

Università degli Studi di Napoli “Federico II”



Dottorato in
Biologia Avanzata

- 22° ciclo -

Effetti citogenetici indotti in cellule umane
da ioni pesanti relativistici

Candidata: Diana Pignalosa

Tutor:

Prof. Luciano Gaudio

Revisore scientifico:

Prof. Marco Durante

Coordinatore del corso di dottorato:

Prof. Luciano Gaudio

anno accademico 2009 – 2010

Effetti citogenetici indotti in cellule umani da ioni pesanti relativistici

Indice

Introduzione	pag. 4
Capitolo 1 : Effetti biologici delle radiazioni ionizzanti	pag. 8
1.1 Interazione dei fotoni con la materia	pag. 9
1.2 Interazione delle particelle cariche con la materia	pag. 12
1.3 LET e struttura di traccia degli ioni pesanti	pag. 16
1.4 Azione diretta e indiretta	pag. 18
1.5 Dose e intensità di dose	pag. 20
1.6 Ioni pesanti nello spazio extraterrestre	pag. 21
1.7 Effetti biologici della radiazione	pag. 24
1.8 RBE e Dose equivalente	pag. 26
Capitolo 2 : Aberrazioni cromosomiche radioindotte	pag. 29
2.1 Meccanismi di riparazione e induzione delle aberrazioni cromosomiche	pag. 30
2.2 Metodiche di studio delle aberrazioni cromosomiche	pag. 33
2.3 Classi di aberrazioni cromosomiche	pag. 37
2.3.1 Delezioni terminali	pag. 38
2.3.2 Interscambi	pag. 39
2.3.3 Intrascambi	pag. 42
2.3.4 Scambi complessi	pag. 45
2.4 Aberrazioni cromosomiche come marcatori dell'esposizione a radiazione	pag. 45
2.5 Aberrazioni cromosomiche indotte da ioni pesanti	pag. 49
Capitolo 3 : Tematiche affrontate	pag. 54

3.1.1	Intrascambi come indice della qualità della radiazione	pag. 54
3.1.2	Progetto di esperimento	pag. 61
3.2.1	Bioindicatori per il rischio di cancro alla tiroide	pag. 63
3.2.2	Progetto di esperimento	pag. 65
3.3.1	Topologia del nucleo in interfase e spettro delle aberrazioni cromosomiche	pag. 66
3.3.2	Progetto di esperimento	pag. 68
Capitolo 4 : Sistemi sperimentali		pag. 72
4.1	Sistema biologico: i linfociti umani del sangue periferico	pag. 72
4.1.2	Sistema biologico: cellule della linea HTori-3	pag. 73
4.1.3	Sistema biologico: fibroblasti AG1522	pag. 74
4.2	Macchina a raggi X	pag. 75
4.3	Acceleratori di ioni pesanti	pag. 77
4.4	Ibridizzazione fluorescente in situ o FISH	pag. 78
4.5	Microscopio a fluorescenza e sistemi di acquisizione delle immagini.	pag. 80
4.6	Programmi per l'analisi delle immagini cromosomiche	pag. 84
Capitolo 5 : Risultati sperimentali e discussione		pag. 87
5.1	Fattore F	pag. 87
5.2	Bioindicatori per il rischio di cancro alla tiroide	pag. 98
5.2.1	Topologia del nucleo in interfase e spettro delle aberrazioni cromosomiche Interscambi	pag. 102
Capitolo 6 : Conclusioni		pag. 108
Appendice : Protocolli sperimentali		pag. 112
Bibliografia		pag. 114
Ringraziamenti		pag. 128

Introduzione

L'obiettivo principale di questo lavoro di tesi sperimentale è lo studio degli effetti biologici indotti dopo esposizione a radiazione densamente ionizzante. L'interesse scientifico su cui si fonda questa analisi si origina come conseguenza alle scarse conoscenze che si hanno in materia.

La radiazione densamente ionizzante (definita anche radiazione di alto LET) è caratteristica dello spazio extraterrestre e costituisce il principale fattore di rischio per i viaggi interplanetari. La colonizzazione della Luna e di altri pianeti, primo tra tutti Marte, sono tra i principali obiettivi di agenzie spaziali nazionali e internazionali, oltre a costituire materia di interesse mondiale. La pianificazione di queste missioni non può prescindere da una conoscenza approfondita dei problemi e dei rischi cui si va incontro nell'attuazione di questi progetti, conoscenza necessaria per la concretizzazione di specifiche contromisure.

La principale incognita legata all'esposizione al campo di radiazione extraterrestre è costituita dal rischio carcinogenetico. Le stime calcolate nelle analisi radioprotezionistiche sono affette da incertezze enormi, stimate tra il 400-1500% del rischio totale (Durante, 2002).

Vi sono due problemi fondamentali che rendono difficile avere un quadro chiaro dei rischi che si intercorrono durante le missioni spaziali.

Il primo è che le stime si basano su conoscenze pregresse, perlopiù fornite da dati epidemiologici. La raccolta più importante di informazioni riguardo l'esposizione a radiazione ionizzante proviene dai sopravvissuti alle bombe di Hiroshima e Nagasaki e dalle popolazioni esposte ai disastri nucleari. Le stime di rischio ricavate in questo modo forniscono indicazioni generali, ma non si possono applicare direttamente all'ambiente extraterrestre in quanto la qualità di radiazione (sia intermini di natura che di energia delle particelle) è sostanzialmente diversa nei due casi. Per risolvere questo problema, sono condotti numerosi esperimenti in vitro e in vivo con modelli animali, utilizzando acceleratori in grado di produrre le particelle caratteristiche dello spazio extraterrestre.

Il secondo problema è determinato dalla complessità del fenomeno carcinogenetico. Una stima corretta per il rischio di induzione tumorale è affetta da numerose incertezze riguardanti la variabilità genetica individuale. Da un punto di vista metodologico, un ulteriore problema è dovuto agli ampi tempi di latenza che rendono

difficoltosi gli studi su modelli animali. Un tentativo finalizzato a superare questo problema è l'impiego delle aberrazioni cromosomiche come bioindicatori del rischio.

Fino ad oggi l'unico valido indicatore della dose assorbita e un possibile indicatore del rischio di tumorigenesi è rappresentato dall'analisi delle aberrazioni cromosomiche nei linfociti estratti dal sangue periferico.

Uno studio effettuato dall'ESCH (European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health) ha riportato la correlazione positiva tra il rischio di cancro e le aberrazioni cromosomiche rilevate nei linfociti estratti dai soggetti in esame (Bonassi *et al.*, 2000).

Tale ipotesi è supportata ulteriormente dai numerosi casi di tumori associati a specifiche aberrazioni cromosomiche. Nel 95% dei casi di leucemia mieloide cronica si osserva una traslocazione reciproca tra il cromosoma 9 e il 22 che dà origine al cromosoma Philadelphia, (Stopera *et al.*, 1990). Il linfoma di Burkitt è associato in oltre 75% dei casi anch'esso ad una traslocazione reciproca tra il cromosoma 8 ed il 14 (Lishner *et al.*, 1993).

Per rimediare alle incertezze nel calcolo dei rischi associati alle missioni spaziali, la NASA ha messo a punto da oltre 10 anni un programma di dosimetria biologica utilizzando aberrazioni cromosomiche (Durante, 2005). Per ciascun astronauta sono costruite curve di calibrazione esponendo i campioni di sangue a raggi γ . Al termine della missione tali curve sono utilizzate per convertire la frequenza di aberrazioni cromosomiche in una stima biologica della dose.

Lo studio effettuato in questo lavoro di tesi parte da queste premesse. L'attività si è articolata in 3 linee principali, il cui fattore comune è costituito dall'analisi delle aberrazioni cromosomiche radioindotte.

Nella prima parte del progetto, l'analisi delle aberrazioni cromosomiche è servita per comprendere meglio il ruolo svolto dalla struttura di traccia delle particelle densamente ionizzanti. Lo studio è finalizzato alla comprensione del meccanismo alla base della formazione di una specifica classe di aberrazioni cromosomiche, gli intrascambi, e alla loro possibile dipendenza dal LET. È stato proposto che tali anomalie costituiscano un'impronta della qualità di radiazione (Brenner e Sachs, 1994) in quanto la struttura di traccia e i meccanismi di deposizione dell'energia caratteristici dell'esposizione a radiazione densamente ionizzante ne favorirebbero la formazione. Gli esperimenti sono stati condotti su linfociti umani di sangue periferico. L'analisi è stata effettuata mediante due tecniche di ibridazione in situ con sonde fluorescenti, le

XCAP, specifiche per il cromosoma 1 e la arm specific mFISH, con sonde complementari all'intero genoma umano. Entrambe le tecniche permettono l'analisi di intrascambi inter-braccia quali inversioni pericentriche.

I non corroborano la tesi di una dipendenza dal LET per le aberrazioni di intrascambio semplici, così come proposto. Al contrario, si è osservata una dipendenza dalla qualità della radiazione per intrascambi di tipo complesso.

La seconda tematica affrontata assume uno scopo più applicativo. Lo studio nasce in seguito alla scoperta che i geni responsabili della formazione di uno degli intrascambi della famiglia RET/PTC (anomalie alla base dell'insorgenza del carcinoma papillare tiroideo, PTC) colocalizzano nel nucleo in interfase nel 35% dei casi (Nikiforova *et al.*, 2000). La contiguità di queste regioni geniche, accoppiata alla deposizione di energia caratteristica delle radiazioni di alto LET suggeriscono che questo tipo di radiazione possa risultare più efficace nell'induzione di questa patologia. Partendo da queste premesse si è ipotizzato che la classe degli intrascambi costituisca un indicatore biologico del rischio mediante la quale sia possibile verificare se la radiazione densamente ionizzante è più efficace nell'induzione di cancro alla tiroide. È stata utilizzata la tecnica mBAND per l'osservazione di tali anomalie su cellule della tiroide umana.

Non è stata osservata una differenza significativa nella formazione di intrascambi nei campioni analizzati. I nostri risultati sono a favore dell'ipotesi che la radiazione di alto LET non sia più efficace nell'induzione di cancro alla tiroide.

Nella terza parte del progetto di tesi si è approfondito il ruolo della topologia nucleare nella determinazione del danno biologico. Lo scopo principale è stato valutare se la fluenza non sia un miglior parametro per valutare gli effetti biologici radioindotti rispetto alla dose.

Studi recenti hanno dimostrato che i cromosomi occupano regioni definite con limitata sovrapposizione e che le estremità rotte del DNA hanno poca mobilità in interfase (Jakob *et al.*, 2009). Stabiliti questi presupposti, lo scopo di questa linea del progetto di tesi è stato valutare se la geometria del nucleo cellulare gioca un ruolo fondamentale nella determinazione della quantità, del tipo e della complessità di aberrazioni cromosomiche formate. L'effetto dovuto alla topologia nucleare dovrebbe essere evidente in seguito ad esposizione a radiazione densamente ionizzante, che produce lesioni al DNA estremamente localizzate lungo la traccia della particella carica che attraversa il nucleo. A questo scopo è stato utilizzato un sistema per crescere

fibroblasti umani in una precisa disposizione spaziale. L'esposizione delle cellule è stata effettuata in 3 diverse configurazioni geometriche tenendo fissa la dose o la fluena. L'analisi del danno citogenetico è stata effettuata sull'intero cariotipo mediante la tecnica mFISH.

I risultati ottenuti sono stati molto interessanti. Si è osservata una influenza della topologia nucleare sulla qualità dello spettro di aberrazioni cromosomiche radioindotte, in termini di diversa complessità. La fluena si è inoltre dimostrata un parametro più rappresentativo del danno.

Nel 3 e nel 4 capitolo di questa tesi sono descritte rispettivamente le singole tematiche e le metodologie sperimentali applicate. Una trattazione più approfondita sulle radiazioni densamente ionizzanti e sugli effetti indotti nella materia biologica è data nel capitolo 1. Il secondo capitolo è dedicato alla descrizione delle aberrazioni cromosomiche e delle metodiche per analizzarle. Nel 5 capitolo si presentano e si discutono i risultati osservati. Nell'ultimo capitolo si riassumono le conclusioni del lavoro.

Capitolo 1

Effetti biologici delle radiazioni ionizzanti

Nella materia esposta a radiazione si possono osservare due fenomeni principali: eccitazione e ionizzazione. Nel primo caso, un elettrone in un atomo o in una molecola assorbe una determinata quantità di energia in grado di stabilizzarlo per un definito intervallo di tempo ad un livello energetico maggiore. In seguito si osserva la diseccitazione e cioè il ritorno dell'elettrone nel suo stato fondamentale, accompagnato da emissione di un fotone la cui energia è pari alla differenza tra gli stati energetici coinvolti. L'eccitazione è il tipo di effetto che si riscontra nella materia esposta a radiazione ottica (visibile, UV) e gli atomi e le molecole responsabili dell'assorbimento sono definiti cromofori.

La ionizzazione si osserva quando l'energia rilasciata nel mezzo è superiore all'energia di legame dell'elettrone all'atomo o molecola considerato. Studi recenti hanno calcolato che l'energia di legame dell'elettrone più esterno nella molecola d'acqua è pari a 0.8 eV (Cabral de Couto 2006). L'elettrone viene rilasciato nel mezzo con una velocità pari alla differenza tra l'energia assorbita e la sua energia di legame. Quando l'energia fornita è sufficiente si può osservare la rottura di un legame covalente fra atomi.

In radiobiologia risulta comodo fare una distinzione tra radiazioni ionizzanti e non-ionizzanti. La differenza non è basata sul totale di energia rilasciata nel materiale, bensì sull'entità rilasciata durante una singola interazione. Quando la radiazione rilascia una quantità di energia in grado di vincere le energie di legame degli elettroni ai nuclei o alle molecole cui appartengono si parla di radiazione ionizzante.

Le radiazioni ionizzanti sono ancora suddivise in direttamente e indirettamente ionizzanti. Quando la particella che costituisce la radiazione in esame è in grado di rimuovere elettroni dal mezzo si parla di azione diretta. Alternativamente, quando la ionizzazione viene esplicita da particelle secondarie prodotte dall'interazione della radiazione con la materia si parla di radiazioni indirettamente ionizzanti. Le radiazioni direttamente ionizzanti sono costituite da particelle elettricamente cariche. Esempi sono gli ioni pesanti, i leptoni, come gli elettroni, gli adroni, come i protoni. Le radiazioni indirettamente ionizzanti sono trasportate da particelle prive di carica elettrica, quali i fotoni o i neutroni.

1.1 Interazione dei fotoni con la materia

Raggi X, raggi γ , UV, luce visibile, infrarosso, microonde, onde radio etc., 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. L'insieme di queste forme costituisce lo spettro elettromagnetico.

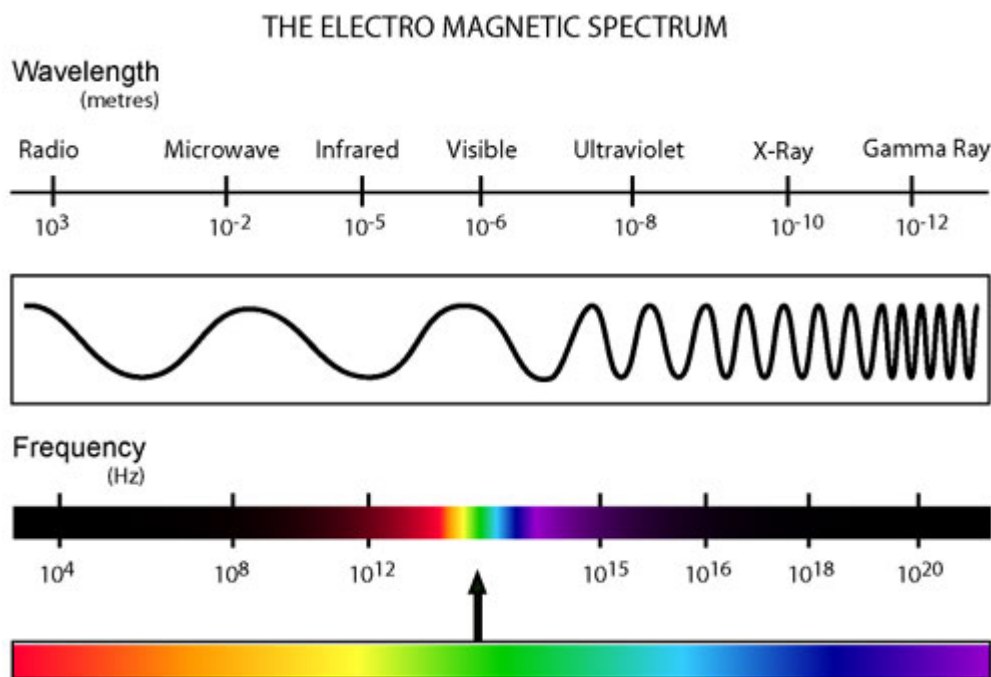


Fig. 1: Lo spettro elettromagnetico

Raggi X e γ , la cui lunghezza d'onda è inferiore ad 1 \AA , sono radiazioni elettromagnetiche ionizzanti. La distinzione fra queste due radiazioni è determinata dal meccanismo con il quale sono generate. I raggi X sono fotoni emessi da elettroni accelerati (*bremstrahlung*) o durante fenomeni di decadimento atomico. I raggi γ sono emessi a seguito di decadimenti nucleari. La radioattività γ si osserva spontaneamente in natura, mentre la radiazione X è in genere prodotta artificialmente.

La materia assorbe la radiazione elettromagnetica ionizzante mediante tre fenomeni principali: **l'effetto fotoelettrico**, **l'effetto Compton** e **la produzione di coppia**. Prevalde l'uno o l'altro effetto in funzione dell'energia della radiazione considerata e della composizione chimica del mezzo assorbente.

Nel caso dell'effetto fotoelettrico l'energia del fotone incidente (E) viene completamente ceduta all'elettrone, che viene espulso con un'energia cinetica pari alla differenza tra l'energia iniziale del fotone e l'energia di legame dell'elettrone (E_0 , binding electron energy).

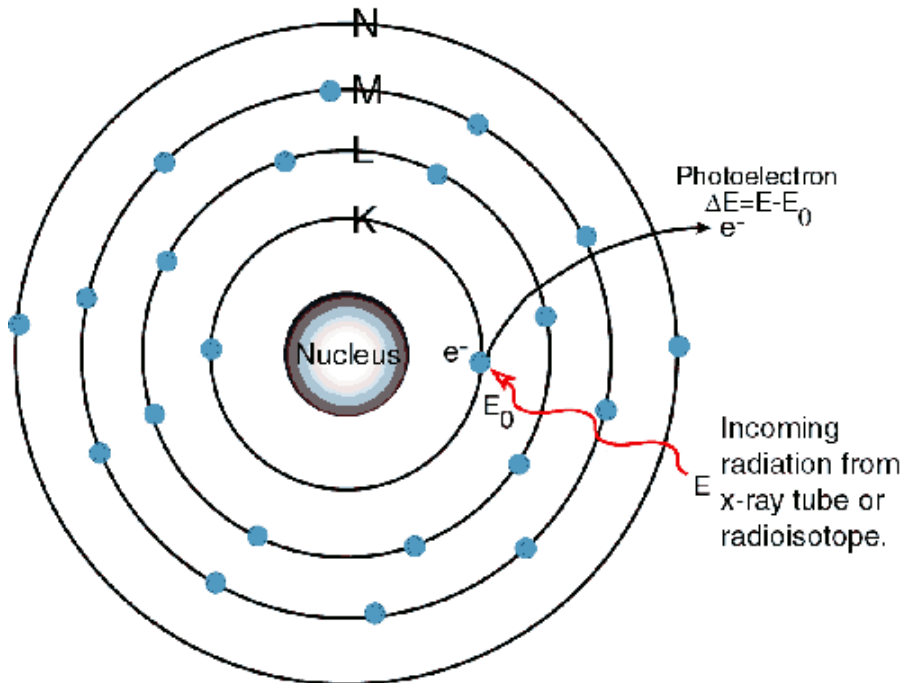


Fig. 2: Meccanismo di assorbimento dell'energia tramite effetto fotoelettrico.

L'effetto fotoelettrico risulta favorito quando l'energia della radiazione è dell'ordine dell'energia di legame degli elettroni, il cui valore, generalmente basso, dipende dalla composizione del mezzo considerato. Le radiazioni di riferimento utilizzate in radiobiologia sono fotoni con energia superiore ai 100 keV, condizione in cui l'effetto fotoelettrico ha poca rilevanza.

Nell'effetto Compton, la radiazione interagisce con elettroni presenti nei gusci esterni degli orbitali atomici o molecolari la cui energia di legame è trascurabile in confronto all'energia del fotone. Quest'ultimo cede parte dell'energia iniziale (E_f) all'elettrone, e risulta deviato dalla sua traiettoria di un angolo θ , correlato all'entità di energia rilasciata. La perdita d'energia varia tra lo 0 e l' 80% in dipendenza da E_f e dalla composizione del bersaglio. La probabilità che avvenga un'interazione è direttamente proporzionale al numero di elettroni presenti nel mezzo, quindi al numero atomico degli atomi costituenti (Z). L'interazione Compton, per unità di spessore attraversato, è quindi più probabile nei materiali pesanti.

Compton Effect

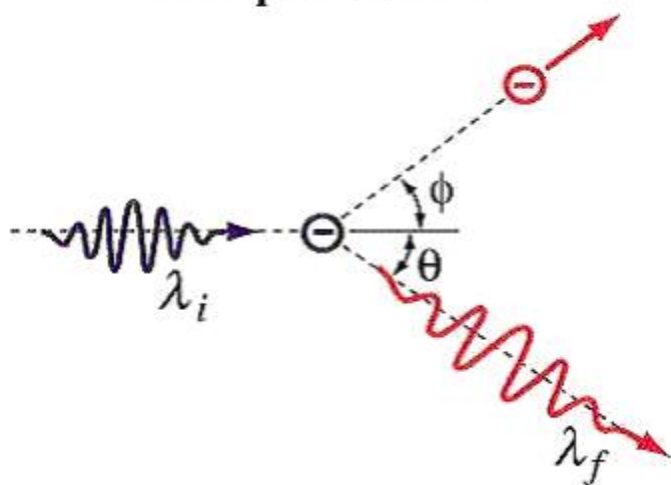


Fig. 3: Assorbimento della radiazione elettromagnetica tramite effetto Compton.

La produzione di coppia è un effetto che si verifica quando la radiazione elettromagnetica possiede energia molto elevata (> 1 MeV). Il fotone, soggetto al campo elettrico generato dai nuclei atomici del mezzo, si trasforma in una coppia elettrone – positrone, ciascuna particella con massa a riposo di 0.511 MeV. Le particelle secondarie così generate ionizzano la materia lungo il loro cammino. Quando l'elettrone esaurisce l'energia cinetica si arresta e viene catturato dagli atomi del mezzo. Al contrario il positrone si annichila con un elettrone generando due fotoni γ con un angolo di 180° , con energia rispettivamente di 0.511 MeV ciascuno.

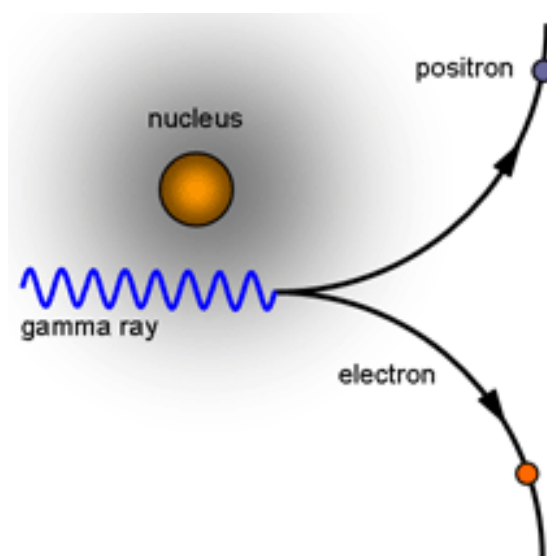


Figura 4: Assorbimento dei fotoni mediante produzione di coppia.

I tre processi coesistono simultaneamente, ma l'intervallo di energia della radiazione considerata determina quale dei tre è l'effetto predominante. Nella maggior parte degli esperimenti di radiobiologia, i campioni biologici risultano esposti a radiazione elettromagnetica con energia fra 0.1 ed 1 MeV, dove risulta prevalente l'interazione Compton.

L'intensità I della radiazione elettromagnetica diminuisce esponenzialmente al crescere della distanza x nel materiale secondo la legge di Lambert-Beer:

$$I(x) = I_0 e^{-\mu x} \quad (1.1)$$

dove μ (cm^{-1}) è il coefficiente di assorbimento, e dipende dal mezzo attraversato e dall'energia della radiazione incidente.

1.2 Interazione delle particelle cariche con la materia

La radiazione direttamente ionizzante è costituita da particelle cariche. Le particelle α (nuclei di elio) e β (elettroni prodotti dal decadimento nucleare) fanno parte della radiazione naturale e rappresentano la componente maggior del fondo di radioattività. Ioni pesanti di alta energia sono presenti nella radiazione cosmica, o possono essere generati negli acceleratori di particelle per usi in fisica o medicina. Come visto per i fotoni, anche le particelle cariche provocano l'emissione di particelle secondarie che possono essere a loro volta direttamente ionizzanti se le energie sono sufficientemente elevate.

Gli ioni interagiscono con la materia principalmente attraverso tre meccanismi: **cattura elettronica, collisione con elettroni atomici, collisioni con nuclei e reazioni nucleari** (Kiefer, 1990). Ioni di bassa energia catturano gli elettroni atomici nel loro campo elettrico, riducendo la loro carica. A medie ed alte energie si osserva la collisione con elettroni atomici: Si tratta di un'interazione di tipo coulombiano in cui, se la forza elettrica esercitata dallo ione è sufficiente, si ha l'espulsione dell'elettrone dall'atomo o molecola. In questo processo gioca un ruolo fondamentale il parametro d'urto, che rappresenta la distanza tra le particelle: quanto più vicino è lo ione alla particella bersaglio, tanto maggiore sarà l'energia rilasciata per interazione di tipo

coulombiano e maggiore sarà l'energia cinetica posseduta dall'elettrone espulso, definito elettrone di knock-out.

Questo processo è responsabile della maggior parte dei danni indotti quando la radiazione ionizzante è costituita da ioni accelerati. La perdita media di energia dello ione per unità di distanza percorsa nel mezzo è rappresentata dalla formula di Bethe-Bloch:

$$-\frac{dE}{dx} = \frac{4\pi e^4}{mc^2} \rho \frac{N_A Z}{A} \frac{z^{*2}}{\beta^2} \left(\log \frac{2m\beta^2 c^2}{I} - \log(1 - \beta^2) - \beta^2 \right) \quad (1.2)$$

ove

m è la massa dell'elettrone a riposo

ρ è la densità del mezzo attraversato

N_A è il numero di Avogadro

Z è il numero atomico del mezzo

A è il peso atomico del mezzo

z^* è la carica efficace dello ione

$\beta = v_{\text{ione}}/c$ è la velocità relativa dello ione

I è il potenziale medio di ionizzazione del mezzo

La carica efficace z^* generalmente non è uguale al numero atomico dello ione, in quanto dipende dalla sua energia e dal mezzo d'interazione. 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^* in acqua, è la formula di Barkas

$$z^* = z \left[1 - e^{\left(-\frac{125\beta}{z^{2/3}} \right)} \right] \quad (1.3)$$

Ciò che si evince dalla formula di Bethe-Bloch è che la perdita media di energia per unità di percorso è indipendente dalla massa dello ione e inversamente

proporzionale al quadrato della sua velocità. Quanto più lo ione è veloce, minore è la probabilità di interagire con gli atomi del mezzo. Pertanto, la perdita d'energia per unità di percorso aumenta con il diminuire della velocità e, in assenza di cattura elettronica, tenderebbe a divergere a basse energie. Poiché però a basse energie z^* diminuisce rapidamente, la perdita di energia raggiunge un massimo in prossimità del punto di arresto dello ione. La curva che descrive questo andamento è detta curva di Bragg ed il picco corrispondente al massimo d'energia rilasciata è detto picco di Bragg.

Questo andamento caratteristico ha dei risvolti importanti nell'impiego degli ioni in radioterapia. Scelta un'opportuna energia iniziale si può fare in modo che la particella rilasci il massimo della dose in corrispondenza del sito ove è localizzato il tumore, massimizzando così gli effetti dannosi arrecati al tessuto malato e preservando il tessuto sano.

A parità di velocità la perdita di energia aumenta con il quadrato della carica dello ione. Ad esempio, una particella α perde 4 volte più energia per unità di percorso di un protone con la stessa velocità.

Dalla formula si evince una dipendenza dal mezzo attraversato, in particolare una diretta proporzionalità con il numero di elettroni per unità di volume. Pertanto, la perdita di energia specifica aumenta al crescere della densità e del rapporto Z/A del mezzo. Ad eccezione dell'idrogeno, il rapporto Z/A è prossimo a $1/2$ per quasi tutti gli elementi chimici; pertanto, la perdita di energia per unità di massa del bersaglio ($-dE/pdx$) dipende poco dal materiale attraversato.

In figura 5 è riportata la dose (proporzionale all'energia rilasciata) in funzione della profondità nel mezzo attraversato. Le radiazioni sparsamente ionizzanti (raggi X e γ) rilasciano l'energia in maniera esponenziale (vedi eq. 1.1), rispetto agli ioni (radiazione densamente ionizzante) caratterizzati dal picco di Bragg.

La massa dell'elettrone è trascurabile se confrontata con quella di uno ione ad alto numero atomico. Ciò fa che la deflessione di uno ione pesante risulta minima lungo il suo percorso. Gli elettroni secondari prodotti dalla radiazione elettromagnetica sono caratterizzati da tracce non lineari a causa degli urti elastici con gli elettroni del bersaglio. Questa differenza è un ulteriore punto a favore per l'impiego di ioni accelerati in radioterapia (Kraft, 1994).

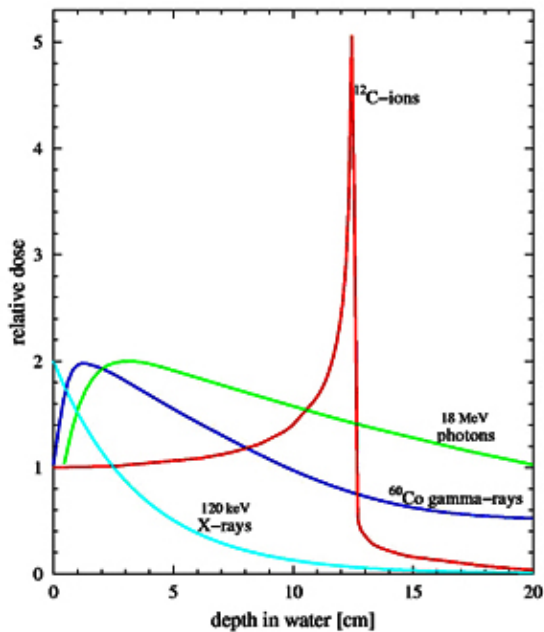


Fig. 5: Andamento della dose in funzione della profondità del mezzo attraversato per differenti tipi di radiazioni.

Anche gli elettroni perdono energia per ionizzazione nel mezzo attraversato, ma in questo caso non è possibile distinguere tra l'elettrone che collide (proiettile) e quello di knock-out. Per gli elettroni accelerati il rilascio di energia per unità di percorso è descritto da una formula approssimata da quella di Bethe-Bloch, che dimostra anche in questo caso la dipendenza dall'inverso della velocità:

$$-dE/dx \propto 1/\beta^2 \quad (1.4)$$

Un ulteriore processo, che si osserva per tutte le particelle cariche accelerate ad elevate energie, particolarmente significativo per gli elettroni, è dovuto alla produzione di radiazione elettromagnetica che si osserva in seguito alla decelerazione della particella carica, causata dall'interazione con il campo elettrostatico degli atomi del bersaglio (radiazione di frenamento o Bremsstrahlung). Si dimostra, infatti, in elettrodinamica che tutte le cariche elettriche accelerate irradiano, emettendo onde elettromagnetiche. Il fenomeno è rilevante quando la massa della particelle cariche è piccola (elettroni) e, ad alte energie, lo spettro di emissione è nella regione dei raggi X. La potenza irradiata P è data dalla formula di Larmor:

$$P = \frac{2e^2}{3c^3} a^2 \quad (1.5)$$

dove a è l'accelerazione della particella. Poiché $F = ma$ descrive la forza coulombiana, l'accelerazione sarà significativa per gli elettroni e non per i nuclei.

Questo meccanismo di rilascio dell'energia è sfruttato per produrre raggi X a scopi diagnostici e terapeutici come accennato in precedenza. In un tubo di Röntgen gli elettroni prodotti da un catodo caldo sono accelerati contro un anodo in un campo dell'ordine dei kV; la decelerazione provocata dall'interazione con il campo coulombiano del nucleo atomico causa l'emissione di raggi X di varie energie, con un valore di picco determinato dalla velocità iniziale degli elettroni accelerati. Raggi X di alta energia sono prodotti utilizzando acceleratori lineari (LINAC), che portano gli elettroni ad energie di diversi MeV. La radiazione di bremsstrahlung prodotta in questo modo è utilizzata per trattare tumori profondi in radioterapia.

1.3 LET e struttura di traccia degli ioni pesanti

Si è descritto come tipi di radiazione diversa sono caratterizzati da diversi meccanismi di rilascio dell'energia. La frequenza e la localizzazione spaziale relativa di questi eventi di ionizzazione radioindotti sono tra loro molto diversi. Si osservano radiazioni che provocano ionizzazioni multiple, ravvicinate nello spazio, lungo un percorso più o meno rettilineo. Altri tipi di radiazione provocano eventi di ionizzazione separati, distribuiti in maniera omogenea all'interno del bersaglio macroscopico. Una grandezza ampiamente utilizzata in radiobiologia per descrivere questo diverso comportamento è il LET (Linear Energy Transfer), termine introdotto da Raymond E. Zirkle nel 1940. Il LET rappresenta l'energia trasferita per unità di percorso. Da un punto di vista numerico il LET è descritto dalla formula di Bethe-Bloch (eq. 1.2), ma nel caso della perdita media di energia per unità di lunghezza l'attenzione è focalizzata sull'entità di energia rilasciata dalla particella, mentre nel caso del LET si pone attenzione sull'assorbimento di energia da parte del mezzo. Per una stima del LET, si devono calcolare gli eventi di deposizione di energia locali all'interno di un generico elemento di massa dm , dovuti sia alla particella primaria (nel caso di radiazioni direttamente ionizzanti), sia alle eventuali particelle secondarie prodotte. Affinché il rilascio d'energia sia considerato locale, le particelle secondarie devono possedere

un'energia cinetica tale che il loro tragitto sia compreso all'interno dell'elemento di massa dm prescelto; per convenzione si considera che il rilascio sia locale per elettroni prodotti con energie sino a 100 keV, che possono allontanarsi dal sito di produzione sino ad un massimo di 5 nm.

Il LET così definito si indica con LET_{100} ; nel caso del LET_{∞} si includeranno nel calcolo dell'energia rilasciata gli eventi totali di trasferimento, per cui il LET_{∞} sarà effettivamente identico al $-dE/dx$ descritto dalla formula di Bethe-Bloch.

Il calcolo del LET è complicato per svariate ragioni. Primo, la radiazione non è mai monocromatica, cioè caratterizzata da particelle o fotoni tutti della medesima energia. Dato che il LET dipende dall'energia, se la radiazione presenta uno spettro energetico, sarà caratterizzata anche da uno spettro del LET. In secondo luogo, l'energia ceduta durante gli eventi di trasferimento effettuati dalle varie particelle o fotoni che costituiscono la radiazione non è mai la stessa; vengono quindi generate particelle secondarie con diversa velocità, ampliando lo spettro del LET.

Si può calcolare un valore medio del LET partendo da basi empiriche, misurando cioè l'energia trasferita lungo il percorso e mediando i risultati. Il LET di un determinato ione viene in genere riferito all'acqua, e viene espresso in keV per μm di acqua attraversata (keV/ μm).

Al crescere del LET gli eventi di deposizione d'energia lungo il percorso saranno più numerosi e ravvicinati. Per le radiazioni elettromagnetiche, il LET si calcola a partire dall'energia cinetica degli elettroni secondari prodotti che, per i raggi X e γ , è nell'ordine di 0.1-1 MeV, portando a valori di LET tra 0.3 e 2.5 keV/ μm . Queste radiazioni vengono definite sparsamente ionizzanti, poiché gli eventi di ionizzazione sono meno frequenti e disposti in maniera omogenea nel volume considerato. Per le radiazioni particellari, il valore del LET dipenderà dall'energia e dalla carica: ioni leggeri ad alta energia possono avere valori del LET prossimi a quelli dei raggi X. D'altra parte, ioni pesanti lenti raggiungono valori del LET molto alti, e quindi ionizzano in modo continuo lungo la traccia. Si parla di radiazione densamente ionizzante quando i valori di energia trasferita sono superiori a 50-100 keV/ μm .

La distanza (range) che le particelle cariche (primarie o secondarie) percorrono nel mezzo dipende dalla loro energia iniziale.

Quando gli eventi di deposizione di energia si sovrappongono lungo il percorso della particella creano un "continuum" di ionizzazioni il "track core". La traccia sarà caratterizzata inoltre da una regione detta "track penumbra", che corrisponde alla

regione attraversata dalle particelle secondarie (elettroni delta) che si allontanano dalla traccia primaria; il raggio della penumbra (r) sarà uguale al range massimo degli elettroni delta. L'energia rilasciata nel centro della traccia o nella penumbra è sensibilmente differente. Allontanandosi dal core, l'energia depositata diminuisce approssimativamente come r^{-2} .

Le radiazioni sparsamente ionizzanti al contrario, hanno una struttura di traccia caratterizzata da eventi distinti e separati nello spazio (fig. 6).

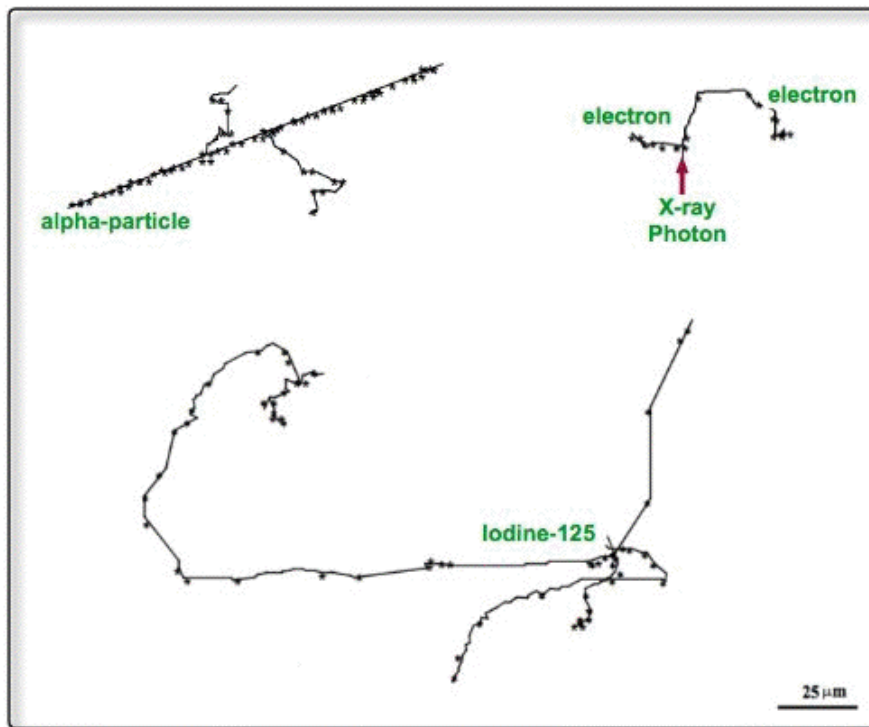


Fig. 6: Ionizzazioni osservate lungo la traccia di particelle in acqua. In alto a sinistra, una particella alfa di 5.4 MeV, a destra e in basso, ionizzazioni generate da elettroni emessi per assorbimento di raggi X da 1.5 keV e per decadimento radioattivo dello iodio-125.

