



**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**

Sede Amministrativa: **Università degli Studi di Padova**

Dipartimento di: **Territorio e Sistemi Agro-Forestali (TESAF)**

---

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN : **TERRITORIO, AMBIENTE, RISORSE E SALUTE**

CICLO: XXVII

TITOLO TESI: **“Dosimetria biologica delle radiazioni ionizzanti: valutazione della dose con metodologie citogenetiche tramite la costruzione di curve di calibrazione”.**

**Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Mario Aristide Lenzi**

**Supervisore: Ch.mo Prof. Giovanni Battista Bartolucci**

**Dottorando: Dott. Demetre Zafiroopoulos**

*Ai miei genitori, Ariadni e Nikos*

*A mia moglie e ai miei figli, Daniela, Nicolas e Andrea*

*Ai miei preziosi amici in Grecia e in Italia*

## PREFAZIONE

La presente tesi di dottorato di ricerca riguarda la valutazione della dose assorbita da un individuo in seguito ad una sovraesposizione alla radiazione gamma utilizzando metodologie citogenetiche e curve di calibrazione dose effetto costruite su colture di linfociti umani *in vitro* per ogni metodologia utilizzata.

Nel caso di una sovraesposizione di uno o più individui alle radiazioni ionizzanti, in assenza di una dosimetria di tipo fisico, la dosimetria biologica, basata sulle metodologie citogenetiche riportate in questo lavoro di tesi, risulta l'unico strumento per una valutazione affidabile e veloce della dose assorbita. La valutazione della dose in caso d'incidente è molto importante per motivi legati alla radioprotezione ma l'affidabilità e soprattutto la velocità di risposta sulla dose assorbita, sono di grande rilevanza anche per gli interventi medici d'urgenza.

Lo studio ha raggiunto l'obiettivo dell'applicazione, dello sviluppo e del consolidamento di una combinazione assolutamente originale di diverse tecniche di analisi citogenetiche applicate nel campo della dosimetria biologica, e ha permesso la costruzione di curve di calibrazione dose-risposta per ogni metodica. Per quanto concerne l'applicazione della tecnica della condensazione prematura dei cromosomi in combinazione con l'ibridizzazione della fluorescenza *in situ* con sonde peptidiche di acido nucleico, questa è la prima volta in letteratura in cui si costruisce una curva di calibrazione.

Il lavoro di questa tesi è stato realizzato presso i Laboratori Nazionali di Legnaro (LNL) dell'Istituto Nazionale di Fisica Nucleare (INFN) con la supervisione del Prof. Giovanni Battista Bartolucci, Ordinario di Medicina del Lavoro dell'Università di Padova. La Commissione del Dottorato di Ricerca ha supervisionato e valutato, alla fine di ogni anno accademico, il lavoro della presente tesi.

Da parte mia vorrei ringraziare i LNL per tutto il sostegno che mi hanno offerto e la Commissione per la loro fiducia e per l'opportunità che mi ha dato di procedere alla realizzazione di questo lavoro.

Ringrazio molto il mio Supervisore Prof. G.B. Bartolucci per la fiducia accordatami fin dal primo momento. La sua guida scientifica e le sue preziose indicazioni sono state estremamente utili. Con la sua esperienza e conoscenza ha contribuito alla realizzazione finale di questa tesi.

Particolari ringraziamenti sono dedicati al Dr. G. Pantelias, Direttore del Laboratorio di Fisica Sanitaria del NRCS "Demokritos" di Atene, maestro instancabile durante tutto il periodo della tesi, la persona che mi ha insegnato l'applicazione di tecniche di analisi citogenetica specialistiche e originali. Vorrei anche ringraziare la Dr.ssa G. Terzoudi, ricercatrice dello stesso Laboratorio per l'aiuto durante la parte sperimentale della tesi e per la sua esperienza che molto generosamente mi ha offerto.

Ringrazio il Dott. F. Berardinelli dell'Università Roma3 per i suoi preziosi insegnamenti, indicazioni e consigli su vari argomenti di questa tesi.

I miei più calorosi ringraziamenti vanno alla Dott.ssa E. Facco, la Sig.ra M.C. Buoso e l'Ing. L. Sarchiapone, collaboratori e colleghi dei Laboratori Nazionali di Legnaro per la loro competenza e per la grande disponibilità ogni volta che ho avuto necessità del loro aiuto.

Infine, vorrei esprimere i miei personali ringraziamenti ai miei genitori per avermi permesso di studiare in Italia, a mia moglie e i miei figli per la comprensione, sostegno e soprattutto pazienza che hanno dimostrato nei miei confronti negli anni di questo ciclo di studi.

Demetre Zafirooulos

Padova, Gennaio 2015

## INDICE

I.	RIASSUNTO .....	7
II.	SUMMARY .....	10
III.	INTRODUZIONE.....	12
I.1	Necessità di ricerca e sviluppo di metodologie di tipo biologico per la valutazione di incidenti con emissione di radiazioni ionizzanti e valutazione della loro pericolosità. ....	12
I.2	Dosimetria biologica basata su metodologie citogenetiche .....	15
I.3	Dosimetria Biologica classica e l'incertezza nella valutazione della pericolosità di una sovraesposizione .....	17
I.4	Dosimetria Biologica con metodiche citogenetiche e molecolari per la valutazione della pericolosità di sovraesposizioni avvenute negli anni passati .....	25
I.5	Variazione della radiosensibilità individuale nella popolazione e necessità di individualizzare la pericolosità di una sovraesposizione.....	29
I.6	Meccanismi di radiosensibilità a livello molecolare e citogenetico .....	31
IV.	MATERIALI E METODI .....	35
II.1	Condizioni di coltura e di irraggiamento di linfociti per l'analisi di aberrazioni cromosomiche in metafase.....	35
II.2	Condizioni di coltura e di irraggiamento di linfociti per l'analisi di aberrazioni cromosomiche col metodo della condensazione prematura dei cromosomi. ....	37
II.3	Preparazione dei vetrini con i cromosomi.....	40
II.4	Individuazione di centromeri e telomeri dei cromosomi con sonde peptidiche di acido nucleico (PNA) e ibridizzazione fluorescente <i>in situ</i> (FISH) .....	43
II.5	Analisi delle aberrazioni cromosomiche in metafase utilizzando un microscopio ottico munito di fluorescenza e sistema di acquisizione delle immagini per la costruzione di curve di calibrazione .....	49
II.6	Condizioni di irraggiamento .....	56
V.	RISULTATI E DISCUSSIONE .....	58
III.1	Dosimetria Biologica delle radiazioni ionizzanti con metodologie citogenetiche classiche.....	58
III.2	Dosimetria Biologica delle radiazioni ionizzanti utilizzando l'ibridizzazione fluorescente <i>in situ</i> (FISH) con sonde Peptidiche di Acido Nucleico (PNA) .....	71
III.3	Dosimetria Biologica delle radiazioni ionizzanti con fusione di linfociti irraggiati alla fase del ciclo cellulare G <sub>0</sub> con cellule mitotiche CHO da hamster .....	85
III.4	Dosimetria Biologica delle radiazioni ionizzanti con fusione di linfociti irraggiati alla fase del ciclo cellulare G <sub>0</sub> con cellule mitotiche CHO da hamster in combinazione con FISH e sonde di tipo PNA per centromeri e telomeri. ....	90
VI.	CONCLUSIONI .....	103
VII.	ABBREVIAZIONI.....	109
VIII.	BIBLIOGRAFIA .....	110

Figura 1. Curve caratteristiche di dose-risposta per la radiazione di alto e basso L.E.T. ....	18
Figura 2. Formazione di un cromosoma dicentrico a partire da due cromosomi non replicati che si trovano nella fase G1 del ciclo cellulare. ....	19
Figura 3. Formazione di un cromosoma dicentrico a partire da due cromosomi normali.....	19
Figura 4. Formazione di un anello a partire da un cromosoma non replicato. ....	20
Figura 5. Modalità di ionizzazione per la radiazione di basso e alto LET (A) e lesioni che possono essere indotte dalla radiazione ionizzante al DNA. ....	21
Figura 6. Viene indicato un cromosoma dicentrico e il suo frammento acentrico. ....	22
Figura 7. Una metafase con 2 anelli, un cromosoma dicentrico e frammenti acentrici. ....	22
Figura 8. Tipica rappresentazione del G-banding di cromosomi umani in metafase dopo l'utilizzo di tripsina e Giemsa secondo l'International System for human Cytogenetic Nomenclature. ....	27
Figura 9. Tipica rappresentazione del G-banding di cromosomi umani in metafase dopo l'utilizzo di tripsina e Giemsa secondo l'International System for human Cytogenetic Nomenclature. ....	27
Figura 10. Cariotipo normale dei cromosomi di maschio col metodo GTG a bande. ....	28
Figura 11. Reciproca traslocazione cromosomica con partecipazione del cromosoma 1 (v. freccia).....	28
Figura 12. Rappresentazione schematica delle quattro fasi del ciclo cellulare e dei punti fondamentali di controllo tra di loro. Cellule che non si dividono (p.e. i linfociti differenziati del sangue periferico) rimangono sincronizzati nella fase G <sub>0</sub> del ciclo cellulare. ....	32
Figura 13. Separazione dei linfociti umani in Ficoll. ....	37
Figura 14. Cellule mitotiche CHO e linfociti umani come si presentano al microscopio prima e durante la fusione cellulare. ....	39
Figura 15. Rappresentazione del processo della condensazione prematura dei cromosomi (PCC). ....	40
Figura 16. Applicazione delle sonde PNA a cromosomi dei linfociti umani. ....	44
Figura 17. Rappresentazione schematica di ibridizzazione della fluorescenza in situ (FISH).....	45
Figura 18. Sopra una lampada a vapori di mercurio con il suo schema di funzionamento. Alla sua destra il suo spettro di emissione. ....	49
Figura 19. Schema semplificato del funzionamento di un microscopio a fluorescenza. ....	50
Figura 20. Microscopio Zeiss-Axiolmager Z2, PC e programma di cattura di analisi di metafasi.....	51
Figura 21. La schermata del programma nella fase di acquisizione di un'immagine in Giemsa. ....	51
Figura 22. La schermata del programma nella fase di acquisizione di un'immagine risultante dalla sovrapposizione dei singoli canali (blu, DAPI – per la cromatina, verde FITC – per i telomeri dei cromosomi, rosso, TRITC per i centromeri).....	52
Figura 23. La schermata del programma nella fase di acquisizione dell'immagine della Fig. 22 sul singolo canale blu (DAPI) per la cromatina. ....	53
Figura 24. La schermata del programma nella fase di acquisizione dell'immagine della Fig. 22 sul singolo canale verde (FITC) per i telomeri. ....	53
Figura 25. La schermata del programma nella fase di acquisizione dell'immagine della Fig. 22 sul singolo canale rosso (TRITC) per i centromeri.....	54
Figura 26. Curva dose risposta (espressa in carica elettrica) dei dosimetri a TLD utilizzati per la caratterizzazione del campo di radiazione. ....	57
Figura 27. Cromosomi normali come si presentano in metafase dopo coltura di sangue periferico non irraggiato e colorati con soluzione Giemsa. ....	58
Figura 28. Aberrazioni cromosomiche come dicentrici, anelli e frammenti senza centromero dopo l'esposizione a 4 Gy di raggi gamma (colorati con soluzione Giemsa). ....	59

Figura 29. Giemsa - Relazione dose risposta per la produzione di aberrazioni cromosomiche (dicentrici ed anelli) per cellula in seguito ad irraggiamento con raggi gamma a varie dosi. Valori medi±SD sono calcolati da tre esperimenti indipendenti.....	62
Figura 30. Curve dose risposta, separate per ogni donatore, per la produzione di aberrazioni cromosomiche (dicentrici ed anelli) per cellula in seguito ad irraggiamento con raggi gamma a varie dosi. ....	63
Figura 31. Giemsa - Curve dose-risposta con limiti di confidenza al 95% utilizzata per valutare l'incertezza sulla dose. ....	67
Figura 32. Giemsa - Curva di calibrazione dose risposta, con limiti di confidenza al 95% fino a 1 Gy di dose.....	69
Figura 33. Metafase in FISH con centromeri e telomeri colorati con sonde PNA dopo irraggiamento gamma a 3 Gy. La facilità di individuare le aberrazioni cromosomiche è immediata.....	72
Figura 34. Metafase in FISH con centromeri e telomeri colorati con sonde PNA dopo irraggiamento gamma a 5 Gy; presenza di cromosomi dicentrici, tricentrici e ad anello con centromero. ....	73
Figura 35. Metafase in Giemsa a sinistra e in FISH con centromeri e telomeri colorati con sonde PNA a destra. Il cromosoma indicato a sinistra (Giemsa) con la freccia sembra essere un dicentrico, invece in FISH si dimostra avere le cromatine incrociate e possedere un solo centromero.....	74
Figura 36. Metafase in Giemsa a sinistra e in FISH a destra con centromeri e telomeri colorati con sonde PNA. Il cromosoma indicato con la freccia in Giemsa sembra essere un dicentrico, invece in FISH è evidente che si tratta di due cromosomi distinti, come si evince dai telomeri presenti. ....	74
Figura 37. Relazione dose risposta per la produzione di aberrazioni cromosomiche per cellula in seguito ad irraggiamento con raggi gamma da <sup>60</sup> Co a varie dosi. Alle metafasi analizzate è stata applicata la tecnica FISH e i centromeri e telomeri sono stati colorati con sonde PNA. ....	76
Figura 38. Curve dose-risposta separate per ogni donatore, per la produzione di aberrazioni cromosomiche (dicentrici ed anelli) per cellula. ....	77
Figura 39. Curva di calibrazione dose-risposta, con la tecnica FISH e sonde PNA per telomeri e centromeri, con limiti di confidenza al 95% utilizzata per valutare incertezze sulla dose.....	80
Figura 40. Curva di calibrazione dose risposta, con limiti di confidenza al 95% fino a 1 Gy di dose.....	81
Figura 41. Curve di calibrazione dose risposta costruite con la colorazione in Giemsa e la tecnica FISH con le sonde PNA. I punti sono valori medi±SD ottenuti da tre esperimenti (donatori) indipendenti; sono altresì riportate le equazioni delle curve.....	84
Figura 42. Linfociti umani non irraggiati fusi con cellule mitotiche CHO di hamster.....	86
Figura 43. Linfociti umani irraggiati a 6 Gy con raggi gamma e fusi con cellule mitotiche CHO di hamster. Si contano cromosomi e frammenti con un semplice click del mouse e si individua l'eccesso rispetto al numero 46.....	86
Figura 44. Numero di frammenti per cellula in linfociti prematuramente condensati con la tecnica della PCC nella fase G <sub>0</sub> del ciclo cellulare in funzione della dose, fusi immediatamente dopo l'irraggiamento con raggi gamma da sorgente di <sup>60</sup> Co. ....	87
Figura 45. Numero di frammenti per cellula in linfociti prematuramente condensati con la tecnica della PCC nella fase G <sub>0</sub> del ciclo cellulare in funzione della dose, fusi dopo 24 ore dall'irraggiamento con raggi gamma da sorgente di <sup>60</sup> Co. ....	89
Figura 46. Linfociti umani irraggiati con raggi gamma a 4 Gy e fusi con cellule CHO. Tecniche applicate PCC e FISH con colorazione dei telomeri (verde) e centromeri (rosso) con sonde PNA. Sono indicate alcune caratteristiche aberrazioni cromosomiche riscontrate e la presenza delle cellule CHO.....	91
Figura 47. Linfociti umani irraggiati con raggi gamma a 8 Gy e fusi con cellule CHO. Tecniche applicate PCC e FISH con colorazione dei telomeri (verde) e centromeri (rosso) con sonde PNA. Sono indicate alcune caratteristiche aberrazioni cromosomiche riscontrate. ....	92

Figura 48. Viene riportata l'immagine della Fig. 47 per il singolo canale blu (DAPI) che evidenzia la presenza della sola cromatina. ....	92
Figura 49. Viene riportata l'immagine della Fig. 47 per il singolo canale verde (FITC) che evidenzia la presenza dei soli telomeri. Notare l'assenza di telomeri nei rings e negli a_rings. ....	93
Figura 50. Viene riportata l'immagine della Fig. 47 per il singolo canale rosso (TRITC) che evidenzia la presenza dei soli centromeri. Notare l'assenza di centromero negli a_rings. ....	93
Figura 51. Numero di aberrazioni cromosomiche per cellula in linfociti prematuramente condensati con la tecnica della PCC, FISH e sonde PNA. La fusione è avvenuta dopo 10 ore dall'irraggiamento con raggi gamma da sorgente di <sup>60</sup> Co. ....	96
Figura 52. Numero di aberrazioni cromosomiche per cellula in linfociti prematuramente condensati con la tecnica della PCC, applicazione della FISH con sonde PNA. La fusione è avvenuta dopo 24 ore dall'irraggiamento con raggi gamma da sorgente di <sup>60</sup> Co. I punti sono valori medi±SD secondo tre esperimenti (donatori) indipendenti. ....	98
Figura 53. Numero di aberrazioni cromosomiche per cellula in linfociti prematuramente condensati con la tecnica della PCC, applicazione della FISH con sonde PNA. La fusione è avvenuta a 10 e a 24 ore dall'irraggiamento con raggi gamma da sorgente di <sup>60</sup> Co. I punti sono valori medi±SD secondo tre esperimenti (donatori) indipendenti. ....	99
Figura 54. Curva di calibrazione dose-risposta, con la tecnica PCC, FISH e sonde PNA per telomeri e centromeri, con limiti di confidenza al 95% utilizzata per valutare incertezze sulla dose. ....	100
Figura 55. Confronto tra le curve di calibrazione dose-risposta ottenute con metodologie classiche (Giemsa), utilizzando FISH con sonde PNA e PCC con FISH e sonde PNA per la colorazione di telomeri e centromeri. ....	102

## I. RIASSUNTO

Per valutare il rischio di danno biologico di un individuo dopo una sovraesposizione alle radiazioni ionizzanti, un incidente o un'azione terroristica che coinvolge le radiazioni è indispensabile valutare la dose assorbita dalla persona esposta. La valutazione della dose assorbita e quindi della pericolosità di una sovraesposizione utilizzando metodologie di tipo biodosimetrico tramite curve di riferimento, presuppone che gli individui della popolazione presentino la stessa sensibilità alle radiazioni ionizzanti. Presuppone cioè che una determinata dose di radiazioni della stessa qualità produca lo stesso numero di aberrazioni cromosomiche a tutti i membri della popolazione. E' anche noto che tra i membri della popolazione esiste una variabilità nella radiosensibilità e che esistono persone particolarmente radiosensibili.

Argomento di questa tesi di dottorato è l'applicazione di varie metodiche citogenetiche per individuare aberrazioni cromosomiche non stabili, cromosomi dicentrici ed anelli con centromero nei linfociti T del sangue periferico (PBL) umano, formati in seguito ad esposizione a radiazioni ionizzanti da sorgente gamma emittente, nonché la costruzione di curve di calibrazione dose-effetto che possono, in caso di sovraesposizione, dare una risposta rapida ed affidabile sulla dose assorbita. La valutazione di tale dose, in caso di incidente, è di fondamentale importanza per la radioprotezione dei lavoratori che operano con radiazioni ionizzanti e, in caso di esposizione, per la popolazione. Di grande rilevanza è anche l'affidabilità e il tempo in cui tale valutazione è ottenuta soprattutto per gli interventi medici di urgenza.

Si è proceduto quindi allo sviluppo, consolidamento e applicazione nel campo della dosimetria biologica di metodologie originali, sensibili e affidabili di analisi citogenetica delle aberrazioni cromosomiche (AC) per la valutazione della dose ricevuta da un individuo dopo una sovraesposizione alle radiazioni ionizzanti.



Oltre all'applicazione classica della colorazione delle AC con la soluzione in Giemsa, quanto sopra riportato ha riguardato:

- sviluppo, consolidamento e applicazione di metodiche originali di dosimetria biologica utilizzando la tecnica dell'ibridizzazione fluorescente *in situ* (FISH), con sonde peptidiche di acido nucleico (PNA) che colorano i telomeri e il centromero dei cromosomi;
- sviluppo e applicazione della metodica della condensazione prematura dei cromosomi (PCC);
- sviluppo di una metodica veloce, sensibile ed affidabile, assolutamente originale nel campo della dosimetria biologica, per valutare in poche ore la dose ricevuta da un individuo, ottenuta combinando la metodica della PCC e la tecnica FISH che include sonde peptidiche di acido nucleico (PNA).

Con l'applicazione delle varie metodiche si è proceduto alla costruzione di apposite curve di calibrazione ove le aberrazioni cromosomiche riscontrate per cellula (esperimenti *in vitro*) sono riportate in funzione della dose gamma. Sono stati utilizzati i linfociti di tre donatori sani di età tra i 30 e i 50 anni. L'irraggiamento *in vitro* è stato effettuato presso i Laboratori Nazionali di Legnaro dell'INFN utilizzando una sorgente gamma (gamma beam) di  $^{60}\text{Co}$  con rateo di dose di 0,5 Gy/min. L'intervallo di dose, per creare le curve di calibrazione, è stato tra i 0,3 Gy e gli 8 Gy.

Sono state analizzate in totale circa 12.500 cellule in metafase e interfase, con l'utilizzo di un microscopio ottico munito di fluorescenza; l'irraggiamento con raggi gamma produce nei cromosomi (dicentrici ed anelli) una distribuzione del danno di tipo Poissoniano (Edwards, 1979). Ogni curva lineare quadratica di dose-effetto è stata costruita analizzando un minimo di 500 metafasi o riscontrando 100 aberrazioni per dose (IAEA, Cytogenetic Dosimetry, 2011). Si è proceduto quindi a controllare, attraverso la verifica del test statistico u-test, che la distribuzione delle aberrazioni nelle metafasi soddisfacesse tale distribuzione per ogni dose utilizzata per

costruire le curve di calibrazione; inoltre è stata verificata la corrispondenza del fit con il modello lineare quadratico  $f = y_0 + \alpha D + \beta D^2$  utilizzando il software SigmaPlot versione 13.0 e sono stati calcolati i coefficienti del modello con i rispettivi errori standard e i valori di p value (livello di significatività assegnato, ossia una misura di evidenza contro l'ipotesi nulla) ottenendo delle stime sulla dose. Quindi, sono state costruite per ogni metodica le curve di calibrazione con limite di confidenza al 95% per stimare l'incertezza sulla dose ricevuta una volta noto il numero di aberrazioni per cellula. Le curve di calibrazione ottenute con le varie metodiche sono confrontate tra loro e discussi i vantaggi delle metodiche utilizzate.

Sono state applicate diverse metodologie di dosimetria biologica e sono state costruite curve di calibrazione per ogni metodica. L'equazione per ogni curva è in grado di fornire una valutazione della dose assorbita dall'individuo in caso di esposizione accidentale alle radiazioni ionizzanti. L'applicazione, in dosimetria biologica, della tecnica della Condensazione Prematura dei Cromosomi (PCC) in combinazione con la tecnica dell'ibridizzazione fluorescente *in situ* (FISH) e le sonde Peptidiche di Acido Nucleico (PNA) è assolutamente originale e pochi Laboratori al mondo la applicano in questo momento. La metodica offre grandi vantaggi di rapidità, accuratezza e sensibilità quando confrontata con quelle convenzionali.

## II. SUMMARY

The assessment of the risk for biological damage of an individual after overexposure to ionizing radiation due to an accident or a terroristic attack passes through the evaluation of the absorbed dose received from the person/s involved. This evaluation, corresponding also to how dangerous the overexposure is, using methodologies typical of the biological dosimetry, is done with the help of reference calibration curves and it presumes that all individuals exposed have the same individual radiosensitivity, which is true when the biological system into account are human lymphocytes of the peripheral blood (PBL). It supposes that a certain dose of radiation produces the same quantity of variation (chromosomal aberrations) in that biological system in all the exposed.

The goal of this Ph.D. thesis is the application of various cytogenetic methodologies to detect in a reliable and possibly fast way chromosomal aberrations non stable (dicentric and centromeric rings) in the lymphocytes of the human peripheral blood after gamma irradiation and the construction of calibration curves dose effect able to give rapidly a response of the absorbed dose in case of radiation accident. The time needed to give a reliable response on the absorbed dose is crucial and this is especially true in radiation emergency medicine.

The objective was to standardize, develop and apply sophisticate, sensitive and reliable methodologies for the estimation of the absorbed doses after accidental gamma radiation overexposures for radiation protection purposes.

Specifically, in the present study the following were performed:

- I. Application of the classic “golden standard” methodology of biological dosimetry which provides stimulation of the lymphocytes and Giemsa staining of the chromosomes at mitosis

- II. Development, consolidation and application of original methodologies in biological dosimetry using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and peptide nucleic acid (PNA) probes for painting specifically chromosome telomers and centromeres
- III. Application and consolidation of the method of premature chromosome condensation (PCC) where no stimulation at lymphocytes is needed
- IV. Development of a fast, sensitive and reliable methodology, absolutely original in the field of biological dosimetry for dose evaluation combining the PCC method with the FISH using PNA probes for centromeres and telomers
- V. Construction for all the above methodologies, using *in vitro* experiments, of calibration curves dose-effect where unstable chromosomal aberrations were plotted against gamma dose given.

The dose interval investigated was between 0.3 Gy and 8 Gy; more than 12.500 slides with metaphases and interphases were scored using Microscopic analysis of chromosome aberrations. Dose effect curves are linear quadratic and for their construction a minimum of 500 cells or 100 dicentrics per dose were analysed. The Poisson distribution of the chromosomal aberrations was tested for every dose and the coefficients  $\alpha$  and  $\beta$  of the linear quadratic equation, their errors and p value were calculated.

Finally, all calibration curves obtained with the different methodologies were compared and the advantages of each methodology reported.

### **III. INTRODUZIONE**

#### **I.1 Necessità di ricerca e sviluppo di metodologie di tipo biologico per la valutazione di incidenti con emissione di radiazioni ionizzanti e valutazione della loro pericolosità.**

Nella maggioranza degli incidenti con radiazioni ionizzanti l'informazione sulla dose assorbita dall'individuo è raramente disponibile. In queste situazioni la dosimetria biologica può avere un ruolo molto importante nella valutazione della dose assorbita. Questo tipo di dosimetria è basata sulla stima delle variazioni di un sistema biologico risultante dall'esposizione alle radiazioni ionizzanti.

Nonostante tutti gli sforzi e la necessità di avere un dosimetro biologico, in particolare per le basse dosi, il suo sviluppo è stato ostacolato dalla mancanza di metodi analitici adeguati capaci di utilizzare pienamente l'informazione proveniente da individui esposti.

In particolare, un dosimetro biologico si riferisce a un substrato o sistema, presente nei fluidi corporei, il quale risponde direttamente, per esposizioni continue alle radiazioni sull'intero corpo o per esposizioni parziali, sia alle basse dosi sia ai bassi ratei di dose. I fluidi corporei come il sangue, hanno il vantaggio di essere facilmente prelevabili, anche in serie, senza provocare nessun danno o disagio all'individuo esposto.

In linea teorica, un dosimetro biologico dovrebbe riscontrare le seguenti caratteristiche:

- 1) la sua risposta deve essere dipendente dalla dose di radiazioni ricevuta su un sufficientemente ampio intervallo di dosi, e specifica per il tipo di radiazione a cui è stato esposto;
- 2) deve avere un grado sufficiente di sensibilità, capace di distinguere su base biologica risposte tra 0,1 Gy e 1 Gy;

- 3) il substrato scelto deve essere presente su tutto il corpo in modo tale che, anche in presenza di esposizione parziale, esso possa rispondere adeguatamente alla dose assorbita;
- 4) deve avere “memoria”: è necessario che la risposta del substrato alla radiazione rimanga per un periodo di tempo prolungato in modo da permettere la valutazione della dose ricevuta e quindi del danno subito dopo l'esposizione;
- 5) il procurarsi dei campioni per l'analisi deve essere innocuo, semplice e la procedura dosimetrica sufficientemente semplice in modo tale da poter essere utilizzata di routine nella pratica della fisica sanitaria e della radioprotezione.

Nella ricerca per un dosimetro biologico sono state considerate procedure basate su variazioni di processi metabolici, ematologici o genetici come ad esempio gli indicatori biochimici, il conteggio di linfociti e la presenza di aberrazioni cromosomiche (IAEA, ed. M. Skalka, 1971).

Le radiazioni ionizzanti possono alterare tutti i tipi di cellule in vari modi provocando diversi gradi di danno. Tuttavia, le dosi necessarie a produrre lo stesso effetto in diversi tipi di cellule sono molto differenti. Il deposito di energia delle radiazioni ionizzanti, necessario a provocare un fenomeno di ionizzazione, è di circa 20-30 eV. Tenuto conto che i legami chimici dei composti organici possono rompersi con l'assorbimento di un'energia pari a 1-2 eV, si conclude che qualsiasi struttura biologica può di fatto subire delle alterazioni di qualche entità, almeno in modo temporaneo. Malgrado ciò, anche dopo l'esposizione a dosi mortali su corpo intero (> 5Gy), la variazione energetica totale che può essere misurata (variazione chimica totale misurabile) è molto piccola. Le macromolecole presenti nella struttura cellulare, come enzimi e proteine, sono numerose e rappresentano larghe riserve di capacità funzionali. Da quanto sopra riportato, la ricerca di un dosimetro biologico è stata rivolta a cellule particolarmente radiosensibili e bersagli come strutture cellulari che sono insostituibili o che, se danneggiate, riparano il danno in modo imperfetto. Esempi ben conosciuti sono i cromosomi e le molecole di DNA coinvolte nella regolazione e nella divisione

cellulare. Gran parte del lavoro sperimentale nella ricerca di un dosimetro biologico affidabile è stato rivolto allo studio del danno cromosomico, in particolare nei linfociti del sangue periferico. È stato provato che i linfociti costituiscono il sistema più appropriato, tra le cellule del sangue, per la dosimetria biologica (Evans, 1978).

I motivi della scelta dei linfociti come dosimetro biologico sono quattro:

- a) i linfociti sono estremamente radiosensibili;
- b) sono distribuiti in tutti i tessuti del corpo umano, sono presenti in ogni esposizione e possono essere facilmente estratti dal sangue periferico (1 ml di sangue può contenere  $1-3 \times 10^6$  linfociti). Di conseguenza i linfociti possono essere utilizzati come indicatori anche nei casi di irraggiamento parziale;
- c) sono cellule differenziate, sincronizzate nella fase  $G_0$  e alcuni di questi linfociti vivono per molti anni. Nelle persone sane, solo raramente sono coinvolti nella proliferazione mitotica e quindi le aberrazioni cromosomiche si accumulano col risultato che può essere effettuata una loro analisi anche dopo molto tempo dall'incidente;
- d) il numero di aberrazioni cromosomiche di interesse presente nei linfociti (dicentrici o configurazioni multicentriche per dosi alte) dipende dalla dose ricevuta e la loro distribuzione nelle cellule segue la distribuzione di Poisson.

La dosimetria biologica riveste un ruolo importante sia in radioprotezione sia nel trattamento medico delle persone accidentalmente esposte alle radiazioni. È molto rilevante in fase diagnostica, nello stabilire la prognosi per le cure successive necessarie. In casi di sospetta sovraesposizione, in assenza di un dato di dosimetria fisica o in presenza di un dato non realistico, l'analisi di aberrazioni cromosomiche (CAA) nei linfociti del sangue periferico fornisce un'informazione molto utile. In molti casi ove i dosimetri fisici sono stati esposti alle radiazioni senza essere stati indossati dal personale, la dosimetria biologica dà al lavoratore l'assicurazione desiderata di non esposizione e

mantiene la sua importanza di tipo medico legale. La tecnica del CAA può fornire informazioni anche sulla distribuzione della dose, se si tratta di un irraggiamento su corpo intero o una esposizione parziale.

Nell'investigare gli incidenti da radiazioni ionizzanti è importante valutare la dose assorbita dalle persone per vari motivi. Nel caso di esposizioni acute ove la dose assorbita è alta ( $>1$  Gy), tale informazione permette di pianificare la terapia e di avvisare i fisici di probabili conseguenze deterministiche sulla salute dell'esposto (danno ai tessuti) che potrebbero manifestarsi nelle settimane o nei mesi successivi. Per esposizioni inferiori a quel livello, che però richiedono un trattamento medico, il dato dosimetrico è importante per il radioprotezionista al fine di informare adeguatamente la persona sul rischio che si presentino malattie stocastiche tardive (p.e. tumori). Altri sintomi che possono manifestarsi subito dopo un'esposizione a corpo intero, potrebbero servire per una valutazione della dose ma non possono essere considerati come un metodo strettamente dosimetrico.

Quindi, come già sopra riportato, benché siano stati identificati anche altri indicatori biologici da utilizzare come dosimetro, i cambiamenti citogenetici nei linfociti del sangue periferico sono a tutt'oggi l'indicatore più credibile di una dose assorbita.

## **I.2 Dosimetria biologica basata su metodologie citogenetiche**

Il metodo attualmente più utilizzato per stimare il danno da radiazioni in persone accidentalmente esposte, è l'analisi delle aberrazioni cromosomiche nei linfociti. La procedura standard richiede l'utilizzo di un'esigua quantità di sangue (0,3-0,4 ml) al quale viene aggiunto un agente mitogeno (0,15 ml di fitoemoagglutinina – PHA) e 5 ml di terreno di coltura. Il tutto contenuto in una provetta da 15 ml che viene posta in incubatore per 48 ore a  $37^{\circ}\text{C}$  e 5% di  $\text{CO}_2$ . I linfociti T, stimolati dal PHA, sono le cellule che andando in mitosi permettono di rendere visibili i cromosomi durante la metafase. I linfociti si bloccano in metafase con l'aggiunta di colcemide tre



ore prima della raccolta delle cellule. I linfociti vanno in seguito fissati con metanolo e acido acetico (3:1), versati con caduta a goccia su vetrini umidi da microscopio, lasciati asciugare all'aria e colorati con Giemsa. Le metafasi vanno infine analizzate con l'ausilio di un microscopio ottico. Le anomalie cromosomiche devono essere contate e le aberrazioni devono essere correlate (dicentrici ed anelli) alla dose ricevuta.

A dosi di radiazioni molto basse le aberrazioni cromosomiche, e in particolare i dicentrici, sono raramente indotte e questo costituisce la maggiore limitazione di tale metodica.

Ci sono almeno tre motivi che spiegano perché dosi molto basse non possono essere rivelate: il primo è legato al fatto che il DNA danneggiato potrebbe essere riparato attraverso processi cellulari normali di riparazione durante le 48 ore necessarie per i linfociti per procedere alla mitosi. E' stato ipotizzato che i linfociti non stimolati sono suscettibili a morte intermitotica senza una significativa riparazione intracellulare e che la riparazione dei linfociti avviene solo dopo la loro stimolazione con agenti mitogeni (Sasaki M.S. 1978). Il secondo motivo è che le cellule che hanno subito un danno cromosomico eccessivo potrebbero non sopravvivere per andare in mitosi. E' stato già dimostrato sperimentalmente che le cellule danneggiate sono accumulate nella fase G2 del ciclo cellulare (Hittelman 1975, Hieber 1983) e quindi, analizzando i linfociti in metafase, una grande quantità di informazioni sull'entità del danno viene perduta (Waldren 1974). Il terzo motivo è legato alla metodica in quanto solo i linfociti T sono stimolati con la PHA e quindi i linfociti B, che risultano più radiosensibili (Prosser J.S. 1976), non possono essere analizzati.

Considerate le problematiche sopra esposte, si possono suggerire tre diversi approcci: 1) inibire in qualche modo il meccanismo di riparazione per far apparire il danno in metafase come aberrazioni cromosomiche, 2) misurare la stessa riparazione e utilizzarla come indicatore dell'estensione del danno cellulare, 3) cercare il danno nell'interfase cioè prima della riparazione del danno o prima che la cellula raggiunga la mitosi o prima che muoia. In questa tesi ci soffermeremo nel terzo approccio utilizzando, per raggiungere il nostro scopo, il metodo della

condensazione prematura dei cromosomi (PCC). Anziché utilizzare i linfociti stimolati per analizzare in metafase i loro cromosomi, si procede inducendo la cromatina in interfase a condensare in modo prematuro col risultato di avere l'opportunità di valutare il danno cromosomico nei linfociti in interfase prima che essi abbiano intrapreso la strada della mitosi.

### **I.3 Dosimetria Biologica classica e l'incertezza nella valutazione della pericolosità di una sovraesposizione**

La metodologia di dosimetria biologica, sviluppata durante gli anni 60, si basa sulla ricerca di aberrazioni cromosomiche nei linfociti del sangue periferico ed è utilizzata su larga scala per la valutazione della dose di personale sovraesposto alle radiazioni ionizzanti (Bender, 1962). La metodologia citogenetica classica prevede la coltura dei suddetti linfociti in presenza di elementi mitogeni in modo tale che le cellule proseguano il loro ciclo cellulare e si renda possibile l'analisi delle aberrazioni cromosomiche nella metafase, come anelli con centromero e cromosomi dicentrici (IAEA, Cytogenetic Dosimetry, 2011). Nelle persone non esposte alle radiazioni la presenza di cromosomi dicentrici è molto rara. E' riportato che si può trovare un dicentrico ogni 1000 cellule analizzate (Edwards, 1997).

I cromosomi dicentrici, che si presentano con una frequenza 10 volte superiore agli anelli, si accompagnano, di norma, a frammenti cromosomici, l'esistenza dei quali diventa un criterio per il loro conteggio e la frequenza della loro presenza è funzione della dose assorbita. Utilizzando tali aberrazioni come indice dell'esposizione, la dose assorbita si determina attraverso curve di calibrazione le quali vengono costruite in seguito all'irraggiamento *in vitro* di sangue periferico. Queste curve di calibrazione, per la radiazione a basso L.E.T. (Linear Energy Transfer), come i raggi gamma, sono del tipo lineare quadratico:

$$f = y_0 + \alpha D + \beta D^2$$

Ove:

$f$  è il numero dei dicentrici riscontrati per cellula,  $D$  è la dose assorbita di radiazione espressa in Gray,  $y_0$  è la frequenza di riscontro nel fondo (cellule non irradiate) e  $\alpha$  e  $\beta$  sono coefficienti che dipendono dal tipo di radiazione utilizzata e vengono dati da apposite tabelle (Edwards et al. 1994). In particolare  $\alpha$  è il coefficiente lineare della curva e  $\beta$  il coefficiente quadratico della dose.

