

**Università degli Studi di Napoli “Federico II”**



**Dottorato in**

**Biologia Avanzata  
Indirizzo Evoluzionistica**

**- 20° ciclo -**

Effetti citogenetici di radiazioni di diversa qualità in vertebrati

Candidata: Bertucci Antonella

Tutor:

*Prof.ssa Rosalba Putti*

Coordinatore:

*Prof.ssa Silvana Filosa*

anno accademico 2006 – 2007

---

# *Indice*

Introduzione	1
Capitolo 1: Effetti biologici delle radiazioni ionizzanti	4
1.1. Interazione radiazione materia.	4
1.1.1 Interazione fotoni materia	5
1.1.2 Interazione neutroni materia	9
1.1.3 Interazione particelle cariche materia	10
1.2 Azione diretta ed azione indiretta	13
1.3 Linear Energy Transfer e struttura di traccia	15
1.4 Dose, intensità di dose e fluenza	17
1.5 RBE e dose equivalente	19
1.6 Effetti biologici delle radiazioni ionizzanti	23
1.7 Radioprotezione nello spazio	26
1.8 Schermature	29
Capitolo 2: Danno citogenetico radioindotto	32
2.1 Meccanismi di formazione e riparazione delle aberrazioni cromosomiche	33
2.2 Tecniche citogenetiche per lo studio delle aberrazioni cromosomiche	39
2.3 Classi di aberrazioni cromosomiche	46
2.3.1 Delezioni terminali	46
2.3.2 Interscambi	48
2.3.3 Intra-scambi/inter-braccia	50
2.3.4 Intra-scambi/intra-braccia	52
2.3.5 Scambi complessi	
2.4 Metodi di classificazione delle aberrazioni cromosomiche	54
2.5 Dipendenza delle aberrazioni dalla qualità della radiazione	55

Capitolo 3: Biodosimetria e biomonitoraggio	63
3.1 Biomarcatori dell'esposizione a radiazione ionizzante	65
3.2 Fattore F come indice della qualità della radiazione	70
3.3 Effetti biologici della radiazione terrestre	76
3.4 Rana <i>esculenta</i> come biodosimetro animale	78
Capitolo 4: Progetto d'esperimento	81
4.1 Descrizione dell'esperimento	82
4.1.1 Protoni	82
4.1.2 Ioni ferro	86
4.1.3 Biodosimetria in astronauti	87
4.1.4 Rana <i>esculenta</i>	88
4.2 Sistema biologico: linfociti del sangue periferico	88
4.3 Irraggiamento dei campioni presso il Brookhaven National Laboratory	90
4.4 Irraggiamento dei campioni con raggi X	91
4.5 Ibridizzazione <i>In Situ</i> in Fluorescenza	93
4.6 Colorazione in Giemsa di cromosomi di anfibi	96
4.7 Sistema di acquisizione di immagini: R.A.I.C.	97
4.8 Visual R.A.I.C.	101
Capitolo 5: Analisi e discussione dei risultati	105
5.1.1 Analisi dei campioni: protoni	105
5.1.2 Analisi dei campioni: protoni alto- basso-rateo di dose	116
5.2 Analisi dei campioni: ioni Fe e raggi X	119
5.3 Analisi dei campioni: biodosimetria in astronauti	123
5.4 Analisi dei campioni: Rana <i>esculenta</i>	129
5.4.1. Messa a punto di un protocollo per colture linfocitarie	129
5.4.2. Analisi cromosomica su esemplari di controllo	131

5.4.3. Risultati dell'analisi su esemplari esposti a differenti dosi di raggi X	132
Conclusioni	137
Bibliografia	143
Appendice: Protocolli	161
Tavole Fotografiche	172

## *Introduzione*

L'esposizione alla radiazione spaziale costituisce uno dei maggiori rischi per la salute degli equipaggi di missioni spaziali, soprattutto nel caso di viaggi interplanetari.

E' noto, infatti, che all'esposizione a radiazione sono associati effetti di tipo deterministico (quali insorgenza di cataratta ed ustione della pelle) e stocastico (quali insorgenza di cancro).

L'utilizzo di schermature è notoriamente l'unico sistema efficace per mitigare gli effetti delle radiazioni. Gli attuali modelli per il danneggiamento biologico suggeriscono, però, che in alcuni casi la presenza di schermature aumenta la pericolosità della radiazione: si ha, infatti, produzione di un largo numero di particelle secondarie, inclusi neutroni, originate dalle interazioni nucleari tra le particelle di alta carica e alta energia (high-energy, high-Z o particelle HZE) che compongono la radiazione spaziale e i nuclei del materiale usato per la schermatura. Le particelle del fascio trasmesso penetrano all'interno della navicella, colpendo l'equipaggio e, avendo energia minore di quelle del fascio primario, possono provocare un danno biologico maggiore. Per valutare i rischi per la salute degli equipaggi (in particolare d'insorgenza di effetti stocastici tardivi) è necessario, quindi, conoscere l'effetto delle schermature sull'efficacia biologica del fascio incidente.

Sono quindi necessarie misure dirette dell'effetto della schermatura sul danno biologico. Disponibili tali misure sarà possibile verificare i correnti modelli di calcolo biofisico, che cercano di correlare l'osservazione degli effetti biologici indotti dalla frammentazione di fasci primari di ioni pesanti con le caratteristiche fisiche del campo di radiazioni cui gli astronauti sono esposti, e di predire il rischio di carcinogenesi per una determinata missione. Sarà, così, possibile progettare opportune schermature.

Dai dati sperimentali attualmente a disposizione emerge che l'efficacia biologica delle particelle varia a seconda dell'effetto biologico considerato. Per tale motivo in questo lavoro saranno analizzati danni al DNA in linfociti del sangue periferico, come le aberrazioni cromosomiche, considerati validi biomarcatori di effetti stocastici indotti da radiazione.

Per avere una stima del danno indotto dalla radiazione è opportuno l'utilizzo di dosimetri biologici; l'esposizione a radiazione, infatti, modifica una serie di parametri

biologici che possono essere utilizzati per ottenere una stima della dose. L'utilizzo di biosimetri risulta particolarmente indicato in quelle situazioni in cui non è possibile risalire in modo diretto, ad esempio con l'utilizzo di dosimetri fisici, alla dose. Tipiche situazioni di questo tipo sono esposizioni alle radiazioni di tipo accidentale come ad esempio incidenti nucleari.

Anche nell'ambiente terrestre sono presenti diverse fonti, naturali e artificiali, di radiazione ionizzante cui gli organismi sono costantemente esposti. E' ben noto da numerosi studi, che hanno utilizzato diversi parametri biologici in un'ampia varietà di organismi, che per l'esposizione a radiazione sparsamente ionizzante esiste una riduzione degli effetti deleteri di una data dose quando il rateo di dose è basso o quando la dose è frazionata. Molti dei dati disponibili circa gli effetti delle radiazioni, su organismi non-umani, sono basati su studi che impiegano dosi e ratei di dose molto più elevati rispetto a quelli cui gli organismi sono esposti e la mortalità dell'individuo è utilizzata come parametro biologico. Lo studio di diverse specie animali che possano funzionare da bioindicatori dell'esposizione a radiazione ionizzante, utilizzando diversi tipi di biomarcatori, ha confermato la validità dell'utilizzo di tali "sentinelle ambientali".

Questo lavoro di ricerca, dunque, si articola su differenti esperimenti il cui filo conduttore è la quantificazione del danno indotto dalle particelle cariche sul DNA in termini di aberrazioni cromosomiche. I riarrangiamenti cromosomici sono infatti gli unici biomarcatori di rischio verificati con studi epidemiologici, e possono essere misurati anche negli animali come indicatore della radioattività ambientale.

La parte principale del lavoro sperimentale ha riguardato i protoni di alta energia. La scelta di tale particella deriva dal fatto che, come viene ampiamente discusso nel capitolo 1, i protoni sono gli elementi più abbondanti nella composizione della radiazione cosmica galattica (GCR) rappresentando circa l'87% del totale con un picco di energia che si aggira intorno a valori pari ad 1 GeV. Nelle missioni spaziali, è quindi predominante l'esposizione a protoni di alta energia.

Tuttavia, non vi sono dati in letteratura sulla efficacia biologica di protoni relativistici, così come poco è noto sulla efficacia delle schermature nel ridurre il danno biologico. In questo lavoro, dunque, vengono riportati i risultati degli esperimenti condotti utilizzando un fascio di protoni da 1 GeV sia in assenza che in presenza di uno schermo di alluminio e di PMMA (lucite). Inoltre si mostrano i risultati preliminari di un esperimento condotto utilizzando lo stesso fascio e le stesse dosi ma differente rateo di dose al fine di

valutare e confrontare le frequenze di aberrazioni cromosomiche indotte dal fascio di protoni ad alta- e bassa- intensità di dose.

Oltre ai protoni, gli ioni pesanti (particelle HZE) danno un contributo importante alla dose equivalente in missioni interplanetarie. Sono stati quindi studiati anche gli effetti biologici di ioni ferro di alta energia, confrontandolo con i raggi X, in linfociti umani sopravvissuti alla esposizione.

I dati in vitro sugli effetti della radiazione cosmica simulata devono poi servire a verificare le osservazioni in vivo, in equipaggi impegnati in missioni spaziali. In questa tesi sono descritte anche le analisi delle aberrazioni cromosomiche misurate nell'astronauta italiano Roberto Vittori, impegnato in due missioni sulla Stazione Spaziale Internazionale (ISS).

Infine, allo scopo di valutare la possibilità di impiego di un sistema vivente non-umano come biosimetro della esposizione a radiazione ionizzante sono mostrati i risultati ottenuti dall' analisi citogenetica preliminare su un modello animale, *Rana esculenta*.

# *Capitolo 1*

## *Effetti biologici delle radiazioni ionizzanti*

La *radiazione* si può definire come un trasporto di energia senza il necessario trasporto del mezzo (Kiefer, 1990). Esistono due modalità di interazione della radiazione con la materia che essa attraversa, entrambi dipendenti dall'energia della radiazione in questione: *eccitazione e ionizzazione*.

Se l'energia depositata nel mezzo è tale da portare un elettrone di un atomo o di una molecola ad un livello energetico superiore senza che questo sia espulso, allora si parla di eccitazione. Il ritorno allo stato energetico fondamentale si realizza attraverso il fenomeno di diseccitazione, ossia mediante l'emissione di un fotone di energia pari alla differenza tra gli stati energetici coinvolti. L'eccitazione è un tipico effetto che si osserva nella materia esposta a radiazione ottica, luce visibile e raggi UV.

Quando una radiazione ha un'intensità sufficiente a generare ionizzazioni in un mezzo, si parla dunque di radiazione ionizzante. Per intensità sufficiente si intende un'energia tale da far espellere un elettrone da un atomo o una molecola. L'importante caratteristica delle radiazioni ionizzanti è il rilascio localizzato di una grossa quantità di energia. L'energia dissipata per evento di ionizzazione è circa 33 eV, quantità di energia decisamente maggiore rispetto a quella necessaria a rompere, ad esempio, un doppio legame C = C che risulta essere 4,9 eV.

La radiazione ionizzante ha come caratteristica peculiare proprio quella di trasferire energia alla materia attraverso processi di ionizzazione ed eccitazione, la consistenza dei quali dipende dalle caratteristiche della radiazione incidente congiuntamente alle caratteristiche del mezzo attraversato.

In base alle modalità di interazione della radiazione con la materia possibile distinguere: un'*azione diretta* ed un'*azione indiretta*, e le radiazioni sono definite direttamente ionizzanti o indirettamente ionizzanti.

Quando una radiazione è assorbita dalla materia, esiste una possibilità che questa interagisca direttamente con il bersaglio critico del sistema, come ad esempio potrebbe



essere il DNA per un sistema cellulare. In questo caso si parla di azione diretta che è tipica di particelle cariche elettricamente come protoni, elettroni e ioni  $\alpha$ .

Quando al contrario l'azione di una radiazione viene esplicita da particelle secondarie, generate dall'interazione della radiazione con la materia e dunque responsabili della ionizzazione del bersaglio, allora si parla di azione indiretta che è tipica di particelle prive di carica come neutroni e fotoni.

## **1.1 Interazione radiazione materia.**

L'interazione della radiazione con la materia avviene con modalità differenti che dipendono sostanzialmente dalle caratteristiche della radiazione in questione. Un ruolo fondamentale è rivestito dalla carica posseduta dalla particella in questione.

### **1.1.1 Interazione fotoni materia**

La radiazione elettromagnetica può essere descritta come un'onda costituita da campi elettrici e magnetici oscillanti perpendicolari tra loro, che si propaga ad una velocità  $c$  che nel vuoto è pari a  $3 \cdot 10^{10}$  cm/s. La distanza tra due successivi picchi dell'onda elettromagnetica,  $\lambda$ , è nota come lunghezza d'onda. Il numero di onde che passano per secondo attraverso un punto stabilito è definito frequenza,  $\nu$ . Il prodotto della frequenza per la lunghezza d'onda ci dà la velocità dell'onda:

$$\lambda \cdot \nu = c$$

Alternativamente la radiazione elettromagnetica può essere descritta come un flusso di pacchetti energetici, definiti fotoni, ciascuno dei quali contiene un'energia pari a:

$$E = h \cdot \nu$$

dove  $h$  è la costante di Planck e  $\nu$  è la frequenza dell'onda (misurata in Hz).

Se una radiazione ha un'elevata lunghezza d'onda essa avrà una bassa frequenza e dunque l'energia per fotone sarà piccola. Al contrario se una data radiazione ha una piccola lunghezza d'onda, la frequenza sarà elevata così come l'energia del fotone.

Raggi X, raggi  $\gamma$ , UV, luce visibile, infrarosso, microonde e onde radio, sono tutte forme di radiazione elettromagnetica, hanno la stessa velocità nel vuoto, ma differiscono per la lunghezza d'onda, e di conseguenza per l'energia che trasportano. (Hall, 1994)

E' dunque l'energia associata al singolo fotone a determinare gli effetti della radiazione in esame e radiazioni che superano un dato valore energetico saranno in grado, quando interagiscono con la materia, di dar luogo alla ionizzazione dell'atomo o della molecola.

La radiazione ionizzante, dunque, è costituita da onde elettromagnetiche di alta frequenza (raggi ultravioletti, raggi X e raggi  $\gamma$ ) e da particelle subatomiche di elevata energia.

I parametri che caratterizzano una radiazione ionizzante sono rappresentati da un valore dell'energia  $E > 10$  eV e da un valore della frequenza  $\nu > 3 \cdot 10^6$  Hz. Lo spettro completo delle onde elettromagnetiche è di seguito mostrato nella figura 1.1.

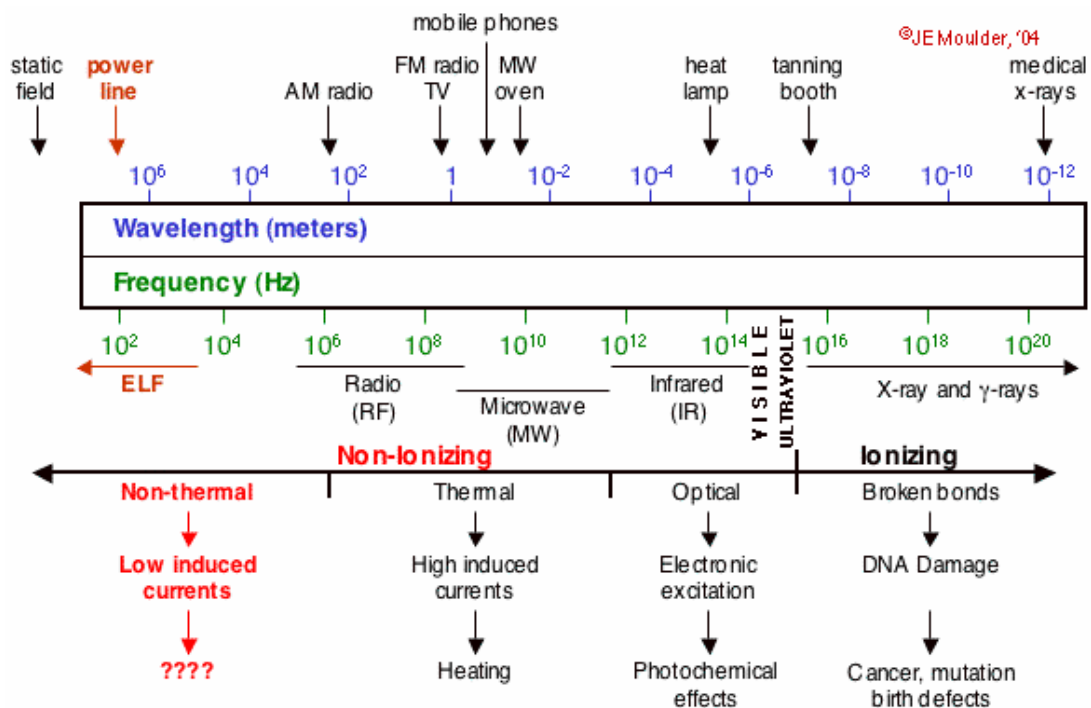
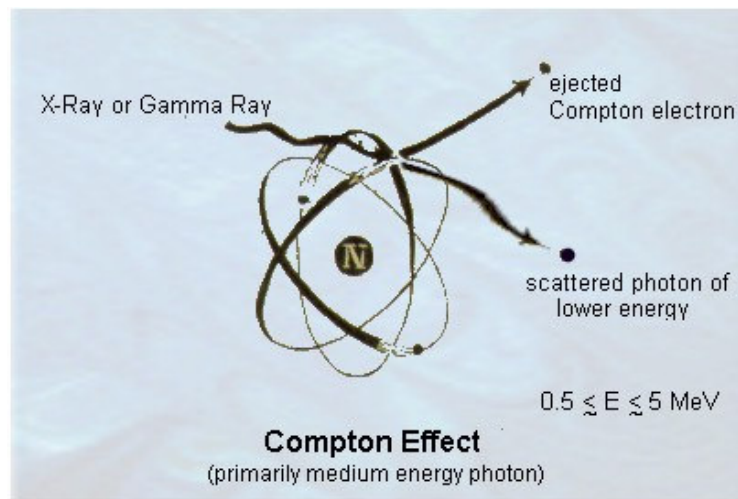


Fig. 1.1: Spettro delle onde elettromagnetiche completo delle frequenze e delle lunghezze d'onda

Il meccanismo attraverso il quale la materia assorbe la radiazione ionizzante dipende sia dall'energia del fotone che dalle caratteristiche del mezzo assorbente. Ad alte energie il processo predominante è l'*effetto Compton*.

In questo processo il fotone incidente interagisce con quello che usualmente è definito elettrone libero, un elettrone cioè la cui energia di legame è trascurabile rispetto all'energia del fotone o generalmente un elettrone degli orbitali più esterni la cui energia di legame è molto inferiore rispetto agli elettroni più interni.



**Fig. 1.2:** Meccanismo di assorbimento dell'energia attraverso effetto Compton

Parte dell'energia del fotone è trasferita all'elettrone sotto forma di energia cinetica generando un elettrone veloce che lascia il sistema originario, mentre la traiettoria del fotone incidente viene deviata rispetto a quella iniziale. Generalmente il fotone abbandona il bersaglio senza ulteriori interazioni. La perdita di energia da parte del fotone dipende dalle caratteristiche del sistema bersaglio e dall'energia iniziale, tale perdita rientra in un range variabile tra lo 0% e l'80%.

Ad energie più basse, invece l'effetto predominante è l'*effetto fotoelettrico*.

In questo caso il fotone incidente interagisce con un elettrone degli strati più interni del materiale assorbente, quali gli orbitali K, L o M.

L'energia del fotone viene completamente ceduta all'elettrone, una parte viene utilizzata per rompere il legame dell'elettrone col nucleo atomico mentre la restante viene convertita in energia cinetica dell'elettrone che viene espulso dall'atomo. La lacuna

elettronica generatasi da questo evento generalmente viene “riempita” da un elettrone degli strati più esterni.

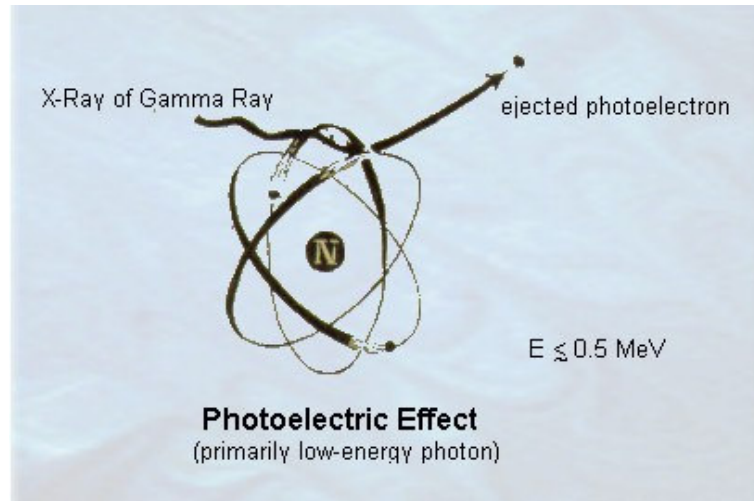
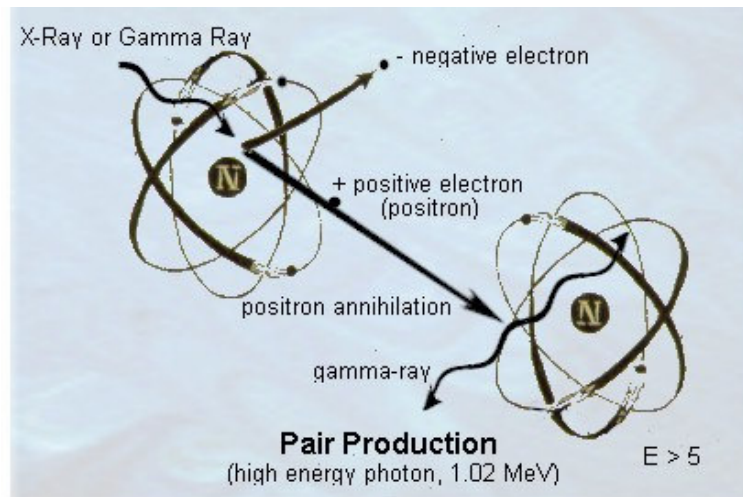


Fig. 1.3: Rappresentazione dell'assorbimento dell'energia attraverso effetto fotoelettrico

Il movimento di un elettrone da un orbitale ad un altro si traduce in un cambiamento energetico nel sistema. Poiché l'elettrone è carico negativamente, il suo passaggio da un legame debole ad uno forte rappresenta una diminuzione di energia potenziale; questo cambiamento energetico è bilanciato dall'emissione di un fotone che sarà “caratteristico” della radiazione in esame.

La **produzione di coppie** si realizza quando l'energia del fotone incidente è molto elevata. Il fotone risentendo del campo elettrico generato dagli nuclei atomici del mezzo assorbente, dà luogo alla sua trasformazione in una coppia elettrone/positrone. Le due particelle generate ionizzeranno entrambe la materia lungo il loro cammino, ma mentre l'elettrone si arresta una volta esaurita la sua energia cinetica, il positrone, nelle stesse condizioni, si annichila con un elettrone generando due fotoni  $\gamma$ .



**Fig. 1.4:** Meccanismo di produzione di coppie

### 1.1.2 Interazione neutroni materia

I neutroni sono particelle prive di carica per tale ragione essi sono particolarmente penetranti rispetto alle particelle cariche a parità di massa e di energia. I neutroni veloci differiscono sostanzialmente rispetto ai fotoni per le modalità di interazione. Mentre i fotoni interagiscono con gli elettroni presenti negli orbitali atomici attraverso differenti modalità, come abbiamo visto nel paragrafo 1.1.1., i neutroni interagiscono direttamente con i nuclei atomici del materiale assorbente mettendo in moto protoni veloci, particelle  $\alpha$  e frammenti nucleari pesanti.

Si realizza una *collisione elastica* quando un neutrone incidente collide con il nucleo di un atomo del materiale assorbente; parte della sua energia cinetica viene trasferita al nucleo e la restante viene mantenuta dal neutrone che può continuare il suo percorso con una traiettoria deviata ed eventualmente collidere nuovamente.

Nei tessuti biologici i neutroni interagiscono con nuclei di idrogeno, quindi con protoni, in maniera predominante. Tale fenomeno si spiega innanzitutto col fatto che i tessuti biologici sono costituiti in larga misura da atomi di idrogeno ed inoltre una grossa quantità di energia viene trasferita quando un neutrone interagisce con un protone a causa della massa simile posseduta da queste particelle.

Ad energie pari a circa 6 MeV, diventa predominante il fenomeno di *collisione anelastica*.

Il neutrone incidente può interagire con il nucleo di un atomo di carbonio producendo 3 particelle  $\alpha$  oppure con il nucleo di un atomo di ossigeno producendo 4 particelle  $\alpha$ . Questi generalmente sono definiti prodotti di *spallation*.

### 1.1.3 Interazione particelle cariche materia

La radiazione direttamente ionizzante è costituita dagli ioni, dalle particelle  $\alpha$  e dagli elettroni. Alcune di queste particelle hanno un elevato potenziale diagnostico mentre altre trovano largo uso in radioterapia. Le particelle  $\alpha$  sono nuclei di elio consistono di due protoni e due elettroni, hanno carica netta positiva e costituiscono gran parte della radiazione naturale essendo emessi durante il decadimento radioattivo di alcuni elementi naturali come l'uranio, il torio, il radio ed il radon. Analogamente, le particelle  $\beta$ , elettroni prodotti dal decadimento nucleare, fanno parte del fondo di radioattività naturale. Al contrario gli ioni pesanti fanno parte della radiazione cosmica o possono essere prodotti mediante l'utilizzo di acceleratori di particelle la radioterapia.

Gli ioni, a seconda della loro energia, interagiscono con la materia attraverso tre processi distinti: cattura elettronica, collisione con elettroni atomici, collisioni con nuclei e reazioni nucleari (Kiefer, 1990).

Ioni di bassa energia catturano essenzialmente gli elettroni atomici diminuendone la loro energia; ioni di medie ed alte energie invece interagiscono con gli elettroni atomici mediante collisione, se l'energia dello ione è sufficientemente elevata si ha l'espulsione dell'elettrone dall'atomo.

La perdita di energia per ionizzazione di una particella di carica  $Z_p$ , incidente su un materiale di numero atomico  $Z_b$  e peso atomico  $A$  è data dalla **formula di Bethe e Block**:

$$-\frac{dE}{dx} = \frac{4\pi e^4 Z_{eff}^2 N_A \rho Z_b}{m_e v^2 A} \ln \left( \frac{2m_e v^2}{I(1-\beta^2)} - 2\beta^2 - \delta - U \right)$$

in cui:

$N_A$  è il numero di Avogadro,

$m_e$  ed  $e$ , la massa a riposo e la carica dell'elettrone,

$Z_{eff}$  e  $v$  la carica efficace e la velocità della particella incidente,

$\beta = v/c$ ;

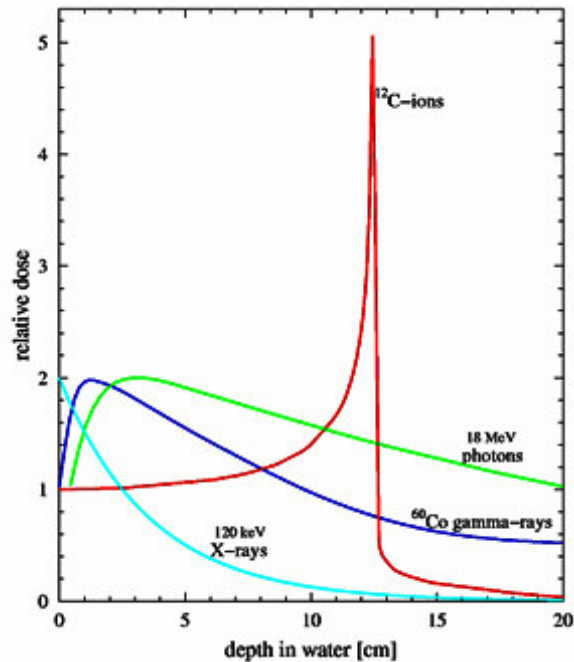
$\rho$  e  $I$  sono la densità e il potenziale di ionizzazione del materiale attraversato,

$\delta$  ed  $U$  sono correzioni relativistiche.

La carica efficace  $Z_{eff}$  generalmente non è uguale al numero atomico dello ione in quanto dipende dalla sua energia e dal mezzo d'interazione. Infatti, la carica dello ione incidente diminuisce a bassa energia a causa della cattura elettronica. Non esiste una formula teorica universalmente accettata per descrivere la variazione della carica efficace in tutti i mezzi: si utilizzano delle formule semi-empiriche di cui la più utilizzata, che descrive il comportamento di  $Z_{eff}$  in acqua, è la **formula di Barkas**:

$$Z_{eff} = Z_p \left( 1 - e^{-125 \beta Z_p^{-2/3}} \right)$$

La formula di Bethe-Block, dunque, ci suggerisce che la perdita media di energia per unità di percorso non dipende dalla massa dello ione ma solo dalla sua carica efficace e dalla sua velocità. La perdita di energia aumenta con il diminuire della velocità dello ione e poiché a basse energie  $Z_{eff}$  diminuisce rapidamente, la perdita di energia raggiunge un massimo in prossimità del punto di arresto dello ione. La curva che descrive questo andamento è la *curva di Bragg*; la massima deposizione di energia dello ione corrisponde al cosiddetto picco di Bragg. Il tipico andamento della curva di Bragg per ciascuno ione ha notevoli riscontri pratici nella radioterapia. Modulando infatti l'energia iniziale si può determinare la dose massima da somministrare al tumore preservando i tessuti sani circostanti. La figura 1.5 illustra in modo esauriente la diversa modalità di rilascio di energia delle radiazioni sparsamente ionizzanti rispetto agli ioni che presentano il tipico picco, corrispondente alla massima deposizione di energia.



**Fig. 1.5:** Andamento della dose in funzione della profondità del mezzo attraversato (in questo caso acqua), per differenti tipi di radiazioni.

Analogamente agli ioni, anche gli elettroni perdono energia per ionizzazioni nel mezzo attraversato, in questo caso però un' ulteriore complicazione deriva dal fatto che non è possibile distinguere l'elettrone incidente e quello che risulta dalla ionizzazione.

A più alte energie diventa predominante l'effetto di *bremstrahlung*. La radiazione di *bremstrahlung* viene generata dalla decelerazione degli elettroni causata dall'interazione con il campo elettrostatico degli atomi del bersaglio. Si comprende quindi che essa dipenda dalla composizione atomica del mezzo.

Ad energie ancora superiori si può osservare la generazione di un altro tipo di radiazione elettromagnetica, la radiazione Cerenkov. Questo tipo di radiazione è generata quando le particelle cariche attraversano il mezzo ad una velocità superiore a quella che avrebbe la luce nello stesso mezzo. Il limite stabilito al di sotto del quale tale processo non si osserva è di circa 500 keV in acqua. La perdita di energia associata alla produzione di luce Cerenkov non risulta rilevante ma tale fenomeno dà luogo alla produzione di luce UV che è responsabile dell'induzione di specifici danni radioindotti.



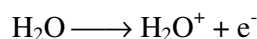
## 1.2 Azione diretta ed azione indiretta

L'effetto biologico radioindotto più consistente risulta essenzialmente in danni al DNA che è il bersaglio critico della radiazione. Quando una qualsiasi forma di radiazione, raggi X o  $\gamma$  particelle cariche o prive di carica, è assorbita dal materiale biologico essa può dar luogo a due diverse modalità di interazione.

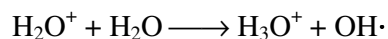
Nel primo caso la radiazione può interagire direttamente con gli atomi del bersaglio, questi ultimi venendo eccitati o ionizzati danno luogo ad una serie di eventi a catena che hanno come evento finale un danno biologico. Nel caso del DNA un elettrone secondario ad esempio, può causare la rottura di un legame covalente zucchero fosfato che se non correttamente riparato porta alla formazione di aberrazioni cromosomiche. Questa modalità di interazione è definita *azione diretta* ed è il processo predominante quando siamo in presenza di radiazioni di alto LET (di cui si darà una esauriente descrizione nel paragrafo 1.3).

In modo alternativo la radiazione può interagire con altri atomi o molecole all'interno della cellula producendo molecole reattive, sostanzialmente radicali liberi, capaci di diffondere ed interagire con il bersaglio biologico. In questo caso si parla di *azione indiretta*. Questi due meccanismi sono schematizzati in figura 1.6.

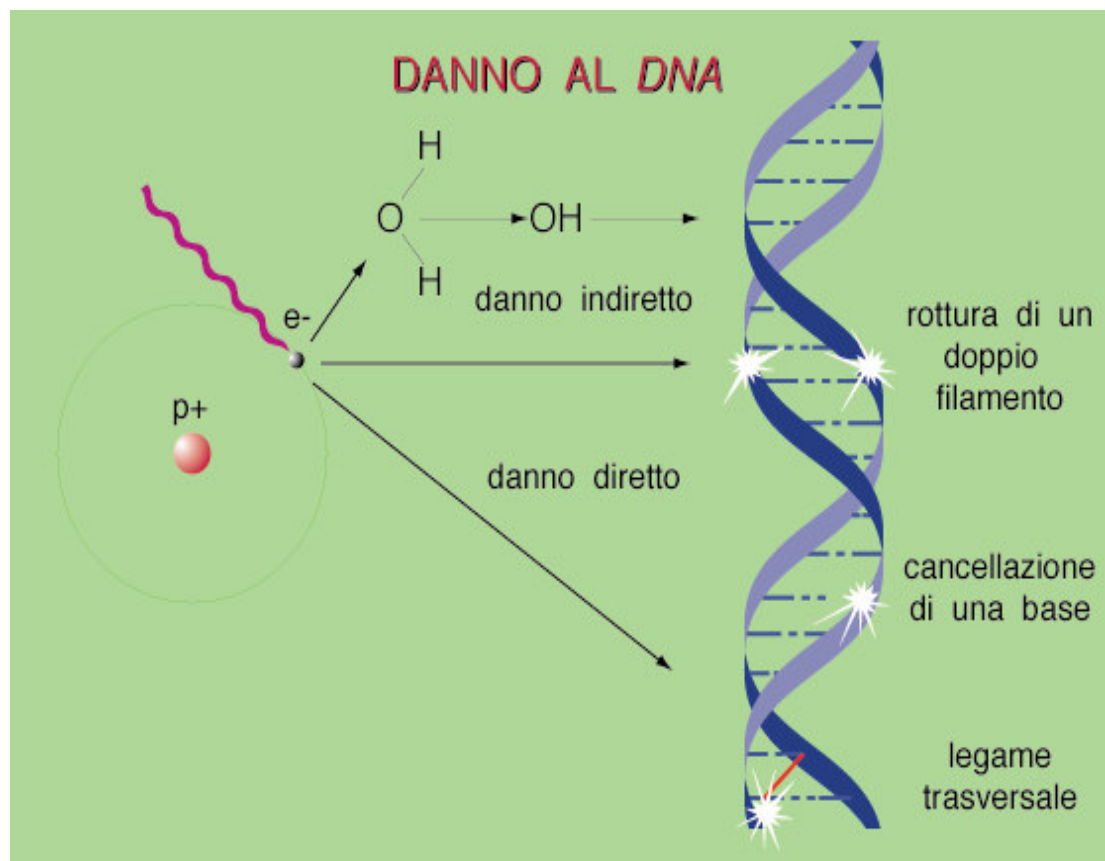
Dal momento che i sistemi biologici sono costituiti essenzialmente da acqua è quest'ultima ad essere coinvolta in questo tipo di azione. Come risultato dell'interazione di un fotone, di raggi X o  $\gamma$  oppure di una particella carica le molecole di acqua subiscono una ionizzazione, questa situazione può essere espressa dalla seguente reazione:



$\text{H}_2\text{O}^+$  è sia uno ione che un radicale. Uno ione definito come una molecola che è elettricamente carica avendo perso un elettrone mentre un radicale libero possiede un elettrone spaiato. La suddetta specie chimica, dunque, è sia l'uno che l'altro. Gli ioni-radicali hanno una vita estremamente breve, dell'ordine di  $10^{-10}$  secondi. Nel caso dell'acqua, lo ione radicale reagisce con un'altra molecola d'acqua formando un radicale idrossilico, estremamente reattivo, secondo la seguente reazione:



E' stato stimato che circa due terzi dei danni indotti al DNA da raggi X è dovuto a radicali idrossilici (Hall, 1994). La maggiore evidenza per questa stima viene da esperimenti condotti utilizzando *radical scavenger*. Tali sostanze, di cui una delle più semplici è la cisterna, sono capaci di ridurre l'effetto dannoso dei radicali dal momento che ne riducono la loro produzione.



**Fig. 1.6:** Rappresentazione schematica del danno radioindotto al DNA. In alto è mostrata la modalità di induzione di danno mediante azione indiretta, mediante la formazione di intermedi altamente reattivi. Nell'azione diretta, mostrata in basso, la radiazione stessa è capace di produrre un danno senza l'intervento di prodotti secondari

### 1.3 Linear Energy Transfer e struttura di traccia

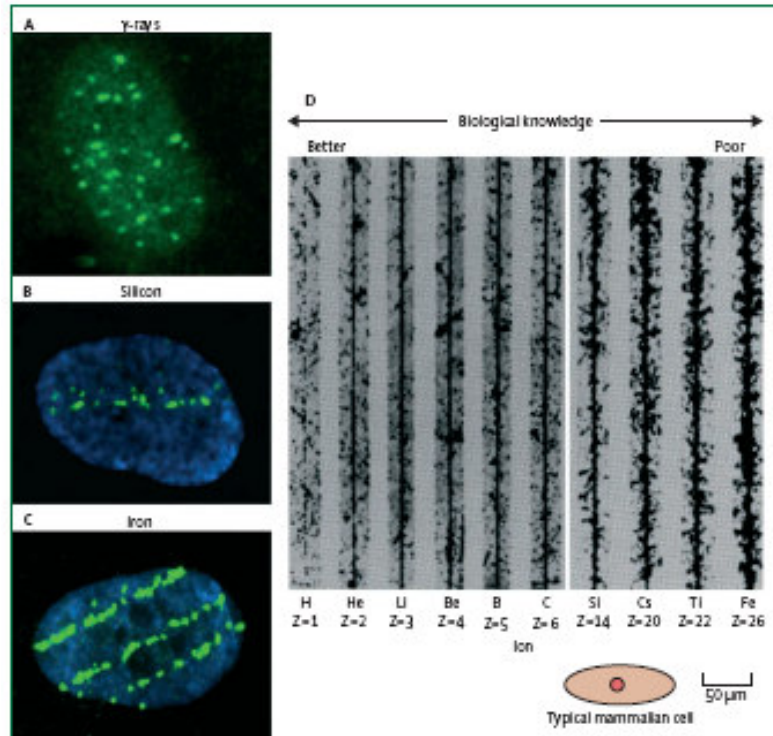
E' stato ampiamente detto che quando la radiazione è assorbita dal materiale biologico essa può dar luogo a fenomeni di ionizzazione ed eccitazione. La localizzazione spaziale di tali fenomeni non è casuale ma dipende dal tipo di radiazione coinvolta nel processo e varia notevolmente da particella a particella. Generalmente ci si riferisce a tali interazioni col materiale biologico con il termine di *traccia*. La traccia dunque consiste nell'insieme di regioni attraversate da una data particella che potranno presentare o meno eventi di ionizzazione. La struttura di una traccia dipende non solo dalla particella che attraversa il materiale biologico ma anche dalla sua energia. Radiazioni di bassa energia danno luogo ad eventi di ionizzazione spazialmente ben separati e distanti fra loro, questo tipo di radiazioni vengono definite *sparsamente ionizzanti*. Per una data particella la densità di ionizzazione diminuisce all'aumentare dell'energia.

Particelle di alta energia danno luogo ad una densa colonna di interazioni attraversando il materiale biologico. Si parla in questo caso di radiazione *densamente ionizzante*. La figura 1.7 mostra fibroblasti umani esposti a differenti tipi di radiazioni ionizzanti. La tecnica citogenetica utilizzata mira ad evidenziare il danno citogenetico radioindotto, *foci*  $\gamma$ -H2AX, corrispondenti a rotture nella doppia elica del DNA. Appare evidente che nelle cellule esposte a radiazioni sparsamente ionizzanti (immagine A) la distribuzione dei *foci* è uniformemente distribuita nel nucleo, mentre le cellule esposte a radiazioni densamente ionizzanti mostrano una distribuzione del danno lungo una traccia (immagini B e C) (Cucinotta e Durante, 2006).

Il termine *Linear Energy Transfer* (LET) fu introdotto da Zirkle nel 1940 e definisce l'energia localmente depositata per unità di lunghezza lungo la traccia. La commissione internazionale delle unità radiologiche nel 1962 ha definito il LET di una particella carica nel mezzo come il rapporto tra:

$$dE \ / \ dl$$

dove  $dE$  è l'energia media localmente depositata nel mezzo da una particella carica di specifica energia e  $dl$  la distanza attraversata dalla particella nel mezzo.



**Fig. 1.7:** Nuclei di fibroblasti umani esposti rispettivamente a (A) raggi  $\gamma$ , (B) ioni Si e (C) ioni C e marcati per la rivelazioni di *foci*  $\gamma$ -H2AX (Cucinotta e Durante, 2006).

Nel processo di ionizzazione non tutta l'energia depositata dalla radiazione incidente è assorbita localmente dal campione; infatti la ionizzazione è mediata da elettroni secondari (liberati in seguito al primo evento di ionizzazione), i quali, interagendo con gli atomi del bersaglio trasportano parte dell'energia ceduta dalla radiazione lontano dal sito in cui è avvenuta l'interazione primaria.

Per stimare il LET di una radiazione bisogna considerare, dunque, sia gli eventi di deposizione di energia dovuti alla particella primaria che quelli dovuti ad eventuali particelle secondarie prodotte all'interno di un generico elemento di massa  $dm$ . Il rilascio di energia sarà considerato "locale" solo se il percorso delle particelle secondarie avviene all'interno dell'elemento di massa considerato.

Se si potesse considerare una radiazione costituita da un insieme di particelle monoenergetiche il calcolo del LET in questo caso sarebbe semplice. Tuttavia nella pratica molte radiazioni sono composte da un ampio spettro di particelle aventi differenti valori dell'energia. Questo fa sì che il LET di una radiazione sia dato dal valor medio.

Il calcolo del LET risulta ulteriormente complicato dal fatto che è possibile calcolare una media in diversi modi. Il metodo più comunemente utilizzato è quello di calcolare la *traccia media*, dividendo cioè, la traccia in segmenti di uguale lunghezza, calcolando l'energia depositata in ciascun segmento e facendone la media. Un altro metodo è quello di calcolare l' *energia media*, in questo caso la traccia viene divisa in incrementi di uguale energia che successivamente vengono mediati.

Il LET di un determinato ione viene in genere riferito all'acqua, e viene espresso in keV per  $\mu\text{m}$  di acqua attraversata ( $\text{keV}/\mu\text{m}$ ). Si parla di radiazione densamente ionizzante quando i valori di energia trasferita sono superiori a  $50\text{-}100 \text{ keV}/\mu\text{m}$  situazione tipica ad esempio degli ioni pesanti. Al contrario, per bassi valori di LET (tra  $0.3$  e  $2.5 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ) si parlerà di radiazioni sparsamente ionizzanti.

#### **1.4 Dose, intensità di dose e fluenza.**

La *dose* (D) si definisce come la quantità di energia assorbita per unità di massa dal tessuto. In termini matematici essa si esprime come il rapporto tra il valor medio dell'energia assorbita dall'elemento di volume irraggiato e la massa del volume stesso:

$$D = \overline{dE_{ass}} / dm$$

L'unità di misura della dose è il Gray ( $\text{Gy}$ ) =  $\text{J}/\text{kg}$ .

Bisogna però tener presente che uguali dosi di differenti tipi di radiazioni non sempre producono lo stesso effetto biologico. Un gray di neutroni ad esempio produce un effetto biologico di gran lunga maggiore di un gray di raggi X. La figura 1.8 mostra come varia la distribuzione delle ionizzazioni in funzione della natura e dell'energia delle particelle incidenti nonché della natura del mezzo (Kiefer, 1990).

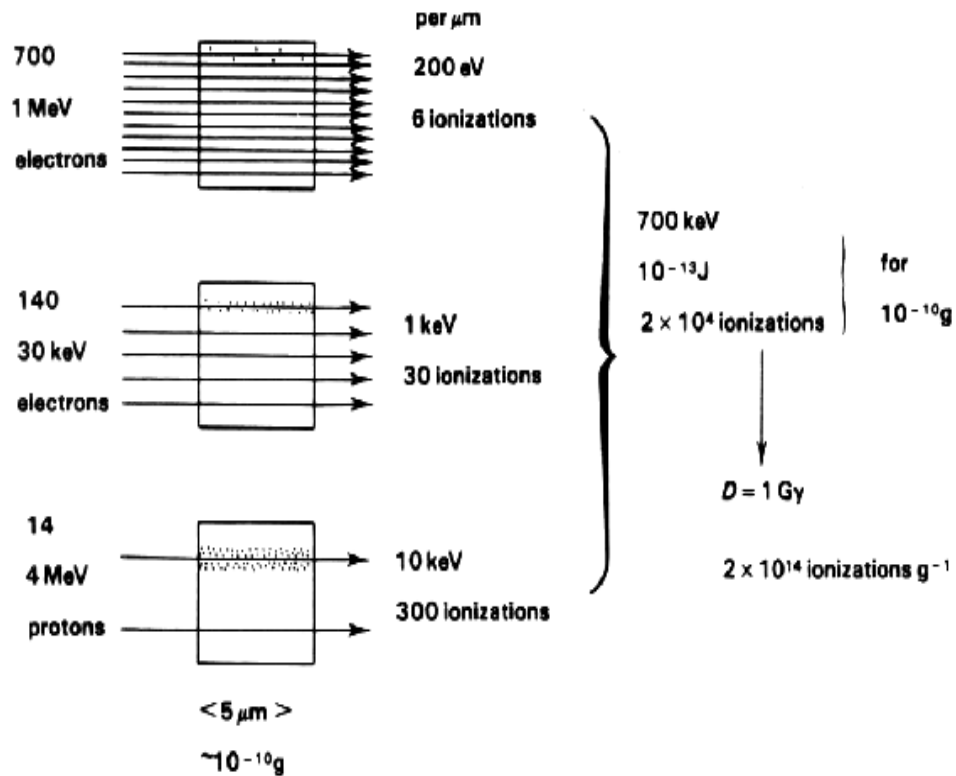


Fig. 1.8: Distribuzione dell'energia e delle ionizzazioni in un elemento di massa pari a  $10^{-10}\text{g}$  che riceve una dose di 1Gy.

La velocità con cui la dose viene rilasciata, indicata col termine rateo di dose, gioca un ruolo fondamentale nella caratterizzazione degli effetti biologici.

Per radiazioni di basso LET la medesima dose induce un maggior numero di danni se rilasciata in tempi brevi (alto dose/rate) piuttosto che in tempi lunghi (basso rateo di dose). Tale differenza di comportamento tuttavia si osserva, per radiazioni di alto LET, debolmente fino a sparire del tutto.

Nel caso di radiazioni indirettamente ionizzanti risulta molto interessante la relazione che intercorre tra dose e fluena. La fluena ( $\Phi$ ) viene definita come il numero di particelle per unità di area:

$$\Phi = dN/da$$

## 1.9 RBE e dose equivalente

Abbiamo visto che differenti tipi di radiazione possono indurre un differente effetto biologico, questa diversità è dovuta sia alle differenti modalità di interazione delle particelle con la materia che alla diversa distribuzione spaziale degli eventi stessi. Ad esempio è ben noto che 1 Gy di neutroni induce un effetto biologico di gran lunga maggiore della stessa dose di raggi X.

Per stabilire il rischio associato all'esposizione di una certa radiazione bisogna conoscerne l'*efficacia biologica relativa* (RBE).

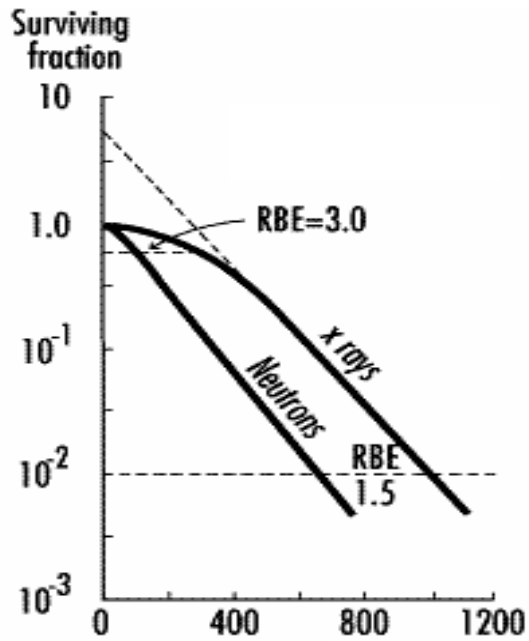
L'efficacia biologica relativa di una data radiazione, relativa ad un determinato effetto biologico, è definita come il rapporto tra la dose di una radiazione di riferimento, solitamente raggi X da 250 kV, ( $D_{250}$ ) e la medesima dose della radiazione in esame ( $D_r$ ) che inducono lo stesso effetto biologico; essa è, dunque, una quantità adimensionale.

$$RBE = D_{250} / D_r$$

Lo studio dell'RBE di una radiazione è estremamente diretto se nel sistema scelto si considera un solo parametro biologico. Esso si complica notevolmente se si sceglie un sistema in cui è necessario tener conto di molteplici parametri.

Per comprendere tale concetto risulta estremamente vantaggioso l'utilizzo delle curve di sopravvivenza. Le curve di sopravvivenza vengono costruite riportando in scala semilogaritmica la frazione di sopravvissuti ed in scala lineare la dose. La figura 1.9 mostra curve di sopravvivenza di cellule di mammifero esposte a varie dosi (espresse in rad) di raggi X da 250 kV e neutroni.

In questo caso l'RBE può semplicemente essere calcolato come il rapporto fra le dosi che causano lo stesso effetto biologico. E' utile osservare, inoltre, che le due curve hanno un andamento differente. La curva relativa ai raggi X mostra a basse dosi un'iniziale "spalla" che indica, qualitativamente, un accumulo di danni sub-letali, all'aumentare della dose l'andamento della curva diventa esponenziale. Tale andamento è tipico delle radiazioni sparsamente ionizzanti.



**Fig. 1.9:** Tipiche curve di sopravvivenza di cellule di mammifero esposte a raggi-x e neutroni. La curva di sopravvivenza dei raggi-x mostra una spalla iniziale che nel caso dei neutroni è estremamente ridotta (Hall, 1994).

