

MECCANISMI CELLULARI
E MOLECOLARI DELLE
RADIAZIONI

**IMPLICAZIONI DI COMPONENTI DELL'ASSE IGF (INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR)
NELLA RISPOSTA PROLIFERATIVA E APOPTOTICA DI CELLULE TUMORALI;
POSSIBILE SINERGISMO CON LE RADIAZIONI IONIZZANTI**

Barbara Tanno, Vincenzo Cesi, Maria Laura Giuffrida, Fabiola Sesti, Roberta Vitali, Camillo Mancini
e Giuseppe Raschellà

Ente Nuove Tecnologie Energia Ambiente (ENEA), Sezione di Tossicologia e Scienze Biomediche, Roma

La *insulin-like growth factor binding protein-5* (IGFBP-5) è una proteina in grado di legare IGF ottimizzandone l'interazione con il suo recettore (IGF1R) oltre a svolgere una azione di fattore di crescita *per se*. In cellule di neuroblastoma in coltura l'espressione di IGFBP-5 è frequente. Su dieci linee cellulari testate otto risultano avere una espressione misurabile con analisi per western blot. Di recente è stato messo in luce un meccanismo, conservato nella scala evolutiva, di silenziamento di geni specifici per azione di piccoli RNA interferenti di due tipi: gli *small interfering RNA* (siRNA) e i microRNA. Abbiamo costruito un vettore di espressione in grado di produrre microRNA per inibire l'espressione di IGFBP-5. Dopo trasfezione di una linea cellulare di neuroblastoma (LAN-5) abbiamo misurato l'espressione di IGFBP-5 nei cloni trasfettati. Abbiamo verificato, in ogni clone analizzato, una considerevole diminuzione dell'espressione rispetto ai controlli. Abbiamo quindi valutato la capacità proliferativa dei cloni in cui è stata inibita l'espressione di IGFBP-5 dimostrando un considerevole rallentamento della crescita e un aumento del tempo di duplicazione. Al tempo stesso, la percentuale delle cellule che vanno incontro ad apoptosi risulta aumentata in questi cloni. La capacità differenziativa sotto stimolo con acido retinoico è diminuita come dimostrato da una comparsa più tardiva dei neurofilamenti e da una ridotta emissione neuritica. La capacità di crescita in agar semisolido delle cellule interferite per l'espressione di IGFBP-5 risulta notevolmente ridotta. Sono attualmente in corso esperimenti per saggiare l'eventuale effetto agonistico dell'inibizione di IGFBP-5 e delle radiazioni ionizzanti. In conclusione, data l'importanza che l'asse IGF riveste in molti tipi di tumore, i nostri dati suggeriscono che IGFBP-5 potrebbe costituire un interessante bersaglio per terapia genica anche in associazione con altre modalità terapeutiche quali la radioterapia.

**MODELLI MECCANICISTICI DI DANNO AL DNA E
ABERRAZIONI CROMOSOMICHE DA RADIAZIONI IONIZZANTI**

F. Ballarini^{1,2}, W. Friedland³, S. Molinelli¹, A. Ottolenghi^{1,2}, H.G. Paretzke³, M. Rossetti¹, A. Valota¹

¹Università degli Studi di Pavia, Dipartimento di Fisica Nucleare e Teorica

²INFN - Istituto Nazionale di Fisica Nucleare

³GSF, Institute for Radiation Protection, Neuherberg, Germany

e-mail: francesca.ballarini@mi.infn.it

Introduzione

I meccanismi che governano l'induzione del danno radiobiologico non sono ancora del tutto noti. I modelli meccanicistici, specialmente se basati su simulazioni di struttura di traccia, possono essere di grande aiuto in quanto permettono di testare diverse assunzioni sugli *step* intermedi che portano dalle deposizioni iniziali di energia alla formazione del danno, nonché di effettuare previsioni nei casi in cui i dati sperimentali sono insufficienti o del tutto assenti (tipicamente alle basse dosi). In questo lavoro ci si è focalizzati su due questioni: 1) la quantificazione del ruolo protettivo giocato dagli *scavengers* e dagli istoni rispetto a ssb, dsb e lesioni più complesse; 2) la valutazione del ruolo giocato dalla complessità del danno iniziale e dalla localizzazione dei cromosomi interfascici nell'induzione di aberrazioni cromosomiche. L'ottimo accordo con vari set di dati sperimentali ha fornito una validazione dei due modelli. Inoltre le applicazioni a problemi difficilmente investigabili sperimentalmente (e.g. clusterizzazione di danni al DNA a livello del nm ed estrapolazioni alle basse dosi) hanno fornito ulteriori esempi di utilizzo dei modelli come strumenti non solo interpretativi ma anche predittivi.

Danno al DNA: ruolo degli *scavengers* e della struttura del bersaglio

Oltre che dalla dose e dalla qualità della radiazione, l'induzione dei danni al DNA può essere modulata anche da

altri parametri quali la struttura del bersaglio e la concentrazione di *scavengers*. In questo contesto è stata quantificata la dipendenza di ssb, dsb e lesioni più complesse dalla *scavenging capacity* (SC) dell'ambiente e dall'organizzazione della doppia elica in diverse strutture, in particolare DNA "nudo", minicromosoma SV40 (in cui gli istoni sono presenti ma poco "impacchettati") e cromatina compatta. Come base di partenza si è utilizzato il codice Monte Carlo PARTRAC, sviluppato nell'ambito di una collaborazione tra le Università di Pavia e Milano e l'istituto GSF di Monaco. PARTRAC è in grado di riprodurre la struttura di traccia di fotoni, elettroni e ioni leggeri in acqua liquida [1] e di simulare il DNA contenuto in una cellula umana con un approccio "atomo-per-atomo" a diversi livelli di organizzazione, dalla doppia elica ai territori cromosomici [2]. Si è assunto che una deposizione diretta di energia nello zucchero-fosfato porti a un ssb con probabilità pari a 0 sotto i 5 eV, crescente linearmente tra 0 e 1 nell'intervallo 5-40 eV e pari a 1 sopra i 40 eV. Come indicato dai dati sperimentali, si è assunto che un attacco del radicale OH allo zucchero-fosfato porti a un ssb con probabilità pari a 0.65. Due ssb su eliche opposte entro 10 copie di basi sono stati considerati come un dsb. Le simulazioni sono state fino ad ora effettuate per raggi gamma, raggi X ultrasoft da 1.5 keV e protoni di diverse energie (0.6, 5 e 10 MeV). Come aspettato, per tutti i tipi di radiazione e di bersaglio i danni hanno mostrato una diminuzione al crescere della SC, dovuta alla crescente competizione della reazione OH-scavenger con la reazione OH-DNA. Inoltre la cromatina compatta si è mostrata meno radiosensibile del minicromosoma SV40, a sua volta meno sensibile del DNA nudo, grazie alla protezione fornita dagli istoni e dalla compattazione della fibra cromatinica rispetto all'attacco dell'OH. I risultati ottenuti hanno mostrato un buon accordo con dati sperimentali relativi a raggi gamma (plasmidi, SV40 e cromatina cellulare) e raggi X ultrasoft (plasmidi, [3]). I risultati relativi ai raggi gamma si possono trovare altrove [4]; in figura 1 sono riportati gli yields di ssb/Gy/Dalton indotti in DNA lineare da raggi X ultrasoft da 1.5 keV, per valori di SC compresi tra 10^6 e 10^9 s⁻¹.

Aberrazioni cromosomiche: ruolo della complessità del danno iniziale e della localizzazione dei cromosomi in interfase

È in continuo sviluppo presso le Università di Pavia e Milano un modello d'induzione di aberrazioni cromosomiche da radiazioni ionizzanti [5-9]. La versione attuale è in grado di fornire curve dose-risposta per i principali tipi di aberrazioni (dicentrici, traslocazioni, anelli, scambi complessi e delezioni) in seguito all'irraggiamento acuto di linfociti umani con raggi gamma e ioni leggeri di diverse energie. Il nucleo linfocitario è stato modellizzato come una sfera di raggio 3 micron, e i territori cromosomici in interfase sono stati descritti come domini compatti di volume proporzionale al loro contenuto in DNA. La formazione di aberrazioni radioindotte è stata simulata assumendo che solo le lesioni complesse della doppia elica possano portare ad aberrazioni, e che solo lesioni indotte nello stesso territorio cromosomico o in territori confinanti possano interagire e formare scambi. La prima assunzione è basata sul fatto che i dsb "semplici" (cioè non clusterizzati) non mostrano la marcata dipendenza dalla qualità della radiazione osservata per *endpoints* quali aberrazioni, mutazioni e morte cellulare; la seconda assunzione riflette l'evidenza sperimentale secondo la quale il riparo del DNA avviene principalmente all'interno dei sottili canali che separano i vari domini intranucleari. Il numero di lesioni per unità di dose e di massa di DNA indotte da radiazioni di diversa qualità è stato derivato da un lavoro precedente basato su simulazioni di struttura di traccia [10]. Lo *scoring* può essere sia di tipo Giemsa sia di tipo FISH. La ripetizione del processo per un numero statisticamente

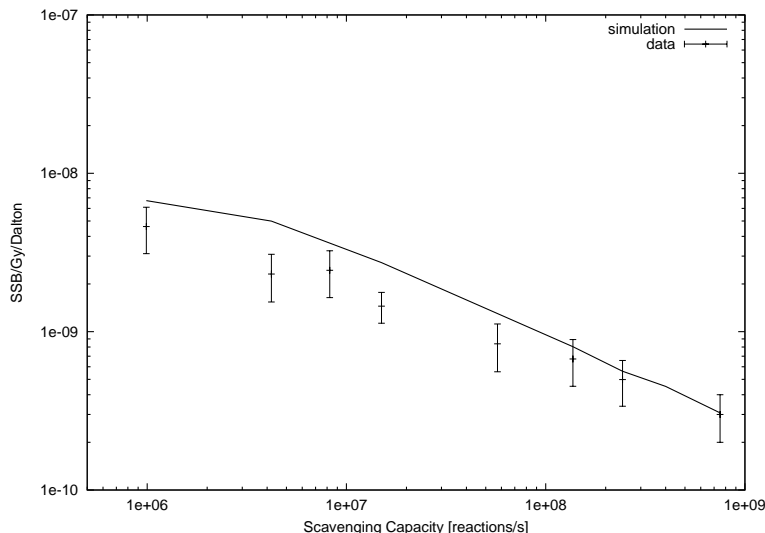


Figura 1: yields di ssb indotti da raggi X ultrasoft (1.5 keV) in DNA lineare, in funzione della *scavenging capacity* dell'ambiente. La linea rappresenta le previsioni del modello, i punti sono dati sperimentali relativi all'irraggiamento di plasmidi [3].

significativo di volte (almeno 100000) e per diversi valori di dose fornisce curve dose risposta direttamente confrontabili con dati sperimentali. Ai fini di tali confronti, i frammenti di dimensioni inferiori a qualche Mbp, che non sono visibili sperimentalmente in metafase, possono essere trascurati. Inoltre, per poter ottenere previsioni affidabili anche a basse dosi, è stata implementata nel modello la presenza di un livello di background di aberrazioni corrispondente a 0.001 dicentrici per cellula. Le curve simulate si sono mostrate in ottimo accordo con curve sperimentali disponibili in letteratura. Nello specifico, è stato confermato il ruolo fondamentale della severità delle lesioni iniziali e della loro distanza. Tali parametri riflettono, rispettivamente, la distribuzione spaziale delle deposizioni di energia iniziali a livello del nanometro ("small scale clustering") e a livello del micron ("large scale clustering"). La possibilità di "vedere" anche i frammenti di piccole dimensioni ha inoltre confermato, come suggerito da recenti studi sperimentali condotti con sonde telomeriche, che gli scambi incompleti sono in realtà molto rari (meno del 10% degli scambi totali), in quanto gli scambi incompleti osservati sono nella maggior parte dei casi degli scambi completi in cui uno dei frammenti coinvolti non è visibile perché di dimensioni troppo ridotte.

