβες βάσεων στο DNA. Παρόλα αυτά πάνω από 100.000 βλάβες του DNA σημειώνονται καθημερινά στα κύτταρα των θηλαστικών αυτογενώς ή λόγω της επίδρασης εξωγενών και ενδογενών παραγόντων. Ευτυχώς το κύτταρο διαθέτει αποτελεσματικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης της βλάβης, πράγμα το οποίο μας έχει οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι το μικρό ποσοστό των μη ή ανεπιτυχώς επιδιορθωμένων βλαβών που σχετίζονται με τα βιολογικά αποτελέσματα των ιοντιζουσών ακτινοβολιών οφείλονται κυρίως στις βλάβες DNA τύπου DSB (Στυλιάρης, Παπαγιάννης, ΕΚΠΑ, 2019, Ιατρική Φυσική, ΕΚΠΑ,2020).

2.2.2.b) Με βάση λοιπόν τα είδη βλαβών του DNA μπορούμε να χωρίσουμε τα βιολογικά αποτελέσματα που προκαλούν οι Ι.Α. σε κυτταρικό επίπεδο σε γονιδιακές μεταλλάξεις, χρωμοσωματικές ανωμαλίες και τέλος τον κυτταρικό θάνατο.

Οι βλάβες βάσεων και οι SSB επιδιορθώνονται σε πολύ μεγάλο ποσοστό τους, σε περίπτωση όμως ανεπιτυχούς επιδιόρθωσης μπορεί να οδηγήσουν σε αλλαγή στην αλληλουχία των βάσεων και του γενετικού υλικού και συνεπώς σε μετάλλαξη. Οι DSB και οι σύνθετες βλάβες του DNA, που επιδιορθώνονται δυσκολότερα, προκαλούν και αυτές με τη σειρά τους μεταλλάξεις λόγω ελλείμματος βάσεων ή συμμετρικής αντιμετάθεσης θραυσμάτων του χρωμοσώματος. Τα αποτελέσματα των μεταλλάξεων ποικίλουν αλλά κυρίως οδηγούν σε έκφραση μίας τροποποιημένης πρωτεΐνης και στην αύξηση ή μείωση των επιπέδων μίας φυσιολογικής πρωτεΐνης. Αυτά τα αποτελέσματα είτε θα επιφέρουν τον κυτταρικό θάνατο ή μεταβιβάζονται στους απογόνους. Τέλος, επειδή ο όρος μετάλλαξη ακούγεται ''βαρύς'' αξίζει να αναφερθεί ότι ο ανθρώπινος μεταβολισμός οδηγεί σε πάνω από 100.000 μεταλλάξεις σε κάθε ανθρώπινο κύτταρο καθημερινά, και η απορρόφηση δόσης ιοντίζουσας ακτινοβολίας προσθέτει σε αυτές μόλις 2.000 μεταλλάξεις ανά Gy. Η συχνότητα εμφάνισης των μεταλλάξεων αυξάνει με τη δόση

ακτινοβολίας αν και σε μεγάλες δόσεις κυριαρχεί ο κυτταρικός θάνατος οπότε ο αριθμός των μεταλλαγμένων κυττάρων μειώνεται. (Στυλιάρης, Παπαγιάννης, ΕΚΠΑ, 2019, Ιατρική Φυσική, ΕΚΠΑ, 2020).

Εκτός από τις μεταλλάξεις που μόλις αναφέραμε οι μη επιτυχώς επιδιορθωμένες DSB μπορούν να προκαλέσουν και χρωμοσωματικές ανωμαλίες, οι οποίες θα παρατηρηθούν στην επόμενη διαίρεση του κυττάρου κατά τη διάρκεια της μετάφρασης. Έτσι λοιπόν μετά από αυτές τις χρωμοσωματικές βλάβες υπάρχουν 4 περιπτώσεις πιθανών αποτελεσμάτων. Πρώτον, τα τμήματα που αποκόπηκαν να ξαναενωθούν αποκαθιστώντας τη βλάβη. Δεύτερον, να μην γίνει καμία επανένωση και απλά να εξαλειφθεί ένα τμήμα του χρωμοσώματος , άρα και του γενετικού υλικού. Τρίτον, τα θραύσματα να επανενωθούν με διάφορους συνδυασμούς, δημιουργώντας έτσι ‘’χρωμοσώματα’’ με παράδοξη μορφολογία. Και τέταρτον, με βάση την τρίτη περίπτωση η αυξημένη εμφάνιση άτυπων χρωμοσωμάτων σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονταν μπορεί να οδηγήσει στον κυτταρικό θάνατο. (Στυλιάρης, Παπαγιάννης, ΕΚΠΑ, 2019, Ιατρική Φυσική, ΕΚΠΑ, 2020).

Τέλος, αναφέρθηκε ότι και στις γονιδιακές μεταλλάξεις αλλά και στις χρωμοσωματικές ανωμαλίες μπορεί να καταλήξουμε σε κυτταρικό θάνατο. Ο κυτταρικός θάνατος λόγω απορρόφησης ιοντίζουσας ακτινοβολίας μπορεί να χωριστεί κι αυτός με τη σειρά του σε τρία είδη: τον αναπαραγωγικό, τον προγραμματισμένο και τον θάνατο λόγω γήρανσης. Ο αναπαραγωγικός θάνατος αφορά τα αναπαραγόμενα κύτταρα και ορίζεται ως την αδυναμία πολλαπλασιασμού του κυττάρου. Απαιτούνται χαμηλές ή μέτριες δόσεις ακτινοβόλησης για να προκληθεί και παρατηρείται ο τελικός θάνατος του κυττάρου σαν αποτέλεσμα ανεπιτυχούς διαδικασίας διαίρεσης. Ο ελεγχόμενος αναπαραγωγικός θάνατος καρκινικών κυττάρων μέσω ιοντιζουσών ακτινοβολιών αποτελεί πια μια συνήθη μέθοδο θεραπείας του καρκίνου. Ο προγραμματισμένος θάνατος (ή αλλιώς απόπτωση) δεν περιορίζεται σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται. Είναι η ακαριαία νέκρωση του κυττάρου, πράγμα το οποίο προϋποθέτει μεγάλες δόσεις ακτινοβόλησης. Και τέλος με την απορρόφηση Ι.Α. ακτινοβολίας μπορεί να επιταχυνθεί το φαινόμενο της κυτταρικής γήρανσης, δηλαδή του μηχανισμού πρόληψης πολλαπλασιασμού κυττάρων που έχουν υποστεί κακοήθη εξαλλαγή. Μιλάμε για έναν έμμεσο και δοσοεξαρτώμενο τρόπο κυτταρικού θανάτου. (Στυλιάρης, Παπαγιάννης, ΕΚΠΑ, 2019, Ιατρική Φυσική, ΕΚΠΑ, 2020).

2.2.2.c) Πριν περάσουμε στα αποτελέσματα των ιοντιζουσών ακτινοβολιών σε επίπεδο ιστών-οργάνων-οργανισμών, μπορούμε να αναφέρουμε πως ένας επιπλέον, ευρέως γνωστός, διαχωρισμός των αποτελεσμάτων σε κυτταρικό

επίπεδο είναι και με βάση την δυνατότητα επιδιόρθωσης των κυτταρικών βλαβών που δημιουργούνται. Σε αυτήν την κατηγοριοποίηση έχουμε τις θανατηφόρες βλάβες που εξ ορισμού οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο, τις υποθανατηφόρες βλάβες και τις δυνητικά θανατηφόρες βλάβες. Οι υποθανατηφόρες έχουν την δυνατότητα επιδιόρθωσης εντός μερικών ωρών, εκτός αν προστεθεί μία νέα όπου αθροιστικά πολλές υποθανατηφόρες βλάβες μπορούν να εξελιχθούν σε μία θανατηφόρα. Τέλος, οι δυνητικά θανατηφόρες είναι κυτταρικές βλάβες που μπορούν να επιδιορθωθούν μόνο αν μετά την ακτινοβόληση αλλάξουν οι ενδοκυτταρικές συνθήκες και επιτρέψουν την επιδιόρθωση, διαφορετικά εξελίσσονται και αυτές σε θανατηφόρες. (Σπυροπούλου Δ., ΙΤΠΠ, 2017).

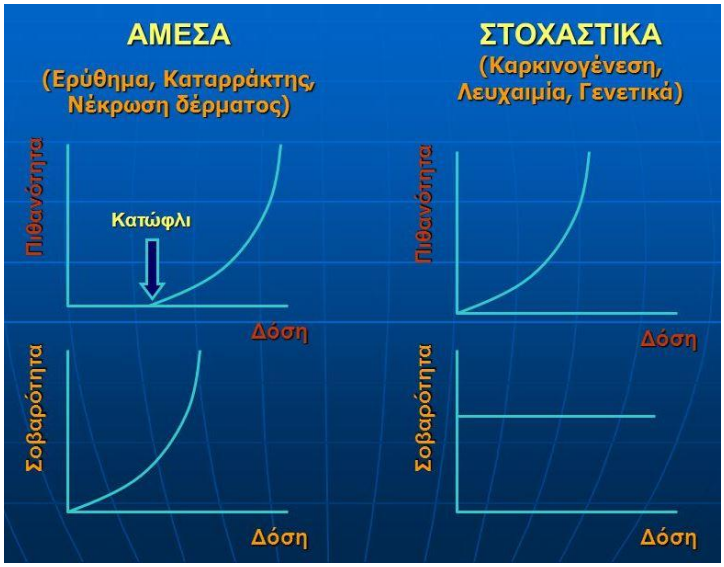
2.2.3 Επίπεδο Ιστών-Οργάνων-Οργανισμών

2.2.3.a) Έχοντας φτάσει πια στο πιο μακροσκοπικό επίπεδο παρατήρησης των αποτελεσμάτων από την απορρόφηση ιοντίζουσας ακτινοβολίας γνωρίζουμε ότι σε χαμηλές δόσεις η έμμεση ή άμεση θανάτωση ενός μικρού αριθμού κυττάρων ενός ιστού δεν έχει δυσμενή επίπτωση στη λειτουργία του οργάνου και κατ' επέκταση του οργανισμού. Αυτό γιατί ο οργανισμός φροντίζει για την άμεση αντικατάσταση των νεκρών κυττάρων. Στη περίπτωση όμως που αυτές οι χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας προκαλέσουν μεταλλάξεις, οι οποίες με τη σειρά τους μεταλαμπαδευτούν στις επόμενες γενιές κυττάρων υπάρχει πιθανότητα μακροπρόθεσμα να υπάρξουν σημαντικές επιπτώσεις στην υγεία του εκτιθέμενου ατόμου, διότι μπορεί να εμφανιστεί μία πιθανή κακοήθεια στο μέλλον (Ιατρική Φυσική, ΕΚΠΑ, 2020).

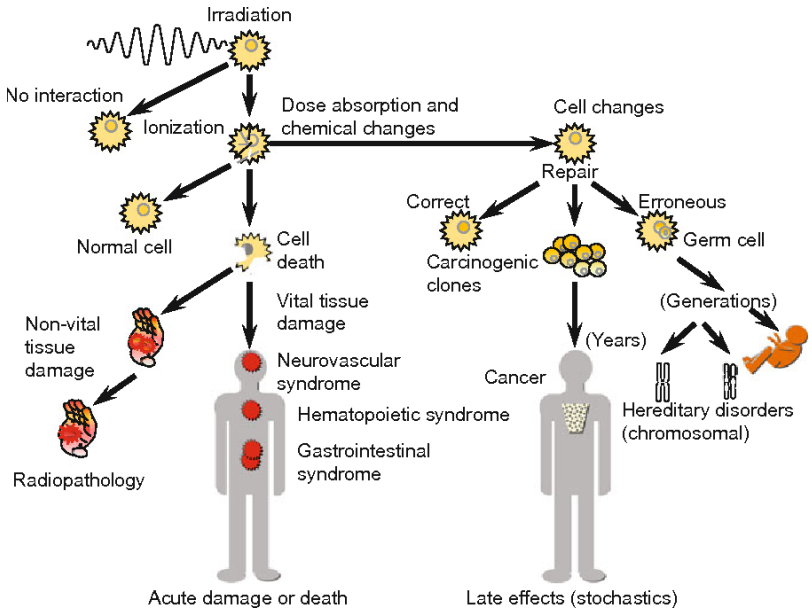
2.2.3.b) Σε ότι αφορά μεγάλες δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας έχουμε βαριά δυσλειτουργία και άμεσο θάνατο πολύ μεγάλου πληθυσμού κυττάρων ενός ιστού ή οργάνου. Οι βλάβες που δημιουργούνται από αυτές τις δόσεις είναι αδύνατο να επιδιορθωθούν από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς των κυττάρων με αποτέλεσμα την άμεση ή βραχυπρόθεσμη παρουσίαση σοβαρών προβλημάτων υγείας του οργανισμού. Με βάση λοιπόν όλα τα παραπάνω μπορούμε να κατηγοριοποιήσουμε τα αποτελέσματα, λόγω απορρόφησης ιοντίζουσας ακτινοβολίας, σε επίπεδο ιστών-οργάνων-οργανισμών σε δύο μεγάλες ομάδες :

- Καθορισμένα αποτελέσματα (deterministic effects), τα οποία αποκαλούνται και επιβλαβείς αντιδράσεις των ιστών. Αυτά είναι κλινικά αποτελέσματα, ανιχνεύσιμα αμέσως μετά από έκθεση σε μεγάλες καταστροφικές δόσεις ακτινοβολίας, ενίοτε πολύ σοβαρά, που οφείλονται στη θανάτωση ή τη βαρεία δυσλειτουργία μεγάλων πληθυσμών κυττάρων ενός ιστού.
- Στοχαστικά αποτελέσματα (stochastic effects), στα οποία ανήκουν η λευχαιμία, ο καρκίνος και οι κληρονομήσιμες βλάβες. Οφείλουν την ονομασία τους στο γεγονός ότι η πιθανότητα εμφάνισής τους,

ακολουθεί στατιστικούς νόμους, οι οποίοι φαίνονται γραφικά στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 1). Προκύπτουν ως αποτέλεσμα του πολλαπλασιασμού ενός μεταλλαγμένου από ακτινοβολία, σωματικού κυττάρου.
(Ιατρική Φυσική, ΕΚΠΑ, 2020).



Εικόνα 1: Εξάρτηση της πιθανότητας εμφάνισης και της σοβαρότητας ενός αποτελέσματος, λόγω απορρόφησης Ι.Α., συναρτήσει του μεγέθους της δόσης



Εικόνα 2: Βιολογικά αποτελέσματα Ι.Α. από το μοριακό επίπεδο στο επίπεδο ιστών-οργάνων-οργανισμών (Avery G., 1961)

2.2.4. Παράγοντες που επηρεάζουν τα βιολογικά αποτελέσματα

Έχοντας αναφέρει περιληπτικά όλων των ειδών τα βιολογικά αποτελέσματα που προκαλούνται από την απορρόφηση ιοντίζουσας ακτινοβολίας σε έναν οργανισμό, είμαστε σε θέση να δούμε ποιοι παράγοντες επηρεάζουν το μέγεθος της βλάβης που μπορεί να προκληθεί. Αυτοί οι παράγοντες μπορεί να είναι φυσικοί, χημικοί ή και βιολογικοί .

a) Φυσικοί παράγοντες: Αφορούν το είδος της ακτινοβολίας, την κατάτμηση της δόσης δεδομένης ακτινοβολίας σε ακτινοθεραπευτικά σχήματα και το ρυθμό δόσης (ευρύτερη ανάλυση στο 3^{ο} κεφάλαιο που αφορά τα στοιχεία δοσιμετρίας).

b) Χημικοί παράγοντες: Παρατηρείται αύξηση των βιολογικών βλαβών κατά την απορρόφηση ιοντίζουσας ακτινοβολίας όταν υπάρχει παράλληλη αύξηση της συγκέντρωσης του μοριακού οξυγόνου στον οργανισμό, διότι όπως είδαμε παραπάνω στην έμμεση δράση της Ι.Α. σε μοριακό επίπεδο, μπορούν σε αυτή τη περίπτωση να παραχθούν περισσότερες δραστικές ελεύθερες ρίζες. Επιπλέον τα ανάλογα θυμιδίνης^{*9} επειδή συνδέονται με τον κλώνο του DNA περιορίζουν τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου σε περίπτωση βλάβης, με αποτέλεσμα να το κάνουν πιο ευάλωτο στα αποτελέσματα που μπορεί να προκαλέσει η ιοντίζουσα ακτινοβολία. Αντίθετα, οι θειόλες^{*10} μέσω της δέσμευσης και αδρανοποίησης δραστικών ελεύθερων ριζών περιορίζουν την ενισχυτική επίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας στην δημιουργία βλαβών.

c) Βιολογικοί παράγοντες: Οι παράγοντες αυτοί περιλαμβάνουν την φάση του κυτταρικού κύκλου^{*11}, κατά την οποία ακτινοβολείται η βιολογική δομή και το είδος των κυττάρων. Κατ' επέκταση αυτού μπορούμε να πούμε ότι η σχετική ευαισθησία στην ακτινοβολία (ακτινευαισθησία) εξαρτάται από το σημείο της ακτινοβόλησης πάνω στο σώμα, το φύλλο και την ηλικία του ασθενή.
(Στυλιάρης, Παπαγιάννης, ΕΚΠΑ,2019, Ιατρική Φυσική, ΕΚΠΑ,2020).

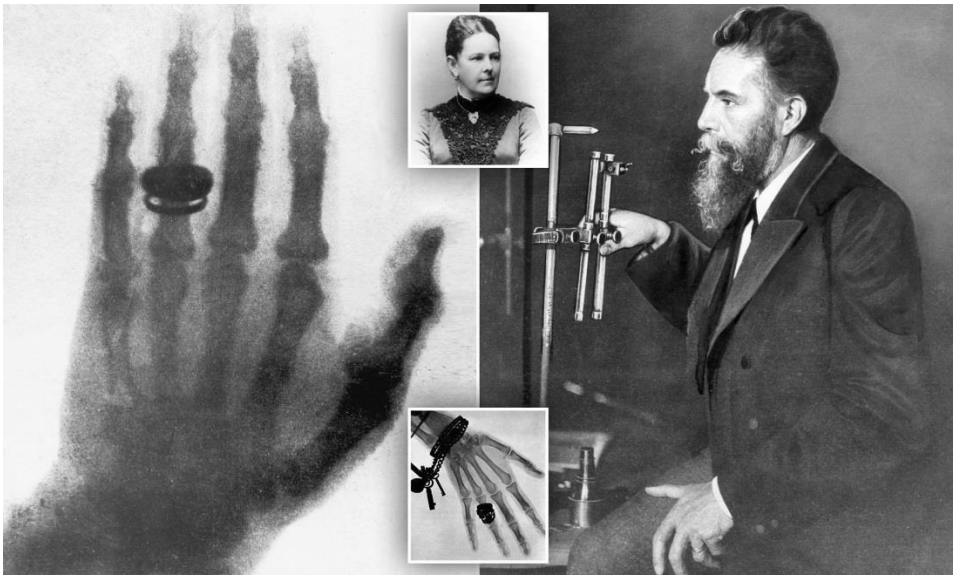
2.3 Ακτίνες Χ

2.3.1 Ορισμός και ιστορικά στοιχεία

Λόγω του ότι οι αγγειογράφοι, με βάση τους οποίους πήραμε τα δείγματα του πειράματος, παράγουν ακτίνες Χ θα αναλύσουμε περισσότερο αυτό το είδος ιοντίζουσας Η/Μ ακτινοβολίας.

Οι ακτίνες Χ αποτελούν ένα σημαντικό κομμάτι του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος ανάμεσα στις υπεριώδεις ακτινοβολίες και τις ακτίνες γ. Χαρακτηρίζονται από μήκη κύματος τα οποία ξεκινούν από 10nm και μπορούν να φτάσουν μέχρι και τα 10pm , αυτά τα μήκη κύματος ενεργειακά αντιστοιχούν στην περιοχή από τα 120eV έως και τα 120keV (Article 57 of Nature, 1897). Οι ακτίνες Χ συχνά αποκαλούνται και ακτίνες Röentgen προς τιμήν του Wilhelm Conrad Röentgen, καθηγητή στο Πανεπιστήμιο Würzburg της Γερμανίας, ο οποίος τις ανακάλυψε το 1895. Δουλεύοντας με έναν καθοδικό σωλήνα στο εργαστήριό του, ο Röentgen παρατήρησε μια λάμψη φθορισμού κρυστάλλων σε ένα τραπέζι κοντά στο σωλήνα του. Ο σωλήνας με τον οποίο εργαζόταν ο Röentgen αποτελείτο από ένα γυάλινο ‘‘θάλαμο’’ (λαμπτήρα) με θετικά και αρνητικά ηλεκτρόδια ενθυλακωμένα σε αυτόν. Ο αέρας στον σωλήνα εκκενώθηκε, και όταν εφαρμόστηκε υψηλή τάση, ο σωλήνας παρήγαγε λάμψη φθορισμού. Ο Röentgen θωράκισε το σωλήνα με βαρύ μαύρο χαρτί και ανακάλυψε ένα πράσινο φως φθορισμού που δημιουργήθηκε από ένα υλικό που βρισκόταν λίγα μέτρα μακριά από το σωλήνα. Στη συνέχεια, μέσω πειραμάτων αποδείχθηκε ότι αυτό το νέο είδος της άγνωστης ακόμη ακτινοβολίας (γι αυτό και τις ονόμασε ακτίνες Χ) μπορούσε να διεισδύσει μέσα σε μαλακούς ιστούς, αλλά όχι μέσα στα οστά και να παράγει εικόνες σκιών σε φωτογραφικές πλάκες. Έτσι μόλις έναν μήνα μετά την ανακοίνωση της ανακάλυψης του Röentgen έγιναν αρκετές ιατρικές ακτινογραφίες στην Ευρώπη και τις Ηνωμένες Πολιτείες, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν από χειρουργούς για να τους καθοδηγήσουν στην εργασία τους. Τον Ιούνιο του 1896, μόνο 6 μήνες μετά την ανακοίνωση του Röentgen, οι ακτινογραφίες χρησιμοποιούνταν από ιατρούς για να εντοπίσουν σφαίρες σε τραυματίες στρατιώτες. Όλα τα παραπάνω έδωσαν στον Röentgen το πρώτο βραβείο Νόμπελ Φυσικής το 1901.

Μετά το 1913 οι ακτινογραφίες βγήκαν εκτός του κλάδου της ιατρικής και ξεκίνησε η ευρύτερη χρήση τους στη βιομηχανία. Κλείνοντας και φτάνοντας πια στο σήμερα οι ακτίνες Χ έχουν ένα πολύ ευρύ φάσμα εφαρμογών στην καθημερινότητά μας. Πιο συγκεκριμένα στην ιατρική, με την παράλληλη ραγδαία τεχνολογική και επιστημονική εξέλιξη, έχουμε κατορθώσει να έχουμε πολλές καινοτόμες εφαρμογές τους, τόσο στο κομμάτι της διάγνωσης με την ιατρική απεικόνιση μέσω των ακτίνων Χ όσο και στη θεραπεία με τη χρήση ελεγχόμενα κατευθυνόμενων ακτίνων Χ για την καταπολέμηση των καρκινικών όγκων (NDT Resource Center, History).



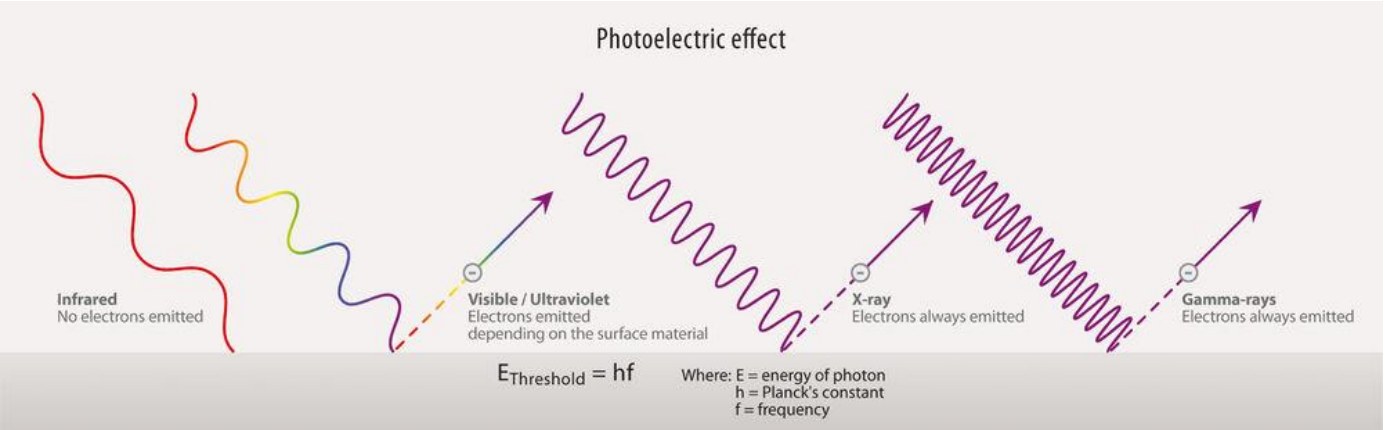
Εικόνα 3: Ο Γερμανός φυσικός Wilhelm Conrad Röentgen και η πρώτη ακτινογραφία που έβγαλε. Αυτή του χεριού της γυναίκας του Anna Bertha Röentgen

2.3.2 Παραγωγή ακτίνων Χ και φαινόμενα κατά την αλληλεπίδρασή τους με την ύλη

Έχοντας σαν κεντρική ιδέα το πείραμα του Röentgen, ακόμα και σήμερα η παραγωγή των ακτίνων Χ βασίζεται στην επιτάχυνση ηλεκτρονίων με χρήση κατάλληλης συσκευής, η οποία αποτελείται από έναν γυάλινο σωλήνα, δύο ηλεκτρόδια, μία άνοδο και μία κάθοδο. Πιο αναλυτικά, η κάθοδος θερμαίνεται με αποτέλεσμα την εκπομπή e^-, τα οποία επιταχύνονται λόγω ύπαρξης υψηλής τάσης προερχόμενη από τα ηλεκτρόδια και τέλος τα e^- αυτά προσπίπτουν με μεγάλη ταχύτητα στην άνοδο, η οποία αποτελείται συνήθως από μεταλλικό υλικό μεγάλου ατομικού αριθμού (π.χ. βαλφραμίου, W). Αξίζει να σημειωθεί ότι ο γυάλινος σωλήνας περιέχει αέριο πολλή χαμηλής πίεσης (της τάξης των $10^{-7} atm$), ώστε να περιορίζονται οι συγκρούσεις των e^- με τα μόρια του αερίου. Κλείνοντας, η προσπίπτουσα δέσμη e^- στην άνοδο χάνει σταδιακά την ενέργεια της επειδή μεταφέρεται στα άτομα του υλικού του στόχου και κατορθώνει να διεγείρει τα e^- ακόμα και των εσωτερικών στιβάδων των ατόμων. Αυτό έχει με τη σειρά του ως συνέπεια, να συμπληρώνονται αυτές οι στιβάδες από ηλεκτρόνια υψηλότερων ενεργειακά στιβάδων και να παράγονται έτσι τα φωτόνια των ακτίνων Χ. (Τσιριπίδου Χ., et. al., 2017)

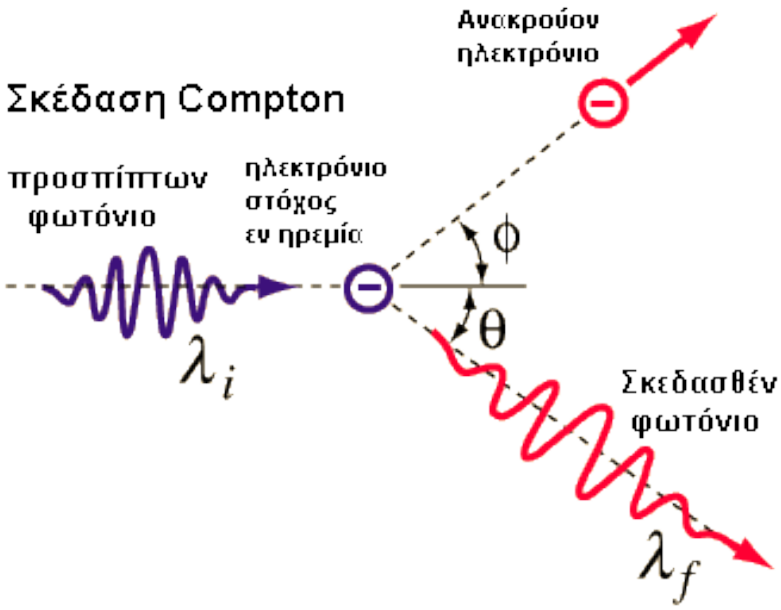
Κατά την αλληλεπίδραση τώρα των ακτίνων Χ με την ύλη παρατηρούνται δύο βασικά φαινόμενα της φυσικής, το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο και το φαινόμενο Compton.

a) Το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο είναι το φαινόμενο της αλληλεπίδρασης φωτονίου με ηλεκτρόνιο ενός ατόμου, κατά το οποίο το φωτόνιο απορροφάται από το ηλεκτρόνιο. Αυτό σημαίνει ότι όλη η ενέργεια του φωτονίου μεταφέρεται στο ηλεκτρόνιο. Από την αλληλεπίδραση παράγεται ένα φωτοηλεκτρόνιο με κινητική ενέργεια ίση με τη διαφορά της αρχικής ενέργειας του φωτονίου πλην την ενέργεια σύνδεσης του ηλεκτρονίου. Ένα μέρος της ενέργειας αυτής καταναλώνεται για την εκδίωξη του ηλεκτρονίου από τη στοιβάδα περιστροφής του ενώ το υπόλοιπο αυξάνει την κινητική ενέργεια του φωτονίου. Η κενή θέση που δημιουργείται στην ηλεκτρονική στοιβάδα καλύπτεται με μεταπήδηση ηλεκτρονίου άλλης στοιβάδας που βρίσκεται πιο έξω, ενώ παράλληλα εκπέμπεται χαρακτηριστική ακτινοβολία-Χ (Article 57 of Nature, 1897, Physics4u, 2002).