Le fonti di errore nella stima di dose potrebbero scaturire da due aspetti che vanno tenuti in considerazione. Il primo riguarda l'errore che potrebbe nascere dalla distribuzione di Poisson dei dicentrici, e il secondo riguarda l'errore della curva di calibrazione che nascerebbe da una variazione individuale nella risposta. In generale, l'errore dovuto alla calibrazione è dell'ordine del 10% e non si discosta in modo significativo variando il livello della dose.

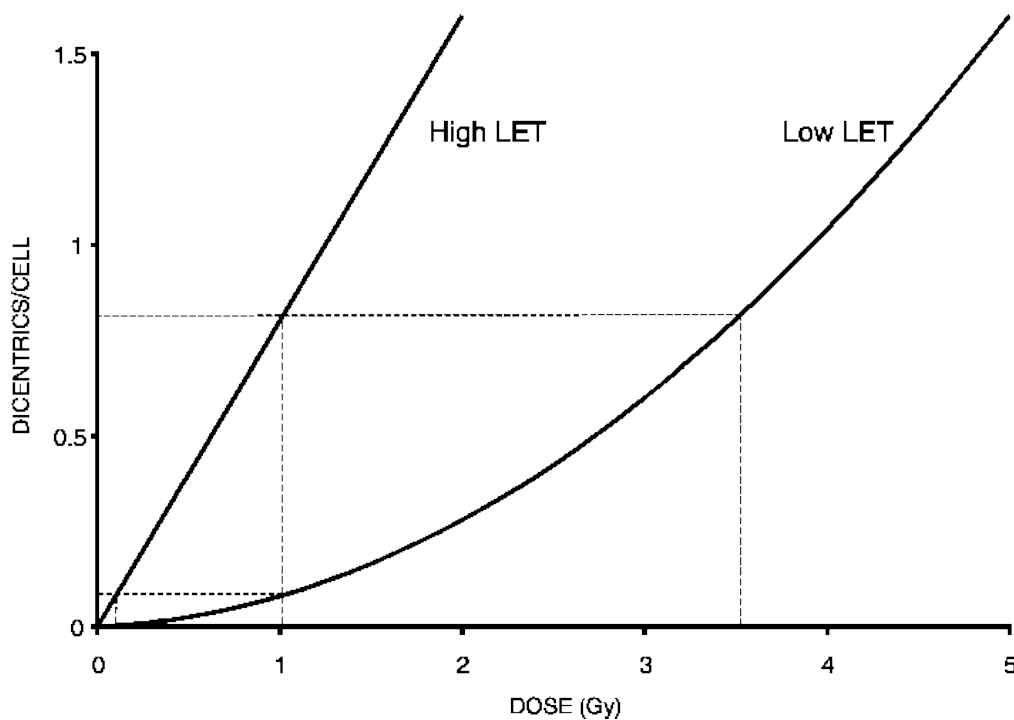


Figura 1. Curve caratteristiche di dose-risposta per la radiazione di alto e basso L.E.T.

La figura 1 mostra tipici comportamenti dose-risposta (dicentrici per cellula) per irraggiamenti di basso e alto LET (neutroni e particelle alfa-nuclei di elio). Il rapporto  $\alpha/\beta$

rappresenta quella dose alla quale i componenti lineare e quadratico contribuiscono ugualmente alla formazione dei dicentrici.

Per capire i motivi per i quali le due curve si presentano in questa forma si deve necessariamente spiegare come si ottiene un cromosoma dicentrico (Fig.2 e Fig.3) o un anello (Fig.4). Il passaggio della radiazione produce un danno al DNA della cellula e quando questo danno coinvolge due cromosomi non replicati producendo uno scambio tra i cromosomi danneggiati, allora si forma un cromosoma dicentrico.

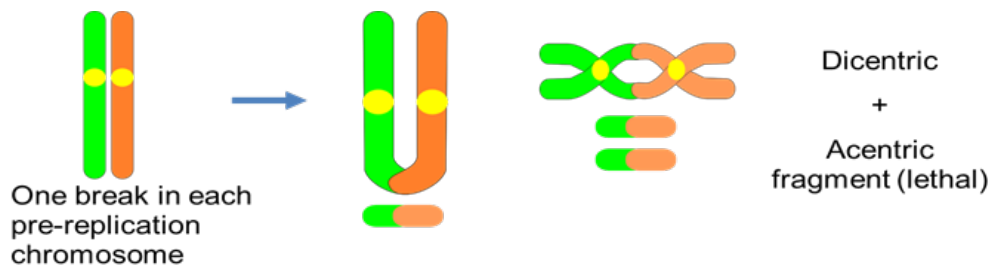


Figura 2. Formazione di un cromosoma dicentrico a partire da due cromosomi non replicati che si trovano nella fase G1 del ciclo cellulare.

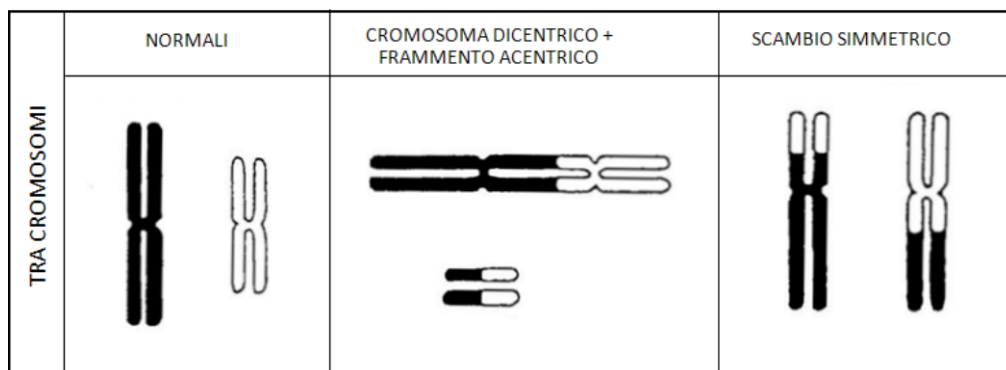


Figura 3. Formazione di un cromosoma dicentrico a partire da due cromosomi normali.

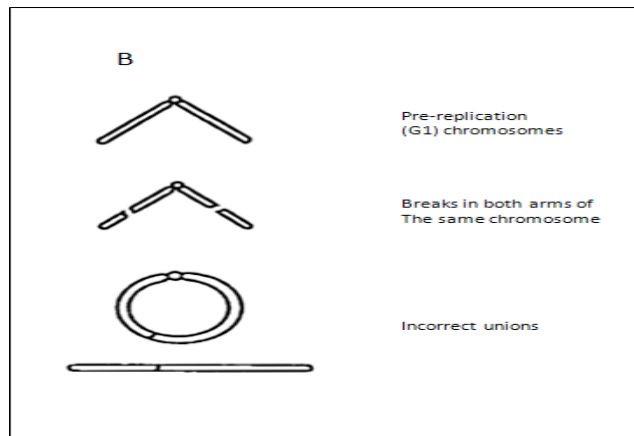


Figura 4. Formazione di un anello a partire da un cromosoma non replicato.

Questo scambio può avvenire a causa di una cattiva riparazione della rottura del DNA a causa della radiazione. Il tutto avviene in uno spazio molto ristretto, dell'ordine del micron di diametro, e le due lesioni dei cromosomi devono essere molto vicine (area di target) perché avvenga la cattiva riparazione. Ora, la radiazione a basso LET (raggi X e gamma) ha basse frequenze di ionizzazione per unità di percorso e quindi, la probabilità di avere due eventi ionizzanti nell'area bersaglio dovuti a una singola traccia, è molto bassa. Per produrre un danno in due cromosomi che sono coinvolti nella formazione di un dicentrico sono necessari almeno due eventi ionizzanti. Esiste una maggiore probabilità che le due lesioni possano essere prodotte da ionizzazione di due tracce indipendenti. Quindi i dicentrici prodotti da un'unica traccia avranno una frequenza proporzionale alla funzione lineare della dose, mentre i dicentrici prodotti da due tracce avranno una frequenza proporzionale al quadrato della dose. A dosi inferiori a 0,5 Gy, la probabilità che due tracce attraversino l'area target è piuttosto bassa e quindi i dicentrici prodotti saranno quasi esclusivamente generati da una sola traccia a bassa frequenza. Se la dose aumenta, il contributo a indurre dicentrici da due tracce aumenterà a sua volta. Di conseguenza, la curva dose-risposta per radiazioni di basso LET a produrre dicentrici sarà una combinazione di eventi prodotti da uno o due tracce, col primo più probabile e frequente a basse dosi e il secondo molto più frequente ad alte dosi.

La situazione è diversa per la radiazione di alto LET (neutroni o nuclei pesanti) in quanto una singola traccia può produrre le due lesioni (v. Fig 5) che portano ad un cromosoma dicentrico. Diminuendo la dose non si altera la produzione dei dicentrici perché la riparazione delle lesioni durante esposizioni più lunghe non è un fattore che possa influenzare la loro produzione (tutte e due le lesioni sono prodotte contemporaneamente da una singola traccia).

Da quanto sopra discusso diventa chiaro che la forma delle curve dose-risposta in dosimetria biologica dipende dal LET e quindi dalla qualità della radiazione. La radiazione che verrà considerata in questa tesi di dottorato sarà quella di basso LET e quindi la radiazione fotonica, in particolare quella gamma. Questa scelta è determinata dal fatto che, durante un incidente nucleare o azione terroristica, la radiazione emessa in ambiente è prevalentemente radiazione gamma.

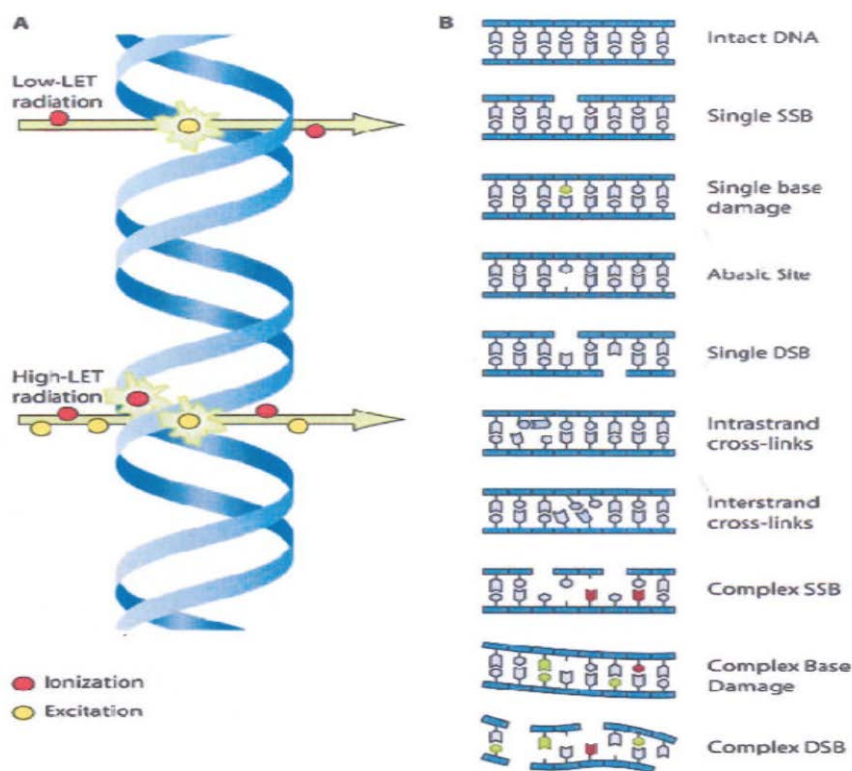


Figura 5. Modalità di ionizzazione per la radiazione di basso e alto LET (A) e lesioni che possono essere indotte dalla radiazione ionizzante al DNA.

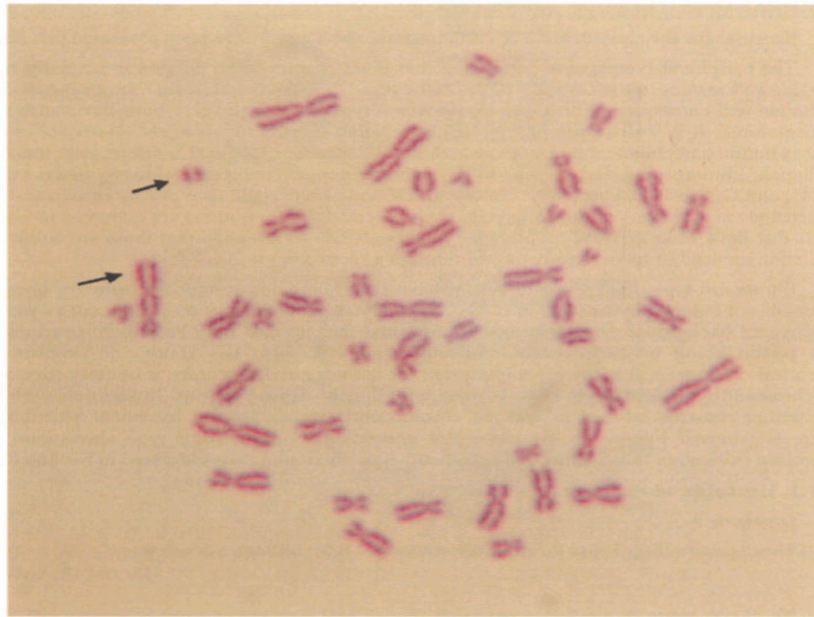


Figura 6. Viene indicato un cromosoma dicentrico e il suo frammento acentrico.

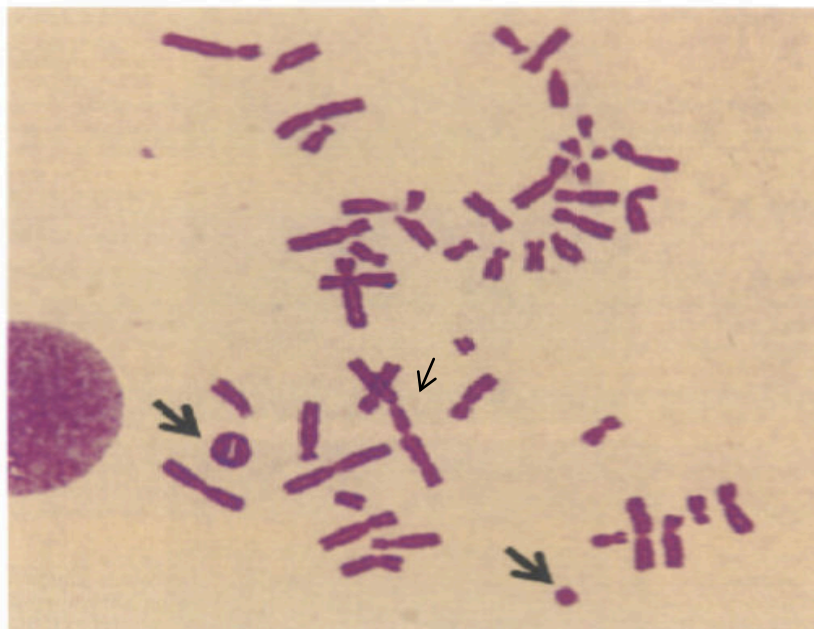


Figura 7. Una metafase con 2 anelli, un cromosoma dicentrico e frammenti acentrici.

I cromosomi dicentrici prodotti dall'irraggiamento, sui quali si basa questa classica metodologia di dosimetria biologica, sono per loro natura instabili. Questo è dovuto al breve tempo di vita dei linfociti del sangue periferico e alla loro sostituzione dopo la moltiplicazione di cellule prevalentemente del midollo osseo. Queste nuove cellule non portano più aberrazioni incompatibili con la divisione cellulare. Il tempo di emivita dei linfociti viene considerato pari a 3 anni (Lloyd et al., 1980) anche se, in casi di radioterapia con alte dosi, si è riscontrato che è molto inferiore (Bauchinger et al., 1989). E' evidente che la credibilità del metodo diminuisce con l'aumentare del tempo trascorso dal momento dell'esposizione. In più è necessario un tempo pari a 48 ore circa per la coltura cellulare e un tempo sufficiente per l'analisi. Quindi, il metodo della dosimetria biologica che si basa sulle aberrazioni cromosomiche instabili (dicentrici), non è idoneo a valutare la dose assorbita se è passato molto tempo tra l'esposizione e il prelievo di sangue.

Per determinare la dose assorbita in tempi più brevi può essere utilizzato il metodo della condensazione prematura dei cromosomi (Premature Chromosome Condensation - PCC). La metodica prevede la fusione di cellule in interfase con cellule mitotiche ospiti. In generale, i cromosomi nelle cellule eucariotiche sono visibili solo per un breve periodo durante il ciclo cellulare e cioè durante la mitosi. La tecnica della fusione cellulare indotta da sostanze chimiche ci permette di visualizzare i cromosomi anche in cellule in interfase. Quando le cellule in interfase vengono fuse con cellule in mitosi, i nuclei delle cellule in interfase, influenzati dai fattori mitogeni presenti nel citoplasma delle cellule mitotiche, subiscono la condensazione della loro cromatina alla quale segue rapidamente la dissoluzione della membrana nucleare e un'ulteriore condensazione della cromatina fino alla formazione di cromosomi separati (Rao 1970). La morfologia dei cromosomi prematuramente condensati riflette la posizione della cellula in interfase nel ciclo cellulare al momento della fusione, p.e. cromatidi singole e lunghe per la fase G<sub>1</sub>, cromatidi doppie e lunghe per la fase G<sub>2</sub> e regioni con cromosomi polverizzati per la fase S (Terzoudi 2011).



In passato questo metodo è stato utilizzato in combinazione con la colorazione dei centromeri con  $\text{Ba(OH)}_2$  (C-banded PCCs) (Pantelias, et al. 1993). La metodica offre grandi vantaggi come la diretta analisi delle aberrazioni cromosomiche in cromosomi di linfociti del sangue periferico (sia T che B). E' inoltre rapida perchè evita la coltura delle 48 ore e ogni complicazione derivante dalla coltura di sangue periferico. E' applicabile a dosi alte (in quanto le cellule non devono arrivare alla mitosi) a tutti i tipi di cellule (non necessita una coltura preliminare) e riesce ad essere utile per una valutazione della dose in presenza di dosi parziali e non solo per esposizioni su corpo intero (si può applicare anche alle cellule della pelle). Di conseguenza, tale metodica può essere utilizzata come dosimetro biologico una volta costruite *in vitro* le curve di calibrazione dose-risposta. Risulta evidente che la tecnica della PCC può essere applicata immediatamente e a tempi variabili post irraggiamento per studiare *in vitro* la cinetica della formazione delle aberrazioni e la loro riparazione a varie dosi di radiazione in linfociti non stimolati del sangue periferico umano.

In particolare con questa metodica l'informazione sull'esposizione può essere acquisita a distanza di 3-4 ore dal ricevimento del sangue. Il fatto che la PCC non necessiti di divisione delle cellule evita artefatti associati alla stimolazione post irraggiamento nonché il proseguimento del ciclo cellulare, eventi che potrebbero interferire con l'analisi. Anche per incidenti che coinvolgono dosi superiori ai 5 Gy, le cellule possono tranquillamente andare in condensazione, ma potrebbero, nel caso della tecnica tradizionale, non raggiungere la metafase. La tecnica della PCC è particolarmente utile per questo tipo di situazioni. Malgrado la sua rapidità di analisi, solo pochi Laboratori la applicano nel mondo. La metodica necessita ancora di approfondimenti per meglio comprendere i fattori che influenzano il processo della condensazione in modo tale da ottenere risultati riproducibili e una distribuzione adeguata dei cromosomi sul vetrino. Pertanto questa tecnica rimane delicata e sofisticata e comunque si basa su aberrazioni cromosomiche instabili e quindi è influenzata dalla loro diminuzione col passare del tempo dall'esposizione.

La conseguenza di quanto sopra descritto è l'incertezza sulla valutazione della pericolosità di una sovraesposizione alle radiazioni ionizzanti, poiché le metodologie classiche utilizzate oggi su larga scala per la valutazione della dose si basano:

- 1) sulla rivelazione di aberrazioni cromosomiche instabili (dicentrici ed anelli)
- 2) sull'aumento della frequenza di malattie neoplastiche sulla base di studi che si riferiscono ad alte dosi e alti ratei di dose di radiazioni
- 3) sull'assunzione dell'extrapolazione lineare delle conseguenze da alte dosi a basse dosi senza che si siano ancora definiti i meccanismi di azione e di pericolosità delle basse dosi
- 4) sull'assunzione che tutti i membri della popolazione presentino la stessa sensibilità alle radiazioni ionizzanti.

#### **I.4 Dosimetria Biologica con metodiche citogenetiche e molecolari per la valutazione della pericolosità di sovraesposizioni avvenute negli anni passati**

In seguito a quanto sopra riportato, è evidente che l'esistenza di aberrazioni cromosomiche non stabili, in seguito all'esposizione alle radiazioni ionizzanti, è limitata nel tempo (possono durare al massimo tre anni). Per esposizioni avvenute negli anni passati, risulta necessario lo sviluppo di una metodologia di tipo biologico che possa dare una risposta alla dose eventualmente ricevuta. Come è noto, un numero non indifferente di popolazione è stata esposta a vari livelli di radiazioni come conseguenza dell'incidente di Chernobyl (Vorobsova et al., 1994, Salassidis et al 1994, Senvan'kaev et al., 1995), dell'attacco atomico a Nagasaki e Hiroshima, dei test nucleari sulla superficie terrestre e delle sovraesposizioni di chi utilizza per motivi lavorativi le radiazioni ionizzanti. In tutti questi casi (come, per esempio, ai sopravvissuti delle bombe atomiche) sono stati utilizzati studi di biologia dosimetrica applicando metodiche di tipo citogenetico (Awa, 1978 and Lucas, 1992). Oggi, una valutazione retrospettiva delle dosi assorbite (retrospective dosimetry) è

considerata indispensabile per poter utilizzare i risultati negli studi epidemiologici riguardanti la salute di questi individui dopo l'esposizione alle radiazioni.

Per completezza, verrà in seguito descritta la metodologia che permette di valutare la dose assorbita da un individuo anche a distanza di anni. Le radiazioni ionizzanti provocano anche aberrazioni cromosomiche stabili che sono compatibili con la divisione cellulare. Queste aberrazioni sono ricombinazioni e traslocazioni di materiale cromosomico tali che il genoma nel suo insieme rimanga stabile. Sono quindi queste aberrazioni equilibrate nei geni che possono essere rilevate nei linfociti del sangue periferico anche dopo alcuni decenni. Negli anni '60, all'interno di studi comuni tra U.S. Air Force e NASA (Hardy, 1991 e Dalrymple, 1991) sono stati effettuati irraggiamenti di scimmie e studi sulle aberrazioni cromosomiche che sono state evidenziate 28 anni dopo (Lucas, 1996).

L'individuazione trent'anni dopo di traslocazioni cromosomiche stabili nelle cellule degli animali da laboratorio e agli stessi livelli di quelli che si producono subito dopo l'irraggiamento in vitro, è una chiara dimostrazione della permanenza di aberrazioni di questo tipo nella popolazione che è stata esposta (Lucas, 1997).

La grande importanza delle aberrazioni cromosomiche stabili risiede nel fatto che è possibile utilizzarle nella valutazione della dose assorbita da un individuo anche a distanza di molti anni dall'esposizione accidentale. Inoltre, la loro formazione sembra essere strettamente legata ai meccanismi della carcinogenesi e il loro studio potrebbe contribuire in modo importante alla comprensione dell'azione cancerogena delle radiazioni ionizzanti. Gli studi per lo sviluppo dei metodi della dosimetria biologica e, in particolare, della valutazione degli incidenti accaduti negli anni passati, si orientano verso la rivelazione e quantificazione delle traslocazioni cromosomiche stabili che si presentano dopo l'esposizione alle radiazioni ionizzanti. Il metodo utilizzato è il GTG-banding dei cromosomi con tripsina e Giemsa, il quale permette la definizione inequivocabile di ogni cromosoma (ISCN, 1985). Di conseguenza possono essere individuate incongruenze strutturali

di due o più cromosomi che si presentano di norma come traslocazioni o scambi di materiale cromosomico. Lo svantaggio di questo metodo, anche se riferito ad aberrazioni cromosomiche stabili che riguardano l'intero genoma di una cellula, è che richiede molto tempo ed è particolarmente pesante quando si devono analizzare centinaia di cellule senza l'ausilio di un analizzatore automatico del cariotipo.

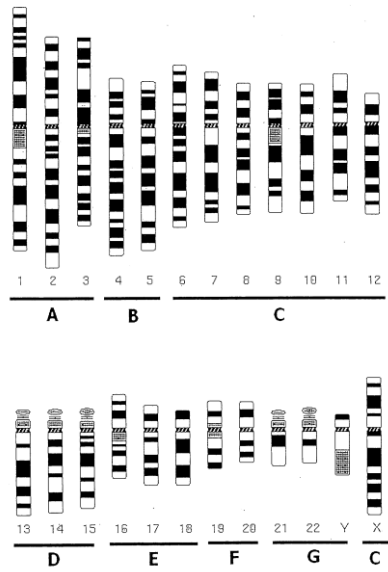


Figura 8. Tipica rappresentazione del G-banding di cromosomi umani in metafase dopo l'utilizzo di tripsina e Giemsa secondo l'International System for human Cytogenetic Nomenclature.



Figura 9. Tipica rappresentazione del G-banding di cromosomi umani in metafase dopo l'utilizzo di tripsina e Giemsa secondo l'International System for human Cytogenetic Nomenclature.

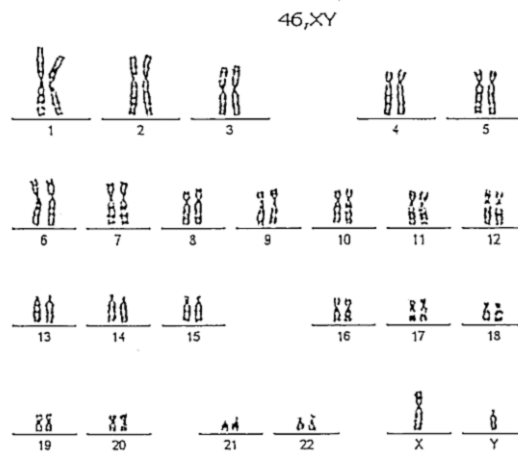


Figura 10. Cariotipo normale dei cromosomi di maschio col metodo GTG a bande.

Per una veloce rivelazione e quantificazione delle aberrazioni cromosomiche stabili nei campioni di sangue periferico dopo una sovraesposizione alle radiazioni ionizzanti, come metodo alternativo al GTG-banding dei cromosomi, possono essere utilizzate metodologie citogenetiche in combinazione con tecniche di genetica molecolare come il metodo dell'ibridizzazione fluorescente *in situ* – FISH (Pinkel, 1986). Il metodo permette la colorazione omogenea di cromosomi prescelti con l'utilizzo di sonde molecolari (DNA probes) che portano sostanze fluorescenti. Utilizzando diverse sostanze fluorescenti per la colorazione delle aree cromosomiche non ibridizzate diventa facile la rivelazione di spostamenti di parti dei cromosomi prescelti grazie alla dicromia che presentano.

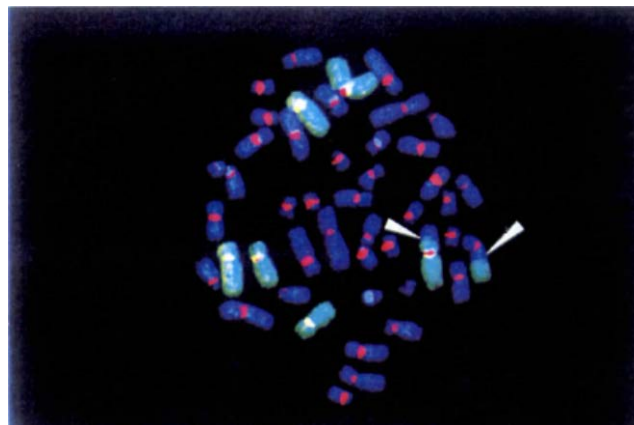


Figura 11. Reciproca traslocazione cromosomica con partecipazione del cromosoma 1 (v. freccia).

L'utilizzo di tale metodo, soprattutto nella valutazione di un incidente recente, presenta degli svantaggi in quanto presuppone una buona coltura cellulare e una buona analisi successiva dei linfociti nella metafase. Se l'attivazione *in vitro* dei linfociti con i fattori mitogeni non ha successo o l'indice mitotico è basso, come nei casi in cui la dose da radiazioni è alta, o dopo irraggiamento parziale e non sul corpo intero, ove le aberrazioni cromosomiche statisticamente non seguono la distribuzione di Poisson, esiste senza dubbio una selezione particolare nella popolazione cellulare che si concentra nella metafase e quindi delle complicazioni nell'applicazione del metodo. Inoltre questo metodo può essere applicato solo all'analisi cromosomica dei linfociti T e non di quelli B nei quali vi potrebbero essere delle importanti traslocazioni cromosomiche. Quindi i ritardi nel ciclo cellulare e in generale una diversa cinetica dei linfociti con serie aberrazioni cromosomiche avranno come risultato che il nostro campione, che viene analizzato 48 ore dopo la coltura, non sarà più rappresentativo.

Per affrontare tali problemi in questa tesi di dottorato, parallelamente con la classica analisi delle aberrazioni cromosomiche instabili nella metafase, si è combinato la tecnica FISH con la tecnica della PCC per l'analisi delle aberrazioni cromosomiche instabili direttamente nei linfociti del sangue periferico durante la metafase. Questo metodo permette la diretta quantificazione delle aberrazioni e la valutazione della dose assorbita nella metafase, evitando così un ritardo di 48 ore e le complicazioni derivanti dalla coltura del sangue periferico. La parte sperimentale sarà connessa alla costruzione di curve originali di calibrazione di riferimento dose-risultato e al confronto con quelle che si ottengono con metodologie classiche di citogenetica.

## **I.5 Variazione della radiosensibilità individuale nella popolazione e necessità di individualizzare la pericolosità di una sovraesposizione**

La valutazione di una dose assorbita utilizzando curve di calibrazione conferma da una parte l'esposizione alle radiazioni, dall'altra contribuisce alla valutazione della pericolosità di tale

esposizione. Conoscendo la dose, la valutazione della pericolosità si riferisce all'atteso aumento della frequenza di malattie neoplastiche come risulta dagli studi sui sopravvissuti di Hiroshima e Nagasaki. Questa metodologia considera che una dose definita di radiazioni sia ugualmente pericolosa per tutti i membri della popolazione senza distinzioni. Presuppone cioè, che lo stesso numero di aberrazioni cromosomiche sia conseguenza della dose ricevuta da ogni individuo, considerato che tutti i membri della popolazione presentano la stessa sensibilità alle radiazioni ionizzanti. E' noto che esistono, tra la popolazione, delle persone particolarmente sensibili alle radiazioni come dimostrano molto spesso le sedute di radioterapia. In più, sono state riferite sindromi o individui portatori di geni mutati che si caratterizzano per una aumentata sensibilità cromosomica all'effetto delle radiazioni e contemporaneamente esprimono una predisposizione a carcinogenesi.

La radiosensibilità sopra menzionata tra diversi individui della popolazione non riguarda i linfociti del sangue periferico (PBL) umano in quanto essi rappresentano una popolazione di cellule la quale si trova in modo predominante (99,8%) in uno stadio presintetico del DNA del ciclo cellulare (fase  $G_0$ ) e, senza stimolazione, non entrano in mitosi. E' consolidato in letteratura (Terzoudi 2008) che dopo l'irraggiamento *in vitro* di PBL di individui sia sani che portatori di sindromi che li rendono particolarmente radiosensibili, a varie dosi di raggi gamma (Gy) non si presentano sostanziali differenze nel numero di aberrazioni cromosomiche per cellula e questo in quanto sono tutti irraggiati mentre si trovano nella fase  $G_0$  del ciclo cellulare. Questa evidenza sperimentale è la base per la quale si possono creare curve di calibrazione "universali". Il fatto che ogni Laboratorio deve avere pronta la propria, si basa sulla diversa risposta dei linfociti alle radiazioni da luogo a luogo e alla diversità degli operatori che processano metodiche ed effettuano le analisi dei risultati.

Per quanto concerne le cellule che entrano in mitosi senza stimolazione (p.e. le cellule del midollo spinale) diventa interessante illustrare, per la valutazione della pericolosità di una sovra-

esposizione e per capire i meccanismi della radiosensibilità individuale tra la popolazione, quali elementi stabiliscono tale radiosensibilità cromosomica.

## **I.6 Meccanismi di radiosensibilità a livello molecolare e citogenetico**

Conoscere gli elementi che stabiliscono la radiosensibilità di un individuo e in particolare quella cromosomica, potrebbe diventare la base biologica indispensabile per lo sviluppo di metodologie tali da poter individuare membri della popolazione particolarmente sensibili alle radiazioni ionizzanti. Nel caso di incidenti che coinvolgono sorgenti di radiazioni importanti ove vengano chiamati ad intervenire per primi soccorritori, vigili del fuoco o gruppi di personale selezionato dell'impianto, la conoscenza *a priori* di una eventuale particolare radiosensibilità di questo personale è importante. Risulta quindi necessario indicare i meccanismi che governano la variabilità della radiosensibilità della cellula a livello genetico e in particolare nelle varie fasi del ciclo cellulare. Una prima descrizione del ciclo cellulare ci è offerta già dagli studi sulla relazione tra le aberrazioni cromosomiche generate da radiazioni ionizzanti e la duplicazione del DNA delle cellule. Le cellule raddoppiano il loro materiale genetico durante una fase di sintesi molto concreta (fase S), la quale segue una fase nota come G1, e si separa dalla mitosi della cellula (fase M) con una seconda fase detta G2. Mentre le cellule compiono questo ciclo la loro radiosensibilità varia. La parte media e finale della sintesi e la fase G1 sono note come fasi radioresistenti mentre la mitosi e i passaggi dalla G1 alla S e dalla G2 alla fase M sono particolarmente sensibili alle radiazioni (Terasima and Tolmach 1963, Sinclair and Morton 1996).



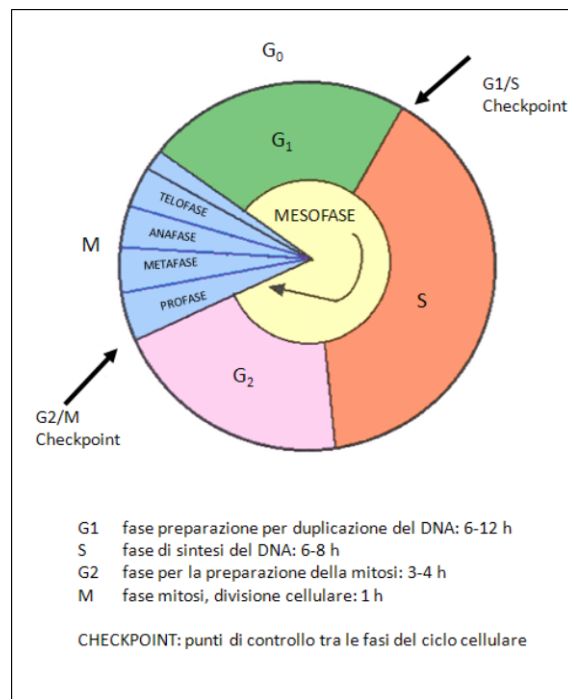


Figura 12. Rappresentazione schematica delle quattro fasi del ciclo cellulare e dei punti fondamentali di controllo tra di loro. Cellule che non si dividono (p.e. i linfociti differenziati del sangue periferico) rimangono sincronizzati nella fase G<sub>0</sub> del ciclo cellulare.

Per poter spiegare questa variazione nella sensibilità, nonché un allungamento delle fasi intermedie G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> dopo esposizione delle cellule alla radiazione (Painter e Robertson 1959, Wolf 1968, Leeper et al. 1972), sono stati proposti molti meccanismi probabili. In un primo momento la loro variazione di radiosensibilità è stata collegata con l'organizzazione della cromatina al momento dell'irraggiamento (Dewey et al., 1972). La struttura architettónica della cromatina e del nucleo si considerano in generale come elementi decisivi della radiosensibilità delle cellule (Oleinik et al., 1994, Olive 1992, Pandita and Hittelman 1995). Non è però possibile spiegare l'importante incremento della radiosensibilità delle cellule durante il passaggio dalla fase G<sub>1</sub> alla sintesi (G<sub>1</sub>/S border), durante la fase G<sub>2</sub> in quei casi in cui la fase G<sub>1</sub> delle cellule è breve. Una seconda spiegazione è che la radiazione procura un diverso numero di doppie rotture nell'elica del DNA (DNA-dsb) a seconda della fase in cui si trova il ciclo cellulare. Invece è già accettato in letteratura che le doppie rotture del DNA portano alla formazione di aberrazioni cromosomiche (Natarajan and

Obe 1978, Bryant 1984) e il loro numero non varia durante tutto il ciclo cellulare (Blocher et al., 1983, Iliakis et al., 1991).