Nel caso dei neutroni, o più in generale delle radiazioni densamente ionizzanti, la curva ha un andamento esponenziale sin dalle bassi dosi e la pendenza della retta risulta maggiore che nel caso delle radiazioni sparsamente ionizzanti.

Dal momento che le curve hanno un andamento differente ne risulta che l’RBE non avrà un unico valore ma esso dipenderà dal danno biologico considerato.

A parità di dosi e di tipo di radiazione scelta, l’RBE assumerà valori differenti dipendenti in questo caso dal sistema cellulare o tissutale utilizzato. Studi condotti nei primi anni 60 sono stati mirati alla comprensione degli effetti indotti da vari tipi di radiazioni su differenti tipi di cellule di mammifero. Tali studi hanno chiaramente evidenziato che differenti cellule esibiscono un ampio spettro di “radiosensibilità” . Tale differenza inoltre è risultata essere più marcata per raggi X che per neutroni.

La principale differenza, nel caso dei raggi X, è data dalla differente dimensione della spalla iniziale e la diretta conseguenza di tale andamento è un valore di RBE differente per ciascun sistema considerato. Complessivamente tali studi hanno evidenziato



che nel topo le cellule staminali ematopoietiche hanno la massima radiosensibilità mentre, nello stesso sistema, le cellule della cripta risultano essere le più radioresistenti.

Nell'esempio delle curve sopraccitato va considerato anche che la spalla diminuisce progressivamente all'aumentare del LET. E' interessante sottolineare che il valore di LET al quale l'RBE raggiunge un valore massimo è pressappoco lo stesso, circa 100 keV/μm, per un ampio range di cellule di mammifero, dal topo all'uomo. La spiegazione di tale fenomeno risiede nel fatto che per tale densità di ionizzazione la distanza media tra gli eventi di ionizzazione coincide con il diametro della doppia elica del DNA, ossia 2 nm. Radiazioni caratterizzate da questo tipo di densità di ionizzazione causano molto facilmente una rottura della doppia elica attraverso il passaggio di una singola particella carica. Nel caso dei raggi-x che sono radiazioni sparsamente ionizzanti la probabilità che una singola particella induca una rottura della doppia elica è molto bassa, come conseguenza si ha che i raggi X hanno una bassa efficacia biologica relativa. Il caso estremo è rappresentato da radiazioni densamente ionizzanti, per esempio radiazioni con un valore di LET pari a 200 keV, le quali facilmente produrranno una rottura della doppia elica ma gran parte della loro energia sarebbe "sprecata" dal momento che gli eventi di ionizzazione che avranno prodotto l'effetto saranno spazialmente troppo vicini tra loro. Dal momento che l'RBE è dato dal rapporto fra dosi che producono lo stesso effetto biologico, l'RBE di queste radiazioni densamente ionizzanti sarà più basso di quello ottimale che si avrebbe ad un valore di LET di 100 keV/μm.

I tipi di radiazione che risultano avere questo valore ottimale di LET includono neutroni, protoni di bassa energia e particelle  $\alpha$ .

Dal momento che risulta particolarmente ostico calcolare l'RBE di una radiazione, dovendo tener conto di differenti parametri come ad esempio: il LET della radiazione in esame, la dose, il rateo di dose, il sistema ed il parametro biologico considerati, è stato introdotto a tale scopo il termine *fattore peso della radiazione* ( $W_r$ ). Il fattore peso, che è caratteristico della radiazione, non dipende dall'energia della radiazione stessa ma assume un valore unico ottenuto dall'analisi dei dati sperimentali ottenuti in numerosi esperimenti. Il  $W_r$  per raggi-x e  $\gamma$  è pari ad 1 il caso estremo è rappresentato dagli ioni pesanti e dalle particelle  $\alpha$  per cui assume un valore pari a 20.

La quantità che si ottiene moltiplicando la dose assorbita ed il fattore peso è definita *dose equivalente (H)*:

$$H = D \cdot W_r$$

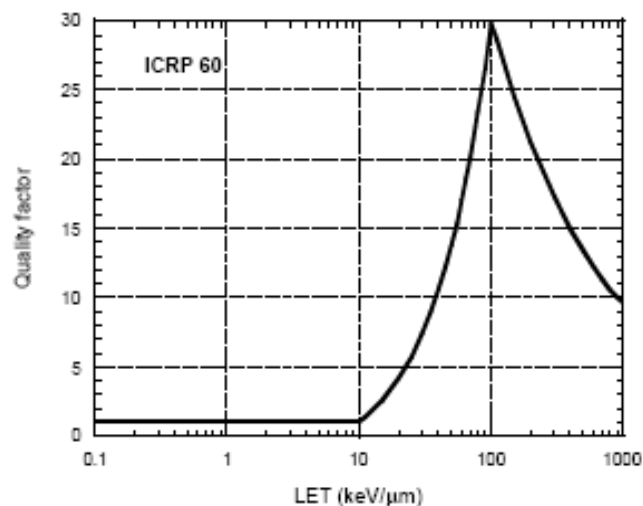
dove la dose è espressa in Gy mentre il fattore peso della radiazione è una quantità adimensionale.

La probabilità di un effetto stocastico (di cui se ne dà un'ampia descrizione nel paragrafo 1.6), come ad esempio induzione di cancro o induzione di patologie ereditabili, dipende non solo dalla dose della radiazione ma anche dalla sua energia; questo spiega perché a parità di dose alcune radiazioni siano biologicamente più efficaci di altre nell'indurre un danno. Di questo dato tiene conto il fattore di qualità (Q) della radiazione. La dose equivalente può quindi anche essere espressa come:

$$D = H \cdot Q$$

ricordando che il fattore di qualità è espresso in sievert (Sv).

Il fattore di qualità Q dipende dal LET della radiazione usata, e l'Internazionale Commissione per la Radio Protezione fornisce la dipendenza funzionale di Q in funzione del LET.



**Fig. 1.1:** Dipendenza dal LET del fattore di qualità, in acqua, come stabilito dall'ICRP.

## 1.10 Effetti biologici delle radiazioni ionizzanti

Gli effetti biologici indotti dalle radiazioni ionizzanti possono essere suddivisi in effetti di tipo *deterministico* ed effetti *stocastici*. Se un danno cellulare indotto da radiazione non viene correttamente riparato le possibili conseguenze si possono essenzialmente ricondurre a due eventi: la cellula è incapace di sopravvivere o riprodursi oppure la cellula stessa sarà ancora vitale ma risulterà modificata presentando ad esempio mutazioni.

Gli effetti *deterministici* sono osservabili per dosi che superano un certo valore soglia, solitamente molto alto. Molti tessuti ed organi a basse dosi di radiazione risultano poco sensibili, una situazione di questo tipo, infatti, può indurre alla perdita di un piccolo numero di cellule senza ulteriori danni aggiuntivi. Se però tale numero diventa via via più consistente può condurre alla perdita di funzione dell'organo stesso. Oltre un certo limite di dose il danno aumenterà all'aumentare della dose stessa oltre a dipendere anche dalla radiosensibilità dell'individuo esposto.

Ben noto è il caso degli individui affetti da Ataxia telangiectasia, un disordine autosomico recessivo. Gli individui che presentano entrambi i geni mutati mostrano una marcata radiosensibilità rispetto agli individui eterozigoti o che non presentano tale mutazione. Inoltre, recenti studi hanno dimostrato che topi AT eterozigoti unitamente alla maggiore radiosensibilità, rispetto ai wild-type, presentavano anche un certo grado di cataratta (Hall *et al.*, 2005).

L'intervallo di tempo che intercorre tra l'irraggiamento ed il manifestarsi del danno, definito *periodo di latenza*, nel caso di effetti deterministici risulta essere solitamente breve.

A dosi non letali i danni radioindotti più comuni sono l'eritema cutaneo e la cataratta. E' stato osservato che la frequenza di cataratta negli astronauti è sensibilmente più alta di quella nella popolazione normale e si ritiene che gli ioni pesanti giochino un ruolo decisivo nell'induzione di questo particolare tipo di effetto (Cucinotta *et al.*, 2001).

La gran parte dei dati in nostro possesso circa gli effetti sull'uomo di un irraggiamento a corpo intero provengono dai sopravvissuti di Hiroshima e Nagasaki, e dalle vittime di altri incidenti nucleari compreso il disastro di Chernobyl. L'esposizione ad altissime dosi di radiazione ha come conseguenza la morte dell'individuo e questa è generalmente nota come *letalità precoce*. L'esposizione a dosi altissime ma non letali dà luogo alla cosiddetta *sindrome prodromica*. Il tempo di sopravvivenza dopo un'esposizione

di questo tipo dipende in larga misura dalla proporzione della dose. A dosi di poche decine di Gy ogni individuo manifesta tale sindrome in un lasso di tempo di circa 5-15 minuti e può persistere per pochi giorni. I sintomi associati a tale esposizione possono essere divisi in due gruppi: gastrointestinali e neuromuscolari. I primi comprendono anoressia, nausea, vomito, diarrea, crampi intestinali, deidratazione e perdita di peso. I sintomi neuromuscolari includono: apatia, sudorazione, febbre ed ipotensione. In seguito la morte sopraggiunge a tempi differenti a seconda della dose ricevuta.

Un'esposizione a corpo intero dell'ordine di 100 Gy la morte sopraggiunge in poche ore dal momento che la maggior parte degli organi viene severamente danneggiata in seguito all'instaurarsi di quella che viene definita *sindrome cerebrovascolare*. I sintomi che precedono la morte sono essenzialmente nausea e vomito seguiti da disorientamento, stress respiratori ed infine coma.

A dosi di circa 10 Gy o poco superiori l'individuo va incontro a *sindrome gastrointestinale* che culmina con la morte a 3-10 giorni dall'esposizione. I sintomi mostrati dagli individui esposti comprendono stanchezza e letargia seguiti da una prolungata diarrea che solitamente indica che la dose ricevuta era maggiore di 10 Gy. Dopo poche giorni questi sintomi sono seguiti da deidratazione e perdita di peso seguiti dalla morte. Questi sintomi sono attribuibili principalmente alla depopolamento delle cellule dell'epitelio del tratto gastrointestinale.

Per dosi comprese tra 3 e 8 Gy a causare la morte può essere il manifestarsi di una *sindrome ematopoietica*. I precursori delle cellule ematiche, che sono mitoticamente attive, vengono completamente sterilizzate dalle radiazioni e la diretta conseguenza è che le cellule mature circolanti non verranno sostituite da nuove cellule. Il manifestarsi della sindrome può richiedere alcune settimane dal momento che essa diviene manifesta solo nel momento in cui le cellule mature circolanti muoiono e la loro sostituzione da parte di cellule nuove risulta insufficiente. Dati clinici indicano che il manifestarsi della sindrome ematopoietica non è ugualmente distribuita fra la popolazione. Individui molto giovani o in età molto avanzata sono molto più sensibili di individui di età media ed inoltre le donne mostrano un più elevato grado di tolleranza alle radiazioni rispetto agli uomini. Dopo circa tre settimane dall'esposizione appaiono i primi sintomi che consistono in emorragie petecchiali della pelle, ulcerazioni della bocca e perdita di capelli. Tutti questi sintomi sono riconducibili ad una depressione del sistema immunitario, infatti la morte, se sopraggiunge, solitamente è dovuta ad infezioni, mentre solitamente l'anemia non è un sintomo osservato.

Diversamente dagli effetti deterministici, gli *effetti stocastici*, non richiedono il superamento di una dose soglia per il loro manifestarsi, hanno lunghi periodi di latenza e la loro gravità non dipende dalla dose ricevuta.

La caratteristica peculiare di questo tipo di effetti è che essi sono effetti tardivi a carico di cellule che sopravvivono alla radiazione ma che “conservano” una memoria del danno ricevuto. A seconda della natura della cellula che ha subito il danno, la mutazione avrà conseguenze differenti.

Nel caso in cui ad essere mutata sia una cellula somatica la conseguenza di tale danno sarà una neoplasia, se ad essere mutata sarà una cellula germinale gli effetti potrebbero essere ereditari, mentre se la mutazione è a carico di una cellula staminale la mutazione potrà essere visibile nella sua progenie. Come già detto, la gravità di questo tipo di danno non aumenta all'aumentare della dose ricevuta, ma sicuramente aumenta la probabilità che un evento di questo tipo si verifichi.

Il periodo di latenza ha una dimensione estremamente variabile e dipende da numerosi parametri, la patologia associata ad esposizione di radiazione che presenta il periodo di latenza più breve è la leucemia. Ancora una volta, le osservazioni effettuate sui sopravvissuti della bomba atomica mostrarono un picco di casi di leucemia a 7-12 anni dall'esposizione.

Nonostante la complessità del danno attualmente vi sono pochi dubbi circa la natura dell'evento scatenante che coinvolge il DNA cellulare, sia attraverso l'induzione di aberrazioni cromosomiche che attraverso l'attivazione di oncogeni o la soppressione dell'attività di geni oncosoppressori.

Sia che ci troviamo di fronte ad effetti di tipo deterministico che stocastico il bersaglio critico della radiazione è rappresentato dal DNA. Tutte le lesioni radioindotte a carico del DNA che non vengono riparate dalla cellula, hanno come conseguenza l'induzione di vari effetti come mutazioni, trasformazione neoplastica ed inattivazione cellulare.

I principali tipi di alterazioni indotte sul DNA possono essere raggruppate come segue:

- rotture della singola elica (ssb) o della doppia elica (dsb), come abbiamo precedentemente visto questo tipo di alterazioni possono essere originati da un meccanismo di tipo diretto o indiretto che a sua volta induce la rottura di uno o entrambi i filamenti della doppia elica

- alterazioni delle basi, è il caso delle mutazioni puntiformi in cui si osserva un cambiamento in una singola coppia di basi di un gene
- inserzioni e delezioni di basi
- cross-link intermolecolari e intramolecolari, nel primo caso si ha la formazione di legami crociati tra diverse regioni tra due filamenti della stessa molecola di DNA, nel secondo si ha la formazione di legami fra DNA ed altre molecole essenzialmente di natura proteica

Tra questi tipi di danni biologici il principale è rappresentato dalle DSB. Se il danno è avvenuto in fase pre-replicativa, una eventuale DSB viene duplicata in fase S ed appare in mitosi come aberrazione cromosomica, se invece il danno avviene in fase G2 o comunque dopo la replicazione del DNA genomico, la sua manifestazione sarà limitata al singolo cromatidio ed in tal caso si parla di aberrazione cromatidica.

Una prima distinzione delle aberrazioni indotte dalle radiazioni sul DNA le divide in aberrazioni numeriche e aberrazioni strutturali. Della prima categoria fanno parte i differenti tipi di aneuploidie, che si instaurano essenzialmente attraverso eventi di non-disgiunzione, mentre le seconde comprendono tutte quelle modifiche che determinano cambiamenti conformazionali e strutturali dei cromosomi.

### **1.11 Radioprotezione nello spazio**

Quotidianamente l'uomo è esposto ad un fondo naturale di radiazione ionizzante. La radioattività presente nell'ambiente può essere sia di origine *naturale* che *artificiale*.

Le fonti artificiali tipicamente sono quelle derivanti dall'utilizzo di radionuclidi o macchine radiogene normalmente utilizzati in medicina per scopi diagnostici o terapeutici.

Fonti di radioattività naturale sono ad esempio il potassio (sotto forma di raggi  $\gamma$ ), in particolare l'isotopo  $^{40}\text{K}$  che normalmente ritroviamo nei cibi, generato per irraggiamento del potassio naturale dai raggi cosmici che riescono ad arrivare al suolo e particelle  $\alpha$  derivanti in larga misura dal decadimento del gas radon presente nelle rocce.

Un piccolo contributo alla radioattività naturale totale deriva dai raggi cosmici che attraversano l'atmosfera terrestre. Tale contributo diviene via via maggiore salendo di quota tanto che la dose annuale assorbita dal nostro pianeta a 5500 metri di altitudine è circa il doppio di quella a livello del mare.

Risulta dunque evidente il rischio cui sono sottoposti gli astronauti durante le missioni interplanetarie. La radiazione cui loro possono essere esposti consiste per la maggior parte di particelle cariche di alta energia come protoni, elio e ioni più pesanti provenienti dalle *Fasce di Van Allen*, i *raggi cosmici* e le *solar particle events (SPE)* (Durante, 2002).

Le *Fasce di Van Allen* è quella zona che parte dall'atmosfera terrestre e si estende fino ad una distanza di circa 76000 km dalla Terra stessa. Questa zona è composta da due fasce formate da particelle cariche, per lo più di origine cosmica e solare, intrappolate nel campo magnetico terrestre.

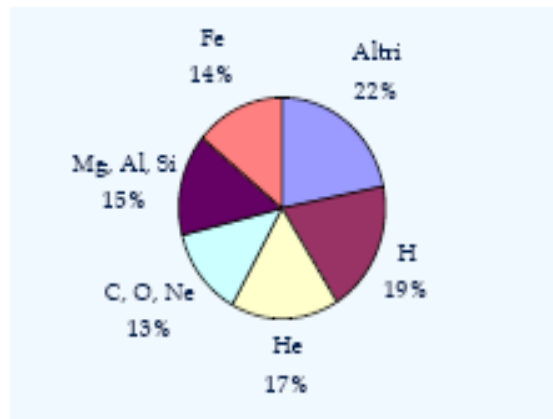
La prima fascia è composta principalmente da protoni molto energetici generati da collisioni tra le particelle dei raggi cosmici e gli atomi dell'atmosfera, mentre la seconda fascia consiste di elettroni. Gli elettroni, avendo un limitato range di penetrazione possono facilmente essere schermati dalle pareti dei veicoli spaziali, il contrario vale per i protoni i quali, anche se presenti in una zona meno estesa sono capaci di penetrare all'interno dei veicoli e generare reazioni che portano alla formazione di particelle secondarie estremamente pericolose per gli equipaggi.

Le Fasce di Van Allen sono centrate con l'asse magnetico terrestre, il quale è inclinato di  $\sim 11^\circ$  rispetto a quello geografico; questo fa sì che la loro distanza non sia omogenea rispetto all'intera superficie terrestre. Sopra l'Oceano Atlantico meridionale la parte più intensa delle Fasce di Van Allen è molto vicina alla Terra, fino a toccare la parte alta dell'atmosfera, questa zona è detta Anomalia del Sud Atlantico. Il maggior contributo alla dose durante le missioni spaziali in Low Earth Orbit (LEO) deriva proprio dai protoni intrappolati in questa zona.

I *raggi cosmici* che costituiscono la Radiazione Cosmica Galattica (GCR) sono presenti isotropicamente nello spazio. La GCR consiste per l'87% di protoni, il 12% elio e l'1% di particelle HZE, ossia nuclei al alto numero atomico ( $Z$ ) ed alte energie.

Nei raggi cosmici sono presenti tutti gli elementi da  $Z = 1$  a  $Z = 92$  anche se gli elementi più pesanti del ferro sono piuttosto rari. Nonostante i protoni siano i principali componenti della GCR, le particelle HZE sono ugualmente importanti dal momento che forniscono il contributo maggiore alla dose di radiazione depositata, quindi a  $Z^2$ . La figura

1.11 mostra una stima teorica del contributo alla dose equivalente dovuto alle diverse componenti dei raggi cosmici (NASA, 1998). Si osserva inoltre che i protoni danno un contributo inferiore al 20% del totale mentre il resto è dovuto alle particelle HZE ed all'elio.



**Fig. 1.11:** Contributo relativo delle diverse componenti della GCR alla dose equivalente (valutato a livello della pelle). (NASA, 1998)

Dal momento che la qualità della radiazione nello spazio è molto differente da quella sulla Terra, si comprende la necessità di ridurre il rischio per quella categoria di persone esposte a tale campo di radiazione come gli astronauti. Sulla Terra le categorie di persone esposte a radiazione ionizzante sono rappresentate da alcune classi di lavoratori (come il personale della radiologia e i minatori) o dai pazienti di radioterapia. Tali impieghi di radiazioni prevedono l'utilizzo di raggi-x o raggi  $\gamma$  che sono radiazioni di basso LET. I dati epidemiologici disponibili provengono da sopravvissuti della bomba atomica in Giappone che consentono una stima de rischio per radiazioni a basso LET. Tuttavia, dati provenienti da irraggiamenti con HZE non sono disponibili e questo rende complicata la stima del rischio per esposizioni alla GCR (Cucinotta e Durante, 2006).

I **Solar Particle Events** sono flussi di particelle cariche: protoni, elio, e ioni pesanti di alta energia provenienti dagli strati più esterni del Sole. Questi eventi possono originarsi



da eruzioni solari o da eiezioni dalla corona solare. La durata degli SPE è estremamente variabile, da alcune ore a giorni o settimane. I protoni contribuiscono per ~ il 90% alla dose equivalente con energie che di solito si aggirano sui 100-200 MeV e che raramente arrivano ad un GeV. Sono state osservate delle SPE particolarmente importanti dovute ad emissioni solari particolarmente violente. In corrispondenza di tali eventi, che sono maggiormente frequenti durante la massima attività solare, la frequenza e l'intensità delle emissioni aumentano fino a raggiungere, in alcuni casi, fluenze di  $10^{10}$  particelle/cm<sup>2</sup> con energie maggiori di 1 GeV/n.

Le SPE costituiscono il più alto rischio per gli equipaggi delle missioni interplanetarie, se non protetti adeguatamente. Durante la massima attività solare, quando cioè è massima la probabilità che uno di questi eventi si verifichi, l'intensità dei raggi cosmici e quella delle particelle presenti nella Fasce di Van Allen è minima. Pianificando, quindi, una missione durante il massimo dell'attività solare si riduce la dose dovuta ai raggi cosmici ed alle particelle cariche, ma aumenta la probabilità di trovarsi in una SPE particolarmente intensa.

## 1.12 Schermature

Per i lavoratori esposti sulla Terra la protezione dalle radiazioni può essere realizzata intervenendo su diversi parametri. L'utilizzo di dosimetri personali permette di quantificare la radiazione assorbita nel tempo da ogni singolo individuo e quindi si configura come il più semplice dei metodi normalmente utilizzati nella radioprotezione. La costruzione di barriere fisiche, costruite in opportuni materiali a seconda del tipo di radiazione, consente inoltre di schermare l'operatore riducendone l'esposizione a radiazione. Inoltre aumentando la distanza dalla sorgente si ha una riduzione della dose assorbita.

Gli astronauti analogamente sono muniti di dosimetri personali durante le loro missioni, ma per la radioprotezione degli equipaggi l'unico parametro fisico sul quale si può intervenire è la *schermatura* dei veicoli. La scelta e gli spessori dei materiali schermanti deve innanzitutto tener conto del tipo di radiazione e della sua energia. La presenza di schermature, tuttavia, può aumentare il rischio dell'esposizione a causa di fenomeni di frammentazione nucleare che possono realizzarsi dall'interazione fra le

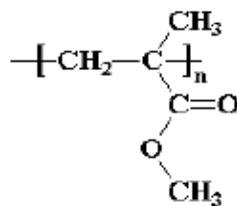
particelle cariche e gli atomi del materiale dello schermo. In seguito a questo fenomeno, dall'interazione della GCR con il materiale dello schermo vengono prodotte una serie di particelle secondarie, inclusi neutroni, di più bassa energia. Nonostante la loro energia, rispetto a quella delle particelle incidenti, sia inferiore esse possono avere un più elevato fattore di qualità.

Non essendo sempre possibile quantificare la composizione del campo di radiazione che viene trasmesso all'organismo sono stati sviluppati modelli matematici che forniscono una stima della dose assorbita dai vari organi. I *codici di trasporto* (Andersen *et al.*, 2004) sono programmi che attraverso una simulazione dell'esperimento sono in grado fornire la composizione del fascio trasmesso dopo un certo spessore di un dato materiale.

Nella progettazione di uno schermo, tuttavia, oltre alla frammentazione del fascio vanno anche considerati altri parametri come l'ingombro ed il peso dello schermo stesso. Generalmente le pareti dei veicoli spaziali sono costituite di  $5 \text{ g/cm}^2$  di alluminio, capaci di schermare protoni di energie inferiori a 65 MeV capaci di penetrare all'interno dell'organismo.

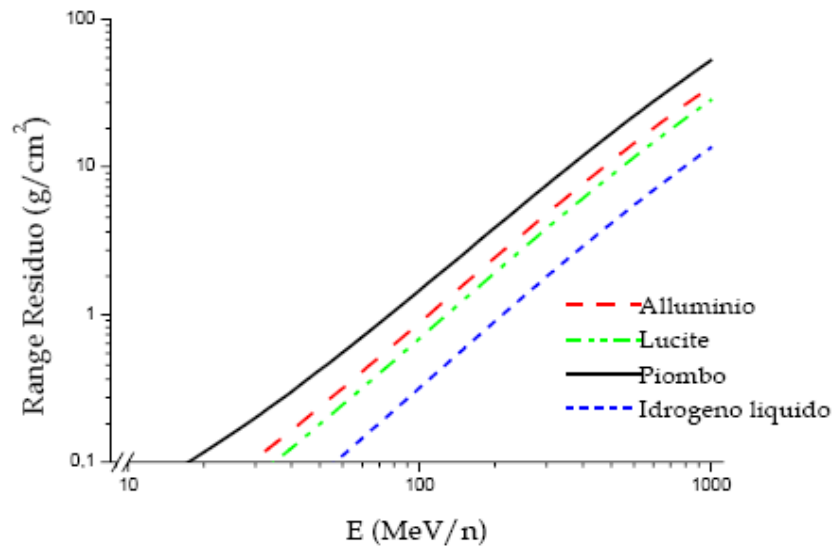
Le particelle cariche interagiscono con gli atomi dello schermo essenzialmente attraverso ionizzazione ed eccitazione e reazioni nucleari che causano la frammentazione delle particelle incidenti e la formazione di frammenti più leggeri.

Come abbiamo visto nel paragrafo 1.1.3 e specificamente dalla formula di Bethe e Block, la perdita di energia per ionizzazione aumenta all'aumentare del rapporto  $Z_b/A$ . I materiali che hanno il massimo numero di elettroni per unità di massa, quindi, sono quelli che determinano il massimo potere frenante. L'idrogeno è risultato essere il materiale che assorbe meglio e quello che causa la frammentazione maggiore del proiettile. Materiali di basso  $Z$  e ricchi di atomi di idrogeno, come ad esempio la lucite (un materiale plastico, la cui struttura è mostrata in figura 1.12), sono risultati essere anch'essi buoni schermi.



**Fig. 1.12:** Struttura della lucite o PMMA (polimetil metacrilato)

In figura 1.13 è mostrato l'andamento del range residuo di energia per un fascio di ioni  $^{56}\text{Fe}$  da 1 GeV/n in materiali di diverso spessore. E' evidente che l'idrogeno sia il materiale assorbente migliore seguito dalla lucite.



**Fig. 1.13:** Range residuo per un fascio di ioni  $^{56}\text{Fe}$ , in piombo ( $\rho=11,34 \text{ g/cm}^3$ ), alluminio ( $\rho=2,7 \text{ g/cm}^3$ ), lucite ( $\rho=1,2 \text{ g/cm}^3$ ) ed idrogeno liquido ( $\rho=0,0715 \text{ g/cm}^3$ ). Risultati ottenuti con il programma di calcolo SRIM 2003

## *Capitolo 2*

### *Danno citogenetico radioindotto*

L'esposizione dei sistemi biologici alle radiazioni ionizzanti può risultare in una molteplicità di effetti cellulari di cui il più severo è la *morte cellulare*.

Una definizione generale di morte cellulare potrebbe dar luogo a controversie per cui risulta molto utile fare delle distinzioni. Per cellule differenziate, cioè non proliferanti, come nervi, muscoli o cellule secretorie la morte cellulare si identifica con la perdita di una specifica funzione. Nel caso di cellule proliferanti, come le cellule staminali ematopoietiche, la definizione assume il significato di perdita dell'integrità riproduttiva (Hall, 1994).

Un ulteriore meccanismo cellulare che può instaurarsi in seguito ad irraggiamento è la morte programmata o *apoptosi*. La morte cellulare per apoptosi non necessariamente avviene immediatamente dopo l'esposizione a radiazione, la cellula può, infatti, anche sopravvivere e dividersi più volte prima di morire. L'apoptosi, tuttavia, non bisogna dimenticare che è un processo che avviene anche in cellule e tessuti normali e non esposti a radiazione sia nei mammiferi che negli anfibi, sia negli embrioni che negli adulti. Ad esempio essa è implicata nella regressione della coda nei girini durante la metamorfosi.

In ogni caso esistono molte prove a favore dell'ipotesi che lesioni a carico del DNA costituiscano le cause degli effetti biologici derivanti dall'esposizione a radiazione; questi, infatti, oltre ai due processi precedentemente descritti, includono mutazioni, e carcinogenesi.

Sarebbe grossolano pensare che le lesioni al DNA siano una diretta causa dell'induzione di aberrazioni cromosomiche. La cellula possiede, infatti, un complesso sistema di riparo del danno che solamente se risulta insufficiente per il tipo di danno indotto o se "commette" errori nell'operare, e dunque ripristinare le condizioni di normalità, ha come conseguenza l'instaurarsi di mutazioni cromosomiche.

Nel paragrafo 1.6 sono state descritte alcune classi di aberrazioni cromosomiche tra cui le rotture a singolo filamento e le rotture a doppio filamento. E' stato osservato che una dose di 4 Gy di raggi X è capace di uccidere circa il 50% di una popolazione di fibroblasti

umani e che tra la frazione di sopravvissuti è misurata solamente 1 aberrazione per cellula se si lascia che tutti i sistemi di riparo agiscano (Cornforth e Bedford, 1987). Probabilmente questo valore lo si ritrova raddoppiato in linfociti umani utilizzando lo stesso tipo e dose di radiazione (Lloyd *et al.*, 1975). Una dose di questo tipo produce approssimativamente 120-160 dsb, 1000-2000 ssb ed una quantità simile di danni alle basi per cellula. In una situazione in cui vengono prodotti un numero estremamente alto di ssb, come ad esempio un'esposizione con luce UVB di cellule in cui si è fatta incorporare BRdU, si osservano circa 50000 ssb e nessuna aberrazione cromosomica (Bender *et al.*, 1973; Ben-Hur e Elkind, 1972). Questi dati suggeriscono che le ssb ed i danni alle basi sono più rapidamente ed efficacemente riparati rispetto a danni più complessi come le dsb (Bailey e Bedford, 2006). Ovviamente questo non vuol dire che i dsb non vengano riparati, al contrario, per tale scopo la cellula possiede eleganti e complessi sistemi.

## **2.1 Meccanismi di formazione e riparo delle aberrazioni cromosomiche**

Per “danno” al DNA si intende qualunque cambiamento che introduca nella doppia elica una deviazione dalla struttura normale. Nel corso dell'evoluzione sia gli organismi procariotici che eucariotici hanno sviluppato complessi sistemi capaci di far fronte ai danni indotti al DNA (Lewin, 2003).

La controversia circa i meccanismi alla base dell'induzione delle aberrazioni cromosomiche da parte delle radiazioni ha avuto origine nel momento stesso in cui si comprese che le radiazioni inducevano danni al DNA.

Il primo modello proposto fu il ***Breakage-and-Reunion***. Esso venne sviluppato in seguito a studi effettuati su *Drosophila* ma la sua formulazione, supportata da numerosi dati sperimentali, derivò dal lavoro di Sax su *Tradescantia*.

Fu postulato che il primo effetto della radiazione sia una rottura a livello del cromonema e che tutte le aberrazioni strutturali derivino da questa lesione primaria. Questa rottura, che genera due estremità libere, può quindi avere tre destini diversi:

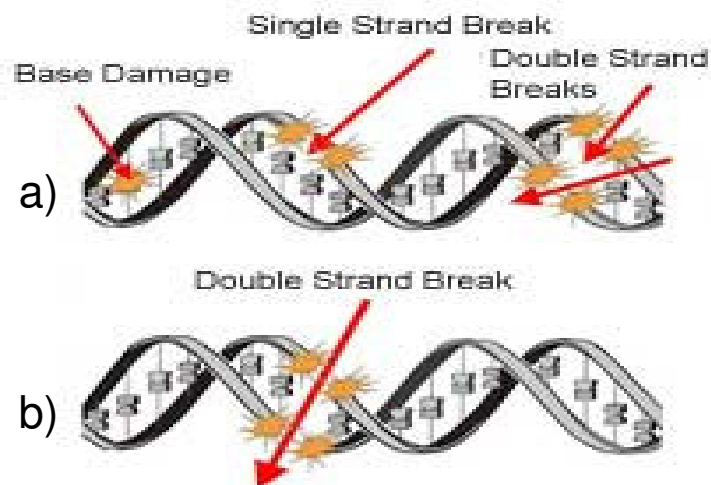
- può essere ricongiunta ripristinando il cromosoma iniziale,

- se è presente una seconda lesione, spazialmente vicina alla precedente, può interagire con questa dando luogo a una nuova combinazione e produrre un'aberrazione strutturale,
- può fallire entrambi i precedenti destini e presentarsi come una delezione terminale.

Fu immediatamente osservato che il danno indotto dalle radiazioni ha un andamento lineare all'aumentare della dose e questo fu visto per tutte le classi di aberrazioni, almeno per radiazioni di basso LET (Savage, 1998).

La teoria del Breakage and Reunion è anche nota come modello “due colpi”, perché assume che due radiazioni siano necessarie per indurre una rottura della doppia elica in due cromosomi e promuovere lo scambio. In realtà le due rotture possono essere prodotte dal passaggio di due particelle cariche indipendenti (figura 2.1 a) ed in questo caso la probabilità di scambio aumenta col quadrato della dose; questo meccanismo è predominante per radiazioni di basso LET a dosi basse o moderatamente alte.

La doppia rottura, però, può anche derivare dall'attraversamento della doppia elica da parte di una singola particella (figura 2.1 b). Questo meccanismo è predominante per radiazioni di basso LET a basse dosi e basso dose/rate mentre per radiazioni di alto LET è predominante a qualunque dose (Cornforth, 2006).



**Fig. 2.1:** Rotture della singola e doppia elica del DNA indotte: a) dal passaggio di due particelle indipendenti e vicine tra loro nel caso della dsb, e b) dal passaggio di una singola particella.

In seguito alla scoperta che alcune sostanze chimiche possono produrre nella cellula aberrazioni cromatidiche, qualitativamente identiche a quelle indotte dalle radiazioni, fu proposto un secondo modello, la *Exchange theory*. Fondamentalmente questa teoria prevede che la lesione primaria al DNA non sia una rottura ma una *lesione instabile* che tende a ritornare alla situazione normale o che può restare non visibile. Se, tuttavia, due eventi sono prodotti contemporaneamente questi possono dar inizio ad un processo di scambio, e l'aberrazione potrà essere visibile in metafase. Può anche accadere che l'evento di scambio non si completi ed in questo caso esso sarà visibile come una *discontinuità* nella struttura del cromosoma.

Il primo modello proposto da Sax, Lea e Revell per questa teoria era completamente differente da quella che oggi è la teoria stessa.

Le prime obiezioni che furono fatte alla loro versione della teoria erano fatte sulla base di una erronea idea circa la struttura dei cromosomi che essi avevano. Un adeguato candidato per la lesione instabile di cui Revell parlava potrebbe proprio essere un dsb. La lesione instabile, come egli stesso notava, ha una vita media limitata ed è rapidamente riparata.

Attualmente non è possibile asserire con certezza che uno scambio è sempre coinvolto nella formazione di una aberrazione. In ogni caso quando aberrazioni di tipo cromatidico vengono indotte da radiazioni in cellule in cui i cromatidi fratelli sono stati fatti replicare in presenza di BRdU, è possibile identificare, in modo non ambiguo, *discontinuità* derivanti da intrascambi. Sorprendentemente, però, la frequenza relativa di queste discontinuità è pressoché costante indipendentemente dal numero di rotture, dalla dose o dal tipo cellulare. Ancora più sorprendente è che la frequenza misurata nei controlli è risultata essere la stessa. Poiché gli intrascambi sono generati da due rotture, è molto difficile conciliare la teoria di Revell con la costanza misurata (Savage, 1998).

Le attuali e più profonde conoscenze dei cromosomi e della loro struttura intranucleare unitamente alla consapevolezza che gli stessi sistemi di riparo cellulare possono essi stessi produrre aberrazioni strutturali ha mitigato la controversia che la *exchange theory* ha sollevato quando per la prima volta è stata introdotta.

Un terzo meccanismo proposto è la *Molecular Theory*. Il punto centrale di questa teoria è che un iniziale dsb, originatosi da un errore durante l'intervento di un meccanismo di riparo, porti alla produzione di un secondo dsb indotto enzimaticamente.

In definitiva, dunque a prescindere dal meccanismo che li ha generati, i danni subiti dal DNA vengono ridotti al minimo, laddove non è possibile un recupero completo da

parte della cellula, ad opera di complessi sistemi capaci di riconoscere il danno e di correggerlo.

I sistemi di riparo spesso riconoscono un'ampia gamma di distorsioni del DNA che fungono da segnali per la loro azione. Questi sistemi possono essere raggruppati in alcune classi generali. La **riparazione diretta** è molto rara e prevede la semplice rimozione del danno. L'esempio più noto è la *fotoriattivazione* dei dimeri di pirimidina. Questo meccanismo è estremamente diffuso in natura e sembra avere particolare rilevanza nelle piante. La **riparazione per escissione** (*excision repair*) è avviata da un enzima capace di riconoscere una base danneggiata o un'alterazione spaziale della molecola di DNA. Al riconoscimento segue l'escissione di una sequenza che contiene le basi danneggiate, viene quindi, sintetizzato un nuovo segmento di DNA che va a sostituire quello rimosso. La **riparazione degli errori di appaiamento** (*mismatch repair*) ha luogo durante uno dei meccanismi di controllo cellulare. Nel caso in cui tali sistemi riconoscono l'incorporazione di una base errata si attivano i sistemi di correzione. I *sistemi di tolleranza* (*tolerance system*) che agiscono in modo da superare le difficoltà che insorgono quando un sito danneggiato blocca la normale replicazione. In figura 2.2 è mostrato uno schema riassuntivo dei processi appena descritti.

Tutti questi processi di riparo, che vengono generalmente definiti *homologous repair* (HR), intervengono a condizione che l'elica complementare all'elica sulla quale è presente il danno, sia integra. Questa infatti viene utilizzata come stampo per ripristinare la sequenza originaria.

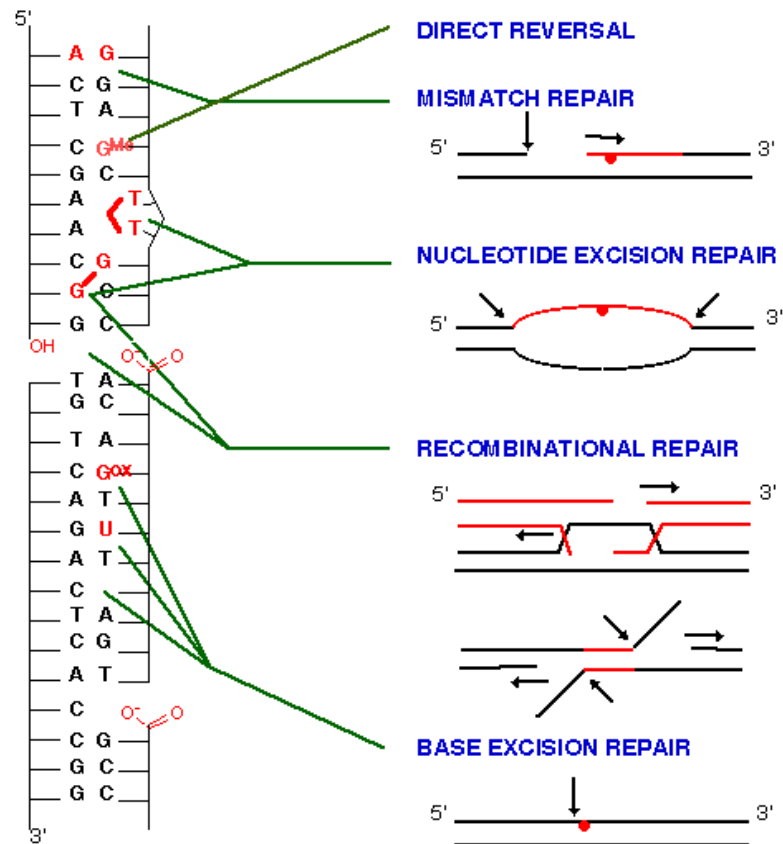
La maggior parte delle informazioni circa l'HR derivano da studi condotti su batteri, fagi e lieviti in cui questo è il meccanismo di riparo più efficiente. Tuttavia, studi successivi hanno messo in evidenza che anche le cellule dei vertebrati sono capaci di usare efficacemente questi sistemi (Liang *et al.*, 1998).

In presenza di dsb entrambe le eliche sono interessate dal danno per cui non esiste uno stampo da poter essere utilizzato. Contrariamente al lievito, dove in presenza di dsb, il meccanismo predominante è comunque l'homologous ricombination, nei mammiferi il meccanismo principale è il **non-homologous end-joining** (NHEJ) (Jeggo, 1998).

Il sistema NHEJ fu osservato per la prima volta durante esperimenti di trasfezione in cellule di mammifero e solo successivamente fu riportato anche per il lievito. Negli anni seguenti il meccanismo di azione di questo sistema è stato studiato nei dettagli utilizzando come sistema cellule di mammifero, estratti cellulari di uova di *Xenopus laevis* e lievito.



## DNA DAMAGE      DNA REPAIR SYSTEM



**Fig. 2.2:** Rappresentazione schematica dei principali homologous DNA repair mechanism.

Nonostante l'intero meccanismo molecolare del sistema NHEJ non sia completamente noto nei dettagli è evidente che esso operi in quattro passaggi distinti:

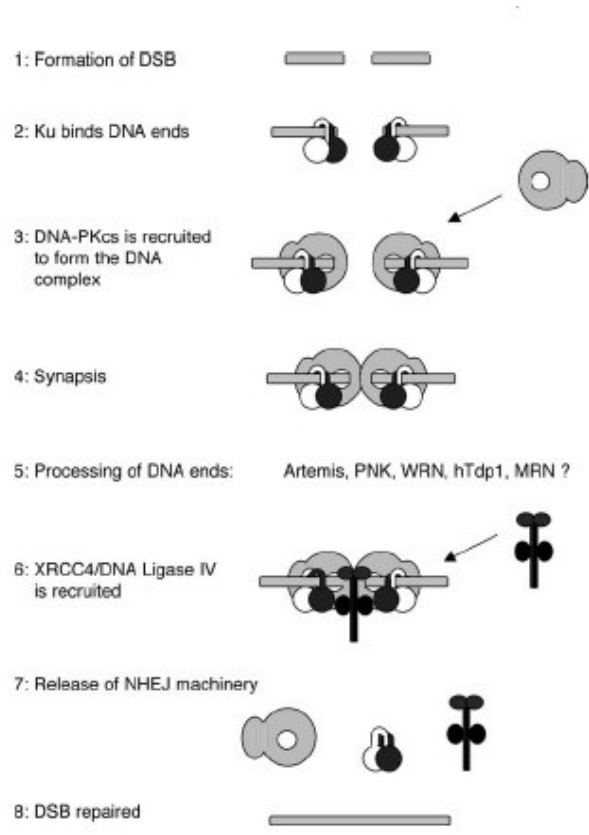
- identificazione di un dsb
- formazione di un ponte molecolare che tenga unite le due estremità libere del DNA
- modifiche a carico delle estremità danneggiate
- riparo del danno (Weterings e van Gent, 2004).

Il riconoscimento della regione interessata dalla rottura è realizzato da una proteina nota come Ku. Ku è un eterodimero formato dalle subunità Ku70 e Ku86 (nota anche come Ku80) ed è molto abbondante nella cellula. In seguito al legame di Ku con le estremità

rotte del DNA, la formazione del ponte molecolare si realizza attraverso il legame di DNA-PK<sub>cs</sub>, una serina/treonina chinasi di circa 465 kDa.

Questi due processi, tuttavia, possono realizzarsi solamente se le estremità rotte del DNA sono tra loro compatibili. Solitamente il processo ha inizio su regioni di microomologia lunghe 1-4 nucleotidi, se tali regioni risultano più lunghe, l'eccesso di DNA viene eliminato da specifiche nucleasi. Recentemente una di queste nucleasi, ARTEMIS, è stata individuata in pazienti in cui una mutazione a suo carico provoca severe immunodeficienze (Moshous *et al.*, 2001). Altri studi invece hanno fatto emergere dubbi circa il reale coinvolgimento di ARTEMIS nel sistema NHEJ ed hanno suggerito che questa venga attivata in risposta a stimoli da stress cellulari, compresi i danni indotti da radiazione (Zhang *et al.*, 2004).

Una volta terminati questi processi, al ponte molecolare assemblatosi sul DNA, si lega il complesso XRCC4-DNA ligasi IV che media il ricongiungimento delle estremità. In figura 2.3 è riportato il meccanismo (Lieber *et al.*, 2003).



**Fig. 2.3:** Rappresentazione schematica delle principali tappe del processo NHEJ e delle principali molecole coinvolte (Lees-Miller and Meek, 2003)

Il sistema NHEJ nelle cellule normali di mammifero è in competizione con l'homologous recombination come hanno dimostrato studi *in vivo*, in cui l'eliminazione di Ku ha messo in evidenza l'attivazione di una ricombinazione omologa (Pierce *et al.*, 2001). Questo modello, tuttavia, è in contrapposizione con dati che mostrano come mutazioni nei componenti del complesso XRCC4-DNA-ligasi IV determinino l'attivazione del meccanismo alternativo di riparo dei dsb (Delacote *et al.*, 2002). Sembrerebbe, dunque, che negli organismi eucariotici il primo sistema da attivarsi sia l'NHEJ e che solo successivamente si attivi l'homologous recombination solo se questo, per qualche ragione, non può riparare il danno.

Da quanto detto sin'ora appare chiaro che se il processo di riconoscimento e riparo del danno avviene in modo corretto si avrà un ripristino della situazione normale. In caso contrario il sistema di riparo stesso può essere fonte di induzione di aberrazioni cromosomiche.

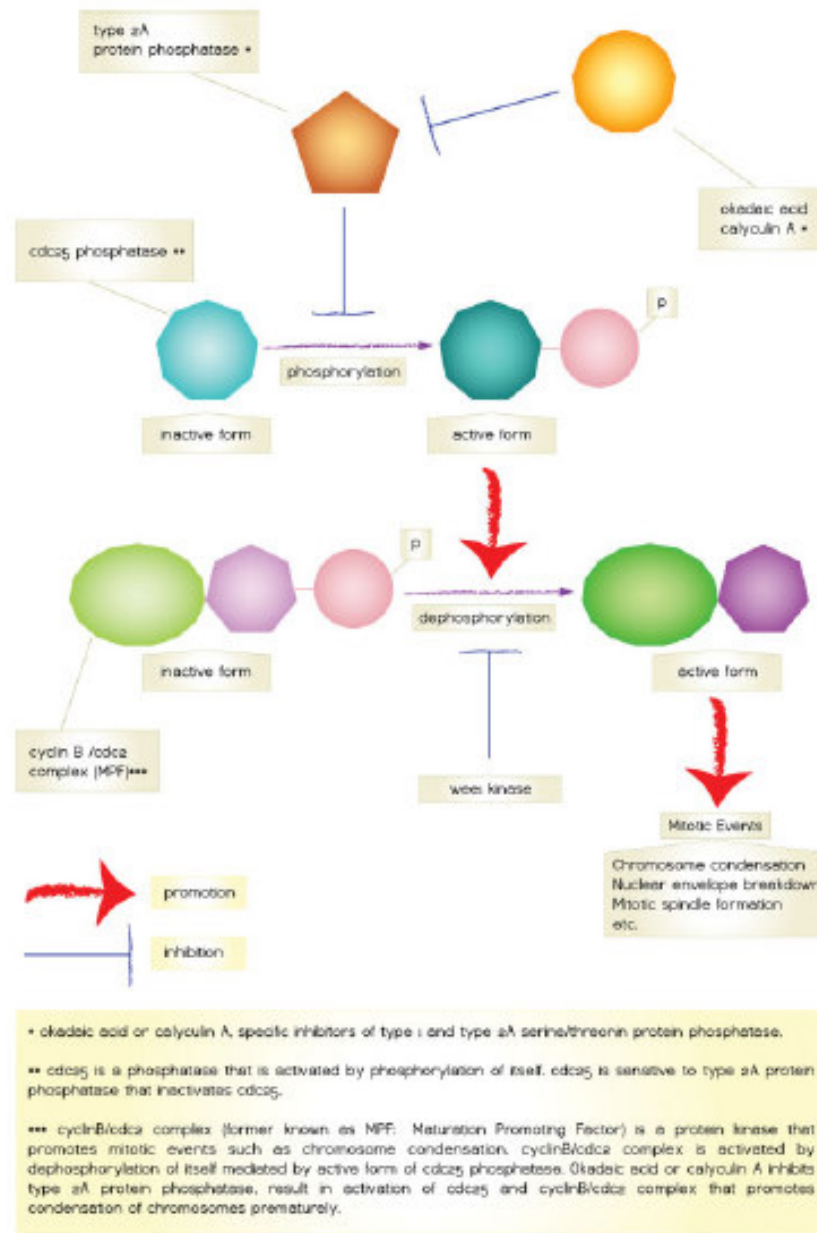
## **2.2 Tecniche citogenetiche per lo studio delle aberrazioni cromosomiche**

Generalmente le aberrazioni cromosomiche strutturali, contrariamente a quelle numeriche, sono visualizzabili solamente in metafase, cioè quando la condensazione cromosomica rende visibile la struttura dei cromosomi.

Il tipo cellulare più utilizzato a tale scopo sono i linfociti del sangue periferico, il cui utilizzo per fini specifici come ad esempio la biosimetria, è preferibile rispetto ad altri sistemi cellulari come ad esempio i fibroblasti (Fossi, 1994). Tali cellule solitamente sono bloccate nella fase G0 del ciclo cellulare e molto diffuso è l'utilizzo di sostanze chimiche che li stimolano a riprendere il ciclo cellulare.

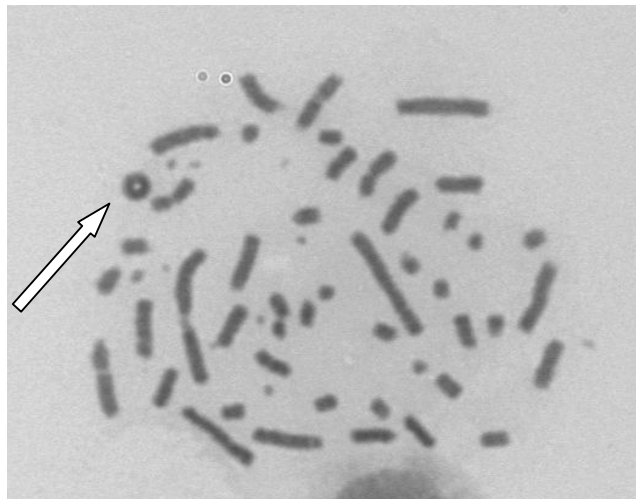
Uno degli effetti delle radiazioni sui sistemi cellulari, oltre ovviamente all'induzione di lesioni a carico del DNA come dettagliatamente è stato già osservato, è l'induzione di ritardo mitotico come risposta allo stress. E' intuitivo comprendere che l'analisi di un campione in queste condizioni si traduce in una sottostima del fenomeno che si vuole investigare. A tale scopo risulta molto utile l'impiego della *premature chromosome condensation* (PCC). Questa tecnica, inizialmente sviluppata mediante la fusione di cellule sincronizzate (in fase G1, G2 o S) con il virus Sendai, attualmente fa uso di sostanze chimiche come la calyculin A o l'acido ocadaico (Gotoh e Durante, 2006).