1.4 Azione biologica diretta e indiretta

Una volta compreso che la ionizzazione è operata da particelle veloci cariche (gli ioni o gli elettroni primari nel caso della radiazione direttamente ionizzante, gli elettroni secondari prodotti dalla radiazione elettromagnetica) possiamo fare un'ulteriore distinzione riguardo al meccanismo tramite cui le molecole biologiche bersaglio sono danneggiate dalla radiazione ionizzante.

Si distingue un'**azione biologica diretta** quando l'assorbimento dell'energia avviene negli atomi della biomolecola di interesse. Si osservano fenomeni di eccitazione o ionizzazione che possono dar luogo alla formazione di radicali e ioni radicali. Il riarrangiamento elettronico dovuto a tali fenomeni può portare alla rottura di legami covalenti. Le rotture che coinvolgono lo scheletro zucchero-fosfato della molecola di DNA quando non riparate correttamente, danno luogo ad aberrazioni cromosomiche.

Nell'**azione indiretta** l'energia è assorbita da altre molecole presenti nel mezzo, che vanno incontro a reazioni a catena, dando prodotti altamente reattivi, tra cui anche in questo caso radicali e ioni radicali, che a loro volta reagiscono con le molecole biologiche d'interesse. Naturalmente nei tessuti biologici la molecola maggiormente coinvolta in questo tipo di azione è l'acqua, che costituisce tra il 70 e l' 85% di una cellula vivente.

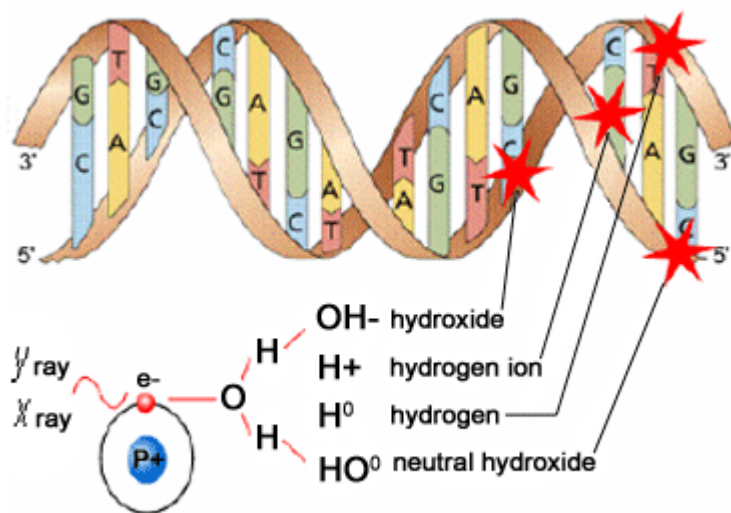


Fig. 7: Nell'azione indiretta i prodotti di radiolisi dell'acqua mediano il danno al DNA. Nell'azione diretta, la radiazione danneggia la doppia elica senza la partecipazione di molecole intermedie.

I radicali liberi sono specie chimiche altamente reattive e possono interagire con una serie di bersagli cellulari. E' stato dimostrato che, tra tutti i prodotti di radiolisi dell'acqua, il radicale ossidrilico OH[•] è responsabile del maggior numero di danni causati al DNA. Reagendo con una base azotata o con uno zucchero (con una frequenza tre volte maggiore per le basi azotate, ed in particolare con le pirimidine) può indurre la formazione di radicali nel DNA, eliminati da successivi riarrangiamenti elettronici.

Talvolta si ha escissione del gruppo fosfato, seguita da rottura dello scheletro (rottura a singolo filamento o ssb, single strand break).

Esistono sostanze (radical scavengers) che riducono l'effetto dannoso della radiazione rimuovendo i radicali prodotti. Viceversa, le sostanze che stabilizzano i radicali liberi, e ne aumentano quindi la distanza di diffusione in acqua, potenziano l'effetto della radiazione ionizzante, in quanto aumentano la probabilità dei radicali prodotti di interagire con le molecole biologiche. La più semplice e diffusa di queste sostanze è l'ossigeno. Per questo motivo, la radiazione sparsamente ionizzante produce danno biologico molto più efficacemente in presenza di ossigeno che in ambiente ipossico (effetto ossigeno).

1.5 Dose e intensità di dose

In radiobiologia si fa spesso riferimento ad una grandezza fisica correlata all'energia assorbita, la dose, definita come l'energia assorbita per unità di massa. E' espressa in J kg^{-1} , unità nota nel SI come gray (Gy).

$$D = \frac{dE}{dm} \quad (1.6)$$

Generalmente negli esperimenti in vitro si utilizzano i sottomultipli del Gy, quali il centigray (100 cGy è pari ad 1 Gy) o il milligray.

La dose è una grandezza essenziale per quantificare gli effetti biologici macroscopici delle radiazioni ionizzanti, ma bisogna tenere conto che essa rappresenta una stima approssimativa dell'energia assorbita a livello microscopico. Supponiamo di irraggiare uno stesso elemento di massa dm , con la stessa dose di radiazione densamente o sparsamente ionizzante (fig. 8).

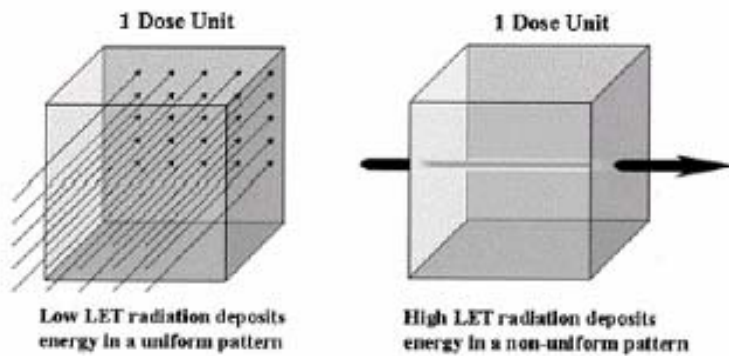


Fig. 8: A parità di dose rilasciata nell'elemento di massa, le radiazioni sparsamente e densamente ionizzanti differiscono nella distribuzione spaziale dell'energia depositata.

A livello microscopico, ci saranno grandissime fluttuazioni nella dose lungo la traccia delle particelle ad alto LET rispetto all'elemento di massa irraggiato con radiazioni di basso LET (Nelson, 2003).

La velocità con cui viene rilasciata la dose, detta intensità o rateo di dose dD/dt , svolge un ruolo importante nella caratterizzazione degli effetti biologici. Per radiazione di basso LET, la stessa dose è più efficace se rilasciata in tempi brevi (esposizione acuta) che in tempi lunghi (esposizione cronica). La diminuzione degli effetti biologici a bassa intensità di dose (sparing effect) è di fondamentale importanza per definire i rischi da esposizione a radiazione. Va però notato che, per radiazione densamente ionizzante, lo sparing effect diminuisce fino a sparire per valori del LET molto alti.

1.6 Ioni pesanti nello spazio extraterrestre

Tutti gli esseri umani sono esposti ad un fondo naturale di radiazione ionizzante. La radioattività ambientale è costituita da raggi γ (principalmente dal ^{40}K che si trova comunemente nei cibi), raggi α (derivanti soprattutto dal gas radon nell'aria), raggi β (da altri radionuclidi naturali), e radiazione X per scopi diagnostici o terapeutici. Una piccola parte della dose collettiva deriva dall'impatto della radiazione cosmica con l'atmosfera. Quando però ci allontaniamo dalla crosta terrestre, riducendo lo schermo dell'atmosfera, con voli di alta quota o nello spazio attorno alla Terra o addirittura nello spazio profondo interplanetario (missioni Apollo e future esplorazione del Sistema Solare), il campo di radiazione cambia radicalmente.

Possiamo individuare tre tipi di radiazione cosmica cui gli astronauti possono essere esposti (Durante, 2002):

- particelle intrappolate nelle fasce di Van Allen;

- radiazione cosmica galattica;

- protoni solari.

Nella prima categoria si considerano le particelle intrappolate nel campo geomagnetico terrestre che genera due regioni che si estendono sino ad una quota di 76000 Km, le fasce di Van Allen. All'interno di queste regioni sono principalmente presenti elettroni e protoni di energie intermedie. Gli elettroni non costituiscono un serio problema per l'analisi dei rischi associati ad esposizione, poiché vengono schermati dalle pareti del veicolo spaziale. I protoni devono invece essere considerati. Le particelle presenti nelle fasce di Van Allen determinano la maggior parte della dose per missioni in orbita attorno alla Terra (LEO, low earth orbit) come i voli dello Space Shuttle o la attuale Stazione Spaziale Internazionale, un centro di ricerca finanziato da molti gruppi europei ed extraeuropei, dove si effettuano ricerche multidisciplinari, tra cui lo studio degli effetti biologici della microgravità e dell'ambiente spaziale in generale.

La radiazione cosmica galattica (GCR, da Galactic Cosmic Radiation) è costituita per l' 87% da protoni, 12% da nuclei di elio e il restante 1% da nuclei di alta energia ed alto numero atomico, chiamati HZE (da High Z and High Energy). Questi ioni pesanti arrivano sino ad $Z=92$ (uranio), ma in realtà oltre $Z=26$ (ferro) l'abbondanza relativa è trascurabile. Queste particelle provengono dall'esterno del sistema solare, ma ancora non si è chiarita la loro origine. Un possibile candidato è rappresentato dalle esplosioni di supernovae.

Nonostante i protoni siano le particelle più frequenti nella GCR, essi contribuiscono solo al 20% della dose assorbita, la restante parte è dovuta all'elio ed alle particelle HZE, in quanto la dose è proporzionale all'energia depositata e dunque a z^2 .

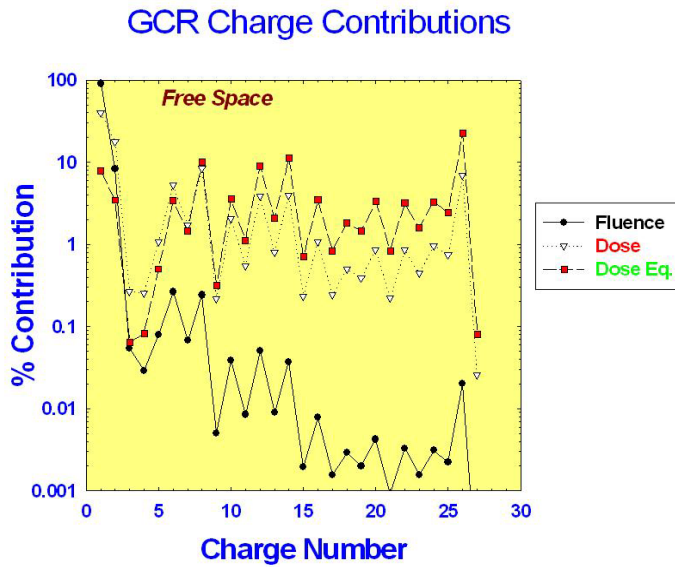


Fig. 9: Contributo relativo alla dose e alla dose equivalente per ioni a diverso Z nella GCR

Nei programmi ESA e NASA è prevista l'esplorazione di Marte. La durata prevista per una missione di questo tipo si aggira intorno ai 18 mesi. Risulta necessario ottenere buone stime di rischio da esposizione a radiazione nello spazio e a questo scopo è indispensabile approfondire gli effetti biologici indotti degli ioni pesanti. L'incertezza associata agli effetti biologici indotti dalle HZE è particolarmente elevata, poiché queste particelle non sono presenti sulla Terra e non esistono dati epidemiologici sulla loro efficacia. La GCR è caratterizzata da energie elevate con un massimo attorno ad 1 GeV/nucleone. E' molto difficile schermare queste particelle, anche a causa delle interazioni nucleari delle HZE con le pareti della navicella che generano ioni secondari leggeri molto penetranti. Per questi motivi, la GCR rappresenta al momento il fattore di rischio sanitario più alto per l'esplorazione umana del Sistema Solare.

La terza categoria è costituita dalla radiazione emessa durante fenomeni di superficie quali i brillamenti solari e durante le eiezioni di massa dalla corona, sottoforma principalmente di protoni e, in misura minore, ioni elio e nuclei pesanti. Durante questi eventi solari, la cui durata è compresa tra qualche ora e qualche settimana, il flusso di particelle è molto intenso. Sono dunque eventi molto pericolosi e poco prevedibili, anche se è noto che sono associati al ciclo solare e in particolare alla comparsa delle macchie solari. In questo caso, i protoni contribuiscono al 90% della dose assorbita, e la loro energia è in genere inferiore ai 100-200 MeV, ma può occasionalmente arrivare fino al GeV.

Le missioni in orbita terrestre (LEO) possono essere disturbate da questi eventi, ma il problema diventa molto serio al di fuori dello schermo del campo geomagnetico, cioè

durante i viaggi interplanetari o sulle superfici dei pianeti. In questo caso, astronauti non adeguatamente schermati potrebbero assorbire dosi anche letali di protoni energetici.

1.7 Effetti biologici della radiazione

Inizialmente gli effetti dannosi determinati da esposizione a radiazioni ionizzanti furono suddivisi in due classi principali: deterministici e stocastici. I primi erano caratterizzati da una dose soglia, superata la quale l'effetto è sempre osservato. Un'altra caratteristica è il breve tempo di latenza. La gravità del danno aumenta all'aumentare della dose ricevuta, oltre a dipendere dalla sensibilità dell'individuo esposto. Le dosi necessarie per l'induzione di un effetto deterministico sono in genere alte. Alcuni esempi sono l'eritema, la fibrosi, la cataratta. Per gli effetti stocastici al contrario, la probabilità di insorgenza aumenta all'aumentare della dose, non vi è nessuna dose soglia, l'entità del danno non dipende dalla dose e il tempo di latenza è in genere lungo. L'esempio più importante è il tumore. Col progredire degli studi epidemiologici, cellulari e molecolari il quadro si è modificato. Si preferisce parlare di effetti biologici derivati dalla morte cellulare al posto di deterministici, e di effetti causati da mutazioni ereditabili per gli effetti stocastici.

Gli effetti dovuti a letalità cellulare sono osservati quando il danno è perpetuato su tessuti a veloce ripopolazione. Dopo esposizione ad alte dosi si induce una massiva morte cellulare (necrosi, apoptosi), ed è probabile che il serbatoio di cellule progenitrici non sia grado di rinnovare il tessuto colpito.

Un esempio è la sindrome gastro-intestinale che si verifica in genere dopo esposizione ad oltre 10 Gy di raggi X o γ . I sintomi sono vomito, diarrea prolungata, e sono da attribuire principalmente alla depopolazione dell'epitelio intestinale. Normalmente le cellule progenitrici si dividono nelle cripte alla base dei villi intestinali. Una dose di 10 Gy è sufficiente a sterilizzare la maggior parte delle progenitrici nelle cripte e nell'arco di 3-8 giorni i villi si assottigliano sempre di più. La sopravvivenza è improbabile a causa dei drastici cambiamenti che avvengono a livello del sistema gastro-intestinale che portano a disidratazione, squilibri elettrolitici, fino alla morte.

La sindrome ematopoietica si osserva dopo esposizione a dosi comprese tra 3 e 5 Gy. I precursori delle cellule rosse e bianche e delle piastrine sono sterilizzati. Quando

le cellule mature circolanti iniziano a morire e non vengono sostituite da elementi nuovi inizia la crisi immunodepressiva. La principale causa di morte sono le infezioni.

I fenomeni dovuti a mutazioni ereditabili sono tardivi, dovuti a cellule che sopravvivono ma mantengono una sorta di “impronta” dell’irraggiamento. Quando la cellula colpita è una progenitrice le alterazioni sono trasmesse alla progenie. Talvolta mutazioni di cellule somatiche possono dare luogo a dedifferenziamento e tumorigenesi. Se una cellula della linea germinale è mutata gli effetti possono essere ereditari. Il periodo di latenza fra esposizione e manifestazione dell’effetto dipende da numerosi parametri tra cui la cinetica di crescita, i metodi e la frequenza di diagnosi. Data la complessità del danno non si può individuare un meccanismo scatenante specifico anche se pochi sono i dubbi sul fatto che l’evento primario riguardi il DNA cellulare, sia attraverso la formazione di mutazioni somatiche (aberrazioni cromosomiche), sia con alterazioni dell’attività genica.

Molti dati sul rischio di induzione del cancro sono stati ricavati dai sopravvissuti alle bombe di Hiroshima e Nagasaki. Per il cancro alla tiroide la maggior parte degli studi epidemiologici è basata sui bambini esposti allo iodio radioattivo dopo il disastro di Chernobyl.

La tumorigenesi è considerata il principale fattore di rischio dopo esposizione ad un regime cronico di bassa dose, come quello dello spazio extraterrestre.

In tutti i casi, sia negli effetti deterministici, sia in quelli stocastici vi sono evidenze che la molecola di DNA giochi un ruolo fondamentale come bersaglio critico della radiazione. Non è semplice delineare il meccanismo tramite cui dal danno al DNA si arriva alla morte cellulare o a quella clonogenica, poiché sono effetti risultanti dalla partecipazione di numerose componenti coinvolte. Vi sono numerose evidenze che la proteina p53 sia coinvolta nell’arresto del ciclo cellulare e nella promozione dell’apoptosi (Fei e El-Deiry, 2003)

La carcinogenesi è un fenomeno complicato. Attivazione di oncogeni, inattivazione di oncosoppressori, sono tutti danni correlati a modifiche del DNA e dei geni da esso codificati. Le aberrazioni strutturali possono portare un gene in un contesto regolativo completamente diverso inattivandolo o favorendone l’espressione. Alcuni dei tumori più diffusi sono caratterizzati da aberrazione cromosomiche strutturali.

Tutti questi eventi prendono origine da modificazioni chimiche a carico della molecola di DNA. Le alterazioni chimiche ascrivibili all’esposizione a radiazioni ionizzanti sono di varia natura :

- rotture a singola (ssb) e a doppia elica (dsb): è stato sopraccitato il meccanismo tramite il quale l'azione diretta o indiretta della radiazione può generare una o più rotture del filamento. I dsb, come vedremo nel secondo capitolo, sono alla base della formazione delle aberrazioni cromosomiche;
- danni alle basi: quando la modifica altera una tripletta codificante ne può risultare una mutazione puntiforme;
- formazione di legami crociati tra i filamenti stessi della molecola di DNA (cross-link intramolecolari inter-catena) le cui conseguenze possono essere drastiche al momento della separazione dei filamenti durante la sintesi del DNA;
- legami crociati tra DNA ed altre molecole, prime fra tutte le proteine;
- denaturazione locale del DNA: qualsiasi modifica che interferisce con un corretto appaiamento provoca la formazione di regioni parzialmente denaturate.

Altri effetti indotti dalle radiazioni possono riguardare altre componenti cellulari quali il citoscheletro, le membrane, i microtubuli del fuso mitotico, arrecando diversi tipi di danno e perdita di funzioni, ma che generalmente necessitano dosi di radiazione elevate. Danni all'apparato del fuso mitotico possono generare aneuploidie (Tallon, 1998) che possono condurre a morte cellulare o effetti stocastici tardivi.

1.8 RBE e dose equivalente

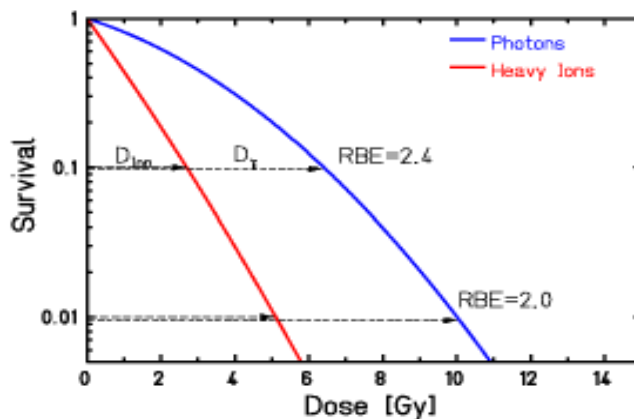
Gli effetti biologici riscontrati dopo esposizione a parità di dose con radiazioni di differente qualità sono diversi, da un punto di vista quantitativo e talvolta qualitativo (dipende da quale parametro è utilizzato per la stima del danno).

I primi studi sulle diverse risposte osservate in seguito all'esposizione a radiazioni ionizzanti erano effettuati con colture cellulari in vitro, di cui si stimava la capacità clonogenica in condizioni normali o dopo irraggiamento. costruendo curve di sopravvivenza in funzione della dose. Nella maggior parte dei casi, quando il campione è irraggiato con radiazione sparsamente ionizzante si ottengono delle curve che a basse

dosi presentano una “spalla”, ove l’efficacia nell’induzione di letalità è bassa. All’aumentare della dose la relazione diventa esponenziale. Le radiazioni densamente ionizzanti presentano dal principio un andamento esponenziale e la retta risultante da un grafico semilogaritmico ha una pendenza maggiore rispetto alla regione lineare delle radiazioni a basso LET. Ciò si traduce in un’efficacia maggiore nell’indurre morte clonogenica.

Le curve variano molto a seconda del tipo cellulare utilizzato, dell’organismo da cui è stato prelevato, dello stadio del ciclo cellulare in cui avviene l’irraggiamento, nonché, come abbiamo già detto, del tipo di radiazione e della modalità di irradiazione (intensità di dose, presenza di ossigeno etc.).

La diversità delle risposte osservate ha suggerito l’introduzione di un parametro, l’Efficacia Biologica Relativa (Relative Biological Effectiveness, RBE) definito come il rapporto tra le dosi della radiazione di riferimento (generalmente raggi X) e della radiazione in esame, che danno luogo allo stesso effetto biologico.



$$RBE = \frac{D_{\gamma}}{D_{Ion}} \Big|_{Isoeffect}$$

Fig. 10: Il calcolo dell’RBE è effettuato a partire dalle curve dose risposta della radiazione di riferimento (raggi X) e di quella test (particelle), tramite il rapporto delle dosi necessarie all’osservazione dello stesso effetto.

La stima dell’RBE può essere effettuata mediante molteplici parametri biologici, quali l’induzione di aberrazioni cromosomiche, la frequenza di mutazioni e di trasformazione neoplastica, l’inibizione della germogliazione di semi irraggiati.

È necessario tenere in conto che il valore dell’RBE cambia a seconda del livello d’effetto considerato (fig. 10). Nella regione delle basse dosi la differenza tra

radiazioni di alto e basso LET è massima, ed il valore calcolato per l'RBE risulta maggiore rispetto a quello stimato a dosi più alte.

Si ritiene che i sistemi di riparo cellulari siano all'origine della formazione della spalla nella curva delle radiazioni di basso LET. Essendo generate rotture poco ravvicinate nello spazio, rispetto alla radiazione di alto LET, i meccanismi cellulari possono riparare il danno radioindotto in maniera più efficiente e la cellula riesce a sopravvivere.

In ambito radioprotezionistico è stata introdotta una grandezza allo scopo di confrontare dosi di radiazioni di diversa qualità, la dose equivalente (H). H è definita come il prodotto tra la dose fisica in Gy e un fattore, Q, o fattore di qualità, ricavato da dati sperimentali ed epidemiologici. H si misura in sievert (Sv):

$$H = D \cdot Q \quad (1.7)$$

Nella pratica radioprotezionistica, la dose equivalente si ricava generalmente dalla formula:

$$H = D \cdot w_r \quad (1.8)$$

dove w_R è il fattore di peso caratteristico della radiazione usata; esso non dipende dall'energia della radiazione ma assume un unico valore, sempre ricavato dall'analisi dei dati ottenuti da numerosi lavori sperimentali. Per raggi X e γ , w_R è uguale ad 1, per ioni pesanti 20.

La dose equivalente H viene quindi usata per stimare il rischio stocastico alle basse dosi, moltiplicando H per opportuni fattori di rischio, che sono generalmente ricavati dai dati epidemiologici (soprattutto i sopravvissuti di Hiroshima e Nagasaki). I fattori di rischio dipendono dal sesso, dall'età, dal tipo di patologia, e dall'intensità di dose, ma non dalla qualità della radiazione (incorporata in H).

Capitolo 2

Aberrazioni cromosomiche radioindotte

Il DNA rappresenta il bersaglio principale causa dell'espressione del danno radioindotto. Questo principio è noto da molto tempo, sin dai primi studi sulle colture cellulari in vitro. Esperimenti in cui timidina triziata (emettitore β di bassa energia) è aggiunta al terreno di coltura (Hall, 1994) mostrano un incremento della letalità cellulare. Fattori che modificano la risposta nelle curve di sopravvivenza quali tipo di radiazione, ossigenazione del preparato, rateo di dose, modificano con andamento simile l'induzione di aberrazioni cromosomiche. È stata osservata una correlazione diretta tra la diminuzione della sopravvivenza cellulare e l'aumento di aberrazioni cromosomiche per cellula (Dewey *et al.*, 1971).

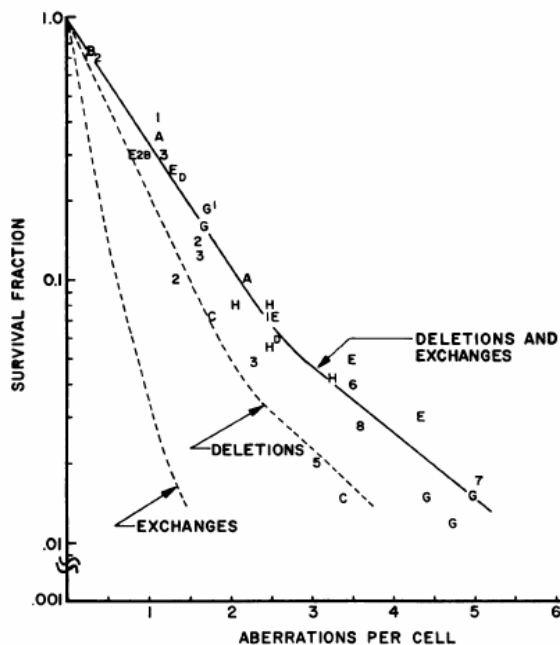


Fig. 111: Relazione tra aberrazioni cromosomiche e sopravvivenza in cellule di criceto cinese irraggiate con raggi X (Dewey *et al.*, 1971).

Riassumendo, lesioni al DNA e tra queste danni che portano alla formazione di aberrazioni cromosomiche, possono essere considerati i principali effettori del danno biologico causato dall'esposizione a radiazioni ionizzanti.

Le cellule sono provviste di numerosi sistemi per riparare i danni al DNA (Frankenberg-Schwager *et al.*, 2009).

Quando vi sono due rotture, ciascuna su un filamento del DNA situate a pochi nucleotidi di distanza si parla di rottura a doppio filamento o dsb (double strand break). Il cromosoma risulta diviso in due parti ciascuna con un'estremità libera. Nel caso di un dsb sono generate estremità libere che possono muoversi l'una rispetto all'altra ed allontanarsi, diminuendo l'efficienza dei processi di recupero: la formazione di aberrazioni cromosomiche avviene proprio in conseguenza dell'errata riparazione di questo tipo di danni.

2.1 Meccanismi di riparazione e induzione delle aberrazioni cromosomiche

Il meccanismo utilizzato dalle cellule procariotiche ed eucariotiche in caso di alterazione di una singola o di poche basi è il sistema di riparazione per escissione nucleotidica. E' un sistema multienzimatico, inizia con il riconoscimento della regione alterata, seguito da tagli endonucleotidici a monte ed a valle di tale regione seguita dalla rimozione da parte della DNA elicasi del frammento generato. Il DNA viene ripolimerizzato usando come stampo il filamento sano e la DNA ligasi salda la regione di neosintesi.

In presenza di dsb i sistemi di riparazione utilizzati dalle cellule di mammifero sono principalmente 3 e il loro contributo è diverso a seconda della fase del ciclo cellulare considerata (Frankenberg-Schwager *et al.*, 2009). Durante la fase S il principale meccanismo è la ricombinazione omologa (HR, Homologous Recombination) mentre in fase G1 o G0 prevale la ricombinazione illegittima o sistema NHEJ (Non Homologous End Joining). Un ultimo meccanismo, detto di accoppiamento del singolo filamento (SSA o Single Strand Annealing) si occupa dei dsb non riparati dagli altri due sistemi.

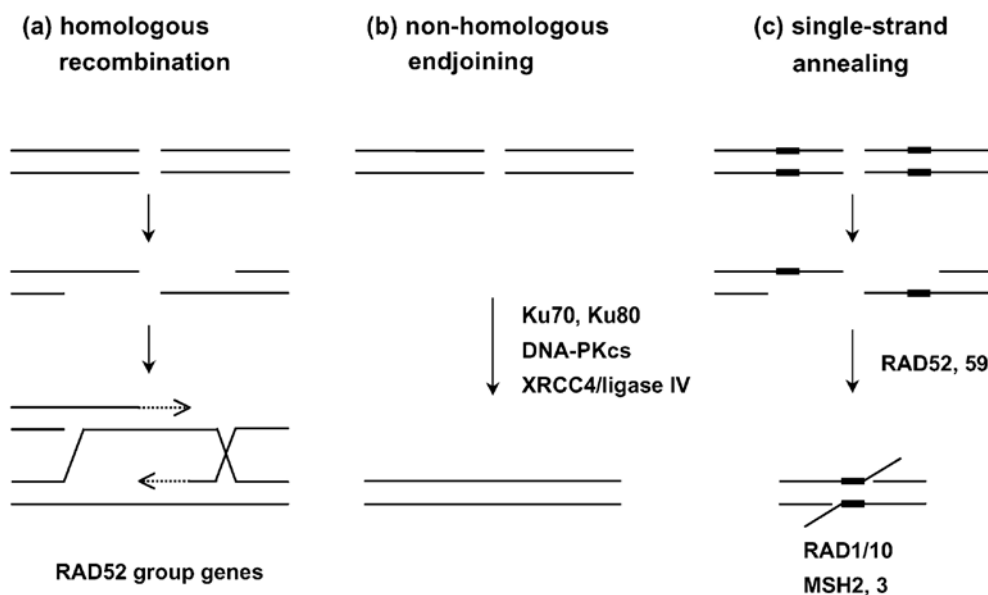


Fig. 112 Meccanismi di riparazione dei dsb

L'NHEJ (Critchlow e Jackson, 1998) è detto ricombinazione illegittima per distinguerlo dal modello di ricombinazione omologa riconosciuto come meccanismo prediletto dagli eucarioti inferiori per riparare i dsb (Dudášová *et al.*, 2004) ed individuato durante la formazione delle spore (Brown, 1999). A differenza dell'SSA e dell'HR, l'NHEJ è un sistema aspecifico e non è in grado di rilevare se le estremità che ricongiunge appartenevano allo stesso cromosoma (fig 12). Sono stati identificati tre passaggi fondamentali per il processo di riparazione effettuato dall'NHEJ (Haber, 2000):

- il fattore Ku, un eterodimero costituito dalle proteine Ku70 e Ku80 si lega alle estremità libere del DNA formate in seguito al dsb, proteggendole dalla degradazione e preparandole per il successivo allineamento. Ku è la componente d'attacco al DNA della proteina chinasi DNA dipendente (DNA-PK) ed una volta che si è posizionata recluta la componente catalitica;

- la subunità catalitica DNA-PKcs (DNA Protein Kinase catalytic subunit) si ancora a Ku. Si forma così l'enzima DNA-PK in grado di fosforilare serina e treonina di ulteriori proteine coinvolte nel sistema. Le estremità del DNA, circondate dall'enzima, si avvicinano a formare il complesso sinaptico. Affinché avvenga l'unione dei filamenti, le estremità non devono essere sporgenti ma piatte. Prima del ricongiungimento può essere necessario l'intervento di enzimi ad attività esonucleasica

o polimerasica: tra questi è stato identificato Artemis, una esonucleasi che si lega al complesso e viene attivata dalla fosforilazione ad opera di DNA-PK (Ma, 2002);

-il complesso XRCC4/DNA ligasi IV aderisce alle estremità e ne media il ricongiungimento.

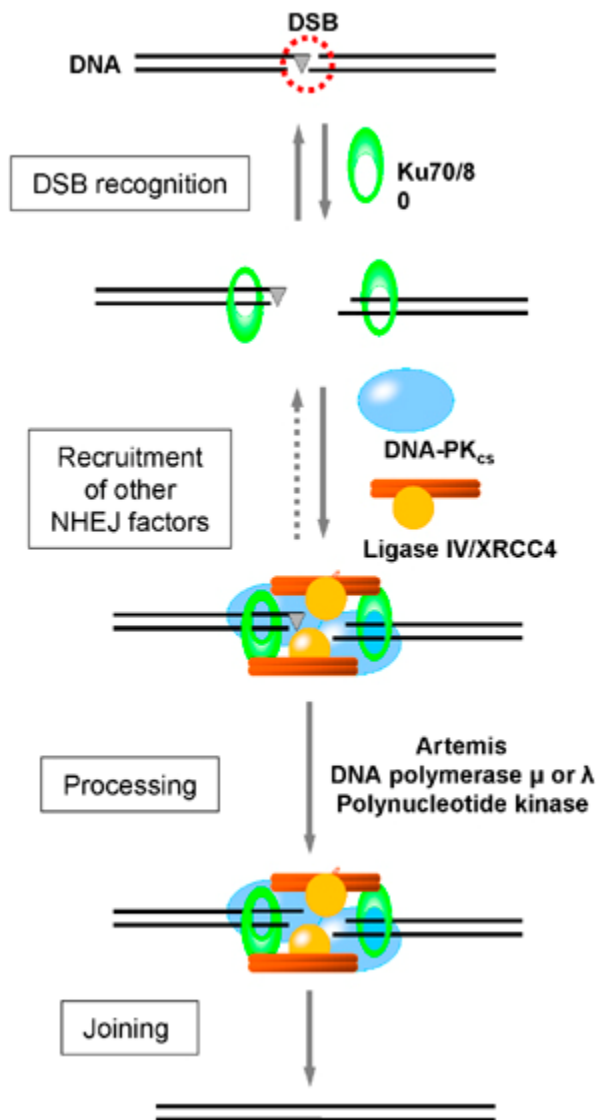


Fig. 113: Rappresentazione schematica delle componenti coinvolte nel sistema NHEJ e delle principali tappe.

Alcuni risultati sperimentali effettuati su cellule HeLa hanno messo in dubbio il coinvolgimento della proteina Artemis nel sistema NHEJ ed è stato invece suggerito che questa proteina venga attivata in risposta a stimoli da stress cellulare, tra i quali danni indotti dalle radiazioni, e che in seguito all'attivazione vada ad assolvere funzioni di controllo del ciclo cellulare (Zhang *et al.*, 2004).

Deficienze nel sistema NHEJ aumentano la radiosensibilità cellulare (Zhang *et al.*, 2005). Questo meccanismo è coinvolto inoltre nell'assemblaggio dei geni per le immunoglobuline e per recettori delle cellule T (Rooney *et al.*, 2004).

Da quanto detto sinora risulta chiaro che se il processo di riconoscimento e riparazione coinvolge le estremità dei due frammenti del cromosoma originario, si avrà un ripristino della situazione iniziale (restituzione). Se sono contemporaneamente presenti più cromosomi danneggiati il sistema NHEJ può ricongiungere erroneamente estremità appartenenti a differenti cromosomi o a differenti regioni dello stesso cromosoma, generando aberrazioni.

2.2 Metodiche di studio delle aberrazioni cromosomiche

Oltre alle diverse tecniche di colorazione messe a punto per l'analisi dei cromosomi, una serie di protocolli sperimentali sono utilizzati per massimizzare la quantità di cariotipi osservabili in un campione. Un tipo cellulare molto utilizzato per le analisi citogenetiche sono i linfociti del sangue periferico. Per osservare i cromosomi è necessario stimolare i linfociti normalmente quiescenti in fase G₀ affinché riprendano il ciclo cellulare e raggiungano la mitosi. Viene comunemente usata la fitoemoagglutinina, una lectina mitogena estratta dai fagioli.

I cromosomi condensati sono osservabili ed analizzabili solo durante la metafase, periodo molto breve del ciclo cellulare (linfociti stimolati in vitro hanno un ciclo cellulare di circa 15 ore (Auf der Maure, 1979). Risulta necessario utilizzare un metodo per massimizzare il numero di cellule mitotiche nel campione. Il composto più usato è la colcemide, un derivato metilato della colchicina, alcaloide che blocca l'assemblaggio dei microtubuli legandosi agli eterodimeri di tubulina (Borisov e Taylor, 1967). La colcemide viene aggiunta nel terreno di coltura e impedisce alle cellule in metafase di proseguire il ciclo cellulare.

Un altro composto largamente utilizzato è la caliculina A, un inibitore delle fosfatasi di tipo 1 e 2 (serina e treonina). Aggiunta al terreno di coltura in poco tempo induce la condensazione prematura dei cromosomi (PCC Premature Chromosome Condensation) in qualsiasi stadio del ciclo cellulare (Durante *et al.*, 1998a).

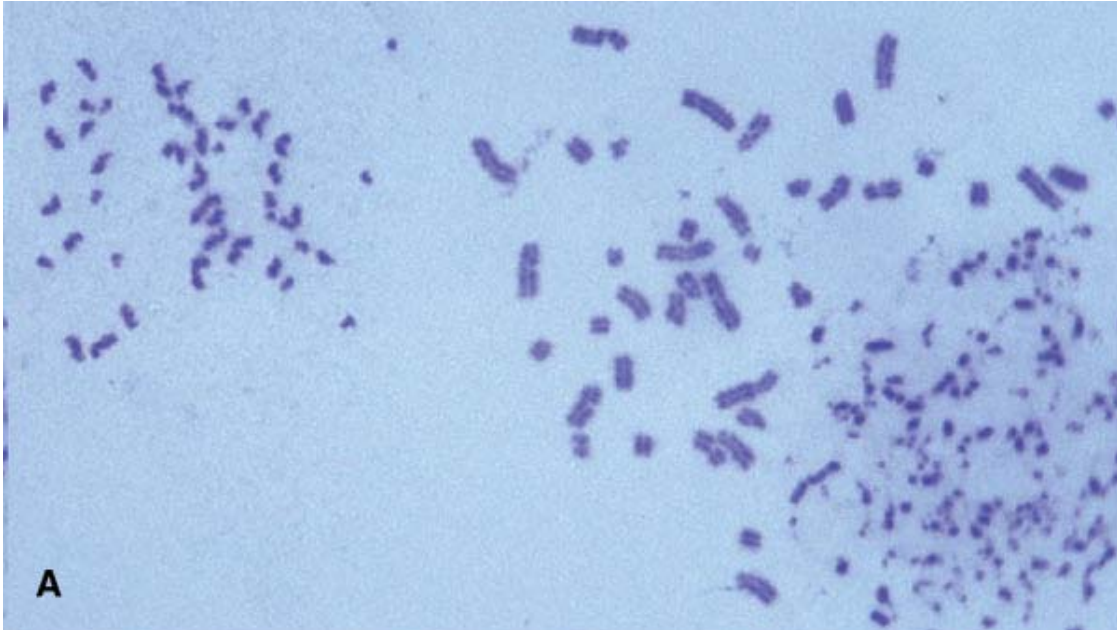


Fig. 114: Linfociti condensati con la tecnica PCC. Partendo da sinistra si osserva un linfocita in G1, in G2 e in fase S del ciclo cellulare

Per la visualizzazione dei cromosomi, una delle prime colorazioni impiegate fu la Giemsa una miscela di blu di metilene ed eosina. E' una colorazione solida, aspecifica in quanto affine ai gruppi fosfato del DNA. Con questa metodica e' possibile osservare solo aberrazioni in cui la struttura dei cromosomi è alterata sensibilmente. Sono state messe a punto altre metodiche per ampliare lo spettro di aberrazioni analizzabili. La piu' importante e' la tecnica del bandeggio, tramite la quale ciascun cromosoma risulta suddiviso in bande precise e ripetibili, che lo contraddistinguono dagli altri cromosomi (fig. 15).

Esistono varie tecniche di bandeggio che fanno uso di diversi composti: una delle più utilizzate è la tecnica del bandeggio G. Si trattano i cromosomi con enzimi proteolitici come la tripsina, quindi si colorano con Giemsa. Con la tecnica di bandeggio è virtualmente possibile l'analisi di molti tipi diversi di aberrazioni, ma l'analisi delle bande è un lavoro laborioso e facilmente si incorre in errori.

