



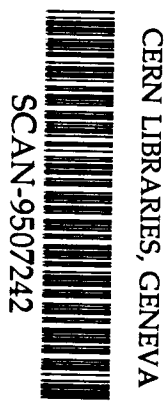
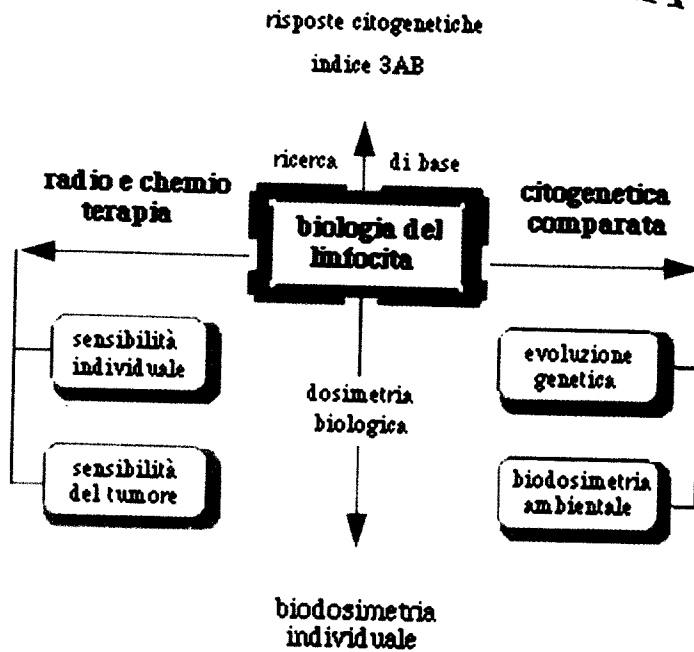
# Laboratori Nazionali di Frascati

LNF-95/017 (IR)  
27 Aprile 1995

## Nuove Metodologie di Dosimetria Biologica Applicabili alla Protezione della Salute dell'Uomo

Carlo Catena<sup>o</sup>, Daniela Conti<sup>oo</sup>, Patrizia Parasacchi<sup>o</sup>, Enzo Righi<sup>oo</sup>  
<sup>o</sup> AMB-BIO, ENEA CR Casaccia, Roma  
<sup>oo</sup> Servizio Medicina del Lavoro, INFN Frascati, Roma

### RADIOPATOLOGIA



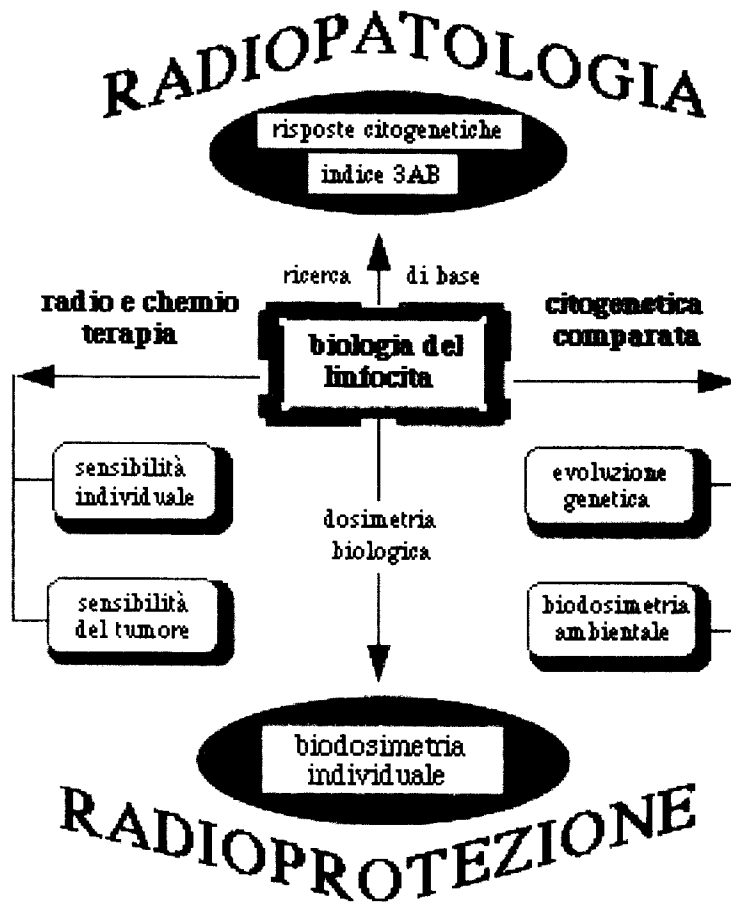
SW 9531

### RADIOPROTEZIONE

# Nuove Metodologie di Dosimetria Biologica Applicabili alla Protezione della Salute dell'Uomo

## *Biodosimetria delle radiazioni ionizzanti*

Carlo Catena<sup>o</sup>, Daniela Conti<sup>oo</sup>, Patrizia Parasacchi<sup>o</sup>, Enzo Righi<sup>oo</sup>  
<sup>o</sup> AMB-BIO, ENEA CR Casaccia, Roma  
<sup>oo</sup> Servizio Medicina del Lavoro, INFN Frascati, Roma



**Programma di ricerca INFN-ENEA**  
Delibera ENEA n. 129/CA del 4 maggio 1993  
Delibera INFN n. 4532 del 29 settembre 1993  
Approvazione dei Ministeri Vigilanti il 5 maggio 1994

Hanno partecipato alle attività di ricerca sulle varie tematiche sviluppate nell'ambito del programma INFN-ENEA:

B. Bortolato, M. Botturi, M. Leoni, P. Marengo;

• *Istituto di Radioterapia Oncologica dell'Ospedale Civile "Niguarda Ca'Granda", Milano.*

P.G. Paleani Vettori, M. Portaluri;

• *Divisione di Radioterapia Oncologica dell'Ospedale "Casa Sollievo della Sofferenza", San Giovanni Rotondo (Foggia).*

B. Galassi, A. Scanni ;

• *Servizio di Oncologia Medica dell'Ospedale "Fatebenefratelli", Milano.*

V.A. Righi, G. Ronga, G. Salerno;

• *Servizio di Medicina Nucleare della II Clinica Medica, Univ. "La Sapienza", Roma.*

A. Antoccia, C. Tanzarella;

• *Cattedra di Radiogenetica dell'Università "La Sapienza", Roma.*

R. Archilei;

• *Centro Studi del Corpo Veterinario dell'Esercito, Roma.*

L. Asprea, S. Carta, G. Tortora;

• *Servizio Veterinario dell'Arma dei Carabinieri.*

Si ringraziano per l'adesione e la collaborazione:

G. Trenta;

• *Div. di Medicina e Radioprotezione, Agenzia Nazionale per la Protezione dell'Ambiente (ANPA), Roma.*

A.M. Alberti, L. De Sio, C.M. Foggi;

• *Divisione di Oncologia Medica dell'Ospedale "San Filippo Neri", Roma.*

L. Gatta ;

• *Servizio di Analisi Cliniche dell'Ospedale "San Filippo Neri", Roma.*

Si ringraziano inoltre, la Sig.ra Paola Rufini e la Sig.ra Patrizia D'Acuti per il valido supporto tecnico e di segreteria, la Dr.ssa Carolina Kent per la revisione delle nostre pubblicazioni in lingua inglese.

## Nuove Metodologie di Dosimetria Biologica Applicabili alla Protezione della Salute dell'Uomo

### Riassunto

La dosimetria biologica è una metodologia diagnostica finalizzata principalmente alla valutazione della dose assorbita in caso di sovraesposizione accidentale alle radiazioni ionizzanti.

Si pone in evidenza come studi radiobiologici (e chemiobiologici) *in vitro*, eseguiti con metodologie citogenetiche su linfociti umani di soggetti sani o di soggetti sottoposti a radioterapia (o a chemioterapia), così come su linfociti di mammiferi non umani (citogenetica comparata), possano contribuire a maturare importanti informazioni scientifiche di radiobiologia (e di chemiobiologia) di base.

Queste ricerche, oltre a fornire un valido contributo per una migliore conoscenza dell'azione delle radiazioni ionizzanti (o dei farmaci) sulla cellula, vengono ad essere vantaggiosamente trasferite, di ritorno, alla radioprotezione (e alla chemioprotezione) operativa dell'uomo.

I nostri studi citogenetici riguardano in particolare: a) la dosimetria biologica (stima della dose ricevuta in eventi accidentali); b) la radiosensibilità individuale (livello di risposta del singolo soggetto); c) la radiobiologia e la chemiobiologia clinica (risposta individuale a radiofarmaci, a radioterapia e a chemioterapia); d) la radiobiologia comparata (studio citogenetico su specie diverse dall'uomo); e) il modello animale nella sorveglianza ambientale.

**Parole chiave:** metodo dei micronuclei, indice 3AB, dosimetria biologica, radiosensibilità, predittività in oncologia.

## New Methodologies of Biological Dosimetry Applied to Human Protection

### Summary

Biological dosimetry is a diagnostic methodology for the measurement of the individual dose absorbed in the case of accidental overexposure to ionizing radiation.

It is demonstrated how "in vitro" radiobiological and chemobiological studies using cytogenetic methods (count of chromosomal aberrations and micronuclei) on human lymphocytes from healthy subjects and individuals undergoing radiotherapy or chemotherapy, as well as on lymphocytes of mammals other than man (comparative cytogenetics), can help to increase the basic radiobiological and chemobiological scientific information.

Such information gives a valid contribution to our understanding of the action of ionizing radiation or of pharmaceuticals on cells and, in return, can be of value to human radioprotection and chemoprotection.

Cytogenetic studies can be summarized as follows: a) biodosimetry (estimate of dose received after accidental events); b) individual radiosensitivity (level of individual response); c) clinical radiobiology and chemobiology (individual response to radiopharmaceuticals, to radiotherapy and to chemopharmaceuticals); d) comparative radiobiology (cytogenetic studies on species other than man); e) animal model in the environmental surveillance.

**Key words:** micronucleus test, 3AB-index, biological dosimetry, radiosensitivity, predictivity assay.



## INDICE

• <b>Riassunto/Summary</b> .....	5
• <b>Introduzione</b> .....	7
• <b>Dosimetria biologica</b> .....	10
• Metodo dei dicentrici.....	13
• Metodo dei micronuclei.....	19
• Consecutio methodologica.....	24
• Calcolo della dose (DOSIME).....	25
• <b>Radiosensibilità individuale</b> .....	28
• Riferimenti scientifici.....	28
• Cenni sulla radiosensibilità cellulare.....	31
• Metodo dei micronuclei e indice 3AB.....	35
• Altre metodiche applicative.....	36
• <b>Biodosimetria clinica</b> .....	42
• Medicina nucleare oncologica.....	42
• Radioterapia oncologica.....	45
• Oncologia medica (chemioterapia).....	49
• <b>Citogenetica comparata</b> .....	55
• Modello animale 1.....	55
• Modello animale 2.....	57
• <b>Conclusioni</b> .....	60
• <b>Glossario</b> .....	62
• <b>Bibliografia</b> .....	63



## INTRODUZIONE

*"Dans les deux cas des dosimetries biologique et clinique, à l'opposé de la dosimétrie physique, l'individu irradié "est son propre dosimètre"....."*

*C. Pasquier et R. Masse, 1991*

La radioprotezione è la disciplina che studia l'impatto sanitario delle radiazioni ionizzanti (r.i.) sull'uomo e il suo ambiente. La sua finalità prioritaria è la preservazione dello stato di salute dei lavoratori e della popolazione riducendo i rischi sanitari derivanti dall'esposizione alle r.i..

Il tema delle nostre ricerche, impostato nel 1990, riguarda la radioprotezione sotto il profilo delle nuove metodologie di dosimetria biologica applicabili alla protezione della salute dell'uomo. Per dosimetria biologica s'intende l'insieme delle metodiche che permettono una correlazione misurabile tra dose assorbita ed eventi biologici radioindotti. Indicazione fondamentale della dosimetria biologica è la sovraesposizione certa o presunta, allo scopo di acquisire dati utili ai fini prognostici e terapeutici. L'importanza della metodica biodosimetrica, che affianca o integra la dosimetria fisica completandola nei casi ove essa sia dubbia o mancante, è dimostrata dalla notevole presenza sul territorio nazionale di lavoratori "esposti" (stimabile intorno a 100000 soggetti presenti nei settori dell'industria, della sanità, della ricerca, dei servizi, etc.). Stime biodosimetriche sono applicabili anche all'evenienza di una irradiazione della popolazione comune. Di particolare interesse sono inoltre gli studi di dosimetria biologica mirati alla risposta individuale di pazienti sottoposti a trattamenti radioterapici (figura 1).

Per acquisire una più ampia conoscenza scientifica nel campo della dosimetria biologica abbiamo sviluppato linee sperimentali finalizzate: a) alla salvaguardia della salute dell'uomo dagli effetti delle r.i. ed eventualmente di altri agenti nocivi fisici e chimici; b) all'innovazione metodologica nell'ambito della dosimetria biologica. Per raggiungere tali scopi le attività di studio



comprendono in particolare: 1) la raccolta e l'elaborazione dei dati disponibili in materia; 2) lo svolgimento di attività sperimentali di laboratorio per la messa a punto di nuove metodologie e per la verifica della loro applicabilità; 3) lo sviluppo in molteplici settori della metodica dei micronuclei per la misura degli effetti delle r.i. e della radiosensibilità individuale; 4) la verifica dell'applicabilità delle nostre metodiche di dosimetria citogenetica alla misura di effetti di agenti diversi dalle r.i..



Fig. 1 - Radioesposizione di coorti di individui.

Nel complesso la nostra linea di ricerca, inizialmente giustificata da prevalenti motivazioni di ordine biodosimetrico riguardanti l'esposizione professionale alle r.i. (soprattutto per quanto concerne eventi di natura accidentale) (Catena e Righi, 1993a; Catena et al., 1993b; Gelas et al., 1994), si è presto estesa al delicato problema biologico e bioetico della risposta individuale all'irradiazione (radiosensibilità individuale) (Catena et al. 1992a; 1994b). E' anche da rilevare l'interesse di quotati laboratori di ricerca internazionali per questo stesso tema (Workshop Report, 1992; Workshop Report, 1993; Annual Meeting ARR, 1994; Workshop Report, 1994). Tutto ciò nella preoccupazione che individui o sottogruppi della popolazione risultanti maggiormente radiosensibili possano essere meno tutelati dalle comuni misure protezionistiche. Questo concetto è stato autorevolmente ripreso dalla "Organization de Cooperation et de Developpement Economiques" (OCDE) che attraverso la sua Agenzia per l'Energia Nucleare (AEN) ha ben delineato la situazione della radioprotezione alle soglie del XXI secolo (AEN, 1994). In particolare è stato posto in evidenza che: 1) i risultati delle ricerche biologiche possono apportare una migliore comprensione dei meccanismi genetici di induzione del tumore; 2) ricerche recenti sembrano indicare la presenza in alcuni individui di una radiosensibilità nettamente più elevata rispetto alla norma; se queste ricerche saranno confermate avranno un impatto significativo sulla gestione del sistema della radioprotezione; 3) la risposta adattativa, ovvero la stimolazione di meccanismi di riparazione cellulare alle basse dosi, può modificare il concetto e la valutazione del

detrimento individuale com'è oggi inteso. Questi nuovi orientamenti scientifici potranno essere la base per nuove impostazioni in campo radioprotezionistico, in particolare per quanto riguarda i danni tardivi (stocastici).

Più recentemente sono state effettuate valutazioni citogenetiche su linfociti di soggetti sottoposti a terapia radiometabolica con iodio-131 e a radioterapia per patologie neoplastiche (Catena et al., 1994a; submitted,a). Queste esperienze, tuttora in corso, dimostrano come le metodologie citogenetiche possano fornire utili indicazioni anche sulla risposta individuale alla terapia. Nel contempo, in considerazione dei risultati conseguiti in questo particolare settore clinico, i test citogenetici sono stati trasferiti anche nel campo della chemioterapia oncologica. Anche in questo ambito, fortemente eterogeneo per la diversità dei farmaci utilizzati, le risposte citogenetiche stanno fornendo interessanti indicazioni sugli effetti della terapia a livello individuale.

Queste metodologie biologiche sono state utilizzate inoltre per studi su mammiferi non umani che hanno confermato la coerenza e l'efficienza del sistema diagnostico citogenetico (Conti et al., 1992; Catena et al., 1993c; 1994c). Queste esperienze hanno consentito, tra l'altro, di individuare la possibilità di impiego del modello animale quale biossimetro ambientale in campo. Una circostanza favorevole ha voluto che nel Piano Sanitario Nazionale 1994-1996 (G.U.I. n.8 Suppl. Ord. n.8 del 12.1.1994) fosse espressamente citato il modello animale come possibile mezzo di sorveglianza ai fini della salvaguardia dell'ambiente.

Il programma di ricerca INFN-ENEA su: "Nuove metodologie di dosimetria biologica applicabili alla protezione della salute dell'uomo", istituzionalizzato con delibera ENEA n. 129/CA del 4 maggio 1993 e con delibera INFN n. 4532 del 29 settembre 1993, è stato approvato dai Ministeri Vigilanti il 5 maggio 1994. Il programma è stato inserito tra i Trasferimenti Tecnologici dell'INFN nell'ambito della collaborazione speciale con Enti Pubblici e Industria (Doc. INFN, gennaio 1995).

## DOSIMETRIA BIOLOGICA

*"...it is important to estimate the dose absorbed by exposed person in order to plan for their therapy..."*

IAEA, 1986

La dosimetria biologica è uno strumento diagnostico in Radiopatologia e in Radioprotezione capace di integrare e talvolta sostituire la dosimetria fisica, consentendo tra l'altro di ottenere importanti indicazioni sulle modalità di risposta a livello individuale o di gruppi a rischio. Pertanto, lo studio della dosimetria biologica delle radiazioni ionizzanti è ancora un tema di forte attualità in considerazione dell'uso delle radiazioni nel campo dell'industria, della medicina e della ricerca. E' da notare inoltre che sono presenti in Italia impianti nucleari di potenza e di ricerca attualmente disattivati che necessitano comunque di una costante sorveglianza e che costituiranno un complesso problema radioprotezionistico al momento del loro "decommissioning". Incidenti come quello di Chernobyl (1986) e della Goiania (1987) dimostrano che eventi di diversa natura (il primo per fusione di un reattore ed il secondo per una incauta manipolazione di una sorgente di Cesio radioattivo) hanno coinvolto non solo persone "professionalmente esposte" al rischio, ma soprattutto membri della popolazione comune (e come tali ovviamente non controllati mediante dosimetria fisica individuale). Non si può quindi escludere l'evenienza di dover affrontare con sistemi biodosimetrici problemi accidentali che coinvolgano un numero non esiguo di persone. Sul piano organizzativo è necessario che le scelte privilegino metodologie ben validate e tali da fornire risultati utili in termini di fattibilità, di significatività e di accettabilità dei costi. E' indispensabile pertanto che siano predisposti interventi di informazione e formazione allo scopo di garantire un corretto apprezzamento da parte degli operatori sanitari del significato dei dati clinici e citologici dose-dipendenti (effetti e danni deterministici), come pure che siano individuate le istituzioni che possano assicurare in caso di necessità e con modalità logistiche preventivamente concordate stime di dose su base citogenetica (dosimetria citogenetica).

In questa impostazione organizzativa deve essere compresa, oltre all'ipotesi di incidenti coinvolgenti un singolo caso o pochi casi, anche la previsione di una improvvisa e massiccia richiesta di accertamenti, come può avvenire in seguito ad una emergenza nucleare. In questa prospettiva deve essere anche considerata la quota derivante da sollecitazioni "calde" sociopolitiche che andrebbe ad aggiungersi alle indicazioni "fredde" proprie della radioprotezione. Ne consegue che la competenza biodosimetrica, e in particolare la dosimetria citogenetica, deve poter contare su di una precisa identificazione delle strutture e dei mezzi, su di una chiara operatività e su di una persistente validazione, con ciò evitando che gli effetti deleteri dell'improvvisazione vadano ad aggiungersi, peggiorandoli, ai danni accidentali. E' anche vero che la rarità degli eventi di sovraesposizione limita ovviamente la richiesta di tali accertamenti diagnostici. Questo implica la necessità che la competenza in materia, certamente di grande rilevanza radioprotezionistica, venga concentrata e conservata in pochissime istituzioni qualificate che dovrebbero essere nel contempo opportunamente sostenute sul piano delle risorse.

Sul piano istituzionale e operativo si richiama la strategia organizzativa che caratterizza il "Centre International de Radiopathologie" (CIR) di Parigi (convenzionato con l'OMS), di cui l'Istituto Curie è una componente essenziale, nonché i criteri e i metodi adottati dai laboratori di dosimetria biologica del National Radiological Protection Board (NRPB), in Harwell, Oxon, Gran Bretagna. Parimenti interessanti in ambito europeo risultano le iniziative scientifiche a suo tempo intraprese nella Germania Federale dalla Commissione per la Protezione Radiologica del Ministero Federale degli Interni per valutare lo stato dell'arte delle metodologie biologiche per la valutazione della dose, ai fini delle applicazioni pratiche, dell'uniformità dei criteri e della scelta di programmi di ricerca. Negli Stati Uniti ha assunto un'importanza di grande rilievo nel campo della dosimetria biologica il "Radiation Emergency Assistance Centre and Training Site" (REAC/TS) di Oak Ridge, Tennessee.

In ambito nazionale la ricerca biodosimetrica viene svolta soltanto presso alcuni Istituti scientifici e comunque al di fuori di un piano organico che abbia, ad esempio, i requisiti di un "progetto finalizzato". Inoltre, pur escludendo, in quanto realisticamente non giustificata, una permanente ed esclusiva struttura di servizio allo scopo dedicata, è tuttora mancante un meccanismo istituzionalizzato capace di convertire competenze scientifiche in pronte ed efficienti disponibilità operative, con modalità tali da soddisfare la vasta gamma delle peculiari esigenze (geografiche, tecniche, temporali e quantitative) determinate da incidenti certi o presunti da sovraesposizione alle radiazioni ionizzanti.

