

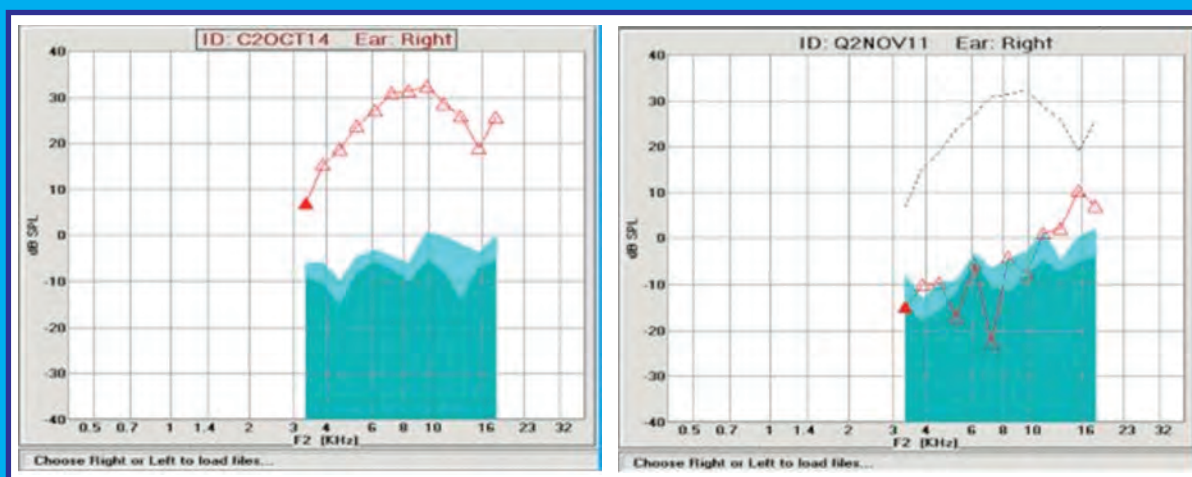
Radiazioni Ricerca e Applicazioni

Periodico della Società Italiana per le Ricerche sulle Radiazioni

***DAL DANNO RADIOINDOTTO AL DNA
ALLA MORTE CELLULARE:
APPROCCI TEORICI***

***EFFETTI DELL'ESPOSIZIONE IN VIVO
A CAMPI ELETTROMAGNETICI ASSOCIATI
ALLA TELEFONIA CELLULARE SULLA
FUNZIONALITÀ UDITIVA
IN ANIMALI DA ESPERIMENTO***

***LE BASSE DOSI DI RADIAZIONE
NELL'AMBIENTE PROTEGGONO
DAL CANCRO?***



IN MEMORIA DI MARIO COPPOLA



L'amico e collega Mario Coppola è venuto a mancare improvvisamente il 5 marzo 2011.

Mario era nato il 5 febbraio 1937 a Roma dove si era laureato in Fisica nel 1960.

Dal 1961 al 1964 era stato PostDoc alla Columbia University di New York, poi, per un breve periodo, all'Università di Padova; successivamente aveva lavorato negli anni dal 1964 al 1971 al Bureau Central de Mesures Nucleaires (BCMN) dell'EURATOM a Geel (Belgio). Aveva ottenuto la Libera Docenza in Fisica Nucleare all'Università di Milano nel 1969.

2

Mario aveva ricoperto l'incarico di Funzionario Scientifico presso il Centro Comune di Ricerche (CCR) dell'Euratom a Ispra dal

1971 al 1977. Da qui si era trasferito, come Funzionario Internazionale, al Centro Enea della Casaccia a Roma, dove è stato attivo fino al 2000, come responsabile di contratti di ricerca europei.

È stato Socio fondatore, Segretario scientifico e quindi Presidente e infine Consigliere Emerito della Società Italiana per le Ricerche sulle Radiazioni (SIRR).

Tra gli altri incarichi, Mario è stato consulente dell'United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiations (UNSCEAR) e membro del Comitato Scientifico della International Association for Radiation Research (IARR), e ha fatto parte del Comitato Scientifico di molti congressi nazionali e internazionali. È stato autore di circa 150 pubblicazioni sulle radiazioni ionizzanti e sui relativi effetti fisici e biologici.

Mario lascia la cara moglie Margherita e tre figli amatissimi.

Chi ha avuto la fortuna di lavorare con Mario ricorderà la sua profonda preparazione scientifica, la lucida intelligenza e il fine umorismo. Chi è stato suo amico lo ricorderà con affetto e ne rimpiangerà per sempre l'assenza.

Vincenzo Di Majo

SOMMARIO

Radiazioni Ricerca e Applicazioni
Periodico della Società Italiana
per le Ricerche sulle Radiazioni
Pubblicazione Periodica
Quadrimestrale
Agosto 2011 - Vol. XIV n. 1-2

Direttore Responsabile
Francesca Ballarini
Dipartimento di Fisica Nucleare e Teorica
Università di Pavia
e-mail: francesca.ballarini@pv.infn.it

Direttore Editoriale
Raffaele De Vita
Unità Biologica delle Radiazioni e
Salute dell'Uomo
ENEA Centro Ricerche Casaccia, Roma
e-mail: devita@enea.it

Capo Redattore
Lorenzo Manti
Dipartimento di Fisica
Università Federico II, Napoli
e-mail: lorenzo.manti@na.infn.it

Comitato di Redazione
Francesca Antonelli
Dipartimento Tecnologia e Salute
Istituto Superiore di Sanità, Roma
e-mail: francesca.antonelli@iss.it

Mauro Bonardi
Università degli Studi di Milano
e-mail: mauro.bonardi@mi.infn.it

Giorgio Leter
Unità Biologica delle Radiazioni e
Salute dell'Uomo
ENEA Centro Ricerche Casaccia, Roma
e-mail: giorgio.leter@enea.it

Marco Schwarz
Agenzia Provinciale per la Protonterapia
Trento
e-mail: schwarz@atrep.it

Cristiana Vidali
S.C. di Radioterapia
Azienda Ospedaliero-Universitaria di Trieste
e-mail: cristiana.vidali@aots.sanita.fvg.it

Per Informazioni e Corrispondenza
Francesca Ballarini
Tel. 0382 987949
e-mail: francesca.ballarini@pv.infn.it

Editrice: Società Italiana
per le Ricerche sulle Radiazioni

Registrazione del Tribunale di Roma
n. 406 del 6 Agosto 1998

Grafica: Renato Cafieri

Stampa:

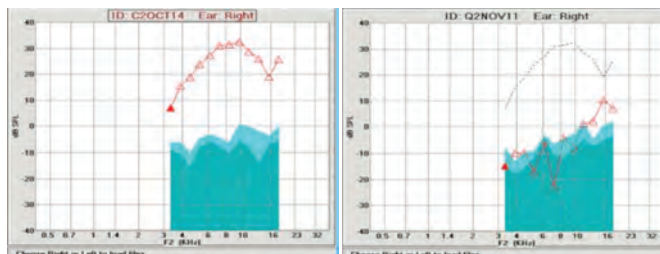


Pubblicità:

**DAL DANNO RADIOINDOTTO AL DNA
ALLA MORTE CELLULARE:
APPROCCI TEORICI** 4
Francesca Ballarini

**EFFETTI DELL'ESPOSIZIONE *IN VIVO*
A CAMPI ELETTROMAGNETICI ASSOCIATI
ALLA TELEFONIA CELLULARE
SULLA FUNZIONALITÀ UDITIVA
IN ANIMALI DA ESPERIMENTO** 8
**Paolo Galloni, Vanni Lopresto, Rosanna Pinto,
Marta Piscitelli, Marta Parazzini, Paolo Ravazzani
e Carmela Marino**

**LE BASSE DOSI DI RADIAZIONE
NELL'AMBIENTE PROTEGGONO
DAL CANCRO?** 12
Emiliano Fratini



In copertina: Relazione tra misura delle DPOAE e stato delle OHC nell'Organo del Corti. Nel grafico (asse Y, decibel di pressione sonora; asse X, frequenza acustica misurata in kHz) sono indicati in rosso il livello delle DPOAE , in blu il livello del rumore di fondo. Nella parte sinistra, le DPOAE sono misurabili, indice di un epitelio funzionante normale, come da immagine istologica. A destra, le DPOAE non sono misurabili, indice di mancanza parziale o totale dell'orletto ciliato nelle OHC, che risultano danneggiate, da "Effetti dell'esposizione *in vivo* a campi elettromagnetici associati alla telefonia cellulare sulla funzionalità uditiva in animali da esperimento" di Paolo Galloni, Vanni Lopresto, Rosanna Pinto, Marta Piscitelli, Marta Parazzini, Paolo Ravazzani e Carmela Marino.