La calyculin A, che è un inibitore delle serine/treonine fosfatasi di tipo 1 e tipo 2, è dunque capace di defosforilare l'MPF convertendolo nella forma attiva che promuove la condensazione cromosomica (figura 2.4). L'aspetto più intrigante di questa tecnica è che essa permette di indurre la condensazione dei cromosomi in qualsiasi fase del ciclo del ciclo cellulare, quando cioè solitamente i livelli di MPF attivo sono molto bassi, ovviando al problema legato alla sottostima del danno.



**Fig. 2. 4:** Meccanismo della condensazione cromosomica prematura indotto dalla Calyculin A (Gotoh e Durante, 2006)

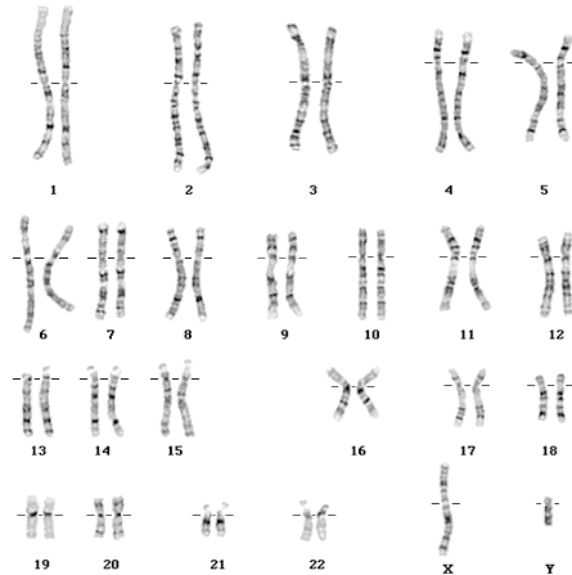
Una delle prime tecniche di colorazione per visualizzare i cromosomi è stata la colorazione in Giemsa. Questo colorante basico si lega ai gruppi fosfato e dunque colora il DNA in modo indistinguibile. Questo determina che con tale tecnica è possibile visualizzare un numero estremamente ridotto di aberrazioni cromosomiche tipo dicentrici e ring (che verranno dettagliatamente descritte nel paragrafo successivo) escludendo, dunque, dall'analisi un'ampia gamma di riarrangiamenti cromosomici (figura 2.5). Attualmente questa tecnica viene utilizzata esclusivamente per analisi di tipo preliminare o quando l'impiego di altre tecniche non sono possibili; ad esempio quando sonde fluorescenti applicate in altre tecniche non sono presenti in commercio.



**Fig. 2.6:** Cariotipo umano visualizzato mediante colorazione in Giemsa in cui è possibile osservare la presenza di un'aberrazione cromosomica di tipo ring.

Solo successivamente, intorno ai primi anni 70, fu introdotta la tecnica del bandeggio. Il bandeggio cromosomico riflette l'organizzazione strutturale e funzionale del genoma (isocore), ad esempio le bande chiare che si ottengono con la colorazione Giemsa corrispondono a regioni caratterizzate da una generale attività trascrizionale, replicazione precoce, basso contenuto di DNA ripetuto e sensibilità alla DNAsi I. Il livello organizzativo cromatinico che si riesce ad osservare con questo tipo di colorazione è alquanto grossolano, infatti una banda citogenetica ha una dimensione media di circa 10 Mb.

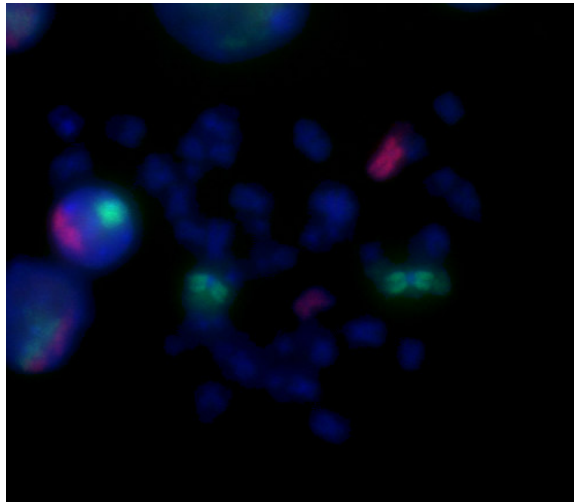
I vari tipi di bandeggio fanno uso di differenti sostanze per visualizzare regioni distinte sui cromosomi congiuntamente all'impiego di enzimi proteolitici come la tripsina. L'analisi delle aberrazioni cromosomiche tramite bandeggio risulta più dettagliata di quella effettuata con la sola colorazione in Giemsa dal momento che l'analisi delle bande permette di evidenziare la presenza di eventuali aberrazioni come inversioni, traslocazioni, delezioni e duplicazioni. Questo tipo di analisi, tuttavia, è estremamente complesso.



**Fig. 2.7:** Cariotipo umano visualizzato con la tecnica del bandeggio G.

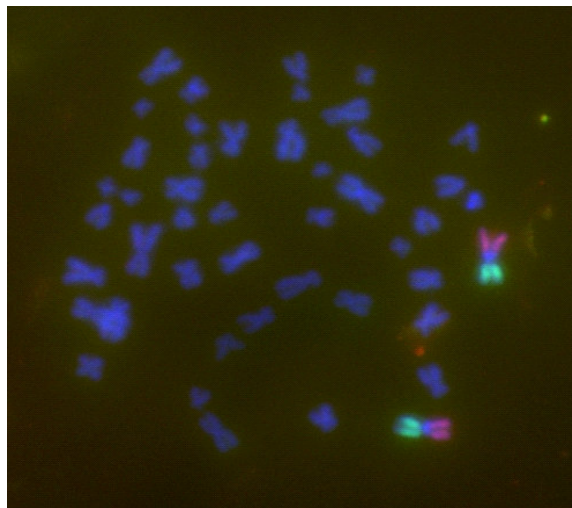
L'innovazione nello studio delle aberrazioni cromosomiche è stato segnato dall'introduzione della tecnica FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization). Questa tecnica, mediante l'utilizzo di sonde marcate specifiche per cromosomi o parte di essi in modo fluorescente, consente di effettuare un'analisi dettagliata e più immediata rispetto alle tecniche precedentemente descritte.

L'utilizzo di sonde fluorescenti “*whole chromosome*” (figura 2.8), che permettono una colorazione selettiva di interi cromosomi, consente di effettuare una dettagliata analisi delle aberrazioni cromosomiche strutturali, definite intercromosomiche, e cioè, coinvolgenti due o più cromosomi (per una dettagliata descrizione di queste aberrazioni si rimanda al paragrafo successivo).



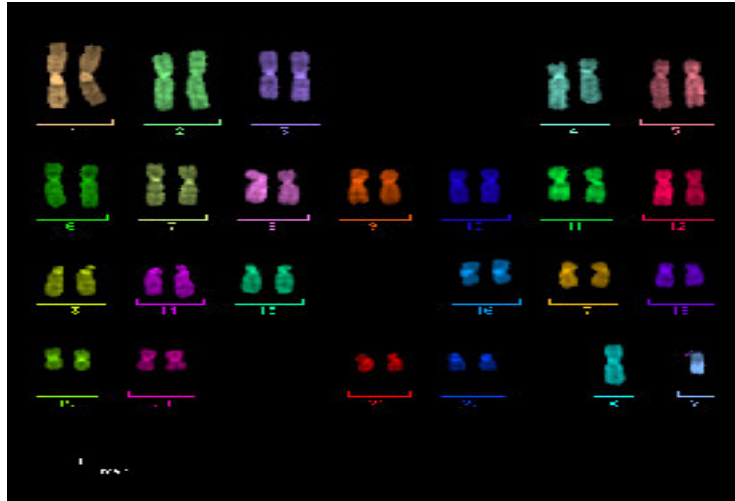
**Fig. 2.8:** Cromosomi metafasici umani visualizzati con tecnica FISH utilizzando sonde per il cromosoma 1 (verde) e 2 (rosso) controcolorati in DAPI

Le anomalie non rilevabili con l'impiego di questo tipo di sonde sono le aberrazioni intracromosomiche, generate da scambi tra i bracci di uno stesso cromosoma (inversioni pericentriche), o all'interno dello stesso braccio (delezioni interstiziali) (figura 2.9). Per tale scopo vengono utilizzate le X-CAP, sonde innovative che permettono l'osservazione di entrambe le categorie di aberrazioni. La particolarità di tali sonde è quella di possedere fluorocromi differenti per i due bracci di uno stesso cromosoma diversificando in tal modo i segnali che provengono dal braccio p e dal braccio q.



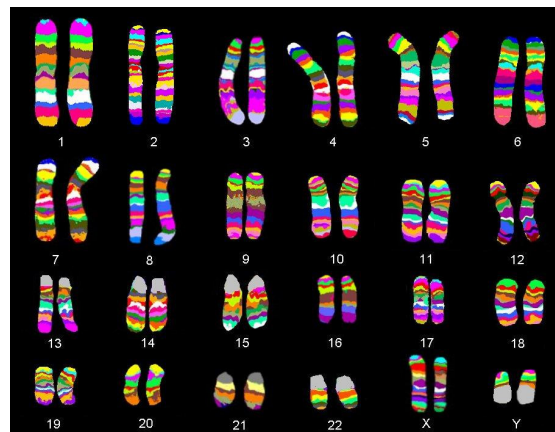
**Fig. 2.9:** Cromosomi umani visualizzati con tecnica FISH utilizzando sonde X-CAP specifiche per il cromosoma 2.

Un'altra variante della classica tecnica FISH, è la m-FISH (*multicolor FISH*), la quale permette di marcare tutti i cromosomi contemporaneamente con sonde di differente colore (figura 2.10), e dunque, di dare una precisa descrizione degli scambi intercromosomici complessi (Liehr *et al.*, 2004). Tale tecnica risulta particolarmente conveniente per l'analisi del danno indotto da radiazione di alto LET a causa della complessità degli scambi cromosomici (Johannes *et al.*, 2004; Horstmann *et al.*, 2004).



**Fig. 2.10:** Cariotipo umano visualizzato con la tecnica m-FISH (per gentile concessione del Prof. M Durante).

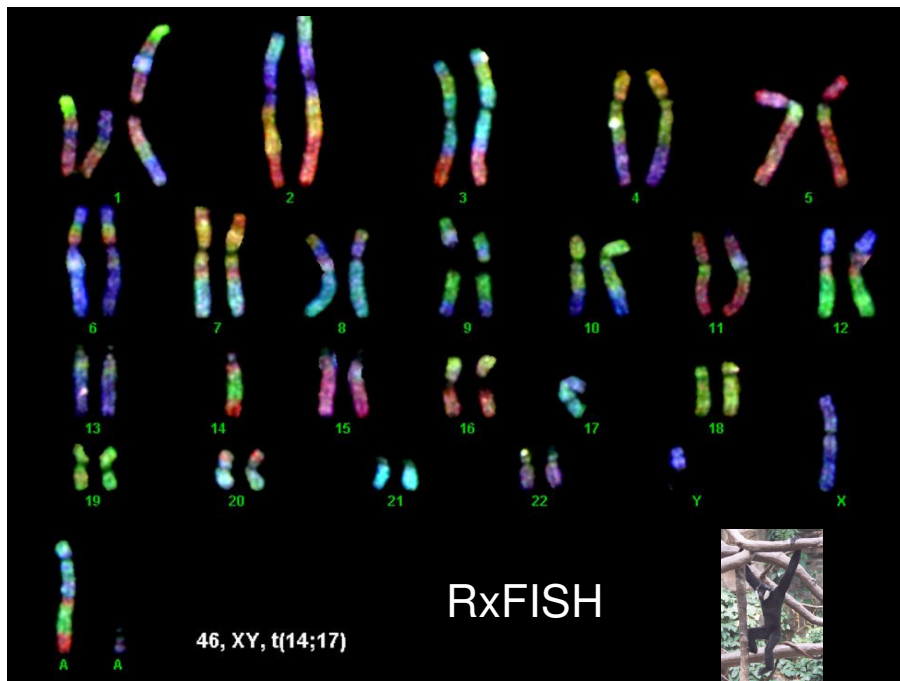
La tecnica mBAND fa uso di sonde che colorano un intero cromosoma in bande fluorescenti (figura 2.11). Grazie a questa tecnica è possibile ottenere informazioni precise su specifici punti di rottura da cui si originano scambi complessi (Hu *et al.*, 2006).



**Fig. 2.11:** Cariotipo umano visualizzato con tecnica mBAND (fonte: <http://www.vialattea.net/esperti/php/risposta.php?num=1283>)



La Rx-FISH è una più recente applicazione della tecnica FISH tradizionale ed è basata sull'omologia di sequenza tra specie differenti. In particolare viene sfruttata l'omologia di sequenza fra uomo e gibbono (che è circa pari al 98%), l'ibridizzazione di queste sonde con DNA umano dà come risultato uno specifico pattern di bande per ciascun cromosoma. Studi hanno dimostrato che mediante Rx-FISH (figura 2.12) è possibile caratterizzare con precisione riarrangiamenti cromosomici presenti in alcune patologie come la leucemia che con non è possibile identificare con precisione utilizzando altre tecniche come il bandeggio G (Micci *et al.*, 1999).



**Fig. 2.12:** Esempio di cariotipo umano visualizzato con Rx-FISH.

## 2.3 Classi di aberrazioni cromosomiche

Con il termine di aberrazioni cromosomiche si intendono tutte le deviazioni di un cariotipo dalla situazione normale. Una prima distinzione delle aberrazioni, dunque, le divide in aberrazioni numeriche e aberrazioni strutturali. Della prima categoria fanno parte i differenti tipi di aneuploidie, che si instaurano essenzialmente attraverso eventi di non-disgiunzione, mentre le seconde comprendono tutte quelle modifiche che determinano cambiamenti conformazionali e strutturali dei cromosomi.

Sin dai primi lavori condotti sulle piante è stato stabilito che quando le cellule sono analizzate in prima mitosi dopo l'esposizione a radiazioni ionizzanti, due grosse categorie di danni permanenti ai cromosomi sono distinguibili: *aberrazioni cromosomiche* ed *aberrazioni cromatidiche* (Savage, 1975).

Le aberrazione di tipo cromosomico, fu osservato, derivano da danni a carico di entrambi i cromatidi fratelli nella stessa posizione. Generalmente questo tipo di danno si instaura in fase G1, quando cioè il cromosoma è a singolo cromatidio. Qualsiasi riarrangiamento in questo stadio sarà duplicato durante la fase di sintesi del DNA.

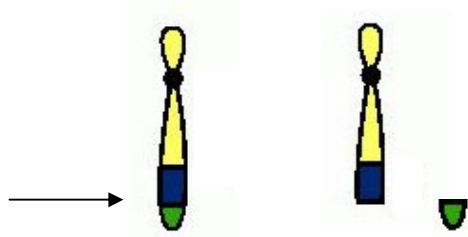
Le aberrazioni cromatidiche invece hanno luogo in seguito ad un danno che avviene in tarda fase G1 o durante la fase S.

Le aberrazioni vengono inoltre suddivise in *inter-scambi* ed *intra-scambi*, questi ultimi a loro volta possono essere in *inter-braccio* ed *intra-braccio*.

Di seguito viene data una descrizione dettagliata delle varie classi di aberrazioni cromosomiche.

### 2.3.1 Delezioni terminali

Quando sull'elica del DNA viene prodotto un dsb, nel caso in cui questo non venga riparato, il cromosoma (osservato in prima mitosi) risulterà costituito da una porzione contenente il centromero e da una porzione che ne risulterà priva, definito frammento acentrico. Il frammento acentrico è costituito da entrambi i cromatidi, essendo questa aberrazione derivante da un danno avvenuto in fase G1, e le sue dimensioni possono essere estremamente variabili. Questo tipo di aberrazione è uno dei più semplici, considerando che deriva da una singola rottura (figura 2.13).

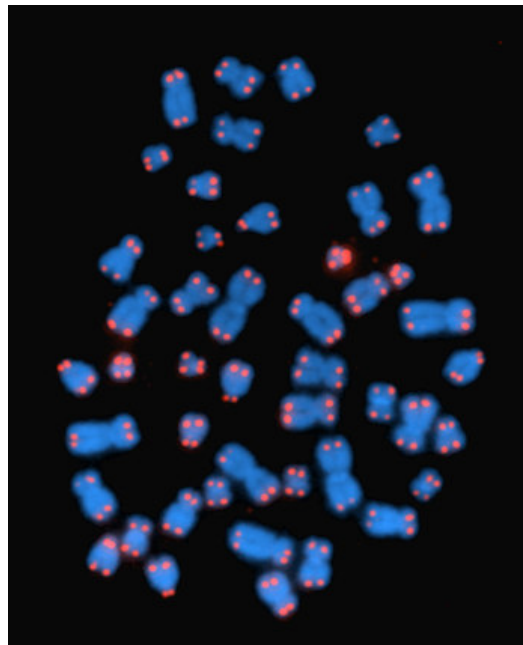


**Fig. 2.13:** Meccanismo di induzione delle delezioni terminali.

La mancanza del centromero rende questi frammenti incapaci di segregare durante l'anafase ed il loro destino ultimo è quello di ritrovarsi in una sola delle cellule figlie.

Come risultato si ha che una delle due cellule figlie mancherà dell'informazione genica contenuta sul frammento, l'entità di questo fenomeno dipende dalle dimensioni del frammento e dall'informazione da esso portata.

Un'aberrazione di questo tipo è definita *delezione terminale* ed il metodo più semplice per la sua visualizzazione è l'utilizzo della tecnica FISH. In particolare per tale scopo sono state create sonde specifiche per le regioni telomeriche (figura 2.13), che colorando selettivamente le estremità dei cromosomi permettono di individuare facilmente la presenza di eventuali lesioni cromosomiche e dunque di frammenti acentrici.



**Fig. 2.13:** Visualizzazione delle regioni telomeriche in un cariotipo umano ottenuto con tecnica FISH e sonde telomeriche.

### 2.3.2 Interscambi

I riarrangiamenti cromosomici che si originano da due rotture cromosomiche danno luogo a quelli che vengono definiti *scambi semplici*. In questa categoria rientrano sia gli *intrascambi*, quando le due rotture avvengono su due cromosomi distinti omologhi o non omologhi, che gli *interscambi*, quelli in cui le due rotture avvengono sullo stesso cromosoma che successivamente si riorganizza a formare una struttura che non è quella originaria. Gli intrascambi a loro volta possono essere *inter-braccia*, quando cioè le due lesioni avvengono a carico dello stesso braccio cromosomico, che *intra-braccia*, cioè quando le due lesioni avvengono contemporaneamente sul braccio p e sul braccio q dello stesso cromosoma.

Quando l'interscambio dà origine ad un cromosoma con due centromeri si formerà un cromosoma *dicentrico*, i frammenti che si originano dalle due lesioni possono restare liberi o possono legarsi fra loro. La distanza fra i due centromeri può variare notevolmente tanto che a volte può essere indistinguibile oppure può coinvolgere l'intera lunghezza delle braccia coinvolte. Alcune forme di traslocazione Robertsoniana ad esempio sono caratterizzate da una distanza estremamente ridotta dei due centromeri (Savage, 1996). In figura 2.14 è mostrato in modo schematico il meccanismo di formazione di un cromosoma dicentrico. Un dicentrico inoltre si dice completo quando i due frammenti che si originano dalle rotture si ricongiungono (come mostrato nella figura sottostante) e incompleto quando invece i due frammenti restano isolati.

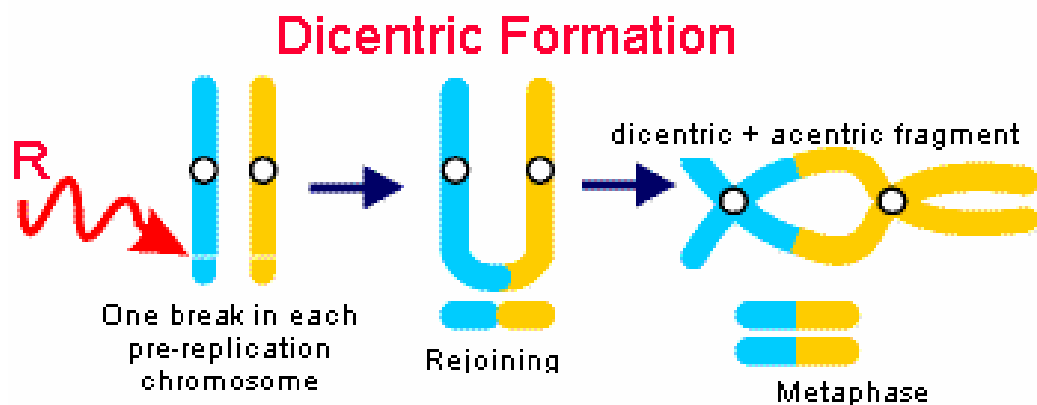
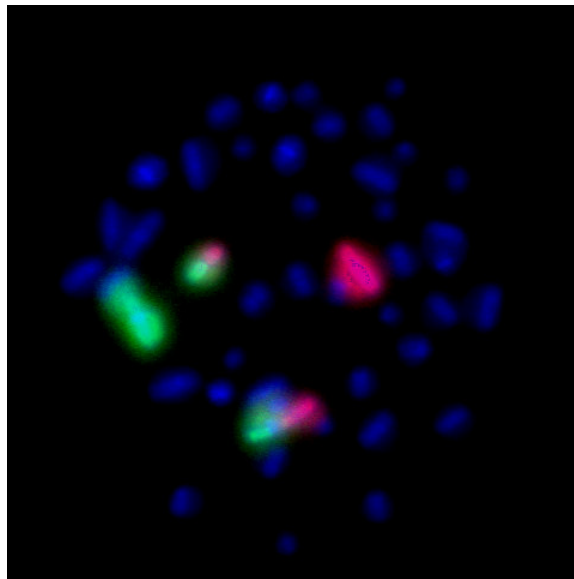


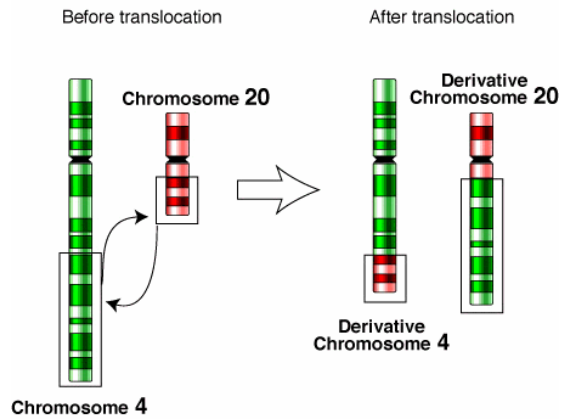
Fig. 2.14: Meccanismo di formazione di un cromosoma dicentrico.

Il frammento acentrico al completamento della mitosi può essere perso proprio a causa dell'assenza del centromero. Tuttavia, le conseguenze peggiori sono legate alla presenza del cromosoma dicentrico stesso. In anafase, il dicentrico può legarsi con entrambi i centromeri al fuso mitotico con conseguenti difficoltà meccaniche durante la divisione. La cellula che eredita il cromosoma dicentrico viene immediatamente esclusa dalla popolazione cellulare. E' stato stimato che in colture di linfociti umani la perdita di questo tipo di aberrazione è circa il 40-50% per ogni ciclo di divisione cellulare.



**Fig 2.15:** Cromosoma dicentrico visualizzato con tecnica FISH e sonde whole chromosome. I cromosomi coinvolti nello scambio sono i cromosomi 1 (verde) e 2 (rosso), è possibile inoltre osservare che i due frammenti acentrici originatisi dalle due lesioni si sono legati fra loro.

Le due lesioni a carico del DNA oltre che portare alla formazione di un cromosoma dicentrico, possono anche dar origine ad un altro tipo di scambio semplice che è la *traslocazione*. Una traslocazione si origina quando in seguito a due rotture su due cromosomi differenti si originano due frammenti che possono scambiarsi tra di loro. Si parla di scambi simmetrico quando entrambi i frammenti si scambieranno, di scambio asimmetrico quando invece solo uno dei due frammenti si lega e l'altro resta come frammento isolato. In figura 2.16 è mostrato un esempio di induzione delle traslocazioni.

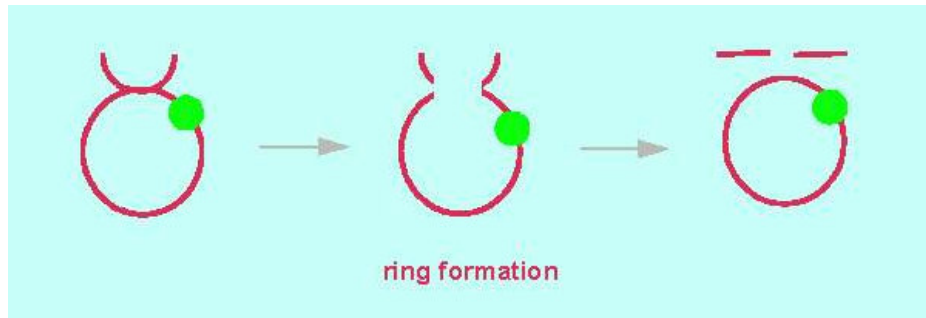


**Fig. 2.16:** Meccanismo di induzione di una traslocazione.

Le traslocazioni reciproche possono essere trasmesse alla progenie successiva in quanto nessuna perdita di materiale genetico è coinvolto in questo tipo di scambio e non sussistono problemi di natura meccanica durante l'anafase. Lo stesso vale per le traslocazioni asimmetriche ma in questo caso bisogna considerare che il frammento che non si è legato può essere perso durante la divisione cellulare. Le conseguenze di tale perdita possono essere più o meno gravi e dipendono sostanzialmente dalle dimensioni del frammento che viene perso dai geni presenti su di esso.

### 2.3.3 Intra-scambi/inter-braccia

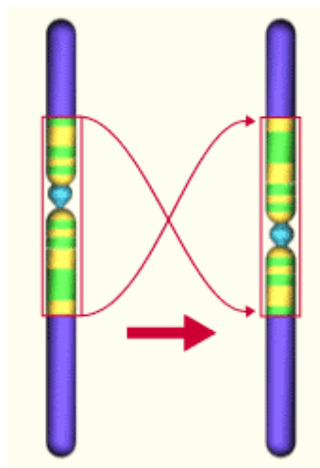
Come già accennato all'inizio del paragrafo, gli intra-scambi analogamente agli inter-scambi, si originano attraverso meccanismi simili l'unica differenza sta nel fatto che essi sono scambi che coinvolgono un solo cromosoma. A questa categoria di aberrazioni cromosomiche appartengono i *ring*, in particolare i ring appartengono alla classe degli scambi inter-braccia. Per comprendere appieno il meccanismo da cui si origina un ring è utile immaginare che le due lesioni coinvolte nella sua formazione avvengano in prossimità del centromero (figura 2.17). La conseguenza di un simile evento è la formazione di un ring centrico, cioè contenente un centromero, e di una componente acentrica risultante dal legame dei due frammenti staccatisi dalle regioni terminali del cromosoma. Le dimensioni del ring possono includere quasi tutto l'intero cromosoma o possono andare poco oltre la regione centromerica.



**Fig. 2.17:** Rappresentazione schematica della formazione di un ring.

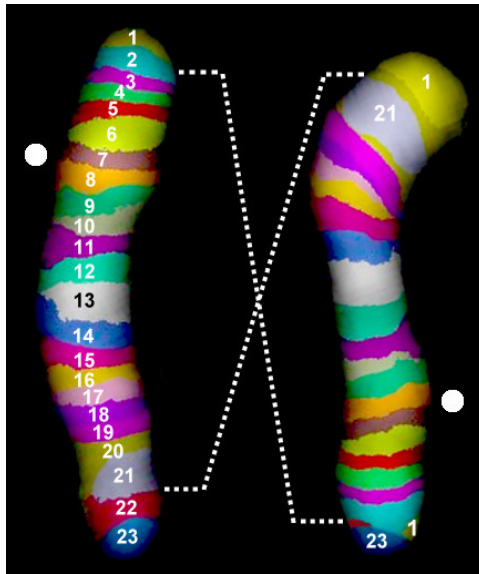
Durante l'anafase il ring può separarsi facilmente senza incontrare particolari problemi meccanici oppure può incontrare una serie di problemi derivanti dalla formazione di varie strutture a loop sul fuso mitotico; il frammento acentrico solitamente viene perso. Questo insieme alla perdita del frammento acentrico generalmente porta alla morte della cellula. Ring persistenti, però, sono stati ritrovati nel genoma di diversi organismi compreso l'uomo. Tuttavia i problemi meccanici che tali strutture incontrano ad ogni successiva mitosi causano una drastica riduzione delle sue dimensioni (Savage, 1975). La presenza di un ring può essere facilmente rilevata con le più semplici tecniche di colorazione come mostra la figura 2.6.

Quando ciascun braccio cromosomico subisce una rottura e la porzione centrale, contenente il centromero, si capovolge prima che le due estremità vengano ricongiunte, si avrà la formazione di una *inversione pericentrica* (figura 2.18).



**Fig. 2.18:** Formazione di una inversione pericentrica

Le inversioni pericentriche non sono individuabili con le classiche tecniche di colorazione, questo tipo di aberrazione può essere visualizzata con la tecnica del bandeggio anche se quelle che coinvolgono una piccola porzione di cromosoma possono passare inosservate. Le maggiori informazioni su questo tipo di aberrazione si possono ottenere con la più moderna m-BAND (figura 2.19). In questa immagine possiamo vedere una inversione pericentrica che coinvolge una porzione molto lunga del cromosoma 5 umano.



**Fig. 2.19:** Cromosoma 5 visualizzato con tecnica m-BAND.

E' possibile vedere una inversione pericentrica.

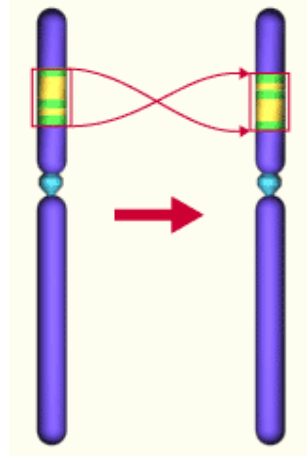
(Per gentile concessione del Prof. M Horstmann)

#### 2.3.4 Intra-scambi/intra-braccia

L'interazione di due lesioni su un cromosoma può risultare nella formazione di un frammento che si origina da una regione compresa tra il centromero ed il telomero. Se questo frammento anziché perdersi nella cellula, si reinserisce nella struttura iniziale invertendo la sua posizione rispetto a quella originaria si viene a generare una *inversione paracentrica*. In figura 2.20 è mostrato il meccanismo di formazione.



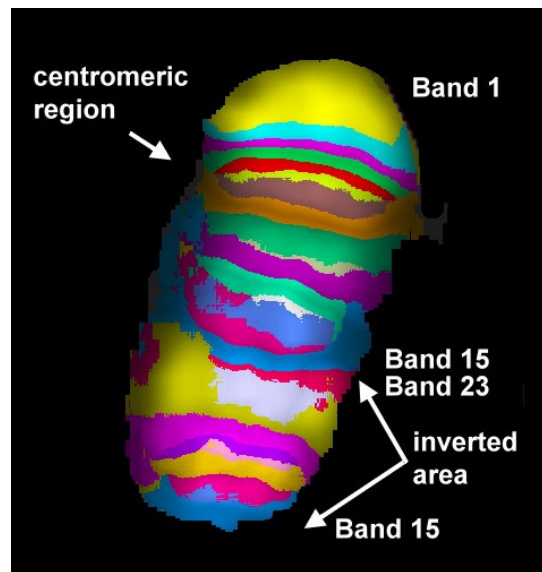
Le estremità della porzione deleta possono anche subire un diverso destino. Se si ricongiungono fra di loro possono dar luogo alla formazione di un *ring acentrico* anche definito *delezione interstiziale*.



**Fig. 2.20:** Meccanismo di formazione di una inversione pericentrica

Analogamente alle inversioni pericentriche la miglior tecnica per visualizzare tale tipo di lesione è il bandeggio. Anche in questo caso l'm-BAND consente una più dettagliata analisi delle regioni cromosomiche coinvolte.

L'immagine 2.21 mostra una inversione paracentrica sul cromosoma 5.



**Fig. 2.21:** Cromosoma 5 visualizzato con tecnica m-BAND.

E' possibile vedere una inversione paracentrica.

(Per gentile concessione del Prof. M Horstmann)

### 2.3.5 Scambi complessi

Quando le rotture cromosomiche sono molteplici e localizzate su più cromosomi i riarrangiamenti possibili sono molteplici e svariati. Queste varie combinazioni possibili si è scelto di definirle *scambi complessi* (Savage e Simpson, 1994). Per essere definito complesso uno scambio deve coinvolgere almeno due cromosomi e deve essere caratterizzato da almeno tre rotture.

Un esempio di aberrazione appartenente a questa classe è la formazione di un cromosoma tricentrico (figura 2.22), un aberrazione di questo tipo affinché si possa formare è necessario che siano coinvolti tre cromosomi e che uno di essi subisca almeno due lesioni, generando un frammento che contiene il centromero, a livello delle quali si legheranno gli altri due frammenti di cromosomi diversi contenenti il centromero. Il destino dei frammenti generatisi da queste lesioni può indurli a restare come frammenti acentrici oppure questi possono legarsi fra di loro.

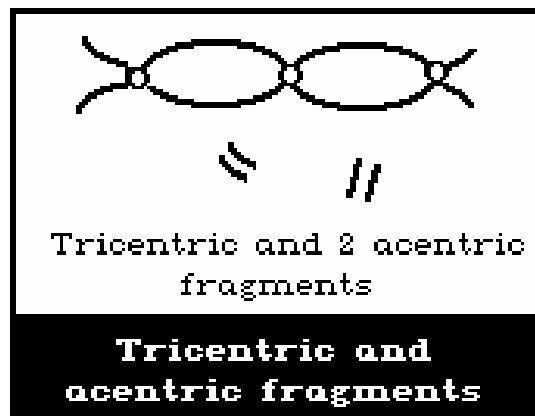
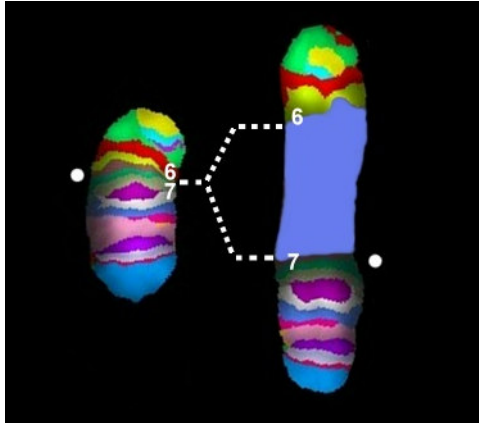


Fig. 2.22: Rappresentazione schematica di un cromosoma tricentrico

Durante la formazione di questa aberrazione i frammenti acentrici che si generano possono restare non legati oppure possono legarsi fra di loro creando diverse combinazioni. Scambi di questo tipo possono facilmente essere individuati ed analizzati utilizzando una m-FISH.

Alla classe degli scambi complessi appartengono anche le *inserzioni*. Un'inserzione deriva da uno scambio tra due cromosomi in cui almeno uno dei due ha

subito una doppia lesione da cui si genera un frammento che si va ad inserire in un secondo cromosoma che ha subito almeno una lesione. In figura 2.23 è possibile osservare, in m-BAND, il cromosoma 5 umano in cui si è andato ad inserire un frammento di notevoli dimensioni (visualizzato in blu).



**Fig. 2.23:** Cromosoma 5 visualizzato con tecnica m-BAND.

E' possibile osservare un'evidente inserzione.  
(Per gentile concessione del Prof. M Horstmann)

## 2.4 Metodi di classificazione delle aberrazioni cromosomiche

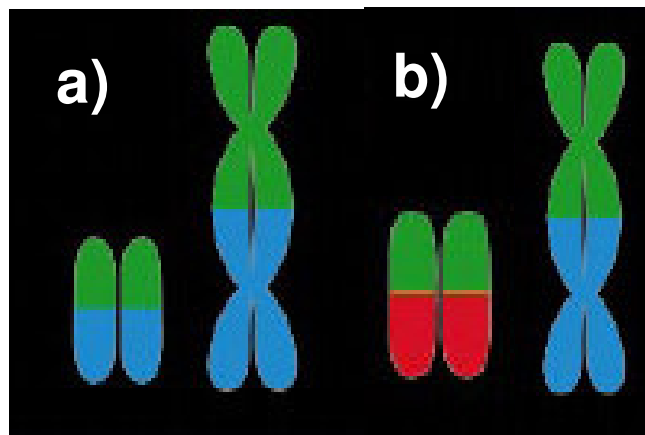
La necessità di caratterizzare e quantificare il danno indotto al DNA ha portato gli studiosi a sviluppare schemi che rendessero l'analisi delle aberrazioni cromosomiche più pratica. Il primo metodo fu proposto da Savage e Simpson, i quali svilupparono uno schema per classificare le aberrazioni di tipo complesso su dati ottenuti da cromosomi visualizzati con un singolo colore. Essi chiamarono questo metodo **CAB (Chromosomes Arms Breaks)**(Savage e Simpson, 1994).

Il metodo CAB definisce gli scambi cromosomici facendo uso di tre parametri:

- il numero di cromosomi coinvolti nell'evento di scambio,
- il numero di braccia che subisce una lesione
- il numero di rotture coinvolte.

Per la definizione di scambio complesso data nel paragrafo 2.3.5, il CAB più semplice possibile è del tipo 2/2/3, il più complesso fin'ora analizzato è stato un CAB 5/5/5 (Cornforth, 2001). Utilizzando una colorazione che preveda di marcare un singolo cromosoma il metodo CAB può indurre in una classificazione delle aberrazioni imprecisa.

Molti scambi complessi, in queste condizioni sperimentali, frequentemente producono delle configurazioni che sono indistinguibili da quelle prodotte durante un evento di scambio semplice. Queste configurazioni sono state definite *scambi pseudosemplici*. L'immagine 2.24 illustra in maniera chiara situazioni di questo tipo.



**Fig 2.24:** Il pannello a) dell'immagine mostra come apparirebbe un'aberrazione utilizzando una singola sonda cromosomica (in questo caso in verde) e controcolorando i cromosomi in blu. Nel pannello b) è invece mostrata la stessa aberrazione che si osserverebbe utilizzando sonde di differente colore (verde- rosso) e controcolorando gli altri cromosomi in blu.

Tenendo presente, dunque, che questo metodo fu designato per colorazioni singole risulta comprensibile che esso non si adatti perfettamente a preparati con colorazioni multiple di cromosomi.

Per tale ragione è stata percepita la necessità nella comunità scientifica di stabilire un sistema di nomenclatura per aberrazioni di tipo complesso che risultasse più flessibile nel suo utilizzo. Così Tucker e collaboratori proposero il metodo ***PAINT (Protocol for Aberrations Identification and Nomenclature Terminology)*** (Tucker *et al.*, 1995).

Il metodo PAINT prevede che si assegnino delle lettere per indicare ciascun colore utilizzato e l'utilizzo della lettera maiuscola per indicare se il segmento di cromosoma coinvolto nello scambio possiede il centromero. Solitamente si assegna la lettera A al

colorante di contrasto e tutte le altre di seguito per ciascun colorante utilizzato. Per la classificazione di uno scambio le lettere vengono poste in parentesi e scritte nello stesso ordine in cui appaiono nello scambio. Lo schema illustrato in figura 2.25 mostra le sigle che vengono utilizzate in tale nomenclatura, l'utilizzo delle lettere per indicare i cromosomi coinvolti nello scambio e se i frammenti contengono o meno il centromero, come stabilito dal codice PAINT.

### Single Color Painting












	<b>translocation</b>	<b>t(Ba)</b>
	<b>translocation</b>	<b>t(Ab)</b>
	<b>dicentric</b>	<b>dic(AB)</b>
	<b>insertion</b>	<b>ins(baB)</b>
	<b>insertion</b>	<b>ins(abA)</b>
	<b>acentric fragment</b>	<b>ace(b)</b>
	<b>compound fragment</b>	<b>ace(ab)</b>
	<b>compound fragment</b>	<b>ace(bab)</b>
	<b>ring</b>	<b>r(B)</b>
	<b>ring/insertion</b>	<b>r-ins(Ba)</b>
	<b>acentric ring</b>	<b>r(b)</b>

Fig. 2.25: Rappresentazione schematica di classificazione di aberrazioni cromosomiche utilizzando il codice PAINT

## 2.5 Dipendenza delle aberrazioni dalla qualità della radiazione

La quantità di lesioni al DNA, sia ssb che dsb, indotti dalle radiazioni ionizzanti varia in modo caratteristico con la qualità della radiazione. Il concetto di RBE, discusso nel paragrafo 1.5, è stato documentato per una varietà di parametri biologici inclusi aberrazioni cromosomiche, mutazioni, trasformazione ed inattivazione cellulare. Lo stesso è stato ampiamente fatto per lo studio della regressione tumorale nella radiologia clinica e sperimentale (Roots *et al.*, 1989).

E' stato più volte detto che la deposizione dell'energia all'interno della materia non è un evento casuale, ma dipende dal tipo di radiazione incidente. La dose assorbita da un tessuto biologico è caratterizzata dalla deposizione di una specifica quantità di energia per unità di lunghezza o LET.

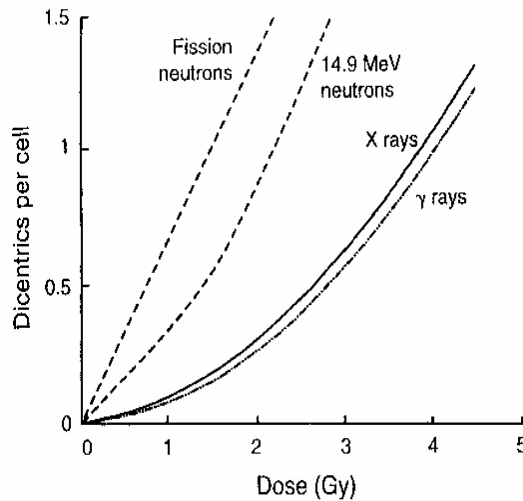
E' stato dimostrato che radiazioni sparsamente ionizzanti quindi di basso LET, come raggi X e raggi  $\gamma$ , sono meno efficaci delle radiazioni densamente ionizzanti, come particelle  $\alpha$  e neutroni e ioni ferro. Infatti la radiazione di alto LET produce un danno clusterizzato lungo un breve percorso (Smith *et al.*, 2003).

I primi studi, mirati a comprendere la relazione che intercorre tra l'induzione di aberrazioni cromosomiche e dose assorbita, stimavano la frequenza di cromosomi dicentrici per cellula indotti da radiazione sparsamente ionizzante. I risultati mostravano un chiaro andamento di tipo lineare quadratico (figura 2.26). Risultati analoghi si ottengono per tutte le classi di aberrazioni indotte da radiazione di basso LET eccetto che per l'induzione di frammenti acentrici la cui frequenza risulta correlata linearmente alla dose.

La relazione che descrive la formazione di scambi indotti da radiazioni sparsamente ionizzanti è la seguente:

$$X = \alpha D + \beta D^2$$

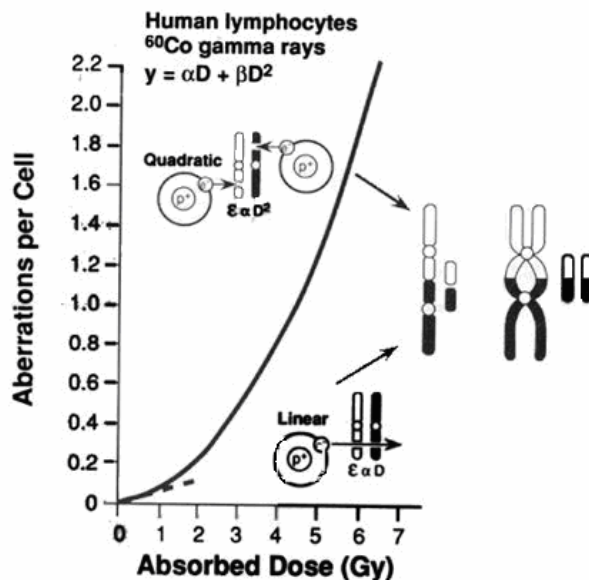
dove X è il numero medio di scambi per cellula e D è la dose.



**Fig. 2.26:** Curve dose-risposta per cromosomi dicentrici/cellula, ottenuto in linfociti irraggiati con radiazione sparsamente (raggi X e  $\gamma$ ) e densamente (neutroni) ionizzante (Kiefer, 1990).

Come è stato già discusso nel paragrafo 2.1, una radiazione può indurre un dsb mediante due meccanismi, ovvero, mediante una singola deposizione di energia, ossia una singola particella che attraversa l'intera doppia elica del DNA causando una lesione su ciascun filamento, quindi un dsb, ed in questo caso si parla di azione intra-traccia della radiazione. Oppure mediante due deposizioni di energia indipendenti fra di loro ma abbastanza vicine da indurre un dsb ed in questo caso si parlerà di effetto inter-traccia della radiazione. quando il danno è arrecato da una singola particella, la formazione di scambi è linearmente correlata alla dose, nel caso siano due tracce ad interagire, la correlazione è di tipo lineare quadratico.

Da questo si evince che i termini  $\alpha$  e  $\beta$  dell'equazione dipendono dalla qualità della radiazione e dal dose/rate. All'aumentare del LET,  $\alpha$  aumenta poiché cresce la probabilità che una singola traccia induca più rotture e  $\beta$  diminuisce al diminuire del dose/rate, in quanto meno particelle attraversano il nucleo nell'unità di tempo, meno è probabile che si generino contemporaneamente due rotture distinte, dovute a due tracce separate, che possano interagire tra loro.



**Fig. 2.27:** La frequenza di aberrazioni cromosomiche (dicentrici e rings) ha un andamento lineare quadratico perché queste aberrazioni sono indotte da due eventi separati. A basse dosi però entrambi gli eventi possono essere indotti da un unico attraversamento e la probabilità che avvenga uno scambio è proporzionale alla dose. Ad alte dosi è più probabile che le due rotture siano causati da eventi indipendenti. La probabilità che si realizzi uno scambio diventa proporzionale al quadrato della dose ( $D^2$ ).

Dal momento che le delezioni terminali si originano da una singola lesione si comprende perché la loro formazione segua un andamento di tipo lineare.

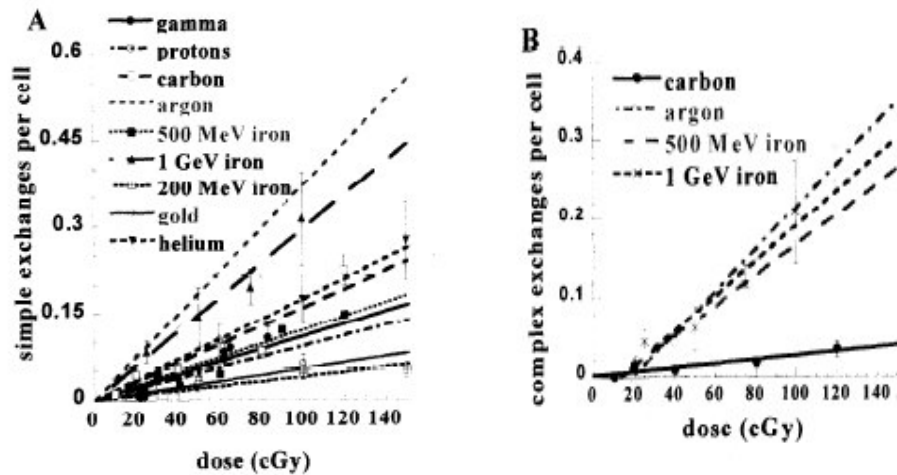
Situazione differente si osserva per radiazioni di alto LET per cui è stato ampiamente dimostrato un andamento lineare con la dose della frequenza di tutti i tipi di aberrazioni e questo ben si accorda con la natura di questa radiazione, caratterizzata da un alta densità di ionizzazione.

Inoltre, studi *in vitro* hanno dimostrato che all'aumentare del LET della radiazione si ha un aumento del rapporto tra scambi semplici e scambi complessi (Griffin *et al.*, 1995; Durante *et al.*, 1996) e che radiazioni di alto LET inducono più scambi complessi che dicentrici (Testard *et al.*, 1997; Durante *et al.*, 1998; George *et al.*, 2001). Infatti gli scambi complessi sono indotti molto efficacemente da radiazioni di alto LET, mentre radiazioni di basso LET con dosi al di sotto dei 2 Gy non inducono una significativa quantità di scambi complessi (Simpson e Savage, 1996).

La figura 2.28 mostra le curve dose/risposta ottenute in uno studio mirato ad investigare la dipendenza del danno radioindotto dal LET della radiazione utilizzata.

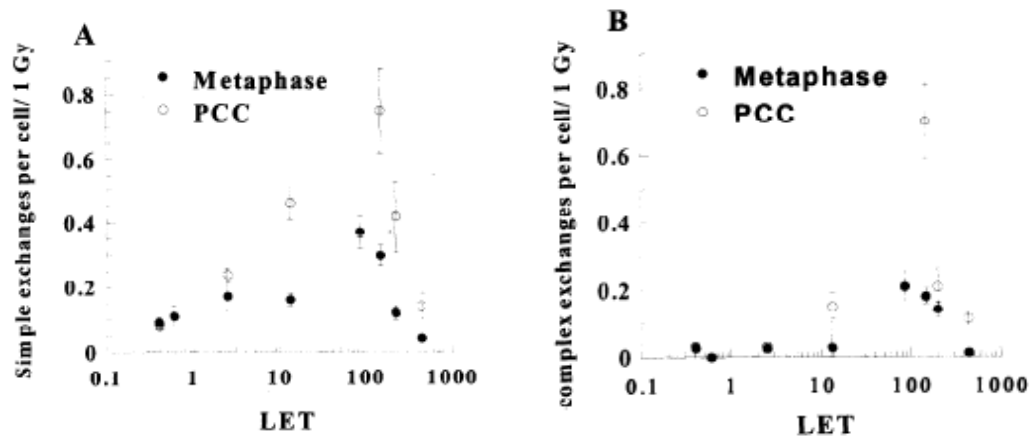


Da questi risultati si evince chiaramente che gli ioni argon sono i più efficaci nell'indurre scambi semplici, seguiti dagli ioni ferro da 1 GeV/n, mentre i protoni, gli ioni oro e gli ioni ferro da 200 MeV/n sono efficaci dei raggi  $\gamma$ . Per quel che riguarda gli scambi complessi, invece, solo argon, ferro sa 1 GeV/n e da 500 MeV/n inducono un livello significativo di scambi mentre per le altre particelle analizzate, compresi i raggi  $\gamma$ , non sono stati riscontrati aumenti significativi.