Identificato sinteticamente lo scenario strutturale in cui viene ad articolarsi la competenza biodosimetrica, deve essere precisato preliminarmente che sono molteplici i fenomeni a carattere clinico, citologico, citogenetico, biochimico, immunologico e genetico (mutazionale) che possono assumere, in quanto opportunamente correlabili all'entità dell'irradiazione, la funzione di indicatori biologici per la valutazione della dose (tabella 1). E' tuttavia opportuno che tali indicatori abbiano requisiti metodologici tali da garantire una adeguata fattibilità cioè una utile e rapida attuabilità nelle diverse tipologie di sovraesposizione accidentale (tabella 2).

Tab. 1 - Indicatori clinico-biologici.

<b>Clinici</b>	sintomi prodromici, radiolesioni cutanee opacità del cristallino
<b>Citologici</b>	linfopenia e ipergranulocitosi iniziali, piastrinopenia e leucopenia (curve neutropeniche)
<b>Citogenetici</b>	aberrazioni cromosomiche e micronuclei
<b>Biochimici</b>	amilasemia, timidinemia, spindosimetria, azione delle lectine sulle piastrine, sulle emazie e sui linfociti
<b>Immunologici</b>	modificazione delle popolazioni linfocitarie con alterazioni delle loro funzioni
<b>Genetici</b>	monitoraggio di eventi mutazionali quali la resistenza alla 6-tioguanina e le mutazioni della glicoforina A eritrocitaria

Capitolo preminente della dosimetria biologica è la dosimetria citogenetica che rappresenta un supporto diagnostico fondamentale nell'ambito della radioprotezione medica. Le principali applicazioni della dosimetria citogenetica sono le seguenti:

- 1) accertamento e valutazione di sovraesposizione accidentale certa o presunta in assenza di dati della dosimetria fisica per mancato uso in zona controllata del dosimetro personale;
- 2) accertamento e valutazione di sovraesposizione accidentale certa o presunta di persone operanti in zone dove non è prevista la dosimetria fisica individuale, ma soltanto quella ambientale;
- 3) controllo di risultati dubbi della dosimetria fisica per motivi diversi, comprese le esposizioni "spurie" e le esposizioni del dosimetro ad agenti chimici o ad agenti fisici di altra natura;
- 4) necessità di integrazioni dosimetriche di ordine biologico ai fini diagnostici, prognostici e terapeutici in soggetti irradiati;
- 5) valutazione sul coinvolgimento della popolazione in seguito ad emergenze nucleari.

Tab. 2 - Criteri di valutazione degli indicatori biologici.

- accesso diagnostico (stress e/o dolore);
- modalità del prelievo (tempo e difficoltà);
- sensibilità del metodo (intervallo di dose);
- conoscenza della relazione dose-effetto;
- fattori di interferenza;
- tempo minimo per l'ottenimento del risultato;
- tempo di applicabilità dopo l'esposizione;
- fattibilità sperimentale (individui/giorno/esaminatore).

Accanto a queste applicazioni a carattere più propriamente operativo, va sottolineata anche la funzione psicologica delle indagini biodosimetriche citogenetiche, in quanto sostanzialmente caratterizzate dalla proprietà generalmente rassicurante del tradizionale intervento di diagnostica medica.

### *Metodo dei dicentrici*

Una esposizione alle radiazioni ionizzanti induce, a livello del DNA, un danno citogenetico facilmente osservabile come aberrazione cromosomica o come micronucleo.

Il dicentrico è l'aberrazione cromosomica elettiva per la dosimetria citogenetica delle radiazioni ionizzanti (Lloyd e Purrot, 1981; Righi, 1987). Il dicentrico si forma dalla ricongiunzione di due cromosomi che abbiano subito nello stadio G<sub>0</sub> (o G<sub>1</sub>), ad opera delle radiazioni ionizzanti, la rottura di uno dei due segmenti che li compongono. I preparati citologici osservati in microscopia ottica mostrano le piastre metafasiche che possono contenere uno o più dicentrici (DIC) facilmente riconoscibili per la loro caratteristica forma a "caramella" (presenza dei due centromeri ben evidenti).

La cellula risultata maggiormente adatta per misure biodosimetriche è il linfocita. Infatti, il linfocita è di per sé un eccellente biodosimetro circolante per le seguenti proprietà: 1) la sua equidistribuzione nel corpo intero (continuo rimescolamento linfocitario); 2) la sua caratteristica di "resting cell" che gli permette di "memorizzare" il danno indotto dalla irradiazione per esprimerlo in un secondo tempo nella fase mitotica, con andamenti dose-dipendenti e parasincroni, dopo manipolazione "in vitro" (fibroblastizzazione) e blocco in metafase (figura 2).

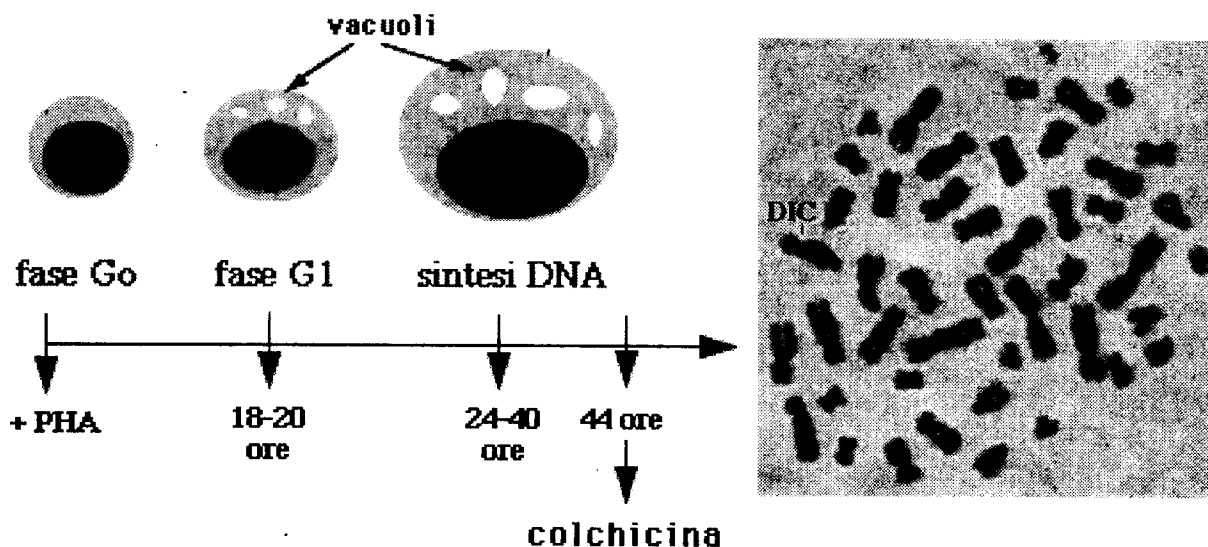


Fig. 2 - Fitostimolazione del linfocita e suo blocco in metafase mediante colchicina. DIC: dicentrico.

E' possibile costruire una curva di calibrazione "in vitro", specifica della relazione dose-effetto, in quanto è stata ampiamente dimostrata la confrontabilità della frequenza delle aberrazioni cromosomiche dopo irradiazione "in vivo" e "in vitro".

Bender (1957) con esperienze condotte "in vitro" e "in vivo" su cellule di midollo osseo osservava, a parità di dose, eguali risposte citogenetiche nelle due condizioni. Tra il 1963 ed il 1975 sono state condotte numerose esperienze in tal senso, sia su animali da laboratorio che su individui irraggiati per cause accidentali o per esposizioni terapeutiche, correlate ad un'accurata dosimetria fisica. I dati sperimentali hanno confermato ampiamente la stretta equivalenza dell'effetto citogenetico (Buckton, 1983; Bender et al., 1988).

La dimostrazione del "teorema fondamentale" della dosimetria citogenetica (equivalenza tra irradiazione "in vivo" e "in vitro") autorizza quindi ad elaborare le curve di calibrazione del sistema biodosimetrico attraverso l'irradiazione "in vitro" di sangue sottoposto a dosi sequenziali progressive. La grandezza in tal modo misurabile è la "dose al corpo intero equivalente" (equivalent whole body dose).

La curva di calibrazione per la dosimetria citogenetica costituisce un riferimento fondamentale e indispensabile che ogni laboratorio di biodosimetria deve necessariamente acquisire in proprio, adottando ben definiti criteri di elaborazione. E' da ricordare che l'andamento delle curve di calibrazione sono dipendenti dal tipo di radiazione (a diverso LET), come pure dal rateo di dose (figura 3). Utilizzare curve di calibrazione altrui

significherebbe inficiare la stima biodosimetrica con innumerevoli e spesso imponderabili fattori di confondimento di ordine metodologico. Il nostro gruppo di studio ha elaborato per i dicentrici una propria curva di calibrazione per radiazioni a basso LET (raggi X e gamma) e per dosi fino a 1,5 Gy (figura 4). Sono in corso di allestimento altre curve di calibrazione per sorgenti diverse.

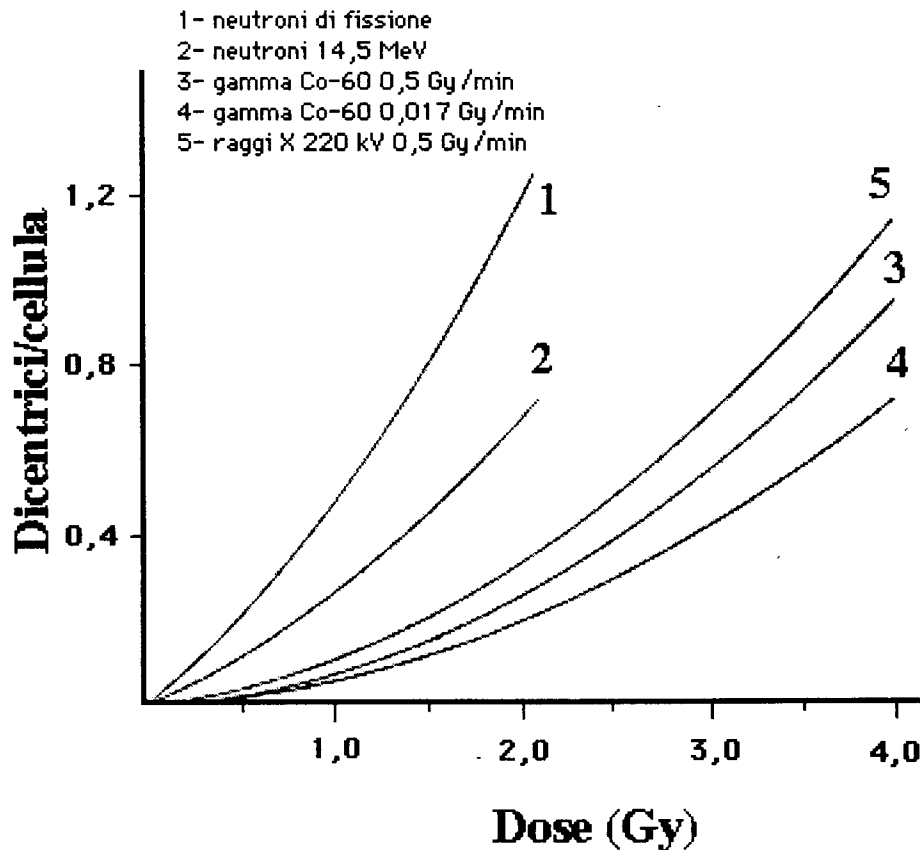


Fig. 3 - Curve dose-effetto riferite a differenti tipi di radiazioni (Bauchinger, 1984; ridisegnata).

Per quanto concerne l'interpretazione della variabilità del fenomeno si è ritenuto utile riportare nella tabella 3, per una analisi comparativa, i dati essenziali sulla frequenza dei dicentrici riferiti da altri Autori (o da noi ricostruiti partendo da loro dati). Dal confronto risulta evidente in primo luogo la disomogeneità dei dati riguardanti l'incidenza (frequenza) "spontanea" dei dicentrici. Da un valore nullo per individui neonati (Bender et al., 1988) si passa ad un valore piuttosto elevato di 0,005 per 21 soggetti adulti (Buckton et al., 1971). E' pur vero che il valore di 0,00078 ottenuto dall'esame di 2000



Tab. 3 - Frequenza dei dicentrici e coefficienti parametrici a confronto

Autori	Sogg.	Dic/met spontanei	Intervallo di dose (Gy)	Coefficienti parametrici		
				A	$\alpha$	$\beta$
Evans '67	-	-	1,2 - 4,0	-	0,290	0,007
Bender et al., '69	-	-	1,0 - 3,0	-	0,056	0,055
Sasaki '71	-	-	0,2 - 4,0	-	0,075	0,071
Buckton et al., '71	21	0,005	-	-	-	-
Linieki et al., '73	-	-	0,5 - 4,5	-	0,040	0,026
Lloyd et al., '75	-	-	0,05 - 8,0	-0,02	0,116	0,046
Linieki et al., '77	2	-	1,0 - 6,0	-0,03	0,025	0,031
Edwards et al., '80	-	-	0,05 - 4,0	0,0022	0,037	0,028
Lloyd et al., '80	2000	0,00078	-	-	-	-
Schmid et al., '76	-	-	0,25 - 4,0	-	0,054	0,079
Fantes et al., '83	4	-	0,5 - 4,0	0,0024	0,120	0,118
Bauchinger, '84	-	0,00038	0,5 - 4,0	-	0,040	0,060
Fabry et al., '86	-	-	0,05 - 2,0	-	0,060	0,044
IAEA '86	4	0,001	-	0,0005	0,016	0,049
Bender et al., '86	431	0,0017	-	-	-	-
Lloyd et al., '88	-	-	-	-	-	-
Bender et al., '88	44	0,0028	-	-	-	-
Bender et al., '88	4501*	0	-	-	-	-
Media		0,00167		-	0,077	0,051
ES		0,00066		-	0,022	0,008
<hr/>						
Nostri dati	20					
Media		0,0009	0,5 - 1,5	0,0021	0,046	0,040
ES					0,018	0,012

A,  $\alpha$  e  $\beta$ : coefficienti parametrici della curva meglio interpolante basata sul modello lineare-quadratico. \*Soggetti neonati.

individui (Lloyd et al., 1980) ha indubbiamente un peso notevole. Pertanto, in linea di massima appare accettabile, per individui adulti, una stima di un evento (dicentrico) per 1000 piastre metafasiche.

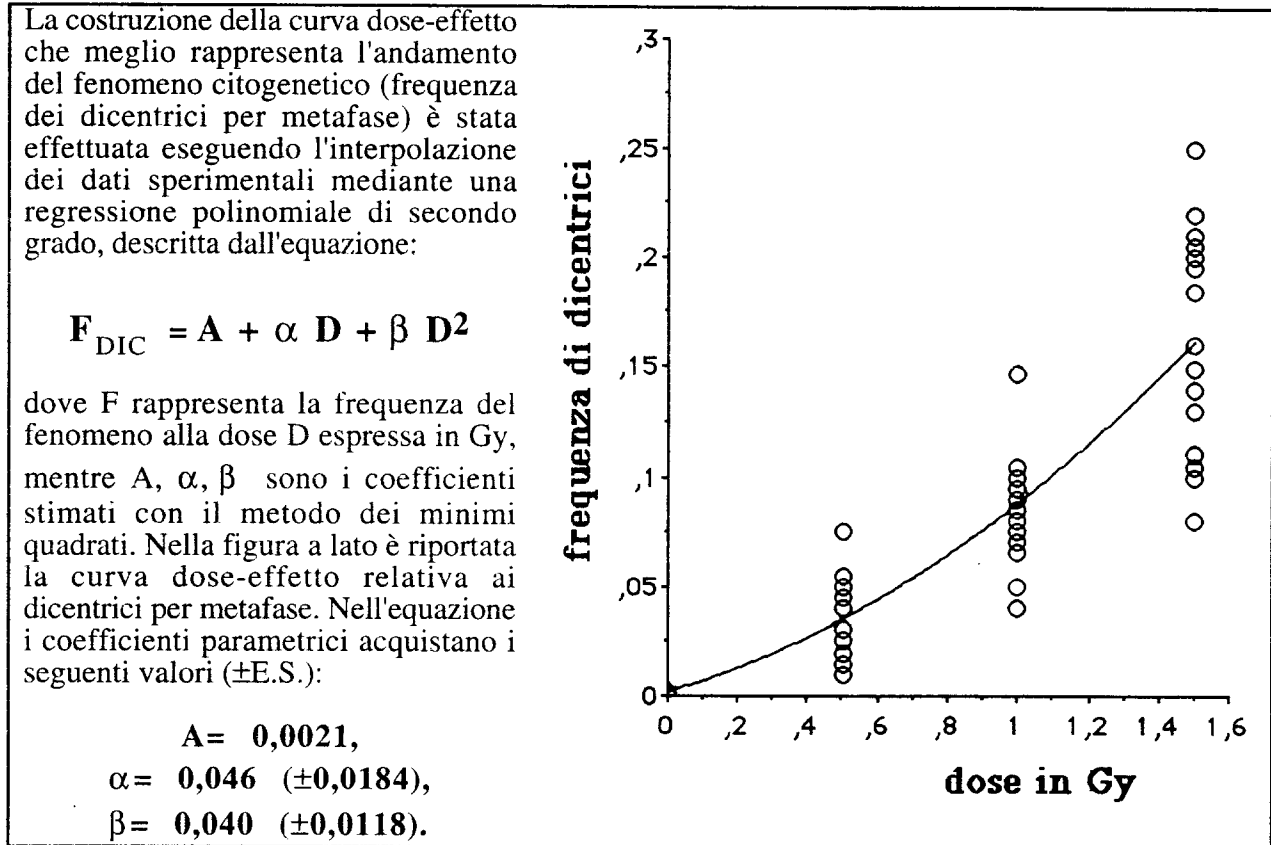


Fig. 4 - Curva di calibrazione della frequenza dei dicentrici in linfociti dopo trattamento "in vitro" con raggi X.

Proseguendo nel confronto tra i dati di vari Autori, la riscontrata variabilità dei valori dei coefficienti parametrici suggerisce ulteriori considerazioni: a) in termini di andamento delle curve dose-effetto, il modello polinomiale correla con buona approssimazione i dati sperimentali di ciascun Autore; b) le differenze tra i Laboratori possono ricollegarsi a variazioni del "modus operandi" (terreni di coltura, tipo di PHA, modalità di irraggiamento, etc.), peraltro di difficile comparazione; c) la diversità della risposta a livello individuale, rivalutata in questi ultimi anni, può dipendere fortemente dal campionamento degli individui da esaminare e può avere un ruolo prevalente come fattore di disomogeneità. Questa metodologia diagnostica è stata autorevolmente omologata a livello internazionale da un rapporto dell'IAEA nel quale sono riportati gli aspetti applicativi fondamentali della metodologia stessa (IAEA, 1986). In sede IAEA è stata anche sottolineata la necessità di

poter disporre in misura più ampia di mezzi che consentano di accelerare il riconoscimento e il conteggio delle metafasi e delle aberrazioni cromosomiche radioindotte, come pure è stata richiamata l'esigenza di identificare altri metodi più rapidi e meno laboriosi. Tentativi di automatizzare la lettura delle piastre metafasiche per il riconoscimento delle aberrazioni cromosomiche sono stati fatti da alcuni Autori (Finnon et al., 1986; Van Vliet et al., 1990). Al riguardo merita richiamare il contributo dato dal gruppo di ricerca CARIOPEPR (INFN-ENEA-SSN) che ha affrontato il problema avvalendosi del sistema PEPR (Precision Encoding and Pattern Recognition), costruito e già utilizzato presso i Laboratori Nazionali di Frascati dell'INFN per la misura automatica di immagini di eventi di alta energia (figura 5).

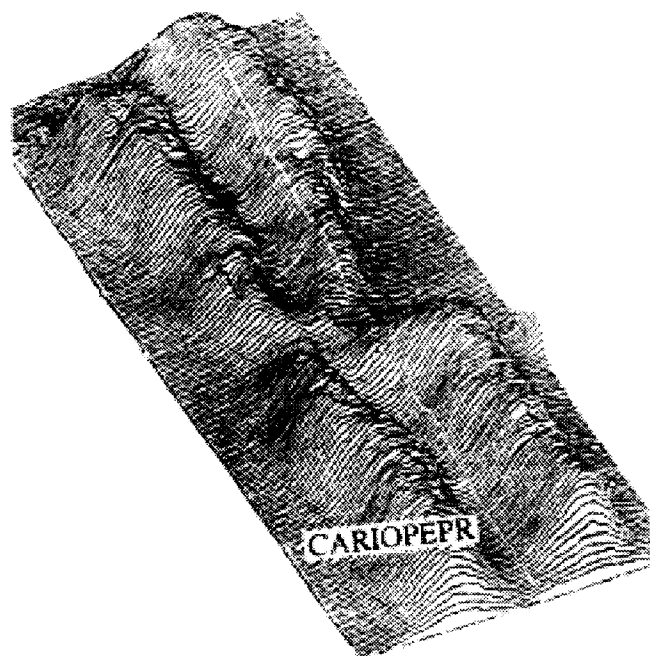


Fig. 5 - Profilo di densità di un cromosoma in metafase in rappresentazione tridimensionale (CARIOPEPR: programma di diagnostica SWPL).

Il gruppo di ricerca aveva tratto lo spunto per il suo studio da una analoga esperienza condotta presso l'Università di Nijmegen in Olanda con il sistema BIOPEPR realizzato per lo screening oncocitologico del cancro del collo dell'utero mediante sistemi automatizzati (CARIOPEPR, 1987). Sono disponibili in commercio diversi sistemi informatici per l'analisi semi-automatizzata dei cromosomi. Accanto agli indubbi vantaggi di tali sistemi vanno anche annoverate le non poche difficoltà di impiego connesse

soprattutto alla presenza di artefatti. Migliori prospettive sembrano derivare dai sistemi basati sulle reti neurali attualmente in studio (Chiarella, 1994).

### *Metodo dei micronuclei*

In questi ultimi anni la metodica dei micronuclei (MN-test) si è progressivamente affermata come valida alternativa alla metodica dei dicentrici in virtù della sua fattibilità più semplice e più rapida e di una sostanziale sovrapponibilità diagnostica.