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση φωτοηλεκτρικού φαινομένου

b) Στη συνέχεια, σε ότι αφορά το φαινόμενο Compton, ή αλλιώς φαινόμενο μη ελαστικής σκέδασης, γνωρίζουμε ότι προκύπτει όταν έχουμε σκέδαση σε συνδυασμό με απώλειες ενέργειας, δηλαδή όταν χάνεται ενέργεια κατά την απόκλιση ενός φωτονίου από την αρχική του πορεία. Πιο αναλυτικά, στο φαινόμενο Compton έχουμε αλληλεπίδραση ενός φωτονίου με ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο (ή ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στιβάδας που είναι χαλαρά συνδεδεμένο με το άτομο) με αποτέλεσμα μέρος της ενέργειας του φωτονίου να δίνεται στο ηλεκτρόνιο με στόχο την εκδίωξη του από το άτομο με μία κινητική ενέργεια. Το αρχικό φωτόνιο με μειωμένη ενέργεια πια συνεχίζει την πορεία του υπό άλλη διεύθυνση. Συνοψίζοντας, σε αυτό το φαινόμενο παρατηρείται η εξασθένιση της δέσμης και απορρόφηση κινητικής ενέργειας των φωτονίων από το υλικό (Malcom Cooper, 2004).



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση φαινομένου Compton

2.3.3 Απεικονιστικές μέθοδοι με χρήση ακτίνων Χ

Ένας από τους τομείς της ιατρικής που παρατηρείται κατά κόρον η χρήση των ακτίνων Χ είναι αυτός της ιατρικής απεικόνισης και πιο συγκεκριμένα στην (υπολογιστική) αξονική τομογραφία. Στόχος της είναι η απεικόνιση των εσωτερικών δομών του σώματος μέσω της αλληλεπίδρασης των ακτίνων Χ με τους βιολογικούς ιστούς, βασιζόμενη σε ένα εξαιρετικά μεγάλο πλήθος (περίπου 500.000) μετρήσεων της διάδοσης αυτού του τύπου Ι.Α. δια του σώματος του εξεταζόμενου σε απολύτως καθορισμένη γεωμετρία. Οι εικόνες που παίρνουμε στο τέλος αποτελούν τομογραφικούς χάρτες του γραμμικού συντελεστή εξασθένησης των ακτίνων Χ των ιστών του εξεταζόμενου (Κουτσούρης Δ., et al., 2018).

Πιο αναλυτικά, μελετώντας το φυσικό κομμάτι της αξονικής τομογραφίας, προκειμένου να πάρουμε την τομογραφική εικόνα πρέπει να υπολογίσουμε τον συντελεστή εξασθένισης της δέσμης των ακτίνων Χ μετά την διέλευσή της μέσα από το σώμα του εξεταζόμενου. Γενικά οι ακτίνες Χ απορροφώνται με βάση την σχέση: $I_d = I_o * e^{-\mu L}$, όπου I_o η αρχική ένταση της ακτινοβολίας, I_d η εξασθενημένη πια έντασή της, L το μήκος διέλευσης και μ ο γραμμικός συντελεστής εξασθένισης, ο οποίος εξαρτάται από την ενέργεια των ακτίνων Χ και την πυκνότητα του στόχου τους. Οπότε με βάση την παραπάνω σχέση και ορίζοντας το μ σαν μία συνάρτηση δύο μεταβλητών για το ανθρώπινο σώμα θα ισχύει:

$$I_d = I_o * e^{-\int_L \mu_{(x,y)} dL} \Leftrightarrow \int_L \mu_{(x,y)} dL = \ln(\frac{I_o}{I_d}).$$

Ως αποτέλεσμα παίρνουμε μία τομογραφική εικόνα με διαβαθμίσεις του γκρι, που αντιστοιχούν σε διαβαθμίσεις του συντελεστή εξασθένισης. Όσο υψηλότερη είναι η τιμή του μ τόσο οι αποχρώσεις τείνουν προς το λευκό, ενώ αντίστροφα όσο χαμηλότερο το μ τόσο προς το μαύρο θα προκύψει να είναι η εικόνα. Σαν μονάδα μέτρησης του συντελεστή εξασθένισης μπορεί να θεωρηθεί ο αριθμός Hounsfield (HU), ο οποίος εξαρτάται από την πυκνότητα του ιστού που θα διαπεράσει η δέσμη των ακτίνων Χ. Το εύρος των τιμών του αριθμού Hounsfield κυμαίνεται από το -1000 HU, το οποίο αντιστοιχεί στην διέλευση της ακτινοβολίας μέσα από οστό και αποδίδεται στην εικόνα με λευκό χρώμα, έως το +1000 HU, το οποίο αντιστοιχεί στην διέλευση στον αέρα και αποδίδεται στην εικόνα με μαύρο χρώμα. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι στην παραπάνω περιγραφή της αξονικής τομογραφίας αναλύθηκε μόνο το φυσικό υπόβαθρο αυτής της απεικονιστικής μεθόδου. Υπάρχει κι ένα μεγάλο κομμάτι, το οποίο αποτελείται από μία πληθώρα αλγορίθμων (αναλυτικών ή επαναληπτικών) που ανακατασκευάζουν την τομογραφική εικόνα βελτιώνοντας την ποιότητά της και κάνοντάς την πιο εύκολη να μελετηθεί από τα άτομα που καλούνται να βγάλουν κάποια πορίσματα από αυτήν (Κουτσούρης Δ., et al., 2018).

Κλείνοντας το κομμάτι της υπολογιστικής τομογραφίας (ΥΤ) δεν μπορούμε να αφήσουμε εκτός και τα είδη των υπολογιστικών τομογράφων που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς. Με στόχο πάντα την παραγωγή μίας καλύτερης τομογραφικής εικόνας και ταυτοχρόνως με την κατά το δυνατόν μικρότερη επιβάρυνση του εξεταζόμενου από την ιοντίζουσα ακτινοβολία, οι υπολογιστικοί τομογράφοι διακρίνονται σε έξι κατηγορίες, ανάλογα με την γεωμετρία τους. Παρακάτω φαίνονται επιγραμματικά αυτές οι κατηγορίες ΥΤ και τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά τους (Κουτσούρης Δ., et al., 2018):

- <u>ΥΤ 1^{ης} Γενιάς (Παράλληλης δέσμης):</u> Σε αυτήν την περίπτωση μία εξαιρετικά ευθυγραμμισμένη δέσμη ακτίνων Χ και ένας ανιχνευτής κινούνται γραμμικά σε σχέση με τον ασθενή για την απόκτηση μίας προβολής. Στην συνέχεια περιστρέφονται ταυτοχρόνως γύρω από τον ασθενή σχηματίζοντας γωνία έως και 180° με βήμα 1°, δηλαδή για κάθε 1° παίρνουμε και μία προβολή. Αυτή η μέθοδος αν και αρκετά ακριβής χρειαζόταν μεγάλο χρονικό διάστημα (≈ 5min.) για την ολοκλήρωση λήψης μίας τομής, πράγμα το οποίο επιβάρυνε αρκετά τον ασθενή λόγω της πολύωρης έκθεσης του σε ιοντίζουσα ακτινοβολία.

- <u>ΥΤ 2^{ης} Γενιάς (Αποκλίνουσας δέσμης με πολλαπλούς ανιχνευτές):</u> Εδώ έχουμε τώρα αποκλίνουσα δέσμη ακτίνων Χ και μία γραμμική διάταξη ανιχνευτών που αρχικά κινούνται γραμμικά και στην συνέχεια περιστρέφονται με γωνιακό βήμα μεγαλύτερου εύρους από αυτό της 1^{ης} γενιάς, με αποτέλεσμα την μείωση του χρόνου ακτινοσκόπησης περίπου στα 30s.

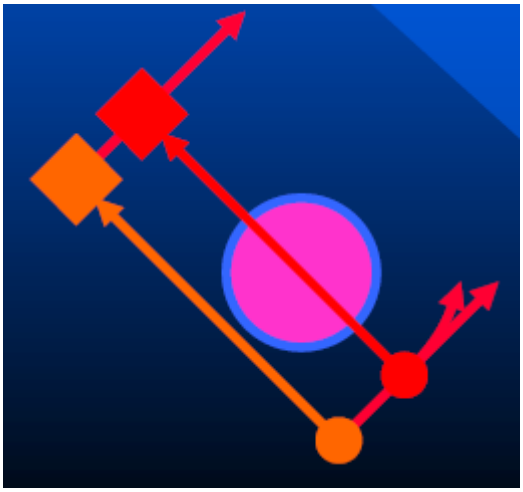
- ΥΤ 3^{ης} Γενιάς (Αποκλίνουσας δέσμης με περιστρεφόμενους ανιχνευτές): Συνεχίζοντας την χρήση αποκλίνουσας δέσμης ακτίνων Χ σε αυτήν την γενιά η καινοτομία βρίσκεται στο ανιχνευτικό σύστημα, το οποίο είναι μια μηχανικά συζευγμένη καμπυλοειδής διάταξη μερικών εκατοντάδων ανιχνευτών (≈800). Αυτή η ανιχνευτική διάταξη έχει δυνατότητα περιστροφής 360°, με αποτέλεσμα την δυνατότητα λήψης μίας τομής σε περίπου 1 δευτερόλεπτο. Επιπλέον, γίνεται χρήση και διαφραγμάτων βολφραμίου μεταξύ των ανιχνευτών με εστίαση στην πηγή έτσι ώστε να απορρίπτεται η ακτινοβολία που προέρχεται από σκέδαση.

- ΥΤ 4^{ης} Γενιάς (Αποκλίνουσας δέσμης με ακίνητους ανιχνευτές): Σε αυτήν την γενιά ΥΤ η αποκλίνουσα δέσμη ακτίνων Χ εκτελεί την περιστροφική κίνηση, ενώ η ανιχνευτική διάταξη, η οποία είναι ένας δακτύλιος 600-4800 ανεξάρτητων ανιχνευτών, παραμένει ακίνητη. Παρόλη την ριζική αλλαγή της διάταξης δεν επιτεύχθηκε η μείωση του χρόνου ακτινοσκόπησης. Παραμένουμε δηλαδή στο 1s προκειμένου να αποκτήσουμε την τομογραφική μας εικόνα.

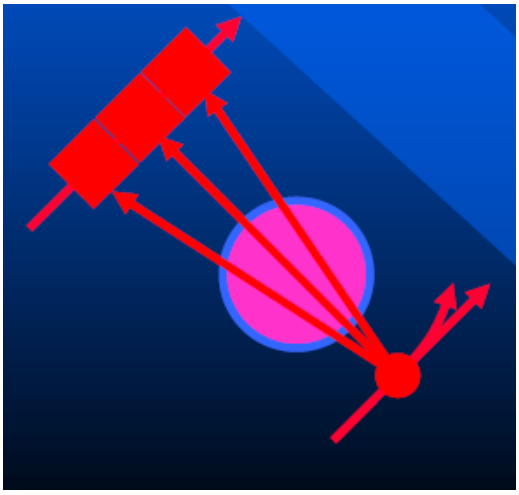
- ΥΤ 5^{ης} Γενιάς (Σάρωση δέσμης ηλεκτρονίων): Κρατώντας ακίνητη την διάταξη των ανιχνευτών όπως και στην προηγούμενη γενιά η πηγή των ακτίνων Χ αποτελεί πια αναπόσπαστο τμήμα της σχεδίασης του συστήματος τομογραφίας. Πιο συγκεκριμένα, μία υψηλής ενέργειας δέσμη ηλεκτρονίων οδηγείται ηλεκτρονικά σε μία ημικυκλική άνοδο βολφραμίου, η οποία στην ουσία αποτελεί μία περιστρεφόμενη πηγή ακτίνων Χ γύρω από τον ασθενή, χωρίς μηχανικά μέρη. Μετά την είσοδο αυτής της διάταξης στον χώρο της αξονικής τομογραφίας οι χρόνοι σάρωσης μειώθηκαν ακόμα περισσότερο. Ο απαιτούμενος χρόνος πλέον για τη λήψη μία ολοκληρωμένης τομής κυμαίνεται περίπου στα 50 με 100 ms.

- ΥΤ Ελικοειδούς Σάρωσης: Τέλος, η διάταξη που χρησιμοποιείται σήμερα στην υπολογιστική τομογραφία είναι αυτή της ελικοειδούς σάρωσης, όπου η πηγή των ακτίνων Χ και η ανιχνευτική διάταξη περιστρέφονται ταυτοχρόνως με την παράλληλη γραμμική μετακίνηση της εξεταστικής τράπεζας. Αυτό μας επιτρέπει την λήψη μίας έως και τριών τομών ανά δευτερόλεπτο.

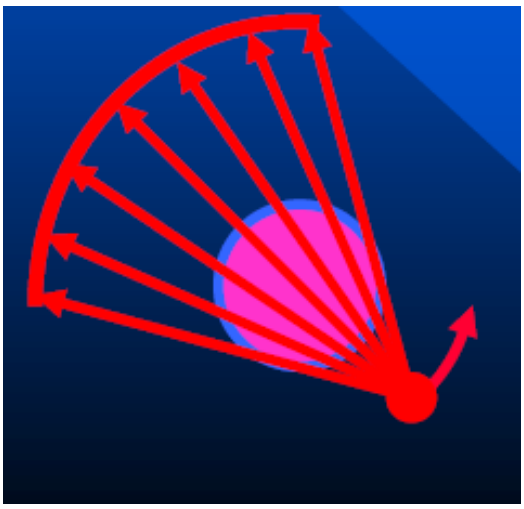
Στις παρακάτω εικόνες φαίνονται διαδοχικά οι σχηματικές αναπαραστάσεις όλων των γενεών υπολογιστικών τομογράφων. Πιο συγκεκριμένα με, ροζ απόχρωση φαίναιται ο στόχος που πρόκειται να ακινοβοληθεί και με κόκκινο χρώμα η πορεία των ακτινοβολιών από την εκάστοτε πηγή προς τον εκάστοτε ανιχνευτή.



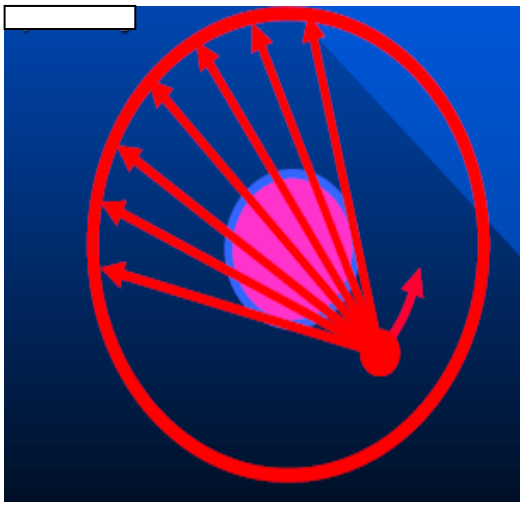
Εικόνα 6: ΥΤ 1ης Γενιάς (Παράλληλης δέσμης)



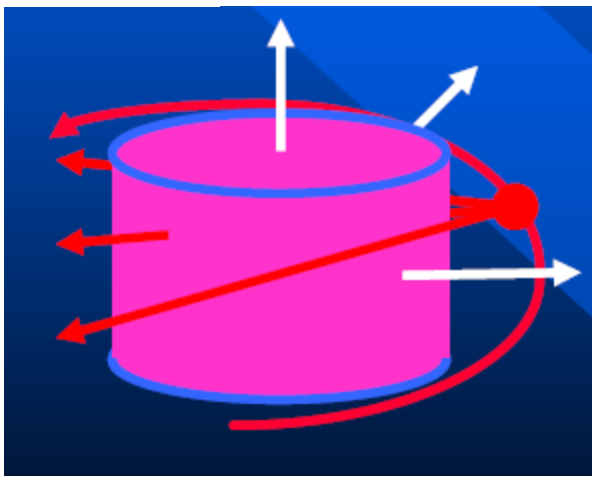
Εικόνα 7: ΥΤ 2ης Γενιάς (Αποκλίνουσας δέσμης με πολλαπλούς ανιχνευτές)



Εικόνα 8: ΥΤ 3ης Γενιάς (Αποκλίνουσας δέσμης με περιστρεφόμενους ανιχνευτές)



Εικόνα 9: ΥΤ 4ης Γενιάς (Αποκλίνουσας δέσμης με ακίνητους ανιχνευτές)



Εικόνα 10: ΥΤ Ελικοειδούς Σάρωσης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Στοιχεία δοσιμετρίας και ακτινοπροστασίας

3.1 Μεγέθη Δοσιμετρίας

Στόχος κάθε δοσιμετρικής μελέτης είναι πάντα η παραγωγή πειραματικών αποτελεσμάτων ακριβείας, τα οποία θα έχουν αντίκτυπο στο μέγιστο επιθυμητό κλινικό αποτέλεσμα οποιασδήποτε ιατρικής πράξης, που βασίζεται στην ακτινοβολία, με την κατά το δυνατόν χαμηλότερη ακτινική επιβάρυνση του προσωπικού και των ασθενών. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί λοιπόν μία μελέτη που αφορά την μέτρηση δόσης ιοντίζουσας ακτινοβολίας, πρέπει να υπάρχει το απαραίτητο θεωρητικό υπόβαθρο σε ότι αφορά όλα τα δοσιμετρικά μεγέθη. Συνεπώς με βάση την Ελληνική Επιτροπή Ατομικής Ενέργειας (ΕΕΑΕ) και την 85η δημοσίευση του ICRU (International Commission on Radiation Units and Measurements) σε συνδυασμό με το ICRP (International Commission on Radiological Protection), που δημοσιεύτηκε τον Οκτώβριο του 2011, τα βασικότερα μεγέθη δοσιμετρίας είναι τα παρακάτω (ICRU Report No.85, 2011):

- Kerma (=Kinetic Energy Released per unit Mass) είναι η ποσότητα ενέργειας που μεταφέρεται από μία δέσμη ακτινοβολίας στα φορτισμένα σωματίδια ανά μονάδα μάζας στο μέσο που μας ενδιαφέρει. $K = \frac{dE}{dm}$[1], με μονάδα μέτρησης στο S.I. το Gray ή Gy:1 $Gy = 1\,J * kg^{-1}$, επίσης ισχύει ότι για ροή Φ σωματιδίων με ενέργεια Ε και μ/ρ τη μάζα μεταφερόμενης ενέργειας (=σταθερά) η Kerma δίνεται κι από τη σχέση: $K = \Phi * E * \frac{\mu}{\rho} = \Psi * \frac{\mu}{\rho}$, $\text{όπου } \Psi = \Phi * E \text{ άρα } K = \int \Psi_{(E)} \frac{\mu}{\rho} dE$,[2]
- Ρυθμός παραγόμενης δόσης ή Kerma-rate: $K' = \dot{\frac{dK}{dt}}$ [3], με μονάδα μέτρησης στοS.I.:1 $Gy * s^{-1} = 1\,J * kg^{-1} * s^{-1}$

- Ενέργεια σύγκρουσης ή Collision Kerma είναι το γινόμενο της παραγόμενης δόσης επί μία σταθερά που εξαρτάται από μία ποσότητα g, η οποία εκφράζει το ποσοστό κινητικής ενέργειας, των ελεύθερων σωματιδίων της ακτινοβολίας, που μπορεί να χαθεί κατά τη σύγκρουση. $K_{col} = K * (1 - g)$ [4], με μονάδα μέτρησης στο S.I.: 1Gy

- Έκθεση ή Exposure είναι το πηλίκο του φορτίου των σωματιδίων της ακτινοβολίας προς την μάζα τους και ο αντίστοιχος ρυθμός μεταβολής (exposure-rate):
  $X = \frac{dq}{dm}$ [5] και $X' = \frac{dX}{dt}$ [6],
  με αντίστοιχες μονάδες μέτρησης στο S.I. : $1C * kg^{-1}$ $\kappa\alpha\iota$ $1C * kg^{-1} * s^{-1}$

- Η μέση ενέργεια που χάθηκε κατά την ηλεκτρονιακή αντίδραση με μία μάζα, από α ιονισμένα σωματίδια προς αυτή τη μάζα δίνει τη Cema (= Converted Energy per Mass): $C = \frac{dE_{el}}{dm}$ [7] , με μονάδα 1Gy και αντίστοιχο ρυθμό: $C' = \frac{dC}{dt}$ [8], με μονάδα: $1\ Gy * s^{-1}$, επιπλέον όμοια με τη σχέση [2] ισχύει και εδώ ότι : $C = \int \Phi_{(E)} * \frac{S_{el}}{\rho} dE$ [9], όπου $\frac{S_{el}}{\rho}$ η μάζα ηλεκτρονιακής πέδησης,(mass-electronic-stopping-power).

- Την εναποτιθέμενη ενέργεια (μίας αλληλεπίδρασης), ή Energy Deposit, την βρίσκουμε από την διαφορά της εισερχόμενης από την εξερχόμενη ενέργεια ιονισμού συν τη διαφορά στις υπόλοιπες ενέργειες των σωματιδίων. $\varepsilon_i = \varepsilon_{in-}\varepsilon_{out} + Q$ [10], με μονάδα μέτρησης στο S.I. το 1 Joule και προφανώς η ολική εναποτιθέμενη ενέργεια θα είναι το άθροισμα όλων των επιμέρους ενεργειών από κάθε αλληλεπίδραση: $\varepsilon = \sum \varepsilon_i$ [11]

- Η μέση τιμή της ολικής εναποτιθέμενης ενέργειας προς τη μάζα δίνει την απορροφούμενη-δόση:
  $D = {d\bar{\varepsilon}}/{dm}$ [12], με μονάδα: 1 Gy , και αντίστοιχο ρυθμό μεταβολής $D' = {dD}/{dt}$ [13], με μονάδα μέτρησης στο S.I.: $1\ Gy * s^{-1}$

  Αξίζει να σημειωθεί ότι τα βιολογικά αποτελέσματα που αναφέρθηκαν παραπάνω διαφέρουν αν η απορροφούμενη δόση προέλθει από ολόσωμη έκθεση, TBI (Total Body Irradiation), σε ιοντίζουσα ακτινοβολία ή μερική έκθεση, PBI (Partial Body Irradiation). Επίσης, η δόση 4Gy συχνά αναφέρεται και ως LD_{50} (lethal dose for 50%) για TBI, δηλαδή η μέση θανατηφόρος δόση, που μπορεί να σκοτώσει το 50% ενός ελεγχόμενου πληθυσμού μετά από ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.

- Ισοδύναμη δόση ή Dose Equivalent αποτελεί το γινόμενο της απορροφούμενης δόσης επί κάποιον σταθερό όρο w_R (weighting factor), ο οποίος με τη σειρά του αν πολλαπλασιαστεί και με άλλο έναν σταθερό όρο w_T(tissue factor) θα μας δώσει την ενεργό δόση ή Effective dose. $D_{eq} = D * w_R$ [14], (αφορά-TBI) και $D_{eff} = D_{eq} * w_T = D * w_R * w_T$ [15],(αφορά-PBI).