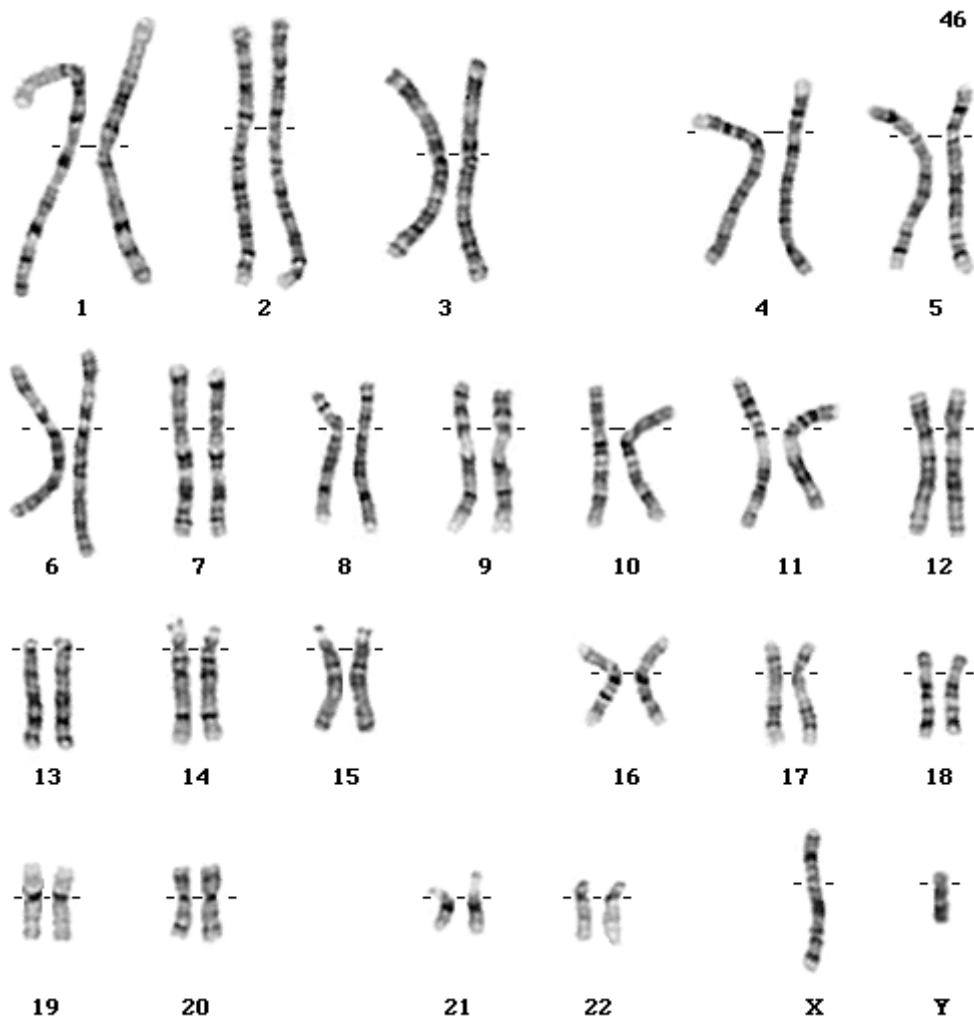


Fig. 15: Cariotipo umano visualizzato mediante bandeggio G

La metodica attualmente piu'usata per l'analisi delle aberrazioni cromosomiche e' l'ibridazione in situ con sonde di DNA marcate con coloranti fluorescenti (o FISH da Fluorescent In Situ Hybridization). In commercio sono disponibili diversi tipi di sonde per marcare parte (sonde centromeriche, telomeriche) o interi cromosomi. I vantaggi delle colorazioni in fluorescenza sono notevoli: l'analisi e' piu' semplice e rapida per cui aumenta il numero di immagini analizzate. I risultati hanno un valore statistico maggiore e l'errore associato alla misurazione diminuisce.

Le sonde centromeriche ad esempio sono impiegate per l'analisi delle aneuploidie delle cellule in interfase. Il sistema e' utilizzato come test diagnostico per le cellule del liquido amniotico e nelle cellule buccali per valutare i danni in seguito a radioterapia nella regione testa-collo (Ai *et al.*, 1999).

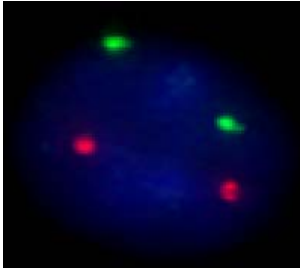


Fig.16: Sonde centromeriche per i cromosomi 8 (rosso) e 12 (verde).

Le sonde ad intero cromosoma (WCP o Whole Chromosome Paints) sono monocromatiche e specifiche per una coppia di omologhi autosomici o per i cromosomi sessuali. In commercio esistono WCP per tutti i cromosomi umani. Una variante è costituita dalle sonde specifiche per braccia cromosomiche (ASP o Arm Specific Probes) con le quali le braccia diverse dello stesso cromosoma sono evidenziate da fluorofori differenti. Naturalmente esistono ASP per tutti i cromosomi umani eccetto gli acrocentrici.

L'intero cariotipo umano può essere visualizzato con la tecnica mFISH (multicolor FISH). Una combinazione di 5 fluorofori permette di dare un pattern caratteristico di ibridazione a ciascuna coppia di omologhi e ai cromosomi sessuali. È una tecnica utile e il confronto con i risultati ottenuti con Giemsa o con WCP ha mostrato come è possibile sottostimare la frequenza di alcuni tipi di aberrazioni (scambi complessi) quando non si visualizza l'intero cariotipo (Durante *et al.*, 2002). Una variante dell'mFISH è la arm specific mFISH dove non solo l'intero cariotipo è ibridizzato ma sono contraddistinte anche le braccia cromosomiche.

Nella mBAND si utilizza come per l'mFISH una miscela di fluorofori differenti. In questo caso le sonde sono complementari ad un singolo cromosoma, che risulta suddiviso in regioni di fluorescenza.

Un apposito programma elabora l'intensità dei diversi segnali luminosi e fornisce un cromosoma distinto in numerose bande. E' una tecnica grazie alla quale si ottengono informazioni su scambi intracromosomici e approssimativamente sui punti di rottura dove si sono originate le aberrazioni (Chudoba *et al.*, 2004).

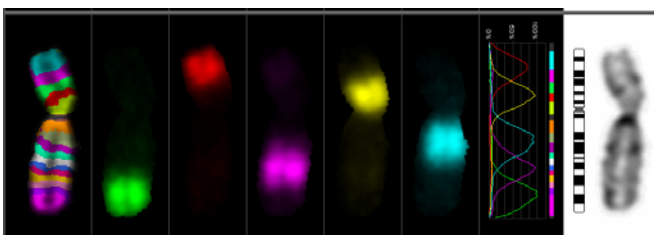


Fig.17: Cromosoma X visualizzato con tecnica mBAND. A sinistra le bande in falsi colori elaborate dal programma, nei 5 canali centrali i distinti fluorofori.

La Rx-FISH può essere vista come una sintesi tra la mBAND e la mFISH, in quanto colora tutti i cromosomi umani ma ciascuno con un pattern caratteristico di bande. Le sonde sono preparate a partire dal genoma di tre specie di gibboni, il cui grado di omologia con il genoma umano è superiore al 95%. Il cariotipo di questi primati è largamente ricombinato rispetto a quello umano quindi le sonde preparate sui primati danno un caratteristico profilo a bande quando ibridizzate sui cromosomi umani.

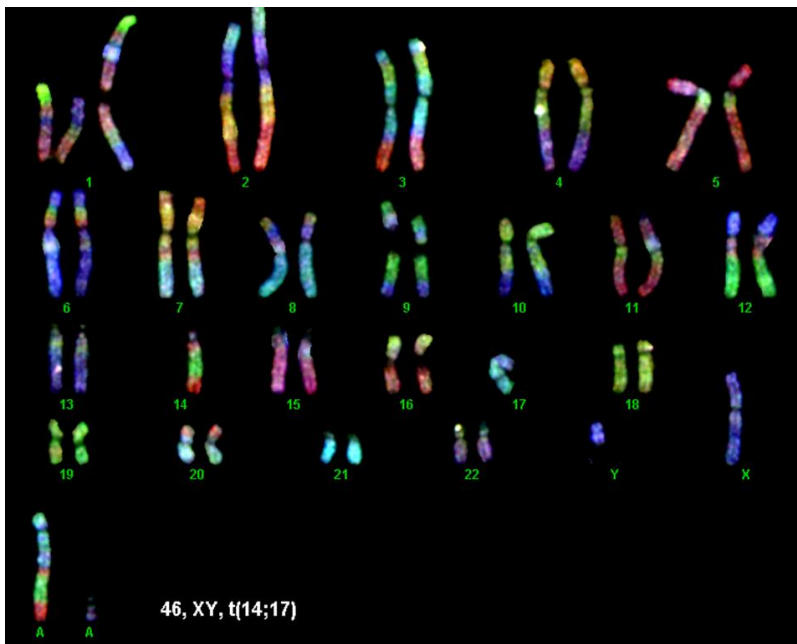


Fig.18: Cariotipo umano visualizzato mediante tecnica Rx-FISH (per gentile concessione del Prof. M. Durante).

In questo lavoro di tesi sono state utilizzate diverse tecniche: le ASP e la arm specific mFISH, l'mBAND, la mFISH ciascuna applicata in un diverso progetto sperimentale.

2.3 Classi di aberrazioni cromosomiche

Sono definite aberrazioni cromosomiche tutte le alterazioni di un normale cariotipo. Questa definizione comprende alterazioni numeriche (aneuploidie) e strutturali.

Sono possibili due grandi categorie di riarrangiamenti strutturali: le aberrazioni di tipo cromosomico (sensu strictu) e quelle di tipo cromatidico. Le prime mostrano il medesimo danno in entrambi i cromatidi fratelli, nelle seconde soltanto uno dei

cromatidi ha subito la rottura. Se il danno al DNA è avvenuto in una popolazione cellulare asincrona possono essere visualizzate entrambe le categorie. In fase G_0 o G_1 il cromosoma è a singolo cromatide, cosicché qualsiasi riarrangiamento avvenga in questo stadio viene duplicato durante la fase di sintesi del DNA dando luogo alle aberrazioni cromosomiche. Se le rotture avvengono durante o dopo la fase di replicazione del DNA si osservano aberrazioni cromatidiche.

In questo lavoro di tesi è stata effettuata l'analisi delle aberrazioni cromosomiche sensu strictu, indotte dopo irraggiamento in fase G_0 o in fase G_1 , e di queste si darà una descrizione più dettagliata.

2.3.1 Delezioni terminali

Le delezioni terminali sono generate da una singola rottura a doppio filamento non riparata (restituita) correttamente. La delezione terminale osservata in prima mitosi consiste in un cromosoma ridotto ed un frammento senza centromero (acentrico) di dimensioni variabili a seconda del sito ove è avvenuta la rottura.

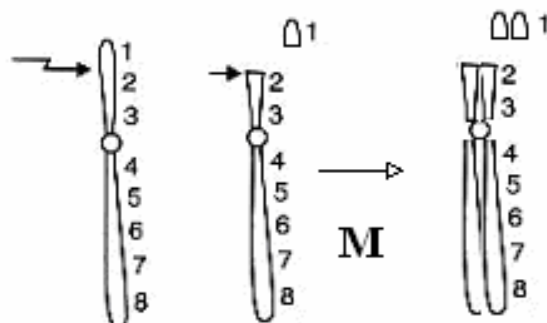


Fig. 19: Meccanismo di induzione delle delezioni terminali.

Il frammento acentrico con il proseguire della mitosi viene perso nel citoplasma con grande probabilità. Nelle analisi citogenetiche, corpi di natura nucleare osservati in interfase nel citoplasma sono definiti micronuclei (Cornforth e Goodwin, 1991). In alternativa, può essere inglobato nella membrana nucleare di una delle cellule figlie. Le delezioni possono essere eventi letali o tumorigenici in funzione dell'importanza e del ruolo delle regioni geniche presenti nel frammento perso.

L'analisi di queste aberrazioni non può essere condotta facilmente con tecniche di colorazione standard. Altre aberrazioni più complesse possono dar luogo alla formazione di un frammento e solo in presenza di sonde specifiche per le regioni

telomeriche (fig. 20) è possibile determinare se il frammento mancante proviene realmente dalla regione terminale.

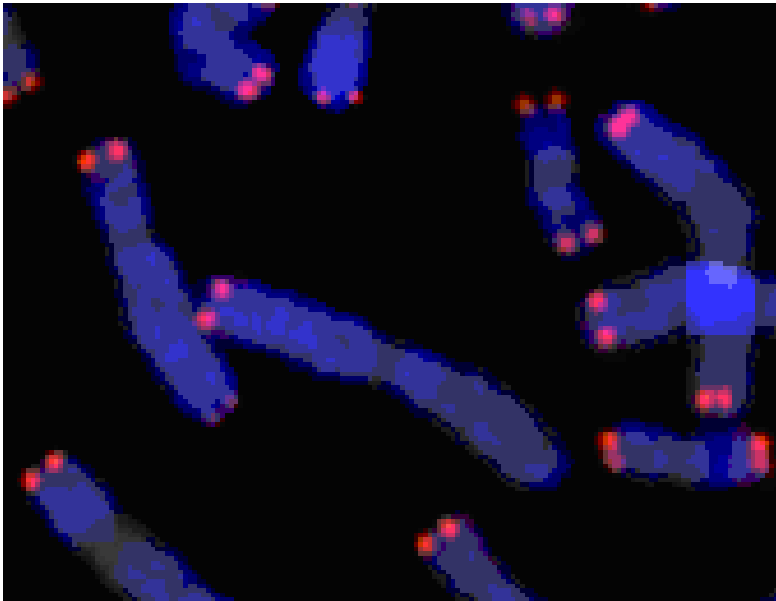


Fig.20: Delezione terminale osservata mediante l'uso di sonde telomeriche (per gentile concessione del prof. M. Durante).

2.3.2 Interscambi

Sono definiti **scambi semplici** le anomalie originate dall'interazione tra due rotture a doppio filamento del DNA. Le due rotture possono essere avvenute sullo stesso cromosoma (intrascambi) o su cromosomi differenti omologhi o non (interscambi).

Negli scambi il processo può essere completo o incompleto a seconda che tutte le estremità libere vengano ricongiunte.

Gli interscambi si dividono a loro volta in simmetrici (traslocazioni) e asimmetrici (dicentrici). Le traslocazioni sono aberrazioni simmetriche in cui i frammenti acentrici rotti originati dalle due rotture sono trasferiti reciprocamente.

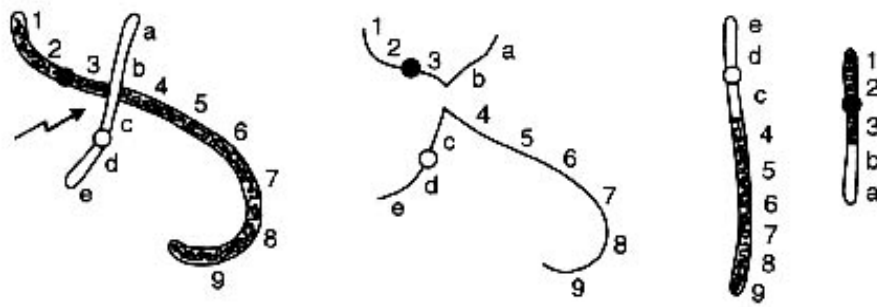


Fig. 21: Meccanismo di induzione di una traslocazione reciproca completa tra cromosomi non omologhi. La freccia indica il sito ove avvengono le due rotture.

In analisi effettuate con colorazioni aspecifiche come la Giemsa non è possibile osservare traslocazioni se non quando le dimensioni dei cromosomi coinvolti nell'aberrazione si modificano sensibilmente (Savage, 1975).

La traslocazione reciproca è un'aberrazione trasmissibile alla progenie cellulare in quanto non c'è perdita di materiale genetico e ciascun cromosoma conserva un centromero, indispensabile per la corretta separazione in anafase. La trasmissibilità di una aberrazione alla progenie è un fattore importante per determinare la carcinogenicità di un'anomalia cromosomica. Se l'aberrazione ha una struttura tale da impedire il corretto compimento della mitosi, una serie di programmi di controllo inducono blocco o morte cellulare. In tal caso, l'aberrazione cromosomica effettua un danno immediato, indebolendo il tessuto di cui la cellula faceva parte, ma non rappresenta un rischio di induzione di danni tardivi come il cancro. Un esempio caratteristico di aberrazione trasmissibile è il cromosoma Philadelphia identificato negli anni '60. Si tratta di una traslocazione reciproca che avviene nelle cellule del midollo osseo e porta alla fusione del gene ABL (enzima tirosin-chinasico altamente regolato) presente sul cromosoma 9 con la regione regolativa del gene BCR sul cromosoma 22. La fusione dà origine ad una oncoproteina BCR-ABL con attività chinasica deregolata. Questo cromosoma è strettamente associato con l'insorgenza della leucemia mieloide cronica (CML) ed utilizzato come criterio di diagnosi.

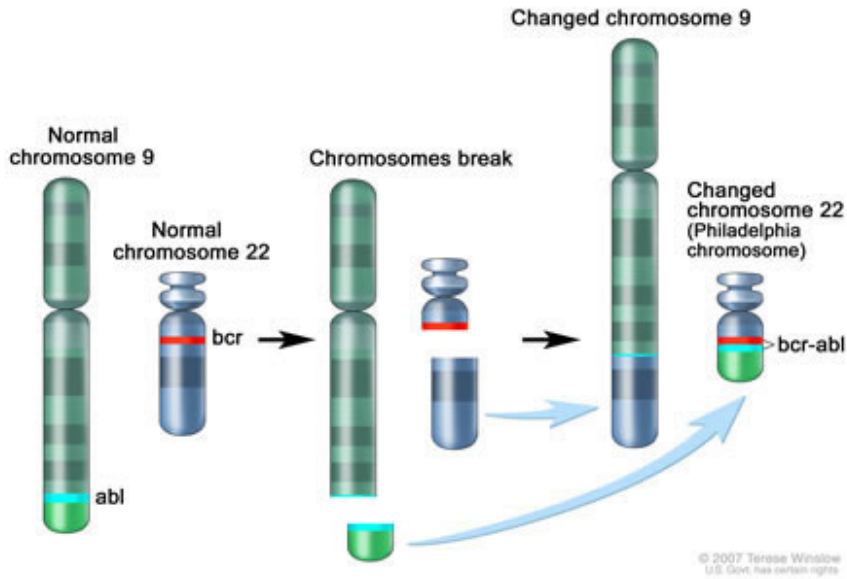


Fig. 22: Formazione del cromosoma Philadelphia originato da una traslocazione reciproca tra il cromosoma 9 e il 22.

Il dicentrico è un interscambio asimmetrico che nella sua forma completa risulta in un cromosoma con due centromeri accompagnato da un singolo frammento acentrico, composto dalle regioni terminali dei cromosomi coinvolti.

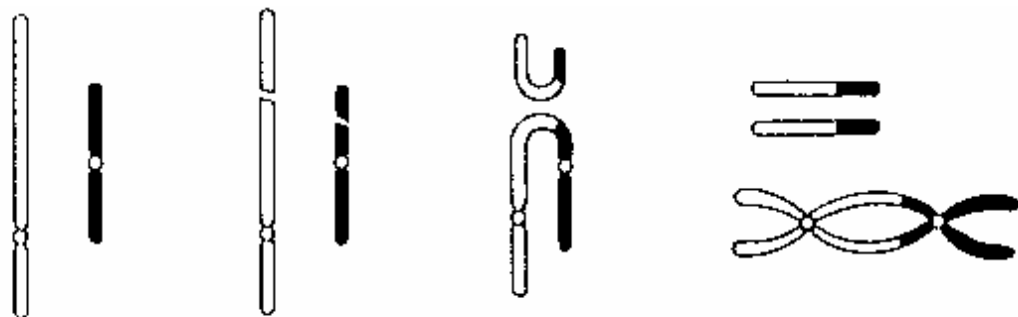


Fig. 23: Meccanismo di formazione di un cromosoma dicentrico e del suo frammento acentrico e loro replicazione nella fase S.

Grazie alla presenza dei due centromeri questa aberrazione è facilmente riconoscibile anche con metodiche di colorazione aspecifiche. Per tale motivo, e per il fatto che la frequenza spontanea in cellule non irradiate è molto bassa, inizialmente la maggior parte degli studi sulle frequenze delle aberrazioni erano effettuati analizzando i dicentrici.

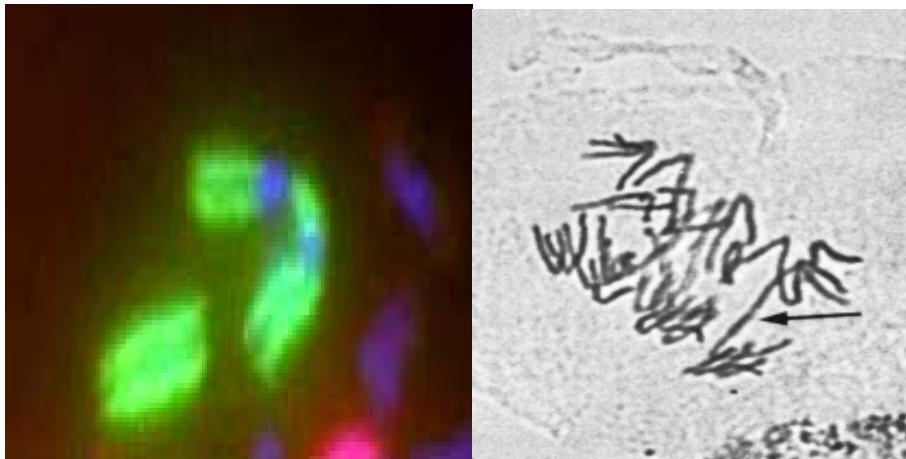


Fig. 24: Dicentrico completo originato dai due cromosomi omologhi colorati in verde, corrispondenti al cromosoma 1 umano. La metafase è visualizzata mediante la tecnica FISH con sonde ad intero cromosoma (sinistra). Formazione di un ponte cromosomico durante l'anafase (destra).

Come per le delezioni terminali, anche in questo caso il frammento acentrico può essere perduto alla fine della mitosi. Le difficoltà strutturali nell'affrontare la mitosi (fig.24) rendono questa anomalia generalmente letale (Belloni et al., 2008). È stata calcolata una riduzione di oltre il 50% di cromosomi dicentrici nel passaggio da prima a seconda mitosi in linfociti esposti a diverse dosi di raggi X (Pala et al., 2001).

2.3.3 Intrascambi

Come per gli interscambi, anche per questa classe si individua la tipologia simmetrica (inversioni peri e paracentriche) e quella asimmetrica (ring e delezioni interstiziali). Le due rotture possono avvenire sullo stesso braccio cromosomico (intrascambi intra-braccia) o sulle braccia opposte (intrascambi inter-braccia).

Quando il ricongiungimento delle due rotture avviene in maniera tale da rigenerare un cromosoma della medesima lunghezza, ma con la regione compresa tra i due dsb integrata con polarità invertita, si parla di inversione peri o paracentrica (a seconda se il frammento invertito contenga o no il centromero). Le inversioni pericentriche portano generalmente ad una variazione nella posizione del centromero per cui un cromosoma metacentrico può diventare submetacentrico.

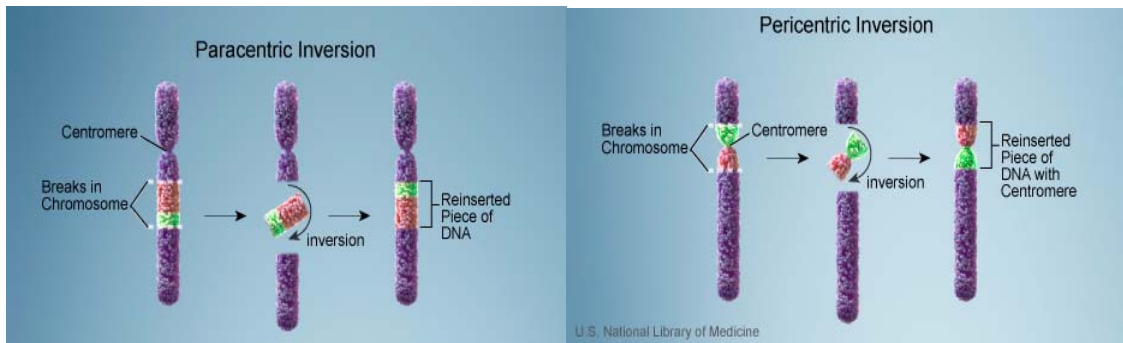


Fig. 25: Meccanismo di formazione delle inversioni para (sinistra) e pericentriche (destra).

Negli intrascambi simmetrici le modifiche strutturali non comportano impedimenti meccanici per la corretta segregazione cromatidica, per cui queste sono aberrazioni di tipo stabile e trasmissibile alle generazioni successive.

L'espressione genica è determinata dalle regioni regolative situate nell'intorno del gene e questo tipo di aberrazioni, come nel caso del cromosoma Philadelphia, benché non letali, possono essere dannose se si vanno a modificare i pattern di espressione di geni regolativi essenziali. La presenza di un' inversione pericentrica del cromosoma 16 è stata correlata alla leucemia acuta mieloblastica (LMA), appartenente al gruppo delle neoplasie maligne del midollo osseo che coinvolgono i precursori mieloidi dei globuli bianchi (Reilly, 2005). Come spiegato nel paragrafo 2.2 questo tipo di aberrazione non si visualizza con tecniche di colorazione convenzionali. Per osservare le inversioni sono necessarie tecniche di bandeggio, la mBAND, la RxFISH o le ASP.

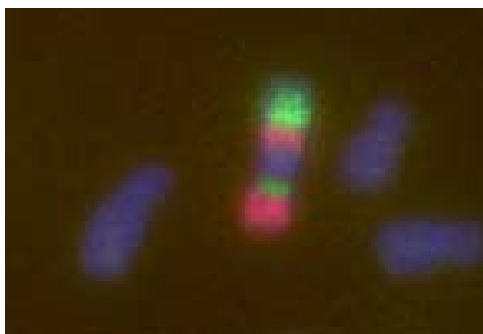


Fig. 26: Inversione pericentrica del cromosoma 1 visualizzata mediante ASP

La controparte asimmetrica dell'intrascambio tra le braccia cromosomiche è il ring, un cromosoma a forma di anello contenente il centromero. La restante parte del cromosoma può (e nel qual caso lo scambio risulterà completo) riunirsi in un frammento acentrico costituito da entrambe le regioni terminali delle due braccia cromosomiche.

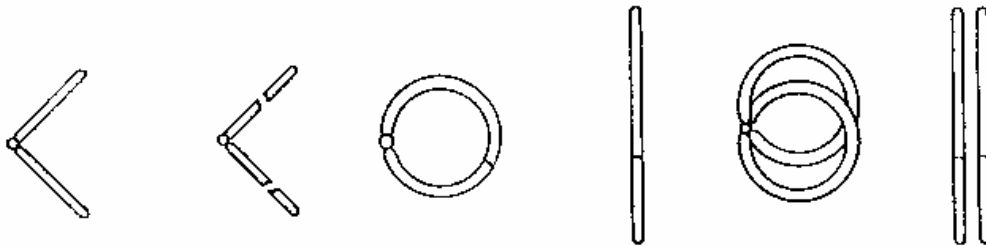


Fig. 27: Formazione di un ring e del frammento acentrico ad esso associato. Entrambe le componenti sono poi replicate in fase S.

Come i dicentrici, i ring presentano una struttura molto alterata, riconoscibile con le colorazioni convenzionali. Sono stati ampiamente usati nei primi lavori di analisi citogenetiche. La probabilità che una cellula porti a compimento la mitosi in presenza di un ring è ancora più bassa rispetto ai dicentrici.

La struttura asimmetrica degli intrascambi intra-braccia è la delezione interstiziale. Il segmento escisso si fonde dando una struttura circolare e nella sua forma completa il cromosoma originario si salda. Durante la mitosi si osserva un cromosoma più corto e due piccoli anelli derivati dalla replicazione in fase S del ring acentrico (paired dots). Il grado di letalità di questa anomalia dipende dalla grandezza del frammento circolare e dall'importanza dei geni ivi contenuti dato che viene molto probabilmente perso nel citoplasma dopo la prima divisione cellulare.

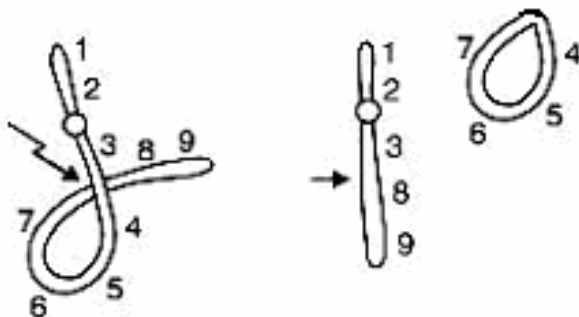


Fig. 28: Meccanismo di formazione di una delezione interstiziale generata da due rotture sullo stesso braccio cromosomico.

2.3.4 Scambi complessi

A partire da tre rotture il pattern di aberrazioni che si possono avere risulta molto ampio e diversificato. È stata proposta la definizione scambi complessi (Savage e Simpson, 1994) per tutte le anomalie generate da 3 o più rotture su due o più cromosomi. Un esempio è l'inserzione nella quale due rotture su un cromosoma generano un frammento che si va ad inserire all'interno di un altro cromosoma che ha subito una rottura. A parte casi particolari (cromosomi policentrici) l'osservazione degli scambi complessi richiede l'impiego di tecniche di colorazione specifiche (fig. 29).



Fig. 29: Scambio complesso generato dalla fusione di 3 cromosomi, osservato mediante tecnica mFISH (sotto) e con colorazione DAPI (sopra). Mediante colorazione aspecifica l'aberrazione si classifica come dicentrico.

Nel caso di tre o più rotture sullo stesso cromosoma le aberrazioni si definiscono intrascambi complessi la cui analisi non può prescindere dall'utilizzo di apposite metodologie di colorazione. La combinazione di un intrascambio con un interscambio da luogo alla formazione degli inter-intrascambi (Savage, 1997) di cui si parlerà ampiamente in seguito, costituendo parte integrante del progetto di questa tesi.

2.4 Aberrazioni cromosomiche come marcatori dell'esposizione a radiazione

Numerose evidenze sperimentali associano un aumento della frequenza di aberrazioni cromosomiche con la dose di radiazione assorbita. Come descritto nel paragrafo precedente, i primi studi furono effettuati stimando la frequenza di ring e dicentrici in funzione della dose e i risultati ottenuti per le radiazioni sparsamente ionizzanti mostravano un andamento lineare quadratico (Dufrain *et al.*, 1979). Questi risultati si osservano per tutte le aberrazioni di scambio indotte da radiazione di basso LET eccetto che per i frammenti che presentano una correlazione lineare.

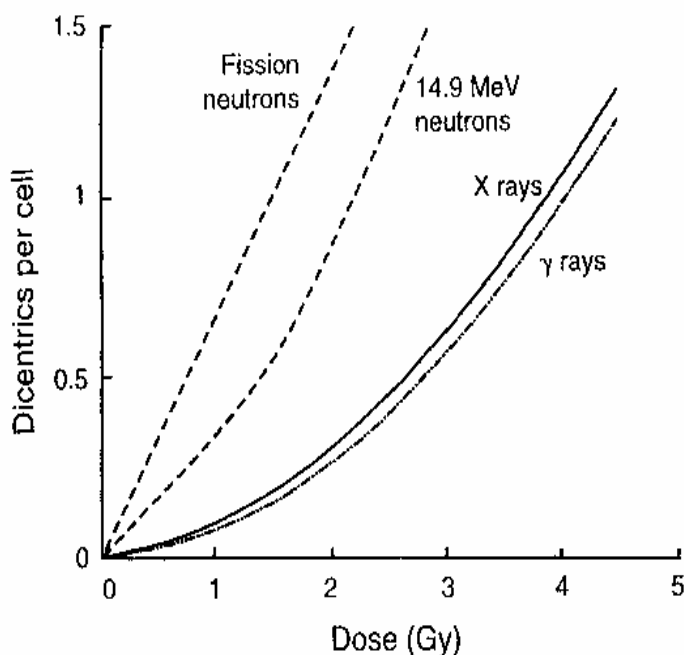


Fig. 30: Il numero di dicentrici per cellula, ottenuto in linfociti irraggiati con radiazione sparsamente (raggi X e γ) e densamente (neutroni) ionizzante (Kiefer, 1990).

La relazione lineare quadratica viene descritta dalla formula

$$Y = \alpha D + \beta D^2 \quad (2.1)$$

ove Y è il numero medio di scambi per cellula, D è la dose e α e β due fattori sperimentali. Una delle teorie più accreditate al giorno d'oggi per spiegare l'andamento lineare quadratico degli scambi radioindotti è quella della azione duale della radiazione. Si attribuisce alla radiazione una duplice maniera di indurre aberrazioni cromosomiche da scambio. La prima è dovuta ad un effetto intra-traccia, ove gli eventi che causano rotture del DNA sono generati da una singola traccia che attraversa la cellula, responsabile dell'induzione di entrambi i dsb. La seconda modalità è dovuta all'effetto inter-traccia, i dsb sono prodotti da due tracce separate passanti per il nucleo cellulare. L'andamento lineare quadratico è la somma di questi due effetti: quando il danno è arrecato da una singola particella, la formazione di scambi è correlata linearmente alla dose, nel caso siano due tracce ad interagire, la correlazione è quadratica.

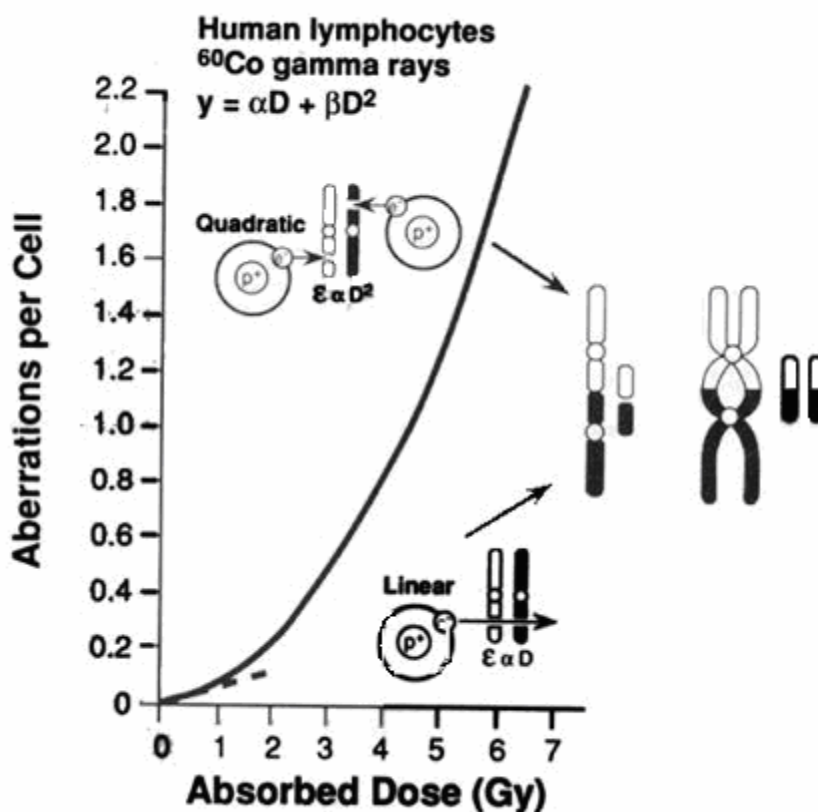


Fig. 31: Il meccanismo di formazione delle aberrazioni da scambio prevede l'effetto intra-traccia a basse dosi ed inter-traccia ad alte dosi.

I due termini α e β dell'equazione 2.1 dipendono dalla qualità della radiazione e dal rateo di dose. All'aumentare del LET α aumenta poiché cresce la probabilità che una singola traccia induca più rotture. Al diminuire del rateo di dose β diminuisce in quanto meno particelle attraversano il nucleo nell'unità di tempo, meno è probabile che si generino contemporaneamente due rotture distinte, dovute a tracce separate, che possano interagire tra loro.

Il fatto che per radiazioni sparsamente ionizzanti la frequenza delle delezioni terminali segua un andamento lineare è in accordo con queste considerazioni, data la natura di questo tipo di aberrazione, che richiede una sola rottura. E' stata ricavata una stima approssimativa di 25 dsb prodotti per Gy per cellula (Stewart, 2001) e l'andamento in funzione della dose mostra una correlazione lineare indicando che i dsb sono preferenzialmente prodotti per interazione di una singola traccia della radiazione ionizzante con il DNA piuttosto che da due tracce separate.

Per quanto concerne la radiazione di alto LET, numerosi esperimenti hanno riportato un andamento lineare con la dose per la frequenza di tutti i tipi di aberrazioni.

Questi risultati concordano con la natura di questa radiazione, caratterizzata da un'alta densità di ionizzazione. Se la componente lineare è dovuta alle aberrazioni generate per interazione di rotture derivanti da una singola traccia, radiazioni con alta densità di ionizzazione produrranno aberrazioni prevalentemente con questo meccanismo.

Valutando la frequenza di aberrazioni indotte a diverse dosi e con diversi tipi di radiazione si sono costruite delle curve di calibrazione. In caso di esposizione accidentale prelevando il sangue dai soggetti è possibile effettuare un'analisi citogenetica dei linfociti e ricavare la frequenza di aberrazioni. Attraverso l'uso delle curve di calibrazione si risale approssimativamente alla dose ricevuta. La conoscenza della dose assorbita è importante nel momento in cui si debbano adottare contromisure. Le aberrazioni cromosomiche sono dunque ottimi candidati per la biodosimetria.

Numerosi tipi cellulari possono essere impiegati per le analisi, ma da un punto di vista pratico, come è stato accennato al paragrafo 2.2 il modello d'elezione è costituito dai linfociti del sangue periferico. Essendo cellule mitoticamente inattive, nella fase G_0 del ciclo cellulare sono molto utili quando si effettuano studi a distanza di anni dal momento in cui è avvenuta l'esposizione. Se nell'individuo esposto si dovessero essere generate aberrazioni clonogenicamente letali, non andrebbero perse durante l'analisi poiché i linfociti normalmente non vanno incontro a mitosi e permangono circolanti per molti anni dalla loro formazione.

L'utilità della stima delle aberrazioni cromosomiche emerge da un'ulteriore considerazione: oltre ad essere rapportate alla dose assorbita, quindi utilizzabili per ricavarne indirettamente il valore, sono anche correlate al rischio d'insorgenza di cancro.

Per oltre trenta anni è stato monitorato un gruppo di persone, di cui erano state effettuate le analisi citogenetiche per la stima della frequenza d'aberrazioni. A partire dai primi dati sono stati formati tre sottogruppi rispettivamente con bassa, media ed alta percentuale di aberrazioni cromosomiche. Dal monitoraggio prolungato è emerso che l'incidenza di cancro era più del doppio per il gruppo ad alta percentuale di aberrazioni rispetto a quello con bassa frequenza (Bonassi *et al.*, 2000).

L'ipotesi fatta per spiegare tale correlazione è che le aberrazioni osservate nei linfociti circolanti rispecchiano il danno presente nelle cellule progenitrici ove può avere luogo il processo carcinogenetico. Questi risultati suggeriscono dunque che la frequenza di aberrazioni cromosomiche nei linfociti sia un biomarcatore importante per il rischio di cancro.

Se è vero che le aberrazioni cromosomiche forniscono informazioni dirette sui rischi da esposizione, il loro impiego risulta ancora più utile in quei casi in cui il calcolo della dose equivalente, mediante cui si può ricavare una stima del rischio, è complicato. E' stato detto nel paragrafo 1.6 come nello spazio extraterrestre la radiazione cui sono soggetti gli astronauti è formata da protoni, nuclei di elio e particelle HZE. Utilizzando la dosimetria fisica per il calcolo della dose, non sarebbe poi possibile convertirla in una corretta stima della dose equivalente, non essendoci dati su cui fare affidamento per ricavare i fattori di qualità per l'esposizione a questo tipo di campi misti. Come si è detto al paragrafo 1.8, i fattori di rischio sono ricavati dai sopravvissuti alle bombe atomiche, esposti principalmente a radiazioni sparsamente ionizzanti (Durante, 2002).