Il micronucleo proviene da un frammento acentrico formatosi in seguito a rottura cromosomica oppure dall'isolamento di un intero cromosoma sganciato dal fuso mitotico (Ramalho et al., 1988). In quest'ultimo caso la segregazione deriva da un danno al cinetocoro o allo stesso apparato del fuso (Heddle et al., 1978). La conseguenza ultima di questi danni è la mancata incorporazione del materiale cromatinico nel nucleo della cellula figlia e la formazione di uno o più nuclei secondari avvolti da una propria membrana. Alcune misure effettuate sulla distribuzione del DNA nei micronuclei indicano che i micronuclei con sezione piccola derivano prevalentemente da frammenti acentrici, mentre quelli con sezione più grande derivano da cromosomi in seguito al danneggiamento delle fibre del fuso (Pincu et al., 1985). Si è valutato che circa il 20% dei frammenti acentrici in linfociti umani è in grado di produrre micronuclei. Poichè i micronuclei presentano una morfologia e una colorabilità simili a quelle dei nuclei principali, distinguendosi da essi solo per le dimensioni, è facile visualizzarli nel citoplasma con le tradizionali tecniche citogenetiche (Heddle et al., 1978).

Il metodo dei micronuclei, basato sulla metodica di Fenech e Morley (1985), consiste nel conteggio dei micronuclei (MN) in linfociti resi binucleati (CB) dopo blocco della citodieresi effettuato con citocalasina B (figura 6). Il metodo è piuttosto semplice e più rapido rispetto a quello dei dicentrici perchè, pur ripercorrendo alcuni momenti tecnici di quest'ultimo (fitostimolazione del linfocita "in vitro"), consente una lettura più facile e quindi più veloce dei preparati. Infatti, il tempo impiegato per osservare, su di un preparato citologico, un centinaio di cellule in metafase per la ricerca dei dicentrici (circa 8 ore/osservatore) è estremamente più elevato se confrontato con quello necessario per osservare un migliaio di cellule binucleate per la ricerca dei micronuclei (circa 20 minuti/osservatore).

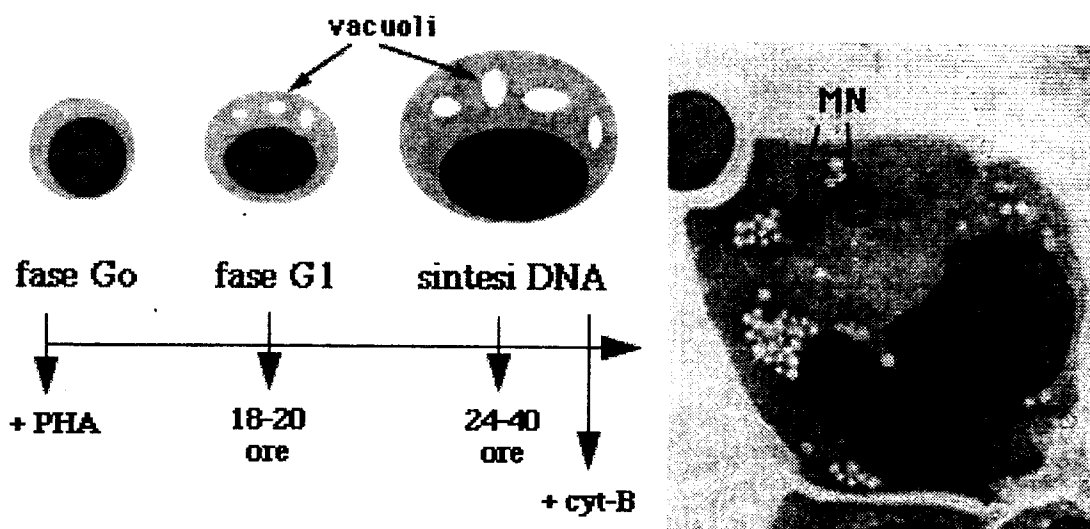


Fig. 6 - Fitostimolazione (PHA) del linfocita e blocco della citochinesi indotto dalla citocalasina B (cyt-B). MN: micronucleo.

Evans (1959) ha effettuato il primo tentativo di conteggio dei micronuclei allo scopo di verificare il danno citogenetico su apici radicali irraggiati con neutroni veloci e raggi gamma. Egli rilevò che le rotture cromatidiche e cromosomiche, come anche gli scambi simmetrici e asimmetrici, danno origine a frammenti acentrici. In alcuni casi essi vengono espulsi dai nuclei delle cellule figlie, apparendo nella successiva interfase come micronuclei. Successivamente, tra il 1973 ed il 1975, venne sviluppato un metodo, definito "micronucleus test", consistente nel conteggio dei micronuclei in eritroblasti policromatici estratti dal midollo osseo dei mammiferi (Schmid, 1982). Questa indagine quantitativa è resa possibile dalla comparsa dei micronuclei nei giovani eritrociti anucleati. Infatti, poche ore dopo il completarsi dell'ultima mitosi, gli eritroblasti perdono il loro nucleo, ma se è presente un micronucleo questo rimane, per ragioni sconosciute, all'interno della cellula divenendo quella struttura da molto tempo nota come corpo di Howell-Jolly. Per tali caratteristiche, il test dei micronuclei sulla serie eritropoietica è stato utilizzato ampiamente negli studi di radiobiologia.

I primi lavori sui linfociti umani risalgono al 1976 quando Countryman e Heddle dimostrarono che le radiazioni ionizzanti inducono micronuclei anche in queste cellule poste in coltura "in vitro". Successivamente, Hogstedt (1984) modificò il metodo per cercare di preservare l'integrità del citoplasma cellulare, favorendo così una migliore osservazione del preparato citologico. Un ulteriore passo avanti fu compiuto usando la bromodeossiuridina. In questa maniera è possibile distinguere i linfociti proliferanti (colore blu) da quelli in fase stazionaria (colore rosso). Anche i micronuclei, se presenti, appaiono di colore blu (Pincu, 1985) in quanto dopo la divisione mitotica, si manifestano soltanto nei linfociti proliferanti che hanno completato almeno un ciclo cellulare. Con esperienze di Bauchinger et al. (1984) il test dei micronuclei viene finalmente caratterizzato dalle prime curve dose-effetto su linfociti irradiati "in vitro" (figura 7).

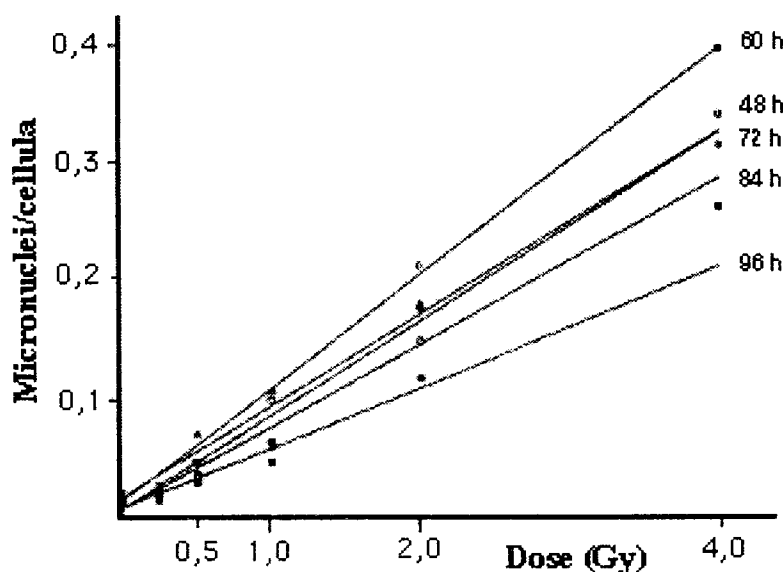


Fig. 7 - Curve dose-effetto dopo raggi X (220 keV) ottenute su linfociti umani alle diverse ore dalla PHA-stimolazione (Bauchinger, 1984; ridisegnata).

Fenech e Morley (1985) tentano di migliorare ulteriormente questa metodica introducendo due tecniche analitiche ambedue basate sulla identificazione delle cellule alla prima divisione mitotica. La prima, autoradiografica, consiste nel marcare con pulse di timidina tritiata i linfociti stimolati con PHA alla 48<sup>a</sup> ora dall'inizio della coltura. Si rende così possibile lo studio dei micronuclei in una sottopopolazione parasincrona alla fase S. Con la seconda tecnica i micronuclei vengono individuati soltanto nelle cellule in cui viene bloccato il processo di citochinesi, mediante citocalasina B. Queste cellule proliferanti, che hanno completato la divisione nucleare ma non quella citoplasmatica, sono facilmente riconoscibili perchè appaiono binucleate. Dimostrato che la citocalasina B, almeno alle dosi impiegate, non incrementa di per sé la frequenza dei micronuclei e non disturba la cinetica cellulare risulta evidente che quest'ultimo metodo raggiunge due obiettivi: a) il micronucleo neoformato rimane "intrappolato" nel citoplasma che non si è suddiviso; b) le cellule binucleate si trovano sicuramente nella loro prima metafase. Poichè l'osservazione dei micronuclei viene limitata alle sole cellule binucleate, si ottiene una più facile lettura dei preparati associata ad una elevata numerosità del reperto.

Analogamente al metodo dei dicentrici anche per il metodo dei micronuclei la curva di calibrazione (dose-effetto) costituisce lo strumento indispensabile per una corretta biodosimetria. La semplicità di questa metodica è un fattore vantaggioso per la costruzione della curva in quanto viene ad aumentare la possibilità di studiare un campione di elevata numerosità in un tempo ragionevolmente ridotto. Nel nostro laboratorio sono state effettuate misure "in vitro" dose-effetto su linfociti appena prelevati da individui sani che ci hanno permesso di costruire una curva di calibrazione per r.i. a basso LET. La curva viene continuamente aggiornata con successive determinazioni (figura 8).

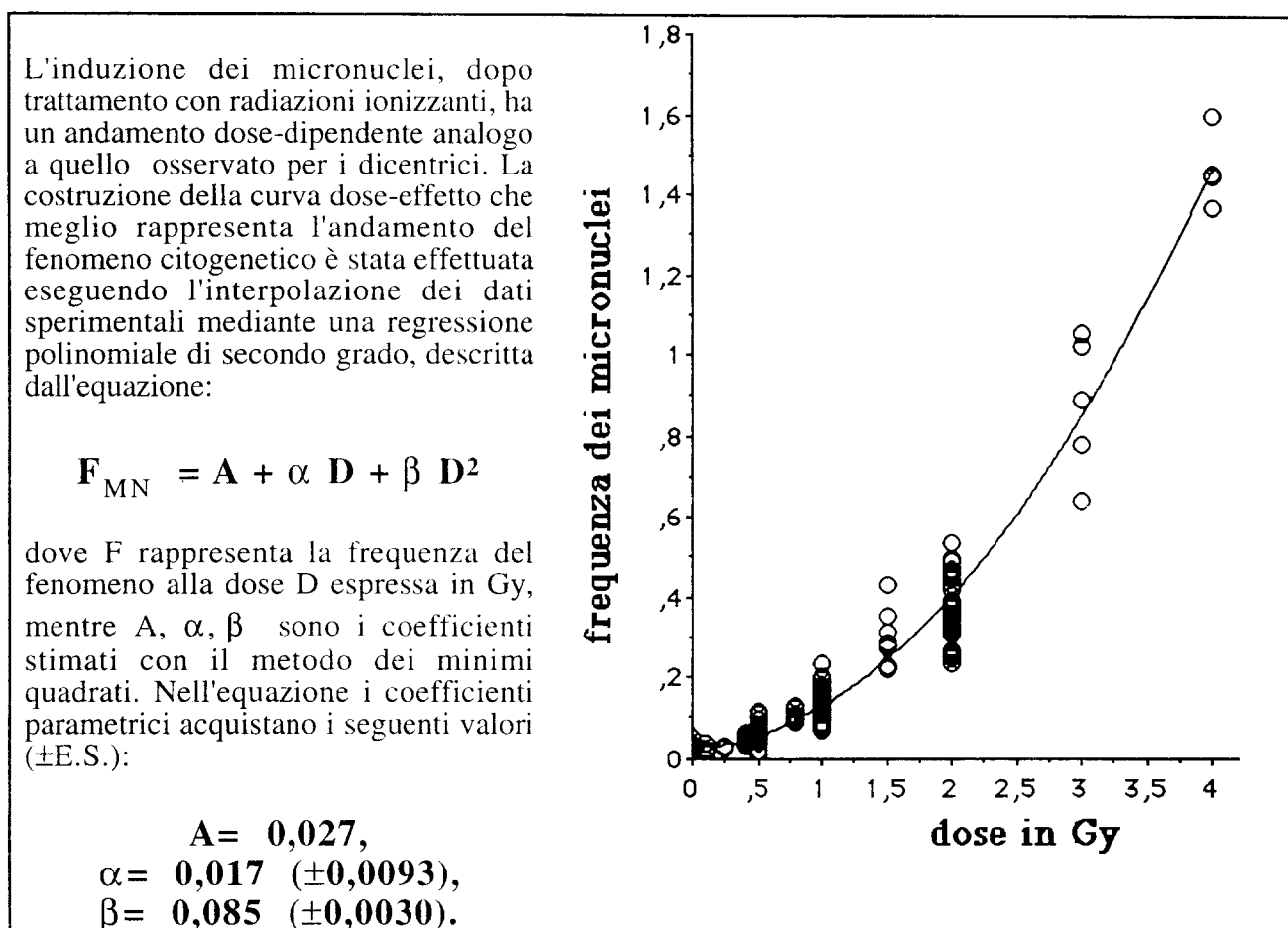


Fig. 8 - Curva di calibrazione della frequenza dei micronuclei in linfociti dopo trattamento "in vitro" con raggi X.

Nella tabella 4 vengono riportati a confronto i nostri dati sui micronuclei con quelli di altri Autori che hanno adottato tecniche sperimentali affini alla nostra metodica. Al riguardo si rileva in primo luogo che i risultati riferiti dagli Autori indicati sono stati ottenuti su di un numero limitato di individui (colonna 2), tale cioè da non evidenziare attendibilmente la variabilità di risposta a livello individuale. Una notevole discordanza tra i vari Laboratori esiste sulla frequenza spontanea dei micronuclei, valutabile intorno ad un fattore 6, ottenuto dal rapporto tra il valore massimo di 0,036 e il valore minimo di 0,0060 (colonna 4). Tale variabilità, che ha un valore medio di 0,015, è probabilmente attribuibile più alle diverse condizioni sperimentali impiegate dagli Autori stessi, che alla variabilità esistente tra i soggetti esaminati. E' interessante notare che nella maggior parte dei casi la preparazione dei vetrini avviene con un preventivo fissaggio dei linfociti. In queste condizioni è facile sottostimare l'evento citogenetico in quanto i linfociti binucleati sono estremamente delicati e possono facilmente essere alterati dal fissativo. Invece, l'uso della citocentrifugazione diretta della

Tab. 4 - Frequenza dei MN e coefficienti parametrici a confronto

Autori	Sog	Met. (*)	Frequenza dei MN			Intervallo di dose (Gy)	Coeff. parametrici			
			Basali	1 Gy	2 Gy		3 Gy	A	$\alpha$	$\beta$
Fenech et al., '85	8	cit.	0,0088	0,090	0,192	0,296	1,0 - 4,0	0,010	0,075	0,007
Fenech et al., '86	6	cit.	0,0100	-	-	-	0,05 - 0,4	0,010	0,070	0,026
Mitchell et al., '87	?	?	0,0080	0,160	0,498	0,760	0,05 - 4,0	0,002	0,126	0,032
Fenech et al., '87	?	cit.	0,0110	0,155	0,320	-	1,0 - 2,0	0,005	0,143	0,008
Kormos et al., '88	4	fiss.	0,0140	0,181	0,499	0,745	0,5 - 4,0	0,011	0,139	0,037
Ramalho et al., '88	2	fiss.	0,0360	0,258	0,476	0,978	0,5 - 3,0	0,056	0,094	0,069
Prosser et al., '88	14	fiss.	0,0140	0,146	0,268	0,439	0,1 - 5,0	0,013	0,117	0,009
Huber et al., '89	14	fiss.	0,0160	-	-	0,345	-	-	-	-
Littlefield et al., '89	2	fiss.	0,0060	0,127	0,413	-	0,25 - 3,85	0,006	0,095	0,050
Ban et al., '91	3	fiss.	0,0230	0,129	0,281	0,423	0,5 - 3,0	0,013	0,104	0,012
Gantenberg et al., '91	12	fiss.	0,0200	-	-	-	1,25 - 5,0	0,008	0,120	0,023
Balasesm et al., '91	6	fiss.	0,0160	0,138	0,322	0,392	0,05 - 6,0	0,033	0,126	0,016
Huber et al., '92	20	fiss.	0,0153	-	-	0,530	3,0	-	-	-
Fenech et al., '92	6	?	0,0115	0,236	-	-	-	-	-	-
Vral et al., '92	4	fiss.	0,0180	0,124	0,323	0,615	1,0 - 4,0	-	-	-
Surrales et al., '92	10	fiss.	0,0170	-	-	-	-	-	-	-
Lee et al., '94	5	fiss.	0,0099	-	0,159	0,411	0,5 - 4,0	0,079	0,025	0,032
Krishnaja et al., '94	15	fiss.	0,0125	-	0,155	-	0,5 - 5,0	-	0,055	0,013
Bender et al., '94	57	fiss.	0,0107	-	-	-	-	-	-	-
Di Giorgio et al., '94	200	fiss.	0,0099	-	-	-	-	-	-	-
Vral et al., '94	6	fiss.	0,0248	0,120	0,305	0,495	0,1 - 3,0	0,025	0,049	0,038
Media			0,0149	0,155	0,324	0,536		0,021	0,096	0,027
ES			0,0015	0,014	0,033	0,058		0,006	0,010	0,005
<hr/>										
Nostri dati	134	cit								
Media			0,0263	0,167	0,457	0,915	0,1 - 4,0	0,027	0,017	0,085
ES			0,0013	0,01	0,01	0,1			0,009	0,003

\*) fiss.: i linfociti binucleati sono fissati e trasferiti su vetrino per semplice caduta; cit.: i vetrini vengono preparati direttamente dalla sospensione per mezzo di una citocentrifuga. A,  $\alpha$  e  $\beta$ : coefficienti parametrici della curva meglio interpolante basata sul modello lineare-quadratico.



sospensione cellulare permette di ottenere dei preparati migliori e di più facile lettura. La variabilità delle osservazioni effettuate dopo irradiazione "in vitro", pur continuando ad esistere, tende ad attenuarsi in misura significativa. Per quanto riguarda gli effetti alle singole dosi scalari, i valori della frequenza riscontrati appaiono abbastanza omogenei ad eccezione di qualche caso isolato.

### *Consecutio methodologica*

La "consecutio methodologica" per la dosimetria citogenetica con dicentrici, e per molti aspetti anche con i micronuclei, può essere riassunta nel modo seguente:

- a) conoscenza del "**teorema fondamentale**" che esprime la coincidenza, a parità di dose, del rapporto dicentrici (o micronuclei) per numero di cellule, osservato rispettivamente sia nell'individuo irradiato "total body", che nel sangue irradiato "in vitro" (equivalent whole body dose);
- b) conoscenza della **relazione dose-effetto** (curva di calibrazione) e del campo di variabilità espresso in genere con limiti fiduciali al 95%;
- c) possibilità di interpolare i dati sperimentali ottenuti "in vitro" con una **funzione lineare** ( $Y = \alpha D$ ) per radiazioni di alto LET (da verificare per i micronuclei) o **lineare-quadratica** ( $Y = \alpha D + \beta D^2$ ) per radiazioni di basso LET;
- d) **distribuzione spaziale della dose** esprimibile con la distribuzione di Poisson nella irradiazione globale omogenea da radiazioni di basso LET e con una sovradisersione (stima secondo Dolphin) nella irradiazione parziale e/o disomogenea da radiazioni di basso LET e nella irradiazione con radiazioni di alto LET;
- e) introduzione di **fattori di correzione** in caso di esposizione frazionata o protratta;
- f) possibilità di ricostruzione della dose in caso di **accertamento tardivo**.

La dosimetria citogenetica risulta dunque particolarmente valida per irradiazioni acute al corpo intero o alla maggior parte di esso. Merita tuttavia sottolineare i vari aspetti che possono rendere disponibile questa metodologia diagnostica, con buona approssimazione, anche nel caso di irradiazione parziale del corpo, condizione questa di più frequente osservazione in caso di eventi accidentali.

E' opportuno ricordare a tale riguardo che il valore unitario del coefficiente di dispersione (C.D.) indica una buona coincidenza tra l'andamento delle osservazioni ed il calcolo teorico della distribuzione secondo Poisson, mentre valori superiori all'unità indicano una sovradisersione per aumento delle classi di frequenza del fenomeno osservato. Nell'irradiazione parziale e/o fortemente disomogenea è stata dimostrata, con la metodica dei dicentrici, una distribuzione "non Poisson" e l'entità della sovradisersione osservata risulta essere inversamente proporzionale alla frazione del corpo irraggiata. Pertanto, dall'entità della sovradisersione della distribuzione delle osservazioni rispetto alla distribuzione teorica di "Poisson" è possibile risalire, con metodi di calcolo basati sul principio della massima verosimiglianza, alla dose attribuibile all'irradiazione parziale o disomogenea, che sarà diversa da quella stimata al corpo intero, con lo stesso numero di dicentrici (Dolphin, 1969). Per similitudine è ipotizzabile lo stesso fenomeno nei riguardi della distribuzione dei micronuclei nelle cellule binucleate anche se è presente in questo caso una tendenza alla sovradisersione. Sono quindi richiesti per i micronuclei opportuni accorgimenti di calcolo per una più corretta valutazione della dose in presenza di una irradiazione non uniforme.