La spiegazione più ampiamente accettata sulla diversa radiosensibilità nel ciclo cellulare si basa sul fatto che la capacità della cellula di riparare il danno è diversa nelle varie fasi (Lavin and Kidson, 1977). E' consolidato nella letteratura che, anche se le cellule subiscono lo stesso danno per unità del DNA in ogni momento del loro ciclo cellulare, l'efficacia dei meccanismi di riparazione delle rotture del DNA è diversa stabilendo così la variabilità della radiosensibilità nelle varie fasi del ciclo (Bender et al., 1974, Tanzarella et al. 1990, Morgan et al., 1991). La capacità della cellula di riparare il danno è stata trovata simile in tutte le fasi del ciclo cellulare (Metzger and Iliakis, 1991) anche se le aberrazioni cromosomiche riscontrate erano diverse. In particolar modo, quando le cellule vengono irraggiate nella loro fase più sensibile che è la metafase, i cromosomi si presentano intatti malgrado la presenza di un gran numero di doppie rotture del DNA, la velocità di riparazione delle quali è stata trovata simile a quella della crescita esponenziale delle cellule (Rydberg, 1984). In più, linee cellulari radiosensibili, mentre presentano la stessa velocità di riparazione delle doppie rotture del DNA di quelli normali, esprimono percentuali alte di morte cellulare (Thacker and Ganesh, 1990, Cheong et al., 1992). Anche le cellule di Ataxia Telangiectasia (linea cellulare estremamente radiosensibile) presentano velocità normali di riparazione delle doppie rotture del DNA dovute alle radiazioni, ma la loro frequenza di aberrazioni cromosomiche, rispetto alle cellule normali, è di 2 o 3 volte maggiore (Conforth and Bedford, 1985, Pandita and Hittelman, 1992).

Evidentemente il danno da radiazioni non dipende dalla velocità con cui viene riparato il danno delle doppie rotture del DNA, ma da un processo di tipo biochimico che trasforma le aberrazioni molecolari in aberrazioni cromosomiche. L'efficacia di questo processo dipende da elementi di controllo del ciclo cellulare genericamente definiti, ed è maggiore nelle fasi più sensibili del ciclo cellulare.

E' stato già dimostrato (Terzoudi G. 2011) che:

- l'incremento della radiosensibilità negli stadi di transizione G1/S e G2/M del ciclo cellulare è collegato con i cambiamenti importanti che avvengono nell'organizzazione della cromatina proprio in questi punti;
- il ritardo che si osserva nell'avanzamento di una cellula nel ciclo cellulare dopo l'irraggiamento con radiazioni ionizzanti rappresenta il tempo necessario per le riparazioni prima che essa entri nelle fasi critiche del ciclo (duplicazione del DNA nella fase S o la condensazione della cromatina nella fase G2);
- le lesioni nel DNA, subito dopo l'irraggiamento, si trasformano con successo in aberrazioni cromosomiche nel passaggio tra le fasi G1/S e G2/M e prima dell'azione dei meccanismi di riparazione;
- la marcata radiosensibilità della fase G2 è dovuta alla struttura particolare della cromatina che permette una più efficace conversione del danno del DNA ad aberrazioni cromosomiche;
- le cellule sono particolarmente radiosensibili durante la fase della mitosi in quanto esiste un collegamento col fatto che le cellule irraggiate in mitosi non possono fermarsi nei punti del ciclo preposti alla riparazione del danno, e l'unfolding della cromatina che avviene successivamente, trasforma le lesioni molecolari del DNA in danno cromosomico visibile.

## IV. MATERIALI E METODI

### II.1 Condizioni di coltura e di irraggiamento di linfociti per l'analisi di aberrazioni cromosomiche in metafase

Campioni di sangue provenienti da due donatori sani vengono esposti ad irraggiamento gamma proveniente da una sorgente di cobalto-60 ( $^{60}\text{Co}$ ) ad un rateo di dose di 0,5 Gy/min e temperatura di 20°C. Il sangue periferico viene prelevato con siringa e trasferito in contenitori che contengono eparina, necessaria per evitare la sua coagulazione. Un campione da ogni donatore è stato suddiviso in un numero di sottocampioni pari al numero delle dosi da erogare e un campione di controllo. I sottocampioni sono stati esposti a varie dosi all'interno dell'intervallo 0,5 – 8 Gy per lo studio delle aberrazioni cromosomiche conseguenti. In seguito è stato aggiunto terreno di coltura a ogni sottocampione di sangue contenuto in particolari contenitori (tubi con base rotonda Falcon, n.2057 da 14 ml) e il tutto è stato collocato nell'incubatore a  $\text{CO}_2$ , a 37°C per circa 50 ore. Nelle stesse condizioni, si coltivano parallelamente i sottocampioni non irraggiati provenienti dagli stessi donatori. Per ogni coltura indipendente si riporta la data sul contenitore con pennarello indelebile, i dati del sottocampione e della coltura, in modo tale che ci sia successivamente il suo completo riconoscimento. La manipolazione dei campioni cellulari avviene in condizioni sterili sotto cappa (Euroclone, mod. AURA 2000 M.A.C.) in sicurezza biologica con flusso di aria sterile verticale.

Per ogni coltura si utilizzano 0,5 ml di sangue periferico al quale si aggiungono 5 ml di terreno di coltura completo (con pipette sterili monouso da 2 ml e 5 ml) contenente RPMI Medium 1640 (Gibco, A10491-01), 1% di L-Glutammina (Biochrom, K 0282), 10% di siero fetale bovino (FCS Gibco, n.10270), 1% di antibiotici come la penicillina e la streptomina (Penicillin/Streptomycin, Biochrom AG A2212). Si ricorda che i linfociti umani del sangue periferico sono una popolazione cellulare che si trova prevalentemente in una fase presintetica del

DNA del ciclo cellulare (Fase G<sub>0</sub>). Pertanto, nel terreno di coltura si aggiunge successivamente il 2% di fitemoagglutinina (PHA, Biochrom M5030), una lectina mitogena estratta dai fagioli, necessaria ad attivare i linfociti del sangue periferico per dare inizio al ciclo cellulare. Il siero fetale bovino contiene componenti necessari per la crescita delle cellule, gli antibiotici agiscono per evitare eventuali infezioni, mentre la glutammina agisce come componente aggiuntivo di aiuto alla duplicazione del DNA durante la fase della sintesi (fase S). Prima di irraggiare i campioni, si chiude col tappo la provetta Falcon, si batte col dito in basso per raccogliere anche l'ultima goccia di sangue e infine si agita.

Le provette (con i controlli) vanno poste, con tappo aperto e con un angolo di 30°, nell'incubatore in condizioni di 95% di aria, 5% di CO<sub>2</sub>, temperatura di 37°C e 100% di umidità. La temperatura di 37°C è necessaria per l'accelerazione delle cellule verso il loro ciclo cellulare e il 5% di CO<sub>2</sub> nell'aria è necessario per il mantenimento del pH tra 6,8 e 7,2 perché così è possibile la successiva crescita delle cellule (il CO<sub>2</sub> contribuisce nell'acidità della miscela). I cromosomi condensati sono osservabili ed analizzabili solo durante la metafase, periodo molto breve del ciclo cellulare (i linfociti stimolati in vitro hanno un ciclo cellulare di circa 15-18 ore); risulta quindi necessario utilizzare un metodo per massimizzare il numero di cellule mitotiche nel campione. Questo si ottiene con l'aggiunta, sotto cappa, di 50µl di colcemide, un derivato metilato della colchicina, che viene aggiunto nel terreno di coltura per impedire ai linfociti non differenziati, a causa dell'aggiunta di PHA, di proseguire nel ciclo cellulare e di conseguenza li porta ad accumularsi in metafase. L'aggiunta avviene dopo 48 h che i campioni stazionano nell'incubatore. Successivamente si agitano le provette e si posizionano con la stessa inclinazione nell'incubatore per altre 3 ore circa. Subito dopo si procede all'interruzione della coltura cellulare di tutti i campioni e si è pronti per la preparazione dei vetrini con i cromosomi.

## II.2 Condizioni di coltura e di irraggiamento di linfociti per l'analisi di aberrazioni cromosomiche col metodo della condensazione prematura dei cromosomi.

Per una diretta analisi delle aberrazioni cromosomiche in interfase, i linfociti del sangue periferico (sia T che B) si separano dal sangue totale periferico col metodo della precipitazione in Ficoll (Biochrom AG, Biocoll Separating solution, n.L 6113), nel modo proposto da Pantelias and Maillie: 5 ml di sangue si versano con pipetta Pasteur, molto lentamente (regolando la velocità), sulla parete di una provetta Falcon da 14 ml inclinata e contenente 5 ml di Ficoll a temperatura ambiente. In seguito si porta a centrifugare a 1850 giri per 30 minuti e nelle Falcon estratte si presentano ben separati 4 diversi strati (fasi), il siero, i linfociti, il Ficoll e in fondo gli eritrociti (vedi figura che segue).



Figura 13. Separazione dei linfociti umani in Ficoll.

Lo strato superiore viene allontanato mentre viene raccolto, con l'aiuto di una pipetta, molto lentamente e girando la provetta in senso rotatorio, lo strato immediatamente sotto che è ricco in linfociti (si distinguono in quanto in "nuvola"). I linfociti si mettono in una provetta nuova con 10-11 ml di terreno di coltura completo e si portano a centrifugare per 15 minuti a 1550 giri. Se eventualmente si genera una schiuma sopra il liquido la si asporta con la pipetta. Si allontana la parte surnatante e, dopo aver battuto la parte del precipitato (pellet) leggermente col dito, si aggiungono nuovamente 7-8 ml di terreno di coltura completo e si portano a centrifugare per altri

15 minuti a 1550 giri. Si elimina la parte surnatante e in questo modo i linfociti sono lavati bene e il Ficoll allontanato. Per rompere bene il pellet formato dai linfociti, si batte nuovamente la parte terminale rotonda della provetta col dito e si aggiunge opportunamente terreno di coltura completo. Si agita bene con la pipetta e da questa soluzione si prelevano 2 ml circa da versare in provette nuove (in numero pari ai punti delle dosi in Gy da considerare, controllo incluso) per l'irraggiamento con i raggi gamma. Per verificare se esiste una variazione nelle aberrazioni cromosomiche in funzione del tempo dopo l'irraggiamento (intervento di meccanismi enzimatici di riparazione del danno nelle cellule), si è proceduto alla fusione dei linfociti irraggiati con varie dosi con cellule mitotiche CHO (Chinese Hamster Ovary) immediatamente dopo l'irraggiamento e a una distanza di 10 e 24 ore dall'irraggiamento.

La fusione tra i linfociti e le cellule mitotiche CHO avviene con l'utilizzo della sostanza poliethilenglicolo (PEG) – (Roche, PEG 1500 n. 10783641001).

Le cellule mitotiche CHO si ottengono dopo procedura standard di distacco selettivo (shake off) da colture esponenziali in seguito all'aggiunta di colcemide (per bloccare le cellule mitotiche in metafase) con concentrazione finale 0,2 mg/ml. Le cellule restano per 4 ore nell'incubatore e si trasferiscono successivamente in provette Falcon da 14 ml (le cellule mitotiche CHO si possono mantenere in ghiaccio o in freezer per essere utilizzate, quando necessario, per la fusione con cellule in interfase per l'induzione di PCC). Nella stessa Falcon si aggiungono i linfociti umani (da 4 fiasche da 250 ml si creano 2 Falcon da 14 ml), circa  $1 \times 10^6$  linfociti sospesi, in terreno senza siero.

Si procede alla centrifugazione per 7 minuti a un numero basso di giri (900 giri) in quanto si desidera che le cellule nel pellet non siano troppo dense (impacchettate). Si elimina la parte surnatante e si aggiunge alla miscela terreno di coltura senza siero (FCS). In questo modo le cellule si lavano nel terreno in modo tale che il siero si elimini dalla loro superficie e la fusione risulta così più facile. In seguito ad un'altra centrifugazione alle stesse condizioni, la parte surnatante si

elimina mantenendo sempre la provetta capovolta. Si asciuga bene la provetta capovolta su carta e si posiziona rovescia su rack. Mentre si tiene la provetta rovescia e leggermente inclinata, ci si avvicina al pellet e si iniettano con la pipetta 150  $\mu$ l di PEG direttamente sul pellet delle cellule. Si gira la provetta e si depone senza agitare su rack porta-provette. A questo punto il pellet delle cellule compare staccato dal fondo della provetta, formando grandi “ciuffi” nella soluzione di PEG. Se il pellet rimane attaccato al fondo, la fusione non avviene. Siccome gli esperimenti effettuati avevano più punti sperimentali di dose, la procedura descritta per la fusione è stata applicata ad ogni campione in modo tale che tutte le provette fossero sottoposte a quanto sopra descritto. La provetta si lascia a riposo per circa 1 minuto e successivamente si aggiunge, con la provetta leggermente inclinata e ruotandola in senso antiorario, goccia a goccia, 1,5 ml di PBS (Phosphate Buffer Solution, Biochrom AG L1825). La provetta si porta a centrifugare per 7 minuti a 900 giri, il surnatante si elimina, si asciuga velocemente la provetta capovolta e si aggiungono 0,8 ml di RPMI completo (con FCS) e 50  $\mu$ l di colcemide. La provetta si posa nell’incubatore nelle condizioni precedentemente indicate per circa 75 minuti. La fusione cellulare avviene già nei primi minuti dell’incubazione, mentre la condensazione prematura dei cromosomi delle cellule in metafasi si completa in 75 minuti circa.

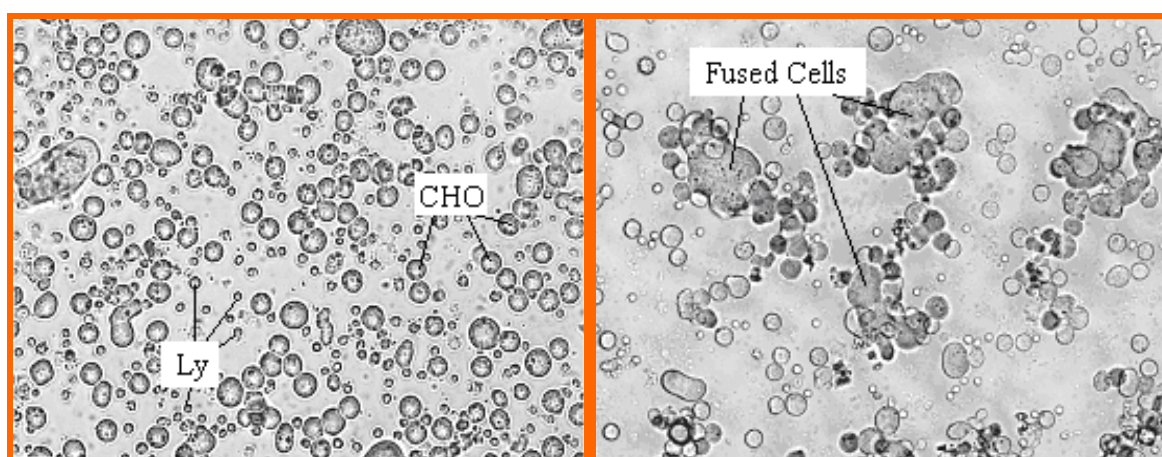


Figura 14. Cellule mitotiche CHO e linfociti umani come si presentano al microscopio prima e durante la fusione cellulare.



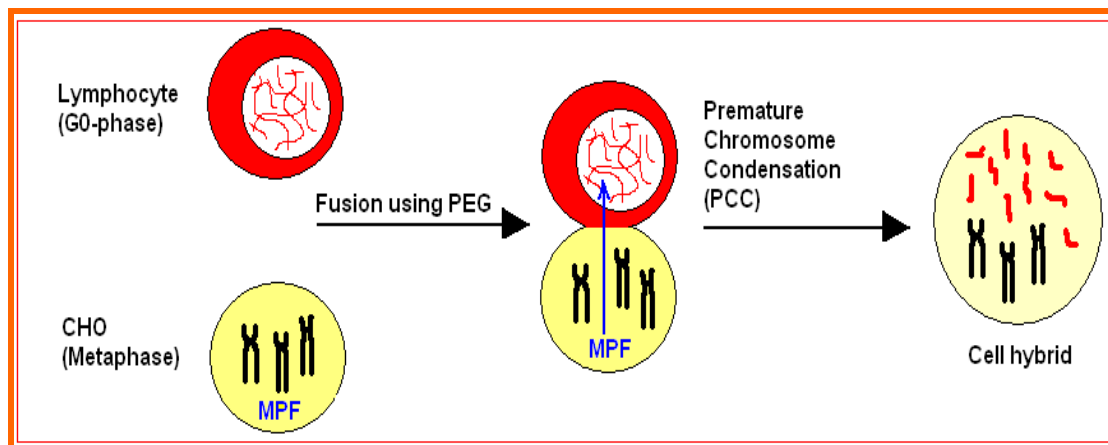


Figura 15. Rappresentazione del processo della condensazione prematura dei cromosomi (PCC).

### II.3 Preparazione dei vetrini con i cromosomi

Nelle colture delle cellule del sangue periferico, come nelle fusioni dei linfociti con cellule mitotiche CHO, si aggiungono 10 ml di soluzione ipotona di KCl 0,075 M per 10 minuti in temperatura ambiente. In questo intervallo di tempo le cellule si gonfiano in quanto la soluzione ipotona ha una pressione osmotica minore di quella che si sviluppa all'interno della cellula stessa. Per ripristinare la stessa pressione tra le due parti, si assorbe dell'acqua dalla cellula attraverso la sua membrana semitrasparente, facendo così gonfiare la cellula senza però rompere la sua membrana mentre simultaneamente i suoi cromosomi si allargano e diventano visibili senza che un cromosoma copra l'altro.

Per evitare la formazione di granuli di cellule durante il fissaggio, la soluzione KCl si elimina dopo centrifugazione, a 1200 giri per 5 minuti, mantenendo però circa 0,5 ml ove le cellule rimangono sospese. In seguito le cellule si fissano in metanolo e acido acetico in proporzione 3:1 in volume. Il metanolo denatura e precipita le proteine mentre l'acido acetico contrasta l'azione del metanolo rigonfiando le cellule. Il fissativo penetra rapidamente nelle cellule e conserva la struttura dei cromosomi; inoltre favorisce l'apertura dei cromosomi delle piastre metafasiche. Si aggiungono circa 10 ml di fissativo e dopo un'ulteriore centrifugazione e eliminazione del surnatante del primo

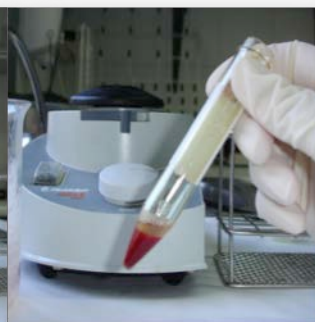
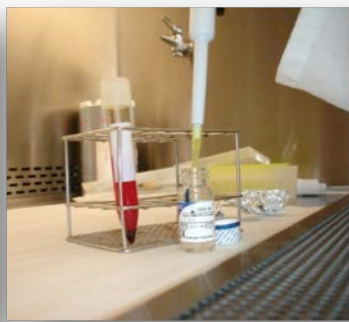
fissativo, le cellule si trovano in sospensione in 6 ml di fresco fissativo. Si centrifuga per una seconda volta e a questo punto le cellule sono attaccate al fondo della provetta; si aggiungono poche gocce di fissativo e si agita con delicatezza il fondo per non perdere cellule sulle pareti della Falcon. La soluzione cellulare si posiziona con pipetta da 20 µl in 2 gocce su vetrini (Menzel-Glaser, microscope slides, 76x26 mm) leggermente inumiditi con acqua distillata; la qualità della preparazione dei cromosomi sui vetrini si controlla col microscopio a contrasto di fase e i vetrini si possono mantenere a lungo a -20°C.

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 è possibile osservare solo aberrazioni in cui la struttura dei cromosomi è alterata sensibilmente. Quindi una volta asciugati, i vetrini vengono colorati in soluzione 4% di Giemsa in Sorensen's phosphate buffer, con pH = 6,8 per circa 10-12 minuti. In seguito si lavano sotto l'acqua corrente, si asciugano e diventano preparazioni permanenti da analizzare incollando il coprioggetto (Prestige, micro cover glass, 24x50 mm) con Pro-texx medium. A questo punto i vetrini sono pronti per essere portati al microscopio ottico per l'analisi.

# PROCEDURA SCHEMATICA DI PREPARAZIONE DI VETRINI CON CROMOSOMI DI LINFOCITI IN METAFASE COLORATI IN GIEMSA



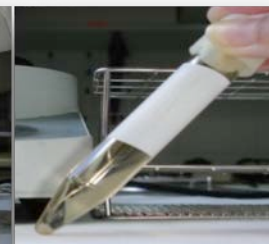
COLTURA CELLULARE



SOLUZIONE  
IPOTONICA

INCUBAZIONE

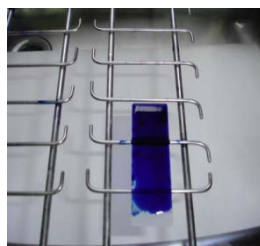
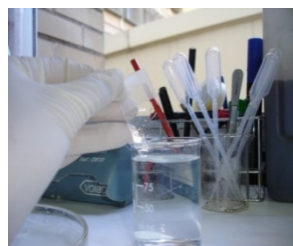
ESTRAZIONE



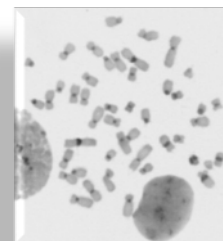
CENTRIFUGAZIONE

FIXAGGIO

VETRINI



GIEMSA

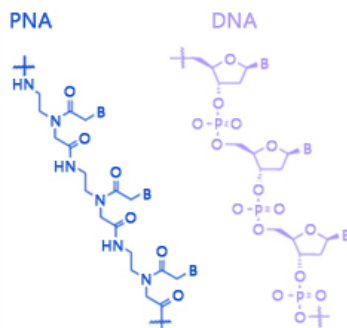


CROMOSOMI

## II.4 Individuazione di centromeri e telomeri dei cromosomi con sonde peptidiche di acido nucleico (PNA) e ibridizzazione fluorescente *in situ* (FISH)

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

Le sonde utilizzate per i nostri esperimenti sono di tipo PNA (Peptide Nucleic Acid) la cui struttura è formata da unità N-(2-aminoethyl)-glycine ripetute e legate da legami peptidici. Grazie a questa modifica radicale di struttura, le sonde PNA formano legami sequenza-specifici in forma di elica complementare a sequenze DNA o RNA, offrendo una superiore affinità di legame e quindi stabilità chimica e biologica.



La presenza delle sonde PNA ha permesso di utilizzare la FISH nel campo della dosimetria biologica in quanto hanno diminuito in maniera molto significativa il tempo di ibridizzazione e hanno aumentato l'intensità del segnale (il metodo standard della FISH richiedeva 3 giorni di periodo di invecchiamento e 12 ore per l'ibridizzazione della sonda del DNA al bersaglio DNA). Nelle sonde PNA lo scheletro composto da zucchero fosfato è sostituito da un neutro polimero pseudo-peptide al quale le nucleo basi sono legate. Questa struttura dà alla sonda PNA grande

affinità e specificità al bersaglio del DNA; per questo il tempo di ibridizzazione delle sonde a PNA (1 ora) è molto minore rispetto alla procedura della FISH convenzionale con sonde DNA (12 ore circa) (P. Paulasova et al., 2004). Nelle foto che seguono viene riportata la colorazione della sonda rossa e di quella verde delle sonde della PANAGENE che abbiamo utilizzato. Per i telomeri il fluoroforo è la fluoresceina-isotiocianato (FITC) verde, mentre per il centromero dei cromosomi il fluoroforo è il tetrametilrodamina-isotiocianato (TRITC), rosso.

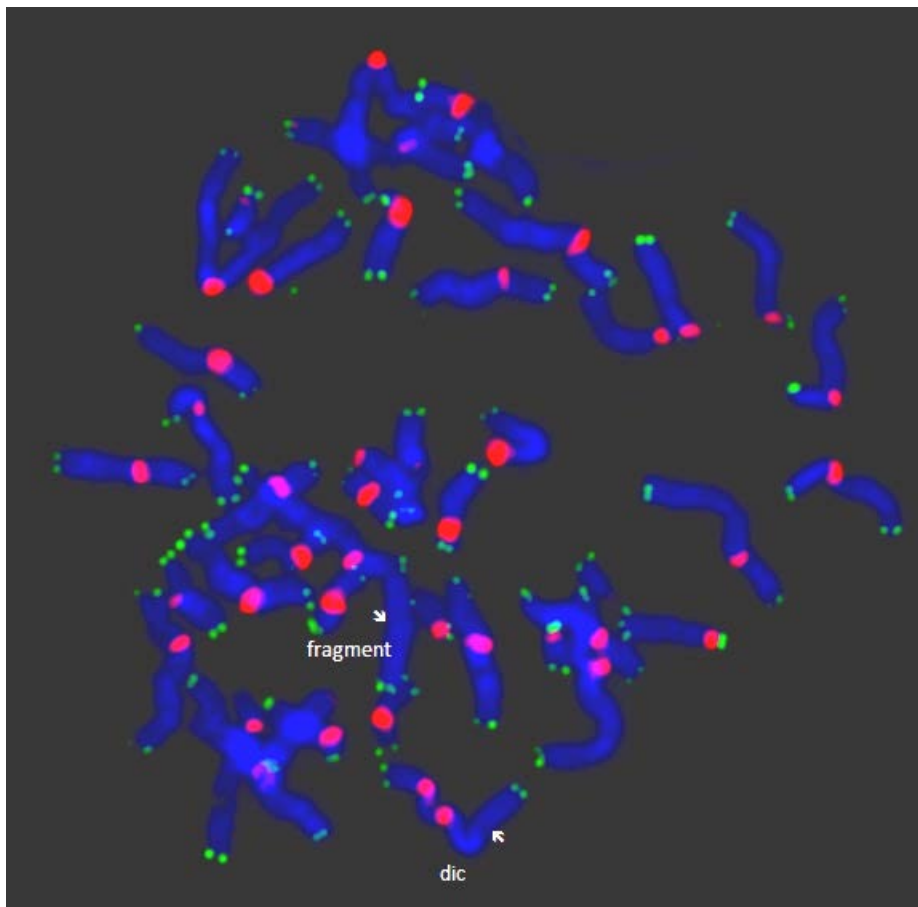


Figura 16. Applicazione delle sonde PNA a cromosomi dei linfociti umani.

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, e il bersaglio.

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. 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.

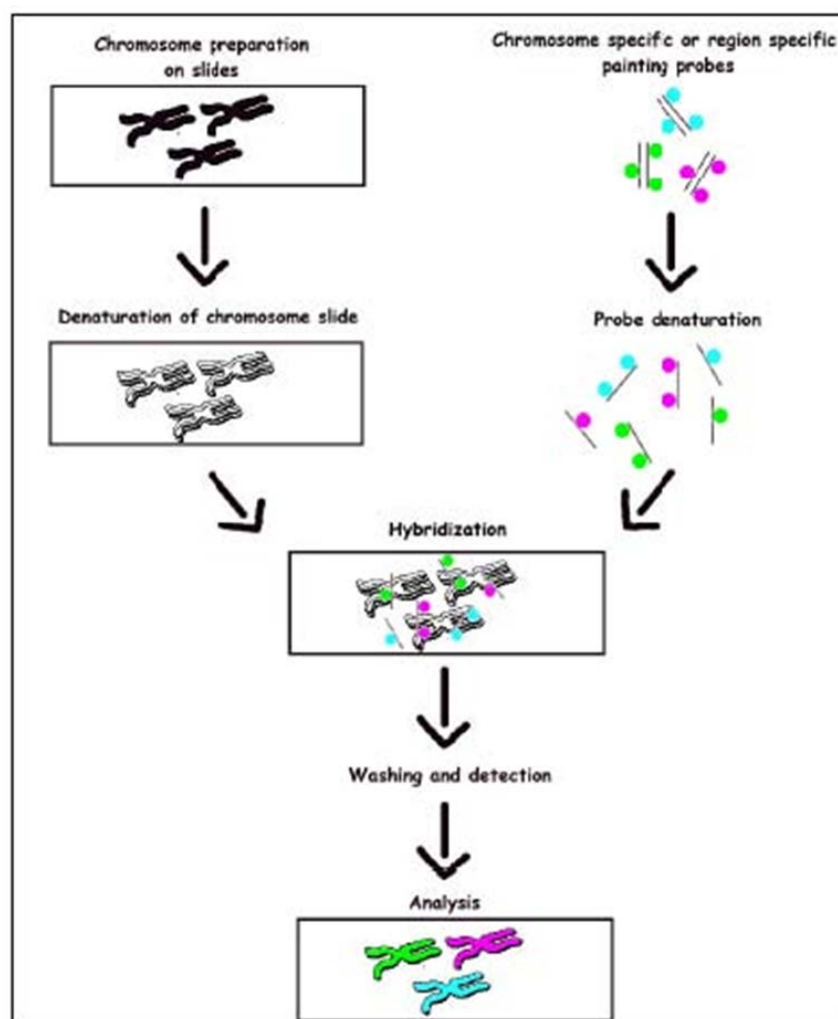


Figura 17. Rappresentazione schematica di ibridizzazione della fluorescenza in situ (FISH).

Sia con l'analisi delle aberrazioni cromosomiche in metafase sia con l'analisi di aberrazioni cromosomiche col metodo della condensazione prematura dei cromosomi, si arriva al punto comune

in cui la soluzione cellulare si posiziona in gocce su vetrini (Menzel-Glaser, microscope slides, 76x26 mm) leggermente inumiditi con acqua distillata, e la qualità della capacità di preparazione cromosomica la si verifica col microscopio a contrasto di fase. Una volta appurata la buona qualità del prodotto ottenuta si procede in entrambi i casi come segue:

I vetrini, immersi in appositi contenitori – coplin jar -, vanno lavati per una volta in PBS (Biochrom, cod. L 1815) per 15 minuti in temperatura ambiente. Il fissaggio delle cellule si ottiene immergendo i vetrini in formaldeide (SIGMA, Formaldehyde solution for molecular biology, 36,5-38% in H<sub>2</sub>O cod. F8775-50) al 4% in PBS (ovvero 7,8 ml formaldeide al 36-38% e 62,2 ml di PBS) per 2 minuti a temperatura ambiente. Successivamente i vetrini vanno lavati in PBS per 2 volte per 5 minuti ognuna. La digestione dei preparati in pepsina - (1mg/ml - 0,2 g pepsina, SIGMA, Pepsin from porcine gastric mucosa cod. P7000-100G), 200 ml H<sub>2</sub>O distillata (SIGMA, Water-Molecular Biology Reagent cod. W3500), 168 µl HCl 37% (SIGMA, Hydrochloric acid 36,5-38,0%, BioReagent for molecular biology cod. H1758) - è stata effettuata per 10 minuti a 37°C nelle coplin jar immerse in bagnetto di acqua nel modo seguente: l'acqua è stata aggiunta nelle coplin jar le quali, coperte, sono state immerse nell'acqua del bagnetto; si è misurato con il termometro la temperatura e quando l'acqua ha raggiunto i 37°C si è aggiunto l'acido cloridrico e in ultimo la pepsina, giusto 2 minuti prima dei vetrini. In seguito i vetrini sono stati lavati in PBS per 5 minuti. Le cellule sono state nuovamente fissate immergendo i vetrini in formaldehyde 4% in PBS 1 volta per 2 minuti (usando la stessa soluzione del passaggio precedente) e i vetrini lavati in PBS due volte per 5 min. Per ottenere la disidratazione dei vetrini essi sono stati immersi in etanolo al 70% per 5 minuti, poi in etanolo al 90% per 5 minuti ed infine in etanolo al 100% per lo stesso tempo (SIGMA, absolute alcohol, without additive, A15 o1, ≥99,8%, cod. 02860). E' importante che il vetrino si asciughi bene nel passaggio da una concentrazione all'altra altrimenti si potrebbe diluire la concentrazione in cui va immerso; se si desidera, i vetrini così trattati possono essere conservati a -20°C per circa 15 giorni.

I vetrini, dopo l'etanolo, sono stati lasciati asciugare all'aria mentre si è proceduto alla preparazione della soluzione di ibridizzazione in una provetta eppendorf da 0,5 ml.

La soluzione di ibridizzazione (da prepararsi al buio) era composta da:

- 1M Tris pH 7,2 (SIGMA, cod T5912)	1 %	per 1 vetrino 0,2 µl
- Buffer MgCl <sub>2</sub>	8,56 %	per 1 vetrino 1,71 µl
- Formamide (IBI Scientific, cod. FC2720240)	70%	per 1 vetrino 14 µl
- Tel. probe PNA Cy3 [25µg/ml] (PANAGENE cod. F1001)	2%	per 1 vetrino 0,4 µl
- Centr. PNA probe FITC [25µg/ml] (PANAGENE cod. F3003)	5%	per 1 vetrino 1 µl
- NEN Blocking agent/ac. maleico 10%	5%	per 1 vetrino 1 µl
- H <sub>2</sub> O (SIGMA, cod. W3500)	8,44%	per 1 vetrino 1,69 µl

La soluzione di ibridizzazione è stata stesa (20 µl) su ogni vetrino facendo una striscia con la micro pipettatrice e il vetrino è stato coperto con il coprivetrino. Si è proceduto con l'operazione di co-denaturazione lasciando il vetrino per 3 minuti su una piastra calda a 80°C (perché avvenga l'ibridazione con le sonde, il DNA cromosomico deve essere denaturato). In seguito i vetrini sono stati posti per 2 ore in un contenitore buio e umidificato senza però appoggiare i vetrini direttamente su superfici bagnate. Si è proceduto eliminando il coprivetrino con un colpo secco di polso (in caso di difficoltà nello staccare il coprivetrino, si può immergere brevemente nella soluzione di lavaggio), si è lavato il vetrino nella soluzione di lavaggio WS1 per due volte per 15 minuti, in due coplin jar separatamente. La soluzione di lavaggio WS (250 ml) è composta da:

- 175 ml of Formamide (IBI Scientific, cod. IB72024)
- 2,5 ml Tris 1M pH 7,5 (SIGMA, Tris Buffered Saline, cod. T5912)
- 2,5 ml of BSA 10% (SIGMA, Albumin from bovine serum cod. A4503)
- 70 ml of H<sub>2</sub>O (SIGMA, cod. W3500)



Il lavaggio dei vetrini è proseguito in TBS/Tween 0,08% (50 ml), composti da 50 ml TBS (SIGMA, Tris Buffered Saline 10 ×, solution cod. T5912) e 40 µl Tween (SIGMA, TWEEN® 20 cod. P1379), 3 volte per 5 minuti a volta. A questo punto si è ripetuto il passaggio della disidratazione del vetrino immergendolo in etanolo al 70% per 5 minuti, poi in etanolo al 90% per 5 minuti ed infine in etanolo al 100%.

Infine si è steso sul vetrino il DAPI e l'antifade (DAPI in concentrazione 2 µg/ml mixata al 50% con antifade, BIOCHROM, VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI cod. H-1200) per prevenire il decadimento della fluorescenza, e si è coperto con il coprivetrino. Si è appoggiato delicatamente e si è asciugato con carta da bancone l'eccesso di DAPI, chiudendo tutto intorno con smalto trasparente (KREATECH, Rubber cement FIXOGUM cod. LK-071A). Si è lasciato stabilizzare la fluorescenza in frigo una notte a 4°C e successivamente i vetrini erano pronti da analizzare al microscopio a fluorescenza.

Si riporta per completezza la composizione completa delle soluzioni sopra citate:

<b><u>Buffer Maleico (10ml)</u></b>	<b><u>Buffer MgCl<sub>2</sub> (10ml)</u></b>	<b><u>NEN Blocking agent</u></b>
1ml acido maleico 1M	250 µl MgCl <sub>2</sub> 1M	1 gr NEN
500 µl NaCl 3M	90 µl acido citrico 1M	10 ml Buffer Maleico pH 7
8,5 ml H <sub>2</sub> O	1,6 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5 M	Sciogliere il NEN e stoccare a -20°C
pH 7, conserv. -20°C	8,06 ml H <sub>2</sub> O	
	pH 7, conserv. -20°C	

I vantaggi delle colorazioni in fluorescenza sono notevoli: l'analisi delle metafasi è più semplice e rapida per cui aumenta il numero di immagini analizzate e l'accuratezza dei risultati; i risultati hanno un valore statistico maggiore e l'errore associato alla misurazione diminuisce.

## II.5 Analisi delle aberrazioni cromosomiche in metafase utilizzando un microscopio ottico munito di fluorescenza e sistema di acquisizione delle immagini per la costruzione di curve di calibrazione

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 e di un apposito sistema di cattura ed elaborazione automatica dell'immagine ISIS (Metasystems). Il microscopio a fluorescenza si distingue per alcune peculiari caratteristiche che saranno riportate in seguito.

Innanzitutto non sono utilizzate lampade a 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 a incandescenza, utilizza il principio della scarica di gas e non presenta uno spettro continuo, ma discreto.

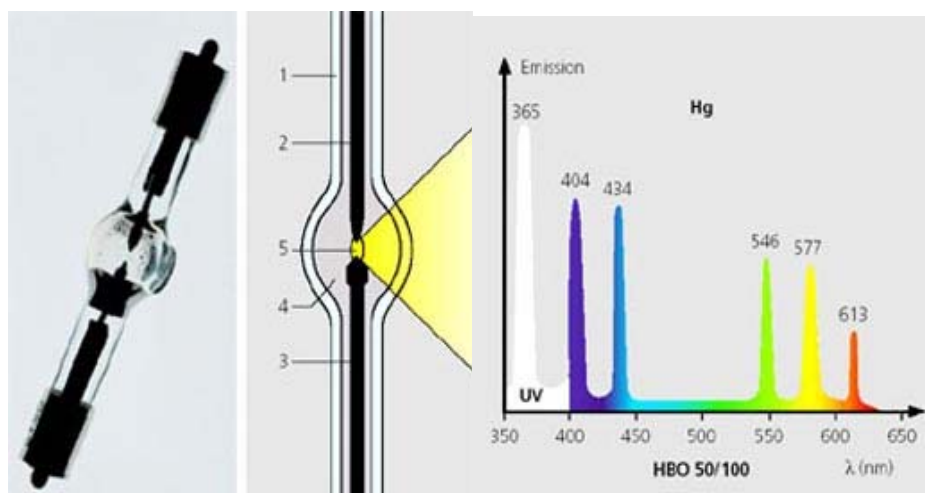


Figura 18. Sopra una lampada a vapori di mercurio con il suo schema di funzionamento. Alla sua destra il suo spettro di emissione.