**Fig. 2.28:** Curve dose/risposta per scambi semplici (A) e scambi complessi (B) indotti in linfociti del sangue periferico da vari tipi di ioni. Le aberrazioni sono state analizzate in cromosomi metafasici; le frequenze riportate sono relative all'intero genoma (George et al., 2003).

Dalle misure ottenute risulta, inoltre, che la frequenza di scambi, sia semplici che complessi, a parità di dose (1 Gy), aumenta con il LET fino a 100 keV/ $\mu\text{m}$  e diminuisce per LET maggiori; in PCC, si osservano valori della frequenza di scambi, anche 3.5 volte maggiori di quelli riscontrati in metafase (Figura 2.29).



**Fig: 2.28:** Frequenza di scambi semplici e complessi per cellula, per una dose pari a 1Gy dei vari ioni, al variare del LET (George et al., 2003).

## *Capitolo 3*

### *Biodosimetria e Biomonitoraggio*

L'uomo e gli altri organismi viventi sono continuamente esposti alle radiazioni ionizzanti provenienti da fonti naturali presenti nell'ambiente inclusa la radiazione cosmica, il radon ed i suoi derivati, gli attinidi ed i loro prodotti di decadimento, e da fonti interne all'organismo come il  $^{40}\text{K}$  ed il  $^{14}\text{C}$ . Questa inevitabile esposizione ovviamente non è priva di conseguenze, infatti, è stato ampiamente discusso delle lesioni indotte alla molecola di DNA da parte delle radiazioni ionizzanti. Sfortunatamente però, la contaminazione dovuta a fonti naturali non è l'unica fonte di radiazione a cui gli organismi sono esposti. E' noto ad esempio che numerosi siti negli Stati Uniti ed in altre regioni del mondo risultano possedere una elevata contaminazione da radionuclidi proveniente da attività antropogeniche (Wolbarst *et al.*, 2000).

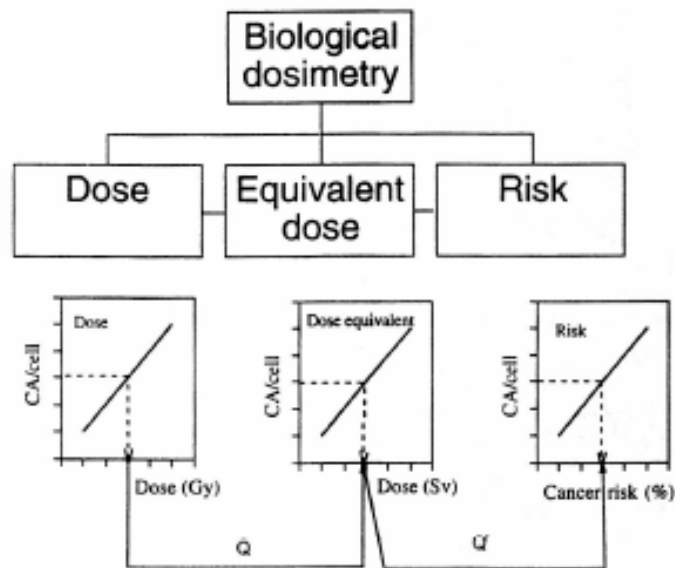
L'esposizione dell'uomo può essere minimizzata o evitata del tutto semplicemente limitando l'accesso alle aree contaminate ma ovviamente questi programmi non sono applicabili a specie non umane e l'esposizione risultante può quindi risultare significativamente più elevata di quella attesa, tenendo conto solo delle fonti naturali.

Per avere una stima del danno indotto dalla radiazione è opportuno l'utilizzo di dosimetri biologici; l'esposizione a radiazione, infatti, modifica una serie di parametri biologici che possono essere utilizzati per ottenere una stima della dose.

Quando la radiazione ionizzante deposita energia all'interno di un tessuto biologico causa un danno che successivamente è rimosso enzimaticamente, in parte o del tutto. Il danno che permane dopo questo processo, a causa di un riparo insufficiente o errato, è quello che genera conseguenze biologiche.

L'utilizzo di *biodosimetri* risulta particolarmente indicato in quelle situazioni in cui non è possibile risalire in modo diretto, ad esempio con l'utilizzo di dosimetri fisici, alla dose. Tipiche situazioni di questo tipo sono esposizioni alle radiazioni di tipo accidentale come ad esempio incidenti nucleari.

Nel caso in cui, in situazioni di questi tipi, si disponga di *curve di calibrazione* per la radiazione in esame il risultato del test può essere espresso direttamente sotto forma di dose biologicamente rilevante (figura 3.1).



**Fig. 3.1:** Possibili risultati di un test biodosimetrico: la frequenza di aberrazioni cromosomiche può essere utilizzata per stimare la dose, la dose equivalente o il rischio, a seconda delle curve di calibrazioni disponibili (Clemenger e Scott, 1971)

Qualora il test biodosimetrico venga condotto *in vivo*, bisogna accertarsi che l'esposizione *in vivo* abbia le stesse caratteristiche (rateo di dose e qualità della radiazione) di quella *in vitro*, utilizzata per stabilire la curva di calibrazione. L'ipotesi alla base di questa affermazione è che: se le caratteristiche della radiazione sono le stesse, allora la quantità di danni misurati, a prescindere dal parametro biologico utilizzato, è la stessa. Tale ipotesi è risultata attendibile in vari esperimenti che utilizzavano come biomarcatore della radiazione ionizzante le aberrazioni cromosomiche (Clemenger e Scott, 1971).

Come Detto nel paragrafo 1.5, la dose equivalente, moltiplicata per l'appropriato coefficiente di rischio, permette di ottenere una stima dell'aumentata probabilità di insorgenza di effetti stocastici. La conoscenza della dose ricevuta è importante nel caso in

cui si debbano e si possano adottare contromisure al danno indotto dalle radiazioni o nel **biomonitoraggio** ambientale.

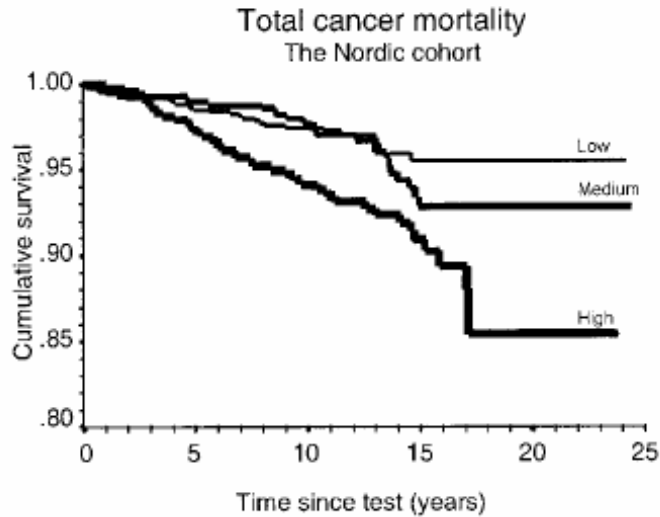
L'utilizzo dei biomarcatori inoltre può anche essere utile per la comprensione dei meccanismi che sono alla base di alcuni fenomeni indotti dalle radiazioni ionizzanti come: l'effetto bystander, l'instabilità cromosomica e la risposta adattativa (Rodrigues *et al.*, 2005).

### **3.1 Biomarcatori dell'esposizione a radiazione ionizzante**

Dal momento che, in caso di un'accidentale esposizione a radiazione ionizzante la dosimetria fisica può essere insufficiente o assente, la necessità di poter ricorrere all'utilizzo di indicatori biologici dell'esposizione rappresenta l'unico mezzo che può essere finalizzato all'adozione di contromisure. I primi indicatori biologici utilizzati a tale scopo si rivolgevano ad una specifica fetta della popolazione esposta a dosi acute di radiazione come i sopravvissuti alla bomba atomica, ai "liquidatori" durante il disastro di Chernobyl ed a pazienti di radioterapia, attualmente inoltre c'è un crescente interesse nello sviluppo della ricerca di biomarcatori anche per esposizioni a basse dosi. Ancora, numerosi tentativi sono costantemente fatti per individuare biomarcatori specifici per radiazioni più densamente ionizzanti come le particelle  $\alpha$  prodotte dal gas radon o dagli ioni pesanti dei raggi cosmici. In tal modo si comprende che tali rimedi si applicano a chiunque, dagli abitanti di regioni ad alta concentrazione di radon al personale di servizio degli aerei, agli astronauti, in particolare alle missioni sulla Stazione Spaziale Internazionale o alle missioni su Marte.

Oltre questi utilizzi, non va dimenticato che è ben nota la correlazione esistente tra esposizione a radiazione ionizzante e rischio di insorgenza di cancro. Uno studio effettuato dall'ESCH (European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health) su un gruppo di 3541 individui sani e provenienti da diverse nazioni europee ha mostrato la correlazione positiva tra aberrazioni cromosomiche e rischio di insorgenza di cancro (Bonassi *et al.*, 2002). Il gruppo in esame è stato suddiviso in tre categorie in base alla frequenza di aberrazioni misurate e successivamente i gruppi sono stati monitorati per 30 anni. Nel gruppo contraddistinto dalla maggiore frequenza di aberrazioni cromosomiche si è

riscontrata un'incidenza di carcinogenesi doppia rispetto a quella riscontrata nel gruppo di frequenza minore (Durante *et al.*, 2001) (figura 3.2).



**Fig. 3.2:** Curve di sopravvivenza per incidenza e mortalità di cancro. Le tre curve corrispondono alle tre classi in cui è stato suddiviso il gruppo di persone analizzate, in base alla frequenza di aberrazioni cromosomiche riscontrate nei loro linfociti (Durante *et al.*, 2001).

A prescindere da quale venga preso in esame, la praticità di utilizzo di un biomarcatore deve sottostare a specifiche caratteristiche. Solitamente la prima cui si dà importanza è il tempo richiesto per l'esecuzione del test biosimetrico, questo parametro è fondamentale per tutte quelle situazioni che richiedono un intervento immediato. Il biomarcatore "ideale" inoltre dovrebbe essere specifico per un tipo di radiazione, tuttavia, spesso i biomarcatori utilizzati sono sensibili anche ad altri fenomeni come gli effetti dovuti all'invecchiamento cellulare, il fumo di sigaretta oppure alla presenza di tossine ambientali (Amundson *et al.*, 2001).

Uno dei primi e più semplici metodi utilizzati per quantificare il danno derivante dall'esposizione a radiazione ionizzante è la conta delle cellule circolanti nel sangue periferico. I leucociti totali declinano rapidamente nella prima settimana dopo l'esposizione per dosi superiori ad 1 Gy ed un'esposizione a corpo intero. La conta di leucociti totali in un individuo sano si aggira su un valore di circa a,  $5-3.5 \cdot 10^6$  milioni per mL di sangue. Dal momento che il numero di linfociti circolanti declina rapidamente in

seguito ad esposizione, la loro stima può essere utilizzata come informazione preliminare sulla dose di radiazione (Durante, 2003).

Come detto nel capitolo due, uno dei tessuti più radiosensibili è il midollo osseo, dunque, il riparo al DNA del danno causato dalle radiazioni ionizzanti nelle cellule staminali ematopoietiche può risultare in mutazioni somatiche in specifici *loci* che possono essere utilizzati nel monitoraggio della dose. Mutazioni presenti in svariati *loci* genici sono state sfruttate per la rivelazione di danni da radiazioni come l'espressione delle varianti della *glicoforina A* (*gpa*) negli eritrociti.

Sebbene i globuli rossi maturi umani siano privi di nucleo, mutazioni a carico delle cellule progenitrici nel midollo osseo possono essere monitorate attraverso la misura delle varianti fenotipiche negli eritrociti circolanti. Due alleli del gene *gpa* codificano per due proteine di membrana che determinano gli antigeni dei gruppi sanguigni M ed N. Negli eterozigoti costitutivi M/N le varianti dei globuli rossi che esprimono solo uno dei due alleli possono facilmente essere quantificati mediante citometria di flusso (Langlois *et al.*, 1990). L'ovvio limite di questa tecnica è che può essere applicata solo agli individui eterozigoti M/N, cioè a circa il 50% della popolazione. Le cellule progenitrici mutanti persistono per svariati anni nel midollo osseo, tuttavia una significativa correlazione dose/risposta è stata trovata nelle varianti *gpa* anche molti anni dopo un'esposizione acuta alle radiazioni nelle vittime del disastro di Chernobyl, nei sopravvissuti alla bomba atomica ed in pazienti trattati con  $^{131}\text{I}$  (Langlois *et al.*, 1993; Jensen *et al.*, 1995; Jensen *et al.*, 1997).

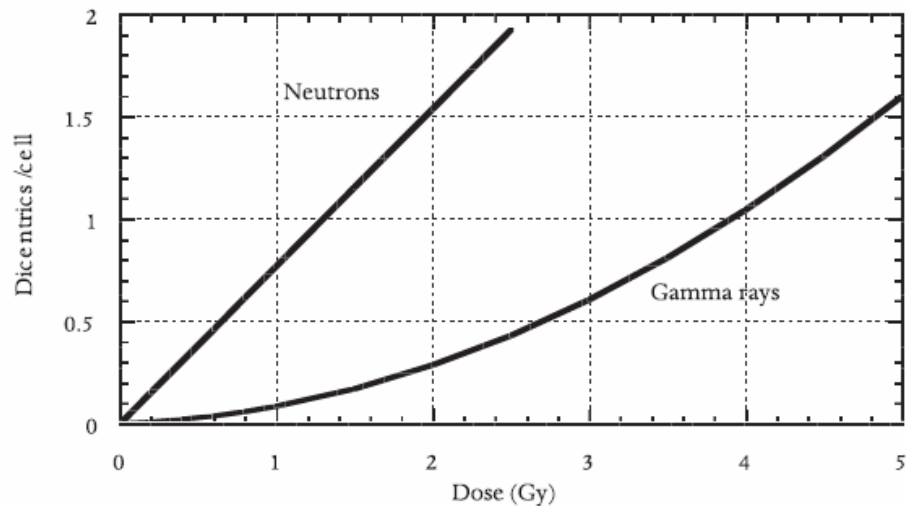
Una semplice tecnica citogenetica utilizza come biomarcatore dell'esposizione a radiazione ionizzante i *micronuclei*, particelle extranucleari di cromatina. A differenza di altre tecniche citogenetiche che utilizzano come biomarcatore le aberrazioni cromosomiche, di cui si parlerà ampiamente in questo e nel prossimo paragrafo, questo metodo non richiede particolari competenze, è molto rapido e semplice e permette di monitorare una grossa popolazione. Tuttavia, la loro formazione non è radiazione-specifica come le aberrazioni cromosomiche. La formazione di micronuclei, infatti, può essere indotta anche da altri clastogeni come il fumo di sigaretta ed alcuni agenti chimici.

Mentre la maggior parte dei micronuclei che si formano spontaneamente contengono la regione centromerica, è stato trovato che la maggior parte dei micronuclei che si originano per effetto della radiazione ionizzante sono frammenti cromosomici acentrici. L'utilizzo della tecnica FISH e di sonde centromeriche permette di discriminare molto facilmente tra i due tipi di micronuclei ed ha permesso di stabilire il limite di

precisione di questo saggio a dosi molto basse (circa 0.1- 0.2 Gy) (Vral *et al.*, 1997; Thierens *et al.*, 1999).

Una delle più applicate tecniche citogenetiche per la biodosimetria è la misura dei cromosomi *dicentrici*. La misura dei dicentrici nei linfociti del sangue periferico è stata per molto tempo il test citogenetico più adottato ed ancora oggi alcuni studiosi ritengono sia il saggio più specifico per il danno indotto da radiazioni ionizzanti (Hoffmann e Schmitz-Feuerhake, 1999). Il livello basale di cromosomi dicentrici in un individuo sano è compreso tra 0.5-2 cromosomi dicentrici ogni 1.000 cellule (Durante, 2003).

La curva dose/risposta dei dicentrici, ottenuta dall'analisi in linfociti umani irraggiati *in vitro*, è nota con grande precisione (figura 3.3). Mentre un significativo incremento nella frequenza dei dicentrici è stato documentato *in vitro* per dosi a partire da 0.02Gy (Lloyd *et al.*, 1992) i limiti pratici per l'analisi, in seguito ad una esposizione *in vivo*, risultano prossimi ad una dose pari a 0.5 Gy (Baranov *et al.*, 1995).



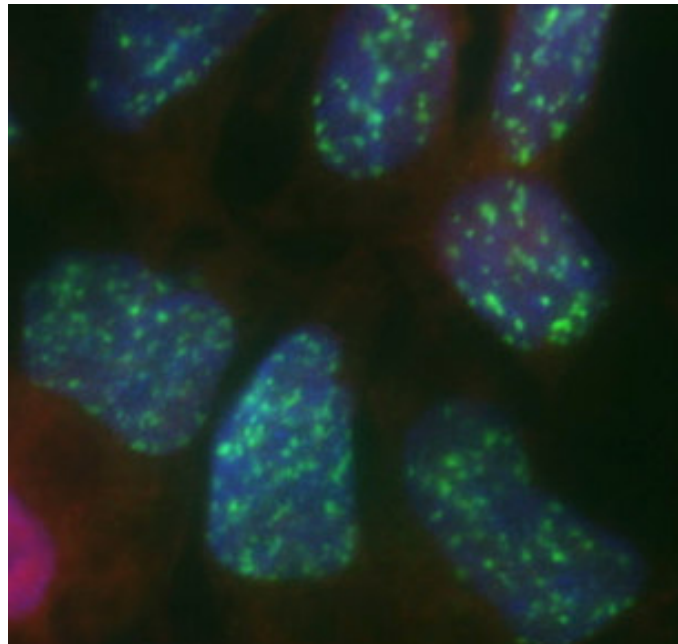
**maFig. 3.3:** Curva dose/risposta per l'induzione di cromosomi dicentrici inseguito all'esposizione di linfociti a raggi  $\gamma$  o neutroni (Durante, 2003)

Studi effettuati su pazienti di radioterapia hanno evidenziato che la quantità di dicentrici misurati *in vivo* può risultare considerevolmente più bassa di quella predetta dalle curve di calibrazione *in vitro* (Steinstrasser e Kemmer, 1981). Queste evidenze si



spiegano facilmente considerando che i dicentrici, dal momento che presentano due centromeri, sono incapaci di segregare correttamente nelle cellule figlie durante la mitosi per cui vengono selettivamente eliminati dall'organismo. Questo equivale a dire non solo che i dicentrici sono aberrazioni instabili ma anche che essi non sono adatti per la biosimetria retrospettiva.

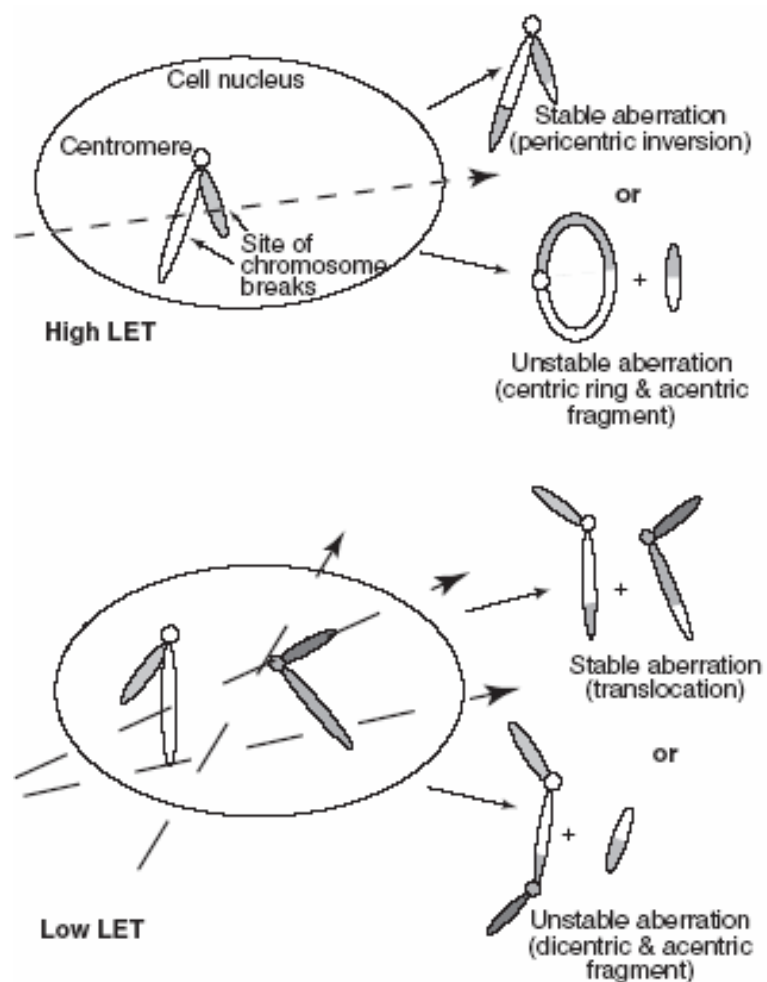
La recente scoperta che la fosforilazione dell'istone H2AX su un residuo di serina 139 ( $\gamma$ -H2AX) è associata alla presenza di dsb sul DNA ha ampliato il campo di azione circa l'utilizzo dei biomarcatori citogenetici. Infatti, i domini cromatinici fosforilati che vengono a formarsi nei pressi del sito di rottura possono essere rivelati mediante tecniche immunocitochimiche e visualizzati sotto forma di *foci* mediante microscopia in fluorescenza (figura 3.4). Poiché 1 Gy di raggi X induce circa 60 dsb per cellula, dovrebbe essere possibile discriminare anche gli effetti di dosi di pochi mGy dal background. Infatti, è stato recentemente dimostrato che 1 mGy di raggi X induce la formazione di un discreto numero di *foci* in fibroblasti umani (Rothkamm e Lobrich, 2003).



**Fig. 3.4:** *Foci*  $\gamma$ -H2AX indotti in cellule NT2 da 1 Gy di raggi X. La visualizzazione dei *foci* è stata ottenuta utilizzando un anticorpo anti H-2AX, è visibile in ciascuna cellula la presenza di un elevato numero di *foci*.

### 3.2 Fattore F come indice della qualità della radiazione

Confrontando i differenti tipi di aberrazioni cromosomiche è possibile distinguere tra esposizioni a radiazioni di alto e basso LET. Radiazioni di alto LET, tipicamente particelle  $\alpha$  e neutroni, come è stato più sottolineato, sono più densamente ionizzanti di raggi X o raggi  $\gamma$  (figura 3.5). Quando queste radiazioni interagiscono con un nucleo cellulare, producono lesioni multiple strettamente connesse tra loro.



**Fig. 3.5:** Rappresentazione schematica della diversa modalità di interazione di radiazioni di diversa qualità (alto e basso LET) con i cromosomi (Amundson *et al.*, 2001).

La creazione di siti multipli di danno vicini tra loro accresce la probabilità che dsb multipli risultino a carico di un singolo cromosoma, mentre i dsb prodotti da raggi  $\gamma$  sono distribuiti più o meno casualmente. Questo fa sì che un'esposizione a radiazioni di alto LET risulterà in un maggior numero di aberrazioni che coinvolgono un singolo cromosoma, come inversioni pericentriche e rings, mentre i raggi  $\gamma$  favorirebbero scambi intercromosomici, come traslocazioni e dicentrici (Brenner e Sachs, 1994).

Affinché i parametri caratteristici di radiazione da alto o basso LET possano risultare utili, devono mantenersi costanti nel tempo, non vi deve, cioè, essere differenza nella trasmissione alla progenie delle aberrazioni prese in considerazione.

Nell'ambito dei parametri proposti, dall'osservazione che le traslocazioni complete e le traslocazioni incomplete sono stabili nel tempo ed aumentano all'aumentare del LET della radiazione, fu proposto che il loro rapporto, definito fattore S, può essere correlato al LET della radiazione (Lucas *et al.*, 1996). Il **fattore F** misurato in linfociti di individui esposti anni prima a radiazioni di basso e medio LET si è trovato in buon accordo con il fattore F misurato *in vitro* (Lucas, 1998).

Per la caratterizzazione di radiazioni di alto LET è molto usato il fattore C, definito come il rapporto tra scambi semplici e scambi complessi. Esso però, mentre si è rivelato particolarmente utile a tale scopo in esperimenti condotti *in vitro* (Anderson *et al.*, 2000) ha presentato problemi per la sua applicazione *in vivo* (Durante *et al.*, 2004). Altri esempi di parametri proposti sono il fattore G, calcolato come il rapporto fra delezioni interstiziali e rings ed il fattore H dato dal rapporto fra le delezioni interstiziali e i dicentrici (Bauchinger and Schimid, 1998). Attualmente numerosi laboratori sono ancora alla ricerca del candidato da eleggere come biomarcatore ottimale caratteristico della radiazione.

Dal momento che uno degli obiettivi di questa ricerca è esaminare le differenze nel tipo di aberrazioni prodotte da radiazioni di diversa qualità, nello specifico di alto e basso LET, è stato programmato lo studio delle aberrazioni intracromosomiche.

Numerose evidenze sperimentali hanno stabilito che i cromosomi occupano nel nucleo dei domini ben precisi (orientamento Rabl) piuttosto che posizioni casuali (Cremer e Cremer, 2001, Parada e Misteli, 2002) e che i movimenti della cromatina interfascia siano ridotti (Lucas e Cervantes, 2002). In un simile contesto si può ipotizzare che la probabilità che avvengano ricombinazioni illegittime dipende dalla distanza alla quale si trovano i dsb prodotti dalla radiazione. Questo fenomeno, definito "effetto prossimità" può essere studiato proprio analizzando le frequenze di vari tipi aberrazioni in funzione della dose o della qualità della radiazione.

L'effetto prossimità è un fenomeno generale, che riguarda la formazione delle aberrazioni, qualsiasi sia il tipo di radiazione cui le cellule sono esposte.

Essendo gli interscambi prodotti dal ricongiungimento errato di due rotture poste su due cromosomi diversi, e data la dipendenza della probabilità di formazione di uno scambio dalla distanza di interazione dei siti danneggiati nel genoma, un aumento di interscambi tra due particolari cromosomi indicherebbe che questi due cromosomi sono, in media, posti l'uno vicino all'altro, e non occupano siti nel nucleo in modo casuale.

È stato stimato inoltre che la probabilità di avere un riparo errato, *misrejoining*, decresce all'aumentare della distanza di interazione tra due dsb.

Allora, se i meccanismi che portano alla restituzione ed al ricongiungimento errato sono simili, si dovrebbero ricongiungere più frequentemente due rotture poste sullo stesso cromosoma, perché più vicini tra di loro. Da queste considerazioni si deduce che l'effetto prossimità acquisterà più rilevanza per le radiazioni densamente ionizzanti in quanto sarà maggiore la vicinanza di una coppia di dsb indotti da un singolo evento di deposizione dell'energia rispetto a quelli indotti da due eventi distinti, relativamente più distanti tra di loro.

Da quanto detto sin'ora, dunque, il confronto tra le frequenze di interscambi ed intrascambi potrebbe essere utilizzato per chiarire se effettivamente la radiazione densamente ionizzante induce preferenzialmente aberrazioni di intrascambio. In particolare il rapporto fra il numero di interscambi ed intrascambi potrebbe essere utilizzabile come biomarcatore della radiazione ad alto LET.

Tale rapporto è identificato come *fattore F* (Hlatky, 1992) e dipende strettamente da due fattori, ovvero dalla struttura di traccia della particella e della struttura interfascica della cromatina (effetto prossimità, moto della cromatina in interfase).

Il valore F in realtà è definito come rapporto tra interscambi inter-braccia con intrascambi inter-braccia, può cioè tanto essere descritto dal rapporto dicentrici/ring quanto dal rapporto traslocazioni reciproche/inversioni pericentriche.

La differenza tra i due consiste nella stabilità delle aberrazioni cromosomiche considerate: nel primo caso si tratta di aberrazioni instabili, nel secondo, stabili. Dato che le aberrazioni stabili sono tipicamente non letali, possono essere analizzate in cellule irraggiate e nella loro progenie anche anni dopo l'esposizione. Il valore F da utilizzare come pratico biomarcatore dell'esposizione a radiazioni densamente ionizzanti è dunque quello ricavato dalle aberrazioni stabili.

Sin dalla sua formulazione, il valore F ha suscitato numero controversie circa la sua validità e circa i criteri utilizzati per il suo calcolo.

Da numerosi esperimenti effettuati *in vivo*, Brenner e Sachs hanno riportato una stima del valore F per radiazione sparsamente ionizzante (Brenner e Sachs, 1994). Tale valore è risultato essere pari a  $37 \pm 19$  per gli abitanti della regione di Chernobyl (Stephan e Oestreicher, 1989) e  $20 \pm 3$  per individui esposti a radiazione sparsamente ionizzante proveniente da una barra radioattiva accidentalmente ritrovata a Goiania (Brasile) nel 1987 (Ramalho e Nascimento, 1991). Inoltre, il valore F misurato in pazienti di radioterapia sottoposti a irraggiamento con raggi X e  $\gamma$ , ha mostrato un valore pari a  $18 \pm 9$  (Martin *et al.*, 1989; Stephan *et al.*, 1990). Per radiazioni densamente ionizzanti, gli stessi autori, hanno preso in considerazione dati provenienti da soggetti a cui era stato somministrato come mezzo di contrasto il Thorotrast, un forte emettitore di particelle  $\alpha$ . In tali studi il valore F è risultato essere pari a  $5.0 \pm 0.3$  (Sasaki *et al.*, 1987). Esperimenti condotti *in vitro* (Lloyd *et al.*, 1986) hanno suggerito agli stessi autori un valore F pari a  $16.7 \pm 0.9$  e  $5.6 \pm 0.5$  rispettivamente per radiazioni di basso ed alto LET.

Questi risultati come accennato precedentemente hanno suscitato varie critiche. La prima di queste è dovuta al fatto che Brenner e Sachs riportano dati prevalentemente ottenuti dall'analisi di aberrazioni instabili come dicentrici e rings. La scelta di queste classi di aberrazioni, ovviamente è dovuta alla relativa facilità di osservazione di queste mediante semplici tecniche di colorazione.

La scelta di considerare dicentrici e rings presuppone che queste aberrazioni siano trasmesse in maniera costante e che il loro rapporto non cambi nel tempo. Inoltre, confrontando vari fattori F ricavati da aberrazioni stabili ed instabili, si presuppone che la variazione nel tempo di traslocazioni ed inversioni sia uguale a quella di dicentrici e rings. Questa posizione non è generalmente accettata (Bauchinger e Schmid, 1997).

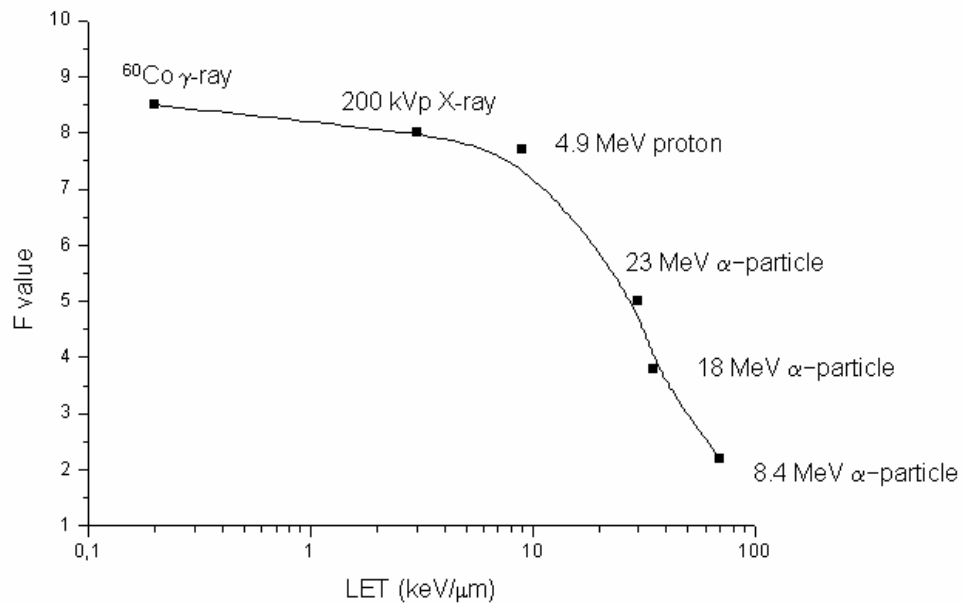
La seconda critica è relativa alla grande variabilità dei risultati ottenuti in diversi laboratori.

Nonostante queste critiche, tuttavia, un aspetto generalmente accettato è l'intervallo di dose entro cui considerare il valore F per accertarne la validità.

All'aumentare della dose di radiazione di alto LET si arriva ad un valore in cui più di una traccia attraversa lo stesso nucleo e la distribuzione spaziale delle rotture cromosomiche assomiglia sempre più a quella generata da radiazione sparsamente ionizzante. Di conseguenza una dipendenza significativa del valore F dal LET si dovrebbe

osservare più facilmente in esperimenti che coinvolgono basse dosi di radiazione (Sachs *et al.*, 1997).

Altri studi, successivi a questi, hanno continuato a tener viva la controversia dal momento che alcuni autori hanno riportato una stima del valore F indipendente dal LET (Bauchinger e Schmid, 1997) ed altri al contrario ne mostravano una dipendenza (Schwartz e Hsie, 1997) (figura 3.6). In particolare, uno di questi studi riportava una dipendenza dal LET per dosi molto basse, cioè molto al di sotto di 1 Gy, mentre il valore F restava costante per dosi superiori ad 1 Gy indipendentemente dal LET della radiazione (Sasaki *et al.*, 1998).



**Fig. 3.6:** Dipendenza del fattore F dal LET della radiazione, calcolato a dosi molto basse (Sasaki *et al.*, 1998)

Anche l'avvento di tecniche citogenetiche più raffinate, come la m-BAND e la m-FISH, che aumentano la sensibilità nell'individuazione di alcune aberrazioni più complesse come le intracromosomiche hanno dato risultati contrastanti nello studio del valore F.

Uno studio ha fatto uso di entrambe queste tecniche per analizzare i campioni di un gruppo di operai di un'industria di armi nucleari nell'ex Unione Sovietica (Hande *et al.*, 2003). Alcuni di questi erano stati esposti solo a radiazione sparsamente ionizzante mentre un secondo gruppo erano stati esposti ad un campo misto di radiazioni, sostanzialmente particelle  $\alpha$  provenienti da plutonio inalato e raggi  $\gamma$ . Secondo quanto affermato da Brenner, la frequenza di intrascambi ricavata nei campioni di sangue estratti dagli operai esposti anche a radiazione densamente ionizzante doveva essere più alta di quella ricavata negli altri lavoratori, mentre non dovevano sussistere differenze nella frequenza di interscambi.

Lo studio ha mostrato che la frequenza di intrascambi è maggiore nel gruppo di individui esposti a radiazione di alto LET. Quindi questo lavoro si trova in accordo con la teoria di Brenner e supportano l'utilizzo del fattore F come impronta della radiazione. Più recentemente, un altro studio utilizzando cellule epiteliali umane esposte a  $^{137}\text{Cs}$  e a ioni Fe da 600 MeV/n ha confermato una maggiore incidenza di inversioni per radiazioni di alto LET (Hada *et al.*, 2007).

Tuttavia, utilizzando le stesse tecniche citogenetiche, è stato condotto un altro studio che ha utilizzato raggi X come radiazione di basso LET e ioni ferro e neutroni come esempio di radiazione di alto LET (Johannes *et al.*, 2004) i cui risultati ancora una volta erano in disaccordo con l'ipotesi iniziale. L'analisi delle aberrazioni cromosomiche in metafasi e PCC ha dato valori di rapporto F calcolato pari a 2.2 per 1 Gy di ioni ferro, 3.1 per il campione esposto a 4 Gy di raggi X e 5.3 per 2 Gy di neutroni. Per cui si conclude che questi risultati non mostrano grande differenza nel rapporto interscambi/intrascambi tra radiazione di alto e basso LET per quel che riguarda le aberrazioni indotte in vitro in quelle condizioni sperimentali.

Appare chiaro dunque che la situazione è controversa per cui si comprende la necessità di appurare la validità del fattore F come impronta della radiazione nonché la sua applicabilità come biossimetro.

Quando è stato discusso del problema della radiazione nello spazio, si è parlato del fatto che nonostante gli ioni pesanti costituiscano solo l'1% della radiazione cosmica galattica (Durante, 2002) diano un notevole contributo alla dose assorbita. Solitamente, le analisi delle aberrazioni cromosomiche che si effettuano su sangue estratto da astronauti prima e dopo una missione spaziale, tengono conto solo degli interscambi e le frequenze misurate non mostrano sostanziali differenze. Dal momento che analisi di questo tipo vengono condotte soprattutto per correlare l'esposizione alle radiazioni al rischio di

insorgenza di effetti tardivi, si comprende che è di fondamentale importanza evitare situazioni di questo tipo.

Se le considerazioni fatte riguardo il valore F sono esatte, analisi di questo tipo sottostimano il danno indotto dalla radiazione spaziale in quanto non tengono conto degli intrascambi, la cui frequenza dovrebbe essere notevolmente aumentata in seguito all'esposizione a ioni pesanti, cioè radiazione di alto LET.

Al fine di chiarire questo punto, è stato effettuato un lavoro *in vivo* estraendo linfociti da campioni di sangue provenienti da 11 astronauti esposti a dosi molto basse (2 mGy e 60 mGy) ed effettuando una mBAND del cromosoma 5 per la stima delle inversioni (Horstmann *et al.*, 2005). Questi risultati sono supportati da un'ulteriore indagine effettuata in vivo su operai di una centrale nucleare a Sellafield nel Regno Unito (Tawn e Whitehouse, 2005) esposti a raggi  $\gamma$  o a particelle  $\alpha$  provenienti da plutonio inalato, con dosi considerevolmente più basse (tra i 60 e i 400 mSv) di quelle riscontrate nello studio di Hande. I dati ottenuti da questo e dal precedente studio escludono dunque la possibilità di utilizzare gli intrascambi come biossimetri per esposizione a dosi molto basse.

### **3.3 Effetti biologici della radiazione terrestre**

Come detto all'inizio di questo capitolo, nell'ambiente sono presenti diverse fonti naturali e non di radiazione ionizzante cui gli organismi sono costantemente esposti. E' ben noto da numerosi studi che hanno utilizzato diversi parametri biologici in un'ampia varietà di organismi, che per l'esposizione a radiazione sparsamente ionizzante esiste una riduzione degli effetti deleteri di una data dose quando il dose/rate è basso o quando la dose è frazionata. Molti dei dati disponibili circa gli effetti delle radiazioni, su organismi non-umani, sono basati su studi che impiegano dosi e dose/rate molti più elevati rispetto a quelli cui gli organismi sono esposti e la mortalità dell'individuo è utilizzata come parametro biologico (Ulsh *et al.*, 2004).

E' evidente che una valutazione dello stato di popolazioni animali e vegetali che vivono in ambienti contaminati e l'analisi dei meccanismi che regolano il loro adattamento ad habitat avversi indubbiamente abbia un'importanza biologica rilevante. Tuttavia, c'è una quasi totale mancanza di dati quantitativi sugli effetti biologici di un'esposizione a lungo termine (Brechignac *et al.*, 2003).



Lo studio di specie animali che possano funzionare da bioindicatori dell'esposizione a radiazione ionizzante, utilizzando altri tipi di biomarcatori, ha confermato la validità dell'utilizzo di tali "sentinelle ambientali".

Un punto cruciale in questo tipo di biomonitoraggio è rappresentato dalla scelta del sistema animale da usare come bioindicatore. Nonostante, infatti, la biodosimetria ambientale ha la potenzialità di essere applicabile a numerose specie animali e vegetali, esistono delle caratteristiche distintive che al specie candidata deve possedere.

Innanzitutto il modello scelto deve possedere un cariotipo adatto, questo equivale a dire che sono preferibili quelle specie che non hanno molti cromosomi e che questi non siano di piccole dimensioni. Selezionando una specie inoltre devono essere considerati fattori demografici ed ovviamente bisogna prediligere quelle che hanno un'alta probabilità di esposizione.

Una consistente raccolta di dati circa gli effetti delle radiazioni, su diverse classi di vertebrati, provengono da studi effettuati dopo il disastro di Chernobyl. Questi studi hanno mostrato che gli stadi iniziali dell'incidente hanno determinato una morte di massa degli animali ed una conseguente morte degli embrioni. Lo stadio successivo è stato l'incremento di cellule che avevano accumulato mutazioni anche letali e traslocazioni reciproche. Accanto a questi dati ne troviamo altri relativi a piccoli mammiferi ed anfibi in cui furono trovate drammatiche deviazioni dalla normalità di parametri biochimici, cambiamenti distruttivi nel fegato e negli organi ematopoietici e gravi effetti genetici. Un altro studio riportò un incremento statisticamente significativo del livello di aberrazioni cromosomiche in cellule del midollo e cellule dell'epitelio intestinale in anfibi e roditori ed un forte incremento nel livello di micronuclei negli eritrociti del sangue periferico di anfibi (ECRR, 2006).

Ovviamente oltre a questi studi condotti in seguito al disastro esistono molti studi che fanno uso di altre classi di vertebrati.

Analisi condotte su varie specie di ungulati hanno dimostrato che l'uso di marcatori citogenetici potrebbero fornire considerevoli indicazioni per la valutazione dei rischi ambientali, nonché, dare informazioni circa la capacità adattativa delle specie esposte. In uno studio in particolare, un biomarcatore citogenetico dell'esposizione a radiazione ionizzante è stato utilizzato in tre specie di ungulati al fine di studiarne gli effetti a livello cromosomico. Il saggio dei micronuclei si è rivelato essere particolarmente idoneo nell'analisi citogenetica di fibroblasti nelle specie considerate. Il confronto dei risultati ottenuti con dati ottenuti dall'analisi in fibroblasti umani (Dolling *et al.*, 1998) ha mostrato

che la risposta cellulare ad alte dosi era simile per due delle specie di ungulati considerate e l'uomo (Ulsh *et al.*, 2004).

Altri studi hanno utilizzato come biomcatore le traslocazioni cromosomiche misurate in linfociti di tartarughe esposte a raggi  $\gamma$ . I risultati hanno mostrato in questo caso una radioresistenza in *T. scripta* maggiore di un fattore circa 1,7 rispetto all'uomo (Ulsh *et al.*, 2000). Inoltre questa differenza non è imputabile ad un diverso contenuto totale di DNA per cellula, essendo questo molto simile, nelle due specie considerate. Risultati analoghi si sono ottenuti anche analizzando linfociti nella stessa specie di tartaruga.

Anche in questo caso, infatti, la frequenza di scambi simmetrici si è rivelata essere più bassa di quella misurata nell'uomo (Ulsh *et al.*, 2001).

Oltre ai biosimetri animali, molto utilizzati sono anche biosimetri vegetali. Sin dai primi anni dopo il disastro nucleare di Chernobyl numerose analisi citogenetiche sono state condotte su organismi vegetali al fine di analizzare alterazioni cariotipiche e frequenze di aberrazioni cromosomiche radioindotte (Grinikh e Shevchenko, 1992).

### **3.4 *Rana esculenta* come biosimetro animale**

Da tutte queste evidenze sperimentali circa la validità dell'utilizzo di biosimetri animali, è nata l'idea in questo progetto di verificare la possibilità di utilizzo dell'anfibio anuro *Rana esculenta* come biosimetro del danno radioindotto.



Fig. 3.7: *Rana esculenta*

La *Rana esculenta* si origina dall'incrocio tra i due parentali *R. ridibunda* e *R. lessonae* ed, essendo autosterile, riesce a riprodursi solo sfruttando, dal punto di vista sessuale, la specie parentale con la quale convive. Il particolare meccanismo che permette la formazione di *R. esculenta* viene definito ibridogenesi (Hotz *et al.*, 1992).

Gli esemplari della *R. esculenta* possiedono un corredo cromosomico diploide di  $2n = 26$ , tutti i cromosomi presentano due braccia con le prime cinque coppie distintamente più grandi delle restanti otto. Colorazioni in Giemsa hanno evidenziato una costrizione secondaria, probabile sede delle regioni nucleolo-organizzatrici (NORs) sul braccio lungo della decima coppia (Gigantino *et al.*, 2002).

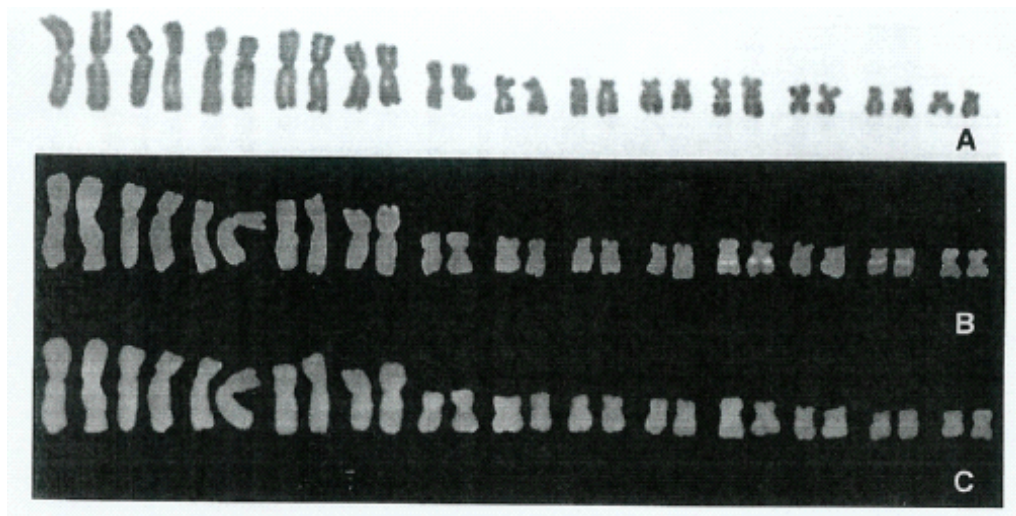


Fig. 3.8: Cariotipo di *R. esculenta* (Gigantino *et al.*, 2002)

La presenza di tale marcatore citogenetico, ma localizzato in coppie cromosomiche differenti, è stata documentata, utilizzando la tecnica FISH e sonde a rDNA, anche in altre specie di rane appartenenti alle Hylidae ed alle Hyalinae (Kasahara *et al.*, 2003; Zampieri Silva *et al.*, 2003), inoltre anche le dimensioni del sito NOR risultano notevolmente differenti nelle diverse specie (Veiga-Menoncello *et al.*, 2003).

*R. esculenta* presenta, rispetto alle specie parentali, elevate capacità adattative, probabilmente attribuibili all'elevato grado di eterozigosi del suo genoma, che ne aumenta

la fitness potenziale ampliando gli intervalli di variazione dei parametri ambientali che questa specie può tollerare in zone caratterizzate da elevato stress antropico (Andreani *et al.*, 2003).

Mentre, come abbiamo visto nel paragrafo precedente, la risposta alle radiazioni ionizzanti dei vertebrati a sangue caldo è stata analizzata sfruttando vari parametri biologici le informazioni circa gli effetti delle radiazioni sui vertebrati a sangue freddo sono piuttosto frammentarie.

L'utilizzo come modello sperimentale di vertebrati a sangue freddo come gli anfibi potrebbe consentire di analizzare in modo più dettagliato l'effetto delle radiazioni ionizzanti su questi organismi che ne sono risultati sensibili mostrando differenti tipi di danni citogenetici (ECRR, 2006).

In conseguenza all'incidente nucleare di Chernobyl si è osservato un generale decremento (oltre il 4%) nella quantità totale del genoma degli esemplari analizzati delle aree contaminate da radiazione  $\gamma$  (Vinogradov e Chubinishvili, 1999). Inoltre, il livello di eritroblasti con micronuclei nel sangue delle larve di altre specie, come *Rana temporaria*, è stato trovato essere 6 volte maggiore che nel controllo (ECRR, 2006).

## *Capitolo 4*

### *Progetto d'esperimento*

Nei precedenti capitoli sono state descritte le diverse tipologie di danni indotti al DNA dalle radiazioni ionizzanti, l'importanza dei test biosimetrici che possono fornire una stima diretta della dose biologicamente rilevante del rischio e i differenti effetti biologici che possono essere osservati.

Questo lavoro di ricerca si è articolato su differenti esperimenti il cui filo conduttore è la quantificazione del danno indotto dalle particelle cariche sul DNA in termini di aberrazioni cromosomiche.

La parte principale del lavoro sperimentale ha riguardato i protoni di alta energia. La scelta di tale particella deriva dal fatto che, come detto nel capitolo 1, i protoni sono gli elementi più abbondanti nella composizione della radiazione cosmica galattica (GCR) rappresentando circa l'87% del totale con un picco di energia che si aggira intorno a valori pari ad 1 GeV. Nelle missioni spaziali, è quindi predominante l'esposizione a protoni di alta energia. Tuttavia, non vi sono dati in letteratura sulla efficacia biologica di protoni relativistici, così come poco è noto sulla efficacia delle schermature nel ridurre il danno biologico.

Oltre ai protoni, gli ioni pesanti (particelle HZE) danno un contributo importante alla dose equivalente in missioni interplanetarie. Abbiamo quindi studiato anche gli effetti biologici di ioni ferro di alta energia, confrontandolo con i raggi X, in linfociti umani sopravvissuti alla esposizione.

I dati in vitro sugli effetti della radiazione cosmica simulata devono poi servire a verificare le osservazioni in vivo, in equipaggi impegnati in missioni spaziali. In questa tesi verranno descritte le analisi nell'astronauta italiano Roberto Vittori, impegnato in due missioni sulla Stazione Spaziale Internazionale (ISS).

Infine, sono state condotte analisi citogenetiche preliminari su un modello animale, *Rana esculenta*, allo scopo di valutare la possibilità di impiego di un sistema vivente non-umano come biosimetro della esposizione a radiazione ionizzante. Tale studio ha avuto

come obiettivo primario lo studio delle caratteristiche dei cromosomi dell'anfibio scelto, la messa a punto di un protocollo per colture linfocitarie in anfibi, la misura di aberrazioni cromosomiche in soggetti di controllo ed infine la misura di aberrazioni cromosomiche indotte da raggi X come studio preparatorio al calcolo dell'RBE.