Redazione Editoriale
Società Italiana per le Ricerche sulle Radiazioni
Unità Biologia delle Radiazioni e Salute dell'Uomo
ENEA Centro Ricerche Casaccia, s.p. 016
Via Anguillarese, 301 - 00123 ROMA
Tel. 06/30484671 Fax 06/30484891
e-mail: devita@enea.it
http://www.sirr.unina.it

Segreteria S.I.R.R.
Unità Biologia delle Radiazioni e Salute dell'Uomo
ENEA Centro Ricerche Casaccia, s.p. 016
Via Anguillarese, 301 - 00123 Roma
Tel. 06/30486654 Fax 06/30483644
e-mail: antonella.testa@enea.it

DAL DANNO RADIOINDOTTO AL DNA ALLA MORTE CELLULARE: APPROCCI TEORICI

Francesca Ballarini

Università degli Studi di Pavia, Dipartimento di Fisica Nucleare e Teorica, e INFN-Sezione di Pavia
e-mail: francesca.ballarini@pv.infn.it

La morte cellulare è un effetto radiobiologico particolarmente rilevante, non solo perché è l'*endpoint* di riferimento per caratterizzare l'efficacia biologica di radiazioni di diversa qualità, ma anche perché l'inattivazione delle cellule cancerose è lo scopo principale di qualsiasi terapia antitumorale. In letteratura sono disponibili molti dati sperimentali sulla sopravvivenza di linee cellulari normali e tumorali coltivate *in vitro* ed esposte a diversi campi di radiazioni. Quasi tutte le cellule di mammifero mostrano una curva di sopravvivenza che, nell'usuale rappresentazione semi-logaritmica, è caratterizzata da una "spalla" iniziale seguita da una regione essenzialmente lineare; per la radiazione ad alto LET la spalla tende a scomparire. In questo lavoro saranno discussi alcuni modelli teorici di induzione di morte cellulare, incluso un approccio meccanicistico sviluppato presso l'Università di Pavia sulla base del legame tra morte cellulare e danno cromosomico.

La Target Theory

La "target theory" di Lea, che è specifica per radiazioni di basso LET, è uno dei primi modelli interpretativi dell'induzione di morte cellulare da radiazioni [1]. La versione che ha trovato la più ampia applicabilità in radiobiologia è la cosiddetta "multitarget-single-hit" (MTSH), secondo la quale la cellula contiene n bersagli critici, ogni bersaglio ha la stessa probabilità q di essere colpito dalla radiazione, e un "hit" (cioè una deposizione di energia in grado di portare a danno biologico, come ad esempio una ionizzazione) in un dato bersaglio è sufficiente a inattivare quel bersaglio ma non l'intera cellula. La probabilità di sopravvivenza per una cellula che ha un numero b di bersagli critici colpiti è quindi $P(q, b, n, D) = (1 - e^{-qD})^b (e^{-qD})^{n-b} {}_n C_b B(b)$, dove $(1 - e^{-qD})^b$ è la probabilità che b bersagli subiscano un hit, $(e^{-qD})^{n-b}$ è la probabilità che i rimanenti $n-b$ bersagli siano mancati, $B(b)$ è la probabilità di sopravvivenza in seguito a b hits e il coefficiente binomiale ${}_n C_b$ tiene conto di tutte le combinazioni pos-

sibili per selezionare b bersagli tra gli n bersagli critici. Se $b < n$, il valore di $B(b)$ è tale che $P = 1$ (sopravvivenza); se $b \geq n$, $B(b)=0$ e $P=0$ (morte). Poiché l' n -esimo hit assicura la non sopravvivenza, la probabilità di sopravvivenza è:

$$S(q, n, D) = 1 - (1 - e^{-qD})^n \quad (1)$$

Esprimendo $\ln S$ in funzione di D , eccetto che per $n=1$ la curva è caratterizzata da una spalla la cui ampiezza cresce con n . Inoltre per valori di S inferiori a circa 0.1 l'andamento diventa rettilineo; l'extrapolazione di tale retta fino a incontrare l'asse delle ordinate fornisce il valore di n . Estrapolando la porzione lineare fino a incrociare la retta di equazione $S=1$, l'intercetta fornisce la "dose di quasi soglia" D_q , che è legata a n dalla relazione $D_q = D_0 \ln n$, dove $D_0 = 1/q$ è la dose per cui $S=1/e$. Eccetto che per $n=1$, la pendenza della curva a dose zero è nulla, il che è una delle principali inconsistenze del modello perché è in disaccordo con i dati sperimentali. Per superare questa limitazione è stato incluso un termine di tipo "single-target-single-hit":

$$S(p, q, n, D) = e^{-pD} [1 - (1 - e^{-qD})^n] \quad (2)$$

In questa formulazione p è il coefficiente di inattivazione per la porzione di morte cellulare che si assume dovuta a un singolo hit, mentre q è il coefficiente di inattivazione del modello MTSH. Sebbene questa equazione descriva abbastanza bene il comportamento della maggior parte delle cellule di mammifero, non risolve il problema della pendenza costante ad alte dosi, che non è consistente con la maggior parte dei dati sperimentali dato che questi ultimi mostrano una pendenza crescente.

Il modello Lineare-Quadratico

Nel 1981 Chadwick e Leenhouts [2] svilupparono il "modello molecolare", meglio noto come modello "lineare-quadratico" (LQ), secondo il quale il danno critico per la sopravvivenza cellulare è il double-strand break (DSB). In particolare la radiazione può indurre rotture dei legami molecolari del DNA ("lesioni"), che

sotto certe condizioni sono riparate; vari gradi di riparo corrispondono a vari effetti biologici. Se N_0 è il numero di legami molecolari del DNA che possono essere rotti nella cellula bersaglio, N sono i legami che restano intatti dopo una dose D e K è la probabilità di rottura di un legame per unità di dose, allora $-dN/dD = KN$, e $N = N_0 e^{-KD}$. Il numero di rotture efficaci è quindi $N_0 - N = f N_0(1 - e^{-KD})$, dove f è la frazione di legami rotti che non sono riparati. Secondo gli autori, la molecola di DNA può subire un DSB come risultato di due meccanismi distinti: i) entrambe le eliche vengono rotte dalla stessa traccia di radiazione; ii) ciascuna delle due eliche viene rotta in modo indipendente, ma le due rotture sono sufficientemente vicine nello spazio e nel tempo per dar luogo a un DSB. Se Δ e $(1 - \Delta)$ sono rispettivamente le frazioni di dose che agiscono in base al primo e al secondo meccanismo, il numero di DSB non riparati per cellula dovuti al meccanismo ii) è $Q_{ii} = E f_0 q_1 q_2$, dove E è la probabilità che due SSB associati nello spazio e nel tempo formino un DSB, f_0 è la frazione di DSB non riparati, e q_1 e q_2 sono rispettivamente il numero di legami rotti sulla prima elica e sulla seconda. Ne consegue che $q_1 = f_1 n_1(1 - e^{-k(1-\Delta)D})$ e $q_2 = f_2 n_2(1 - e^{-k(1-\Delta)D})$, dove n_1 e n_2 sono rispettivamente il numero di legami critici sulla prima e sulla seconda elica, f_1 e f_2 sono le frazioni di rotture non riparate e k è la probabilità di rottura di un legame per unità di dose. Adottando una notazione simile, il numero di DSB non riparati dovuti al meccanismo i) è $Q_i = n_0 f_0 [1 - \exp(-k_0 \Delta D)]$, dove n_0 è il numero di siti del DNA che possono subire un DSB e k_0 è la probabilità di hit. Il numero medio di DSB per cellula è quindi $Q_i + Q_{ii}$, e il numero medio di DSB *letali* per cellula è $Q = p(Q_i + Q_{ii})$, dove si è assunto che lo yield di DSB e la probabilità di morte cellulare siano proporzionali mediante la costante p . Poiché la probabilità di sopravvivenza cellulare S è data dalla probabilità di avere zero lesioni letali, secondo la distribuzione di probabilità poissoniana si ha $S = e^{-Q}$. Tenendo conto del fatto che k e k_0 sono piccoli, si ottiene la ben nota relazione lineare-quadratica:

$$S = \exp(-\alpha D - \beta D^2) \quad (3)$$

α è funzione di f_0, n_0, k_0 e Δ , mentre β è funzione di $f_0, E, n_1, n_2, f_1, f_2, k^2$ e $(1-\Delta)^2$.

Questo approccio rappresenta un tentativo di colmare il divario tra i meccanismi fisici del problema, cioè la deposizione di energia da parte della radiazione, e quelli biochimici e biologici, che consistono principalmente nel riparo o mancato riparo del DNA, sebbene non tutte le assunzioni adottate siano accettabili. In particolare l'ipotesi di proporzionalità tra lo *yield* di DSB e quello di lesioni letali non è consistente con la

maggior parte dei dati sperimentali, i quali mostrano che mentre i DSB tendono a crescere con la dose linearmente, le lesioni letali indotte da radiazione di basso LET crescono con la dose secondo una relazione lineare-quadratica. Tuttavia il modello LQ è tuttora ampiamente utilizzato in radiobiologia in quanto descrive bene i dati relativi a cellule di mammifero, superando non solo il problema della pendenza zero a dose zero, ma anche quello della pendenza costante ad alte dosi.