  Η ισοδύναμη και ενεργός δόση εκτός από το 1Gy σαν μονάδα μέτρησης συχνά μετρώνται και στη κλίμακα Sievert, όπου ισχύει $1Gy = 1Sv$. Η διαφοροποίηση αυτή στις μονάδες, παρόλο που όπως φαίνεται παραπάνω είναι ισοδύναμες, υπάρχει για να ξεχωρίζουμε γενικά την απορροφούμενη δόση από ιοντίζουσα ακτινοβολία από τις δόσεις, οι οποίες όντας πια πολλαπλασιασμένες με κάποιους σταθερούς όρους (w_R και w_T) μετά την απορρόφηση τους προκαλούν βιολογικά αποτελέσματα στο στόχο (Faulkner

K., et al., 2020). Στους παρακάτω πίνακες φαίνονται οι πιο βασικές τιμές των σταθερών w_R *και* w_T (Tsipolitis G., 2011) :

Πίνακας 1: Αντιστοίχιση ιοντιζουσών ακτινοβολιών με weighting factors

ΕΙΔΟΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ	$\boldsymbol{W_R}$
Για ακτίνες Χ, γ και $\boldsymbol{e^-}$	1
Για ακτίνες $\boldsymbol{p^+}$	2
Για ακτίνες $\boldsymbol{n^0}$(ανάλογα την ενέργειά τους)	5-20
Για ακτίνες σωμάτιων α και βαρέων ιόντων	20

Πίνακας 2: Αντιστοίχιση ιστών ανθρωπίνου σώματος με tissue factors

ΕΙΔΟΣ ΙΣΤΟΥ	$\boldsymbol{W_T}$
Γονάδες (ωάρια και σπερματοζωάρια)	0,2
Μυελός των οστών	0,12
Στομάχι	0,12
Πνεύμονες	0,12
Έντερο (παχύ και λεπτό)	0,12
Θυρεοειδή	0,05
Οισοφάγο	0,05
Συκώτι	0,05
Ουροδόχο κύστη	0,05
Στήθος	0,05
Δέρμα	0,01
Κόκαλα	0,01
Υπόλοιπα	0,05
ΣΥΝΟΛΙΚΑ :	$\sum \boldsymbol{W_T} \cong 1$

- Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί η ύπαρξη της λεγόμενης βιολογικής δόσης, η οποία πρακτικά είναι η ισοδύναμη δόση που μετά την απορρόφηση της από

έναν έμβιο οργανισμό μπορεί να προκαλέσει καθορισμένα ή στοχαστικά αποτελέσματα μέσω της έμμεσης ή άμεσης δράσης της ιοντίζουσας ακτινοβολίας όπως αναλύθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο.
Η βιολογική δόση εξαρτάται από την γραμμική μεταφορά ενέργειας της ακτινοβολίας προς το στόχο, ή αλλιώς LET (= Linear Energy Transfer), όπου για αυτό το μέγεθος ισχύουν τα παρακάτω:
(1) $LET = \frac{dE}{dx}$ [16] , με μονάδα μέτρησης: $1\frac{keV}{\mu m}$
(2) Το LET για ακτίνες X και γ είναι μικρότερο από αυτό των σωματιδιακών ακτινοβολιών $\boldsymbol{p^+}, \boldsymbol{e^-}, \sigma\omega\mu\acute{\alpha}\tau\iota\omega\nu\ \alpha\ \kappa\alpha\iota\ C$ **.**
(3) Σε low LET κυριαρχεί η έμμεση δράση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας, ενώ σε high LET η άμεση.
(4) Όσο μεγαλύτερο το LET τόσο μεγαλύτερο θα είναι και το βιολογικό αποτέλεσμα που μπορεί να προκληθεί σε έναν οργανισμό.

- Το γινόμενο απορροφηθείσας δόσης επί την επιφάνεια του ιστού που ακτινοβολείται ή DAP (Dose Area Product) , $DAP = D * A$ [17], με μονάδα στο SI το $1\text{Gy} * m^2$, αλλά γενικότερα τα περισσότερα ιατρικά μηχανήματα που παράγουν ακτίνες X, οι οποίες μας ενδιαφέρουν για το συγκεκριμένο πείραμα, μετράνε το DAP σε $1mGy * cm^2$ ή ισοδύναμα σε $0{,}1\mu Gy * m^2$.

- Τέλος, αλλά εξίσου σημαντικά μεγέθη δοσιμετρίας αποτελούν και οι παράμετροι λειτουργίας των ακτινολογικών συστημάτων, όπως η υψηλή τάση (σε kV), το φορτίο (σε mAs), το ρεύμα (σε mA), ο χρόνος έκθεσης (σε min) και ο χρόνος ενεργοποίησης (σε ms) της λυχνίας ακτίνων X (Κορφόπουλος Κ.,ΕΕΑΕ,2020).

3.2 Δοσίμετρο και τα χαρακτηριστικά επιλογής του

Με τον όρο δοσίμετρο εννοούμε το όργανο με το οποίο έχουμε την δυνατότητα μέτρησης ή εκτίμησης της δόσης ή δευτερογενών μεγεθών από τα οποία προκύπτει η δόση μίας ιοντίζουσας ακτινοβολίας (Connor N., et.al, 2019). Κάθε εφαρμογή, ιατρική και μη, στην οποία παρατηρείται χρήση ιοντίζουσας ακτινοβολίας έχει διαφορετικές ανάγκες ως προς τη δοσιμετρία. Αυτές οι ανάγκες προσδιορίζονται με βάση τέσσερεις παράγοντες, οι οποίοι είναι (a) το είδος της ακτινοβολίας και το ενεργειακό της φάσμα, (b) το ελάχιστο όριο ανιχνευσιμότητας και η αξιοπιστία-ακρίβεια του, (c) η ροή και ο ρυθμός ροής των σωματιδίων της ακτινοβολίας και (d) η ομοιογένεια του πεδίου. Με βάση λοιπόν αυτούς τους τέσσερεις παράγοντες γίνεται η επιλογή του δοσιμέτρου ή των δοσιμέτρων που θεωρείται ότι θα εξυπηρετήσουν καλύτερα στην εκάστοτε περίπτωση, με στόχο να έχουμε πάντα το ‘’ιδανικό’’ δοσίμετρο. Με τον όρο ‘’ιδανικό’’ εννοούμε το δοσίμετρο ή τον συνδυασμό δοσιμέτρων που πληρούν τα παρακάτω χαρακτηριστικά (Ανδρέου Κ., 2016):

- Μεγάλο εύρος στην κλίμακα της μετρούμενης δόσης, ιδανική θα ήταν η δυνατότητα μέτρησης από μGy έως kGy.
- Γραμμική απόκριση προς τη δόση.
- Ακρίβεια και ευαισθησία
- Εύκολη και απλή χρήση
- Ανταπόκριση ανεξάρτητη του ρυθμού δόσεως, της ευθύγραμμης μετάδοσης ενέργειας και του ειδικού ιοντισμού.
- Παροχή αναπαραγώγιμων αποτελεσμάτων
- Όσο το δυνατόν μικρότερες διαστάσεις, αλλά παράλληλα μεγάλο ενεργό όγκο ώστε να γίνονται πολλές αλληλεπιδράσεις.
- Μεγάλο δημιουργούμενο σήμα.

3.3 Ακτινοπροστασία

3.3.1 Βασικές Αρχές και Πρακτικές Ακτινοπροστασίας

Η ακτινοπροστασία πρέπει να αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι οποιασδήποτε εφαρμογής εμπεριέχει χρήση ιοντιζουσών ακτινοβολιών. Γιατί έχει ως στόχο την προστασία των εργαζομένων και των ασθενών, αλλά και των αγαθών και του περιβάλλοντος σε γενικότερη κλίμακα, από τις επιβλαβείς επιδράσεις που προκαλεί η απορρόφηση ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Οι βασικές αρχές που την διέπουν είναι τρείς κατά σειρά, η αρχή της αιτιολόγησης, της βελτιστοποίησης και αυτή των ορίων δόσεων. Πιο αναλυτικά, (Εργαστήριο Ιατρικής Φυσικής, ΕΚΠΑ,2016, Σημαντηράκης Γ.,ΕΕΑΕ) :

- Η αρχή της αιτιολόγησης λέει πως η εφαρμογή των διαφόρων διαδικασιών που εμπεριέχουν την έκθεση σε Ι.Α. πρέπει να αιτιολογείται πλήρως με βάση τα πλεονεκτήματα που μπορεί να παράξει, έναντι των βιολογικών βλαβών που μπορούν να προκληθούν ταυτοχρόνως. Οποιαδήποτε μη δικαιολογημένη έκθεση απαγορεύεται και διώκεται ποινικά.
- Έπειτα, σύμφωνα με την αρχή της βελτιστοποίησης σε κάθε ακτινοβόληση με Ι.Α. πρέπει να έχει γίνει η απαραίτητη μελέτη πριν, έτσι ώστε ο αριθμός και το μέγεθος των δόσεων, η πιθανότητα ατυχήματος και ο αριθμός των εκτιθέμενων ατόμων να είναι οι ελάχιστοι δυνατοί, επιτυγχάνοντας παράλληλα το επιθυμητό αποτέλεσμα. Η παραπάνω αρχή υλοποιείται λαμβάνοντας υπόψη πάντα κάθε κοινωνικό-οικονομικό παράγοντα. Την αρχή της βελτιστοποίησης συχνά την συναντάμε και με το αγγλικό αρκτικόλεξο ALARA, το οποίο σημαίνει As Low As Reasonably Achievable.

- Τέλος, με βάση τους επίσημους κανονισμούς ακτινοπροστασίας (ΦΕΚ/β/216/6.3.2001) δεν επιτρέπεται η υπέρβαση του ορίου ενεργού δόσης των 20mSv/yr για τους επαγγελματικά εκτιθέμενους και του 1mSv/yr για τον κοινό πληθυσμό. Μόνες εξαιρέσεις των παραπάνω αποτελούν η ιατρική έκθεση των ασθενών και η έκθεση σε περιπτώσεις έκτακτης ανάγκης.

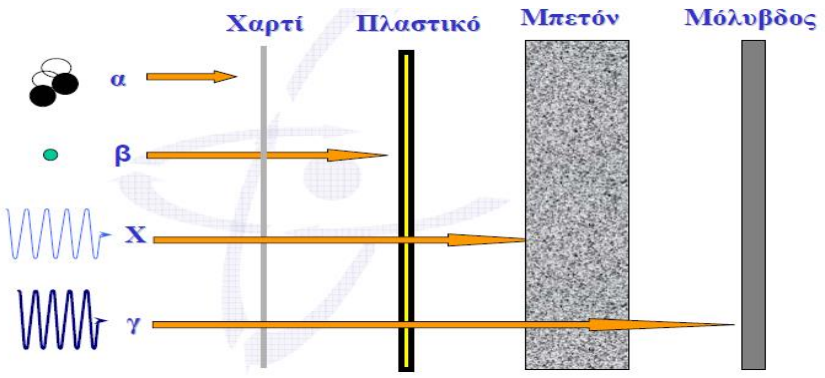
Για οποιαδήποτε πρακτική εφαρμογή των ιοντιζουσών ακτινοβολιών απαιτείται άδεια. Αυτή δίνεται από την ΕΕΑΕ (Ελληνική Επιτροπή Ατομικής Ενέργειας) αφότου πραγματοποιηθεί έλεγχος για το αν εφαρμόζονται οι τρείς προαναφερθείσες αρχές ακτινοπροστασίας (Tafili V., ΕΕΑΕ, 2019).

Σε πρακτικό επίπεδο, πέραν των παραπάνω αρχών η ακτινοπροστασία βασίζεται και σε άλλους τρείς παράγοντες: τον χρόνο, την απόσταση και την θωράκιση. Λέγοντας χρόνο εννοούμε το χρονικό διάστημα κατά το οποίο είναι κάποιος εκτεθειμένος σε περιβάλλον που εκπέμπεται ιοντίζουσα ακτινοβολία, είτε συνεχόμενα είτε και διακεκομμένα. Δε διαφέρει ιδιαίτερα η συνεχόμενη ακτινοβόληση από την διακεκομμένη σε μικρά χρονικά διαστήματα γιατί, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, τα αποτελέσματα που προκαλούνται από την απορρόφηση ιοντίζουσας ακτινοβολίας έχουν την τάση να λειτουργούν αθροιστικά. Επιπλέον, σε ότι αφορά την απόσταση πρέπει να βρισκόμαστε πάντα στην μακρύτερη δυνατή, διότι ο ρυθμός δόσης από μία πηγή ακτινοβολίας έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι είναι (γενικά) αντιστρόφως ανάλογος του τετραγώνου της απόστασης από αυτήν. Η θωράκιση τώρα μπορεί να μας παρέχει έως και 90% προστασία από την ιοντίζουσα ακτινοβολία, πράγμα το οποίο την καθιστά απαραίτητη σε οποιαδήποτε εφαρμογή. Πιο συγκεκριμένα θα αναφερθούμε σε πρακτικές της μόλις αναλύσουμε παρακάτω τα μέτρα ακτινοπροστασίας που λαμβάνονται στο αιμοδυναμικό εργαστήριο του Ωνασείου, από το οποίο έγινε η δειγματοληψία των πειραματικών μας δεδομένων (Εργαστήριο Ιατρικής Φυσικής, ΕΚΠΑ, 2016, Σημαντηράκης Γ., ΕΕΑΕ).

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα είδη ιοντίζουσας ακτινοβολίας και τα υλικά, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιούν για την αντίστοιχη θωράκιση (Tsipolitis G.,2011).

Πίνακας 3: Αντισοίχιση ιοντιζουσών ακτινοβολιών με υλικά θωράκισης

Είδη ιοντίζουσας ακτινοβολίας	**Υλικά**
Δέσμες σωμάτιων α	Χαρτί
Δέσμες σωμάτιων β	Πλαστικό
Ακτίνες Χ	Μπετόν
Ακτίνες γ	Μόλυβδος



Εικόνα 6: Υλικά θωράκισης για τα διάφορα είδη ιοντίζουσας ακτινοβολίας

3.3.2 Μέτρα ακτινοπροστασίας που λαμβάνονται στο αιμοδυναμικό εργαστήριο του Ωνασείου

Κατά την παρουσία μας στο αιμοδυναμικό εργαστήριο του Ωνασείου Καρδιολογικού Κέντρου, για την συλλογή των δειγμάτων αίματος του πειράματός μας, παρατηρήθηκαν τα εξής μέτρα ακτινοπροστασίας από τους εργαζομένους μέσα στις αίθουσες ακτινοσκόπησης :

- Υπήρχαν όλα τα όργανα τελευταίας τεχνολογίας που επέτρεπαν να υλοποιηθεί οποιαδήποτε ιατρική πράξη που απαιτούσε ακτινοσκόπηση με την κατά το δυνατόν μικρότερη δόση ακτινοβολίας.
- Όλοι οι εργαζόμενοι (καρδιολόγοι, αναισθησιολόγοι, τεχνολόγοι, νοσηλευτές και καταγραφείς) εντός της αίθουσας ακτινοσκόπησης φορούσαν ολόσωμες στολές εμπλουτισμένες με μόλυβδο. Αυτές οι στολές αποτελούνται από ποδιές (τύπου φούστας), γιλέκο και κολάρο προστασίας του θυρεοειδή. Είναι χωρισμένες στα παραπάνω τρία κομμάτια για τον διαμερισμό του βάρους και στο εμπρόσθιο μέρος όλων υπάρχει επένδυση μολύβδου ισοδύναμου πάχους 0,25mm, ενώ στο πίσω 0,05mm. Επιπρόσθετα στην παραπάνω στολή εμπεριέχεται και ζευγάρι γυαλιών με μολυβδύαλο και έξτρα πλευρική προστασία.
- Για τους εργαζομένους οι οποίοι δεν χρειάζεται να βρίσκονται συνεχώς πάνω από τον ασθενή κατά την διάρκεια της ιατρικής πράξης, υπάρχουν μέσα στην αίθουσα μέρη όπου τοποθετούνται τροχήλατες επιδαπέδιες ασπίδες, επίσης εμπλουτισμένες με μόλυβδο, για να κάθονται πίσω τους αυτοί οι εργαζόμενοι (νοσηλευτές και καταγραφείς).

- Λόγω του ότι όλες οι ιατρικές πράξεις αφορούσαν καρδιαγγειακά προβλήματα, ο αγγειογράφος στόχευε πάντα στο στήθος του ασθενή. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα από το ύψος του στήθους και κάτω να ενσωματώνονται στην ιατρική τράπεζα ασπίδες οροφής, πλευρικές ασπίδες και προστατευτικές κουρτίνες, οι οποίες προσφέρουν περισσότερο από 90% προστασία από την σκεδαζόμενη ακτινοβολία κατά τη διάρκεια της ακτινοσκόπησης.
- Προφανώς, κατά την ακτινοσκόπηση κανείς δεν τοποθετούσε τα χέρια του εντός της πρωτεύουσας δέσμης των ακτίνων Χ. Η λυχνία παραγωγής ακτίνων Χ βρισκόταν ως επί το πλείστον κάτω από το οριζόντιο επίπεδο που όριζε η ιατρική τράπεζα με τους εργαζομένους να βρίσκονται πάντα από την πλευρά του ανιχνευτή και όχι της λυχνίας. Αυτό γιατί μόλις 1-5% της προσπίπτουσας δέσμης στον ασθενή εξέρχεται από την άλλη πλευρά, δηλαδή αυτή του ανιχνευτή.
- Όλοι οι εργαζόμενοι εντός της αίθουσας είχαν πάνω τους τουλάχιστον δύο δοσίμετρα. Ένα κάτω από τη μολύβδινη στολή στο ύψος του στήθους και ένα εξωτερικά της στολής στο λαιμό, έτσι ώστε να γνωρίζουν ανά πάσα στιγμή πόση ακτινοβολία έχουν απορροφήσει φορώντας την θωρακισμένη στολή αλλά και την ελάχιστη απορροφηθείσα δόση που ίσως την είχε διαπεράσει.
- Πάντα εκτός της αίθουσας υπήρχε διαθέσιμος τεχνικός στο κτήριο σε περίπτωση δυσλειτουργίας του μηχανήματος και διαθέσιμος ακτινοφυσικός, ο οποίος ήταν υπεύθυνος για την ακτινοπροστασία και πάντα ενήμερος για τις δυνατότητες και την κατάλληλη χρήση όλου του εξοπλισμού.

Τέλος, σε ότι αφορά όλους τους υπόλοιπους εργαζομένους του νοσοκομείου, ασθενείς και εξωτερικούς συνεργάτες υπήρχαν στους τοίχους και στις πόρτες όλα τα απαραίτητα αυτοκόλλητα που ενημέρωναν ότι εισέρχονται σε χώρο όπου μπορεί να υπάρξει εκπομπή ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Συγκεκριμένα, έξω από τις τρείς αίθουσες των αγγειογράφων υπήρχε φωτεινή ένδειξη, η οποία αναβόσβηνε και προειδοποιούσε τον κόσμο εκτός της αίθουσας να μην εισέλθουν κατά την διάρκεια της ακτινοσκόπησης.

Όλα τα παραπάνω μέτρα ακτινοπροστασίας που παρατηρήθηκαν στο ΩΚΚ εννοείται πως πρέπει να λαμβάνονται σε οποιοδήποτε ιατρικό κέντρο κάνει χρήση ακτίνων Χ. Πόσο μάλλον σε πιο εξειδικευμένες τεχνικές που χρησιμοποιούν πιο ‘‘επικίνδυνες’’ ακτινοβολίες όπως το γ-knife που λειτουργεί με ακτίνες γ ή οι θεραπείες πρωτονίων που χρησιμοποιούν δέσμες p^+. Σε αυτές τις περιπτώσεις πρέπει να λαμβάνονται ακόμα περισσότερα μέτρα προστασίας, τα κατάλληλα σε κάθε περίπτωση μέτρα ακτινοπροστασίας για να έχουμε πάντα το επιθυμητό αποτέλεσμα με τις μικρότερες κατά το δυνατόν παράπλευρες απώλειες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Εισαγωγή στην τεχνική PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης) και σχετική ανάλυση

4.1 Εισαγωγή

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ή στα αγγλικά Polymerase Chain Reaction, ονομασία που της προσδίδει τη λεγόμενη συντομογραφία PCR, αποτελεί μία επαναστατική μέθοδο στο κλάδο της μοριακής βιολογίας από την ανακάλυψή της το 1983. Η PCR ξεκίνησε ως ένας απλός τρόπος πολλαπλασιασμού συγκεκριμένων τμημάτων του γενετικού υλικού και μέχρι σήμερα με την ταυτόχρονη και ταχύρρυθμη εξέλιξη όλων των τεχνολογικών μέσων έχουν ανακαλυφθεί πολυάριθμες παραλλαγές της. Η ταχύτητα, η μεγάλη ευστάθεια, ακρίβεια και το χαμηλό της κόστος την καθιστούν μία από τις συχνότερα χρησιμοποιούμενες μεθόδους τόσο σε ερευνητικό όσο και σε διαγνωστικό επίπεδο. Ο βασικός της κορμός αποτελείται από τρία επαναλαμβανόμενα στάδια, την αποδιάταξη του γενετικού υλικού, τον υβριδισμό των εκκινητών στη συμπληρωματική αλληλουχία του DNA και την επιμήκυνση της νεοσυντιθεμένης αλυσίδας DNA. Πάνω σε αυτόν τον βασικό κορμό, ο οποίος αποτελεί την λεγόμενη κλασική PCR, έχουν προστεθεί επιπλέον στάδια τα οποία μας δίνουν κάποιες ειδικότερες εφαρμογές αυτής της μεθόδου όπως η ποσοτική PCR, την οποία χρησιμοποιήσαμε με μία παραλλαγή (με χρήση SYBR green) για να δούμε την έκφραση του γονιδίου FDXR στο πείραμά μας (Garibyan Lilit et.al., 2013) .

4.2 Κλασική PCR (Polymerase Chain Reaction)

Η πρώτη ή αλλιώς η κλασική PCR ανακαλύφθηκε το 1983 από τον βιοχημικό Karry Mullis που εργαζόταν σε μια εταιρία βιοτεχνολογίας της Καλιφόρνια. Αυτή του η ανακάλυψη 10 χρόνια αργότερα του χάρισε το βραβείο Νόμπελ Χημείας. Με την PCR μιλάμε για μια ενζυμική μέθοδο ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων του γενετικού υλικού *in vitro*, η οποία βασίζεται στη γρήγορη και ακριβή θερμοκρασιακή αλλαγή από στάδιο σε στάδιο (Garibyan Lilit et.al., 2013). Το αποτέλεσμα της PCR μετά την επανάληψη τριών βασικών σταδίων, που θα αναλύσουμε παρακάτω, είναι ο πολλαπλασιασμός ενός τμήματος του DNA έως και ένα δισεκατομμύριο φορές.

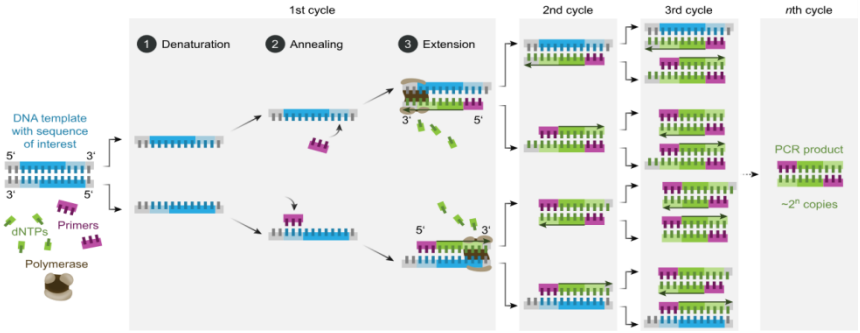
Τα τρία βασικά στάδια της κλασικής PCR είναι :

- Αποδιάταξη: Οι δύο αλυσίδες του αρχικού DNA διαχωρίζονται με θέρμανση στους 94-95℃ για περίπου 30-60 s.

- Υβριδισμός εκκινητών: Μειώνοντας αμέσως μετά τη θερμοκρασία στους 55-65℃ για περίπου 30-60 s, οι εκκινητές υβριδιοποιούνται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στους διαχωρισμένους πια κλώνους του DNA.

- Επιμήκυνση: Για την σύνθεση της νέας αλυσίδας αυξάνουμε τη θερμοκρασία στους 72°C, τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης*[12]. Η πολυμεράση επιμηκύνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs)*[13] χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο. Η ταχύτητα με την οποία γίνεται η σύνθεση της νέας αλυσίδας είναι της τάξης των 1000bp ανά λεπτό, όπου bp (base pairs) είναι μία μονάδα μέτρησης βασισμένη στη θεμελιώδη μονάδα δίκλωνων νουκλεϊκών οξέων που αποτελείται από δύο νουκλεοβάσεις που συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου.

Σε μία τυπική PCR έχουμε από 25 έως 35 φορές επανάληψη της παραπάνω διαδικασίας και διαρκεί περίπου 2-4 ώρες ανάλογα με το μήκος του αρχικού δείγματος DNA. Σε μία αποτελεσματική διαδικασία από ένα ή μερικά πρότυπα προκύπτουν δισεκατομμύρια αντίγραφα. Αυτό γιατί σε κάθε κύκλο της PCR τα παραγόμενα γενετικά υλικά μπορούν να λειτουργήσουν σαν πρότυπα στον επόμενο κύκλο με αποτέλεσμα να έχω μια εκθετική αύξηση, όπως φαίνεται και στη παρακάτω σχηματική-αναπαράσταση (JB. de-Kok, et.al., 2003, Winer J., et.al., 1999).



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση κλασικής μεθόδου PCR

Η PCR εκτελείται σε μία συσκευή που φέρει θερμαινόμενη πλάκα που μπορεί να εναλλάσσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια. Αυτή η συσκευή λέγεται θερμικός κυκλοποιητής (Thermal cycler) και έχει την δυνατότητα ρύθμισης της θερμοκρασίας και της διάρκειας κάθε σταδίου της PCR. Κλείνοντας, πέραν των 3 σταδίων από τα οποία αποτελείται ένας κύκλος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, μπορεί να χαρακτηριστεί και από τρεις άλλες φάσεις που αφορούν όλες τις επαναλήψεις της. Πρώτη είναι η εκθετική φάση όπου μόλις έχει αρχίσει ο πολλαπλασιασμός της αλληλουχίας στόχου. Όλα τα αντιδραστήρια βρίσκονται σε επάρκεια και η αντίδραση είναι πολύ αποτελεσματική, δηλαδή σε κάθε κύκλο διπλασιάζονται τα μόρια της αλληλουχίας στόχου. Μετά δεύτερη έρχεται η γραμμική φάση όπου παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων της αλληλουχίας στόχου εξαιτίας της μείωσης της ποσότητας των αντιδραστηρίων. Τέλος, τρίτη είναι η φάση πλατώ όπου δεν συντίθενται νέα μόρια DNA λόγω της εξάντλησης ενός ή περισσοτέρων αντιδραστηρίων (JB. de Kok, et al., 2003, Winer J., et al., 1999).