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 ( $\lambda_1$ ) in una ristretta regione spettrale ed emettono luce con lunghezza d'onda maggiore di circa 20 - 50 nanometri ( $\lambda_2$ ) 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 (vedi figura che segue).

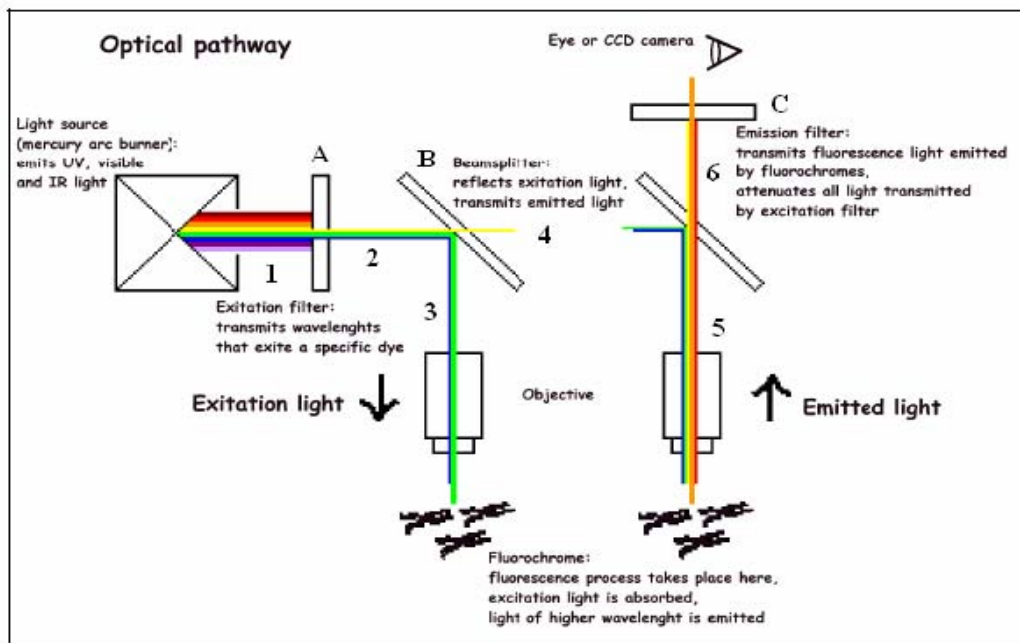


Figura 19. Schema semplificato del funzionamento di un microscopio a fluorescenza.

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 il lavoro della presente tesi è stato utilizzato un microscopio ottico ZEISS, modello AxioImager Z2, munito di fluorescenza, dotato di telecamera e collegato a un computer provvisto di programmi per la cattura e l'elaborazione delle immagini (IKAROS e ISIS4 - vers. 5.5). L'acquisizione delle immagini è avvenuta in modo manuale tramite la telecamera.



Figura 20. Microscopio Zeiss-AxioImager Z2, PC e programma di cattura di analisi di metafasi.

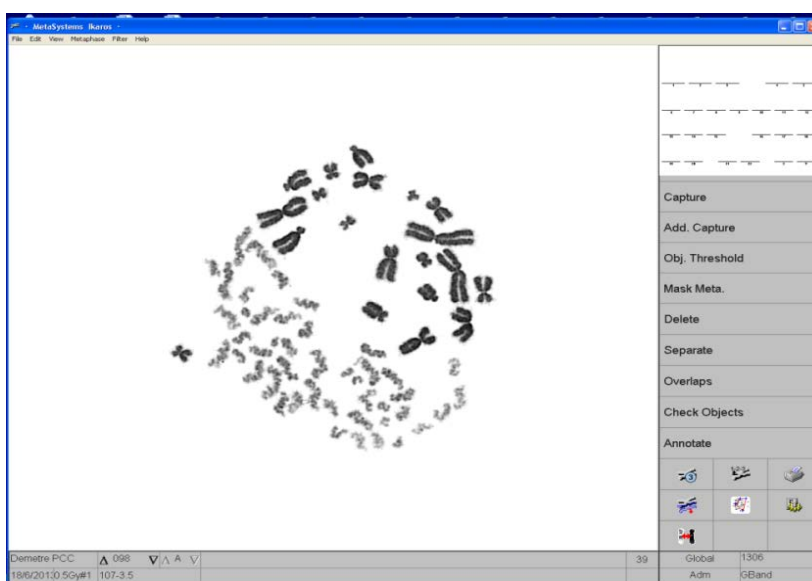


Figura 21. La schermata del programma nella fase di acquisizione di un'immagine in Giemsa.

Nella Fig. 22 è riportata una metafase colorata con sonde PNA con indicazione del danno cromosomico prodotto dopo l'irraggiamento a 4Gy di raggi gamma. Nelle Fig. 23, 24 e 25 che seguono vengono riportate le immagini dei singoli canali di acquisizione che forniscono al lettore non solo una chiara idea della facilità di individuare le aberrazioni cromosomiche presenti, ma anche la possibilità, analizzando separatamente il singolo canale, di dare risposte oggettive su eventuali dubbi provenienti dall'analisi della sola immagine composita.

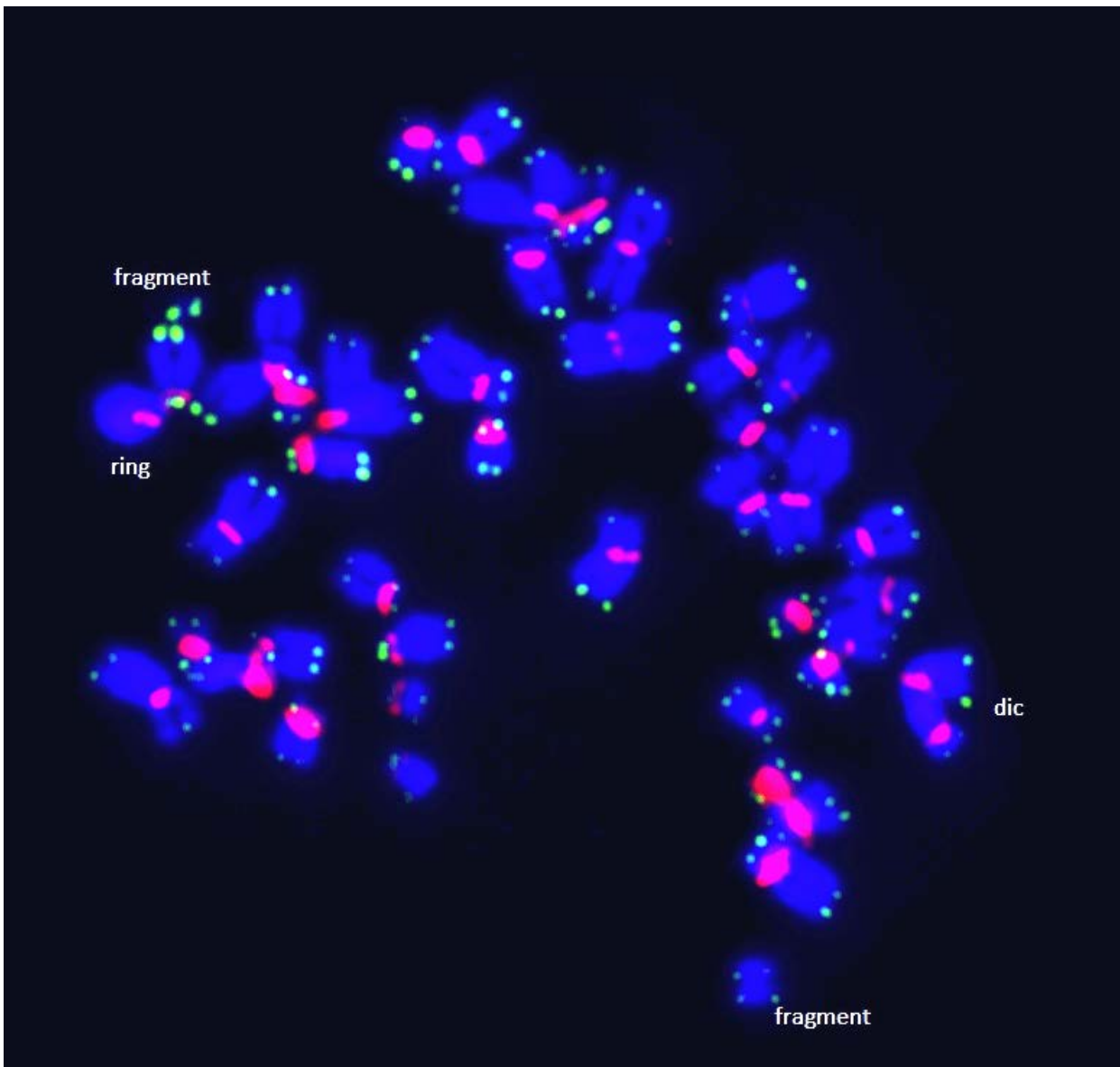


Figura 22. La schermata del programma nella fase di acquisizione di un'immagine risultante dalla sovrapposizione dei singoli canali (blu, DAPI – per la cromatina, verde FITC – per i telomeri dei cromosomi, rosso, TRITC per i centromeri).

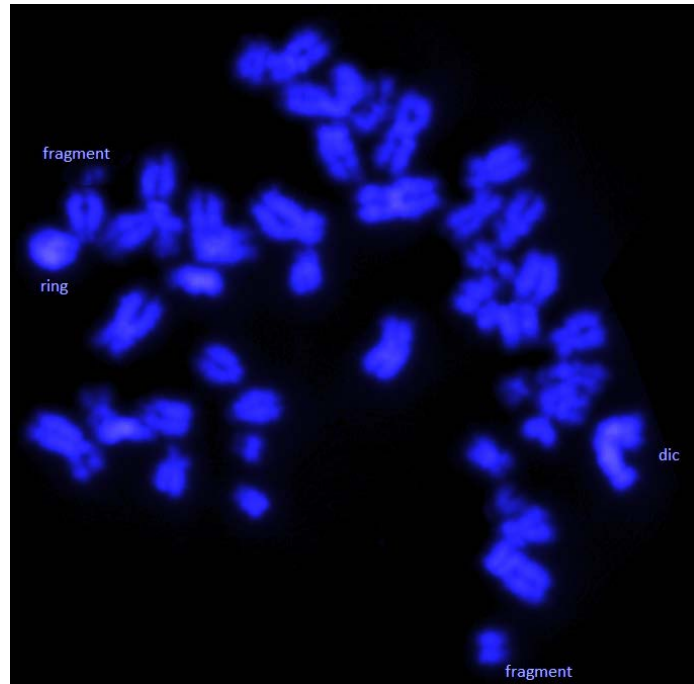


Figura 23. La schermata del programma nella fase di acquisizione dell'immagine della Fig. 22 sul singolo canale blu (DAPI) per la cromatina.

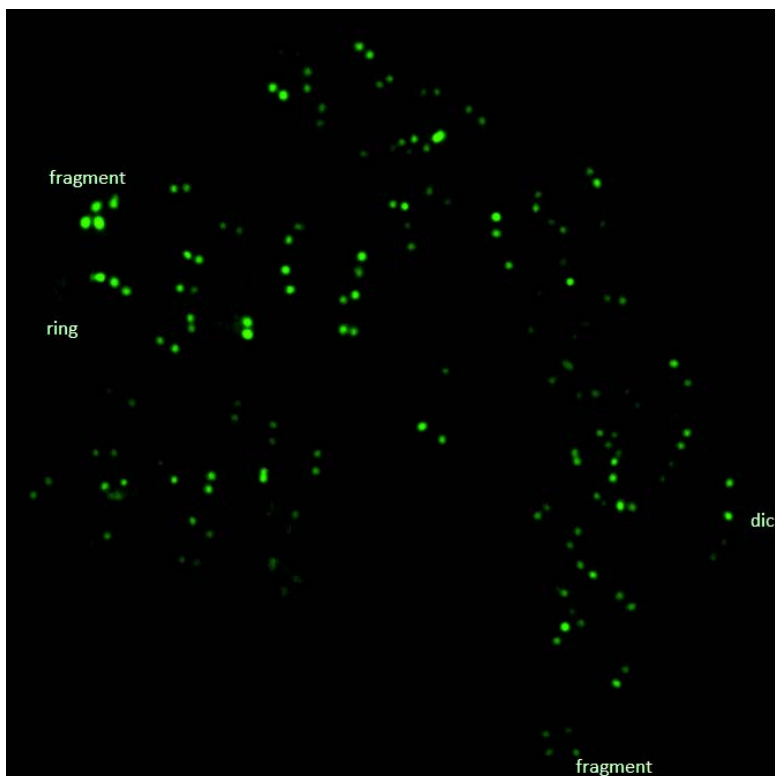


Figura 24. La schermata del programma nella fase di acquisizione dell'immagine della Fig. 22 sul singolo canale verde (FITC) per i telomeri.

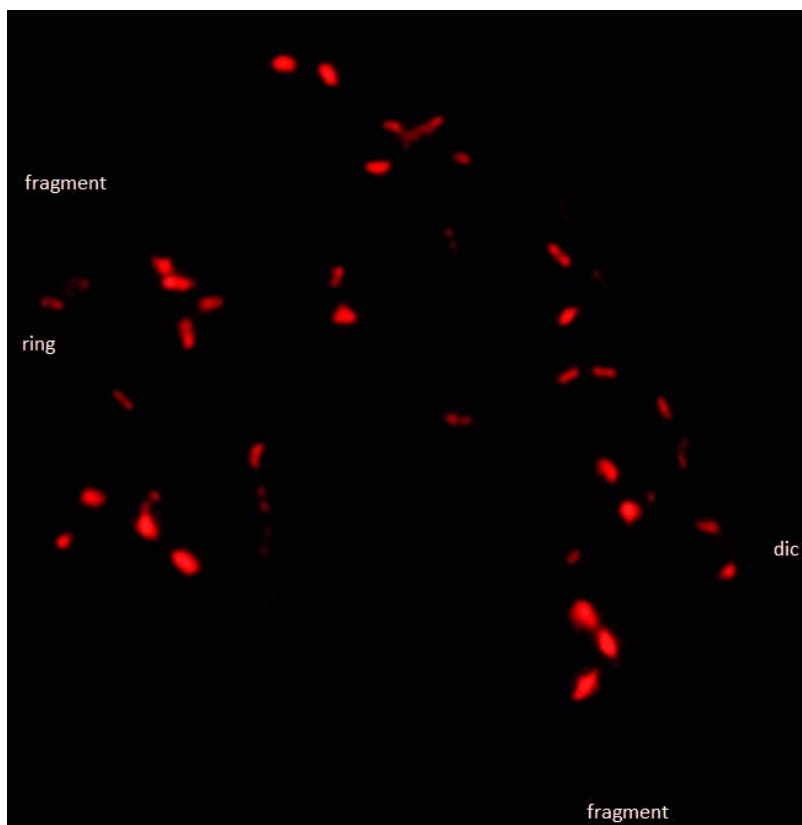


Figura 25. La schermata del programma nella fase di acquisizione dell'immagine della Fig. 22 sul singolo canale rosso (TRITC) per i centromeri.

Si passa all'analisi di tutte le metafasi presenti su ogni vetrino procedendo in modo metodico per coprire la sua intera area. Inizialmente si utilizza un ingrandimento basso (obiettivo 20 o 40X) per individuare le metafasi che possono avere 40 o più oggetti (cromosomi), poi si passa a ingrandimenti superiori (100X per immersione in olio) per verificare la qualità della metafase e la possibilità di procedere alla sua analisi. Questo dipende dalla nitidezza dell'immagine, dalla torsione e sovrapposizione dei cromosomi (soprattutto in Giemsa). Solo metafasi che hanno 46 o più cromosomi si prendono in considerazione. Le aberrazioni cromosomiche considerate, per la costruzione di curve di calibrazione, sono solo ed esclusivamente quelle instabili dei dicentrici e degli anelli con un centromero (golden standard per la dosimetria biologica in Giemsa staining). Si contano quindi per metafase i cromosomi con 2 centromeri (dicentrici), accompagnati da un frammento acentrico (acentric fragment) – numero di oggetti presenti 46 – e di anelli con centromero, accompagnati da un frammento – numero di oggetti presenti 47. La somma di queste 2

aberrazioni cromosomiche per metafase viene messa in grafico in funzione della dose data espressa in Gray (Gy), 1Gy corrisponde a 1 Joule/kg. In caso di presenza, alle alte dosi, di cromosomi tricentrici o multicentrici essi vanno contati come (n-1) dicentrici e mantengono la regola che devono essere accompagnati da (n-1) frammenti acentrici. I frammenti acentrici si presentano in colorazione FISH con 4 telomeri (compound fragments) o con 2 telomeri nel caso della FISH in PCC (presenza di una sola cromatina). Nel caso di frammenti acentrici con meno telomeri, si parla di frammento terminale (terminal fragment). Sono altresì individuati anelli senza centromero (acentric rings) in colorazione FISH DNA senza telomeri - si parla di frammenti interstiziali (interstitial fragments) – nonché cromosomi con centromero ma con numero di telomeri incompleto (incomplete chromosomes).

Attenzione è stata data nel caso dell'irraggiamento con raggi gamma dei linfociti del sangue periferico e della condensazione prematura dei cromosomi in presenza di cellule CHO secondo il metodo di Pantelias e Maillie (Pantelias e Maillie, 1983). In particolare, per studiare la conversione delle lesioni molecolari del DNA in lesioni di cromosomi prematuramente condensati sotto l'effetto della fosforilazione della cromatina e dell'attività del fattore MPF (Mitosis Promoting Factor) delle cellule che promuovono la condensazione prematura dei cromosomi, linfociti si fondono con cellule mitotiche CHO immediatamente dopo l'irraggiamento, alla distanza di 10 ore e di 24 ore da esso. I frammenti riscontrati in eccesso immediatamente dopo l'irraggiamento e alle varie distanze temporali indicate, rispetto ai controlli, vanno riportate in grafico in funzione della dose di radiazioni data. Inoltre la formazione di dicentrici avvenuta dopo circa un'ora, per cattiva riparazione o non riparazione delle doppie rotture nel DNA in seguito all'irraggiamento, viene individuata, a 10h e 24 h di distanza dalla fusione, con la tecnica FISH colorando con apposite sonde il centromero e i telomeri dei linfociti umani. Il numero di aberrazioni cromosomiche (AC) per cellula viene riportata nei due casi in funzione della dose.



## II.6 Condizioni di irraggiamento

L'irraggiamento dei campioni avviene utilizzando una sorgente di  $^{60}\text{Co}$  panoramica (gamma beam) collocata presso i Laboratori Nazionali di Legnaro. Per verificare la dosimetria della sorgente di cobalto si è proceduto al confronto tra dosimetri a termoluminescenza (TLD) irraggiati con l'irraggiatore della Thermo SCIENTIFIC, che include una sorgente di  $^{90}\text{Sr}$  di attività pari a 18 MBq, e gli stessi irraggiati con la sorgente di  $^{60}\text{Co}$ . In questo irraggiatore i dosimetri sono disposti su un supporto circolare il quale, mediante un meccanismo automatizzato incluso nello strumento, ruota permettendo un irraggiamento uniforme dei TLD. Il rateo di esposizione alla sorgente di  $^{90}\text{Sr}$  è pari a 8,18 mR per rotazione equivalente a 71,13  $\mu\text{Gy}$  per giro.

Sono stati scelti 10 TLD (non calibrati) e sono stati irraggiati a 10 valori diversi di dose compresi tra 71  $\mu\text{Gy}$  e 80 mGy. I dosimetri a termoluminescenza sono stati letti con un lettore Hersaw 3500 e successivamente azzerati.

E' stata osservata una linearità della carica raccolta (il segnale luminoso emesso dai dosimetri in fase di controllato riscaldamento si moltiplica con un fotomoltiplicatore e si trasforma in carica elettrica) in funzione della dose (v. grafico), ed è stato valutato un fattore di conversione carica/dose pari a 0,63  $\mu\text{C}/\text{mGy}$  equivalente a quanto ricavato precedentemente irraggiando i dosimetri con una sorgente gamma di  $^{137}\text{Cs}$ . Sulla base di questo valore si è quindi calcolato un valore di rateo di dose pari a 1 Gy/min ad una distanza di circa 20 cm dalla sorgente di  $^{60}\text{Co}$  ed un valore pari a 0,5 Gy/min alla distanza di circa 30 cm.

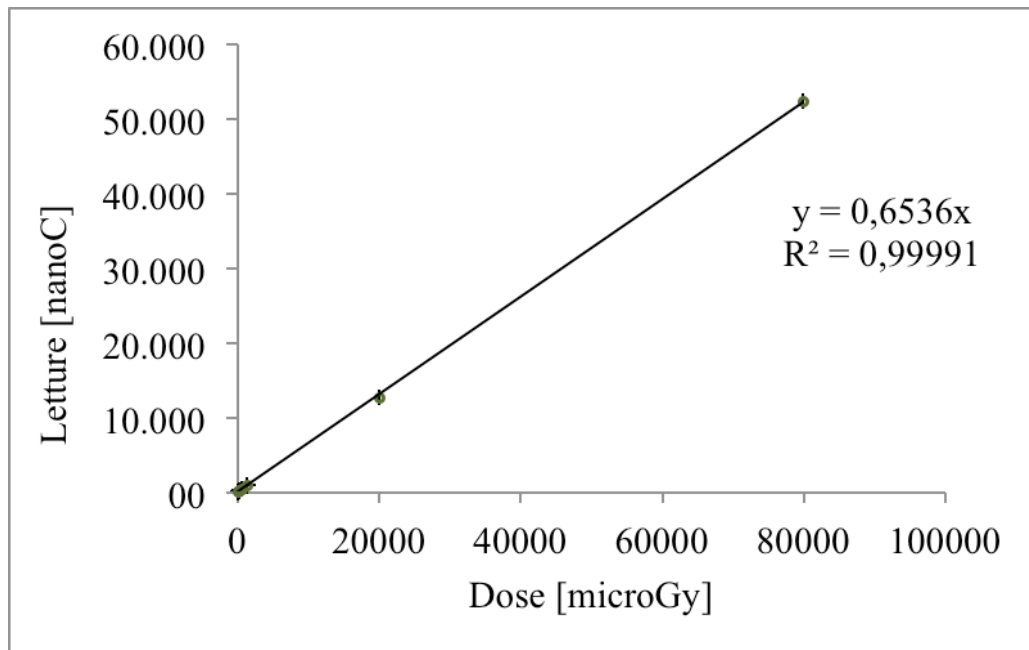


Figura 26. Curva dose risposta (espressa in carica elettrica) dei dosimetri a TLD utilizzati per la caratterizzazione del campo di radiazione.

Tutti gli irraggiamenti dei campioni riportati in questa relazione sono stati effettuati con una sorgente di  $^{60}\text{Co}$ , alla distanza di 30 cm, con un rateo di dose pari 0,5 Gy/minuto.

## V. RISULTATI E DISCUSSIONE

### III.1 Dosimetria Biologica delle radiazioni ionizzanti con metodologie citogenetiche classiche

La metodologia citogenetica classica della dosimetria biologica presuppone la coltura di linfociti T del sangue periferico umano per 48 ore in presenza di fattori mitogeni come è stato analiticamente descritto precedentemente. I linfociti si differenziano, entrano e avanzano nel ciclo cellulare e le aberrazioni cromosomiche instabili, come dicentrici ed anelli con centromero, si valutano nella prima mitosi dopo l'inizio della coltura cellulare (fig. 27 e 28).



Figura 27. Cromosomi normali come si presentano in metafase dopo coltura di sangue periferico non irraggiato e colorati con soluzione Giemsa.

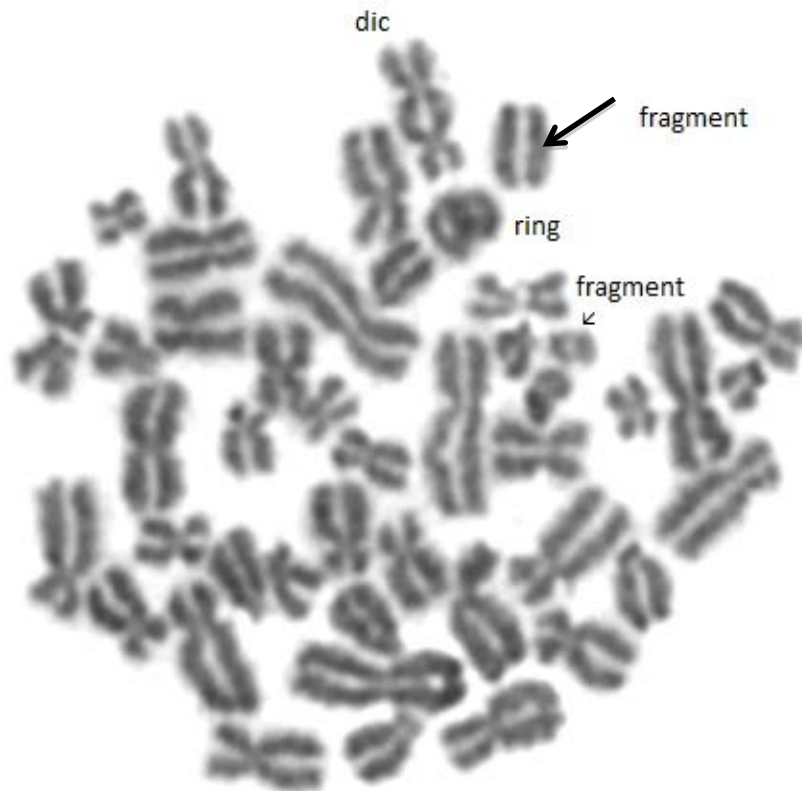


Figura 28. Aberrazioni cromosomiche come dicentrici, anelli e frammenti senza centromero dopo l'esposizione a 4 Gy di raggi gamma (colorati con soluzione Giemsa).

I campioni di sangue periferico da irraggiare, provenienti da tre donatori sani di età tra i 35 e i 55 anni, sono stati 3, due di sesso femminile e uno di sesso maschile. Ogni campione (5 ml) è stato diviso in nove provette da 0,5 ml e otto di loro sono state irraggiate con raggi gamma provenienti da una sorgente di  $^{60}\text{Co}$  a dosi da 0,3 Gy a 5 Gy mentre il nono campione è servito come controllo. Il numero totale delle metafasi analizzate in microscopio ottico sono state circa 6.070.

Le aberrazioni cromosomiche analizzate sono in relazione con la dose (D) attraverso una equazione lineare quadratica di tipo  $f = y_0 + \alpha D + \beta D^2$ , ove f sono le aberrazioni cromosomiche per cellula riscontrate.

L'obiettivo della costruzione della curva di calibrazione è di determinare quei valori dei coefficienti  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $y_0$  che interpolano nel modo migliore i dati. Per i dicentrici, l'irraggiamento con raggi gamma produce una distribuzione del danno il quale è molto ben rappresentato da una distribuzione di Poisson.

Il fatto che la curva di interpolazione dei dati si basi su statistica di tipo Poissoniano, obbliga che sia verificato, per ogni dose utilizzata per costruire la curva di calibrazione, che la distribuzione delle aberrazioni cromosomiche nelle cellule segua una distribuzione di Poisson. Il test statistico maggiormente utilizzato in dosimetria biologica per fare questo è l'u-test (Rao, 1956 e Savage, 1970). Tale test statistico è un'unità normalizzata dell'indice di dispersione ( $\sigma^2/y$ ), ove  $\sigma^2$  è la varianza e  $y$  la media dei valori; per una distribuzione di Poisson l'indice deve essere uguale a 1. Valori di  $u$  superiori a 1,96 indicano sovradisersione dei dati mentre valori minori di -1,96 indicano una sottodispersione. L'equazione utilizzata per la verifica che i dati ottenuti soddisfano una distribuzione di Poisson è sotto riportata:

$$u = [(\sigma^2/y) - 1] * \sqrt{\frac{n-1}{2(1-\frac{1}{N})}}$$

ove:  $\sigma^2$  indica la varianza,  $y$  indica la media,  $N$  indica il numero delle cellule analizzate e  $X$  il numero di aberrazioni cromosomiche riscontrate.

La frequenza dei dicentrici riportata come fondo naturale è nell'intervallo 1-2 dicentrici ogni 1000 cellule e il limite minimo di rivelazione della metodica delle CAA è collocata ad una dose di 100 mGy (0,1 Gy). Quindi la presenza di 1 cromosoma dicentrico per 500 cellule analizzate, viene interpretato come una dose assorbita di 100 mGy, anche se esiste una probabilità del 50% che i dicentrici osservati non siano attribuibili ad una dose assorbita. In questa regione di basse dosi il metodo del CAA è più qualitativo, ma sempre utile per individuare e confermare l'autenticità di una esposizione sospetta quando combinato insieme ad altre metodiche di investigazione.

La probabilità di trovare 2-3 dicentrici in 500 metafasi a individui non esposti alle radiazioni ionizzanti è molto piccola (0,05) e l'affidabilità della metodica viene considerevolmente aumentata quando vengono individuati due o più dicentrici.

I risultati citogenetici complessivi ottenuti dai tre campioni di sangue irraggiati con raggi gamma e utilizzati per la costruzione della curva di calibrazione, la distribuzione delle aberrazioni cromosomiche nelle cellule e i risultati del test statistico u-test, sono riportati nella tabella che segue.

Tabella 1. Risultati citogenetici ottenuti dai campioni di sangue irraggiati con raggi gamma da  $^{60}\text{Co}$ .

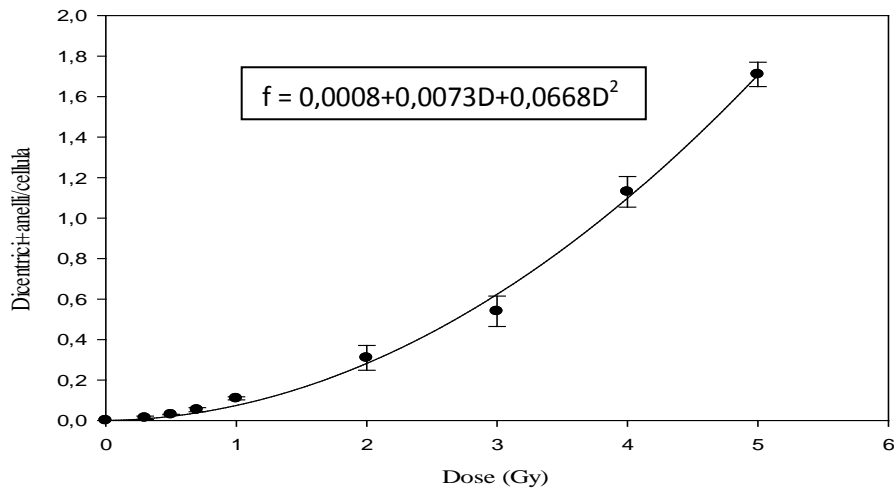
Distribuzione delle aberrazioni cromosomiche nelle cellule

Dose (Gy)	Metafasi	Num AC	0	1	2	3	4	5	6	$\sigma^2/y$	u
0	2468	2	2466	2						1,00	-0,02
0,3	994	14	980	14						0,99	-0,30
0,5	540	16	524	16						0,97	-0,47
0,7	404	22	382	22						0,95	-0,76
1	500	53	448	51	1					0,97	-0,47
2	501	155	368	116	14	2		1		1,09	1,38
3	291	156	176	80	30	4	1			1,08	1,00
4	175	197	47	73	44	9	1	1		0,76	-2,23
5	198	338	30	59	63	36	6	3	1	0,79	-2,11

Dai valori ottenuti di u si può notare che, per le dosi alte di 4 e 5 Gy, si hanno valori leggermente minori di -1,96 e quindi una sottodispersione dei dati indicativa di un qualche problema nel campionamento degli stessi.

La curva di calibrazione, aberrazioni cromosomiche per cellula in funzione della dose data, ottenuta dai dati sopra riportati è graficamente riportata nella Fig. 29. I valori medi e la deviazione standard riportata sono calcolati da tre esperimenti (donatori) indipendenti. Nel grafico viene altresì riportata l'equazione lineare quadratica con i coefficienti  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $y_0$ . Utilizzando il programma SigmaPlot ver. 13.0 si è proceduto alla verifica della bontà del fit della curva e al calcolo del valore p per i coefficienti alfa e beta dell'equazione lineare quadratica.

**Curva Dose risposta - Media di 3 donatori**



**Analisi statistica**

$f = y_0 + a \cdot x + b \cdot x^2$

R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate
0,9982	0,9965	0,9959	0,0384

	Coefficient	Std. Error	t	P
y0	0,0008	0,0000	(+inf)	<0,0001
a	0,0073	0,0194	0,3752	0,7186
b	0,0668	0,0046	14,3826	<0,0001

**Analysis of Variance:**

	DF	SS	MS
Regression	2	4,5945	2,2972
Residual	7	0,0103	0,0015
Total	9	4,6048	0,5116

Corrected for the mean of the observations:

	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	2,9055	2,9055	1966,8391	<0,0001
Residual	7	0,0103	0,0015		
Total	8	2,9159	0,3645		

Figura 29. Giemsa - Relazione dose risposta per la produzione di aberrazioni cromosomiche (dicentrici ed anelli) per cellula in seguito ad irraggiamento con raggi gamma a varie dosi. Valori medi  $\pm$  SD sono calcolati da tre esperimenti indipendenti.

Dall'analisi statistica si evince che per questo caso la variabile dose non risulta statisticamente significativa ( $p = 0,72$ ). Risulta però statisticamente significativo il quadrato della dose. L'adattabilità del modello ai dati osservati è molto alta ( $R^2$  molto prossimo a 1) e i residui del modello hanno un impatto molto basso sul modello stesso. E' da sottolineare che la curva da noi costruita e riportata in Fig. 29 è in buon accordo con la curva universale di calibrazione per radiazioni di basso LET (raggi gamma) pubblicata nell'anno 2011 dalla Commissione Internazionale dell'Energia Atomica di Vienna e riportata in Fig. 1 di questa tesi.

In figura 30 che segue, giusto per confronto, vengono riportate le singole curve dose risposta ottenute dai dati dei tre singoli donatori. Come si evince dal grafico, le aberrazioni cromosomiche ottenute per dose sono molto vicine, le curve quasi coincidono e questo si riflette sull'errore piccolo riportato nei punti sperimentali della fig.29.

### Giemsa - Curve Dose risposta dei tre donatori separatamente

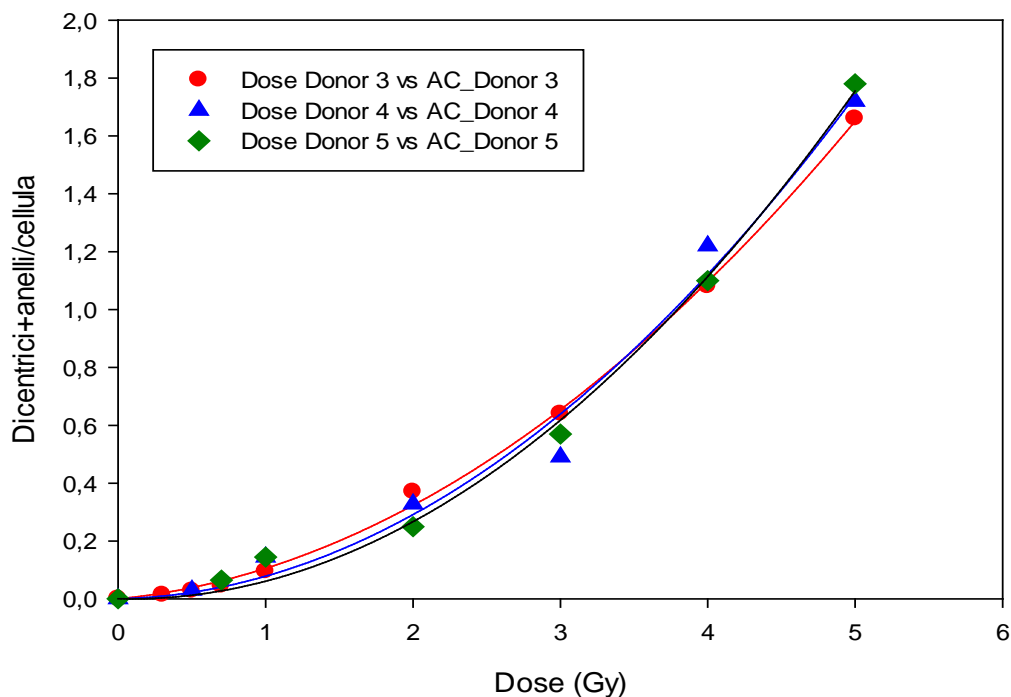


Figura 30. Curve dose risposta, separate per ogni donatore, per la produzione di aberrazioni cromosomiche (dicentrici ed anelli) per cellula in seguito ad irraggiamento con raggi gamma a varie dosi.



