

RADIOBIOLOGIA E RADIOPROTEZIONE

RECENTI SVILUPPI DELLA RADIOBIOLOGIA CELLULARE RILEVANTI PER LA RADIOPROTEZIONE

Mauro Belli

*Laboratorio di Fisica, Istituto Superiore di Sanità e INFN-Roma1
Gruppo Collegato Sanità, Roma
e-mail: m.belli@iss.it*

Il ruolo della radiobiologia nella radioprotezione

La protezione dagli effetti nocivi prodotti dalle radiazioni ionizzanti si basa sulle seguenti azioni: a) valutazione delle dosi ricevute dalle persone, anche attraverso opportuni modelli metabolici ed ambientali; b) valutazione degli effetti associati alle dosi ricevute; c) implementazione di pratiche di prevenzione e di intervento.

Nonostante i numerosi studi epidemiologici e sperimentali condotti da oltre un secolo, vi sono ancora grosse incertezze intorno alla valutazione degli effetti, in particolare quelli delle dosi basse e protratte (quali sono quelle normalmente associate ad esposizioni lavorative, mediche ed ambientali) e delle radiazioni di alto LET (ad es. particelle alfa, associate alla presenza di radon in ambienti chiusi, e altre particelle di interesse nella protezione negli impianti nucleari e nei voli ad alta quota).

Gli effetti di basse dosi e bassi ratei di dose riguardano sostanzialmente rischi di tumori e leucemie, e la loro valutazione è attualmente basata sull'estrapolazione dei dati epidemiologici che si riferiscono sostanzialmente ad esposizioni a raggi γ con dosi da moderate ad elevate e con alti ratei di dose. Già una decina d'anni fa l'UNSCEAR (organismo delle Nazioni Unite) sottolineava che la maggior fonte d'informazione sugli effetti biologici delle radiazioni ionizzanti sull'uomo provengono dall'epidemiologia delle popolazioni, ma che molte informazioni sui meccanismi di danno e sulla relazione dose-risposta possono essere dedotte da ricerche radiobiologiche su cellule isolate coltivate *in vitro* e su animali. In effetti, le conoscenze radiobiologiche ed i modelli dei meccanismi d'azione delle radiazioni si sono rivelate essenziali per guidare la suddetta estrapolazione e per valutare i fattori di peso delle radiazioni densamente ionizzanti. La Commissione Europea ha previsto uno spazio significativo alle ricerche nel settore all'interno del "Framework Programme 6" dell'Euratom.

Tra le diverse relazioni dose-risposta che possono essere considerate, il modello cosiddetto lineare-quadratico (L-Q) è quello attualmente utilizzato per l'estrapolazione alle basse dosi dei dati epidemiologici. Il termine lineare, prevalente alle basse dosi, è determinato sostanzialmente da dati sperimentali su sistemi biologici, che forniscono la stima del rapporto fra l'effetto ad alti livelli di esposizione e quello a bassi livelli, detto fattore di correzione per la dose ed il rateo di dose (DDREF). L'attuale impostazione della radioprotezione si basa dunque sull'ipotesi di una risposta alle basse dosi lineare senza soglia (linear, non-threshold, LNT), che implica l'additività degli effetti dovuti ad esposizioni intervallate nel tempo, ciò che è essenziale per la gestione della radioprotezione nella forma attuale.

Il modello LNT ha sinora trovato giustificazione radiobiologica nell'osservazione sperimentale di risposte con componenti lineari per vari "endpoints" biologici e nella considerazione che anche piccole quantità d'energia rilasciate in una cellula potrebbero dar luogo ad effetti cellulari osservabili. Negli ultimi tempi, tuttavia, questa impostazione è sempre più messa in discussione. In effetti, le recenti ricerche radiobiologiche hanno evidenziato la complessità della risposta cellulare sotto vari aspetti.

Aspetti biofisici e molecolari

Varie evidenze indicano che l'efficienza biologica di una radiazione è legata al raggruppamento ("clustering") degli eventi di deposizione energetica (1). L'attuale ipotesi di lavoro è che la correlazione spaziale dei siti di ionizzazione influisce sulla distribuzione delle lesioni indotte sul DNA, in particolare delle doppie rotture (DSB), che a sua volta influisce sulla riparabilità del danno e quindi sulle sue conseguenze biologiche. In questo modo è spiegata la maggiore efficacia biologica, rispetto alle radiazioni sparsamente ionizzanti, delle radiazioni densamente ionizzanti (di alto LET).

La correlazione delle DSB è stata studiata sperimentalmente attraverso la determinazione dello spettro di frammentazione del DNA in cellule irradiate con diversi tipi di radiazione (2,3,4). Complessivamente, tali studi indicano che le particelle cariche inducono, rispetto ai raggi X o γ , un maggior numero di piccoli frammenti e una maggiore correlazione delle DSB su dimensioni caratteristiche delle strutture organizzative della cromatina.

I recenti avanzamenti di biologia molecolare hanno consentito lo sviluppo di metodi per la determinazione di piccole concentrazioni di DSB, necessari per gli studi a basse dosi. Essi hanno messo in evidenza che anche alle basse dosi la formazione delle DSB è lineare con la dose (5). Anche il problema della fedeltà del ricongiungimento delle DSB si sta affrontando con un metodo di biologia molecolare che sembrerebbe indicare un ricongiungimento altamente corretto per le DSB indotte dall'esposizione a basso rateo di dose di raggi γ , ma non per quelle indotte dall'esposizione a basso rateo di dose di particelle α .

L'evidenza che i cromosomi nelle cellule in interfase sono organizzati in "territori" ha indicato una stretta relazione tra l'organizzazione nucleare e i meccanismi di aberrazione cromosomica, suggerendo l'introduzione del concetto di "prossimità" nei modelli di formazione delle aberrazioni cromosomiche. Ciò ha consentito lo sviluppo di modelli più realistici, con i quali è possibile ottenere una buona simulazione delle curve di risposta per scambi intra- e intercromosomici, quando si consideri la produzione di lesioni complesse (DSB raggruppate) come origine delle aberrazioni. (6)

Aspetti a livello cellulare

La complessità della risposta cellulare è stata evidenziata da una serie di fenomeni, più o meno recenti (quali la risposta adattativa, l'instabilità genomica, l'ipersensibilità a basse dosi, l'effetto bystander), che possono dar luogo a componenti non lineari con effetti diversi e forse opposti nella risposta cellulare, facendo nascere dunque notevoli incertezze sulle modalità di estrapolazione.

L'ipersensibilità alle basse dosi, osservata su colture di V79 irradiate con raggi X nel 1993 (7) è stata più recentemente evidenziata nel Regno Unito utilizzando un microbeam di protoni (8) e studiata ai LNL su colture di V79 irradiate con varie particelle cariche (9).

Nell'ultimo decennio è stata messa in evidenza l'induzione di danni in cellule non direttamente colpite dalla radiazione, effetto comunemente noto come "bystander effect" (v. ref. 10 per una rassegna). Lo studio di questi fenomeni si è fortemente giovato dello sviluppo di "microbeam" di raggi X e di particelle cariche, capaci di colpire selettivamente singole cellule o addirittura parti specifiche della cellula. Alcuni di questi studi mostrano che l'effetto bystander ha in genere una saturazione, suggerendo la possibilità di un suo ruolo significativo alle basse dosi. Poiché i meccanismi che conducono alla morte cellulare competono con i processi di carcinogenesi, gli esperimenti che evidenziano un effetto bystander a livello dell'inattivazione cellulare suggeriscono un effetto protettivo, mentre quelli che evidenziano un effetto a livello di induzione di mutazioni o di trasformazione *in vitro* suggeriscono un effetto dannoso.

La "risposta adattativa" è il fenomeno per cui un organismo esposto ad una bassa dose ("priming dose") di un agente dannoso, come le radiazioni ionizzanti, diviene meno sensibile ad una successiva esposizione ad alta dose dello stesso agente ("challenging dose"). La prima evidenza di risposta adattativa a radiazioni ionizzanti fu riportata da Olivieri et al nel 1984 (11) usando una piccola "priming dose" acuta. Essi osservarono che linfociti umani in coltura, trattati con timidina tritiata, erano meno suscettibili a danni citogenetici prodotti da dosi più elevate di raggi X. Ai fini della radioprotezione è rilevante chiedersi se anche le esposizioni croniche inducono una risposta adattativa, in relazione ad un eventuale ruolo del fondo naturale di radiazioni ionizzanti. Alcune indagini sono state recentemente effettuate attraverso il confronto di cellule V79 coltivate *in vitro* in presenza di fondo "normale" e con quelle coltivate in ambienti a basso fondo di radiazioni, utilizzando il tunnel dei Laboratori Nazionali del Gran Sasso dell'INFN. I risultati ottenuti sembrerebbero indicare che nelle cellule mantenute a basso fondo vi è un aumento della suscettibilità all'induzione di mutazioni da dosi acute di raggi γ (12).

Le recenti acquisizioni radiobiologiche confermano l'idea generale che le modificazioni del genoma costituiscono gli effetti rilevanti delle radiazioni ionizzanti, ma indicano l'importanza, oltre al "classico" bersaglio costituito dalla molecola del DNA, anche di altri bersagli "complementari" (v. ref. 13 per una rassegna), legati ai meccanismi di difesa cellulare, quali i sistemi riparativi e i punti d'arresto del ciclo cellulare ("cell cycle checkpoints"). Essi sono attivati dal danno al DNA (in particolare dalle DSB) e cooperano strettamente allo scopo di mantenere l'integrità genomica delle cellule.

In questo quadro in cui compaiono nuovi fenomeni radiobiologici o in cui fenomeni già noti assumono una nuova luce, la comunicazione cellula-cellula appare come un meccanismo comune per la corretta interpretazione di alcuni di essi, quali l'effetto bystander e la risposta adattativa, in relazione alla cancerogenesi da radiazione (14).

Alcune considerazioni

Il quadro che emerge dalle conoscenze radiobiologiche indica che la risposta delle cellule e dei tessuti sia più complessa di quanto si pensasse. E' verosimile che gli stessi meccanismi radiobiologici siano alla base sia della radioterapia che della radioprotezione, ma probabilmente certi meccanismi sono particolarmente evidenti alle basse dosi. I recenti progressi della radiobiologia hanno gettato nuova luce su questi meccanismi, ma le ricadute immediate sulla radioprotezione sono lente.

Tuttavia, un'indicazione di alcuni significativi mutamenti nella radioprotezione rispetto alle precedenti posizioni sulla validità del modello LNT si può trovare in una pubblicazione del National Council for Radiation Protection and Measures (organismo ufficiale degli USA per la radioprotezione) nella quale si legge: "The possibility of a linear non threshold dose-response relationship at low radiation dose cannot be excluded" (15).

Il fascio di ioni fornito dall'acceleratore viene estratto in aria e collimato meccanicamente mediante un disco in tantalio con apertura circolare di area 4 mm², montato su un supporto che ne permette l'allineamento con l'asse del fascio per mezzo di motori passo-passo a controllo remoto. La visualizzazione delle singole cellule da irradiare e la registrazione delle loro coordinate rispetto a marker di riferimento avviene mediante un microscopio ottico invertito a contrasto di fase accoppiato a una CCD-camera e a un software appositamente sviluppato. Una coppia di traslatori XY micrometrici consente il posizionamento delle cellule sotto fascio con una precisione e ripetibilità di 0.1 mm. Una CCD-camera raffreddata appositamente disegnata è utilizzata per misurare il profilo in aria del fascio di ioni microcollimato e determinarne la posizione nello spazio rispetto a marker di riferimento; un rivelatore in silicio (SSBD, silicon surface barrier detector), montato a valle di una speciale capsula di Petri, permette di misurare il numero e l'energia delle particelle che colpiscono le singole cellule. Il rivelatore SSB fornisce inoltre un segnale di trigger ad un deflettore elettrostatico per l'intercettazione veloce (150 nsec) del fascio una volta raggiunto il numero predeterminato di particelle per singola cellula.