Il Local Effect Model (LEM)

Un approccio più recente è il "Local Effect Model" (LEM) [3], particolarmente interessante in quanto è stato implementato nel piano di trattamento TRiP utilizzato per la terapia con ioni carbonio al GSI di Darmstadt. Secondo l'assunzione di base l'effetto biologico *locale*, cioè in un volume intra-cellulare avente dimensioni lineari dell'ordine del nm, è determinato esclusivamente dall'entità della deposizione di energia in quel volume, indipendentemente dalla qualità della radiazione che l'ha depositata. Di conseguenza la diversa efficacia biologica delle particelle cariche pesanti in un dato bersaglio è dovuta alla diversa modalità di deposizione di energia che esse hanno rispetto ai fotoni, cioè alla struttura di traccia a livello del nm. Per i fotoni, la densità volumetrica di danni letali per cellula $n_X(D)$ si può scrivere come $n_X(D) = \langle N_X(D) \rangle / V_n = -\ln S_X(D) / V_n$, dove $\langle N_X(D) \rangle$ è il numero medio di danni letali per cellula indotti da una dose D di fotoni, V_n è il volume del nucleo cellulare e $S_X(D)$ è la frazione di cellule sopravvissute all'irraggiamento con fotoni. Nota la distribuzione di dose *locale* $d(x,y,z)$ per irraggiamento con ioni pesanti, il numero medio di danni letali per cellula in caso di irraggiamento con ioni $\langle N_{ion} \rangle$ si ottiene integrando la densità locale di danni $n_{ion}(d(x,y,z))$: $\langle N_{ion} \rangle = \int n_{ion}(d(x,y,z)) dV_n$. Poiché secondo l'assunzione fondamentale del modello $n_{ion}(d) = n_X(d)$, il numero medio di danni locali per cellula nel caso di ioni pesanti diventa

$$\langle N_{ion} \rangle = \int -\ln S_X(d(x,y,z)) / V_n dV_n \quad (4)$$

Essendo l'integrandata interamente determinata dalla risposta biologica ai fotoni, l'induzione di morte cellulare da ioni pesanti si può quindi calcolare partendo da dati sperimentali relativi a fotoni. L'eq. (4), che è la formulazione più generale del LEM, non si basa su alcuna rappresentazione particolare della curva di sopravvivenza da fotoni, e può essere applicata anche se sono disponibili solo valori numerici di S_X . Tuttavia, per praticità, la risposta ai fotoni è stata descritta mediante un approccio lineare-quadratico, opportunamente modificato per tener conto che spesso ad alte dosi le curve di sopravvivenza mostrano una transizio-

ne dalla forma a spalla a una forma esponenziale:

$$-\ln S_X(D) = \begin{cases} \alpha_X D + \beta_X D^2 & D \leq D_t \\ \alpha_X D_t + \beta_X D_t^2 + s_{\max}(D - D_t) & D > D_t \end{cases} \quad (5)$$

D_t , che è un parametro semi-libero del modello con valori nel range 15-30 Gy, rappresenta la dose di transizione verso un andamento esponenziale con pendenza $s_{\max} = \alpha_X + 2\beta_X D_t$. L'attuale versione del modello ha mostrato un buon accordo con dati di sopravvivenza da ioni carbonio per diverse energie delle particelle e diverse linee cellulari.

Un approccio meccanicistico basato sulle aberrazioni cromosomiche

Presso l'Università di Pavia un modello meccanicistico e un codice Monte Carlo originariamente sviluppati per l'induzione di aberrazioni cromosomiche sono stati recentemente estesi alla simulazione della morte cellulare radioindotta, considerando la relazione esistente tra alcuni tipi di aberrazioni cromosomiche (dicentrici, anelli e delezioni) e l'inattivazione clonogenica [4]. Il modello per le aberrazioni si basa sulle seguenti assunzioni: 1) le aberrazioni cromosomiche nascono da *clusters* di rotture del DNA a livello del nm (Cluster Lesions, CLs), ciascuno dei quali dà origine a due estremi liberi indipendenti; 2) solo coppie di estremi liberi inizialmente indotti entro una distanza di soglia d possono congiungersi e dare luogo ad aberrazioni di scambio. L'attuale versione del modello permette di trattare nuclei cellulari sia sferici sia cilindrici, con dimensioni selezionabili dall'utente. I vari territori cromosomici in interfase sono modellizzati mediante l'unione di voxels cubici di lato 0.2 μm , e occupano un volume proporzionale al contenuto in DNA di quel cromosoma. La ripetizione della costruzione dei territori cromosomici con diverse posizioni dei singoli cromosomi fornisce diverse configurazioni del nucleo interfase.

L'input fondamentale per la simulazione delle curve dose-risposta è lo *yield* (numero medio per Gy e per cellula) di CLs radioindotte, che dipende primariamente dalla qualità della radiazione ma può anche essere modulato dalla capacità di riparo della specifica linea cellulare. Per questa ragione, mentre in lavori precedenti [5-7] gli *yield* erano stati presi da simulazioni di struttura di traccia, in lavori più recenti [8] sono stati lasciati come parametro semi-libero, con valori compresi tra 1 e 10 CLs Gy⁻¹ cell⁻¹. Per radiazioni sparsamente ionizzanti come i raggi X e i raggi γ si estrae un numero vero di CLs da una distribuzione di Poisson, e le lesioni sono poi distribuite in posizioni casuali entro il nucleo cellulare. Al contrario per gli ioni (protoni, particelle α , ioni carbonio...) si estrae un numero vero

di attraversamenti nucleari da una distribuzione di Poisson di valor medio $n = SD / (0.16L)$, dove S è la sezione del nucleo in μm^2 , D è la dose in Gy, L è il LET in keV/ μm e 0.16 viene dalla conversione da eV a Joules; per ogni attraversamento si estrae poi un numero vero di lesioni da una distribuzione di Poisson di valor medio $t \cdot CL / \mu\text{m}$, dove t è la lunghezza dell'attraversamento in μm e $CL / \mu\text{m}$ è il numero medio di CLs per micron, calcolato come $CL / \mu\text{m} = CLs \text{ Gy}^{-1} \text{ cell}^{-1} 0.16 L V^{-1}$, essendo V il volume del nucleo in μm^3 . Mentre per ioni leggeri come protoni e particelle alfa le CLs indotte da una certa particella sono distribuite lungo un segmento che rappresenta la traccia della particella primaria, le CLs indotte da ioni pesanti come il Carbonio e il Ferro sono localizzate in parte lungo il *core* della traccia primaria e in parte con uno *shift* radiale che riproduce l'effetto dei raggi delta; in questo caso la probabilità di avere una CL a distanza r dal *core* si assume proporzionale a r^{-2} .

L'assegnazione delle posizioni di ogni CL è seguita dall'identificazione dei cromosomi e dei bracci cromosomici colpiti, il ricongiungimento tra estremi liberi e lo scoring delle aberrazioni (Giemsa o FISH a scelta dell'utente). La ripetizione per un numero significativo di cellule e per diverse dosi fornisce una curva dose-risposta per i principali tipi di aberrazioni direttamente confrontabile con i dati sperimentali. Fino ad ora il modello è stato validato per l'induzione di aberrazioni in linfociti umani esposti a raggi X e γ [6], protoni e particelle alfa [5], ioni carbonio e ioni ferro [7]. L'accordo con i dati ha supportato le assunzioni adottate. Recentemente l'approccio è stato esteso alla morte cellulare radioindotta, sulla base della relazione uno-a-uno tra $-\ln S$ (logaritmo della sopravvivenza cambiato di segno) e il numero medio di aberrazioni letali (dicentrici, anelli e delezioni) per cellula osservata da Cornforth e Bedford [4]. In questa versione estesa la frazione di cellule sopravvissute è calcolata come $S(D) = e^{-LA(D)}$, dove $LA(D)$ è il numero medio di aberrazioni letali per cellula. Mentre lo studio di Cornforth e Bedford riguarda cellule AG1522 esposte a raggi X, l'approccio teorico qui riportato è stato applicato, oltre che ai dati di Cornforth e Bedford, anche a protoni, particelle alfa e ioni carbonio. La figura 1 riporta i risultati ottenuti per cellule V79 esposte a fotoni, protoni da 0.76 MeV (LET: ~ 30.5 keV/ μm), particelle α da 3.2 MeV (LET: ~ 120 keV/ μm) e ioni carbonio da 11.0 MeV/u (LET: 153.5 keV/mm). Il buon accordo con i dati sperimentali considerati [9-12] indica che la relazione osservata da Cornforth e Bedford può essere valida non solo per cellule AG1522 esposte a raggi X ma anche per altre linee cellulari e altre radiazioni.

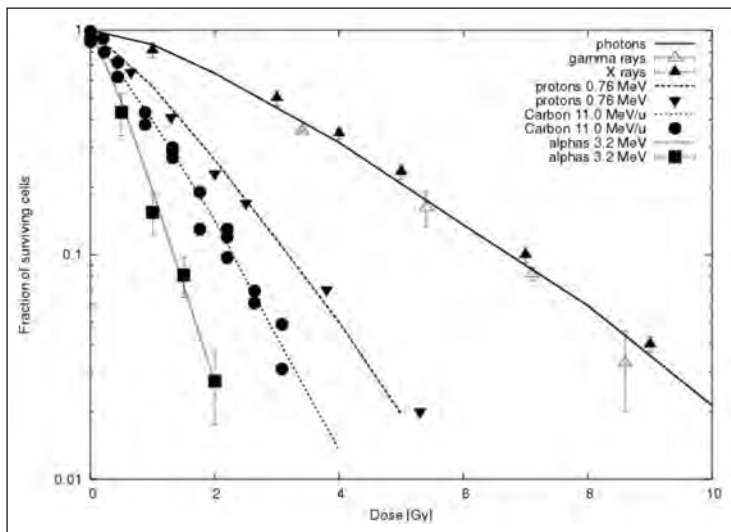


Figura 1. Sopravvivenza di cellule V79 esposte a fotoni, protoni da 0.76 MeV, ioni carbonio da 11.0 MeV/u e particelle alfa da 3.2 MeV; le linee sono previsioni del modello, i punti sono dati sperimentali disponibili in letteratura [9-12].

Ringraziamenti

Si ringraziano Michael Cornforth, Roberto Cherubini, Marco Durante, Yoshiya Furusawa, Andrea Ottolenghi, Ben Phoenix, Michael Scholz, Maria Antonella Tabocchini e Wilma Weyrather per le utili discussioni e lo scambio di informazioni.