Nello spazio, inoltre, la radiazione è accompagnata da fattori che ne possono modificare gli effetti, quali la microgravità. Questi ed altri motivi supportano ulteriormente l'utilizzo di indicatori biologici della dose, del danno ricevuto e del rischio ad esso correlato.

2.5 Aberrazioni cromosomiche indotte da ioni pesanti

Gli ioni pesanti costituiscono una radiazione particellare caratterizzata da un alto valore del LET. Gli esperimenti effettuati sinora mostrano una maggiore efficacia rispetto alla radiazione sparsamente ionizzante nell'induzione di una serie di danni cellulari, quali mutazioni (Kiefer, 2002), trasformazione neoplastica in vitro (Yang et al., 1985) ed in vivo (Ando *et al.*, 2005), aberrazioni cromosomiche, anch'esse indotte in vivo (Brooks *et al.*, 2001) ed in vitro (Durante et al., 1998b). Un approfondimento degli effetti risultanti dall'esposizione a questo tipo di radiazione è dunque necessario per prevedere e ridurre i rischi da essa derivanti.

Una considerazione generalmente accettata è che l'RBE calcolato per differenti effetti biologici (mutazioni, trasformazione, aberrazioni etc.) degli ioni pesanti cresce all'aumentare del LET della radiazione in esame, in quanto viene rilasciata più energia nel mezzo per unità di percorso e l'efficacia del danno aumenta. La crescita dell'RBE all'aumentare del LET non è una funzione continua, ma presenta un picco seguito da una diminuzione di efficacia.

Questo fenomeno viene spiegato in termini di effetto "over kill": in corrispondenza del picco si può immaginare che il valore del LET sia tale che la radiazione rilasci l'energia all'interno del mezzo in maniera tale da ottenere il massimo danno biologico.

Considerando per esempio la formazione di aberrazioni da scambio è stato ipotizzato che nella regione del picco, il LET della radiazione è tale da dar luogo ad eventi di ionizzazione la cui distanza è proprio uguale alla distanza della doppia elica, cioè la distanza ideale per la formazione di un dsb.

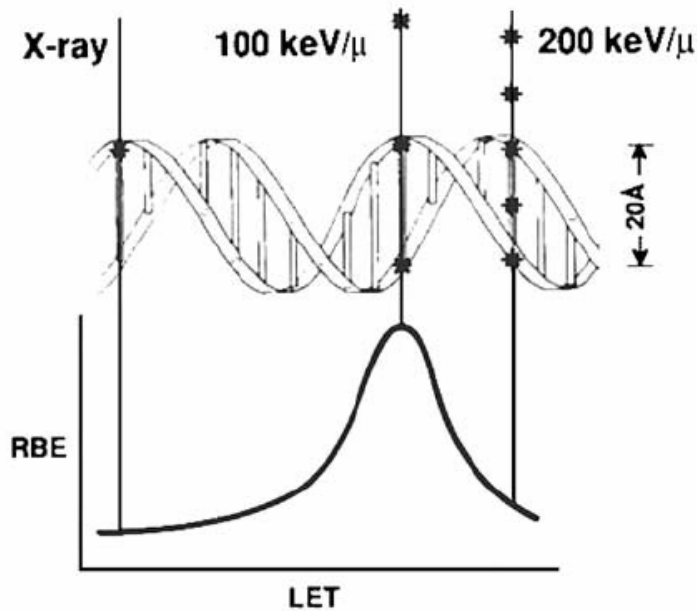


Fig. 32: L'andamento dell'RBE in funzione del LET mostra un picco laddove la distanza media degli eventi di ionizzazione corrisponde al diametro della doppia elica (Hall, 2003).

All'aumentare del LET, la dose rilasciata per unità di percorso aumenta, ma ciò non serve ad incrementare ulteriormente l'effetto biologico, il cui massimo è stato già raggiunto a valori inferiori del LET. Andando a calcolare l'RBE la dose per la radiazione in esame aumenta, ma l'effetto osservato rimane lo stesso, per cui l'RBE diminuisce.

Questo modello per spiegare l'andamento dell'RBE in funzione del LET è perlopiù descrittivo. In realtà l'energia viene rilasciata lungo la traccia in una maniera molto più complicata, come è stato descritto quando si è parlato di track core e di penumbra al paragrafo 1.3.

I risultati sperimentali concordano con la presenza di un picco di efficacia. In uno studio sono state analizzate le frequenze di aberrazioni cromosomiche in linfociti esposti a varie dosi con differenti ioni, il cui LET variava tra 0,4 e 1393 keV/μm e paragonate a quelle indotte da esposizione a raggi γ .

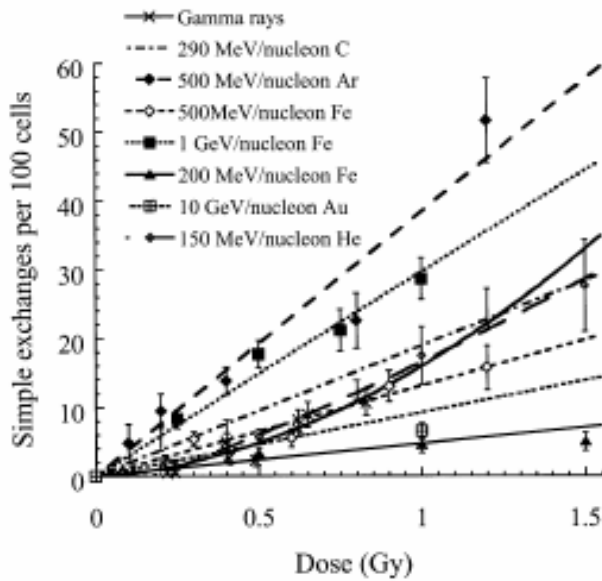


Fig. 33: Frequenza di scambi semplici osservata dopo esposizione a raggi γ , ioni C, Ar, Fe, Au, He. (George *et al.*, 2003)

I risultati hanno riportato, come previsto, una maggior frequenza di scambi, sia semplici che complessi per le radiazioni di alto LET rispetto a quella di basso LET (George *et al.*, 2003). Le curve dose-risposta per gli scambi semplici hanno mostrato andamento lineare per tutti gli ioni eccetto che per l' He e per i raggi γ .

Da questi risultati si è potuto calcolare il coefficiente angolare della retta, α , che corrisponde alla frequenza di aberrazioni per Gy di radiazione e valutarne l'andamento in funzione del LET: si osserva un andamento che cresce con il LET della radiazione e raggiunge il picco attorno ai 100 keV/ μm .

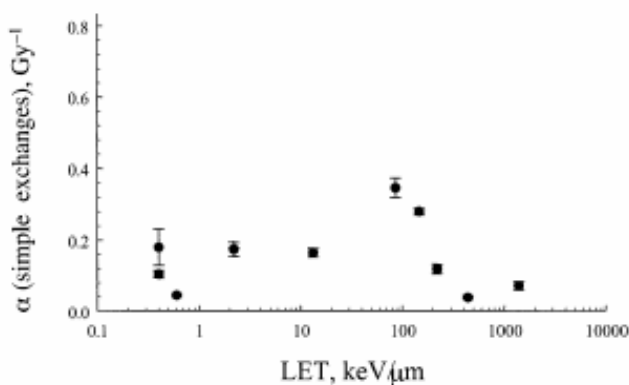


Fig. 34: Andamento del coefficiente α in funzione del LET calcolato in metafasi raccolte a 48 h (George *et al.*, 2003).

Ovviamente il valore massimo dell'RBE per l'induzione di aberrazioni cromosomiche dipenderà da molti fattori. Quando si calcola utilizzando come radiazione di riferimento raggi γ a bassa intensità di dose l'RBE risulta maggiore

rispetto al valore ottenuto con raggi γ ad alto rateo di dose: ciò si spiega facilmente alla luce di quello che si è detto sul meccanismo di formazione delle aberrazioni per radiazioni sparsamente ionizzanti, ove l'effetto intertraccia è molto più rilevante rispetto a quanto lo sia per radiazioni di alto LET. Una alta intensità di dose aumenta la probabilità che vi siano contemporaneamente due tracce che passano per un nucleo e che possono generare ionizzazioni, le quali a loro volta hanno la possibilità di interagire per andare a formare aberrazioni. A parità di dose di raggi γ ricevuti dai campioni, la frequenza di aberrazioni è maggiore nel campione irraggiato con alta intensità e questo si traduce nel minore RBE calcolato per gli ioni pesanti.

Un altro fattore importante che influenza il calcolo dell'RBE per la formazione di aberrazioni, è il fenomeno del ritardo mitotico. Sono stati effettuati studi nei quali veniva confrontata la frequenza di aberrazioni osservata in linfociti raccolti ad intervalli di tempo successivi dopo esposizione in fase G_0 (Ritter *et al.*, 2002; Nasonova *et al.*, 2000). Nei campioni irraggiati con radiazione sparsamente ionizzante le frequenze non subiscono variazioni significative all'aumentare del tempo di raccolta. Nei campioni irraggiati con ioni pesanti si osserva un aumento significativo della frequenza di aberrazioni all'aumentare del tempo concesso alle cellule danneggiate di raggiungere la mitosi. Il fenomeno del ritardo mitotico determina una sottostima del danno indotto da ioni pesanti quando l'analisi è effettuata stimolando i linfociti e raccogliendo i cromosomi a 48 h dall'irraggiamento. Tale sottostima a sua volta si ripercuote nel calcolo dell'RBE.

Per la risoluzione di questo problema si utilizzano alcuni protocolli sperimentali con i quali si ottengono cromosomi condensati anche in una fase diversa da quella mitotica. Una delle tecniche più utilizzate è la condensazione prematura dei cromosomi (PCC) descritta al paragrafo 2.2. Gli RBE per la formazione di aberrazioni cromosomiche, calcolati per campioni irraggiati con ioni pesanti e sottoposti alla tecnica PCC danno valori costantemente più alti (sino a 3 volte il valore) degli stessi campioni quando vengono analizzate le normali metafasi (George *et al.*, 2003).

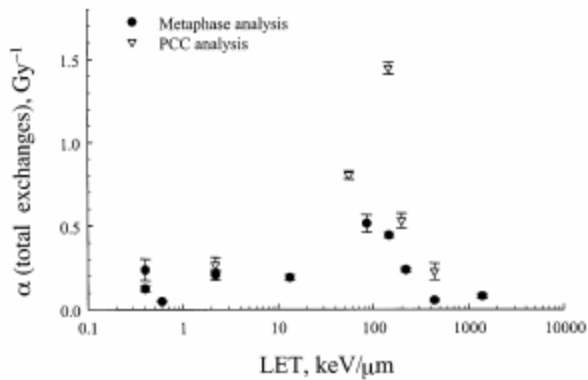


Fig. 35: Confronto tra i valori del coefficiente α ottenuti con analisi convenzionali e con la tecnica PCC (George *et al.*, 2003).

Un carattere distintivo della radiazione costituita da ioni pesanti risiede nella formazione di scambi complessi (paragrafo 2.3.4) e nella produzione di delezioni terminali (Durante *et al.*, 2006). Gli scambi complessi, come già detto precedentemente, non sono facilmente rilevabili con le tecniche di colorazione ordinarie. La frequenza di scambi complessi in campioni esposti a radiazione di basso LET a dosi basse è perlopiù trascurabile, anche quando sono utilizzate tecniche di visualizzazione opportune, ponendo il problema del calcolo dell'RBE in queste regioni. Aumentando la dose, la frequenza inizia a farsi significativa, ma è sempre inferiore a quella riscontrata dopo esposizione a ioni pesanti. Linfociti irraggiati con 3 Gy di raggi gamma presentano il 20% di cellule con uno o più scambi complessi, mentre per la stessa dose di ioni ferro se ne osservano il 70% (Durante *et al.*, 2002). Per tale ragione gli scambi complessi sono considerati un possibile marcatore della qualità della radiazione, cioè dalla stima di tali aberrazioni cromosomiche si potrebbe risalire al tipo di radiazione cui l'organismo è stato esposto. Il rapporto tra scambi complessi e semplici, anche detto rapporto C, può essere utilizzato per paragonare gli effetti della radiazione di diversa qualità, ma di questo e di altri parametri distintivi della qualità della radiazione si parlerà ampiamente nel capitolo successivo.

Capitolo 3

Tematiche affrontate

In questo progetto di tesi sono state affrontate tre tematiche principali riconducibili ad un progetto unico riguardante lo studio delle aberrazioni cromosomiche indotte da ioni pesanti. Per ciascuna tematica è stata impiegata una diversa metodologia per l'osservazione dei cromosomi ed un diverso sistema cellulare.

Delle tre tematiche affrontate, delle metodologie e dei diversi sistemi sperimentali utilizzati si darà di seguito una trattazione più approfondita.

3.1.1 Intrascambi come indice della qualità della radiazione

Le radiazioni di alto LET sono più efficaci rispetto alla radiazione sparsamente ionizzante nell'induzione di vari tipi di danni e tra questi nel capitolo precedente è stata citata la trasformazione neoplastica in vitro (Yang *et al.*, 1985) ed in vivo. Studi sulla formazione di tumori alla pelle in topi (Burns *et al.*, 1993), alla ghiandola di Harderian (Alpen *et al.*, 1993) e a quella mammaria (Dicello *et al.*, 2004), hanno fornito un RBE per gli ioni pesanti compreso tra 25 e 40.

La diversa efficacia nell'induzione di cancro tra radiazioni di basso ed alto LET potrebbe essere spiegata in termini di qualità o quantità (per unità di dose) diverse di aberrazioni cromosomiche prodotte dai due tipi di radiazioni.

Uno studio recente molto interessante effettuato su topi esposti a raggi γ e ioni ferro ha mostrato che gli ioni pesanti non sono più efficaci nell'induzione di leucemia mieloide acuta (AML), mentre l'RBE per l'insorgenza di carcinoma epatocellulare risulta pari a 50 (Weil *et al.*, 2009). Una possibile spiegazione è che l'insorgenza della leucemia richieda un numero inferiore di mutazioni e modifiche epigenetiche rispetto alla formazione di tumori solidi, ove sono necessari cambiamenti nelle caratteristiche di crescita e segnali per il processo angiogenetico e metastatico. Per l'induzione della leucemia il blocco della differenziazione ematopoietica e un incremento nella proliferazione sono sufficienti.

Dal punto di vista cromosomico si può ipotizzare che aberrazioni semplici quali delezioni o scambi sono caratteristici dei tumori liquidi, mentre anomalie più complesse

sono richieste per l'induzione di tumori solidi. Parte di queste considerazioni sono state verificate per l'AML, ove delezioni nel cromosoma 2 appaiono un fattore chiave per l'iniziazione della leucemia in topi (Haran-Ghera, 1989).

La maggior parte dei dati presenti in letteratura sull'induzione di aberrazioni cromosomiche è costituita da risultati ottenuti osservando linfociti umani raccolti dopo 48 ore dall'irraggiamento. Dato che, in media, un linfocita stimolato si divide in 24 ore ma che la radiazione ritarda la ripresa del ciclo, a 48 ore dalla stimolazione si osservano prevalentemente cellule in prima mitosi (Bender *et al.*, 1988). Le frequenze delle aberrazioni cromosomiche ottenute in tale modo costituiscono un'immagine del danno precoce provocato dalla radiazione, tra cui vi sarà la formazione di aberrazioni instabili, quali grandi delezioni, dicentrici e ring. Se lo scopo dello studio è determinare la diversa efficacia nell'induzione di effetti tardivi, tramite l'analisi di un bioindicatore come le AC, risulta dunque necessario effettuare uno studio sulla progenie delle cellule irraggiate e sulle generazioni successive (Leonard *et al.*, 2005), andando ad analizzare le aberrazioni stabili e trasmissibili.

La ricerca di una classe caratteristica di aberrazioni cromosomiche associata all'esposizione ad un certo tipo di radiazione è utile anche in altri settori. E' stato accennato al paragrafo 2.4 il concetto di curve di calibrazione ed il loro impiego in biodosimetria. Se si deve effettuare un'analisi su un campione proveniente da un individuo accidentalmente esposto ad una radiazione di cui non sono note qualità e dose, risulta molto utile avere degli indici utilizzabili per risalire al tipo di radiazione ricevuta (Amundson *et al.*, 2001; Durante, 2002). Quando un individuo è esposto a radiazione, possono essere danneggiate tutte le cellule del suo corpo, quindi sia i linfociti circolanti nel sangue e nella linfa che le linee progenitrici del midollo osseo. Quando le cellule progenitrici dei linfociti riportano aberrazioni che non impediscono la mitosi, il danno radioindotto può essere rivelato anche a distanza di molti anni dall'irraggiamento.

Perché un parametro caratteristico dell'esposizione a radiazione di alto o basso LET sia utile, si deve mantenere pressoché costante nel tempo. Uno dei parametri proposti è il fattore C dato dal rapporto tra scambi complessi e semplici. In alcuni studi *in vitro* si è dimostrato utile per la caratterizzazione della radiazione di alto LET (Anderson *et al.*, 2000), ma presenta problemi per la sua applicazione *in vivo* (Durante *et al.*, 2004). Sono stati proposti il fattore G ottenuto dal rapporto tra le delezioni interstiziali e i ring, il fattore H dato da delezioni interstiziali e dicentrici (Bauchinger

and Schimid, 1998). Oltre a questi rapporti, anche la frequenza di delezioni terminali, maggiore in linfociti esposti a radiazione di alto LET (Durante *et al.*, 2006), si è candidata come un possibile marcatore. Sono tuttora in corso numerosi studi in diversi laboratori alla ricerca del miglior parametro caratteristico della radiazione.

La prima parte di questo progetto di tesi si è posta come scopo investigare la validità del parametro F (rapporto tra interscambi ed intrascambi) in campioni esposti a radiazione densamente e sparsamente ionizzante.

È noto che i cromosomi occupano degli spazi precisi nel nucleo, definiti domini cromosomici (Cremer and Cremer, 2001, Parada and Misteli, 2002) e che i movimenti della cromatina in interfase sono ridotti (Lucas and Cervantes, 2002). La probabilità che avvengano ricombinazioni illegittime dipende dalla distanza alla quale si trovano i dsb prodotti dalla radiazione, fenomeno definito “effetto prossimità”.

L’effetto prossimità è un fenomeno generale, che riguarda la formazione delle aberrazioni qualsiasi sia il tipo di radiazione cui le cellule sono esposte. Quando la radiazione utilizzata è densamente ionizzante, la deposizione di energia e le rotture generate non sono diffuse omogeneamente all’interno del nucleo, ma estremamente localizzate lungo la traccia della particella, come spiegato nel paragrafo 1.3.

Rotture ravvicinate interesseranno con una più alta probabilità regioni cromosomiche vicine e quindi regioni dello stesso cromosoma. La formazione di aberrazioni intracromosomiche, secondo un’ipotesi avanzata da Brenner e Sachs nel 1994, dovrebbe essere favorita dopo esposizione a radiazione di alto LET. Il valore F è stato proposto come impronta della qualità di radiazione assorbita e utilizzato per valutare se un determinato campione è stato o non esposto a radiazione densamente ionizzante (Brenner, 1996).

Mediante modelli matematici è possibile calcolare il valore del rapporto F in assenza di effetto prossimità, assumendo che le estremità libere generate in maniera casuale nel nucleo hanno uguale probabilità di interagire tra loro. È stato calcolato che in cellule che possiedono 46 cromosomi con braccia di diversa lunghezza tale rapporto è 86 (Sachs *et al.*, 1997). Gli esperimenti hanno sempre fornito valori inferiori. Campioni esposti a radiazione sparsamente ionizzante a basse dosi mostrano un intervallo che va da 5 a 20 (Hlatky *et al.*, 1992). Questa discrepanza è stata interpretata come una prova a favore dell’effetto prossimità.

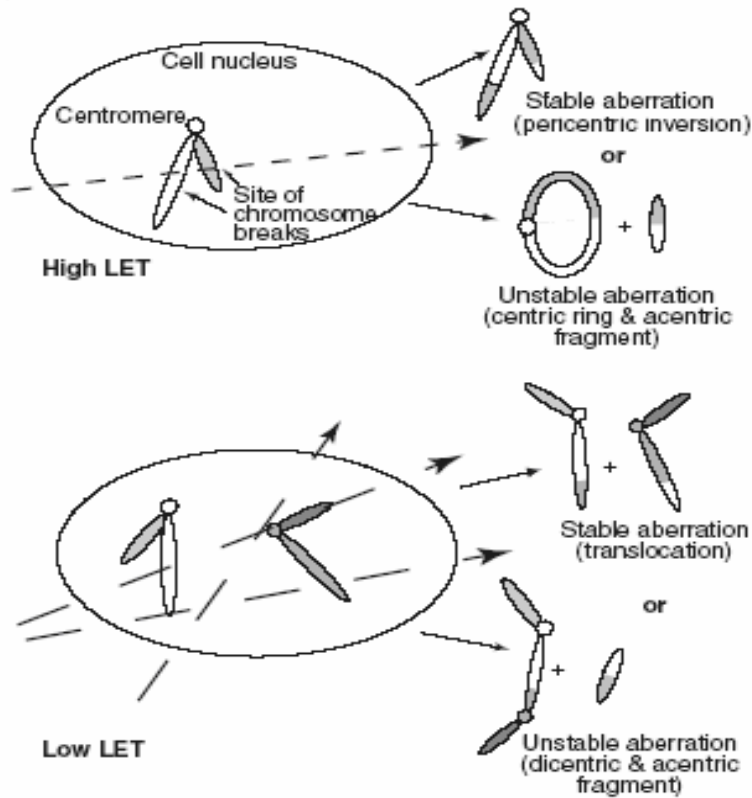


Fig. 36: La diversa struttura di traccia delle radiazioni di alto e basso LET (Amundson *et al.*, 2001).

Un'ulteriore osservazione in favore di tale effetto è data dal calcolo dell'ammontare dei dsb riparati correttamente dopo esposizione a raggi X. Esperimenti effettuati a vari intervalli di tempo dopo l'esposizione dimostrano che la maggior parte del danno indotto è riparato correttamente (restituite le estremità originali). Solo una piccola percentuale dei dsb formati si ricombina illegittimamente o permane come estremità libera (Wojewodzka *et al.*, 2002).

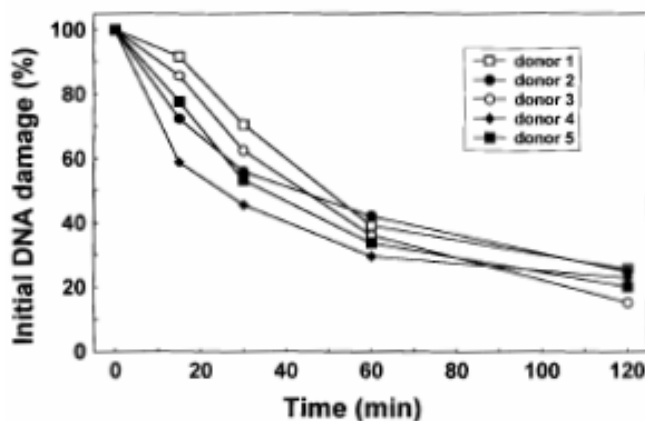


Fig. 37: La riparazione dei dsb indotti da 10 Gy di raggi γ in linfociti isolati da 5 donatori, prelevati a diversi intervalli di tempo espressi come percentuale del danno iniziale (da Wojewodzka *et al.*, 2002).

Da quanto detto sinora, se è vero che i meccanismi che portano alla restituzione (riparazione corretta) del danno o alla ricombinazione illegittima sono eventi molecolari simili (Wu *et al.*, 1996), questi dati dimostrano che sono riunite in preferenza le estremità provenienti dallo stesso cromosoma, in quanto più vicine.

Il valore F è definito come rapporto tra interscambi inter-braccia e intra-scambi inter-braccia. Così definito può tanto essere descritto dal rapporto dicentrici/ring quanto da traslocazioni reciproche/inversioni pericentriche. La differenza tra i due rapporti sussiste nella stabilità delle aberrazioni cromosomiche considerate. Dato che le aberrazioni stabili sono generalmente non letali, possono essere analizzate in cellule irraggiate e nella loro progenie anche anni dopo l'esposizione. Il valore F da utilizzare preferibilmente come biomarcatore è dunque quello ricavato dalle aberrazioni stabili. Risulta utile ricorrere al fattore F stabile anche per quanto scritto sulla correlazione tra tumori e aberrazioni cromosomiche. Le aberrazioni stabili, in quanto trasmissibili, sono quelle che assumono in genere un ruolo nel rischio di induzione di trasformazione neoplastica. In linea di principio, se ring e dicentrici hanno lo stesso tempo di dimezzamento, anche il parametro F instabile può essere calcolato.

In letteratura si ritrovano pareri contrastanti sull'efficacia del valore F e sui criteri da utilizzare per ricavarlo. Brenner e Sachs (Brenner e Sachs, 1994) riportano una serie di stime del valore F per radiazione sparsamente ionizzante ricavate dalla letteratura. Un valore di F pari a 37 ± 19 ([Stephan e Oestreicher](#), 1989) è stato ottenuto da un campione di persone risiedenti nella regione di Chernobyl nel periodo dell'incidente, una stima pari a 20 ± 3 per individui esposti a radiazione sparsamente ionizzante proveniente da una barra radioattiva accidentalmente ritrovata a Goiania (Brasile) nel 1987 ([Ramalho and Nascimento](#), 1991), 18 ± 9 per individui sottoposti a radioterapia con raggi X o γ (Stephan *et al.*, 1990). Per le radiazioni densamente ionizzanti i due autori riportano i dati di uno studio effettuato su soggetti cui era stato iniettato un agente di contrasto radioattivo, il Thorotrast, emettitore di particelle α . Il valore di F è risultato 5.0 ± 0.3 (Sasaki *et al.*, 1987). Tali valori originano tutti da studi effettuati in vivo; Brenner e Sachs nell'articolo sopraccitato riportano anche le stime dei valori F ottenute da esperimenti in vitro, i cui risultati danno 16.7 ± 0.9 e 5.6 ± 0.5 rispettivamente per radiazioni di basso ed alto LET.

Una critica avanzata a questi risultati è che i dati mostrati da Brenner derivano prevalentemente dall'osservazione di aberrazioni instabili, e cioè dicentrici e ring. Questa scelta presuppone che dicentrici e ring siano trasmessi in maniera costante e che

il rapporto tra essi non muti al trascorrere del tempo. Inoltre, quando si mettono a confronto 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 ring. Questa posizione non è generalmente accettata (Bauchinger e Schmid, 1997). Un'ulteriore critica è avanzata alla grande variabilità dei risultati riportati tra i diversi laboratori.

Un aspetto che risulta invece generalmente approvato riguarda l'intervallo di dose entro cui si può 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 in esperimenti che coinvolgono basse dosi di radiazione (Sachs *et al.*, 1997).

Nell'1998 è stato organizzato un congresso presso la fondazione di ricerca per gli effetti delle radiazioni a Hiroshima, il cui scopo era lo scambio delle conoscenze correnti sul valore F e su altri parametri ottenuti dai vari laboratori in giro per il mondo (Nakamura *et al.*, 1998). Furono presentati numerosi studi effettuati sia in vivo che in vitro ed i risultati erano contrastanti. Alcuni autori riportavano un valore del rapporto F indipendente dal LET (Bauchinger e Schmid, 1997) ed altri una dipendenza (Schwartz e Hsie, 1997). Uno di questi studi riportava dipendenza dal LET a bassi dosi, molto inferiori ad 1 Gy, mentre il valore del rapporto F rimaneva costante per dosi superiori ad 1 Gy indipendentemente dal LET della radiazione utilizzata (Sasaki *et al.*, 1998).

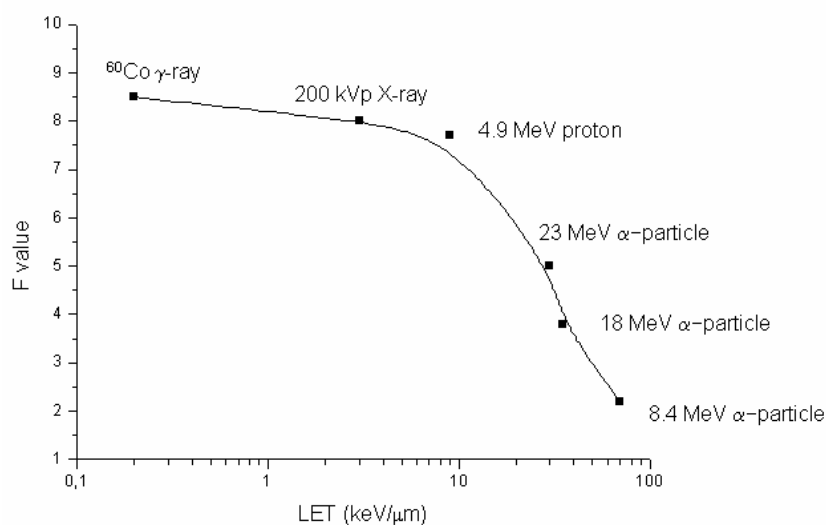


Fig. 38: Dipendenza dal LET del valore F calcolato per dosi molto basse.

Tecniche di colorazione più sofisticate hanno aumentato la sensibilità nell'individuazione delle aberrazioni intracromosomiche. La mBAND è stata impiegata per ricavare il rapporto F in diverse analisi che, anche in questo caso, hanno dato risultati contrastanti. È stato effettuato uno studio in vivo su operai di un'industria di armi nucleari dell'ex Unione Sovietica (Hande *et al.*, 2003) esposti in passato a sola radiazione sparsamente ionizzante (in media 2,3 Gy), o a radiazione mista (1,1 Gy da particelle α provenienti da plutonio inalato e 1,5 Gy di raggi γ). Secondo quanto affermato da Brenner, la frequenza di intrascambi ricavata nei campioni di sangue estratti dagli operai esposti anche alle particelle α doveva essere più alta di quella ricavata negli altri lavoratori, mentre non dovevano sussistere differenze nella frequenza di interscambi. La tecnica mFISH è stata impiegata per la stima degli interscambi stabili (traslocazioni reciproche). La frequenza osservata non differiva significativamente tra i due campioni. Per la stima degli intrascambi stabili (inversioni peri e paracentriche, delezioni interstiziali) è stata impiegata la mBAND per il cromosoma 5, ed i valori riportati hanno dato una frequenza rispettivamente di $3,7 \pm 0,5\%$ e di $0,1 \pm 0,1\%$ per i due gruppi sopraccitati. La frequenza di intrascambi è risultata maggiore negli individui esposti a radiazione di alto LET.

Uno studio in vitro, effettuato con raggi X, fasci di ioni ferro e neutroni ha dato risultati non concordanti. È stata impiegata la mFISH per la stima degli interscambi e la mBAND del cromosoma 5 per quella degli intrascambi (Johannes *et al.*, 2004). Sono stati analizzati linfociti alla prima mitosi a 48 h dall'irraggiamento nei campioni esposti a raggi X e a neutroni, mentre metafasi prematuramente condensate (PCC) nei campioni esposti a ioni pesanti, per evitare una sottostima delle aberrazioni (vedere paragrafo 2.5). Il rapporto F calcolato è risultato 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.

La situazione è controversa e ulteriori studi si devono effettuare per poter chiarire se il valore F costituisce un'impronta della radiazione. Se gli intrascambi sono aberrazioni caratteristiche dell'esposizione ad alto LET, come quella cui sono esposti gli astronauti, potrebbero essere utilizzati per la biodosimetria in queste particolari situazioni. Nei precedenti capitoli è stato discusso il problema della radiazione nello spazio ed è stato detto in che misura gli ioni pesanti contribuiscano alla dose assorbita, sebbene costituiscano solo l'1% della radiazione cosmica (Durante, 2002). Generalmente le analisi effettuate su campioni di sangue estratti da astronauti di ritorno da una missione spaziale si basano sulla stima di interscambi e i risultati sono

paragonati alle frequenze calcolate prima del volo, per capire quanto dannoso è risultato il viaggio in termini di induzione di aberrazioni e quindi di rischio di insorgenza di effetti tardivi. 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. Per chiarire questo problema 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). Sono state analizzate un totale di 2800 metafasi e non è stata individuata nemmeno un'inversione nei campioni estratti sia prima che successivamente il volo. Questi risultati sono supportati da un'ulteriore indagine effettuata in vivo su operai di una centrale nucleare a Sellafield nel Regno Unito (Tawn and Whitehouse, 2005) esposti a raggi γ o a particelle α provenienti da plutonio inalato, con dosi considerevolmente più basse (tra i 60 e i 400 mSv) di quelle riscontrate nello studio di Hande. Le aberrazioni, sia intra che intercromosomiche, sono state visualizzate mediante la tecnica del bandeggio G, ma non è stata rilevata nessuna variazione statisticamente significativa nella frequenza di intrascambi tra i due gruppi di lavoratori.

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.

In base a queste considerazioni si è definita questa prima parte del progetto di tesi, il cui scopo è valutare l'attendibilità del fattore F come biomarcatore. L'elemento innovativo rispetto agli studi precedenti è l'impiego delle Arm Specific Probes, sonde specifiche per le braccia cromosomiche consentendo l'analisi di un vasto gruppo di cellule.

3.1.2 Progetto d'esperimento

Lo scopo principale di questa prima sezione del lavoro di tesi è l'analisi delle aberrazioni intracromosomiche per stimare il valore F in campioni di cellule sopravvissute ad irraggiamento con radiazioni sparsamente e densamente ionizzanti. Si è voluto confrontare la qualità e la quantità del danno citogenetico nella progenie delle cellule esposte, utilizzando le ASP per visualizzare gli intrascambi. Fine ultimo è verificare se gli intrascambi possano giocare un ruolo nella maggiore efficacia degli

ioni pesanti per l'induzione di effetti tardivi, e se possono avere un valore pratico come "impronta digitale" del danno indotto da ioni pesanti.

Campioni di sangue intero prelevato da donatore sano sono stati utilizzati per i diversi irraggiamenti. Come radiazione rappresentativa dell'alto LET si è scelto un fascio di ioni ferro di energia pari a 1 GeV/nucleone, generato all'acceleratore presso il Brookhaven National Laboratory (BNL), Long Island, New York. Il LET medio è pari a 147 keV/ μm , valore prossimo a quello corrispondente al picco di efficacia biologica relativa delle particelle cariche (George *et al.*, 2003). Per il basso LET sono stati usati raggi γ prodotti da una sorgente di Cs^{137} a temperatura ambiente presso il BNL e raggi X (LET medio degli elettroni nel target 0,2 keV/ μm) prodotti al dipartimento di Scienze Fisiche dell'Università Federico II di Napoli. Le caratteristiche dell'acceleratore e della macchina a raggi X verranno descritte nel prossimo capitolo. Le dosi utilizzate per gli esperimenti sono state 50,100,200,300 cGy. Sono stati esposti 2 ml di sangue per ciascun campione. Dopo l'esposizione il sangue è stato messo in cultura in terreno arricchito con fitoemoagglutinina per la stimolazione dei linfociti. Trascorse 144 h dalla stimolazione i linfociti hanno compiuto più di tre cicli cellulari (Miller *et al.*, 1981) e si è proceduto con la tecnica della raccolta dei cromosomi (harvest). Per i protocolli sperimentali dettagliati si rimanda all'appendice.

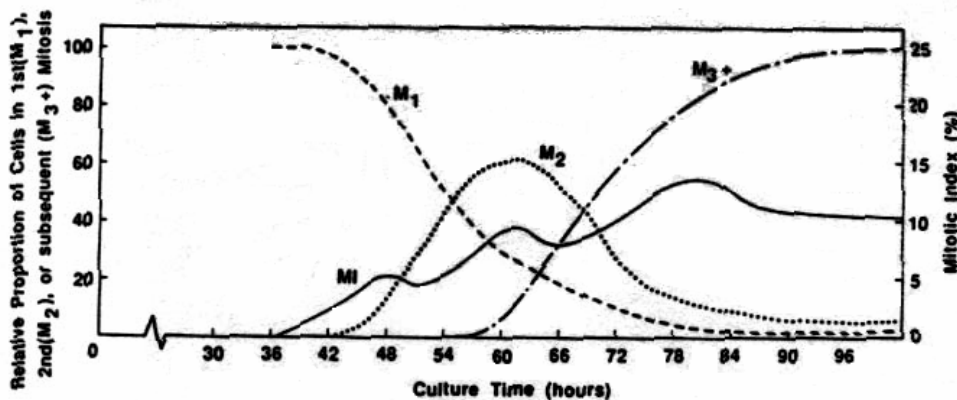


Fig.39: Relazione tra la proporzione di linfociti in prima (M_1), seconda (M_2) o terza (M_3) mitosi, con il tempo di coltura in terreno contenente PHA e indice mitotico (da Bender *et al.*, 1988).

Lo studio degli intrascambi è stato effettuato con 2 metodiche di ibridazione: con le ASP specifiche per il cromosoma 1 e con la arm specific mFISH. Con la prima metodica sono stati analizzati tutti i punti esposti a ioni ferro e a raggi γ , per ottenere una curva dose-risposta. Con la arm mFISH è stato analizzato un punto dose (2 Gy) di linfociti esposti a ioni ferro e raggi X e raccolti a 108 h. I protocolli per l'ibridazione in situ si ritrovano in appendice.

I vetrini ibridizzati sono poi stati osservati con l'utilizzo di un microscopio a fluorescenza collegato ad un computer. Nel caso delle ASP per il cromosoma 1, l'acquisizione è stata automatica (Metafer 4 software, MetaSystems) e le immagini sono state analizzate con un programma (visual R.A.I.C.) messo a punto al dipartimento di fisica dell'università di Napoli. L'acquisizione delle immagini in arm specific mFISH è stata effettuata manualmente su un microscopio a fluorescenza (AxioImager M1, Carl Zeiss) e l'analisi effettuata mediante un programma per la cariotipizzazione (ISIS, MetaSystems). La descrizione dettagliata delle varie risorse utilizzate per questo e per gli altri progetti d'esperimento si rimanda al prossimo capitolo.

3.2.1 Bioindicatori per il rischio di cancro alla tiroide

Il cancro alla tiroide è la neoplasia endocrina più frequente nell'essere umano. Fortunatamente i tumori alla tiroide sono rari e rappresentano solo l'1% delle malattie oncologiche, e colpiscono le donne più che gli uomini. Il carcinoma papillare tiroideo (PTC da Papillary Thyroid Carcinoma) origina dalle cellule follicolari e rappresenta il 70% delle neoplasie al tessuto tiroideo (Pisani *et al.*, 1999). La radiazione ionizzante costituisce un conclamato fattore di rischio per l'induzione del cancro alla tiroide (Ron, 2007). Sin dagli anni '50 emersero le prime evidenze in materia quando fu riscontrato un aumento della patologia in bambini con iperplasia del timo sottoposti a terapia con raggi X (Janower e Miettinen, 1971). Studi epidemiologici effettuati sui sopravvissuti delle esplosioni nucleari (Thompson *et al.*, 1994) e in seguito al disastro di Chernobyl (Reiners *et al.*, 2008) hanno ulteriormente confermato la correlazione tra esposizione a radiazione ionizzante e l'aumento del rischio di incidenza del carcinoma papillare tiroideo.

Con l'impiego di metodiche di biologia molecolare è stato possibile investigare i meccanismi alla base dello sviluppo della neoplasia e individuare i geni maggiormente coinvolti. Analisi di trasfezione del DNA hanno dimostrato una connessione importante tra l'insorgenza di PTC e alterazioni nel gene RET (Rearranged During Transfection), (Fusco *et al.*, 1987; Greco *et al.*, 1990). Studi in vitro hanno inoltre dimostrato una correlazione tra esposizione a radiazioni ionizzanti e formazione di anomalie RET/PTC (Ito *et al.*, 1993). Il gene RET è situato sul braccio lungo (q) del cromosoma 10 a livello della banda q11.2 e codifica per un recettore di membrana tirosin-chinasico appartenente alla famiglia dei fattori neurofici derivati dalla linea di cellule gliali

(Airaksinen *et al.*, 1999). RET è normalmente espresso dalle cellule C parafollicolari e mutazioni puntiformi in questo sito sono responsabili dei carcinoma tiroidei sporadici e midollari (Smith *et al.*, 1994).