Bibliografia

- 1) Ballarini F., M. Biaggi, M. Merzagora, A. Ottolenghi, M. Dingfelder, W. Friedland, P. Jacob, H.G. Paretzke (2000), *Stochastic aspects and uncertainties in the prechemical and chemical stages of electron tracks in liquid water: a quantitative analysis based on M.C. simulations*. Radiat. Environ. Biophys. **39**, 179-188.
- 2) Friedland W., P. Jacob, H.G. Paretzke, M. Merzagora and A. Ottolenghi (1999), *Simulation of DNA fragment distributions after irradiation with photons*. Radiat. Environ. Biophys. **38**, 39-47.
- 3) Fulford J., H. Nikjoo, D.T. Goodhead, P. O'Neill (2001), *Yields of SSB and DSB induced in DNA by Alk ultrasoft X-rays and α -particles: comparison of experimental and simulated yields*. Int. J. Radiat. Biol. **77**, 1053-1066.
- 4) Valota A., F. Ballarini, W. Friedland, P. Jacob, A. Ottolenghi, H.G. Paretzke (2003), *A modelling study on the protective role of OH radical scavengers and DNA higher-order structures in induction of ssb and dsb by γ radiation*. Int. J. Radiat. Biol. **79**, 643-653.
- 5) Ballarini F., M. Merzagora, F. Monforti, M. Durante, G. Gialanella, G.F. Grossi, M. Pugliese, A. Ottolenghi (1999), *Chromosome aberrations induced by light ions: Monte carlo simulations based on a mechanistic model*. Int. J. Radiat. Biol. **75**, 35-46.
- 6) Ottolenghi A., F. Ballarini, M. Merzagora (1999), *Modelling radiation induced biological lesions: from initial energy depositions to chromosome aberrations*. Radiat. Environ. Biophys. **38**, 1-13.
- 7) Ballarini F., M. Biaggi, A. Ottolenghi (2002), *Nuclear architecture and radiation-induced chromosome aberrations: models and simulations*. Radiat. Protec. Dosim. **99**, 175-182.
- 8) Ballarini F. and A. Ottolenghi (2003), *Chromosome aberrations as biomarkers of radiation exposure: modelling basic mechanisms*. Adv. Space Res. **31**(6), 1557
- 9) Ballarini F. and A. Ottolenghi, *Models of chromosome aberration induction: an example based on radiation track structure*. Cytogenetic and genome research, *in press*.
- 10) Ottolenghi A., M. Merzagora, L. Tallone, M. Durante, H.G. Paretzke, W.E. Wilson (1995), *The quality of DNA double-strand breaks: a Monte Carlo simulation of the end-structure of strand breaks produced by protons and alpha particles*. Radiat. Environ. Biophys. **34**, 239-244.

RIPARAZIONE DELLE DOPPIE ROTTURE RADIOINDOTTE NEL DNA DI CELLULE K562: INFLUENZA DELLO STATO DIFFERENZIAATIVO E DEL FRAZIONAMENTO DELLA DOSE

C. Minorenti*, M. Belli*[^], G. Esposito*[^], A. Maggi*, O. Sapora*, G. Simone*[^],
M.A. Tabocchini*[^]

*Istituto Superiore di Sanità e [^]INFN Gruppo Collegato Sanità, Sezione di Roma1, Roma

e-mail: antonella.tabocchini@iss.it

Introduzione

Le metodiche più comunemente utilizzate per lo studio della riparazione delle doppie rotture (DSB) radioindotte nel DNA cellulare richiedono dosi relativamente elevate che possono destabilizzare la struttura della cromatina e quindi influenzare gli andamenti delle cinetiche di riparazione. Per approfondire questo aspetto, cellule K562, attivamente proliferanti (AP) e a 48 ore dall'induzione del differenziamento (D), che presentano una diversa organizzazione del genoma, sono state irradiate con una dose acuta di 40 Gy e con dosi di 5 Gy o 10 Gy, intervallate da 30 o 60 minuti di riparazione fino a raggiungere una dose totale di 40 Gy, e tempi di riparazione complessivi fino a 8 ore. La percentuale di danno iniziale e residuo è stata valutata utilizzando la tecnica dell'elettroforesi pulsata calibrata.

Materiali e metodi

I metodi relativi alla crescita, alla caratterizzazione, al differenziamento e alla marcatura con ¹⁴C-timidina del DNA di cellule K562 sono stati già descritti in dettaglio (1). Per gli esperimenti di induzione di DSB, le cellule sono state

centrifugate, risospese in PBS e sottoposte ad irraggiamento a 4 °C. Per studiare la riparazione delle DSB dopo irraggiamento con una dose acuta di 40 Gy, effettuato a 4 °C, le cellule sono state nuovamente centrifugate, risospese in terreno e incubate in atmosfera di CO₂ a 37 °C per diversi tempi fino a 8 ore. Per l'esperimento di riparazione dopo dose frazionata, gli irraggiamenti con dosi di 5 o 10 Gy sono stati effettuati a temperatura ambiente e, tra una dose e l'altra, le cellule sono state incubate in atmosfera di CO₂ a 37 °C per tempi di riparazione di 30 e 60 minuti.

Al termine di ogni fase sperimentale, sono state preparate le plug prelevando uguali volumi di agarosio Low Gelling type VII Sigma (1.4%) e di sospensione cellulare, precedentemente centrifugata e risospesa in PBS, e trasferendo la sospensione così ottenuta all'interno di "plug mould". Dopo solidificazione, le plug sono state trasferite nella soluzione di lisi (0.5 M EDTA, pH 8.0; 1% Lauryl sarcosine; 0.5 mg/ml proteinasi K) per 24 ore, lavate con tampone TE (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 7.5) e sottoposte ad elettroforesi in campo pulsato (PFGE, Pulsed field Gel Electrophoresis) nelle seguenti condizioni: gel di agarosio (Pulsed field certified agarose BioRad) 0.8%, tampone TBE 0.5x, temperatura 12 °C, voltaggio 1.5 V/cm, incremento lineare della durata dell'impulso da 50 a 5000 secondi, angolo di riordinamento costante di 120°, tempo complessivo di 72 ore. Al termine dell'elettroforesi il gel è stato colorato con bromuro di etidio (1µg/ml), fotografato e tagliato in modo da separare una "lane" dall'altra. Ogni "lane" è stata tagliata in 24 frammenti che sono stati inseriti in altrettante vial da scintillazione contenenti 0.5 ml di HCl 1M. Dopo aver fatto sciogliere la matrice di agarosio a 70 °C o.n. e aver aggiunto 5 ml di liquido di scintillazione, le vial sono state poste in un contatore beta per la lettura della radioattività. Dai dati così ottenuti (in termini di disintegrazioni per minuto, dpm) è stato possibile ricavare il valore della frazione di attività rilasciata nel gel (FAR, Fraction of Activity Released) che dipende, in modo non lineare, dal numero di rotture radioindotte (2).

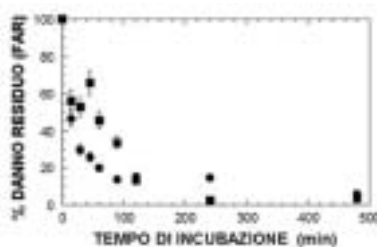


Figura 1 - Percentuale di danno residuo calcolato a partire dall'analisi della FAR: cellule K562 attivamente proliferanti (A) e differenziate (B)

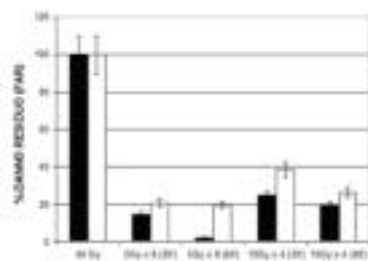


Figura 2 - Percentuale di danno residuo calcolato a partire dall'analisi della FAR: cellule K562 attivamente proliferanti (A) e differenziate (B)

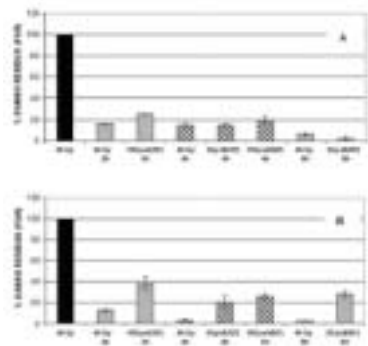


Figura 3 - Confronto tra la percentuale di danno residuo ottenuto dopo dosi frazionate di 5 e 10 Gy e dopo dose acute di 40 Gy: cellule K562 attivamente proliferanti (A) e differenziate (B)

Risultati e discussione

Negli esperimenti riportati sono state impiegate cellule K562 in attiva proliferazione (AP) e a 48 ore dall'induzione del differenziamento (D).

Le curve dose risposta indicano che la FAR aumenta con l'aumentare della dose e che l'efficienza di induzione di doppie rotture (DSB) nel DNA cellulare risulta essere simile in cellule AP e D (AP: $5.44 \pm 0.27 (10^9 \text{ bp Gy})^{-1}$; D: $5.52 \pm 0.27 (10^9 \text{ bp Gy})^{-1}$).

I risultati relativi alla riparazione delle DSB dopo irradiazione acuta con una dose di 40 Gy, sono riportati nella figura 1. La percentuale di DSB non ricongiunte diminuisce all'aumentare del tempo di riparazione e la cinetica

di ricongiungimento entro le prime due ore di incubazione è più veloce in cellule AP rispetto a cellule D. Per tempi più lunghi, vi è indicazione che siano le cellule D a riparare più velocemente delle AP anche se dopo 8 ore la percentuale di danno residuo è simile. Quest'ultimo dato potrebbe essere ricondotto all'assenza del blocco in G₁ in questa linea cellulare, difettiva in p53 (1).