L'uso del microscopio a contrasto di fase permette di individuare le singole cellule senza far ricorso a coloranti fluorescenti e quindi senza l'ulteriore esposizione delle colture cellulari a raggi UV.

Le cellule sono seminate a bassa densità in una speciale capsula di Petri (diam 65 mm; altezza utile 20 mm), realizzata in acciaio, con la base e il coperchio in mylar da 6 mm di spessore, che garantisce condizioni di sterilità durante l'irraggiamento.

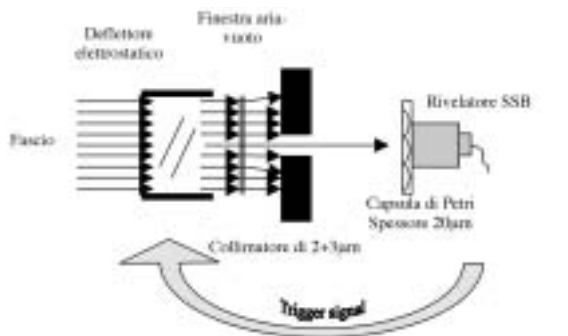


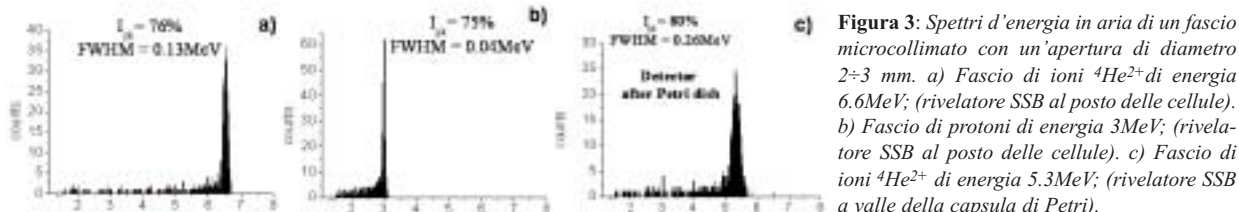
Figura 2: Schema del set up sperimentale per l'irraggiamento di singola cellula. Il rivelatore SSB montato a valle della speciale capsula di Petri permette di misurare l'energia e il numero delle particelle che hanno colpito e attraversato le cellule (v. testo).

Misure preliminari sono state effettuate per la caratterizzazione della qualità di fascio microcollimato in aria utilizzando collimatori con aperture di 5 e 2÷3 mm di diametro, rispettivamente, e per l'ottimizzazione del protocollo di irraggiamento sopra illustrato.

Le Figure 3a) e 3b) mostrano rispettivamente gli spettri d'energia di un fascio microcollimato di protoni di energia 3 MeV in aria e di un fascio di ioni ⁴He²⁺ di 6.6 MeV in aria, ottenuti utilizzando il microcollimatore di diametro 2÷3 mm e misurati dal rivelatore SSB (300 mm) posto nella stessa posizione dei campioni biologici.

Tabella I : Protocollo di irraggiamento	
Il protocollo di irraggiamento di singola cellula prevede le fasi seguenti:	
capsula di Petri in posizione orizzontale sotto microscopio; registrazione delle coordinate dei marker di riferimento e delle singole cellule rispetto ad essi;	
roto-traslazione del campione biologico in posizione verticale di fronte al fascio;	
ri-localizzazione dei marker di riferimento; misura della posizione del fascio con la CCD camera raffreddata; correzione via software delle coordinate delle cellule rispetto alla nuova posizione del marker e alla posizione del fascio;	
posizionamento delle singole cellule di fronte al fascio richiamando via software una ad una le coordinate precedentemente corrette e registrate;	
irraggiamento di ogni cellula con il numero predefinito di ioni;	
riposizionamento della capsula di Petri sotto microscopio; rivisitazione delle cellule irraggiate e delle loro coordinate.	

La Figura 3c) mostra lo spettro d'energia ottenuto con il rivelatore SSB posto nelle condizioni di irraggiamento, cioè posizionato a valle della capsula di Petri contenente le cellule e il terreno di coltura. Si può notare che l'80% delle particelle cade sotto il picco di massima energia, con un'indeterminazione energetica di circa il 5%. (Parzialmente finanziato dal contratto dell'EC "RADNA" FIGH-CT-1999-00012)



Bibliografia

- 1) *K. Prise et al.*, Int. J. Radiat. Biol., 74 (1998) 793-798
- 2) *H. Zhou et al.*, Radiat. Prot. Dos., 99 (2002) 227-232
- 3) *B. Marples et al.*, Radiat. Res., 133 (1993) 41 – 51
- 4) *E. Tsoulou et al.*, Int. J. Radiat. Biol., 77 (2001) 1133-1139
- 5) *G. Böhrnsen et al.*, Int. J. Radiat. Biol., 78 (2002) 259-266
- 6) *S. Gerardi*, Tesi di Laurea, Dip. di Fisica – Univ. di Padova, Nov. 2001
- 7) *R. Cherubini et al.*, Radiat. Res., 158 (2002) 371-372
- 8) *S. Gerardi et al.*, Radiat. Res., 161 (2004).

**DOSIMETRIA BIOLOGICA IN PAZIENTI AFFETTE DA CARCINOMA MAMMARIO
SOTTOPOSTE A RADIOTERAPIA**

P. Scampoli^(1,3), V. d'Alesio⁽¹⁾, R. Pacelli⁽⁴⁾, M. Durante^(1,3), G. Canale Cama⁽²⁾, L. Cella⁽⁴⁾, G. Gialanella^(1,3),
G. Grossi^(1,3), M. Pugliese^(1,3), L. Manti^(1,3), G. Punzo⁽⁴⁾, R. Solla⁽⁴⁾, and M. Salvatore⁽²⁾

¹Dipartimento di Scienze Fisiche, Università di Napoli Federico II, Napoli

²Dipartimento di Radioterapia, Università di Napoli Federico II, Napoli

³Istituto Nazionale di Fisica Nucleare (INFN), Sezione di Napoli, Napoli

⁴Istituto di Biostrutture e Bioimmagini, Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Napoli

e-mail: paola.scampoli@na.infn.it

Introduzione

L'analisi delle aberrazioni cromosomiche (AC) nei linfociti del sangue periferico potrebbe essere di grande utilità in radioterapia al fine della determinazione del danno acuto, legato al tessuto ematopoietico, e del rischio di danni tardivi, in termini di tumori secondari. Studi recenti hanno infatti mostrato che le AC nei linfociti del sangue periferico sono correlate con il rischio di cancro (1,2).

Sebbene studi sulla frequenza delle AC indotte da irraggiamenti *in vitro*, effettuati prima del trattamento radioterapeutico, non abbiano mostrato una relazione con la risposta dei tessuti sani alla radioterapia, le numerose misure esistenti in letteratura sulla frequenza delle AC nei linfociti, dopo i trattamenti radioterapeutici, mostrano una notevole dipendenza del danno citogenetico in funzione delle variabili tipiche di tali trattamenti come il volume e il tipo di tessuto irraggiato, le modalità di frazionamento, il ripopolamento dal midollo spinale, la variabilità individuale e l'eventuale concomitanza con un trattamento chemioterapico.

Nel presente studio abbiamo analizzato le AC nei linfociti di pazienti affette da carcinoma mammario trattate con intervento chirurgico conservativo e successiva radioterapia. Alcune delle pazienti avevano anche subito un trattamento chemioterapico coadiuvante.

I linfociti sono stati isolati dal sangue intero e analizzati, dopo aver indotto chimicamente la loro condensazione, con la tecnica di ibridizzazione *in situ* in fluorescenza (FISH).

Materiali e metodi

I linfociti del sangue periferico sono stati prelevati in ventidue pazienti sottoposte a radioterapia per carcinoma mammario. Tutte le pazienti erano state precedentemente sottoposte a intervento chirurgico con asportazione di un numero variabile di linfonodi ascellari (da 0 a 20) e nove pazienti erano state sottoposte a trattamento coadiuvante chemioterapico.

Il protocollo radioterapeutico prevedeva l'irraggiamento del volume bersaglio, variabile nell'intervallo 325-1180 cm³, con fotoni da 6 MV di picco, per una dose totale di 50 Gy, somministrata in 5 settimane, con frazioni giornaliere di 2 Gy.

I campioni di sangue sono stati prelevati all'inizio del trattamento, a metà e alla fine.

I linfociti sono stati separati e quindi stimolati con PHA per 48 ore a 37°C e raccolti, dopo aver indotto chimicamente la loro condensazione con calyculin A. Successivamente, i cromosomi 2 e 4 sono stati colorati con la tecnica FISH. Per una completa descrizione della tecnica, si rimanda alla referenza (3).

Le AC, analizzate in cromosomi condensati in fase G₂ e in mitosi, sono state classificate in scambi, semplici e complessi, e frammenti acentrici. Questi ultimi non sono stati inclusi nell'analisi dei dati, avendo mostrato notevoli fluttuazioni. I dati relativi a 50 Gy sono stati analizzati sottraendo le AC presenti prima del trattamento.

Risultati

La frequenza di scambi nei cromosomi 2 e 4 ha mostrato un aumento dopo 50 Gy di dose somministrata al volume bersaglio in tutte le pazienti studiate, anche se è presente una notevole variabilità interindividuale. In Tab. 1 sono riportate le frequenze medie per cellula.

	Chemioterapia + radioterapia (n=9)		Solo radioterapia (n=13)	
	Inizio trattamento	Fine trattamento	Inizio trattamento	Fine trattamento
Media	0.0030	0.0303	0.0031	0.0269
Dev. standard	0.0018	0.0163	0.0031	0.0125
Mediana	0.0030	0.0330	0.0020	0.0270

Tab.1. Frequenza di AC per cellula

Tale variabilità non sembra direttamente imputabile alla differenza nei volumi trattati, come mostra la Fig. 1. D’altro canto, è probabile una dipendenza del numero di AC dalla radiosensibilità individuale, che potrebbe, a sua volta, essere legata alla risposta alle radiazioni del tessuto sano. Tuttavia, non abbiamo osservato una correlazione fra il grado di morbidità, valutato nelle pazienti a fine trattamento, e il numero di scambi (Fig. 2).

E’ stata osservata, invece, una correlazione inversa tra il numero di scambi e il numero di linfonodi ascellari asportati chirurgicamente. Dalla Fig. 3 risulta evidente come, dividendo le pazienti in due gruppi, uno senza linfonodi ascellari rimossi e l’altro con un numero maggiore di 10 di linfonodi rimossi, la distribuzione degli scambi è sposta-

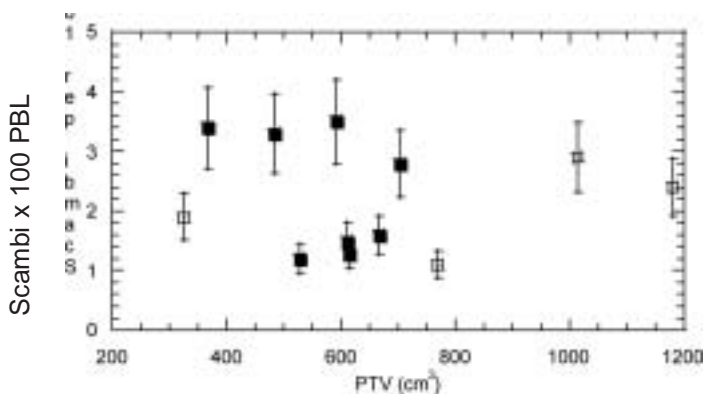


Fig. 1. Scambi nei cromosomi 2 e 4 in funzione del volume irradiato con 50 Gy di dose per pazienti sottoposte alla sola radioterapia (quadrati neri) e a radioterapia + chemioterapia (quadrati vuoti).