Referenze

1. Lea, D.E. *Actions of radiations on living cells*. 2nd ed., Cambridge Univ. Press, New York (1955).
2. Chadwick, K. and Leenhouts, H, *A molecular theory of cell survival*. Phys. Med. Biol. 18, 78-87 (1973).
3. Elsasser, T., Kramer, M. and Scholz, M., *Accuracy of the local effect model for the prediction of biologic effects of carbon ion beams in vitro and in vivo*. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 71, 866-72 (2008).
4. Cornforth, M. and Bedford, J. *A quantitative comparison of potentially lethal damage repair and the rejoining of interphase chromosome breaks in low passage normal human fibroblasts*. Radiat. Res. 111, 385-405 (1987).
5. Ballarini, F. and Ottolenghi, A., *Chromosome aberrations as biomarkers of radiation exposure: modelling basic mechanisms*. Adv. Space Res. 31, 1557-1568 (2003).
6. Ballarini, F., Biaggi, M. and Ottolenghi, A., *Nuclear architecture and radiation-induced chromosome aberrations: models and simulations*. Radiat. Prot. Dosim. 99, 175-182 (2002).
7. Ballarini, F., Alloni, D., Facoetti, A. and Ottolenghi, A., *Heavy-ion effects: from track structure to DNA and chromosome damage*. New Journal of Physics 10, 075008, <http://www.njp.org> (2008).
8. Ballarini, F., S. Bortolussi, A.M. Clerici, C. Ferrari, N. Protti, S. Altieri, *From radiation-induced chromosome damage to cell death: modelling basic mechanisms and applications to boron neutron capture therapy*. Radiat.

- Prot. Dosim. 143, 523-527 (2011)
9. Furusawa, Y., Fukutsu, K., Aoki, M., Itsukaichi, H., Eguchi-Kasai, K., Ohara, H., Yatagai, F., Kanai, T. and Ando, K., *Inactivation of aerobic and hypoxic cells from three different cell lines by accelerated ³He-, ¹²C and ²⁰Ne-ion beams*. Radiat. Res. 154, 485-496 (2000).
10. Phoenix, B., Green, S., Hill, M., Jones, B., Mill, A. and Stevens, D., *Do the various radiations present in BNCT act synergistically? Cell survival experiments in mixed alpha-particle and gamma-ray fields*. Appl. Radiat. Isotopes 67, S318-S320 (2009).
11. Belli, M., Cera, F., Cherubini, R., Dalla Vecchia, M., Haque, A., Ianzini, F., Moschini, G., Sapora, O., Simone, G., Tabocchini, M.A. and Tiveron, P., *RBE-LET relationships for cell inactivation and mutation induced by low energy protons in V79 cells: further results at the LNL facility*. Int. J. Radiat. Biol. 74, 501-509 (1998).
12. W. Weyrather, S. Ritter, M. Scholz and G. Kraft, *RBE for Carbon track-segment irradiation in cell lines of differing repair capacity*. Int. J. Radiat. Biol. 75, 1357-1364 (1999).

EFFETTI DELL'ESPOSIZIONE *IN VIVO* A CAMPI ELETTROMAGNETICI ASSOCIATI ALLA TELEFONIA CELLULARE SULLA FUNZIONALITÀ Uditiva IN ANIMALI DA ESPERIMENTO

Paolo Galloni¹, Vanni Lopresto¹, Rosanna Pinto¹, Marta Piscitelli¹, Marta Parazzini²,
Paolo Ravazzani² e Carmela Marino¹

¹UTBIORAD, ENEA Casaccia, Roma

²CNR Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Ingegneria Biomedica, Milano
e-mail: paolo.galloni@enea.it

Introduzione

La presenza pressoché continua di sorgenti di emissioni elettromagnetiche (EM) di vario genere, come le linee di trasporto dell'energia elettrica, gli elettrodomestici e i moderni sistemi di comunicazione mobile, col conseguente utilizzo di apparecchi generanti radiofrequenze (RF) a diretto contatto con il corpo (telefoni cellulari), ha determinato un'attenzione sempre crescente, sia nell'opinione pubblica sia nella comunità scientifica, al possibile rischio per la salute dovuto a questo tipo di esposizione [1]. Ciò ha portato allo sviluppo di studi teorici e sperimentali volti alla comprensione dei meccanismi di interazione tra campi EM e tessuti biologici e ai possibili effetti nocivi sulla salute [2,3].

Ad oggi, per i campi EM a RF, il solo meccanismo che è provato causare effetti avversi, e che viene considerato nella definizione delle linee guida di sicurezza, è rappresentato dall'aumento di temperatura nel tessuto bersaglio dovuto all'assorbimento di energia. Le più recenti tecnologie in campo elettrico ed elettronico, i nuovi sistemi di comunicazione, le tecnologie di imaging magnetico in medicina e non solo, portano nuove "sfide" elettromagnetiche di cui va valutato il rischio espositivo associato. A tutt'oggi non c'è significativa evidenza che i livelli di campo a RF a cui la popolazione è comunemente esposta, al di sotto degli standard di sicurezza internazionali, causino danni alla salute; comunque, sulla base delle attuali conoscenze in campo scientifico, la questione di un eventuale rischio associato a queste tecnologie è ancora aperta.

Telefoni cellulari e sistema uditivo

Focalizzando l'attenzione sui sistemi di telefonia mobile, l'orecchio è chiaramente la struttura anatomica più prossima all'apparecchio durante l'uso. Ciò potrebbe comportare una deposizione di energia EM (nel range di frequenze 800-3000 MHz) relativamente alta in confronto ad altre parti del corpo. Da molto tempo è noto il cosiddetto fenomeno del "microwave hearing" [4], ossia la percezione di microonde ad alta potenza come ronzii, fischi, sibili, click durante l'esposizione. La spiegazione comunemente accettata è che, a causa dell'assorbimento di RF e per picchi di esposizione molto brevi e molto intensi, si generi un'onda acustica di pressione dovuta a una rapida espansione termo-elastica dei tessuti della testa. L'onda poi, raggiunge l'orecchio interno attraverso meccanismi di conduzione ossea ed è quindi percepita dal sistema uditivo come un normale suono.

Fino all'anno 2000, sono stati scarsamente studiati altri specifici effetti dei campi a RF sul sistema uditivo. Dal 2001 la Commissione Europea ha finanziato nell'arco di 7 anni due progetti, identificati con gli acronimi GUARD ed EMF-nEAR [5,6], con lo scopo specifico di determinare il possibile effetto dei campi elettromagnetici emessi dai telefoni mobili sulla funzione uditiva, includendo sia studi su volontari umani sia studi su animali da esperimento. In tali ambiti il gruppo di bioelettromagnetismo dell'Unità Tecnica Biologia delle Radiazioni e Salute dell'uomo dell'ENEA Casaccia, in collaborazione con l'Istituto di Ingegneria Biomedica del Consiglio Nazionale delle Ricerche di Milano si è occupato di sviluppare protocolli di espo-

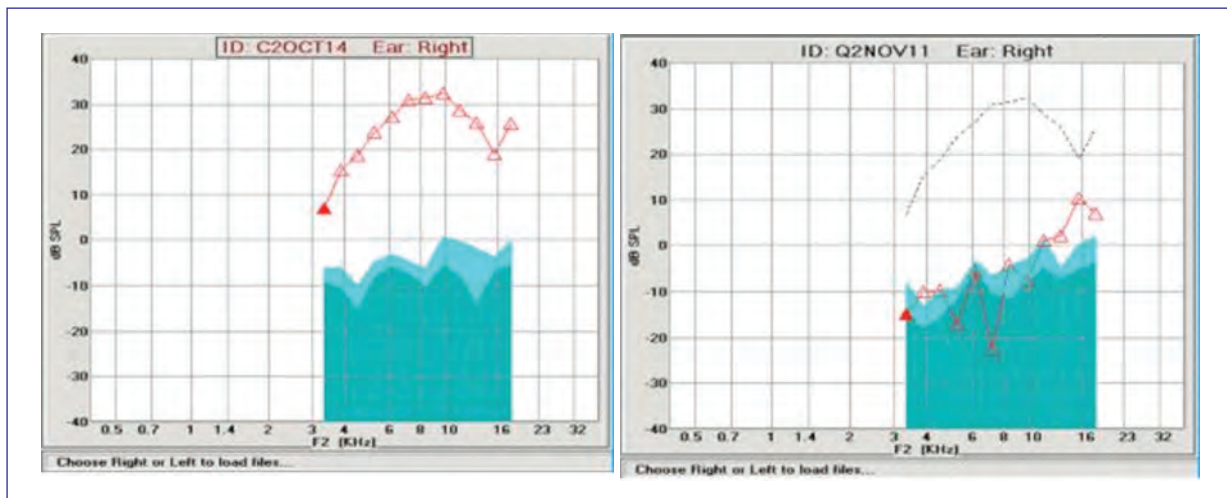


Figura 1: relazione tra misura delle DPOAE e stato delle OHC nell’Organo del Corti. Nel grafico (asse Y, decibel di pressione sonora; asse X, frequenza acustica misurata in kHz) sono indicati in rosso il livello delle DPOAE , in blu il livello del rumore di fondo. Nella parte sinistra, le DPOAE sono misurabili, indice di un epitelio funzionante normale, come da immagine istologica. A destra, le DPOAE non sono misurabili, indice di mancanza parziale o totale dell’orletto ciliato nelle OHC, che risultano danneggiate.

sizione localizzata di ratti in vivo alle frequenze GSM (progetto GUARD) ed UMTS (progetto EMF nEAR), valutando l’eventuale danno a carico della funzione uditiva tramite la misura di emissioni otoacustiche negli animali esposti.