Dosi relativamente elevate, quali quelle comunemente utilizzate per lo studio delle DSB, possono destabilizzare la struttura della cromatina ed influenzare gli andamenti delle cinetiche di riparazione modulando l'accessibilità enzimatica ai siti danneggiati (3). L'impiego di dosi più basse e frazionate dovrebbe provocare una minore destabilizzazione della cromatina ed aiutare a mettere in evidenza eventuali differenze di riparazione dovute ai cambiamenti di struttura legati al differenziamento. Per approfondire questo aspetto è stato effettuato un esperimento di dose frazionata i cui risultati sono riportati nella figura 2. Gli istogrammi mostrano che per dosi di 5 e 10 Gy, intervallate da 30 e 60 minuti di riparazione, cellule AP presentano una percentuale minore di DSB non riparate rispetto a cellule D. Tale effetto è più evidente nel caso della dose più bassa e dell'intervallo di tempo tra le frazioni più alto. Questi risultati sono stati anche confrontati a parità di tempo di riparazione complessivo. Dopo 30 min, in cellule AP il danno residuo è maggiore dopo dosi frazionate rispetto a quanto osservato dopo irradiazione acuta. Tale differenza diminuisce al crescere dell'intervallo di tempo tra le dosi e, per intervalli più lunghi, il danno residuo è minore di quello osservato dopo la dose acuta. Nel caso di cellule D, si osserva invece sempre un danno residuo maggiore dopo irradiazione frazionata (figura 3).

Complessivamente questi dati indicano che la struttura della cromatina modula l'accessibilità degli enzimi della riparazione al danno radioindotto e che l'impiego di alte dosi, causando una significativa destabilizzazione del target, rende meno evidenti differenze nella riparazione.

Bibliografia

- 1) Tabocchini M.A., Rothkamm K., Signoretti C., Risse J., Sabora O., Löbrich M., *Mutat. Res.*, 461, 71-82, 2000
- 2) Cook V.E. and Mortimer R.K., *Radiat. Res.*, 125, 102-106, 1991
- 3) Szabo G., Damjanovich S., Sümegi J., Klein G., *Exper. Cell Res.*, 169, 158-168, 1987

FATTORI CHE POSSONO INFLUIRE SULLA PRODUZIONE E LA MISURA DELLE DOPPIE ROTTURE RADIOINDOTTE SUL DNA

Di Carlo B.¹, La Sala G.¹, Maggi A.¹, Tabocchini M.A.^{2,3} e Sabora O.^{1,3}

¹Dipartimento Ambiente e Prevenzione Primaria, ²Dipartimento Tecnologie e Salute, ³INFN Sezione Sanità, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Le cellule sia *in vitro* che *in vivo* possono presentarsi in differenti stati fisiologici con caratteristiche strutturali e funzionali differenti. Le cellule *in vitro* sono in grado di replicarsi presentando differenze sostanziali con le cellule *in vivo* che in generale sono in fase G₀ e presentano differenti gradi di differenziamento. Questi differenti stati fisiologici legati alle fasi del ciclo cellulare possono influenzare fortemente sia la produzione che la misura dei danni introdotti dal trattamento radiante sul DNA. Infatti questa molecola è organizzata dinamicamente in fibre cromatiniche che possono assumere conformazioni e densità differenti in funzione dello stato fisiologico. Sistemi cellulari in grado di andare incontro a differenziamento *in vitro*, possono rappresentare un sistema utile a chiarire almeno in parte i rapporti tra danno e struttura molecolare.

In questo lavoro sono riportati esperimenti che riguardano la determinazione di doppie rotture (dsb) indotte dalle radiazioni ionizzanti sul DNA di cellule K562 attivamente proliferanti, sincronizzate, e differenziate, impiegando la tecnica della elettroforesi a basso voltaggio.

Materiali e metodi

I metodi relativi alla crescita, alla caratterizzazione, al differenziamento e alla marcatura del DNA di cellule K562 sono stati già descritti in dettaglio (1). La sincronizzazione delle cellule in fase S è stata ottenuta impiegando un metodo che fa uso di trattamento non continuo con basse concentrazioni (0.1 mM) di timidina (2). Al termine del trattamento le cellule sono state centrifugate, lavate, risospese in PBS, imprigionate in blocchetti di agarosio e quindi irradiate.

I nuclei sono stati ottenuti imprigionando le cellule, proliferanti o differenziate, in blocchetti di agarosio che sono trattati per 30 minuti in tampone ipotonico e per ulteriori 30 minuti in tampone di lisi (KCl 0.11 M, NaCl 0.03 M, MgCl 0.2 mM, tris-HCl 0.01 M, Tiodiglicole 0.1 M, PMSF 0.4 mM, digitonina 0.1%). I nucleoidi sono stati otte-

nuti mediante trattamento con NaCl 2 M nello stesso tampone senza digitonina per ulteriori 30 minuti. Tutti i trattamenti sono stati effettuati a 4°C. Al termine i blocchetti di agarosio sono lavati tre volte con PBS ed irradiati. Dopo irraggiamento, per il quale è stata utilizzata una sorgente gamma al ⁶⁰Co, i blocchetti sono stati trattati con soluzione di lisi (EDTA 0.4 M, sarkosil 1%, proteinasi K 1 mg/ml) per 24 ore e al termine lavati con PBS. Le doppie rotture del DNA sono state valutate mediante elettroforesi continua a basso voltaggio, 1V/cm, per 24 ore e a bassa concentrazione di agarosio, 0.5%. Al termine dell'elettroforesi la migrazione del DNA è stata visualizzata mediante colorazione con bromuro di etidio, il gel è stato quindi frazionato e le singole frazioni poste in un contatore beta contate per l'analisi della radioattività presente. I risultati ottenuti sono riportati in termini di FAR, frazione di attività migrata fuori dal pozzetto, in funzione della dose.

Risultati e discussione

Negli esperimenti riportati sono state impiegate cellule K562 in differenti stati fisiologici, attivamente proliferanti (AP) e differenziate (D). Le curve dose risposta ottenute con le cellule AP e D indicano chiaramente una differente risposta (1). A basse dosi l'attività rilasciata in funzione della dose è maggiore in cellule AP rispetto alle D mentre ad alte dosi circa il 20% dell'attività delle AP è trattenuta nel pozzetto. Quest'ultimo fenomeno è stato attribuito alla presenza, in cellule attivamente proliferanti, di significative percentuali di cellule in fase S. La presenza di queste cellule può influire sulla misura delle dsb impedendo la migrazione fuori dal pozzetto di una parte del DNA cellulare in quanto la presenza delle bolle di replicazione impedisce la migrazione di parte del DNA all'interno del gel (3). Allo scopo di chiarire meglio l'entità di questo effetto sono state impiegate cellule sincronizzate con un metodo che prevede l'impiego di dosi di timidina circa 10 volte più basse di quelle normalmente impiegate a questo scopo e un trattamento non continuo (2). In questo modo non si altera in maniera drastica il metabolismo cellulare e si ottiene circa l'80 % delle cellule in fase G₁. Al termine del trattamento si osserva un progressivo accumulo di cellule in fase S, rispettivamente del 25-35% dopo 1 ora, del 50-60 % dopo 4 ore e del 70-75% dopo 6 ore. L'aumento della percentuale di cellule in fase S dovrebbe portare, a parità di dose, ad una parallela diminuzione dell'attività rilasciata fuori del pozzetto. Il confronto tra le curve dose-risposta (figura 1) ottenute con cellule e nucleoidi, indica che la struttura a bolle del DNA è solo una delle cause della mancata migrazione del DNA fuori dal pozzetto. Infatti, solo dopo la rimozione delle proteine per trattamento con alta concentrazione di sali, si ha una diminuzione della attività rilasciata in funzione dell'ammontare di cellule in fase S. Questa discrepanza può essere messa in relazione alla presenza, nel caso di cellule intatte di radioprotettori endogeni, come il glutatione, la cui concentrazione varia al variare del ciclo cellulare (4). Queste sostanze vengono perse durante la preparazione di nuclei e nucleoidi.

Cellule indotte al differenziamento si trovano tutte in fase G₀ e quindi non presentano effetti legati alle bolle di replicazione, tuttavia hanno una differente organizzazione del DNA e differenti concentrazioni di radioprotettori endogeni che possono influenzare la risposta al trattamento radiante (1). Una prima prova della differente organizzazione è la frazione di DNA a relativo basso peso molecolare, circa 10⁷ daltons, presente nelle cellule differenziate (1, 5). Una seconda evidenza sperimentale è riportata in figura 2a. I nucleoidi sono formati da lamina e matrice nucleare a cui sono attaccate alla loro base anse di DNA di differente lunghezza. Un'ansa, sotto l'azione di un campo elettrico, per liberare un frammento della molecola deve subire due doppie rotture mentre una sola porta alla linearizzazione della molecola ma non alla sua migrazione. Se irradiati i nucleoidi liberano frammenti di DNA in funzio-

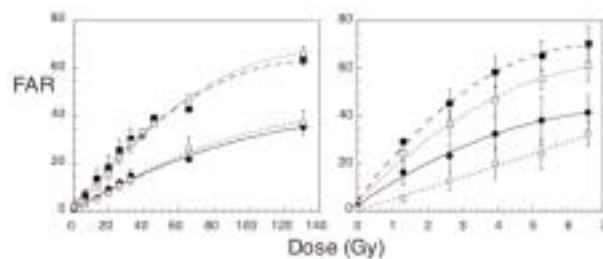


Figura 1: Frazione di attività rilasciata (FAR) dal pozzetto in funzione della dose per cellule AP (■), dopo 1 ora (□), 4 ore (●) e 6 ore (○) dalla fine del trattamento di sincronizzazione. A destra curva dose risposta per nucleoidi estratti dalle stesse cellule, irradiati e trattati con proteinasi K per rimuovere la componente proteica.

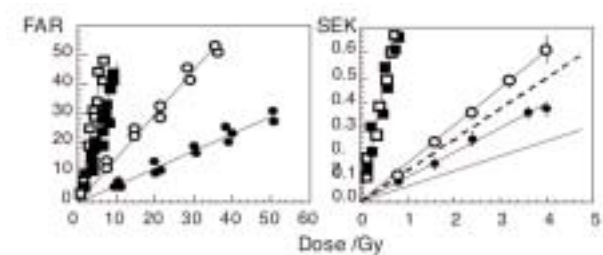


Figura 2: Frazione di attività rilasciata (FAR) in funzione della dose per nucleoidi di cellule AP (simboli vuoti) e D (simboli pieni) irradiati e processati senza (circoli) o dopo trattamento con proteinasi K (quadrati). A destra è riportata l'inclinazione delle cinetiche di eluzione alcalina (SEK=slope elution kinetics) per nuclei (circoli) e nucleoidi (quadrati) di cellule AP (simboli vuoti) e D (simboli pieni). Sono anche riportate le curve per le corrispondenti cellule AP (linea tratteggiata) e D (linea continua).

ne della dose e, a parità di dose, nucleoidi con anse più estese avranno una maggiore probabilità di produrre frammenti di DNA liberi. In figura 2a sono riportate le FAR ottenute con nucleoidi AP e D irraggiati ma non trattati con proteinasi K. Nella stessa figura sono riportati i risultati ottenuti con nucleoidi AP e D irraggiati e subito dopo trattati con l'enzima per la rimozione delle proteine strutturali. I risultati mostrano che con la rimozione delle proteine vi è un forte aumento di danno sulla molecola del DNA confermando la struttura della cromatina come il maggiore fattore protettivo per il DNA cellulare. Le curve dose risposta dei nucleoidi D non lisati mostrano una maggiore produzione di frammenti. Assumendo che le dsb siano distribuite in maniera casuale lungo la catena del DNA dei nucleoidi, si può dedurre che le dimensioni medie delle anse in cellule D siano circa 4 volte più grandi di quelle in cellule AP. Questi cambiamenti di struttura influenzano il livello di danno radioindotto. Risultati ottenuti con eluzione alcalina (fig.2 b), che misura singole rotture sul DNA cellulare, mostrano che questi cambiamenti di struttura, accompagnati da un generale aumento della compattezza della struttura della cromatina (6), rendono le cellule D, circa 2.3 volte più radioresistenti di cellule AP. Tale maggiore resistenza è solo marginalmente attribuibile ad un aumento del livello di radioprotettori endogeni (7) dato che solo dopo rimozione delle proteine istoniche la differenza di sensibilità al danno tra cellule AP e D si annulla.