## ANALISI STATISTICA

### DONATORE 3

<b>R</b>	<b>Rsqr</b>	<b>Adj Rsqr</b>	<b>Standard Error of Estimate</b>
0,9994	0,9988	0,9986	0,0216

	<b>Coefficient</b>	<b>Std. Error</b>	<b>t</b>	<b>P</b>
y0	0,0006	0,0000	(+inf)	<0,0001
a	0,0492	0,0109	4,5007	0,0028
b	0,0562	0,0026	21,5036	<0,0001

#### **Analysis of Variance:**

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>
Regression	2	4,4773	2,2386
Residual	7	0,0033	0,0005
Total	9	4,4805	0,4978

Corrected for the mean of the observations:

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Regression	1	2,7589	2,7589	5898,7850	<0,0001
Residual	7	0,0033	0,0005		
Total	8	2,7622	0,3453		

### DONATORE 4

<b>R</b>	<b>Rsqr</b>	<b>Adj Rsqr</b>	<b>Standard Error of Estimate</b>
0,9927	0,9855	0,9826	0,0869

	<b>Coefficient</b>	<b>Std. Error</b>	<b>t</b>	<b>P</b>
y0	0,0008	0,0000	(+inf)	<0,0001
a	0,0106	0,0465	0,2273	0,8292
b	0,0674	0,0111	6,0944	0,0017

#### **Analysis of Variance:**

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>
Regression	2	4,7796	2,3898
Residual	5	0,0378	0,0076
Total	7	4,8174	0,6882

Corrected for the mean of the observations:

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Regression	1	2,5678	2,5678	340,0542	<0,0001
Residual	5	0,0378	0,0076		
Total	6	2,6056	0,4343		

### DONATORE 5

<b>R</b>	<b>Rsqr</b>	<b>Adj Rsqr</b>	<b>Standard Error of Estimate</b>
0,9977	0,9955	0,9946	0,0485

	<b>Coefficient</b>	<b>Std. Error</b>	<b>t</b>	<b>P</b>
y0	0,0010	0,0000	(+inf)	<0,0001
a	-0,0122	0,0254	-0,4805	0,6512
b	0,0726	0,0061	11,9978	<0,0001

#### **Analysis of Variance:**

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>
Regression	2	4,7793	2,3897
Residual	5	0,0117	0,0023
Total	7	4,7911	0,6844

Corrected for the mean of the observations:

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Regression	1	2,5942	2,5942	1104,4053	<0,0001
Residual	5	0,0117	0,0023		
Total	6	2,6059	0,4343		

Dall'analisi statistica delle singole curve si nota che per i donatori 4 e 5 la variabile dose non risulta statisticamente significativa (rispettivamente  $p = 0,83$  e  $p = 0,65$ ). Risulta però statisticamente significativo il quadrato della dose. L'adattabilità del modello ai dati osservati è molto alta ( $R^2$  molto prossimo a 1) e i residui del modello hanno un impatto molto basso sul modello stesso.

Per poter produrre una stima di dose con una incertezza statistica piccola abbastanza per essere considerata un valore, deve essere analizzato un numero molto grande di cellule. La decisione su quante cellule vanno analizzate è un compromesso basato sull'importanza del caso, sulla manodopera disponibile ad analizzare le cellule e sulla qualità dei preparati. In particolare per le dosi alte (diversi Gy) il numero dei linfociti umani potrebbe essere limitato e questo influisce sul numero delle metafasi presenti sui vetrini. Ad ogni modo, se il numero delle aberrazioni cromosomiche presenti è alto, l'analisi di alcune decine di metafasi è sufficiente per avere una valutazione della dose ragionevole (IAEA, 2011).

Per dosi inferiori, ove il numero delle cellule disponibili non costituisce un fattore di limitazione, una valutazione della dose si può fare analizzando circa 500 cellule. Per dosi prossime allo zero o per i controlli, risulta necessaria l'analisi di un numero di cellule tra 500 e 1000 o anche di più; la decisione di estendere l'analisi oltre le 1000 cellule dipende dalla presenza di elementi che lascino pensare ad una seria sovraesposizione che giustifichi tale estensione o se il proseguimento dell'impiego continuo del lavoratore esposto alle radiazioni sia a rischio. Come regola generale la letteratura suggerisce che 500 cellule analizzate o 100 dicentrici riscontrati sono sufficienti a produrre una valutazione della dose ragionevolmente accurata.

Una volta noto il numero delle aberrazioni cromosomiche per cellula non esiste nessuna difficoltà nel calcolo della dose; esistono però vari modi per calcolare l'incertezza sulla dose. Lo scopo è di esprimere l'incertezza in termini di un intervallo di confidenza e prassi comune è di esprimere limiti al 95%. I limiti di confidenza al 95% definiscono un intervallo che contiene la dose

vera almeno nel 95% delle occasioni. La difficoltà nel calcolo dei limiti di confidenza sorge dal fatto che ci sono due componenti legati all'incertezza: uno proviene dalla distribuzione di Poisson delle aberrazioni riscontrate nel campione della persona esposta alle radiazioni e l'altro dalle incertezze associate alla curva di calibrazione le quali sono, approssimativamente, normalmente distribuite. Il problema è stato molto discusso in letteratura (Savage, 2000, Merkle, 1983, Szluinska, 2007) e la soluzione più semplice è stata proposta da Merkle e qui adottata.

Tale approccio contiene i seguenti passaggi:

- a) noto il numero di aberrazioni cromosomiche per cellula per ogni dose e in presenza di una curva di calibrazione, assumendo una distribuzione di Poisson delle aberrazioni, si risolve l'equazione lineare quadratica rispetto ad ogni dose e si ottiene una nuova singola dose;
- b) noto il numero delle aberrazioni precedentemente riscontrate per dose, utilizzando la tabella riportata da E.L. Crow et.al (1959), si ottiene per ogni valore della variabile "aberrazioni" il suo valore Upper e Lower per un coefficiente di 0,95 e quindi, conoscendo il numero delle metafasi analizzate, si ottiene il valore Upper/cellula e Lower/cellula;
- c) nella dose ottenuta al punto a) si inseriscono nel termine noto i valori di Upper/cellula e Lower/cellula ottenuti al punto b) e si calcolano la dose Upper e la dose Lower;
- d) per ottenere le aberrazioni/cellula come coordinata Y, si risolve l'equazione con la dose pari al nuovo valore calcolato al punto c) (Upper e Lower);
- e) si riporta in grafico, uno per volta la dose Upper e la dose Lower con i valori delle aberrazioni/cellula ottenuti.

Nella Fig. 31, che segue, è riportata la curva di calibrazione della Fig. 29 con i suoi limiti di confidenza al 95% utilizzati per la stima di incertezze sulla dose calcolati con il metodo di Merkle precedentemente descritto.

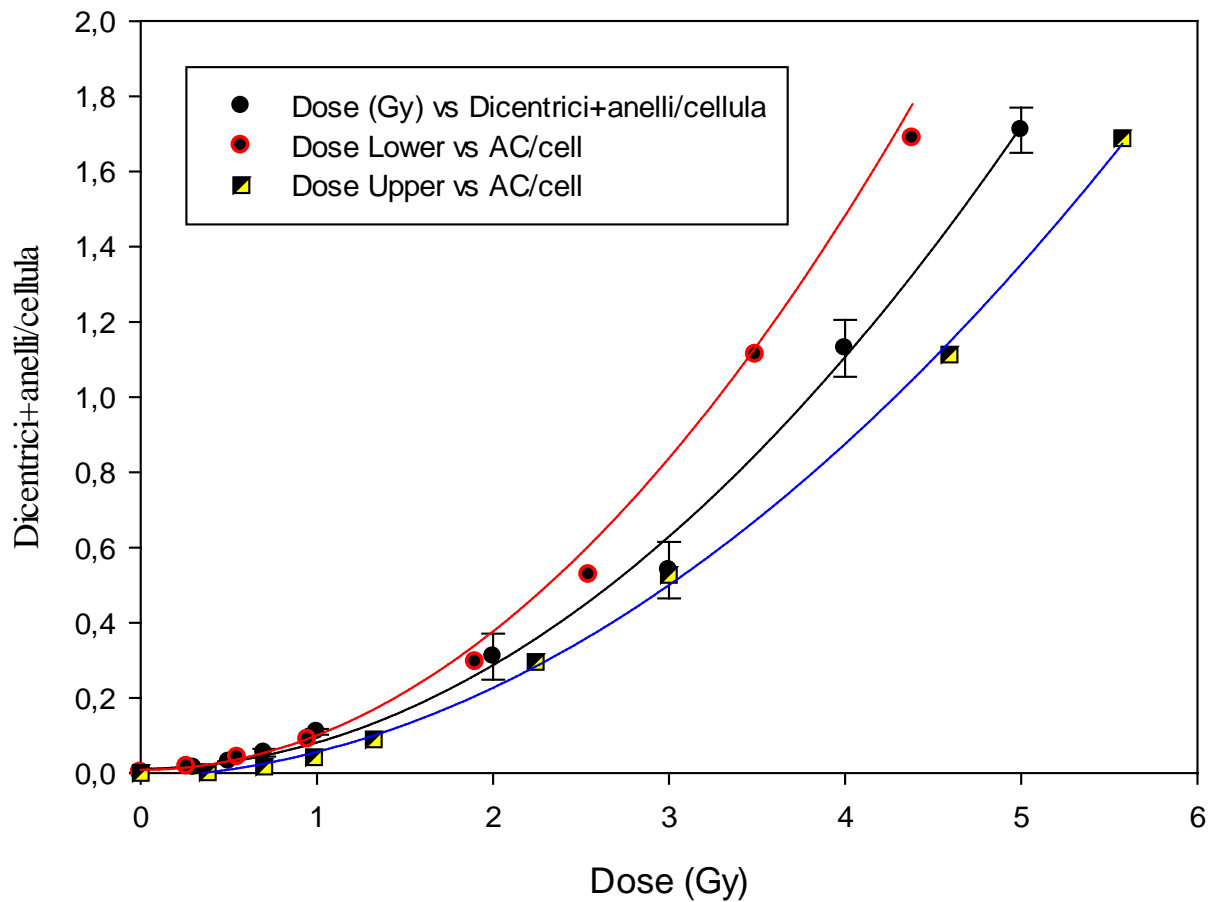


Figura 31. Giemsa - Curve dose-risposta con limiti di confidenza al 95% utilizzata per valutare l'incertezza sulla dose.

### Lower Dose Curve

<b>R</b>	<b>Rsqr</b>	<b>Adj Rsqr</b>	<b>Standard Error of Estimate</b>
0,9811	0,9626	0,9564	0,1294

	<b>Coefficient</b>	<b>Std. Error</b>	<b>t</b>	<b>P</b>
y0	0,0007	0,0000	(+inf)	<0,0001
a	0,0400	0,0756	0,5293	0,6156
b	0,0900	0,0206	4,3617	0,0048

#### Analysis of Variance:

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>
Regression	2	4,3623	2,1811
Residual	6	0,1004	0,0167
Total	8	4,4627	0,5578

Corrected for the mean of the observations:

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Regression	1	2,5845	2,5845	154,4684	<0,0001
Residual	6	0,1004	0,0167		
Total	7	2,6849	0,3836		

### Upper dose curve

<b>R</b>	<b>Rsqr</b>	<b>Adj Rsqr</b>	<b>Standard Error of Estimate</b>
0,9995	0,9989	0,9988	0,0208

	<b>Coefficient</b>	<b>Std. Error</b>	<b>t</b>	<b>P</b>
y0	-0,0000	0,0000	(+inf)	<0,0001
a	0,0075	0,0088	0,8507	0,4231
b	0,0526	0,0019	27,8086	<0,0001

#### Analysis of Variance:

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>
Regression	2	4,4596	2,2298
Residual	7	0,0030	0,0004
Total	9	4,4627	0,4959

Corrected for the mean of the observations:

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Regression	1	2,8783	2,8783	6642,2687	<0,0001
Residual	7	0,0030	0,0004		
Total	8	2,8814	0,3602		

Dall'analisi statistica delle curve di Lower Dose e di Upper Dose si nota che la variabile dose non è statisticamente significativa (rispettivamente  $p = 0,62$  e  $p = 0,42$ ). Risulta però statisticamente significativo il quadrato della dose. L'adattabilità del modello ai dati osservati è buona per la curva di Lower Dose e molto alta ( $R^2$  molto prossimo a 1) per la curva di Upper Dose mentre i residui del modello hanno un impatto basso sul modello stesso.

Un numero importante di incidenti da radiazioni ionizzanti con sovraesposizione avviene con dosi che rientrano nell'intervallo da 0,3 a 1 Gy. In Fig. 32 si riporta quella parte della curva di calibrazione, con i suoi limiti di confidenza al 95% utilizzati per la stima di incertezze sulla dose, nell'intervallo 0,2-1 Gy.

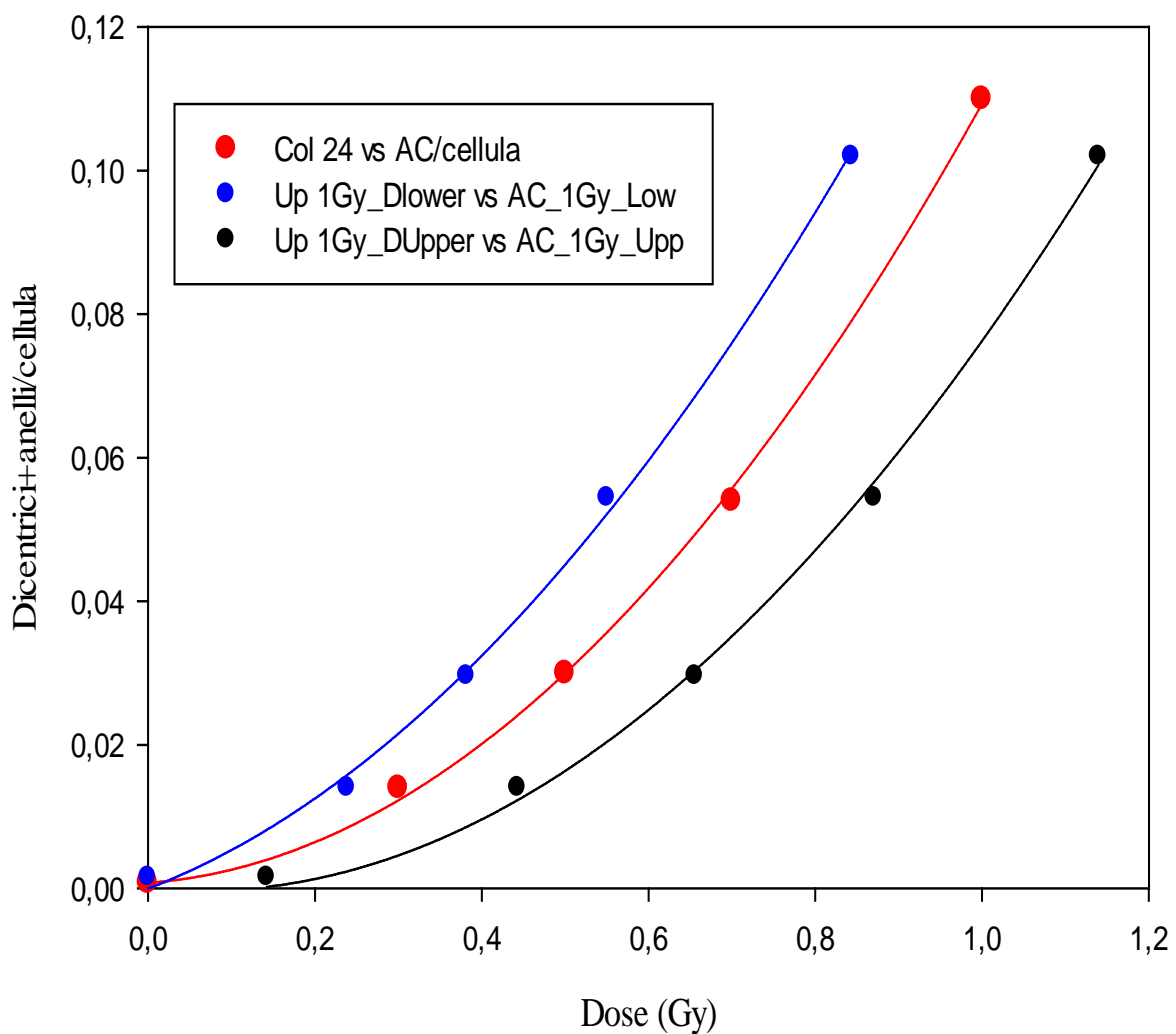


Figura 32. Giemsa - Curva di calibrazione dose risposta, con limiti di confidenza al 95% fino a 1 Gy di dose.

### Lower Dose Curve

**R**    **Rsqr**    **Adj Rsqr**    **Standard Error of Estimate**  
 0,9991   0,9981   0,9975    0,0020

	<b>Coefficient</b>	<b>Std. Error</b>	<b>t</b>	<b>P</b>
y0	-0,0000	0,0000	(+inf)	<0,0001
a	0,0444	0,0064	6,9075	0,0062
b	0,0916	0,0090	10,1951	0,0020

#### Analysis of Variance:

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>
Regression	2	0,0144	0,0072
Residual	3	1,1670E-005	3,8901E-006
Total	5	0,0144	0,0029

Corrected for the mean of the observations:

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Regression	1	0,0063	0,0063	1617,6208	<0,0001
Residual	3	1,1670E-005	3,8901E-006		
Total	4	0,0063	0,0016		

### Upper Dose Curve

**R**    **Rsqr**    **Adj Rsqr**    **Standard Error of Estimate**  
 0,9991   0,9982   0,9976    0,0020

	<b>Coefficient</b>	<b>Std. Error</b>	<b>t</b>	<b>P</b>
y0	-0,0000	0,0000	(+inf)	<0,0001
a	-0,0108	0,0048	-2,2243	0,1126
b	0,0871	0,0050	17,2534	0,0004

#### Analysis of Variance:

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>
Regression	2	0,0144	0,0072
Residual	3	1,1548E-005	3,8494E-006
Total	5	0,0144	0,0029

Corrected for the mean of the observations:

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Regression	1	0,0063	0,0063	1634,7774	<0,0001
Residual	3	1,1548E-005	3,8494E-006		
Total	4	0,0063	0,0016		

Dall'analisi statistica delle curve di Lower Dose e di Upper Dose fino a 1 Gy, si nota che la variabile dose non risulta statisticamente significativa per la curva di Upper Dose. Inoltre non si riesce a valutare dosi che sono inferiori a 0,2 Gy circa. Risulta statisticamente significativo il quadrato della dose. L'adattabilità del modello ai dati osservati è molto buona ( $R^2$  molto prossimo a 1) per tutte e due le curve mentre i residui del modello hanno un impatto basso sul modello stesso.

L'applicazione della metodologia di citogenetica classica sui linfociti del sangue periferico di campioni provenienti da tre donatori sani, ha permesso la costruzione di curve di calibrazione dose effetto come prerequisito fondamentale per la valutazione della dose in caso di incidente radiologico. E' stato riscontrato un basso livello di dicentrici nei controlli (background), pari a 0,8 per 1000 cellule. Questo è perfettamente consistente con altri dati pubblicati (Lloyd, 1980 e IAEA, 2011). La distribuzione dei cromosomi dicentrici e degli anelli seguono la distribuzione di Poisson per una serie di punti dose e presentano una leggera sottodispersione nelle dosi di 4 e 5 Gy. I coefficienti  $\alpha$  e  $\beta$  ottenuti sono in ottimo accordo con altri pubblicati in letteratura (Szluinska, 2005, IAEA, 2011, Beinke, 2010).

### **III.2 Dosimetria Biologica delle radiazioni ionizzanti utilizzando l'ibridizzazione fluorescente *in situ* (FISH) con sonde Peptidiche di Acido Nucleico (PNA)**

Nella sezione III.1 è stata prodotta la curva di calibrazione in seguito all'analisi di aberrazioni cromosomiche instabili dopo colorazione in soluzione di Giemsa. La metodologia è molto ben consolidata da decenni nella dosimetria biologica. Infatti, è stata applicata ampiamente per valutare la dose di individui coinvolti negli incidenti di Chernobyl, di Goiania (1987), di Tokaimura (1999) e di Fukushima (2011). L'analisi di cromosomi dicentrici, multicentrici e ad anello con centromero, necessitano però di personale ben formato ed esperto a causa delle difficoltà inerenti al metodo stesso.

La tecnica della FISH, ampiamente utilizzata da anni per visualizzare specifici cromosomi o geni potrebbe essere uno strumento estremamente utile per una precisa stima della dose ricevuta in seguito alla quantificazione dei vari tipi di anomalie cromosomiche riscontrate. Il fattore limitante che non ha permesso per anni l'applicazione della FISH nella dosimetria biologica standard è il lungo tempo necessario per l'invecchiamento (aging) del preparato sul vetrino (circa 3 giorni) e le



ulteriori 12 ore necessarie per l'ibridizzazione della sonda DNA al DNA del bersaglio (Garcia-Sagredo, 2008).

Il recente sviluppo di sonde peptidiche di acido nucleico (PNA), ove la base dello zucchero fosfato è sostituito con un polimero pseudo peptide sul quale sono attaccate le nucleo basi, offre grande affinità e specificità al bersaglio del DNA e quindi il tempo di ibridizzazione è molto minore (1h). La disponibilità di sonde PNA che possono colorare in modo altamente specifico il centromero e i telomeri dei cromosomi, ha permesso di poter utilizzare tali sonde e la FISH nel campo della dosimetria biologica. Il risultato che si ottiene è riportato nelle figure che seguono.

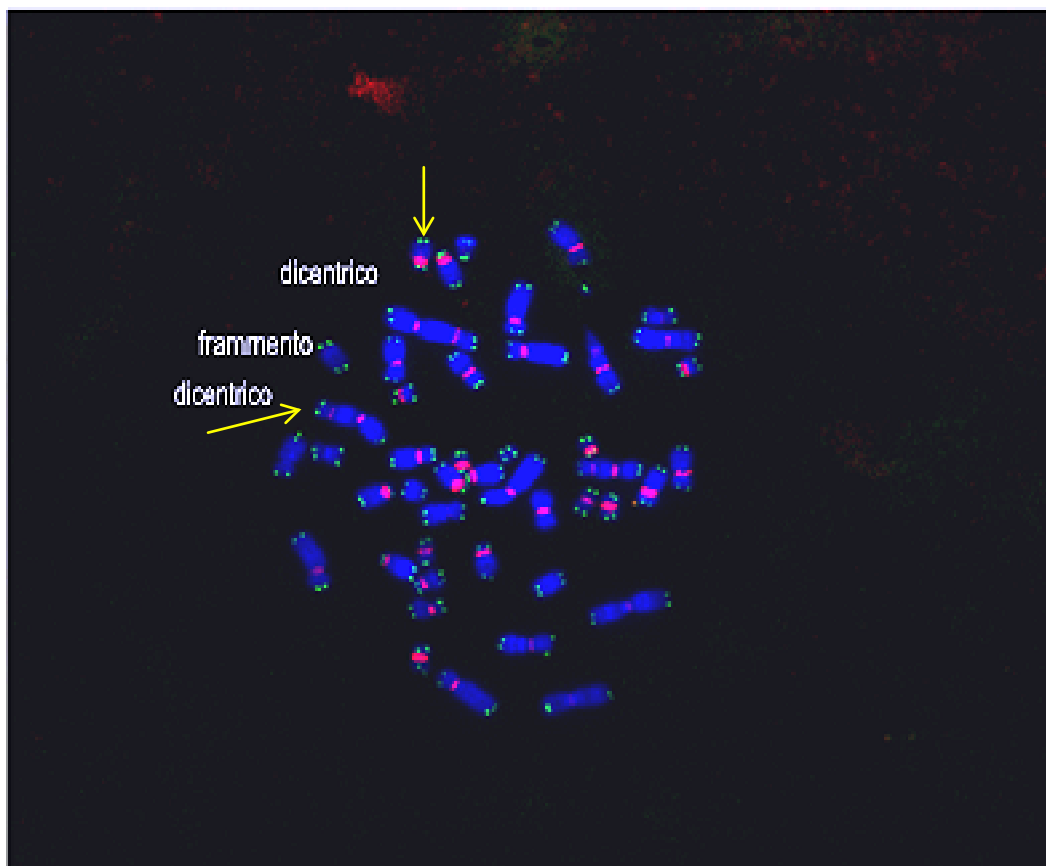


Figura 33. Metafase in FISH con centromeri e telomeri colorati con sonde PNA dopo irraggiamento gamma a 3 Gy. La facilità di individuare le aberrazioni cromosomiche è immediata.

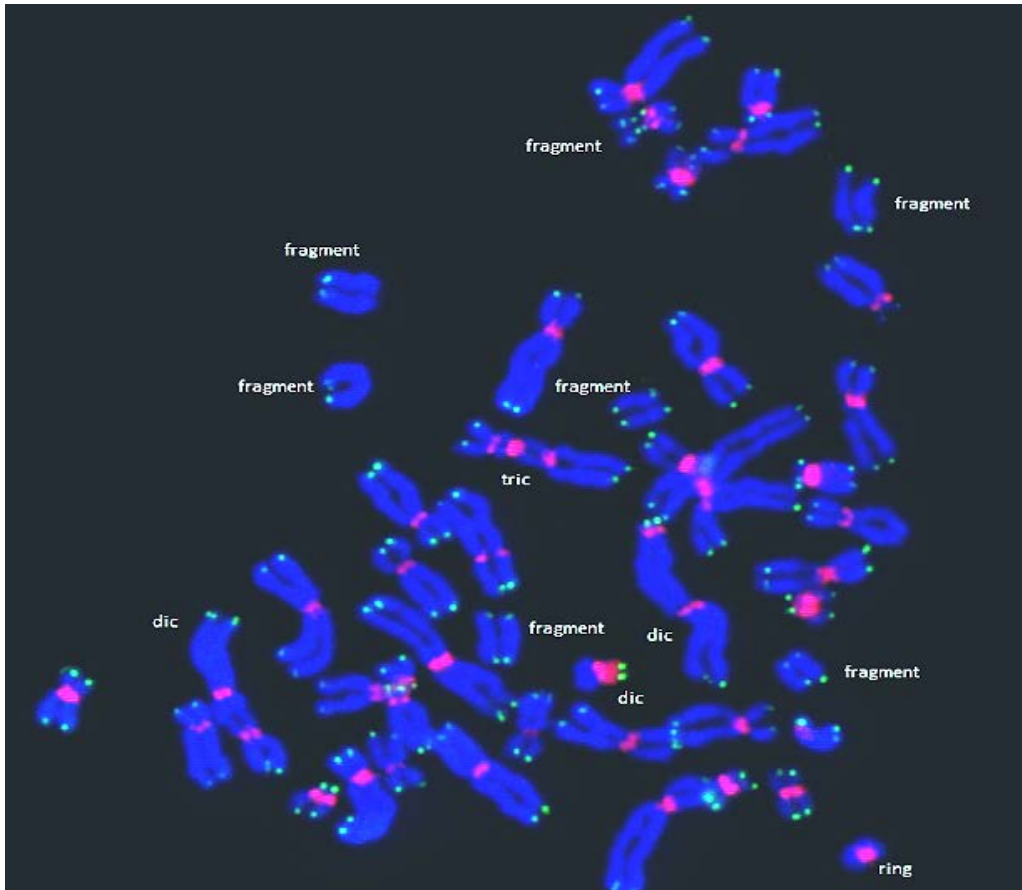


Figura 34. Metafase in FISH con centromeri e telomeri colorati con sonde PNA dopo irraggiamento gamma a 5 Gy; presenza di cromosomi dicentrici, tricentrici e ad anello con centromero.

E' degno di nota il fatto che il primo articolo in letteratura, ove la tecnica FISH con sonde PNA è stato applicato in dosimetria biologica, risale al 2012 (Shi 2012) contemporaneamente allo sviluppo della presente tesi di dottorato.

Tale metodologia risulta molto più veloce e accurata nell'individuare le aberrazioni cromosomiche evitando falsi positivi e negativi.

Nelle figure che seguono sono riportati alcuni casi che dimostrano in modo evidente i grandi vantaggi della metodologia applicata nel campo della dosimetria biologica.

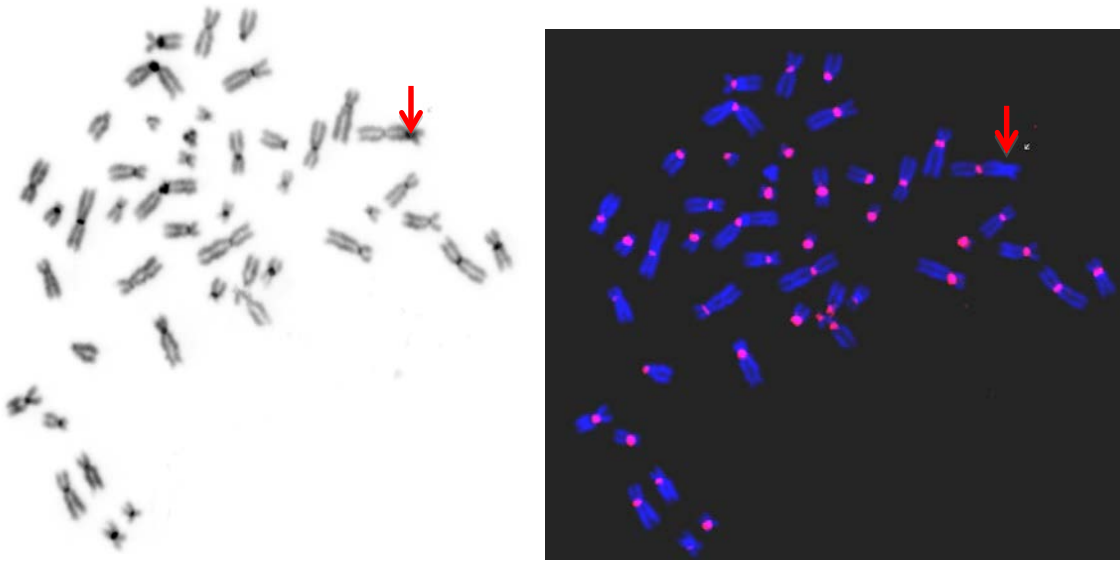


Figura 35. Metafase in Giemsa a sinistra e in FISH con centromeri e telomeri colorati con sonde PNA a destra. Il cromosoma indicato a sinistra (Giemsa) con la freccia sembra essere un dicentrico, invece in FISH si dimostra avere le cromatine incrociate e possedere un solo centromero.

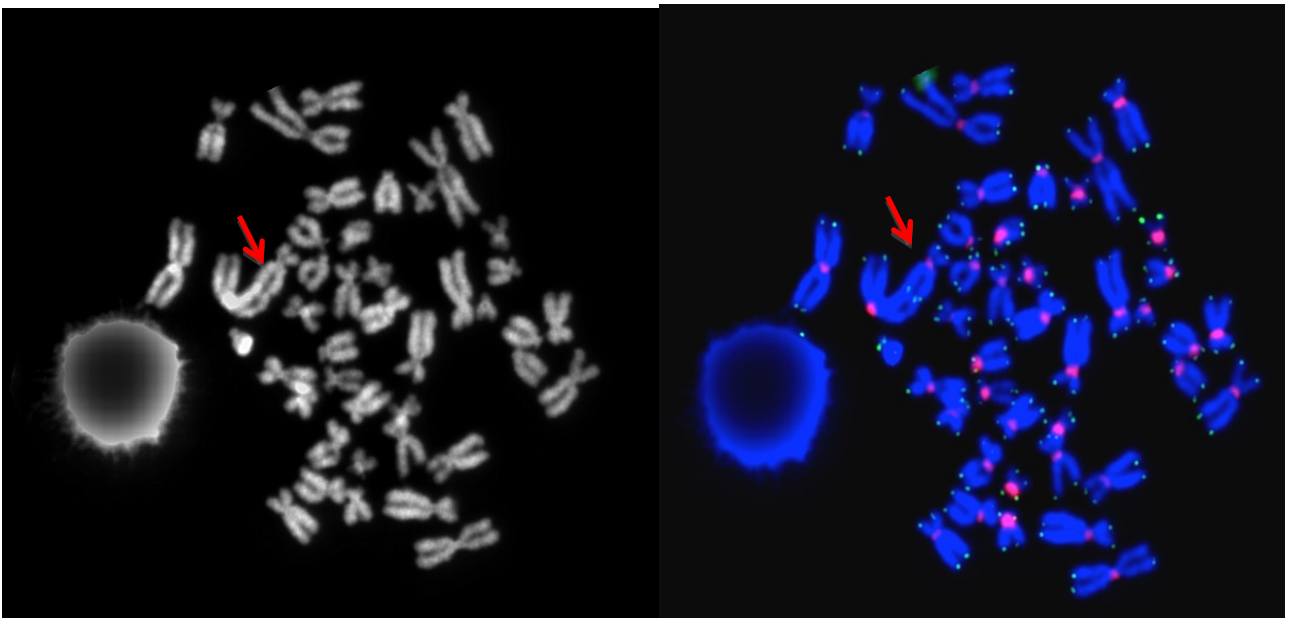


Figura 36. Metafase in Giemsa a sinistra e in FISH a destra con centromeri e telomeri colorati con sonde PNA. Il cromosoma indicato con la freccia in Giemsa sembra essere un dicentrico, invece in FISH è evidente che si tratta di due cromosomi distinti, come si evince dai telomeri presenti.

Confermata l'utilità della metodica si è proceduto alla costruzione di una curva di calibrazione utilizzando campioni di sangue dei tre donatori precedentemente riportati. Ogni campione (5 ml) è stato diviso in otto provette da 0,5 ml e sette di loro sono state irraggiate con raggi gamma provenienti da una sorgente di  $^{60}\text{Co}$  a dosi da 0,5 Gy a 5 Gy mentre l'ottavo campione è servito come controllo. Il numero totale delle metafasi analizzate al microscopio a fluorescenza sono state circa 1.940. Nella tabella che segue sono riportati i risultati citogenetici complessivi ottenuti dai tre campioni di sangue irraggiati con raggi gamma e utilizzati per la costruzione della curva di calibrazione, la distribuzione delle aberrazioni cromosomiche nelle cellule e i risultati del test statistico u test.

Tabella 2. Risultati citogenetici ottenuti da 3 campioni di sangue irraggiati con raggi gamma da  $^{60}\text{Co}$ . La tecnica FISH è stata applicata alle metafasi analizzate e i centromeri e i telomeri dei cromosomi sono stati colorati con sonde PNA.

Distribuzione delle aberrazioni cromosomiche nelle cellule

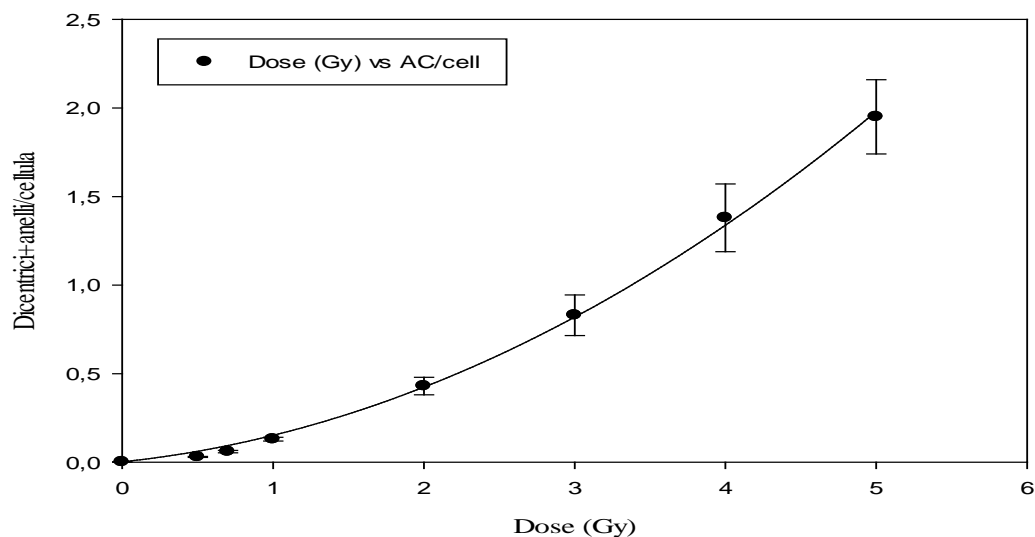
Dose (Gy)	Metafasi	Num AC	0	1	2	3	4	5	6	7	$\sigma^2/y$	u
0	1942	4	1938	4							1,00	-0,06
0,5	615	19	596	19							0,97	-0,53
0,7	540	32	508	32							0,94	-0,96
1	520	69	457	57	6						1,04	0,70
2	373	160	244	104	19	6					1,04	0,50
3	202	168	85	75	32	7	2				0,94	-0,58
4	182	251	46	68	35	22	9	1	1		1,06	0,58
5	152	296	17	51	36	31	8	8		1	0,95	-0,46

Dai valori ottenuti di u si può notare che per tutte le dosi la distribuzione delle aberrazioni cromosomiche non stabili segue una distribuzione di Poisson. Si è proceduto quindi a costruire la

curva di calibrazione per i valori medi ottenuti dai tre donatori nonché le altre curve seguendo quanto precedentemente riportato per il caso dell'analisi dei cromosomi colorati in soluzione di Giemsa. Il programma SigmaPlot è stato utilizzato anche in questo caso sia per la costruzione delle curve sia per verificare la bontà del fit della curva e calcolare il valore p per i coefficienti alfa e beta della lineare quadratica.

I risultati sono di seguito riportati.

### FISH - Media di tre donatori



R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate
0,9993	0,9985	0,9983	0,0302

	Coefficient	Std. Error	t	P
y0	0,0030	0,0000	(+inf)	<0,0001
a	0,0876	0,0155	5,6671	0,0013
b	0,0616	0,0037	16,6988	<0,0001

#### Analysis of Variance:

	DF	SS	MS
Regression	2	6,5966	3,2983
Residual	6	0,0055	0,0009
Total	8	6,6021	0,8253

Corrected for the mean of the observations:

	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	3,7022	3,7022	4049,7016	<0,0001
Residual	6	0,0055	0,0009		
Total	7	3,7077	0,5297		

Figura 37. Relazione dose risposta per la produzione di aberrazioni cromosomiche per cellula in seguito ad irraggiamento con raggi gamma da  $^{60}\text{Co}$  a varie dosi. Alle metafasi analizzate è stata applicata la tecnica FISH e i centromeri e telomeri sono stati colorati con sonde PNA.

I valori medi e la deviazione standard riportata nel grafico sono calcolati da tre esperimenti (donatori) indipendenti. Nel grafico viene altresì riportata l'equazione lineare quadratica con i coefficienti  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $y_0$ . In questo caso i coefficienti del modello sono significativamente diversi dallo zero ( $p < 0,05$ ), l'adattabilità del modello ai dati osservati è alta ( $R^2$  molto prossimo a 1) e i residui del modello hanno un impatto molto basso su di esso.