4.3 Ποσοτική PCR (real time-PCR ή q-PCR)

4.3.1 Γενικά στοιχεία της q-PCR

Η κλασική PCR, όπως την έχουμε περιγράψει μέχρι στιγμής πολλαπλασιάζει ένα αρχικό δείγμα γενετικού υλικού παρέχοντάς μας πάρα πολλά αντίγραφα, τα οποία με τη σειρά τους χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές όπως αλληλούχηση, κλωνοποίηση σε πλασμιδικούς φορείς ή ηλεκτροφόρηση. Σε όλα τα αποτελέσματα των παραπάνω εφαρμογών η απάντηση που παίρνουμε είναι ποιοτική, ποτέ όμως ποσοτική. Έτσι το 1993 ο Russel Higutsi και οι συνεργάτες του ανακάλυψαν την ποσοτική PCR προσθέτοντας βρωμιούχο αιθίδιο*[14] στο διάλυμα της αντίδρασης και εφάρμοσαν μία κάμερα κλειστού κυκλώματος πάνω στον θερμικό κυκλοποιητή. Ο λόγος για τον οποίο θα αναλυθούν σε βάθος οι αρχές της q-PCR είναι επειδή αυτή η μέθοδος αποτέλεσε πολύ σημαντικό κομμάτι στην επεξεργασία των δειγμάτων του πειράματος και στην εκπόνηση των αποτελεσμάτων του. Η ποσοτική PCR, ή αλλιώς quantitative PCR (q-PCR) ή real time PCR (RT-PCR) όπως μπορούμε να τη βρούμε στη βιβλιογραφία αποτελεί σήμερα μία γρήγορη, ευαίσθητη και αξιόπιστη μέθοδο ποσοτικοποίησης μορίων DNA και cDNA*[15]. Εκτελείται σε εξειδικευμένα μηχανήματα (θερμικοί κυκλοποιητές πραγματικού χρόνου), εξοπλισμένα με ένα πολύπλοκο σύστημα κατόπτρων και φίλτρων που καταγράφουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από διάφορες φθορίζουσες χρωστικές, καθώς αυτές ενσωματώνονται στα προϊόντα της PCR. Σήμερα είναι δυνατή η ταυτόχρονη χρήση μέχρι και 21 διαφορετικών χρωστικών σε μία αντίδραση q-PCR (Kralik P., et. al., 2017).

4.3.2 Βασικές αρχές της q-PCR

Όπως θα έχετε παρατηρήσει αναφερόμαστε στην ποσοτική PCR περισσότερο με την ονομασία q-PCR (quantitative PCR) κι όχι RT-PCR (Real Time PCR). Αυτό συμβαίνει γιατί η ονομασία RT-PCR μας παραπέμπει περισσότερο σε μία άλλη εκδοχή της μεθόδου, αυτή της αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription PCR), η οποία έχει επίσης την συντομογραφία RT-PCR.

Για να κατανοήσουμε καλύτερα τις βασικές αρχές της q-PCR οφείλουμε να κατανοήσουμε πρώτα το βασικό χαρακτηριστικό που την διαφοροποιεί από την κλασική. Στην κλασική PCR πρέπει πρώτα να ολοκληρωθούν όλοι οι κύκλοι της αντίδρασης μέχρι να φτάσει στη φάση κορεσμού (πλατώ), όπου τα δείγματα υφίστανται περαιτέρω επεξεργασία (π.χ. ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης*[16]) για να γίνει η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της. Αντιθέτως στην q-PCR τα δεδομένα συλλέγονται κατά τη φάση της εκθετικής αύξησης της αντίδρασης. Η σημαντικότερη παράμετρος για την ποσοτικοποίηση είναι η σταθερή τιμή

C_P (σημείο διασταύρωσης ή crossing point) η οποία αντιστοιχεί στον κύκλο της αντίδρασης όπου η ένταση του φθορισμού των προϊόντων της PCR θα ξεπεράσει το βασικό επίπεδο (baseline) και θα φτάσει σε ένα συγκεκριμένο κατώφλι καταγραφής. Το όριο αυτό υπολογίζεται αυτόματα από το μηχάνημα ανάλογα με την διακύμανση των τιμών του βασικού επιπέδου. Θεωρώντας λοιπόν ότι στο σημείο C_P η αντίδραση είναι στην εκθετική φάση, δηλαδή σε κάθε κύκλο τα προϊόντα της PCR διπλασιάζονται, τότε η απόδοση της αντίδρασης θα είναι 2. Με βάση λοιπόν αυτό και τον παρακάτω τύπο θα μπορέσουν να υπολογιστούν τα αντίγραφα του γονιδίου στόχου σε κάθε δείγμα. $N_o = N_t/(E+1)^{C_p}$[18], όπου N_o είναι τα αντίγραφα του γονιδίου στόχου στο αρχικό δείγμα, N_t είναι τα αντίγραφα του γονιδίου στόχου στο C_P, E (Efficiency) είναι η απόδοση της αντίδρασης (όπου στην εκθετική φάση E=2) και C_P το σημείο διασταύρωσης, δηλαδή ο κύκλος της αντίδρασης κατά τον οποίο η ένταση του φθορισμού ξεπερνά το κατώφλι του βασικού επιπέδου. Ο ποσοτικός προσδιορισμός βασίζεται στο γεγονός ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των μορίων DNA (ή cDNA) στο αρχικό δείγμα τόσο μικρότερος είναι ο αριθμός των κύκλων πολλαπλασιασμού που χρειάζονται για να παραχθεί ικανός αριθμός προϊόντων ώστε ο φθορισμός του δείγματος να ξεπεράσει το επίπεδο ανίχνευσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα δείγματα με πολλά αντίγραφα του γονιδίου στόχου να έχουν μικρότερο C_P από δείγματα με λιγότερα αντίγραφα. Επίσης πρέπει να αναφερθεί ότι η παραγωγή του προϊόντος της PCR έχει γραμμική συσχέτιση με τον παραγόμενο φθορισμό. [(JB. de Kok, et al., 2003, Winer J., et al., 1999) and (Untergasser Andreas, et al., 2012, Koressaar, et al., 2007)]

4.3.3 Απόλυτη ποσοτικοποίηση, πρότυπη καμπύλη και γονίδιο αναφοράς

Στην ποσοτική PCR η απόλυτη ποσοτικοποίηση γίνεται με την βοήθεια μίας πρότυπης καμπύλης, η οποία προκύπτει από δείγματα γνωστής συγκέντρωσης ή καλύτερα με γνωστό αριθμό αντιγράφων του γονιδίου που πρόκειται να ποσοτικοποιηθεί (standards). Συνήθως γίνεται χρήση τουλάχιστον τεσσάρων standards, τα οποία έχουν 1 log διαφορά μεταξύ τους (δηλαδή μία μονάδα διαφορά σε λογαριθμική κλίμακα), έτσι ώστε η πρότυπη καμπύλη να καλύπτει όλο το εύρος των συγκεντρώσεων που μπορεί να ανιχνευθούν πειραματικά. Τέλος, παρόλο που θεωρείται προφανές πρέπει να αναφέρουμε ότι για το κάθε γονίδιο κατασκευάζεται ξεχωριστή πρότυπη καμπύλη. Στην περίπτωση που γίνεται ποσοτικοποίηση γονιδίων που εκφράζονται ενδογενώς στον άνθρωπο, είναι απαραίτητη η χρήση ενός γονιδίου αναφοράς. Το κύριο χαρακτηριστικό αυτού του γονιδίου είναι η σταθερή του έκφραση για τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες και αυτό που καθιστά απαραίτητη τη χρήση του είναι

το ότι εξομαλύνει τις διαφορές που υπάρχουν ανάμεσα στα δείγματα είτε λόγω αποκλίσεων στην απόδοση της σύνθεσης του cDNA είτε λόγω μικροδιαφορών στο πιπετάρισμα (δηλαδή στην διαδικασία αναρρόφησης με πιπέτα, η οποία αποτελεί αιτία τυχαίου λάθους στην μικροβιολογία) κατά την προσθήκη γενετικού υλικού στην αντίδραση. Εκτός της απόλυτης, υπάρχει και η σχετική ποσοτικοποίηση, όπου συγκρίνονται τα C_P του γονιδίου στόχου και του γονιδίου αναφοράς ανάμεσα σε δύο δείγματα. Αυτήν την μεθοδολογία ακολουθήσαμε κι εμείς και πήραμε τα αποτελέσματα της q-PCR με την μορφή : ‘‘± x φορές υψηλότερη ή χαμηλότερη έκφραση του γονιδίου στο δείγμα A σε σχέση με το δείγμα B’’. Το μαθηματικό μοντέλο που μας έδωσε αυτού του είδους τα αποτελέσματα βασίζεται στη σχέση:

$R = 2^{-[\Delta C_{P\ \delta\epsilon\acute{\iota}\gamma\mu\alpha\tau o\varsigma} - \Delta C_{P\ \gamma o\nu\iota\delta\acute{\iota}o\upsilon\ \alpha\nu\alpha\varphi o\rho\acute{\alpha}\varsigma}]} = 2^{-[\Delta\Delta C_P]}$ [19]

(Untergasser An.,et. al., 2012, Koressaar, et. al., 2007).

4.3.4 Φθορίζουσες χρωστικές και SYBR Green q-PCR

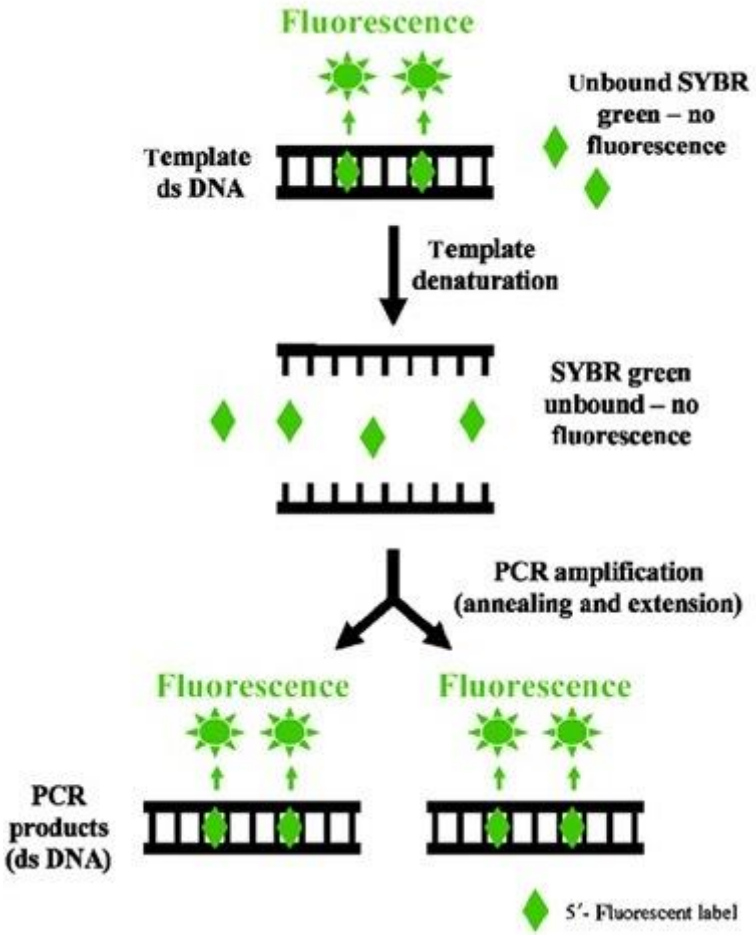
Οι φθορίζουσες χρωστικές που ενσωματώνονται στην q-PCR και βοηθούν στην ποσοτικοποίηση της αντίδρασης διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες τις ειδικές και μη ειδικές.

- Οι μη ειδικές (π.χ. SYBR Green I) παρουσιάζουν ελάχιστο ή μηδενικό φθορισμό όταν είναι ελεύθερες στο διάλυμα και φθορίζουν όταν ενσωματώνονται στη μικρή αύλακα των δίκλωνων μορίων DNA. Επιπλέον, όσο περισσότερα προϊόντα παράγονται κατά την αντίδραση τόσο περισσότερο αυξάνει και ο φθορισμός.

- Οι ειδικές (π.χ. Taqman Probes) δεν είναι ελεύθερες, αλλά προσδεδεμένες πάνω σε μικρά μόρια DNA (25-30 βάσεων) και υβριδιοποιούνται στο γονίδιο στόχο ανάμεσα στους δύο εκκινητές. Κατά την επιμήκυνση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας, η Taq-πολυμεράση διασπά έναν ιχνηθέτη διαχωρίζοντας έτσι το φθοριοφόρο από τον καταστολέα της ειδικής χρωστικής, με αποτέλεσμα την εκπομπή φθορισμού από το πρώτο άκρο του μορίου DNA που ήταν προσδεδεμένη η ειδική χρωστική.

Και στα δύο είδη φθοριζουσών χρωστικών η μέτρηση φθορισμού γίνεται σε κάθε κύκλο της PCR μετά το τέλος της επιμήκυνσης των μορίων DNA. Επιπρόσθετα σε ότι αφορά τη χρήση των παραπάνω δύο ειδών χρωστικών, οι ειδικές χρωστικές έχουν το πλεονέκτημα, έναντι των μην ειδικών, του ότι καθιστούν δυνατή τη μέτρηση και ποσοτικοποίηση μόνο του επιθυμητού προϊόντος της PCR. Από την άλλη πλευρά οι μη ειδικές χρωστικές ως προς το θέμα κόστους είναι αισθητά πιο φθηνές και κοινές για όλα τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιούνται στην q-PCR (JB.de Kok, et. al., 1970). Στο δικό μας πείραμα έγινε χρήση της μη ειδικής

SYBR Green I q-PCR με σχετική ποσοτικοποίηση για την εκπόνηση των αποτελεσμάτων της. Το SYBR Green I είναι μία ασύμμετρη βαφή κυανίνης*[17], που χρησιμοποιείται ως χρώση νουκλεϊκού οξέος στην μοριακή βιολογία. Το SYBR Green I συνδέεται με το DNA και το προκύπτον σύμπλεγμα DNA-βαφής απορροφά καλύτερα το μπλε φως μήκους κύματος λ=497nm και εκπέμπει πράσινο φως με λ=520nm. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι αυτού του είδους η χρωστική μπορεί να χρωματίσει και το RNA, απλά με μικρότερη απόδοση (Wittwer et. al., 1997).



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση ενός κύκλου της SYBR Green q-PCR

4.4 Εκκινητές γονιδίου FDXR και αλγόριθμος που έδωσε την έκφρασή του

Αφήνοντας την γενική θεωρία που αποτελεί τους πυλώνες αυτού του πειράματος , περνάμε στην ανάλυση των εκκινητών (primers) και στην ακριβή μεθοδολογία της PCR που πραγματοποιήθηκε για την παραγωγή των αποτελεσμάτων. Στο δεύτερο μέρος της εργασίας θα γίνει και η αναλυτική περιγραφή όλου του πειράματος καθώς και η παρουσίαση και επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων για την εκπόνηση των τελικών αποτελεσμάτων.

Όπως έχει προαναφερθεί έγινε χρήση SYBR Green I q-PCR με σχετική ποσοτικοποίηση. Πιο αναλυτικά, ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα με την συγκεκριμένη σειρά :

(1) Αρχικά ως αντιδραστήρια υπήρχαν τα γονίδια GAPDH και FDXR, στα οποία εφαρμόστηκε αντίστροφη μεταγραφή για να πάρουμε τα δύο ζεύγη εκκινητών (forwards και reverses), όπως φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Gene	Forward	Reverse
GAPDH	5’-GAAATCCCATCACCATCTTCCAGG-3’	5’-GAGCCCCAGCCTTCTCCATG-3’
FDXR	5’-CATAGCCACAACCATGACTGACAG-3’	5’-CCACCTCCTCGGCATCCA-3’

Η αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription PCR or RT-PCR) πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας PrimeScript First Strand cDNA Synthesis Kit στους 37°C για 30 λεπτά και στη συνέχεια στους 85°C για 5 δευτερόλεπτα.

(2) Η αξιολόγηση της έκφρασης του FDXR έγινε με χρήση του γονιδίου GAPDH ως γονίδιο αναφοράς.

(3) Πριν από κάθε q-PCR όλα τα δείγματα αναμείχθηκαν με συγκεκριμένη δόση εκκινητών και ένα συγκεκριμένο διάλυμα (PCR master mix, KAPA SYBR FAST qPCR Kit) που πρέπει να υπάρχει προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι αντιδράσεις.

(4) Στη συνέχεια έγιναν οι ποσοτικές PCR με αρχική θερμοκρασία στους 95°C για 10 λεπτά, μετά συνεχίζοντας για 40 κύκλους στην ίδια θερμοκρασία για 10 δευτερόλεπτα και τέλος στους 60°C για 30 δευτερόλεπτα.

(5) Τέλος, προέκυψαν τα αποτελέσματα της σχετικής ποσοτικοποίησης με βάση την έκφραση του γονιδίου αναφοράς (GAPDH) και την εξίσωση [19] που αναγράφεται στην παράγραφο 4.3.3.

Εικόνα 9: Το θερμικό κύκλοτρο που χρησιμοποιήθηκε για την υλοποίηση της SYBR Green q-PCR

Β’ Μέρος: Πειραματικό

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας

5.1 Εισαγωγή

Οι νέες τεχνολογικές εξελίξεις στ συστήματα απεικόνισης και ανίχνευσης καθώς και η ανάπτυξη νέων επεμβατικών εργαλείων όπως καθετήρων και stents οδήγησαν σε σημαντική αύξηση της συχνότητας των επεμβατικών διαδικασιών που χρησιμοποιούν ιοντίζουσα ακτινοβολία (ΙΑ) τα τελευταία χρόνια (Lobrich M., et al, 2005). Όσον αφορά τις επεμβατικές διαδικασίες σε παιδιατρικούς ασθενείς, την περίοδο 1999-2008νστην Αγγλία παρατηρήθηκε 7-πλασιασμός των επεμβάσεων (Brunhild M. Halm,et al, 2014). Στην Ελλάδα σύμφωνα με τον Διεθνή Οργανισμό Ατομικής Ενέργειας το 2006, οι επεμβατικές διαδικασίες σε παιδιατρικούς ασθενείς στη χώρα μας αποτελούσαν το 14.3% του συνόλου των επεμβατικών διαδικασιών (Vandevoorde C., et al, 2015). Τα πιθανά δυσμενή αποτελέσματα που μπορεί να προκληθούν μετά την έκθεση ακόμα και σε μικρές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας, αποτελεί ένα θέμα υψίστης σημασίας για όλη την επιστημονική κοινότητα. Για παράδειγμα, το NTP (National Toxicology Program, 2006) έχει ανακοινώσει ότι η Ι.Α. που χρησιμοποιείται σε ιατρικές εφαρμογές θεωρείται επισήμως ως ένα μέσω γέννησης καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, τον Ιούνιο του 2006 το βασικό θέμα συζήτησης του National Academy of Sciences (Biological Effects of Ionizing Radiation (BEIR) VII Report, NAS, 2006) ήταν η πιθανότητα καρκινογένεσης προερχόμενη από χαμηλές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας.

Δεδομένης της επικινδυνότητας των χαμηλών δόσεων που μόλις προαναφέραμε εύκολα καταλαβαίνει κανείς πως τα παιδιά μπορούν να βρεθούν σε ακόμα πιο δύσκολη θέση. Αυτό προκύπτει από το γεγονός του ότι οι παιδιατρικοί ασθενείς έχουν μεγαλύτερο προσδόκιμο ζωής, συνεπώς και μεγαλύτερη πιθανότητα να παρουσιάσουν καρκίνο και από το ότι είναι αρκετά πιο ακτινοευαίσθητοι συγκριτικά με τους ενήλικες, λόγω των ταχέων αναπτυσσόμενων ιστών τους. Επιπροσθέτως, οι επεμβατικές διαδικασίες περιλαμβάνουν μεγάλους χρόνους ακτινοσκόπησης, υψηλούς ρυθμούς δόσης, λήψη κινηματογραφικών (cine) εικόνων, ενώ επιπλέον στα παιδιά απαιτείται πολύ συχνά η χρήση μεγέθυνσης (zoom) με αποτέλεσμα οι ασθενείς να εκτίθενται σε υψηλότερες δόσεις ακτινοβολίας. Αξίζει να αναφερθεί ότι παιδιατρικοί ασθενείς με πολύπλοκες καρδιοπάθειες υποβάλλονται τουλάχιστον σε 1-3 διαγνωστικές και 1-4 θεραπευτικές επεμβατικές καρδιολογικές διαδικασίες (με μέγιστο όριο ενεργού δόσης 11 και 67 mSv, αντιστοίχως) κατά την διάρκεια της ζωής τους (Ait-Ali L., et al, 2010).

Με αφορμή λοιπόν όλα τα παραπάνω οδηγηθήκαμε και εμείς στην διεξαγωγή της παρούσας έρευνας, της οποίας το πειραματικό σκέλος παρουσιάζεται αναλυτικά παρακάτω.

5.2 Αιμοδυναμικό εργαστήριο και Αγγειογράφος

Ένα από τα πιο σημαντικά μέρη όλων των ερευνών αποτελεί η διαδικασία λήψης των πειραματικών δεδομένων, που στην προκειμένη περίπτωση ήταν δείγματα αίματος παιδιατρικών ασθενών. Τα δείγματα αυτά λήφθηκαν στο αιμοδυναμικό εργαστήριο του Ωνάσειου Καρδιολογικού Κέντρου (Ω.Κ.Κ.). Με τον όρο αιμοδυναμικό εργαστήριο εννοούμε έναν πλήρως εξοπλισμένο χώρο με ένα άκρως εκπαιδευμένο προσωπικό, το οποίο είναι σε θέση να αντιμετωπίσει όλα τα είδη καρδιαγγειακών περιστατικών με χρήση:

- Αγγειοπλαστικής
- Αρτηριογραφίας
- Στεφανιογραφίας
- Εμφύτευσης, αντικατάστασης και αφαίρεσης απινιδωτών και βηματοδοτών
- Ηλεκτροφυσιολογικής μελέτης (ΗΦΕ)
- Ενδοαγγειακής κατάλυσης καρδιακών αρρυθμιών (Ablations)

Στη παρακάτω παράγραφο θα γίνει αναλυτική περιγραφή του αγγειογράφου του ΩΚΚ, με βάση τον οποίο καθοδηγούνται όλες οι ιατρικές πράξεις που αναφέρθηκαν παραπάνω και αποτέλεσε την βασική πηγή ιοντίζουσας ακτινοβολίας (X-rays) για τους ασθενείς από τους οποίους πήραμε τα ακτινοβολημένα δείγματα αίματος για το πείραμά μας. Το αγγειογραφικό σύστημα που διαθέτει το Ωνάσειο είναι το Artis Zee Biplane system, της εταιρίας SIEMENS, και αποτελείται από μία βάση και δύο όμοιους βραχίονες ακτινοσκόπησης (C-arms), έναν ενσωματωμένο στο δάπεδο για το κάθετο επίπεδο ακτινοσκόπησης και έναν στο ταβάνι για το οριζόντιο επίπεδο ακτινοσκόπησης, την κονσόλα ελέγχου συνδεδεμένη με την ιατρική τράπεζα, ένα σετ ποδοδιακοπτών, σύστημα εγχυτών στο πλάι της ιατρικής τράπεζας και ένα σετ έξι οθονών με το αντίστοιχο σύστημα ψηφιακής απεικόνισης (Artis Zee, SIEMENS Healthineers®). Έχοντας αναφέρει λοιπόν τα μέρη από τα οποία αποτελείται το Artis Zee, μπορούμε τώρα να τα πάρουμε ένα προς ένα και να αναλύσουμε την χρησιμότητά τους και τον τρόπο με τον οποίο λειτουργούν.

- Η βάση των C-arms τους παρέχει στήριξη και την απαραίτητη ενεργειακή τροφοδοσία για να λειτουργήσουν, διότι αυτοί οι βραχίονες ακτινοσκόπησης με τη σειρά τους απαρτίζονται από δύο βασικά μέρη των οποίων η άρτια λειτουργία οδηγεί σε μια επιτυχημένη ακτινοσκόπηση.

- Πιο συγκεκριμένα ένα C-arm αποτελείται από μία λυχνία ακτίνων X (MEGALIX Cat Plus X-ray tube) που βρίσκεται πάντα κάτω από το οριζόντιο επίπεδο που ορίζει η ιατρική τράπεζα και έναν επίπεδο ανιχνευτή (Flat Panel Detector-FPD) στο πάνω μέρος (ArtisZee, SIEMENS Healthineers®). Η ταυτόχρονη συνδυαστική κίνηση,

ευθύγραμμη και περιστροφική, των δύο βραχιόνων ακτινοσκόπησης δίνουν την δυνατότητα στον χειριστή τους να ακτινοβολήσει με μεγάλη ακρίβεια όλα τα μέρη του σώματος, ανεξαρτήτως από το γεγονός ότι στα περιστατικά που αφορούσαν το αιμοδυναμικό εργαστήριο η ακτινοβολία εστιάζεται γύρω από την καρδιά, δηλαδή στο ύψος του στήθους του ασθενή.

- Όπως προαναφέρθηκε για την παραγωγή ακτίνων Χ γίνεται χρήση του σωλήνα MEGALIX Cat Plus, ο οποίος με εφαρμογή μίας μεγάλης διαφοράς δυναμικού σε δύο ηλεκτρόδια μπορεί να παράξει ακτίνες Χ. Συνδυαζόμενες με το μικρό εστιακό σημείο που διαθέτει ο σωλήνας, κατά την έξοδο τους να δώσουν πολύ ακριβείς εικόνες χωρίς να έχει επιβαρυνθεί ο ασθενής με μεγάλες δόσεις ακτινοβολίας (Artis Zee, SIEMENS Healthineers®).