Emissioni otoacustiche

Le emissioni otoacustiche (OAE) rappresentano un indicatore della normale contrattilità meccanica delle cellule ciliate esterne (OHC) dell’orecchio, e più specificatamente dell’Organo del Corti all’interno della coclea [7]. Le OHC, che sono tra l’altro molto sensibili a vari agenti esogeni ed endogeni, generano un segnale acustico in risposta ad uno stimolo uditivo; questo segnale di risposta (misurato comunemente come Prodotto di Distorsione delle OAE, o DPOAE) può essere misurato direttamente nel meato uditivo utilizzando un apposito microfono. La misura delle DPOAE è ritenuta un metodo affidabile e non invasivo per valutare la funzione cocleare in vivo: variazioni significative della loro ampiezza, prima e dopo l’esposizione ad un agente nocivo, sono indice di un danno all’epitelio sensoriale costituito dalle OHC (figura 1).

Studi sperimentali

Un primo studio [8] è stato effettuato su ratti Sprague-Dawley maschi (modello animale scelto ed utilizzato anche in seguito) di 10 settimane, esposti alla frequenza di 950 MHz CW* (SAR** di 0.2 e 1 W/kg), per 3 ore al giorno per 3 giorni, ed alla frequenza di 936 MHz CW (SAR di 1 W/kg), per 3 ore al giorno per 5 giorni; in entrambi i casi sono stati

inclusi 8 animali esposti ed 8 sham-esposti (ossia ad esposizione simulata, con la sorgente di campo EM spenta). I DPOAE (nel range di frequenze acustiche 2-6 kHz) sono stati registrati prima del trattamento ed immediatamente 24 ore e 48 ore dopo, senza riscontrare nessun segno di danno alla funzione uditiva. In questo lavoro l’esposizione è stata ottenuta con la sorgente di RF (horn antenna) posta lontano dai soggetti esposti. In tutti gli studi successivi si è invece lavorato in esposizione localizzata, ottenuta con un sistema di antenne a loop poste in prossimità dell’orecchio del ratto, per simulare una reale situazione d’uso del telefono cellulare.

Il lavoro seguente ha incluso 58 ratti [9], trattati con protocolli che prevedevano diversi tempi di esposizione (3h/giorno per 5 giorni, oppure 2h/g, 5 gg/settimana, 4 settimane), diverse frequenze EM (936 MHz CW, 923 MHz CW, 900 MHz GSM, 960 MHz GSM), SAR (1 o 2 W/kg), e diversi tempi dei test DPOAE (nel range di frequenze acustiche 3-7 kHz) prima, durante e dopo l’esposizione (al termine di ogni settimana di esposizione e 1 g, 2 gg, 3 gg o una settimana dopo le 4 settimane di esposizione). Nessuna variazione significativa è stata riscontrata a seguito dell’esposizione ai campi EM. Nei lavori successivi si sono utilizzati sistemi espositivi migliorativi dal punto di vista della dosimetria e delle condizioni sperimentali [10]. Il sistema precedentemente utilizzato consisteva in un semplice rack di 4 antenne a loop poste su di un piano in posizione adiacente. Il sistema realizzato in seguito si sviluppa invece su tre racks sovrapposti (in totale quindi 12 antenne) con materiale assorbente alle RF

per evitare interferenze tra le singole antenne e tra i piani; si sono ottenuti quindi un miglior controllo dosimetrico, la possibilità di esporre un maggior numero di animali contemporaneamente e, inoltre, di lavorare “in cieco” rispetto ai gruppi sperimentali. Si è poi utilizzato anche un nuovo sistema di registrazione delle DPOAE capace di acquisire una gamma più ampia di frequenze acustiche. In particolare nello studio successivo [11] sono stati esposti 48 ratti per 2h/g, 5gg/settimana, 4 settimane, ad un SAR locale di 2 W/kg, alle frequenze di 900 e 1800 MHz in modulazione GSM, o sham-esposti. I test DPOAEs (nell’intervallo di frequenze acustiche 3-13 kHz) sono stati effettuati prima, durante (alla fine di ogni settimana) ed una settimana dopo l’ultimo giorno di trattamento. L’analisi dei dati non ha mostrato differenze significative tra gruppi esposti e sham nei segnali acustici registrati.

L’esperimento seguente [12] ha valutato il possibile effetto combinato dei 900 MHz CW con la gentamicina (GM), farmaco ototossico, sui DPOAE di 32 ratti, divisi in 4 gruppi: (1) trattato con iniezioni giornaliere i.m. di 150 mg/kg di GM per 15 giorni, (2) trattato con GM 150 mg/kg per 15 giorni + campo EM, (3) esposto al campo EM, (4) sham-esposto al campo EM. L’esposizione è stata di 2 h/g, 5 gg/settimana per 4 settimane, ad un SAR locale di 4 W/kg. I test DPOAE (range 3-13 kHz) sono stati eseguiti prima, durante e dopo le 4 settimane di esposizione combinata. L’analisi dei risultati (figura 2) ha confermato l’ototossicità del farmaco, ma non ha rilevato alcun effetto del campo a 900 MHz, neanche in co-esposizione. L’eventuale effetto dell’esposizione a campo UMTS (1946 MHz) sulla funzione delle OHC è stato studiato nell’ultimo lavoro della serie [13]. In questo caso gli animali sono stati trattati per 2 h/g, 5 gg/settimana per 4 settimane, 24 realmente esposti e 24 sham, ad un SAR locale di 10 W/kg; inoltre è stato anche incluso un gruppo di controllo positivo, composto da 12 ratti trattati con kanamicina (KM), un altro farmaco con proprietà ototossiche, iniettati i.m. con 250 mg/kg giornalieri per 21 giorni. Le registrazioni delle DPOAE (tra 3 e 16 kHz) sono state effettuate prima, durante e dopo le 4 settimane di esposizione. Nonostante il livello di SAR localizzato molto superiore a quello di solito associato ai telefoni cellulari normalmente presenti in commercio, non è stato riscontrato nessun effetto dell’esposizione al campo UMTS (figura 3).

Conclusioni

Lo scopo di questi studi era la valutazione del potenziale effetto dannoso dell’esposizione ad emissioni elettromagnetiche simili a quelle derivanti dall’uso del

telefono cellulare sulla funzionalità delle cellule ciliate esterne dell’orecchio in roditori da esperimento. Nei diversi esperimenti da noi condotti sono state analizzate varie frequenze (nel range associato alla telefonia mobile), con modulazioni diverse e con intensità variabile, anche in co-esposizione ed in comparazione con agenti ototossici. Nel complesso, i nostri studi non hanno riscontrato nessun effetto significativo dell’esposizione sulla funzionalità uditiva periferica del modello animale in studio, anche con livelli di SAR molto superiori a quelli normalmente generati dai dispositivi di uso comune.

* CW, Continuous Wave, Onda Continua, segnale a radiofrequenza senza la modulazione GSM o UMTS.

**SAR, Specific Absorption Rate, parametro comunemente utilizzato per definire l’assorbimento di energia EM per unità di massa, nell’ambito di frequenze di interesse.

Referenze

1. European Health Risk Assessment Network on Electromagnetic Fields Exposure. *Report on the level of exposure (frequency, patterns and modulation) in the European Union. Part 1: Radiofrequency (RF) radiation*. Deliverable Report D4 of EHFRAN project, August 2010
2. Paolo Vecchia, Rüdiger Matthes, Gunde Ziegelberger, James Lin, Richard Saunders, Anthony Swerdlow. *Exposure to high frequency electromagnetic fields, biological effects and health consequences (100 kHz-300 GHz)*. ICNIRP 16/2009
3. Luc Verschaeve. *Genetic damage in subjects exposed to radiofrequency radiation*. Review Mutation Research 681 (2009) 259–270
4. Lin JC, Wang Z. *Hearing of microwave pulses by humans and animals: effects, mechanism, and thresholds*. Health Physics 92(6):621–628, 2007
5. GUARD - *Potential adverse effects of GSM cellular phones on hearing*, European Commission programme: Life Quality, 5th FWP, co # QLK4-CT-2001-00150, 01 Jan 2002 - 31 Dec 2004
6. EMF NEAR - *Exposure at UMTS electromagnetic fields: study on potential adverse effects on hearing*, a project funded by the FWP of Community Action in the field of Public Health of the EC, DG Health and Consumer Protection, cont. n°2004127, Dec 2004 – July 2007
7. Brownell WE. 1990. *Outer hair cell electromotility and otoacoustic emissions*. Ear Hear 11:82–92.
8. Marino C, Cristalli G, Galloni P, Pasqualetti P, Piscitelli M, Lovisolo G A (2000) *Effects of microwaves (900 MHz) on the cochlear receptor: exposure systems and preliminary results*. Radiat. Environ. Biophys., 39:131-136.