In conclusione i cambiamenti di struttura legati a differenti stati fisiologici possono influenzare in maniera differente la misura e sensibilità al danno introdotto dalle radiazioni ionizzanti sul DNA cellulare. Il maggior fattore di protezione risulta essere la struttura della cromatina mentre è solo marginale l'effetto dovuto ai radioprotettori endogeni.

Bibliografia

- 1) Tabocchini M.A., et al. *Mut. Res.*, 461, 71, 2000.
- 2) Saporà O., et al.. In: *Physical Methods on Biological Membranes*, F.Conti G.Pocchiari R. Blumberg eds., Plenum Press, London, 291, 1984.
- 3) Mateos S., et al.. *Int. J. Radiat. Biol.*, xx, 687, 1996.
- 4) Revesz L., et al.. *Nature* 198, 1275, 1963.
- 5) Saporà O., et al.. *ATLA* 21, 50, 1993.
- 6) Hartwig M., et al.. *Studia Biophys.*, 99, 185, 1984.
- 7) Steinkulher C., et al.. *J. Biol. Chem.* 266, 24580, 1991.

¹H NMR IN ALTA RISOLUZIONE APPLICATA ALLO STUDIO COMPARATIVO DEGLI EFFETTI DELL'IRRAGGIAMENTO CON FASCI DI PROTONI E DI RADIAZIONE GAMMA IN CELLULE DI CARCINOMA MAMMARIO

A.Rosi*, S.Grande*, L.Guidoni*, A.M. Luciani*, P.A.Lojacono&, V.I. Patti&, L.M. Valastro&, R. Cherubini§, S. Gerardi§, V.Viti*

*Laboratorio di Fisica, Istituto Superiore di Sanità and INFN, Roma, - &INFN Laboratori Nazionali del Sud, Catania, - §INFN, Laboratori Nazionali di Legnaro, Legnaro (Padova)

e-mail: sveva.grande@iss.it

Introduzione

Lo studio degli eventi metabolici indotti dall'irraggiamento è di grande utilità per la comprensione dei diversi meccanismi di morte cellulare. Numerosi studi recenti hanno mostrato come la spettroscopia di risonanza magnetica (MRS) *in vivo* è in grado di individuare e valutare sia gli effetti dell'irraggiamento sui tumori [1-2] che effetti immediati o mediati dal metabolismo su tessuti sani di pazienti in seguito a radioterapia [3-4]. Di particolare interesse è il metabolismo lipidico, che può essere esaminato attraverso l'identificazione e l'analisi di diversi metaboliti [5,6] le cui variazioni possono essere messe in relazione alla crescita dei tumori *in vivo*. In precedenti lavori su cellule tumorali della cervice (HeLa) abbiamo mostrato come diversi segnali di MRS siano sensibili all'irraggiamento con particelle ad alto e basso LET [7-8]. Scopo del presente lavoro è l'individuazione di segnali di ¹H MRS, che siano in grado di fornire informazioni sulle variazioni metaboliche e proliferative di cellule tumorali in seguito ad irraggiamento con fasci fotonici e protonici.

Diversi studi dimostrano che i protoni sono più efficienti dei fotoni nel produrre la morte cellulare. Queste caratteristiche sono di grande interesse in medicina, in relazione alle applicazioni terapeutiche dei fasci protonici. Sono stati perciò studiati gli spettri di cellule tumorali provenienti da carcinoma mammario umano (MCF-7), in seguito ad irraggiamento con fasci di protoni e con radiazione gamma, dopo differenti tempi d'attesa e a diverse dosi. Gli effetti sono stati osservati sia in spettri di cellule intatte che nei relativi estratti cellulari, sia lipidici che perclorici.

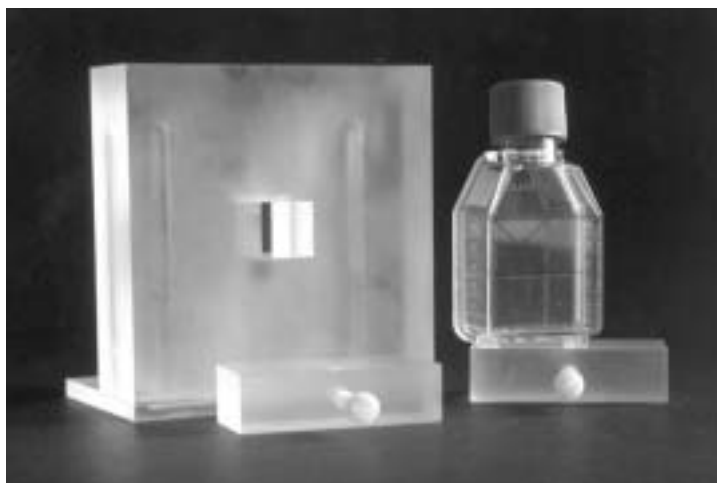


Figura 1. Collimatore e alloggiamento per la fiasca.

Materiali e metodi

Le cellule MCF-7 sono state coltivate in fiasca, in terreno RPMI. L'irraggiamento gamma delle cellule è stato effettuato mediante una *Gammacell* ⁶⁰Co, a temperatura ambiente. Le cellule sono state irraggiate a dosi di 20 o 40 Gy, direttamente nella fiasca di coltura, con un rateo di dose pari a 5 Gy/min. L'irraggiamento delle cellule con protoni è stato effettuato presso i Laboratori Nazionali del Sud (LNS-INFN) di Catania, in diverse posizioni lungo il fascio (62 MeV), a dosi di 10 o 20 Gy. Per l'irraggiamento, è stato costruito un collimatore che permette di selezionare sei quadrati identici e contigui, così da irraggiare in modo completo la parete della fiasca su cui le cellule sono state cresciute (Fig. 1). Per la misura NMR, le cellule MCF-7, in PBS, sono state inserite in un sistema di tubi coassiali. La vitalità cellulare, verificata mediante il test di esclusione del *trypan blue*, resta maggiore dell'80% alla fine dell'esperimento. Gli estratti di cellule MCF-7, lipidici e perclorici (PCA), sono stati risospesi, rispettivamente, in una soluzione CDC13/MeOD 2:1 o in D₂O. Gli spettri di ¹H MR ad alta risoluzione sono stati effettuati con spettrometri Bruker AVANCE operanti a 400, 600 and 700 MHz. Si è fatto uso di soppressione del segnale della risonanza dell'acqua, che si sovrappone ai segnali cellulari.

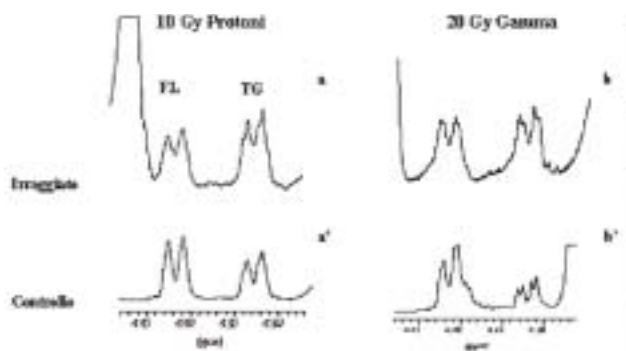


Figura 2. Spettri 1H MR (regione del glicerolo) di estratti lipidici di cellule MCF-7 irraggiate, acquisiti 48 ore dopo l'irraggiamento; a', b': controllo, a: irraggiato con protoni (10 Gy), b: irraggiato con raggi gamma (20 Gy).

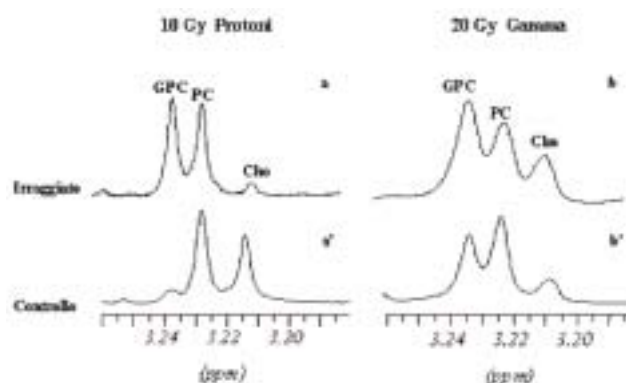


Figura 3. Spettri 1H MR (regione dei metaboliti della colina) di estratti perclorici PCA di cellule MCF-7, acquisiti 48 ore dopo l'irraggiamento. a'.b'. controllo, a. irraggiato con protoni (10 Gy) b. irraggiato con raggi gamma (20 Gy). La diversa larghezza di riga è dovuta al fatto che gli spettri b,b' sono stati acquisiti a 400 MHz, mentre gli spettri a,a' sono stati acquisiti a 600 MHz.

Risultati e discussione

In Figura 2 sono riportati gli spettri ^1H MRS (regione del glicerolo) di estratti lipidici preparati da cellule MCF7 irraggiate, 48 ore dopo l'irraggiamento, e i relativi controlli. Le cellule irraggiate mostrano segnali dei trigliceridi (TG) più intensi dei rispettivi controlli. Il segnale dei fosfolipidi (FL) può essere utilizzato come riferimento. L'effetto appare di entità paragonabile per i campioni irraggiati con 10 Gy di protoni (regione distale) e 20 Gy di raggi gamma. Un netto aumento dell'intensità dei segnali relativi ai lipidi mobili è parallelamente osservabile in spettri di cellule intatte (non mostrati). La Figura 3 mostra la regione dei metaboliti della colina di spettri di estratti perclorici da cellule MCF-7 irraggiate, 48 ore dopo l'irraggiamento. Il rapporto fra le intensità dei segnali della glicerofosforilcolina (GPC) e della fosforilcolina (PC) è più intenso nei campioni irraggiati che nei controlli. L'effetto è di entità paragonabile ad una dose di 20 Gy gamma e 10 Gy di protoni.