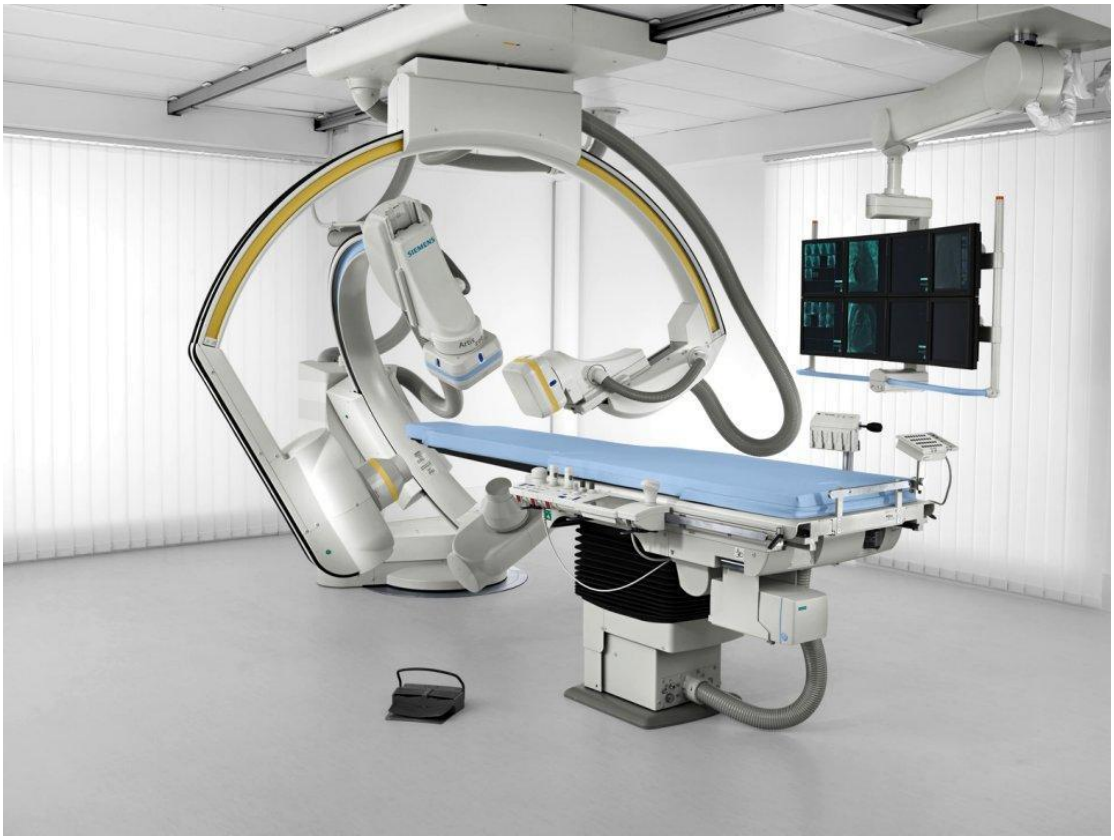
- Τις παραγόμενες αυτές ακτίνες Χ τις ανιχνεύει ο FPD (Flat Panel Detector) ένα λεπτό τετράγωνο φύλλο-στρώμα με διατεταγμένες κρυσταλλοτριόδους. Πιο αναλυτικά το φύλλο-στρώμα είναι δομημένο με pixels και κάθε pixel αντιστοιχεί σε μία φωτοδίοδο, η οποία μετατρέπει την προσπίπτουσα φωτεινή ενέργεια σε ηλεκτρικό σήμα. Επειδή η ανιχνευτική αυτή διάταξη είναι ευαίσθητη στην φωτεινή ακτινοβολία και όχι στις ακτίνες Χ, υπάρχει και μία επίστρωση σπινθηριστών (συνήθως ιωδιούχου καισίου-CsI) που μετατρέπει την προσπίπτουσα ιοντίζουσα ακτινοβολία σε φωτεινή (Ανδρέου Κ., 2016). Επιπλέον στον επίπεδο ανιχνευτή είναι ενσωματωμένο και ένα σύστημα αυτόματου ελέγχου έκθεσης σε ακτινοβολία (automatic exposure technique, AEC), του οποίου η αρχή λειτουργίας είναι να τερματίζει την εκπομπή ακτίνων Χ από τη λυχνία μόλις μία προκαθορισμένη ποσότητα ακτινοβολίας διαπεράσει τον ασθενή (Radiology Key, 2016). Με αυτόν τον τρόπο καθορίζεται ένα άνω φράγμα για τον χρόνο ακτινοβόλησης και συνεπώς για την συνολική απορροφηθείσα δόση ακτινοβολίας από τον ασθενή.

- Το αγγειογραφικό αυτό σύστημα συνοδεύεται από το αντίστοιχο σύστημα έγχυσης σκιαγραφικής ουσίας, τους εγχυτές (injectors). Το σκιαγραφικό πρέπει να εγχέεται μέσα στα αγγεία με μεγάλη πίεση και ταχύτητα, έτσι ώστε σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα να έχουμε την κατάλληλη πυκνότητα στο αίμα για να πάρουμε εν τέλει την επιθυμητή εικόνα (Ανδρέου Κ., 2016).

- Σε ότι αφορά τον χειρισμό του μηχανήματος, η κονσόλα ελέγχου επιτρέπει στον τεχνολόγο της αίθουσας να κινεί με ακρίβεια την ιατρική τράπεζα και τους βραχίονες ακτινοσκόπησης προς όλες τις κατευθύνσεις, ενώ το

σετ των ασύρματων ποδοδιακοπτών δίνει την δυνατότητα της έναρξης και της λήξης της ακτινοσκόπησης στους γιατρούς από οποιοδήποτε σημείο μέσα στην αίθουσα.

- Τέλος, στο ταβάνι της αίθουσας είναι ενσωματωμένο ένα κινητό σύστημα έξι οθονών, το οποίο μπορεί να μεταφερθεί σε οποιοδήποτε σημείο του χώρου με στόχο να κάνει πιο εύκολη την διαδικασία, βλέποντας αναλυτικά και με όλες τις λεπτομέρειες όλες τις εικόνες της ακτινοσκόπησης ανά πάσα στιγμή. Η ευκρίνεια αυτή των εικόνων οφείλεται στην μονάδα των 16-bit ψηφιακής απεικόνισης, η οποία έχει την δυνατότητα να παράξει έως και 65 χιλιάδες διαφορετικές αποχρώσεις του γκρι με βάση το εισερχόμενο ηλεκτρικό σήμα από τον ανιχνευτή (ArtisZee, SIEMENS Healthineers®).



Εικόνα 10: Artis Zee Biplane System by SIEMENS

5.3 Περιγραφή πειράματος

Μία από τις πολυάριθμες δυσκολίες που είχε προκαλέσει στη ζωή μας η πανδημία του covid-19 και οι συνθήκες του lockdown ήταν η αναβολή όλων των ειδών πειραμάτων και ερευνητικών προγραμμάτων. Προφανώς η δυσχερής αυτή κατάσταση είχε αντίκτυπο και στο δικό μας πείραμα που σχετιζόταν άμεσα με τον κλάδο της υγείας. Έπειτα λοιπόν από μία πολλή μεγάλη αναμονή, από τον Απρίλιο του 2020, και παράλληλα με μεγάλες προσπάθειες που καταβάλαμε, καταφέραμε να ξεκινήσει η διεξαγωγή του πειράματος τον Οκτώβρη του 2020, παίρνοντας έγκριση από το ΩΚΚ στο οποίο είχε σταλεί αναλυτικά όλο το πλάνο της διεξαγωγής της μελέτης.

Το μεγαλύτερο σκέλος του πειράματός μας αποτέλεσε η λήψη των δεδομένων, η οποία πραγματοποιήθηκε στο αιμοδυναμικό εργαστήριο του Ωνάσειου Καρδιολογικού Κέντρου και διήρκησε περίπου δύο μήνες. Κατά την διάρκεια αυτών των μηνών παρακολουθούσαμε σχεδόν καθημερινά όλα τα παιδιατρικά περιστατικά του ΩΚΚ, από τα οποία είχαμε την δυνατότητα να πάρουμε δείγματα αίματος. Αυτήν την δυνατότητα μας την παρείχαν οι γονείς των ασθενών, που μέσω συνεννόησης με τους γιατρούς, μας υπέγραφαν τα απαραίτητα έντυπα συγκατάθεσης (αντίγραφο αυτών των εντύπων συγκατάθεσης βρίσκεται στο Παράρτημα ΙΙ), στα πλαίσια των κανόνων Βιοηθικής και Δεοντολογίας. Το έντυπο συγκατάθεσης επέτρεπε σε εμάς να προχωρήσουμε την δειγματοληπτική διαδικασία, ενώ από την άλλη επιβεβαίωνε στους γονείς των ασθενών πως τα προσωπικά δεδομένα των παιδιών τους δεν θα διέρρεαν πουθενά και ότι αυτή η διαδικασία, για την οποία έδιναν την συγκατάθεσή τους, δεν θα επηρέαζε με κανέναν τρόπο την υγεία των παιδιών. Εδώ αξίζει να σημειωθεί πως αρκετοί γονείς δεν υπέγραφαν, πράγμα το οποίο καθυστέρησε ακόμα περισσότερα την υλοποίηση της έρευνας. Κατά την συλλογή λοιπόν των δειγμάτων αίματος, για τα οποία είχαμε άδεια, η διαδικασία που ακολουθούσαμε ήταν η εξής:

1. Οι νοσηλευτές του αιμοδυναμικού εργαστηρίου έπαιρναν 3ml αίματος από τους ασθενείς πριν την ακτινοσκόπησή τους.

2. Αυτά τα δείγματα αίματος που μας δίνονταν τοποθετούνταν εντός φιαλιδίων EDTA tubes, τα οποία είναι σωλήνες που αποτρέπουν την πήξη του αίματος λόγω ασβεστίου (το ασβέστιο-Ca που υπάρχει στο αίμα είναι ένα από τα κύρια στοιχεία που βοηθούν στην πήξη του), παρέχοντας έτσι ακριβή και αναπαραγώγιμα δεδομένα γονιδιακής έκφρασης.

3. Στην συνέχεια, τα δείγματα αποθηκεύονταν προσωρινά (για περίπου 2 με 3 ώρες) εντός μίας κινητής μονάδας συντήρησης (φορητό ψυγείο) προτού αποθηκευτούν σε συμβατική κατάψυξη (οικιακή συσκευή ψύξης), η οποία άγγιζε την θερμοκρασία των -18°C .

4. Μετά την λήξη κάθε περιστατικού, που παρακολουθούσαμε, συλλέγαμε βασικά δεδομένα των ασθενών όπως το φύλλο, η ηλικία, το είδος της ιατρικής πράξης στην οποία υποβλήθηκαν και τα αντίστοιχα στοιχεία της ιατρικής πράξης όπως τη συνολική δόση και τον χρόνο ακτινοβόλησης του ασθενούς. Τα παραπάνω δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν στη δημιουργία των γραφημάτων έτσι ώστε να μπορέσουμε να συσχετίσουμε την απορροφούμενη δόση με την έκφραση του γονιδίου FDXR.

5. Τέλος, περίπου 24 ώρες (±2μιση ώρες) μετά την λήξη του περιστατικού, προτού οι ασθενείς πάρουν εξιτήριο, οι νοσηλεύτριες του παιδοκαρδιολογικού τομέα του νοσοκομείου φρόντιζαν να πάρουν άλλα 3ml, ακτινοβολημένου πια, αίματος των ασθενών. Η αναμονή των 24 ωρών πριν την λήψη του 2^{ου} δείγματος ήταν απαραίτητη λόγω του ότι το γονίδιο FDXR χρειάζεται ένα μεγάλο χρονικό διάστημα για να ρυθμιστεί έτσι ώστε να παρουσιάσει αξιοσημείωτη μεταβολή στην έκφρασή του. (O'Brien G., et al., 2018) Τα ακτινοβολημένα δείγματα ακολουθούσαν την ίδια πορεία συντήρησης όπως αναφέρεται και για τα δείγματα προ ακτινοβόλησης στο βήμα (3).

Η παραπάνω διαδικασία των πέντε αυτών βημάτων πραγματοποιήθηκε επιτυχώς για 28 ασθενείς. Συνεπώς, συλλέχθηκαν συνολικά 56 δείγματα αίματος, αφού από κάθε ασθενή παίρναμε ένα ζεύγος δειγμάτων (ένα πριν και ένα μετά την ακτινοβόληση). Μόλις συλλέχθηκαν τα 12 πρώτα ζεύγη δειγμάτων μεταφέρθηκαν για ανάλυση στο μικροβιολογικό εργαστήριο της Ιατρικής Σχολής Αθηνών του ΕΚΠΑ με την χρήση της μεθόδου SYBR Green q-PCR (η οποία αναλύθηκε με ακρίβεια στην παράγραφο 4.4). Έτσι για αυτήν την πρώτη δόση δειγμάτων κατορθώσαμε να πάρουμε την έκφραση του γονιδίου FDXR, η οποία με τη σειρά της μας καθοδήγησε για την συλλογή των επόμενων 16 ζευγών δειγμάτων. Με την έννοια ‘‘καθοδήγηση’’ εννοούμε ότι στοχεύαμε πια στην συλλογή δειγμάτων, των οποίων οι ασθενείς είχαν απορροφήσει μεγαλύτερες δόσεις ακτινοβολίας από αυτές των 12 πρώτων ζευγών, έτσι ώστε να δούμε μέχρι ποιο βαθμό θα έφτανε η διακύμανση των τιμών της έκφρασης του γονιδίου. Από την ανάλυση όλων των δειγμάτων συνολικά από 28 ασθενείς εξαιρέθηκαν οι 3 διότι είχαν υπερβολικά μικρές δόσεις (DAP) της τάξης του $1{,}1\mu Gm^2$.

Στα επόμενα κεφάλαια παρουσιάζονται τα πειραματικά δεδομένα καθώς και η επεξεργασία τους για την εύρεση συσχετίσεων μεταξύ της απορροφούμενης δόσης από τους ασθενείς και της αλλαγής της έκφρασης του γονιδίου FDXR.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Παρουσίαση και επεξεργασία πειραματικών δεδομένων

- Ο παρακάτω πίνακας απεικονίζει τα στοιχεία των ασθενών, των ιατρικών πράξεων στις οποίες υποβλήθηκαν και τα αποτελέσματα της μεθόδου SYBR Green q-PCR για την έκφραση του γονιδίου FDXR.

Ασθενής [A/A]	**Φύλλο [M/F]**	**Βάρος [kg]**	**Ηλικία [years]**	**DAP [μGm^2]**	**Χρόνος Ακτινοβόλησης [min]**	**Χρόνος μεταξύ Α και Β Δείγματος [hours]**	**Έκφραση FDXR [μεταξύ Α και Β]**	**Σχόλια [είδος ιατρικής πράξης]**
1	M	31,2	9,8	19,06	0,9	27	2,64	Ablation*1
2	F	47,5	13,4	282,16	7,6	23,5	-1,32	Ablation
3	M	26,7	8,4	128,65	7,0	25	-1,71	Ablation
4	M	51,2	14,0	200,21	2,9	24	-2,00	Ablation
5	F	53,9	16,0	16,41	0,5	20,5	2,46	Ablation
6	F	34,5	10,4	273,39	4,1	26,5	1,10	ASD*2
7	M	61,2	16,9	5278,70	14,6	23,5	-1,21	Βαλβίδα
8	M	10,9	1,5	52,23	4,0	27	2,22	-
9	M	46,2	13,1	85,21	3,5	25	2,28	Ablation
10	M	75,0	23,0	8,00	0,3	23	2,22	Αντικατάσταση βηματοδότη
11	F	40,0	11,5	1122,70	11,5	24	2,32	Μπαλονάκι*3
12	M	45,4	12,9	671,11	12,3	23	1,89	Check-up
13	M	66,7	17,8	170,60	1,7	22	1,32	Ablation
14	M	26,2	8,2	141,00	1,7	25	1,46	ASD
15	F	48,1	13,6	285,19	14,1	24,5	-1,41	Ablation
16	F	55,7	17,5	3738,70	26,3	25	4,00	*4
17	F	44,0	12,5	556,97	3,7	25	1,26	ASD
18	F	7,3	0,5	99,25	3,4	25,5	3,25	-
19	F	31,0	9,5	39,98	3,8	27	-1,31	Ablation
20	F	48,4	13,7	1,29	0,1	23,5	1,57	Ablation
21	M	43,2	12,5	168,82	6,7	26	1,10	Ablation
22	F	55,2	17,0	913,41	4,6	25	4,20	Μπαλονάκι
23	M	43,6	12,6	1163,70	6,0	22,5	-1,54	ASD
24	M	63,0	16,5	1322,00	3,2	22	3,48	ASD
25	M	9.2	0,8	228,01	6,4	24	1,96	*5

Πίνακας 4: Πειραματικά Δεδομένα

- Σχόλια πάνω στα πειραματικά δεδομένα του Πίνακα 4:

1. Από τους 25 ασθενείς: 11 ήταν κορίτσια [F for Females] και 14 ήταν αγόρια [M for Males].

2. Ένας εκ των 25 ασθενών είναι άνω των 18 ετών [ασθενής (10)], αλλά εντάσσεται στους παιδιατρικούς ασθενείς έχοντας συγγενές καρδιολογικό νόσημα, παρόλα αυτά δεν συμπεριλήφθηκε στην παρακάτω επεξεργασία.

3. Δύο ασθενείς εκ των 25 θεωρούνται βρέφη, δηλαδή η ηλικία τους ήταν κάτω του ενός έτους, πράγμα το οποίο τους καθιστά ακόμα πιο ακτινοευαίσθητους.

4. Σε 7 εκ των 25 ασθενών η έκφραση του γονιδίου προέκυψε με αρνητικό πρόσημο, δεδομένου του ότι δεν μπορέσαμε να ερμηνεύσουμε την προέλευση αυτής της αρνητικής μεταβολής της έκφρασης του γονιδίου προτιμήσαμε να μην τις συμπεριλάβουμε στην σχεδίαση των γραφημάτων του επόμενου κεφαλαίου.

5. *1 => Ablation: Ενδοαγγειακή κατάλυση καρδιακών αρρυθμιών

6. *2 => ASD (Atrial Septal Defects): Αντιμετώπιση μεσοκολπικής διαταραχής (ή η κοινώς γνωστή ονομασία της ‘‘ομπρέλα’’)

7. *3 => Με τον όρο μπαλονάκι εννοούμε την αντίστοιχη αγγειοπλαστική με χρήση της προαναφερθείσας μεθόδου.

8. *4 => η ασθενής (16) ξεκίνησε για check-up της ενδοπρόθεσης (stent) στην πνευμονική της αρτηρία και προέκυψε πρόβλημα μετά την αγγειοπλαστική στην πνευμονική αρτηρία, όπου ένα ανοιχτό αγγείο πέταγε μη οξυγονωμένο αίμα στην δεξιά κοιλία.

9. *5 => ο ασθενής (25) είχε μία σπάνια καρδιαγγειακή νόσο.

- Η στήλη των DAP στον Πίνακα 4 αφορά το Dose Area Product, το οποίο ορίζεται ως το γινόμενο της επιφάνειας της διατομής μιας δέσμης ακτίνων X με το μέσο όρο του (air) Kerma πάνω από αυτήν την διατομή. Αποτελεί το πιο σύνηθες χρησιμοποιούμενο μέγεθος για την εκτίμηση της ακτινοβολίας που έλαβε ο ασθενής. Αυτό συμβαίνει για το λόγο του ότι δεν εξαρτάται από την

απόσταση (d), την οποία υπολογίζεται η δόση εισόδου του ασθενούς. Πιο συγκεκριμένα, η δόση μειώνεται με βάση τον παράγοντα $^{1}/_{d^2}$, ενώ το εμβαδό αυξάνει με το d^2. Οπότε καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το γινόμενο της έντασης της ακτινοβολίας επί το εμβαδόν της ακτινοβολούμενης περιοχής παραμένει ανεξάρτητο της απόστασης. Τέλος, έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι το DAP σχετίζεται άμεσα με τον υπολογισμό της ενεργού δόσης, πράγμα το οποίο μας βοήθησε να κάνουμε την επεξεργασία που φαίνεται παρακάτω (Ανδρέου Κ.,2016).

- Με βάση τα δεδομένα του Πίνακα 4 μετατρέψαμε την ηλικία από χρόνια σε μήνες, το DAP από [μG*m^2] σε [Gy*cm^2] και βρήκαμε τον συντελεστή του DAP ως προς το βάρος [Body Weight, BW] των ασθενών, προκειμένου να βρούμε μετά την ενεργό δόση με την οποία ακτινοβολήθηκαν οι ασθενείς. Έτσι λοιπόν προέκυψε ο παρακάτω Πίνακας 5 των πειραματικών δεδομένων:

Ασθενής [A/A]	**Ηλικία [months]**	**DAP [Gy*cm^2]**	**DAP/BW**
1	117,6	0,19	0,0061
2	160,8	2,82	0,0594
3	100,8	1,29	0,0482
4	168,0	2,00	0,0391
5	192,0	0,16	0,0030
6	124,8	2,73	0,0792
7	202,8	52,79	0,8625
8	18,0	0,52	0,0479
9	157,2	0,85	0,0184
10	276,0	0,08	0,0011
11	138,0	11,23	0,2807
12	154,8	6,71	0,1478
13	213,6	1,71	0,0256
14	98,4	1,41	0,0538
15	163,2	2,85	0,0593
16	210,0	37,39	0,6712
17	150,0	5,57	0,1266
18	6,0	0,99	0,1360
19	114,0	0,40	0,0129
20	164,4	0,01	0,0003
21	150,0	1,69	0,0391
22	204,0	9,13	0,1655
23	151,2	11,64	0,2669
24	198,0	13,22	0,2098
25	9,6	2,28	0,2478

Πίνακας 5: Πειραματικά δεδομένα μετά από επεξεργασία των στοιχείων του Πίνακα 4

- Η ενεργός δόση (Effective Dose, ED) υπολογίστηκε με βάση το ολικό DAP και με χρήση κατάλληλων παραγόντων μετατροπής (k-factors). Στην κλινική πράξη δεν είναι εύκολο να γνωρίζουμε την τιμή της απορροφούμενης δόσης στα διάφορα όργανα. Πρακτικά η ενεργός δόση για ακτινοσκοπικές διαδικασίες υπολογίζεται από το γινόμενο δόσης-επιφάνειας (Dose Area Product-DAP) με τη χρήση κατάλληλων παραγόντων, γνωστοί ως k-factors, μέσω της σχέσης.

- Το μέγεθος DAP είναι πλέον εύκολο να εξαχθεί καθώς τα σύγχρονα αγγειογραφικά συστήματα μετά το τέλος της εξέτασης δημιουργούν ειδική αναφορά, η οποία περιέχει πληροφορίες για τα δοσιμετρικά δεδομένα (dose info ή dose report). Όσον αφορά τους k-factors, στην βιβλιογραφία υπάρχουν ελάχιστα δεδομένα για παιδιατρικές επεμβατικές καρδιολογικές διαδικασίες (Schmidt PWE, et. al., 2000 και Karambatsakidou A., et. al., 2009). Επιπλέον, οι ήδη δημοσιευμένοι παράγοντες αναφέρονται σε αγγειογραφικά συστήματα παλαιότερης τεχνολογίας τα οποία τείνουν να εκλείψουν, ενώ παράλληλα δεν λαμβάνουν υπόψη τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά και το φύλο του ασθενούς. Στην μελέτη αυτή η ενεργός δόση υπολογίστηκε με k-factors που αναφέρονται σε συστήματα σύγχρονης τεχνολογίας και συνυπολογίζουν το μέγεθος, την ηλικία και το φύλο του ασθενούς, κάτι που είναι ιδιαίτερα σημαντικό στην παιδιατρική δοσιμετρία λόγω της μεγάλης διακύμανσης που παρουσιάζουν τα παιδιά στο μέγεθός τους ανάλογα με την ηλικία τους.

- Οι παράγοντες μετατροπής βασίστηκαν στη δημοσίευση του Schmidt και των συνεργατών του (Schmidt PWE, Dance DR, et. al., 2000) λαμβάνοντας υπόψη το βάρος των ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη. Η ενεργός δόση υπολογίστηκε για κάθε ασθενή σύμφωνα με την σχέση: $ED = 9.28 \left[\frac{kg*mSv}{Gy^1*cm^2}\right] * \frac{DAP}{BW}$, όπου DAP το συνολικό DAP που προέρχεται από τις δύο λυχνίες A και B και BW το βάρος του ασθενούς.

- Έτσι προκύπτει ο παρακάτω Πίνακας 6 ενεργού δόσης των ασθενών:

Ασθενής [A/A]	**Ενεργός Δόση, ED [mSv]**
1	0,057
2	0,551
3	0,447
4	0,363
5	0,028
6	0,735
7	8,004
8	0,445
9	0,171
10	0,010
11	2,605
12	1,372
13	0,237
14	0,499
15	0,550
16	6,229
17	1,175
18	1,262
19	0,120
20	0,002
21	0,363
22	1,536
23	2,477
24	1,947
25	2,300

Πίνακας 6: Ενεργός δόση με την οποία ακτινοβολήθηκαν οι ασθενείς

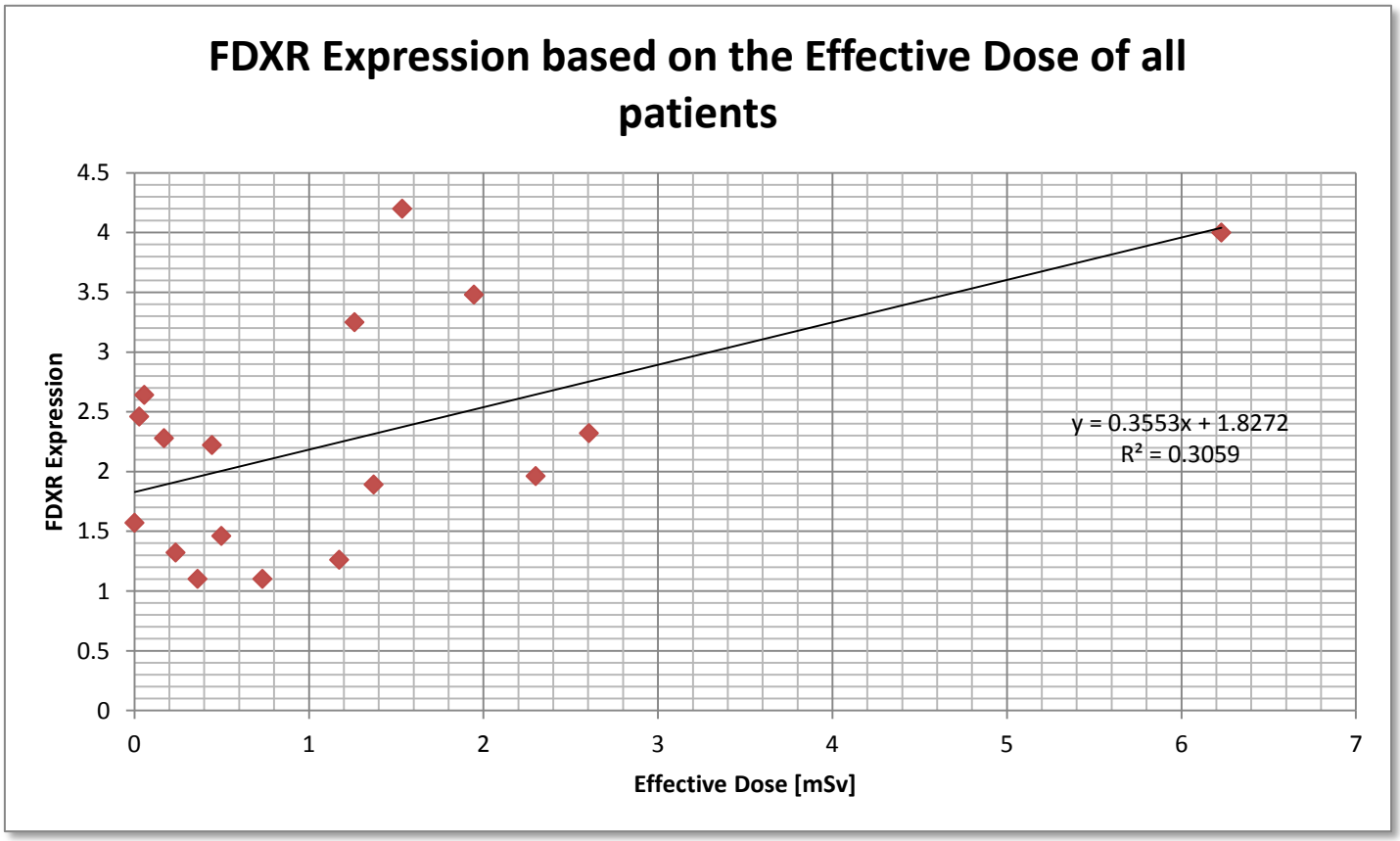
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