## **4.1 Descrizione dell'esperimento**

### **4.1.1 Protoni**

L'efficacia biologica di protoni di alta energia è poco conosciuta. Inoltre, la schermatura dei protoni galattici genera radiazione secondaria, per cui gli astronauti vengono esposti ad un campo misto la cui efficacia biologica è ignota. Lo scopo dell'esperimento è dunque quello di fornire una misura delle curve dose/risposta per induzione di aberrazioni cromosomiche in linfociti esposti a protoni (ioni H) da 1 GeV non schermati o schermati con lucite (PMMA) ed alluminio. La scelta degli schermi è di natura pratica: l'alluminio è sempre presente come componente strutturale dei veicoli spaziali, mentre il PMMA (anche noto con il comune nome di plexiglass) è una plastica molto usata in fisica nucleare in quanto fortemente idrogenata con eccellenti proprietà di schermo per gli ioni pesanti.

Il fascio di idrogeno ad alta energia è stato prodotto presso il NASA Space Radiation Laboratory del Brookhaven National Laboratory (Upton, NY, USA).

Durante il periodo di lavoro sono stati effettuati diversi irraggiamenti. Il campione biologico (sangue intero) in ognuno degli esperimenti, è stato prelevato da un donatore di sesso maschile sano pochi minuti prima dell'irraggiamento e successivamente posto in tubi sterili contenenti sodio eparina. I campioni poi aliquotati sono stati esposti al fascio di ioni e successivamente messi in coltura in terreno di crescita RPMI (per la composizione si rimanda all'appendice) con il 2% di fitoemoagglutinina, per la stimolazione dei linfociti. La fiasca è stata poi messa in incubatore verticalmente a 37°C per 48 h, trascorse le quali si è proceduto con la tecnica della raccolta dei cromosomi (harvest) il cui protocollo sperimentale si ritrova in appendice. Una volta terminata la procedura di raccolta dei cromosomi i campioni vengono posti in congelatore fino alla successiva preparazione dei vetrini per l'analisi.

Il primo esperimento è consistito nell'esposizione dei campioni biologici ad un fascio di ioni H alle seguenti dosi: 50, 100, 200 e 300 cGy.

In questo set di esperimenti i campioni sono stati esposti senza schermo, con uno schermo di alluminio ( $\rho=2.7 \text{ g/cm}^3$ ) dello spessore  $x=79 \text{ mm}$  e con uno schermo di PMMA ( $\rho=1.16 \text{ g/cm}^3$ ) dello spessore  $x=193 \text{ mm}$ . I due spessori corrispondono quindi alla stessa densità areale  $\rho x= 20 \text{ g/cm}^2$ . I materiali migliori per la schermatura nello spazio danno maggiore attenuazione della dose a parità di densità areale (spessore massico), in quanto saranno in grado di attenuare di più a parità di massa dello schermo: il peso della schermatura è ovviamente il fattore critico limitante per un veicolo spaziale.

L'esperimento successivo è stato effettuato esponendo nuovi campioni nelle medesime condizioni sperimentali, ossia usando lo stesso donatore, lo stesso ione e la stessa energia dell'esperimento precedente.

I campioni senza schermo sono stati esposti alle seguenti dosi: 75, 150, 250 e 350 cGy allo scopo di avere più punti sperimentali per la costruzione della curva dose risposta. I campioni con schermi di alluminio sono stati esposti alle stesse dosi dell'esperimento precedente, allo scopo di verificare i risultati ottenuti in precedenza, ed a nuove dosi per la stessa ragione vista per l'esperimento senza schermo.

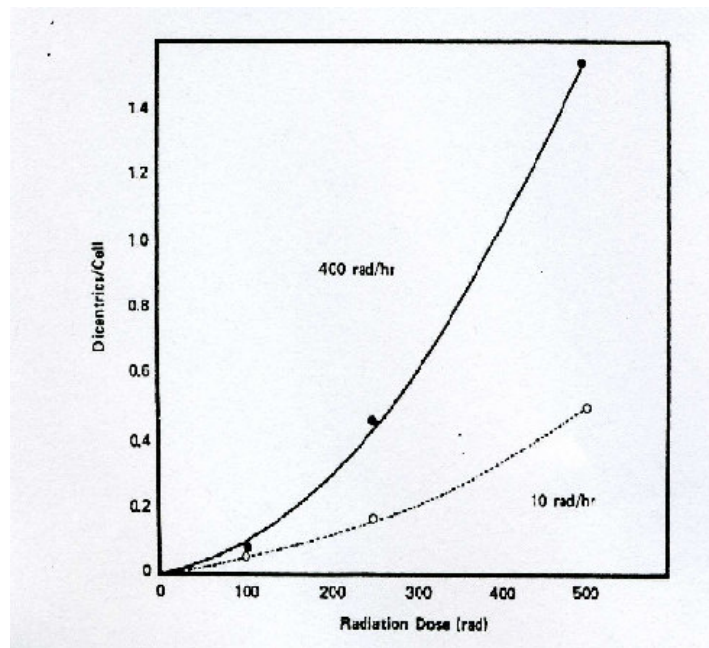
Complessivamente, le dosi a cui sono stati esposti i campioni in questo esperimento sono state le seguenti: 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300 e 350 cGy.

Infine è stato condotto un esperimento utilizzando lo stesso ione, le stesse condizioni sperimentali, lo stesso sistema biologico ma donatore differente che in questo caso era di sesso femminile e le stesse dosi ma differente rateo di dose al fine di valutare e confrontare le frequenze di aberrazioni cromosomiche indotte dal fascio di protoni ad alto- e basso- rateo di dose.

E' noto che per raggi X e  $\gamma$ , il rateo di dose (o intensità di dose) è il fattore principale che determina le conseguenze biologiche della dose di radiazione assorbita dal campione (Hall, 1994). Man mano che il rateo di dose diminuisce ed il tempo di esposizione aumenta, l'effetto biologico di una data dose viene generalmente ridotto (*sparing effect*). Poiché durante i voli spaziali l'intensità di dose si mantiene bassa ( $<1 \text{ mSv/giorno}$ ), è importante valutare la modificazione dell'efficacia biologica dei protoni nel caso di esposizione cronica.

Quando linfociti umani vengono esposti a radiazioni di basso LET e la dose viene rilasciata molto lentamente è noto che si assiste ad una riduzione della frequenza di

aberrazioni cromosomiche. Questa evidenza risulta dal fatto che i siti di danno indotti dalla radiazione sul DNA che possono interagire tra loro dando luogo alla formazione ad esempio di un cromosoma dicentrico, restano “disponibili” per l’interazione solo per un periodo di tempo finito. Quando le cellule sono esposte ad un rateo di dose molto basso, il danno al DNA indotto da una singola particella della traccia può essere riparato prima che un’altra particella interagisca col DNA dando luogo ad un secondo evento di rottura, portando a zero la componente quadratica della curva dose-risposta (Bender *et al.*, 1988). La figura 4.1 mostra le curve dose risposta di cromosomi dicentrici esposti a radiazione di basso LET rilasciata con alto e basso rateo di dose.



**Fig. 4.1:** Confronto delle curve dose risposta di cromosomi dicentrici osservati in cromosomi umani esposti a radiazione di basso LET rilasciata con alto- e basso-rateo di dose. Si può osservare una pronunciata riduzione nella frequenza dei cromosomi dicentrici a basso rateo di dose (Bender *et al.*, 1988).

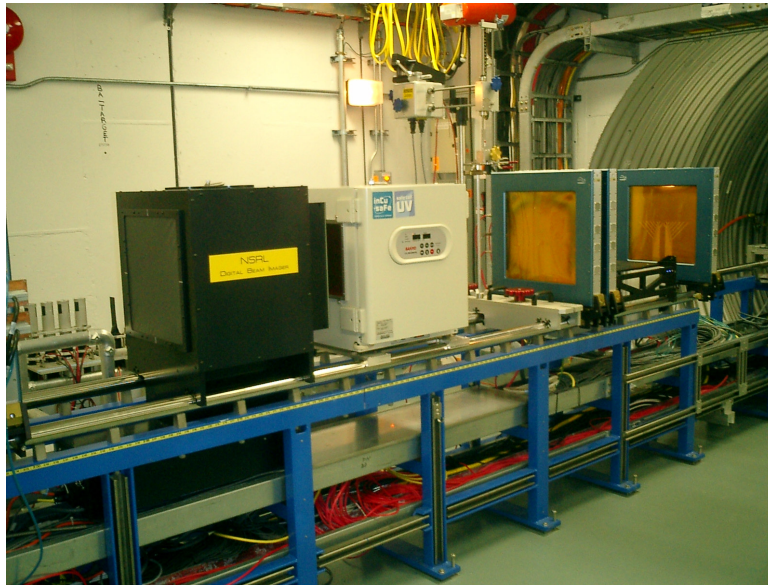
Dal momento che non sono noti gli effetti biologici indotti da un fascio di ioni H rilasciati con differente rateo di dose in questo lavoro di ricerca si è pensato di misurare



anche le aberrazioni cromosomiche indotte da ioni H da 1 GeV ad alto e basso rateo di dose.

Analogamente agli altri esperimenti, anche in questo, le procedure utilizzate per la preparazione dei campioni biologici hanno previsto prelievo, utilizzo di tubi con sodio eparina, irraggiamento e messa in coltura per 48 h.

Le dosi usate per l'irraggiamento sono state: 50, 100, 150, 200 e 250 cGy. Il rateo di dose per i campioni ad alta intensità di dose (esposizione acuta) è stato di  $\sim 1$  Gy/min, mentre quello per l'esperimento a bassa intensità di dose (esposizione cronica) è stato di  $\sim 0.8$  cGy/min. Durante tutto l'esperimento, tutti i campioni sono stati tenuti in incubatore a 37 °C. Per i campioni con esposizione cronica questo equivale a dire che durante l'irraggiamento, della durata totale di circa 6 ore per la massima dose, i campioni sono stati posti all'interno di un incubatore (figura 4. 2); questo è stato possibile grazie al montaggio di un incubatore lungo la linea del fascio durante l'irraggiamento.



**Fig. 4.2:** L'immagine mostra l'incubatore nella sala bersagli dell'acceleratore, all'interno del quale sono stati messi i campioni biologici durante l'irraggiamento

### 4.1.2 Ioni ferro

La stima degli intrascambi cromosomici è necessaria per valutare il valore del fattore F, di cui si è ampiamente parlato nel paragrafo 3.2, come indice della qualità della radiazione. L'analisi delle aberrazioni intra-cromosomiche nella progenie di linfociti esposti ad un fascio di ioni Fe da 1 GeV/n, come esempio di radiazione ad alto LET, è stata valutata al fine di stabilire se gli intra-scambi giocano un ruolo nella maggiore efficacia degli ioni pesanti per l'induzione di effetti tardivi, e se possono avere un valore pratico come "impronta genetica" del danno indotto da ioni pesanti. Il campione rappresentativo dell'esposizione a basso LET è stato irraggiato con raggi X (LET medio degli elettroni nel target circa 2 keV/ $\mu\text{m}$ ). La descrizione dettagliata della macchina radiogena utilizzata è riportata nel paragrafo 4.4.

Anche in questo caso, il campione biologico è stato esposto pochi minuti prima dell'irraggiamento, posto in tubi contenete sodio eparina e quindi esposto al fascio. Una volta messi in terreno di crescita sono stati tenuti in incubatore a 37°C per 120 h fino alla raccolta dei cromosomi. Dopo 120 h dalla stimolazione i linfociti hanno compiuto almeno tre cicli cellulari (Miller *et al.*, 1981; Fig. 4.3). Si è stabilito dunque di aspettare un tale intervallo di tempo dall'irraggiamento in quanto lo scopo dell'esperimento è quello di analizzare la frequenza delle aberrazioni stabili e trasmissibili alla progenie.

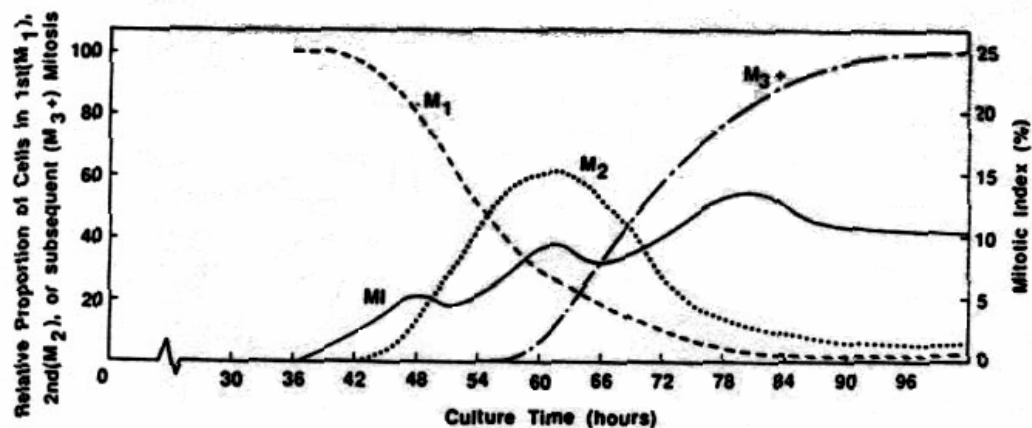


Fig. 4.3: Relazione tra la proporzione di linfociti in prima ( $M_1$ ), seconda ( $M_2$ ) o terza ( $M_3$ ) mitosi, con il tempo di cultura in terreno contenente PHA e indice mitotico (da Bender *et al.*, 1988).

### 4.1.3 Biodosimetria in astronauti

Analisi *in vivo* del danno citogenetico indotto dalle particelle cariche nello spazio sono state condotte misurando le frequenze di aberrazioni cromosomiche in linfociti dell'astronauta Roberto Vittori durante due missioni brevi Stazione Spaziale Internazionale (ISS).

Lo scopo di questo studio è stato a) misurare un eventuale aumento di aberrazioni prodotte dalla radiazione assorbita durante il volo, e b) verificare se l'ambiente spaziale (microgravità, stress,...) determina una variazione nella radiosensibilità dei campioni prelevati prima, immediatamente dopo la missione ed a distanza di 6 mesi dal termine della stessa.

Il sangue dell'astronauta Roberto Vittori è stato prelevato alla base spaziale di Baikonur, nel Kazakhstan e portato in Italia presso il laboratorio di Biofisica delle Radiazioni dell'Università di Napoli Federico II.

In un lavoro precedente erano state analizzate le frequenze di aberrazioni cromosomiche nei campioni di sangue dello stesso astronauta durante la missione breve "Marco Polo" sulla ISS (aprile 2002) (Greco *et al.*, 2003). Durante questo lavoro di tesi sono stati analizzati i campioni prelevati dopo sei mesi dal termine della missione Marco Polo e i campioni di sangue prelevati in occasione della missione ENEIDE (aprile 2005).

La missione ENEIDE ha avuto la stessa durata, circa 10 giorni, della missione Marco Polo. Il prelievo ematico è stato effettuato poco prima del lancio della capsula Soyuz TMA-6 che è avvenuto il 15 aprile 2005 dalla base di Baikonur, Kazakhstan mentre il prelievo al termine della missione è avvenuto dopo 10 giorni, il 25 aprile 2005.

Una volta giunto in laboratorio il sangue è stato irraggiato con raggi X alle dosi di 100, 200 e 300 cGy (rateo di dose pari a ~ 100 cGy/min) allo scopo di verificare se il campo di radiazione spaziale modifica la radiosensibilità individuale. Il sangue è stato messo in coltura in terreno RPMI e fitoemagglutinina al 2%, e dopo 48 h è stata effettuata la raccolta cromosomica. Per i campioni di controllo, ossia non irraggiati, è stata effettuata sia un'analisi delle metafasi che delle PCC; quindi in un caso è stata usata colchicina per la raccolta delle metafasi e nell'altro calyculin A (come riportato nei protocolli in appendice).

I campioni poi sono stati fissati e conservati in congelatore fino alla successiva analisi.

#### **4.1.4 Rana *esculenta***

Come detto all'inizio del capitolo, uno degli esperimenti condotti durante questo lavoro di ricerca ha riguardato lo studio delle caratteristiche del genoma di un modello animale al fine di verificare l'utilizzo di tale sistema come biosimulatore del danno radioindotto. Il modello animale utilizzato è stato *Rana esculenta*. La scelta è stata dovuta soprattutto al fatto che questo anfibio possiede notevoli capacità adattative ed inoltre perché si è ritenuto utile analizzare la risposta ad un agente clastogeno come le radiazioni in vertebrati a sangue freddo dal momento che in letteratura esistono numerosi studi sulle risposte dei vertebrati a sangue caldo ma pochissime e frammentarie su quelli a sangue freddo.

L'idea centrale è stata quella di utilizzare il suddetto modello per studi *in vivo*, dunque, quello di effettuare irraggiamenti a corpo intero ed analizzare le aberrazioni cromosomiche indotte da raggi X in linfociti.

Il primo obiettivo in questo lavoro è stato mettere a punto un protocollo per le colture linfocitarie di anfibi. Il passo successivo è stato quello di misurare le frequenze di aberrazioni cromosomiche in esemplari di controllo e successivamente quello di effettuare irraggiamenti di esemplari utilizzando raggi X a differenti dosi: 4, 6 e 10 Gy.

I prelievi ematici dagli animali sono stati condotti presso il laboratorio di Morfologia Sperimentale del Dipartimento di Biologia Evolutiva e Comparata dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" in seguito alla somministrazione di un blando sedativo, MS222 (Sigma-Aldrich). Nello stesso laboratorio sono state effettuate le colture e le raccolte dei cromosomi.

Va precisato inoltre che tutto questo lavoro è stato condotto solo in seguito all'approvazione da parte del Comitato Etico per la Sperimentazione Animale.

#### **4.2 Sistema biologico: linfociti del sangue periferico**

Tra i diversi sistemi cellulari che possono essere utilizzati, i linfociti del sangue periferico sono certamente i più utilizzati per analisi citogenetiche. Questi, come tutte le cellule del sistema emolinfopoietico, originano (nell'adulto) nel midollo osseo da cellule

staminali pluripotenti. Queste cellule linfoidei giocano un ruolo vitale nelle difese dell'organismo contro agenti esterni e reagiscono in ampia varietà di modi.

I precursori dei linfociti T migrano nel timo (da ciò il termine linfociti T) dove ultimano il loro processo di maturazione; i linfociti B lo completano invece nel midollo osseo. I linfociti T e B, una volta terminata la maturazione nei rispettivi organi (per questo chiamati anche organi linfoidei primari o centrali), passano nel sangue e da qui negli altri organi linfoidei periferici: linfonodi, tonsille, milza, appendice.

Le cellule linfoidei rappresentano circa il 20% di tutti i leucociti circolanti i linfociti T costituiscono l'85% dei linfociti totali, mentre la restante parte è composta da linfociti B.

I linfociti T e B hanno differenti antigeni di superficie e possono essere facilmente distinguibili utilizzando anticorpi specifici. I linfociti maturi che ancora non hanno subito un processo di divisione si trovano bloccati nella fase  $G_0$  del ciclo cellulare.

I linfociti B hanno come funzione principale quella di produrre anticorpi che si trovano localizzati sulla loro superficie esterna. Ad eccezione di nuove risposte anticorpali sembra che tutte le risposte immunitarie dipendano dai linfociti T che posseggono numerose sottoclassi. Le cellule T non secernono molecole di anticorpo ma, come le cellule di tipo B, espongono sulla loro superficie recettori per antigeni. Le sottoclassi di linfociti T, T helper e T suppressor, hanno un ruolo regolativo e controllano la produzione di anticorpi dei linfociti B.

Dal momento che i linfociti circolano nel torrente sanguigno sono distribuiti praticamente in tutti i tessuti del corpo. Inoltre la loro accessibilità è enorme, basti considerare che 1 mL di sangue contiene approssimativamente un milione di linfociti. La vita media di un linfocita è circa 3.5 anni, anche se quotidianamente si ha un ricambio delle cellule, inoltre essi conservano una memoria del danno. Questa caratteristica è dovuta al fatto che i linfociti, come abbiamo già detto, sono fermi in fase  $G_0$ , questa caratteristica fa sì che le cellule non vada incontro a morte mitotica se l'aberrazione cromosomica subita è di tipo instabile.

L'attivazione dei linfociti nella ripresa del ciclo cellulare, oltre che "naturalmente" nella risposta immunitaria, può anche essere realizzata *in vitro*. L'esposizione dei linfociti alla fitoemagglutinina (PHA), un estratto di molte specie leguminose, determina l'attivazione dei linfociti in coltura. I primi ad essere attivati sono i linfociti T, ma aspettando tempi più lunghi si ottiene anche l'attivazione dei linfociti B. La risposta alla PHA e le percentuali di cellule attraverso le diverse fasi del ciclo cellulare non sono

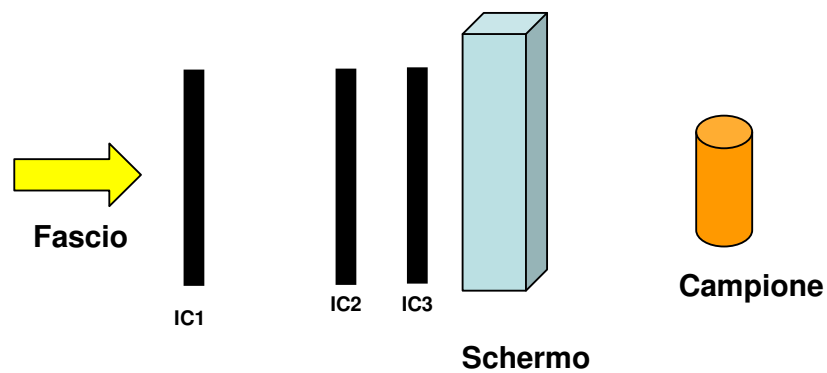
uniformi, tuttavia, a circa 48 ore dalla semina la maggior parte delle cellule si trovano in prima mitosi (figura 4.3).

### **4.3 Irraggiamento dei campioni presso il Brookhaven National Laboratory**

Un acceleratore di particelle è un dispositivo il cui scopo è quello di produrre fasci di particelle subatomiche o ioni ad alta energia. Questi dispositivi sfruttano l'azione congiunta di campi elettrici e magnetici, mentre i primi hanno lo scopo di fornire energia alle particelle i secondi hanno lo scopo di curvare la traiettoria delle particelle stesse. Gli acceleratori possono essere utilizzati per scopi medici, nella produzione di particelle impiegate in radioterapia, per scopi di ricerca ed in radiobiologia.

Per gli esperimenti effettuati in questo lavoro di ricerca la produzione di ioni è stata realizzata utilizzando un sincrotrone a gradiente alternato (AGS da Alternating Gradient Synchrotron) presso il Brookhaven National Laboratory a Long Island, New York.

I campioni sono stati esposti a ioni H di energia pari 1 GeV ed a ioni Fe da 56 GeV. Per la dosimetria del fascio sono state utilizzate delle camere a ionizzazione sottili (IC1, IC2, IC3) distribuite lungo il percorso del fascio come mostrato in figura 4.4. Per alcuni dei campioni esposti a ioni H, si ricorda che sono stati interposti degli schermi (schematicamente mostrati in figura 4.4) tra il fascio ed il campione biologico. La dose al campione inoltre viene misurata utilizzando un dosimetro mobile (non illustrato in figura), una camera a ionizzazione del tipo "egg chamber".



**.Fig. 4.4:** Schema di irraggiamento utilizzato durante gli esperimenti.

La forma del fascio è assimilabile ad un quadrato di circa  $20 \times 20 \text{ cm}^2$  e le misure di dosimetria effettuate prima degli esperimenti hanno mostrato una disomogeneità del fascio sempre inferiore al 5%.

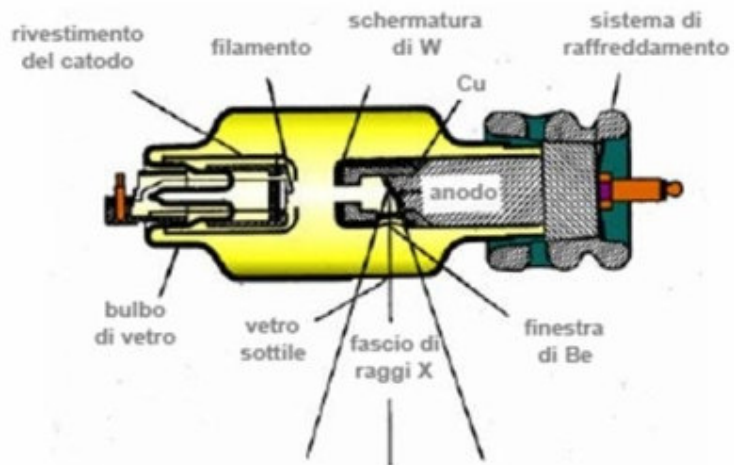
#### **4.4 Irraggiamento dei campioni con raggi X**

Tutti gli irraggiamenti con raggi x sono stati realizzati mediante l'utilizzo di una macchina radiogena, modello Stabilipan 2 della Siemens, presso il dipartimento di Scienze Fisiche dell'Università di Napoli Federico II. In figura 4.5 è mostrata la macchina radiogena utilizzata in questo lavoro.



**Fig. 4.5:** Macchina a raggi X presso il Dipartimento di Scienze Fisiche dell'Università Federico II di Napoli.

Una macchina a raggi X è essenzialmente un tubo all'interno del quale viene generato il vuoto ed in cui sono presenti un catodo ed un anodo. Il catodo è costituito da un filamento metallico nel quale viene fatta passare una corrente elettrica fornita da un generatore di bassa tensione ed alta corrente. L'anodo invece è formato da una piastra metallica che possiede i seguenti requisiti: alto  $Z$  (numero atomico), elevata temperatura di fusione e buona conducibilità termica. Il materiale solitamente utilizzato a tale scopo è il tungsteno (figura 4.6).



**Fig. 4.6:** Rappresentazione schematica di tubo a raggi X



Tra catodo ed anodo si stabilisce una differenza di potenziale (d.d.p.) molto elevata, che può andare dai 10 kilovolt al milione di volt, a seconda dell'impiego che si vuole fare dei raggi X. In diagnostica, dove è indispensabile differenziare i tessuti si utilizzano solitamente d.d.p. fino a 200-300 kV, mentre in radioterapia si utilizzano tensioni molto maggiori. Bisogna precisare però che in questo caso il dispositivo che genera alte tensioni non è rappresentato da un tubo a raggi X

#### **4.5 Ibridizzazione *In Situ* in Fluorescenza**

Nel paragrafo 2.2 sono state descritte le tecniche maggiormente utilizzate per visualizzare le aberrazioni cromosomiche e tra queste è stata citata la tecnica di ibridizzazione in fluorescenza classica ed in tutte le sue varianti. Questa tecnica fondamentalmente si basa su alcune proprietà caratteristiche del DNA, come la sua capacità di denaturazione e rinaturazione in presenza di specifiche sostanze chimiche o in seguito a variazioni della temperatura e la capacità del DNA a singolo filamento di riconoscere sequenze complementari alla propria. In questa tecnica si utilizzano sonde (*probes*) costituite da corti frammenti di DNA a doppio filamento complementari alle sequenze bersaglio, quali geni specifici, regioni subcromosomiche (centromeri, telomeri) od interi cromosomi.

La tecnica originale si basava sul fatto che il DNA può essere biotinilato e sulla proprietà della biotina di legarsi all'avidina. Utilizzando una reazione particolare, una sonda di DNA veniva fatta reagire con la biotina che in questo modo poteva essere incorporata al DNA stesso. La sonda biotinilata veniva successivamente messa in presenza del DNA da ibridizzare precedentemente denaturato, ripetendo più volte l'intero processo al fine di incorporare un maggior numero di molecole fluorescenti. Una volta effettuata l'ibridizzazione, si effettuavano dei lavaggi successivi allo scopo di eliminare l'eccesso di sonda, quindi il DNA biotinilato veniva esposto all'azione dell'avidina. Avvenuto il legame biotina-avidina, il passo successivo era quello di rendere visibile l'ibridizzazione; a tale scopo si sfruttava la capacità degli anticorpi anti-avidina marcati con fluorocromi di riconoscere la molecola di avidina e di legarsi, permettendo così di evidenziare il DNA. Attualmente si realizza una marcatura diretta del DNA mediante l'impiego di oligonucleotidi direttamente legati a composti fluorocromi. I *fluorocromi* sono molecole

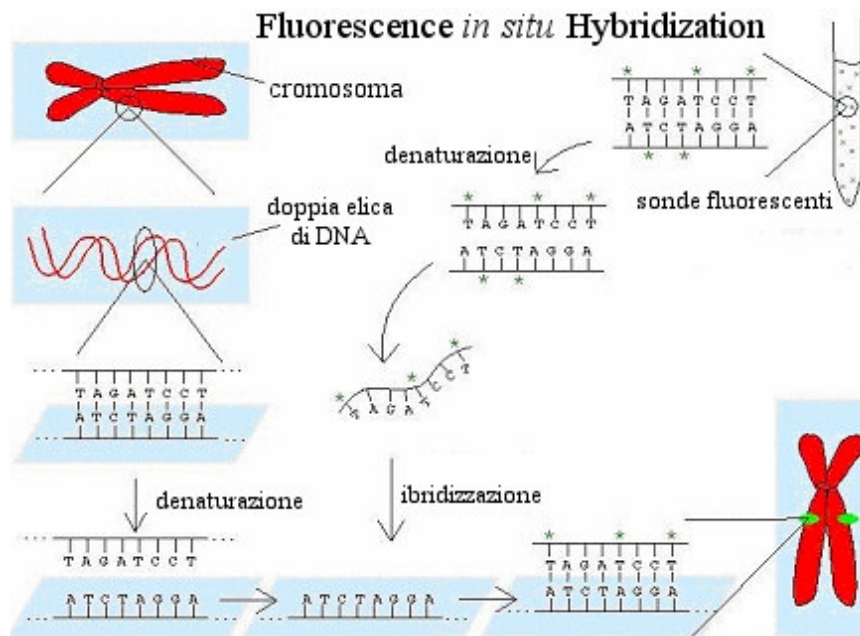
che hanno la caratteristica di eccitarsi assorbendo luce ad una specifica lunghezza d'onda ( $\lambda$ ) e di riemetterla ad una lunghezza d'onda differente. Le sonde utilizzate durante questo lavoro appartengono a questa categoria.

Affinché avvenga l'ibridazione con le sonde, il DNA deve essere denaturato, e ciò si ottiene aumentando la temperatura in genere tra i 70 e gli 80° C. Il controllo della temperatura è stato realizzato in questa tesi mediante l'utilizzo di una piattaforma di controllo prodotta dalla Vysis, l'*HyBrite* (figura 4.7).



**Fig. 4.7:** HyBrite (Vysis): 1) postazioni dei vetrini, 2) pannello per l'impostazione dei differenti programmi di ibridizzazione

La fusione del DNA è facilitata dalla presenza di formammide nella soluzione contenente la sonda, un agente denaturante in grado di rompere i legami idrogeno tra le basi. Talvolta le case di produzione vendono le sonde già in soluzione con formammide, in modo da denaturare anch'esse se sono a doppio filamento. Le sonde inoltre devono essere in eccesso rispetto alla concentrazione di DNA: quando si abbassa la temperatura per permettere la rinaturazione, le sonde devono competere efficacemente con i filamenti parentali per le sequenze bersaglio. La figura 4.8 illustra schematicamente le varie fasi della tecnica F.I.S.H.



**Fig. 4.8:** Rappresentazione schematica della tecnica F.I.S.H.

Durante le varie fasi dell'ibridizzazione possono verificarsi diverse situazioni che portano alla formazione di legami bersaglio-bersaglio, legami sonda-sonda, legami specifici sonda-bersaglio e legami non specifici sonda-bersaglio.

Fondamentali sono le condizioni di stringenza alle quali avviene la formazione delle molecole ibride: maggiori sono le condizioni di stringenza (bassa concentrazione di sali, elevata temperatura, presenza di agenti denaturanti), minore è la probabilità di mantenere eteroduplex contenenti appaiamenti errati.

Gli appaiamenti sonda-sonda non sono evidenziabili, poiché il complesso non si lega al supporto e viene rimosso durante le fasi di lavaggio. L'appaiamento bersaglio-bersaglio non è marcato con fluorocromi e quindi non può essere rilevato. Le interazioni non specifiche sono eliminate normalmente durante le fasi di lavaggio in condizioni di stringenza. La concentrazione di sonda, di bersaglio, la temperatura, il contenuto in sali, il pH, influenzano significativamente il processo di appaiamento.

Per lo svolgimento di questo lavoro di ricerca sono stati utilizzati differenti tipi di sonde cromosomiche, le cosiddette sonde "whole chromosome" che marcano interi cromosomi e le sonde "Arm specific probes" (ASP). Le sonde whole chromosome

utilizzate erano specifiche per i cromosomi 1 e 2 marcate rispettivamente con fluoresceina isotiocianato (FITC), che emette nel verde, e Texas Red che emette nel rosso, entrambe prodotte dalla MetaSystems, Germany.

Allo scopo di analizzare le aberrazioni intracromosomiche inter-braccio si sono scelte come sonde le *Arm Specific Probes* (ASP), cioè sonde specifiche per le braccia cromosomiche. La particolarità di queste sonde è che esse sono coniugate a fluorofori diversi per il braccio p ed il braccio q dei cromosomi, ed in particolare per il braccio p viene utilizzato il FITC e per il braccio q viene utilizzato il Texas Red. Si è scelto per l'ibridizzazione con le ASP di utilizzare il cromosoma 1.



**Fig. 2.9:** Disegno di un cromosoma metafaseico ibridizzato con le Arm Specific Probes.

I protocolli sperimentali utilizzati in questo lavoro sono riportati in appendice.

#### **4.6 Colorazione in Giemsa di cromosomi di anfibi**

L'analisi delle aberrazioni cromosomiche in cromosomi di anfibi realizzata durante questo lavoro è stata realizzata mediante colorazione in Giemsa, data la mancanza di sonde specifiche per la marcatura dei cromosomi di questi animali.

Questa tecnica di colorazione è stata fra le prime ad essere utilizzata anche per l'analisi citogenetica di cromosomi umani ed ancor oggi è ampiamente utilizzata sia per scopi diagnostici che per scopi di ricerca (Stephan *et al.*, 2007).

Questo colorante è costituito ad una miscela di blu di metilene ed eosina e si lega specificamente ai gruppi fosfato del DNA essendo una molecola carica positivamente.

Come detto nel capitolo 2, la colorazione in Giemsa permette di effettuare analisi cariotipiche e consente di individuare alcune classi di aberrazioni cromosomiche come i dicentrici ed i ring. In questo lavoro cromosomi di *Rana esculenta* sono stati visualizzati ed analizzati mediante colorazione in Giemsa al 10% e successivamente sono state misurate le frequenze di cromosomi dicentrici.

#### **4.7 Sistema di acquisizione di immagini: R.A.I.C.**

L'analisi dei campioni in questo lavoro è stata realizzata mediante l'impiego del R.A.I.C (Riconoscitore Automatico di Immagini Cromosomiche) (figura 4.10), un sistema che consente di effettuare un'analisi automatica ad alta velocità di cellule ibridizzate.



**Fig. 4.10:** Il sistema R.A.I.C. e le sue componenti.

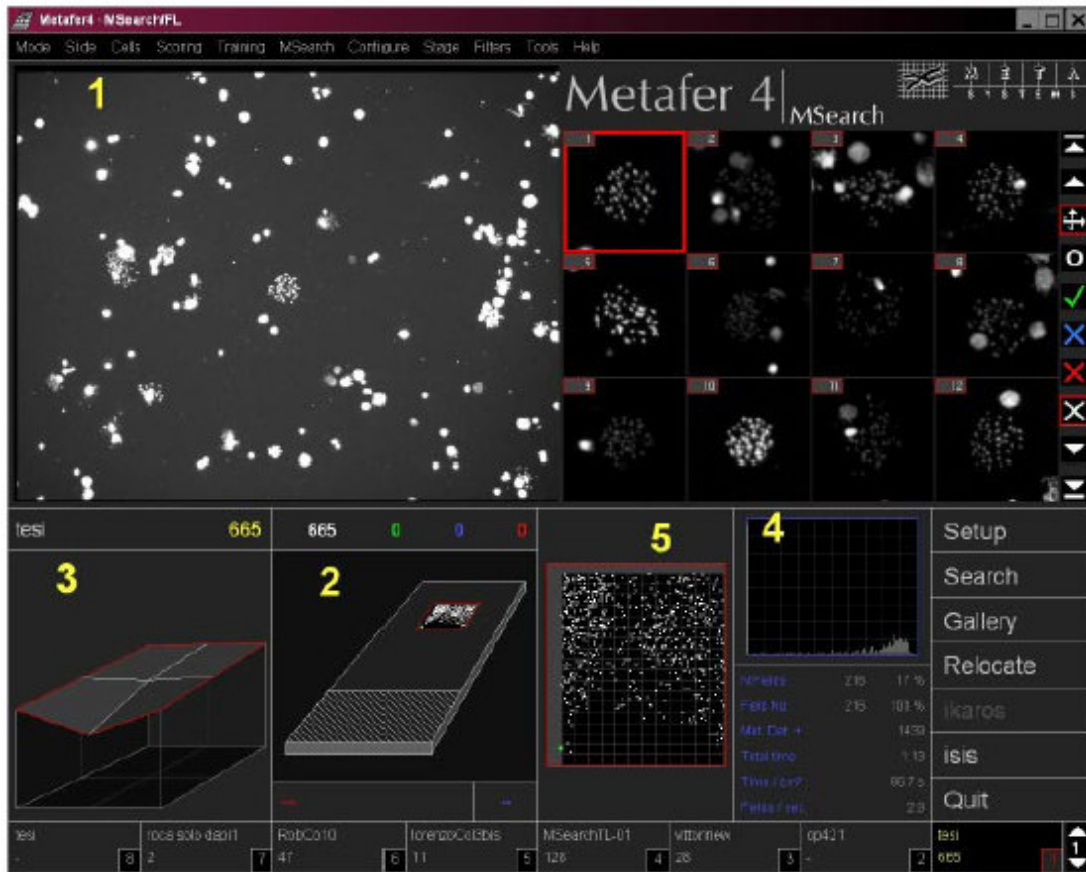
Il sistema è composto da un microscopio Axioplan2MOT completamente motorizzato e controllabile mediante calcolatore, un carrello porta vetrini Matrzhauer anch'esso motorizzato, una telecamera b/n ad alta risoluzione ed un PC equipaggiato con un software specifico, *Metafer4* prodotto dalla MetaSystems (Germany) e ulteriormente implementato nel laboratorio di Biofisica, per il controllo e l'acquisizione delle immagini.

Il microscopio presente nel sistema consente di effettuare analisi con luce in fluorescenza e luce trasmessa essendo dotato sia di una lampada ai vapori di mercurio, che emette anche nell'ultravioletto, che di una lampada alogena che emette nel visibile.

Le varie funzioni descritte possono essere eseguite sia operando sui controlli presenti sul corpo del microscopio che attraverso il calcolatore cui è collegato.

Il vetrino da analizzare viene posto sul carrello porta vetrini e l'operatore dalla finestra di *setup* di *Metafer4* imposta i parametri della ricerca: area del vetrino sulla quale compiere la ricerca, tipo di cellule da cercare (PCC o metafasi), la sensibilità della ricerca ed il numero massimo di cellule da acquisire. Il software installato sul PC del R.A.I.C. è in grado di ricercare le cellule presenti sul vetrino, utilizzando un obiettivo a basso ingrandimento (obiettivo a secco 10 X) e di rilocalizzarle ed acquisirle con un obiettivo ad alto ingrandimento (obiettivo ad immersione 63 X). Tale funzione risulta particolarmente utile anche nel caso in cui durante l'analisi delle aberrazioni cromosomiche ci si trovi davanti ad una situazione di incertezza che potrebbe derivare ad esempio da una cattiva qualità dell'immagine. In questo caso infatti, grazie a questa funzione è molto semplice risalire alla cellula in questione anche a distanza di tempo ed osservarla direttamente al microscopio.

Una volta impostati tali parametri si individua sul vetrino un oggetto da fornire al sistema come oggetto di riferimento (per luminosità e piano focale) e lo si mette a fuoco, quindi si avvia il sistema alla ricerca a basso ingrandimento. Il sistema analizzerà automaticamente il piano focale dell'area selezionata per la ricerca e poi inizierà la ricerca e l'acquisizione (Figura 4.10) che durerà qualche minuto.



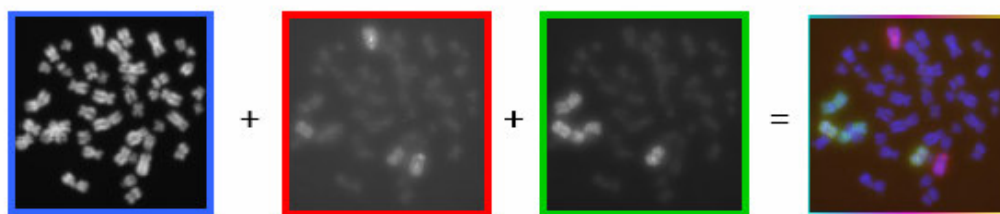
**Fig. 4.10:** Metafer4: finestra di ricerca a basso ingrandimento. Nella zona 1 è visibile l’area del vetrino osservata, nella zona 2 è rappresentata l’area del vetrino selezionata per l’analisi, nella zona 3 è rappresentato il piano focale dell’area da analizzare e nella zona 5 è raffigurata la zona analizzata e le metafasi identificate. Nella zona 4 è riportato il numero di oggetti identificati e un diagramma che rappresenta la “qualità” di tali oggetti rispetto agli standard impostati.

Terminata tale ricerca l’operatore può selezionare, da un’apposita finestra del programma le immagini delle metafasi o PCC che si desidera acquisire ad alto ingrandimento, rigettando quelle non d’interesse in quanto incomplete, poco “aperte”, ossia con cromosomi, cioè, che si sovrappongono gli uni agli altri, o *falsi positivi* cioè immagini e non metafasi acquisite dal sistema per errore.

Una volta selezionate le immagini di metafasi o PCC che si desidera acquisire ad alto ingrandimento si apre il modulo di Metafer 4 per la ricerca ad alto ingrandimento, *MetaCyte*, e dalla finestra di *setup* si impostano i parametri per tale ricerca, tra i quali i set di filtri da utilizzare. Il sistema, quindi, una volta avviato, esegue automaticamente le

acquisizioni nei canali scelti, per ogni oggetto selezionato: è possibile fare acquisire il sistema in rosso, verde e blu a seconda delle sonde utilizzate per ibridizzare il campione.

L'immagine che il software fornisce risulta da una integrazione di immagini successive acquisite nei differenti canali. In precedenza, inoltre, è stato detto che il sistema è fornito di una telecamera b/n per cui la risultante immagine a colori risulta da una conversione operata dal software che appunto, converte le diverse scale di grigio acquisite dalla telecamera in colori (figura 4.11).



**Fig. 4.11:** Acquisizione dell'immagine in vari canali e "conversione" della stessa in colori

L'acquisizione ad alto ingrandimento può durare anche diverse ore a seconda del numero di immagini da acquisire e del numero di filtri con cui acquisirle (mediante il sistema impiega 7 s ad acquisire un'immagine in un canale, nel caso di cellule ibridizzate in FITC e TEXAS RED, quindi, occorrono mediamente 20 s a cellula).

Numerosi sono i vantaggi associati all'utilizzo del R.A.I.C.. Il tempo che normalmente si perde per cercare le metafasi sul vetrino e passare dal basso all'alto ingrandimento per l'analisi è completamente eliminato, in quanto questo lavoro è completamente automatizzato.

L'analisi delle aberrazioni cromosomiche effettuata direttamente al microscopio è complicata e più incline ad errori di quella effettuata sullo schermo di un computer, che ingrandisce l'immagine, può migliorarla (agendo su contrasto, luminosità ecc.) e ne consente una visione comoda, anche di più osservatori in contemporanea. Le sonde fluorescenti inoltre decadono nel tempo, cioè un'intensa e prolungata illuminazione diminuisce la capacità di emissione del campione. Uno studio delle aberrazioni effettuato direttamente al microscopio ecciterebbe le sonde in maniera continuata escludendo la possibilità di analizzare nuovamente il campione anche molto tempo dopo dalla prima analisi, magari per verificare se l'analisi è stata effettuata in maniera corretta.

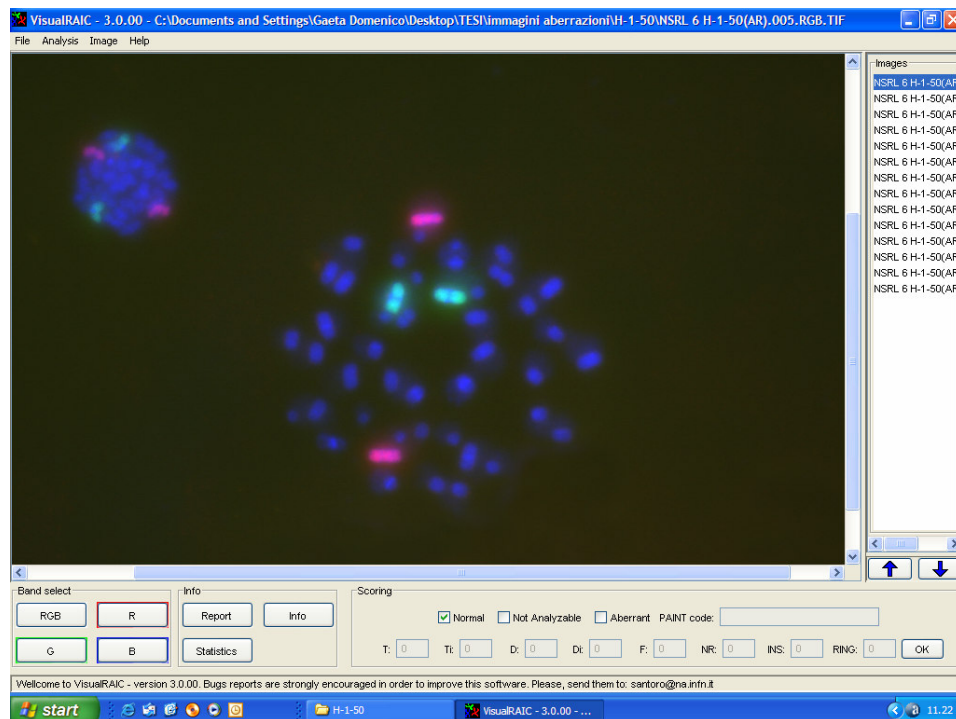


## 4.8 Visual R.A.I.C.

Una volta ottenute le immagini cromosomiche dal R.A.I.C. e salvate su un Cdrom queste sono state facilmente analizzate utilizzando il programma Visual R.A.I.C. sviluppato nel laboratorio di Biofisica.

La caratteristica principale di tale software è quella di fornire, al termine dell'analisi, un report in cui sono contenuti tutti i dettagli dell'analisi come ad esempio il numero di immagini analizzate ed il numero di aberrazioni trovate divise per tipo.

La figura 4.11 mostra la schermata iniziale del programma. Al centro è possibile visualizzare l'immagine da analizzare ed in basso sono presenti i comandi che si possono impartire al programma.

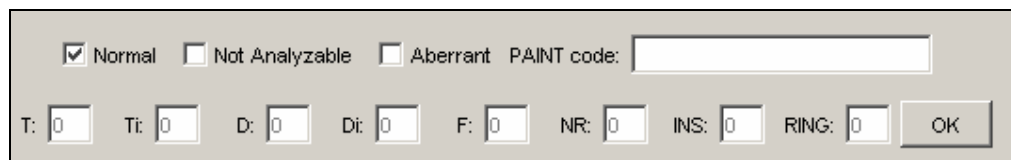


**Fig. 4.11:** Immagine della schermata di lavoro del programma visual R.A.I.C.

Nel paragrafo precedente è stato detto che il sistema R.A.I.C acquisisce l'immagine in tre canali differenti e fornisce poi un'immagine complessiva che risulta dall'integrazione delle singole. Il programma Visual R.A.I.C consente di passare da un canale luminoso all'altro durante l'analisi delle immagini per l'identificazione dei cromosomi coinvolti

nell'aberrazione. Avere l'opportunità di isolare i singoli segnali luminosi risulta particolarmente vantaggioso nell'analisi delle aberrazioni cromosomiche in quanto si possono mettere in evidenza caratteristiche altrimenti non facilmente distinguibili osservando l'immagine a tre colori. Ad esempio, tramite il tasto per la selezione del segnale DAPI si possono osservare tutti i cromosomi e la posizione dei loro centromeri che appaiono brillanti rispetto al resto del genoma. L'identificazione e la corretta localizzazione del centromero, infatti, sono passaggi fondamentali per la classificazione delle aberrazioni.

Quando si è in presenza di metafasi normali semplicemente premendo il comando "OK" il sistema registra la classificazione e passa all'immagine successiva.



**Fig. 4.12:** Finestra dei comandi per la registrazione e la classificazione delle aberrazioni. In figura la metafase è analizzata come normale

In presenza invece di un'aberrazione, premendo il comando "Aberrant", si attiva la barra sottostante che consente di inserire un valore numerico, corrispondente al numero di aberrazioni trovate nella cellula, nell'apposita casella corrispondente ad una specifica classe di aberrazione.

Nel caso in cui l'immagine non sia nitida oppure non sia possibile analizzare la cellula perché ad esempio i cromosomi appaiono parzialmente coperti da altre cellule il sistema permette di non considerare quella cellula nell'analisi mediante il comando "Not Analyzable". Il programma inoltre consente di analizzare anche più metafasi contemporaneamente. Spesso capita che due o più metafasi siano sul vetrino a distanza molto ravvicinata, questo ha come conseguenza che una stessa immagine contenga più di una metafase. In questo caso è possibile analizzare tutte le metafasi presenti nell'immagine come singole e quindi evitare di "perdere" dati. Questo è possibile, una volta analizzata un'immagine, tornare sull'immagine stessa ed analizzare la seconda metafase dal momento che appare una schermata che chiede se aggiungere il dato all'analisi (ADD). Questa funzione è particolarmente utile anche nel caso in cui si sia effettuata una classificazione

errata dal momento che la stessa schermata chiede anche se si vuole che la nuova analisi venga sostituita alla precedente (OVERWRITE).

Dal momento che questo programma è stato creato per l'analisi di metafasi ibridizzate con sonde "whole chromosome", manca, pertanto, di finestre adibite alla classificazione di scambi intracromosomici simmetrici, come le inversioni pericentriche, che tali sonde non rilevano. Per superare questo problema si è deciso di segnalare le inversioni pericentriche nella finestra dei ring e al termine della classificazione di tutte le immagini si è andato a modificare il report fornito dal programma apportando le dovute correzioni.