E' noto che le cellule MCF-7 subiscono morte per apoptosi in seguito ad irraggiamento [9]. Gli spettri di cellule MCF-7 e dei relativi estratti lipidici mostrano un aumento in intensità dei segnali dei TG: questo comportamento è consistente con l'instaurarsi dell'apoptosi, ed è stato osservato in altri sistemi cellulari [10]. D'altro canto, le cellule HeLa, che muoiono prevalentemente per morte mitotica, non mostrano un comportamento simile in seguito ad irraggiamento sia con radiazione gamma che con protoni. Questi risultati mostrano che l'aumento dei segnali dei TG può essere associato all'apoptosi indotta da radiazioni. Per quanto riguarda le osservazioni sugli spettri di estratti perclorici, gli effetti dell'irraggiamento più rilevanti sono a carico del segnale del catabolita glicerofosforilcolina, che subisce un incremento, già osservato anche nelle cellule HeLa [7,8], sia dopo trattamento con fasci fotonici che protonici. Questo risultato indica la presenza di un meccanismo di danno da radiazioni non correlato all'apoptosi, ma che si può attribuire ad un malfunzionamento dell'equilibrio metabolico della cellula indotto dalle condizioni di *stress* dovuto all'irraggiamento. Le variazioni spettrali osservate irraggiando le cellule con una singola dose acuta di raggi gamma sono di entità paragonabile a quelle osservate facendo uso di metà dose di protoni. L'entità delle variazioni osservate è quindi fortemente dipendente dalla qualità della radiazione; i risultati ottenuti suggeriscono per i protoni un'efficacia biologica relativa pari a 2 per questo tipo di effetti.

Bibliografia

- 1) D.R. Olsen et al. *Radiother Oncol* 52 (1999) 261.
- 2) E.O. Aboagye et al. *Radiat Res* 150 (1998) 38.
- 3) K. Kamada et al. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 37 (1997) 250.
- 4) V.F. Chong et al. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 45 (1999) 699.
- 5) D.Y. Sze et al. *Biochim Biophys Acta* 1054 (1990) 198.
- 6) J. Henke et al. *Anticancer Res* 16 (1996) 1417.
- 7) S. Grande et al. *Int J Cancer (Radiat Oncol Invest)* 96 (2001) 27.
- 8) A.M. Luciani et al. *Radiat. Prot Dos.* (2002) 99 (2002) 307.
- 9) J. M.Coco et al. *Cancer Res* 59 (1999)1134.
- 10) J.M. Hakumaki et al. *Nat Med* 5 (1999) 1323.

INFLUENZA DELLA MICROGRAVITA' SULLA RISPOSTA CELLULARE ALLE RADIAZIONI IONIZZANTI E SULL' INSTABILITA' GENOMICA

Sabrina Canova, Maddalena Mognato, Filippo Fiorasi, Mauro Grifalconi, Elena Reddi,
Antonella Russo, Lucia Celotti

Dipartimento di Biologia, Università di Padova, Padova

Definire il ruolo della riduzione della forza gravitazionale nel modulare la risposta al danno al DNA indotto dalle radiazioni riveste un'importanza specifica per i soggetti esposti a radiazioni ionizzanti nello spazio. E' stato ipotizzato che esista un effetto sinergico tra queste due componenti dell'ambiente spaziale, anche se i dati finora pubblicati non hanno fornito risposte conclusive. Per simulare l'ambiente spaziale abbiamo usato un modello sperimentale costituito da cellule linfoblastoidi umane TK6 irraggiate con raggi γ e incubate nel bioreattore "Rotating Wall Vessel" (RWV-Synthecon) per verificare se la riduzione di gravità può aumentare l'instabilità genomica indotta dalle radiazioni. La risposta cellulare alle radiazioni ionizzanti è stata studiata in cellule TK6 incubate in condizioni 1g o in microgravità simulata (Modeled MicroGravity-MMG) per 24 h dopo l'irradiazione. Le cellule sono state irraggiate con raggi γ (1-4 Gy) mediante la sorgente ^{60}Co "gamma beam" del CNR-FRAE presso gli INFN-LNL.

Figura 1: Induzione di apoptosi

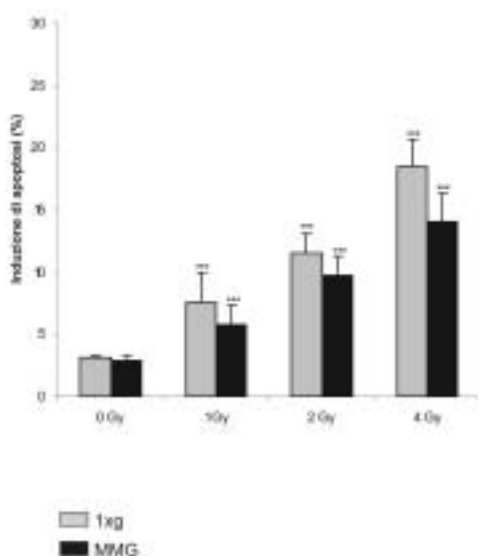


Figura 2: Ciclo cellulare

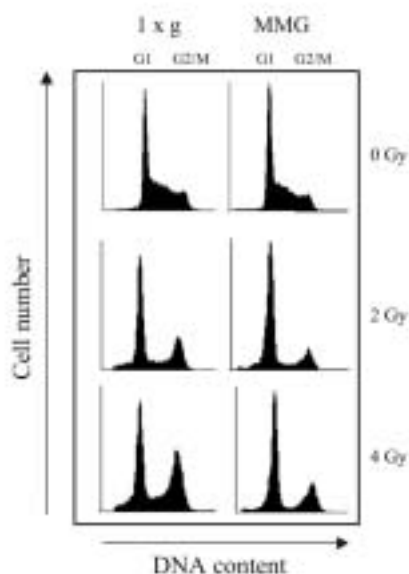


Figura 3: Frequenza di mutanti al locus HPRT

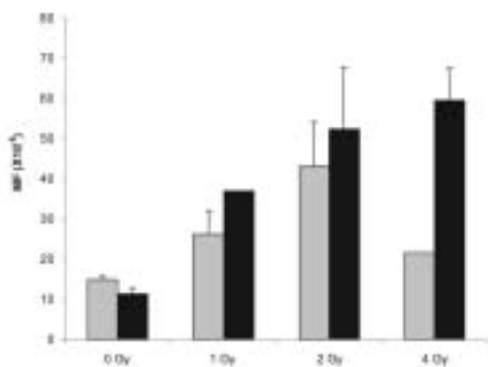
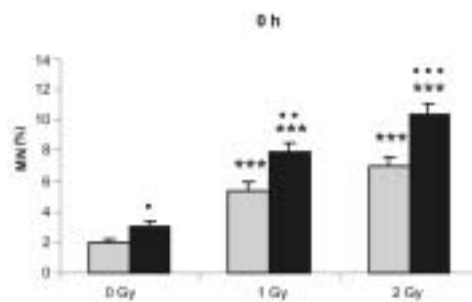


Figura 4: Frequenza di micronuclei



Sono stati misurati e confrontati alcuni parametri di risposta cellulare ai raggi γ -sopravvivenza cellulare, induzione di apoptosi e alterazione del ciclo cellulare- nelle due condizioni di gravità, MMG ($10^{-2}g$) e 1g. L'instabilità genomica è stata valutata in base alla frequenza di mutanti al locus *HPRT* e mediante il test del micronucleo. Poiché la sopravvivenza alle radiazioni appare aumentata nelle cellule mantenute in MMG dopo l'irradiazione in confronto alle cellule incubate in 1g, abbiamo valutato l'induzione di apoptosi nelle cellule irraggiate a vari tempi dopo la fine dell'incubazione nelle due condizioni di gravità. In figura 1 si può osservare una diminuzione significativa dell'indice apoptotico nelle TK6 incubate in MMG dopo irradiazione rispetto alle cellule mantenute in 1g. E' noto che l'esposizione a radiazioni ionizzanti provoca un arresto del ciclo cellulare con blocco in fase G2. In figura 2 si nota che dopo irradiazione la percentuale di cellule in fase G2/M è diminuita nelle cellule incubate in MMG. Sulla base di questi risultati abbiamo ipotizzato che l'incubazione delle cellule in MMG dopo irradiazione sia in grado di aumentare la sopravvivenza di cellule danneggiate che, evitando il blocco in fase G2, non vanno incontro a morte per apoptosi. Poiché tale risultato potrebbe aver un esito negativo per la stabilità del genoma, è stata misurata l'induzione di mutanti al locus Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase (*HPRT*) e la frequenza di micronuclei (MN), come indicatori del danno indotto dall'irradiazione. Nelle figure 3 e 4 sono riportati i risultati relativi alla frequenza di mutanti *HPRT* e delle cellule micronucleate nelle colture incubate in MMG o 1g dopo irradiazione. Si può notare che dopo irradiazione γ la frequenza di mutanti *HPRT* e le cellule micronucleate sono aumentate più nelle TK6 mantenute in MMG rispetto a quelle in condizioni 1xg. I risultati indicano che l'incubazione in microgravità simulata dopo l'esposizione ai raggi γ influisce sulla risposta delle cellule irradiate, aumentando il numero delle cellule sopravvissute e l'instabilità indotta dalle radiazioni ionizzanti.

Bibliografia

1) ALBERTINI, R.J., CASTLE, K.L. and BORCHERDING, W.R, 1982, T-cell cloning to detect the mutant 6-thioguanine-resistant lymphocytes present in human peripheral blood. Proceedings of the National Academy Science of U.S.A., 79, 6617-6621.

- 2) BROWNING, L.S., 1971, Genetic effects of the space environment on the reproductive cells of *Drosophila* adults and pupae. In: The Experiments of Biosatellite II, NASA SP-204, edited by J.F. Saunders, 55-78.
- 3) COGOLI, A., 1997, Signal transduction in T lymphocytes in microgravity. *Gravitational and Space Biology Bulletin*, 10, 5-16.
- 4) COGOLI, A., WALTHER, I., TURRINI, F., MANNU, F., MELONI, M.A. and PIPPIA, P., 1999, Direct effect of microgravity on T lymphocyte signal transduction. *Space Biology*. Presented at the Biennial Meeting of European Low Gravity Research Association. 28 February – 3 March, Rome, Italy.
- 5) CUBANO, L.A. and LEWIS, M.L., 2000, Fas/APO-1 is increased in spaceflown lymphocytes (Jurkat). *Experimental Gerontology*, 35, 389-400.
- 6) HUGHES-FURFOLD, M., 2001, Changes in gene expression and signal transduction in microgravity. *Journal of Gravitational Physiology*, 8, 1-4.
- 7) HORNECK, G., 1999, Impact of microgravity on radiobiological processes and efficiency of DNA repair. *Mutation Research*, 430, 221-228.
- 8) HORNECK, G., RETTBERG, P., KOZUBEK, S., BAUMSTARK-KHAN, C., RINK, H., SCHAFER, M. and SCHMITZ, C., 1997, The influence of microgravity on repair of radiation-induced DNA damage in bacteria and human fibroblasts. *Radiation Research*, 147, 376-384.
- 9) KIEFER, J. and PROSS, H.D., 1999, Space radiation effects and microgravity. *Mutation Research*, 430, 299-305.
- 10) MACCARONE, M., BATTISTA, N., MELONI, M., BARI, M., GALLERI, G., PIPPIA, P., COGOLI, A. and FINAZZI-AGRÒ, A., 2003, Creating conditions similar to those that occur during exposure of cells to microgravity induces apoptosis in human lymphocytes by 5-lipoxygenase-mediated mitochondrial uncoupling and cytochrome c release. *Journal of Leukocyte Biology*, 73, 472-481.
- 11) PROSS, H.D., CASARES, A. and KIEFER, J., 2000, Induction and repair of DNA double-strand breaks under irradiation and microgravity. *Radiation Research*, 153, 521-525.
- 12) REITZ, G., BUCKER, H., FACIUS, R., HORNECK, G., GRAUL, E.H., BERGER, H., RUTHER, W., HEINRICH, W., BEAUJEAN, R., ENGE, W., ALPATOV, A.M., USHAKOV, I.A., ZACHVATKIN, Y.A. and MESLAND, D.A., 1989, Influence of cosmic radiation and/or microgravity on development of *Caurasius morosus*. *Advances in Space Research*, 9, 161-173.
- 13) RISIN, D. and PELLIS, N.R., 2001, Modeled microgravity inhibits apoptosis in peripheral blood lymphocytes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 37, 66-72.