In figura 38 che segue, giusto per un confronto, vengono riportate le singole curve dose risposta ottenute dai dati dei tre singoli donatori. Come si evince dal grafico, il valore delle aberrazioni cromosomiche per cellula in funzione della dose per i tre donatori risulta prossimo alla dose di circa 2 Gy. Alle dosi più alte rimangono molto vicine quelle dei donatori 4 e 5 mentre il terzo donatore si differenzia dai precedenti. Tale dato influenza l'errore sulla media dei punti sperimentali alle dosi più elevate che risulta più alto rispetto alla colorazione con la Giemsa.

### FISH - Curve Dose risposta separate per i tre donatori

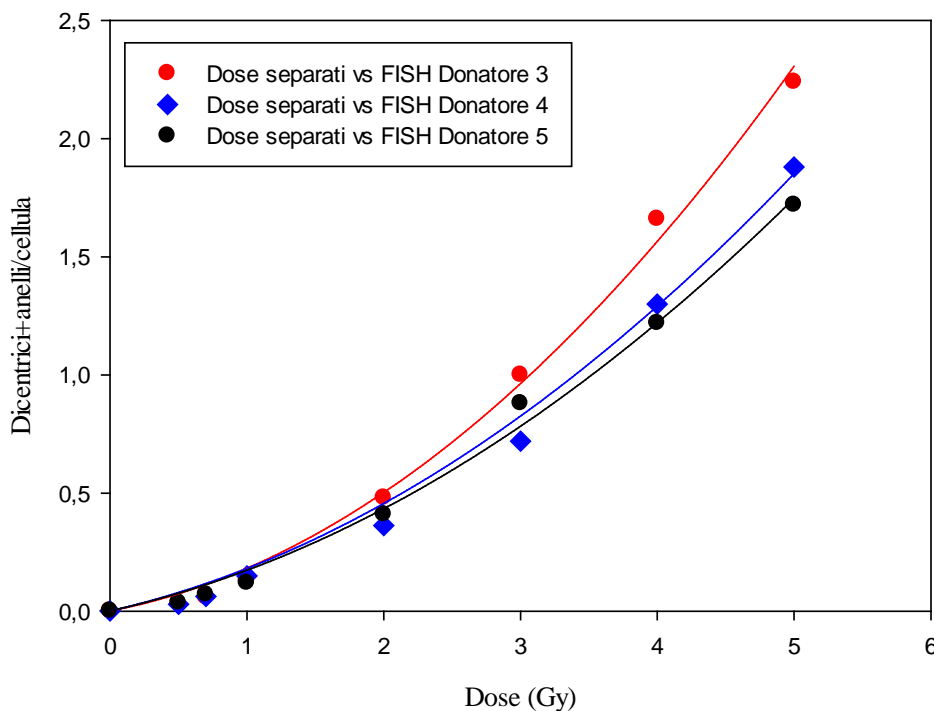


Figura 38. Curve dose-risposta separate per ogni donatore, per la produzione di aberrazioni cromosomiche (dicentrici ed anelli) per cellula.

In seguito sono riportati i dati dall'analisi statistica effettuata con il programma SigmaPlot per le tre curve ottenute.

### FISH Donatore 3

**R**      **Rsqr**    **Adj Rsqr**      **Standard Error of Estimate**  
 0,9978   0,9956   0,9949            0,0612

	<b>Coefficient</b>	<b>Std. Error</b>	<b>t</b>	<b>P</b>
y0	0,0020	0,0000	(+inf)	<0,0001
a	0,1102	0,0313	3,5271	0,0124
b	0,0701	0,0075	9,4044	<0,0001

#### Analysis of Variance:

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>
Regression	2	9,0030	4,5015
Residual	6	0,0225	0,0037
Total	8	9,0255	1,1282

Corrected for the mean of the observations:

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Regression	1	5,0732	5,0732	1355,8198	<0,0001
Residual	6	0,0225	0,0037		
Total	7	5,0957	0,7280		

### FISH Donatore 4

**R**      **Rsqr**    **Adj Rsqr**      **Standard Error of Estimate**  
 0,9994   0,9988   0,9986            0,0263

	<b>Coefficient</b>	<b>Std. Error</b>	<b>t</b>	<b>P</b>
y0	0,0020	0,0000	(+inf)	<0,0001
a	0,0577	0,0135	4,2834	0,0052
b	0,0643	0,0032	20,0294	<0,0001

#### Analysis of Variance:

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>
Regression	2	5,8978	2,9489
Residual	6	0,0042	0,0007
Total	8	5,9019	0,7377

Corrected for the mean of the observations:

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Regression	1	3,3575	3,3575	4837,0448	<0,0001
Residual	6	0,0042	0,0007		
Total	7	3,3617	0,4802		

## FISH Donatore 5

<b>R</b>	<b>Rsqr</b>	<b>Adj Rsqr</b>	<b>Standard Error of Estimate</b>
0,9971	0,9942	0,9932	0,0531

	<b>Coefficient</b>	<b>Std. Error</b>	<b>t</b>	<b>P</b>
y0	0,0020	0,0000	(+inf)	<0,0001
a	0,1276	0,0271	4,7012	0,0033
b	0,0443	0,0065	6,8386	0,0005

### Analysis of Variance:

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>
Regression	2	5,3932	2,6966
Residual	6	0,0169	0,0028
Total	8	5,4101	0,6763

Corrected for the mean of the observations:

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Regression	1	2,9067	2,9067	1030,3699	<0,0001
Residual	6	0,0169	0,0028		
Total	7	2,9237	0,4177		

Dall'analisi statistica delle singole curve si nota che per tutti i donatori sia la variabile dose sia il suo quadrato risultano statisticamente significativi ( $p < 0,05$ ). L'adattabilità del modello ai dati osservati è molto alta ( $R^2$  molto prossimo a 1) e i residui del modello hanno un impatto molto basso sul modello stesso.

Con le stesse considerazioni riportate nella Sezione III.1, nella Fig 39 che segue, è riportata la curva di calibrazione della Fig. 37 con i suoi limiti di confidenza al 95% utilizzati per la stima di incertezze sulla dose; invece nella Fig. 40 si riporta quella parte della curva di calibrazione con i suoi limiti di confidenza al 95% utilizzati per la stima di incertezze sulla dose nell'intervallo 0-1 Gy.



## FISH - Curve di dose al 95% di limite di confidenza

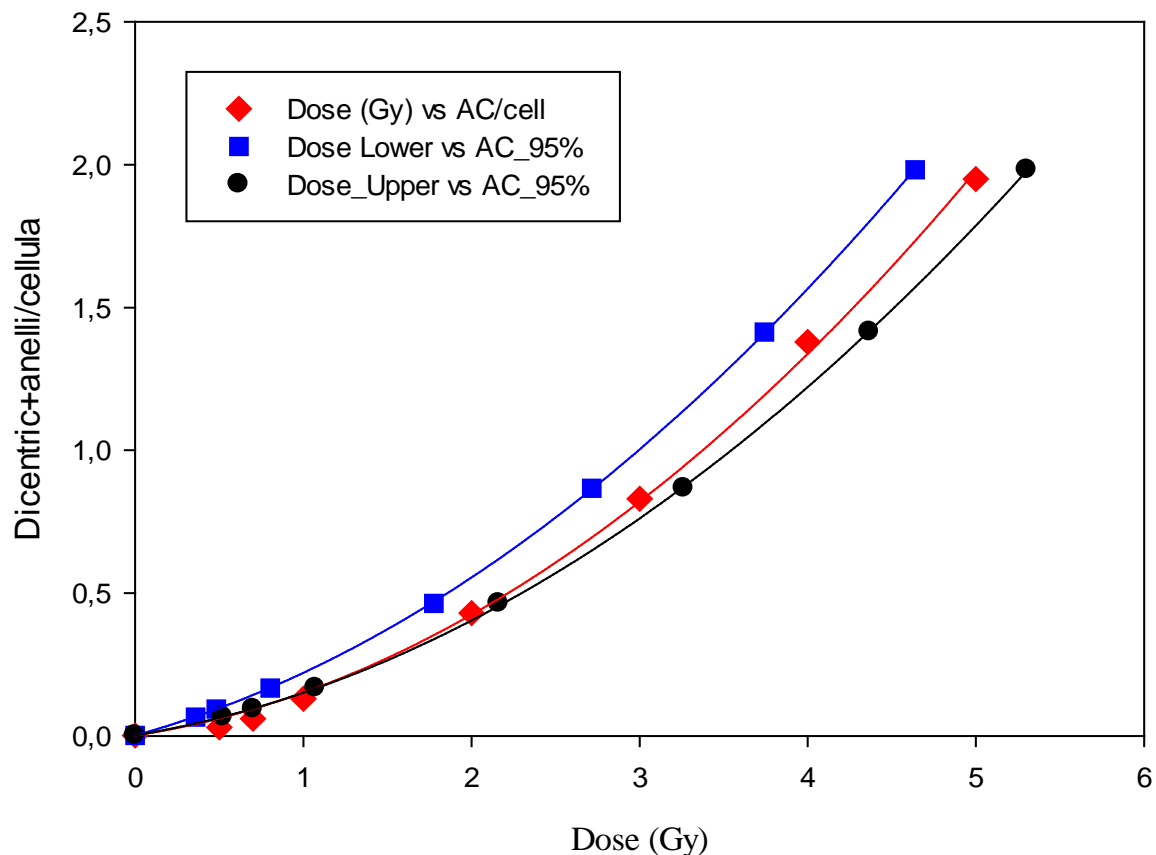


Figura 39. Curva di calibrazione dose-risposta, con la tecnica FISH e sonde PNA per telomeri e centromeri, con limiti di confidenza al 95% utilizzata per valutare incertezze sulla dose.

### FISH - Lower Dose Curve

**R**      **Rsqr**    **Adj Rsqr**      **Standard Error of Estimate**  
 1,0000   1,0000   1,0000            0,0036

	<b>Coefficient</b>	<b>Std. Error</b>	<b>t</b>	<b>P</b>
y0	0,0020	0,0000	(+inf)	<0,0001
a	0,1616	0,0021	78,6340	<0,0001
b	0,0574	0,0005	109,4894	<0,0001

#### Analysis of Variance:

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>
Regression	2	6,9382	3,4691
Residual	6	7,6801E-005	1,2800E-005
Total	8	6,9383	0,8673

Corrected for the mean of the observations:

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Regression	1	3,7407	3,7407	292239,8623	<0,0001
Residual	6	7,6801E-005	1,2800E-005		
Total	7	3,7408	0,5344		

### FISH - Upper Dose Curve

R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate	
1,0000	1,0000	1,0000	0,0049	
	Coefficient	Std. Error	t	P
y0	0,0020	0,0000	(+inf)	<0,0001
a	0,0971	0,0024	40,0551	<0,0001
b	0,0520	0,0005	95,9791	<0,0001

#### Analysis of Variance:

	DF	SS	MS
Regression	2	6,9381	3,4691
Residual	6	0,0001	2,4452E-005
Total	8	6,9383	0,8673

Corrected for the mean of the observations:

	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	3,7406	3,7406	152979,6021	<0,0001
Residual	6	0,0001	2,4452E-005		
Total	7	3,7408	0,5344		

Dall'analisi statistica delle curve per la Lower Dose e per l'Upper Dose si nota che sia la variabile dose sia il suo quadrato risultano statisticamente significative ( $p < 0,05$ ). L'adattabilità del modello ai dati osservati è altissima ( $R^2$  pari a 1) e i residui del modello hanno un impatto bassissimo sul modello stesso.

FISH - Curva Dose risposta fino a 1 Gy con limiti di confidenza al 95%

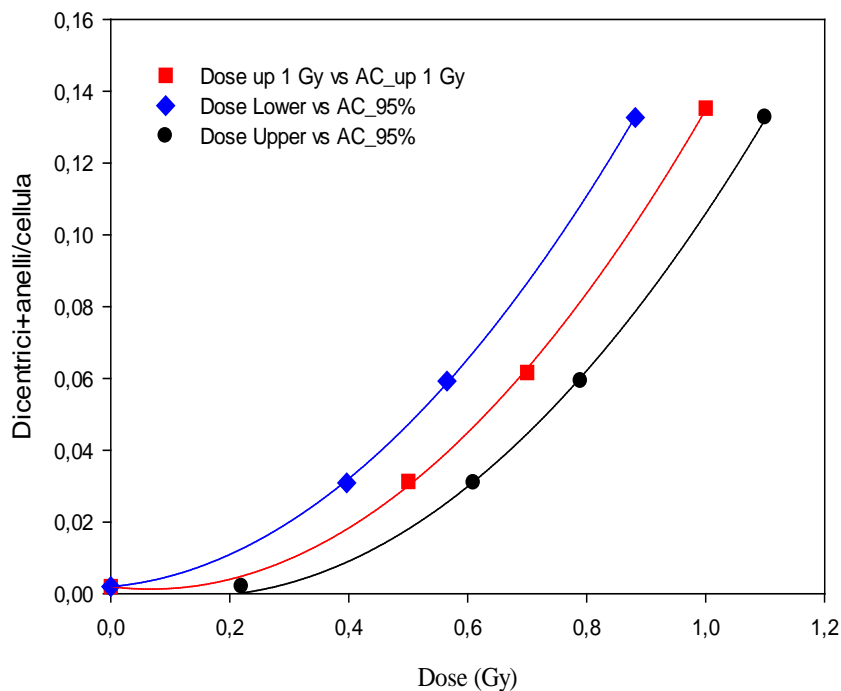


Figura 40. Curva di calibrazione dose risposta, con limiti di confidenza al 95% fino a 1 Gy di dose.

In seguito sono riportati i dati dall'analisi statistica effettuata con il programma SigmaPlot per le tre curve ottenute.

<b>R</b>	<b>Rsqr</b>	<b>Adj Rsqr</b>	<b>Standard Error of Estimate</b>	
0,9998	0,9997	0,9995	0,0012	
	<b>Coefficient</b>	<b>Std. Error</b>	<b>t</b>	<b>P</b>
y0	0,0020	0,0000	(+inf)	<0,0001
a	-0,0204	0,0042	-4,8346	0,0402
b	0,1532	0,0049	31,4046	0,0010

**Analysis of Variance:**

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>
Regression	2	0,0231	0,0116
Residual	2	3,0513E-006	1,5256E-006
Total	4	0,0231	0,0058

Corrected for the mean of the observations:

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Regression	1	0,0098	0,0098	6447,9758	0,0002
Residual	2	3,0513E-006	1,5256E-006		
Total	3	0,0098	0,0033		

**FISH - Lower Dose Curve up to 1 Gy**

<b>R</b>	<b>Rsqr</b>	<b>Adj Rsqr</b>	<b>Standard Error of Estimate</b>	
1,0000	0,9999	0,9999	0,0007	
	<b>Coefficient</b>	<b>Std. Error</b>	<b>t</b>	<b>P</b>
y0	0,0020	0,0000	(+inf)	<0,0001
a	0,0144	0,0024	5,9417	0,0272
b	0,1520	0,0032	47,7921	0,0004

**Analysis of Variance:**

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>
Regression	2	0,0221	0,0110
Residual	2	8,8959E-007	4,4479E-007
Total	4	0,0221	0,0055

Corrected for the mean of the observations:

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Regression	1	0,0094	0,0094	21217,8815	<0,0001
Residual	2	8,8959E-007	4,4479E-007		
Total	3	0,0094	0,0031		

## FISH - Upper Curve Dose up to 1 Gy

**R**      **Rsqr**    **Adj Rsqr**      **Standard Error of Estimate**

0,9998   0,9995   0,9993            0,0015

	<b>Coefficient</b>	<b>Std. Error</b>	<b>t</b>	<b>P</b>
y0	0,0020	0,0000	(+inf)	<0,0001
a	-0,0397	0,0043	-9,1595	0,0117
b	0,1437	0,0046	31,1433	0,0010

### Analysis of Variance:

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>
Regression	2	0,0221	0,0110
Residual	2	4,6470E-006	2,3235E-006
Total	4	0,0221	0,0055

Corrected for the mean of the observations:

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Regression	1	0,0094	0,0094	4060,1271	0,0002
Residual	2	4,6470E-006	2,3235E-006		
Total	3	0,0094	0,0031		

Dall'analisi statistica delle curve di Lower Dose e di Upper Dose fino a 1 Gy, si nota che la variabile dose risulta statisticamente significativa solo per la curva di Lower Dose. Inoltre non si riescono a valutare dosi che sono inferiori a 0,25 Gy circa. Risulta statisticamente significativo il quadrato della dose per tutte le curve. L'adattabilità del modello ai dati osservati è molto buona ( $R^2$  molto prossimo a 1) per tutte e due le curve mentre i residui del modello hanno un impatto basso sul modello stesso.

Per poter confrontare la sensibilità delle due metodiche la curva di calibrazione costruita colorando i cromosomi con la soluzione di Giemsa (Fig. 29) è riportata nella Fig. 41 insieme alla curva di calibrazione ottenuta dall'analisi dei cromosomi colorati in FISH (Fig. 37).

## Confronto curve di calibrazione Giemsa - FISH

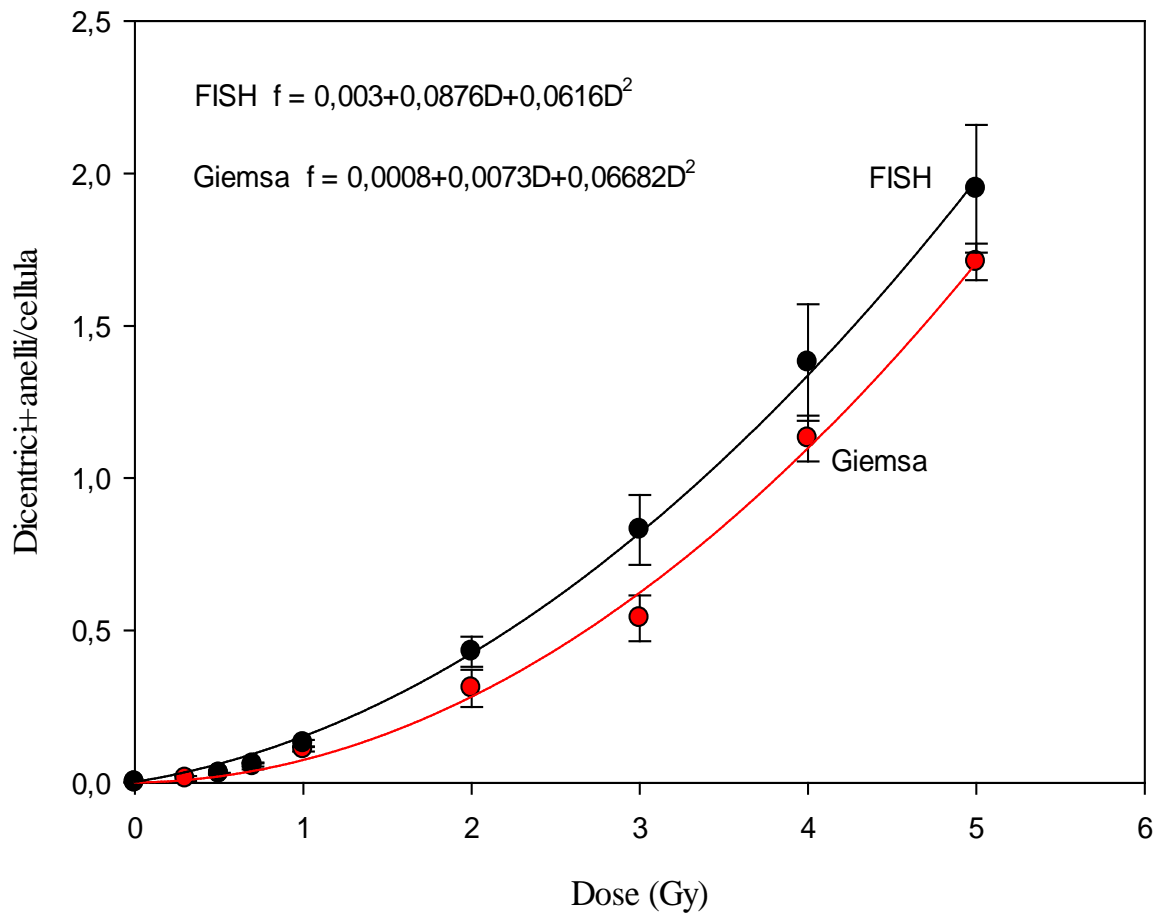


Figura 41. Curve di calibrazione dose risposta costruite con la colorazione in Giemsa e la tecnica FISH con le sonde PNA. I punti sono valori medi  $\pm$  SD ottenuti da tre esperimenti (donatori) indipendenti; sono altresì riportate le equazioni delle curve.

Dal confronto delle due curve è evidente che si ottiene una maggiore sensibilità nella valutazione delle aberrazioni cromosomiche utilizzando la tecnica della colorazione FISH con sonde PNA rispetto alla tecnica tradizionale della colorazione dei cromosomi con soluzione di Giemsa in particolare a dosi superiori a 1 Gy.

### **III.3 Dosimetria Biologica delle radiazioni ionizzanti con fusione di linfociti irraggiati alla fase del ciclo cellulare G<sub>0</sub> con cellule mitotiche CHO da hamster**

Le metodiche precedentemente descritte, come è stato già detto, necessitano di stimolazione per dare inizio al ciclo cellulare e analizzare nella prima metafase aberrazioni cromosomiche non stabili. Questo implica un tempo di almeno 50 ore prima di poter analizzare le prime metafasi per valutare la dose in caso di incidente. Ovviamente il tempo di valutazione della dose è di grande importanza in caso di sovraesposizione alle radiazioni ionizzanti di un individuo, per motivi di intervento di emergenza medica.

La fusione delle cellule con la condensazione prematura dei cromosomi (PCC) permette l'osservazione diretta di danno citogenetico, dovuto alle radiazioni, in linfociti non stimolati senza la necessità di coltura del sangue. La quantificazione dell'esposizione con questo metodo, l'unico sensibile per poter valutare il danno cromosomico immediatamente dopo l'esposizione, è stato per molti anni limitato all'analisi dei frammenti cromosomici.

Per poter creare una curva di calibrazione dopo analisi dei frammenti cromosomici prodotti, linfociti umani del sangue periferico sono stati irraggiati a varie dosi di raggi gamma e successivamente sono stati fusi in diversi intervalli temporali con cellule mitotiche CHO di hamster. Sono state quindi create curve di calibrazione dose-risposta riportanti in ordinata l'eccesso di frammenti cromosomici analizzati immediatamente e 24 ore dopo l'irraggiamento.

Nelle Figure 42 e 43 che seguono è riportato quanto si presenta al microscopio ottico dopo colorazione delle cellule in interfase con Giemsa. Utilizzando dedicati programmi di acquisizione delle immagini (IKAROS della MetaSystem) si può con estrema facilità contare i frammenti cromosomici prodotti. Nella media dei controlli (non irraggiati) si conta un numero di 46 cromosomi con un eccesso di frammenti pari a zero.

Cromosomi umani

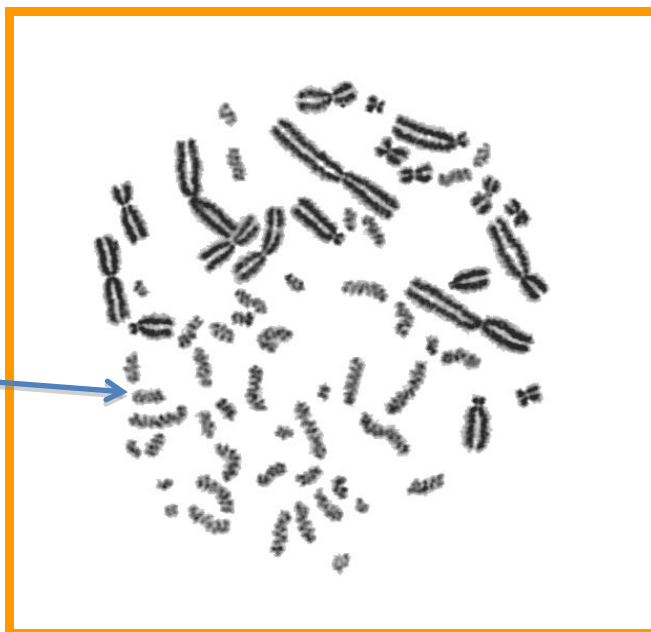


Figura 42. Linfociti umani non irradiati fusi con cellule mitotiche CHO di hamster.

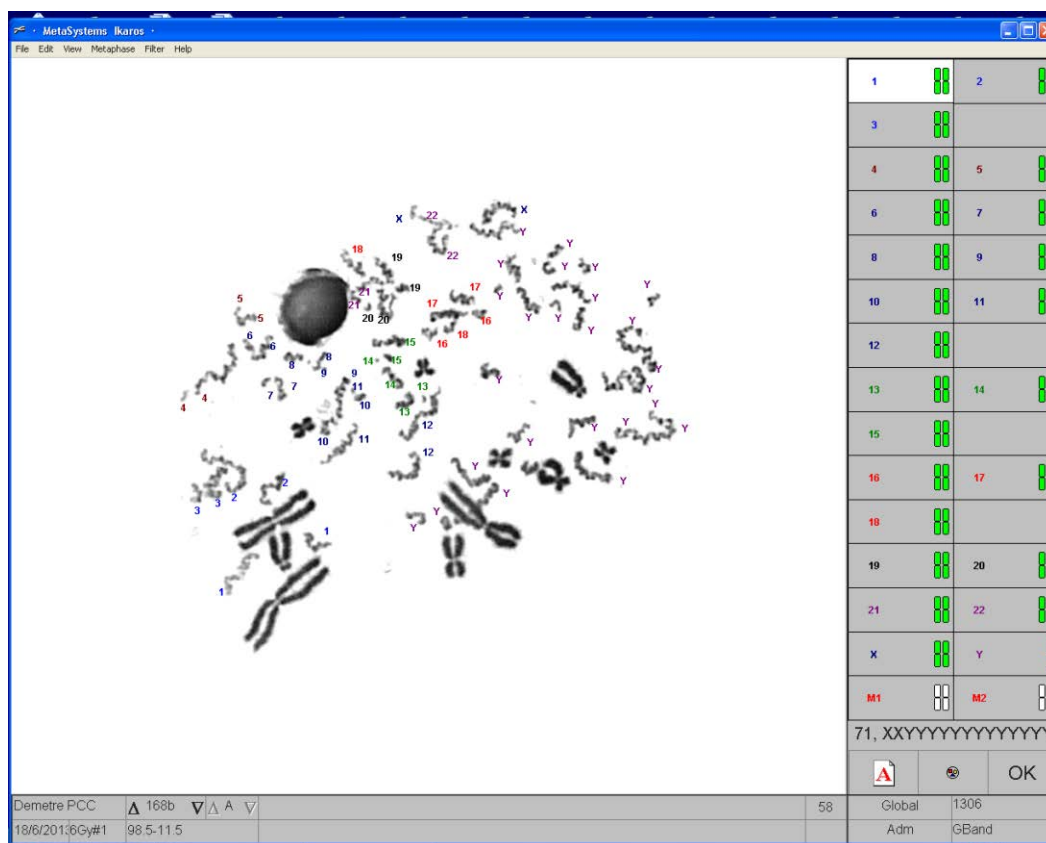


Figura 43. Linfociti umani irradiati a 6 Gy con raggi gamma e fusi con cellule mitotiche CHO di hamster. Si contano cromosomi e frammenti con un semplice click del mouse e si individua l'eccesso rispetto al numero 46.

Nel grafico della Fig. 44 viene riportata la frequenza dei frammenti in linfociti prematuramente condensati nella fase  $G_0$  del ciclo cellulare in funzione della dose gamma come essi sono valutati con il metodo della PCC. Le deviazioni tipiche (SD) sono state calcolate secondo 3 esperimenti indipendenti. Viene altresì riportata l'analisi statistica effettuata.

### Fusione tra linfociti e CHO immediatamente dopo l'irraggiamento

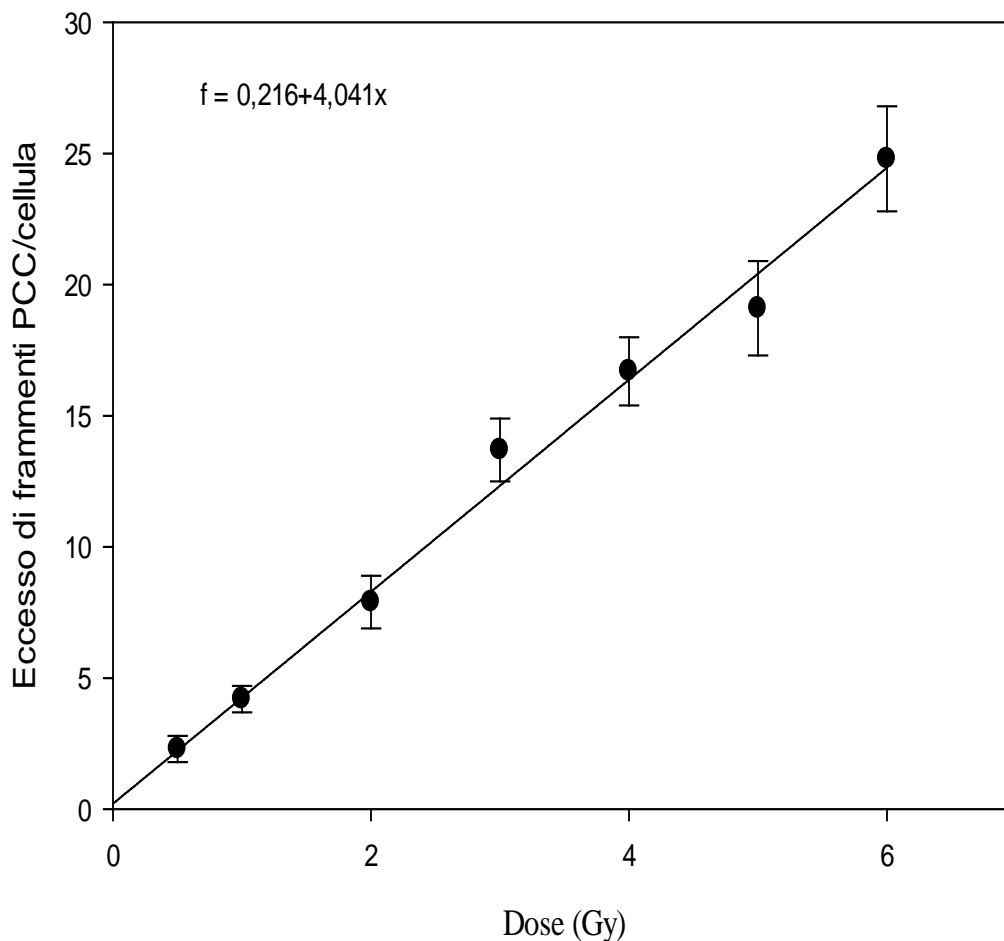


Figura 44. Numero di frammenti per cellula in linfociti prematuramente condensati con la tecnica della PCC nella fase  $G_0$  del ciclo cellulare in funzione della dose, fusi immediatamente dopo l'irraggiamento con raggi gamma da sorgente di  $^{60}\text{Co}$ .



<b>R</b>	<b>Rsqr</b>	<b>Adj Rsqr</b>	<b>Standard Error of Estimate</b>
0,9963	0,9926	0,9914	0,8246

	<b>Coefficient</b>	<b>Std. Error</b>	<b>t</b>	<b>P</b>
y0	0,2156	0,4814	0,4479	0,6700
a	4,0407	0,1425	28,3497	<0,0001

**Analysis of Variance:**

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>
Regression	2	1527,7005	763,8502
Residual	6	4,0795	0,6799
Total	8	1531,7800	191,4725

Corrected for the mean of the observations:

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Regression	1	546,4555	546,4555	803,7029	<0,0001
Residual	6	4,0795	0,6799		
Total	7	550,5350	78,6479		

La disponibilità di sangue immediatamente dopo l'esposizione di un individuo è un evento raro. Processi di riparazione del danno cromosomico iniziano immediatamente dopo l'irraggiamento e una rapida ricongiunzione dei frammenti cromosomici inizia entro 3 ore dall'irraggiamento, per terminare entro 6 ore (Pantelias, 1985). Considerate le 24 ore dall'irraggiamento un tempo ragionevole di consegna di un campione di sangue e volendo esaminare la cinetica di ricongiunzione dei frammenti, si è proceduto a costruire una curva di calibrazione procedendo alla fusione dei linfociti con cellule CHO ad una distanza di 24 ore dall'irraggiamento. Il risultato è riportato nella Fig. 45. Le deviazioni tipiche (SD) sono state calcolate secondo 3 esperimenti indipendenti. Viene altresì riportata l'analisi statistica effettuata.

## Fusione tra linfociti e CHO a 24 ore dopo l'irraggiamento

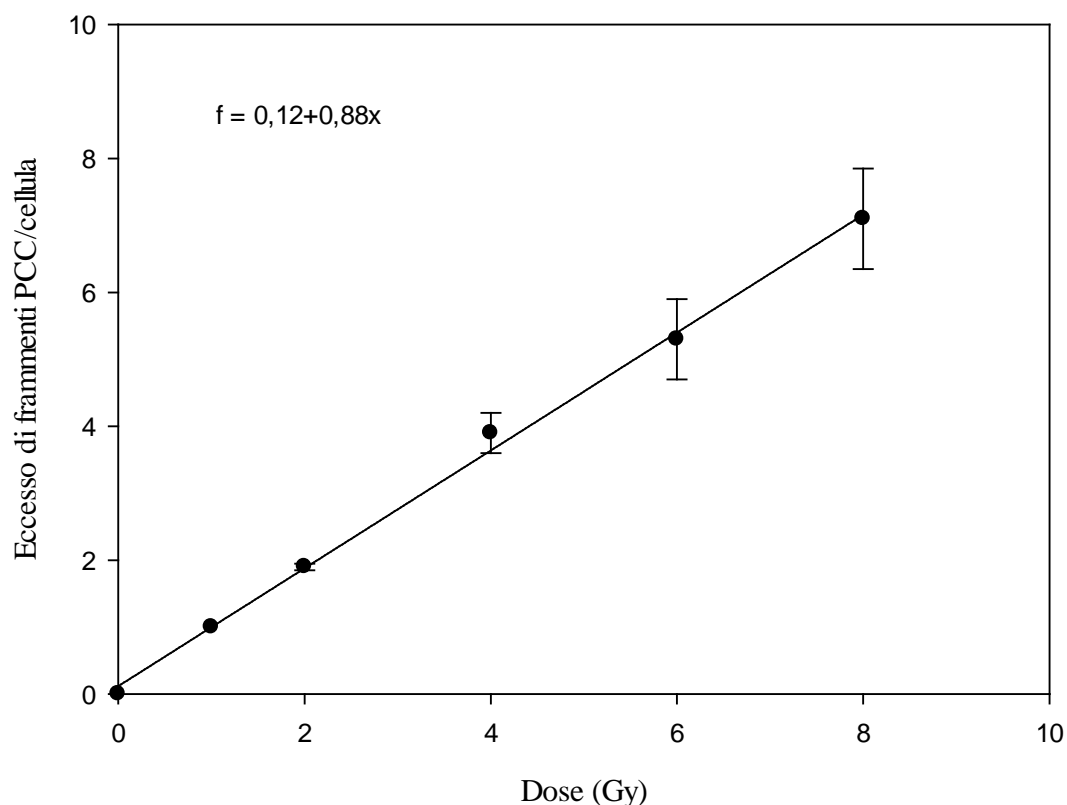


Figura 45. Numero di frammenti per cellula in linfociti prematuramente condensati con la tecnica della PCC nella fase  $G_0$  del ciclo cellulare in funzione della dose, fusi dopo 24 ore dall'irraggiamento con raggi gamma da sorgente di  $^{60}\text{Co}$ .

R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate
0,9987	0,9974	0,9967	0,1549

	Coefficient	Std. Error	t	P
y0	0,1200	0,1009	1,1888	0,3003
a	0,8800	0,0225	39,1493	<0,0001

### Analysis of Variance:

	DF	SS	MS
Regression	2	98,2240	49,1120
Residual	4	0,0960	0,0240
Total	6	98,3200	16,3867

Corrected for the mean of the observations:

	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	36,7840	36,7840	1532,6667	<0,0001
Residual	4	0,0960	0,0240		
Total	5	36,8800	7,3760		

Dai risultati ottenuti risulta evidente che a distanza di 24 ore dall'irraggiamento il numero dei frammenti residui è sufficiente per avere, in modo estremamente rapido, un valore della dose assorbita attendibile utile per un intervento medico di emergenza.

#### **III.4 Dosimetria Biologica delle radiazioni ionizzanti con fusione di linfociti irraggiati alla fase del ciclo cellulare $G_0$ con cellule mitotiche CHO da hamster in combinazione con FISH e sonde di tipo PNA per centromeri e telomeri.**

L'utilizzo della tecnica della PCC per quantificare un'esposizione alle radiazioni ionizzanti, è stata sempre limitata fino ad oggi dal fatto che si poteva effettuare soltanto l'analisi di frammenti e anelli a dosi superiori a 4-5 Gy; come abbiamo già visto tali frammenti si riducono notevolmente a 24 ore dall'esposizione, al punto di non essere più utilizzabili per costruire una curva di calibrazione per tempi superiori. Inoltre una limitazione più importante consiste nell'incapacità della colorazione con Giemsa di evidenziare i centromeri e i telomeri dei cromosomi ottenuti con la PCC e di conseguenza l'individuazione di dicentrici, di anelli con centromero e di frammenti senza centromero.

Nel presente lavoro superiamo questa limitazione sviluppando una metodologia, assolutamente originale e non ancora pubblicata in letteratura, la quale ci permette di individuare in linfociti non stimolati, fusi con la tecnica della PCC, aberrazioni cromosomiche non stabili in modo rapido e accurato a tempi distanti (mesi) dal momento dell'esposizione accidentale dell'individuo.

Va sottolineato che uno dei vantaggi più importanti della tecnica della PCC consiste nel fatto che con questo metodo possiamo visualizzare il danno radio indotto iniziale nel nucleo di linfociti non stimolati del sangue periferico. Si conosce, infatti, che la radiazione induce un numero di rotture iniziali maggiori rispetto alle aberrazioni cromosomiche che si possono osservare in metafase.