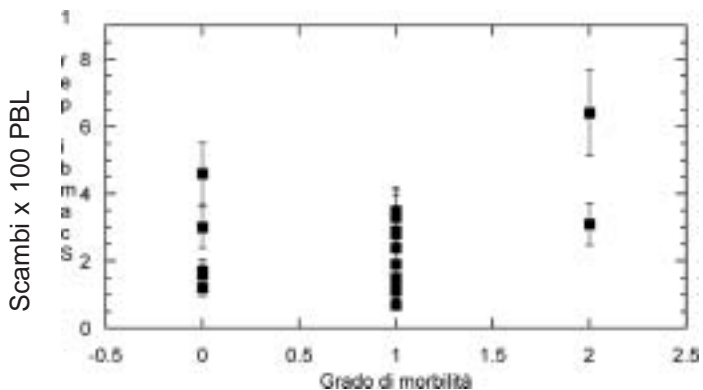


Fig. 2. Scambi nei cromosomi 2 e 4 in funzione del grado di morbidità valutato alla fine del trattamento.

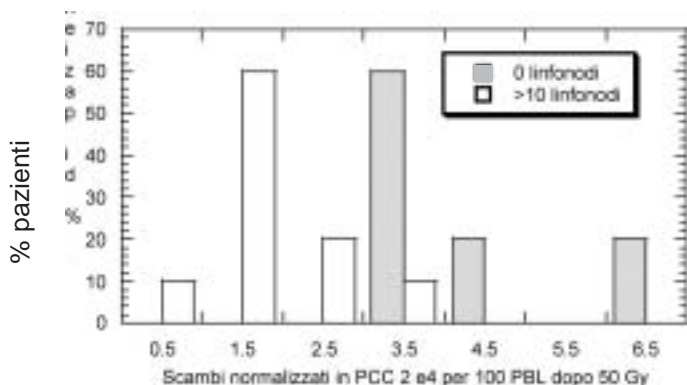


Fig. 3. Distribuzione in frequenza di scambi normalizzati nei cromosomi 2 e 4, alla fine del trattamento, nelle pazienti con 0 (n=5) e > 10 (n=10) linfonodi rimossi.

ta verso valori più alti nel caso in cui erano presenti tutti i linfonodi. In particolare, la frequenza media per cellula degli scambi è risultata essere, dopo 50 Gy, $(4.2 \pm 0.6)10^{-2}$ per le pazienti senza linfonodi rimossi e $(1.8 \pm 0.2)10^{-2}$, per quelle che avevano avuto più di 10 linfonodi rimossi, mostrando una differenza statisticamente significativa.

Conclusioni

Un aumento significativo delle AC è stato osservato in seguito al trattamento, con una notevole variabilità individuale non dipendente per altro dalle dimensioni del campo di radiazione o dal trattamento chemioterapico.

La frequenza di scambi diminuisce in modo significativo col crescere del numero di linfonodi ascellari rimossi chirurgicamente prima del trattamento. Si può quindi affermare che il numero di linfonodi presenti nel campo di radiazione influenza il numero di AC nei linfociti del sangue periferico delle pazienti affette da carcinoma mammario. Ciò deve essere tenuto presente nel considerare le AC dei linfociti del sangue periferico come bio-indicatori del rischio di tumori secondari dovuti alla radioterapia.

Bibliografia

- 1) Bonassi S. et al., Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. *Cancer Res.* 2000;60:1619-1625.
- 2) Durante M. et al., Risk estimation based on chromosomal aberrations induced by radiation *Radiat. Res.* 2001;156:662-667.
- 3) Durante M. et al., A simple method for simultaneous interphase-metaphase analysis in biological dosimetry. *Int. J. Radiat. Biol.* 1998;74:457-462.

IL PROGETTO DI RADIOPROTEZIONE CHERNOBYL: MONITORAGGIO DI BAMBINI RESIDENTI IN REGIONI DELLA EX U.R.S.S.

R. De Vita, P. Eleuteri, M.G. Grollino, S. Bazzarri, G. Tarroni, D. Tirindelli Danesi

Sezione Tossicologia e Scienze Biomediche, ENEA Centro Ricerche Casaccia, Roma

Nell'ambito di un'iniziativa umanitaria, coordinata dal Circolo S. Pietro di Roma, è stato condotto uno studio per valutare i livelli di radiocontaminazione interna ed i possibili effetti indotti in bambini residenti in regioni interessate dall'incidente di Chernobyl.

E' ben noto che l'incidente ha indotto il rilascio di radioisotopi importanti dal punto di vista radiotossicologico e tra questi il rilascio di radioisotopi del Cesio. Le condizioni meteorologiche hanno determinato una distribuzione eterogenea in una area molto vasta che comprende la Bielorussia, l'Ucraina e la Russia. La contaminazione del terreno ha determinato anche un trasferimento dei radioisotopi nella catena alimentare. Questa condizione determina la necessità di monitorare i livelli di contaminazione interna delle popolazioni che vivono in queste regioni, con particolare attenzione ai bambini che possono rivelarsi come gruppo a rischio più elevato.

Sono stati valutati gruppi rappresentativi di una popolazione di circa 500.000 bambini residenti nelle aree contaminate, durante un periodo di permanenza di 1-2 mesi in Italia per scopi umanitari. Il gruppo è risultato costituito da bambini provenienti prevalentemente da regioni delle Bielorussia con un "range" di età compreso tra 6 e 15 anni, e suddivisi per il 47% maschi e 53% femmine.

L'obiettivo dello studio è stato quello di monitorare i livelli di contaminazione interna da radioisotopi gamma emettitori e metterli in relazione ai parametri biomedici per valutare l'utilità di un uso integrato di diversi parametri per una possibile individuazione di eventi subclinici indotti dall'esposizione cronica alla radiocontaminazione presente nelle regioni di residenza.

Il monitoraggio radiotossicologico comprendeva la misura mediante "Whole Body Counter" (WBC) e la misura mediante spettrometria gamma delle urine raccolte per 24 ore in diversi momenti rispetto alla data di arrivo in Italia. Le misure con il WBC sono state effettuate presso i Centri ENEA di Roma - Casaccia e Bologna con un sistema caratterizzato da una soglia di sensibilità di 30 Bq. Il sistema di misura della contaminazione delle urine, mediante la spettrometria gamma, ha utilizzato un rivelatore coassiale al GeLi interfacciato con un PC con uno specifico software e con una soglia di sensibilità di 1Bq.

Entrambi gli approcci metodologici hanno evidenziato una contaminazione da radioisotopi del Cesio con valori molto eterogenei in un "range" compreso tra 100 e 32.000 Bq (tab. 1) mediante WBC e tra 1 e 287 Bq/lit mediante spettrometria gamma (tab. 2).

I nostri risultati hanno evidenziato una ottima correlazione tra i livelli di contaminazione osservati mediante WBC e quelli ottenuti mediante spettrometria gamma nelle urine, con un rapporto WBC/urine specifico per il "range" di

Tab 1. – WBC (Log Bq) Misure nei Gruppi Esposti

	Gruppo A (Bielorussia)		Gruppo B (Ucraina)		Gruppo C (Federazione Russa)	
	n	%	n	%	n	%
WBC (Bq)						
< 500	223	76.9	69	94.5	47	79.7
500-1,000	26	9.0	3	4.1	7	11.9
> 1,000	41	14.1	1	1.4	5	8.5
totale	290		73		59	
<i>GM ± SD (Log Bq)</i>	214.2 ± 1.55		85.6±1.67		268.5±0.78	
<i>Range (Bq)</i>	30-32,343		30-1,721		73-2,565	

WBC = Whole Body Counter, SD = deviazione standard, GM = media geometrica

Tab 2. - Log Bq⁻¹ Valori di ¹³⁷Cs nelle Urine in Gruppi Esposti

	Gruppo A (Bielorussia)		Gruppo C (Federazione Russa)	
	n	%	n	%
¹³⁷ Cs (Bq ⁻¹)				
< 3	90	47.9	12	33.3
3-20	72	38.3	21	58.3
> 20	26	13.8	3	8.3
totale n	188		36	
<i>GM ± SD (Log Bq⁻¹)</i>	4.29 ± 1.44		4.1 ± 2.32	
<i>Range (Bq⁻¹)</i>	1.0-287		1.0-0.84	
	GM = media geometrica, SD = deviazione standard			

età dei bambini esaminati. Gli stessi risultati possono essere ricondotti con un buon accordo ad una curva di epurazione biologica dei radioisotopi del Cesio di tipo bifasico (ICRP) che comprende una prima fase di epurazione “rapida” della durata di circa 10 giorni ed una seconda fase di epurazione “lenta” della durata di diversi mesi.

L’insieme dei dati suggerisce l’esistenza di una contaminazione cronica di origine alimentare. All’equilibrio i livelli di contaminazione interna sono molto eterogenei e riferibili ai livelli di contaminazione del terreno delle regioni di residenza ed alle abitudini alimentari.

La valutazione clinico-pediatrica ha evidenziato una popolazione sostanzialmente omogenea per le condizioni generali e per lo stato di salute rivelatesi soddisfacenti.

L’analisi dei dati biochimici, ematologici ed immunologici non ha evidenziato specifiche condizioni patologiche anche se è stato osservato un incremento del valore dei linfociti in circa il 30% dei bambini esaminati, caratterizzati anche da un rapporto CD4/CD8 inferiore ai limiti della norma nel gruppo di bambini più esposti.

E’ ben noto che le radiazioni ionizzanti possono indurre due tipi di aberrazioni cromosomiche: le aberrazioni instabili (dicentrici, frammenti acentrici, cromosomi ad anello) e aberrazioni stabili (traslocazioni reciproche o di altro tipo). Con l’obiettivo di monitorare possibili effetti a livello citogenetico sono state condotte indagini su linfociti di soggetti selezionati sulla base dei livelli di contaminazione individuale e ambientale. La coltura è stata effettuata secondo il protocollo standard per 48 ore e sono state studiate almeno 500 metafasi per ogni soggetto.

Sono state evidenziate aberrazioni cromosomiche totali (acentrici, dicentrici e traslocazioni), a bassa frequenza ma con valori significativi in alcuni casi rispetto a quelli di un gruppo di controllo. In particolare, la frequenza di frammenti acentrici era significativamente più elevata, rispetto al gruppo di controllo, in gruppi di bambini con elevati livelli di contaminazione interna.

Sono state osservate frequenze più elevate di acentrici e traslocazioni rispetto a quelle dei dicentrici. La frequenza dei dicentrici è più alta dopo il primo periodo dall’esposizione e diminuisce con il tempo, mentre le aberrazioni stabili persistono per un lungo periodo.

In conclusione il nostro studio ha dimostrato l’utilità di un uso integrato dei diversi approcci di studio con l’obiettivo di evidenziare modificazioni subcliniche dei diversi parametri biologici utilizzati.