**EFFETTI BIOLOGICI A LUNGO TERMINE INDOTTI IN CELLULE UMANE
DELLA LINEA CGL1 DA FASCI UVB MONOCROMATICI UTILIZZANDO
LA LINEA UV DI LUCE DI SINCROTRONE DEI LNF**

F. Belloni¹, D. Bettega², E. Burattini^{1,3}, P. Calzolari², S. Crema², L. Doneda⁴,
A. Grilli¹, F. Malvezzi Campeggi³, F. Monti³, J.L. Redpath⁵, L. Tallone²

¹*INFN - Laboratori Nazionali di Frascati*

²*Dipartimento di Fisica, Università degli Studi di Milano e INFN-Milano*

³*Dipartimento di Informatica, Università degli Studi di Verona*

⁴*Dipartimento di Biologia e Genetica, Università degli Studi di Milano*

⁵*Department of Radiation Oncology, University of California*

La riduzione dello spessore di ozono osservata negli ultimi decenni comporta un aumento della trasmissione della componente UVB dello spettro solare sulla superficie terrestre. Poiché l'efficacia biologica della radiazione ultravioletta dipende fortemente dalla lunghezza d'onda, incrementi anche piccoli dell'irradianza UVB possono portare ad un aumento significativo degli effetti biologici soprattutto alle lunghezze d'onda minori: è, quindi, importante poterne conoscere l'entità in funzione della dose al variare della lunghezza d'onda.

A tale scopo è in corso uno studio sistematico degli effetti biologici immediati e tardivi indotti da radiazione monocromatica nella banda B (280-320 nm, 4.5-3.9 eV) dell'Ultravioletto in cellule umane coltivate *in vitro*, utilizzando il fascio di Luce di Sincrotrone generato dall'anello di accumulazione DAΦNE, da qualche anno operativo a Frascati, presso il Laboratorio DAΦNE-Luce. In questo lavoro si riportano i dati preliminari relativi allo studio dell'efficacia dei fasci di lunghezza d'onda di 285, 292, e 295 nm per l'induzione di inattivazione della capacità proliferativa delle cellule direttamente irraggiate e della loro progenie e per l'induzione di trasformazione neoplastica.

L'area dove si eseguono gli irraggiamenti è equipaggiata con un monocromatore a reticolo in grado di selezionare

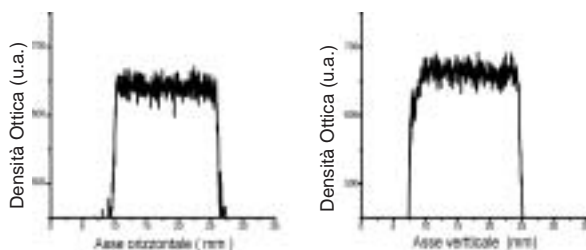


Fig.1. Distribuzione spaziale del fascio lungo due assi ortogonali con centro corrispondente a quello del campione biologico. (l = 280 nm)

fotoni in un intervallo spettrale compreso fra 2 e 6 eV con una risoluzione di circa lo 0.3%. Il fascio esce in aria dopo aver attraversato una finestra di zaffiro e viene focheggiato sulle fenditure di ingresso del monocromatore da un sistema ottico con controlli remoti. Il fatto che i fotoni di lunghezza d'onda minore di 180 nm non siano trasmessi dalla finestra di zaffiro garantisce l'assenza di contaminazioni del secondo ordine in uscita dal monocromatore.

Per l'irraggiamento, le cellule vengono fatte crescere sulla base di quarzo di cilindretti di teflon del diametro di 13 mm. Dopo le fenditure di uscita del monocromatore è montato un apposito sistema portacampioni studiato per posizionare i cilindretti alla distanza ottimale in modo da garantire un'esposizione spazialmente uniforme entro il 10%. La distribuzione dei fotoni sui campioni viene determinata mediante microdensitometria su apposite lastre fotografiche altamente sensibili all'UV collocate al posto dei campioni (Fig. 1).

La dosimetria viene effettuata utilizzando come rivelatore un fotodiodo calibrato sensibile nella regione spettrale compresa fra 200 e 1200 nm e di area attiva pari a 1 cm². Prima dell'irraggiamento, per ciascuna lunghezza d'onda, si determinano la potenza e l'irradianza sul campione per unità di corrente circolante nell'anello; nel corso dell'irraggiamento viene monitorata la corrente circolante $I(t)$ e la dose viene determinata dalla relazione:

$$\text{Dose} = [\text{irradianza per unità di corrente circolante}] * \int I(t) dt$$

La linearità della risposta del fotodiodo in funzione della corrente circolante è stata verificata nell'intervallo di correnti fra 0.1 A e 1 A.

Nella configurazione in cui sono state effettuate le sessioni di irraggiamento, in una banda passante di 2.5-3 nm e per fasci monocromatici di lunghezza d'onda compresa tra 280 e 320 nm, la potenza incidente sul campione per unità di corrente circolante era dell'ordine di 4 μW/A e il valore dell'irradianza è stato mediamente di 20 mW/m² per dosi fino a 55 J/m².

Il sistema biologico utilizzato è la linea cellulare ibrida umana [HeLaxfibroblasti umani della pelle] non tumorigenica, denominata CGL1 (Stanbridge et al. 1982 e Redpath et al. 1987). In condizioni ottimali di coltura è caratterizzata da un valore di efficienza di piastramento pari a circa 80%, da un tempo di generazione di 20±2 h e da uno spessore cellulare pari a 5.7±0.9 mm (Bettega et al. 2003). Le cellule, seminate 24 ore prima dell'irraggiamento negli appositi contenitori di teflon con base di quarzo, sono state esposte a fasci UV monocromatici di 285, 292 e 295 nm nell'intervallo di dose compreso tra 5 e 55 J/m².

Dopo l'irraggiamento, le cellule irraggiate ed i relativi campioni di controllo sono stati trattati con tecnica standard per la determinazione, a 12 giorni, della frazione di cellule che hanno mantenuto la capacità proliferativa (sopravvissute). Parte delle cellule, progenie di quelle sopravvissute all'irraggiamento, sono state riseminate a bassa densità 12 giorni dopo l'irraggiamento per determinarne, dopo ulteriori 12 giorni, la capacità proliferativa. La riduzione della capacità proliferativa della progenie delle cellule irraggiate è un effetto noto in letteratura come "morte riproduttiva ritardata" ed è ritenuto manifestazione di indotta instabilità genomica (Little, 1998). I dati ottenuti per le cellule direttamente irraggiate e per la progenie sono state analizzate utilizzando il modello lineare-quadratico. Per la determinazione della trasformazione neoplastica, 6 giorni dopo l'irraggiamento le cellule sono state piastrate in flasks T75. Dopo 21 giorni di incubazione, con un cambio di terreno alla settimana, i campioni cellulari sono stati fissati e trattati con Western Blue per l'identificazione dei cloni di cellule trasformate (focus) (Mendonca et al. 1992). La frequenza di trasformazione per cellula sopravvissuta ad una densità cellulare di riferimento di 50 cellule/cm² è stata determinata come descritto in precedenti lavori. (Bettega et al. 1997, Bettega et al. 2003).

In Fig. 2 sono riportate le curve dose-effetto per l'inattivazione della capacità proliferativa della cellule direttamente irraggiate. Come si può vedere dalla figura, la sopravvivenza cellulare diminuisce all'aumentare della dose ed al diminuire della lunghezza d'onda; la pendenza iniziale della curva aumenta di circa un fattore 2 passando da 295 a 285 nm.

In Fig. 3 sono riportate le curve di efficienza di clonaggio della progenie della cellule sopravvissute all'irraggiamento, in funzione della dose data ai loro progenitori. L'efficienza di clonaggio risulta essere minore di quella della popolazione di controllo e decresce al crescere della dose e al diminuire della lunghezza d'onda.

La Fig. 4 riporta la frequenza di trasformazione per cellula sopravvissuta in funzione della dose per i tre fasci studiati. La frequenza di trasformazione aumenta all'aumentare della dose e al diminuire della lunghezza d'onda; la pendenza della curva aumenta di circa un fattore 20 passando da 295 a 285 nm

La Fig. 5 mostra l'efficacia dei tre fasci (espressa dalla pendenza iniziale delle curve, parametro a, dei tre effetti considerati) in funzione della lunghezza d'onda. Si osserva che per gli effetti a lungo termine (morte riproduttiva ritardata e trasformazione neoplastica) l'efficacia della radiazione aumenta, al diminuire della lunghezza d'onda, più rapidamente di quanto avvenga per gli effetti a breve termine (sopravvivenza cellulare). Lo spettro d'azione della radiazione UVB per gli effetti a lungo termine è diverso da quello degli effetti a breve termine nell'intervallo di lunghezze d'onda studiate.

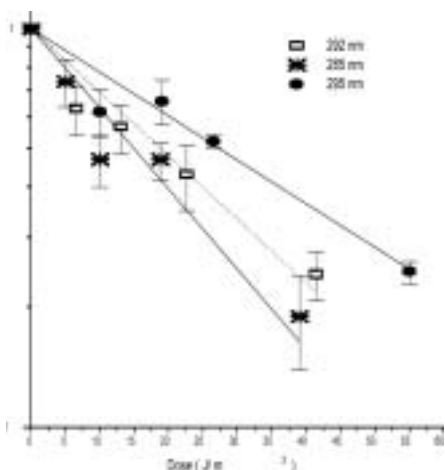


Fig. 2 Sopravvivenza delle cellule irradiate vs dose

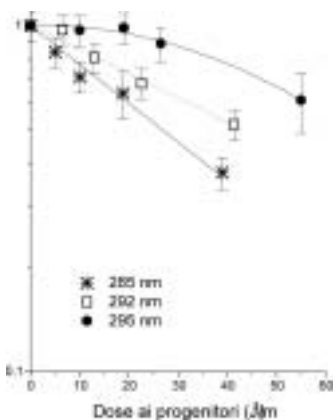


Fig. 3 Efficienza di clonaggio della progenie vs dose dei progenitori

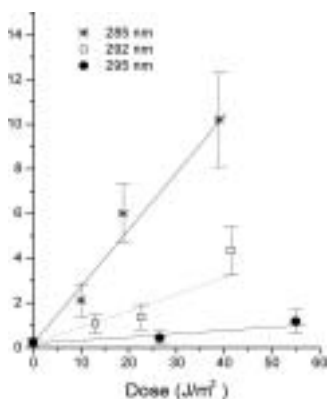


Fig. 4 Trasformazione neoplastica per cellula sopravvissuta vs dose (densità cellulare cell/cm²)

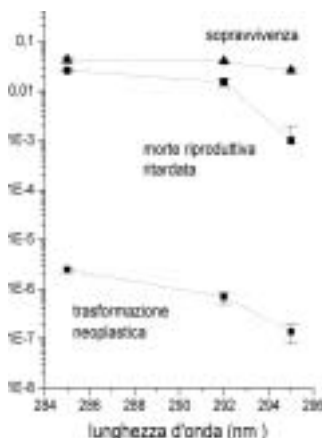


Fig. 5 Parametro α delle curve dei tre effetti studiati vs lunghezza d'onda

In conclusione la radiazione UVB studiata induce inattivazione della capacità proliferativa, morte riproduttiva ritardata e trasformazione neoplastica a tutte le lunghezze d'onda studiate con efficacia che dipende dall'effetto ed aumenta al diminuire della lunghezza d'onda. Il fattore di aumento è maggiore per gli effetti a lungo termine.