La tecnica della PCC è stata applicata in combinazione con la FISH utilizzando contemporaneamente sonde peptidiche di acido nucleico per colorare i centromeri e i telomeri dei cromosomi. L'individuazione dei cromosomi multicentrici e di anelli è avvenuta con l'utilizzo di un microscopio a fluorescenza. Il risultato che si ottiene sia con la combinazione dei tre colori sia per i singoli canali è riportato nelle figure che seguono.

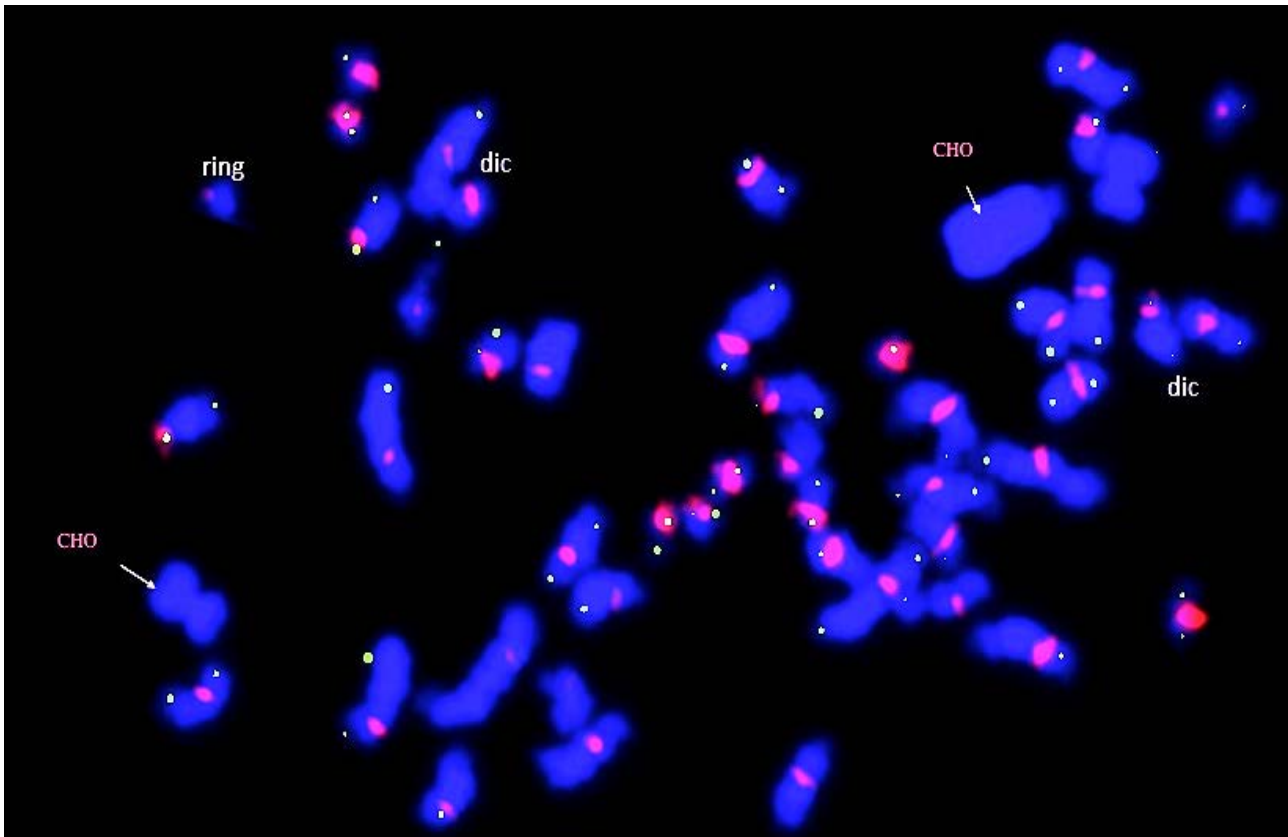


Figura 46. Linfociti umani irraggiati con raggi gamma a 4 Gy e fusi con cellule CHO. Tecniche applicate PCC e FISH con colorazione dei telomeri (verde) e centromeri (rosso) con sonde PNA. Sono indicate alcune caratteristiche aberrazioni cromosomiche riscontrate e la presenza delle cellule CHO.

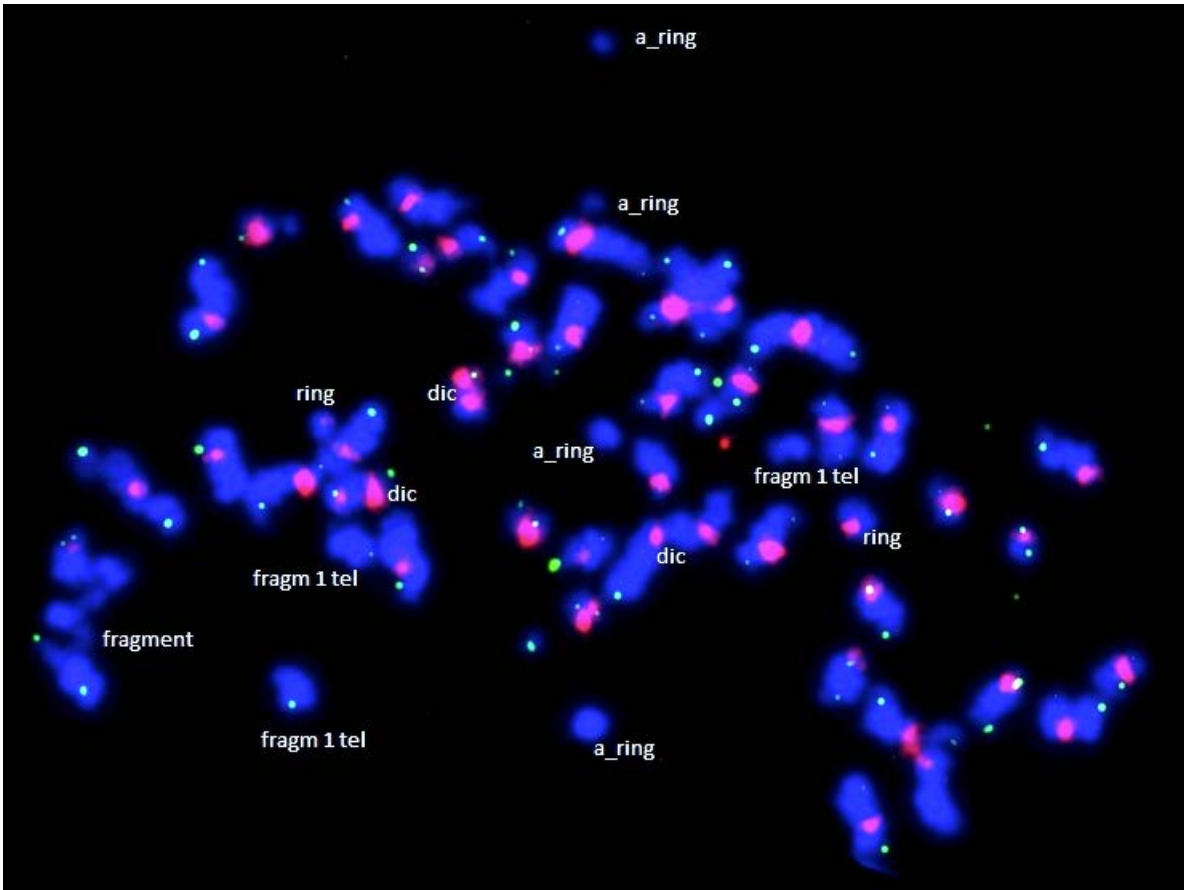


Figura 47. Linfociti umani irradiati con raggi gamma a 8 Gy e fusi con cellule CHO. Tecniche applicate PCC e FISH con colorazione dei telomeri (verde) e centromeri (rosso) con sonde PNA. Sono indicate alcune caratteristiche aberrazioni cromosomiche riscontrate.

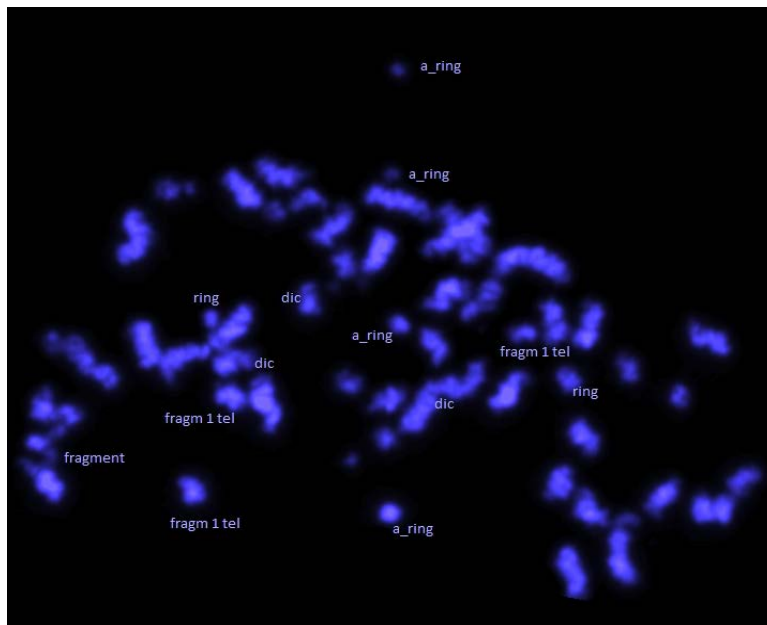


Figura 48. Viene riportata l'immagine della Fig. 47 per il singolo canale blu (DAPI) che evidenzia la presenza della sola cromatina.

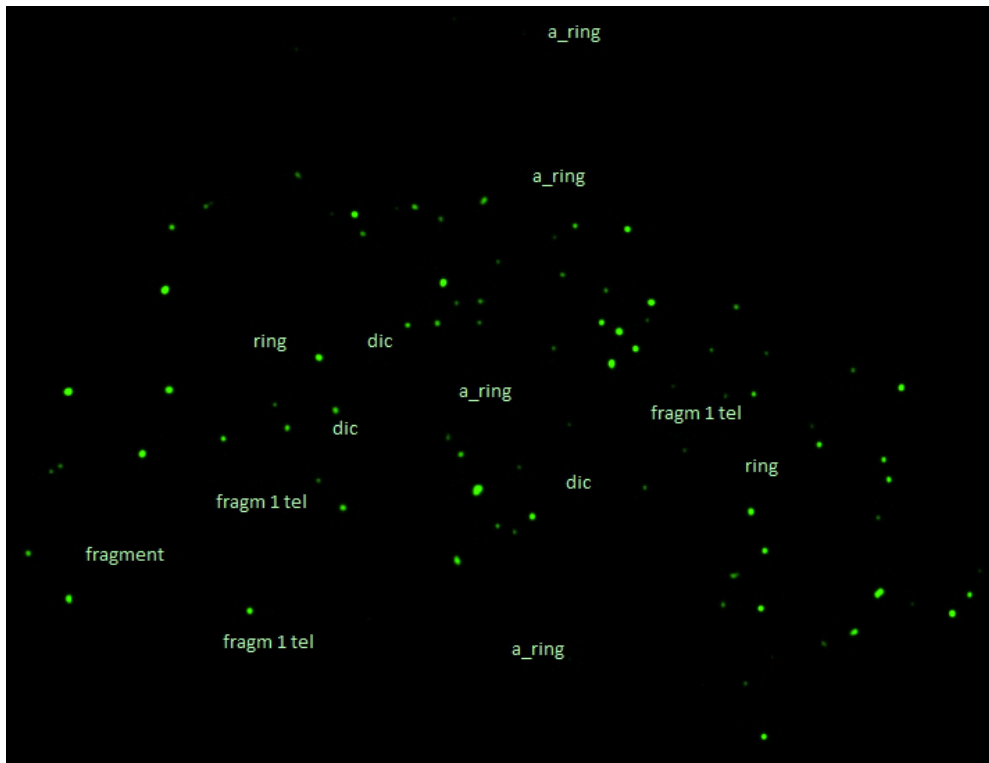


Figura 49. Viene riportata l'immagine della Fig. 47 per il singolo canale verde (FITC) che evidenzia la presenza dei soli telomeri. Notare l'assenza di telomeri nei rings e negli a\_rings.

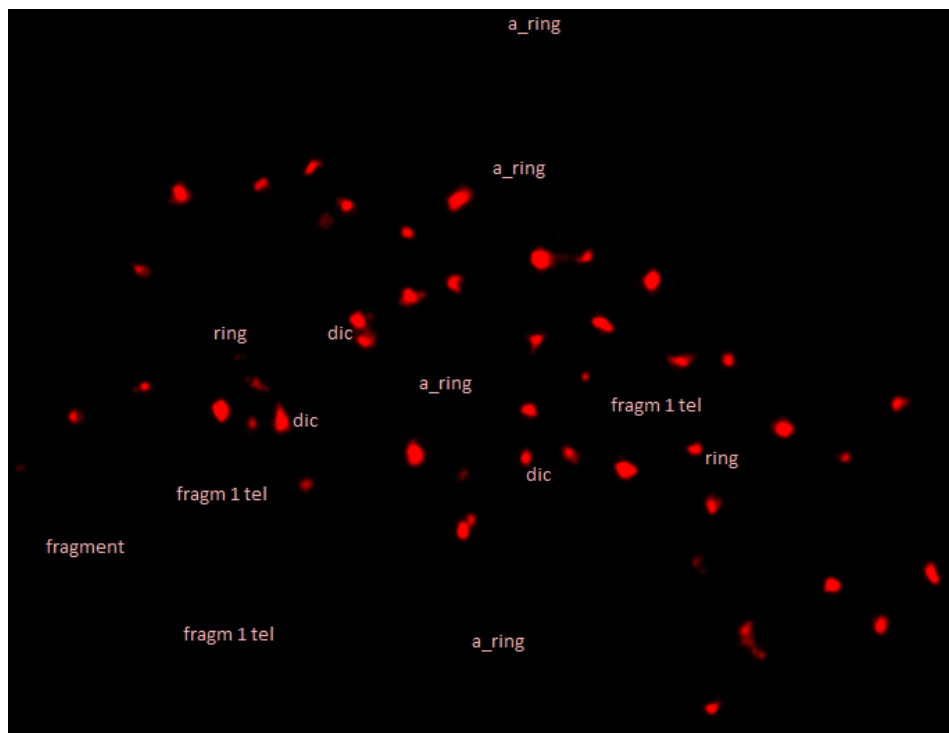


Figura 50. Viene riportata l'immagine della Fig. 47 per il singolo canale rosso (TRITC) che evidenzia la presenza dei soli centromeri. Notare l'assenza di centromero negli a\_rings.

Si è proceduto quindi alla costruzione di curve di calibrazione per dosi fino a 8 Gy.

Inoltre, sfruttando la possibilità di individuare in modo accurato e rapido le aberrazioni cromosomiche instabili, si è proceduto a verificare la cinetica di formazione dei dicentrici procedendo alla fusione a 10 e a 24 ore dopo l'irraggiamento.

Sono state quindi costruite due curve di calibrazione, una che tiene conto della fusione a 10 ore dall'irraggiamento e l'altra a 24 ore dall'irraggiamento. Le curve di calibrazione sono state ottenute utilizzando campioni di sangue dei tre donatori precedentemente riportati.

Nel caso delle 10 ore, sono stati utilizzati 5 campioni di sangue dei quali quattro sono stati irraggiati a 1, 3, 5 e 7 Gy mentre il quinto campione è servito come controllo. Il numero totale delle metafasi analizzate al microscopio a fluorescenza sono state circa 1.030. Nel caso delle 24 ore, sono stati utilizzati 6 campioni di sangue dei quali cinque sono stati irraggiati a 1, 2, 4, 6 e 8 Gy mentre il sesto campione è servito come controllo. Il numero totale delle cellule analizzate al microscopio a fluorescenza sono state circa 930.

I risultati citogenetici complessivi ottenuti dai campioni di sangue irraggiati con raggi gamma e utilizzati per la costruzione delle curve di calibrazione, la distribuzione delle aberrazioni cromosomiche nelle cellule e il risultato del test statistico u test sono riportati nelle tabelle che seguono.

Tabella 3. Risultati citogenetici ottenuti da 3 campioni di sangue irraggiati con raggi gamma da  $^{60}\text{Co}$ . La fusione con la tecnica PCC è avvenuta 10 ore dopo l'irraggiamento; è stata applicata la FISH e i centromeri e i telomeri dei cromosomi sono stati colorati con sonde PNA.

Distribuzione delle aberrazioni cromosomiche nelle cellule

Dose (Gy)	Metafasi	Num AC	0	1	2	3	4	5	6	7	$\sigma^2/y$	u
0	521	0	521								0,00	0,00
1	288	104	196	80	12						0,87	-1,53
3	99	105	32	37	24	4	2				0,86	-0,97
5	43	100	3	6	16	13	3	1	1		0,65	-1,61
7	72	196	4	9	21	22	7	5	2	2	0,85	-0,89

Dai valori ottenuti di u si può notare che per tutte le dosi la distribuzione delle aberrazioni cromosomiche non stabili segue una distribuzione di Poisson. Si è proceduto quindi a costruire la curva di calibrazione per i valori medi ottenuti dai tre donatori seguendo quanto riportato in precedenza per il caso dell'analisi dei cromosomi colorati in soluzione di Giemsa e in FISH.

Il programma SigmaPlot è stato utilizzato anche in questo caso sia per la costruzione delle curve sia per verificare la bontà del fit della curva e calcolare il valore p per i coefficienti alfa e beta della lineare quadratica.

I risultati sono di seguito riportati.



Curva di calibrazione di linfociti fusi con cellule CHO (PCC) dopo 10 ore dall'irraggiamento; FISH e colorazione di centromeri e telomeri con sonde PNA

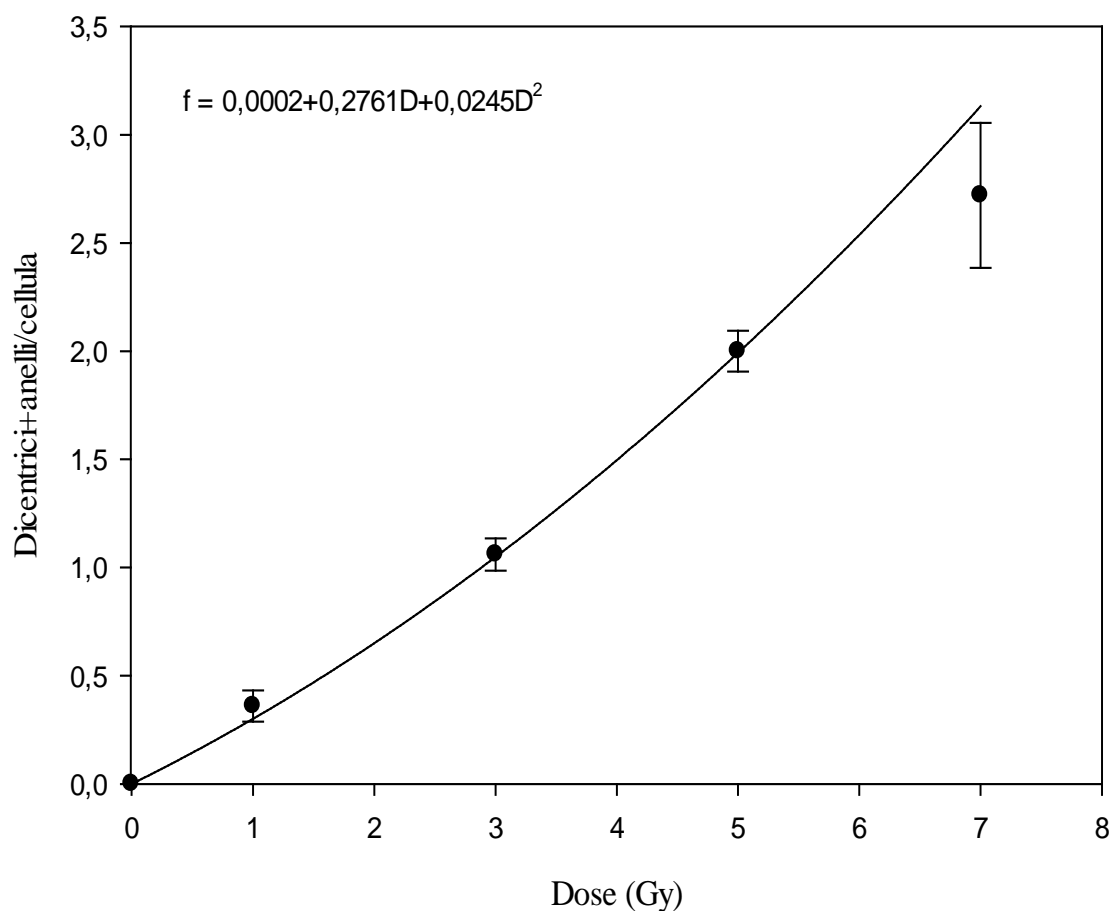


Figura 51. Numero di aberrazioni cromosomiche per cellula in linfociti prematuramente condensati con la tecnica della PCC, FISH e sonde PNA. La fusione è avvenuta dopo 10 ore dall'irraggiamento con raggi gamma da sorgente di  $^{60}\text{Co}$ .

**R**      **Rsqr**      **Adj Rsqr**      **Standard Error of Estimate**

0,9988    0,9975    0,9967      0,0740

	<b>Coefficient</b>	<b>Std. Error</b>	<b>t</b>	<b>P</b>
y0	0,0002	0,0000	(+inf)	<0,0001
a	0,2761	0,0336	8,2166	0,0038
b	0,0245	0,0055	4,4265	0,0214

**Analysis of Variance:**

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>
Regression	2	14,7642	7,3821
Residual	3	0,0164	0,0055
Total	5	14,7806	2,9561

Corrected for the mean of the observations:

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Regression	1	6,5854	6,5854	1203,5405	<0,0001
Residual	3	0,0164	0,0055		
Total	4	6,6018	1,6504		

Dall'analisi statistica risulta che i coefficienti del modello sono significativamente diversi dallo zero ( $p < 0,05$ ), l'adattabilità del modello ai dati osservati è alta ( $R^2$  molto prossimo a 1) e i residui del modello hanno un impatto basso sul modello stesso.

Tabella 4. Come il caso precedente ma la fusione con la tecnica PCC è avvenuta 24 ore dopo l'irraggiamento.

Distribuzione delle aberrazioni cromosomiche nelle cellule; fusione dopo 24 ore

Dose (Gy)	Metafasi	Num AC	0	1	2	3	4	5	6	7	8	$\sigma^2/y$	u
0	500	0	500	0								0,00	0,00
1	285	111	189	81	15							0,88	-1,39
2	159	105	76	62	20	1						0,78	-1,94
4	85	111	24	28	21	9	1	2				1,04	0,26
6	45	105	4	7	15	12	4	2	1			0,78	-1,04
8	50	173	1	3	11	13	11	7	1		3	0,85	-0,74

Dai valori ottenuti di u si può notare che per tutte le dosi la distribuzione delle aberrazioni cromosomiche non stabili segue una distribuzione di Poisson. Si è proceduto quindi a costruire la curva di calibrazione per i valori medi ottenuti dai tre donatori seguendo quanto riportato in precedenza e a effettuare l'analisi statistica.

I risultati sono di seguito riportati.

Curva di calibrazione di linfociti fusi con cellule CHO (PCC) dopo 24 ore dall'irraggiamento; FISH e colorazione di centromeri e telomeri con sonde PNA

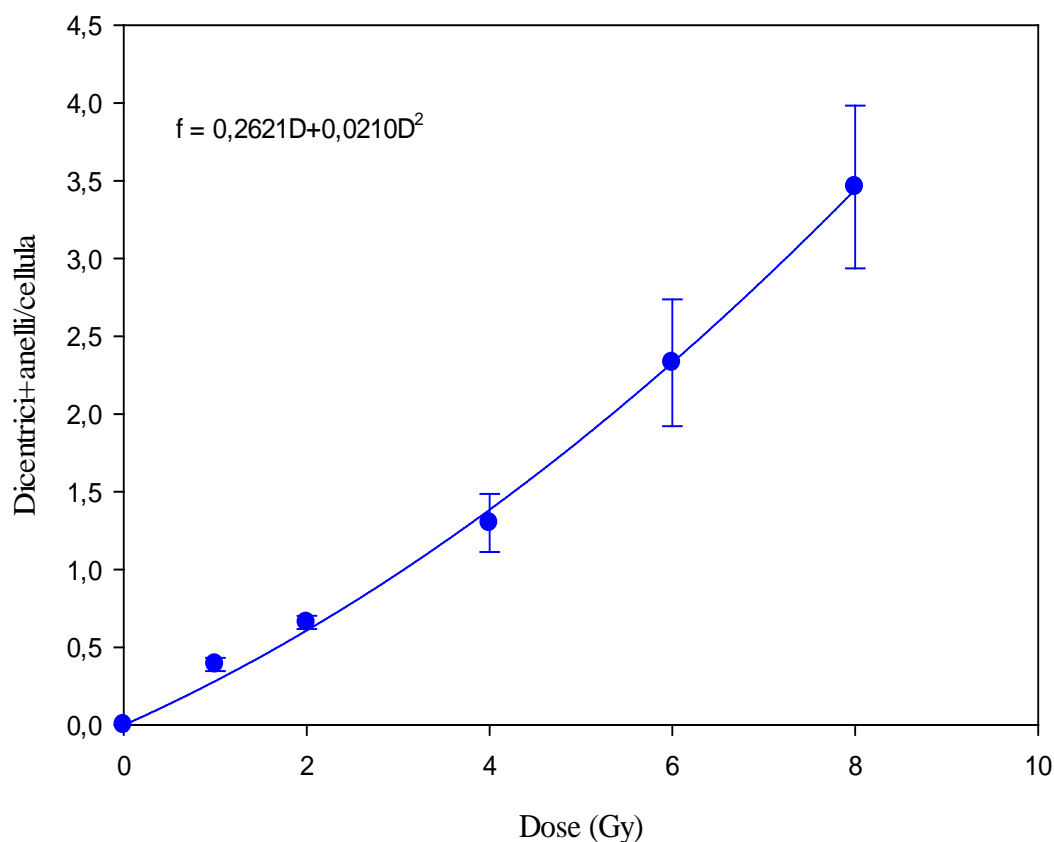


Figura 52. Numero di aberrazioni cromosomiche per cellula in linfociti prematuramente condensati con la tecnica della PCC, applicazione della FISH con sonde PNA. La fusione è avvenuta dopo 24 ore dall'irraggiamento con raggi gamma da sorgente di  $^{60}\text{Co}$ . I punti sono valori medi  $\pm$  SD secondo tre esperimenti (donatori) indipendenti.

R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate
0,9987	0,9975	0,9969	0,0735

	Coefficient	Std. Error	t	P
y0	-0,0000	0,0000	(+inf)	<0,0001
a	0,2621	0,0264	9,9273	0,0006
b	0,0210	0,0039	5,4518	0,0055

**Analysis of Variance:**

	DF	SS	MS
Regression	2	19,6566	9,8283
Residual	4	0,0216	0,0054
Total	6	19,6782	3,2797

Corrected for the mean of the observations:

	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	8,6133	8,6133	1595,4788	<0,0001
Residual	4	0,0216	0,0054		
Total	5	8,6349	1,7270		

I coefficienti del modello sono significativamente diversi dallo zero, l'adattabilità del modello ai dati osservati è alta ( $R^2$  molto prossimo a 1) e i residui del modello hanno un impatto basso sul modello stesso.

Per verificare se esistono differenze nelle aberrazioni cromosomiche riscontrate in funzione del tempo di fusione dopo l'irraggiamento, si è proceduto a riportare in un unico grafico le curve di calibrazione costruite a 10 ore e a 24 ore di fusione dopo l'irraggiamento.

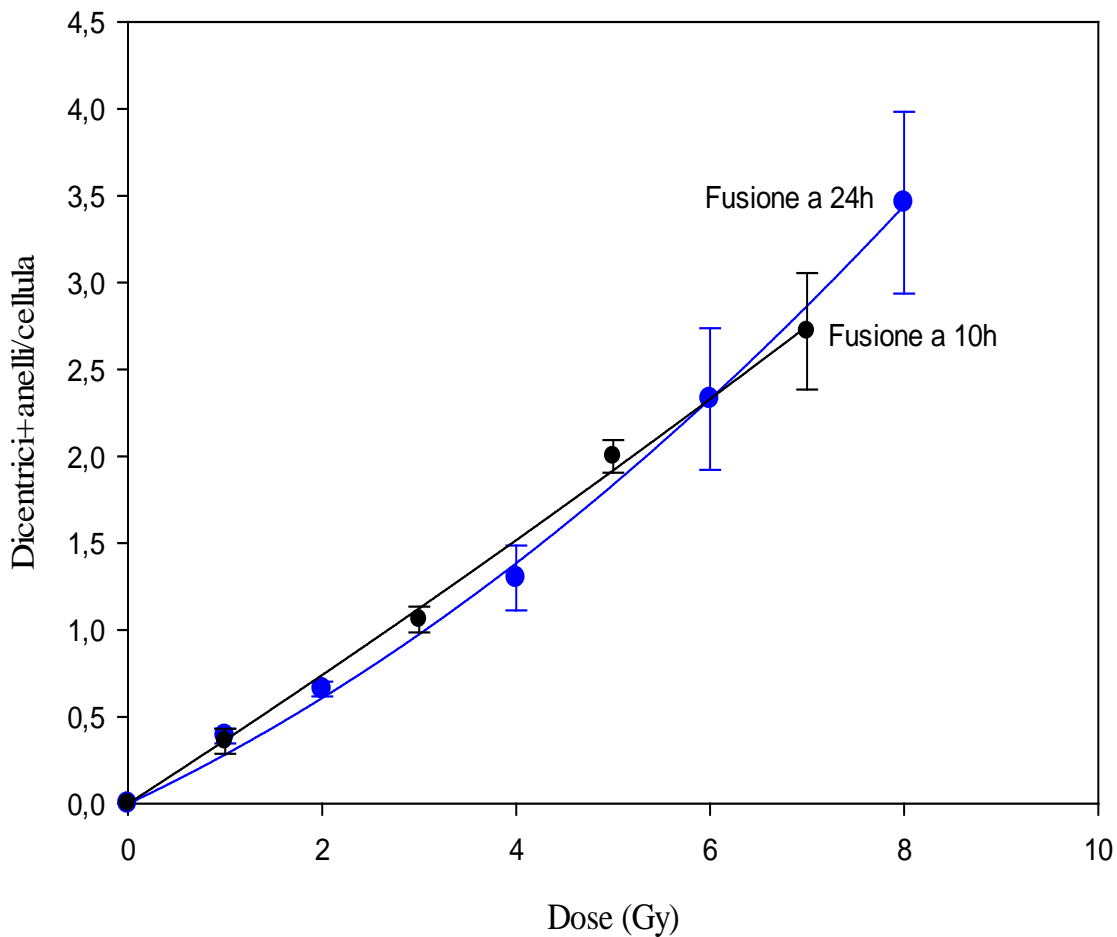


Figura 53. Numero di aberrazioni cromosomiche per cellula in linfociti prematuramente condensati con la tecnica della PCC, applicazione della FISH con sonde PNA. La fusione è avvenuta a 10 e a 24 ore dall'irraggiamento con raggi gamma da sorgente di  $^{60}\text{Co}$ . I punti sono valori medi $\pm$ SD secondo tre esperimenti (donatori) indipendenti.

Il confronto tra le due curve mostra, entro l'errore statistico, una sovrapposizione delle due curve. Questo significa che il tempo trascorso tra irraggiamento e fusione dei linfociti non influenza

il numero delle aberrazioni cromosomiche formatesi. Inoltre conferma, per la prima volta, quanto riportato da Pantelias et al. (1993): combinando le tecniche PCC-FISH e usando C-banding, le aberrazioni cromosomiche non stabili sono completate prima delle 10 ore. Esperimenti effettuati successivamente (Greinert, 1995) hanno confermato che il termine quadratico  $\alpha D^2$  necessita di 8 ore per essere interamente espresso, mentre il termine lineare  $\beta D$  si forma in un processo rapido.

Verificato che si possa utilizzare la sola curva ove la fusione avviene a 24 ore dall'irraggiamento, si è proceduto, con le stesse considerazioni riportate precedentemente, alla costruzione della curva di calibrazione dose-risposta con limiti di confidenza al 95% utilizzati per la stima di incertezze sulla dose. Il risultato è riportato nella Fig. 54.

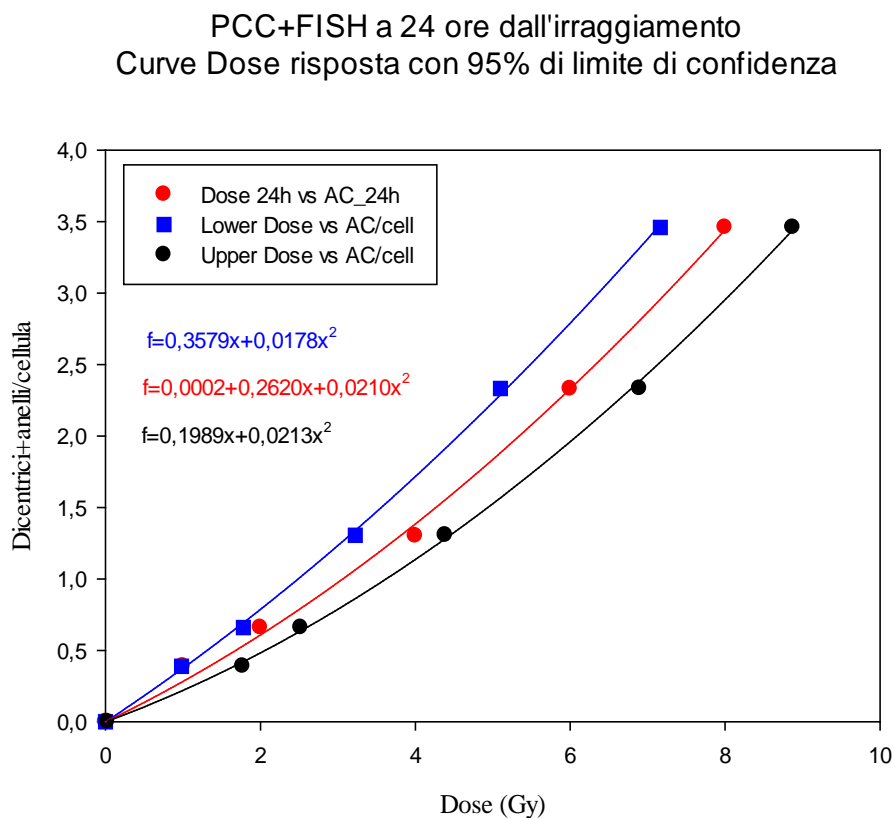


Figura 54. Curva di calibrazione dose-risposta, con la tecnica PCC, FISH e sonde PNA per telomeri e centromeri, con limiti di confidenza al 95% utilizzata per valutare incertezze sulla dose.

### PCC+FISH Lower Dose Curve

**R      Rsqr    Adj Rsqr      Standard Error of Estimate**

0,9997   0,9994   0,9993      0,0358

	<b>Coefficient</b>	<b>Std. Error</b>	<b>t</b>	<b>P</b>
y0	0,0000	0,0000	(+inf)	<0,0001
a	0,3579	0,0138	25,8771	<0,0001
b	0,0178	0,0023	7,8870	0,0014

#### Analysis of Variance:

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>
Regression	2	19,7040	9,8520
Residual	4	0,0051	0,0013
Total	6	19,7092	3,2849

Corrected for the mean of the observations:

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Regression	1	8,6362	8,6362	6738,5389	<0,0001
Residual	4	0,0051	0,0013		
Total	5	8,6413	1,7283		

### PCC+FISH Upper Dose Curve

**R      Rsqr    Adj Rsqr      Standard Error of Estimate**

0,9997   0,9994   0,9993      0,0351

	<b>Coefficient</b>	<b>Std. Error</b>	<b>t</b>	<b>P</b>
y0	0,0000	0,0000	(+inf)	<0,0001
a	0,1989	0,0108	18,4454	<0,0001
b	0,0213	0,0014	14,9543	0,0001

#### Analysis of Variance:

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>
Regression	2	19,7042	9,8521
Residual	4	0,0049	0,0012
Total	6	19,7092	3,2849

Corrected for the mean of the observations:

	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Regression	1	8,6363	8,6363	7004,7104	<0,0001
Residual	4	0,0049	0,0012		
Total	5	8,6413	1,7283		

Dall'analisi statistica delle curve per la Lower Dose e per l'Upper Dose si nota che sia la variabile dose sia il suo quadrato risultano statisticamente significative ( $p < 0,05$ ). L'adattabilità del modello ai dati osservati è altissima ( $R^2$  quasi pari a 1) e i residui del modello hanno un impatto bassissimo sul modello stesso.

Conclusa la costruzione di curve di calibrazione per ognuna delle tecniche sopra riportate, si è proceduto al confronto delle rispettive curve di calibrazione per poter valutare eventuali vantaggi tra le metodiche. Il risultato è riportato in Fig. 55.