Bibliografia

- 1) UNSCEAR. Sources, Effects and Risks of Ionizing Radiation. New York: United Nations, 1988.
 - 2) ICRP. Limits for intakes of radionuclides by workers. Publ. no. 30, Part 1. Oxford, U. K.: Pergamon Press, 1989; 2: 3-4.
 - 3) Natarajan AT, Rohini CV, Wiegant J, et al. A cytogenetics follow-up study of the victims of radiation accident in Goinia (Brazil). Mutat Res 1991; 247:103-11.
 - 4) Bard D, Verger P, Hubert P. Chernobyl, 10 years after: health consequences. Epidemiol Rev 1997; 19/187-204.
- *Il Programma Chernobyl è stato realizzato con il supporto e la collaborazione del Circolo S. Pietro di Roma.

EFFETTI SUL DIFFERENZIAMENTO CELLULARE IN UNA LINEA CELLULARE DI NEUROBLASTOMA ESPOSTA A CAMPI ELETTROMAGNETICI ASSOCIATI ALLA TELEFONIA MOBILE (900 MHz)

Cristina Laconi, Lucia Mosiello, Maria Celeste Pirozzoli, Anna Negroni, Rosanna Pinto, Alfonso Giorgio Lovisolo, Carmela Marino

Sezione di Tossicologia e Scienze Biomediche, ENEA Casaccia, Roma
 e-mail: cristiana.laconi@tiscalinet.it

Obiettivo del presente lavoro è stato quello di investigare i possibili effetti dei segnali di radiofrequenza (telefonia mobile - 900 MHz) sul differenziamento di cellule neurali. Il sistema biologico utilizzato è una linea di neuroblastoma umano LAN-5, che deriva da uno dei più frequenti tumori solidi infantili. Le cellule LAN-5 sono frequentemente utilizzate come modello di cellule neurali, poiché rispondono ad una serie di stimoli esterni quali fattori di crescita, neurotrofine, induttori tumorali, attivando specifici pathways intracellulari che possono indurre cambiamenti nella proliferazione e nel differenziamento [1]. Inoltre, nel caso specifico dello studio degli effetti dei campi elettromagnetici su sistemi cellulari neurali, abbiamo precedentemente utilizzato la linea LAN-5 per caratterizzare alcuni effetti dei campi elettromagnetici a bassa frequenza ELF [2].

Nel presente lavoro le risposte cellulari derivanti dall'esposizione ai campi elettromagnetici (EM) sono state analizzate osservando il possibile effetto sul processo di differenziamento cellulare, dal momento che tale processo e, ovviamente i fenomeni correlati alla sua regolazione, sembrano svolgere un ruolo essenziale negli eventi di carcinogenesi [3]. In particolare abbiamo cercato di valutare e caratterizzare gli eventuali effetti dei campi EM sull'emissione di neuriti e sull'espressione di alcuni marker molecolari (come le proteine costitutive del citoscheletro o dei neurofilamenti).

Metodi e Procedure

Le cellule LAN-5, sono state scongelate dall'azoto liquido (-198°C), seminate in piastre Petri per colture cellulari di 3,5 cm di diametro e poste in incubatore a 37°C e 5% di CO₂, utilizzando come terreno di crescita RPMI 1640 (GIBCO-BRL) complementato dall'aggiunta di 10% di siero fetale bovino (GIBCO-BRL), di L-glutamina (GIBCO-BRL) e di una soluzione di antibiotici e antimicotici (penicillina/streptomicina/fungizone). Al mezzo di coltura è stato inoltre aggiunto 5 mM di acido retinoico per indurre il differenziamento. In fig.1 è riportato l'aspet-

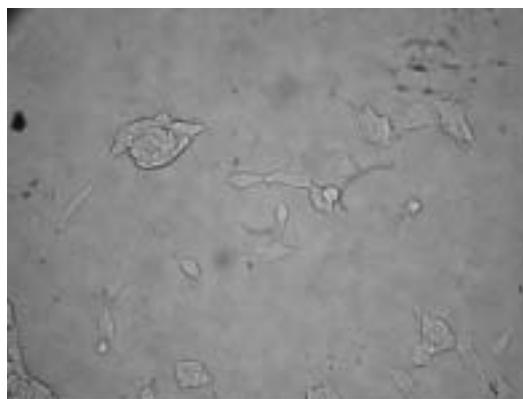


Fig. 1 - inizio di differenziamento in cellule LAN-5.

Sistema espositivo per cellule in vitro

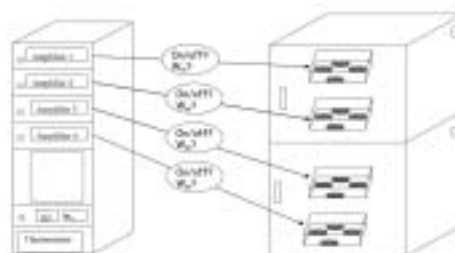


Fig. 2 - schema del sistema espositivo a RF per colture *in vitro*.

to morfologico delle cellule LAN-5 indotto al differenziamento da acido retinoico.

Dopo 24 ore dall'aggiunta di acido retinoico i campioni (400.000 cellule/piastra petri) sono stati trasferiti nel sistema espositivo ed esposti ad un campo elettromagnetico di 900 MHz e SAR pari a 1 W/Kg. Le cellule sham-esposte sono state incubate nelle stesse condizioni, ma in assenza di campo elettromagnetico.

La sorgente a radiofrequenza studiata per gli esperimenti *in vitro* è la Wire Patch Cell (WPC): costituita da due piatti metallici cortocircuitati agli angoli da quattro cilindri di metallo. Le piccole dimensioni di questo dispositivo (15x15x3 cm a 900 MHz) permettono di posizionarla all'interno di un incubatore standard. In condizioni operative, la WPC viene utilizzata circondata di pannelli assorbenti alle radiofrequenze e inserita all'interno di una gabbia metallica al fine di simulare le condizioni di campo aperto e di evitare problemi di compatibilità elettromagnetica con i dispositivi elettronici di controllo dell'incubatore. Le WPC permettono al loro interno il posizionamento di quattro o otto piastre di Petri (f = 3,5cm) alle stesse condizioni di esposizione.

Il sistema espositivo WPC è schematicamente illustrato in fig.2.

I campioni esposti e i campioni *sham* sono stati raccolti dopo 24 e 48 ore ed analizzati per l'espressione di una proteina costitutiva dei neurofilamenti (della grandezza molecolare di 145 kDa) tramite analisi molecolare del Western Blot, utilizzando il sistema MiniProtean II della Biorad per la preparazione di un gel SDS-PAGE, sul quale le proteine estratte dai vari campioni sono state separate per elettroforesi; le proteine sono state successivamente trasferite su membrana ed ibridate con un anticorpo policlonale specifico per la proteina dei neurofilamenti; il sistema di determinazione utilizzato per la rilevazione del binding specifico è stato il sistema ECL, che utilizza un anticorpo secondario marcato con perossidasi in associazione ad un co-substrato chemiluminescente; per ogni esperimento di western blot è stato condotto anche un esperimento di controllo della quantità di proteine effettivamente presenti sulla membrana, mediante l'ibridazione della stessa con un anticorpo anti-actina. Infine le lastre autoradiografiche ottenute sono state caratterizzate utilizzando il densitometro GS-700 della Biorad, in modo da ottenere per ogni banda visibile nella lastra autoradiografica un valore numerico di Densità Ottica.

Risultati

Le fig.3 mostra il pattern di espressione della proteina marker del differenziamento (una proteina costitutiva dei neurofilamenti 145 kDa) in cellule LAN-5 esposte alla frequenza di 900 MHz, SAR pari a 1 W/Kg e sham dopo 24 e 48 ore, sia così come appare nella lastra autoradiografica, mentre la fig. 4 riporta un grafico delle O.D. ottenute dopo caratterizzazione densitometrica, nel quale è stato possibile confrontare i valori ottenuti nei campioni esposti a quelli dei campioni sham e valutare se vi erano differenze significative.



Figura 3 - Espressione della proteina costitutiva dei neurofilamenti in cellule LAN-5 sham ed esposte dopo 24 e 48 ore; espressione della beta-actina usata come controllo – western blot.

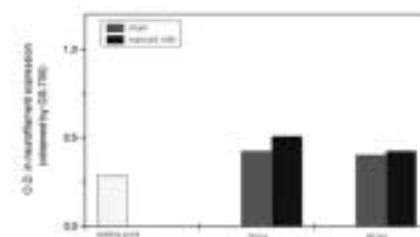


Figura 4 - valori di densità ottica delle bande ottenute nel western blot per l'espressione di una proteina dei neurofilamenti.

Conclusioni

Dai risultati ottenuti non si osservano differenze significative sull'espressione dei neurofilamenti tra cellule sham e cellule di neuroblastoma umano esposte a 900 MHz e SAR pari a 1 W/Kg dopo 24 e 48 ore.

Il presente lavoro è stato parzialmente finanziato dal EU VFQ "Quality of Life and Management of Living Resources" RAMP2001 Project QLRT-2001-00463 "RISK ASSESSMENT FOR EXPOSURE OF NERVOUS SYSTEM CELLS TO MOBILE TELEPHONE EMF: FROM *IN VITRO* TO *IN VIVO* STUDIES"

Bibliografia

- 1) Hill D and Robertson KA, Characterization of the cholinergic neuronal differentiation of the human neuroblastoma cell line LAN-5 after treatment with retinoic acid, *Developmental brain research* (1997), 102: 53-67.
- 2) Pirozzoli MC, Marino C, Lovisolo AG, Laconi C, Mosiello L, Negroni A, Effects of 50 Hz electromagnetic field exposure on apoptosis and differentiation in a neuroblastoma cell line, *Bioelectromagnetics* (2003) 24: 510-516.
- 3) Von Wangenheim KH and Peterson HP, Control of cell proliferation by progress in differentiation: clues to mechanisms of aging, cancer causation and therapy, *J.Theor. Biol.* (1998) 193: 663-678.

RADIAZIONI E STUDI CLINICI: PROBLEMI ETICI

Laura Guidoni, Giustina Simone, Carlo Petrini, Flavia Barone,
Milena Mazzei, Annarita Meneguz

Istituto Superiore di Sanità, Roma,
e-mail: guidoni@iss.it

L'evoluzione delle conoscenze scientifiche e dei metodi della medicina e della ricerca biomedica ha reso necessario identificare dei principi generali di tutela per gli individui coinvolti, principi che sono codificati nella cosiddetta Dichiarazione di Helsinki. Tale documento, concordato per la prima volta nell'ambito della World Medical Association (WMA) nel 1964 ad Helsinki, viene periodicamente aggiornato (1) per adeguarlo agli sviluppi della conoscenza e alle nuove situazioni ed emergenze di salute che si vengono a creare nel panorama mondiale.

Questo codice, condiviso a livello mondiale, identifica gli strumenti di tutela per tenere in debito conto il diritto all'autonomia del paziente sulla base dei tre imperativi etici del rispetto, del beneficio e della giustizia. Gli strumenti di tutela trovano una fondamentale garanzia in organismi indipendenti dallo sperimentatore quali i Comitati di revisione dell'Istituzione (IRB) o i Comitati etici indipendenti (EC).

Più recentemente, la necessità di predisporre tutele per gli individui coinvolti nella ricerca biomedica ha dato luogo ad altri codici e linee guida, sia a livello internazionale (2) che a livello europeo, nella cosiddetta Convenzione di Oviedo recepita dal nostro Paese (3).