Bibliografia

- 1) Bettega et al. (1997), *Int. J. of Rad. Biol.* 72, 523.
- 2) Bettega et al (2003), *Int. J. of Rad. Biol.* 77, 963.
- 3) Little J. (1998), *Int. J. of Rad. Biol.* 74, 663.
- 4) Mendonca et al. (1992), *Rad. Res.* 131, 345.
- 5) Redpath, et al (1978), *Rad. Res.* 110, 468.
- 6) Stanbridge et al. (1982), *Science*, 215, 252.

DANNO INDOTTO DAI RAGGI-X A SPECIFICHE REGIONI DEL DNA DETERMINATO CON LA COMET-FISH

Grollino MG, Barattini P, Stronati L, Tirindelli-Danesi D.

Sezione di Tossicologia e Scienze Biomediche, ENEA Casaccia, Roma,

e-mail: grollino@casaccia.enea.it

La Comet-FISH è una combinazione dell'elettroforesi su gel a singola cellula (Comet assay) con l'ibridazione *in situ* in fluorescenza (FISH) e permette di studiare il danno indotto al DNA da agenti genotossici attraverso l'esame, per fluorescenza, di tipici profili "a cometa" e della localizzazione di domini contenenti specifiche sequenze di DNA, in cellule singole (1,2). La posizione dei segnali di ibridazione nella testa o nella coda della cometa indica se essi si trovano all'interno o nella vicinanza di una regione danneggiata di DNA. L'obiettivo dello studio è stato quello di valutare se il danno indotto al DNA dai raggi X, in una linea cellulare di carcinoma della vescica, è casuale o avviene in siti preferenziali. Le cellule sono state raccolte, distribuite su vetrino, incluse in agarosio e sottoposte a irraggiamento con raggi X alle dosi di 2, 4, 6 Gy. Dopo il Comet-assay alcalino, i vetrini sono stati colorati con Bromuro di Etidio o sono stati processati per la FISH, utilizzando una sonda specifica per il locus p53 e una

sonda centromerica per il cromosoma 17 (Vysis). I risultati del Comet-assay hanno evidenziato una chiara dose-risposta ai raggi X; infatti all'aumentare della dose aumenta la quantità di DNA danneggiato delle cellule trattate rispetto a quelle di controllo, come evidenziato dall'aumento dei valori di Tail Moment. I risultati degli esperimenti di Comet-FISH hanno mostrato che il numero medio di spot aumenta nella coda all'aumentare della dose. Le cellule trattate hanno mostrato segnali di ibridazione relativi al gene p53 nella coda della cometa con una frequenza del 30% (a 2 Gy), dell'82% (a 4 Gy) e del 95% (a 6 Gy), mentre quelli relativi alla sonda centromerica del cromosoma 17 avevano una frequenza del 35% (a 2 Gy), dell'87% (a 4 Gy) e del 95% (a 6 Gy). Le cellule di controllo, non irraggiate, hanno mostrato la maggior parte dei segnali nella testa della cometa (94% per il gene p53 e 96% per la sonda centromerica del cromosoma 17). Inoltre, l'aumento del numero dei segnali osservati nella coda (più di due per ogni sonda) ha evidenziato che avvengono rotture anche all'interno delle sequenze da noi utilizzate. In conclusione, i nostri risultati dimostrano che la Comet-FISH può essere utilizzata nel determinare se il danno al DNA è distribuito in modo casuale o in domini contenenti sequenze di nostro interesse.

Bibliografia

- 1) Santos S.J., Singh N.P., Natarajan A.T. Fluorescence in situ hybridization with comets. *Exp. Cell Res.* 232: 407-411; 1997
- 2) Rapp A., Bock C., Dittmar H., Greulich K.O. UV.A breakage sensitivity of human chromosomes as measured by Comet-FISH depends on gene density and not on the chromosome size. *J. Photochem. Photobiol.B*, 56:107-117; 2000.

L'ECCITAZIONE ELETTROMAGNETICA SELETTIVA MEDIANTE *NON IONIZING RADIATION* (NIR) NELLA DIAGNOSTICA NON INVASIVA

G. Vermiglio, C. Sansotta, B. Testagrossa

Dip. Protezione Ambientale, Sanitaria, Sociale ed Industriale - Università di Messina
 e-mail: ifmsa@unime.it

Il fatto che uno stesso tessuto biologico presenti un comportamento ottico differente a seconda della propria natura, normale o patologica, è stato già oggetto di precedenti lavori, in cui gli Autori hanno illustrato un protocollo operativo per rilevare con la teletermografia (TT) eventuali incrementi di temperatura dei tessuti mammari neoplastici, una volta che questi erano stati irradiati con onde e.m. di lunghezza d'onda opportuna. Sulla scorta dei confortanti risultati ottenuti e con l'intento di incrementare le potenzialità delle tecniche diagnostiche non invasive, gli AA. quindi hanno pianificato l'adattamento di tali procedure anche alle patologie di natura cutanea, al fine di individuare la possibilità di evidenziare, sempre mediante TT, gli incrementi di temperatura indotti dalla stimolazione con radiazioni e.m. di lunghezza d'onda centrata sui picchi di assorbimento precedentemente determinati mediante analisi spettrofotometrica.

Nell'ambito di tale ricerca sono stati esaminati 7 campioni di basalioma, 9 di fibroma, 6 di granuloma, 5 di tessuto cicatriziale, 6 di tessuto infiammatorio e 6 campioni normali, i quali hanno costituito il gruppo di riferimento. Tutti i campioni, separati dalla parte lipidica e con le stesse adeguate dimensioni, sono stati inizialmente classificati istologicamente in relazione alla patologia. I reperti tissutali, sia normali che patologici, conservati a -20° C, sono stati quindi sottoposti, dopo scongelamento a temperatura ambiente, ad un procedimento di omogeneizzazione con saccarosio 0,25 M, in rapporto 1:10 peso/volume e, successivamente, ad una serie di ultracentrifugazioni differenziate (rotore 50Ti, r max 80.8), necessarie per ottenere la frazione solubile cellulare (citosol), la quale è stata analizzata spettrofotometricamente nel range di lunghezze d'onda compreso tra 190 e 1100 nm, con uno Spettrofotometro Ocean Optics.

Gli spettri di assorbimento così ottenuti, accorpati per gruppi omogenei, hanno evidenziato la presenza di bande, specifiche del particolare tessuto patologico in esame ed identificative dello stesso (Figura 1). Sulla scorta di tali risultati, gli AA. ritengono possibile utilizzare il differente comportamento spettrofotometrico, che si manifesta attraverso una caratteristica localizzazione delle bande di assorbimento nell'intervallo di lunghezze d'onda considerato, per riuscire a differenziare sia tra tessuti normali e patologici che tra i differenti tessuti patologici, sottopo-



Figura 1- Bande di assorbimento caratteristiche dei differenti tessuti cutanei patologici (lunghezze d'onda espresse in nm)

nendo gli stessi a stimolazioni selettive con radiazioni e.m. centrate all'interno dello specifico range di assorbimento ed analizzando la risposta teletermografica fornita dal campione di tessuto analizzato il quale, in caso positivo, dovrebbe evidenziare un riscaldamento nella regione interessata, visibile come un'area "calda" rispetto alla zona circostante.

Bibliografia

- 1) Vermiglio G., Tamà S., Sansotta C., Denuzzo G., Pulejo A., *Possibilità di accoppiamento della stimolazione elettromagnetica alla termografia nella diagnostica senologica*. Giornale Italiano di Senologia 1990; 3: 83-88.
- 2) Webb S.J., Booth A.D. *Microwave absorption by normal and tumor cells*. Science 1971; 174: 72-74
- 3) Harry H.H., Le Veen H., Obrien P., Keene M., *Radiofrequency thermotherapy for cancer*, The Journal of the South Carolina medical association, 76, 5-9, 1980.

ANALISI E MODELLIZZAZIONE DELLE IMMAGINI DI FLUORESCENZA OTTENUTE DAL COMET ASSAY

Francesca Antonelli, Mauro Belli, Alessandro Campa e Giuseppe Esposito

Istituto Superiore di Sanità e INFN-Gruppo Collegato Sanità, Roma

e-mail: campa@iss.infn.it

In questo lavoro presentiamo alcuni dati ottenuti attraverso esperimenti di Single Cell Gel Electrophoresis (Comet assay), eseguiti su cellule di osteosarcoma umano (linea cellulare MG63) irradiate con raggi γ ; introduciamo inoltre un modello per l'analisi di questi dati.

Il Comet Assay è una tecnica di analisi del danno al DNA che permette di studiare le doppie rotture indotte nella doppia elica (double strand breaks, DSB) al livello di singola cellula [1], rendendo possibile lo studio dell'eterogeneità di una popolazione cellulare. La tecnica permette inoltre di rilevare in modo sensibile le DSB senza necessità di marcare il DNA con sostanze radioattive, richiede un numero minimo di cellule e non presenta costi di attuazione elevati.

Le comete che si ottengono con il Comet assay si formano allorché le estremità rotte della molecola di DNA carica negativamente divengono libere di migrare all'interno di un campo elettrico verso l'anodo. Il parametro fondamentale che si ricava dall'analisi delle comete è il "Tail Moment" (TM), il quale rappresenta il migliore indicatore di DSB indotte nel DNA, tenendo conto sia della distanza di migrazione del DNA nel campo elettrico, sia della quantità di DNA presente nella coda.

I grafici del TM in funzione della dose (Fig. 1) mostrano un andamento lineare almeno fino a dosi di 30 Gy. Il modello che abbiamo elaborato considera la fluorescenza presente nella coda delle comete come dovuta in maniera preponderante, per queste dosi, all'elongazione dei due bracci dei loops cromatinici [2, 3] all'interno dei quali si è prodotta una doppia rottura. Questo assunto si basa sull'ipotesi che l'irradiazione con raggi γ produce la progressiva rottura dei loops cromatinici, rilassando il DNA superavvolto e permettendone l'elongazione nel campo elettrico. E' dunque possibile calcolare la fluorescenza presente nella coda, e quindi il TM, in funzione della probabilità di produzione di una singola DSB in ogni loop danneggiato. Per basse dosi la relazione che si ottiene da questa modellizzazione si mantiene lineare, in accordo con i dati sperimentali. Il confronto quantitativo tra i dati sperimentali e i valori calcolati permette inoltre di ottenere una stima della lunghezza media dei loops cromatinici.