### Curve di calibrazione in Giemsa, in FISH e in PCC+FISH

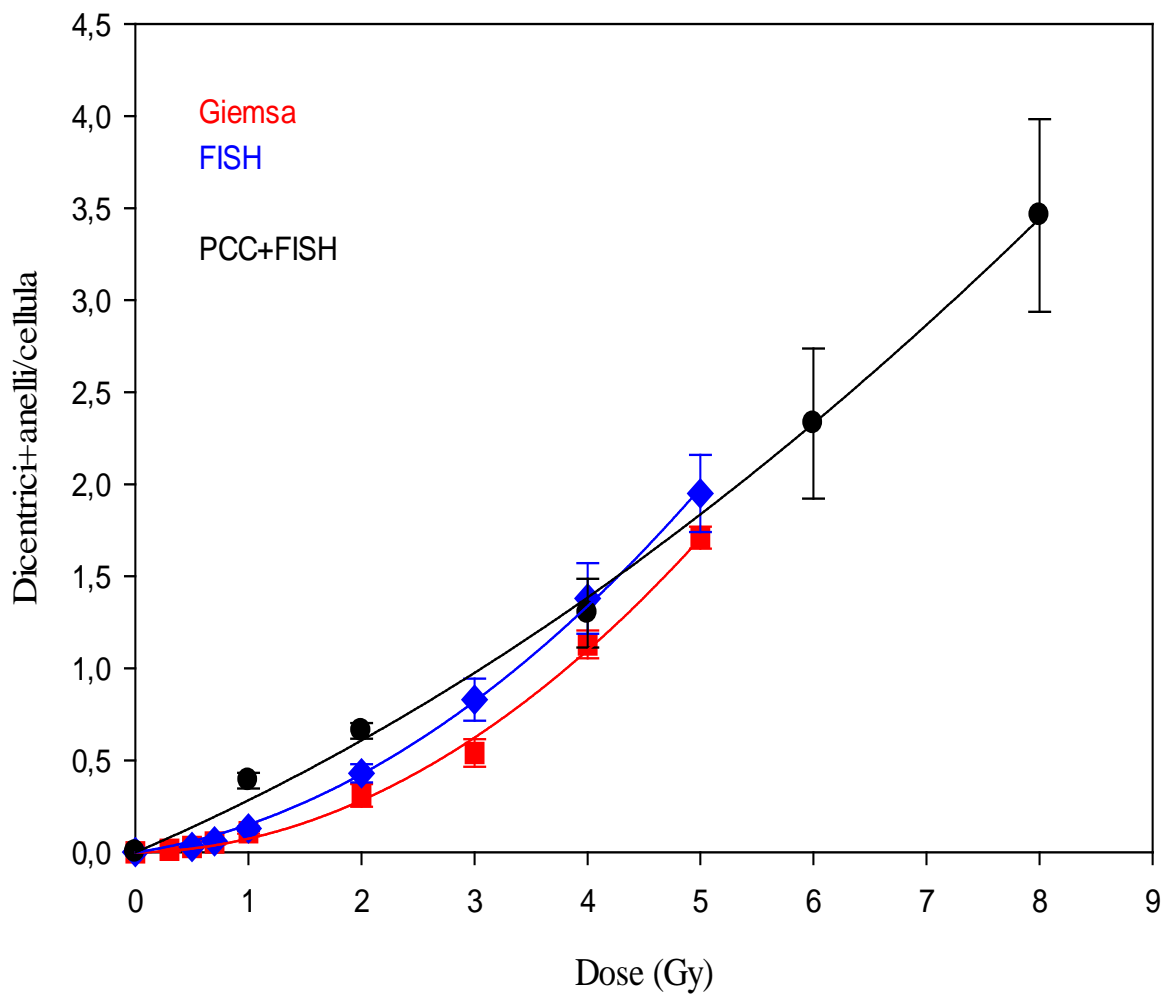


Figura 55. Confronto tra le curve di calibrazione dose-risposta ottenute con metodologie classiche (Giemsa), utilizzando FISH con sonde PNA e PCC con FISH e sonde PNA per la colorazione di telomeri e centromeri.

## VI. CONCLUSIONI

Lo scopo di questa tesi di dottorato è la valutazione della dose ricevuta da un individuo in caso di sovraesposizione alle radiazioni ionizzanti utilizzando metodologie citogenetiche per la costruzione di curve di calibrazione. Il range di dosi per le quali tali metodologie possono avere la loro applicazione inizia a 0,2 Gy e si estende fino a 8 Gy.

Sono state applicate e consolidate diverse tecniche citogenetiche. La valutazione delle aberrazioni cromosomiche non stabili (dicentrici ed anelli con centromero) nei linfociti umani T del sangue periferico (PBL) con la metodologia classica (colorazione dei cromosomi in Giemsa) è considerato il “golden standard” della dosimetria biologica. La sua utilità è stata dimostrata in vari incidenti radiologici che hanno coinvolto individui.

La difficoltà nell'analizzare metafasi colorate in Giemsa rende necessario avvalersi di personale ben formato a riconoscere i dicentrici, inoltre, il lungo tempo necessario per lo scoring (non più di 60 metafasi per ora per una persona esperta) pone dei problemi se è necessaria una risposta rapida ed accurata.

Nel campo della dosimetria biologica, per l'analisi delle AC, l'applicazione della tecnica dell'ibridazione fluorescente *in situ* (FISH) in combinazione con sonde fluorescenti (PNA) per la colorazione di centromeri e telomeri dei cromosomi, ha dimostrato di essere più accurata e rapida del metodo convenzionale. L'ibridazione delle sonde di PNA al DNA bersaglio richiede solo 1 ora con alta affinità e specificità al DNA bersaglio. Si ottengono segnali FISH luminosi anche senza invecchiamento del vetrino. Il tempo per l'analisi delle metafasi nel microscopio (l'acquisizione in questo caso avviene con un microscopio a fluorescenza) si riduce di metà e la sensibilità e l'accuratezza risultano migliori. L'applicazione di tale tecnica è stata introdotta nel campo della dosimetria biologica molto recentemente (2012) in contemporanea con lo svolgimento della



presente tesi. La metodica è applicabile in tutti i casi in cui è necessario un intervento medico di emergenza per sovraesposizione alle radiazioni.

Le tecniche sopra riportate necessitano che i linfociti umani per entrare nel ciclo cellulare e produrre metafasi di prima mitosi (quelle che vanno analizzate), vengano stimolati con apposite sostanze, poi occorre aspettare almeno 49-52 ore prima di poter analizzare una metafase. Tale inconveniente si supera obbligando i cromosomi dei linfociti del sangue periferico (ora sia B che T) a condensare in modo prematuro (PCC) dopo fusione con cellule mitotiche CHO di un topo (hamster cinese). I fattori che promuovono la mitosi delle cellule CHO inducono condensazione prematura nei linfociti umani. La cromatina diffusa del nucleo in interfase condensa e forma così cromosomi prematuri permettendo la loro visualizzazione (colorazione in Giemsa e lettura al microscopio ottico). Il tempo necessario per una fusione in presenza di cellule mitotiche CHO non supera i 75 minuti. In questo modo in caso di sovraesposizione alle radiazioni e disponibilità del sangue umano immediatamente dopo o a 24 ore dall'esposizione, è possibile valutare la dose analizzando l'eccesso di frammenti cromosomici presenti.

Quindi, in seguito ad esposizione alle radiazioni ionizzanti, la tecnica della PCC permette di misurare le aberrazioni cromosomiche direttamente nella fase  $G_0$  del ciclo cellulare dei linfociti in poco tempo dopo il campionamento del sangue della persona esposta senza la necessità di stimolazione mitogena e coltura (Pantelias and Maillie, 1983). Rimane però il problema di che tipo di danno andiamo ad analizzare in quanto se procediamo alla colorazione con Giemsa delle fusioni ottenute dalla PCC è possibile valutare solo il numero di cromosomi umani e di frammenti in eccesso rispetto a quanti riscontrati come background, anelli ed eventualmente il numero di cromosomi acentrici. La valutazione di questi ultimi è limitata dal meccanismo di riparazione il quale li sottrae abbassando la frequenza di presenza. I dicentrici, che costituiscono il risultato più specifico dovuto alle radiazioni, non possono essere visualizzati a causa della morfologia specifica dei cromosomi condensati in interfase e dell'incapacità di rivelare i centromeri dopo una

colorazione uniforme. Lavori già pubblicati hanno utilizzato la tecnica del C-banding per visualizzare i centromeri e le regioni di eterocromatina con bassi risultati di riproducibilità ed accuratezza. Quando però la metodica della PCC si combina con la FISH e le sonde PNA si ha, in modo rapido ed accurato, la rivelazione di frammenti di PCC, di eventuali traslocazioni nonché di cromosomi dicentrici e ad anello con centromero (M'kacher et al., 2014).

La metodica può essere utilizzata per determinare esposizioni sia a dosi basse sia a dosi acute che possono comportare un pericolo di vita. Essa può discriminare in modo accurato tra dose su corpo intero e dose parziale in quanto il numero delle cellule normali, determinato direttamente nei linfociti nella fase  $G_0$  senza la necessità di stimolazione mitogena e coltura, rispecchia in modo molto più accurato la proporzione di linfociti non irraggiati nel sangue periferico. Anche una piccola frazione risparmiata dell'ordine del 5% può essere rivelata in modo efficiente utilizzando tale metodica. Infine, nel caso di incidenti che coinvolgono le radiazioni ionizzanti, la metodica della PCC insieme alla FISH e alle sonde PNA costituisce uno strumento molto valido per triage di emergenza soprattutto se combinato con un sistema computerizzato automatico di acquisizione e analisi delle immagini provenienti dal microscopio a fluorescenza (M'kacher et al., 2014).

Quanto sopra è stato possibile perché, mentre nel passato le sonde per il DNA dedicate alla colorazione e visualizzazione di specifici cromosomi non ha avuto futuro in dosimetria biologica a causa del lungo tempo necessario per il loro completamento (2-5 giorni) e dell'alto costo delle sonde, molto recentemente sono state introdotte in commercio sonde peptidiche di acido nucleico (PNA) a basso costo. Esse hanno permesso di analizzare aberrazioni cromosomiche dovute alle radiazioni con tempi di ibridizzazione molto limitati, altissima specificità, intensità del segnale significativamente aumentato, aprendo nuove prospettive per tale applicazione.

Comunque, la metodica della PCC rimane una tecnica sofisticata e la presenza delle cellule CHO del topo con la loro inevitabile intensa colorazione potrebbe creare dei problemi nella rivelazione dei telomeri ai linfociti umani più debolmente colorati.

Nella presente tesi di dottorato è stato dimostrato che la colorazione di centromeri e telomeri con sonde DNA di tipo PNA permette una facile rivelazione di dicentrici, anelli con centromero, frammenti e cromosomi acentrici di linfociti (nel caso della tecnica PCC). La valutazione e lo scoring manuale di queste aberrazioni cromosomiche è stato provato che sono dirette e affidabili.

Questa miglioria apportata nelle tecniche citogenetiche utilizzate in questa tesi e in particolare alla tecnica della PCC con l'introduzione della FISH con sonde PNA ha permesso la costruzione della *prima curva* dose-risposta di dicentrici ed anelli esistente ad oggi in letteratura.

Questo rende la PCC una metodica di dosimetria biologica che non necessita di stimolazione dei linfociti, si riescono ad analizzare le AC sia in linfociti B e T e si riescono a valutare dosi ricevute non solo a corpo intero come le precedenti metodiche, ma anche dosi parziali. I vantaggi sopra elencati rendono tale metodica una futura candidata a diventare il nuovo “*golden standard*” della dosimetria biologica. Risulta rapida, sensibile, attendibile e necessita, per l'analisi e lo scoring di personale non altamente formato.

Di seguito è riportata una guida per la scelta della metodica citogenetica da seguire in presenza di qualche indicazione sulla dose assorbita:

Intervallo di dose (Gy)	Metodo di Dosimetria indicato	Manifestazioni
0.1 – 1	Dicentrici (+FISH)	Nessuna o leggera diminuzione nel conteggio del sangue
1.0 – 3.5	Cinetica della diminuzione dei linfociti/dicentrici (+FISH)	Danno al BM leggero o importante
3.5 – 7.5	Cinetica della diminuzione dei linfociti /PCC (+FISH)	Danno moderato GI
7.5 – 10	Cinetica della diminuzione dei linfociti/PCC (+FISH)	Grave danno al BM e danno GI

GI (gastrointestinale); MS (midollo spinale).

Per le metodiche sopra riportate sono state costruite curve di calibrazione dose effetto come prerequisito fondamentale per la stima della dose in caso di esposizione. Le curve sono state ottenute da campioni di sangue di tre donatori sani sia per valutare il valore di fondo dei dicentrici sia per preparare i campioni che in seguito saranno irraggiati in vitro a varie dosi da 0,3 a 8 Gy con una sorgente gamma di  $^{60}\text{Co}$  con rateo di dose pari a 0,5 Gy/min.

Noto che il numero delle aberrazioni cromosomiche (AC) è legato alla dose attraverso una equazione lineare quadratica e che nel caso dell'irraggiamento con raggi gamma la distribuzione delle AC è ben rappresentata da una distribuzione di Poisson, è stato verificato dai dati ottenuti per la costruzione delle curve che quanto sopra riportato è vero applicando ai dati il test statistico u test. Solo nel caso della colorazione con Giemsa e per le dosi alte i valori di u test hanno mostrato una leggera sottodispersione dei dati ottenuti mentre per tutti gli altri casi la distribuzione di Poisson dei dati è stata confermata.

Sono state calcolate le equazioni di tutte le curve, sono stati ottenuti i valori dei coefficienti quadratico e lineare (alfa e beta) con i propri errori standard ed è stato verificato per ogni caso considerato, con l'utilizzo di software statistici, che i coefficienti del modello siano significativamente diversi dallo zero ( $p < 0,05$ ). È stata verificata l'adattabilità del modello ai dati osservati, risultata molto alta in tutti i casi (coefficiente di regressione lineare quadratica molto prossimo a 1) e che i residui del modello hanno un impatto molto basso sul modello stesso.

I risultati di questa tesi di dottorato rendono possibile, dopo un'esposizione accidentale alla radiazione gamma con una dose nell'intervallo tra 0,3 e 8 Gy, l'applicazione di metodologie citogenetiche nuove e originali per valutare in modo rapido, attendibile e accurato, la dose ricevuta, all'interno di un intervallo di confidenza al 95% basandosi su curve originali di calibrazione dose effetto costruite in laboratorio. Una veloce valutazione della dose ricevuta permette un appropriato intervento medico di emergenza, utile in casi di individui con sovraesposizioni radiologiche con

sorgenti gamma o di individui esposti ad azioni di terrorismo con utilizzo di materiale radioattivo, caso ove l'automazione dello scoring delle aberrazioni cromosomiche risulta indispensabile.

## VII. ABBREVIAZIONI

<b>AC</b>	Aberrazioni cromosomiche
<b>BSA</b>	Albumina siero bovino
<b>CAA</b>	Analisi delle aberrazioni cromosomiche
<b>C-banding</b>	Tecnica di colorazione dei centromeri dei cromosomi
<b>CHO cells</b>	Linea di cellule ovariche di hamster
<b>DAPI</b>	4',6-diamidin-2-fenilindolo, colorante organico fluorescente che lega fortemente regioni del DNA ricche in sequenze A-T
<b>DNA</b>	Acido desossiribonucleico
<b>DSB</b>	Doppie rotture del DNA
<b>eV, keV, MeV</b>	elettron volt, kilo, Mega
<b>FCS</b>	Fetal Calf Serum, siero fetale di vitello
<b>FISH</b>	Ibridizzazione fluorescente <i>in situ</i> – tecnica di individuare i cromosomi con ibridizzazione <i>in situ</i>
<b>FITC</b>	Fluoresceina isotiocianato, gruppo fluoroforo
<b>G0, G1, G2, S, M</b>	Fasi del ciclo cellulare, S sintesi, M mitosi
<b>GTG-banding</b>	G-bands by trypsin using Giemsa, tecnica di presentazione dei cromosomi con zone
<b>Gy</b>	Gray – unità di misura della dose, 1 Gy = 100 rad
<b>INFN</b>	Istituto Nazionale di Fisica Nucleare
<b>ISIS</b>	Software di acquisizione dell'immagine in fluorescenza
<b>LET</b>	Linear Energy Transfer, energia depositata linearmente
<b>Ly</b>	Linfociti
<b>PBL</b>	Peripheral blood lymphocytes – linfociti sangue periferico
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Solution
<b>PCC</b>	Premature Chromosome Condensation
<b>PEG</b>	Polyethylene Glycol - glicole polietilenico
<b>PHA</b>	Phytohaemagglutinin – fitoemoagglutinina
<b>SSB</b>	Singole rotture del DNA
<b>SD</b>	Deviazione standard
<b>TLD</b>	Thermoluminescent dosimeter – dosimetri a termoluminescenza
<b>TRITC</b>	Isotiocianato di tetrametilrodamina, gruppo fluoroforo

## VIII. BIBLIOGRAFIA

- 1) Awa A.A., T. Sofuni, T. Honda, M. Itoh, S. Neriishi and M. Otake (1978) "Relationship between the radiation dose and chromosome aberrations in atomic bomb survivors of Hiroshima and Nagasaki" *J. Radiat. Res.* 19, 126-140.
- 2) Badie C, G. Iliakis, N. Foray, G. Alsbeih, G. E. Pantelias, R. Okayasu, N. Cheong, N. S. Russell, A. C. Begg, C.F. Arlett and E.P. Malaise (1995) "Defective Repair of DNA Double-Strand Breaks and Chromosome Damage in Fibroblasts from a Radiosensitive Leukemia Patient" *Cancer Research*, 55, 1232-1234.
- 3) Bauchinger M., E. Schmid, H. Braselman, N. Willich and C. Clemm (1980) "Time-effect relationship of chromosome aberrations in peripheral lymphocytes after radiation therapy for seminoma. *Mutat. Res.* 211, 265-272.
- 4) Bauchinger ML, E. Schmid, H. Zitzelsberger, H. Braselmann and U. Nahrstedt (1993) "Radiation-induced chromosome aberrations analysed by two-colour fluorescence in situ hybridization with composite whole chromosome-specific DNA probes and a pancentromeric DNA probe". *Int. J. Radiat. Biol* 64, No. 2, 179-184.
- 5) Bender M.A. and P.C. Gouch (1962) "Types and rates of X-ray-induced chromosome aberrations in human blood irradiated in vitro". *Proc. Natl. Acad. Sci.(U.S.A)*, 48, 522-532.
- 6) Bender M.A., J.M. Rary and R.P. Kale (1985) "G2 chromosomal radiosensitivity in ataxiatelangiectasia lymphocytes". *Mutation Research*, 152, 39-47.
- 7) Bender M.A., M.V. Viola, J. Fiore, M.H. Thompson and R.C. Leonard (1988) "Normal G2 chromosomal radiosensitivity and cell survival in the cancer family syndrome". *Cancer Research*, 48, 2579-2584.
- 8) Bender, M.A., Griggs, H.G. and Bedford J.S. (1974) "Mechanisms of chromosomal aberration production. III. Chemicals and ionizing radiation. *Mutation Research*, 23, 197-212.
- 9) Biocher, D., Nuesse, M. and Bryant, P.E. (1983) "Kinetics of double strand break repair in the DNA of X-irradiated synchronized mammalian cells". *Int. J. Radiat. Biol.* 43, 579-584.
- 10) Boyum A. (1968) "Separation of white blood cells". *Nature*, 204, 793-794.
- 11) Brandan M.E., M.A. Perez-Pastenes, P. Ostrosky-Wegman, M.E. Gonsebatt and R. Diaz-Perches (1994) "Mean dose to lymphocytes during radiotherapy treatments". *Health Rhys.* 61, 326-329.
- 12) Bryant, P.E. (1984) "Enzymatic restriction of in situ mammalian cell DNA using Pvu II and Bam HI: evidence for the double-strand break origin of chromosomal aberrations". *Int. J. Radiat. Biol.* 46, 57-65.
- 13) Buckton K.E., G.E. Hamilton, L. Paton and A.O. Langlands (1978) "Chromosome aberrations in irradiated ankylosing spondylitis patients". In *Mutagen-Induced Chromosome Damage in Man* (H. J. Evans and D.C. Lloyd, Eds.), pp. 142-150. Yale University Press, New Haven, CT.

- 14) Cheng,X., Pantelias,G.E., Okayasu,R., Cheong,N. and Iliakis,G. (1993) "Mitosis-promoting factor activity of inducer mitotic cells may affect radiation yield of interphase chromosome breaks in the premature chromosome condensation assay". *Cancer Res.*, 53, 5592-5596.
- 15) Cheong,N., Wang,Y., Jackson, M. and Iliakis,G. (1992) "Radiation-sensitive *irs* mutants rejoin DNA double-strand breaks with efficiency similar to that of parental V79 cells but show altered response to radiation-induced G2 delay". *Mutation Res.*, 274, 111-122.
- 16) Cornforth,M.N. and BedfordJ.S. (1985) "On the nature of a defect in cells from individuals with ataxia-telangiectasia". *Science*, 227, 1589-1591.
- 17) Dalrymple G.V., I.R. Lindsay, J.C. Mitchell and K.A. Hardy (1991) "A review of the USAF/NASA proton bioeffects project: Rationale and acute effects". *Radiat. Res.* 126, 117-119.
- 18) Dewey, W.C., Furman, S.C. and Miller, H.H. (1970) Comparison of lethality and chromosomal damage induced by X-rays in synchronized Chinese hamster cells in vitro. *Radiat. Res.*, 43, 561-581.
- 19) Dewey, W.C., NoelJ.S. and Dettor.C.M. (1972) Changes in radiosensitivity and dispersion of chromatin during the cell cycle of synchronous Chinese hamster cells. *Radiat. Res.*, 52, 373-394.
- 20) Durante M., K. George and T.C. Yang (1996) "Biological dosimetry by interphase chromosome painting". *Radiat. Res.*, 145, 53-60.
- 21) Durante M., K. George and T.C. Yang (1997) "Biodosimetry of ionizing radiation by selective painting of prematurely condensed chromosomes in human lymphocytes". *Radiat. Res.* 148, S45-S50.
- 22) Edwards A.A. (1997) "The Use of Chromosomal Aberrations in Human Lymphocytes for Biological Dosimetry". *Radiation Research* 148, S39- S44.
- 23) Edwards A.A., P. Finnon, J.E. Moquet, D.C. Lloyd, F. Darroudi and A.T. Natarajan (1994) "The effectiveness of high energy neon ions in producing chromosomal aberrations in human lymphocytes". *Radiat. Prot. Dosim.* 52, 299-303.
- 24) Edwards A.A., R.J. Purrott, J.S. Prosser and D.C. Lloyd (1980) "The induction of chromosome aberrations in human lymphocytes by alpha-radiation". *Int. J. Radiat. Biol.* 38, 83-91.
- 25) Ekstrand K.E., R.L. Dixon, S. Plunkett and M. Raben (1981) "The calculation of the dose to lymphocytes in external beam radiation therapy". *Radiat. Res.* 85, 399-407.
- 26) Evans H.J. and Lloyd D.C. eds., (1978) "Mutagen-Induced Chromosome Damage in Man". Edinburgh Press.
- 27) Hardy K.A. (1991) "Dosimetry methods used in the studies of the effects of protons on primates: A review". *Radiat. Res.* 126, 120-126.
- 28) HarrisJ.W. and PowerJ.A. (1973) "Diamide: A new radiosensitizer for anoxic cells". *Radiat. Res.*, 56, 97-109.
- 29) Hieber L. and Lucke-Huhle C. (1983). "PCC technique reveals severe chromatin lesions and repair in G2-arrested cells after alpha irradiation". *Exp. Cell. Res.*, 144, 57-62.
- 30) Hittelman W.N. et.al. (1975). "The nature of Adriamycin-induced cytotoxicity in Chinese hamster cells as revealed by premature chromosome condensation". *Cancer Res.* 35:3027.



- 31) IAEA, 2011. Cytogenetic Dosimetry: Applications in preparedness for and response to radiation emergencies". International Atomic Energy Agency, Vienna.
- 32) Iliakis, G., Cicilioni, O. and Metzger, L. (1991) Measurement of DNA double-strand breaks in CHO cells at various stages of the cell cycle using pulsed field gel electrophoresis: calibration by means of  $^{125}\text{I}$  decay". *Int. J. Radiat. Biol.*, 59, 343-357.
- 33) Iliakis, G. and Nuesse, M. (1983a) "Evidence that repair and expression of potentially lethal damage causes the variations in the cell cycle in Ehrlich ascites tumor cells after X-irradiation". *Radiat. Res.*, 95, 97-107.
- 34) Iliakis, G. and Nuesse, M. (1983b) "The importance of G<sub>1</sub>/S-border and mitosis in the fixation of potentially lethal damage". *Radiat. Envir. Biophys.*, 22, 201-207.
- 35) Iliakis, G., Ganguly, T., Pantelias, G.E., Cheong, N., Okayasu, R., Shah, S., Nederostek, D. and Nishimoto, T. (1995) In Hagen, U., Harder, D., Jung, H. and Streffer, C. "Tenth International Congress of Radiation Research". Wurzburg, Germany, pp. 384-387.
- 36) Iliakis, G., Pantelias, G.E., Okayasu, R. and Seamer R. (1987) " $^{125}\text{I}$ Urd-induced chromosome fragments, assayed by premature chromosome condensation, and DNA double-strand breaks have similar repair kinetics in G<sub>1</sub>-phase CHO-cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 52, 705-722.
- 37) ISCN, 1985. "An International System for Human Cytogenetic Nomenclature". Eds. D.G. Harnden and H.P. Klinger. *Birth Defects: Original Article Series Vol. 21 No. 1.* March of Dimes Birth Defects Foundation, New York.
- 38) Johnson, R.T. and Rao, P.N. (1970) "Mammalian cell fusion: Induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei". *Nature (London)*, 226, 717-722.
- 39) King, J.S., Phillips, J.W. and Morgan, W.F. (1993) "The role of DNA double-strand-break rejoining in chromosome damage and repair". In Obe, G. and Natarajan, A.T. (eds.), *Chromosome Alterations: Origin and Significance.* Springer-Verlag, Berlin, pp. 64-75.
- 40) Knehr S., H. Zitzelsberger, H. Braselmann and Bauchinger (1994) "Analysis for DNA-proportional distribution of radiation-induced chromosome aberrations in various triple combinations of human chromosomes using fluorescence in situ hybridization". *Int. J. Radiat. Biol.* 65, No. 6, 683-690.
- 41) Knight R.D., R. Parshad, F.M. Price, Tarone and K.K. Sanford (1993) "X-ray-induced chromatid damage in relation to DNA repair and cancer incidence in family members". *Int. J. Cancer*, 54, 589-593.
- 42) Lavin, M.F. and Kidson, C. (1977) "Repair of ionizing radiation induced DNA damage in human lymphocytes". *Nucleic Acids*, 4, 4015-4022.
- 43) Leeper D.B., Schneiderman, M.H. and Dewey, W.C. (1972) "Radiation-induced division delay in synchronized Chinese hamster cells in monolayer". *Radiat. Res.*, 50, 401-417.
- 44) Lin S., et al. (2012), "A modified system for analyzing ionizing radiation-induced chromosome abnormalities" *Rad. Research* 177, 533-538.

- 45) Lloyd D.C., R.J. Purrott and E.J. Reeder (1980) The incidence of unstable chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes from unirradiated and occupationally exposed people". *Mutat. Res.* 72, 523-532.
- 46) Lucas J. N., F. S. Hill, C.E. Burk, A.B. Cox and T. Straume (1996) "Stability of the translocation frequency following whole-body irradiation measured in rhesus monkeys". *Int. J. Radiat. Biol.* 70, 309-317.
- 47) Lucas J.N. (1997) "Dose reconstruction for individuals exposed to ionizing radiation using chromosome painting". *Radiat. Res.* 148, S33-S38.
- 48) Lucas J.N., A. Awa, T. Straume, M. Poggensee, Y. Kodama, M. Nakano, K. Ohtaki, H.U. Weier, D. Pinkel, J. Gray and G. Littlefield (1992) "Rapid traslocation frequency analysis in humans decades after exposure to ionising radiation". *Int. J. Radiat. Biol.* 62, 53-63.
- 49) Merkle. W. (1983) "Statistical methods in regression and calibration analysis of chromosome aberration data". *Radiat. Environ. Biophys.* 21, 217-233.
- 50) Metzger,L. and Iliakis,G. (1991) "Kinetics of DNA double-strand break repair throughout the cell cycle assayed by pulsed field gel electrophoresis in CHO cells". *Int. J. Radiat. Biol.* 59, 1325-1339.
- 51) M'kacher R. et al. (2014), "Detection and automated scoring of dicentric chromosomes in non-stimulated lymphocyte prematurely condensed chromosomes following telomere and centromere staining", *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, In press.
- 52) Morgan,W.F., Valcarcel,E.R., Columna,E.A., Winegar,R.A. and Yates,B.L. (1991b) "Induction of chromosome damage by restriction enzymes during mitosis". *Radiat. Res.*, 127, 101-106.
- 53) Morgan,W.F., Yates,B.L., RuferJ.T., Columna,E.A., Valcarcel,E.R. and PhillipsJ.W. (1991a) "Chromosomal aberration induction in CHO cells by combined exposure to restriction enzymes and X-rays". *Int. J. Radiat. Biol.* 60,627-634.
- 54) Natarajan, A.T. and Obe,G. (1978) "Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations. I. Utilisation of Neurospora endonuclease for the study of aberration production in G2 stage of the cell cycle". *Mutation Res.*, 52, 137-149.
- 55) Okayasu,R., Pantelias,G.E. and Iliakis,G. (1993) "Increased frequency of formation of interphase ring-chromosomes in radiosensitive irs-1 cells exposed to X-rays". *Mutation Research*, 294, 199-206.
- 56) Oleinick,N.L., Balasubramaniam,U., Xue,I. and Chiu,S. (1994) "Nuclear structure and the microdistribution of radiation damage in DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* 66, 523-529.
- 57) Olive,P.L. (1992) "DNA organization affects cellular radiosensitivity and detection of initial DNA strand breaks". *Int. J. Radiat. Biol.* 62, 389-396.
- 58) Order S.B. (1977) "The effects of therapeutic irradiation on lymphocytes and immunity". *Cancer* 39, 737-743.
- 59) Pandita,T.K. and Hittelman, W.N. (1995) Evidence of a chromatin basis for increased mutagen sensitivity associated with multiple primary malignancies of the head and neck. *Int. J. Cancer*, 61, 738-743.

- 60) Pandita, T.K. and Hittelman, W.N. (1992) "Initial chromosome damage but not DNA damage is greater in ataxia-telangiectasia cells. *Radiat. Res.*, 130, 94-103.
- 61) Pantelias G.E. and H.D. Maillie (1984) "The use of peripheral blood mononuclear cell prematurely condensed chromosomes for biological dosimetry". *Radiat. Res.* 99, 140-150.
- 62) Pantelias G.E., G. Iliakis, C. Sambani and G. Politis (1993) "Biological dosimetry of absorbed radiation by C-banding of interphase chromosomes in peripheral blood lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 63, 349-354.
- 63) Pantelias, G.E. (1986) "Radiation-induced cytogenetic damage in relation to changes in interphase chromosome conformation". *Radiat. Res.*, 105, 341-350.
- 64) Pantelias, G.E. (1993) "Factors determining the yields of radiation-induced chromosome aberrations as visualised by means of premature chromosome condensation in interphase cells". In Obe, G. and Natarajan, A.T. (eds.), *Chromosome Alterations: Origin and Significance*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 140-149.
- 65) Pantelias, G.E. and Maillie, H.D. (1983) "A simple method for premature chromosome condensation induction in primary human and rodent cells using polyethylene glycol". *Somat. Cell Genet.*, 9, 533-547.
- 66) Pinkel D, Straume T and Gray JW, 1986. "Cytogenetic Analysis Using Quantitative, High Sensitivity, Fluorescence Hybridization". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2934-2938.
- 67) Plowman P.N., B.A. Bridges, C.F. Arlett, A. Hinney and J.E. Kingston (1990) "An instance of clinical radiation morbidity and cellular radiosensitivity, not associated with ataxia-telangiectasia". *The British Journal of Radiology*, 63, 624-628.
- 68) Ponder B. (1994) "Breast cancer genes: searches begin and end". *Nature*, 37, 279.
- 69) Preston D.L., M.E. McConney, A.A. Awa, K. Ohtaki, M. Itoh and T. Honda (1989) "Comparison of the Dose-Response relationship for Chromosome aberration frequencies between the T65D and DS86 Dosimetries". TR 7-88 Radiation effects Research Foundation, Hiroshima, 1989.
- 70) Prosser J.S. (1976). "Survival of human T and B lymphocytes after X-irradiation". *Inter. J. Rad. Biol.*, 30:459.
- 71) Rao P.N. et al. (1970). "Mammalian cell fusion". *Nature*, 225:159.
- 72) Rydberg, B. (1984) "Repair of DNA double-strand breaks in colcemid-arrested mitotic Chinese hamster cells". *Int. J. Radiat. Biol.*, 46, 299-304.
- 73) Salassidis K, Georgiadoy-Schumacher V, Braselmann H, Muller P, Peter RU and Bauchinger M, 1995. "Chromosome painting in highly irradiated Chernobyl victims: A follow-up study to evaluate the stability of symmetrical translocations and the influence of clonal aberrations for retrospective dose estimation. *Int. J. Radiat. Biol.* 68, 257-262.
- 74) Salassidis K, Schmid E, Peter RU, Braselmann H and Bauchinger M, 1994. "Dicentric and translocation analysis for retrospective dose estimation in humans exposed to ionizing radiation during the Chernobyl nuclear plant accident". *Mutat. Res.* 311, 39-48.

- 75) Sanford K.K., R. Parshad, R. Gantt, R.E. Tarone, G.M. Jones and F.M. Price (1989) "Factors affecting and significance of G2 chromatin radiosensitivity in predisposition to cancer". *Int. J. Radiation Biology*, 55, 963-981.
- 76) Sasaki H. and Nishimoto T. (1987) "Chromosome condensation may enhance X-ray related cell lethality in a temperature-sensitive mutant (ts BN2) of baby hamster kidney cells (BHK21)". *Radiat. Res.*, 109, 407-418.
- 77) Sasaki M.S. (1978) "Radiation damage and its repair in the formation of chromosome aberrations in human lymphocytes". In "Mutagen-Induced Chromosome Damage in Man". Evans H.J. and Lloyd D.C. eds., (1978), Edinburgh Univ. Press.
- 78) Sax K. (1943) "The effect of centrifugation upon the production of X-ray induced chromosomal aberrations". *Proc. Natl. Acad. Set USA*, 29, 18-21.
- 79) Schmid E., Zitzelberger H., Braselmann H., Gray J.W. and Bauchinger M. (1992) "Radiation-induced chromosome aberrations analysed by fluorescence in situ hybridization with a triple combination of composite whole chromosome- specific DNA probes". *International Journal of Radiation Biology*, 62, 673-678.
- 80) Scott D., A. Spreadborough, E. Levine and S.A. Roberts (1994) "Genetic predisposition in breast cancer". *The Lancet*, 344, 1444.
- 81) Senvan'kaev AV, Lloyd DC, Edwards AA and Moiseenko VV and Zhloba AA, (1995) "A Survey of Chromosome Aberrations in Lymphocytes of Chernobyl Liquidators". *Radiat. Prot. Dosim.* 58, 85-91.
- 82) Senvan'kaev AV, Lloyd DC, Edwards AA and Moiseenko W, (1995) "High exposure to radiation received by workers inside the Chernobyl sarcophagus". *Radiat. Prot. Dosim.* 59, 85-91.
- 83) Shi L., Fujioka K., Sun J., Kinomura A., Inaba T., Ikura T., Ohtaki M., Yoshida M., Kodama Y., Livingston K. G., Kamiya K. and Tashiro S. (2012) "A Modified System for Analyzing Ionizing Radiation-Induced Chromosome Abnormalities". *Radiat. Res.* 177, 533-538.
- 84) Skalka M., (1971) "Biochemical Indicators of Radiation Injury in Man". IAEA
- 85) Straume T. and M.A. Bender (1997) "Issues in cytogenetic biological dosimetry: Emphasis on radiation environments in space". *Radiat. Res.* 148, S60-S70.
- 86) Tanzarella,C, De Salvia,R., Degrassi F., Fiore,M. and Palitti,F. (1990) "Interactions between X-ray and restriction endonuclease-induced lesions in the formation of chromosomal aberrations". *Mutation Res.*, 244, 197-200.
- 87) Terzoudi G. et al. (2008) " A new cytogenetic screening methodology to evaluate individual susceptibility to radiation sensitivity", 36<sup>th</sup> Annual meeting of Radiation Research Society, September 2008, Tours, France.
- 88) Terzoudi G. et al. (2011). " Chromatin dynamics during cell cycle mediate conversion of DNA damage into chromatid breaks and affect formation of chromosomal aberrations:Biological and clinical significance". *Mut. Res.* 711, 174-186.

- 89) Thacker J. and Ganesh,A.N. (1990) "DNA-break repair, radioresistance of DNA synthesis, and camptothecin sensitivity in the radiation-sensitive *irs* mutants: Comparisons to ataxia-telangiectasia cells". *Mutation Res.*, 235, 49-58.
- 90) Thompson D.E., K. Mabuchi, E. Ron, M. Soda, M. Tokunaga, S. Ochikubo, S. Sugimoto, T. Ikeda, M. Terasaki, S. Izumi and D.L.Preston (1994) "Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part II: Solid tumors, 1958-1987". *Radiat. Res.* 137, S17-S67.
- 91) Tucker S.L., Turesson I. and Thames H.D. (1992) " Evidence for individual differences in radiosensitivity of human skin". *European Journal of Cancer*, 11, 1783-1791.
- 92) Turesson I. and Thames H. (1989) "Repair capacity and kinetics of human skin during fractionated radiotherapy: erythema, desquamation and telangiectasia after 3 and 5 years follow-up". *Radiotherapy and Oncology*, 15, 169-188.
- 93) Turesson I., (1990) "Individual variation and dose dependency in the progression rate of skin telangiectasia". *International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics*, 19, 1569-1574.
- 94) Vorobsova IE. Mikhelson VM et al, 1994." Cytogenetic examination of ameliorators performed in different times after the Chernobyl accident". *Radiobiology and Radioecology* 34, 798-804.
- 95) Watanabe M. and Horikawa,M. (1977) "Analysis of differential sensitivities of synchronized HeLa S3 cells to radiations and chemical carcinogens during the cell cycle, Part IV. X rays". *Mutation Res.*, 44, 413-426.
- 96) Wolff S. (1961) Radiation genetics. In Errera, M. and Forssberg,A. (eds), "Mechanisms in radiobiology" Academic Press. New York, pp. 419-475.