Dopo aver inserito nella finestra del Visual R.A.I.C. la tipologia dell'aberrazione si procede alla descrizione dell'aberrazione utilizzando un codice alfanumerico. Il codice utilizzato è il codice PAINT di cui si è parlato nel paragrafo 2.5. Seguendo le regole di tale codice si è assegnata la lettera A ai cromosomi colorati in DAPI, la B a quelli colorati in verde e la C a quelli in rosso. Le lettere scritte in maiuscolo o minuscolo indicano la presenza o meno del centromero. Ad esempio un cromosoma dicentrico che coinvolge un cromosoma ibridizzato in verde ed uno qualsiasi dei cromosomi colorati in DAPI sarà scritta nel seguente modo: t(A,B) t(a,b) nel caso in cui si tratti di un dicentrico completo, t(A,B)b nel caso in cui il dicentrico sia incompleto, la lettera b indica il frammento derivante dal cromosoma ibridizzato che è rimasto come frammento acentrico.

Per l'analisi delle nostre metafasi e dei cromosomi ibridizzati con le Arm Specific Probes si è deciso di mettere a punto una nomenclatura particolare per differenziare le aberrazioni che coinvolgono le due braccia del cromosoma ibridizzato, il codice intraPAINT. Le lettere P e Q servono per identificare il braccio p ed il braccio q del cromosoma colorato con la sonda, mentre C è utilizzata per tutti gli altri colorati in DAPI. Un dicentrico completo identificato con le ASP che coinvolge ad esempio il braccio q si descrive: t ( Q,C ) t ( q,c ), un'inversione pericentrica viene classificata con t ( p,Q,P,q) un ring r ( P,Q ) r ( p,q ) e così via.

Una volta terminata l'analisi è possibile esportare dal programma tutti i dati ottenuti durante la classificazione all'interno di un report, che si aggiorna automaticamente ad ogni immagine classificata. All'interno di questo file vi sono informazioni per risalire al numero di immagini osservate e, tra queste, la frazione di normali, di aberrate e di non analizzabili. Vi è inoltre registrato il tipo e la quantità di aberrazioni ritrovate e la sigla delle immagini alle quali appartengono.

Di seguito sono riportati due esempi di report ottenuti alla fine di un'analisi.

FIELD NAME	ABERRATION	CLASSIFICATION
Fe 100.120 534	Q,t(P,c)t(p,C)	T1
Fe 100.120 573	Q,t(P,c)t(p,C)	T1
Statistical Report		
Number of analysed images: 150		
Number of analysed metaphases: 130		
Normal metaphases: 128		
Not analysable metaphases: 20		
Aberrant metaphases: 2		
=====		
Aberrations details:		
- T: 2		
- Ti: 0		
- D: 0		
- Di: 0		
- F: 0		
- NR: 0		
- RING: 0		
- INS: 0		
- INTRA COMPL: 0		
- INV: 0		
- INTER + INTRA: 0		

**Fig. 4.13:** Esempio di report esportato dopo un'analisi di aberrazioni cromosomiche con ASP

FIELD NAME	ABERRATION	CLASSIFICATION
NSRL6- B H-A1-50 (AR).002.RGB.TIF	b	F1
NSRL6- B H-A1-50 (AR).005.RGB.TIF	b	F1
NSRL6- B H-A1-50 (AR).054.RGB.TIF	b	F1
NSRL6- B H-A1-50 (AR).059.RGB.TIF	b	F1
NSRL6- B H-A1-50 (AR).082.RGB.TIF	b	F1
NSRL6- B H-A1-50 (AR).1006.RGB.TIF	b	F1
NSRL6- B H-A1-50 (AR).1012.RGB.TIF	b, t(A,C)	Di1F1
NSRL6- B H-A1-50 (AR).1016.RGB.TIF	c	F1
Statistical Report		
Number of analysed images: 1279		
Number of analysed metaphases: 1290		
Normal metaphases: 1060		
Not analysable metaphases: 160		
Aberrant metaphases: 70		
=====		
Aberrations details:		
- T: 7		
- Ti: 13		
- D: 3		
- Di: 15		
- F: 35		
- NR: 2		
- RING: 2		
- INS: 1		

**Fig. 4.14:** Esempio di report esportato dopo un'analisi di aberrazioni cromosomiche con sonde "whole chromosome"

## Capitolo 5

### *Analisi e discussione dei risultati*

#### 5.1.1 Analisi dei campioni: protoni

I primi dati relativi all'esposizione dei campioni biologici ad un fascio di protoni (Giugno 2005) da 1 GeV (LET = 0.22 keV/ $\mu$ m) sono consistiti nell'analisi delle aberrazioni cromosomiche dei campioni esposti alle dosi di 50, 100, 200 e 300 cGy.

In questo esperimento sono state usate sonde a cromosoma intero per i cromosomi 1 e 2 e nella tabella 1 sono riportati i risultati dell'analisi delle aberrazioni cromosomiche.

<i>Campione</i>	<i>Dose (cGy)</i>	<i>Cellule analizzate</i>	<i>Cellule aberrate</i>	<i>Scambi semplici</i>	<i>Scambi complessi</i>	<i>Scambi totali</i>	<i>Frammenti</i>
<i>Senza schermo</i>	0	3258	12	7	0	7	5
	50	651	37	21	3	24	20
	100	452	38	16	11	27	15
	200	272	58	41	4	45	22
	300	198	66	53	13	66	21
<i>Schermo Al</i>	50	446	25	10	2	12	13
	100	527	51	32	6	38	19
	200	204	52	34	6	40	21
	300	336	108	71	16	87	48
<i>Schermo PMMA</i>	50	462	46	16	3	19	31
	100	266	31	19	0	19	16
	200	374	77	44	9	53	38
	300	200	67	53	10	63	20

**Tabella 1:** Dati per il primo esperimento con protoni. Sono riportate le dosi utilizzate, espresse in cGy, e lo schermo interposto tra il fascio ed il campione laddove era presente.

Come detto nel capitolo 4 durante la descrizione degli esperimenti effettuati, il successivo esperimento (Giugno 2006), alla luce dei risultati ottenuti, è consistito nell'esposizione di nuovi campioni nelle medesime condizioni sperimentali a dosi differenti.

Per questo secondo irraggiamento i campioni senza schermo sono stati esposti alle seguenti dosi: 75, 150, 250 e 350 cGy, allo scopo di avere più punti sperimentali per la costruzione della curva dose risposta, mentre quelli con schermo di alluminio sono stati esposti alle stesse dosi dell'esperimento precedente, allo scopo di verificare i risultati ottenuti in precedenza, ed a nuove dosi per la stessa ragione vista per l'esperimento senza schermo.

Ovviamente l'analisi dei campioni è stata effettuata utilizzando la stessa tecnica citogenetica, le stesse sonde e gli stessi criteri di classificazione.

In tabella 2 sono mostrati i risultati dell'analisi delle aberrazioni cromosomiche effettuate.

<i>Campione</i>	<i>Dose (cGy)</i>	<i>Cellule analizzate</i>	<i>Cellule aberrate</i>	<i>Scambi semplici</i>	<i>Scambi complessi</i>	<i>Scambi totali</i>	<i>Frammenti</i>
<i>Senza schermo</i>	0	3258	12	7	0	7	5
	75	1293	134	64	9	73	77
	150	656	119	85	18	103	39
	250	553	187	134	50	184	48
	350	517	274	226	52	278	80
<i>Schermo Al</i>	50	1130	70	38	3	41	35
	75	908	92	43	13	56	46
	100	703	59	35	6	41	27
	150	802	134	96	21	117	37
	200	788	167	116	36	152	56
	250	488	141	115	22	137	48
	300	690	258	232	37	269	62

**Tabella 2:** Dati per il secondo esperimento con protoni. Sono riportate le dosi utilizzate, espresse in cGy, e lo schermo interposto tra il fascio ed il campione.

Per ogni campione sono state analizzate solamente quelle metafasi che presentavano un cariotipo completo ed escludendo dunque dall'analisi tutte quelle metafasi che presentavano caratteristiche quali: cattiva qualità delle immagini, ibridizzazione incompleta (una delle due sonde non si era legata), immagini sfocate e segnale di ibridizzazione debole.

La frequenza  $f_x$  di ciascun tipo di aberrazione  $x$  è stata calcolata come:

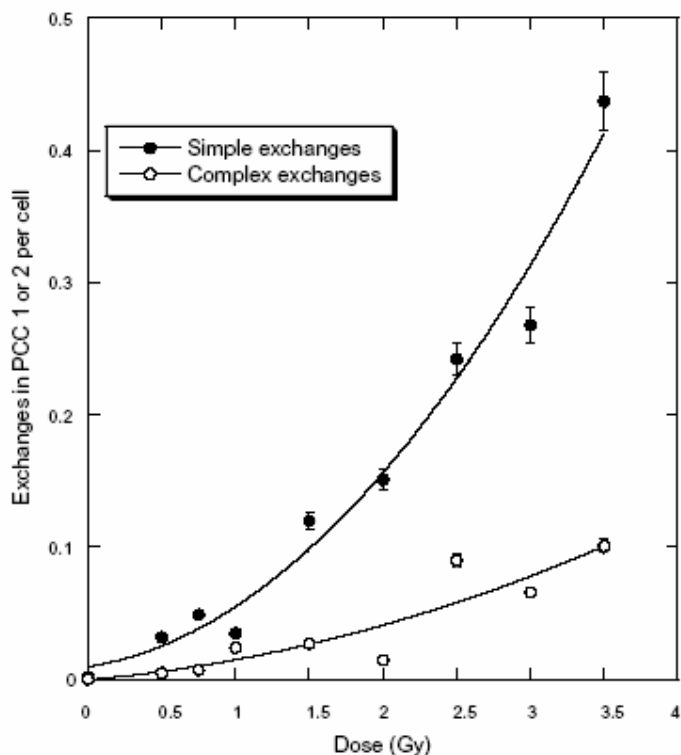
$$f_x = \frac{n_x}{N}$$

dove  $n_x$  è il numero di aberrazioni di classe  $x$  osservate ed  $N$  il numero di cellule analizzate.

Il conteggio del numero di eventi segue la statistica di Poisson, per cui alla stima della frequenza è stato associato l'errore statistico calcolato in base a questa distribuzione. Nella statistica di Poisson la varianza coincide con il valore medio e l'errore standard  $\sigma$  (o deviazione standard della media) sul valore della frequenza  $f = n / N$  è calcolato come:

$$\sigma = \frac{\sqrt{n}}{N}$$

La figura 5.1 mostra le curve dose risposta per gli scambi semplici e gli scambi complessi ottenute dall'analisi ottenuta dal fascio puro, ossia senza schermo, di protoni da 1 GeV. In questa figura, abbiamo combinato i dati del primo e del secondo esperimento, non essendo state osservate differenze statisticamente significative nei due casi.

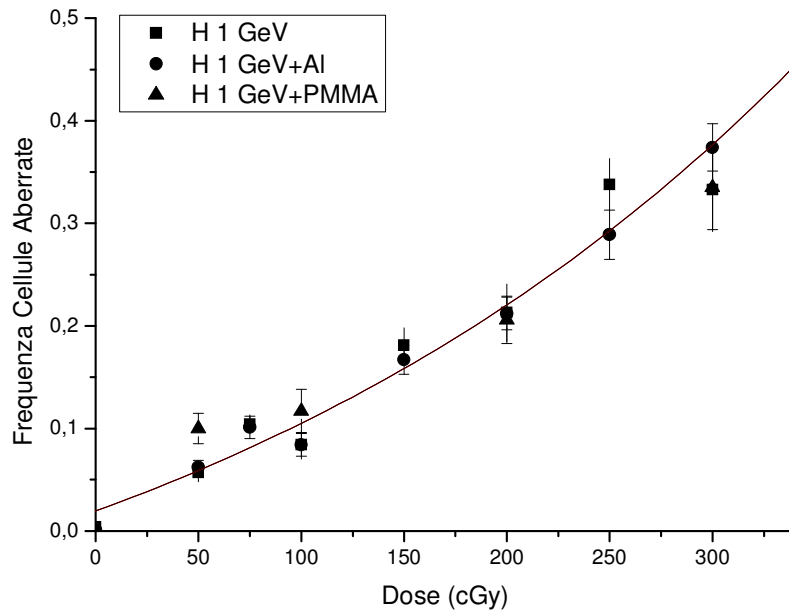


**Fig. 5.1:** Scambi semplici e scambi complessi misurati in linfociti esposti ad un fascio di protoni da 1 GeV. Le barre di errore indicano l'errore standard (Mancusi *et al.*, 2007).

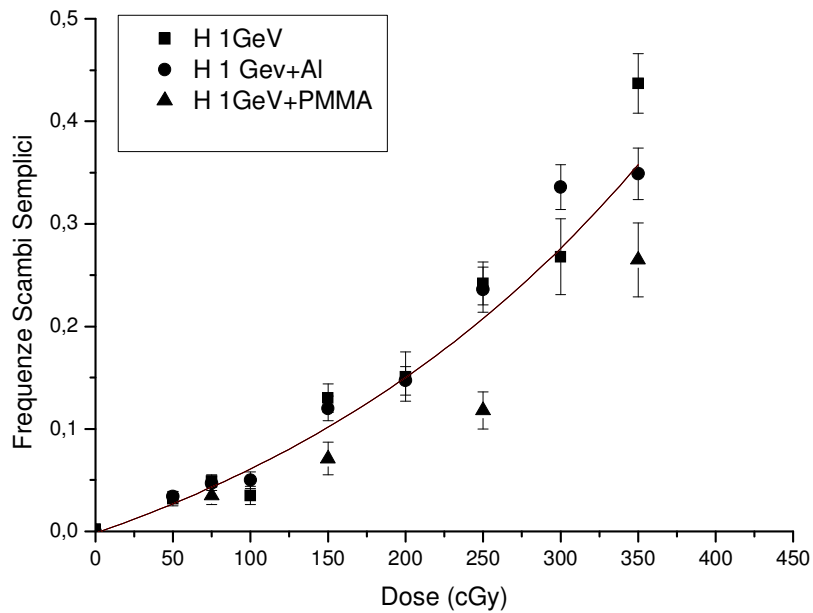
Gli scambi semplici, che includono traslocazioni e dicentrici, sono risultati essere gli scambi più frequenti.

Di seguito sono riportate le curve dose-risposta per le varie classi di aberrazioni considerate sia per il fascio non schermato che per quello schermato con alluminio e PMMA (figure 5.2; 5.3; 5.4). Anche in tali curve sono riportati complessivamente tutti dati, cioè, sia quelli ottenuti dall'analisi dei campioni del primo esperimento che quelli ottenuti dal secondo esperimento. Infatti, anche per gli esperimenti con lo schermo, non si sono osservate differenze statisticamente significative fra i dati ottenuti nel 2005 e quelli del 2006 (vedi Tabella 1 e 2).

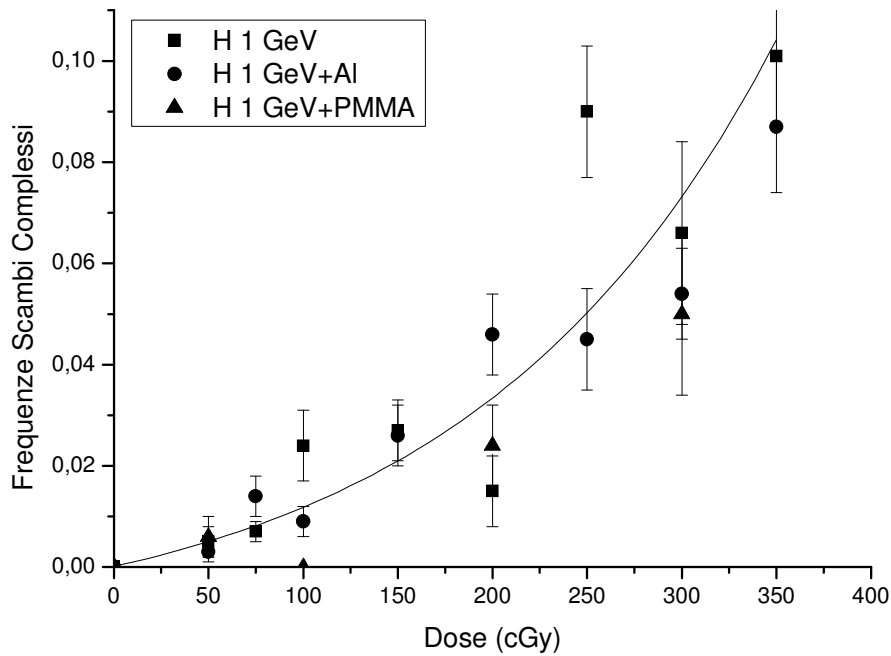




**Fig. 5.1:** Frequenza di cellule aberrate in funzione della dose per i campioni analizzati senza schermo, con schermo di alluminio e schermo di PMMA.

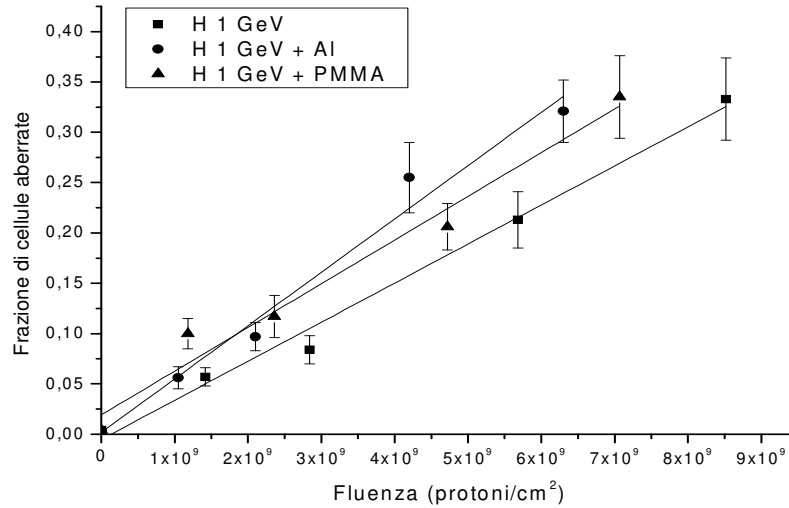


**Fig. 5.2:** Frequenza di scambi semplici in funzione della dose per i campioni analizzati senza schermo, con schermo di alluminio e schermo di PMMA.



**Fig. 5.3:** Frequenza di scambi complessi in funzione della dose per i campioni analizzati senza schermo, con schermo di alluminio e schermo di PMMA.

Le linee rappresentano dei fit ai dati sperimentali con una funzione lineare-quadratica. I fit separati dei diversi gruppi di dati (senza schermo, con schermo in Al o PMMA) non forniscono un  $\chi^2$  migliore del fit complessivo. Utilizzando il test F di Fisher, abbiamo quindi dedotto che non vi è differenza significativa fra i diversi insiemi di dati con un livello di confidenza del 95%. Pertanto, a parità di dose assorbita dal campione non si osservano differenze significative nelle frequenze di aberrazioni cromosomiche tra i campioni irraggiati senza schermo e con schermo. I risultati biologici ottenuti sono stati poi utilizzati anche per costruire delle curve fluenza-risposta. Ricordiamo che, come detto nel paragrafo 1.5, la fluenza viene definita come il numero di particelle per unità di area. La figura 5.4 mostra la frazione di cellule aberrate in funzione della fluenza di protoni incidenti sullo schermo (che può essere 0 o 20 g/cm<sup>2</sup> di Al e PMMA).



**Fig. 5.4:** Frazione di cellule aberrate in funzione della dose per i campioni analizzati senza schermo, con schermo di alluminio e schermo di PMMA.

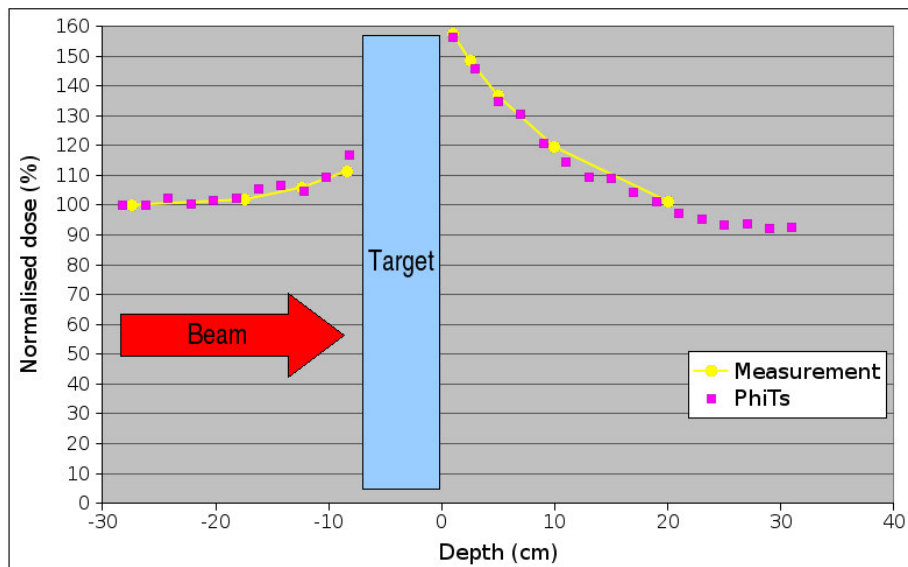
Contrariamente ai dati in funzione della dose, i dati in funzione della fluenza mostrano che gli schermi aumentano in modo significativo l'efficacia biologica per protone incidente e tale incremento è maggiore per lo schermo di alluminio (Bertucci *et al.*, 2007 a; Mancusi *et al.*, 2007).

La differenza fra la figura 5.1 e 5.4 è legata al fatto che la dose (dopo lo schermo, cioè nella posizione del campione) per protone incidente (sullo schermo) è modificata dal bersaglio e, in particolare, risulta aumentata in presenza dello schermo. Le misure di dosimetria effettuate durante l'esposizione dei campioni biologici hanno infatti mostrato un aumento di dose prima dello schermo ed immediatamente dietro di esso ed una diminuzione della dose allontanandosi dallo schermo (Figure 5.5 e 5.6). Più precisamente è stato osservato un aumento del 25% e del 40% per i blocchi di 20g/cm<sup>2</sup> di PMMA e di Al rispettivamente. I dati di Figura 5.1 ottenuti suggeriscono però che l'aumento di dose osservato dopo lo schermo non aumenta l'efficacia biologica del fascio primario nell'induzione del danno.

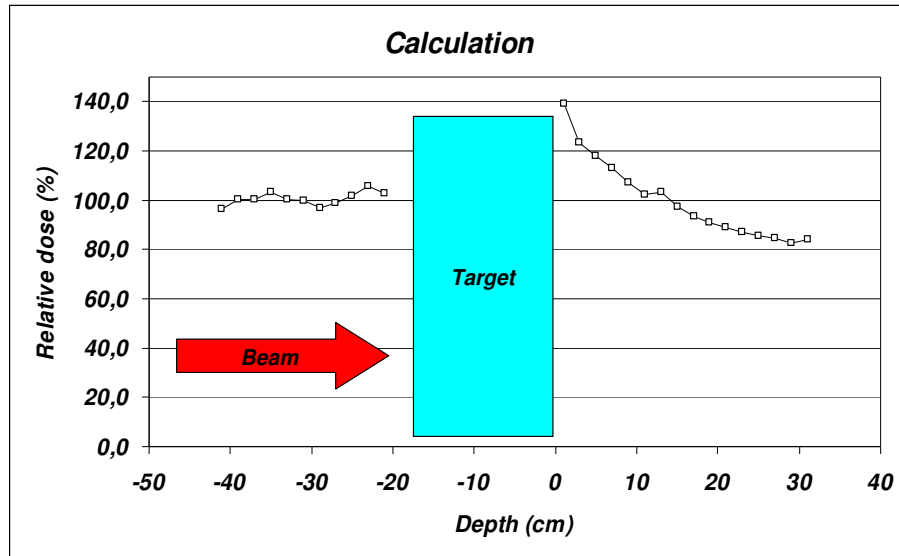
Il fenomeno rilevato in questo esperimento, cioè l'aumento di dose prima e dopo lo schermo, è stato analizzato utilizzando il codice di trasporto **PHITS** (Particle and Heavy Ion Transport Code System; Sato *et al.*, 2005). Grazie alla collaborazione con il Dipartimento di Chimica Nucleare della Chalmers University of Technology (Svezia), la

simulazione con il codice PHITS ha riprodotto molto bene i dati sperimentali sulla dose (figure 5.5 e 5.6). Tale aumento è dovuto alla produzione di particelle secondarie in seguito all'interazione del fascio con lo schermo che genera frammenti del bersaglio per interazione nucleare.

L'aumento di dose potrebbe essere dovuto a diverse particelle secondarie prodotte dall'interazione nucleare, per esempio i neutroni del bersaglio. Se fosse così, però, ci si aspetterebbe un aumento dell'efficacia biologica, perché i neutroni hanno un elevato RBE. Tuttavia, i dati in figure 5.1-5.3 non indicano nessun aumento significativo dell'RBE del fascio. La simulazione ha mostrato infatti che i protoni secondari contribuiscono all'incremento di dose misurato per circa il 92% mentre solo meno del 10% è attribuibile a muoni, pioni e neutroni. Si può dunque affermare che l'aumento di dose sia dovuto quasi interamente ai protoni secondari prodotti nel bersaglio.

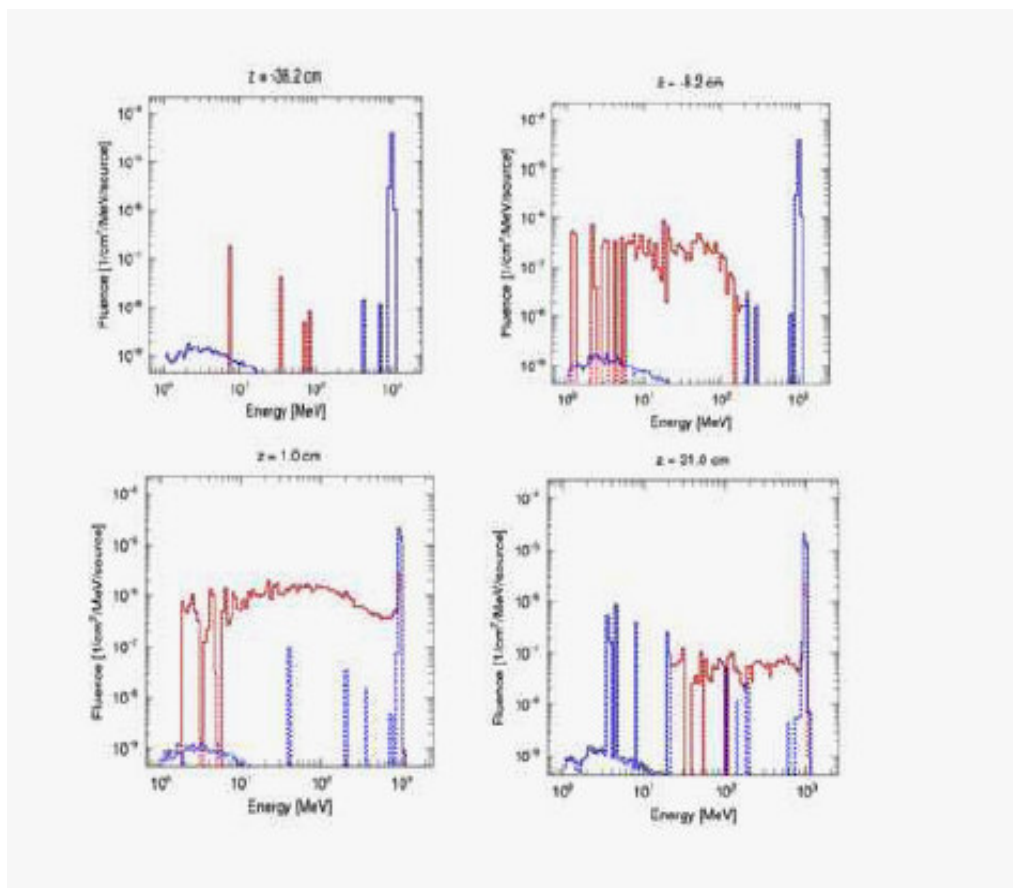


**Fig. 5.5:** Valori delle dosi misurate durante l'irraggiamento (giallo) o calcolate (rosso) in funzione della profondità di un fascio di protoni da 1GeV in presenza di uno schermo di alluminio di densità pari a 20g/cm<sup>2</sup>



**Fig. 5.6:** Valori delle dosi calcolate in funzione della profondità di un fascio di protoni da 1GeV in presenza di uno schermo di PMMA di densità pari a 20g/cm<sup>2</sup>

I protoni secondari vengono emessi con due processi: urto con il protone primario (protoni di knock-out) o emissione dovuto al decadimento del nucleo residuo eccitato (protoni di evaporazione). I protoni di *knock-out* hanno quasi la stessa velocità di quelli incidenti, sono emessi principalmente in avanti (cioè dopo lo schermo nella stessa direzione del fascio primario) provocando l'aumento di dose oltre lo schermo. I protoni di *evaporazione* hanno energia più bassa, sono emessi isotropicamente e contribuiscono all'incremento di dose osservato avanti allo schermo. La divergenza del fascio e dei secondari ed il frenamento dei protoni lenti provocano la diminuzione della dose allontanandosi dallo schermo lungo l'asse centrale del fascio z. La simulazione inoltre dimostra che lo schermo di alluminio produce più protoni secondari di quanto faccia lo schermo di PMMA (Mancusi *et al.*, 2007), coerentemente con il fatto che l'alluminio ha numero atomico maggiore della plastica, e produce quindi più protoni secondari. Gli spettri in energia simulati da PHITS sono mostrati in Figura 5.7 a diverse distanze lungo il fascio.



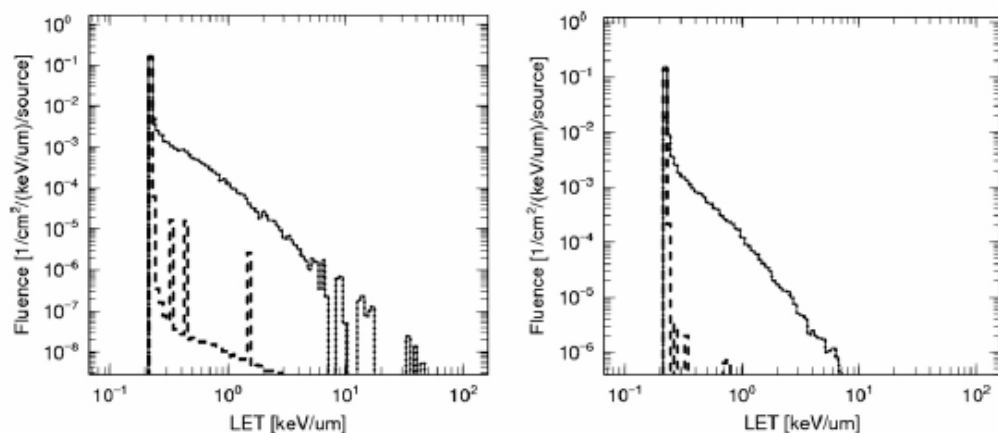
**Fig. 5.7:** Spettro dell'energia dei protoni simulato da PHITS differenti distanze dal bersaglio (schermo). La linea blu si riferisce ai protoni primari, cioè quelli del fascio incidente, la linea rossa ai protoni secondari

La figura 5.7 mostra che ad una distanza dal bersaglio pari a 30 cm, si osserva che quasi tutti i protoni sono primari (curve blu) da 1 GeV. Questo si spiega col fatto che i protoni secondari, in questa posizione, sono i protoni di evaporazione i quali non posseggono un'energia tale da raggiungere una distanza così elevata dal bersaglio. Infatti, osservando il pannello successivo della stessa figura, si può vedere come avvicinandosi al bersaglio ( $z = -8$  cm) il contributo energetico dei protoni secondari (curve rosse) diventa molto più consistente.

La medesima figura, nella parte inferiore, mostra che l'energia corrispondente ai protoni secondari dopo lo schermo è più vicina a quella dei protoni del fascio primario. La spiegazione si origina dalla differente genesi di questi protoni, che come è stato detto all'inizio del paragrafo sono protoni di *knock-out*. Pertanto, oltre lo schermo si osservano protoni con energia fra 100 e 1000 MeV che sono tutti di knock-out. Allontanandosi molto

dal bersaglio ( $z=+21$  cm), i protoni lenti si perdono ed anche quelli di knock-out ed i primari diminuiscono, a causa della divergenza geometrica del fascio che viene aumentata dall'interazione elastica nel bersaglio.

Il valore del LET dei protoni secondari è prossimo a quello dei protoni primari per cui si spiega perché i risultati biologici ottenuti mostrano che il campo di radiazione dopo lo schermo non sia più efficace del fascio primario a parità di dose. Lo spettro in LET simulato da PHITS dopo gli schermi in Al e PMMA è mostrato in figura 5.8.



**Fig.5.8:** Spettro in LET, simulato da PHITS, dopo lo schermo di alluminio (sinistra) e PMMA (destra). La linea tratteggiata si riferisce ai protoni primari, la linea punteggiata ai protoni secondari.

Questi grafici che riportano la fluenza in funzione del LET, mostrano che i valori del LET calcolato nella stessa posizione in cui è stato esposto il campione biologico, sono inferiori ad  $1 \text{ keV}/\mu\text{m}$  e questo è molto più evidente per lo schermo di PMMA che per quello di alluminio. Pertanto, la presenza di protoni secondari allarga lo spettro in LET rispetto al fascio primario, ma non abbastanza da portarlo a valori di LET oltre i quali si può osservare un significativo aumento del RBE (generalmente, ciò avviene solo per valori del  $\text{LET} > 10 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ).

I risultati della simulazione dunque, permettono di spiegare e comprendere i risultati biologici, alla luce dei quali si può affermare che per protoni relativistici, così come è stato in precedenza dimostrato anche per ioni pesanti, materiali leggeri come il PMMA sono da preferirsi a materiali di alto Z per la radioprotezione degli astronauti, a causa del fatto che materiali leggeri producono meno radiazione secondaria.

### 5.1.2 Analisi dei campioni: protoni alto- basso-rateo di dose

Come detto nel capitolo 4, la continuazione dell'esperimento con i protoni ha riguardato una esposizione di sangue intero umano a differenti dosi di protoni da 1 GeV con due differenti ratei di dose. In tabella 3 sono riassunte le dosi e sono mostrati i risultati dell'analisi delle aberrazioni cromosomiche.

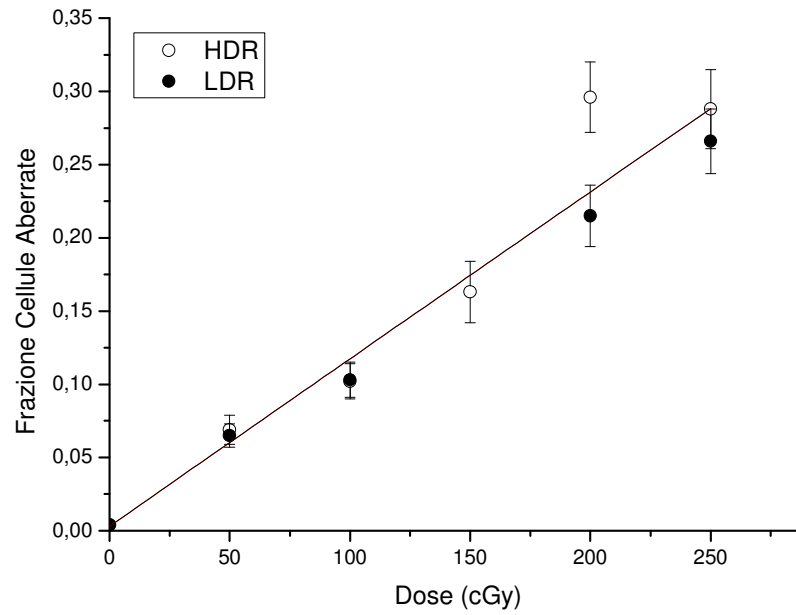
<i>Campione</i>	<i>Dose (cGy)</i>	<i>Cellule analizzate</i>	<i>Cellule aberrate</i>	<i>Scambi semplici</i>	<i>Scambi complessi</i>	<i>Scambi totali</i>	<i>Frammenti</i>
<i>HDR</i>	0	3258	12	7	0	7	5
	50	670	46	16	3	19	33
	100	677	69	41	1	42	40
	150	356	58	28	4	32	32
	200	497	147	96	29	125	58
	250	406	117	102	18	120	36
<i>LDR</i>	0	3258	12	7	0	7	5
	50	1048	68	28	3	31	47
	100	757	78	45	11	56	48
	200	484	104	61	19	80	42
	250	534	142	104	24	128	46

**Tabella 3:** Risultati dell'analisi delle aberrazioni cromosomiche effettuata e dosi utilizzate.

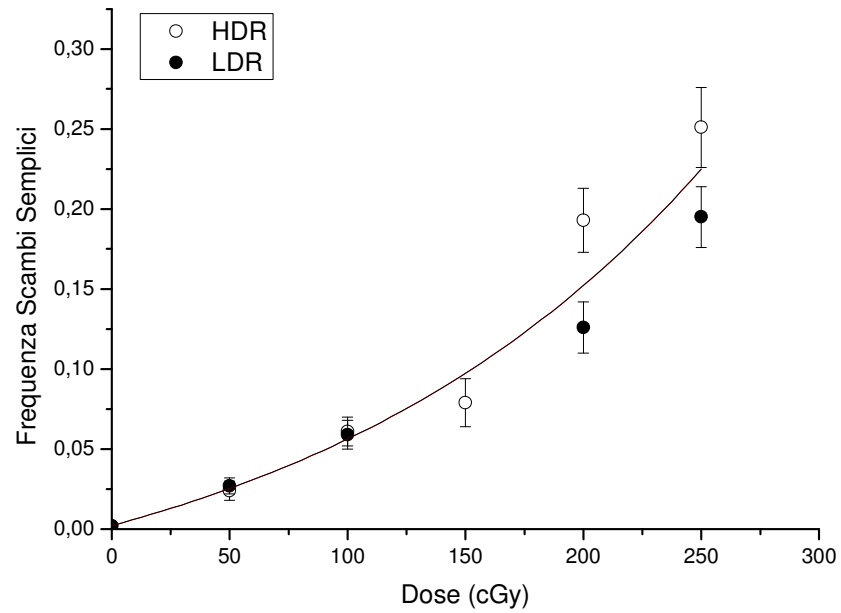
Ricordiamo che nell'esposizione acuta dei campioni il rateo di dose è stato pari a ~ 100 cGy/min, mentre nell'esposizione cronica il rateo di dose è stato pari a 0.8 cGy/min. Inoltre le condizioni sperimentali sono state esattamente le stesse, questo equivale a dire che durante l'esposizione cronica, durata in tutto ~ 6 ore i campioni precedentemente esposti ad alto rateo di dose sono stati tenuti in incubatore.

Di seguito sono riportate le curve dose risposta ottenute dall'analisi dei campioni per questo esperimento, in particolare nelle figure 5.9, 5.10 e 5.11 sono mostrate le curve per le frequenze di cellule aberrate, scambi semplici e scambi complessi.

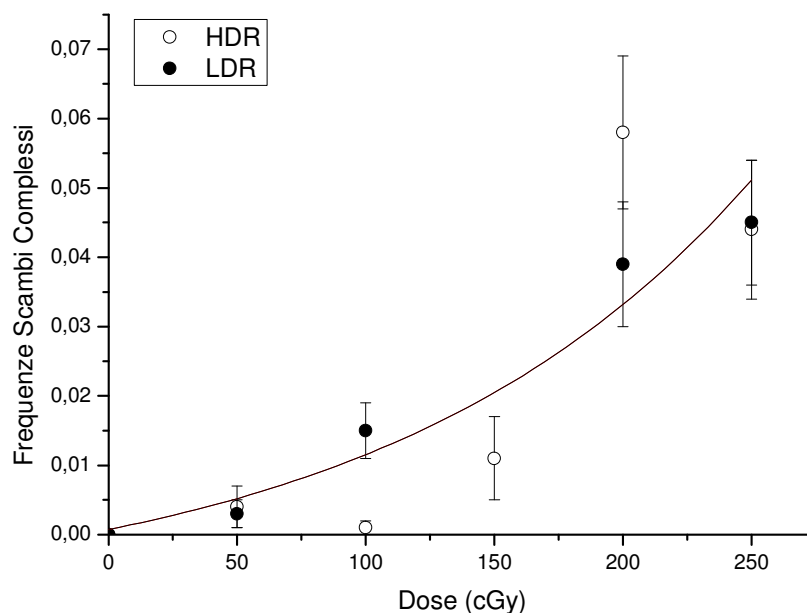




**Fig. 5.9:** Frazione di cellule aberrante in funzione della dose per i campioni analizzati, esposti a protoni da 1 GeV in condizioni di dose acuta e cronica.



**Fig. 5.10:** Frequenze di scambi semplici in funzione della dose per i campioni analizzati, esposti a protoni da 1 GeV in condizioni di dose acuta e cronica.



**Fig. 5.11:** Frequenze di scambi complessi in funzione della dose per i campioni analizzati, esposti a protoni da 1 GeV in condizioni di dose acuta e cronica.

Questi risultati preliminari mostrano che non vi sono significative differenze nell'induzione di aberrazioni cromosomiche dopo esposizione di protoni da 1 GeV ad alto e basso rateo di dose nelle condizioni sperimentali qui utilizzate (Bertucci *et al.*, 2007 b).

In letteratura non sono noti lavori di questo tipo per cui non è possibile effettuare un'analisi comparativa.

Dati precedenti sono stati ottenuti esponendo campioni di sangue umano ad un fascio di protoni da 250 MeV. Oltre la differente energia del fascio, rispetto al nostro esperimento, in questo sono stati usati anche differenti ratei di dose:  $\sim 0.1$  cGy/min,  $\sim 0.5$  cGy/min e  $\sim 1$  cGy/min. I risultati hanno mostrato anche in questo caso risultati non molto differenti tra loro (George *et al.*, 2002). La figura 5.12 mostra le curve dose risposta per gli scambi totali ottenuti da George *et al.* per differenti ratei di dose.

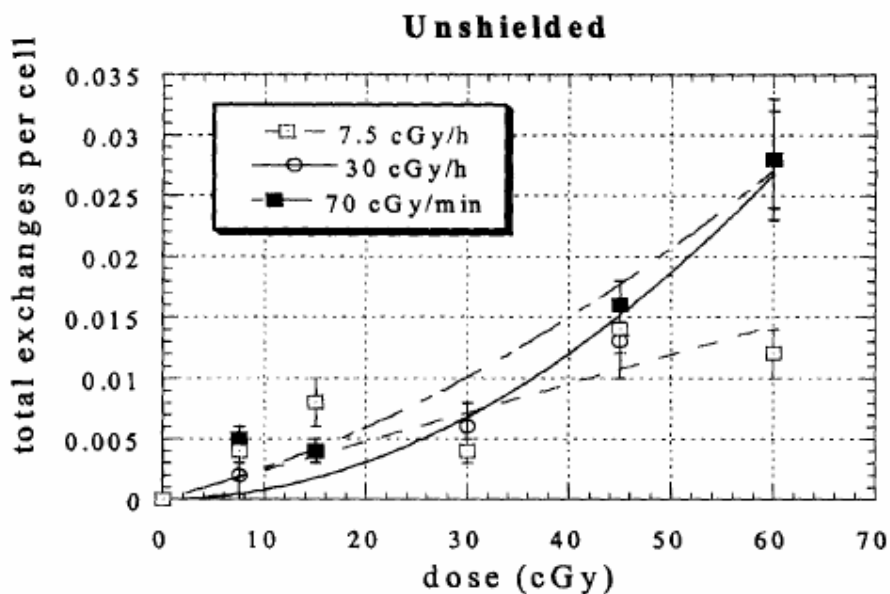


Fig. 5.12: Scambi totali misurati nei cromosomi 1, 2 e 5 in linfociti umani dopo esposizione ad un fascio di protoni da 250 MeV a differenti ratei di dose (George *et al.*, 2002)

## 5.2 Analisi dei campioni: ioni Fe e raggi X

In questo esperimento, dal momento che come detto nel paragrafo 4.5 sono state usate sonde ASP che colorano selettivamente i due bracci cromosomici, è stato necessario stabilire dei criteri per l'analisi delle aberrazioni cromosomiche.

Gli interscambi visualizzati con le ASP possono essere di due tipologie: quelli che coinvolgono uno dei cromosomi ibridizzati ed uno qualunque dei cromosomi in DAPI, oppure quelli in cui entrambi i partner dell'interscambio sono i cromosomi colorati con le sonde, caso meno frequente del precedente, dato che vi sono 44 cromosomi colorati in DAPI e solo due ibridizzati dalle sonde. Quando è stata riscontrata un'aberrazione di questo tipo i criteri classificativi imponevano che venisse registrata come due eventi distinti, dato che ai fini dell'analisi statistica questa aberrazione è generata da danni subiti separatamente dai due cromosomi, che hanno poi interagito. Le immagini che si osservano in questi casi potranno essere diverse a seconda delle braccia coinvolte nello scambio.

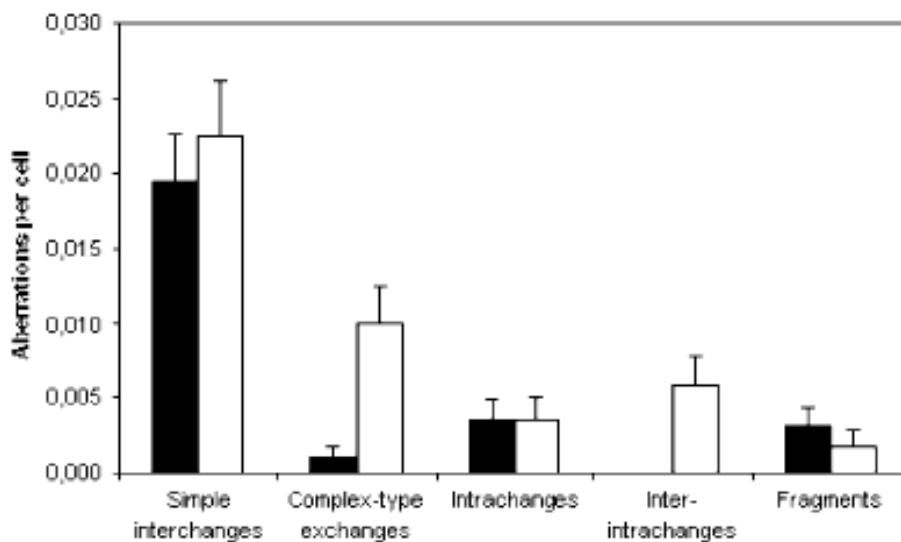
In tabella 4 sono riportati i risultati dell'analisi delle aberrazioni, precisiamo che nella classe degli interscambi semplici sono incluse traslocazioni e dicentrici, la classe degli interscambi complessi include le inserzioni, nella categoria di intrascambi puri sono

stati considerati i ring e le inversioni pericentriche, appartenenti agli intrascambi semplici, e gli intrascambi complessi. La classe degli INTER+INTRA comprende tutte quelle aberrazioni formate da tre o più rotture, che riguardano due o più cromosomi, ma un carattere distintivo è che almeno due di queste rotture siano avvenute sul cromosoma ibridizzato, ciascuna su un braccio distinto, e che almeno 2 delle 4 estremità libere dello stesso cromosoma si siano ricongiunte tra loro.

<i>Campione</i>	<i>Dose (cGy)</i>	<i>Cellule analizzate</i>	<i>Cellule Aberrate</i>	<i>Interscambi Semplici</i>	<i>Interscambi Complessi</i>	<i>Intrascambi</i>	<i>Inserzioni</i>	<i>Inter+Intra</i>	<i>Frammenti</i>
<i>Fe</i>	1	1953	50	38	1	7	1	0	6
<i>Raggi X</i>	1	1690	72	38	15	6	2	10	3

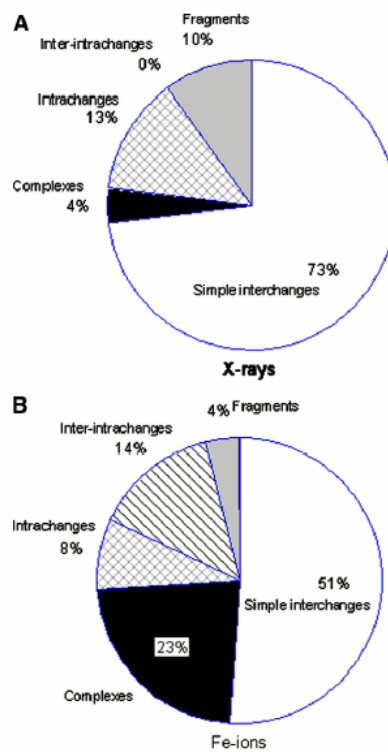
**Tabella 4:** Risultati dell'analisi delle aberrazioni

La figura 5.13, mostra lo spettro totale di aberrazioni analizzate, dalla quali si evince subito la grande differenza che sussiste nella frequenza di scambi complessi tra campioni esposti a radiazione densamente o sparsamente ionizzante.



**Fig. 5.13:** Confronto tra le aberrazioni osservate nei campioni esposti a raggi X (barra nera) e a ioni Fe (barra bianca) è indicato l'errore standard (Manti *et al.*, 2007).

In fig. 5.14 sono mostrate le frequenze percentuali delle varie tipologie di aberrazioni riscontrate nei due campioni esposti al ferro e ai raggi X rispettivamente, calcolate sul totale di aberrazioni osservate.



**Fig. 5.14:** Frequenze percentuali dei differenti tipi di aberrazioni trovate nel cromosoma 1 nella progenie di cellule esposte ad 1Gy di raggi X (A) e ioni Fe (B) (Manti *et al.*, 2007)

In entrambi i casi la categoria più rappresentata è costituita dagli scambi semplici, seguita dagli intrascambi nei campioni esposti a raggi X e dagli scambi complessi in quelli esposti a ioni ferro. Questi dati, inoltre, sono in accordo con i risultati di un lavoro effettuato in condizioni sperimentali simili, in cui i campioni esposti ad 1 Gy di raggi  $\gamma$  e ioni ferro da 1 GeV/nucleone, raccolti a 144 h dall'irraggiamento, sono stati analizzati mediante RxFISH (Durante *et al.*, 2006).

Il fattore F è stato definito come rapporto tra interscambi inter-braccia e intrascambi intra-braccia, ovvero esprimibile sia dal rapporto dicentrici/ring che dal rapporto

traslocazioni/inversioni pericentriche. Molti dei dati utilizzati in letteratura per il calcolo del valore F hanno fatto uso del rapporto tra le aberrazioni instabili (Schwartz and Hsie, 1997) e questo è stato fonte di critica da parte di chi confuta l'uso di questo parametro come indice della qualità della radiazione (Bauchinger and Schimdt, 1997).