Nel campo della sperimentazione dei medicinali sono state definite in dettaglio le modalità con cui gli studi devono venire svolti con l'identificazione di una serie di principi e di regole, sostanzialmente analoghe in vari Paesi. In Europa, USA, Canada e Giappone. queste regole vengono definite come norme di Buona Pratica Clinica (GCP) e costituiscono uno standard internazionale di etica e qualità scientifica in relazione alla progettazione e alla conduzione di studi clinici che coinvolgono le persone. L'aderenza a questi standard ha lo scopo di tutelare i diritti, la sicurezza ed il benessere dei soggetti partecipanti, conformemente ai principi della Dichiarazione di Helsinki nella sua forma più aggiornata. La conformità nelle modalità di stesura e valutazione delle ricerche e dei protocolli ha anche il vantaggio di rendere ugualmente attendibili i dati relativi a studi condotti in tempi e luoghi diversi. Ciò permette di accelerare le procedure di riconoscimento delle modalità terapeutiche nei vari Paesi e di non duplicare gli studi, raggiungendo quindi un ulteriore vantaggio sotto il profilo etico. Gli studi clinici, d'altra parte, costituiscono uno strumento indispensabile per l'avanzamento della medicina, in relazione alle applicazioni delle scoperte nella ricerca biomedica e farmacologica e al controllo delle malattie. Prima di introdurre una strategia terapeutica, o meglio, prima di introdurre un medicinale nella normale pratica clinica, devono venire condotti studi preclinici, e solo successivamente studi sull'uomo per verificare la sicurezza e la tossicità (Fase I), l'attività farmacologica e l'efficacia (Fase II e III). Infine vengono condotti studi più estesi di fase IV per verificare l'efficacia ed eventualmente la presenza di reazioni indesiderate su un numero più alto di pazienti. Ognuna di queste fasi è strettamente codificata. La normativa italiana regola la sperimentazione clinica dei medicinali con una serie di decreti in veloce evoluzione, che identificano in modo puntuale le procedure e i processi autorizzativi. In particolare, salvo che per alcune tipologie di medicinali, il compito di valutare i protocolli sperimentali, di verificare la presenza di tutti gli aspetti delle tutele e di rilasciare l'autorizzazione alla sperimentazione è affidato ai Comitati etici locali, istituiti contestualmente al recepimento delle GCP con il Decreto Ministeriale del 1997 (4). E' rilevante il fatto che, oltre al gran numero di norme emanate dal 1997 ad oggi, il 1 gennaio 04 entrerà in vigore un nuovo Decreto sulla sperimentazione (5), che recepisce una recente Direttiva europea.

Anche per quanto riguarda la sperimentazione clinica che utilizza le radiazioni ionizzanti in questi ultimi anni vi sono state importanti novità. Le disposizioni di legge, e le relative tutele per le persone coinvolte nelle sperimentazioni, sono state modificate in modo sostanziale con il recepimento della Direttiva europea 97/43/ Euratom interamente dedicata alla radioprotezione del paziente (6). Il D. L.vo 26/5/2000, n. 187 (7), che la recepisce, si ricollega ai Decreti emanati per la sperimentazione clinica. In particolare si fa riferimento alla valutazione dei protocolli sperimentali da parte dei Comitati etici, sui quali viene a gravare tutto il peso dell'armonizzazione fra i principi etici, la normativa relativa alla sperimentazione dei medicinali e i principi di radioprotezione

Da poco più di un anno, inoltre, è stata emanata la legge n. 39 del 1/3/2002 (8), recante le disposizioni per l'adempimento di obblighi derivanti dall'appartenenza dell'Italia alle Comunità europee, che ha apportato alcune importanti modifiche al DL n. 187 e all'altro fondamento normativo della radioprotezione, il D.L.vo 17/3/1995, n.230 (9). Le modifiche apportate sono cambiamenti rilevanti che inevitabilmente dovranno essere oggetto di ulteriori chiarimenti. In particolare è importante segnalare che, a fronte di uno snellimento nelle procedure autorizzative che attribuisce ai soli comitati etici locali il compito di esaminare ed esprimere un parere sui progetti, si pone il problema di garantire la presenza delle giuste competenze, all'interno dei comitati stessi, in particolare per quanto riguarda

gli aspetti di radioprotezione.

Per le esposizioni mediche valgono i principi fondamentali della radioprotezione, stabiliti dalla Pubblicazione n. 60 dell'ICRP (International Commission on Radiological Protection) (10), che regolano l'esposizione delle persone alle radiazioni ionizzanti, e cioè a) il principio di giustificazione: l'impiego delle radiazioni ionizzanti deve produrre un beneficio sufficiente, agli individui esposti o alla società, tale da bilanciare il detrimento radiologico che provoca; b) il principio di ottimizzazione: l'esposizione ad una certa sorgente deve essere mantenuta tanto bassa quanto ragionevolmente ottenibile (riguarda le strutture, le apparecchiature, le procedure e le installazioni protezionistiche); c) il principio dei limiti di dose: le dosi devono essere le più basse possibili. Tale principio non può essere applicato tal quale nel caso delle esposizioni mediche poiché è evidente che detrimento e beneficio riguardano lo stesso soggetto. In questo tipo di esposizioni si parla quindi di vincoli di dose, cioè di una restrizione per le dosi individuali possibili che derivano da una determinata sorgente, cui attenersi nella fase di pianificazione della radioprotezione, tutte le volte in cui entri in gioco il principio di ottimizzazione.

Devono essere tenuti presente anche i principi esposti nella Radiation Protection 99- Guidance on medical exposure in medical and biomedical research che costituisce la linea guida della Commissione europea (11)

Nella sperimentazione clinica con radiazioni ionizzanti dovrà dunque essere trovato il giusto raccordo fra i principi di radioprotezione e i principi di tutela sotto il profilo etico. Questo raccordo non è tuttavia facile, come non è facile l'applicazione della normativa sulle sperimentazioni cliniche. Si è perciò formato presso l'ISS un gruppo di studio che con un approccio multidisciplinare è finalizzato all'approfondimento di queste tematiche, tenendo conto della normativa radioprotezionistica e delle linee guida esistenti a livello nazionale ed internazionale nel campo della sperimentazione clinica. Il gruppo ha raccolto la normativa e la documentazione e ne ha approfondito gli aspetti procedurali e normativi.

Nell'ambito delle attività del gruppo di studio, di cui fanno parte gli autori della presente nota, è stato organizzato nel 2002 un convegno per individuare le problematiche e gli aspetti specifici e per fornire uno spazio di dibattito circa la sperimentazione clinica che fa uso di radiazioni ionizzanti, privilegiando il tema del rapporto fra i Comitati etici e le figure professionali coinvolte nelle sperimentazioni. E' inoltre in corso di stesura un documento, che sarà pubblicato come Rapporto ISTISAN, per costituire una base informativa aggiornata sulla normativa esistente.

Infine è stato formato un ulteriore gruppo di lavoro, all'interno di un Progetto più vasto finanziato dal Ministero della salute, finalizzato all'analisi delle problematiche etiche sollevate dai protocolli sperimentali che utilizzano la radioterapia, anche in relazione al ruolo dei Comitati etici alla luce della più recente normativa, e con lo scopo di identificare strumenti utili a garantire l'omogeneità delle procedure. Partecipano a questo Gruppo radioterapisti oncologici, fisici medici, tecnici di radiologia e psicologi, con l'obiettivo di promuovere il dibattito tra Centri di radioterapia, con il contributo auspicabile dei membri dei Comitati etici. In particolare saranno discussi la correttezza dei protocolli, sia monocentrici che multicentrici, l'adesione alle linee guida delle Associazioni Professionali e dell'Istituto Superiore di Sanità, l'adesione a programmi di assicurazione di qualità, la tutela del paziente, anche nei riguardi di effetti indesiderati specificamente prodotti dal trattamento con radiazioni.

Bibliografia

- 1) World Medical Association Declaration of Helsinki. Medical Principles for Medical Research Involving Human Subjects - Adopted by the 18th WMA General Assembly, Helsinki, Finland, 1964, and amendments - Disponibile all'indirizzo www.wma.net
- 2) International Ethical Guidelines for Biomedical Research Involving Human Subjects - Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS) in collaboration with the World Health Organization (WHO) Geneva 2002 - Disponibili all'indirizzo www.cioms.ch
- 3) Legge 28 marzo 2001, n. 145. Ratifica ed esecuzione della Convenzione del Consiglio d'Europa per la protezione dei diritti dell'uomo e della dignità dell'essere umano riguardo all'applicazione della biologia e della medicina: Convenzione sui diritti dell'uomo e sulla biomedicina nonché del Protocollo addizionale n. 168, 12 gennaio 1998 sul divieto di clonazione di esseri umani. Gazzetta ufficiale n. 95, 24 aprile 2001.
- 4) Decreto del Ministro della Sanità 15 luglio 1997, Supplemento Ordinario n. 162. Recepimento delle linee guida dell'U.E. di Buona Pratica Clinica per la esecuzione delle sperimentazioni cliniche dei medicinali, Gazzetta ufficiale n. 191, 18 agosto 1997.
- 5) Decreto legislativo 24 giugno 2003, n. 211. Attuazione della direttiva 2001/20/CE relativa all'applicazione della buona pratica clinica nell'esecuzione delle sperimentazioni cliniche di medicinali per uso clinico. Gazzetta ufficiale n. 184, 9 agosto 2003 - Suppl. Ordinario n. 130.
- 6) Direttiva 97/43/Euratom del Consiglio del 30 giugno 1997 riguardante la protezione sanitaria delle persone contro i pericoli delle radiazioni ionizzanti connesse a esposizioni mediche e che abroga la direttiva 84/466/Euratom -Gazzetta ufficiale n. L 180 del 09/07/1997 pag. 2 -27
- 7) Decr. L.vo 26 maggio 2000, n. 187 Attuazione della direttiva 97/43/ EURATOM in materia di protezione sanitaria delle persone contro i pericoli delle radiazioni ionizzanti connesse ad esposizioni mediche. Gazzetta Ufficiale n. 157 del 7.7.2000
- 8) Legge 1° marzo 2002, n. 39. Disposizioni per l'adempimento di obblighi derivanti dall'appartenenza dell'Italia alle Comunità europee- Legge comunitaria 2001. Gazzetta Ufficiale n. 72 del 26.3.2002
- 9) Decreto Legislativo 17 marzo 1995, n. 230. Attuazione delle direttive Euratom 80/836, 84/467, 84/466, 89/618, 90/641 e 92/3 in materia di radiazioni ionizzanti. Gazzetta Ufficiale n. 74 del 13.6.95
- 10) ICRP Publication n.60: Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. Annals of the ICRP Vol. 21/1-3, 1991
- 11) EUROPEAN COMMISSION. Radiation Protection 99- Guidance on medical exposure in medical and biomedical research. 2000.

STATO ATTUALE DELLE CONOSCENZE SUGLI EFFETTI BIOLOGICI E SANITARI DEI CAMPI ELETTROMAGNETICI

Martino Grandolfo

Laboratorio di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità, Roma

e-mail: martino@iss.it

Lo studio delle interazioni tra biosistemi e campi elettromagnetici è usualmente diversificato, seguendo lo spettro elettromagnetico, nei campi statici, i campi a frequenze estremamente basse e i campi a radiofrequenza e a microonde. Gli effetti cosiddetti acuti non riguardano livelli d'esposizione normalmente presenti nell'ambiente, mentre oggetto di forte preoccupazione e, in molti casi, anche di una distorta percezione del livello di rischio, sono i cosiddetti effetti a lungo termine, meno noti, eventualmente legati ad esposizioni ad intensità basse ma prolungate nel tempo. Le indagini epidemiologiche costituiscono, per questo secondo tipo di effetti, uno dei principali strumenti d'indagine poiché, a differenza degli studi di laboratorio, su cellule o su animali, questo tipo di ricerche consente di osservare direttamente le risposte degli individui, in condizioni reali, senza i problemi e le incertezze che sorgono quando si trasferiscono i dati da una specie all'altra, o da un sistema semplificato (come una coltura cellulare) all'organismo intero.