Le alterazioni cromosomiche riscontrate nei PTC sono caratterizzate dalla fusione della regione codificante il dominio tirosin chinasi (TK) di RET con regioni aminoterminali di geni espressi costitutivamente nella tiroide (Pasini *et al.*, 1996; Santoro *et al.*, 2002). La famiglia di oncogeni prende il nome collettivamente di RET/PTC e tra queste sono state identificate tre strutture più comuni.

RET/PTC1 è un'inversione paracentrica che giustappone il dominio TK al promotore e al primo esone del gene H4 (Greco *et al.*, 1990; Pienotti *et al.*, 1992) anche noto come D10S170, distante linearmente 30 megabasi da RET. È stato recentemente dimostrato che H4 è una proteina ubiquitaria con funzioni legate al processo apoptotico (Celetti *et al.*, 2004). Gli autori dello studio suggeriscono che la perdita di questa funzione genetica possa avere un ulteriore ruolo nello sviluppo del tumore.

RET/PTC2 è una traslocazione con il gene $Ric\alpha$ (subunità regolativa della chinasi dipendente dall'AMP ciclico) sul cromosoma 17 che determina l'espressione ectopica di RET (Bongarzone *et al.*, 1993).

RET/PTC3 è un'altra inversione paracentrica che coinvolge il gene ELE1 situato a 0.5 megabasi da RET (Santoro *et al.*, 1994).

La prevalenza dei riarrangiamenti RET/PTC nei carcinoma papillari varia a seconda della regione geografica e dell'età del paziente. Negli USA, in Italia e in Canada si registra RET/PTC nel 30-40% dei casi negli adulti (Nikiforov, 2002). Nei bambini e nei giovani la prevalenza è più alta, fino al 60%. In entrambe le categorie RET/PTC1 è l'anomalia più comune, ritrovata nel 60-70% dei casi e insieme RET/PTC1 e RET/PTC3 (entrambi intrascambi) rappresentano più del 90% delle anomalie nei PTC. L'incidenza aumenta in pazienti con storia di esposizione (accidentale o terapeutica) a radiazioni ionizzanti. Le analisi molecolari eseguite sui bambini esposti alla ricaduta radioattiva in seguito al disastro di Chernobyl hanno mostrato che nel 87% dei pazienti con carcinoma papillare era presente un riarrangiamento RET/PTC (Nikiforov, 2002). Nel caso di Chernobyl, il responsabile principale dell'induzione tumorale è stato lo I^{131} , un prodotto di fissione dell' U^{235} . L'emivita del radionuclide è di 8,02 giorni e il decadimento è di tipo γ e β , entrambe radiazioni di basso LET.

Lo iodio normalmente circola nel sangue e viene velocemente incorporato dai tireociti ove viene ossidato a iodio metallico e collegato ai radicali tirosinici della proteina tireoglobulina (mono-iodio tirosina o MIT e di-iodio tirosina, DIT). Questa proteina viene poi secreta per esocitosi nel lume del follicolo a costituire la sostanza colloidale. Quando la ghiandola deve secernere gli ormoni, il colloide viene riassorbito dai tireociti e al loro interno avviene l'idrolisi della globulina e la condensazione degli ormoni per formare tri o tetra.iidotironina (la più abbondante). L'incorporazione del radioisotopo I^{131} è stata la causa dell'incremento significativo di neoplasie alla tiroide dopo Chernobyl.

Il riarrangiamento RET/PTC3 è risultato il più comune nel caso di tumori indotti dalla radiazione e analizzati entro 10 anni dall'incidente (Smida *et al.*, 1999). Nuove forme nella famiglia RET/PTC sono inoltre state trovate in pazienti con PTC esposti a radiazione.

Il meccanismo alla base della formazione dei RET/PTC è stato analizzato in uno studio effettuato con microscopia tridimensionale. La distanza media tra i geni RET e H4 è stata misurata in nuclei in interfase (Nikiforova *et al.*, 2000). I risultati hanno dimostrato che fino al 40% di cellule di tiroide normali avevano almeno una coppia di geni RET e H4 giustapposti. La co-localizzazione di questi geni in interfase potrebbe spiegare l'alta probabilità di indurre simultaneamente un danno con una singola traccia di radiazione, supportando l'importanza dell'effetto prossimità per la formazione degli scambi radioindotti.

Lo scopo di questa parte del progetto di tesi è valutare se le regioni in cui sono presenti questi geni costituiscono hot spot di mutazione e se qualità di radiazione diverse inducono con differente efficacia i riarrangiamenti intracromosomici. Poiché RET/PTC rappresenta un marcatore del cancro alla tiroide (Asa, 2001; Corvi *et al.*, 2001) ci si è proposti di ottenere un indicatore molecolare dell'RBE per ioni pesanti utilizzando la frequenza delle inversioni nel cromosoma 10 in cellule della tiroide umana.

3.2.2 Progetto d'esperimento

Una cultura primaria di cellule follicolari normali di tiroide sostiene poche divisioni in vitro prima di andare in senescenza. Per tale motivo, l'esperimento è stato condotto con una linea cellulare di tiroide immortalizzata, la HTori-3. Presso

l'acceleratore lineare di bassa energia (UNILAC) del GSI (Germania) è stata effettuata l'esposizione in vitro di cellule Htori-3 con ioni nichel (6 MeV/n, LET 3480 keV/μm). L'esposizione a raggi X è stata anch'essa condotta al GSI con una macchina Seifert operante con un picco di voltaggio di 250 kV. L'esposizione a ioni ferro (1 GeV/n, LET 147 keV/μm) è stata effettuata presso il BNL. Le dosi sono state 200 cGy per gli ioni ferro e i raggi X ed una dose più alta per gli ioni nickel, 550 cGy, valore in cui la sopravvivenza cellulare risulta simile al campione esposto a basso LET.

Le cellule sono state lasciate 24 – 30 h in incubatore prima di effettuare la raccolta prematura di cromosomi. Sono stati allestiti dei vetrini sui quali è stata effettuata l'ibridizzazione in situ utilizzando la tecnica mBAND specifica per il cromosoma 10. Le immagini cromosomiche sono state acquisite manualmente mediante un microscopio a fluorescenza (Olympus BX61) collegato ad un computer dotato del software (ISIS) per la cariotipizzazione e l'analisi dei preparati.

3.3 Topologia del nucleo in interfase e spettro delle aberrazioni cromosomiche

Nei primi studi di topologia cellulare si assumeva che i cromosomi in interfase erano diffusi omogeneamente nel nucleo in maniera casuale (Mauelidis, 1990). Un danno operato da un agente clastogeno secondo questo schema genera un gruppo di cromosomi rotti liberi di interagire tra loro per formare riarrangiamenti cromosomici (Savage, 1993).

Studi recenti hanno dimostrato che questa visione del nucleo risulta fondamentalmente sbagliata. Studi sull'architettura del nucleo in interfase hanno mostrato che i cromosomi occupano regioni definite e localizzate, denominate domini o territori cromosomici (Cremer e Cremer, 2001). Una definizione spaziale è stata riscontrata persino a livello delle braccia cromosomiche. La grandezza dei territori cromosomici è determinata sia dal contenuto in DNA che da altri fattori come lo stato trascrizionale. L'introduzione della tecnica FISH è stata molto importante per la visualizzazione di queste regioni. È stato inoltre dimostrato che i movimenti della cromatina (Bornfleth *et al.*, 1999) e dei dsb prodotti dalla radiazione sono molto limitati (Jakob *et al.*, 2009). Questi studi si limitano ovviamente alle linee cellulari investigate, infatti i altri casi (neuroni in differenziamento o in situazioni patologiche) sono stati osservati ampi movimenti della cromatina.

Mediante la FISH si è cercato di valutare se i territori cromosomici si presentano in maniera riproducibile, cioè se i rapporti fra i singoli domini sono casuali o meno. I risultati sono contrastanti. Alcuni studi riportano un alto grado di ordine dei riarrangiamenti, altri portano una disposizione completamente casuale, altri ancora mostrano che il grado di ordine dipende dalla linea cellulare utilizzata.

Due parametri importati sono stati identificati, la grandezza del cromosoma e la densità genica. Uno studio recente ha correlato la posizione relativa dei cromosomi nel nucleo in base al contenuto in DNA, stabilendo che i cromosomi piccoli tendono a raggrupparsi al centro del nucleo, circondati da quelli più grandi. Alternativamente si è visto che il contenuto genico gioca un ruolo chiave per cui i cromosomi ricchi in geni si ritrovano raggruppati all'interno circondati dai cromosomi con bassa densità genica. Un esempio è costituito dai cromosomi 18 e 19, con contenuto in DNA simile (85 e 67 megabasi) ma posizionati rispettivamente alla periferia e al centro del nucleo. La disposizione radiale rispetto alla densità genica è stata ritrovata anche nelle scimmie, suggerendo che il fenomeno abbia un ruolo funzionale importante e che quindi si sia conservato durante l'evoluzione.

Un ulteriore parametro per la preferenziale distribuzione dei cromosomi potrebbero essere i rapporti fra specifici cromosomi.

La conseguenza di una disposizione definita dei cromosomi e della mobilità ridotta della cromatina è che il fattore prossimità, di cui si è ampiamente parlato in precedenza, diventa un parametro importante nel determinare la probabilità di interazione fra due specifiche regioni geniche (Savage, 2000). Se i cromosomi occupano regioni definite con limitata sovrapposizione e se le estremità rotte del DNA hanno poca mobilità, la geometria del nucleo cellulare deve giocare un ruolo fondamentale nella determinazione della quantità, del tipo e della complessità di aberrazioni cromosomiche formate. L'effetto dovuto alla topologia nucleare dovrebbe essere evidente in seguito ad esposizione a radiazione densamente ionizzante, che produce lesioni al DNA estremamente localizzate lungo la traccia lineare della particella carica che attraversa il nucleo (Aten *et al.*, 2004).

Si è ampiamente discusso sull'utilità delle aberrazioni cromosomiche come indicatori del danno radioindotto e del rischio carcinogenetico. Tuttavia i danni da radiazione e le stime di rischio per la salute dopo esposizione a particelle cariche sono correlati alla dose equivalente, cioè all'energia rilasciata per unità di massa, senza nessuna considerazione concernente la geometria, ed in particolare sulla posizione

relativa del proiettile (particella carica) e del bersaglio (domini cromosomici nel nucleo interfascio).

Il fine di questa parte del progetto di tesi è investigare questo aspetto del danno radioindotto e cioè verificare se la topologia nucleare ha una diretta influenza sul danno genetico e sul rischio tardivo. Inoltre dal punto di vista radioprotezionistico, ci si propone di investigare se la dose assorbita sia realmente un parametro efficace nella determinazione del danno o se la fluenza (il numero di particelle per unità di area) non costituisca un fattore più rappresentativo.

Per definire la topologia nucleare si è fatto uso di un sistema per la crescita cellulare molto particolare, un substrato provvisto di solchi paralleli. Le cellule utilizzate sono stati fibroblasti della linea AG1522 facilmente reperibili in commercio.

Studi sulle superfici di crescita hanno mostrato che solchi di dimensioni micrometriche costringono le cellule (e il nucleo al loro interno) che crescono adese al substrato a assumere una posizione allineata lungo il solco. Questo fenomeno è noto come guida da contatto (contact guidance). Le cellule tendono a crescere nella direzione impartita da solchi, fibre o qualsiasi altra struttura esterna. In vivo questo fenomeno è alla base della formazione e del corretto sviluppo dei tessuti.

Il meccanismo alla base non è noto, si ritiene che le strutture allineate costituiscano una costrizione strutturale nella formazione dei microfilamenti cellulari e della struttura citoscheletrica.

Uno stress meccanico sarebbe dunque responsabile del posizionamento della cellula e del suo allineamento (Walboomers *et al.*, 2000).

È interessante notare che a parte strutture fisiche, anche altre forze, come quelle generate da un campo elettrico o magnetico, possono essere impiegate per l'allineamento cellulare (Guido e Tranquillo, 1993).

3.3.2 Progetto d'esperimento

Per poter definire se la topologia nucleare abbia influenza su quantità e tipo di aberrazioni prodotte è stato necessario mettere a punto un sistema per coltivare le cellule in una disposizione geometrica definita. Il sistema è stato ottenuto in collaborazione con l'università Radboud del centro medico di Nijmegen in Olanda. I collaboratori hanno utilizzato degli stampi in silicone su cui mediante fotolitografia hanno ottenuto uno schema di solchi con spessore di 2 μm , distanziati 2 μm e profondi

0,5 μm . Una miscela di polistirene/cloroformio è stata poi versata sullo stampo e dopo l'evaporazione del cloroformio, la replica in polistirene è stata rimossa e attaccata su un supporto, in polistirene anch'esso. Il risultato è un substrato con solchi che viene in seguito sterilizzato.

Le cellule sono state seminate in questi supporti. Tramite colorazione in vivo con Hoechst è stato possibile verificare che i nuclei cellulari si presentavano allineati lungo i solchi e misurare l'asse maggiore e minore delle cellule allineate per poter pianificare gli irraggiamenti (fig. 40).

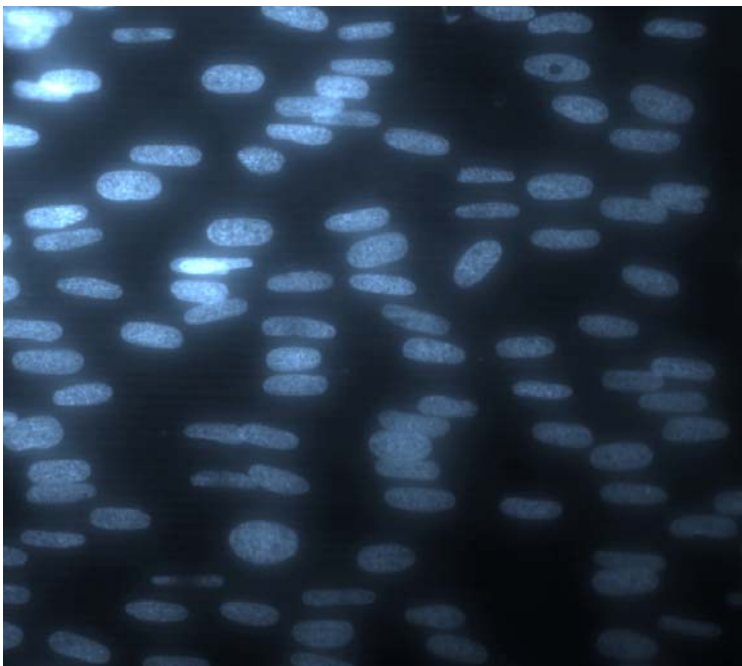


Fig. 40: Fibroblasti AG1522 seminati su substrati con solchi paralleli e osservati dopo colorazione in Hoechst.

Presso i nostri collaboratori, sono state effettuate misurazioni con microscopio a forza atomica (AFM) per ottenere una stima dell'altezza della cellula al di sopra del solco. Le misurazioni con AFM hanno confermato che le cellule crescono come ellissoidi paralleli ai solchi e che l'asse maggiore è più lungo di un fattore 3 rispetto alla componente ortogonale.

Ulteriori immagini sono state ottenute con microscopia elettronica a scansione (SEM).

Le cellule sono state seminate e lasciate in coltura sino al raggiungimento della confluenza cellulare. A questo stadio, il ciclo si blocca in G1 e quando si effettua l'esposizione a radiazioni, si indurrà la formazioni di aberrazioni di tipo cromosomico e non cromatidico, come precedentemente spiegato.

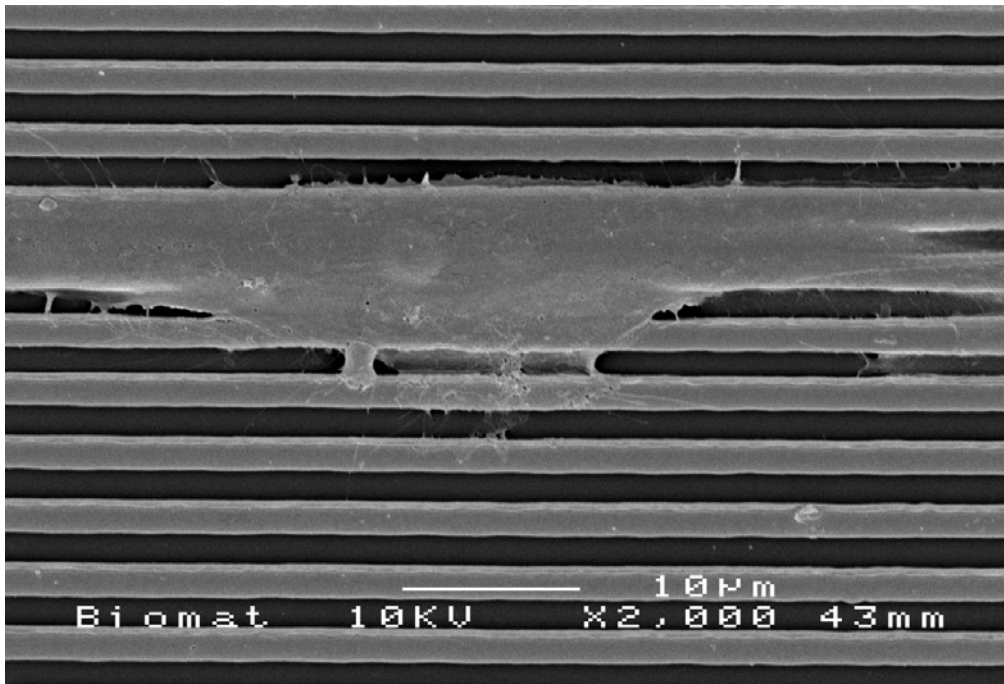
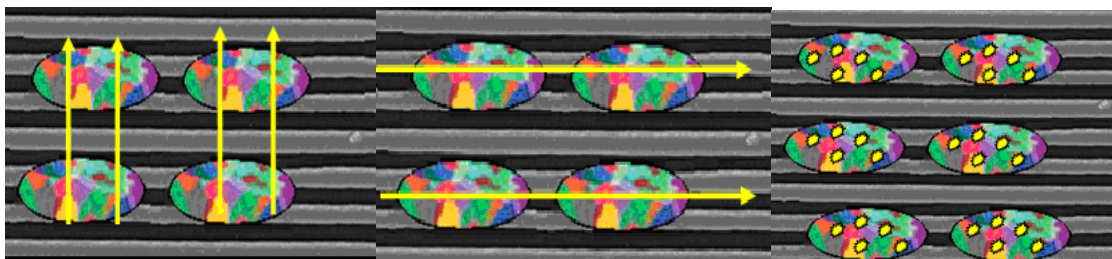


Fig. 41: Fibroblasto AG1522 osservato in microscopia elettronica a scansione (ingrandimento 2000x) cresciuto su substrato con solchi (gentilmente fornita dal prof. F.X. Walboomers).

Lo scopo del lavoro è definire quanto la topologia influisca sullo spettro di aberrazioni radioindotte.

I campioni sono stati esposti in diverse condizioni di irraggiamento: a parità di dose (1 Gy) o a parità di numero di tracce passanti per il nucleo (1 particella/nucleo). A partire dalle misurazioni ottenute con la colorazione Hoechst e con l'AFM si sono determinate le dosi necessarie per avere in media un attraversamento per nucleo.



Schema di esposizione: A sinistra l'irraggiamento lungo l'asse minore del nucleo (SIDE o S) al centro lungo l'asse maggiore (HEAD o H) e a destra lungo l'asse perpendicolare al sostrato di crescita (BACK o B).

Gli irraggiamenti sono stati effettuati presso il BNL e presso il sincrotrone del GSI (SIS). In entrambi i casi è stato utilizzato un fascio di ioni ferro da 1 GeV/n (LET 147 keV/μm). La statistica di Poisson è stata impiegata per il calcolo del numero di attraversamenti per nucleo mentre per le dimensioni nucleari si è applicata la

distribuzione di Gauss. L'irraggiamento con la stessa dose (1 Gy) equivale ad un numero di attraversamenti per nucleo pari a 1,98 per la configurazione S, 0,89 per H e 5,5 per B. Per avere in media un singolo attraversamento per nucleo in ciascuna configurazione la dose è pari a 0,38 Gy per S, 1,2 Gy per H e 0,17 Gy per B, approssimate rispettivamente a 0,4, 1 e 0,2 Gy.

Dopo l'esposizione le cellule sono state tenute per 24 h in incubatore e sono poi state tripsinizzate dai substrati con solchi e riseminate in fiasche di coltura per poter effettuare la raccolta dei cromosomi. La procedura è stata effettuata dopo 24 ore dalla semina utilizzando la tecnica PCC.

I campioni conservati in fissativo sono stati utilizzati per preparare dei vetrini su cui è stata in seguito effettuata la tecnica mFISH. In questo modo si è potuto analizzare lo spettro totale delle aberrazioni cromosomiche da scambio. L'acquisizione delle immagini è stata effettuata automaticamente con il microscopio a fluorescenza (Imager Z1 Zeiss) e l'analisi effettuata con il programma di cariotipizzazione ISIS.

Capitolo 4

Sistemi sperimentali

4.1 Sistema biologico: i linfociti umani del sangue periferico

Nel capitolo 2 si è detto che uno dei tipi cellulari più utilizzati per le analisi citogenetiche sono i linfociti del sangue periferico. Questi, come tutte le cellule del sistema emolinfopoietico, originano (nell'adulto) nel midollo osseo da cellule pluripotenti. Durante lo sviluppo fetale anche il fegato e ad altri organi costituiscono sedi di formazione.

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 (chiamati anche organi linfoidi primari o centrali), passano nel sangue e da qui negli altri organi linfoidi periferici: linfonodi, tonsille, milza, appendice.

I linfociti rappresentano il 20-40% dei leucociti circolanti; i linfociti T costituiscono l'85% dei linfociti totali, la restante parte è costituita da linfociti B (Boari e Macori, 2001). Un linfocita maturo, che non ha ancora subito il processo di attivazione, definito vergine, è bloccato in fase G₀ (resting) del ciclo cellulare.

Nel sangue e negli altri organi linfoidi periferici i linfociti circolano continuamente alla ricerca di sostanze estranee. Le sedi ove avvengono il riconoscimento e l'attivazione sono i linfonodi: qualora i linfociti riconoscano un antigene estraneo vi si legano e vanno incontro ad una serie di modificazioni morfologiche e fisiologiche necessarie per avviare la risposta immunitaria, cellulo-mediata nel caso dei linfociti T, umorale nei linfociti B.

Fasi principali dell'attivazione sono un'intensa proliferazione, la ripresa del ciclo cellulare e infine il differenziamento. I linfociti B possono differenziarsi in plasmacellule o in cellule B della memoria. Le prime hanno vita breve e secernono gli anticorpi specifici che si andranno a legare all'antigene bersaglio determinando il richiamo di altri fattori di difesa. I linfociti T attivati proliferano anch'essi e si differenziano in cellule T effettrici, a loro volta suddivise in T-helpers, T-citotossici, T-suppressori, le cui funzioni

sono finalizzate al coinvolgimento di altre cellule del sistema immunitario, e in cellule T della memoria.

Le cellule della memoria vivono per anni se non per l'intera vita dell'organismo e sono responsabili dell'immunità a lungo termine nei confronti dell'antigene che ha scatenato la risposta (Ahmed and Gray, 1996).

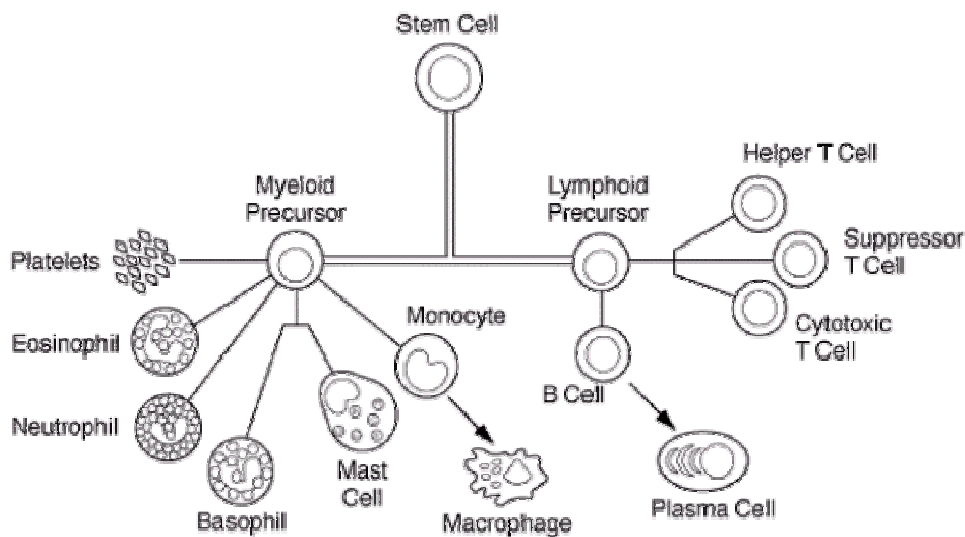


Fig. 42: La formazione dei linfociti T e B, parte dalla cellula ematopoietica pluripotente del midollo osseo e prosegue con il progenitore comune linfoide. I linfociti B e T a loro volta si differenziano rispettivamente in plasmacellule e cellule T attivate.

Da un punto di vista morfologico i linfociti vergini sono cellule abbastanza piccole: circa 8-10 μm di diametro, con un nucleo molto grande che occupa quasi interamente il corpo cellulare. Una volta stimolato il linfocita cresce in dimensioni (10-12 μm), il citoplasma aumenta notevolmente e, in seguito alla massiccia ripresa delle attività di sintesi proteica, sviluppa un diffuso reticolo endoplasmatico.

La stimolazione *in vitro* dei linfociti estratti dal sangue periferico con fitemoagglutinina, attiva sia i linfociti T sia i B, ma data la differenza in proporzione dei due tipi di cellule, l'analisi effettuata in questo progetto di tesi riguarda principalmente i linfociti T.

4.1.2 Sistema biologico: cellule della linea HTori-3

La linea Htori-3 origina da cellule primarie dell'epitelio follicolare della tiroide umana. Per questo esperimento è stata gentilmente fornita dal Prof. Yuri Nikiforov dell'università di Pittsburgh.

Per immortalizzare la linea cellulare soggetta altrimenti a senescenza precoce è stato effettuato un esperimento di trasfezione con un plasmide contenente il genoma difettivo del virus SV40 (Lemoine *et al.*, 1989). Le cellule sono state poi analizzate per determinare se conservavano le caratteristiche peculiari dei tireociti, ovvero la capacità di accumulare iodio e di secernere tireoglobulina.

Tendono a crescere come isole strettamente impacchettate. Sono mitoticamente più attive delle cellule normali primarie da cui derivano. Possono crescere in terreno senza siero ma l'attività mitotica aumenta drasticamente in mezzo di crescita arricchito con 10% di siero.

In confluenza non raggiungono mai una completa inibizione da contatto e hanno l'abilità di formare colonie anche in mancanza di ancoraggio.

Sono definite parzialmente trasformate in quanto iniettate in topi nudi non inducono trasformazione neoplastica. L'aspetto più interessante dal punto di vista citogenetico è che il loro cariotipo è aneuploide, con un numero di cromosomi variabile tra 44 e 76 per metafase. Vi sono anche numerose aberrazioni cromosomiche, per lo più di tipo clonale.

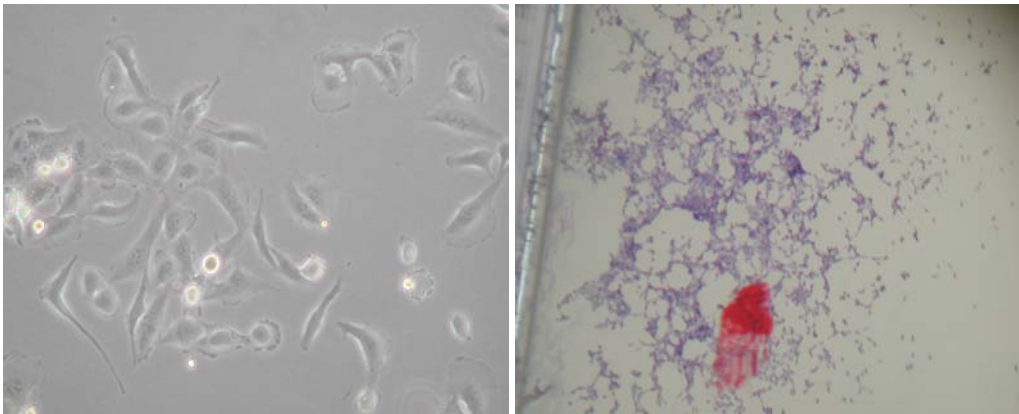


Fig. 43: Cellule HTori in vivo osservate con microscopia a contrasto di fase (sinistra) e clone fotografato dopo colorazione in Giemsa (destra).

4.1.3 Sistema biologico: fibroblasti AG1522

I fibroblasti sono cellule di origine mesodermica, caratteristiche del tessuto connettivo la cui principale funzione è mantenerne l'integrità attraverso la secrezione dei precursori della matrice extracellulare (proteoglicani, glicosaminoglicani, glicoproteine e fibre). La composizione della matrice determina le proprietà fisiche del tessuto connettivo di cui fanno parte.

La morfologia dei fibroblasti varia in funzione del sito ove sono localizzati e della loro attività. Hanno generalmente un citoplasma ramificato, nucleo ellittico, due nucleoli e una abbondante reticolo endoplasmatico ruvido. Nella forma inattiva sono definiti fibrociti. Crescono in maniera sparsa sul substrato, cercando di coprire ampie regioni. Quando la popolazione cellulare diventa numerosa tendono a raggrupparsi in fasci paralleli.

In caso di danni al tessuto, i fibrociti sono stimolati a riprendere l'attività mitotica e i fibroblasti iniziano a produrre la matrice extracellulare del sito danneggiato.

La linea AG1522 è costituita da fibroblasti dell'epidermide e fu ottenuta con una biopsia del prepuzio di un bambino di 3 giorni in seguito alla circoncisione. La linea è conservata in banche cellulari.

4.2 Macchina a raggi X

Le macchine a raggi X utilizzate per gli esperimenti con radiazione sparsamente ionizzante sono il modello Stabilipan 2 della Siemens, ubicata presso il Dipartimento di Scienze Fisiche dell'Università Federico II di Napoli e la Seifert presso il GSI.

Una macchina a raggi X è caratterizzata da un tubo radiogeno, all'interno del quale sono situati due elementi metallici in tungsteno, che costituiscono il catodo (K in fig. 44) e l'anodo (A). All'interno del tubo è ottenuto il vuoto e, mediante un generatore applicato al catodo viene prodotta una corrente ad alto voltaggio, che determina la fuoriuscita di elettroni per effetto termoionico. Una differenza di potenziale variabile, al massimo di 300 kV, è applicata tra i due elettrodi per accelerare gli elettroni verso l'anodo, generando una corrente all'interno del tubo di circa. Il voltaggio applicato per il nostro esperimento è stato di 250 kV e la corrente misurata nel tubo di 15 mA. I raggi X da 250 kV sono spesso utilizzati come radiazione di riferimento per gli studi sulla efficacia biologica relativa di radiazione di diversa qualità.

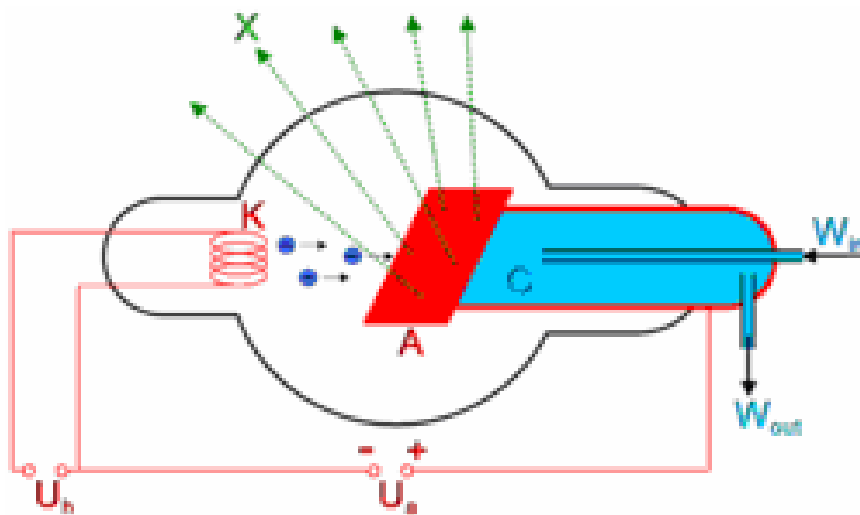


Fig. 44: Produzione di raggi X all'interno di un tubo radiogeno. In blu è rappresentato il sistema di raffreddamento della sorgente.

L'interazione degli elettroni con l'anodo, determina la formazione di raggi X secondo il processi di *bremsstrahlung* descritto nel paragrafo 1.1.

La radiazione elettromagnetica è isotropa, viene dunque emessa in tutte le direzioni, ma all'interno della macchina a raggi X è situato un collimatore che indirizza il fascio solo nella direzione desiderata, ove si pone il campione. All'interno dell'apertura è presente un filtro di rame da 1 mm che assorbe i fotoni meno energetici (radiazione molle).

Assumendo che la sorgente della radiazione sia puntiforme, il flusso dei fotoni attraverso un'area perpendicolare alla sorgente dipende dall'inverso del quadrato della distanza tra area e sorgente stessa: nelle stesse condizioni di irraggiamento il flusso dei fotoni, e quindi la dose ricevuta dal campione nell'unità di tempo (rateo di dose, vedere paragrafo 1.5), dipende dalla distanza a cui il campione viene posto.

Nel nostro esperimento il campione era posto ad una distanza di 16 cm dal tubo di uscita della macchina e la dose è stata erogata con un'intensità di $1,11 \text{ Gy min}^{-1}$.

Il dispositivo utilizzato per la dosimetria del fascio è una camera a ionizzazione costituita da un tubo cilindrico metallico (catodo) all'interno del quale scorre l'anodo metallico filiforme. Gli elettrodi sono collegati ad un generatore di corrente che mantiene costante la ddp intorno a 100 eV e ad un amperometro per la misura della corrente. All'interno del tubo è presente una miscela di gas ionizzabili. Quando i fotoni interagiscono con i gas provocano la ionizzazione di alcuni atomi o molecole e gli elettroni liberati, accelerati a causa della ddp verso l'anodo, ionizzano a loro volta altri atomi o molecole causando un effetto a cascata, registrato come variazione della corrente dall'amperometro. L'intensità della variazione è proporzionale all'energia

posseduta dal fotone. Con l'utilizzo di curve di calibrazione è possibile risalire alla dose assorbita all'interno del tubo in base all'intensità della corrente registrata.

4.3 Acceleratori di ioni pesanti

In un acceleratore di particelle è possibile produrre fasci di ioni o di particelle subatomiche con elevata energia cinetica. Tali macchine sono utilizzate principalmente per scopi medici o a scopi di ricerca, nello studio della struttura dei materiali, in radiobiologia e altre applicazioni.

L'applicazione di campi elettrici e magnetici determina l'energia e il percorso delle particelle e permette di ottenere traiettorie curve negli acceleratori circolari (ciclotroni e sincrotroni).

Per questi esperimenti si sono utilizzati tre acceleratori, un sincrotrone a gradiente alternato (AGS da Alternating Gradient Synchrotron) presso il Brookhaven National Laboratory a Long Island, un acceleratore lineare di bassa energia (UNILAC da UNiversal Linear ACcelerator) e il sincrotrone SIS18 entrambi presso il GSI in Germania.

L'AGS è stato per molti anni l'acceleratore a più alta energia del mondo; oggi costituisce l'unico acceleratore di ioni pesanti negli Stati Uniti utilizzato per lo studio degli effetti biologici indotti dalle radiazioni nello spazio ed arriva ad accelerare ioni pesanti sino ad un'energia pari a 1000 MeV/n (Miller, 2003).

L'acceleratore lineare UNILAC è entrato in funzione nel 1969 e viene utilizzato per esperimenti di basse energie. Sono impiegati ioni a partire dai protoni sino all'uranio con energia massima di 11,4 MeV/n. L'applicazione principale è lo studio degli elementi superpesanti e la produzione dei nuovi elementi.

Il SIS è stato impiegato per numerosi esperimenti di alte energie, ma l'applicazione più importante è la radioterapia. La massima energia raggiungibile è circa 2 GeV/n.

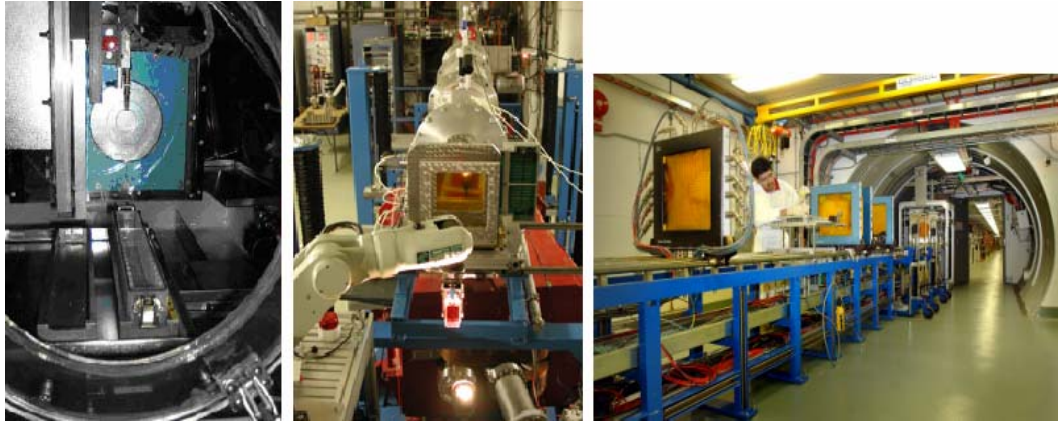


Fig. 45: Strutture utilizzate per le esposizioni dei campioni. A sinistra la facility di basse energie X6 dell'UNILAC, al centro la Cave A del SIS18 e a destra l'NSRL del sincrotrone AGS.

4.4 Ibridizzazione fluorescente in situ o FISH

Nel capitolo 2 si è parlato delle tecniche di visualizzazione delle aberrazioni cromosomiche e tra queste è stata citata l'ibridazione in situ in fluorescenza (FISH), con tutte le sue varianti.

Il principio sfruttato da questa metodologia è la capacità del DNA a singolo filamento di riconoscere e ibridarsi con sequenze complementari alla propria. Si utilizzano sonde costituite da corti frammenti di DNA complementari alle sequenze bersaglio, cui sono legate, direttamente o indirettamente, molecole fluorescenti (fluorocromi).

Nella marcatura indiretta la sonda contiene una molecola che, per affinità immunochimica, si lega ad un altro composto su cui è presente il fluorocromo. Alcune molecole utilizzate in questo tipo di marcatura sono la biotina (vitamina B12) o la digossigenina, uno steroide vegetale. Una volta effettuata l'ibridizzazione, sono utilizzate molecole che riconoscono la biotina o la digossigenina (la streptavidina ad esempio è una proteina che si lega alla biotina) a loro volta coniugate con il fluoroforo, generalmente con la fluoresceina-isotiocianato (FITC) o con la tetrametilrodamina-isotiocianato (TRITC).

Nella marcatura diretta gli oligonucleotidi sono direttamente legati alle molecole fluorescenti.

Le sonde utilizzate per i nostri esperimenti sono ottenute mediante entrambi i tipi di marcatura. I fluorofori associati in maniera diretta sono il FITC, il DEAC, il Texas Red, lo Spectrum Orange, mentre a marcatura indiretta sono il Cy5 e l'Alexa700,

rispettivamente coniugati alla streptavidina e ad anticorpi murini che riconoscono la digossigenina.