### *Calcolo della dose (DOSIME)*

Si assume come valida la trasposizione della criteriologia matematica "A", descritta dall' IAEA (1986) per la stima di dose mediante conteggio dei dicentrici, alla stima di dose ottenuta con i micronuclei allo scopo di procedere allo svolgimento sequenziale del calcolo dosimetrico. Al riguardo vengono utilizzati i coefficienti parametrici della funzione polinomiale di secondo grado utilizzata per la costruzione della curva dose-effetto con la loro variabilità espressa come errore standard (E.S.). La sequenza degli atti di calcolo può essere così rappresentata:

- 1) dalla lettura della frequenza dei micronuclei  $[F_{(MN)}]$  si determina la dose  $[D]$  in funzione della curva di calibrazione;
- 2) in rapporto alla dose  $[D]$  si determina l'E.S. in termini di frequenza di micronuclei  $[E.S._{curva}]$  quale espressione dell'incertezza della curva di calibrazione;
- 3) si determina l'E.S. dovuto all'osservazione  $[E.S._{oss.}]$  espresso da  $\sqrt{MN/CB}$  in funzione della distribuzione di Poisson;
- 4) l'E.S. totale è rappresentato dalla radice quadrata della somma dei quadrati dei due E.S., cioè:  $E.S._{tot} = \sqrt{(E.S._{curva})^2 + (E.S._{oss})^2}$  ;

5) la frequenza dei micronuclei con il limite di confidenza al 95% calcolato dall' E.S.<sub>tot</sub> sarà dato da:  $F_{(MN)} \pm 1.96 (E.S._{tot})$ ;

6) dai due valori della frequenza [ $F_{(MN)max}$ ] e [ $F_{(MN)min}$ ] così ottenuti si determinano tramite la curva di calibrazione le dosi corrispondenti (superiore ed inferiore).

Valutazioni al di fuori dell' intervallo di dose saggio, ottenute con estrapolazioni della curva, sono arbitrarie e da considerare a "non senso".

Per quanto riguarda la regione inferiore della scala dosimetrica, ottenuta mediante i micronuclei, occorre identificare con metodi statistici il valore minimo di dose che può essere diagnosticato. Nelle nostre condizioni sperimentali dal confronto delle due serie di dati (controllo e dose di 0,1 Gy) eseguito con il t-test (test ad una direzione) si ottiene un valore di  $p:0,226$  che conferma l'omogeneità della risposta, cioè l'incapacità del sistema di distinguere i dati del controllo da quelli correlabili ad una dose di 0,1 Gy. Invece, dal confronto tra i dati del controllo e quelli relativi alla dose di 0,25 Gy, eseguito con lo stesso t-test, si ottiene un valore di  $p:0,0014$ , che dimostra che le due serie di dati sono significativamente diverse. Ne consegue che il valore di 0,25 Gy è accettabile come livello minimo di stima di dose.

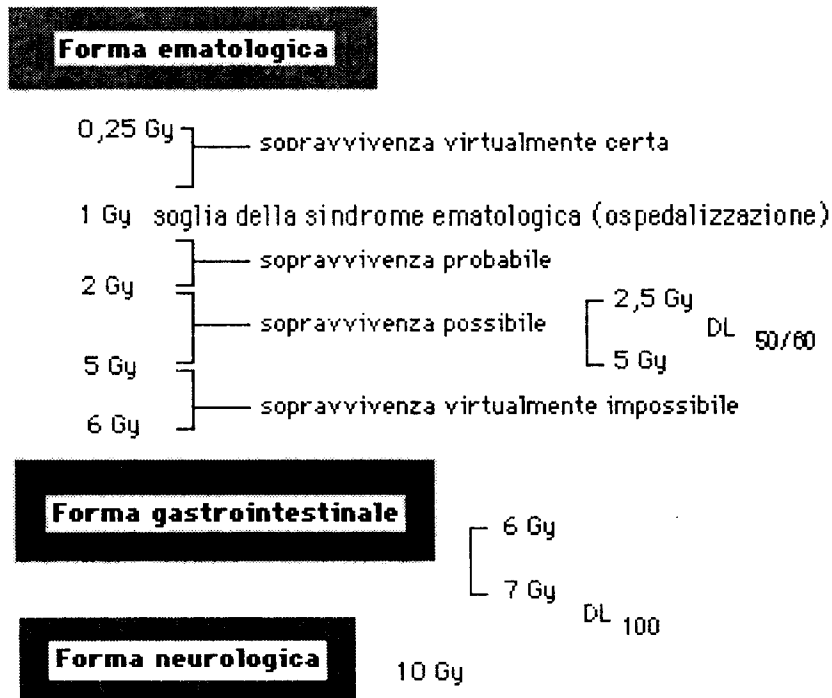


Fig. 9 - Sindrome acuta da irradiazione: forme cliniche ai vari livelli di dose.

La disponibilità di ottenere una stima di dose, con adeguata precisione, al corpo intero nell'intervallo tra 0,25 e 4 Gy, costituisce un sostanziale riferimento diagnostico in caso di esposizione accidentale. Infatti, le stesse forme che compongono sul piano fisiopatologico e clinico la sindrome acuta da irradiazione, cioè la forma ematologica, la forma gastrointestinale e la forma neurologica, sono correlate, come è noto, a soglie differenziate di induzione, comunque molto superiori alla soglia biodosimetrica significativa per i micronuclei (0,25 Gy) (figura 9). La sequenza dei calcoli per la stima della dose con il metodo dei micronuclei è affidata ad un programma di calcolo elaborato dal nostro gruppo e denominato "DOSIME". Il programma genera uno stampato che oltre a fornire la stima di dose con la sua variabilità, presenta anche valori utili per meglio caratterizzare l'osservazione (tabella 5).

Tab. 5 - Elaborato del programma "DOSIME" per la stima della dose ricevuta.

<b>DOSIME:</b> soggetto ??		Esperienza: AA BB 0000	
<b>micronuclei:</b>	<b>87</b>	coeff. noto:	0,027
CB senza MN:	1052	coeff. alfa:	0,017
<b>CB tot.</b>	<b>1120</b>	ES (alfa):	0,0093
		coeff. beta:	0,085
<b>F(MN):</b>	<b>0,078</b>	ES (beta):	0,0030
		alfa+ES:	0,026
		beta+ES:	0,088
SQ:	0,0175	F(MN) max:	0,097
F(MN)+ES:	0,0854	F(MN) min:	0,058
ES curva:	0,0077	Z:	0,03146
ES osservato:	0,0083		
ES totale:	0,0098		
		lim. fid. (95%) superiore:	0,81
<b>Stima della dose in Gy: 0,68</b>		lim. fid. (95%) inferiore:	0,60
<b>Stima della frazione irraggiata secondo Dolphin</b>			
F(MN) attesa secondo Poisson:	0,10		
Frazione del corpo irraggiata:	0,81		
Stima della dose della parte irraggiata (Gy):	<b>0,84</b>		

## **RADIOSENSIBILITA' INDIVIDUALE**

*"The primary aim was to evaluate the usefulness of chromosome damage assays for identification of radiosensitive individuals and the relationship of this sensitivity to cancer predisposition"*

*Second L.H. Gray Workshop, 1992*

La risposta individuale alle r.i. rappresenta un parametro radiobiologico di grande interesse per valutare gli effetti dell'esposizione sia per motivi clinici (radiofarmaci e radioterapia) che per motivi professionali (medicina del lavoro). In sintesi, un danno radioindotto al DNA può produrre, come è noto, effetti radiobiologici di notevole rilevanza quali l'inattivazione cellulare e la trasformazione neoplastica. Tuttavia, la cellula in determinate condizioni è anche in grado di modulare il danno radiobiologico attraverso meccanismi riparativi a carattere enzimatico fino al normale ripristino della struttura molecolare del DNA. E' pertanto di particolare interesse poter valutare la capacità riparativa propria del singolo sistema biologico o del singolo individuo.

### *Riferimenti scientifici*

La radiosensibilità individuale, cioè la suscettibilità all'esposizione tipica del singolo soggetto, si affaccia a buon titolo nel contesto radioprotezionistico avendo assunto negli ultimi anni una primaria importanza nella predizione degli effetti deterministici e, in misura maggiore, in quella degli effetti stocastici indotti dalle radiazioni. Sono interessanti al riguardo i seguenti riferimenti.

- Dal BEIR III (1980): "I genotipi umani possono conferire un aumento della suscettibilità (o della resistenza) nei riguardi del danno al DNA e un aumento del rischio tumorale a seguito di esposizione ad agenti cancerogeni, comprese le radiazioni ionizzanti. Laddove sia possibile identificare sottopopolazioni manifestanti sostanzialmente un maggior rischio di cancerogenesi da radiazioni, il loro rischio richiederà una stima separata".
- Dall'UNSCEAR (1986): "Ci può essere una frazione non trascurabile della popolazione umana che è predisposta a sviluppare cancro e di conseguenza questa può essere molto più sensibile alle radiazioni e ad altri agenti cancerogeni rispetto alla restante popolazione".
- Dall'UNSCEAR (1988): "In considerazione della variabilità genetica tra gli individui di un gruppo e fra gruppi, è ragionevole presumere che il rischio di cancro può variare tra gli individui di sesso, età e stile di vita eguali quando siano esposti alla stessa quantità di radiazioni ionizzanti..... In disordini recessivi, relativamente rari, è dimostrato che i fibroblasti presentano *in vitro* una riparazione difettosa di alcuni danni da radiazioni; ed è anche noto che questi individui sono a rischio più elevato per alcune patologie maligne, in particolare linfomi e leucemie..... Il gene AT [Atassia Telangiectasia] è relativamente comune in Israele e si presume che alcuni bambini irradiati per tinea capitis potrebbero essere portatori di questo gene..... L'andamento dei tumori tiroidei potrebbe anche riflettere questa condizione.....".
- Dall'ICRP 60 (1990): "Attualmente non vi sono dati epidemiologici utili per identificare sottopopolazioni che abbiano una maggiore sensibilità all'induzione di tumori da radiazioni, anche se è noto che vi sono gruppi più sensibili. Pazienti con una malattia genetica chiamata atassia telangiectasia (A-T) sono più prone a sviluppare leucemie e sono molto sensibili all'effetto di radiazioni a basso LET. Studi a livello cellulare chiamano in causa una deficienza della riparazione del DNA (Cox, 1982; Arlett et al., 1989). E' importante dire che anche qualora tutti i pazienti A-T fossero più prone a sviluppare leucemia delle persone sane, la bassissima frequenza di omozigotia per la mutazione A-T nella popolazione comporterebbe un contributo molto piccolo al rischio totale della popolazione. Si è anche ipotizzato che la mutazione A-T nella forma eterozigote - molto più frequente - possa conferire una certa maggior suscettibilità nei confronti dei tumori spontanei, particolarmente quelli della mammella (Swift et al., 1976). Di conseguenza, gli eterozigoti A-T potrebbero, in linea di principio, costituire una piccola ma significativa sottopopolazione sensibile. Questa ipotesi non è stata però ancora provata. Si potrebbe anche considerare che altri disordini genetici umani, come il retinoblastoma, in cui tumori specifici possono essere associati con una eterozigotia per i cosiddetti "geni soppressori di tumori", siano associati con un maggior rischio di neoplasia (Knudson, 1986; Reik e Surani, 1989). Al momento attuale, tuttavia, non si conosce la frequenza di tutte queste mutazioni

e la loro rilevanza rispetto al fenomeno dell'induzione di tumori; questo impedisce ogni stima quantitativa dei tumori ad esse attribuibili nella popolazione umana".

- Del tutto recentemente (1994) l'Agenzia per l'Energia Nucleare (AEN), dell'"Organisation de Cooperation et de Developpement Economiques (OCDE) ha pubblicato un interessante documento dal titolo: "La Radioprotection aujourd'hui et demain" nel quale, tra le motivazioni scientifiche e tecniche suscettibili di apportare variazioni fondamentali nei concetti e nell'applicazione dei principi della radioprotezione, viene citato quanto segue: "I risultati della ricerca biologica potrebbero portare ad una migliore comprensione dei meccanismi genetici di induzione dei tumori. Recenti ricerche sembrano indicare che sarebbe possibile identificare alcuni cancri radioindotti, come anche che alcuni individui presentano una radiosensibilità nettamente più elevata rispetto al normale. Se queste informazioni dovessero essere confermate, esse avrebbero un impatto significativo sulla gestione del sistema di protezione". Nel documento si aggiunge che "...le ricerche che portano ad una migliore comprensione dei meccanismi biologici che regolano la sensibilità alle radiazioni in funzione di particolari condizioni genetiche sono certamente molto promettenti, ma possono far nascere problemi etici nell'ambito della radioprotezione. Infatti, se la scienza sarà un giorno in grado di determinare che alcuni individui sono molto più sensibili alle radiazioni del normale, o che sono più minacciati rispetto alla media della popolazione, potrebbero porsi problemi etici in ordine alla necessità di una protezione supplementare e di una limitazione delle professioni accessibili a queste persone. Così i lavoratori potrebbero essere selezionati e destinati a posti specifici in funzione della loro predisposizione genetica. Potrebbe essere stabilita la prescrizione di dosi specifiche per le persone particolarmente sensibili alle radiazioni. Supponendo che una tale discriminazione sia socialmente accettabile, verrebbe comunque da interrogarsi sui vantaggi di una tale selezione sul piano etico ed economico. Si osserva tuttavia che predisposizioni individuali, come le allergie, determinano tali selezioni e pongono problemi analoghi in numerosi settori....".

Va sottolineato al riguardo che il nostro ordinamento giuridico rende addirittura obbligatorio, perseguendo le omissioni, lo studio della "sensibilità individuale del lavoratore" ad alcuni agenti diversi dalle r.i.. E' il caso dell'esposizione al piombo (D.Lg. n.277/1991) e agli agenti cancerogeni (chimici) (D.Lg. n. 626/1994).

- E' stato anche dimostrato che pazienti con neoplasie del polmone e del colon possono presentare in prove *in vitro* frequenze più elevate di rotture cromosomiche a seguito del trattamento con bleomicina delle colture linfocitarie (Hsu et al., 1989). Lo stesso fenomeno di fragilità cromosomica (instabilità genomica) è stato rilevato anche in giovani adulti affetti da neoplasia maligna (carcinoma a cellule squamose) delle porzioni alte

dell'apparato respiratorio e digestivo (naso-faringe, cavità orale, faringe e laringe) (Shantz et al., 1990).

### *Cenni sulla radiosensibilità cellulare*

Com'è noto, gli organi e i tessuti costituenti l'individuo presentano una loro diversa radiosensibilità in rapporto ad una serie di fattori fisici e biologici. Questi possono essere intrinseci alla cellula, come il livello di differenziazione, la posizione nel ciclo replicativo, etc.; oppure estrinseci, come il livello di ossigeno e di temperatura, la presenza di radioprotettori o di radiosensibilizzanti, etc..

Lo studio degli effetti biologici delle radiazioni sulla cellula (radiosensibilità nelle diverse fasi del ciclo cellulare) e la scoperta di sindromi cliniche caratterizzate da elevata radiosensibilità, hanno condizionato, solo in epoca più recente, quelle convinzioni radiobiologiche che hanno portato ad estendere questo tema nell'ambito di interesse della radioprotezione operativa.

L'esistenza di sindromi cliniche di origine genetica associate ad un'elevata radiosensibilità (sindrome di Bloom, atassia-telangiectasia, anemia di Fanconi, ecc.) ha riproposto il problema delle stime di rischio in radioprotezione (tabella 6). Queste sindromi sono di particolare interesse in campo clinico in quanto mostrano una elevata sensibilità nei confronti di agenti genotossici di varia natura ed un'elevata incidenza di tumori spontanei. L'atassia-telangiectasia (omozigote ed eterozigote), per la sua non trascurabile distribuzione nella popolazione e per la sua nota associazione con un elevato rischio di neoplasie letali può essere portata come concreto esempio per una "giustificazione" dello studio della radiosensibilità individuale e del rischio oncologico connesso. Infatti, mentre la frequenza di tale sindrome è nella forma omozigote relativamente bassa (1:40000), la frequenza delle forme eterozigoti è invece significativamente più elevata, cioè intorno all'1,5% della popolazione (alcuni Autori stimano tale incidenza superiore al 5%). I soggetti eterozigoti non presentano fenomenologie cliniche apparenti, ma manifestano una risposta individuale all'irradiazione notevolmente differenziata (fragilità cromosomica o instabilità genomica) (Swift, 1985).

In tema di "radiosensibilità" è opportuno richiamare la "teoria del target" o "teoria del bersaglio". Essa si basa su considerazioni fisiche che consentono di valutare la sezione (la grandezza in termini molecolari) delle substrutture dei sistemi biologici sensibili all'irradiazione (concetto di "hit"). Questa teoria trova ampia conferma in esperienze radiobiologiche effettuate sull'inattivazione di enzimi di diverso peso molecolare (figura 10). In questo caso si dimostra che la sensibilità della molecola è direttamente proporzionale alla sua sezione. Fin dal 1946 è stato osservato che i piccoli virus presentano una radioresistenza maggiore rispetto ai virus più grandi. Successivamente è stata riscontrata una buona correlazione tra la radiosensibilità dei virus e il loro contenuto in acidi nucleici, piuttosto che con la loro sezione. Un ulteriore chiarimento è intervenuto nel 1964 dalla dimostrazione che la radiosensibilità dei virus, dei batteri, dei lieviti e delle cellule eucariotiche è direttamente proporzionale al numero dei nucleotidi. E' da notare comunque che la radiosensibilità diminuisce (anche di oltre 10 volte) con la complessità della struttura del DNA, caratteristica delle cellule più evolute. Ciò è dovuto probabilmente alla presenza di proteine nucleari e all'elevato sviluppo delle capacità riparative del DNA presente in queste strutture cellulari (figura 11).



Tab. 6 - Rischio relativo di morte per tumore in soggetti eterozigoti per Atassia Telangiectasia.

Tumori letali	sexo	intervalli di età	rischio relativo
Tutti i siti	uomo	45 - 75	1,8
	donna	45 - 74	2,2
	uomo	0 - 44	5,6
	donna	0 - 44	5,7
Leucemia e linfoma	entrambi	0 - 44	7
Carcinoma dell'ovaio	donna	0 - 54	10

Per quanto riguarda la molecola del DNA (struttura depositaria del genoma e quindi molecola elettiva nella funzionalità cellulare) lo studio del suo comportamento dopo un evento dannoso appare di primaria importanza. Tale studio, sviluppatosi considerevolmente negli ultimi decenni, ha dimostrato che la cellula è in grado di modulare il danno biologico indotto sulla molecola del DNA dalle r.i. attraverso meccanismi a carattere enzimatico, capaci di riparare il danno fino alla ricostituzione "ad integrum" della struttura molecolare. Si suppone inoltre che processi di ricostruzione o di ristabilizzazione a carico delle membrane possano realizzarsi quando il danno non sia di rilevante entità.

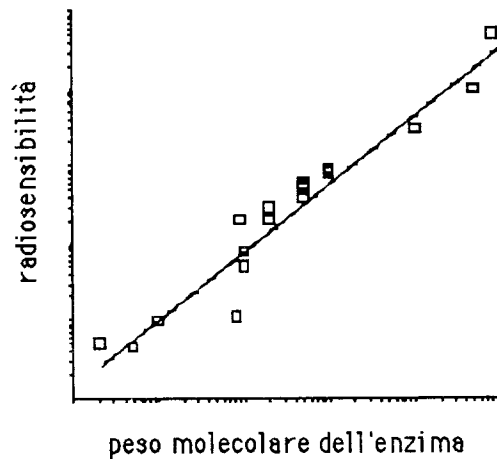


Fig. 10 - Inattivazione dell'enzima in funzione del suo peso molecolare.

La diversa radiosensibilità cellulare è stata ampiamente studiata "in vivo" (in particolare in animali da esperimento), e soprattutto *in vitro* in colture cellulari sia primarie (appena espantate), che stabilizzate. In sintesi, si può ragionevolmente affermare che nelle cellule proliferanti (cellule ciclanti) una grave alterazione della molecola del DNA, principale bersaglio delle r.i., può indurre la "morte mitotica"; mentre in cellule quiescenti (al di fuori del ciclo cellulare) le alterazioni a carico delle membrane (cellulari e nucleari) e il concomitante squilibrio fisico-chimico possono indurre la "morte in interfase" (picnosi o apoptosi).

Fino al 1950 il ciclo cellulare, come fenomeno fisiologico tipico delle cellule in proliferazione, si intendeva costituito da un preminente periodo di "interfase" e da un periodo molto più breve definito "mitosi". Solo studi successivi, effettuati con tecniche autoradiografiche, hanno dimostrato che l'interfase comprende anche un'intensa attività metabolica. All'interno di questa è presente la duplicazione del DNA (fase S) e le due fasi adiacenti G1 e G2 (G: gap), rispettivamente prima e dopo la sintesi del DNA. Al contrario, le cellule non in proliferazione (stadio fisiologico comune alle cellule completamente differenziate) si trovano al di fuori del ciclo cellulare in uno stadio definito fase Go (figura 12).



Fig. 11 - Aspetti della radiosensibilità del DNA in funzione della grandezza e della complessità della molecola.

Comportamenti emblematici di diversa radiosensibilità cellulare, associata alla posizione del ciclo cellulare, si possono osservare in fisiopatologia ematologica (figura 13) (Fliender, 1967; White, 1975). Una notevole radioresistenza caratterizza gli elementi del compartimento funzionale o circolante (granulociti segmentati, eritrociti, reticolociti, piastrine) che mostrano segni di danno per dosi di alcune decine di Gy. Le cellule del compartimento maturativo, che in questa fase perdono la loro capacità replicativa, presentano una scarsa radiosensibilità. Un blocco completo delle attività emopoietiche, come può avvenire per una dose di 10 Gy al corpo intero, si eserciterà attraverso la totale inibizione mitotica delle cellule dei compartimenti staminali e proliferativi del midollo osseo e delle cellule del tessuto linfopoietico, in funzione della loro radiosensibilità quali cellule intermitotiche (vegetative e in differenziazione). Fanno eccezione però i linfociti, notevolmente radiosensibili anche nel sangue periferico.