Mentre le numerose ricerche sperimentali sono da considerarsi nel complesso negative, sia per i campi a radiofrequenza e microonde che per i campi elettrici e magnetici ELF, le uniche associazioni di una certa consistenza (ma nessuna relazione causa-effetto) sono quelle tra un aumentato rischio di leucemie infantili ed esposizioni residenziali a livelli d'induzione magnetica a 50/60 Hz superiori a 0.4 mT (Marino et al. 2002).

Nel corso degli ultimi anni sono state, infatti, pubblicate diverse rassegne degli studi epidemiologici relativi alla leucemia infantile in relazione alle esposizioni ai campi magnetici alla frequenza di rete, in alcune delle quali sono state effettuate delle meta-analisi che sono, prima di tutto, utili strumenti per verificare il grado d'omogeneità delle evidenze provenienti dai differenti studi e, se tale omogeneità è accettabile, per stimare un rischio relativo combinato che superi i problemi collegati alla variabilità casuale dei singoli studi originali. Sono state effettuate anche due analisi *pooled*, cioè utilizzando direttamente i dati originali dei singoli studi e non quelli pubblicati, per la cui descrizione si rimanda a Lagorio e Salvan (2001).

In relazione ai possibili effetti a lungo termine associati all'esposizione a campi ELF, il contributo conoscitivo più ampio è stato quello fornito dal National Institute for Environmental Health Sciences (NIEHS) degli USA (Portier e Wolfe 1998), che ha effettuato una valutazione di tali evidenze utilizzando i criteri da tempo seguiti dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) di Lione. Seguendo tale approccio il NIEHS ha riscontrato un'evidenza limitata di cancerogenicità per la leucemia infantile in relazione all'esposizione residenziale a campi ELF e per la leucemia linfatica cronica in relazione alle esposizioni professionali. Per la maggior parte delle altre associazioni menzionate dalla letteratura, l'evidenza è risultata inadeguata. Sulla base di queste valutazioni il NIEHS ha giudicato i campi ELF come *possibili cancerogeni* (Gruppo 2B).

Anche nell'ambito del Progetto Internazionale "Campi Elettromagnetici", coordinato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), è stata effettuata una valutazione degli effetti dei campi elettrici e magnetici statici ed a frequenze estremamente basse. Più esattamente, l'analisi degli effetti cancerogeni è stata effettuata congiuntamente dall'OMS e dalla IARC che, nel 2002, ha pubblicato la sua monografia sulla valutazione dei rischi cancerogeni per l'uomo in relazione ai campi sopra menzionati. In particolare la IARC ha incluso nel Gruppo 3 della sua classificazione (agenti non classificabili) i campi statici e il campo elettrico ELF, mentre ha anch'essa incluso nel gruppo 2B i campi magnetici ELF (IARC 2002). Un precedente rapporto dell'Istituto Superiore di Sanità (Comba et al. 1995) aveva ugualmente formulato una valutazione di "evidenza limitata di cancerogenicità" per gli studi epidemiologici, suggerendo tuttavia che questo portasse ad una valutazione complessiva di *probabile cancerogeno* (Gruppo 2A).

Lo studio italiano che potrà fornire un contributo significativo al dibattito internazionale è il progetto SETIL, uno studio caso-controllo multicentrico con base di popolazione, relativo ai fattori di rischio di leucemie, linfomi non Hodgkin e neuroblastomi (Magnani et al. 1999).

Sulla base dei risultati di alcune delle meta-analisi precedentemente descritte, sono state effettuate in passato valutazioni di rischio relative alla realtà italiana consistenti in stime di rischio collettivo, in termini di casi annuali di leucemia infantile attribuibili alle linee ad alta tensione. Un tentativo in tal senso è stato effettuato da Polichetti (2000) utilizzando i risultati della meta-analisi di Lagorio et al. (1998) e alcune assunzioni sulla relazione dose-risposta, che ha così valutato un rischio annuale aggiuntivo di morte per leucemia infantile pari a $1.5 \cdot 10^{-5}$ per ogni microtesla d'esposizione.

I risultati della letteratura pertinente agli effetti a lungo termine dei campi a radiofrequenza e microonde sono stati raccolti e analizzati in ampi articoli di rassegna (Elwood 1999, Moulder et al. 1999, Marino et al. 2002). La possibilità di un aumento di neoplasie tra le persone esposte a campi elettromagnetici RF/MO è stata indicata da alcuni

studi su esposti per motivi lavorativi, mentre altre indagini simili hanno fornito risultati opposti. Mancano ancora, anche a causa della grande disomogeneità tra i diversi studi, meta-analisi su questo argomento. Un rilevante problema nella valutazione complessiva dei dati in letteratura viene dal fatto che nessuno di questi studi fornisce adeguate indicazioni quantitative sull'intensità delle esposizioni. In Italia uno studio è stato svolto dall'Agenzia di Sanità Pubblica (ASP) del Lazio in relazione all'incidenza della leucemia infantile in prossimità del Centro trasmittente di Santa Maria di Galeria (Roma) della Radio Vaticana (Michelozzi et al. 2001). I risultati dello studio mostrano una correlazione fra incidenza della leucemia infantile e distanza delle abitazioni dal centro trasmittente della Radio Vaticana ma, come chiarito dagli stessi autori, la loro indagine "documenta un eccesso di leucemia ed un decremento del rischio a distanza crescente dall'impianto"..... "pur non potendo inferire un nesso eziologico tra emissione di radiofrequenze dalla stazione della Radio Vaticana e rischio di leucemia infantile". Allo stato delle conoscenze attuali non è, quindi, possibile affermare l'esistenza di alcun nesso causale fra esposizione a campi elettromagnetici a radiofrequenza e casi di leucemia.

Non molto differente è la situazione relativa ad altri effetti a lungo termine. Alcuni studi suggeriscono possibili effetti, per esempio a carico della funzione cardiovascolare, quali modeste variazioni della frequenza cardiaca e della pressione arteriosa, mentre a carico del sistema nervoso centrale sono state rilevate modificazioni dell'attività EEG o disturbi del sonno; tali osservazioni sono in attesa di adeguate conferme e, comunque, il loro preciso significato clinico è certamente ancora da definire.

Per quanto riguarda gli studi epidemiologici relativi agli utilizzatori di telefoni cellulari, è utile menzionare quanto segue, anche se si rinvia al recente contributo di Lagorio et al. (2001) per una trattazione più puntuale. Nel 1996 è stata pubblicata un'analisi della mortalità di una coorte di circa 256000 titolari di contratto d'utenza con un operatore di rete di telefonia mobile negli USA. Nell'analisi della mortalità per tutte le cause, i tassi di mortalità specifici per età sono risultati inferiori a quelli della popolazione generale e non sono emerse differenze tra i tassi osservati nel gruppo di utilizzatori di telefoni cellulari portatili e quelli relativi agli utenti di telefoni cellulari da auto. In una pubblicazione successiva, gli stessi Autori hanno presentato un'estensione della coorte in cui la mortalità per tutti i tumori non risultava correlata all'intensità d'uso del cellulare ed il piccolo numero di decessi per tumori cerebrali e leucemie (6 e 15) non consentiva analisi robuste, dal punto di vista statistico. In definitiva, l'unica causa di morte per la quale si è osservato un incremento di rischio associato all'intensità d'uso del cellulare sono gli incidenti automobilistici.

Nel 2001 è stata pubblicata un'analisi sull'incidenza di tumori in una coorte di 420095 danesi utenti di servizi di telefonia mobile tra il 1982 ed il 1995 (Johansen et al. 2001). Su più di un milione di anni-persona di osservazione sono stati individuati 3391 casi di tumore, meno di quanto atteso sulla base dell'incidenza specifica per età nella popolazione generale. Non si sono osservati eccessi di rischio per le neoplasie d'interesse (tumori cerebrali e del sistema nervoso, delle ghiandole salivari e leucemie), né variazioni del rischio per questi tumori in relazione alla durata dell'uso del telefono, al tempo trascorso dal primo contratto d'utenza, all'età al momento della sottoscrizione del primo contratto e al tipo di cellulare. Il periodo di latenza potrebbe però essere stato troppo breve per evidenziare un effetto su stadi precoci o un effetto sui tumori cerebrali a più lenta crescita.

Bibliografia

- 1) Comba P, Grandolfo M, Lagorio S, Polichetti A, Vecchia P. (1995). Rischio cancerogeno associato a campi magnetici a 50/60 Hz. Rapporto ISTISAN 95/29. Istituto Superiore di Sanità, Roma.
- 2) Elwood MJ. (1999). A critical review of epidemiological studies of radiofrequency exposure and human cancers. *Environmental Health Perspective* 107 (Suppl 1): 155-68.
- 3) IARC (2002). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Non-Ionizing Radiation, Part 1: Static and Extremely Low Frequency (ELF) Electric and Magnetic Fields, Vol. 80, 2002.
- 4) Johansen C, Boice JD, McLaughlin JK, Olsen JH. (2001). Cellular telephones and cancer – a nationwide cohort study in Denmark. *J Natl Cancer Inst* 93 (3): 203-207.
- 5) Lagorio S., Comba P., Iavarone I., Zapponi G.A. (1998). Tumori e malattie neurodegenerative in relazione all'esposizione a campi elettrici e magnetici a 50/60 Hz: rassegna degli studi epidemiologici. Rapporto ISTISAN 98/31. Istituto Superiore di Sanità, Roma.
- 6) Lagorio S e Salvan A. (2001). Leucemia infantile ed esposizione a campi magnetici a 50/60 Hz: una rassegna delle evidenze epidemiologiche al 2000. Rapporto ISTISAN, Roma.
- 7) Lagorio S, Ardoino L, D'Ippoliti D, Forastiere F, Galiè E, Iavarone I, Jandolo B, Martuzzi M, Polichetti A, Salvan A, Vecchia P e i partecipanti alla rete ospedaliera per il Progetto INTERPHONE in Italia (2001). Tumori del distretto cervico-encefalico e uso dei telefoni cellulari: uno studio epidemiologico internazionale. *Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità*, Vol. 14, n. 2.
- 8) Marino C., Galloni P., Gatta L., Scarfi M. R., Lovisolo G. A. (2002). Campi elettromagnetici: stato delle conoscenze per la valutazione della cancerogenità. *Energia, Ambiente e Innovazione* 3: 32-50.
- 9) Magnani C e il gruppo SETIL. (1999). Protocollo dello studio epidemiologico SETIL sull'eziologia dei tumori infantili (leucemie, linfomi non Hodgkin e neuroblastomi).
- 10) Michelozzi P., A. Capon, U. Kirchmayer, F. Forastiere, A. Biggeri, A. Barca, C. Perucci. (2002). Adult and Childhood Leukemia near a High-Power Radio Station in Rome, Italy. *Am. J. Epidemiol.* 12: 1096-1103.
- 11) Moulder JE, Erdreich LS, Malyapa RS, Merritt J, Pickard WF, Vijayalaxmi. (1999). Cell phones and cancer: what is the evidence for a connection? *Radiation Research* 151: 513-531.
- 12) Portier CJ e Wolfe MS (eds). (1998). Assessment of health effects from exposure to power-line frequency electric and magnetic fields. NIH Publication No. 98-3981. NIEHS, Research Triangle Park, NC.