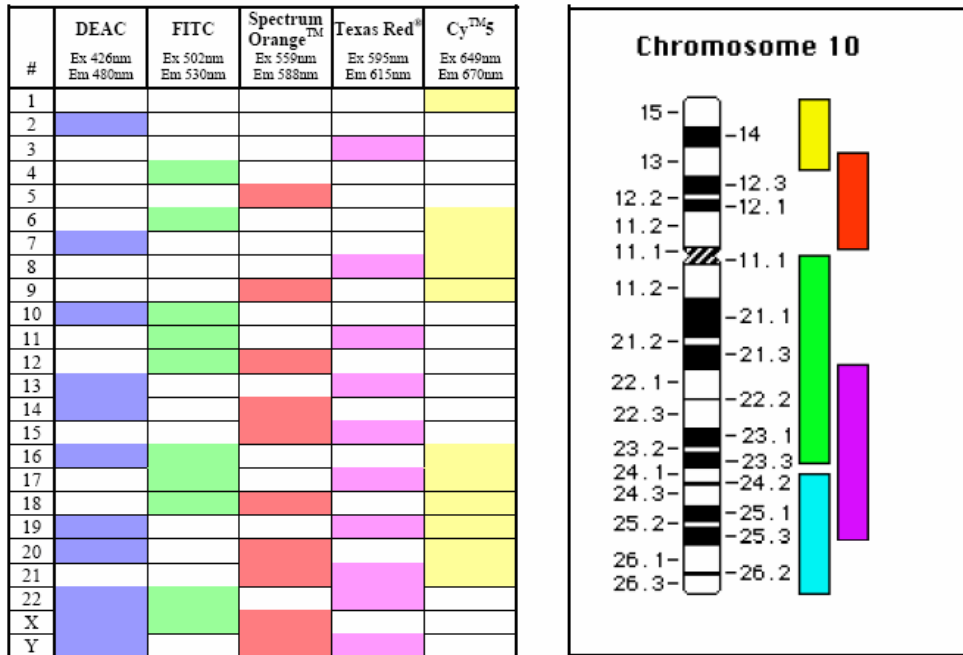


Fig. 46: Esempi di schemi per la marcatura specifica nella FISH. A sinistra, marcatura combinatoriale dei singoli cromosomi nella mFISH. A destra marcatura sequenziale del cromosoma 10 con la mBAND (Metasystems).

Affinché avvenga l’ibridazione con le sonde, il DNA cromosomico deve essere denaturato, e ciò si ottiene ponendo i vetrini in soluzione basica (NaOH 0.07N). Le sonde fluorescenti sono a doppio filamento, la loro denaturazione, facilitata dalla presenza di formammide nella soluzione in cui sono contenute, avviene con l’aumento della temperatura.

Le sonde devono essere in eccesso rispetto alla concentrazione di DNA: quando si abbassa la temperatura per permettere la rinaturazione, devono competere efficacemente con i filamenti parentali per le sequenze bersaglio.

L’ibridazione è una reazione dinamica dove sequenze di DNA bersaglio denaturate e sonde a singolo filamento complementari, si associano per formare molecole ibride a doppio filamento (eteroduplex). Durante il processo di ibridazione si verificano interazioni stabili e veloci tra la sonda e il bersaglio. Si possono formare quattro tipi di appaiamento: bersaglio-bersaglio, sonda-sonda, formazione di ibridi specifici e formazione di ibridi non specifici. Fondamentali sono le condizioni di stringenza utilizzate durante l’appaiamento delle molecole ibride: maggiori sono le condizioni di stringenza (bassa concentrazione di sali, elevata temperatura, presenza di agenti

denaturanti), minore è la probabilità di ottenere eteroduplex contenenti appaiamenti errati.

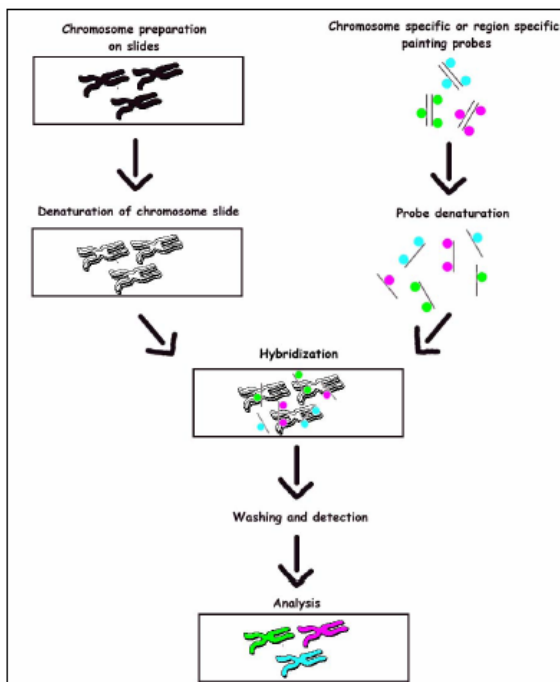


Fig. 47: Rappresentazione schematica della tecnica F.I.S.H.

Gli appaiamenti sonda-sonda e le interazioni non specifiche non si rilevano, poiché il complesso non si lega al supporto e viene rimosso durante le fasi di lavaggio. In opportune condizioni di stringenza, saranno visualizzati i segnali fluorescenti provenienti dagli ibridi specifici DNA bersaglio-sonda

Per una descrizione dettagliata del protocollo della FISH effettuata in questo esperimento, si rimanda all'appendice.

4.5 Microscopi a fluorescenza e sistemi di acquisizione delle immagini

Marcati i cromosomi con sonde fluorescenti si procede all'osservazione dei campioni. L'analisi non può essere effettuata con un microscopio standard a campo chiaro, ma è necessario l'utilizzo di un microscopio a fluorescenza, che si distingue per alcune peculiari caratteristiche.

Innanzitutto non sono utilizzate lampade ad incandescenza per l'illuminazione del campione: i filamenti di metallo incandescente convertono la maggior parte dell'energia elettrica utilizzata dalla lampada in calore, luce rossa e in luce infrarossa invisibile. La fluorescenza richiede, invece, luce intensa di breve lunghezza d'onda. Una sorgente

impiegata in fluorescenza è la lampada a vapori di mercurio ad alta pressione che, a differenza della lampada ad incandescenza, utilizza il principio della scarica di gas e non presenta uno spettro continuo, ma discreto.

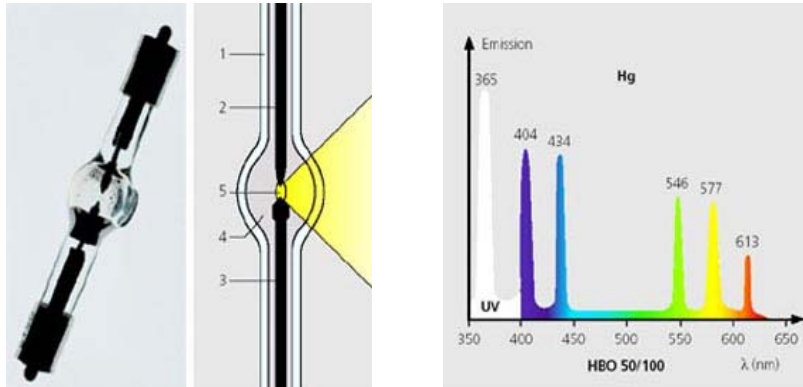


Fig. 48: A sinistra una lampada a vapori di mercurio con il suo schema di funzionamento. A destra il suo spettro di emissione

Questa sorgente di luce presenta un globo di quarzo resistente alle alte pressioni (1), all'interno del quale sono fusi il catodo (2) e l'anodo (3). La camera di combustione (4) contiene una piccola quantità di mercurio. Con scariche ad alta tensione tra gli elettrodi si innesca un arco voltaico (5), mantenuto dall'alimentazione elettrica. Il calore prodotto fa evaporare il mercurio generando nella lampada un'enorme sovrappressione. La lampada irraggia una luce molto intensa, che contiene un'alta percentuale di raggi UV. L'energia luminosa irraggiata si concentra in determinate lunghezze d'onda, le cosiddette "linee del mercurio".

I fluorocromi assorbono la luce (λ_1) in una ristretta regione spettrale ed emettono luce con lunghezza d'onda maggiore di circa 20 - 50 nanometri (λ_2) secondo quanto formulato dalla legge di Stokes.

Normalmente i microscopi ottici semplici sono provvisti di un obiettivo che raccoglie la luce trasmessa dal campione. In un microscopio a fluorescenza il sistema è strutturato in maniera tale che la luce proveniente dalla sorgente incide sul campione, mentre l'obiettivo raccoglie la luce fluorescente emessa dai coloranti in esso contenuti. Tra l'obiettivo e la lente oculare sono disposte combinazioni di filtri (fig. 49).

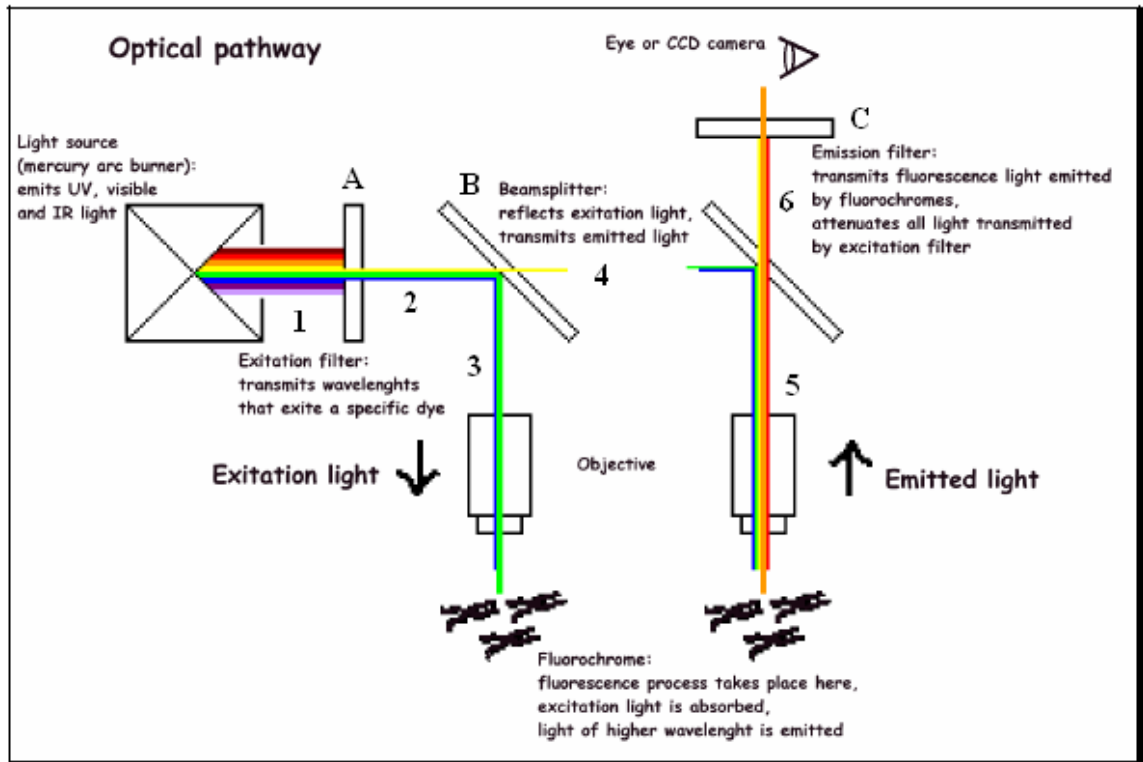


Fig. 49: Schema semplificato del funzionamento di un microscopio a fluorescenza.

Il filtro di eccitazione (A) lascia passare la luce monocromatica di interesse (2) proveniente dalla sorgente luminosa (1). Lo specchio dicroico (B) riflette la luce di eccitazione (3) che andrà a colpire il campione e lascia passare quasi completamente la luce di fluorescenza (4) emessa dalla lampada. Il campione eccitato emette con una specifica lunghezza d'onda (maggiore per la legge di Stokes) e il filtro di emissione (C) trasmette la luce fluorescente emessa dal campione (6) filtrando i residui della luce di eccitazione (5).

Per questo progetto di tesi sono stati utilizzati diversi microscopi, il modello Axioplan 2 e il modello AxioImager Z1 della Zeiss e l'Olympus BX61. A parte specifiche riguardanti gli obiettivi e il funzionamento della telecamera, le caratteristiche sostanziali dei 3 modelli si equivalgono.

Sia per l'acquisizione delle immagini automatica che per la manuale, il microscopio è collegato ad una telecamera e ad un computer provvisto del programma per la cattura. Nel primo caso però, il microscopio è motorizzato ed è provvisto di un piano mobile su cui si collocano i vetrini con il campione cellulare. Il programma per l'automatizzazione della ricerca delle metafasi (Metafer 4, Metasystems) utilizzando il

filtro specifico per il DAPI, effettua una prima scansione automatica a basso ingrandimento (obiettivo 10 X) della regione scelta sul vetrino.

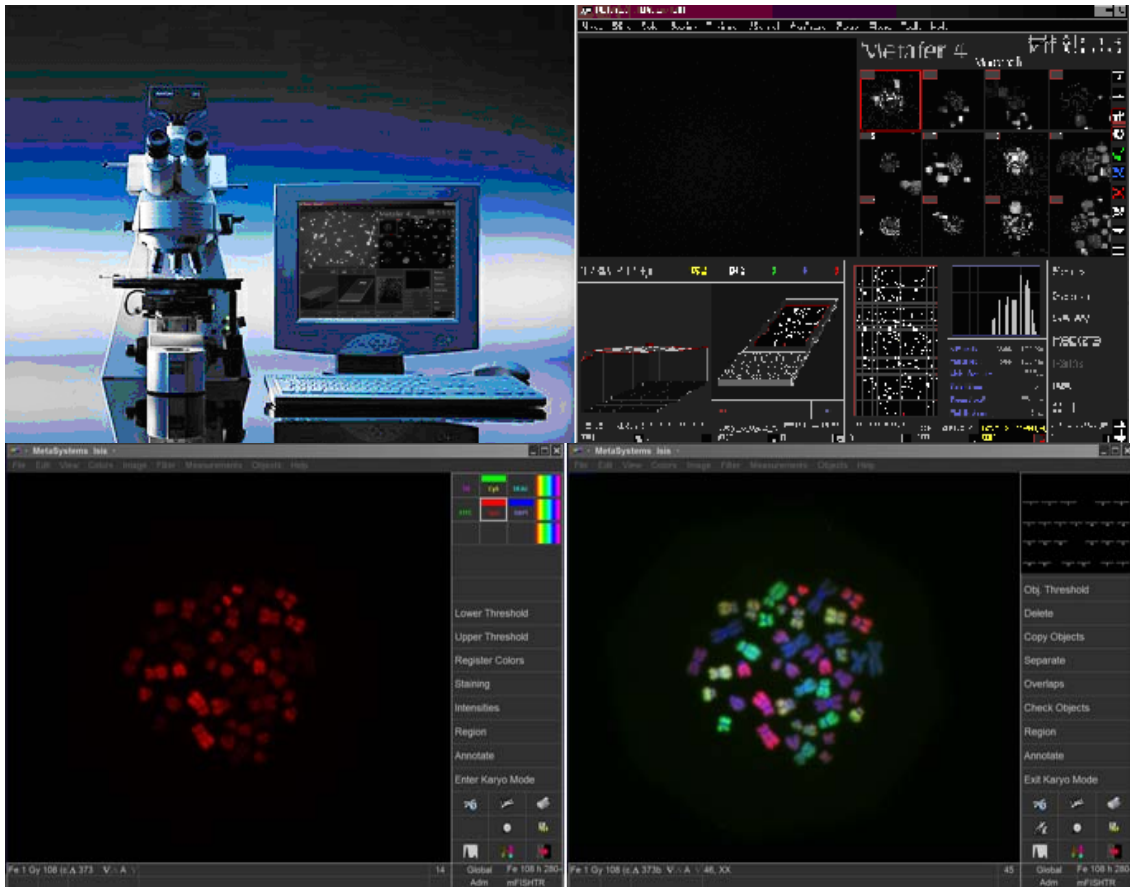


Fig. 50: A sinistra in alto un microscopio a fluorescenza collegato ad un computer con il programma Metafer 4. A destra la schermata del programma nella fase di selezioni delle immagini a basso ingrandimento. In basso a sinistra acquisizione del segnale Orange, a destra immagine risultante dalla sovrapposizione dei singoli canali

Numerosi parametri, come l'intensità del segnale luminoso, la sua distribuzione nello spazio e altri ancora sono utilizzati dal programma per distinguere l'oggetto della ricerca, in questo caso, le metafasi. Impostando altri parametri è possibile acquisire oggetti diversi.

Ottenuto il primo file a basso ingrandimento, si effettua manualmente una selezione delle immagini più idonee all'analisi del cariotipo. Si procede con l'acquisizione ad alto ingrandimento (obiettivi 63X o 100X ad immersione). Durante questa seconda fase il programma interpone in successione su ciascuna immagine i diversi filtri di emissione/eccitazione per catturare separatamente la luce emessa da ciascun fluoroforo. Al termine della cattura le immagini ottenute sono combinate in una singola multicolore.

I file con le immagini cromosomiche sono stati analizzati con il programma visual RAIC (nel caso delle sonde ASP) o con il software di cariotipizzazione ISIS (per le analisi in mFISH e in mBAND).

4.6 Programmi per l'analisi delle immagini cromosomiche

Il programma più semplice utilizzato per le analisi è stato il visual R.A.I.C. messo a punto nel dipartimento di fisica dell'università di Napoli.

È provvisto di una barra di comandi per osservare i segnali provenienti dai singoli canali e di una regione per registrare il tipo di aberrazione e descriverla secondo il codice correntemente utilizzato per la descrizione delle aberrazioni cromosomiche (PAINT). Al termine dell'analisi, il programma fornisce un rapporto contenente le informazioni per ciascuna immagine analizzata. Il rapporto 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 dell'immagine alla quale appartengono.

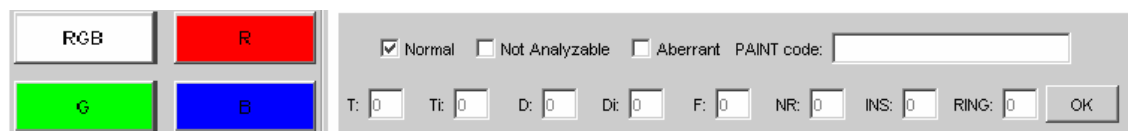


Fig. 51: A sinistra i comandi utilizzati per selezionare i segnali rosso (R) verde (G) e blu (B) o per vedere simultaneamente i tre colori (RGB). A destra la finestra dei comandi per la registrazione e la classificazione delle aberrazioni

Osservare singolarmente il segnale di ciascun canale è fondamentale per la corretta analisi. 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 è una fase indispensabile per la classificazione delle aberrazioni. Gli altri canali sono utilizzati per l'analisi dei segnali provenienti dai fluorofori.

Le categorie di aberrazioni visualizzate sono le traslocazioni complete (T), le incomplete (Ti) i dicentrici completi (D) e gli incompleti (Di) i frammenti (F), gli scambi non reciproci o complessi (NR), le inserzioni (INS) e i ring (R).

Il programma visual R.A.I.C. è stato messo a punto per l'analisi di campioni ibridizzati con sonde ad intero cromosoma. Manca, perciò, di finestre adibite alla

classificazione di scambi intracromosomici simmetrici. Per superare questo problema si è deciso di segnalare le inversioni pericentriche nella finestra dei ring e al termine della classificazione si è andato a modificare il report fornito dal programma apportando le dovute correzioni.

Dopo aver segnalato la tipologia di aberrazione trovata si è assegnato un codice alfanumerico per la precisa descrizione dell'aberrazione si è utilizzato il codice PAINT, modificandolo allo scopo di adattarlo all'analisi di intrascambi. Si sono utilizzate le lettere P e Q per identificare il braccio p ed il braccio q del cromosoma ibridizzato e la lettera C è stata utilizzata per i segnali in DAPI.

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		
<hr/>		
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. 52: Esempio di report esportato dopo un'analisi.

Il software ISIS risulta più complesso poiché prima dell'analisi è necessario effettuare la cariotipizzazione della metafase. La presenza simultanea di molti segnali rende indispensabile effettuare correzioni dell'immagine, come eliminazione del background, impostazione dei valori soglia del segnale e altro ancora. Una volta ripulita l'immagine dai segnali spuri, si passa alla separazione degli oggetti nell'immagine (cromosomi). Una funzione importante serve a separare i cromosomi in caso di sovrapposizione. Ottenuti i 46 cromosomi come oggetti ben definiti, si passa alla "assegnazione" e cioè al posizionamento di ciascun cromosoma nella giusta collocazione (cromosoma 1,2, 3 etc.). Questo passaggio è in prima istanza operato automaticamente dal programma, va poi controllato manualmente. A questo punto inizia la parte più importante e cioè l'analisi. Strumento fondamentale è la galleria dei

canali una funzione che permette di visualizzare su ciascun cromosoma i segnali provenienti dai vari fluorofori e determinare se è presente o no un'aberrazione cromosomica. In figura si osservano le gallerie dei canali ottenute con un esperimento in mFISH (sopra) e in mBAND (sotto). All'estrema sinistra si osserva il cromosoma aberrato in falsi colori, generati dal programma ISIS mentre nelle 5 colonne centrali sono presenti i segnali dei singoli canali. Nel penultimo riquadro a destra è presente un grafico che riporta l'intensità dei vari segnali e per finire, l'immagine del cromosoma in scala di grigi, ottenuta con la colorazione DAPI.

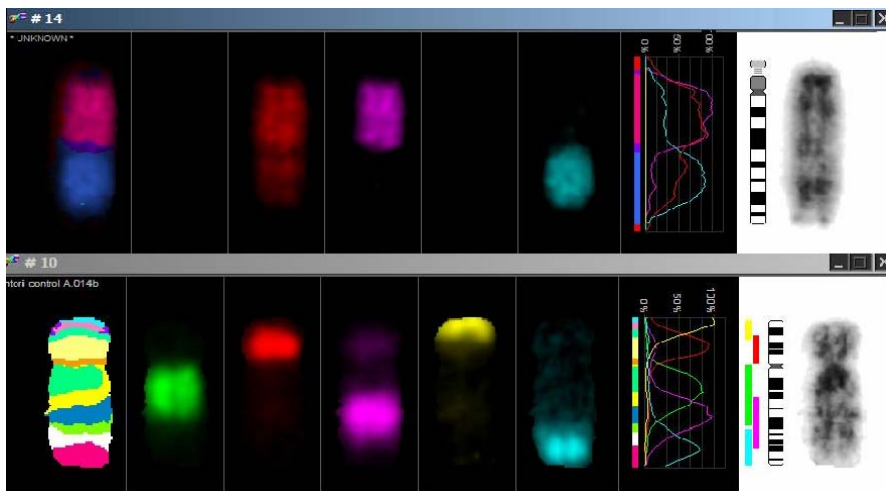


Fig. 53: Galleria dei segnali nell'analisi in mFISH (sopra) e in mBAND (sotto).

La galleria in mFISH mostra un esempio di aberrazione, il cromosoma 14 (blu-rosso) e il 15 (rosa-rosso) si sono fusi in un'unica struttura.

Effettuata l'analisi per ciascun cromosoma del cariotipo, si registra il risultato e si procede con una nuova metafase.

Capitolo 5

Risultati sperimentali e discussione

Per ciascuna tematica affrontata sono di seguito portati i risultati sperimentali. Per il calcolo della frequenza di specifiche aberrazioni ci si è avvalsi della formula:

$$f_a = \frac{n_a}{N} \quad (5.1)$$

dove n_a è il numero di aberrazioni osservate in N 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 (Durante e Gialanella, 2006). Nella statistica di Poisson la varianza coincide con il valore medio, e l'errore standard (o deviazione standard della media) sul valore della frequenza si calcola come:

$$s \text{ freq} = \frac{\sqrt{n}}{N} \quad (5.2).$$

5.1 Fattore F

Come descritto nel capitolo 3, per la stima del fattore F e per la valutazione degli intrascambi sono state utilizzate due tipi di colorazioni, sonde specifiche per il cromosoma 1 (XCAP) e la arm specific mFISH.

Di seguito si riportano i risultati crudi ottenuti con le XCAP (tabella 1). Sono riportate la frazione di cellule aberrate e il numero di aberrazioni trovate in ciascun campione. Le stime sono associate ai relativi errori statistici ($s \text{ freq}$). Un totale di 5844 e 5725 metafasi sono state analizzate nei campioni esposti a ioni ferro e raggi gamma rispettivamente. E' interessante notare come la frazione di cellule aberrate aumenta linearmente con la dose nel campione esposto a ioni ferro. I dati riportati in tabella si ritrovano nel grafico di figura 54. L'andamento delle curve è stato descritto con un fit lineare per i campioni esposti a ioni ferro e lineare quadratico per i campioni esposti a raggi γ .

La frazione di cellule recanti un cromosoma 1 aberrante nella progenie delle cellule esposte a ioni ferro appare simile a quella osservata nella progenie esposta a raggi gamma (fig 54).

Campione	Dose (cGy)	Cellule analizzate	Cellule aberrate	Frequenza	Errore
Controllo	0	742	4	0.01	0.00
Ioni ferro	50	842	15	0.02	0.00
	100	2800	115	0.04	0.00
	200	757	45	0.06	0.01
	300	1445	109	0.08	0.01
Gamma	50	1128	10	0.01	0.00
	100	2980	71	0.02	0.00
	200	692	51	0.07	0.01
	300	925	116	0.13	0.01

Tabella 1: Numero di cellule analizzate e tra queste normali, aberrate e numero di aberrazioni per i campioni analizzati con XCAP.

Questi risultati differiscono significativamente da quello che si osserva in campioni raccolti a 48 ore dall'esposizione (George *et al.*, 2003; Durante *et al.*, 2002), dove il valore dell'RBE per l'induzione di aberrazioni cromosomiche é molto grande.

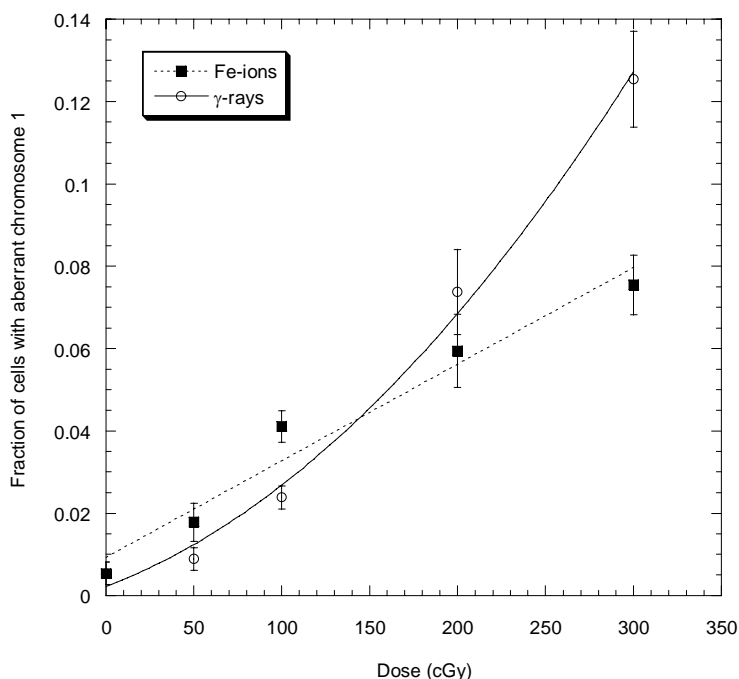


Fig. 54: Curva dose-risposta per la frazione di cellule con cromosoma 1 aberrato in linfociti esposti a ioni ferro e raggi γ , raccolti a 144h dall'esposizione e osservati con la tecnica di colorazione XCAP

In esperimenti condotti utilizzando le ASP per il cromosoma 1 su linfociti esposti a 1 Gy di raggi X e a 1 Gy di neutroni (radiazione densamente ionizzante) raccolti a 48 h dall'irraggiamento, le frequenze di cromosomi aberrati per cellula sono l'8,3% per basso LET (Boei *et al.*, 1998a) ed il 23,8% (Boei *et al.*, 2001) per alto LET. Un dato che emerge dal confronto con i nostri dati a 1 Gy è che a 144 h la frequenza di cromosomi aberrati per cellula è notevolmente ridotta (2 e 4% rispettivamente). Le cellule aberrate si riducono dopo circa 3 cicli di replicazione di un fattore 4 dopo esposizione a raggi gamma e di un fattore 6 dopo ioni ferro. Ciò indica che gli ioni pesanti inducono un maggior numero di aberrazioni letali, mentre la radiazione di basso LET presenta una più alta frazione di aberrazioni trasmissibili. Questi risultati concordano con quelli ottenuti con la tecnica RxFISH su linfociti raccolti a 144 dall'irraggiamento (Durante *et al.*, 2006) e in culture a lungo termine esposte a particelle α (Anderson *et al.*, 2003).

La frazione di cellule aberrate aumenta notevolmente quando l'analisi si effettua con arm mFISH, poiché è possibile osservare l'intero cariotipo. Nel nostro esperimento la frazione di aberrate è significativamente maggiore dopo esposizione a 2 Gy di raggi X rispetto al campione irraggiato con ioni ferro ($0,5 \pm 0,06$ e $0,25 \pm 0,03$ rispettivamente).

L'analisi dello spettro di aberrazioni riportate dalla progenie di linfociti ha dato risultati molto interessanti. Nelle tabelle 2 e 3 è possibile osservare in dettaglio la distribuzione delle varie classi in funzione della dose.

Campione	Dose	Interscambi semplici	Frequenza \pm errore	Interscambi complessi	Frequenza \pm errore
Controllo	0	4	0.005 \pm 0.003	0	0
Ioni ferro	50	10	0.012 \pm 0.004	3	0.004 \pm 0.002
	100	60	0.021 \pm 0.003	30	0.011 \pm 0.002
	200	27	0.036 \pm 0.007	15	0.020 \pm 0.005
	300	70	0.048 \pm 0.006	24	0.017 \pm 0.003
gamma	50	6	0.005 \pm 0.002	2	0.002 \pm 0.001
	100	57	0.019 \pm 0.003	2	0.001 \pm 0.000
	200	34	0.049 \pm 0.008	3	0.004 \pm 0.003

	300	90	0.097 ± 0.010	9	0.010 ± 0.003
--	------------	-----------	--------------------------	----------	--------------------------

Tabella 2: Frequenze ed errori degli interscambi semplici e complessi osservati in campioni esposti a diverse dosi di raggi gamma e ioni ferro e visualizzati con la tecnica XCAP

Le traslocazioni e i dicentrici sono stati raggruppati nella classe scambi semplici, le inserzioni e le aberrazioni che coinvolgevano 2 o più cromosomi a partire da 3 o più rotture costituiscono gli interscambi complessi.

Campione	Dose	Intrascambi semplici	Frequenza ± errore	Intrascambi complessi	Frequenza ± errore
Controllo	0	0	0	0	0
Ioni ferro	50	0	0	1	0.001 ± 0.001
	100	8	0.003 ± 0.001	18	0.006 ± 0.002
	200	2	0.003 ± 0.002	8	0.011 ± 0.004
	300	5	0.003 ± 0.002	14	0.010 ± 0.003
gamma	50	1	0.001 ± 0.001	0	0.000
	100	6	0.002 ± 0.001	0	0.000
	200	5	0.007 ± 0.003	2	0.003 ± 0.002
	300	13	0.014 ± 0.004	2	0.002 ± 0.002

Tabella 3: Frequenze ed errori degli intrascambi semplici complessi osservati in campioni esposti a diverse dosi di raggi gamma e ioni ferro e visualizzati con la tecnica XCAP

Gli intrascambi semplici sono rappresentati da ring e inversioni pericentriche, per intrascambi complessi si intendono le aberrazioni generate da un minimo di 3 rotture ma di cui almeno 2 appartengono al cromosoma 1, ciascuna su un braccio cromosomico. Condizione necessaria affinché un'aberrazione si possa classificare come intrascambio è il ricongiungimento delle regioni appartenenti alle braccia cromosomiche opposte in almeno uno dei punti di rottura (fig. 55).

La classe degli inter-intrascambi appartiene a questa categoria di anomalie cromosomiche, a cui va aggiunta la classe di intrascambi complessi puri, generati da 3 o più rotture, tutte avvenute sul cromosoma ibridizzato.

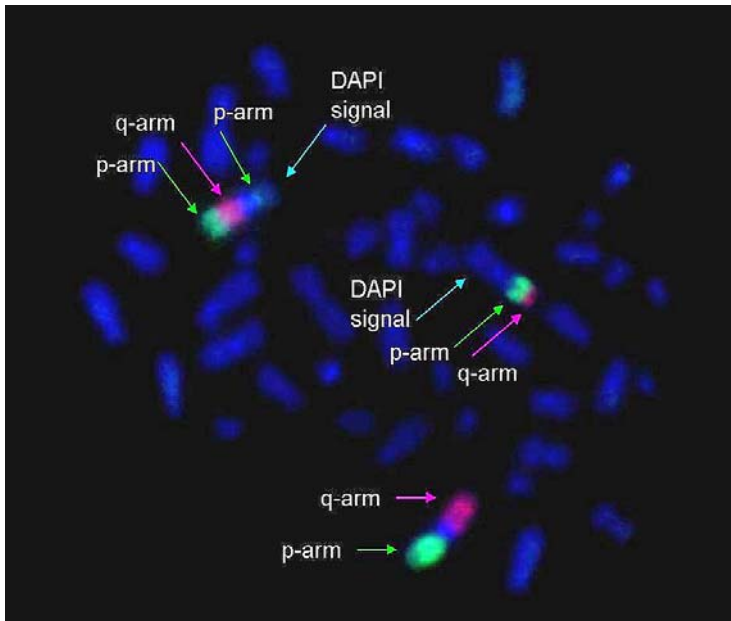


Fig. 55: Inter-intrascambio generato da 2 rotture sul cromosoma 1 (ciascuna su un braccio) e da una rottura su un cromosoma in DAPI.

Per entrambe le radiazioni, la classe più frequente risulta quella degli scambi semplici (fig. 56), che rappresentano tra il 50 (nel campione ferro 100 cGy) e l'84% (gamma 100 cGy) del totale delle aberrazioni osservate. Le traslocazioni a loro volta costituiscono tra il 90 e il 98% degli interscambi semplici osservati.

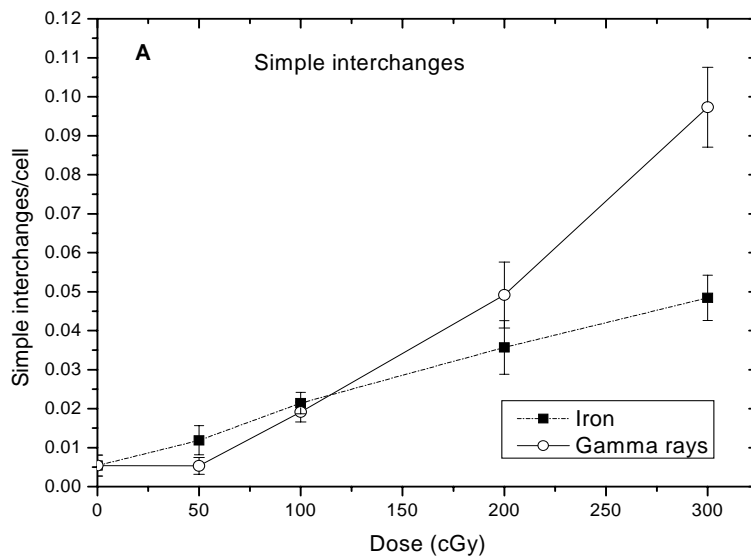


Fig. 56: Curva dose-risposta per gli interscambi semplici in campioni esposti a ioni ferro e raggi gamma e visualizzati a 144 h con tecnica XCAP.

La prima osservazione importante ai fini della discussione sulla validità del rapporto F è che la frequenza degli intrascambi semplici non differisce

significativamente tra i due campioni. Osservando la curva dose-risposta in figura 57 è possibile osservare che fino a 100 cGy i valori delle frequenze sono simili, all'aumentare della dose, la curva per l'alto LET rimane pressoché costante, mentre quella del basso LET inizia a divergere. A 300 cGy la frequenza di intrascambi semplici presenta una differenza significativa a favore dei campioni esposti a raggi gamma.

Nei campioni esposti a 300 cGy sia gli interscambi che gli intrascambi semplici sono più frequenti nel campione esposto a basso LET, con frequenze pari a $0,097 \pm 0,010$ e $0,014 \pm 0,004$. Alla stessa dose di ioni ferro si sono osservati valori pari a $0,048 \pm 0,006$ e $0,003 \pm 0,002$.

Ad alte dosi la maggior parte di aberrazioni che si osservano nel campione esposto ad alto LET sono scambi di tipo complesso.

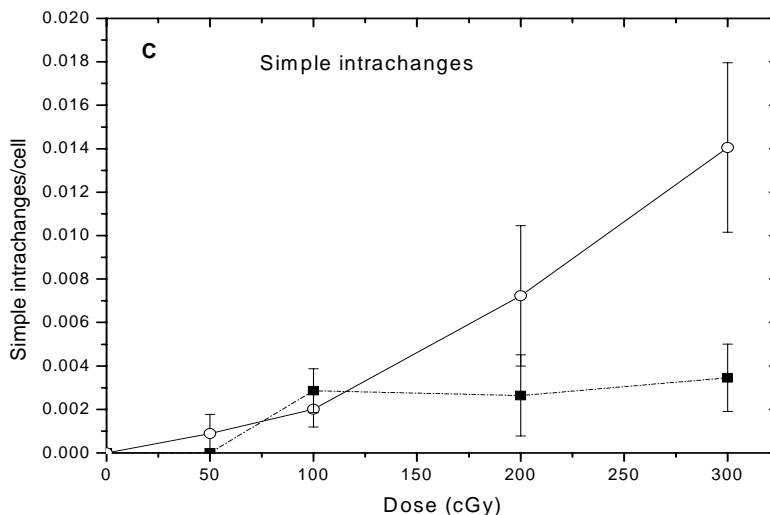


Fig. 57: Curva dose-risposta per gli intrascambi semplici in campioni esposti a ioni ferro e raggi gamma e visualizzati a 144 h con tecnica XCAP

A partire dalle basse dosi si osserva una differenza statisticamente significativa nella frequenza degli scambi complessi per entrambe le categorie (inter ed intrascambi complessi). Nella progenie delle cellule esposte a ioni ferro gli scambi complessi nel totale rappresentano tra il 27 e il 47% delle aberrazioni osservate mentre solo tra il 2 e il 20% di quelle analizzate nei campioni esposti a raggi gamma. Risulta interessante notare che in entrambi i campioni gli scambi complessi di tipo stabile (cioè non costituiti da cromosomi policentrici o da ring) rappresentano tra il 58 e il 100% degli scambi complessi osservati dopo esposizione ad alto LET e tra l'85 e il 100% di quelli osservati nel basso LET.

Questi risultati forniscono un ulteriore supporto all'ipotesi che la maggior parte delle anomalie instabili indotte dagli ioni pesanti sono letali per la cellula, sebbene alcune riescano ad essere trasmesse alla progenie.

Nelle figure 58 e 59 è possibile osservare rispettivamente la curva dose-risposta per interscambi e intrascambi di tipo complesso.

Nei campioni osservati si è ritrovato un solo tipo di intrascambio complesso puro, le restanti aberrazioni sono tutte del tipo inter-intrascambio, cioè coinvolgono almeno un cromosoma colorato in DAPI.

L'importanza della classe degli intrascambi complessi e in particolare degli inter-intrascambi era stata già evidenziata in un primo studio effettuato su progenie di linfociti esposti a 100 cGy di raggi X e ioni ferro (Manti *et al.*, 2007).