Se l'indice è utilizzato al fine di risalire alla qualità di radiazione assorbita da un soggetto, deve necessariamente rimanere inalterato nel tempo, cioè il tasso di diminuzione delle aberrazioni che lo caratterizzano deve essere lo stesso. L'uso del rapporto dicentrici : ring non assicura questo aspetto, anzi vi sono alcuni risultati sperimentali che indicano una diversa trasmissione alla progenie di questi due tipi di aberrazioni instabili (Krishnaja and Sharma, 2004) favorendo la presenza di ring all'interno del campione. Il valore F dovrebbe dunque diminuire all'aumentare del tempo trascorso dall'esposizione.

Per tutte queste ragioni è stato ritenuto opportuno ricavare il valore F dalle aberrazioni stabili, ovvero traslocazioni reciproche ed inversioni pericentriche.

Il valore F calcolato, dunque, è risultato essere pari a 7 sia per radiazioni di alto LET che per radiazioni di basso LET (figura 5.15).

	Traslocazioni	Inversioni	F value
Raggi X	35	5	7
Ferro	28	4	7

**Fig. 5.15:** Valore F calcolato per i campioni esposti a basso ed alto LET.

Questi risultati dimostrano che l'RBE degli ioni pesanti per l'induzione di aberrazioni cromosomiche nella progenie delle cellule irraggiate è più basso di quello relativo alle cellule esposte. Le aberrazioni più frequenti, gli interscambi semplici (principalmente traslocazioni), non mostrano differenze statisticamente significative fra i due campioni. Ciò nonostante, la frequenza di aberrazioni a parità di dose è ancora più alta per le cellule progenitrici di linfociti esposti a ferro (4.4%) rispetto ai raggi X (2.7%). Tale aumento è dovuto alla presenza di scambi di tipo complesso, che possono essere o interscambi complessi "puri" o eventi misti, in cui il cromosoma 1 risulta coinvolto in scambi sia inter sia intracromosomici (eventi denominati INTER+INTRA).

In conclusione i risultati di questo esperimento suggeriscono quindi che gli scambi di tipo complesso, sia intercromosomici che intracromosomici, rappresentino un biomarcatore della esposizione a ioni pesanti. Poiché l'RBE degli ioni pesanti è molto

minore nella progenie rispetto alle cellule direttamente irraggiate, la maggiore efficacia nell'induzione di effetti tardivi dovrebbe essere legata alla qualità, più che alla quantità, del danno radioindotto, e quindi alla sua complessità. Resta naturalmente da determinare se interscambi complessi o eventi INTER + INTRA scambi cromosomici possano aumentare la probabilità di trasformazione cellulare (Manti *et al.*, 2007).

### **5.3 Analisi dei campioni: biodosimetria in astronauti**

L'analisi delle aberrazioni cromosomiche nell'astronauta italiano Roberto Vittori sono state condotte in seguito alla sua seconda missione breve sulla ISS nell'aprile 2005, (missione ENEIDE).

In questo lavoro di tesi sono stati analizzati i campioni prelevati all'astronauta prima ed immediatamente dopo la missione ENEIDE ed un campione prelevato a sei mesi dal termine della precedente missione Marco Polo.

Alcuni dei campioni sono stati esposti a raggi X, per i campioni di controllo l'analisi è stata effettuata sia su metafasi che su PCC. La tabella 5 mostra i dettagli dell'analisi effettuata e le dosi utilizzate.

Sample	Dose (Gy)	Cells Analyzed	Aberrant Cells		Total exchanges	
			Number	Frequency (%)	Number	Frequency
Follow-up						
Marco Polo metaphases	0	1152	13	0,011±0,003	3	0,003±0,002
Follow-up						
Marco Polo PCC	0	1945	62	0,032±0,004	14	0,007±0,002
Follow-up						
Marco Polo PCC	1	961	98	0,102±0,010	45	0,047±0,007
Follow-up						
Marco Polo PCC	3	669	274	0,410±0,025	256	0,383±0,024
Follow-up						
Marco Polo PCC	5	768	562	0,732±0,031	714	0,930±0,035
Pre-flight ENEIDE metaphases						
Pre-flight ENEIDE metaphases	0	447	3	0,007±0,004	3	0,007±0,004
Pre-flight ENEIDE PCC	0	919	27	0,029±0,006	6	0,007±0,003
Pre-flight ENEIDE PCC	1	486	52	0,107±0,015	23	0,047±0,010
Pre-flight ENEIDE PCC	3	523	277	0,530±0,032	288	0,551±0,032
Pre-flight ENEIDE PCC	5	413	338	0,818±0,045	501	1,213±0,054
Post-flight ENEIDE metaphases						
Post-flight ENEIDE metaphases	0	1797	10	0,006±0,002	10	0,006±0,002
Post-flight ENEIDE PCC	0	1774	62	0,035±0,004	21	0,012±0,003
Post-flight ENEIDE PCC	1	1019	123	0,121±0,011	103	0,101±0,010
Post-flight ENEIDE PCC	3	790	436	0,552±0,026	459	0,581±0,027
Post-flight ENEIDE PCC	5	508	404	0,795±0,040	510	1,004±0,044

**Tabella 5:** Risultati dell'analisi delle aberrazioni cromosomiche (Bertucci *et al.*, 2007 c)

Le figure 5.16 e 5.17 mostrano le curve dose risposta degli scambi totali in funzione della dose. Più specificamente la prima mostra i dati relativi alla sola missione ENEIDE mentre la seconda mette a confronto i dati ottenuti dall'analisi dei campioni della missione ENEIDE con quelli precedentemente ottenuti dall'analisi dei campioni della missione Marco Polo (Greco *et al.*, 2003).



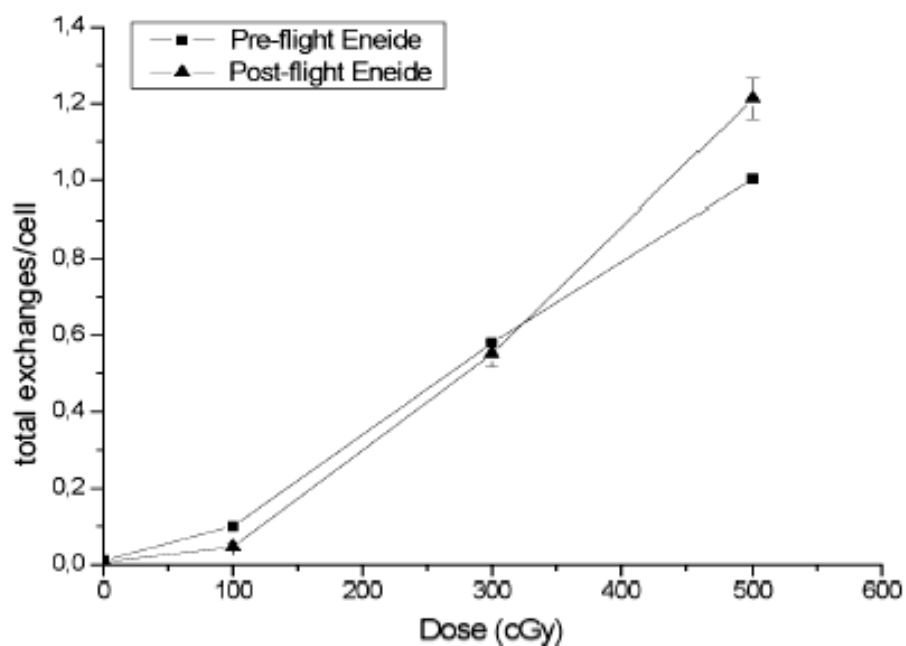


Fig. 5.16: Curve dose risposta degli scambi totali a carico dei cromosomi 1 e 2 dopo esposizione a raggi X (Bertucci *et al.*, 2007 c)

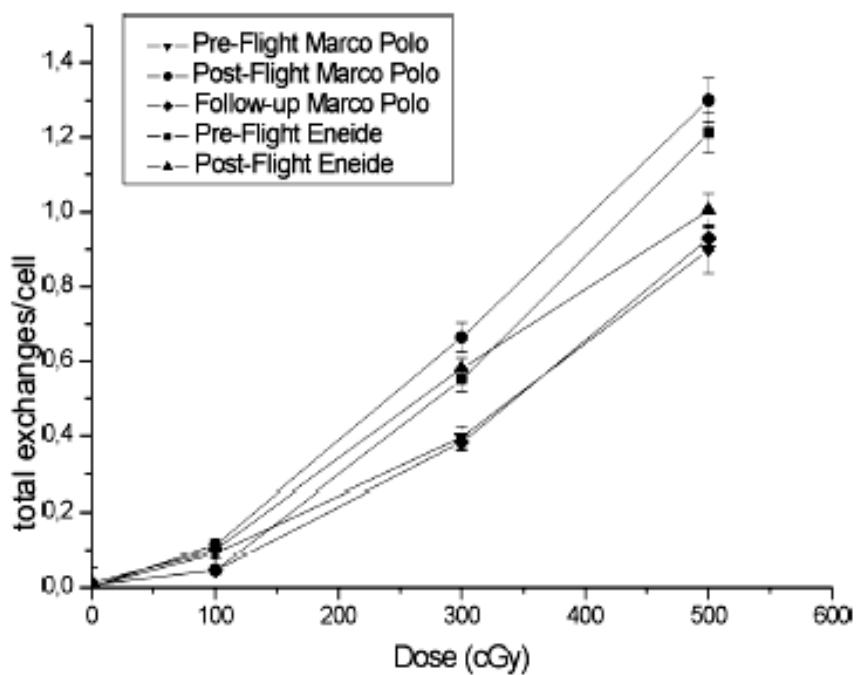
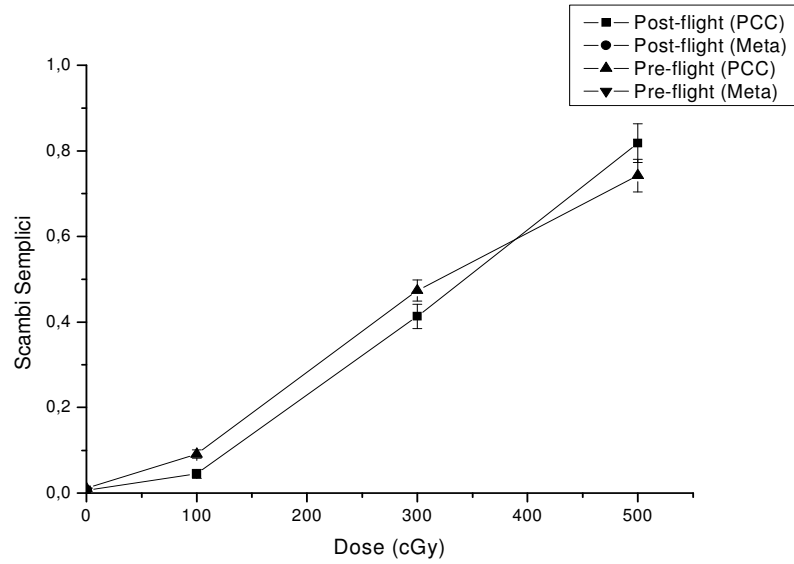
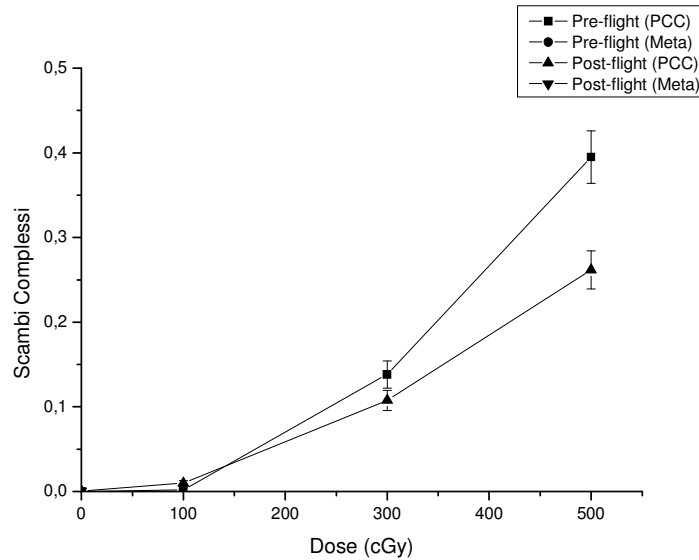


Fig. 5.17: Confronto delle curve dose risposta degli scambi totali a carico dei cromosomi 1 e 2 dopo esposizione a raggi X durante le missioni Marco Polo ed ENEIDE (Bertucci *et al.*, 2007 c)

Di seguito sono mostrate le curve dose risposta per gli scambi semplici (figura 5.18) e gli scambi complessi (figura 5.19) misurati nei campioni relativi alla missione ENEIDE.



**Fig. 5. 18:** Curva dose-risposta per gli scambi semplici a carico dei cromosomi 1 e 2 dopo esposizione a differenti dosi di raggi X.



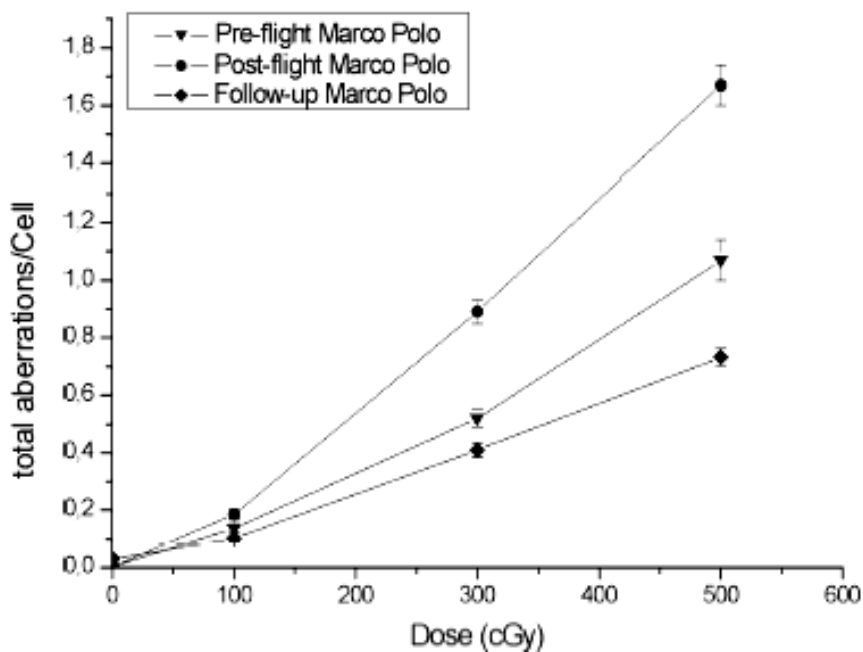
**Fig. 5. 19:** Curva dose-risposta per gli scambi complessi a carico dei cromosomi 1 e 2 dopo esposizione a differenti dosi di raggi X.

I precedenti dati ottenuti dall'analisi delle aberrazioni cromosomiche in linfociti del sangue periferico dell'astronauta dopo la missione Marco Polo avevano mostrato un significativo incremento delle aberrazioni totali. Questa osservazione aveva suggerito una maggiore radiosensibilità dei linfociti dopo la missione in confronto a quella degli stessi misurata prima del lancio (Greco *et al.*, 2003).

Tuttavia questi risultati non hanno trovato conferma nell'analisi delle aberrazioni relative alla missione ENEIDE e qui presentate. Le frequenze di aberrazioni totali per cellula (fig.5.15) nei campioni pre-volo e post-volo non mostrano significative differenze. Risultati simili sono stati ottenuti anche in altri lavori in cui il sangue di astronauti coinvolti in missioni brevi è stato esposto a raggi  $\gamma$  (Wu *et al.*, 2001).

Questi risultati, dunque, suggeriscono che la variazione della radiosensibilità intra-individuale può essere significativa ma non può essere messa in relazione all'ambiente spaziale.

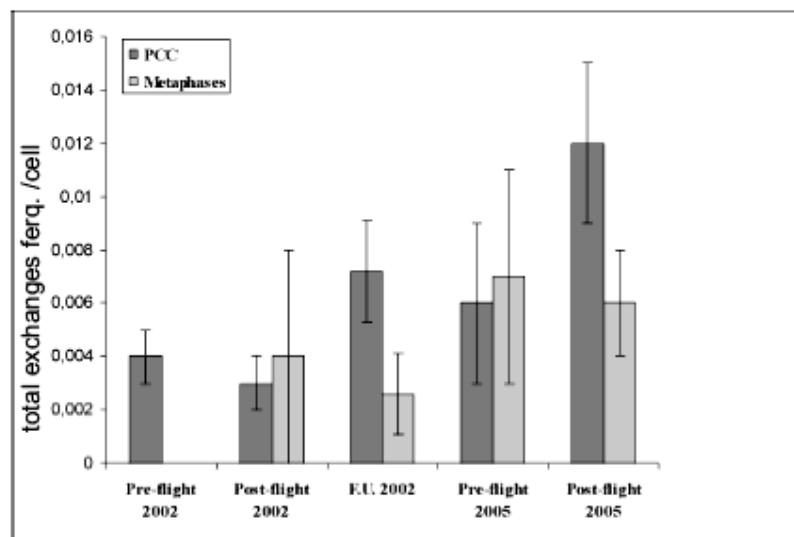
La curva dose risposta relativa alle aberrazioni totali nei campioni prelevati a sei mesi dal termine della missione Marco Polo (figura 5.20) confrontata con le precedenti analisi per la stessa missione mostra una ridotta radiosensibilità confrontata con le curve pre- e post- volo.



**Fig. 5.20:** Curva dose risposta per le aberrazioni totali misurate nei campioni relativi alla missione Marco Polo esposti a differenti dosi di raggi X (Bertucci *et al.*, 2007 c).

Questo risultato può essere interpretato come un aumento nella radioresistenza conferita dalla permanenza nello spazio. Questa osservazione è consistente con altri dati riportati da Durante *et al.* (2003) in cosmonauti russi in cui è mostrata una evidenza per un probabile adattamento alle radiazioni.

Le frequenze di aberrazioni cromosomiche in cellule non esposte a raggi X non mostra alcuna variazione né dopo la missione Marco Polo che quella ENEIDE (figura 5.21) e questo è in accordo con la durata della missione.



**Fig. 5.21:** frequenze di scambi totali misurati nei campioni di controllo delle missioni Marco Polo ed ENEIDE (Bertucci *et al.*, 2007 c)

Nonostante questi risultati non mostrino significative variazioni nelle frequenze di aberrazioni nelle metafasi, un lieve incremento viene rilevato nelle PCC.

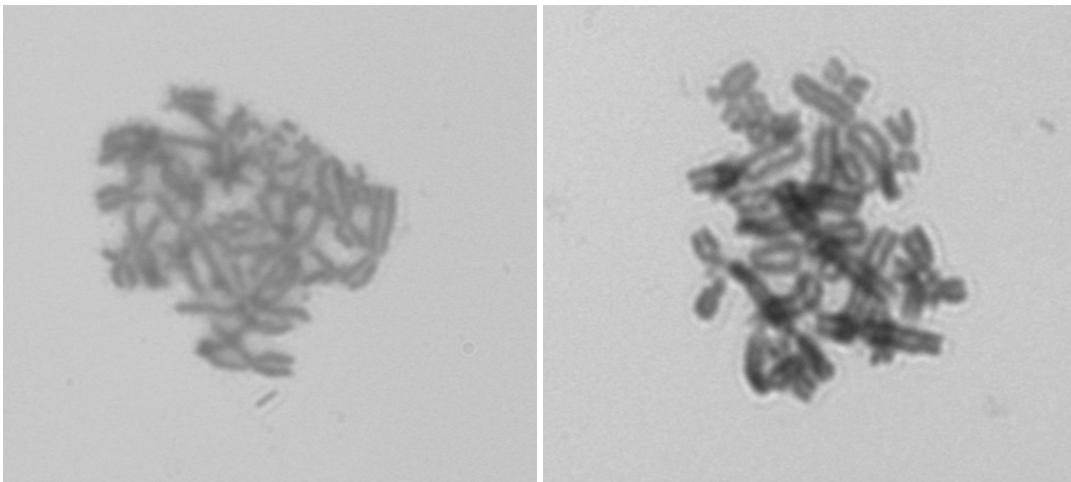
Questo potrebbe essere messo in relazione col ritardo mitotico che la radiazione induce sulle cellule. Questa situazione rende impossibile la visualizzazione di aberrazioni cromosomiche nelle metafasi conducendo ad una sottostima del danno, problema che invece viene risolto dall'impiego della tecnica di induzione prematura dei cromosomi (PCC).

## 5.4 Analisi dei campioni: *Rana esculenta*

### 5.4.1. Messa a punto di un protocollo per colture linfocitarie

Lo studio delle caratteristiche del genoma di *Rana esculenta* è iniziato con prelievi ematici 10 esemplari di controllo. Immediatamente è apparso evidente che i protocolli da utilizzare per le colture linfocitarie necessitavano di alcune implementazioni. In letteratura infatti sono noti protocolli per colture linfocitarie di *bufonidi* (Kasahara *et al.*, 1998), ma questi hanno richiesto variazioni che fossero adeguate per le colture dei linfociti di *R. esculenta*.

La maggiore difficoltà incontrata è stata relativa al fatto che le metafasi ottenute si presentavano in una forma tale da non consentire un'attendibile analisi cromosomica. Le cellule infatti apparivano poco gonfie e questo determina una scarsa distribuzione spaziale dei cromosomi all'interno, condizione essenziale per l'analisi citogenetica. I cromosomi infatti, come mostrano le figure 5.22 A e B risultavano ammassati e sovrapposti fra loro, quindi indistinguibili.



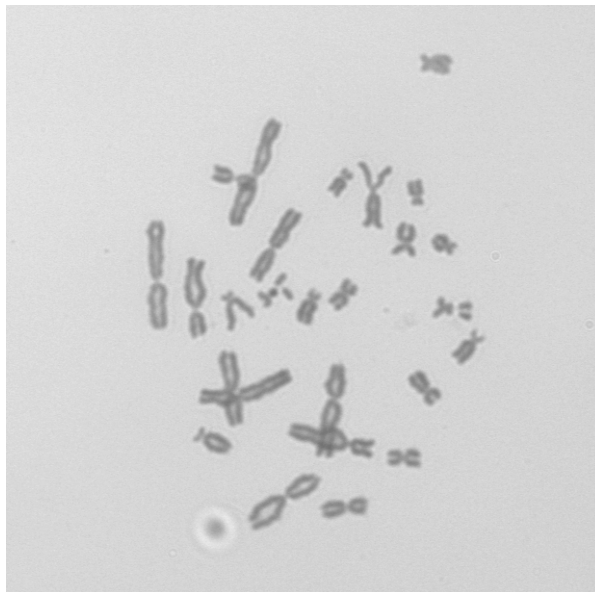
**Fig. 5.22:** Metafasi di *Rana esculenta* ottenuta prima dell'implementazione del protocollo.

Per tale scopo è stata valutata la capacità di diverse soluzioni ipotoniche. Nello specifico sono state utilizzate le seguenti soluzioni:

- KCl 0.075 M
- H<sub>2</sub>O distillata
- 1:1 KCl 0.075 M / H<sub>2</sub>O distillata

I risultati migliori si sono ottenuti con l'utilizzo della soluzione di KCl 0.075M e con la miscela KCl 0.075M/H<sub>2</sub>O distillata. I protocolli utilizzati sono riportati in appendice.

Queste procedure hanno permesso di migliorare notevolmente la qualità delle metafasi ottenute, come si può osservare dalla figura 5.23, in cui i cromosomi appaiono ben distanziati fra loro, premessa fondamentale per un'attendibile analisi cariotipica.



**Fig. 5.23:** Cariotipo normale di *Rana esculenta* ottenuto dopo l'implementazione del protocollo.

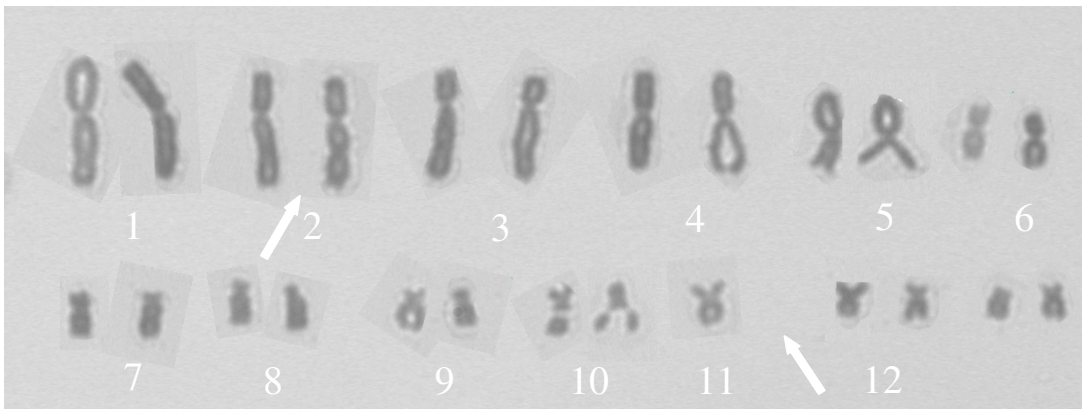
### 5.4.2. Analisi cromosomica su esemplari di controllo

L'analisi cromosomica preliminare ha riguardato i campioni estratti da 10 animali (2006). Dopo ogni prelievo il sangue è stato messo in coltura per 4 giorni trascorsi i quali si è proceduto con la raccolta cromosomica (harvest) e successiva colorazione in Giemsa. Ricordiamo che tale tipo di colorazione si è resa necessaria dal momento che in commercio non esistono sonde fluorescenti che si adattino ai cromosomi di anfibio.

L'acquisizione delle immagini è stata effettuata attraverso l'utilizzo del sistema R.A.I.C per quello che riguarda la ricerca delle metafasi a basso ingrandimento (obiettivo 10x) e successivamente le immagini sono state acquisite ad alto ingrandimento (obiettivo 63x) mediante l'utilizzo di un software accessorio, ISIS, del Metafer4 descritto nel paragrafo 4.7, dal momento che il Metafer4 non supporta l'acquisizione automatica di immagini in luce trasmessa.

L'analisi dei risultati ha mostrato la presenza di due sole cellule aberrate, cioè sono stati osservati due cromosomi dicentrici.

Nella figura 5.24 è mostrato il cariotipo di una delle due cellule aberrate che si sono osservate durante l'analisi.



**Fig. 5.24:** Cariotipo di *Rana esculenta* in cui è possibile osservare la presenza di un cromosoma dicentrico originatosi da un evento di scambio tra uno dei cromosomi 2 ed uno della coppia 11.

A questi risultati si sono aggiunte ulteriori analisi in soggetti di controllo (2007). I prelievi sono stati effettuati su un gruppo di 12 animali. I dettagli dell'analisi delle aberrazioni cromosomiche dei due esperimenti sono mostrate in tabella 5.

<i>Campione</i>	<i>Cellule analizzate</i>	<i>Cellule normali</i>	<i>Cromosomi dicentrici</i>	<i>Ring</i>	<i>Cellule non-analizzabili</i>
<i>Controllo 1</i>	1442	915	2	0	525
<i>Controllo 2</i>	1142	870	2	0	270

**Tabella 6:** Risultati dell'analisi delle aberrazioni effettuate per i due esperimenti.

Come risulta evidente, le analisi effettuate sui due gruppi di animali sono risultate tra loro compatibili.

#### **5.4.3. Risultati dell'analisi su esemplari esposti a differenti dosi di raggi X**

Una volta definite le frequenze delle aberrazioni nei primi due gruppi di controlli si è proceduto all'irraggiamento di nuovi esemplari con tre differenti dosi di raggi X. Un gruppo di 5 animali è stato esposto ad una dose totale di 10 Gy (rateo di dose ~ 1 Gy/min), un gruppo di tre animali è stato esposto alla dose di 6 Gy ed un gruppo di 6 animali esposto a 4 Gy di raggi X nelle medesime condizioni sperimentali, ossia stesso rateo di dose.

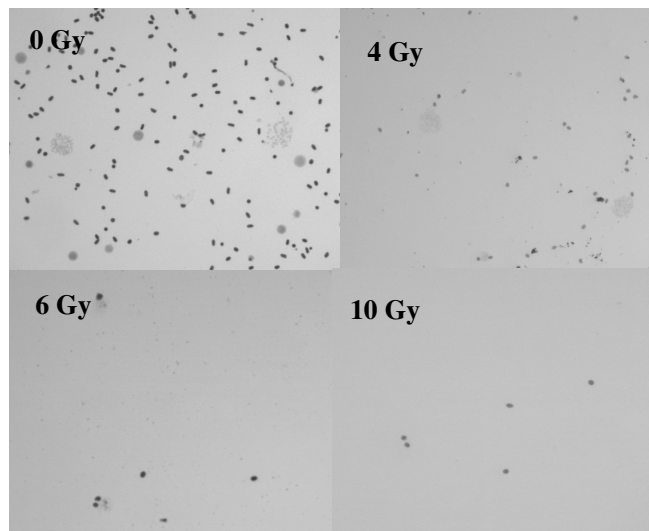
Su questi esemplari prima dell'irraggiamento è stato effettuato un prelievo ematico e successiva analisi delle aberrazioni cromosomiche allo scopo di aggiungere nuovi dati ai controlli effettuati precedentemente.

L'esposizione di questi esemplari è avvenuta dopo un periodo di tempo sufficientemente lungo da garantirci le buone condizioni fisiche degli animali (circa 1 mese). A distanza di una settimana dall'esposizione sono stati effettuati nuovi prelievi



ematici, le cellule sono state messe in coltura e successivamente si è effettuata la raccolta cromosomica.

L'analisi delle immagini ha rivelato una totale assenza di metafasi nei campioni degli esemplari sottoposti ad un irraggiamento di 6 e 10 Gy. La figura 5.25 mostra alcune immagini acquisite con l'ingrandimento 10x in cui si osserva una progressiva diminuzione di linfociti all'aumentare della dose fino alla loro completa scomparsa.



**Fig. 5.25:** Immagini acquisite da vetrini preparati col campione di esemplari di controllo (0 Gy) in cui sono visibili due metafasi, da un esemplare di *Rana esculenta* esposto a 4 Gy di raggi X in cui si possono osservare due metafasi ed alcuni linfociti ed eritrociti, da un esemplare esposto a 6 Gy di raggi X in cui si osservano alcuni eritrociti e due linfociti molto danneggiati e da uno esposto a 10 Gy di raggi X in cui sono del tutto assenti linfociti.

L'elemento limitante in questo tipo di esperimenti è stato rappresentato dalla quantità di sangue che ad ogni prelievo si riusciva ad ottenere. Durante alcuni prelievi infatti il campione ha avuto una dimensione estremamente ridotta, ~ 20  $\mu$ L in altri si è arrivati anche ad ottenere anche 200  $\mu$ L.

I campioni le cui immagini sono mostrate in figura 5.25 sono stati preparati nelle medesime condizioni sperimentali.

In questo caso il confronto della densità cellulare è stato effettuato analizzando le immagini di esemplari da cui era stata prelevata la medesima quantità di sangue (~ 150 µL) ed il successivo allestimento dei vetrini è avvenuto risospesando il pellet ottenuto nella stessa quantità di fissativo.

L'osservazione che in questa situazione si può fare è che il fenomeno rilevato dall'analisi qualitativa delle immagini sia riconducibile ad una sindrome ematopoietica come conseguenza dell'esposizione alle radiazioni. Come è stato detto nel capitolo 1, il manifestarsi della sindrome può richiedere alcune settimane dal momento che essa diviene manifesta solo nel momento in cui le cellule mature circolanti muoiono e la loro sostituzione da parte di cellule nuove risulta insufficiente. Questo è in accordo con il fatto che i prelievi ematici effettuati in questo esperimento sono avvenuti a distanza di 1 settimana dall'irraggiamento.

Negli esemplari esposti a 6 Gy di raggi X inoltre è stato effettuato un nuovo prelievo a distanza di un mese dall'irraggiamento. I risultati tuttavia sono stati analoghi ai precedenti, nessuna metafase infatti è stata osservata.

Non è stato possibile effettuare nuove analisi dal momento che a circa due mesi dall'irraggiamento per tutti gli esemplari esposti è sopraggiunta la morte.

L'analisi delle aberrazioni cromosomiche, dunque, è stata effettuata solo sugli esemplari esposti a 4 Gy di raggi X.

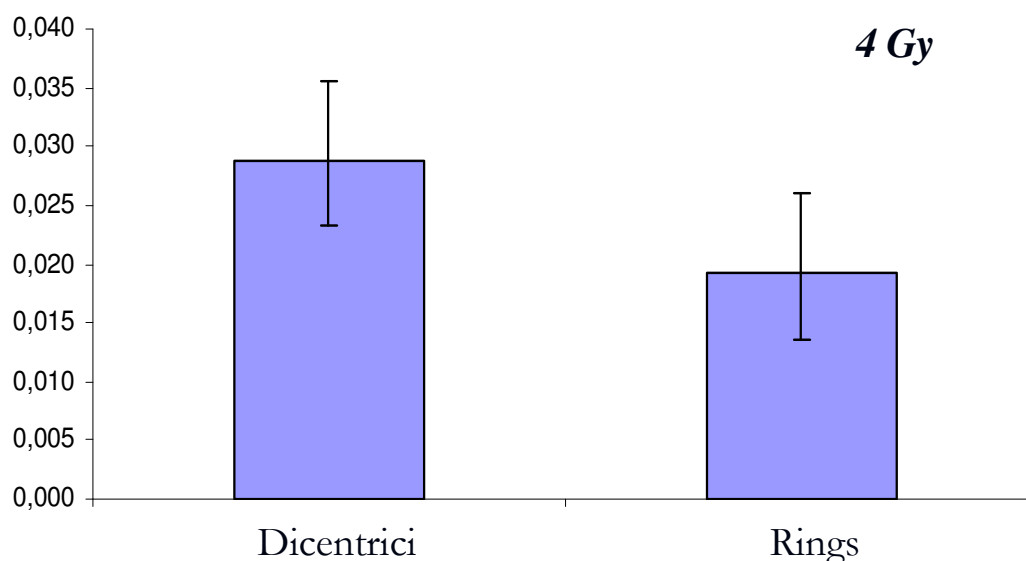
I risultati delle analisi delle aberrazioni cromosomiche effettuate sono mostrate in tabella 7, dove sono riassunti sia quelli relativi all'analisi pre-irraggiamento sugli stessi animali (controllo 3) che quelle dopo l'esposizione.

<i>Campione</i>	<i>Cellule analizzate</i>	<i>Cellule normali</i>	<i>Cromosomi dicentrici</i>	<i>Ring</i>	<i>Cellule non-analizzabili</i>
<i>Controllo 3</i>	775	639	1	0	134
<i>4 Gy</i>	776	597	19	12	151

**Tabella 7:** Risultati dell'analisi delle aberrazioni cromosomiche sul gruppo di animali prima (controllo 3) e dopo l'esposizione a 4 Gy di raggi X.

L'analisi delle aberrazioni cromosomiche, effettuata su consistenti campioni di cellule, nei tre gruppi di controllo ha mostrato che le frequenze di aberrazioni sono praticamente coincidenti mostrando in ogni caso un valore pari a  $0.002 \pm 0.001$ .

La figura 5.26 mostra l'istogramma relativo alle frequenze di aberrazioni cromosomiche misurate nei campioni degli esemplari esposti a 4 Gy di raggi X.



**Fig. 5.26:** Frequenze di aberrazioni cromosomiche misurate nei campioni prelevati dal gruppo di esemplari di *Rana esculenta* dopo esposizione a 4 Gy di raggi X.

Da questi risultati si evince chiaramente che le frequenze di cromosomi dicentrici e rings sono praticamente le stesse. Questo dato è apparso immediatamente sorprendente considerando che nell'uomo le frequenze di cromosomi dicentrici sono di gran lunga maggiori rispetto a quelle dei rings.

Nel paragrafo 3.2 è stato introdotto il concetto di fattore F come indice della qualità della radiazione, in tale contesto sono stati anche riportati i valori del fattore F misurato nell'uomo dopo esposizione a vari tipi di radiazione. Il valore F, dato dal rapporto fra cromosomi dicentrici e rings, misurato nell'uomo dopo esposizione a raggi X ha mostrato un valore pari a  $\sim 20$  (Martin *et al.*, 1989; Stephan *et al.*, 1990).

Il valore F calcolato in *Rana esculenta*, in seguito all'analisi dei risultati ottenuti in questo lavoro, ha mostrato un valore pari a ~ 1.5.

La risposta a tale enorme differenza nei valori osservati è venuta da alcune considerazioni circa le caratteristiche genomiche e cromosomiche di *Rana esculenta* ed uomo.

Il contenuto di DNA per cellula nell'uomo è pari a 7 pg e questo lo troviamo distribuito in 46 cromosomi, nella rana tale contenuto misurato ha mostrato un valore di 14.08 pg (Vinogradov A. E., 1998) distribuito in 26 cromosomi. Dunque, nella rana è presente una quantità di DNA per cellula che è il doppio di quella presente nelle cellule umane ed inoltre esso è distribuito tra un numero di cromosomi che è circa la metà di quelli presenti nella cellula umana. Questo determina che i cromosomi della rana abbiano dimensioni maggiori.

Nel paragrafo 3.2 si è parlato dell'effetto prossimità e si è detto che è possibile ipotizzare che la probabilità che avvengano ricombinazioni illegittime tra cromosomi dipende dalla distanza alla quale si trovano i dsb prodotti dalla radiazione.

In tale contesto, in conseguenza delle considerazioni fatte per la struttura e le dimensioni dei cromosomi della rana e tenendo conto della modalità di interazione delle radiazioni con le cellule si comprende come, nel caso dell'anfibio, la probabilità che due dsb avvengano su cromosomi differenti che poi ricongiungendosi tra loro danno origine ad interscambi (cromosomi dicentrici) sia la stessa che i due dsb si producano sullo stesso cromosoma che poi ricongiungendosi origina intrascambi (rings). Si comprende facilmente, dunque, perchè nell'uomo questa probabilità sia decisamente spostata a favore degli interscambi. Essendo i cromosomi umani fisicamente più piccoli la probabilità che due eventi di rottura indipendenti si creino sullo stesso cromosoma è molto bassa.

Si può concludere, dunque, che l'analisi delle caratteristiche genomiche e cromosomiche della *Rana esculenta* spiegano bene il diverso valore F misurato, rispetto a quello osservato nell'uomo.

## *Conclusioni*

L'esposizione all' ambiente spaziale rappresenta uno dei maggiori rischi per gli equipaggi impegnati in missioni interplanetarie. E' ben noto che la microgravità induce una serie di effetti fisiologici che vanno da scompensi circolatori, alla parziale inibizione del sistema immunitario. Tuttavia, è generalmente accettato che il rischio maggiore è correlato all'esposizione ai raggi cosmici. Infatti, non esistono efficaci contromisure per l'esposizione alla radiazione spaziale. Inoltre, l'effetto tardivo più importante, il cancro, è naturalmente molto grave. Infine, l'incertezza sul rischio di cancro è molto alta, perché si sa troppo poco sui meccanismi responsabili degli effetti a lungo termine successivi ad esposizione a ioni pesanti di alta energia.

L'unica contromisura adottabile per la radioprotezione da raggi cosmici è l'utilizzo di opportune schermature da utilizzare nella progettazione e costruzione di veicoli spaziali. Allo scopo di progettare opportune schermature per la radioprotezione nello spazio sono stati sviluppati codici di trasporto che forniscono, tenendo conto della composizione della radiazione cosmica, la dose assorbita a livello dei vari organi dell'organismo esposto. Per la messa a punto e la verifica della validità di tali modelli sono però necessarie misure dirette dell'efficacia biologica delle differenti particelle costituenti la radiazione cosmica galattica (GCR).

Per tali ragioni la maggior parte di questo lavoro si è concentrata sullo studio degli effetti biologici, in termini di aberrazioni cromosomiche, indotti da un fascio di protoni da 1 GeV. La scelta di tale ione risiede nel fatto che la GCR risulta costituita in larga misura da protoni di tale energia. Per tale lavoro inoltre è stato analizzato il danno indotto anche in presenza di schermi come l'alluminio, principale costituente delle navicelle spaziali, e il PMMA (lucite), che come tutti i materiali plastici, ricchi in idrogeno, costituisce un buono schermo (per unità di massa) per la radiazione spaziale.

Abbiamo osservato che la produzione di particelle secondarie generate per interazione del fascio di H da 1 GeV con gli atomi del bersaglio (di spessore massico pari a  $20 \text{ g/cm}^2$ ) genera un aumento di dose prima e dopo lo schermo, di ~ il 25% e di ~ il 40% in dopo gli schermi in PMMA ed alluminio, rispettivamente. I risultati ottenuti sono stati

interpretati con l'ausilio di simulazioni, utilizzando il codice trasporto PHITS. La simulazione ha permesso di stabilire che:

- i protoni secondari contribuiscono all'incremento di dose misurato per circa il 92% mentre solo meno del 10% è attribuibile a muoni, pioni e neutroni. Si può dunque affermare che l'aumento di dose sia dovuto quasi interamente ai protoni secondari prodotti nel bersaglio
- il valore del LET dei protoni secondari è prossimo a quello dei protoni primari e questo spiega perché i risultati biologici ottenuti mostrano che il campo di radiazione dopo lo schermo non sia più efficace del fascio primario a parità di dose
- le aberrazioni per protone incidente sono aumentate in presenza dello schermo, a causa dell'aumento nella dose per protone incidente
- i dati sulle aberrazioni e le simulazioni provano che la plastica è uno schermo migliore dell'alluminio contro i protoni galattici.

E' stato anche analizzato il danno indotto da protoni a differente rateo di dose. E' noto, infatti, che per raggi X e  $\gamma$ , il rateo di dose (o intensità di dose) è il fattore principale che determina le conseguenze biologiche della dose di radiazione assorbita dal campione. Man mano che il rateo di dose diminuisce ed il tempo di esposizione aumenta, l'effetto biologico di una data dose viene generalmente ridotto (*sparing effect*). Questo effetto è ben noto per esposizione a fotoni sulla terra. Poiché durante i voli spaziali l'intensità di dose si mantiene bassa (<1 mSv/giorno), è importante valutare la modificazione dell'efficacia biologica dei protoni nel caso di esposizione cronica.

Le curve dose risposta ottenute dall'analisi dei campioni irraggiati con protoni a dose acuta (rateo di dose ~ 100 cGy/min) e a dose cronica (rateo di dose ~ 0.8 cGy/min) mostrano, seppur preliminarmente,

- che non vi sono significative differenze nell'induzione di aberrazioni cromosomiche dopo esposizione di protoni da 1 GeV ad alto e basso rateo di dose nelle condizioni sperimentali utilizzate.

Analisi *in vivo* del danno citogenetico indotto dalle particelle cariche nello spazio sono state condotte misurando le frequenze di aberrazioni cromosomiche in linfociti dell'astronauta Roberto Vittori durante due missioni brevi Stazione Spaziale Internazionale (ISS). Per questo esperimento, campioni ematici dell'astronauta sono stati prelevati prima della missione ed immediatamente al termine della stessa. Oltre i campioni di controllo, sono stati anche analizzati campioni sottoposti ad irraggiamento con raggi X allo scopo di verificare se il campo di radiazione spaziale modifica la radiosensibilità individuale.

I risultati hanno mostrato che:

- il significativo incremento delle aberrazioni totali misurato nei campioni dell'astronauta esposti a raggi X in vitro dopo la missione Marco Polo non ha trovato conferma nell'analisi delle aberrazioni relative alla seconda missione (ENEIDE)
- questo dato suggerisce che la varianza della radiosensibilità intra-individuale può essere significativa, ma non può essere messa in relazione all'ambiente spaziale
- le frequenze di aberrazioni cromosomiche in cellule non esposte a raggi X non mostrano alcuna variazione né dopo la missione Marco Polo che quella ENEIDE e questo è in accordo con la breve durata della missione

La parte di lavoro sperimentale effettuato allo scopo di determinare le differenze nell'induzione di effetti tardivi del danno radioindotto ha fatto uso di radiazione di alto e basso LET, utilizzando campioni di linfociti umani esposti ad 1 Gy di raggi X da 250 kV e di ioni ferro da 1 GeV/n e raccolti a 120 h dall'irraggiamento.

Il rapporto inter/intrascambi, noto come fattore F, è stato proposto come un possibile biomarcatore dell'esposizione a radiazione densamente ionizzante, perché i modelli biofisici prevedono che esso diminuisca al crescere del LET, in quanto per

radiazione densamente ionizzante le lesioni nel DNA sono più vicine, favorendo gli intra.scambi cromosomici.. Se realmente le cellule sopravvissute all'esposizione a ioni pesanti presentano molti più intrascambi di quelle esposte a raggi X (e quindi un fattore F più basso), ciò suggerirebbe che gli intrascambi possono giocare un ruolo negli effetti tardivi prodotti dagli ioni pesanti.

L'analisi delle aberrazioni cromosomiche ha permesso di concludere che:

- un maggior numero di cellule con aberrazioni a carico del cromosoma 1 (analizzato) sono state trovate nella progenie di cellule esposte a ioni Fe (4.3%) rispetto a raggi-X (2.3%)
- le aberrazioni più frequenti, gli interscambi semplici (principalmente traslocazioni), non mostrano differenze statisticamente significative fra i due campioni, dunque, l' RBE per traslocazioni ed inversioni stabili è circa 1, e l' *F*-value a 120 h è simile.
- Scambi complessi, inclusi quelli che contengono *intrascambi*, sono più frequenti nella progenie di cellule esposte a ioni pesanti

La parte finale di questo lavoro ha avuto come scopo lo studio delle caratteristiche cromosomiche di un modello animale allo scopo di verificare la possibilità di utilizzo di tale modello come biosimetro del danno radioindotto. Il modello animale scelto è stato *Rana esculenta*.

- il primo obiettivo raggiunto in questo lavoro è stato quello dell'ottimizzazione di un protocollo per le colture linfocitarie della rana. L'ottenimento, infatti, di cellule in cui i cromosomi siano ben separati e distinguibili gli uni dagli altri è una premessa fondamentale per una corretta analisi cromosomica.



Raggiunto tale obiettivo, sono state effettuate diverse misure su esemplari di controllo per stabilire il tasso di aberrazioni di fondo e successivamente si è proceduto all'esposizione di tre gruppi di esemplari a raggi X di differente dose.

La misura delle aberrazioni cromosomiche negli esemplari di controllo ha mostrato che:

- non vi è differenza statisticamente significativa nelle frequenze di aberrazioni cromosomiche misurate nei differenti gruppi di esemplari di controllo e tale frequenza è risultata essere pari a  $2 \pm 1 \cdot 10^{-3}$  aberrazioni per cellula

L'analisi delle aberrazioni cromosomiche sugli esemplari esposti a differenti dosi di raggi X ha mostrato che:

- una sindrome ematopoietica sembrerebbe instaurarsi a partire da una dose pari a 6 Gy di raggi X.

L'analisi delle aberrazioni sugli esemplari esposti a 4 Gy di raggi X ha mostrato

- il fattore F (dicentrici/rings) nella rana è risultato essere pari a ~ 1.5 mentre nell'uomo è ben noto essere ~ 20 per lo stesso tipo di radiazione X, così come misurato anche da noi nell'esperimento precedente.

Le caratteristiche genomiche della rana, come il numero di cromosomi ed il contenuto di DNA totale per cellula, giustifica la notevole differenza nel valore del fattore F osservato.

Complessivamente, i dati ottenuti dall'analisi dei campioni, quindi, sono risultati consistenti. La misura di aberrazioni cromosomiche in linfociti estratti dal sangue periferico si conferma un buon test dosimetrico.

I risultati ottenuti con i protoni forniscono importanti indicazioni per lo sviluppo di modelli di calcolo; sarà, dunque, possibile verificare e migliorare tali codici. Sulla base di

tali misure sperimentali sarà, inoltre possibile metterne a punto di nuovi che siano in grado di fornire una stima diretta del rischio.

I risultati degli esperimenti condotti con ioni ferro e raggi X, sia nell'uomo che nelle rane, suggeriscono quindi che le aberrazioni cromosomiche rappresentano un buon marcatore citogenetico del danno radioindotto. I risultati ottenuti sull'anfibio mostrano che il fattore F, già noto essere un buon indicatore della qualità della radiazione nell'uomo, lo è anche per *Rana esculenta*.

Inoltre, gli scambi di tipo complesso, sia intercromosomici che intracromosomici, sembra rappresentino un buon biomarcatore della esposizione a ioni pesanti. Poiché l'RBE degli ioni pesanti è molto minore nella progenie rispetto alle cellule direttamente irraggiate, la maggiore efficacia nell'induzione di effetti tardivi dovrebbe essere legata alla qualità, più che alla quantità, del danno radioindotto, e quindi alla sua complessità. Resta naturalmente da determinare se interscambi complessi o eventi INTER + INTRA scambi cromosomici possano aumentare la probabilità di trasformazione cellulare.

## Bibliografia

Amundson S. A., Bitter M., Meltzer P., Trent J., Fornace A. J. Jr.

“Biological indicators for the identification of ionizing radiation exposure in human”

*Expert Review of Molecular Diagnostic* **1** (2001) 89- 97

Andersen V., Ballarini F., Battistoni G., Campanella M., Carboni M., Cerutti F., Empl A., Fasso A., Ferrari A., Gladioli E., Garzelli M. V., Lee K., Ottolenghi A., Pelliccioni M., Pinsky L. S., Roesler S., Sala P. R., Wilson T. L.

“The FLUKA code for space applications: recent developments”

*Advances in Space Research* **34** (2004) 1302-1310

Anderson R. M., Marsden S. J., Wright E. G., Kadhim M. A., Goodhead D. T., Griffin C. S.

“Complex chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes as a potential biomarker of exposure to high-LET  $\alpha$ -particles”

*International Journal of Radiation Biology* **76** (2000) 31-42

Andreani P., Santucci F., Nascetti G.

“Le rane verdi del complesso *Rana Esculenta* come bioindicatori della qualità degli ambienti fluviali italiani”

*Biologia Ambientale* **17** (2003) 35-44

Bailey S. M., Bedford J. S.

“Studies on chromosome aberration induction: what can they tell us about DNA repair?”

*DNA Repair* **5** (2006) 1171-1181

Baranov A. E., Guskova A. K., Nadejina N. M., Nugis V. Y.

“Chernobyl experience: biological indicators of exposure to ionizing radiation”

*Stem Cell* **13 (Suppl. 1)** (1995) 69-77

Bauchinger M., Schmid E.

“Is there reliable experimental evidence for a chromosomal “fingerprint” of exposure to densely ionizing radiation?”

*Radiation Research* **147** (1997) 506-510

Bauchinger M., Schmid E.

“Is there reliable experimental evidence for a chromosomal "fingerprint" of exposure to densely ionizing radiation?”

*Radiation Research* **147** (1997) 506-510.

Bauchinger M., Schmid E.

“LET dependence of yield ratios of radiation-induced intra- and interchromosomal aberrations in human lymphocytes”

*International Journal of Radiation Biology* **74** (1998) 17-25.

Bender M. A., Awa A. A., Brooks A. L., Evans H. J., Groer P. G., Littlefield L.G., Pereire C., Preston R. J., Wachholtz B. W.