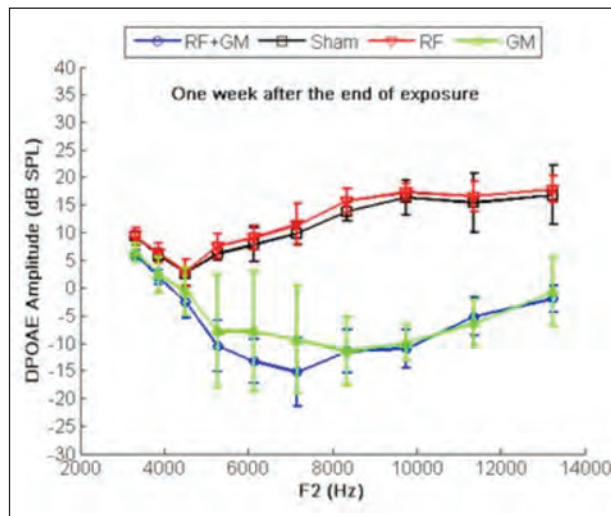


Figura 2: Esempio di misura dei DPOAE nei 4 gruppi sperimentali (asse Y, decibel di pressione sonora; asse X, frequenza acustica misurata in Hz). Si nota l’effetto sull’ampiezza nei due gruppi trattati con GM, e l’assenza di effetto da parte del campo EM. Valori espressi come media dei gruppi \pm dev. standard.

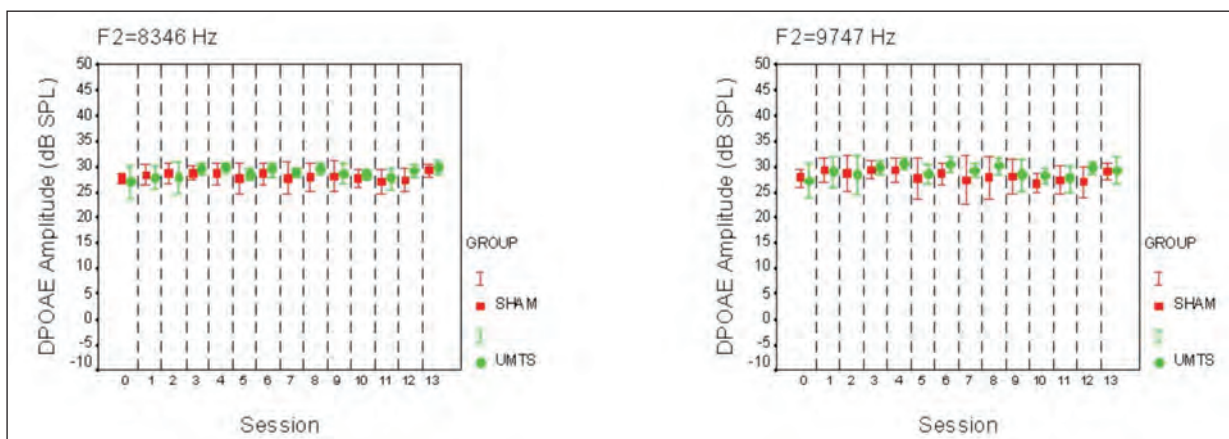


Figura 3: Esempi di misura dei DPOAE negli animali esposti e sham-esposti (asse Y, decibel di pressione sonora; asse X, sessioni di misura successive nel tempo), per le frequenze acustiche di 8346 e 9747 Hz. Si nota l’assenza di effetto da parte del campo UMTS. Valori espressi come media dei gruppi \pm dev. standard.

9. P. Galloni, M. Parazzini, M. Piscitelli, R. Pinto, G.A. Lovisololo, G. Tognola, C. Marino, e P. Ravazzani, *Electromagnetic fields from mobile phones do not affect the inner auditory system of Sprague-Dawley rats*. Radiation Research, vol. 164, Dic. 2005, pagg. 798-804.

10. V. Lopresto; R. Pinto; A. De Vita; S. Mancini; P. Galloni; C. Marino; P. Ravazzani; G. A. Lovisololo *Exposure setup to study potential adverse effects at GSM 1800 and UMTS frequencies on the auditory systems of rats*. Radiation Protection Dosimetry 2007;123(4):473-82.

11. P. Galloni, G.A. Lovisololo, S. Mancini, M. Parazzini, R. Pinto, M. Piscitelli, P. Ravazzani, e C. Marino, *Effects of 900 MHz electromagnetic fields exposure on cochlear cells’ functionality in rats: evaluation of distortion product otoacoustic emissions*. Bioelectromagnetics, vol. 26, Ott. 2005, pagg. 536-547.

12. M. Parazzini, P. Galloni, M. Piscitelli, R. Pinto, G.A. Lovisololo, G. Tognola, P. Ravazzani, e C. Marino, *Possible combined effects of 900 MHz continuous-wave electromagnetic fields and gentamicin on the auditory system of rats*. Radiation Research, vol. 167, Mag. 2007, pp. 600-605.

13. Galloni P., Lopresto V., Parazzini M., Pinto R., Piscitelli M., Ravazzani P., Marino C.: *No Effects of UMTS Exposure on the Function of Rat Outer Hair Cells*. Bioelectromagnetics 2009, 30, 385-392

LE BASSE DOSI DI RADIAZIONE NELL'AMBIENTE PROTEGGONO DAL CANCRO?

Emiliano Fratini

Centro studi e ricerche e Museo storico della fisica Enrico Fermi
Istituto Superiore di Sanità
e-mail: efratini@live.it

Il 5 settembre 2011 la professoressa Pamela Sykes, della Flinders University di Adelaide (Australia), ha tenuto presso l'Istituto Superiore di Sanità un seminario dal titolo: "Are low doses of radiation in the environment PROTECTING you from cancer?". Pamela Sykes ha un PhD in genetica ed ha lavorato per 25 anni nel campo della genetica molecolare in Australia e negli Stati Uniti d'America. Attualmente è Professore Ordinario in Genetica Molecolare Umana presso la Flinders University e studia gli effetti biologici delle basse dosi di radiazioni ionizzanti. Le sue ricerche attuali, finanziate dal Dipartimento dell'Energia degli Stati Uniti d'America (DOE) e dal programma Low Dose Radiation, sono focalizzate sullo studio del ruolo protettivo delle basse dosi di radiazione. Attualmente fa parte delle commissioni di radioprotezione australiane e del comitato editoriale della rivista Radiation Research.

In linee generali, il discorso inizia con una panoramica sulle basse dosi di radiazioni, con speciale attenzione al punto di vista dell'opinione pubblica, sulle radiazioni e i loro effetti. Continua con una discussione del corrente paradigma della valutazione del rischio, presentando dati di letteratura che lo contraddicono, ad esempio la capacità delle basse dosi di radiazione di indurre protezione verso il cancro. Infine si sofferma sulla ricerca e lo studio dei meccanismi di protezione sia in modelli *in vivo* sia a dosi di radiazione pertinenti.

Fin dall'inizio del seminario, la prof.ssa Sykes ci tiene a sottolineare la presenza e l'importanza delle basse dosi di radiazione nella vita quotidiana e l'infondatezza del timore generalizzato verso le radiazioni, mostrando che le radiazioni sono presenti ovunque nell'ambiente che ci circonda, e quello che è importante sono le dosi a cui siamo esposti. Ogni abitante della terra riceve dosi differenti di radiazione sia da fonti naturali (quali le rocce, le piante e gli elementi radioattivi, come ad esempio il Radon presente nell'aria), sia da fonti artificiali (come, ad esempio, l'impiego di radioisotopi a scopo diagnostico o terapeutico). Forme naturali di radiazione raggiun-

gono la superficie terrestre sia dallo spazio sia dalla crosta terrestre: viviamo in un mare di radiazioni! Ma a seguito di Hiroshima, Nagasaki e Chernobyl, la sola parola radiazione suscita terrore.

Per comprendere meglio l'importanza della dose, la prof.ssa Sykes ha fatto alcuni esempi in cifre: la dose annuale dovuta alla radiazione cosmica che raggiunge il livello del mare è di circa 0.3 mSv, quella dovuta al Radon che inaliamo giornalmente è di ~ 0.7 mSv, e la dose massima per gli individui della popolazione, stabilita dall'ICRP, è di 1 mSv all'anno (mSv/yr). Sottolinea inoltre che anche il corpo umano, principalmente a causa del Potassio-40, è una fonte di radiazioni; assorbiamo 0.02 mSv/yr solo dormendo vicino ad un'altra persona per otto ore a notte.

L'opinione pubblica sulle centrali nucleari, sugli incidenti di Chernobyl e più recentemente di Fukushima, mostra come la maggior parte delle persone sono diffidenti e timorose delle radiazioni, in particolare di quelle di origine artificiale. Questo timore è dovuto alla convinzione che qualsiasi dose di radiazione sia dannosa, tanto che le autorità tentano di proteggerci anche dalle più minuscole dosi di radiazione. Secondo Pamela Sykes, tutto ciò è dovuto principalmente ai giornali e telegiornali che omettono molti dati nel riportare le notizie. Ad esempio, a seguito del terremoto di Fukushima, l'onda incontrollata dei mezzi di comunicazione di massa ci ha riportato le ormai ben note immagini delle conseguenze del terremoto e dello tsunami, accostate agli innumerevoli filmati delle esplosioni dei reattori della centrale nucleare e correlate alle stime di morti e dispersi. Pochi hanno puntualizzato che dei 30000 morti nessuno è dovuto all'esplosione dei reattori, e che tutte le dosi di radiazioni, calcolate nelle zone colpite erano di gran lunga al di sotto della dose limite per la popolazione (1 mSv/yr). La Sykes ha tenuto a puntualizzare che non è la radiazione in sé ad essere dannosa, ma è la dose!