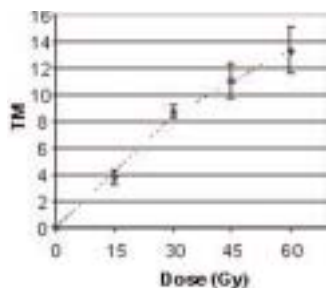


Fig. 1: Curva del Tail Moment in funzione della dose.

Bibliografia

- 1) C.R.H. Kent et al. : Int. J. Radiat. Biol., vol. 67, pp. 655-660, 1995
- 2) D.A. Jackson et al. : EMBO J., vol. 9, pp. 567-571, 1990
- 3) J.L. Roti Roti and W.D. Wright : Cytometry, vol. 8, pp. 461-467, 1987.

RADIOLISI DEL LISOZIMA IN FASE SOLIDA

A.Mariani¹, I.Bonomi¹, A.Buttafava², A.Fessaz³, A.Faucitano²

¹Dip. Ingegneria Nucleare Politecnico di Milano, ²Dip. Chimica Generale, Università di Pavia,
³DISTAM - Università di Milano

Il Lisozima è una proteina globulare ricca di zolfo contenente 129 aminoacidi, spesso scelto come modello per lo studio del danno da radiazioni, sia dal punto di vista biologico che chimico, per la completa conoscenza delle sue strutture primaria, secondaria e terziaria.

Le caratteristiche principali della radiolisi allo stato solido del Lisozima in condizioni anaerobiche, in un intervallo di dose fino a 150 kGy, possono essere così riassunte:

- Le misure EPR evidenziano la formazione di una specie allo zolfo che, attraverso il confronto con la radiolisi allo stato solido di un tiolo alifatico a catena lunga e con l'aiuto di un'analisi EPR della dinamica molecolare, è identificata come un radicale pertiilico R-S-S• o un radicale tiilico perturbato RS•.....S(H)R. Quest'ultima ipotesi implica che la degenerazione orbitalica sia rimossa dalla debole interazione legante tra gli atomi di zolfo. La specie allo zolfo proviene dalla reazione del radicale anione del disolfuro che è la specie intrappolata in maggior quantità dopo la radiolisi a 77K.

- Le misure EPR evidenziano inoltre la presenza di una specie paramagnetica al sito della glicina, precursore, dopo riscaldamento oltre 220K, del radicale -NH-CH¹-C(=O)-. Questa osservazione suggerisce che nel meccanismo di reazione sia presente un processo di migrazione della carica positiva al sito della glicina, seguito dalla reazione di deprotonazione.

- La determinazione analitica di gruppi -SH dopo irraggiamento a temperatura ambiente, testimonia che in tali condizioni la rottura del legame -S-S- costituisce l'effetto radiolitico più importante. Le misure EPR suggeriscono che questa reazione è prevalente anche nella radiolisi a bassa temperatura.

- E' stata verificata la presenza di un processo di aggregazione della proteina con la formazione prevalente di dime-ri legati da ponti a zolfo e, in sottordine, da altri tipi di legami covalenti.

- La diminuzione dell'entalpia di denaturazione, misurata con DSC, all'aumentare della dose di radiazioni (circa il 50% della proteina viene denaturata con una dose di 150 kGy a temperature ambiente), testimonia che il danno radiolitico coinvolge pesantemente la struttura terziaria della proteina.

- Le misure spettrofotometriche e spettrofluorimetriche sembrano indicare che, fino a 150 kGy, gli aminoacidi a carattere aromatico sono solo marginalmente coinvolti dal danno radiolitico.

E' stato proposto un meccanismo coerente con le misure sperimentali.

STUDIO DI CELLULE TUMORALI IRRAGGIATE E TRATTATE CON CAFFEINA MEDIANTE SPETTROSCOPIA DI RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE

Alessandra Palma, Sveva Grande, Laura Guidoni,
Anna Maria Luciani, Antonella Rosi, Vincenza Viti

Laboratorio di Fisica, Istituto Superiore di Sanità e INFN, Roma,
e-mail: a.palma@iss.it

Molte terapie antitumorali basano la loro efficacia sull'eliminazione delle cellule tumorali attraverso l'attivazione del processo di morte cellulare per via apoptotica. L'apoptosi è uno dei possibili meccanismi che, mediante l'eliminazione delle cellule, regola l'equilibrio cellulare all'interno degli organismi viventi. Essa può essere indotta, ad esempio, da agenti ormonali, farmaci per chemioterapia o trattamenti radioterapici.

L'applicazione della Spettroscopia di Risonanza Magnetica (MRS) allo studio degli eventi metabolici che avvengono in seguito ad irraggiamento di cellule tumorali è di grande utilità per individuare i danni da radiazione e correlarli ai diversi tipi di morte cellulare. Infatti, alcuni studi indicano che l'apoptosi è caratterizzata da un marcato aumento in intensità dei segnali dei lipidi mobili (ML) in spettri di ¹H MRS di cellule tumorali intatte (1).

Nel presente studio, abbiamo esaminato il comportamento di due diverse linee cellulari *in vitro*, HeLa (da carcinoma della cervice) ed MCF-7 (da carcinoma mammario), in seguito ad irraggiamento con fasci fotonici (sorgente di ⁶⁰Co) a 20 Gy. Le cellule MCF-7 irraggiate muoiono essenzialmente per apoptosi, mentre nel caso delle HeLa il meccanismo predominante è la morte mitotica. Studi recenti indicano che il trattamento con la caffeina induce apop-

tosì nelle cellule HeLa irraggiate (2).

Abbiamo esaminato le variazioni dei segnali dei ML 48 ore dopo l'irraggiamento. Osserviamo un aumento dei segnali suddetti sia negli spettri mono che bidimensionali COSY (CORrelation Spectroscopy) delle MCF-7, ed una diminuzione negli spettri delle HeLa.

Tempo	A / (Lys + Ala)	
	24h	48h
Controllo	2.0 ± 0.2	4.2 ± 0.4
Irraggiato con 20 Gy	2.0 ± 0.2	3.5 ± 0.3
Trattato con caffeina	2.1 ± 0.2	2.3 ± 0.2
Trattato con caffeina+irr.20Gy	1.7 ± 0.2	2.7 ± 0.2

Tab.1 Effetti dell'irraggiamento in funzione del tempo sull'intensità del segnale del *cross peak* A, misurato in relazione con le intensità dei *cross peaks* di Lisina ed Alanina presi come riferimento, nelle cellule HeLa.

Il trattamento delle HeLa con caffeina prima dell'irraggiamento rende il loro comportamento simile a quello delle MCF-7. In Tab. 1 è possibile osservare come, 48 ore dopo l'irraggiamento, l'intensità del segnale del *cross peak* A, relativo alla correlazione tra (CH₂)_n e t-(CH₃) delle catene, aumenti nel campione irraggiato e trattato con caffeina rispetto al suo controllo.

In conclusione il trattamento delle cellule HeLa con caffeina fa sì che negli spettri di cellule irraggiate sia possibile osservare un aumento dell'intensità del segnale ML. Quest'ultimo effetto può essere messo in relazione con la morte apoptotica.

Bibliografia

- 1) Hakumaki J.M. et al., Nat. Med. 1999, 5 (11): 1323-1327
- 2) Bernhard E.J. et al., Int. J. Radiat. Bio. 1996, 60 (5):575-584.

**ESPRESSIONE PRECOCE DEI RECETTORI PER L'ACIDO GLUTAMMICO
INDOTTA DA CAMPO MAGNETICO A BASSA FREQUENZA (50 Hz)
IN CELLULE DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE DI RATTI NEONATI**

Lisi A. *, Ledda M. *, Rieti S. ^, Pozzi D. §, Ciotti M.T. *, Pieri M. β, Zona C. β, Mercanti D. *, Grimaldi S. *

*Istituto di Neurobiologia e Medicina Molecolare, CNR, Roma
§Dipartimento di Medicina Sperimentale e Patologia, Università la Sapienza, Roma
βDipartimento di Neuroscienze, Università di Roma "Tor Vergata"
^SPESL-DIPIA, Roma, Italy
e-mail: deleana.pozzi@uniroma1.it

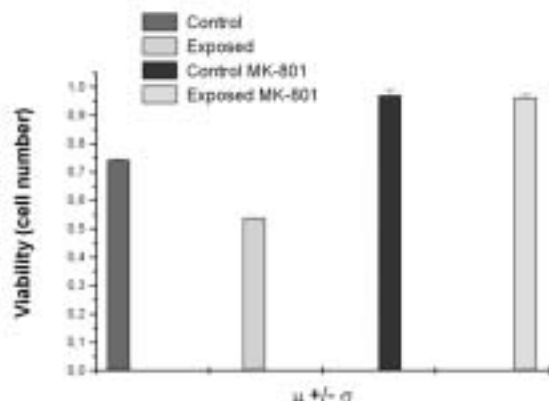
In questo lavoro abbiamo studiato gli effetti indotti dall'esposizione a radiazioni non ionizzanti (NIR) sullo sviluppo e maturazione del sistema nervoso centrale del ratto neonato.

Cellule del cervelletto del ratto neonato vengono espianate otto giorni dopo la nascita (1) e fatte aderire in piastra allo scopo di ottenere la coltura cellulare che verrà poi esposta a radiazioni non ionizzanti a bassa frequenza (50

Hz, 1 mT).

Dopo cinque giorni di esposizione viene indotta una risposta al test di eccitotossicità da glutammato (2) significativamente differente tra campioni esposti e quelli di controllo. In particolare nei campioni esposti è stata rilevata una diminuzione del 30% nella sopravvivenza cellulare, contro il 5% di mortalità rilevato nei campioni di controllo. Questo aumento nella mortalità delle cellule esposte viene annullato dall'inibitore MK-801.

Utilizzando la tecnica del patch-clamp, gli stessi campioni esposti mostrano anche un significativo aumento dell'intensità delle correnti del sodio e del potassio. Mediante tecniche di RT-PCR e Western Blotting abbiamo inoltre evidenziato



che l'esposizione a radiazioni non ionizzanti induce una precoce espressione dei recettori del glutammato sia a livello trascrizionale che traduzionale (3). Anticorpi monoclonali anti-neurofilamenti (NF-200) mostrano poi, la presenza di questi marcatori del differenziamento neuronale nelle cellule esposte rispetto alle cellule di controllo. La precoce presenza dei recettori per il glutammato a livello della membrana citoplasmatica delle cellule neuronali suggerisce che l'esposizione alle NIR possa favorire un'accelerazione dei processi di maturazione e differenziamento.

Bibliografia

- 1) Aloisi, F., Ciotti, MT., and Levi, G., (1985) *J. Neurosci.*, 5, 2001-2008.
- 2) Gallo, V., Giotti, MT., Coletti, A., Aloisi, F., and Levi, G. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 79, 7919-7923.
- 3) Caitlin Smith T. Lu-Yang Wang and R. Howe J. (1999) *J. Physiol.*, 517.1, 51-58.