Solo con l'avvento delle colture cellulari di mammifero e con l'ampliamento delle tecnologie di indagine biologica (sopravvivenza clonale, marcatura dei componenti cellulari con precursori radioattivi, riparazione del DNA, aberrazioni cromosomiche, ecc.) si sono potute acquisire importanti conoscenze radiobiologiche concernenti le differenze tra varie specie e all'interno della stessa specie.

Lo sviluppo di metodiche più sofisticate ha permesso di ampliare le conoscenze radiobiologiche nelle diverse fasi cellulari mettendo in evidenza la loro diversa radiosensibilità. Inizialmente essa è stata osservata sotto due aspetti: l'effetto letale e l'effetto subletale. Il primo riguarda ovviamente la morte cellulare, intesa però in termini biologici come incapacità di dare

progenie; il secondo riguarda il ritardo nella cinetica della divisione cellulare, cioè il ritardo mitotico.

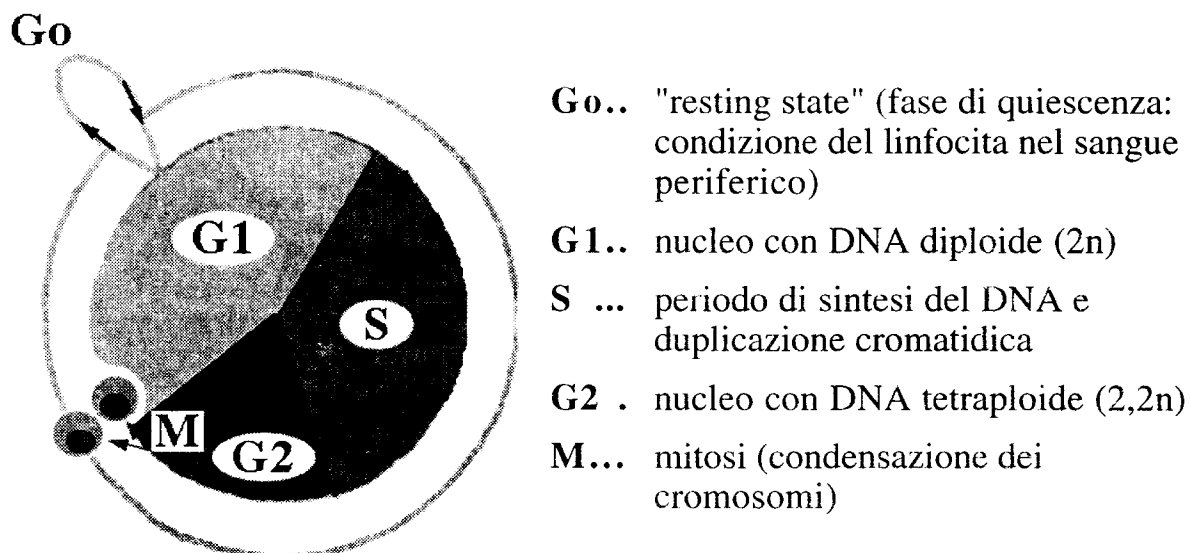


Fig. 12 - Ciclo cellulare.

Gli studi radiobiologici, che hanno avuto un notevole sviluppo negli anni 1950-1980, sono stati rivolti principalmente allo studio della sopravvivenza clonale (curva dose-effetto) e allo studio della biochimica del DNA dopo trattamento con r.i.. Il primo aspetto (sopravvivenza clonale) ha contribuito ad evidenziare le differenze individuali (con misure effettuate su fibroblasti e linfociti appena espianati), confermando alcune peculiari caratteristiche radiobiologiche delle sindromi cliniche riportate precedentemente (aumentata radiosensibilità). Il secondo aspetto (biochimica del DNA) ha fornito a sua volta alcune valide spiegazioni nei riguardi dei meccanismi cellulari coinvolti. Possiamo infine dire che la citogenetica (studio delle aberrazioni cromosomiche) ha dato un ulteriore contributo alla conoscenza del danno radioindotto a livello cellulare e della sua evoluzione in funzione dei meccanismi riparativi cellulari.

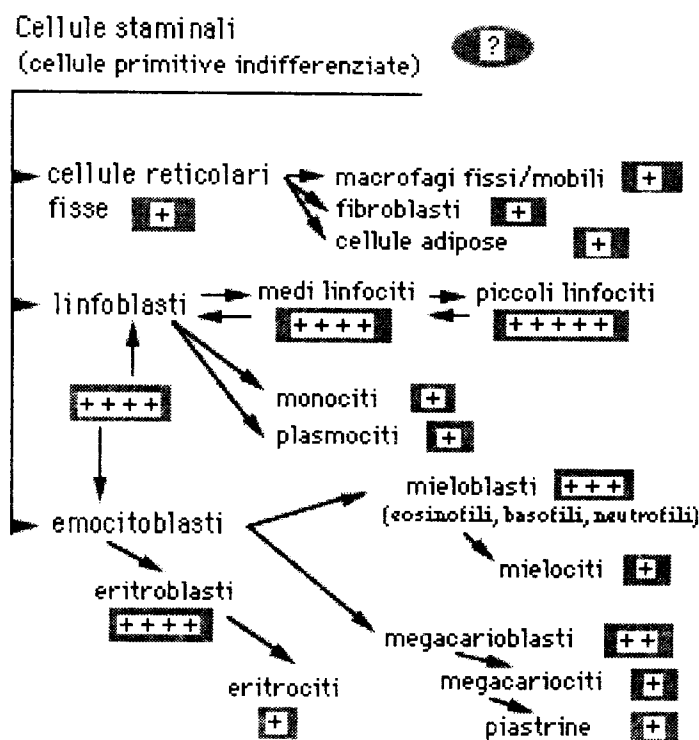


Fig. 13 - Emopoiesi e radiosensibilità delle varie linee cellulari.

### Metodo dei micronuclei e indice 3AB

Al fine di evidenziare e possibilmente misurare la variabilità individuale nella risposta biologica alle r.i., il nostro gruppo di ricerca ha utilizzato il test dei micronuclei in cellule linfocitarie binucleate dopo irraggiamento *in vitro*. L'induzione dei micronuclei con dosi scalari può infatti indicare la risposta citogenetica all'esposizione alle r.i. caratteristica dell'individuo. La curva dose-effetto "personalizzata" è un primo elemento della sensibilità dei linfociti del soggetto in esame. La sola misura della frequenza dei micronuclei ottenuta con una sequenza di dosi non fornisce però indicazioni sull'evoluzione che il danno iniziale ha subito in conseguenza degli interventi riparativi del sistema enzimatico cellulare successivamente intervenuti.

Per integrare ulteriormente le possibilità diagnostiche citogenetiche, il gruppo di ricerca ha messo a punto una metodica che utilizza il test dei micronuclei applicato ai linfociti umani dopo irradiazione "in vitro" con una dose di 2 Gy di raggi X, e integrato da una doppia stima dell'effetto citogenetico ottenuto con e senza 3-aminobenzamide (3AB) (Catena et al.,

1992a). Questo composto è risultato essere uno specifico inibitore della poli(ADP-ribosio)polimerasi (Sims et al., 1982). Questo enzima si rende particolarmente attivo dopo esposizione alle radiazioni ionizzanti, partecipando in misura notevole alla riparazione del danno radioindotto a carico del DNA (figura 14 e 15).

L'azione inibitrice prodotta dalla 3AB sulla polimerasi (figura 16) può essere espressa in termini quantitativi attraverso la misura del potenziamento dell'effetto clastogeno delle r.i.. Tale potenziamento può essere calcolato mediante un apposito indice, cioè l'indice 3AB ( $I_{3AB}$ ) (figura 17). In tal modo viene ad ampliarsi il grado di apprezzamento della fragilità cromosomica del soggetto in esame (instabilità genomica propria dell'individuo). Si può ritenere quindi che la risposta biologica (frequenza dei micronuclei), ottenuta dal trattamento combinato (r.i. e inibitore 3AB) e opportunamente integrata con  $I_{3AB}$ , possa fornire utili indicazioni sulla capacità propria dei linfociti (e per estensione dell'individuo donatore) di rispondere ad una irradiazione.

### *Altre metodiche applicative*

Per brevità (le relazioni congressuali e i lavori scientifici sono ormai numerosi) vogliamo citare come riferimento emblematico il secondo Workshop della L.H. Gray Trust tenutosi presso l'Università di St. Andrews (Scozia) nel settembre del 1991, dove è stata posta in evidenza l'importanza della radiosensibilità individuale discutendo la validità di alcune potenziali metodiche diagnostiche applicabili ai fini della radioprotezione e della radioterapia oncologica.

In quella sede sono state discusse le possibilità applicative di procedure metodologiche in grado di identificare i soggetti radiosensibili, quali: 1) la stima della riparazione in G2 (G2 assay), basata sulla valutazione del decremento delle aberrazioni cromosomiche osservato in cellule appena espianate dal soggetto (linfociti o fibroblasti in coltura *in vitro*) in funzione del tempo intercorso dall'irradiazione (Sanford et al., 1989); 2) l'induzione dei micronuclei (micronucleus assay), basata sulla riduzione della frequenza dei micronuclei (sempre in funzione del tempo dall'irradiazione) osservata in fibroblasti appena espianati e posti nella fase stazionaria di crescita, come indicazione della capacità riparativa della lesione clastogena radioindotta (Rummelein et al., 1992); 3) l'analisi della sopravvivenza cellulare o delle aberrazioni cromosomiche dopo un trattamento a basso rateo di dose (low dose-rate), allo scopo di evidenziare la sensibilità cellulare (linfociti o fibroblasti) in migliori condizioni di riparazione cellulare (Lloyd et al., 1992); 4) la misura delle aberrazioni in cromosomi prematuramente condensati

(premature chromosome condensation o PCC) (Pantelias and Maillie, 1984). Sullo stesso tema sono state proposte metodiche innovative, quali il "Comet assay" basato sull'elettroforesi del DNA danneggiato (con distribuzione a coda di cometa) (Muller et al., 1994) e la ibridizzazione "in situ" del DNA con sonde fluorescenti (fluorescence in situ hybridization o FISH) capace di evidenziare facilmente riarrangiamenti cromosomici (Tucker et al., 1993). Quest'ultime due metodiche potrebbero nel futuro risultare utili per studi di radiosensibilità cellulare e individuale.

Ad ogni modo, sul piano della fattibilità sperimentale e della significatività diagnostica, il test dei micronuclei applicato alle cellule appena espianate (linfociti circolanti, fibroblasti o cellule tumorali) sta acquistando un notevole credito nell'ambito della citogenetica classica e in radiobiologia.

Il bagaglio di conoscenze sinora acquisito ha permesso di orientare la ricerca sull'isolamento e l'identificazione di sistemi biologici caratterizzati da una diversa risposta radiobiologica con ciò consentendo di valutare meglio le cause di comportamenti abnormi. Questa ricerca di base si è dimostrata indispensabile per proiettare il problema della radiosensibilità individuale nel contesto delle esigenze proprie della radioprotezione e della radioterapia.

L'enzima poli(ADP-ribosio)polimerasi è una proteina nucleare di 116 kd (1014 amminoacidi) capace di sintetizzare il poli(ADP-ribosio) a partire dalle molecole di nicotinamide-adeninucleotide (NAD). Questo polimero è una lunga catena di unità difosforibosio, legata covalentemente alla polimerasi o ad altre proteine, includendo l'istone H1. L'enzima, che fa parte delle ADP-ribosiltransferasi, è in grado di rompere il legame azoto-glicosidico tra la nicotinamide ed il ribosio della molecola del NAD, per trasferire il radicale ADP-ribosio al polimero in formazione. L'attività endogena dell'enzima, in cellule eucariotiche, è principalmente localizzata nel nucleo. Infatti, l'enzima non costituisce un'entità libera, ma è legato alla proteina istonica H1 del DNA. In tali condizioni il poli(ADP-ribosio) neoformato è in grado di aprire e distendere la struttura dei nucleosomi, agendo sulle proteine cromosomali e modificando il grado di superavvolgimento del DNA. Questa operazione è necessaria per creare le condizioni favorevoli ad un'attiva ed efficace riparazione del DNA. Esistono anche indicazioni sul ruolo determinante che il polimero esercita sull'attività della topoisomerasi e della ligasi II. Una volta esaurita la sua funzione, il polimero viene degradato dall'enzima poli(ADP-ribosio) glicoidrolasi, con un turnover molto elevato, in modo da permettere la successiva ricostituzione "ad integrum" della struttura del DNA. Ulteriori prove sul coinvolgimento dell'enzima poli(ADP-ribosio)polimerasi nella riparazione del DNA sono state effettuate, attraverso misure di incorporazione di NAD marcato, su nuclei isolati o su cellule con membrana resa permeabile. E' stato inoltre dimostrato che il trattamento con agenti clastogeni, comprese le r.i., determina un potenziamento della stimolazione della poli(ADP-ribosio)polimerasi. Poichè l'attività di questo enzima viene stimolata dalla presenza di rotture del singolo (SSB) o del doppio filamento (DSB) del DNA, viene così confermata la sua importanza nella induzione dei fenomeni riparativi. Merita anche precisare che le rotture a doppio filamento sembrano almeno 10 volte più efficienti nell'attivare l'enzima rispetto alle rotture a singolo filamento. Inoltre, in condizioni "di crisi" per danno indotto dalle r.i., l'enzima può intervenire nel processo di "excision repair" come attivatore della DNA ligasi II. La maggior parte dei lavori sperimentali indicano dunque che le lesioni del DNA sono un elemento capace di incrementare l'attività della poli(ADP-ribosio)polimerasi. L'attivazione si esprime con una notevole riduzione, a livello cellulare, della concentrazione del NAD e di conseguenza con il consumo di ATP che non può essere più utilizzato attraverso la sua seconda via (pool di nucleotidi). L'effetto finale è il blocco della sintesi del DNA. Nell'intervallo tra l'induzione del danno e l'eventuale ripresa della sintesi del DNA si verifica un ritardo della duplicazione (DNA synthesis delay), durante il quale avviene la riparazione resa possibile proprio dal polimero poli(ADP-ribosio). Tra gli inibitori della poli(ADP-ribosio)polimerasi si possono annoverare gli analoghi delle pirimidine (nicotinamide), delle purine (caffeine) e della benzamide (aminoderivati). In base ai risultati sperimentali, gli analoghi della benzamide sembrano avere una migliore capacità inibitoria e tra questi la 3AB risulta essere la meno tossica a livello cellulare. Un eventuale blocco dell'attività dell'enzima al momento del danno avrà come conseguenza la fissazione del danno stesso dovuta ad uno squilibrio biochimico dell'apparato riparativo del DNA. Il danno infatti non viene rimosso (probabilmente anche per inibizione della ligasi) e, poichè il livello del NAD intracellulare resta inalterato, la sintesi semiconservativa del DNA prosegue non risentendo della presenza del danno indotto. E' stato osservato che la radiosensibilità delle cellule eucariotiche aumenta, in termini di letalità cellulare, in seguito ad inibizione della poli(ADP-ribosio)polimerasi. Tale aumento compare sia in cellule in crescita esponenziale (fibroblasti umani in coltura in vitro), che in cellule in fase stazionaria (linfociti umani in G0).

Fig. 14 - La poli(ADP-ribosio)polimerasi

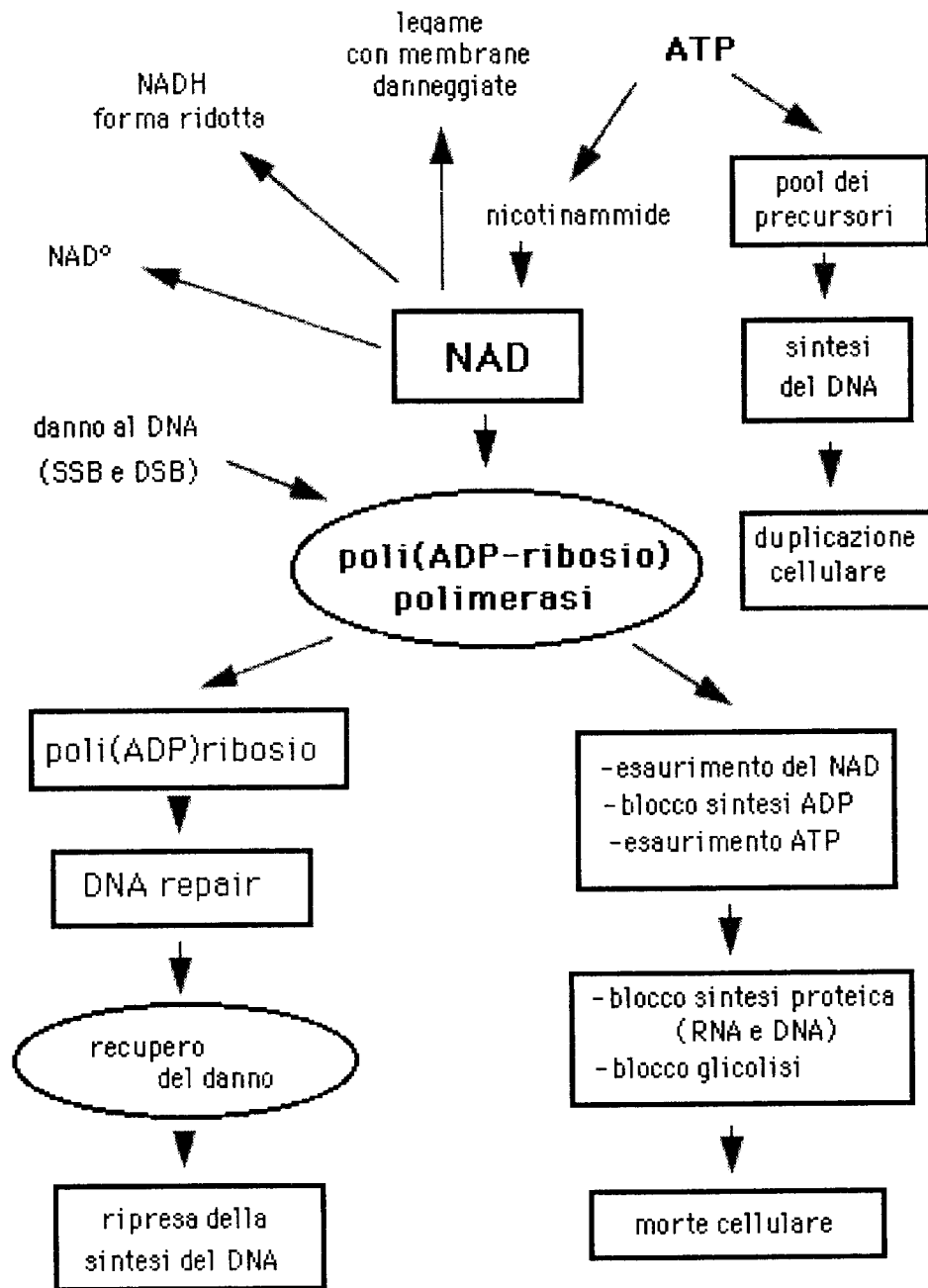
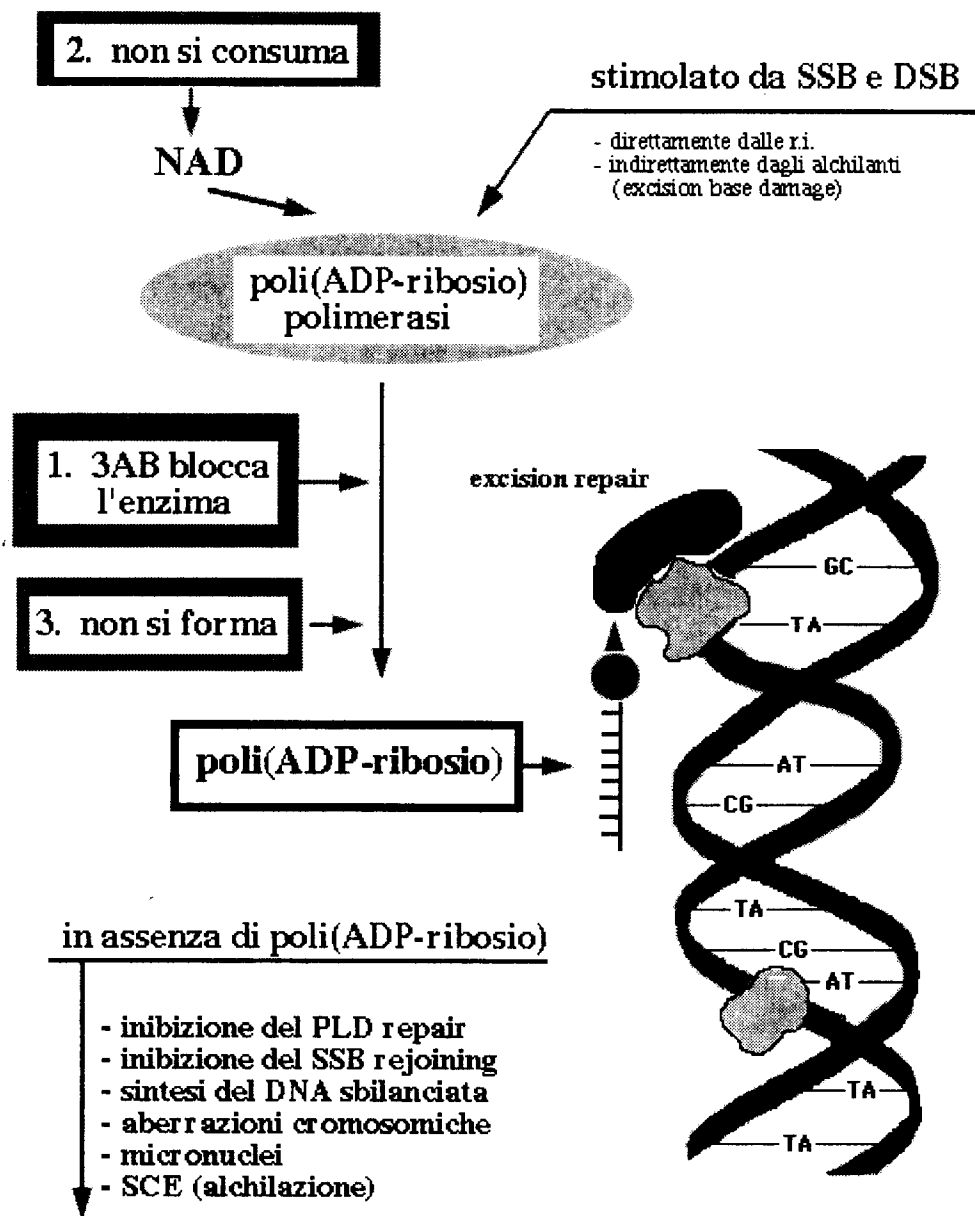


Fig. 15 - Equilibri biochimici della polimerasi

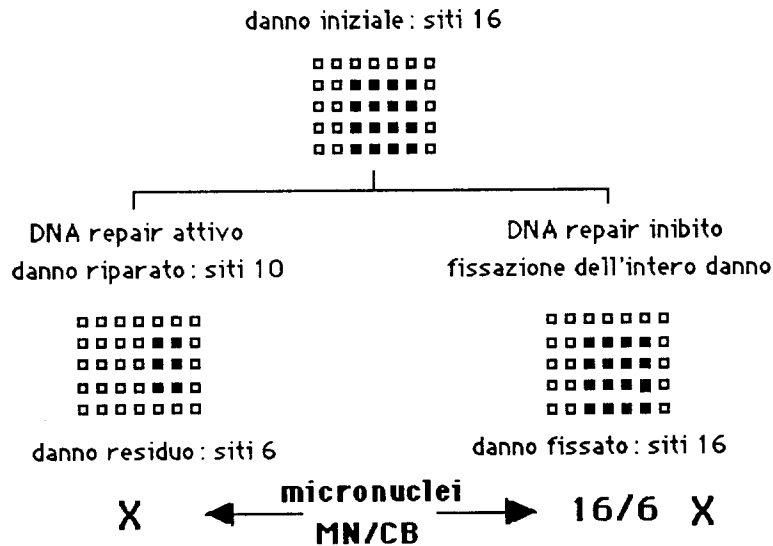




SSB: single strand breaks; DSB: double strand breaks; NAD: nicotinadenindinucleotide;  
PLD: potential lethal damage; SCE: sister chromatide exchange.