INFLUENZA DELLA SCHERMATURA NELLA PRODUZIONE DI FRAMMENTI NEL DNA INDOTTA DA IONI FERRO IN CELLULE UMANE IN COLTURA

Francesca Antonelli, Mauro Belli, Valentina Dini, Giuseppe Esposito, Giustina Simone, Eugenio Sorrentino, Maria Antonella Tabocchini

Laboratorio di Fisica, Istituto Superiore di Sanità e INFN Gruppo Collegato Sanità, Roma
 e-mail: francesca.antonelli@iss.it

Oltre il campo magnetico terrestre, gli ioni pesanti ad alta energia (particelle HZE) costituiscono una parte rilevante della dose biologicamente significativa ricevuta dagli astronauti durante le missioni spaziali di lunga durata. E' quindi estremamente importante lo studio dell'efficacia biologica di questi ioni e dell'influenza di una eventuale schermatura.

Esperimenti volti allo studio dell'influenza di diversi tipi di schermature sugli effetti biologici di ioni ferro di diversa energia sono stati effettuati presso il Brookhaven National Laboratory (Upton, USA) dove è stato possibile utilizzare fasci di ioni ferro da 1 e 5 GeV/u. Le schermature utilizzate sono state piombo, alluminio e polimetilmetacrilato (PMMA) dello stesso spessore in g/cm².

Cellule AG1522 in fase di plateau sono state irradiate in plugs di agarosio e l'induzione di DSB è stata determinata mediante l'analisi dei frammenti di DNA separati mediante elettroforesi in campo pulsato (Belli *et al.*, 2001, 2002).

I risultati ottenuti fino ad ora mostrano che il numero di DSB aumenta in maniera lineare sia in funzione della dose sul campione che della fluenza, e che i due fasci non schermati hanno un'efficienza simile nell'intervallo 5.7-0.023 Mbp, mentre quando si considerano i frammenti di dimensioni comprese nell'intervallo 23-9 kbp, risulta più efficace il fascio di ferro da 1 GeV/u. Dopo il fascio di ioni ferro da 5 GeV/u la produzione di piccoli frammenti (23-9 kbp) è di circa il 10 % rispetto ai frammenti più grandi (5.7-0.023 Mbp) e questa percentuale non varia in presenza dei vari schermi. In generale, l'efficacia della radiazione nella produzione di frammenti in tutto l'intervallo di pesi molecolari studiato non varia in maniera significativa. Se il numero di DSB indotte viene valutato in funzione della fluenza, si ottiene un effetto protettivo in tutto l'intervallo di pesi molecolari considerato da parte di tutti gli schermi e quello di PMMA dà la maggiore protezione.

Energia (MeV/u)	Shielding	y _D (Gbp ⁻¹ ·Gy ⁻¹) (9 - 5700) kbp	R _D	y _F (Gbp ⁻¹ ·μm ²) (9 - 5700) kbp	R _F
1032		9.52 ± 0.87		226.4 ± 20.8	
	Pb	11.10 ± 1.09	1.17 ± 0.16	231.6 ± 22.7	1.02 ± 0.14
5000		10.02 ± 0.96		227.7 ± 21.7	
	PMMA	9.45 ± 0.90	0.94 ± 0.13	58.5 ± 5.6	0.26 ± 0.03
	Al	9.59 ± 1.07	0.96 ± 0.14	109.2 ± 12.2	0.48 ± 0.07
	Pb	9.10 ± 0.98	0.91 ± 0.14	185.1 ± 20.0	0.81 ± 0.13

yield y e fattori di protezione R ricavati dalle curve del numero di DSB in funzione della dose o della fluenza dove R = y(fascio schermato) / y(fascio non schermato)

Bibliografia

- 1) Belli *et al.*, *Adv. Space Res.* **27**, 393-399, 2001
- 2) Belli *et al.*, *Int. J. Radiat. Res.* **78**, 475-482, 2002.

ABERRAZIONI CROMOSOMICHE IN LINFOCITI UMANI INDOTTE DA IONI PESANTI FRAMMENTATI NELLA MATERIA

M. Pugliese, M. Durante, G. Gialanella, G. Grossi, C. La Tessa, L. Manti, P. Scampoli, R. Spera

*Dipartimento di Scienze Fisiche, Università di Napoli Federico II
Istituto Nazionale di Fisica Nucleare, Sezione di Napoli
e-mail: pugliese@na.infn.it*

Lo studio degli effetti biologici degli ioni pesanti frammentati fornisce informazioni sugli effetti biologici di campi misti [1] che non sono ottenibili semplicemente sommando gli effetti delle varie componenti monocromatiche del campo, in quanto possono avvenire interazioni tra le componenti di diverso LET.

Scopo del presente lavoro è lo studio dell'efficacia biologica di ioni Ferro di 500 MeV/n e di 1 GeV/n per induzione di aberrazioni cromosomiche in linfociti del sangue periferico umano e gli effetti della frammentazione (dovuta a schermature di alluminio e lucite) su tale efficacia. Gli irraggiamenti dei linfociti sono stati eseguiti al Sincrotrone a Gradiente Alternato (AGS) dei Laboratori Nazionali di Brookhaven (Upton, NY) e all'Heavy Ion Medical Accelerator Center (HIMAC) del NIRS di Chiba (Giappone).

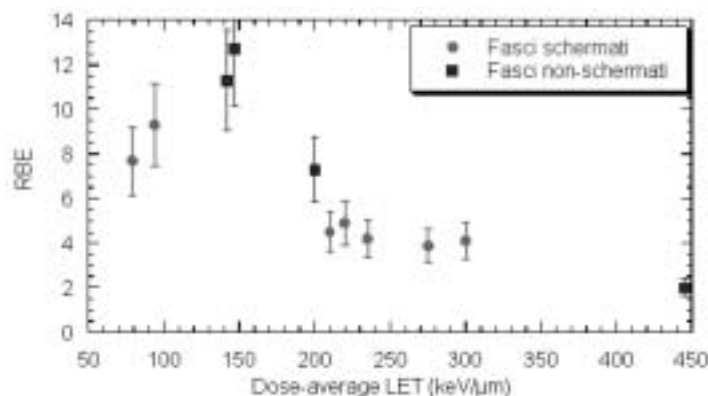
L'analisi delle aberrazioni cromosomiche nei linfociti irraggiati è stata fatta utilizzando la tecnica di ibridizzazione *in situ* in fluorescenza (FISH) [2].

I risultati ottenuti sono particolarmente utili per la scelta delle schermature atte a proteggere gli astronauti dall'esposizione alla radiazione spaziale.

Si è osservato che il fascio da 500 MeV/n e quello da 1 GeV/n si comportano in modo diverso in presenza degli schermi. L'efficacia biologica del fascio 500 MeV/n a parità di dose al bersaglio varia infatti solo leggermente, mentre quella del fascio da 1 GeV/n diminuisce in maniera significativa. A parità di fluensa incidente sugli schermi l'efficacia biologica del fascio da 500 MeV/n aumenta [3], mentre diminuisce nel caso del fascio da 1 GeV/n.

Tra i vari tipi di aberrazioni analizzati, gli scambi complessi sono risultati quelli più sensibili alla variazione della *dose average LET* del fascio. La frequenza di scambi complessi fornisce quindi un'utile informazione sul LET della radiazione a cui il sistema biologico è stato esposto.

Il *dose average LET* è risultato un parametro significativo nello studio dell'efficacia biologica di fasci misti. In base ai risultati ottenuti è stato, infatti, possibile costruire una curva RBE - *dose average LET* che consente di ricavare l'efficacia biologica di fasci misti in funzione della dose al bersaglio in base al *dose average LET* del fascio.



Bibliografia

- 1) Durante, M. (2002). "Radiation protection in space." Riv. Nuovo Cimento 25.
- 2) Durante, M., Y. Furusawa and E. Gotoh (1998b). "A simple method for simultaneous interphase-metaphase chromosome analysis in biodosimetry." Int J Radiat Biol 74: 457-462
- 3) Durante, M., G. Gialanella, G. Grossi, M. Pugliese, P. S. Scampoli, T. Kawata, N. Yasuda and Y. Furusawa (2003). "Influence of the shielding on the induction of chromosomal aberrations in human lymphocytes exposed to high-energy iron ions." Adv Space Res 23: 523-7.

INDICATORI PER IL “FOLLOW UP” NELLA IRRADIAZIONE CORPOREA TOTALE

C. Aristei*, P.Latini*, M.Antonella Tabocchini**, V. Viti**

**Università degli Studi di Perugia*

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

e-mail: cynthia.aristei@tiscalinet.it

Nell'ambito di un programma di ricerca volto alla costruzione di indicatori di qualità in radioterapia è partito uno studio mirato alla costruzione di indicatori di esito per la Irradiazione Corporea Totale (Total Body Irradiation, TBI) atti a monitorare la qualità del trattamento in relazione alla sua efficacia e agli effetti collaterali acuti, subacuti e tardivi. Lo studio è di carattere fortemente interdisciplinare e prevede una stretta collaborazione tra radioterapisti, ematologi, oncologi pediatri e fisici medici.

Le istituzioni italiane che partecipano al programma con i loro centri di radioterapia, di ematologia e le Fische sanitarie sono i seguenti: Università di Perugia e Policlinico Monteluce, Università di Bologna e Policlinico S. Orsola, Università di Torino e Ospedale Le Molinette, Università di Firenze e Ospedale Careggi, Casa Sollievo della Sofferenza di San Giovanni Rotondo, Università La Bicocca e Ospedale San Gerardo di Monza, Ospedale Niguarda di Milano, IST, Ospedale San Martino e Ospedale Gaslini di Genova, Università La Sapienza e Policlinico Umberto Primo di Roma, Azienda Ospedaliera di Padova, Università e Spedali Civili di Brescia.

Per individuare standard e soglie necessari alla costruzione degli indicatori è stato deciso di effettuare uno studio retrospettivo con analisi multivariata che valuti l'efficacia e la tossicità del trattamento sulla base di opportuni parametri TBI selezionati, e di confrontare i risultati ottenuti con quelli presenti in letteratura.

Un punto nodale è stato l'elaborazione di schede di raccolta dati, semplici e non ridondanti dal punto di vista informativo, dove fossero chiaramente riportati i dati relativi alla tipologia del trattamento effettuato e gli effetti collaterali riscontrati.

Per quanto riguarda la scelta delle neoplasie ematologiche si è deciso di prendere in considerazione leucemie acute non in recidiva, né chemioresistenti, trattate dal 1996 al 2000 con trapianto autologo o allogenico e condizionate o meno con TBI. Verranno valutati i dati relativi a pazienti adulti e pediatrici.

I parametri relativi ai trattamenti TBI che verranno raccolti per tutti i pazienti esaminati sono numerosi e sono di natura sia radiobiologica che relativi all'esecuzione del trattamento. In particolare verranno raccolti i seguenti parametri di TBI per tutti i pazienti esaminati: dose singola, dose totale, disomogeneità di dose (dose alla testa, mediastino e addome), numero di frazioni, rateo di dose (istantaneo e medio), dose totale media polmonare, compensazione su coste con elettroni, intervallo medio fra le frazioni, “boost” testicolare e/o in altre sedi. Per la valutazione dell'efficacia del trattamento sono stati scelti la percentuale di attecchimento e la “regimen related mortality”. Per la valutazione degli effetti collaterali sono stati scelti polmonite interstiziale, cataratta e secondi tumori.

Ci si propone di inserire i dati raccolti all'interno dei registri nazionali del gruppo italiano trapianto midollo osseo (GITMO) in modo da costituire una base di dati per la valutazione globale dei trattamenti TBI che possa essere utilizzata nell'ottica del miglioramento continuo di qualità (MCQ). La raccolta dati si propone, infatti, l'identificazione di standard relativi all'efficacia del trattamento e agli effetti collaterali (acuti, subacuti e tardivi).

Costruiti gli indicatori completi di standard e soglie si potrà infine valutare se impostare uno studio prospettico coinvolgente tutti i centri italiani che effettuano TBI che lo desiderassero. Al momento attuale tali centri risultano essere 25, con diversa dislocazione geografica.