“Current status of cytogenetic procedures to detect and quantify previous exposures to radiation”

*Mutation Research* **196** (1998) 103-159.

Bender M. A., Bedford J. S., Mitchell J. B.

“Mechanism of chromosomal aberration production. II. Aberration induced by 5 BUdR and visible light”

*Mutation Research* **20** (1973) 403-416

Ben-Hur E., Elkind M. M.

“Damage and repair in 5-bromodeoxyuridine-labeled Chinese hamster cells exposed to fluorescent light”

*Journal of Biophysic* **12** (1972) 636-647

Bertucci A., Durante M., Gialanella G., Grossi G., Manti L., Pugliese M., Scampoli P., Mancusi D., Sihver L., Rusek A.

“Shielding of relativistic protons”

*Radiation and Environmental Biophysics* **46** (2007a) 107-111

Bertucci A., Gialanella G., Grossi G., Manti L., Pugliese M., Scampoli P., Rusek A., Vazquez M. E. , Durante M.

“Chromosomal aberrations in human lymphocytes exposed to low-dose rate energetic protons”

*18<sup>th</sup> Annual NASA Space Radiation Investigator’s Workshop*, July 13-15, (2007 b). Rohnert Park, California, 82

Bertucci A., Durante M., Gialanella G., Grossi G., Manti L., Pugliese M., Scampoli P.

“Biological dosimetry in the ENEIDE Mission on the International Space Station”

*Microgravity Science and Technology* **19** (2007) 45-48

Brechigac F., Polikarpov G. G., Oughton D. H., Hunter G., Alexakhin R. M., Zhu Y. G., Hilton J., Strand P.

“Protection of environment in the 21<sup>st</sup> century: radiation protection of the biosphere including humankind. Statement of the International Union of Radioecology”

*Journal of Environmental Radioactivity* **70** (2003) 155-159

Brenner D. J., Sachs R. K.

“Chromosomal “Fingerprints” of prior exposure to densely ionizing radiation”

*Radiation Research* **140** (1994) 134-142

Bonassi S., Hagmar L., Stromberg U., Montagud A. H., Tinnerberg H., Forni A., Heikkila P., Wanders S., Wilhardt P., Hansteen I. L., Knudsen L. E., Norppa H.

“Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health”

*Cancer Research* **60** (2000) 1619-1625.

Clemenger J. F., Scott D.

“*In Vitro* and *In Vivo* sensitivity of cultured blood lymphocytes to radiation induction of chromosome aberrations”

*Nature, New Biology* **234**(1971)154-164

Cornforth M. N., Bedford J. S.

“A quantitative comparison of potentially lethal damage repair and rejoining of interphase chromosome breaks in low passage normal human fibroblast”

*Radiation Research* **111** (1987) 385-405

Cornforth M. N.

“Analyzing radiation-induced complex chromosome rearrangements by combinatorial painting”

*Radiation Research* **155** (2001) 643-659

Cornforth M. N.

“Perspectives on the formation of radiation-induced exchange aberrations”

*DNA Repair* **5** (2006) 1182-1191

Cremer T., Cremer C.

“Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells”

*Nature Review Genetic* **2** (2001) 292-301.

Cucinotta F. A., Durante M.

“Cancer risk from exposure to galactic cosmic rays: implications for space exploration by human beings”

*Lancet Oncology* **7** (2006) 431-435

Cucinotta F.A., Manuel F.K., Jones J., Iszard G., Murrey J., Djojonegro B., Wear M.

“Space radiation and cataracts in astronauts”

*Radiation Research* **156** (2001) 460-466

Delacote F., Han M., Stamato T. D., Jasin M., Lopez B. S.

“An XRCC4 defect or Wortmannin stimulates homologous recombination specifically induced by double-strand break in mammalian cells”

*Nucleic acid Research* **30** (2002) 3454-3463

Dolling J. A., Boreham D. R., Brown D. L., Mitchel R.E., Raaphorst G. P.  
“Modulation of radiation-induced strand break repair by cisplatin in mammalian cells”  
*International Journal of Radiation Biology* **74** (1998) 61-69

Durante M., Snigiryova G., Akaeva E., Bogomazova A., Druzhinin S., Fedorenko B.,  
Greco O., Novitskaya N., Rubanovich A., Shevchenko V., Recklinghausen U., Obe G.  
“Chromosome aberration dosimetry in cosmonauts after single or multiple space flights”  
*Cytogenetic and Genome Research* **103** (2003) 40-46

Durante M.  
“Radiation protection in space”  
*La Rivista del Nuovo Cimento* **25** (2002) 1-70.

Durante M.  
“Potential applications of biomarkers of radiation exposure in nuclear  
terrorism events”  
*Physica Medica* **19** (2003) 191-212

Durante M., George K., Wu H., Yang T. C.  
“Rejoining and misrejoining of radiation-induced chromatin breaks. I experiments with  
human lymphocytes”  
*Radiation Research* **145** (1996) 274-280

Durante M., Furusawa Y., Gotoh E.  
“A simple method for simultaneous interphase-metaphase chromosome analysis in  
biodosimetry”  
*International Journal of Radiation Biology* **74** (1998) 457-462

Durante M., Bonassi S., George k., Cucinotta F. A.  
“Risk estimation based on chromosomal aberrations induced by radiation”  
*Radiation research* **156** (2001) 662-667

Durante M., Ando K., Furusawa Y., Obe G., George K., Cucinotta F.A.

“Complex chromosomal rearrangements induced in vivo by heavy ions”

*Cytogenetic Genome Research* **104** (2004) 240-244

Durante M., George K., Cucinotta F.A.

“Chromosomes lacking telomeres are present in the progeny of human lymphocytes exposed to heavy ions”

*Radiation Research.* **165** (2006) 51-58.

European Committee on Radiation Risk

“Health Effects of the Chernobyl accident”

*Green Audit Press, Aberystwyth UK* (2006)

Fossi M. C.

“Non destructive biomarkers in ecotoxicology”

*Environmental Health Perspective* **102 Suppl. 12** (1994) 65-69

George K., Wu H., Willingham V., Furusawa Y., Kawata T., Cucinotta F. A.

“High- and low -LET induced chromosome damage in human lymphocytes: a time-course of aberrations in metaphase and interphase”

*International Journal of Radiation Biology* **77** (2001) 175-183

George K., Willingham V., Wu H., Gridley D, Nelson G., Cucinotta F. A.

“Chromosome aberrations in human lymphocytes induced by 250 MeV protons: effects of dose, dose rate and shielding”

*Advances in Space Research* **30** (2002) 891-899

George K., Durante M., Wu H., Willingham V., Cucinotta F. A.

“*In vivo* and *in vitro* measurement of complex-type chromosomal exchanges induced by heavy ions”

*Advances in Space Research* **31** (2003)1525-1535



- Gigantino R., Aprea G., Capriglione T., Guarino F. M., Odierna G.  
“Caratteristiche genomiche dei vertebrati ectodermi del Parco del Matese. I . Risultati dell’analisi cromosomica”  
*I vertebrati ectodermi del parco regionale del Matese*, Centro Stampa dell’Università degli Studi di Napoli Federico II Napoli, (2002).
- Gotoh E., Durante M.  
“Chromosome condensation outside of mitosis: mechanism and new tools”  
*Journal of Cellular Physiology* **209** (2006) 297-304
- Greco O., Durante M., Gialanella G., Grossi G., Pugliese M., Scampoli P., Snigiryova G., Obe G.  
“Biological dosimetry in Russian and Italian astronauts”  
*Advances in Space Research* **31**(2003) 1495-1503.
- Griffin C., S., Marsden S. J., Stevens D. L., Simpson P., Savage J. R.  
“Frequencies of complex chromosome exchange aberration induced by  $^{238}\text{Pu}$  alpha particles and detected by fluorescence in situ hybridization using single chromosome-specific probes”  
*International Journal of Radiation Biology* **67** (1995) 431-439
- Grinikh L. I., Shevchenko V. V.  
“Cytogenetic effects of ionizing radiations in *Crepis tectorum* growing within 30 km of the Chernobyl atomic power station”  
*Science of the Total Environment* **112** (1992) 9-18
- Hada M., Cucinotta F. A., Gonda S. R., Wu H.  
“m-BAND analysis of chromosomal aberrations in human epithelial cells exposed to Low- and High-LET radiations”  
*Radiation Research* **168** (2007) 98-105
- Hall E. J.  
“Radiobiology for the radiologist”  
*J. B. Lippincott Company*, Philadelphia (1994)

Hall E. J., Brenner D. J., Worgul B., Smilenov L.

“Genetic susceptibility to radiation”

*Advances in Space Research* **35** (2005) 249-253

Hande M. P., Azizova T. V., Burak L. E., Khokhryakov V. F., Geard C. R., Brenner D. J.

“Complex chromosome aberrations persist in individuals many years after occupational exposure to densely ionizing radiation: an mFISH study”

*Genes Chromosomes and Cancer* **44** (2005) 1-9.

Hlatky L. R., Sachs R. K., Hahnfeldt P.

“The ratio of dicentrics to centric rings produced in human lymphocytes by acute low-LET radiation”

*Radiation Research* **129** (1992) 304-308.

Hoffmann W., Schmitz-Feuerhake I.

“How radiation-specific is the dicentric assay?”

*Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology* **9** (1999) 113-133

Horstmann M., Durante M., Obe G.

“Distribution of breakpoints and fragment sizes in human chromosome 5 after heavy-ion bombardment”

*International Journal of Radiation Biology* **6** (2004) 437-443

Horstmann M., Durante M., Johannes C., Pieper R., Obe G.

“Space radiation does not induce a significant increase of intrachromosomal exchanges in astronauts' lymphocytes”

*Radiation and Environmental Biophysics* **44** (2005) 219-224.

Hotz H., Beerli P., Spolsky C.

“Mitochondrial DNA reveals formation of non hybrid frogs by natural mating bet hemiclinal hybrids”

*Molecular Biology Evolution* **4** (1992) 610-620

Hu J., Sathanoori M., Kochmar S. J., Surti U.

“Application of Multicolour Banding for identification of complex chromosome 18 rearrangements”

*Journal of Molecular Diagnostic* **8** (2006) 521-528

Jeggo P. A.

“Identification of genes involved in repair of DNA double strand breaks in mammalian cells”

*Radiation Research* **150** (1998) 80-91

Jensen R. H., Langlois R. G., Bigbee W. L., Grant S. G., Moore D. 2nd, Pilinskaya M., Vorobtsova I, Pleshanov P.

“Elevated frequency of glycoporphin A mutation in erythrocytes from Chernobyl accident victims”

*Radiation Research* **141** (1995) 129-135

Jensen R. H., Reynolds J. C., Robbins J., Bigbee W. L., Grant S. G., Langlois R. G., Pineda J. D., Lee T., Barker W. C.

“Glycophorin A as a biological dosimeter for radiation dose to the bone marrow from iodine-131”

*Radiation Research* **147** (1997) 747-752

Johannes C, Horstmann M, Durante M, Chudoba I, Obe G

“Chromosome intrachanges and interchanges detected by multicolor banding in lymphocytes: searching for clastogen signatures in the human genome”

*Radiation Research* **5** (2004) 540-548

Kasahara S., Zampieri Silva A. P., Gruber S. L., Haddab C. F. B.

“Comparative cytogenetic analysis on tree frog species (Anura, Hylidae, Hylinae) from Brazil”

*Cytogenetic Genome Research* **103** (2003) 155-162

Kasahara S., Zampieri Silva A. P., Gruber S. L.

“Use of lymphocyte cultures for BrdU replication banding patterns in anuran species (Amphibia)”

*Genetics and Molecular Biology* **21** (1994) 471-476

Kiefer J.

“Biological radiation effects”

*Springer-Verlag, Berlin Heidelberg* (1990)

Krishnaja A.P., Sharma N.K.

“Transmission of gamma-ray-induced unstable chromosomal aberrations through successive mitotic divisions in human lymphocytes in vitro”

*Mutagenesis*. **19** (2004) 299-305

Langlois R. G., Nisbet B. A., Bigbee W. I., Ridinger D. N., Jensen R. H.

“An improved flow cytometric assay for somatic mutations at the glycophorin A locus in human”

*Cytometry* **11** (1990) 513-521

Langlois R. G., Akiyama M., Kusunoki Y., DuPont B. R., Moore D.H. 2nd, Bigbee W.L., Grant S. G., Jensen R.H.

“Analysis of somatic cell mutations at the glycophorin A locus in atomic bomb survivors: a comparative study of assay methods”

*Radiation Research* **136** (1993) 111-117

Lees-Miller S. P., Meek K.

“Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining”

*Biochimie* **85** (2003) 1161-1173

Lewin B.

“Genes VI”

*Oxford University Press and Cell Press, New York* (2003)

Liang F., Han M., Romanienko P. J., Jasin M.

“Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells”

*Proceeding of National Academy of Science* **95** (1998) 5172-5177

Lieber M. R., Ma Y., Pannicke U., Schwarz K.

“Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining”

*Nature* **4** (2003) 712-720

Liehr T., Starke H., Weise A., Lehrer H., Claussen U.

“Multicolor FISH probe sets and their applications”

*Hystology and Hystopatology* **19** (2004) 229-237

Lloyd D. C., Edwards A. A., Leonard A., Deknudt G. L., Verschaeve L., Natarajan A. T., Darroudi F., Obe G., Palitti F., Tanzarella C., Tawn E. J.

“Chromosomal aberrations in human lymphocytes induced *in vitro* by very low doses of X-rays”

*International Journal of Radiation Biology* **61** (1992) 335-343

Lloyd D. C., Edwards A. A., Prosser J. S.

“Chromosome aberrations induced in human lymphocytes by *in vitro* acute x and gamma radiation”

*Radiation Protection and Dosimetry* **15** (1986) 83-88

Lloyd D., Purrot R., Dolphin G., Bolton D., Edwards A. A.

“The relationship between chromosome aberration and low LET radiation dose to human lymphocyte”

*International Journal of Radiation Biology* **28** (1975) 75-90

Lucas J. N.

“Cytogenetic signature for ionizing radiation”

*International Journal of Radiation Biology* **73** (1998) 15-20

Lucas J.N., Cervantes E.

“Significant large-scale chromosome territory movement occurs as a result of mitosis, but not during interphase”

*International Journal of Radiation Biology* **78** (2002) 449-55.

Lucas J. N., Hill F. S., Burk C. E., Cox A. B., Straume T.

“Stability of the translocation frequency following whole-body irradiation measured in rhesus monkey”

*International Journal of Radiation Biology* **70** (1996) 309-317

Mancusi D., Bertucci A., Gialanella G., Grossi G., Manti L., Pugliese M., Rusek A., Scampoli P., Sihver L., Durante M.

“Comparison of aluminum and lucite for shielding against 1GeV protons”

*Advances in Space Research* **40** (2007) 581-585

Manti L., Bertucci A., Gialanella G., Grossi G., Pignalosa D., Pugliese M., Scampoli P., Durante M.

“Rearrangements in human chromosome 1 visualized by arm-specific probes in the human progeny of blood lymphocytes exposed to iron ions”

*Advances in Space Research* **39** (2007) 1066-1069

Martin R. H., Rademaker A., Hildebrand K., Barnes M., Artheu K., Rigrose T., Brown I. S., Douglas G.

“A comparison of chromosomal aberrations induced by *in vivo* radiotherapy in human sperm and lymphocytes”

*Mutation Research* **226** (1989) 21-30

Micci F., Teixeira M. R., Dietrich C. U., Saeter G., Bjerkehagen B., Heim S.

“Combined RxFISH/G-banding allows refined karyotyping of solid tumors”

*Human Genetics* **104** (1999) 370-375

Miller K., Schendel D. J., Wank R.

“Cell-growth kinetics and karyotype analysis of human memory lymphocytes responding to alloantigen and mitogen”

*Immunobiology* **159** (1981) 269-282.

Moshous D., Callebaut I., de Chasseval R., Corneo B., Cavazzana-Calvo M., Le Deist F., Tezcan I., Sanal O., Bertrand Y., Philippe N., Fischer A., de Villartay J.P.

“Artemis a novel DNA double- strand break repair /V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency”

*Cell* **105** (2001) 177-186

NASA

“Strategic Program Plan for Space Radiation Health Research”

NASA, Washington DC (1998)

Parada L., Misteli T.

“Chromosome positioning in the interphase nucleus”

*Trends in Cell Biology* **12** (2002) 425-432.

Pierce A. J., Hu P., Han M., Ellis N., Jasin M.

“Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mammalian cells”

*Genes and Development* **15** (2001) 3237-3242

Preston D. L., Shimizu Y., Pierce D. A., Suyama A., Mabuchi K.

“Studies of mortality of atomic bomb survivors. Report 13: solid cancer and noncancer disease mortality”

*Radiation Research* **160** (2003) 381-407

Ramalho A. T., Nascimento A. C. H.

“The fate of chromosomal aberrations in <sup>137</sup>Cs-exposed individuals in the Goiania radiation accident”

*Health Physics* **60** (1991) 67-70

Rodrigues A. S., Oliveira N. G., Monteiro Gil O., Leonard A., Rueff J.

“Use of cytogenetic indicators in radiobiology”

*Radiation Protection Dosimetry* **115** (2005) 455-460

Roots R., Holley W., Chatterjee A., Rachal E, Kraft G.

“The influence of radiation quality on the formation of DNA breaks”

*Advances in Space Research* **9** (1989) 45-55

Rothkamm K., Lobrich M.

“Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low X-rays doses”

*Proceeding of National Academy of Science* **100** (2003) 5057-5062

Sachs R. K., Hahnfeld P., Brenner D. J.

“The link between low-LET dose-response relations and the underlying kinetics of damage production/repair/misrepair”

*International Journal of Radiation Biology* **72** (1997) 351-374.

Sasaki M. S., Takatsuji T., Ejima Y., Kodama S., Kido C.

“Chromosome aberration frequency and radiation dose to lymphocytes by alpha-particles from internal deposit of Thorotrast”

*Radiation and Environmental Biophysics* **26** (1987) 227-238.

Sasaki M. S., Takatsuji T., Ejima Y.

“Commentary: The F value cannot be ruled out as a chromosomal fingerprint of radiation quality”

*Radiation Research* **150** (1998) 253-258.

Sato T., Sihver L., Iwase H., Nakashima H., Niita K.

“Simulation of an accelerator-based shielding experiment using the particle and heavy-ion transport code system PHITS”

*Advances in Space Research* **35** (2005) 208-213



Savage J. R. K

“A brief survey of aberration origin theories”

*Mutation Research* **404** (1998) 139-147

Savage J.R.K, Simpson P. J.

“On the scoring of FISH-"painted" chromosome-type exchange aberrations”

*Mutation Research* **307** (1994) 345-353.

Schwartz J.L., Hsie A.W.

“Genetic and cytogenetic markers of exposure to high-linear energy transfer radiation”

*Radiation Research* **148** ()1997 87-92

Simpson P. J., Savage J.R.K.

“FISH “painting” patterns resulting from complex exchanges”

*Mutation Research* **312** (1994) 51-60

Simpson P. J., Savage J.R.K.

“Dose-response curves for simple and complex chromosome aberrations induced by X-rays and detected using fluorescence in situ hybridization”

*International Journal of Radiation Biology* **69** (1996) 429-436

Smith L. E., Nagar S., Kim G. J., Morgan W. F.

“Radiation-induced genomic instability: radiation quality and dose response”

*Health Physics* **85** (2003) 23-29

Stephan G., Diener A., Vogl T.

“Chromosome aberrations in peripheral lymphocytes of patients irradiated with 15-MeV-photons for Morbus Hodgkin”

*Strahlenther Onkol.* **166** (1990) 460-465.

Stephan G., Oestreicher U.

“An increased frequency of structural chromosome aberrations in person present in the vicinity of Chernobyl during and after the reactor accident”

*Mutation Research* **223** (1989) 7-12

Steinstrasser A., Kemmer W.

“Biophysical investigations of dose-effects relationship in chromosome aberrations of human lymphocytes caused by thorotrast deposit. II. Biological and medical aspects”

*Radiation Environmental Biophysics* **19** (1981) 17-28

Schwartz J. L., Hsie A. W.

“Genetic and cytogenetic markers of exposure to high-linear energy transfer radiation”

*Radiation Research* **148** (1997) S87-92.

Stephan G, Schneider K, Panzer W, Walsh L, Oestreicher U.

“Enhanced yield of chromosome aberrations after CT examinations in paediatric patients”

*International Journal of Radiation Biology* **83** (2007) 281-287

Tawn E. J., Whitehouse C. A.

“Chromosome intra- and inter-changes determined by G-banding in radiation workers with in vivo exposure to plutonium”

*Journal of Radiological Protection* **25** (2005) 83-88

Testard I., Dutrillaux B., Sabatier L.

“Chromosomal aberrations induced in human lymphocytes by high.LET irradiation”

*International Journal of Radiation Biology* **72** (1997) 423-433

Thierens H., Vral A., Barbe M., Aousalah B., De Ridder L.

“A cytogenetic study of nuclear power plant workers using the micronucleus-centromere assay”

*Mutation Research* **445** (1999) 105-111

Tucker J. D., Morgan W. F., Awa A. A., Bauchinger M., Blakey D., Cornforth M. N., Littlefield L. G., Natarajan A. T., Shasserre C.

“PAINT: a proposed nomenclature for structural aberrations detected by whole chromosome painting”

*Mutation Research* **347** (1995) 21-24

Ulsh B., Hinton T. G., Congdon J. D., Dugan L. C., Whicker F. W., Bedford J. S.  
“Environmental biodosimetry: a biologically relevant tool for ecological risk assessment and biomonitoring”

*Journal of Environmental Radioactivity* **66** (2004) 121-139

Ulsh B. A., Mühlmann-Díaz M. C., Whicker F. W., Hinton T. G., Congdon J. D., Bedford J. S.

“Chromosome translocations in turtles: a biomarker in a sentinel animal for ecological dosimetry.”

*Radiation Research* **153** (2000) 752-759

Ulsh B. A., Whicker F. W., Congdon J. D., Bedford J. S., Hinton T. G.

“Chromosome translocations in *T. Scripta*: the dose-rate effect and in vivo lymphocyte radiation response”

*Radiation Research* **155** (2001) 63-73

Weterings E., van Gent D. C.

“The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synapsis”

*DNA Repair* **3** (2004) 1425-1435

Wolbarst A. B., Bloom P. F., Chan D., Cherry R.N. Jr, Doehnert M., Fauver D., Hull H. B., MacKinney J. A., Mauro J., Richardson A. C. B., Zaragoza L.,

“Sites in the United States contaminated with radioactivity”

*Health Physics* **77** (2000) 247-260

Veiga–Menoncello A. C. P., Lima A. P., Recco-Pimentel S. M.

“Cytogenetic analysis of four central Amazonian species of *Colostethus* (Anura – Dendrobatidae) with a diploid complement of 22 chromosomes”

*Hereditas* **139** (2003) 189-198

Vinogradov A. E.

“Genome size and GC-Percent in vertebrates as determined by flow cytometry: the triangular relationship.

*Cytometry* **31** (1998) 100-109

Vinogradov A. E., Chubinishvili A. T.

“Genome reduction in Hemiclonal frog *Rana esculenta* from radioactively contaminated area”

*Genetics* **151** (1999) 1123-1125

Vral A., Thierens H., De Ridder L.

“*In vitro* micronucleus-centromere assay to detect radiation-damage induced by low doses in human lymphocytes”

*International Journal of Radiation Biology* **71** (1997) 61-68

Wu H., George K., Willingham V., Cucinotta F. A.

“Comparison of chromosome aberration frequencies in pre- and post-flight astronauts lymphocytes irradiated in vitro with gamma rays”

*Physica Medica* **17** (2001) 229-231

Zampieri Silva A. P., Haddab C. F. B., Kasahara S.

“Chromosome banding in *Macrogenioglottus Alipioi* carvalho, 1946 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae), with comments on its taxonomic position”

*Boletim do Museu Nacional, Rio de Janeiro, Brazil* **499** (2003) 1-9

Zhang X., Succi J., Feng Z., Prithivirajsingh S., Story M. D., Legerski R. J.

“Artemis is a phosphorylation target of ATM and ATR and is involved in the G2/M DNA damage checkpoint response”

*Molecular and Cellular Biology* **24** (2004) 9207-9220.

## ***Appendice:***

### **Protocolli**

#### **Preparazione terreno di coltura per linfociti**

##### **Preparativi:**

- Scongellare Fetal Bovine o Fetal Calf Serum
- Scongellare penicillina/streptomicina
- Reidratare PHA (polvere 4°C) in 10 mL di acqua bidistillata, conservare a -20°C
- Soluzione Sodio Eparina -283.7 mg di sodio eparina (polvere 176.2 unità/mg) in 5 mL di PBS 1X, conservare a 4°C

##### **Ingredienti** (Per 500mL di terreno ed in condizioni di sterilità)

- A 500 mL di terreno Gibco RPMI 1640 (CON L-glutamina) vanno aggiunti:
- 100 mL di siero
- 5 mL di penicillina/streptomicina
- 0.5 mL di sodio eparina
- 5 mL di PHA

**Filtrare il terreno e conservarlo a 4°C per max 1 mese ed a -20°C per un max di 6 mesi.**

#### **Raccolta delle metafasi (Harvest)**

**Soluzioni:**

- Colcemid della Gibco (10 µg/µL)
  - Soluzione ipotonica- Cloruro di Potassio 0.075 M
  - Carnoy- 3:1 Metanolo/Acido Acetico
- 
- 1) Dopo 48 ore di incubazione a 37°C, aggiungere 0.2 mL di Colcemid a ciascuna coltura di 10 mL agitando delicatamente il tubo, per una concentrazione finale di 0.2 µg/mL ed incubare nuovamente .
  - 2) Dopo 2 ore di incubazione a 37°C, trasferire il contenute dalle fiasche ad un tubo Falcon e centrifugare a 2000 rpm per 5 min. Si ottiene un pellet rosso.
  - 3) Rimuovere il sopranatante con una pipetta pasteur lasciando ½ mL al di sopra del pellet. Agitare delicatamente per mischiare.
  - 4) Risospendere il pellet in 1 mL di soluzione ipotonica preriscaldata a 37°C. Fra partire il timer regolato a 20 min. Assicurarsi che i grumi siano sciolti agitando con una pipetta non troppo vigorosamente per evitare di danneggiare le cellule.
  - 5) Aggiungere altri 8 mL si soluzione ipotonica aciascun tubo.
  - 6) Incubare a 37°C per il tempo che resta dei 20 min.
  - 7) Aggiungere 2 mL di fissativo (Carnoy) preparato al momento e mischiare lentamente aiutandosi con una pipetta. Il liquido diventa nero.
  - 8) Centrifugare a 2000 rpm per 5 min, si ottiene un pellet nero.
  - 9) Rimuovere il sopranatante con una pipetta e mescolare il pellet.

- 10) Aggiungere Carnoy fino ad un volume finale complessivo di 10 mL nel tubo. Mischiare e lasciare per 20 min a 4°C
- 11) Centrifugare a 2000 rpm per 5 min. Il pellet è ora marrone. 12) Rimuovere il sopranatante, aggiungere 5 mL di fissativo, mescolare e centrifugare di nuovo. Si ottiene un pellet bianco; nel caso in cui dovesse presentarsi ancora sporco, si possono fare ulteriori sciacqui in Carnoy ripetendo il punto 8.
- 13) A questo punto i campioni possono essere conservati in freezer a -20 °C fino alla preparazione dei vetrini.

### Preparazione di PCC

#### **Preparativi:**

- Sospendere 10 µg di Calyculina A in 100 µL di EtOH al 100% per ottenere calyculina A 0.1M.

**Attenzione:** non accendere il flusso laminare della cappa sterile.

- 1) Aggiungere 5 µL di calyculina A 0.1M alla fiasca contenente linfociti e terreno di coltura.
- 2) Incubare la fiasca per 45 min a 37°C.
- 3) Procedere con la raccolta dei linfociti.

#### Squash

#### **Soluzioni:**

**Carnoy:** 3:1 Metanolo/Acido Acetico

1. Immergere i vetrini in acqua bidistillata fresca e preriscaldarli a 37°C in un bagno termico
2. Prendere il campione dal freezer, eliminare il vecchio fissativo e risospendere il campione in Carnoy fresco.
3. Centrifugare il campione a 2000 rpm per 5 minuti.
4. Eliminare il surnatante e risospendere le cellule in fissativo fresco finché la soluzione non diventa opaca.
5. Con una pipetta Pasteur aspirare qualche microlitro di soluzione.
6. Prendere un vetrino preriscaldato e lasciarvi cadere la soluzione da un'altezza di circa 20 cm. Il vetrino deve essere inclinato di circa 45° rispetto alla verticale. Fare in modo che la sospensione si distribuisca bene sul vetrino.
7. Far asciugare il vetrino all'aria, possibilmente in assenza di polvere.
8. Osservare i risultati al microscopio a contrasto di fase. La densità cellulare non dovrebbe essere troppo bassa. Nel caso in cui risultasse tale centrifugare nuovamente il campione e risospendere le cellule in un volume minore di fissativo. Nel caso in cui la densità cellulare risulti troppo elevata, diluire la sospensione con dell'altro fissativo \*.
9. Far invecchiare i vetrini al buio per un numero di giorni dipendente dalla temperatura ambientale (es. ~ 4-5 gg quando la  $T_{amb}$  è pari a 20-30 °C, ~ 7 gg quando la  $T_{amb}$  risulta essere < 20 °C).

\* Una buona densità cellulare si ottiene quando guardando il vetrino al MO con l'obiettivo 10X si possono contare ~ 4-5 metafasi in un unico campo.



FISH Linfociti  
(sonde Whole Chromosomes)

**Soluzioni:**

**2XSSC/0,1%NP-40:** miscelare 100 mL di 20X SSC (pH 5,3) con 850 mL di acqua bidistillata. Aggiungere 1 mL di NP-40. Misurare il pH e controllare che sia compreso tra 7,0-7,2 ed eventualmente aggiustarlo utilizzando NaOH. Aggiungere acqua bidistillata fino a raggiungere il volume finale di 1L. Conservare a temperatura ambiente.

**0.4XSSC 0.3% NP-40:** miscelare 20 mL di 20X SSC (pH 5,3) con 950 mL di acqua bidistillata. Aggiungere 3 mL di NP-40. Mescolare bene fino a quando il NP-40 si sia disciolto completamente, aggiungere acqua bidistillata fino a raggiungere il volume finale di 1L. Accertarsi che il pH sia pari a 7,0-7,5 ed eventualmente aggiustarlo utilizzando NaOH. Conservare a temperatura ambiente.

Ibridizzazione in Situ in Fluorescenza.

1. Prelevare 8  $\mu$ L XCP1 (verde) e 8  $\mu$ L XCP2(rossa). Nel caso in cui, come spesso accade con tali quantità la sonda verde non mostri un'elevata capacità di ibridizzazione, modificare le quantità di sonda da prelevare nel seguente modo: 10 $\mu$ L di XCP1 (verde) e 6  $\mu$ L di XCP2 (rossa).
2. Passare al vortex e microcentrifugare la soluzione delle sonde.
3. Sistemare con una pipetta Gilson la soluzione delle sonde al centro della metà del vetrino, su cui sono depositati i linfociti.

4. Coprire il vetrino con un coprivetrino di vetro (24x40 mm<sup>2</sup>) e, con l'aiuto delle dita, distribuire uniformemente la sonda eliminando le bolle d'aria che possono formarsi.
5. Applicare uno strato sottile di rubber cement con una siringa ai bordi del coprivetrino.
6. Impostare sull'HyBrite il programma per l'ibridizzazione della sonda in uso: 72°C per 3 min per denaturare il DNA e 37°C per un tempo che può variare tra 12-15 h per l'ibridizzazione.
7. Preriscaldare in bagno termico a 72 °C la soluzione 0.4XSSC 0.3% NP40 in una couplin jar.
8. Terminata l'ibridizzazione, rimuovere i vetrini dall'HyBrite, eliminare il rubber cement e il coprivetrino dai vetrini.
9. Immergere il vetrino per 2 min nella soluzione 0.4XSSC 0.3% NP40 sciacquandolo bene.
10. Immergere per 2 min il vetrino in una seconda couplin jar contenente 2XSSC 0.1% NP40 a temperatura ambiente.
11. Lasciare asciugare all'aria, evitando l'esposizione alla luce.
12. Passare al vortex e microcentrifugare il tubo di colorante.
13. Prelevare 12µl di DAPI con una Gilson e depositarli sul vetrino.
14. Coprire il vetrino con un coprivetrino di vetro (24x40 mm<sup>2</sup>) schiacciando le bolle d'aria che eventualmente possono formarsi.

Tutta la procedura deve essere effettuata in assenza di luce diretta, dal momento che le sonde fluorescenti decadono se esposte alla luce.

FISH Linfociti  
(sonde X-CAP)

**Soluzioni:**

**2 X SSC 0,1% NP-40:** miscelare 100 mL di 20X SSC (pH 5,3) con 850 mL di acqua bidistillata. Aggiungere 1 mL di NP-40. Misurare il pH e controllare che sia compreso tra 7,0-7,2 ed eventualmente correggerlo utilizzando NaOH. Aggiungere acqua bidistillata fino a raggiungere un volume finale di 1L. Conservare a temperatura ambiente.

**0.4 X SSC 0.3% NP-40:** miscelare 20 mL di 20X SSC (pH 5,3) con 950 mL di acqua bidistillata. Aggiungere 3 mL di NP-40. Mescolare bene fino a quando l' NP-40 si sia disciolto completamente, aggiungere acqua bidistillata fino a raggiungere un volume finale di 1L. Accertarsi che il pH sia pari a 7,0-7,5 ed eventualmente correggerlo utilizzando NaOH. Conservare a temperatura ambiente.

- 1) Prelevare con una pipetta Gilson 8  $\mu$ L di X-CAP del braccio p (verde) e 4  $\mu$ L di X-CAP del braccio q (rossa) e deporli in una eppendorf di plastica.
- 2) Microcentrifugare la soluzione delle sonde.
- 3) Mediante la pipetta Gilson prelevare la soluzione delle sonde e posizionarla al centro del vetrino da ibridizzare.
- 4) Coprire il vetrino con un vetrino coprioggetti di vetro (24 x 24 mm<sup>2</sup>) e schiacciare le bolle eventualmente presenti.

- 5) Applicare, mediante una siringa, uno strato sottile di rubber cement ai bordi del vetrino coprioggetti.
- 6) Impostare sull'HyBrite il programma per l'ibridizzazione: 72 °C per 3 min per denaturare il DNA e 37 °C per 7 h per l'ibridizzazione.
- 7) Preriscaldare a 72 °C la soluzione 0.4 X SSC 0.3% NP40 in una coplin jar posta all'interno di un bagnetto termico.
- 8) Terminata l'ibridizzazione, rimuovere i vetrini dall'HyBrite, eliminare il rubber cement e il vetrino coprioggetti.
- 9) Immergere il vetrino per 2 min nella soluzione 0.4 X SSC 0.3% NP40.
- 10) Immergere il vetrino per 2 min nella soluzione 2 X SSC 0.1% NP40 a temperatura ambiente.
- 11) Lasciare asciugare all'aria, evitando l'esposizione alla luce.
- 12) Prelevare con una Gilson 12µl di DAPI e depositarli sul vetrino.
- 14) Porre un vetrino coprioggetti (24 x 24 mm<sup>2</sup>) e schiacciare le bolle d'aria eventualmente presenti.

## Colture di linfociti di anfibio

### **Soluzioni:**

- terreno di coltura per linfociti
- soluzione acquosa di MS-222 0.05%
- Etanolo al 90%

### **Procedura:**

- 1) Immergere gli animali nella soluzione contenente MS-222 fino a quando non se ne osserva l'avvenuta anestetizzazione
- 2) Introdurre nella siringa 1mL di terreno di coltura e poi svuotarla completamente
- 3) Disinfettare la cute dell'animale con etanolo
- 4) Effettuare il prelievo
- 5) Mettere in coltura il sangue immediatamente dopo il prelievo ed incubare a 26°C per 4 giorni

## Raccolta delle metafasi (Harvest)

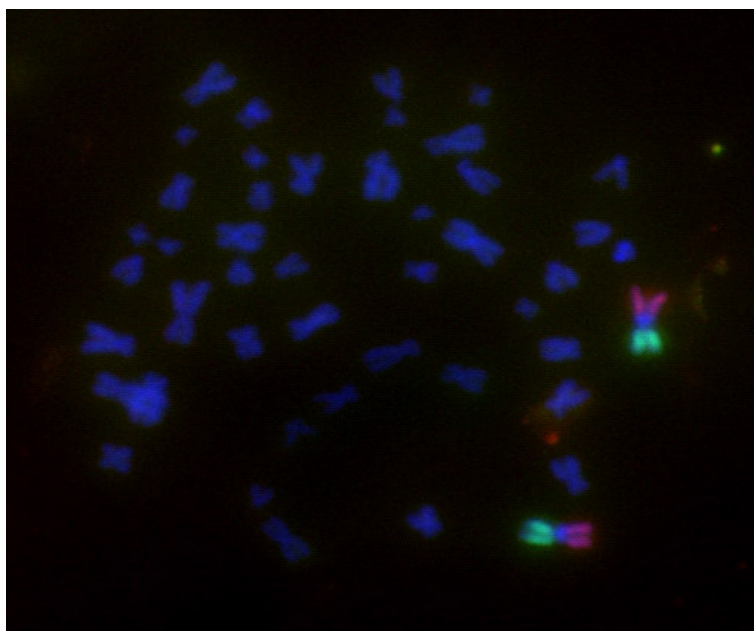
### **Soluzioni:**

- Colcemid della Gibco (10 µg/µL)
- Soluzione ipotonica- Cloruro di Potassio 0.075 M
- Carnoy- 3:1 Metanolo/Acido Acetico

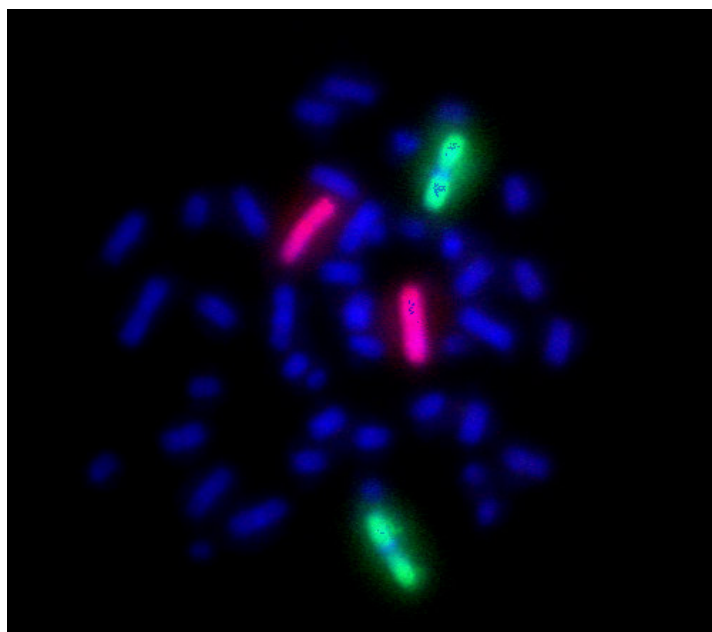
- 1) Dopo 4 giorni di incubazione a 26°C, aggiungere 60 µL di Colcemid a ciascuna coltura di 2.5 mL agitando delicatamente il tubo, per una concentrazione finale di 0.2 µg/mL ed incubare nuovamente .
- 2) Dopo 3 ore di incubazione a 26°C, trasferire il contenute dalle fiasche ad un tubo Falcon e centrifugare a 1000 rpm per 10 min. Si ottiene un pellet rosso.
- 3) Rimuovere il sopranatante con una pipetta pasteur lasciando ½ mL al di sopra del pellet. Agitare delicatamente per mischiare.
- 4) Risospendere il pellet in 1 mL di soluzione ipotonica preriscaldata a 26°C. Fra partire il timer regolato a 30 min. Assicurarsi che i grumi siano sciolti agitando con una pipetta non troppo vigorosamente per evitare di danneggiare le cellule.
- 5) Aggiungere altri 4 mL si soluzione ipotonica a ciascun tubo.
- 6) Incubare a 26°C per il tempo che resta dei 30 min.
- 7) Aggiungere 1 mL di fissativo (Carnoy) preparato al momento e mischiare lentamente aiutandosi con una pipetta. Il liquido diventa nero.
- 8) Centrifugare a 1000 rpm per 10 min, si ottiene un pellet nero.
- 9) Rimuovere il sopranatante con una pipetta e mescolare il pellet.
- 10) Aggiungere Carnoy fino ad un volume finale complessivo di 4 mL nel tubo. Mischiare e lasciare per 20 min a 4°C
- 11) Centrifugare a 1000 rpm per 10 min. Il pellet è ora marrone.
- 12) Rimuovere il sopranatante, aggiungere 4 mL di fissativo, mescolare e centrifugare di nuovo. Si ottiene un pellet bianco; nel caso in cui dovesse presentarsi ancora sporco, si possono fare ulteriori sciacqui in Carnoy ripetendo il punto 8.

13) A questo punto i campioni possono essere conservati in freezer a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  fino alla preparazione dei vetrini.

## *Tavole Fotografiche*

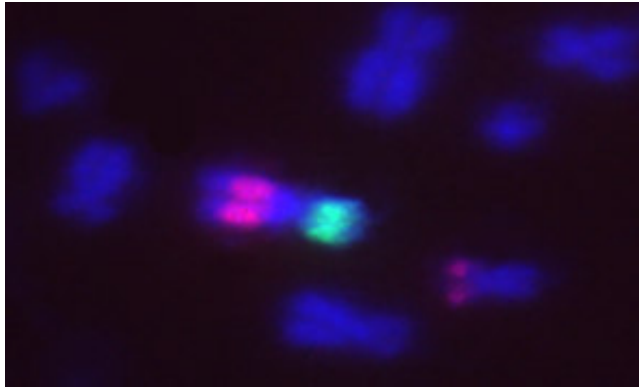


*Figura 1* : Metafase non aberrata, la coppia di cromosomi 1 è visualizzata con sonde X-CAP

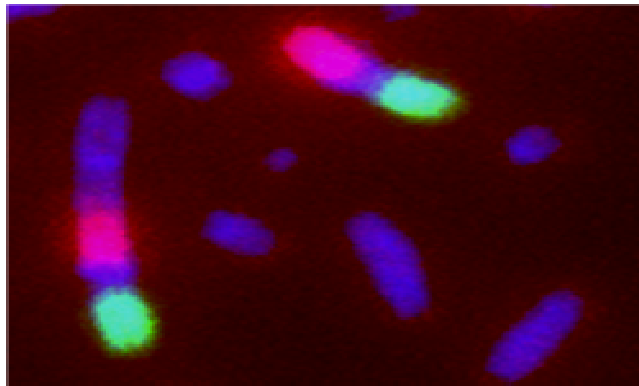


*Figura 2* : PCC che mostra tutti i cromosomi non aberrati. In verde è visibile la coppia di cromosomi 1 ed in rosso la coppia 2.

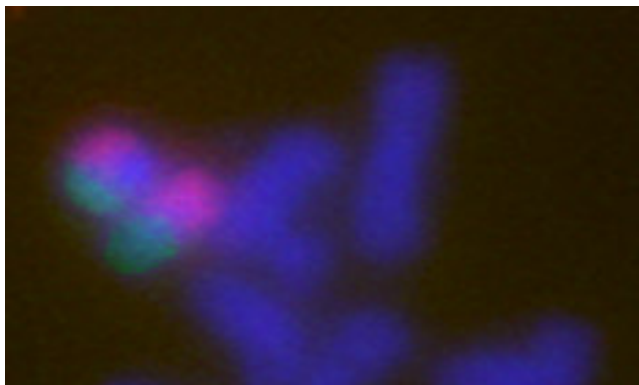




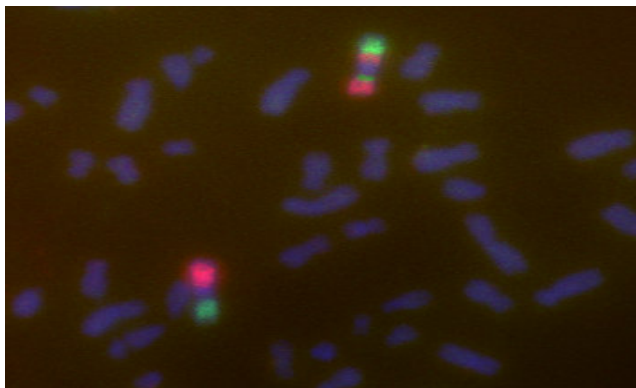
*Figura 3:* Traslocazione reciproca della regione terminale del braccio q del cromosoma 1, visualizzato con sonde X-CAP.



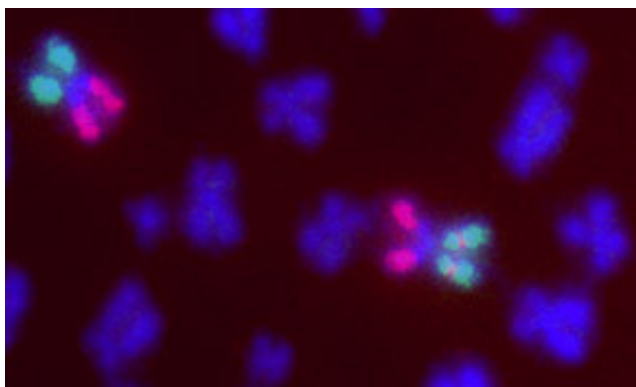
*Figura 4:* Dicentrico incompleto, visualizzato con sonde X-CAP, che coinvolge il braccio q del cromosoma libridizzato ed un cromosoma colorato in DAPI.



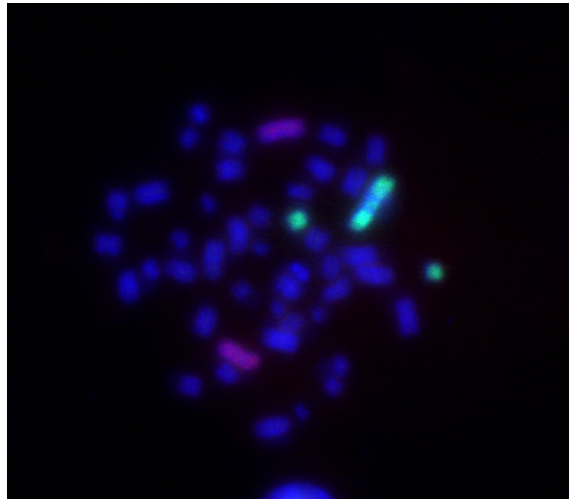
*Figura 5:* Ring completo, visualizzato con sonde X-CAP. il cromosoma ibridizzato è il cromosoma 1



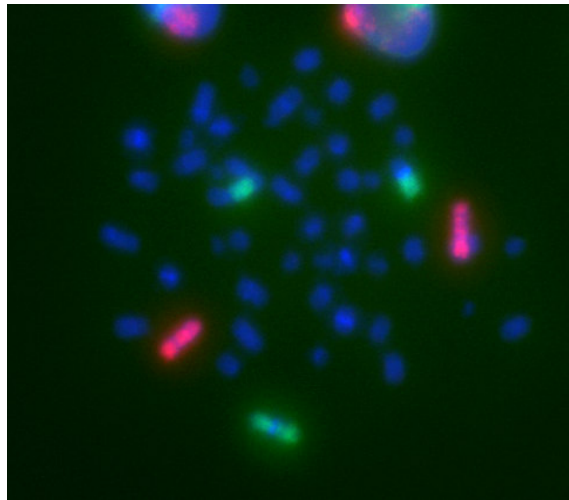
*Figura 6:* Inversione pericentrica completa, visualizzata con sonde X-CAP.  
Il cromosoma ibridizzato è il cromosoma 1



*Figura 7:* Interscambio complesso, visualizzata con sonde X-CAP.  
Il cromosoma ibridizzato è il cromosoma 1



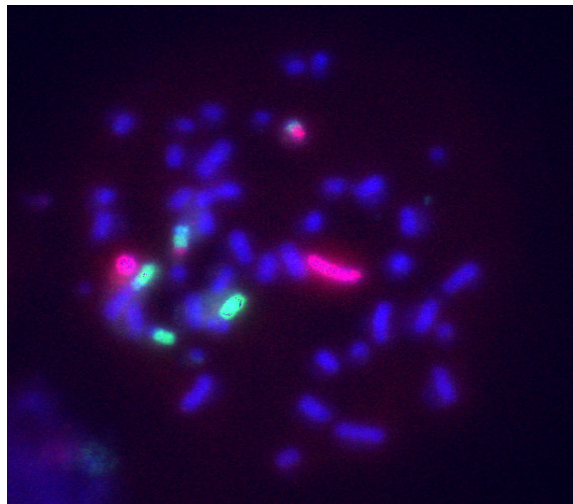
*Figura 8:* Dicentrico incompleto (verde), visualizzato con sonde “whole chromosome”, formatosi dallo scambio tra i due cromosomi 1 e visualizzato con sonde whole chromosome.



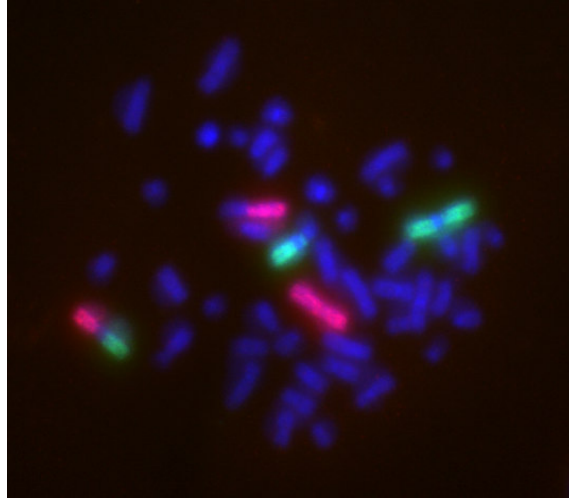
*Figura 9:* Traslocazione completa, visualizzato con sonde “whole chromosome”, avvenuta tra uno dei cromosomi della coppia 1 (verde) ed uno dei cromosomi controcolorato in DAPI.



*Figura 10:* Ring incompleto, visualizzato con sonde “whole chromosome”, originatosi da una doppia rottura a carico di uno dei cromosomi della coppia 2 (rosso), sono anche visibili i due frammenti acentrici.



*Figura 11:* Scambio complesso, visualizzato con sonde “whole chromosome”, che coinvolge uno dei cromosomi della coppia 2 (rosso) ed entrambi i cromosomi 1 (verde), nell’immagine è anche visibile un ring (rosso).



*Figura 12:* Scambio complesso, visualizzato con sonde “whole chromosome”, avvenuto tra uno dei cromosomi della coppia 1 (verde), uno della coppia 2 (rosso) ed uno dei cromosomi controcolorato in DAPI.