Fig. 16 - Azione della 3-aminobenzamide (3AB) sulla polimerasi.

## Ipotesi di danno iniziale



Per calcolare l'effetto della 3AB nel test dei micronuclei è stata recentemente da noi proposta la seguente equazione:

$$I = \frac{\text{danno iniziale (16)} - \text{danno residuo (6)}}{\text{danno iniziale (16)}}$$

### In caso di potenziamento dell'effetto ottenuto con la 3AB

$$I_{3AB} = 1 - \frac{MN_{-3AB}}{MN_{+3AB}} \quad \text{dove } I_{3AB} \text{ esiste nell'intervallo } 0 \rightarrow 1$$

$I_{3AB}$  rappresenta l'indice dell'effetto della 3AB, mentre  $MN_{+3AB}$  e  $MN_{-3AB}$  indicano la frequenza dei micronuclei ottenuta rispettivamente con e senza 3AB.

$I_{3AB}$  tenderà a zero quando la frequenza dei micronuclei sarà confrontabile con e senza 3AB ( $MN_{+3AB} \approx MN_{-3AB}$ ), con ciò esprimendo una maggiore radiosensibilità (riparazione del DNA o attività della poli(ADP-ribosio)polimerasi ridotte o assenti?).

$I_{3AB}$  tenderà all'unità quando la frequenza dei micronuclei in presenza di 3AB ( $MN_{+3AB}$ ) sarà fortemente prevalente su quella senza 3AB ( $MN_{-3AB}$ ), con ciò esprimendo una maggiore resistenza (riparazione del DNA associata ad una elevata sintesi di poli(ADP-ribosio)polimerasi?).

Il calcolo dell'errore standard (ES) di  $I_{3AB}$ , ottenuto con la regola della radice dei quadrati, consentirà inoltre di valutare più puntualmente il grado di radiosensibilità (o di radioresistenza) individuale nell'ambito di un gruppo o di una popolazione.

Fig. 17 - Calcolo dell'indice 3AB con schema esemplificativo.

## **BIODOSIMETRIA CLINICA**

Accanto alla preoccupazione che individui o sottogruppi della popolazione risultanti maggiormente radiosensibili possano essere meno tutelati dalle comuni misure protezionistiche, è presente anche la reale esigenza di poter misurare la radiosensibilità dei pazienti che devono essere sottoposti a trattamenti di radioterapia, di medicina nucleare e di chemioterapia. Pertanto è fortemente giustificato l'interesse nei riguardi di queste particolari branche specialistiche per alcuni approfondimenti degli studi biodosimetrici.

### *Medicina nucleare oncologica*

La terapia con  $^{131}\text{I}$  è ormai ampiamente riconosciuta come valido aiuto nel trattamento dei carcinomi differenziati della tiroide. I suoi effetti collaterali sono ridotti e le complicanze sono abbastanza rare, tanto da far ritenere che il beneficio della terapia supera in genere i rischi connessi. Tuttavia, questa terapia, benchè in uso da più di 40 anni, è stata per molto tempo argomento di disputa per quanto riguarda la valutazione dei suoi effetti benefici, delle modalità di esecuzione e della sua applicazione in condizioni radioprotezionistiche accettabili (Bushnell et al., 1992).

Nel contesto radioprotezionistico il livello di dose ricevuto dal paziente, soprattutto a livello dei siti bersaglio dello  $^{131}\text{I}$ , è di grande importanza. Esso viene di solito calcolato facendo riferimento al modello dosimetrico BEL (Benua et al., 1962), alla pubblicazione n. 5 del MIRD (MIRD, 1975), alla pubblicazione n. 53 dell'ICRP (ICRP, 1987) e a modelli matematici sviluppati dai vari Autori (Stabin, 1991; Wheldon et al. 1991; Maxon et al., 1992).

E' stato utilizzato il nostro metodo dei micronuclei per stimare la dose ricevuta dai pazienti sottoposti a terapia radiometabolica con  $^{131}\text{I}$  (dosimetria

citogenetica), valutando inoltre la risposta individuale all'irradiazione attraverso l'indice 3AB. Si è tentato anche di valutare a livello individuale l'attenuazione della risposta citogenetica indotta dallo  $^{131}\text{I}$  in funzione del tempo trascorso dopo la somministrazione di ogni singola dose. A tale scopo è stato utilizzato un modello matematico di decadimento esponenziale (Catena et al., 1993d; 1993e; 1994a).

Il nostro studio ha riguardato 21 pazienti sottoposti a tiroidectomia totale e a successivo trattamento con  $^{131}\text{I}$ . La frequenza media dei micronuclei di 0,044 ( $\pm 0,006$ ) osservata nei pazienti è risultata significativamente differente ( $p < 0,001$ ) da quella osservata in 93 soggetti sani di controllo ( $0,025 \pm 0,001$ ). L'approccio metodologico per valutare se la diversità della risposta fosse causata dal trattamento radiometabolico, ha portato a correlare l'attività totale ( $A_{\text{tot}}$ ) somministrata al paziente, espressa in mCi, con la risposta citogenetica osservata. La correlazione tra le due misure è ben rappresentata dal seguente formalismo:

$$F_{(\text{MN})} = 4.7 \cdot 10^{-5} (\pm 8.9 \cdot 10^{-6}) A_{\text{tot}} + 0.017; \quad R = 0,718 \quad [1]$$

dove il valore in parentesi è l'errore standard del coefficiente angolare.

Per valutare l'attenuazione della risposta citogenetica nel tempo è stata formulata una relazione di decadimento che ha lo scopo di tradurre il valore dell'attività totale somministrata al paziente in valore "attuale" (attività modificata). L'attività modificata, che ha un valore necessariamente più basso dell'attività somministrata, è espressa da :

$$A_{\text{mod}} = \sum_{i=1} (A_i \cdot e^{-(d_i \cdot k)})$$

dove  $A_i$  sono le attività dello  $^{131}\text{I}$  somministrate al paziente nei vari trattamenti;  $d_i$  il numero dei giorni trascorsi tra una singola somministrazione alla data del prelievo di sangue e  $k$  è il coefficiente giornaliero di attenuazione della radioattività somministrata. Attribuendo a  $k$  valori crescenti da 0 a 1 si vengono ad identificare i corrispondenti valori di  $A_{\text{mod}}$  che consentono di stabilire la migliore regressione lineare tra valori di radioattività e frequenza dei micronuclei.



Per valutare se l'effetto radiobiologico indotto dal trattamento con  $^{131}\text{I}$  viene ad essere influenzato dalla radiosensibilità di ogni singolo individuo è stato calcolato l'indice 3AB ( $I_{3AB}$ ). La media pesata dell' $I_{3AB}$  calcolata su 15 pazienti sottoposti alla terapia ( $0,320 \pm 0,046$ ) si è rivelata più alta del valore ottenuto su 38 soggetti di controllo ( $0,217 \pm 0,032$ ) (tabella 7). Sebbene sia stato ottenuto su di un numero esiguo di pazienti questo dato, se confermato, riveste un particolare interesse in quanto consentirebbe di ipotizzare che un lieve stress radiobiologico ripetuto nel tempo possa potenziare l'attività della poli(ADP-riboso)polimerasi e quindi avere effetti favorevoli sulla riparazione del DNA. I nostri studi, da considerarsi ovviamente del tutto preliminari, indicano che il metodo dei micronuclei combinato con l'indice 3AB può essere utilizzabile per analizzare alcune importanti caratteristiche radiobiologiche dei linfociti dei pazienti sottoposti a terapia radiometabolica con  $^{131}\text{I}$ . Questi dati citogenetici fanno intravedere la possibilità di un adeguamento della terapia in funzione della radiosensibilità intrinseca del paziente.

Tab. 7 - Distribuzione di frequenza dell'indice 3AB

Indice 3AB		pazienti		controlli	
da:( $\geq$ )	a:( $<$ )	n.	%	n.	%
0,00	0,05	1	6,7	5	13,2
0,05	0,10	0	0,0	2	5,3
0,10	0,15	1	6,7	5	13,2
0,15	0,20	0	0,0	6	15,8
0,20	0,25	1	6,7	4	10,5
0,25	0,30	1	6,7	5	13,2
0,30	0,35	2	13,3	4	10,5
0,35	0,40	1	6,7	0	0,0
0,40	0,45	4	26,7	5	13,2
0,45	0,50	4	26,7	1	2,6
0,50	0,55	0	0,0	1	2,6

### *Radioterapia oncologica*

Nel campo della radioterapia oncologica l'individuazione di parametri biologici indicativi e predittivi della risposta individuale al trattamento ha stimolato studi e ricerche i cui risultati sono tuttavia ancora molto controversi.

Nell'ambito delle indagini riguardanti la radiosensibilità delle cellule tumorali un contributo fondamentale è stato dato da Fertil e Malaise (1985).

Questi Autori hanno dimostrato che la radiosensibilità delle linee cellulari derivate direttamente da vari tumori umani è caratteristica per ogni tumore. Il parametro da loro considerato come predittivo è la frazione di cellule sopravvivate dopo una dose di 2 Gy (SF2). Questa osservazione ha trovato successive ed incoraggianti riscontri negli studi di molti Autori (Deacon et al., 1984; Tucker, 1986; West et al. 1989; Weichselbaum et al., 1989; Brock et al., 1989; Jacobson, 1993). Bristow e Hill (1985), in esperimenti che prevedevano trattamenti frazionati su tumori murini di differente radiosensibilità e misure di sopravvivenza delle cellule tumorali dopo espianto, hanno mostrato che il grado di morte cellulare in ciascun tumore trattato "in vivo" veniva "predetto" dalla SF2 misurata "in vitro". Tuttavia, non tutti gli studi hanno poi confermato questa correlazione tra la risposta del tumore alla radioterapia e la relativa risposta "in vitro" delle cellule tumorali (Ramsay et al., 1992; Raaphorst, 1993).

Analoghe considerazioni valgono per l'utilizzazione di altri parametri biologici, come il grado di ploidia e la frazione di cellule tumorali in fase S determinati con diversi metodi ( timidina tritiata, bromodeossiuridina, citofluorimetria). Tali parametri si sono rivelati promettenti nel predire l'evoluzione della malattia tumorale e la sua radiocurabilità, ma non sono risultati estensibili a tutte le neoplasie (Barlogie et al, 1980; Tepper J.E., 1983; Streffer et al., 1986; Tubiana e Courdi, 1989).

I nostri studi sulla misura dell'effetto citogenetico "in vitro", mediante il metodo dei micronuclei su linfociti umani appena prelevati, hanno fornito alcune valide indicazioni sulla radiosensibilità linfocitaria (e per estensione dell'individuo donatore). E' sembrato quindi coerente trasferire le tematiche di questo delicato capitolo della radiobiologia alla radioterapia oncologica proprio in considerazione della reale possibilità di misurare mediante il metodo dei micronuclei la radiosensibilità dei pazienti (Fenech et al., 1990; Gantenberg et al., 1991) e dei processi neoplastici da trattare (Shibamoto et al., 1991; Thierens et al., 1991).

L'uso del metodo dei micronuclei su linfociti umani di soggetti sottoposti a radioterapia (esposizione frazionata) per tumori polmonari (6 pazienti), pelvici (15 pazienti), mammari (7 pazienti), della testa e del collo (4 pazienti) e per linfoma di Hodgkin (4 pazienti) hanno avuto lo scopo di valutare; 1) la capacità biosimetrica del test in varie condizioni di esposizione; 2) la dose biologica assorbita (al corpo intero) a livello individuale; 3) l'attenuazione dell'effetto citogenetico in funzione dell'intervallo tra esposizione e prelievo (Catena et al., 1994d; 1994e; 1995; submitted, a).

Per le pazienti irradiate per tumore della mammella, il metodo dei micronuclei non ha permesso di evidenziare una risposta dose-effetto per la bassa ed omogenea risposta citogenetica. Tale comportamento può essere giustificato sia dalle modalità dell'esposizione, che dalla ridotta irradiazione sanguigna del sito irradiato. Per i pazienti irradiati per linfoma di Hodgkin e per tumori dell'area testa-collo sembra esistere una correlazione dose-dipendente (debole nel primo caso e più evidente nel secondo) che necessita però di ulteriore verifica attraverso un maggiore campionamento (figura 19).

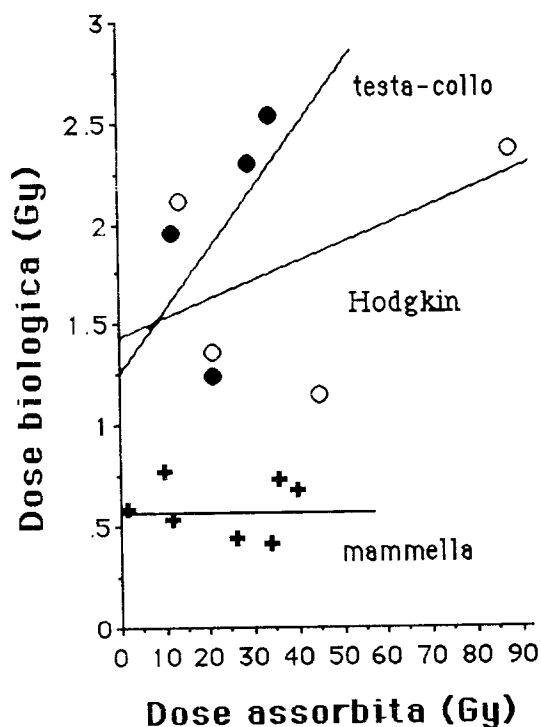


Fig. 19 - Dose biologica misurata su pazienti irradiati per linfoma di Hodgkin, e per tumori alla mammella e all'area testa-collo.

Nei pazienti sottoposti a radioterapia in sede polmonare e pelvica, il metodo dei micronuclei ha permesso di evidenziare che all'aumentare della dose fisica totale somministrata è presente un aumento proporzionale della dose biologica (figura 20). Pertanto, il metodo dei micronuclei sembra idoneo per misure biodosimetriche in soggetti sottoposti a radioterapia in sedi con più elevata irradiazione sanguigna. Tuttavia, essendo l'esposizione del paziente frazionata, l'andamento della dose biologica in funzione di quella fisica tende ad attenuarsi all'aumentare della dose fisica totale, verosimilmente per l'instaurarsi di fenomeni di riparazione a livello citogenetico. Assumendo su base modellistica che l'andamento della curva della figura 20 sia dovuta a



parziale recupero radiobiologico nel tempo dopo ogni singola frazione di dose, è possibile misurare l'entità di tale recupero utilizzando la seguente equazione:

$$D_b = \sum_{i=1} (D_d \cdot e^{-(d_i \cdot k)})$$

dove  $D_b$  è la dose biologica,  $D_d$  è la dose giornaliera calcolata,  $d$  sono i giorni trascorsi dalla singola dose al giorno del prelievo,  $k$  è il fattore di recupero citogenetico. In accordo con la modellistica citata si possono attribuire a  $k$  le seguenti caratteristiche: 1) per  $k$  tendente a zero la dose biologica tende a coincidere con la dose fisica somministrata, condizione questa indicativa di un ridotto recupero citogenetico; 2) valori positivi e crescenti di  $k$  sono correlabili alla parziale scomparsa dell'effetto citogenetico nel tempo.

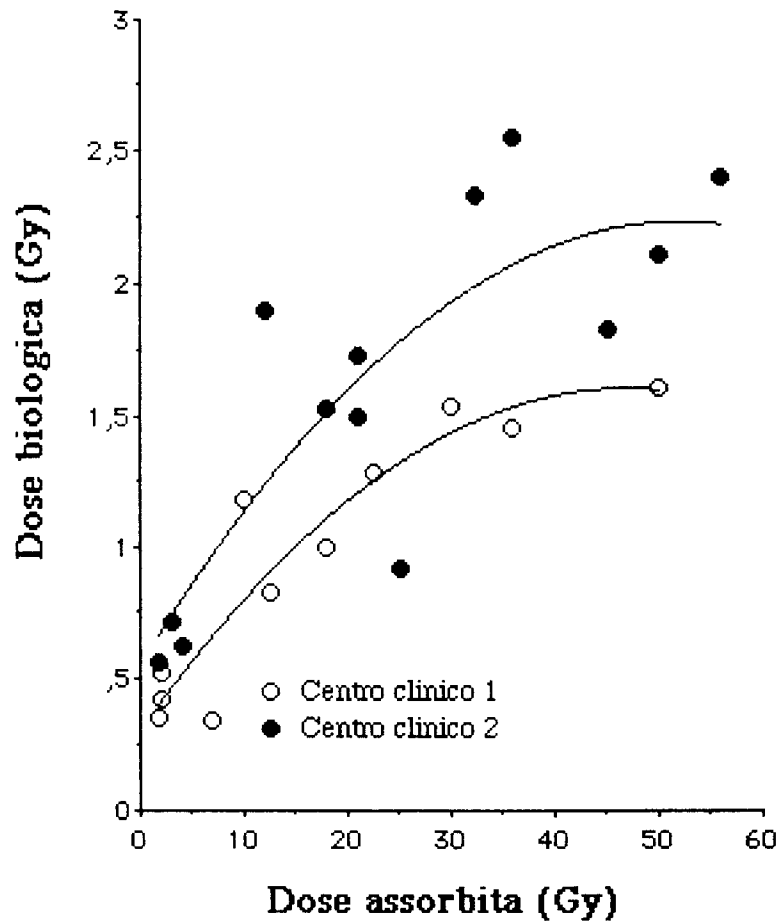


Fig. 20 - Dose biologica in funzione della dose assorbita in pazienti irradiati nel sito pelvico o polmonare.

Coerentemente con questa modellistica è possibile ipotizzare che dopo una esposizione frazionata (di tipo terapeutico) un valore di  $k$  decisamente basso evidenzia una elevata radiosensibilità del pool linfocitario ovvero identifica un soggetto in cui vi è verosimilmente uno scarso recupero del danno citogenetico. Al contrario, un valore di  $k$  decisamente elevato evidenzia una bassa radiosensibilità del pool linfocitario, ovvero identifica un soggetto in cui è presumibile un rapido recupero del danno citogenetico.

Nelle nostre esperienze preliminari, condotte su soggetti sottoposti a radioterapia per neoplasie polmonari e pelviche (21 soggetti), i valori di  $k$  sono compresi in un intervallo tra 0,030 e 0,307. Questa variabilità individuale potrebbe essere una base di riferimento per un confronto con la risposta clinica al trattamento (indicatori sintomatologici di radiocurabilità).

Nel complesso, le ricerche sulla utilizzazione del metodo dei micronuclei e il loro sviluppo modellistico (fattore  $k$ ) potrebbero risultare utili per alcune problematiche connesse alla radioterapia. Ad esempio, poiché in giovani pazienti trattati per neoplasie a prognosi frequentemente favorevole (linfoma di Hodgkin e seminoma) la dose assorbita al corpo intero rappresenta un importante cofattore per l'insorgenza di "secondi tumori", potrebbe essere interessante conoscere preventivamente la risposta citogenetica e quindi l'intrinseca radiosensibilità del soggetto. L'aumento del rischio cancerogeno in questi soggetti sottoposti a radio- e chemioterapia potrebbe quindi trovare nel test citogenetico un metodo utile di stima prognostica.

Anche gli effetti acuti e tardivi clinicamente osservati in seguito a radioterapia potrebbero essere in parte spiegati attraverso il fattore di recupero citogenetico. Riguardo ai danni acuti, la conoscenza preventiva della radiosensibilità del soggetto potrebbe fornire un'indicazione circa la possibilità di sottoporre il paziente a frazionamenti accelerati o a trattamenti combinati radio- e chemioterapici, che notoriamente possono comportare danni acuti generalmente maggiori. Inoltre, osservazioni cliniche protratte nel tempo potrebbero dare conferma della validità del fattore  $k$  nell'esprimere l'eventuale predisposizione del soggetto a sviluppare danni tardivi.