Αποτελέσματα και συμπεράσματα

7.1 Παρουσίαση γραφικών παραστάσεων

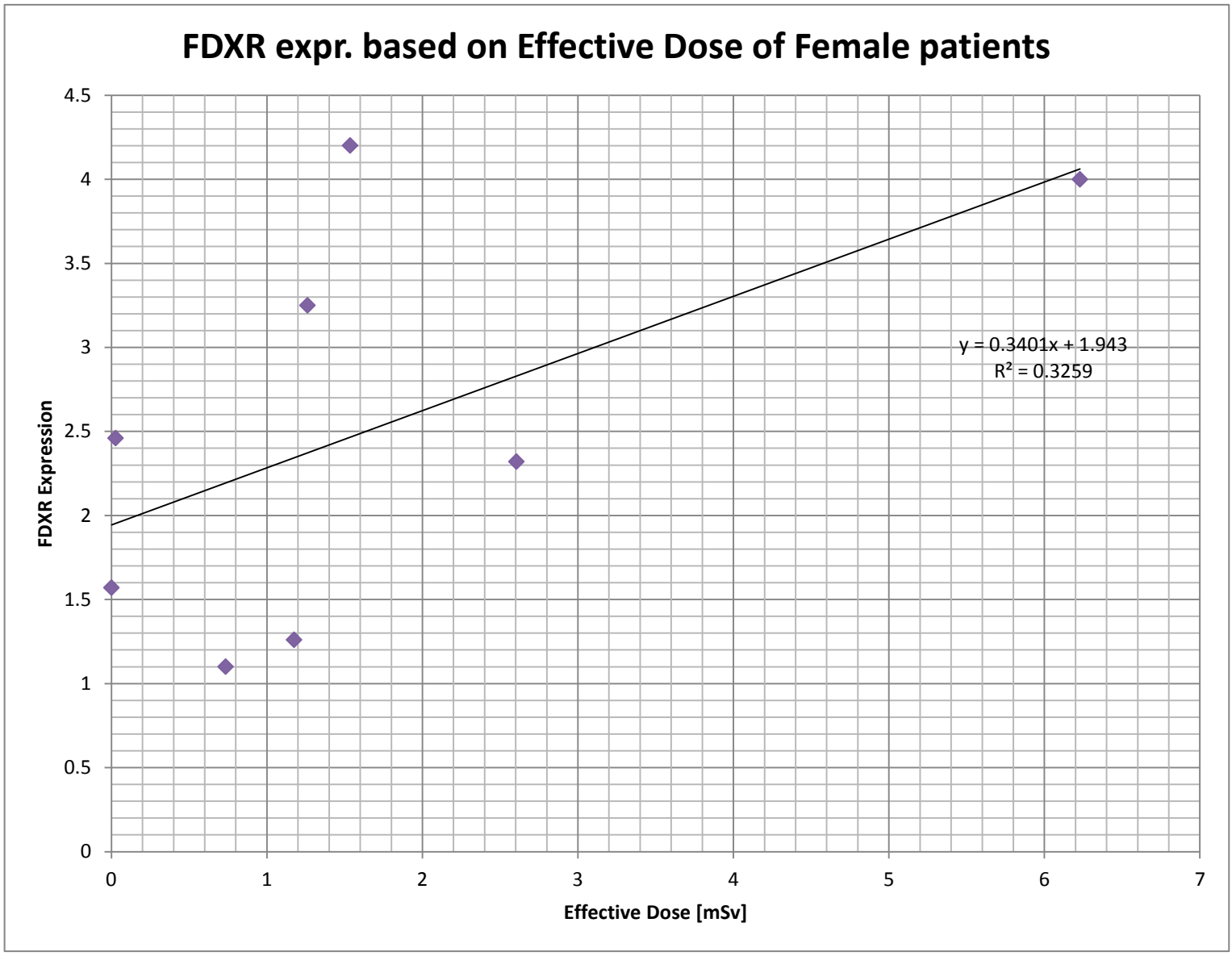
Με βάση τώρα τα δεδομένα των πινάκων 4, 5 και 6, του προηγούμενου κεφαλαίου, θα παραστεί γραφικά η εξάρτηση της έκφρασης του γονιδίου FDXR συναρτήσει της ενεργού δόσης. Προκειμένου να κατανοηθεί καλύτερα αυτή η εξάρτηση και να είμαστε σε θέση να βγάλουμε περισσότερα και πιο ακριβή συμπεράσματα, εκτός του ολικού γραφήματος έκφρασης-δόσης που θα αφορά όλους τους ασθενείς, διεξήχθησαν και γραφήματα με βάση το φύλλο και το βάρος των ασθενών. Να υπενθυμίσουμε πως σε όλα τα παρακάτω γραφήματα δεν έχουν συμπεριληφθεί τα ζεύγη πειραματικών δεδομένων ([Effective Dose, FDXR Expression]) των ασθενών οι οποίοι παρουσίασαν αρνητική τιμή στην έκφραση του γονιδίου.

- Το ολικό γράφημα για όλους τους ασθενείς και ο έλεγχος γραμμικότητας ανάμεσα στην ενεργό δόση και την έκφραση του γονιδίου.

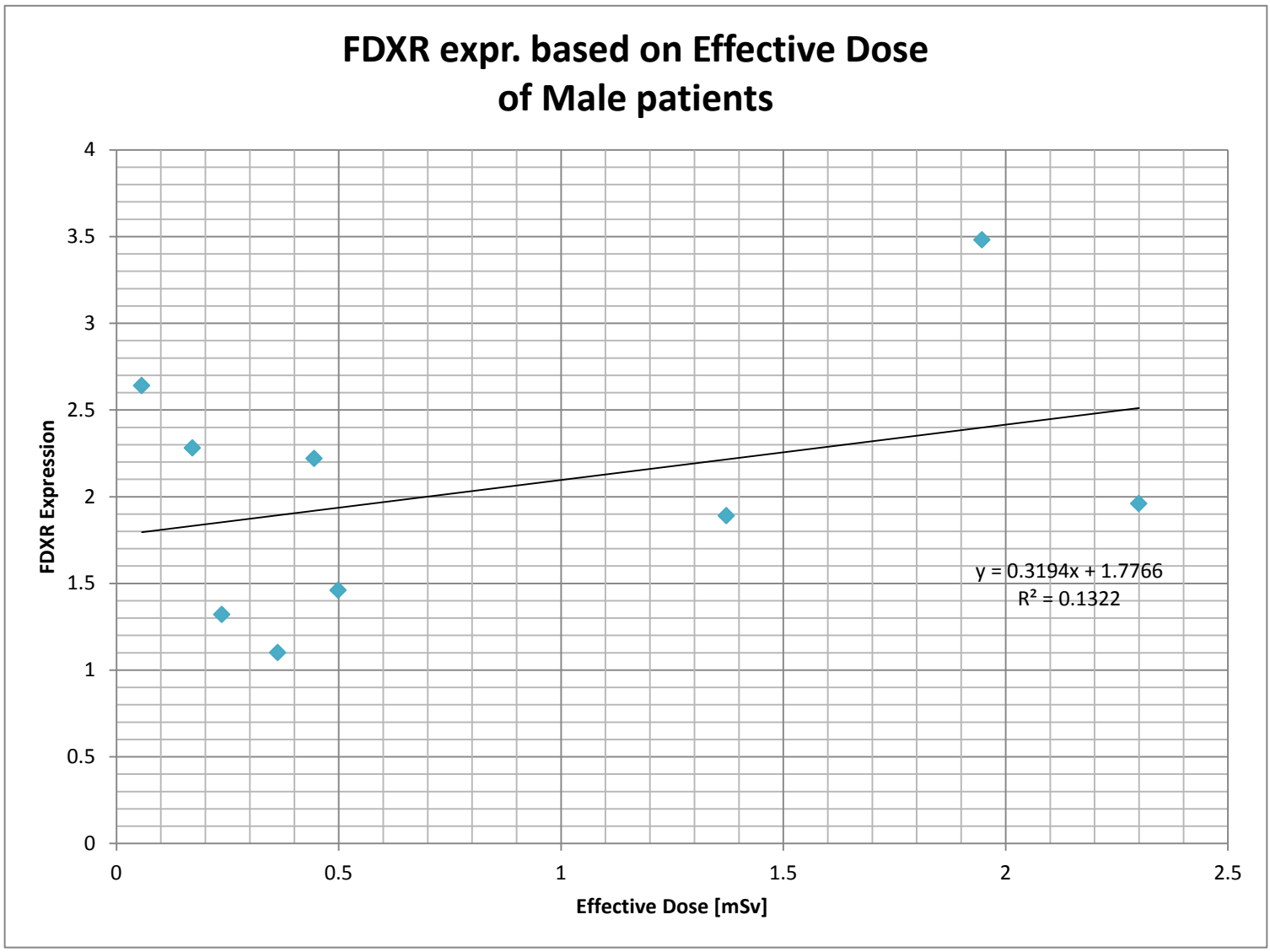


Γραφική Παράσταση 1: Γράφημα έκφρασης FDXR - ενεργού δόσης (ED) για όλους τους ασθενείς και έλεγχος γραμμικότητάς του

- Τα γραφήματα της έκφρασης του FDXR συναρτήσει της ενεργού δόσεις για τα δύο φύλα ξεχωριστά και τα αντίστοιχα κομμάτια όπου παρουσιάστηκε γραμμικότητα ανάμεσα στα 2 μεγέθη:

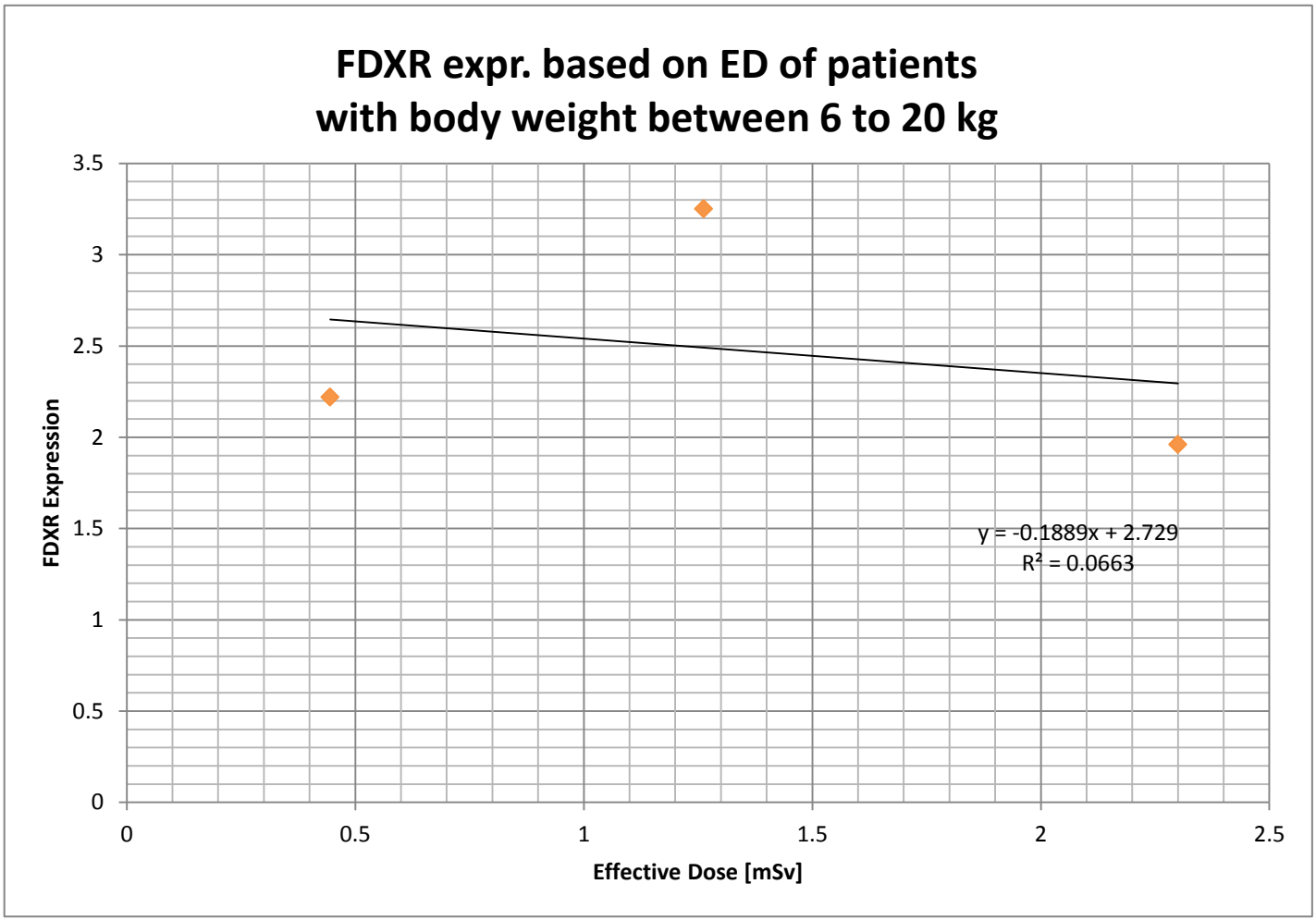


Γραφική Παράσταση 2: Γράφημα έκφρασης FDXR - ενεργού δόσης (ED) για τους ασθενείς θηλυκού γένους και έλεγχος γραμμικότητάς του

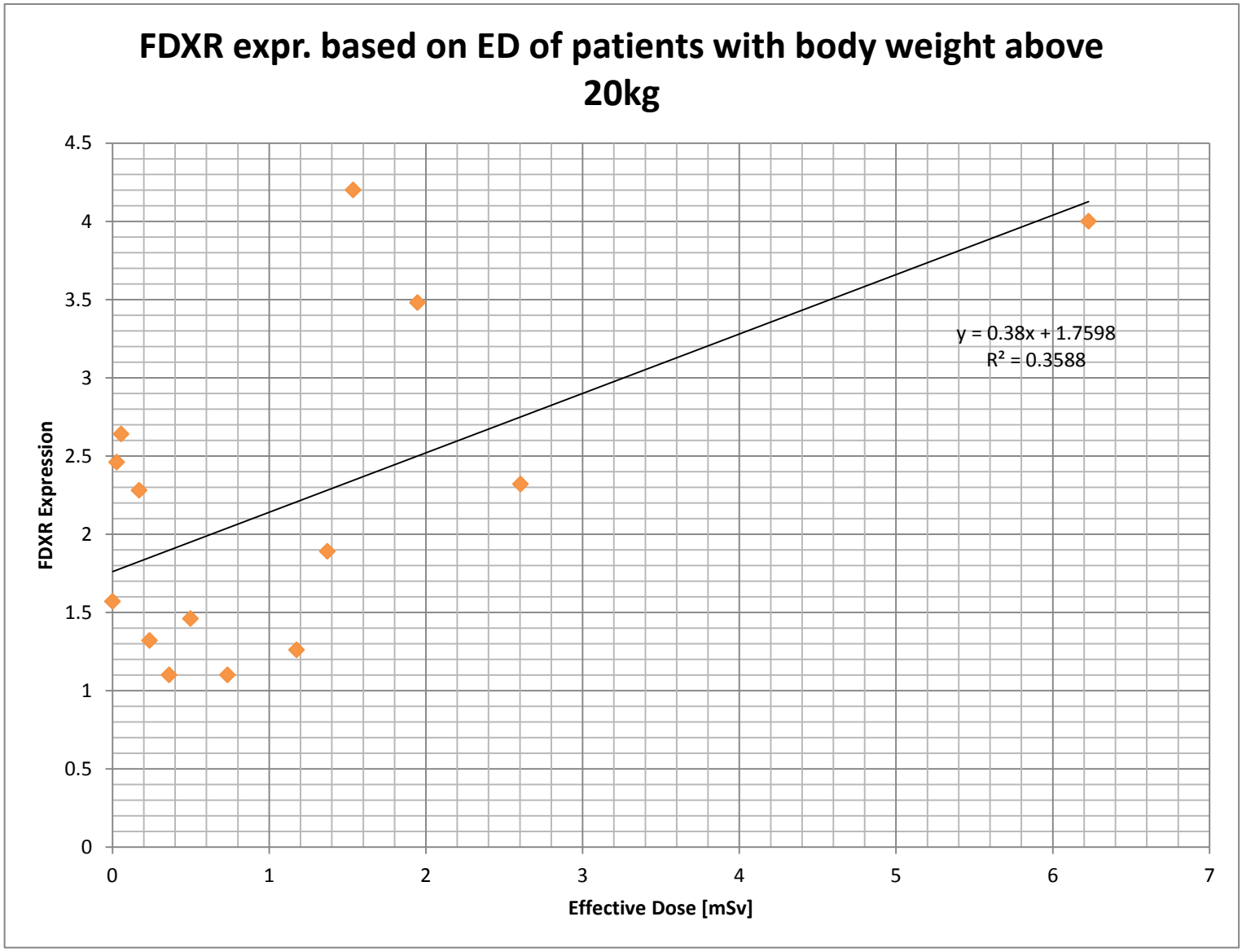


Γραφική Παράσταση 3: Γράφημα έκφρασης FDXR - ενεργού δόσης (ED) για τους ασθενείς αρσενικού γένους και έλεγχος γραμμικότητάς του

- Τα γραφήματα της έκφρασης του FDXR συναρτήσει της ενεργού δόσης για τρεις διαφορετικές ομάδες ασθενών με βάση το βάρος τους. Αυτές οι ομαδοποιήσεις προέκυψαν με βάση τα πρωτόκολλα του αγγειογράφου του ΩΚΚ και είναι για ασθενείς βάρους από 0 έως 6 κιλά, από 6 έως 20 κιλά και από 20 και άνω κιλά. Δυστυχώς, δεν συμμετείχαν στην έρευνα ασθενείς της 1^{ης} ομάδας (0-6kg), οπότε παρακάτω φαίνονται τα γραφήματα των ασθενών 6-20kg και 20kg και άνω.



Γραφική Παράσταση 4: Γράφημα έκφρασης FDXR - ενεργού δόσης (ED) για ασθενείς με βάρος μεταξύ 6 και 20 κιλών και έλεγχος γραμμικότητάς του



Γραφική Παράσταση 5: Γράφημα έκφρασης FDXR - ενεργού δόσης (ED) για ασθενείς με βάρος άνω των 20 κιλών και έλεγχος γραμμικότητάς του

7.2 Σχολιασμός Αποτελεσμάτων

Μετά την μελέτη όλων των γραφημάτων που παραθέσαμε μπορέσαμε να καταλήξουμε στο ότι σε όλους τους παιδιατρικούς ασθενείς παρατηρήθηκε μία αλλαγή στην έκφραση του γονιδίου μετά την ακτινοβόλησή τους κατά την σταδιακή αύξηση της ενεργού δόσης. Πιο αναλυτικά τα συμπεράσματά μας ήταν τα εξής:

1. Παρατηρήθηκε μία καλή γραμμική συσχέτιση μεταξύ της αύξησης της ενεργού δόσης και της αλλαγής της έκφρασης του γονιδίου FDXR.

2. Οι παιδιατρικοί ασθενείς θηλυκού γένους παρουσίασαν πιο έντονη αύξηση στην έκφραση του γονιδίου συγκριτικά με τους ασθενείς αρσενικού γένους για τα ίδια μεγέθη ενεργού δόσης. Ωστόσο, η πιθανή αυτή μεγαλύτερη υπερέκθεση της έκφρασης του γονιδίου των κοριτσιών συγκριτικά με αυτή των αγοριών θα πρέπει να διερευνηθεί με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών.

3. Στους παιδιατρικούς ασθενείς κάτω των 20 κιλών παρατηρήθηκαν σχετικά μεγάλες τιμές αλλαγής έκφρασης του γονιδίου FDXR παρά τις μικρές τιμές της ενεργούς δόσης, δεδομένου ότι όσο πιο νέος ηλικιακά είναι ένας ασθενής τόσο πιο ακτινοευαίσθητος είναι. Για την κατηγορία άνω των 20 κιλών η συμπεριφορά είναι ίδια με το αρχικό συμπέρασμα. (1)

7.3 Σύγκριση αποτελεσμάτων με αυτά της βιβλιογραφίας

Εξ όσων γνωρίζουμε είναι η πρώτη φορά που μελετάται η έκφραση του γονιδίου FDXR συναρτήσει της ενεργού δόσης που λαμβάνουν παιδιατρικοί ασθενείς κατά τη διεξαγωγή επεμβατικών καρδιολογικών πράξεων. Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν μόνο δύο δημοσιευμένες μελέτες (O'Brien Gráinne, et al., 2018 και Lourdes Cruz-Garcia et al., 2020), σχετικά με την έκφραση του γονιδίου FDXR συναρτήσει της δόσης ιοντίζουσας ακτινοβολίας σε ενήλικους ασθενείς.

Ο O'Brien Gráinne και οι συνεργάτες του πραγματοποίησαν για πρώτη φορά φυσική και βιολογική δοσιμετρία χρησιμοποιώντας την έκφραση του γονιδίου FDXR. Σε αυτή τη μελέτη συλλέχθηκαν δείγματα αίματος από περίπου 50 ασθενείς που εκτέθηκαν *in vivo* σε ιοντίζουσα ακτινοβολία για μεγάλο εύρος δόσεων από 8 mGy – 7,25 Gy. Ωστόσο, στην περίπτωση των χαμηλών δόσεων που προήλθαν από διαγνωστικές πράξεις υπολογιστικής τομογραφίας CT και σε 10 ασθενείς, παρατηρήθηκε ελαφριά μεταβολή στην έκφραση του γονιδίου FDXR 24 ώρες μετά την έκθεση στην ακτινοβολία.

Δύο χρόνια μετά τον O'Brien Gráinne, έρχεται ο Lourdes Cruz-Garcia και οι συνεργάτες του να επαληθεύσουν τις προηγούμενες έρευνες πάνω στην εξάρτηση του FDXR από την ιοντίζουσα ακτινοβολία. Πιο αναλυτικά, σε ένα κομμάτι της έρευνας συλλέχθηκαν δείγματα αίματος από 10 υγιείς δότες (5 γυναίκες και 5 άντρες), τα

οποία είχαν εκτεθεί *ex vivo* σε ακτίνες Χ για ένα μεγάλος εύρος δόσεων (από 0,25 έως 5 Gy με ρυθμό ακτινοβόλησης 0,5 Gy/min). Τα δείγματα αυτά αφέθηκαν να επωασθούν για 24 ώρες στους 37°C. Επιπλέον, συλλέχθηκα και *in vivo* ακτινοβολημένα δείγματα από 2 ασθενείς με λευχαιμία 24 ώρες μετά την πρώτη συνεδρία του πλάνου θεραπείας τους, όπου είχαν εκτεθεί σε ολόσωμη ακτινοβόληση (Total Body Irradiation patients – TBI patients) και από 8 ασθενείς με καρκίνο του ενδομητρίου 24 ώρες μετά την μερική ακτινοβόλησή τους (Partial Body Irradiation patients- PBI patients), της οποίας η δόση ήταν 1,8 Gy. Για όλες τις προαναφερθείσες κατηγορίες δειγμάτων από υγιείς, TBI και PBI δότες έγινε ανάλυση, προκειμένου να καταγραφεί η έκφραση 8 γνωστών παραλλαγών του γονιδίου FDXR (FDXR-201+, FDXR-214, FDXR-204, FDXR-202, FDXR-217, FDXR-203, FDXR-205, FDXR-206). Σε όλες αυτές τις παραλλαγές και για 4 νέες παρουσιάστηκε αύξηση της έκφρασής τους, με μεγαλύτερη (κατά 40 μονάδες) αυτή του FDXR-206 για την δόση των 4Gy.

Παρόλη αυτή την μεγάλη διαφορά στο εύρος δόσεων και την διαφορά ηλικίας το γενικό συμπέρασμα τόσο των ερευνών της βιβλιογραφίας όσο και της δικιάς μας κατέληξε να είναι το ίδιο: το γονίδιο FDXR παρουσιάζει σημαντική μεταγραφική αύξηση 24 ώρες μετά την ακτινοβόληση στην πλειοψηφία των ασθενών. Επίσης, φαίνεται η αύξηση αυτή να εξαρτάται άμεσα από την δόση ακτινοβολίας που απορρόφησε ο εκάστοτε ασθενής αλλά και από την κλινική εικόνα του ασθενούς. Πράγμα το οποίο καθιστά το FDXR έναν αξιόπιστο βιοδείκτη από τον οποίο μπορούμε να εκτιμήσουμε την εξατομικευμένη δόση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας.

7.4 Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Η ανάγκη για βελτιστοποίηση όλων των επεμβατικών ιατρικών πράξεων που χρησιμοποιούν ιοντίζουσα ακτινοβολία είναι απαραίτητη για να πραγματοποιηθεί με επιτυχία μία θεραπεία ή διάγνωση ενός ασθενούς με την ελάχιστη δυνατή δόση. Ιδιαίτερα, στους παιδιατρικούς ασθενείς που παρουσιάζουν αυξημένη ακτινοευαισθησία και πολύ μεγαλύτερο προσδόκιμο ζωής συγκριτικά με τους ενήλικες, η ανάγκη αυτή είναι μεγαλύτερη. Στόχος είναι η εξατομικευμένη εκτίμηση της απορροφούμενης δόσης ιοντίζουσας ακτινοβολίας για τη βελτιστοποίηση των κλινικών πρωτοκόλλων καθώς και την εκτίμηση του ενεχόμενου κινδύνου ακτινογενούς καρκινογένεσης, δηλαδή πρόκλησης καρκίνου λόγω έκθεσης σε ιοντίζουσα ακτινοβολία, ο οποίος είναι έντονα εξαρτώμενος από την ηλικία ακτινοβόλησης.

Όπως αποδείχθηκε στην παρούσα έρευνα για παιδιατρικούς ασθενείς και έχει αποδειχθεί πρόσφατα για ενήλικους, η έκφραση του γονιδίου FDXR θα μπορούσε να αποτελέσει έναν πολύ χρήσιμο δείκτη βιοδοσιμετρίας. Ωστόσο, η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μας θα βελτιωνόταν με την επανάληψη του πειράματος με :

- Μεγαλύτερο εύρος δόσεων ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Δυστυχώς κατορθώσαμε να υλοποιήσουμε το πείραμα ως επί το πλείστον με χαμηλές δόσεις ΙΑ (με τη μεγαλύτερη εξ αυτών να είναι 6,229mSv), πράγμα το οποίο δεν μας επέτρεψε να βγάλουμε συμπεράσματα για την συμπεριφορά της έκφρασης του FDXR σε μεγάλες δόσεις στους παιδιατρικούς ασθενείς.

- Τον προσδιορισμό του βαθμού επιρροής της έκφρασης του γονιδίου από παράγοντες όπως ηλικία, φύλο, βάρος, ιατρικό ιστορικό και κλινικό περιβάλλον των ασθενών. Στην παρούσα έρευνα φαίνεται τα αποτελέσματά μας να επηρεάζονται από μερικούς από τους παραπάνω παράγοντες π.χ. φύλο και βάρος, ωστόσο ο αριθμός των δειγμάτων ήταν μικρός για να διεξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για το βαθμό επιρροής.