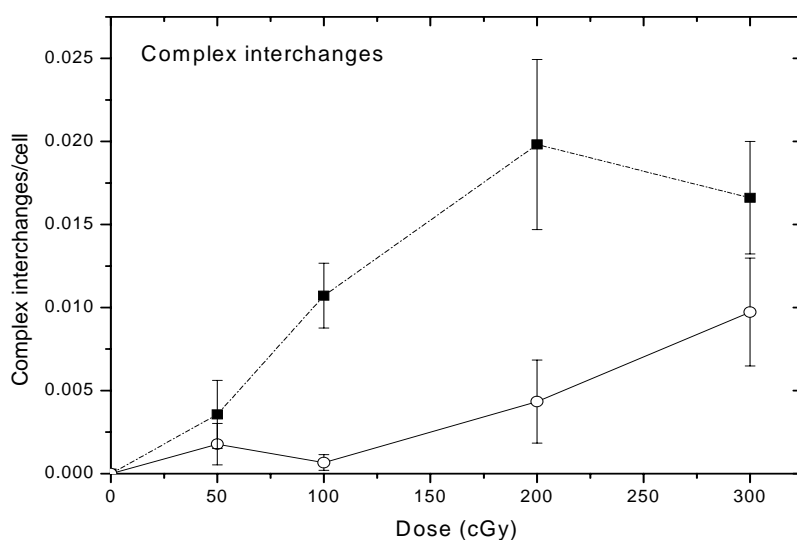


Fig. 58: Curva dose-risposta per gli interscambi complessi in campioni esposti a ioni ferro e raggi gamma e visualizzati a 144 h con tecnica XCAP

La curva dose-risposta ottenuta in questa sezione del progetto di tesi ha confermato e supportato i nostri precedenti risultati. Dalla tabella 3 e dal confronto tra le figure 57 e 59 è possibile osservare che nei campioni esposti a radiazione densamente ionizzante, la frequenza degli intrascambi complessi è sempre più alta rispetto a quella degli intrascambi semplici a parità di dose. Al contrario, nella progenie cellulare sopravvissuta ad irraggiamento gamma è possibile osservare intrascambi complessi solo alle dosi più alte.

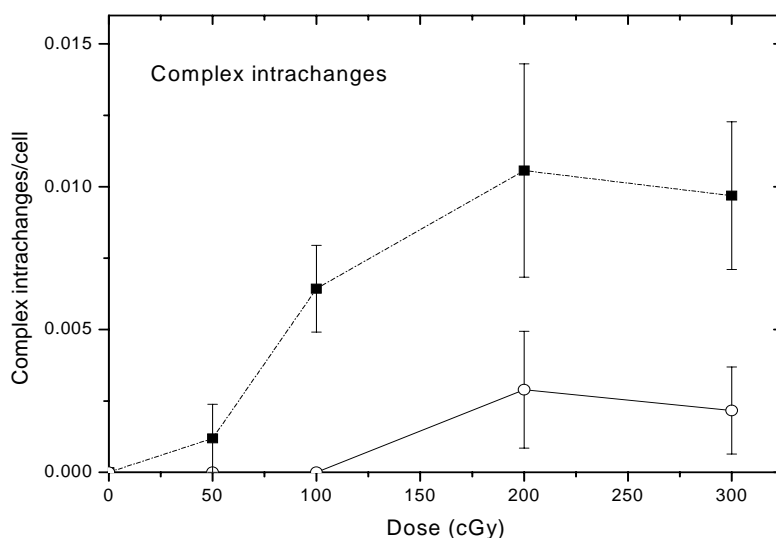


Fig. 59: Curva dose-risposta per gli interscambi complessi in campioni esposti a ioni ferro e raggi gamma e visualizzati a 144 h con tecnica XCAP

L'analisi del parametro F non ha fornito alcuna correlazione in funzione della dose. Inoltre, non è stata verificata l'ipotesi proposta da Brenner e Sachs, e cioè che i campioni esposti ad alto LET dovrebbero mostrare un valore F significativamente più basso.

In tutti i campioni analizzati eccetto per la dose 100 cGy, il valore F calcolato come rapporto tra interscambi semplici su intrascambi semplici è sempre maggiore a parità di dose nei campioni esposti a ioni ferro (tra 7.5 e 14) rispetto a quelli irraggiati con raggi gamma (tra 6 e 9.5). Quando per la stima del valore F è inclusa la classe inter-intrascambi il risultato è nettamente diverso, il parametro F calcolato per gli ioni pesanti (2.3-3.6) scende drasticamente rispetto a quello dei raggi γ (4.8-9.5).

L'analisi dello spettro delle aberrazioni osservate è effettuato più efficacemente con l'impiego della arm mFISH, che, come precedentemente esplicitato, evidenzia anomalie riportate da qualsiasi cromosoma del cariotipo umano.

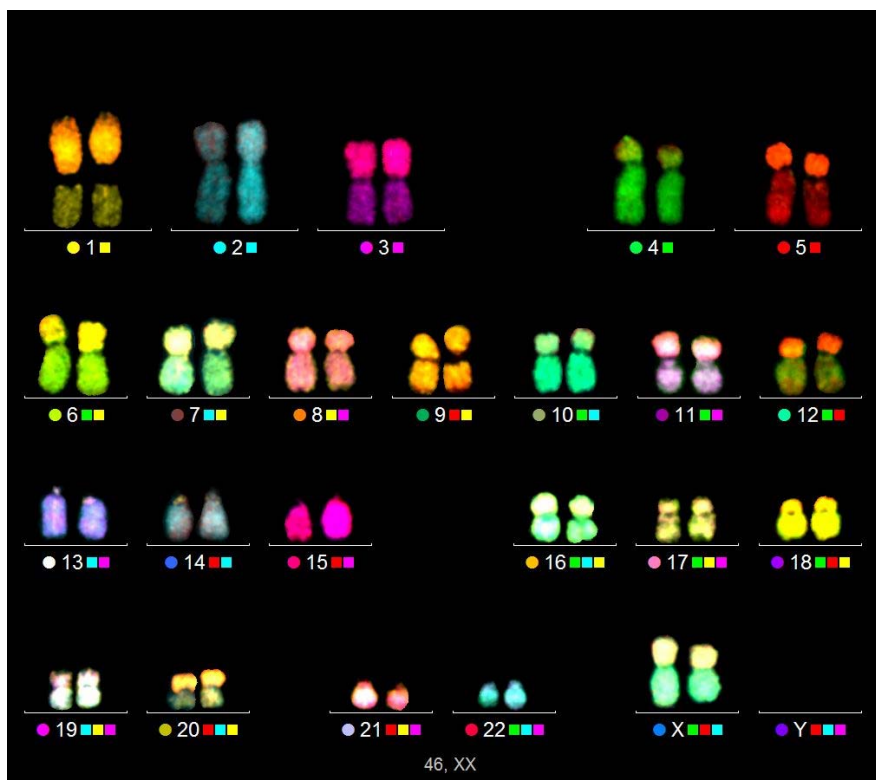


Fig. 60: Cariotipo normale di un linfocita umano visualizzato con la tecnica arm mFISH. Le braccia p dei cromosomi meta e submetacentrici possiedono un marcatore fluorescente aggiuntivo, necessario alla visualizzazione degli scambi intracromosomici.

In tabella 4 sono riportati i risultati dell'analisi dei campioni esposti a 2 Gy di ioni ferro e raggi X, raccolti a 108 h dall'irraggiamento e osservati con arm mFISH.

	Cellule analizzate	Trasloc.	Dicent.	Ring	Invers.	Inter compl.	Intra comp.	Delez.
Raggi X	111	45	17	1	4	8	0	11
Ferro	225	20	11	0	2	33	10	18

Tabella 4: Analisi dei campioni esposti a 2 Gy di raggi X e ioni ferro e visualizzati a 108 h dall'esposizione mediante tecnica arm mFISH.

In contrasto con i dati ottenuti con XCAP, gli interscambi semplici (traslocazioni e dicentrici) costituiscono la classe più abbondante esclusivamente per il campione esposto a radiazione sparsamente ionizzante (rappresentano il 72% del totale). Seguono le delezioni (13%), i complessi (9%) e gli intrascambi semplici (6%).

L'aumentata sensibilità della tecnica riesce a far emergere che ad una dose di 200 cGy di radiazioni densamente ionizzanti la classe più comune sia invece quella degli scambi complessi (45% considerando sia gli inter che gli intrascambi complessi) seguita da quelli semplici (37%) e dalle delezioni (18%).

In figura 61 è riportata la distribuzione del numero di cromosomi danneggiati per cellula aberrante.

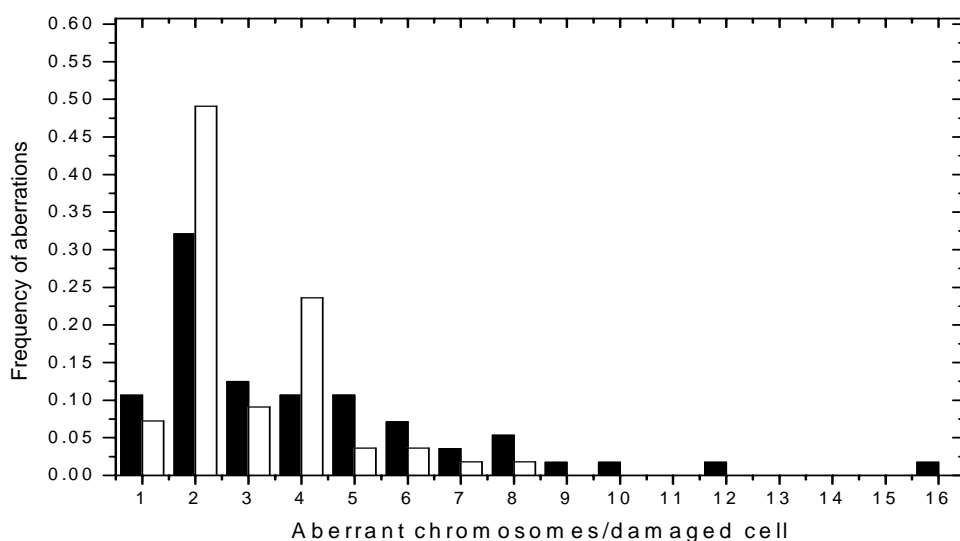


Fig. 615: Distribuzione del numero di cromosomi danneggiati per cellula aberrata nel campione esposto a 2 Gy di ioni ferro (■) o raggi X (□).

Si evince da questo istogramma che la complessità del danno in termini di cromosomi coinvolti è maggiore nel campione esposto ad alto LET. I valori medi riportati per il numero di cromosomi coinvolti sono di 4.0 e di 2.9 rispettivamente per il ferro e per i raggi X, e la deviazione standard, indice dell'ampiezza della distribuzione, risulta rispettivamente 3.0 e 1.5. La classe comprendente 2 cromosomi aberranti per cellula (costituita dagli interscambi semplici) risulta la più comune e la frequenza è maggiore nei campioni esposti a raggi gamma.

Questi risultati sono consistenti con i valori ottenuti a 48h dopo esposizione a 3 Gy di ioni ferro e raggi gamma, dove valori medi di 5.0 e 3.1 sono stati osservati e deviazioni standard di 2.9 e 1.8 (Durante et al., 2002).

Si conclude che anche dopo vari cicli di replicazione cellulare la differenza in termini di complessità del danno cellulare indotta da ioni pesanti o da fotoni rimane conservata.

Per quanto riguarda il valore F, anche utilizzando questa tecnica sperimentale, il valore osservato è inferiore dopo esposizione a basso LET (12.4) rispetto all'irraggiamento ad alto LET (15.5) quando il parametro è calcolato in base agli intrascambi semplici. Includendo gli inter-intrascambi il valore per i raggi X rimane invariato mentre per gli ioni ferro scende drasticamente a 2.6.

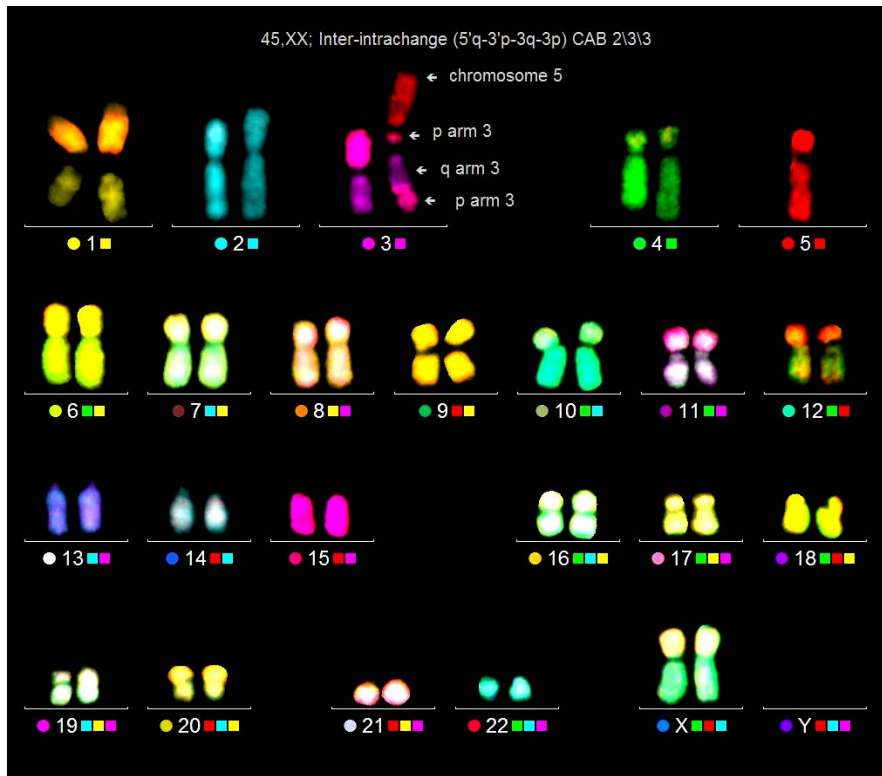


Fig. 61: Cariotipo aberrato visualizzato con armFISH. Si osserva un inter-intrascambio avvenuto tra il cromosoma 3 (che rappresenta la componente intracromosomica) e il 5 (componente intercromosomica).

Da quanto riportato possiamo stabilire che gli scambi intracromosomici di tipo complesso sono molto importanti per una corretta stima del danno indotto da radiazione.

La conclusione derivata dalle analisi ottenute con entrambe le tecniche è che non si osserva una dipendenza dal LET per il parametro F fintanto che il valore è stimato basandosi sugli intrascambi semplici (ring ed inversioni pericentriche). Aggiungendo gli intrascambi complessi si ottiene una marcata dipendenza dalla qualità della radiazione suggerendo che questa classe possa essere utilizzata come marcatore.

Si è osservata una riduzione dell'efficacia biologica degli ioni pesanti nell'induzione del danno citogenetico quando i risultati osservati nella progenie cellulare sopravvissuta all'esposizione sono confrontati con il danno precoce. Si ritiene che la riduzione sia principalmente dovuta alla morte di cellule recanti aberrazioni troppo complesse e dunque letali. La conferma a questa ipotesi si ricava dalla sensibile riduzione di tali scambi con l'aumentare dei cicli di replicazione e nella selezione preferenziale di scambi di tipo trasmissibile.

5.2 Bioindicatori per il rischio di cancro alla tiroide

La seconda tematica descritta nel progetto di tesi riguarda lo studio degli intrascambi in cellule parzialmente trasformate della tiroide umana.

In figura 62 è possibile osservare la frazione di cellule aberrate riportata nei diversi campioni

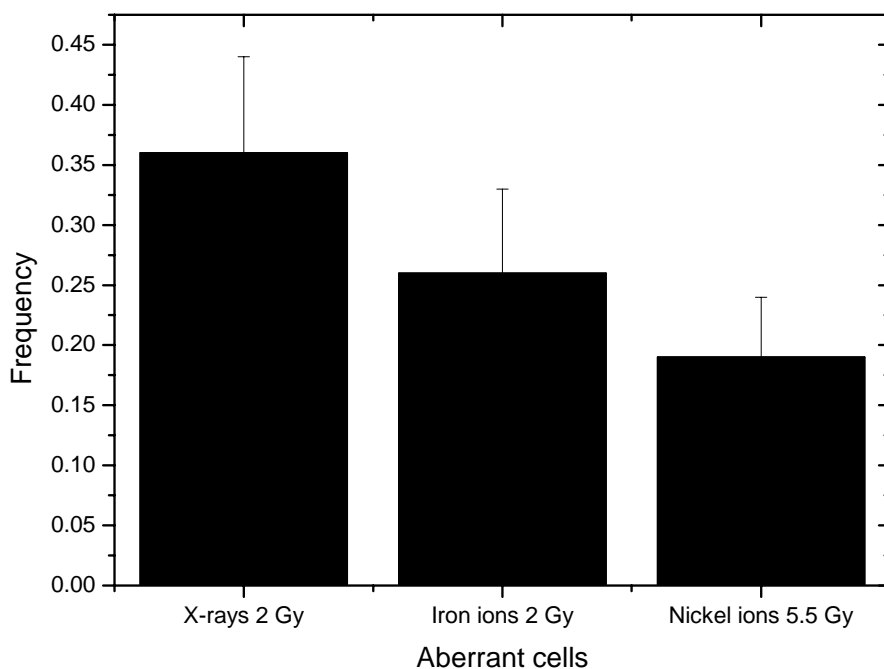


Fig. 62: Frazione di cellule aberrate osservata nei campioni esposti a 2 Gy di raggi X e ioni ferro e 5.5 Gy di ioni nickel.

La frazione di cellule aberrate più alta si osserva nel campione esposto a raggi X, seguito dagli ioni ferro e dal nickel.

L'area media delle cellule HTori-3 è $170 \mu\text{m}^2$, e in accordo con la statistica di Poisson la frazione di cellule non attraversate da una particella è il 18 % nel campione esposto a Nickel. La dose di ioni ferro corrisponde invece ad un numero medio di 14 attraversamenti per nucleo il che significa praticamente che tutte le cellule sono state attraversate. La reale area del bersaglio del nostro esperimento è in realtà più piccola del nucleo, poiché il cromosoma ibridizzato in questo esperimento, il 10, rappresenta solo il 5% del genoma totale. Prendendo dunque in considerazione la reale dimensione del bersaglio, a 2 Gy circa il 50% delle cellule sono attraversate da uno ione ferro lungo il cromosoma 10. Questo potrebbe spiegare perché la frequenza di aberrate è inferiore in questo campione rispetto all'esposizione a raggi X.

Un'altra possibile spiegazione risiede nel fatto che, nonostante sia stata applicata la tecnica PCC, dunque evitata la sottostima del danno dovuta al fenomeno del ritardo mitotico, le cellule pesantemente danneggiate dagli ioni pesanti muoiono prima di essere raccolte per l'analisi cromosomica.

Nella tabella di seguito sono riportati i risultati dell'analisi effettuata con la tecnica mBAND applicata ai differenti campioni.

	Dose (Gy)	Scored cells	Interscambi semplici Frequenza \pm SD	Interscambi complessi Frequenza \pm SD	Frammenti Frequenza \pm SD	Intrascambi semplici Frequenza \pm SD	Intrascambi complessi Frequenza \pm SD
Raggi X	2	59	13 0.22 \pm 0.06	4 0.07 \pm 0.03	8 0.14 \pm 0.05	0	1 0.02 \pm 0.02
Ferro	2	50	5 0.18 \pm 0.06	7 0.16 \pm 0.06	1 0.04 \pm 0.03	2 0.04 \pm 0.03	2 0.04 \pm 0.03
Nickel	5,5	80	9 0.11 \pm 0.04	5 0.06 \pm 0.03	5 0.06 \pm 0.03	1 0.01 \pm 0.01	3 0.04 \pm 0.02

Tabella 5: Analisi dei campioni esposti a raggi X, ioni ferro e nickel effettuata 24 h dopo l'esposizione. I campioni sono raccolti mediante tecnica PCC.

Considerando i dati del controllo (non mostrati) e quelli dei campioni esposti, più di 200 metafasi sono state analizzate.

Il campione esposto a basso LET mostra la frequenza più alta di interscambi semplici (0,22 \pm 0,06), mentre gli scambi complessi dominano nel campione esposto a ioni ferro (0,16 \pm 0,06), in accordo con i risultati che si osservano analizzando il danno precoce.

Un risultato interessante è la frequenza di scambi complessi nel campione esposto a nickel, che risulta la più bassa dei tre. Il motivo può risiedere nel concetto formulato precedentemente e cioè che il danno prodotto dopo esposizione a nickel (LET 3480 keV/ μ m) sia così complesso che le cellule muoiono prima ancora di raggiungere il primo ciclo di replicazione. Le cellule che trasportano scambi semplici è più probabile che sopravvivano e che possano essere osservate.

Riguardo gli scambi intracromosomici (semplici e complessi), gli ioni ferro mostrano la più alta frequenza, ma i risultati non sono statisticamente significativi (test esatto di Fisher $p=0,13 > 0,05$).

In figura 63 i dati della tabella 5 sono riportati come frazione delle aberrazioni totali. La classe degli intrascambi è stata divisa in semplici (ring, inversioni pericentriche e paracentriche) e complessi (comprendente sia gli intrascambi complessi puri che gli inter-intrascambi).

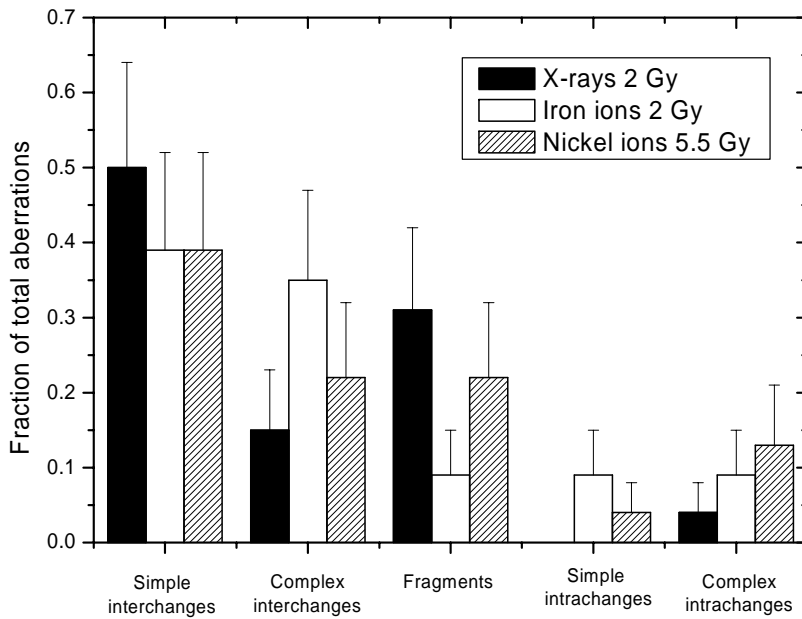


Fig. 63: Spettro delle anomalie osservate nei campioni irraggiati, riportato come frazione delle aberrazioni totali.

Nell'analisi dei campioni esposti a raggi X non è stato trovato nessun intrascambio semplice, ed un intrascambio complesso. Si riscontra una tendenza all'aumento degli intrascambi complessi con il crescere del LET ma le differenze non sono statisticamente significative.

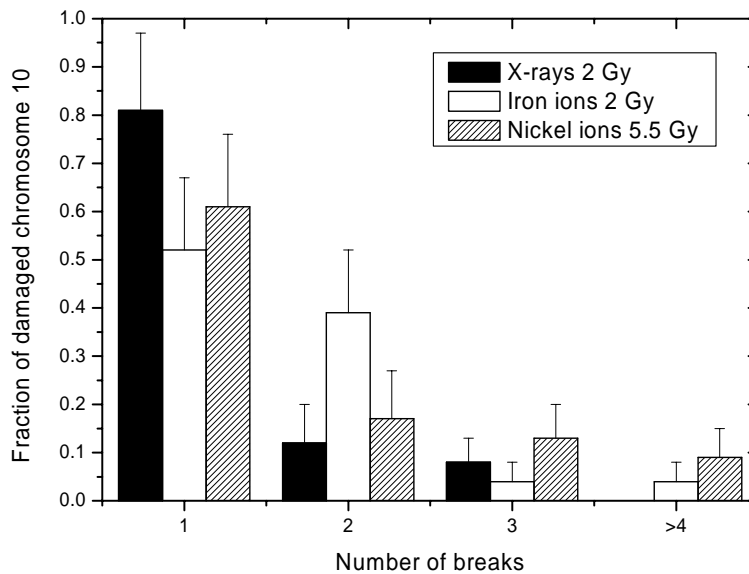


Fig. 64: Numero di rotture per cromosoma 10 danneggiato osservate tramite analisi con mBAND.

Nella figura 64 è riportata la distribuzione di rotture per cromosoma danneggiato. Il numero medio di rotture calcolato per ciascun campione è 1,27, 1,61 e 1,86 per i raggi X, ioni ferro e nickel rispettivamente. Si osserva dunque un aumento del numero di rotture con l'aumentare del LET. I valori della deviazione standard sono 0,60, 0,78 e 1,39. Le cellule esposte a ioni nickel hanno la distribuzione più ampia, dimostrando che sebbene numerose cellule recanti aberrazioni complesse muoiono, il danno complessivo risulta maggiore per la radiazione con il più alto valore del LET. La maggior parte della complessità deriva dai dati sugli intrascambi.

Da quanto riportato possiamo concludere che non si sono trovate evidenze sperimentali che la radiazione di alto LET induca con maggiore frequenza inversioni nel cromosoma 10 rispetto alla radiazione di basso LET. Questa considerazione conferma i risultati riportati nell'affrontare la prima tematica della tesi, ottenuti con una diversa tecnica di ibridazione.

Basandoci su questi dati si potrebbe concludere che gli ioni pesanti non dovrebbero essere più efficaci del basso LET nell'indurre cancro alla tiroide. Gli scambi intracromosomici sono sempre meno frequenti rispetto agli interscambi, come riportato in linfociti umani (Johannes *et al.*, 2004), o in cellule epiteliali (Hada *et al.*, 2007) esposti a raggi X e ioni pesanti. La frequenza risulta così bassa che diventa difficile osservare differenze statisticamente significative con la mBAND (Horstmann *et al.*, 2005).

Questi risultati sono piuttosto sorprendenti poiché i modelli biofisici predicono un'alta frequenza di intrascambi soprattutto dopo esposizione ad alto LET. Un problema può essere legato alla risoluzione della metodologia applicata, il cui campo di osservazione è rappresentato da domini di megabasi. Per esempio, lo scambio RET/PTC1 avviene all'interno della medesima banda di ibridazione nel cromosoma 10 e risulta impossibile osservarlo con le attuali sonde mBAND. Studi sulla dimensione dei frammenti generati dopo esposizione a ioni pesanti sul cromosoma 5 umano hanno mostrato che la maggior parte degli scambi intracromosomici avviene a partire da frammenti molto piccoli (Horstmann *et al.*, 2004). Da ciò la necessità di utilizzare tecniche con risoluzione maggiore per chiarire il problema.

5.3 Topologia del nucleo in interfase e spettro delle aberrazioni cromosomiche

I risultati osservati nell'ambito dell'esperimento sulla topologia nucleare sono riportati in tabella 6. Le configurazioni HEAD, SIDE e BACK come spiegato nel capitolo 3 si riferiscono rispettivamente all'irraggiamento lungo l'asse nucleare maggiore, minore e perpendicolare alla superficie di crescita. Per lo schema di esposizione si rimanda al capitolo 3.

Campione	Cellule osservate	Cellule aberranti	Scambi semplici	Scambi complessi	Frammentiacentrici
HEAD 1 Gy	90	19	18	4	7
SIDE 1 Gy	50	20	16	13	7
BACK 1 Gy	50	42	48	9	11
BACK 0,2 Gy	50	13	12	2	2
SIDE 0,4 Gy	83	20	18	0	5

Tabella 6 : Spettro delle aberrazioni osservate nei campioni esposti a ioni ferro a diverse dosi e con diverse configurazioni. Le cellule sono state raccolte a 48 h dall'esposizione mediante tecnica PCC e visualizzate utilizzando la colorazione mFISH.

I dati provenienti dai campioni esposti in America e quelli esposti in Germania sono stati unificati poiché non è stata riscontrata alcuna differenza statisticamente significativa nei risultati.

In figura 65 è possibile osservare che la frazione di cellule aberrate è significativamente diversa nei campioni esposti alla stessa dose ma in una differente configurazione.

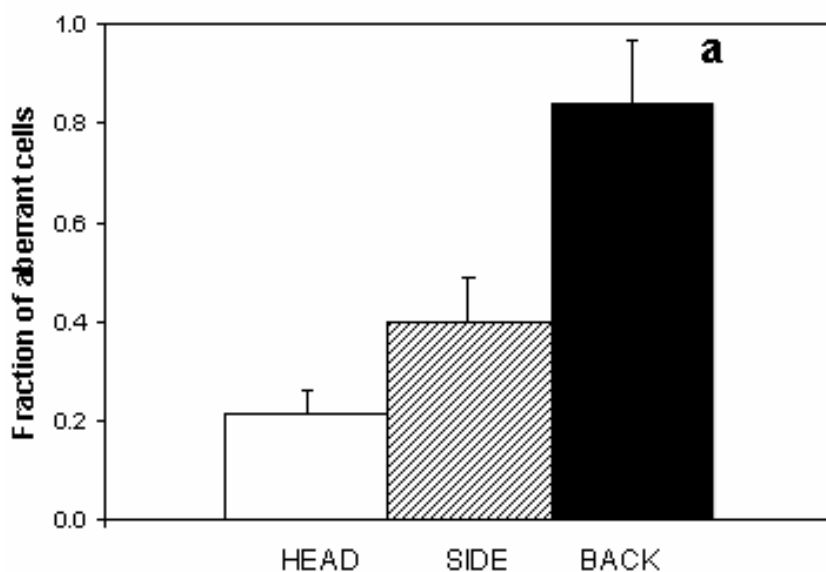


Fig. 65: Frazione di cellule aberrante in fibroblasti esposti ad 1 Gy di ioni ferro in differenti configurazioni e visualizzati a 48 h dall'esposizione con la tecnica mFISH.

Nella configurazione BACK (perpendicolare) è stata osservata una frazione di cellule aberrante doppia rispetto alla configurazione SIDE (asse minore) a loro volta due volte più aberrante della HEAD.

La situazione risulta differente quando i campioni sono esposti allo stesso numero medio di attraversamenti per nucleo (fluenza). In questa situazione la frazione di cellule aberrante risulta la stessa, indipendentemente dalla configurazione (figura 66).

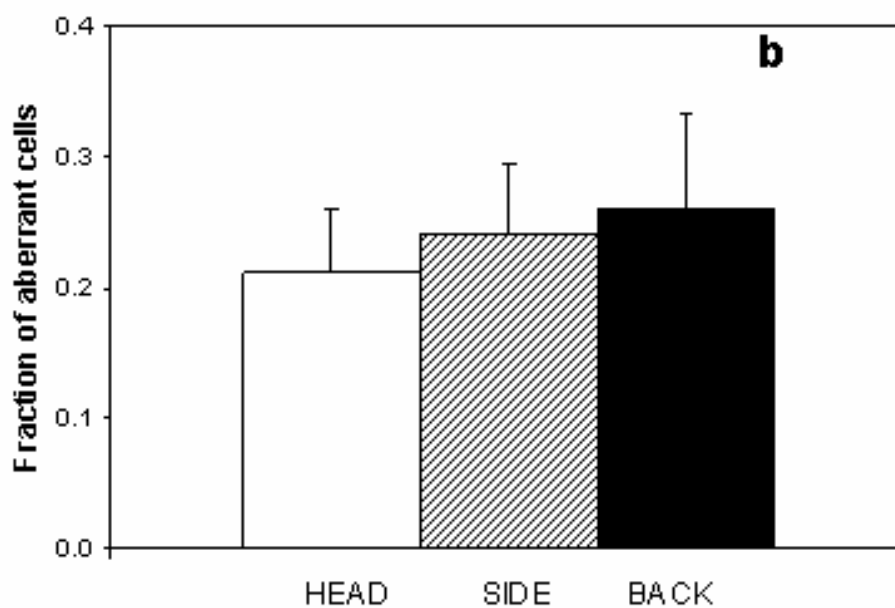


Fig. 66: Frazione di cellule aberrante in fibroblasti esposti a 1 Gy (HEAD), 0,4 Gy (SIDE) e 0,2 Gy (BACK) di ioni ferro in differenti configurazioni e visualizzati a 48 h dall'esposizione con colorazione mFISH.

Questo risultato è sorprendente in quanto, l'energia rilasciata dallo ione è molto diversa nelle differenti configurazioni. La particella che passa per il nucleo nella disposizione HEAD, attraversa la cellula lungo l'asse maggiore e rilascia un ammontare di energia totale significativamente più grande rispetto alla particella che attraversa il nucleo per il suo spessore (BACK) o lungo l'asse minore (SIDE). Da un punto di vista biologico, ci si potrebbe attendere una maggior frazione di cellule aberrante nella configurazione HEAD in quanto dovrebbe essere più difficile restituire completamente il danno arrecato in seguito al maggior numero di rotture indotte nel DNA.

Ciò che si evince dal confronto tra le figure 65 e 66 è che la dose non è un parametro sufficiente per determinare il danno genetico indotto da radiazione densamente ionizzante quando sono coinvolte geometrie differenti.

Dalla figura 66 si conclude che quando in media una particella attraversa il nucleo si ha approssimativamente un 20% di fibroblasti con aberrazioni cromosomiche indipendentemente dalla configurazione di esposizione e malgrado la diversa energia depositata per nucleo.

La frequenza delle aberrazioni totali (numero totale di aberrazioni/cellule osservate) è circa 0,3 nelle condizioni di una particella per nucleo per tutte le configurazioni.

La qualità del danno è differente nei diversi campioni come si evince in figura 67, ove è riportato lo spettro delle aberrazioni (semplici, complesse e frammenti) in rapporto al totale delle anomalie osservate.

In tutte le configurazioni gli scambi semplici sono i più frequenti. La configurazione S esposta a 1 Gy ha la frazione più alta di scambi complessi (0,4), superiore alle configurazioni H e B (entrambe 0,2) anche se esposte alla stessa dose. A parità di dose, la configurazione SIDE ha in media 2 tracce per nucleo, la HEAD ne ha 1 e la BACK 5. Nella configurazione S risulta più probabile che si formino scambi complessi in quanto le 2 tracce distinte che attraversano il nucleo inducono danno in domini cromosomici distinti che possono interagire tra loro. Per la formazione degli scambi complessi parteciperanno entrambe le componenti, la intra e la intertraccia. Nel caso della configurazione H, in media un'unica traccia passa per il nucleo e induce ionizzazioni che più distanti tra loro poiché occorrono lungo l'asse maggiore della cellula. In questa situazione gli scambi semplici, tra due cromosomi sono favoriti.

L'importanza dell'interazione tra i danni arrecati dalle due tracce è confermata dai risultati ottenuti negli esperimenti effettuati a parità di fluenza. La configurazione S in questo caso non presenta alcuno scambio complesso, mentre in H e B rappresentano il 10%. È interessante notare come nella S a 0,4 Gy (1 attraversamento per nucleo) la frazione di scambi complessi si annulla a favore degli scambi semplici.

La configurazione B mostra un risultato interessante: la frazione di complessi è la stessa in entrambe i campioni esposti rispettivamente ad 1 e 0,2 Gy, nonostante il numero di tracce sia differente (1 e 5 in media per nucleo). Considerando i risultati forniti dalle altre due configurazioni si può ipotizzare che nella disposizione B la formazione di complessi avviene principalmente grazie alla componente intratraccia.

Questi risultati sono in accordo con quanto detto al capitolo 3 riguardo i ridotti movimenti della cromatina in interfase. La condizione di esposizione a parità di dose induce in media lo stesso numero di danni nelle diverse configurazioni, ma organizzati

nello spazio in maniera differente. Se i movimenti della cromatina fossero ampi, non ci sarebbero restrizioni dovute alla distanza delle rotture nel DNA e non si dovrebbero osservare differenze nella qualità del danno cromosomico, in particolare per la classe di scambi complessi. I nostri risultati mostrano una significativa discrepanza nella formazione di questa classe di anomalie.

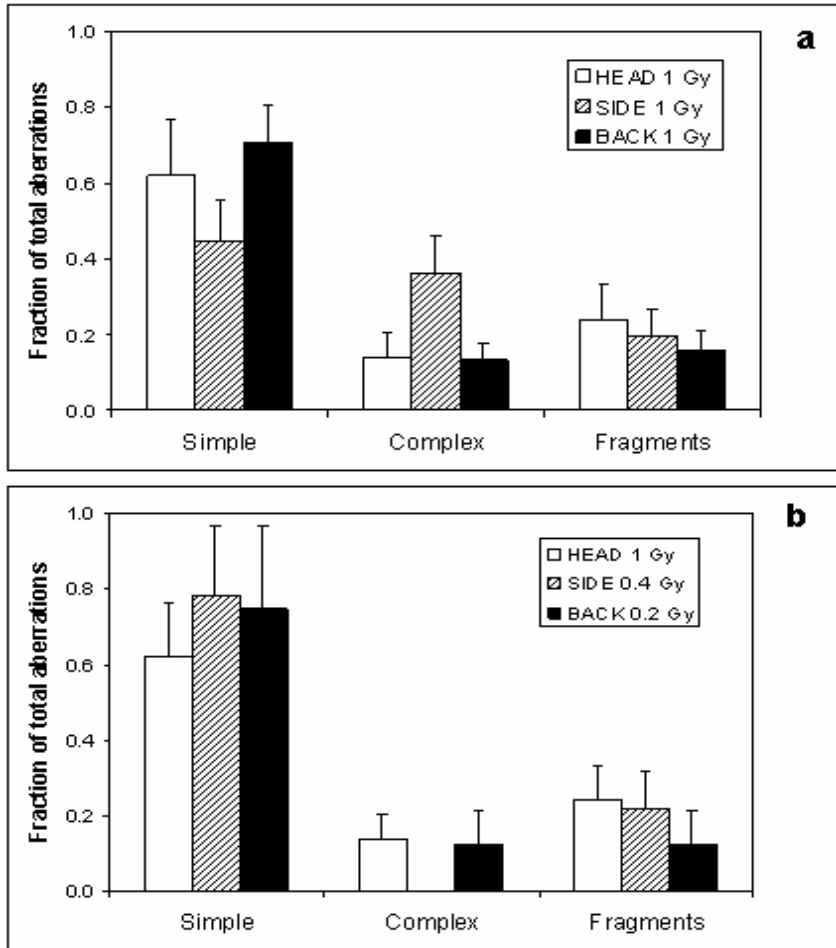


Fig. 67: Spettro delle aberrazioni osservate nei campioni esposti alla stessa dose (a) o alla stessa fluensa (b).

Come spiegato nel capitolo 2, si definiscono scambi complessi quelli originati da 2 o più cromosomi e 3 o più rotture. In questa categoria si riuniscono anomalie con un grado di complessità molto variabile. Una rappresentazione più precisa della complessità del danno è fornita in figura 68 e 69, ove sono riportati il numero di cromosomi coinvolti per aberrazione e il numero di rotture per scambio complesso.

Nei linfociti umani, cellule di tipo sferico, gli ioni ferro inducono un'alta percentuale di scambi complessi anche a basse dosi, che coinvolgono fino a 10 cromosomi. In un esperimento precedente effettuato con la stessa linea di fibroblasti AG1522, si è osservato mediante tecnica mFISH che il rapporto scambi complessi/semplici è inferiore a quello che si osserva in linfociti.

Nelle configurazioni S ed H sono state osservate anomalie formate da molti cromosomi (fino a 6) generate da numerose rotture (fino a 9). Nella configurazione B la complessità è sempre molto bassa (figure 68 e 69).

Nelle configurazioni asimmetriche utilizzate nel nostro esperimento l'accumulo progressivo del danno dipende dal numero di domini cromosomici attraversati. Nella configurazione B pochi domini cromosomici sono attraversati da una singola traccia poiché i fibroblasti sono poco spessi. In questa configurazione non sono stati osservati scambi complessi che coinvolgevano più di 3 cromosomi (fig. 68) e più di 4 rotture (fig. 69).

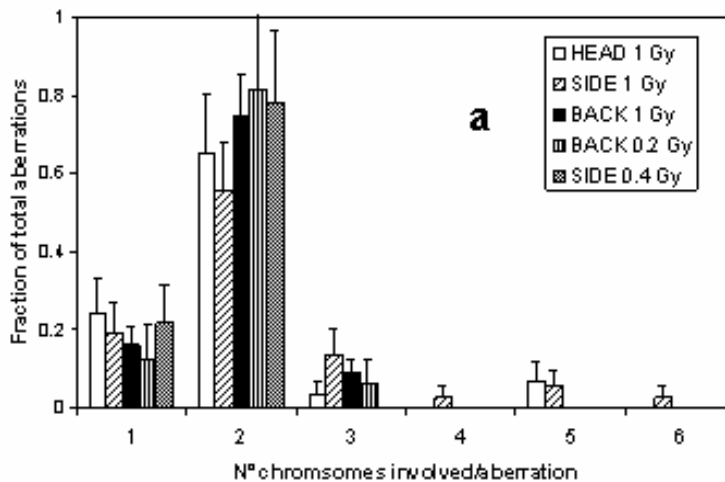


Fig. 68: Numero di cromosomi coinvolti per aberrazione.