### *Oncologia medica (chemioterapia)*

Sebbene gran parte delle ricerche condotte fino ad ora siano state dedicate alla dosimetria citogenetica nella radiopatologia e nella radioprotezione, recentemente i nostri studi hanno riguardato anche la chemioterapia in oncologia. L'osservazione citogenetica ha compreso due

gruppi di pazienti: 1) pazienti sottoposti a trattamento con cis-platino (CDDP) e vinorelbina (VNB) per carcinoma polmonare non a piccole cellule (9 soggetti); 2) pazienti sottoposti a trattamento con 5-fluorouracile (5FU) da solo o in combinazione con acido folinico per adenocarcinoma del grosso intestino (9 soggetti).

Tab. 8 - Frequenza dei micronuclei dopo trattamento con cis-platino e vinorelbina.

Gruppo	Pz.	Età	CDDP+VNB (mg)	Frequenza dei MN			
						2 Gy "in vitro"	
				basale	in terapia	basale	in terapia
<b>A</b>	PF	73	280	0,044	0,034	0,455	0,311
	PA	71	420	0,081	0,060	0,403	0,541
	PA	"	420	-	0,024		0,198
	TA	71	210	0,046	0,063	0,302	0,306
<b>B</b>	PA	72	270	0,120	0,064	-	0,268
	RG	53	220	0,040	0,118	0,472	0,361
<b>C</b>	SP	46	800	0,082	0,055	0,643	0,571
	SP	"	800		0,410		0,745
	LE	70	270	0,022	0,421	-	0,622
	LE	"	270		0,062		
	MC	63	460	0,050	0,599	0,583	0,804
	CG	70	400	-	0,653	-	0,846
	CG	"	400		0,091		0,421
	CG	"	400		0,132		0,534

Le finalità dello studio erano: a) valutare la capacità clastogena del trattamento terapeutico in relazione alla dose somministrata, allo schema terapeutico adottato e alla sensibilità individuale; b) verificare la capacità predittiva della metodica riguardo all'efficacia e alla tossicità della terapia mediante la correlazione tra dati citogenetici e clinici. Il metodo dei micronuclei è stato eseguito sui linfociti del sangue periferico dei pazienti prima dell'inizio della terapia (prelievo basale) e nel corso della terapia (dopo 2 cicli e dopo 4-5 cicli).

I valori basali delle frequenze dei micronuclei sono risultati superiori a quelli osservati in individui sani, presentando inoltre una notevole variabilità individuale. Essi sono compresi in un intervallo da 0,022 a 0,120 con un

valore medio di 0,061 ( $\pm 0,011$ ) nei pazienti affetti da carcinoma polmonare non a piccole cellule e in un intervallo da 0,050 e 0,113 con un valore medio di 0,076 ( $\pm 0,008$ ) nei pazienti affetti da adenocarcinoma del grosso intestino. I due valori medi sono statisticamente diversi dalla media di 0,026 ( $\pm 0,0013$ ) ottenuta su 134 soggetti sani di controllo. Per quanto riguarda le frequenze dei micronuclei ottenute nel corso delle terapie i risultati divergono tra i due trattamenti.

Tab. 9 - Frequenza dei micronuclei dopo trattamento con 5-fluorouracile.

Pz	Età	5FU (mg)	Frequenza dei MN				
			basale	in terapia	2 Gy "in vitro"		
					basale	in terapia	terapia-basale
RU	68	5600	0,063	0,090	-	0,537	-
BT	67	13000	0,104	0,083	0,793	0,425	-0,368
		22100		0,099		0,600	-0,193
EG	56	3250	0,082	0,065	0,660	0,674	0,014
		10700		0,035		0,510	-0,150
		18750		0,037		0,475	-0,185
SA	57	9100	0,050	0,042	0,639	0,487	-0,152
		17500		0,022		0,419	-0,220
CC	56	9100	0,072	0,061	0,657	0,407	-0,250
		19500		0,025		0,565	-0,092
LR	63	2050	-	0,047	-	0,635	-
		17550		0,080		0,455	-
CA	42	5600	0,050	0,046	0,530	0,275	-0,255
		14000		0,034		0,423	-0,107
MR	53	4550	0,113	0,099	0,405	0,501	0,096
GO	60	4100	0,072	0,111	0,337	0,516	0,179
		11100		0,030		0,434	0,097

Nel trattamento con CDDP+VNB i valori ottenuti hanno permesso di suddividere i pazienti in tre gruppi in funzione dell'effetto citogenetico

osservato (tabella 8): 1) gruppo A con diminuzione della frequenza dei micronuclei durante la terapia; 2) gruppo B con frequenza dei micronuclei più elevata rispetto ai valori basali; 3) gruppo C con frequenza dei micronuclei significativamente maggiore rispetto ai valori basali, con notevole diversità inter- e intraindividuale.

Nel trattamento con 5FU si evidenzia sostanzialmente una incapacità del farmaco a produrre micronuclei "in vivo" (assenza di effetto clastogeno?) (tabella 9). Il trattamento "in vitro" con una dose di 2 Gy di raggi X dei linfociti dei pazienti in terapia con 5FU, evidenzia (in 5 casi su 7) una frequenza di micronuclei notevolmente minore (valori negativi in ultima colonna di tabella 9). Tale fenomeno è particolarmente evidente a dosi superiori a 4100 mg del farmaco chemioterapico e risulta dipendente dalla dose farmacologica (figura 21).

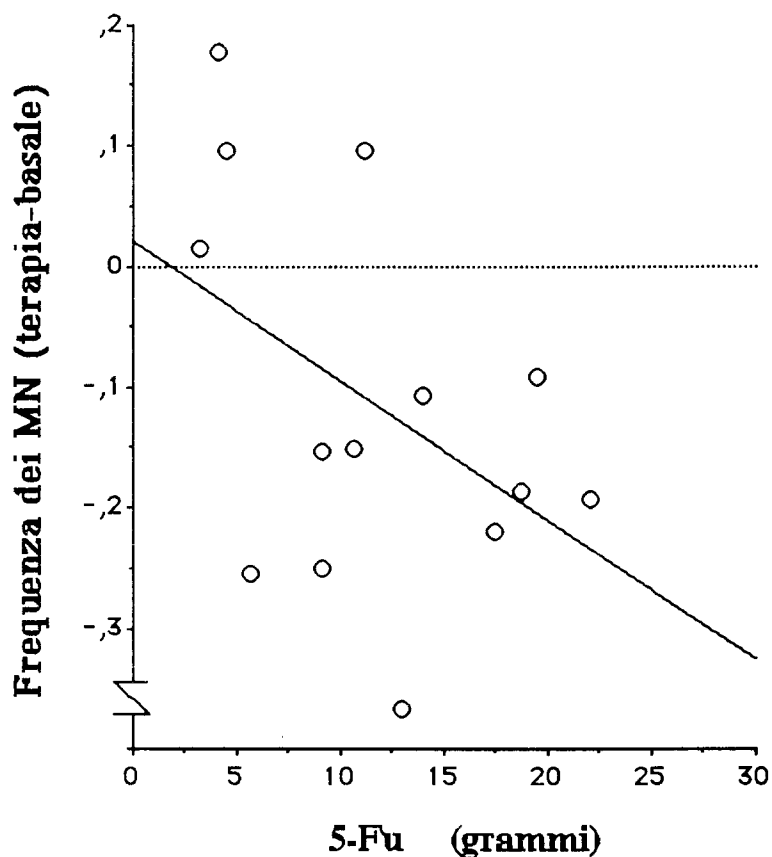


Fig. 21 - Effetto della terapia con 5-FU sulla frequenza dei micronuclei dopo un trattamento "in vitro" con una dose di 2 Gy di raggi X.

Alla luce dei dati finora raccolti, sono possibili le seguenti considerazioni di ordine generale. L'aumento della frequenza dei micronuclei nei prelievi basali dei pazienti affetti da patologia neoplastica, rispetto ai

soggetti sani di controllo, può essere considerata una indicazione di "fragilità citogenetica" meritevole di approfondimento. Tale condizione, se confermata dall'analisi di un numero maggiore di soggetti, potrebbe assumere forti implicazioni di ordine diagnostico. Il trattamento con cis-platino associato alla vinorelbina produce un aumento dei micronuclei nei linfociti dei pazienti sottoposti a tale terapia differenziato tra i vari soggetti. La clastogenicità riscontrata è in perfetto accordo con le modalità d'azione del cis-platino che si lega stabilmente al DNA con formazione di ponti intra- e interfilamento provocando la rottura della molecola. Mettendo in relazione l'esito della malattia tumorale dopo il trattamento chemioterapico con la frequenza dei micronuclei si può ipotizzare che ai diversi tipi di risposta citogenetica potrebbe corrispondere una diversa evoluzione della patologia (tabella 10). L'ipotesi di una relazione tra frequenza dei micronuclei ed efficacia del trattamento appare particolarmente incoraggiante soprattutto ai fini prognostici. Il trattamento con il farmaco chemioterapico 5FU (da solo o in combinazione con l'acido folinico) non produce un aumento dei micronuclei nei linfociti dei pazienti sottoposti a tale terapia e pertanto non è possibile effettuare una valutazione citogenetica.

Tab.10 - Confronto tra effetto citogenetico ed esito della malattia tumorale dopo trattamento con cis-platino e vinorelbina.

Gruppo	Paz.	CDDP+VNB (mg)	Frequenza dei MN		Esito
			prel. A	prel. B	
A	PF	280	0,034	-	PRO
	PA	840	0,060	0,024	NC
	TA	210	0,063	-	PRO? - NC
B	PA	270	0,064	-	NC
	RG	220	0,118	-	NC
C	SP	800	0,055	0,410	RP< 50%
	LE	540	0,421	0,062	RP<50%
	MC	460	0,599	-	NC
	CG	800	0,653	0,091	RP<50%

PRO: progressione di malattia; NC: nessun cambiamento; RP: remissione parziale

Un approfondimento maggiore meriterebbe comunque l'effetto biologico osservato su queste cellule che, venute a contatto "in vivo" con il 5FU, presentano una minore produzione di micronuclei dopo trattamento "in

vitro" con 2 Gy di raggi X. Ques'ultimo fenomeno propone due ipotesi: a) quella di una probabile risposta adattativa della cellula linfocitaria a seguito del trattamento farmacologico; b) quella del turnover del pool linfocitario stimolato dall'azione del farmaco con immissione in circolo di cellule linfocitarie più radioresistenti.

## CITOGENETICA COMPARATA

### *Modello animale 1*

Si è voluto trovare conferma alla coerenza e all'efficienza del sistema diagnostico adottato attraverso studi di citogenetica comparata. La validità del suddetto approccio è stata dimostrata inizialmente attraverso confronti radiobiologici tra uomo e cane (Catena et al., 1992b; 1992c; 1993c; 1994c). Questa breve indagine, effettuata con la collaborazione del Centro Studi del Corpo Veterinario Militare, pone l'accento su due considerazioni preliminari: a) il numero cromosomico del cane molto elevato rispetto a quello umano (rapporto  $78/46 = 1,7$ ); b) l'eventuale specie-specificità della risposta alla 3AB. Per un ulteriore confronto sono stati raccolti anche i dati ottenuti con analoghe metodiche sperimentali da una linea cellulare di hamster cinese (CL1/AF) stabilizzata in coltura "in vitro". Queste cellule presentano la caratteristica di possedere 22 cromosomi, cioè un corredo cromosomico pari alla metà (meno uno) di quello umano.

In figura 22 è mostrato un istogramma dell'induzione di micronuclei in cellule binucleate dopo un trattamento con raggi X "in vitro" con e senza 3AB nelle tre diverse specie cellulari. Come è possibile notare, sia per il solo irraggiamento che per i trattamenti combinati con la 3AB, appare una debole, ma sostanziale correlazione con il numero cromosomico della specie.

Per quanto riguarda il solo trattamento con una dose di 2Gy assume un particolare rilievo il livello di induzione citogenetica fondamentale associato al numero dei centromeri. Il confronto sperimentale dell'effetto citogenetico radioindotto in cellule con diverso numero di cromosomi può consentire la verifica dell'ipotesi secondo cui il micronucleo derivi da uno o più eventi dannosi di rottura del cromosoma (frammento acentrico) o di alterazione del centromero e suo mancato aggancio con le fibre del fuso (Evans et al., 1959; Heddle et al., 1978; Yamamoto e Kikuchi, 1981).



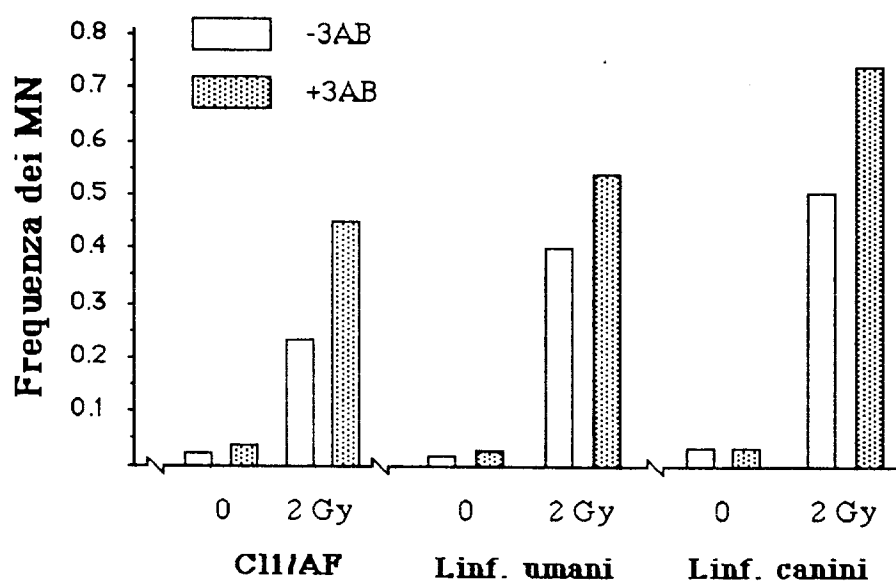


Fig. 22 - Frequenza dei micronuclei nelle tre specie cellulari dopo trattamento di raggi X "in vitro" con e senza la 3-aminobenzamide (3AB).

Inoltre, è risultato che il trattamento con 3AB, sia nei controlli che nei trattati con raggi X "in vitro", non modifica sostanzialmente l'avanzamento nel ciclo cellulare dopo PHA-stimolazione nelle tre specie considerate. L'elevata frequenza dei micronuclei in presenza della 3AB dopo una dose di 2 Gy mette in evidenza che esiste, nelle tre specie considerate, un potenziamento dell'effetto radioindotto da parte dell'inibitore 3AB.

Nella figura 23 è riportato il valore dell'indice 3AB ottenuto in linfociti umani e canini a livello individuale. Come si può notare, in entrambe le specie, le medie sono statisticamente simili ( $p=0,37$ , t-test) ed il loro campo di variabilità, espresso come deviazione standard (+/-sd), si trova nettamente al di sopra dello zero. Ciò dimostra che l'inibitore è in grado di potenziare l'induzione dei micronuclei e che il suo effetto è quantitativamente identico nelle due specie. Inoltre, l'ampiezza della variabilità individuale riscontrata a livello umano è dello stesso ordine di quella rilevata a livello canino. L'indice 3AB, ottenuto come media dei soggetti osservati, acquista, per le due specie, valori di 0,25 (linfociti umani) e 0,33 (linfociti canini).

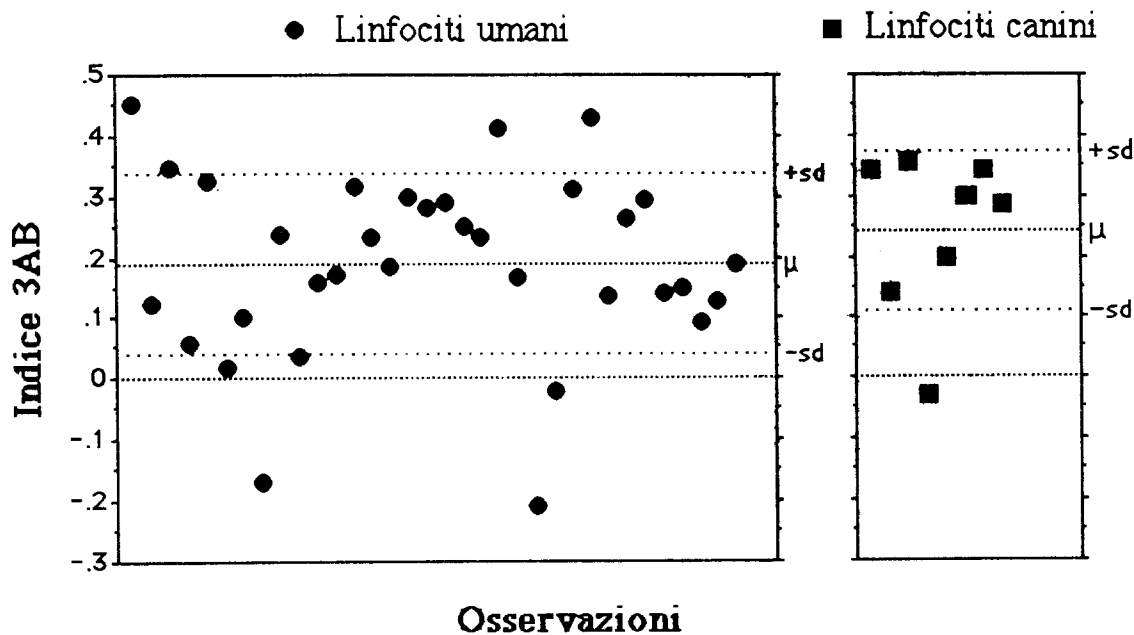


Fig. 23 - Indice 3AB ottenuto su linfociti umani e canini a livello individuale.

### *Modello animale 2*

I risultati si riferiscono ad una fase preliminare di un progetto di ricerca avviato con il Servizio Veterinario dell'Arma dei Carabinieri sul melanoma del cavallo a mantello grigio in considerazione dell'elevata incidenza della suddetta patologia in questa varietà equina. In esperienze radiobiologiche effettuate su linfociti equini è stato sorprendentemente osservato che la frequenza dei micronuclei in funzione della dose è risultata spiccatamente superiore (Catena et al., submitted,b). Nella figura 24 è mostrato un istogramma dell'induzione di micronuclei in cellule binucleate di uomo e di cavallo dopo un trattamento con raggi X "in vitro" alle diverse dosi. E' possibile notare come i linfociti equini appaiano estremamente sensibili se confrontati con quelli umani. Per dosi fino ad 1 Gy l'effetto citogenetico indotto dalle radiazioni "in vitro" nei linfociti equini è circa doppio di quello osservato, nelle stesse condizioni, nei linfociti umani. Inoltre, anche nei controlli (non irradiati) esiste una significativa differenza citogenetica tra i linfociti del cavallo e quelli dell'uomo.

L'interesse suscitato da questa fenomenologia ci ha indotto ad eseguire sui linfociti delle due specie delle misure di letalità cellulare dopo trattamento con raggi X. Il metodo utilizzato è basato sul grado di marcatura del DNA per mezzo della timidina tritiata ( $^3\text{H-Td}$ ). Nelle nostre condizioni sperimentali

questo metodo si può considerare come sinonimo di letalità cellulare. In figura 25 è mostrato il diagramma dose-effetto sulla inibizione della sintesi del DNA nei linfociti umani e equini. E' evidente come i linfociti equini rispondano in maniera estremamente più sensibile rispetto a quelli umani. Da ciò emergono almeno due considerazioni: a) i due modelli divengono fortemente interessanti per studi comparativi di radiosensibilità cellulare; b) la potenziata risposta alle r.i. dei linfociti equini propone questa specie come biossimitro campale.

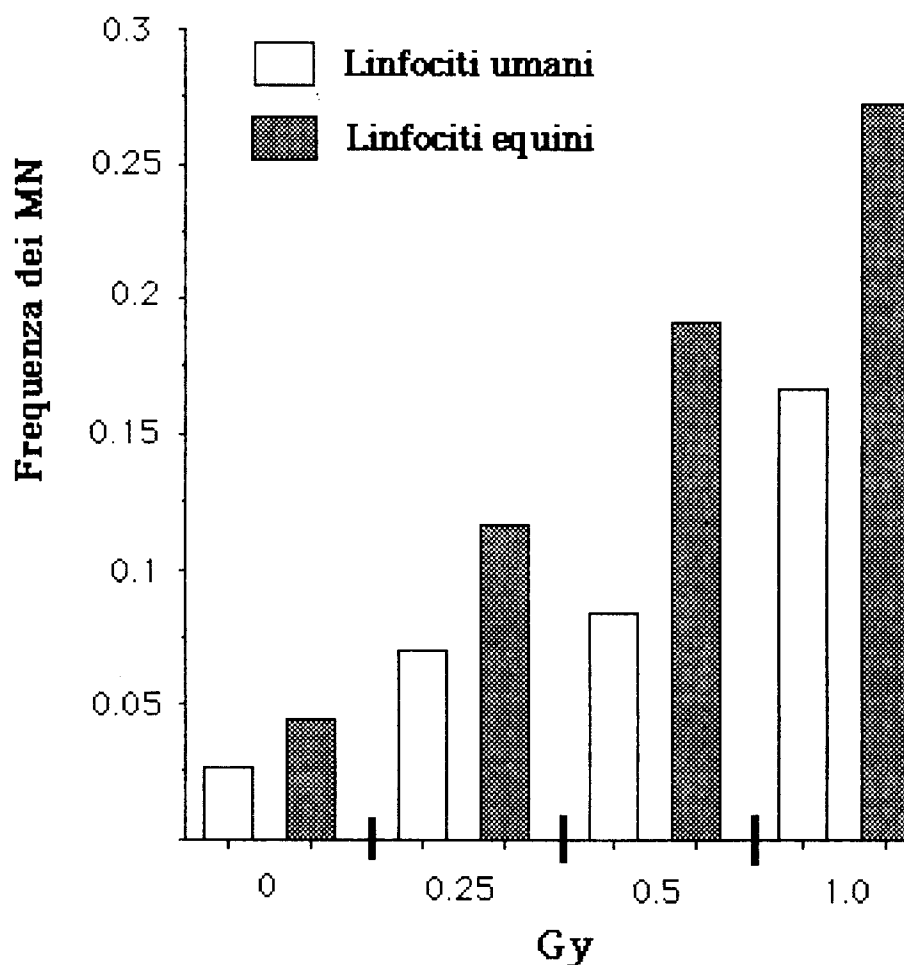


Fig. 24 - Frequenza dei MN osservata in linfociti umani e equini a dosi crescenti di raggi X "in vitro".