MONITORAGGIO DELL'ESPOSIZIONE INDIVIDUALE AL RADON NEGLI AMBIENTI DI LAVORO

G. Sciocchetti, G. Cotellessa, A. Ceccatelli, E. Soldano, M. Pagliari,

ENEA, ION-IRP, C.R. Casaccia (Roma)

La nuova normativa sulla radioprotezione (Decreti legislativi 241/2000 e 257/2001), con il recepimento della Direttiva UE 96/29, ha regolamentato il controllo dell'esposizione al radon negli ambienti di lavoro. Il DL 241/2000 ha messo in prospettiva una tipologia di misurazioni basata sul monitoraggio di campioni rappresentativi dell'aria respirata per la valutazione dell'esposizione individuale. Allo stato dell'arte non è ancora possibile una misurazione

ne diretta della dose dovuta all'inalazione di materiale aerodisperso. Pertanto la dosimetria del radon si basa su due grandezze fisiche misurabili: la concentrazione dell'attività del radon e l'esposizione, definita come concentrazione dell'attività del radon integrata nel tempo. Il prelievo dei campioni rappresentativi dell'aria inalata può essere effettuato o mediante misure d'area su postazioni fisse o con dosimetri personali portati dai lavoratori.

Nei luoghi di lavoro la stima dell'esposizione al radon viene effettuata di regola attraverso misure integrate durante appropriati intervalli di tempo. La misura integrata, compensa l'effetto delle variazioni dei livelli della concentrazione di attività del radon, che si verificano durante il ciclo lavorativo e, pertanto, fornisce un valor medio di questa grandezza. Tale valore dovrebbe essere utilizzato per la stima del livello di azione, pari a 500 Bq/m³ di concentrazione di attività di radon media in un anno, come previsto dal Decreto Legislativo n.241/2000. Analogamente il datore di lavoro non è tenuto a porre in essere azioni di rimedio ove la dose non sia superiore a 3 mSv/anno.

Il problema della stima della concentrazione media dell'attività del radon è ancora oggetto di attenta considerazione. Il monitoraggio dell'esposizione individuale comporta alcune difficoltà d'ordine pratico connesse alla registrazione del tempo trascorso dai lavoratori nelle diverse aree operative. I dosimetri radon dovrebbero essere esposti solo durante l'orario di lavoro, al di fuori del quale dovrebbero essere adottate speciali precauzioni per evitare indesiderate esposizioni addizionali. Alcuni studi sperimentali hanno evidenziato significative variazioni dei livelli di attività del radon durante il ciclo notte-giorno. Questo effetto è particolarmente rilevante nel caso di ambienti di lavoro climatizzati, qualora l'impianto venga spento al termine delle attività lavorative.

Allo stato dell'arte non sono ancora disponibili dosimetri radon individuali con caratteristiche di semplicità e d'affidabilità. I limiti della tecnologia della misura possono influenzare prescrizioni operative con l'effetto di una sovrastima delle reali condizioni d'esposizione. Nelle Linee Guida sul monitoraggio del radon adottate di recente dalla Conferenza delle Regioni, ai fini della stima della concentrazione media, è previsto un monitoraggio che include il periodo diurno e notturno. La misurazione dell'esposizione dei rivelatori durante le ore notturne, non rispecchia in generale sia le reali condizioni d'esercizio degli impianti sia la correlazione del monitoraggio con la presenza dei lavoratori durante un normale ciclo operativo.

In questo lavoro viene descritto un sistema integrato per il monitoraggio del radon in garanzia di qualità messo a punto dal Laboratorio Radon del C.R. Casaccia il quale concorre a definire un nuovo standard a livello d'affidabilità e flessibilità. In particolare viene presentato un nuovo dosimetro radon di tipo passivo basato sui rivelatori a tracce, messo a punto nei laboratori dell'ENEA. Il dosimetro presenta caratteristiche uniche ed innovative che lo rendono idoneo a soddisfare le prescrizioni della nuova normativa della radioprotezione con modalità d'uso semplici ed efficienti. Il nuovo dispositivo di campionamento a volume variabile implementato nel dosimetro consente, in particolare, il controllo della durata e delle modalità dell'esposizione.

ESPOSIZIONI POTENZIALI NEL CASO DI INCENDIO IN UN LABORATORIO DI RICERCA CON IMPIEGO DI RADIOISOTOPI

Silvia Vaccari, Giuseppe Pedrazzi, Ermanno Papotti

Servizio di Fisica Sanitaria, Università di Parma,, Parma

e-mail: silviav@unipr.it

In questo lavoro presentiamo il caso di un laboratorio di ricerca in cui vengono impiegate sorgenti non sigillate di uso comune, come ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ⁴⁵Ca, ⁵¹Cr, ¹²⁵I in un tipico scenario di emergenza, quale può essere l'incendio. Un incendio che coinvolge materiale radioattivo può generare episodi di contaminazione aerodispersa, anche in zone relativamente distanti, con conseguenze ovviamente più gravi rispetto a quelle provocate dal solo incendio.

Abbiamo valutato, per ogni radionuclide in esame, la distribuzione spaziale e temporale delle sostanze radioattive disperse e rilasciate e le dosi efficaci impegnate per i lavoratori e per i gruppi di riferimento della popolazione.

Sono stati considerati possibili scenari di rischio in ordine crescente di gravità.

La diffusione accidentale incontrollata di radioelementi può comportare i seguenti aspetti.

112

Contaminazione delle superfici di lavoro e dei pavimenti

Si può stimare abbastanza semplicemente il valore dell'intensità di dose ad una certa distanza lungo l'asse centrale della superficie contaminata, conoscendo l'area contaminata, il valore di concentrazione superficiale ed il valo-

re della costante G specifica (per i nuclidi gamma emettitori), e le energie massima e media (per i nuclidi beta emettitori).

Contaminazione aerodispersa con rischio di incorporazione

La contaminazione dell'aria può essere provocata da radioelementi presenti sotto forma di polveri finemente suddivise. Il rischio più grave è dovuto all'incorporazione per inalazione.

Conoscendo le quantità di radionuclidi contaminanti, si può calcolare la concentrazione in aria e valutare le esposizioni potenziali relative ai lavoratori e ai gruppi di riferimento della popolazione. Si esamina quindi sia il caso di un incendio confinato ad un unico ambiente, con la valutazione del rischio di contaminazione per i lavoratori facendo ipotesi sulla percentuale di attività dispersa, sul tempo di permanenza nel locale e utilizzando i coefficienti di dose per inalazione riportati nel Decreto Legislativo, sia la diffusione della contaminazione in ambienti diversi e all'aperto, con i relativi rischi per i lavoratori e per i gruppi della popolazione.

Il calcolo della distribuzione spaziale e temporale delle concentrazioni di radionuclidi emessi incidentalmente nell'ambiente sotto forma di fumi caldi si fonda principalmente sulla teoria della diffusione atmosferica. Questa teoria studia il movimento dei fumi ed il loro dissolversi in funzione del gradiente di temperatura, della velocità del vento, del grado di turbolenza, della deposizione al suolo, della ricaduta per pioggia e di altri parametri che rendono complesso il problema. Esistono algoritmi di calcolo che, inserendo opportuni parametri meteorologici per l'individuazione delle categorie corrispondenti, permettono di simulare l'impatto sull'ambiente e sull'uomo quando si verifica un incidente con rilascio in atmosfera di radionuclidi. Nel caso più grave, quando è interessato tutto l'edificio, con conseguente diffusione di radioattività in atmosfera e contaminazione delle aree circostanti, si avrebbe la formazione di un pennacchio di fumo, la cui distribuzione di dose e i relativi valori massimi di dose efficace impegnata sono stati stimati utilizzando il codice di calcolo Hotspot 2.01, elaborato presso il Lawrence Livermore National Laboratory (USA).

Irraggiamento esterno

Questo rischio si verifica in seguito alla dispersione di elevate quantità di radioisotopi, soprattutto gamma emettitori. Si ha irraggiamento quando ci si trova nella zona di passaggio dei fumi: la cosiddetta sommersione in nube. In questo caso si può valutare l'intensità di dose in un determinato punto ad una certa distanza dall'elemento radiante supponendo una contaminazione dell'aria di isotopi gamma emittenti uniformemente distribuita.

EFFETTI DEI TELEFONI CELLULARI GSM SUL SISTEMA Uditivo DI RATTI SPRAGUE-DAWLEY (GUARD PROJECT)

C. Marino¹, P. Galloni¹, M. Piscitelli¹, M. Parazzini^{2,3}, A. Brazzale², G. Tognola², P. Ravazzani²

¹Unità Di Tossicologia e Scienze Biomediche, ENEA Casaccia, Roma,

²Istituto di Ingegneria Biomedica CNR,

³Politecnico di Milano, Dip. di Bioingegneria, Milano

e-mail paolo.galloni@casaccia.enea.it, marino@casaccia.enea.it

Scopo di questo lavoro è la valutazione dei potenziali effetti sul sistema uditivo di animali esposti a campi elettromagnetici prodotti da telefoni cellulari GSM alle frequenze di 900 e 1800 MHz. La funzionalità e l'attività micro-meccanica delle cellule ciliate esterne (OHC) cocleari di ratti Sprague-Dawley prima e dopo l'esposizione ai campi GSM sono state testate tramite i prodotti di distorsione delle emissioni otoacustiche (DPOAE). I DPOAE sono segnali acustici provenienti dalla coclea che vengono registrati da una sonda acustica inserita nel canale uditivo. I DPOAE sono riconosciuti come indicatori dello "stato di salute" della coclea: variazioni significative della loro ampiezza possono essere un segnale di danni funzionali o strutturali a carico delle OHC.

Sistema espositivo

3 set di 4 antenne loop ciascuno, simulanti l'emissione del telefono cellulare; campo elettromagnetico: 900 o 1800 MHz in modulazione GSM; SAR (Specific Absorption Rate, tasso di assorbimento specifico) di 2 W/kg; dosimetria effettuata tramite simulazione numerica, su fantocci e su ratto cadavere; esposizione localizzata (orecchio destro); ratti inseriti in gabbiette in perspex individuali.

Protocollo sperimentale

In totale 48 ratti (16 a 900 MHz, 16 a 1800 MHz e 16 sham) sono stati sottoposti esposti 2 ore/giorno, 5 giorni/settimana, per 4 settimane, ad un SAR (Specific Absorption Rate, tasso di assorbimento specifico) di 2 W/kg. I test DPOAE sono stati effettuati prima del trattamento, durante (cioè alla fine di ogni settimana di esposizione) e dopo (l'ultimo giorno di trattamento, un giorno dopo ed una settimana dopo). Durante la misura dei DPOAE gli animali si trovano sotto anestesia gassosa, tramite una miscela di Isoflurano in O₂ all' 1.8%

Parametri otoacustici: se si utilizzano come frequenze acustiche di stimolo due toni puri F1 ed F2, il DPOAE più tipicamente analizzato è di frequenza = 2F1-F2. Caratteristiche del test: frequenze di stimolo: tra i 3 ed i 32 kHz (11 punti analizzati); intensità di stimolo: F1/F2 = 70/65 o 65/55 dB SPL (Sound Pressure Level); rapporto F2/F1 = 1.22.

Intensità dei DPOAE misurata un giorno dopo la fine del trattamento

Nel grafico è rappresentata l'intensità dei DPOAE alle varie frequenze acustiche testate. Dall'analisi dei dati non appaiono differenze significative tra animali esposti e sham. Non si sono quindi evidenziati effetti dell'esposizione al campo elettromagnetico alla frequenza dei telefoni cellulari sull'attività delle OHC.