Per capire bene cosa si intende per basse dosi di radia-

zione, bisogna innanzitutto considerare che il programma di ricerca sulle basse dosi del dipartimento dell'Energia degli Stati Uniti d'America (US DOE Low Dose Radiation Program) considera per "basse" le dosi inferiori ai 100 mGy di radiazione a basso LET (per i raggi-X, 1mGy equivale ad 1mSv). Perciò parliamo di basse dosi quando ci riferiamo, ad esempio, alla mammografia (2.5 mSv), alla radiografia dentale (0.6 mSv) o toracica (0.1 mSv), o ad un volo da Adelaide a Sydney (0.01 mSv). Al contrario, non sono incluse nelle basse dosi le quantità di radiazioni dovute alla radioterapia (70000 mSv) o a una missione di 1000 giorni su Marte (1000 mSv) [1]. Lo studio delle basse dosi di radiazioni ionizzanti assume un'importanza sempre maggiore grazie all'incremento dell'uso della radiologia diagnostica, legato ai miglioramenti tecnici che ne facilitano l'esecuzione e ne aumentano l'accessibilità; all'aumento della durata delle missioni spaziali; alla potenziale necessità di incrementare la generazione di energia da centrali nucleari; ed infine all'evidenza dell'assorbimento di basse dosi di radiazioni, a livello dei tessuti posti al di fuori dei campi di trattamento, nei pazienti che effettuano la Radioterapia [2]. Il punto di vista ufficiale su cui si basa la legislazione radioprotezionistica di tutto il mondo, è sostenuto dall'*International Commission on Radiobiological Protection* (ICRP), e si fonda sul Modello Lineare Senza soglia (LNT, Linear No-threshold Model). Questo modello assume, in maniera cautelativa, che anche le più basse dosi di radiazione possano essere dannose, e che il rischio per la salute associato alla radiazione incrementi linearmente con la dose. Questo comporta una notevole spesa (miliardi di dollari) per garantire protezione anche dalle dosi più piccole. Tuttavia gli unici dati epidemiologici sono al di sopra dei 100 mSv, e cosa realmente accada al di sotto di questa dose è ancora in via di chiarimento.

Negli ultimi anni diversi studi, compresi quelli della professoressa Sykes, hanno mostrato una risposta omeostatica allo stress dovuto alle basse dosi di radiazione. Questa risposta può proteggere da mutazioni e cancro, al contrario della risposta tossica alle alte dosi di radiazione che favorisce lo sviluppo di cancro. Questo effetto bifasico della relazione dose/risposta è tipico di molti sistemi biologici esposti a un'ampia gamma di stimoli. Il termine *ormesi*, che deriva dal verbo greco *ormao* che significa *stimolare*, viene utilizzato per descrivere un effetto "benefico" di basse dosi e implica un meccanismo di sovra-compensazione dovuta a una perturbazione dell'omeostasi. Punti caratteristici di questo fenomeno sono: lo scompenso dell'omeostasi, una modesta sovra-compensazione fino al ripristino dell'omeostasi e la natura adattativa del processo.

La Prof.ssa Sykes ricorda come su questi aspetti sia nato un forte dibattito, spesso caratterizzato dalla diversa interpretazione degli stessi dati, tra chi è a favore del modello LNT e chi lo rifiuta. Chi è a favore di questo modello fa perno sui dati epidemiologici, ma spesso riceve critiche incentrate sugli effetti confondenti delle basse dosi. Al contrario, chi rifiuta il modello LNT si fa forte dei dati biologici, spesso acquisiti da modelli *in vitro* o murini *in vivo*, che vengono altrettanto criticati per la trasferibilità dei dati al modello umano. Così, mentre Brenner e Hall predicono che un gran numero di tumori (0.4-2% del totale) nella popolazione americana saranno dovuti ad un incremento dell'uso della tomografia computerizzata [3], Scott predice che tali dosi sono al di sotto della soglia di rischio e potrebbero essere protettive verso i tumori [4].

Gli Anti-LNT fanno notare che gli effetti a lungo termine delle radiazioni sulle popolazioni evacuate da Chernobyl non collimano con le stime di 4000 morti per tumore predette da tale modello. Gli studi, pubblicati nel 2006 dal UN Chernobyl Forum, parlano di un incremento di quattro volte dei casi di cancro alla tiroide, con 15 morti stimate, mentre non si è rilevato nessun incremento in leucemia, tumori solidi e disordini ereditari. Al contrario, l'evacuazione in Bielorussia, Russia e Ucraina ha causato disturbi psicosomatici di massa, gravi perdite economiche e conseguenze sociali traumatiche.

Ancora un punto a favore degli anti-LNT arriva dai dati sulla risposta adattativa. Il modello LNT prevede che le dosi di due irraggiamenti consecutivi, intervallati da un determinato tempo, debbano avere effetti additivi. In realtà alcuni dati biologici mostrano che il trattamento preliminare con basse dosi rende l'organismo capace di rispondere meglio non solamente a dosi alte ricevute in seguito, ma anche ad altri agenti genotossici e perfino all'invecchiamento. E' stato riscontrato che la capacità di una dose di 4 Gy di indurre linfomi nel topo è diminuita dall'esposizione preventiva a basse dosi di radiazione (10 o 100 mGy), e che queste basse dosi incrementano anche la latenza del linfoma radioindotto [5]. La Prof.ssa Sykes sottolinea come l'efficacia della dose dipende anche dal rateo di dose. Alcuni studi mostrano come il basso rateo di dose di radiazioni possa stimolare il sistema immunitario e ad esempio prolungare l'aspettativa di vita di topi con il diabete (topi diabetici db/db aumentano di circa 15 settimane l'aspettativa di vita se irraggiati con 0.7 mGy/hr di raggi gamma per una dose totale di 10 Gy, [6]).

Studi degli ultimi anni sembrano delineare anche alcuni parametri per cui basse dosi di radiazione mostrano protezione; ciò sembra avvenire quando le dosi sono al di sotto dei 50 mSv, e somministrate a determinati ratei di dose. Gran parte delle evidenze sono per le dosi di radia-

zione a basso LET (raggi-X, raggi- γ , paricelle- β), ma ci sono anche dati che mostrano ormesi dovuta a radiazioni ad alto LET (es. neutroni, [7]). La protezione spesso si vede solo a seguito di irraggiamento "Total Body", ma non è limitata solamente al cancro, anzi è efficace anche sull'aspettativa di vita, sul diabete e sulle malattie cardiache; se la dose è troppo bassa potrebbe anche non esserci protezione. Un fatto incontestabile sulla biologia delle radiazioni è che le risposte biologiche alle basse dosi sono differenti dalle risposte biologiche alle alte dosi, come dimostrato anche dalle analisi di espressione genica (gene expression profiling) [7].

Da anni anche la prof.ssa Sykes, con il suo gruppo di ricerca, studia gli effetti delle basse dosi di radiazione, focalizzando l'attenzione su dosi estremamente basse. Il loro approccio si basa su lavori *in vivo* utilizzando il topo (*Mus musculus*) come modello sperimentale a dosi rilevanti per la sicurezza e salute occupazionale (OH&S) e per l'esposizione della popolazione (1 μ Gy, 10 mGy, 250 mGy). Le finalità di questi lavori sono l'analisi *in situ* del danno a livello del DNA (γ H2AX) e del destino cellulare (ciclo cellulare/apoptosi) tramite studi temporali e di risposta adattativa.

Il modello murino da loro utilizzato, pKZ1, permette di rilevare il danno prodotto anche da piccolissime dosi di radiazioni, con un transgene che si attiva, tramite inversione cromosomica, in presenza di danno al DNA. Con questo modello, Sykes et al. hanno effettuato studi di rilevazione *in situ* delle inversioni nel transgene pKZ1 in prostata e milza a seguito di esposizione del topo a basse dosi di raggi X. Questi studi mostrano un andamento non lineare delle inversioni, con tendenza alla protezione per le dosi comprese tra 0.1 e 100 mGy [8].

Inoltre esperimenti di risposta adattativa, in cui queste basse dosi (0.1-100 mGy) sono seguite o precedute da una dose più alta (1Gy), mostrano la loro capacità di indurre protezione e riparo [9]. Per studiare se questa complessa relazione dose-risposta è un effetto permanente, sono stati effettuati saggi di inversione di pKZ1 in studi di cinetiche temporali, e si è visto che la risposta delle inversioni nella milza è differente per le differenti dosi: alla dose di 0.01 mGy si ha un incremento delle inversioni nei primi 3 giorni, seguito da un ritorno ai valori di controllo al settimo giorno; a 1 mGy si ha l'effetto contrario, con un decremento delle inversioni nei primi 3 giorni, mentre alla dose di 1 Gy l'incremento si ha solo a partire dal settimo giorno [10]. Questo effetto di diminuzione delle inversioni di pKZ1 alle basse dosi può essere interpretato come diminuzione del numero di cellule che presentano inversioni, grazie alla eliminazione delle cellule pre-tumorali indotta dalle basse dosi di radiazione, fenomeno che *in vitro* è stato verificato da Portess [11]. Queste cellule

potrebbero essere eliminate per apoptosi, ma a queste basse dosi l'incremento atteso di apoptosi dovuto agli effetti diretti dovrebbe essere molto piccolo. Il gruppo della Flinders University ha utilizzato, per studiare questi effetti, un approccio consistente in un saggio TUNEL *in situ*. Questo approccio prevede l'analisi di un minimo di 110000 cellule per avere una precisione dello 0.001%. Tuttavia, utilizzando 274 topi wt, solamente la dose più alta di radiazione (1Gy) ha dimostrato essere in grado di indurre un incremento significativo di apoptosi. Una stima del numero di topi necessari a rilevare cambiamenti nelle frequenze di apoptosi, calcolate tramite il modello LNT, mostra quanto sia difficile rilevare cambiamenti con tecniche biologiche convenzionali a dosi molto basse (12.325 topi per una dose di 1 mGy e 123.249.910 topi per una dose di 0.01 mGy), poiché i cambiamenti che avvengono ricadono nella fascia dei normali cambiamenti omeostatici.