Επιπλέον, μία ενδιαφέρουσα ιδέα θα ήταν και η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της αλλαγής της έκφρασης του γονιδίου FDXR πραγματοποιώντας την ίδια πειραματική διαδικασία, αλλά για *ex vivo* ακτινοβόληση των δειγμάτων αίματος. Κατά αυτό τον τρόπο θα μπορούσε να διερευνηθεί και η επίδραση που μπορεί να έχει στο αίμα το κλινικό περιβάλλον του ασθενούς κατά την *in vivo* ακτινοβόληση στο βαθμό έκφρασης του γονιδίου. Εξίσου ενδιαφέρουσα θα ήταν και η παρατήρηση της συμπεριφοράς της έκφρασης του γονιδίου FDXR μετά την ακτινοβόληση του κι από ένα άλλο είδος ιοντίζουσας ακτινοβολίας, π.χ. ακτίνες γ, πρωτόνια, κ.α. Τέλος, θα πρέπει επίσης να διερευνηθεί που οφείλονται οι αρνητικές τιμές αλλαγής έκφρασης του γονιδίου FDXR.

Τα αποτελέσματα της προτεινόμενης μελέτης εκτιμάται ότι θα επιτρέψουν τον υπολογισμό της δόσης ακτινοβολίας που λαμβάνει ο κάθε παιδιατρικός ασθενής σε επεμβατικές καρδιολογικές πράξεις και τη βελτιστοποίηση των εφαρμοζόμενων πρωτοκόλλων. Παράλληλα, η μελέτη αυτή αναμένεται να συμβάλλει στην ανάδειξη της σημασίας της ακτινοπροστασίας του παιδιατρικού πληθυσμού που υποβάλλεται σε επεμβατικές καρδιολογικές διαδικασίες με χρήση ιοντίζουσας ακτινοβολίας.

Παράρτημα Ι - Ευρετήριο Όρων

*1 Ριβοφλαβίνη (World Health Organization, 2019): Η ριβοφλαβίνη, γνωστή και ως βιταμίνη Β2, βρίσκεται στις τροφές και στα συμπληρώματα διατροφής. Αποτελεί συστατικό των συνενζύμων FAD και FMN (το μονονουκλεοτίδιο της φλαβίνης ή FMN και το δινουκλεοτίδιο φλαβίνης αδενίνης ή FAD) και εμπλέκεται σε ζωτικής σημασίας μεταβολικές και ενζυμικές διεργασίες του οργανισμού για τον μεταβολισμό των αμινοξέων, των λιπών και των υδατανθράκων. Δεν επηρεάζεται από θερμότητα, οξείδωση ή όξινο περιβάλλον, όπως άλλες βιταμίνες του συμπλέγματος Β. Καταστρέφεται όμως από το φως-ακτινοβολία, το νερό και τα αλκάλια.

*2 Συνένζυμο NADPH (= Φωσφορική Δινουκλεοτιδική Αδενίνη Νικοτιναμιδίου) (Spaans SK, et. al., 2015): Ένζυμα που χρησιμοποιούν NADPH ως συνένζυμο, δηλαδή μεταφέρουν 2 ηλεκτρόνια από το NADPH στο FAD. Στα σπονδυλωτά, χρησιμεύει ως το πρώτο ένζυμο στην αλυσίδα των συστημάτων μιτοχονδρίων P450 που συνθέτουν στεροειδείς ορμόνες.

ΙδιότητεςNADPH:
i) μείωση της οξείδωσης που εμπλέκεται στην προστασία από την τοξικότητα των δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), προκειμένου να υπάρξει αναγέννηση της γλουταθειόνης (GSH)

ii) χρησιμοποιείται για αναβολικές οδούς, όπως σύνθεση χοληστερόλης και επιμήκυνση αλυσίδα λιπαρών οξέων

iii) δημιουργία ελεύθερων ριζών σε ανοσοκύτταρα από την NADPH οξειδάση. Αυτές οι ρίζες χρησιμοποιούνται για να καταστρέψουν τους παθογόνους παράγοντες σε μία διαδικασία που λέγεται αναπνευστική έκρηξη.

*3 Κυτόχρωμα-P450 (Zhang Lu, et.al., 2015): Το κυτόχρωμα P450 (CYP450) είναι ένας τύπος ενζύμων που συμμετέχουν στον οξειδωτικό μεταβολισμό των φαρμάκων *in vivo* και μπορεί να αλλάξει την φαρμακοκινητική και την αποτελεσματικότητα των φαρμάκων. Το κυτόχρωμα P450 βρίσκεται σε όλους σχεδόν τους ιστούς αλλά σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στις μιτοχονδριακές μεμβράνες ή στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων του ήπατος. Τα ένζυμα του CYP450 ανήκουν στην υπεροικογένεια των πρωτεϊνών που περιέχουν μια αίμη και ως εκ τούτου είναι αιμοπρωτείνες. Όταν ο σίδηρος της αίμης είναι Fe2+ τότε το κυτόχρωμα P450 μπορεί να συνδέεται με CO και να σχηματίζει ένα σύμπλοκο, το οποίο απορροφάει στα 450 nm. Το κυτόχρωμα P450 παίζει σημαντικό ρόλο στην ένταση και στη διάρκεια δράσης των φαρμάκων.

*4 Διαδικασία μεταγραφής (Θεοτόκης Π., 2018, Αλεξίου Ζ., 2016): Στη βιολογία, μεταγραφή ονομάζεται το πρώτο στάδιο της γονιδιακής έκφρασης και περιγράφει τη διαδικασία κατά την οποία δημιουργείται ένα μόριο RNA, με χρήση μιας αλυσίδας του DNA ως προτύπου, της οποίας είναι συμπληρωματικό.

Χρησιμοποιείται ο όρος μεταγραφή γιατί η γενετική πληροφορία, στη γλώσσα του DNA, μεταγράφεται στη γλώσσα του RNA, με τη διαφορά πως η βάση ουρακίλη χρησιμοποιείται αντί της θυμίνης. Υπενθυμίζουμε ότι το RNA συνίσταται από ουρακίλη στη θέση της θυμίνης. Η διαδικασία αυτή συμβαίνει στον πυρήνα των ευκαριωτικών κυττάρων ή στο πυρηνοειδές των προκαρυωτικών, στα μιτοχόνδρια και στους χλωροπλάστες. Σκοπός της είναι να μεταφερθούν οι γενετικές πληροφορίες από το DNA στα ριβοσώματα, για να γίνει η πρωτεϊνοσύνθεση. Η μεταγραφή του DNA μπορεί να γίνει πολλές φορές ταυτόχρονα επιταχύνοντας τις διεργασίες του κυττάρου. Σπανίως η μεταγραφή γίνεται αντίστροφα δημιουργώντας DNA με καλούπι το RNA από ρετροϊούς με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση.

*5 Διαδικασία μετάφρασης (Θεοτόκης Π., 2018, Αλεξίου Ζ., 2016): Μετάφραση ονομάζεται το στάδιο της έκφρασης της γενετικής πληροφορίας κατά το οποίο δημιουργείται η πολυπεπτιδική αλυσίδα με βάση το mRNA . Η μετάφραση έπεται της μεταγραφής και προηγείται της αναδίπλωσης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Όπως και το προηγούμενο στάδιο, η μετάφραση στηρίζεται στη συμπληρωματικότητα των νουκλεϊκών οξέων και στη δημιουργία και διάσπαση των δεσμών υδρογόνου και τη δημιουργία των πεπτιδικών δεσμών.

*6 Ενέργεια σύνδεσης ηλεκτρονίου (W.N. Cottingham, et. al., 2002): Είναι η ενέργεια που απαιτείται να απορροφηθεί από ένα ηλεκτρόνιο για να εκδιωχθεί από την στιβάδα στην οποία περιστρέφεται γύρω από τον πυρήνα ενός ατόμου.

*7 Ελεύθερες ρίζες (IUPAC, 1997, Chalk S.J., 2019): Είναι ένα άτομο, μόριο ή ιόν στο οποίο κάποιο εξωτερικό τροχιακό δεν καταλαμβάνεται από ζεύγος ηλεκτρονίων, αλλά από ένα μόνο ηλεκτρόνιο (μονήρες) και για αυτό μπορεί να θεωρηθεί ότι έχει έναν ή περισσότερους εν δυνάμει ομοιοπολικούς δεσμούς. Αυτό καθιστά τις ελεύθερες ρίζες εξαιρετικά χημικά δραστικές έναντι άλλων χημικών ουσιών ή ακόμα και απέναντι σε άλλες ελεύθερες ρίζες.

*8 Ραδιόλυση (Tsipolitis G., 2011): Είναι ο διαχωρισμός των μορίων με ιοντίζουσα ακτινοβολία. Πιο αναλυτικά, είναι η διάσπαση ενός ή περισσοτέρων χημικών δεσμών που προκύπτουν από την έκθεση σε ροή υψηλής ενέργειας.

*9 Ανάλογο θυμιδίνης (Mokoto Is., et. al., 1989): Παραπλήσια χημική ουσία με τη θυμιδίνη, η οποία είναι νουκλεοτίδιο χωρίς φωσφορική ομάδα και συνδυάζεται με την αδενοσίνη (A) σε δίκλωνο DNA.

*10 Θειόλη (Patai S., et. al., 1974): Στην οργανική χημεία ως θειόλες αναφέρονται οι οργανικές ενώσεις που περιέχουν μια (τουλάχιστον) υδροθειομάδα (-SH), συνδεμένη με άτομο άνθρακα και εφόσον η υδροθειομάδα είναι η κύρια χαρακτηριστική ομάδα της ένωσης.

*11 Φάση κυτταρικού κύκλου (Θεοτόκης Π., 2018, ΑλεξίουΖ., 2016): Κυτταρικός κύκλος ή κύκλος ζωής του κυττάρου είναι το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από τη στιγμή που το κύτταρο δημιουργείται μέχρι να διαιρεθεί σε δύο νέα κύτταρα. Ο κυτταρικός κύκλος χωρίζεται σε δύο φάσεις: την μεσόφαση και την μίτωση ή μιτωτική διαίρεση. Η μεσόφαση καταλαμβάνει ποσοστό 90% - 95% της διάρκειας ζωής του κύτταρου. Η μεσόφαση υποδιαιρείται σε 4 φάσεις:G0, G1, S και G2. Η μίτωση είναι ο τρόπος διαίρεσης των σωματικών κυττάρων και περιλαμβάνει επίσης 4 φάσεις, την πρόφαση , την μετάφαση, την ανάφαση και την τελόφαση.

*12 Taq πολυμεράση (Chien A., et. al., 1976): Η πολυμεράση Taq είναι μια θερμοσταθερή πολυμεράση DNA που πήρε το όνομά της από τον θερμόφιλο ευβακτηριακό μικροοργανισμό Thermus aquaticus, από τον οποίο απομονώθηκε αρχικά από τον Chien A. και τους συνεργάτες του το 1976. Το όνομά της συντομογραφείται συχνά ως Taq ή Taq pol και η κύρια χρήση της είναι στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), μια μέθοδος για την ενίσχυση της ποσότητας μικρών τμημάτων DNA .

*13 Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) (Lodish H., et. al., 1970): Τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) είναι τα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια που περιέχουν δεοξυριβόζη. Είναι τα δομικά στοιχεία του DNA και χάνουν δύο από τις φωσφορικές ομάδες όταν ενσωματώνονται στο DNA κατά την αντιγραφή. Τα μέλη των dNTP περιλαμβάνουν τριφωσφορική δεοξυαδενοσίνη (dATP), τριφωσφορική δεοξυθυμιδίνη (dTTP), τριφωσφορική δεοξυκυτιδίνη (dCTP), τριφωσφορική δεοξυγουανουσίνη (dGTP) και τριφωσφορική δεοξυουριδίνη (dUTP).

*14 Βρωμιούχο αιθίδιο (Borst P., 2005): Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι ένας παράγοντας παρεμβολής που χρησιμοποιείται συνήθως ως ετικέτα φθορισμού σε εργαστήρια μοριακής βιολογίας για τεχνικές όπως η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Συντομογραφείται συνήθως ως EtBr. Η ίδια βραχυγραφία χρησιμοποιείται για το βρωμαιθάνιο.

*15 cDNA (Croy R, et. al., 1998): Το cDNA (complementary DNA-συμπληρωματικό DNA) είναι ένα μόριο DNA που έχει συντεθεί με βάση το ώριμο mRNA, δηλαδή το mRNA που έχει υποστεί τις απαραίτητες αποκοπές και επεξεργασίες (ωρίμανση mRNA), ώστε να είναι έτοιμο για τη μετάφραση. Η σύνθεση του cDNA γίνεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση. Το cDNA χρησιμοποιείται ευρύτατα για την κλωνοποίηση γονιδίων ευκαριωτικών κυττάρων σε προκαρυωτικά, ώστε να παραχθεί η πρωτεΐνη, που αυτά κωδικοποιούν, σε μεγάλες ποσότητες. Κάθε προκαρυωτικό κύτταρο που δέχεται το γονίδιο πολλαπλασιάζεται, παράγοντας έτσι ένα βακτηριακό κλώνο. Το σύνολο των βακτηριακών κλώνων που περιέχουν τα DNA αντίγραφα όλων των ώριμων mRNA των γονιδίων που εκφράζονται σε έναν κυτταρικό τύπο ονομάζεται cDNA βιβλιοθήκη.

*16 Ηλεκτροφόρηση σε gel-αγαρόζης (Voytas D., et. al., 2001): Η ηλεκτροφόρηση είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μακρομορίων (π.χ. πρωτεϊνών, DNA, RNA κλπ.), για τον έλεγχο καθαρότητας δειγμάτων, για τον ποσοτικό και ποιοτικό έλεγχο και για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους.

Ανακαλύφθηκε το1930 από τον Σουηδό βιοχημικό Arne Tiselius, ο οποίος κέρδισε το Νόμπελ Χημείας το 1948 για αυτήν του την ανακάλυψη. Τέλος, η ηλεκτροφόρηση συνηθίζεται να εφαρμόζεται μέσα σε gel αγαρόζης, διότι η αγαρόζη έχοντας ουδέτερο φορτίο και χαμηλό βαθμό χημικής πολυπλοκότητας δεν αλληλεπιδρά με τα υπό ανάλυση βιομόρια. Η αγαρόζη είναι ένα γραμμικό πολυμερές που βρίσκεται μέσα στο άγαρ, το οποίο απομονώνεται από τα φύκια.

*17 Βαφή κυανίνης (IUPAC, 1997, Chalk S.J., 2019): Οι κυανίνες ορίζονται ως συνθετικές βαφές με τον γενικό τύπο: R2N [CH = CH] nCH = N + R2↔R2N + = CH [CH = CH] nNR (το n είναι ένας μικρός αριθμός) στον οποίο συνήθως το άζωτο και μέρος της συζευγμένης αλυσίδας αποτελούν μέρος ενός ετεροκυκλικού συστήματος, όπως η ιμιδαζόλη, η πυριδίνη, η πυρρόλη, η κινολίνη και η θειαζόλη’’. Οι κυανίνες χρησιμοποιούνται στη βιοτεχνολογία (επισήμανση, ανάλυση, βιοϊατρική απεικόνιση).

Βιβλιογραφία

- **Ξένη βιβλιογραφία :**

1. *Anthony J. F. Griffiths, Jeffrey H. Miller, David T. Suzuki, Richard C. Lewontin, William M. Gelbart (2000). «Genetics and the Organism: Introduction». An Introduction to Genetic Analysis (7η έκδοση). New York: W. H. Freeman. ISBN 0-7167-3520-2. Ανακτήθηκε στις 11 Σεπτεμβρίου 2019.*
2. *Artis zee with PURE®. Https://cdn0.Scrvt.com/39b415fb07de4d9656c7b516d8e2d907/1800000007325590/277b2e94e432/Siemens-Healthineers-artis_zee_angiography-brochure_HDR_Familiy_US_1800000007325590.Pdf, SIEMENS Healthineers.*
3. *Artis Zee, www.siemens-healthineers.com/angio/artis-interventional-angiography-systems/artis-zee.*
4. *Artis zee. Https://cdn0.Scrvt.com/39b415fb07de4d9656c7b516d8e2d907/1800000007325591/d6fef8385a93/Siemens-Healthineers-Angiography-artiszee_MP_HDR_withPURE_brochure_1800000007325591.Pdf, SIEMENS Healthineers.*
5. *Ait-Ali L, Andreassi MG, Foffa I, Spadoni I, Vano E,Picano E. ''Cumulative patient effective dose and acute radiation-induced chromosomal DNA damage in children with congenital heart disease'', Heart 96:269-274 (2010).*
6. *Avery G. " The Biological Effects of Ionizing Radiation.: Semantic Scholar.", 1 Jan. 1961, www.semanticscholar.org/paper/The-biological-effects-of-ionizing-radiation.-Avery/82c9ad3cfff50ef0c9805c22acdec241fddda75d.*
7. *Badie, C., et al. "Established and Emerging Biomarkers of Radiation Exposure." Clinicaloncologyonline.net, 8 July 2016, www.clinicaloncologyonline.net/article/S0936-6555(16)30120-0/fulltext.*
8. *Biomarkers Definitions Working Group (March 2001). "Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework". Clinical Pharmacology and Therapeutics (Review). 69 (3): 89–95.* doi:10.1067/mcp.2001.113989. PMID 11240971
9. *Bahreyni-Toossi, Mohammad Taghi, et al. "In Vivo Exposure Effects of 99mTc-Methoxyisobutylisonitrile on the FDXR and XPA Genes Expression in Human Peripheral Blood Lymphocytes." Asia Oceania Journal of Nuclear Medicine & Biology, Asia Oceania Journal of Nuclear Medicine & Biology, 2018, www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5765331/.*
10. *Borst P. (Nov 2005). "Ethidium DNA agarose gel electrophoresis: how it started". IUBMB Life. 57 (11): 745–747. doi:10.1080/15216540500380855. PMID 16511967.*
11. *Brooks, Antone L. The Use of Biomarkers to Predict Radiation Dose and Risk During Space Flights. Washington State University, 28 June 2012, three.jsc.nasa.gov/cellDamage/BrooksBiomarkers062812.pdf.*
12. *Brunhild M. Halm et al. γ-H2AX foci are increased in lymphocytes in vivo in young children 1h after very low-dose X-irradiation:a pilot study. Pediatr. Radiol. 2014*
13. Coghlan V.M. , Tuckey R.C., Duff J., Srivastava, S.K. , Hofbauer, L.C. et al.*WikiGenes, www.wikigenes.org/e/gene/e/2232.html.*
14. *Connor, Nick. "What Is Radiation Dosimeter - Definition." Radiation Dosimetry, 14 Dec. 2019, www.radiation-dosimetry.org/what-is-radiation-dosimeter-definition/.*
15. *Croy Ron. "Molecular Genetics II - Genetic Engineering Course (Supplementary notes)". Durham University durham.ac.uk; 20 April 1998. Archived from the original on 24 August 2002. Retrieved 4 February 2015.*
16. *Chien A, Edgar DB, Trela JM (September 1976). "Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile Thermus aquaticus". Journal of Bacteriology. 127 (3): 1550–7. doi:10.1128/jb.127.3.1550-1557.1976. PMC 232952. PMID 8432.*
17. *Cruz-Garcia, Lourdes, et al. "In Vivo Validation of Alternative FDXR Transcripts in Human Blood in Response to Ionizing Radiation." MDPI, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 23 Oct. 2020, www.mdpi.com/1422-0067/21/21/7851.*

18. D. Voytas, "Agarose gel electrophoresis," in Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., 2001. doi: 10.1002/0471142727.mb0205as51,μετάφραση: Δ.Παλαιολόγου, file:///C:/Users/User/Downloads/02_chapter_08.pdf
19. FDA-NIH Biomarker Working Group. "Prognostic Biomarker." BEST (Biomarkers, EndpointS, and Other Tools) Resource [Internet]., U.S. National Library of Medicine, 22 Dec. 2016, www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK402289/.
20. FDA-NIH Biomarker Working Group. "Diagnostic Biomarker" BEST (Biomarkers, EndpointS, and Other Tools) Resource [Internet]., U.S. National Library of Medicine, 22 Dec. 2016, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK402285/.
21. FDA-NIH Biomarker Working Group. "Understanding Prognostic versus Predictive Biomarkers." BEST (Biomarkers, EndpointS, and Other Tools) Resource [Internet]., U.S. National Library of Medicine, 22 Dec. 2016, www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK402284/.
22. Faulkner, K, et al. "What Is the Difference between Sievert and Gray? A Practical Question Concerning the SI Units for Ionizing Radiation." ResearchGate, 1 Dec. 2020, www.researchgate.net/post/What_is_the_difference_between_Sievert_and_Gray_A_practical_question_concerning_the_SI_units_for_ionizing_radiation.
23. Garibyan Lilit and Nidhi Avashia. "Polymerase Chain Reaction." The Journal of Investigative Dermatology, U.S. National Library of Medicine, Mar. 2013, www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4102308/.
24. ICRU, FUNDAMENTAL QUANTITIES AND UNITS FOR IONIZING RADIATION (Revised)., Oct. 2011, eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/PHYS215/%CE%92%CE%99%CE%92%CE%9B%CE%99%CE%9F%CE%93%CE%A1%CE%91%CE%A6%CE%99%CE%9A%CE%91%20%CE%A3%CE%A5%CE%9C%CE%A0%CE%9B%CE%97%CE%A1%CE%A9%CE%9C%CE%91%CE%A4%CE%91/Thomas%20-%202012%20-%20ICRU%20report%2085%20fundamental%20quantities%20and%20units%20for%20ionizing%20radiation.pdf.
25. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Online version (2019-) created by S. J. Chalk. ISBN 0-9678550-9-8. https://doi.org/10.1351/goldbook.
26. JB. de Kok, MR. van Balken, et al. "Real-Time PCR Based on SYBR-Green I Fluorescence: An Alternative to the TaqMan Assay for a Relative Quantification of Gene Rearrangements, Gene Amplifications and Micro Gene Deletions." BMC Biotechnology, BioMed Central, 13 Oct. 2003, bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6750-3-18.
27. John Cameron, Radiation Dosimetry Environmental Health Perspectives Vol.91, pp. 45-48, 1991.
28. Karambatsakidou A, Sahlgren B, Hannson B, Lidegran M, Fransson A. ''Effective dose conversion factors in paediatric interventional cardiology'', Br J Radiol. 82(981):748-55 (2009).
29. Koressaar, Triinu, and Maido Remm. Enhancements and Modifications of Primer Design Program Primer3. 10th ed., vol. 23, Bioinformatics, 2007.
30. Kralik Petr, and Matteo Ricchi. "A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything." Frontiers in Microbiology, Frontiers Media S.A., 2 Feb. 2017, www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5288344/.
31. Lipinski C., Hopkins A., (2004). «Navigating chemical space for biology and medicine». Nature 432 (7019): 855-61. PMID 15602551.
32. Lodish Harvey. "Structure of Nucleic Acids." Molecular Cell Biology. 4th Edition., U.S. National Library of Medicine, 1 Jan. 1970, www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21514/.
33. Lobrich, M., N. Rief, M. Kuhne, M. Heckmann, J. Fleckenstein, C. Rube and M. Uder (2005). "In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations." Proc. Natl. Acad. Sci. USA102: 8984-8989
34. Lu Zhang, Fei-hu Wang, Sai-zhen Chen, Jian-chun Pan, 2015, ''Advanced in studies on natural antidepressant drugs and cytochrome P450'', PMID:26087541, https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26087541/.
35. Malcolm Cooper ,14 October 2004. ''X-Ray Compton Scattering''. OUP Oxford. ISBN 978-0-19-850168-8.