Dato l'alto grado di complessità osservato in H (9 rotture) i risultati in figura 69 sembrano discordare con quanto detto precedentemente e cioè che la probabilità di formazione di complessi in H è bassa poiché determinata solo dalla componente intratraccia e limitata dagli scarsi movimenti della cromatina. Bisogna tener presente che non necessariamente queste anomalie sono causate da un singola particella poiché statisticamente il 25% delle cellule è attraversato da almeno 2 tracce quando il numero medio è 1.

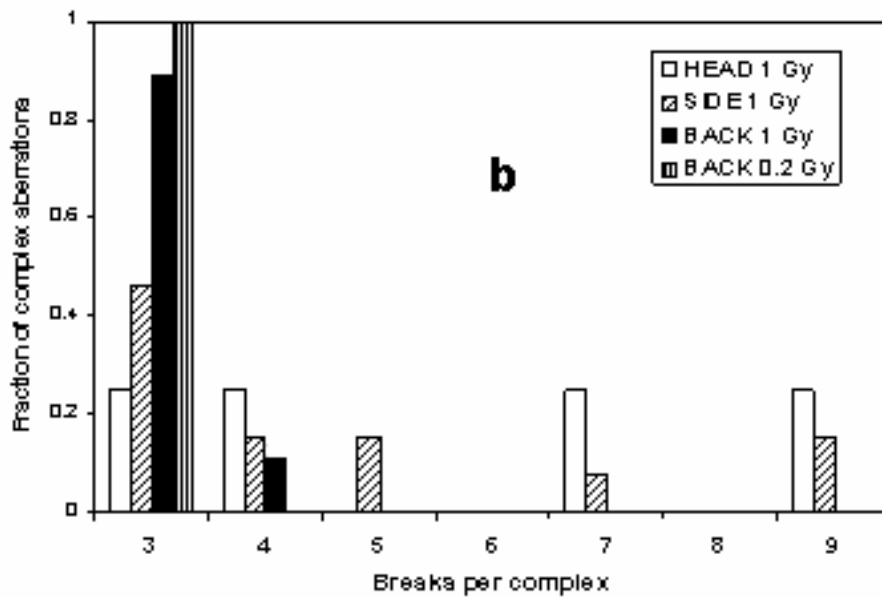


Fig. 69: Numero di rotture osservate per scambio complesso

Da questi risultati concludiamo che il riarrangiamento genetico indotto dalla radiazione in cellule umane è influenzato dall'architettura nucleare. Mediante l'analisi delle aberrazioni cromosomiche è stato possibile corroborare la tesi che i movimenti della cromatina in interfase sono limitati.

Per quanto riguarda le grandezze di interesse dal punto di vista radioprotezionistico, si è dimostrato che nella regione delle basse dosi, la fluenza delle particelle di alto LET rappresenta una grandezza in grado di riflettere meglio della dose assorbita il danno genetico indotto dalla radiazione.

Questi risultati forniscono una evidenza sperimentale in supporto di una tesi proposta alcuni anni fa, che la fluenza e le sezioni d'urto del bersaglio dovrebbero essere considerate come unità di protezione dalla radiazione.

Capitolo 6

Conclusioni

I recenti piani delle agenzie spaziali prevedono permanenze sempre più lunghe di equipaggi umani al di fuori del campo geomagnetico terrestre: la colonizzazione della Luna attorno al 2020, e l'esplorazione di Marte a partire dal 2025-2030. L'ambiente spaziale è ostile agli esseri umani, e non mancano i rischi per la salute associati alla esplorazione e colonizzazione del sistema Solare.

E' generalmente riconosciuto che la problematica principale per la salute è legata all'esposizione a raggi cosmici (Cucinotta e Durante, 2006) ed è rappresentata dal rischio di induzione neoplastica. 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 (Durante e Cucinotta, 2008). Questa tesi rappresenta appunto un tentativo di raccogliere dati sperimentali utili a chiarire il meccanismo mediante il quale ioni pesanti relativistici inducono danno tardivo.

Il lavoro sperimentale si è articolato in 3 sezioni.

La prima riguardante l'analisi delle aberrazioni cromosomiche indotte da radiazione di alto e basso LET in linfociti umani, esposti a diverse dosi di raggi γ e di ioni ferro da 1 GeV/n (LET=145 keV/ μ m) e raccolti a 144 h dall'irraggiamento. Lo scopo è stato valutare la validità del fattore F (rapporto tra interscambi ed intrascambi), proposto come possibile biomarcatore dell'esposizione a radiazione densamente ionizzante (Brenner and Sachs 1994). I nostri risultati, riportati nel capitolo 5, mostrano che l'RBE degli ioni pesanti per l'induzione di aberrazioni cromosomiche si riduce di un fattore 6 quando l'analisi è effettuata nella progenie delle cellule irraggiate in confronto ai valori calcolati prendendo in esame il danno precoce (Boei *et al.*, 2001). Le aberrazioni più frequenti per entrambe i tipi di radiazioni sono gli interscambi semplici (principalmente traslocazioni). Questi risultati suggeriscono che molte delle aberrazioni indotte dagli ioni pesanti sono clonogenicamente letali e non possono essere osservate nella progenie cellulare

E' noto che la radiazione densamente ionizzante produce scambi complessi con notevole efficacia (Griffin *et al.*, 1995). I nostri risultati sperimentali confermano questa

ipotesi e mostrano come anche nella progenie cellulare, la differenza nella frequenza di questa classe tra i campioni esposti ad alto e basso LET permane significativa.

I nostri dati mostrano che molti degli scambi complessi risultano letali per le cellule, in quanto solo il 26% delle aberrazioni nella progenie delle cellule esposte a 1 Gy di ioni ferro appartiene a questa categoria, che risulta invece la più frequente nelle cellule irraggiate (George *et al.*, 2003).

Contrariamente ad altri studi effettuate con mBAND (Hande *et al.*, 2003) i nostri risultati non evidenziano alcuna dipendenza del fattore F dal LET, e quindi non supportano l'ipotesi che gli intrascambi rappresentino un biomarcatore dell'esposizione a ioni pesanti. La frequenza di intrascambi semplici risulta uguale (50-200 cGy) o inferiore (300 cGy) nel campione esposto a ferro rispetto ai raggi γ .

In tutti i campioni analizzati eccetto per la dose 100 cGy, il valore F calcolato come rapporto tra interscambi semplici su intrascambi semplici è sempre maggiore a parità di dose nei campioni esposti a ioni ferro (tra 7.5 e 14) rispetto a quelli irraggiati con raggi γ (tra 6 e 9.5). Quando per la stima del valore F è inclusa la classe inter-intrascambi il risultato è nettamente diverso, il parametro F calcolato per gli ioni pesanti (2.3-3.6) scende drasticamente rispetto a quello osservato nel campione esposto a fotoni (4.8-9.5). È interessante notare che le due tecniche applicate per l'analisi delle aberrazioni intracromosomiche (XCAP e arm specific mFISH) forniscono risultati sperimentali concordanti tra loro, corroborando le conclusioni che ne derivano.

La conclusione tratta da questa prima linea di investigazione è che la validità del parametro F come indicatore della qualità della radiazione è riconosciuta quando si includono nel calcolo gli intrascambi di tipo complesso.

La seconda tematica affrontata ha riguardato l'utilizzo degli intrascambi come bioindicatori del rischio di insorgenza di cancro alla tiroide. Una linea di cellule della tiroide umana è stata esposta a radiazione di alto e basso LET e analizzata mediante l'uso della mBAND.

Il campione esposto a basso LET mostra la frequenza più alta di interscambi semplici ($0,22 \pm 0,06$), mentre gli scambi complessi dominano nel campione esposto a ioni ferro ($0,16 \pm 0,06$), in accordo con i risultati che si osservano analizzando il danno precoce.

La complessità generale del danno fornita dalla distribuzione di rotture per cromosoma aberrato mostra un aumento al crescere del LET. Le cellule esposte a ioni nichel hanno la distribuzione più ampia, dimostrando che sebbene numerose cellule

recanti aberrazioni complesse muoiono, il danno complessivo risulta maggiore per la radiazione con il più alto valore del LET.

Non è stata osservata una differenza statisticamente significativa nella frequenza di scambi intracromosomici (semplici e complessi) tra i vari campioni. Questa considerazione conferma i risultati riportati nell'affrontare la prima tematica della tesi, ottenuti con una diversa tecnica di ibridazione.

Basandoci su questi dati si potrebbe concludere che gli ioni pesanti non dovrebbero essere più efficaci del basso LET nell'indurre cancro alla tiroide. Gli scambi intracromosomici sono sempre meno frequenti rispetto agli interscambi, come riportato in linfociti umani (Johannes *et al.*, 2004), o in cellule epiteliali (Hada *et al.*, 2007) esposti a raggi X e ioni pesanti. La frequenza risulta così bassa che diventa difficile osservare differenze statisticamente significative con la mBAND (Horstmann *et al.*, 2005).

La terza tematica si è sviluppata intorno al concetto di dose e al suo ruolo nella pratica radioprotezionistica. Il quesito che si è posto è stato se un'altra grandezza, la fluena, possa rappresentare un migliore parametro per la determinazione del danno biologico indotto da ioni pesanti. Per tale studio sono stati utilizzati fibroblasti messi in coltura su supporti la cui superficie induce una crescita per file parallele, determinando una precisa disposizione geometrica dei nuclei. Effettuando esperimenti a parità di dose o di fluena si è voluta determinare la quantità e la qualità del danno citogenetico indotto utilizzando la tecnica mFISH per visualizzare gli scambi cromosomici.

I risultati sono stati molto interessanti. La frazione di cellule aberrate è significativamente diversa nei campioni esposti alla stessa dose ma in differenti configurazioni. La situazione appare diversa quando i campioni sono esposti allo stesso numero medio di attraversamenti per nucleo (fluena). In questa situazione la frazione di cellule aberrate risulta la stessa (20%), indipendentemente dalla configurazione e dall'ammontare di energia rilasciata nel nucleo. La frequenza delle aberrazioni totali è circa 0,3 nelle condizioni di una particella per nucleo per tutte le configurazioni.

L'analisi della qualità del danno mostra interessanti risultati. Nella configurazione ove due tracce passano per l'asse minore del nucleo si osserva la frazione più grande di complessi (40%). Nessun complesso si osserva quando un'unica traccia passa nella medesima configurazione geometrica e da questo si conclude che la formazione di complessi nel primo caso è determinata per effetto inter-traccia.

La configurazione invece, che presenta il maggior numero di domini attraversati dalla singola traccia riporta una frazione di complessi inferiore (20%). La ragione risiede negli scarsi movimenti effettuati dalla cromatina in interfase, che delimitano la possibile area di interazione delle rotture indotte nel DNA.

La conclusione interessante che si è ricavata da questo studio è che la topologia nucleare ha una grossa influenza sulla qualità del danno citogenetico radioindotto. Questi risultati forniscono inoltre un'evidenza sperimentale alla ipotesi che la dose non sia un parametro sufficiente per determinare il danno genetico indotto da radiazione densamente ionizzante quando sono coinvolte geometrie differenti.

La conclusione generale del lavoro è che le aberrazioni cromosomiche costituiscono un ottimo bioindicatore per lo studio degli effetti indotti da radiazioni ionizzanti. Oltre a costituire indicatori della dose, sono ottimi indici della qualità della radiazione e del rischio biologico di insorgenza di determinate patologie.

Oltre all'utilità riconosciuta in ambito radioprotezionistico, costituiscono un interessante metodo di indagine per applicazioni più fini, quali l'investigazione dei domini cromosomici e dei movimenti della cromatina.

Appendice

Protocolli sperimentali

1) Raccolta delle metafasi (Harvest)

Soluzioni:

Colcemide della Gibco (10 µg/ mL)

Soluzione ipotonica di cloruro di potassio 0.075 M

Carnoy 3:1 metanolo : acido acetico

1) Dopo 144 h di incubazione, aggiungere 0.4 mL di colcemide a ciascuna coltura di 20 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 in un tubo Falcon e centrifugare a 2000 rpm per 5 min.

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. Far 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 di soluzione ipotonica a ciascun tubo.

6) Incubare a 37 °C per il tempo rimanente allo scadere dei 20 min.

7) Aggiungere 2 mL di fissativo (Carnoy) e mischiare lentamente, aiutandosi con una pipetta.

8) Centrifugare a 2000 rpm per 5 min.

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.

12) Rimuovere il sopranatante, aggiungere 5 mL di fissativo, mescolare e centrifugare di nuovo.

13) Conservati i campioni in freezer a -20 °C fino alla preparazione dei vetrini.

2). FISH

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.

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.

- 1) Prelevare con una pipetta Gilson la quantità desiderata di sonda fluorescente.
- 2) Centrifugare 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 mm²)
- 5) Applicare, mediante una siringa, uno strato sottile di colla ai bordi del vetrino coprioggetti.
- 6) Lasciare a 37° per 2 – 3 giorni
- 7) Preriscaldare a 72 °C la soluzione 0.4 X SSC 0.3% NP40
- 8) Terminata l'ibridizzazione, rimuovere il vetrino coprioggetti.
- 9) Sciacquare 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) Effettuare la rivelazione secondaria quando necessario
- 12) Lasciare asciugare all'aria, evitando l'esposizione alla luce.
- 13) Prelevare con una Gilson 12µl di DAPI e depositarli sul vetrino.
- 14) Porre un vetrino coprioggetti (24 x 24 mm²)

Bibliografia

Ahmed R., Gray D. 1996 Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272 : 54-60.

Ai H., Barrera J.E., Pan Z., Meyers A.D., Varella-Garcia M. 1999 Identification of individuals at high risk for head and neck carcinogenesis using chromosome aneuploidy detected by fluorescence in situ hybridization. *Mutat. Res.* 439 : 223-232.

Airaksinen M.S., Titievsky A., Saarma M. 1999 GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant? *Mol. Cell Neurosci.* 13 : 313-325.

Alpen E.L., Powers-Risius P., Curtis S.B., DeGuzman R. 1993 Tumorigenic potential of high-Z, high-LET charged-particle radiations. *Radiat. Res.* 36 : 382-391.

Amundson S.A., Bittner M., Meltzer P., Trent J., Fornace A.J. Jr. 2001 Biological indicators for the identification of ionizing radiation exposure in humans. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 1 : 211-219.

Anderson R.M., Marsden S.J., Wright E.G., Kadhim M.A., Goodhead D.T., Griffin C.S. 2000 Complex chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes as a potential biomarker of exposure to high-LET alpha-particles. *Int. J. Radiat. Biol.* 76 : 31-42.

Anderson R.M., Marsden S.J., Paice S.J., Bristow A.E., Kadhim M.A., Griffin C.S., Goodhead D.T. 2003 Transmissible and nontransmissible complex chromosome aberrations characterized by three-color and mFISH define a biomarker of exposure to high-LET alpha particles. *Radiat. Res.* 159 : 40-48.

Ando K., Koike S., Oohira C., Ogiu T., Yatagai F. 2005 Tumor induction in mice locally irradiated with carbon ions: a retrospective analysis. *J. Radiat. Res.* 46 : 185-190.

Asa S.L. 2001 How familial cancer genes and environmentally induced oncogenes have changed the endocrine landscape. *Mod. Pathol.* 14 : 246-253.

Aten J.A., Stap J., Krawczyk P.M., van Oven C.H., Hoebe R.A., Essers J., Kanaar R. 2004 Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains. *Science* 303 : 92-95.

Auf der Maur P., Berlincourt-Böhni K. 1979. Human lymphocyte cell cycle: studies with the use of BrUdR. *Hum. Genet.* 49 : 209-215.

Bauchinger M., Schmid E. 1997 Is there reliable experimental evidence for a chromosomal "fingerprint" of exposure to densely ionizing radiation? *Radiat. Res.* 147 : 506-510.

Bauchinger M., Schmid E. 1998 LET dependence of yield ratios of radiation-induced intra- and interchromosomal aberrations in human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 74 : 17-25.

Belloni P., Meschini R., Lewinska D., Palitti F. 2008 Apoptosis preferentially eliminates irradiated g0 human lymphocytes bearing dicentric chromosomes. *Radiat. Res.* 169 : 181-187.

Bender M.A., Awa A.A., Brooks A.L., Evans H.J., Groer P.G., Littlefield L.G., Pereira C., Preston R.J., Wachholz B.W. 1988 Current status of cytogenetic procedures to detect and quantify previous exposures to radiation. *Mutat. Res.* 196 : 103-159.

Boari C., Macori L. 2001 *Emocromo: guida rapida all'interpretazione ragionata* Piccin-Nuova Libreria, Padova

Boei J.J., Vermeulen S., Natarajan A.T. 1998a Dose-response curves for X-ray induced interchanges and interarm intrachanges in human lymphocytes using arm-specific probes for chromosome 1. *Mutat. Res.* 404 : 45-53.

Boei J.J., Vermeulen S., Mullenders L.H., Natarajan A.T. 2001 Impact of radiation quality on the spectrum of induced chromosome exchange aberrations. *Int. J. Radiat. Biol.* 77 : 847-857.

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. 2000 Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *Cancer Res.* 60 : 1619-1625.

Bongarzone I., Monzini N., Borrello M.G., Carcano C., Ferraresi G., Arighi E., Mondellini P., Della P.G., Pierotti M.A. 1993 Molecular characterization of a thyroid tumor-specific transforming sequence formed by the fusion of ret tyrosine kinase and the regulatory subunit RI alpha of cyclic AMP-dependent protein kinase A. *Mol. Cell Biol.* 13 : 358-366.

Borisy GG, Taylor EW. 1967 The mechanism of action of colchicine. Binding of colchicine-3H to cellular protein. *J. Cell. Biol.* 34 : 525-533.

Bornfleth H, Edelmann P, Zink D, Cremer T, Cremer C. 1999 Quantitative motion analysis of subchromosomal foci in living cells using four-dimensional microscopy. *Biophys. J.* 77 : 2871-2886.

Brenner D.J., Sachs R.K. 1994 Chromosomal "fingerprints" of prior exposure to densely ionizing radiation. *Radiat. Res.* 140 : 134-142.

Brooks A., Bao S., Rithidech K., Couch L.A., Braby L.A. 2001 Relative effectiveness of HZE iron-56 particles for the induction of cytogenetic damage in vivo. *Radiat. Res.* 155 : 353-359.

Brown T.A. 1999 *Genomes* Wiley-Liss, Wilmington

Burns F.J., Jin Y., Koenig K.L., Hosselet S. 1993 The low carcinogenicity of electron radiation relative to argon ions in rat skin. *Radiat. Res.* 135 : 178-188.

Cabral do Couto P., Costa Cabral B.J., Canuto S. 2006 Electron binding energies of water clusters: Implications for the electronic properties of liquid water *Chem. Phys. Lett.* 429 : 129-135.

Chudoba I., Hickmann G., Friedrich T., Jauch A., Kozłowski P., Senger G. mBAND: a high resolution multicolor banding technique for the detection of complex intrachromosomal aberrations. *Cytogenet. Genome Res.* 104 : 390-393.

Cornforth M.N., Goodwin E.H. 1991 Transmission of radiation-induced acentric chromosomal fragments to micronuclei in normal human fibroblasts. *Radiat. Res.* 126 : 210-217.

Corvi R., Lesueur F., Martinez-Alfaro M., Zini M., Decaussin M., Murat A., Romeo G. 2001 RET rearrangements in familial papillary thyroid carcinomas. *Cancer Lett.* 170 : 191-198.

Cremer T., Cremer C. 2001 Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat. Rev. Genet.* 2 : 292-301.

Critchlow S.E. and Jackson S.P. 1998 DNA end-joining: from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.* 23 : 394-398.

Durante M., Cucinotta F.A. 2008 , Heavy ion carcinogenesis and human space exploration. *Nat. Rev. Cancer.* 8 : 465-472.

Cucinotta F.A., Durante M. 2006 Cancer risk from exposure to galactic cosmic rays: implications for space exploration by human beings. *Lancet Oncol.* 7 : 431-435.

Dewey W.C., Miller H.H., Leeper D.B. 1971 Chromosomal aberrations and mortality of x-irradiated mammalian cells: emphasis on repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68 : 667-671.

Dicello J.F., Christian A., Cucinotta F.A., Gridley D.S., Kathirithamby R., Mann J., Markham A.R., Moyers M.F., Novak G.R., Piantadosi S., Ricart-Arbona R., Simonson D.M., Strandberg J.D., Vazquez M., Williams J.R., Zhang Y., Zhou H., Huso D. 2004 In vivo mammary tumourigenesis in the Sprague-Dawley rat and microdosimetric correlates. *Phys. Med. Biol.* 49 : 3817-3830.

Dudášová Z., Dudáš A., Chovanec M. 2004 Non-homologous end-joining factors of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 28 : 581-601.

DuFrain R.J., Littlefield L.G., Joiner E.E., Frome E.L. 1979 Human cytogenetic dosimetry: a dose-response relationship for alpha particle radiation from ²⁴¹Am. *Health Phys.* 37 : 279-289.

Durante M., Furusawa Y., Gotoh E. 1998a A simple method for simultaneous interphase-metaphase chromosome analysis in biodosimetry. *Int. J. Radiat. Biol.* 74 : 457-462.

Durante M., Furusawa Y., George K., Gialanella G., Greco O., Grossi G., Matsufuji N., Pugliese M., Yang T.C. 1998b Rejoining and misrejoining of radiation-induced chromatin breaks. IV. Charged particles. *Radiat. Res.* 149 : 446-54.

Durante M. 2002 Radiation protection in space *Riv. Nuovo Cimento* 25 : 1-70.

Durante M., George K., Wu H., Cucinotta F.A. 2002 Karyotypes of human lymphocytes exposed to high-energy iron ions. *Radiat. Res.* 158 : 581-590.

Durante M., Ando K., Furusawa Y., Obe G., George K., Cucinotta F.A. 2004 Complex chromosomal rearrangements induced in vivo by heavy ions. *Cytogenet. Genome Res.* 104 : 240-244.

Durante M., 2005 Biomarkers of space radiation risk. *Radiat. Res.* 164 : 467-473.

Durante M., George K., Cucinotta F.A. 2006 Chromosomes lacking telomeres are present in the progeny of human lymphocytes exposed to heavy ions. *Radiat. Res.* 165 : 51-58.

Durante M., Gialanella G. 2006 *Metodi statistici per la sperimentazione biologica* UTET, Napoli

Fei P., El-Deiry W.S. 2003 P53 and radiation responses. *Oncogene.* 22 : 5774 – 5783.

Frankenberg-Schwager M., Gebauer A., Koppe C., Wolf H., Pralle E., Frankenberg D. 2009 Single-strand annealing, conservative homologous recombination, nonhomologous DNA end joining, and the cell cycle-dependent repair of DNA double-strand breaks induced by sparsely or densely ionizing radiation. *Radiat. Res.* 171 : 265-273.

Fusco A., Grieco M., Santoro M., Berlingieri M.T., Pilotti S., Pierotti M.A., Della P.G., Vecchio G. 1987 A new oncogene in human thyroid papillary carcinomas and their lymph-nodal metastases. *Nature.* 328 : 170-172.

George K., Durante M., Willingham V., Wu H., Yang T.C., Cucinotta F.A. 2003 Biological effectiveness of accelerated particles for the induction of chromosome damage measured in metaphase and interphase human lymphocytes. *Radiat. Res.* 160 : 425-435.

Grieco M., M., Santoro M., Berlingieri M.T., Melillo R.M., Donghi R., Bongarzone I., Pierotti M.A., Della P.G., Fusco A., Vecchio G. 1990 PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell.* 60 : 557-563.

Griffin C.S., Marsden S.J., Stevens D.L., Simpson P., Savage J.R. 1995 Frequencies of complex chromosome exchange aberrations induced by ²³⁸Pu alpha-particles and detected by fluorescence in situ hybridization using single chromosome-specific probes. *Int. J. Radiat. Biol.* 67 : 431-439.

Guido S., Tranquillo R.T. 1993 A methodology for the systematic and quantitative study of cell contact guidance in oriented collagen gels. Correlation of fibroblast orientation and gel birefringence. *J. Cell Sci.* 105 : 317-331.

Haber J.E. 2000 Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet.* 16 : 259-264.

Hada M., Cucinotta F.A., Gonda S.R., Wu H. 2007 mBAND analysis of chromosomal aberrations in human epithelial cells exposed to low- and high-LET radiation. *Radiat. Res.* 168 : 98-105.

Hall E.J. 1994 *Radiobiology for the Radiologist* J.B.Lippincott Company, Philadelphia

Hall E.J. 2003 Genomic instability and bystander effects induced by high-LET radiation. *Oncogene* 22 : 7034-7042.

Hande M.P., Azizova T.V., Geard C.R., Burak L.E., Mitchell C.R., Khokhryakov V.F., Vasilenko E.K., Brenner D.J. 2003 Past exposure to densely ionizing radiation leaves a unique permanent signature in the genome. *Am. J. Hum. Genet.* 72 : 1162-1170.

Haran-Ghera N. 1989 Radiation induced deletion of chromosome 2 in myeloid leukemogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 149 : 35-41.

Hlatky L.R., Sachs R.K., Hahnfeldt P. 1992 The ratio of dicentrics to centric rings produced in human lymphocytes by acute low-LET radiation. *Radiat. Res.* 129 : 304-308.

Horstmann M., Durante M., Johannes C., Pieper R., Obe G. 2005 Space radiation does not induce a significant increase of intrachromosomal exchanges in astronauts' lymphocytes. *Radiat. Environ. Biophys.* 44 : 219-224.

Ito T., Seyama T., Iwamoto K.S., Hayashi T., Mizuno T., Tsuyama N., Dohi K., Nakamura N., Akiyama M. 1993 In vitro irradiation is able to cause RET oncogene rearrangement. *Cancer Res.* 53: 2940-2943.

Jakob B, Splinter J, Durante M, Taucher-Scholz G. 2009 Live cell microscopy analysis of radiation-induced DNA double-strand break motion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 106 : 3172-3177.

Janower M.L., Miettinen O.S. 1971 Neoplasms after childhood irradiation of the thymus gland. *JAMA.* 215 : 753-756.

Johannes C., Horstmann M., Durante M., Chudoba I., Obe G. 2004 Chromosome intrachanges and interchanges detected by multicolor banding in lymphocytes: searching for clastogen signatures in the human genome. *Radiat. Res.* 161 : 540-548.

Kiefer J. 1990 *Biological Radiation Effects* Springer Verlag, Berlin Heidelberg

Kiefer J. 2002 Mutagenic effects of heavy charged particles. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 43 : S21-25.

Kraft G., Becher W., Blasche K., Böhne D., Franczak B., Haberer Th., Kraft-Weyrather W., Krämer M., Langenbeck B., Lenz G., Ritter S., Scholz M., Schardt D., Stelzer H., Strehl P., Weber U. 1994 The Darmstadt program HITAG: heavy ion therapy at GSI *Hadrontherapy in Oncology* : 217-223.

Lemoine N.R., Mayall E.S., Jones T., Sheer D., McDermid S., Kendall-Taylor P., Wynford-Thomas D. 1989 Characterisation of human thyroid epithelial cells immortalised in vitro by simian virus 40 DNA transfection. *Br. J. Cancer.* 60 : 897-903.

Leonard A., Rueff J., Gerber G.B., Leonard E.D. 2005 Usefulness and limits of biological dosimetry based on cytogenetic methods. *Radiat. Prot. Dosimetry* 115 : 448-454.

Lishner M., Kenet G., Lalkin A., Yarkoni S., Ben-Bassat H., Fejgin M., Rechavi G., Amiel A. 1993 Fluorescent in situ hybridization for the detection of t(8:14) in Burkitt's lymphoma. *Acta Haematol.* 90 : 186-189.

Lucas J.N., Cervantes E. 2002 Significant large-scale chromosome territory movement occurs as a result of mitosis, but not during interphase. *Int. J. Radiat. Biol.* 78 : 449-55.

Ma Y., Pannicke U., Schwarz K., Lieber M.R. 2002 Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell.* 108 : 781-794.

Manuelidis L. 1990 A view of interphase chromosomes. *Science* 250 : 1533-40.

Manti L., Bertucci A., Gialanella G., Grossi G., Pignalosa D., Pugliese M., Scampoli P., Durante M. 2007 Rearrangements in human chromosome 1 visualized by arm-specific probes in the progeny of blood lymphocytes exposed to iron ions. *Adv. Space Res.* 39 : 1066-1069.

Miller K., Schendel D.J., Wank R. 1981 Cell-growth kinetics and karyotype analysis of human memory lymphocytes responding to alloantigen and mitogen. *Immunobiology* 159 : 269-282.

Miller J. 2003 Proton and heavy ion acceleration facilities for space radiation research. *Gravit Space Biol Bull.* 16 : 19-28.

Nakamura N., Tucker J.D., Bauchinger M., Littlefield L.G., Lloyd D.C., Preston R.J., Sasaki M.S., Awa A.A., Wolff S. 1998 F values as cytogenetic fingerprints of prior exposure to different radiation qualities: prediction, reality and future. *Radiat. Res.* 150 : 492-494.

Nasonova E., Ritter S., Gudowska-Nowak E., Kraft G. 2000 High-LET-induced chromosomal damage: time-dependent expression. *Phys. Med.* 17 : S1198-201.

Nelson G.A. 2003 Fundamental space radiobiology. *Gravit. Space Biol. Bull.* 16 :29-36.

Nikiforov Y.E. 2002 RET/PTC rearrangement in thyroid tumors. *Endocr. Pathol.* 13 : 3-16.

- Nikiforova M.N., Stringer J.R., Blough R., Medvedovic M., Fagin J.A., Nikiforov Y.E. 2000 Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cells. *Science* 290 : 138-141.
- Pala F.S., Moquet J.E., Edwards A.A., Lloyd D.C. 2001 In vitro transmission of chromosomal aberrations through mitosis in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 474 : 139-146.
- Parada L., Misteli T. 2002 Chromosome positioning in the interphase nucleus. *Trends Cell Biol.* 12 : 425-432.
- Pasini B., Ceccherini I., Romeo G. 1996 RET mutations in human disease. *Trends Genet.* 12 : 138-144.
- Pierotti M.A., Santoro M., Jenkins R.B., Sozzi G., Bongarzone I., Grieco M., Monzini N., Miozzo M., Herrmann M.A., Fusco A. 1992 Characterization of an inversion on the long arm of chromosome 10 juxtaposing D10S170 and RET and creating the oncogenic sequence RET/PTC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 : 1616-1620.
- Santoro M., Dathan N.A., Berlingieri M.T., Bongarzone I., Paulin C., Grieco M., Pierotti M.A., Vecchio G., Fusco A. 1994 Molecular characterization of RET/PTC3; a novel rearranged version of the RET proto-oncogene in a human thyroid papillary carcinoma. *Oncogene.* 9 : 509-516.
- Pisani T., Parkin D.M., Bray F., Ferlay J. 1999 Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int. J. Cancer.* 83 : 18-29.
- Ramalho A.T., Nascimento A.C. 1991 The fate of chromosomal aberrations in ¹³⁷Cs-exposed individuals in the Goiania radiation accident. *Health Phys.* 60 : 67-70.
- Reilly J.T. 2005 Pathogenesis of acute myeloid leukaemia and inv(16)(p13;q22): a paradigm for understanding leukaemogenesis? *Br. J. Haematol.* 128 : 18-34.
- Reiners C., Demidchik Y.E., Drozd V.M., Biko J. 2008 Thyroid cancer in infants and adolescents after Chernobyl. *Minerva Endocrinol.* 33 : 381-395.

Ritter S., Nasonova E., Furusawa Y., Ando K. 2002 Relationship between aberration yield and mitotic delay in human lymphocytes exposed to 200 MeV/u Fe-ions or X-rays. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 43 : S175-179.

Ron E. 2007 Thyroid cancer incidence among people living in areas contaminated by radiation from the Chernobyl accident. *Health Phys.* 93 : 502-511.

Rooney S., Alt F.W., Sekiguchi J., Manis J.P. 2004 Artemis-independent functions of DNA-dependent protein kinase in Ig heavy chain class switch recombination and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 : 2471-2475.

Sachs R.K., Brenner D.J., Chen A.M., Hahnfeldt P., Hlatky L.R. 1997 Intra-arm and interarm chromosome intrachanges: tools for probing the geometry and dynamics of chromatin. *Radiat. Res.* 148 : 330-340.

Sachs R.K., Hahnfeld P., Brenner D.J. 1997 The link between low-LET dose-response relations and the underlying kinetics of damage production/repair/misrepair. *Int. J. Radiat. Biol.* 72 : 351-374.

Santoro M., Melillo R.M., Carlomagno F., Fusco A., Vecchio G. 2002 Molecular mechanisms of RET activation in human cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 963 : 116-121.

Sasaki M.S., Takatsuji T., Ejima Y., Kodama S., Kido C. 1987 Chromosome aberration frequency and radiation dose to lymphocytes by alpha-particles from internal deposit of Thorotrast. *Radiat. Environ. Biophys.* 26 : 227-238.

Sasaki M.S., Takatsuji T., Ejima Y. 1998 Commentary: The F value cannot be ruled out as a chromosomal fingerprint of radiation quality. *Radiat. Res.* 150 : 253-258.

Savage J.R.K. 1975 Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *J. Med. Genet.* 12 : 103-122.

Savage J.R.K. 1993 Interchange and intra-nuclear architecture. *Environ. Mol. Mutagen.* 22 : 234-44.

Savage J.R.K., Simpson P. 1994 On the scoring of FISH-"painted" chromosome-type exchange aberrations. *Mutat. Res.* 307 : 345-53.

Savage J.R.K. 1997 A note on inter-arm intrachange patterns resulting from dual-arm fish painting. *Mutat. Res.* 373 : 265-269.

Schwartz J.L., Hsie A.W. 1997 Genetic and cytogenetic markers of exposure to high-linear energy transfer radiation. *Radiat. Res.* 148 : S87-92.

Smida J., Salassidis K., Hieber L., Zitzelsberger H., Kellerer A.M., Demidchik E.P., Negele T., Spelsberg F., Lengfelder E., Bauchinger M. 1999 Distinct frequency of ret rearrangements in papillary thyroid carcinomas of children and adults from Belarus. *Int. J. Cancer.* 80 : 32-38.

Smith D.P., Eng C., Ponder B.A. 1994 Mutations of the RET proto-oncogene in the multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes and Hirschsprung disease. *J. Cell Sci. Suppl.* 18 : 43-49.

Stephan G., Oestreicher U. 1989 An increased frequency of structural chromosome aberrations in persons present in the vicinity of Chernobyl during and after the reactor accident. Is this effect caused by radiation exposure? *Mutat. Res.* 223 : 7-12.

Stephan G., Diener A., Vogl T. 1990 Chromosome aberrations in peripheral lymphocytes of patients irradiated with 15-MeV-photons for Morbus Hodgkin. *Strahlenther Onkol.* 166 : 460-465.

Stewart R.D. 2001 Two-lesion kinetic model of DSB rejoining and cell killing. *Radiat. Res* 156 : 365-378.

Stopera S.A., Ray M., Riordan D., Christie N., Wickstrom D. 1990 Variant Philadelphia translocations in chronic myeloid leukemia: correlation with cancer breakpoints, fragile sites and oncogenes. *Cancer Lett.* 55 : 249-253.

Tallon I., Verschaeve L., Kirsch-Volders M. 1998 Cell cycle dependent aneuploidy induction by X-Rays in vitro in human lymphocytes. *Microsc. Res. Tec.* 40: 344-353.

Tawn E.J., Whitehouse C.A. 2005 Chromosome intra- and inter-changes determined by G-banding in radiation workers with in vivo exposure to plutonium. *J. Radiol. Prot.* 25 : 83-88

Thompson D.E., Mabuchi K., Ron E., Soda M., Tokunaga M., Ochikubo S., Sugimoto S., Ikeda T., Terasaki M., Izumi S. 1994 Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part II: Solid tumors 1958-1987. *Radiat. Res.* 137 : S17-67.

Walboomers X.F., Ginsel L.A., Jansen J.A. 2000 Early spreading events of fibroblasts on microgrooved substrates. *J. Biomed. Mater. Res.* 51 : 529-534.

Weil M.M., Bedford J.S., Bielefeldt-Ohmann H., Ray F.A., Genik P.C., Ehrhart E.J., Fallgren C.M., Hailu F., Battaglia C.L., Charles B., Callan M.A., Ullrich R.L. 2009 Incidence of acute myeloid leukemia and hepatocellular carcinoma in mice irradiated with 1 GeV/nucleon (56)Fe ions. *Radiat. Res.* 172 : 213-219.

Wojewodzka M., Buraczewska I. and Kruszewski M. 2002 A modified neutral comet assay: elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-single-stranded DNA antibody. *Mutat. Res.*, 518 : 9–20.

Wu H., Durante M., George K., Goodwin E.H., Yang T.C. 1996 Rejoining and misrejoining of radiation-induced chromatin breaks. II. Biophysical Model. *Radiat. Res.* 145 : 281-288.

Yang T.C., Craise L.M., Mei M., Tobias C.A. 1985 Neoplastic cell transformation by heavy charged particles. *Radiat. Res.* 104 : S177-187.

Zhang X., Succi J., Feng Z., Prithivirajasingh S., Story M.D., Legerski R.J. 2004 Artemis is a phosphorylation target of ATM and ATR and is involved in the G2/M DNA damage checkpoint response. *Mol. Cell. Biol.* 24 : 9207-9220.

Zhang Q., Williams E.S., Askin K.F., Peng Y., Bedford J.S., Liber H.L., Bailey S.M.
2005 Suppression of DNA-PK by RNAi has different quantitative effects on telomere
dysfunction and mutagenesis in human lymphoblasts treated with gamma rays or HZE
particles. *Radiat. Res.* 164 : 497-504.

Ringraziamenti

Tre anni sono trascorsi da quando ho iniziato questo dottorato e innumerevoli cose mi sono accadute. Il tempo è passato, ma la costante della mia vita è rappresentata dalla mia famiglia, che mi è sempre stata vicina, è stata il mio supporto nei momenti difficili e il calore dei momenti belli. Non c'è niente che può sostituire l'amore incondizionato che proviene da loro e non ci saranno mai abbastanza parole per rappresentare quello che provo nei loro confronti. La parte più dura della crescita di una persona è proprio allontanarsi dalla propria famiglia, dalla fonte di amore più naturale che c'è. I miei genitori mi mancano ogni giorno, ma so che sono felici fintanto che io lo sono e so che anche se lontani, il loro amore per me non cambia.

Come tante altre persone, ho condotto molto del mio lavoro all'estero, come "emigrante". All'inizio è stato difficile, avevo nostalgia degli affetti familiari e delle mie amiche più strette. Ma partire è stata anche la cosa più bella che mi potesse succedere, poichè mi ha dato la possibilità di conoscere la persona che amo e che ho sposato, Julio. Con lui condivido ogni giorno gioie e dispiaceri, risate e lacrime. Questo anno trascorso con lui mi ha fatto maturare moltissimo in poco tempo. Con la sua forte personalità mi ha sempre trasmesso energia nei momenti di difficoltà, facendo leva sull'importanza del nostro legame in grado di superare qualsiasi ostacolo. La persona che è diventata una parte di me, che ogni giorno mi nutre di amore e che spero lo farà per sempre. In una realtà piena di problemi, il suo affetto mi sostiene, mi dà la forza e la volontà di continuare. Adesso, con lui al mio fianco, la mia famiglia si è allargata.

In tre anni ho avuto la possibilità di conoscere tanta gente, di lavorare con molte persone che mi sono state di grande aiuto, sia dal punto di vista pratico che professionale. Ringrazio il mio professore, Marco Durante, che mi ha appoggiato sin dall'inizio della mia carriera, e mi ha permesso di avere questa esperienza incredibile di lavoro e di crescita. Ringrazio molto gli amici (Antonella, Anna, Filomena, Lorenzo, Gennaro, Annalisa, Claudia, Carla, Gabriella, Enzo) e i colleghi di Napoli, che rimarranno sempre nel mio cuore.

Grazie di cuore a tutti