Il modello pKZ1, invece, è un modello molto sensibile che permette di rilevare una modulazione significativa anche a bassissime dosi. Nei suoi esperimenti, la Sykes ha visto un'incremento delle inversioni di pKZ1 con alte dosi di raggi X, di etoposide, mitomicina C, ciclofosfamide e cloruro di metilene, ma anche con l'invecchiamento, con l'over-espressione di c-myc e con bassissime dosi di raggi X; un decremento del numero di inversioni è stato invece rilevato con basse dosi di raggi X, etoposide e mitomicina C, ma anche a seguito della perdita del gene msh-2 e del gene TP53 e dell'espressione dell'antigene SV40T.

Ad oggi, il meccanismo di azione del transgene pKZ1 è ancora da chiarire. Si sa che avviene trascrizione del gene reporter (beta-galattosidasi) a seguito di inversione mediata probabilmente dal sistema di riparo del danno al DNA, "non-homologous End-Joining" (NHEJ), ma la trascrizione può essere mediata anche da un promotore criptico in assenza di inversione. Inoltre l'espressione del gene pKZ1 è affetta da agenti demetilanti e da inibitori dell'istone deacetilasi.

Cio' che si sa con certezza è che questo modello è l'unico a permettere analisi di dosi (10^{-4} - 10^{-6} Gy) e ratei di dose (10^{-3} - 10^{-4} Gy/hr) estremamente bassi. In futuro, ci si propone di studiare il comportamento cellulare e di verificare una variazione della risposta adattativa in assenza del condizionamento dovuto alla radiazione di fondo presente sulla terra. Questo lavoro, in collaborazione con il Centro Fermi, l'Istituto superiore di Sanità, l'INFN, l'Università dell'Aquila e l'ENEA, riprenderà gli studi già effettuati da Satta et al. su diversi modelli sperimentali [12] [13] [14], allo scopo di confermare che la radiazione ambientale è indispensabile per una efficiente risposta adattativa e di studiare approfonditamente i meccanismi di omeostasi e di protezione verso il danno.

Referenze

1. DOE Low Dose Radiation Research Program <http://low-dose.energy.gov/>
2. Taylor ML, Kron T. (2011), *Consideration of the radiation dose delivered away from the treatment field to patients in radiotherapy*. J Med Phys. 36, 59-71.
3. Brenner DJ, Hall EJ. (2007), *Computed tomography—an increasing source of radiation exposure*. N Engl J Med. 357, 2277-84.
4. Scott BR, CL Sanders, REJ Mitchel and DR Boreham. (2008), *CT scans may reduce rather than increase the risk of cancer*. J Am Physicians and Surg 13, 8-11.
5. Mitchel R.E.J., Jackson J.S., Morrison D.P. and Carlisle S.M.. (2003), *Low doses of radiation increase the latency of spontaneous lymphomas and spinal osteosarcomas in cancer prone, radiation sensitive Trp53 heterozygous mice*. Radiation Research 159, 320-327.
6. Nomura T, Li XH, Ogata H, Sakai K, Kondo T, Takano Y, Magae J. (2011), *Suppressive effects of continuous low-dose-rate γ irradiation on diabetic nephropathy in type II*
7. Fratini E, Licursi V, Artibani M, Kobos K, Colautti P, Negri R., Amendola R (2011), *Dose-Dependent Onset of Regenerative Program in Neutron Irradiated Mouse Skin*.
8. Zeng, G., Day, T.K., Hooker, A.M., Blyth, B.J., Bhat, M., Tilley, W.D., & Sykes, P.J., (2006), *Non-linear chromosomal inversion response in prostate after low dose X-radiation exposure*. Mutation Research 602, 65-73.
9. Day T.K., Zeng G., Hooker A.M., Bhat M., Scott B., Turner D.R., & Sykes P.J., (2007), *Adaptive response for chromosomal inversions in pKZ1 mouse prostate induced by low doses of X radiation delivered after a high dose*. Radiation Research, 167, 682-692.
10. Staudacher A., Blyth B.J., Lawrence M.D., Ormsby R.J., Bezak E., & Sykes P.J., (2010), *If bystander effects for apoptosis occur in spleen after low-dose irradiation in vivo then the magnitude of the effect falls within the range of normal homeostatic apoptosis*. Radiation Research, 174.
11. Portess DI, Bauer G, Hill MA, O’Neill P. (2007), *Low-dose irradiation of nontransformed cells stimulates the selective removal of precancerous cells via intercellular induction of apoptosis*. Cancer Res. 67, 1246-53.
12. Satta L., Augusti-Tocco G., Ceccarelli R., Esposito A., Fiore M., Paggi P., Poggesi I., Ricordy R, Scarsella G. and Cundari E.. (1995), *Low environmental radiation background impairs biological defence of the yeast Saccharomyces cerevisiae to chemical radiomimetic agents*. Mutat Res 347, 129-133.
13. Satta L., Antonelli F., Belli M., Sapora O., Simone G., Sorrentino E., Tabocchini M. A., Amicarelli F., Ara C., et al. (2002), *Influence of a low background radiation environment on biochemical and biological responses in V79 cells*. Radiat Environ Biophys 41, 217-224.
14. Carbone M. C., Pinto M., Antonelli F., Balata M., Belli M., Conti Devirgiliis L., Sapora O., Sorrentino E., Simone G., Tabocchini M. A. and Satta L.. (2010), *Effects of deprivation of background environmental radiation on cultured human cells*. Il Nuovo Cimento 125, 469-47.

Supporto SIRR per giovani ricercatori al 14th ICRR

Quattro ricercatori italiani hanno ricevuto il supporto finanziario offerto dalla SIRR per la presentazione dei loro lavori al 14th International Congress of Radiation Research (Varsavia, 28 agosto - 1 settembre 2011).

Nel primo (in ordine alfabetico) dei lavori premiati, dal titolo “*In vitro enhancement of TMZ-induced glioma cell killing by high-LET radiation*”, I. Improta (INFN, Sezione di Napoli) e colleghi presentano i risultati di esperimenti che si propongono di verificare se fasci di ioni carbonio, quali quelli che sono utilizzati in adroterapia, potenziano l’azione radiosensibilizzante del farmaco Temozolomide nella cura dei gliomi, tumori cerebrali dalla prognosi particolarmente infausta data la loro refrattarietà al trattamento radioterapico convenzionale con fotoni. L. Mariotti (Dipartimento di Fisica Nucleare e Teorica, Università degli Studi di Pavia e INFN-Pavia) e collaboratori presentano un lavoro dal titolo “*Investigation of signaling perturbation in cells exposed at low doses of ionizing radiation*” in cui vengono investigati i meccanismi alla base dell’effetto bystander mediati dal rilascio di vari fattori molecolari nel terreno di coltura da parte di cellule irraggiate, con particolare enfasi sul ruolo di citochine quali COX-2 e NOS.

“*Alanine/ESR Dosimetry for Electron Intra-Operative Therapy (ELIOT)*” è il titolo del lavoro di M. Marrale e colleghi (Università di Palermo, Dipartimento di Fisica), che illustra un’applicazione del sistema dosimetrico alanina/ESR alla radioterapia intraoperatoria realizzata con fasci di elettroni ad elevatissimo rateo di dose; la linearità della risposta è analizzata per dosi inferiori a 40 Gy nel caso del trattamento di tumori senologici, ed è comparata sia con risultati presenti nella letteratura sia con quelli ottenuti mediante simulazioni Monte-Carlo. Infine, in “*Investigation of the neutron beam of an accelerator-based BNCT facility by means of a Bonner sphere spectrometer*”, N. Mirzajani e collaboratori (Università di Pisa, Dipartimento di Ingegneria Nucleare, Meccanica e della Produzione) mostrano un’applicazione dello spettrometro a multisfera (BSS) per ottenere delle informazioni energetiche e dosimetriche su un flusso di neutroni prodotto in una reazione ${}^9\text{Be}(p,xn)$ di interesse per la Boron Neutron Capture Therapy. Questo lavoro, che si inquadra nell’ambito del progetto SPES-BNCT condotto presso i laboratori LNL-INFN di Legnaro, si propone, in particolare, di verificare la risposta dello spettrometro BSS per neutroni di bassa energia (< 100 keV).

A cura di Lorenzo Manti



EUROPEAN RADIATION RESEARCH 2012

39th Annual Meeting of the European Radiation Research Society



Vietri sul Mare, Italy, October 15 -19, 2012

TOPICS

**Radiation physics, Radiation chemistry, DNA damage and repair,
Low dose/dose-rate effects, Genomic instability, Bystander effect
and radio-adaptation, Non-cancer effects, Radiation sensitizers,
Stem cells, Radiation carcinogenesis, Biological dosimetry,
Radiation protection, Accidents and consequence management,
Non-ionising radiation, Radioecology, Pharmacological
modulation of radiation damage, Radiation oncology,
Normal tissue damage, Hadrontherapy, Space radiation**

web site: <http://www.iss.infn.it/err2012>