36. *Merritt, Robert B., et al. "Tasting Phenylthiocarbamide (PTC): A New Integrative Genetics Lab with an Old Flavor." The American Biology Teacher, National Association of Biology Teachers, bioone.org/journals/the-american-biology-teacher/volume-70/issue-5/0002-7685(2008)70[23:TPPANI]2.0.CO;2/Tasting-Phenylthiocarbamide-PTC--A-New-Integrative-Genetics-Lab-with/10.1662/0002-7685(2008)70[23:TPPANI]2.0.CO;2.full.*
37. *MicroDiagnostics, "ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ." www.microdiagnostics.gr/service/%CE%B2%CE%B9%CE%BF%CE%B4%CE%B5%CE%B9%CE%BA%CF%84%CE%B5%CF%83/.*
38. *Mokoto Ishii, Hideyuki Shirae, Kenzo Yokozeki, "* Enzymatic Production of 5-Methyluridine from Purine Nucleosides and Thymine by *Erwinia carotovora* AJ-2992*",31 May 1989, published online:08 Sep. 2014.*
39. *National Toxicology Program ,Public Health Service, Department of Health and Human Services, 2006, 11th report on carcinogens. http://www.ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/toc11.html*
40. *National Academy of Sciences, 2006, Health risks from exposure to low levels of ionizing radiation: BEIR VII Phase 2. National Academies Press, Washington DC. http://www.fermat.nap.edu/openbook/030900156X/html/7.html*
41. *Nature 57, Bibliography of X-Ray Literature and Research (1896–1897); being a Ready Reference Index to the Literature on the Subject of Röentgen or X-Rays., (1897). https://doi.org/10.1038/057053b0.*
42. *NDT Resource Center, "History of Radiography." History, www.nde-ed.org/EducationResources/CommunityCollege/Radiography/Introduction/history.htm.*
43. *O'Brien, Gráinne, et al. "FDXR Is a Biomarker of Radiation Exposure in Vivo." Scientific Reports, Nature Publishing Group UK, 12 Jan. 2018.*
44. *Patai Saul "The chemistry of the thiol group", Ed. Wiley, London, 1974. ISBN 0-471-66949-0.*
45. *Polozov S, Cruz-Garcia L, Badie C. RAPID GENE EXPRESSION BASED DOSE ESTIMATION FOR RADIOLOGICAL EMERGENCIES. Radiat Prot Dosimetry. 2019 Dec 31;186(1):24-30. doi: 10.1093/rpd/ncz053. PMID: 31137037.*
46. *Physics4u , ''Το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο και το ιστορικό πείραμα του Millikan'', Nov.2002, http://www.physics4u.gr/articles/2002/photoelectric.html.*
47. *Rana S, Kumar R, Sultana S, Sharma RK. Radiation-induced biomarkers for the detection and assessment of absorbed radiation doses. J Pharm Bioallied Sci. 2010;2(3):189-196. doi:10.4103/0975-7406.68500*
48. *Radiology Key, "Automatic Exposure Control.", 27 Feb. 2016, radiologykey.com/automatic-exposure-control/.*
49. *ScienceLab.Gr , "Τοξικολογία: Ο Ορισμός Του Βιοδείκτη.", 15 Feb. 2018, www.sciencelab.gr/2017/09/28/%CE%BF%CF%81%CE%B9%CF%83%CE%BC%CF%8C%CF%82-%CF%84%CE%BF%CF%85-%CE%B2%CE%B9%CE%BF%CE%B4%CE%B5%CE%AF%CE%BA%CF%84%CE%B7/.*
50. *Schmidt PWE, Dance DR, Skinner CL, Castellano Smith IA, McNeill JG. Conversion factors for the estimation of effective dose in paediatric cardiac angiography. Phys Med Biol 2000;45:3095–107.*
51. *Spaans SK, Weusthuis RA, van der Oost J, Kengen SW (2015). "NADPH-generating systems in bacteria and archaea". Frontiers in Microbiology. 6: 742. doi:10.3389/fmicb.2015.00742. PMC 4518329. PMID 26284036.*
52. *Spencer, Brandon and Lily, άρθρα της JRank Np"Βασική Διαφορά - In Vitro vs In Vivo." Διαφορά Μεταξύ In Vitro Και In Vivo, el.mort-sure.com/blog/difference-between-in-vitro-and-in-vivo/.*
53. *Tafili Vasiliki. "Κανονιστικό Πλαίσιο Ακτινοπροστασίας." Κανονιστικό Πλαίσιο - Ελληνική Επιτροπή Ατομικής Ενέργειας, EEAE, 2019, eeae.gr*
54. *Tichy Ales, et al. "The First in Vivo Multiparametric Comparison of Different Radiation Exposure Biomarkers in Human Blood." PLOS ONE, Public Library of Science, 23 Feb. 2018, journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371%2Fjournal.pone.0193412.*
55. *Tsipolitis George, Επίδραση Ιοντιζουσών Ακτινοβολιών, 2011 www.physics.ntua.gr/~yorgos/med/lecture19-25.pdf.*
56. *Untergasser Andreas, et al. Primer3—New Capabilities and Interfaces. 15th ed., vol. 40, Nucleic Acids Research, 2012.*

57. *Vandevoorde C., et al. γ-H2AX foci as in vivo effect biomarker in children emphasize the importance to minimize x-ray doses in paediatric CT imaging. Eur. Radiol. 2015;25:800-811*
58. *Wittwer. et.al.,1997 "SYBR Green I." SYBR Green I - an Overview | ScienceDirect Topics, Biotechnology Advances, www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/sybr-green-i*.
59. *Winer J., et al. Development and Validation of Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction for Monitoring Gene Expressionin Cardiac Myocytes in Vitro. 1st ed., vol. 270, Anal.Biohem., 1999.*
60. *W.N. Cottingham, D.A. Greenwood, ''AN INTRODUCTION TO NUCLEAR PHYSICS'', 02/2002, ISBN13:9789607643186.*
61. *World Health Organization, 2019, World Health Organization model list of essential medicines: 21st list 2019. Geneva: World Health Organization.* hdl:10665/325771. *WHO/MVP/EMP/IAU/2019.06. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO*

- **Ελληνική βιβλιογραφία :**

1. *Ανδρέου Κατερίνα. "ΔΟΣΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΤΗΝ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΙΕΝΕΡΓΕΙΑ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΩΝ ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΡΑΞΕΩΝ." Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Πατρών , 2016.*
2. *Εργαστήριο Ιατρικής Φυσικής. Βασικές Γνώσεις Ακτινοπροστασίας Ασθενών Και Προσωπικού Στην Επεμβατική Ακτινολογία. Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ, 2016, www.vascularsociety.gr/wp-content/uploads/2019/03/seminar_notes.pdf.*
3. *Ζεφύρα Αλεξίου, 2016, ''Δομή, Αντιγραφή, Μεταγραφή, Μετάφραση, DNA και το Γενετικό Υλικό'', ΓΕΝΕΤΙΚΗ. Αντιγραφή, μεταγραφή και μετάφραση <iframe frameborder="0" style="border-bottom: 2px solid #eee; border-top: 0px;" scrolling="no" src="http://docplayer.gr/docview/82/85923723/" width="728" height="412" allowfullscreen></iframe> .*
4. *Ιατρική φυσική, ΕΚΠΑ, 2020, ''ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΑΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ''. eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/PHYS215/2020/%CE%92%CE%B9%CE%BF%CE%BB%CE%BF%CE%B3%CE%B9%CE%BA%CE%AD%CF%82%20%CE%B5%CF%80%CE%B9%CE%B4%CF%81%CE%AC%CF%83%CE%B5%CE%B9%CF%82%20%CF%83%CE%B7%CE%BC%CE%B5%CE%B9%CF%8E%CF%83%CE%B5%CE%B9%CF%82.pdf.*
5. *IAEA, Οι 10 Χρυσοί Κανόνες Της Ακτινοπροστασίας., www.iaea.org/sites/default/files/documents/rpop/poster-staff-radiation-protection-gr.pdf.*
6. *ΚΑΡΦΟΠΟΥΛΟΣ, Κωνσταντίνος. "Δοσιμετρικά Μεγέθη." Ελληνική Επιτροπή Ατομικής Ενέργειας,2020, www.eeae.gr/%CF%85%CF%80%CE%B7%CF%81%CE%B5%CF%83%CE%AF%CE%B5%CF%82/%CE%B2%CE%B1%CE%B8%CE%BC%CE%BF%CE%BD%CF%8C%CE%BC%CE%B7%CF%83%CE%B7%CE%B5%CE%BE%CE%BF%CF%80%CE%BB%CE%B9%CF%83%CE%BC%CE%BF%CF%8D/%CE%B4%CE%BF%CF%83%CE%B9%CE%BC%CE%B5%CF%84%CF%81%CE%B9%CE%BA%CE%AC-%CE%BC%CE%B5%CE%B3%CE%AD%CE%B8%CE%B7.*
7. Κουτσούρης Δ., et al., 2018, "Κεφάλαιο 3: ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΉ ΑΞΟΝΙΚΗ ΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ ." *ΙΑΤΡΙΚΑ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ*, ΕΜΠ - ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΤΖΙΟΛΑ, pp. 55–71.
8. *Λέτσα Ιωάννα, 4 Oct.2018, Περί Βιοδεικτών: Τι Γνωρίζαμε Μέχρι Τώρα, Τι Υπάρχει Σήμερα & Τι Ετοιμάζεται. ellok.org/wp-content/uploads/2018/10/4.3-Letsa.pdf.*
9. *Πάνθηρας Θεοτόκης,2018, ''Γενετική: Αντιγραφή, μεταγραφή και μετάφραση'', ΓΕΝΕΤΙΚΗ. Αντιγραφή, μεταγραφή και μετάφραση <iframe frameborder="0" style="border-bottom: 2px solid #eee; border-top: 0px;" scrolling="no" src="http://docplayer.gr/docview/82/85923723/" width="728" height="412" allowfullscreen></iframe> .*
10. *Σημαντηράκης, Γεώργιος. Προστασία Από Τις Ακτινοβολίες (Ακτινοπροστασία). ΕΕΑΕ, eeae.gr/docs/president/_simant.radprotect2.pdf.*
11. *Σπυροπούλου Δέσποινα. Βασικές Αρχές Ακτινοβιολογίας. Ιατρικό Τμήμα Πανεπιστημίου Πατρών, 2017, https://docplayer.gr/49830875-Vasikes-arhes-aktinoviologias-despoina-spyropoyloy-epikoyri-kathigitria-aktinotherapeytikis-ogkologias-iatriko-tmima-panepistimioy-patron.html*
12. *Στυλιάρης Ε., and Π. Παπαγιάννης. Ιατρική Φυσική. ΕΚΠΑ, 2019, eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/PHYS215/2020/%CE%92%CE%B9%CE%BF%CE%BB%CE%BF%CE%B3%CE%B9%CE%BA%CE%AD%CF%82%20%CE%B5%CF%80%CE%B9%CE%B4%CF%81%CE%AC%CF%83%CE%B5%CE%B9%CF%82%20%CF%80%CE%B1%CF%81%CE%BF%CF%85%CF%83%CE%AF%CE%B1%CF%83%CE%B7.pdf.*
13. *Τσιριπίδου Χριστίνα, et al. "Ακτίνες Χ Και Οι Εφαρμογές Τους." SlideShare, Φίλιππος Χατζηανδρέας, 12 June 2017, www.slideshare.net/filippos_chatziandreas/ss-76874623.*

Παράρτημα ΙΙ

ΕΝΤΥΠΟ ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗΣ ΣΕ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

1. Ποιος διεξάγει τη Μελέτη;

Η Μελέτη διεξάγεται από το Καρδιολογικό Τμήμα Παίδων και Συγγενών Καρδιοπαθειών Ενηλίκων σε συνεργασία με το Εργαστήριο Μελέτης Βλαβών DNA του Τομέα Φυσικής του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου και στο Εργαστήριο Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Στο πλαίσιο της συμμετοχής σας στην εν λόγω ερευνητική μελέτη και αναφορικά με την επεξεργασία των προσωπικών δεδομένων σας, Υπεύθυνος Επεξεργασίας σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΕ) 2016/679 (εφεξής ΓΚΠΔ) είναι το «Ωνάσειο Καρδιοχειρουργικό Κέντρο» (εφεξής ΩΚΚ), με ταχυδρομική διεύθυνση Λεωφόρος Συγγρού αριθ. 356, Καλλιθέα Αττικής, τηλέφωνο επικοινωνίας 2109493000 και ηλεκτρονική διεύθυνση www.onasseio.gr. Σε περίπτωση που θελήσετε να λάβετε περισσότερες πληροφορίες αναφορικά με τον τρόπο επεξεργασίας των προσωπικών δεδομένων σας, τα τεχνικά και οργανωτικά μέτρα προστασίας τα οποία εφαρμόζονται ή/και την άσκηση των δικαιωμάτων σας, μπορείτε να επικοινωνείτε με τον Υπεύθυνο Προστασίας Δεδομένων που το ΩΚΚ έχει ορίσει, είτε ταχυδρομικώς (με την ένδειξη «υπόψη Υπευθύνου Προστασίας Προσωπικών Δεδομένων/ DPO») είτε ηλεκτρονικώς στη διεύθυνση dpo@ocsc.gr.

2. Γιατί καλούμαι να συμμετάσχω σε αυτή τη Μελέτη;

Η πιθανή επιτυχής ολοκλήρωση της μελέτης θα είναι πολύ σημαντική για τα εξεταζόμενα παιδιά καθώς θα δίνει τη δυνατότητα σε όλους (ιατρούς, γονείς κ.λ.π.) να γνωρίζουν την απορροφούμενη δόση που έλαβε το παιδί από την εξέταση, και την εκτίμηση κινδύνου από την ακτινοβολία, κάτι που θα συμβάλλει σημαντικά στην καλύτερη αιτιολόγηση αλλά και βελτιστοποίηση της κάθε εξέτασης για το κάθε παιδί ξεχωριστά.

Η νομική βάση επεξεργασίας των προσωπικών δεδομένων σας είναι η προηγούμενη δική σας συγκατάθεση, σύμφωνα με τα άρθρα 6 (παρ. 1 περ. α') και 9 (παρ. 2 περ. α') του ΓΚΠΔ, καθώς και η αρχειοθέτηση προς το δημόσιο συμφέρον για σκοπούς επιστημονικής έρευνας σύμφωνα με τα άρθρα 9 (παρ. 2 περ. ι') και 89 (παρ. 1) του ΓΚΠΔ.

Θυμηθείτε ότι η συμμετοχή σας είναι απολύτως εθελοντική και μπορείτε οποτεδήποτε να ανακαλέσετε την παρούσα δήλωση.

3. Ποιος είναι ο σκοπός της μελέτης αυτής;

Σκοπός της μελέτης είναι η ανάπτυξη μεθοδολογίας για την εξατομικευμένη βιολογική δοσιμετρία έκθεσης σε ιοντίζουσα ακτινοβολία των παιδιατρικών ασθενών που υποβάλλονται σε επεμβατικές καρδιολογικές διαδικασίες. Στη μελέτη αυτή θα ενταχθούν παιδιά ηλικίας 0-18 ετών τα οποία έχουν παραπεμφθεί από τον επιβλέποντα γιατρό τους σε επεμβατική καρδιολογική πράξη στον σύγχρονο αγγειογράφο που διαθέτει το Τμήμα Αιμοδυναμικών Μελετών και Επεμβατικής Καρδιολογίας του Ωνασείου Καρδιολογικού Κέντρου (ΩΚΚ).

Προς το σκοπό αυτό, μπορεί να ζητηθεί να δούμε το ιατρικό ιστορικό σας και θα σας ζητηθεί να παράσχετε δείγμα αίματος.

Τα δεδομένα της έρευνας θα τηρηθούν ψευδονυμοποιημένα. Βάση Δεδομένων και θα χρησιμοποιηθούν αποκλειστικά για την διεξαγόμενη έρευνα, συμπεριλαμβανομένης της μελέτης των μεταλλάξεων των γονιδίων που συνδέονται με την ασθένεια σας.

4. Συντρέχει ενδεχόμενο συγκρούσεως συμφερόντων;

Οι ερευνητές του ΩΚΚ και οι επιστημονικοί συνεργάτες τους υποχρεούνται να τηρούν τον Κώδικα Ιατρικής Ηθικής και Δεοντολογίας και σας διαβεβαιώνουν ότι ο σχεδιασμός, η διεξαγωγή και οι αναφορές της μελέτης δεν θα επηρεασθούν από άλλα συμφέροντα.

Αν οποιαδήποτε στιγμή έχετε συγκεκριμένες ερωτήσεις σχετικά με τους οικονομικούς διακανονισμούς της μελέτης, είστε ελεύθεροι να έρθετε σε επαφή με τους ερευνητές, όπως αναφέρονται κατωτέρω.

Ο ερευνητής ουδένα οικονομικό συμφέρον από τη μελέτη έχει και αυτό σημαίνει ότι ο ερευνητής δεν θα ωφεληθεί οικονομικά από τα αποτελέσματα της μελέτης.

5. Πόσοι άνθρωποι θα συμμετάσχουν στην μελέτη;

Στην μελέτη προβλέπεται να συμμετάσχουν __40__ ασθενείς

6. Τι θα μου ζητηθεί στα πλαίσια της μελέτης;

Η Μελέτη προϋποθέτει τη συλλογή, αποθήκευση και πιθανώς διανομή βιολογικού υλικού για ερευνητικούς σκοπούς.

Συγκεκριμένα για τον υπολογισμό της εξατομικευμένης δόσης, θα χρειαστεί η λήψη 6 ml περιφερειακού αίματος από κάθε παιδιατρικό ασθενή πριν και 6 ml αίματος μετά από την επεμβατική καρδιολογική διαδικασία στην οποία θα υποβληθεί. Συγκεκριμένα, πριν την επεμβατική διαδικασία θα συλλέγεται αίμα είτε από ξεχωριστή φλεβοκέντηση είτε από το σημείο της παρακέντησης που θα γίνει στα πλαίσια του καθετηριασμού, ενώ μετά το τέλος της επεμβατικής διαδικασίας θα συλλέγεται αίμα αμέσως μετά από το σημείο της παρακέντησης είτε από ξεχωριστή φλεβοκέντηση 24 ώρες μετά.

Σε κάθε περίπτωση, το ΩΚΚ επεξεργάζεται τα προσωπικά σας δεδομένα με τρόπο που διασφαλίζεται η προστασία τους, λαμβάνοντας όλα τα κατάλληλα οργανωτικά και τεχνικά μέτρα για την ασφάλεια των δεδομένων και την προστασία τους από τυχαία ή αθέμιτη καταστροφή, τυχαία απώλεια, αλλοίωση, απαγορευμένη διάδοση ή πρόσβαση και κάθε άλλης μορφής αθέμιτη επεξεργασία.

7. Προς τι θα χρησιμοποιηθούν τα δείγματά μου;

Στόχος είναι η ανίχνευση: διαφοροποιήσεων της έκφρασης του γονιδίου FDXR μέσω της τεχνικής PCR, γνωστή ως αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Η μεταγραφική ρυθμιστική αύξηση του γονιδίου μπορεί να θεωρηθεί ως μία γενικευμένη απόκριση βλάβης DNA. Οι δύο παραπάνω παράγοντες μπορούν να αποτελέσουν βιοδείκτες έκθεσης σε χαμηλές δόσης ιοντίζουσας ακτινοβολίας και να οδηγήσουν σε μία εξατομικευμένη δοσιμετρία σε παιδιατρικούς ασθενείς που υποβάλλονται σε επεμβατικές καρδιολογικές διαδικασίες με τη χρήση ιοντίζουσας ακτινοβολίας, η οποία θα μπορεί να

εφαρμοστεί αποτελεσματικά και εύκολα στην κλινική πράξη συνδυάζοντας τη φυσική με τη βιολογική δοσιμετρία (υβριδική δοσιμετρία).

{Το ΩΚΚ δεν προτίθεται να διαθέσει τα προσωπικά δεδομένα σας σε τρίτους, τρίτες χώρες ή/ και διεθνείς οργανισμούς.}

8. Πόσο καιρό θα διαρκέσει η μελέτη;

Η μελέτη θα διαρκέσει 4 μήνες.

Μετά την πάροδο του εν λόγω χρονικού διαστήματος, τα πάσης φύσεως προσωπικά δεδομένα σας (που αφορούν στη συμμετοχή σας στην εν λόγω μελέτη) θα διαγραφούν από τα συστήματα φυσικής και ηλεκτρονικής αρχειοθέτησης του ΩΚΚ, ενώ θα διατηρηθούν σε ανωνυμοποιημένη μορφή τα στατιστικά εκείνα δεδομένα που προέκυψαν από τη μελέτη προς το σκοπό της συνέχισης και ολοκλήρωσης της επιστημονικής έρευνας.

9. Θα λάβω πληροφορίες σχετικά με το γενετικό υλικό μου;

Η έρευνα είναι μια μακρά και περίπλοκη διαδικασία. Η αποκόμιση πληροφοριών από την έρευνα μπορεί να διαρκέσει πολλά χρόνια.

Ακόμη και αν υπάρξουν νέες γενικές πληροφορίες, ενδέχεται αυτές οι πληροφορίες να μην αφορούν εσάς ως άτομο.

Ωστόσο μπορείτε να ζητήσετε τα αποτελέσματα της μελέτης να αποκαλυφθούν στον θεράποντα ιατρό σας, ο οποίος θα σας ενημερώσει. Τόσο εσείς όσο και ο Ιατρός σας πρέπει να κατανοήσετε ότι οι εξετάσεις και εκτιμήσεις που γίνονται στα πλαίσια της έρευνας δεν είναι επιβεβαιωμένες. Τα αποτελέσματα αφορούν αποκλειστικά ερευνητικούς σκοπούς και δεν θα στηρίξουν κλινικούς σκοπούς.

Στο τέλος του παρόντος σας δίδεται η ευκαιρία να υποδείξετε αν επιθυμείτε να ανακοινωθούν τα αποτελέσματα στο θεράποντα ιατρό σας. Σε αυτήν την περίπτωση οι προαναφερθέντες ερευνητές θα αποκαλύψουν τις πληροφορίες αυτές στο θεράποντα ιατρό σας.

10. Ποιοι είναι οι κίνδυνοι της έρευνας;

Υπάρχουν ορισμένοι πιθανοί κίνδυνοι συνδεόμενοι με την μελέτη και περιγράφονται παρακάτω:

10.1. Δεν υπάρχουν πιθανοί κίνδυνοι στα πλαίσια αυτής της μελέτης.

10.2. Ειδικότερα, οι πληροφορίες σχετικές με τη μελέτη (ερευνητικές ή κλινικές) θα τηρούνται ψευδονημοποιημένα σε ιδιαίτερο αρχείο από τον τηρούμενο στο νοσοκομείο ιατρικό σας φάκελο στον οποίο θα έχουν πρόσβαση αποκλειστικά οι Ερευνητές και για το απόρρητο του οποίου έχουν ληφθεί όλα τα απαραίτητα μέτρα. Ερευνητικά δεδομένα που μπορεί να σας ταυτοποιήσουν δεν θα αποκαλυφθούν σε καμία περίπτωση σε τρίτα πρόσωπα εκτός αν δώσετε τη συγκατάθεσή σας ή αν τούτο επιβάλλεται από το νόμο.

10.3. Είναι πιθανό η μελέτη να αποκαλύψει πληροφορίες για εσάς που δεν ήταν προηγουμένως γνωστές (όπως κατάσταση ή κίνδυνο ανάπτυξης ασθένειας). Τέτοιες τυχαίες αποκαλύψεις, αν υπάρξουν, δεν θα ανακοινωθούν σε κανένα συγγενή σας εκτός αν τα τυχαία ευρήματα αφορούν σε κληρονομούμενο κίνδυνο για ασθένεια που είναι γνωστό ότι μπορεί να προκαλέσει πρόωρο θάνατο αν δεν αντιμετωπισθεί.

10.4. Αν υπάρξουν τέτοια αποτελέσματα που απειλούν τη ζωή τη δική σας ή των ανήλικων παιδιών σας, θα φροντίσουμε να συναντήσετε έναν ειδικό. Τα αποτελέσματα δεν θα σας κοινοποιηθούν μέσω ηλεκτρονικού ταχυδρομείου ή τηλεφώνου.

11. Πώς μπορεί αυτή η έρευνα να βοηθήσει την κοινωνία;

Η Ερευνητική Μελέτη είναι δυνατόν να οδηγήσει σε καινούριες εξετάσεις ή θεραπείες.

12. Ποιες επιλογές και δικαιώματα έχω;

Μπορείτε να επιλέξετε να μη συμμετάσχετε στη Μελέτη. Αναφορικά με την προστασία των προσωπικών δεδομένων σας εφόσον συγκατατεθείτε και επιλέξετε να συμμετάσχετε στη μελέτη, εκ του ΓΚΠΔ σας δίδονται τα δικαιώματα πρόσβασης, περιορισμού της επεξεργασίας, φορητότητας, διόρθωσης ή διαγραφής των προσωπικών δεδομένων σας, όπου αυτό είναι εφικτό. Επίσης, σε περίπτωση που νοιώθετε ότι είτε κάποιο δικαίωμά σας παραβιάζεται είτε τα προσωπικά δεδομένα σας δεν προστατεύονται κατά τον προσήκοντα τρόπο, μπορείτε εφόσον το επιθυμείτε να υποβάλετε καταγγελία στην αρμόδια ελληνική εποπτική αρχή (Αρχή Προστασίας Δεδομένων Προσωπικού Χαρακτήρα).

13. Πως θα προστατευθούν τα δεδομένα μου; Ποιες πληροφορίες σχετικά με εμένα θα χρησιμοποιηθούν στην έρευνα;

Τα δεδομένα σας θα τηρούνται ψευδονυμοποιημένα.

Για τυχόν ταυτοποιήσιμα δεδομένα θα σας δοθεί πλήρης αναφορά τι περιέχουν και ποιοι ακριβώς θα έχουν πρόσβαση σε αυτά και για ποιο λόγο.

14. Μπορώ να αποσύρω τα δείγματά μου;

Μπορείτε να αλλάξετε τη γνώμη σας και να μη συμμετάσχετε στη μελέτη οποιαδήποτε στιγμή. Αν αποσυρθείτε από την έρευνα, τα αρχεία σας και τα δείγματά σας θα απομακρυνθούν από τη βάση δεδομένων και θα καταστραφούν.

Καμία επίπτωση δεν θα έχει τούτο στην περίθαλψη σας. Επίσης μπορείτε να ανακαλέσετε την συναίνεση για την αποκάλυψη των προσωπικών σας στοιχείων, χωρίς όμως να θίγεται η νομιμότητα της επεξεργασίας που βασίστηκε στη συγκατάθεση πριν από την εκ μέρους σας ανάκληση αυτής.

15. Ποιο είναι το κόστος;

Ούτε εσείς ούτε το ασφαλιστικό σας ταμείο θα χρεωθείτε για τη συμμετοχή σας στη μελέτη.

Μόνο οι εξετάσεις και εν γένει διαδικασίες που αποτελούν μέρος της ιατρικής σας φροντίδας εξ αιτίας της κατάστασής σας θα χρεωθούν σε εσάς ή στο ασφαλιστικό σας ταμείο.

16. Θα πληρωθώ;

Όχι.

17. Όροι σχετικά με τη συναίνεση και την εξουσιοδότηση

Η κάτωθι υπογραφή σας δηλώνει ότι:

- □ Διαβάσατε προσεκτικά και κατανοήσατε τις πληροφορίες που περιέχονται σε αυτή τη συγκατάθεση.
- □ Οι πληροφορίες που αφορούν στην κλινική έρευνα και οι σχετικές διαδικασίες, σας έχουν πλήρως εξηγηθεί και οι ερωτήσεις σας έχουν ικανοποιητικώς απαντηθεί.
- □ Λάβατε τις πληροφορίες που επιθυμείτε.
- □ Συγκατατίθεσθε στη συμμετοχή σας στη μελέτη και εξουσιοδοτείτε τη χρήση και ανακοίνωση των ταυτοποιήσιμων ιατρικών σας πληροφοριών που περιγράφονται στο παρόν έντυπο.
- □ Αν έχετε πρόσθετες ερωτήσεις, διαρκούσης της συμμετοχής σας στη μελέτη, θα πρέπει να επικοινωνήσετε με τον ερευνητή.
- □ Αφού λάβατε υπόψη τόσο τους πιθανούς κινδύνους, τα αναμενόμενα οφέλη και τις εναλλακτικές της συμμετοχής, εκουσίως συμφωνείτε να συμμετάσχετε στη μελέτη και εξουσιοδοτείτε την ερευνητική ομάδα να ενεργήσει όπως περιγράφεται σε αυτό το κείμενο.
- □ Συναινώντας στη συμμετοχή σας στη μελέτη, δεν παραιτείστε από κανένα δικαίωμα παρά μόνο συμφωνείτε ότι δεν θα έχετε πρόσβαση σε ιατρικές πληροφορίες που θα παραχθούν κατά τη διάρκεια της μελέτης παρά μόνο μετά το πέρας αυτής.
- □ Θα σας δοθεί αντίγραφο της υπογεγραμμένης δήλωσης συγκατάθεσης, καθώς και αντίγραφο των «Δικαιωμάτων του Ερευνητικού Υποκειμένου»

18. Επιθυμία να διαβιβασθούν τα αποτελέσματα των εξετάσεων ως μέρος της έρευνας.

Θέλω οι πληροφορίες να διαβιβασθούν στο θεράποντα ιατρό μου.

ΝΑΙ ☐

ΟΧΙ ☐

Θα ήθελα να ενημερωθώ για πληροφορίες που μπορεί να είναι σημαντικές για την υγεία μου (και που μπορεί να προκύψουν στο μέλλον), ώστε να μου δοθεί η ευκαιρία να αποκαλύψω τις πληροφορίες στο θεράποντα ιατρό μου.

Καταλαβαίνω ότι είναι δική μου ευθύνη να ενημερώσω για τυχόν αλλαγές στη διεύθυνση επικοινωνίας μου.

ΝΑΙ ☐

ΟΧΙ ☐

ΥΠΟΓΡΑΦΗ ΕΝΗΛΙΚΑ ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΟΥ …….……

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ……

ΥΠΟΓΡΑΦΗ ΕΡΕΥΝΗΤΗ …….……..

Διαβεβαιώνω ότι όλα τα στοιχεία της ενημερωμένης συγκατάθεσης όπως περιγράφεται στο έντυπο συζητήθηκαν πλήρως με μη τεχνικούς όρους με τον συμμετέχοντα.

ΥΠΟΓΡΑΦΗ ΜΑΡΤΥΡΑ / ΔΙΕΡΜΗΝΕΑ ……