Questa ricerca ha consentito, tra l'altro, di porre in evidenza la generalizzazione del fenomeno biologico a specie diverse e la possibilità di valutarlo sperimentalmente in termini qualitativi e quantitativi. Ciò stimola ad approfondire questa tematica anche su altre specie la cui presenza sia significativa sul territorio (come quella ovina e bovina). Una circostanza favorevole ha voluto che nel Piano Sanitario Nazionale 1994-1996 (G.U. n.8

Suppl. Ord. del 12.1.1994) fosse espressamente citato l'impiego del modello animale come mezzo di sorveglianza ai fini della salvaguardia dell'ambiente.

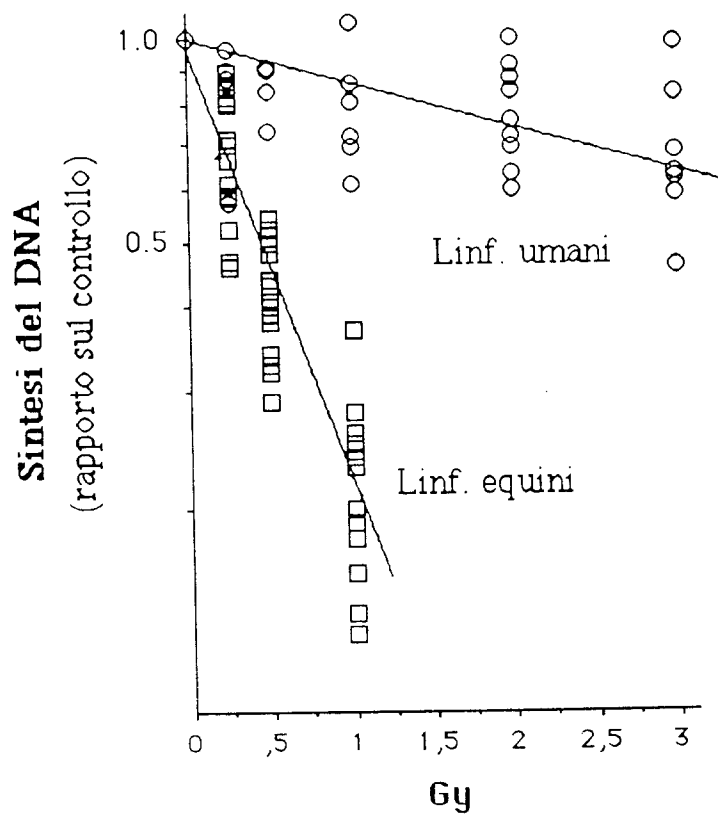


Fig. 25 - Sintesi del DNA in linfociti umani e equini dopo trattamento "in vitro" con raggi X.

## CONCLUSIONI

In ambito nazionale la ricerca biodosimetrica viene svolta soltanto presso alcuni Istituti scientifici e comunque al di fuori di un piano organico che abbia, ad esempio, i requisiti di un "progetto finalizzato". Inoltre, pur escludendo, in quanto realisticamente non giustificata, una permanente ed esclusiva struttura di servizio allo scopo dedicata, è tuttora mancante un meccanismo istituzionalizzato capace di convertire competenze scientifiche in pronte ed efficienti disponibilità operative, con modalità tali da soddisfare la vasta gamma delle peculiari esigenze (geografiche, tecniche, temporali e quantitative) determinate da incidenti certi o presunti da sovraesposizione alle radiazioni ionizzanti.

I risultati scientifici in precedenza presentati e discussi giustificano l'applicazione dei metodi citogenetici (dicentrici e micronuclei) e dell'indice 3AB, così come messi a punto dal nostro gruppo di ricerca, nelle seguenti aree:

1) **dosimetria biologica** in caso di sovraesposizione accidentale alle radiazioni ionizzanti;

2) **prescreening della radiosensibilità** di individui professionalmente esposti al rischio da radiazioni ionizzanti (curva dose-effetto personalizzata per la dosimetria citogenetica?);

3) **identificazione di gruppi della popolazione** con maggiore instabilità genomica (fragilità cromosomica) e quindi potenzialmente a maggior rischio di patologie oncologiche e di anomalie genetiche;

4) **studio delle alterazioni citogenetiche** nelle patologie oncologiche in atto;

5) **studio della radiosensibilità dei tumori** da sottoporre a radioterapia;

6) **studio della radiosensibilità dei pazienti** da sottoporre a radioterapia;

7) **studio sugli effetti genotossici di agenti fisici** diversi dalle r.i., **da agenti chimici** (chemioprotezione professionale) e **da agenti biologici**;

8) **impiego del modello animale quale strumento di sorveglianza** nella salvaguardia dell'ambiente.

Nel prossimo futuro particolare attenzione sarà dedicata al tema del rateo di dose (almeno per le radiazioni a basso LET) e dell'effetto delle basse e bassissime dosi, tema questo tuttora controverso, ma certamente suggestivo nel duplice aspetto di lesività e di stimolazione biologicamente vantaggiosa (risposta adattativa). Di indubbio interesse è inoltre lo studio, ai fini biodosimetrici, dell'effetto biologico delle radiazioni ad alto LET, i cui comportamenti radiobiologici indotti necessitano di maggiori approfondimenti soprattutto in una prospettiva di ordine applicativo.

L'iter conoscitivo sinora percorso dal nostro gruppo di ricerca allo scopo di approfondire ed estendere il campo di applicabilità della biodosimetria ha permesso di lasciare contributi scientifici concretamente promettenti in ogni settore esplorato (medicina nucleare, radioterapia, chemioterapia oncologica, citogenetica comparata), acquisendo nel contempo, di ritorno, ulteriori dati utili per migliorare le applicazioni di questa disciplina biologica in radioprotezione.

La richiesta di partecipazione e lo spirito di adesione da parte di altre Istituzioni scientifiche ai nostri temi di ricerca è di grande incoraggiamento ai fini della prosecuzione e dell'approfondimento del nostro studio. Come pure, la partecipazione al nostro programma, quale occasione di formazione scientifica e professionale, di giovani ricercatori costituisce per noi un indubbio motivo di gratificazione.

## GLOSSARIO

**3-aminobenzamide (3AB):** agente chimico inibitore dell'enzima poli(ADP-ribosio)polimerasi attivo nella riparazione del DNA

**Aberrazione cromosomica:** alterazione morfologica del cromosoma

**Citocalasina B (cyt B):** agente chimico che inibisce, al termine della mitosi, la suddivisione della cellula nelle due cellule figlie

**Curva di calibrazione:** espressione grafica dell'elaborazione matematica che descrive il rapporto tra dose assorbita e danno biologico osservato (relazione dose-effetto)

**Dicentrico:** aberrazione cromosomica prodotta dalla ricongiunzione di due cromosomi che hanno subito rotture da parte di tracce ionizzanti (il dicentrico è altamente specifico delle radiazioni ionizzanti)

**Dose assorbita:** rapporto tra l'energia depositata dalla radiazione ionizzante in una massa e la massa stessa. Unità di misura il Gray (Gy)= 1J/Kg= 100 rad

**DOSIME:** programma in linguaggio Basic in grado di calcolare la stima di dose assorbita, e la sua variabilità, attraverso il conteggio dei micronuclei osservabili nei linfociti

**Dosimetria biologica:** stima dosimetrica (di agenti fisici o chimici) basata sulla correlazione tra dose ed eventi biologici di varia natura (clinica, citologica, citogenetica, biochimica e mutazionale)

**Dosimetria citogenetica:** stima dosimetrica ottenuta mediante conteggio di aberrazioni cromosomiche o di micronuclei

**Fitoemoagglutinina (PHA):** agente chimico capace di trasformare il linfocita in cellula proliferante (cellula blastica)

**Indice 3AB (I3AB):** indice valutativo della riparazione del DNA basato sull'azione inibitrice della 3-aminobenzamide

**Metafase:** fase della mitosi in cui si rendono completamente visibili i cromosomi composti dai due cromatidi fratelli

**Micronucleo:** piccolo frammento cromatinico dotato di membrana nucleare osservabile nel citoplasma

**Radiosensibilità cellulare:** livello di risposta biologica di una specifica linea cellulare dopo una esposizione alle r.i.

**Radiosensibilità individuale:** livello di risposta biologica del singolo soggetto dopo una esposizione alle r.i.

**Test dei micronuclei:** metodo di valutazione del danno al DNA mediante conteggio dei micronuclei (MN)

## **BIBLIOGRAFIA**

AEN: La radioprotection aujourd'hui et demain. Opinion collective du Comité de Protection Radiologique et de Santé publique de l'Agence de l'OCDE pour l'énergie nucléaire, 1994.

Association for Radiation Research: Annual Meeting 12-15 July 1993  
University of Surrey, Guildford. *Int. J. Radiat. Biol.* 65, 1994.

Arlett C.F., Cole J. and Green M.H.L.: Radiosensitive individuals in the population. In: *Low Dose Radiation: Biological Bases of Risk Assessment*. K. F. Baverstock and J.W. Stather, eds, Taylor and Francis, London, pp. 240-252, 1989.

Balasesm A.N., Ali A.S.K.: Establishment of dose-response relationships between doses of Cs-137 gamma rays and frequencies of micronuclei in human peripheral blood lymphocytes. *Mut. Res.* 259, 133-138, 1991.

Ban S., Donovan M.P., Cologne J. B. and Sawada S.: Gamma-ray and fission neutron-induced micronuclei in PHA stimulated and unstimulated human lymphocytes. *J. of Radiat. Res.* 32, 13-22, 1991.

Barlogie B., Drewinko B., Schumann J., Gohde W., Dosik G., Latreille J., Johnston D.A. and Freieich E.J.: Cellular DNA content as a marker of neoplasia in man. *Am. J. Med.* 69, 195-203, 1980.

Bauchinger M.: Cytogenetic effects in human lymphocytes as a dosimetry system. In *Biological Dosimetry*, Eds W.G. Eisert and M.L. Mendelsohn. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 15-24, 1984.

BEIR III, National Academy of Sciences - National Research Council: Report of the Biological Effects of Ionizing Radiation. The Effects on Populations of Exposure of Low Levels of Ionizing Radiation. Report, 1980.

Bender M.A.: X ray-induced chromosome aberrations in normal diploid human tissue cultures. *Science* 126, 974-975, 1957.

Bender M.A., Brewen J.G.: Factors influencing chromosome aberration yields in the human peripheral leukocyte system. *Mut. Res.* 8, 383-390, 1969.

Bender M.A., Preston R.J.: Personal communication, Brookhaven National Laboratory, Upton, New York, and Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN, 1986.



Bender M.A., Awa A.A., Brooks A.L. et al.: Current status of cytogenic procedures to detect and quantify previous exposures to radiation. *Mut. Res.* 196, 103-159, 1988.

Bender M.A. and Setlow R.B.: Spontaneous and induced micronuclei and UDS in peripheral lymphocytes. *Mut. Res.* 313, 209-214, 1994.

Benua R.S., Cicale N.R., Sonenberg M. et al.: The relation of radioiodine dosimetry to results and complications in the treatment of metastatic thyroid cancer. *Am. J. Roent. Rad. Ther. Nuc. Med.* 87, 171-182, 1962.

Bristow R.G., Hill R.P.: Comparisons between *in vitro* radiosensitivity and *in vivo* radioresponse in murine tumour cell lines. In: Abstracts of Papers for the Thirty-Sixth Annual Meeting of the Radiation Research, 8 (Suppl.), S290-S296, 1985.

Brock W.A., Baker F. L., Peters L.J.: Radiosensitivity of human head and neck squamous cell carcinomas in primary culture and its potential as a predictive assay of tumor radiocurability. *Int. J. Radiat. Biol.* vol. 56, n. 5, 751-760, 1989.

Buckton K.E., Langlands A.O., Smith P.G., Woodcock G.E., Looby P.C.: Further studies on chromosome aberration production after whole-body irradiation in man. *Int. J. Radiat. Biol.* 19, 369-378, 1971.

Buckton K.E.: Chromosome aberrations in patients treated with X-irradiation for ankylosing spondylitis. *Radiation-induced Chromosome Damage in Man* (Alan R. Liss, New York), 491-511, 1983.

Bushnell D.L., Boles M.A., Kaufman G.E., Wadas M.A., Barnes W.E.: Complications, sequela and dosimetry of iodine-131 therapy for thyroid carcinoma. *J. Nucl. Med.* 33, 2214-2221, 1992.

CARIOPEPR (Gruppo di ricerca INFN-ENEA-SSN): Studio di un sistema automatizzato per la dosimetria citogenetica. Rapporto LNF 87/100(R), 20 novembre 1987.

Catena C., Conti D., Del Nero A., Righi E.: Inter-individual differences in radiation response shown by an "in vitro" micronucleus assay: effects of 3-aminobenzamide on X-ray treatment. *Int. J. Radiat. Biol.* 62, 687-694, 1992a.

Catena C., Conti D., Villani P., Archilei R., Righi E.: Analisi comparativa dell'effetto citogenetico (micronuclei) su linfociti umani e canini e sulla linea cellulare CL1/AF di hamster cinese dopo irraggiamento "in vitro". Boll. Associazione Italiana Veterinari Piccoli Animali (AIVPA) 3, 19-26, 1992b.

Catena C., Conti D., Villani P., Nastasi R., Righi E.: Radiosensibilità individuale. Il test dei micronuclei con 3-aminobenzamide. Riv. Med. Lav. Ig. Ind. Anno XVI, Luglio-Dicembre 1992c.

Catena C. e Righi E.: La dosimetria biologica delle radiazioni ionizzanti: aggiornamenti e fattibilità. La Medicina del Lavoro 84, 99-107, 1993a.

Catena C., Conti D., Del Nero A., Righi E.: La dosimetria citogenetica: curve dose-effetto e confronto metodologico. La Medicina del Lavoro 84, 133-146, 1993b.

Catena C., Conti D., Villani P., Nastasi R., Archilei R., Righi E.: Studio comparativo sugli effetti radioindotti a livello citogenetico. Indice 3-aminobenzamide. Rivista Militare di Medicina Veterinaria 6, 2-15, 1993c.

Catena C., Villani P., Nastasi R., Conti D., Righi E., Salerno G., Righi V., Ronga G.: Effetto citogenetico (micronuclei) e indice 3AB in pazienti tiroidectomizzati sottoposti a terapia radiometabolica con 131-I. XX Congresso Nazionale dell'Associazione Italiana di Radiobiologia (AIRB), Roma, 29-30 settembre 1993d.

Catena C., Villani P., Nastasi R., Conti D., Righi E., Salerno G., Righi V., Ronga G.: Micronuclei and 3AB-Index in patients receiving 131-I therapy. Congresso dell'Associazione Europea di Medicina Nucleare, Losanna (Svizzera), 10-14 ottobre 1993e.

Catena C., Villani P., Nastasi R., Conti D., Righi E., Salerno G., Righi V., Ronga G.: Micronuclei and 3AB-Index in patients receiving iodine-131 therapy. The Journal of Nuclear Biology and Medicine 38, 540-547, 1994a.

Catena C., Villani P., Conti D., Righi E.: Micronuclei and 3AB index in X-irradiated human lymphocytes in G<sub>0</sub> and G<sub>1</sub> phases. Mutation Research 311, 231-237, 1994b.

Catena C., Conti D., Villani P., Nastasi R., Archilei R. and Righi E.: Micronuclei and 3AB index in human and canine lymphocytes after in vitro X-irradiation. Mutation Research 312, 1-8, 1994c.

Catena C., Villani P., Conti D., Righi E., Marengo P., Bortolato B., Botturi M., Leoni M.: Test dei micronuclei: indicatore di effetto biologico in pazienti sottoposti a radioterapia. IV Cong. Naz. AIRO, Taormina, 14-17 Settembre 1994d.

Catena C., Parasacchi P., Conti D., Righi E., Marengo P., Bortolato B., Botturi M., Leoni M., Portaluri M., Paleani-Vettori P.G.: Cytogenetic biodosimetry in radiotherapy. VIII Congresso Nazionale dell'Associazione Italiana di Fisica Biomedica (AIFB). Pisa, 15-18 novembre 1994, *Physica Medica - Vol. X, N. 4, October-December 1994e*.

Catena C., Parasacchi P., Conti D., Righi E., Marengo P., Bortolato B., Botturi M., Leoni M., Portaluri M., Paleani-Vettori P.G.: Predittività dei metodi citogenetici nella risposta alla radioterapia. V Cong. Naz. AIRO, Genova, 27-30 Settembre 1995.

Catena C., Parasacchi P., Conti D., Righi E., Marengo P., Bortolato B., Botturi M., Leoni M., Portaluri M., Paleani-Vettori P.G.: Biological dosimetry (MN-test) of patients undergoing radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology* (submitted,a).

Catena C., Parasacchi P., Conti D., Righi E.: Human and horse lymphocytes: different radiosensitivity. *Nature* (submitted,b).

Chiarella V.: Reti neuronali e diagnostica. Lettura presentata all'8° Corso Avanzato di Radioprotezione Medica, Bressanone, 5-9 Settembre 1994.

Conti D., Catena C., Righi E.: Test dei micronuclei nello studio della tossicità di agenti chimici. *Archivio di Scienze del Lavoro* vol VIII, n. 2, 1992

Countryman P., Heddle J.: The Production of Micronuclei from Chromosome Aberration in Irradiated Cultures of Human Lymphocytes. *Mut. Res.* 41, 321-332, 1976.

Cox F.: A cellular description of the repair defect in ataxia telangiectasia. B. A. Bridges and D. G. Harnden (eds.). John Wiley, Chichester, pp. 141-153, 1982.

Deacon J., Peckham M.J., Steel G.G.: The radioresponsiveness of human tumours and the initial slope of the cell survival curve. *Radiother. Oncol.* 2, 317-323, 1984.

Di Giorgio C., De Meo M.P., Laget M., Guiraud H., Botta A., Dumenil G.: The micronucleus assay in human lymphocytes: screening for inter-individual variability and application to biomonitoring. *Carcinogenesis* 15, 313-317, 1994.

Dolphin G.W.: Biological dosimetry with particular reference to chromosome aberration analysis. In *Proc. Symp. on the Handling of Radiation Accidents*. IAEA 1969: Wien: 215.

Edwards A.A., Purrot R.J., Prosser J.S., Lloyd D.C.: The induction of chromosomes aberrations in human lymphocytes by alpha-radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 38, 38-91, 1980.

Evans H.J., Neary C.J., Williamson F.S.: The Relative Biological Efficiency of Single Dose of Fast Neutrons and Gamma Rays on *Vicia Faba* Roots and the Effect of Oxygen. Part II. Chromosome Damage: The Production of Micronuclei. *Int. J. Radiat. Biol.* 3, 216-229, 1959.

Evans H.J.: Dose-response relations from in vitro studies. In Evans H.J., Court Brown B., Mc Lean C. (eds): *Human Radiation Cytogenetics*. Elsevier/Nort-Holland, Amsterdam, 54, 1967.

Fabry L., Lemaire M.: Dose response relationships for radiation induced chromosome aberrations in human lymphocytes in vivo and in vitro. *Strahlentherapie* 162, 117-122, 1986.

Fantes J.A., Green D.K. Elder J.K., Malloy P., Evans H.J.: Detecting radiation damage to human chromosomes by flow cytometry. *Mut. Res.* 119, 161-168, 1983.

Fenech M. and A.A. Morley: Measurement of Micronuclei in Lymphocytes. *Mutation Research* 147, 29-36, 1985.

Fenech M., Morley A.A.: Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo aging and low dose X-irradiation. *Mut. Res.* 161, 193-198, 1986.

Fenech M., Jarvis L.R., Morley A.A.: Preliminary studies on scoring micronuclei by computerised image analysis. *Mut. Res.* 203, 33-38, 1987.

Fenech M., Denham J., Francise W., Morley A.: Micronuclei in cytokinesis-blocked lymphocytes of cancer patients following fractionated partial-body radiotherapy. *Int. J. Radiat. Biol.* 57: 373-383, 1990.

Fenech M., Neville S.: Conversion of excision-repairable DNA lesions to micronuclei within one cell cycle in human lymphocytes. *Env. Molec. Mutag.* 19, 27-36, 1992.

Fertil B. and Malaise E.P.: Intrinsic radiosensitivity of human cell lines is correlated with radioresponsiveness of human tumours. Analysis of 101 published survival curves. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 11: 1699-1707, 1985.

Finnon P., Lloyd D.C., Edwards A.A.: An assessment of the metaphase finding capability of the Cytoscan 110. *Mut. Res.* 164, 101-108, 1986.

Fliender Th M.: The consequences of the radiosensitivity of hemopoiesis for the evaluation of radiation injury In Proc. of the Intern. Symposium on Accidental Irradiation at Place of Work, Nice (France), 1966, Bruxelles EURATOM, 105-115, 1967.

Gantenberg H.W., Wuttke K., Streffer C., Muller W.U.: Micronuclei in human lymphocytes irradiated in vitro or in vivo. *Radiation Research* 128, 276-281, 1991.

Gelas M., Giraud M., Righi E., Tobajas L.: Medical surveillance of workers exposed to ionizing radiation. *La Medicina del Lavoro* 85, 193-204, 1994.

Heddle J.A., Lue C.B., Saunders E.F., Benz D.R.: Sensitivity to Five Mutagens in Fanconi's Anemia as Measured by the Micronucleus Method. *Cancer Research* 38, 2983-2988, 1978.

Hogstedt, B.: Micronuclei in lymphocytes with preserved cytoplasm. A method for assessment of cytogenetic damage in man. *Mutation Research* 130, 63-72, 1984.

Hsu T. C., Johnston D. A., Cherry L. M. et al.: Sensitivity to genotoxic effects of bleomycin in humans: possible relationship to environmental carcinogenesis. *Int. J. Cancer* 43, 403-409, 1989.

Huber R., Braselmann H., Bauchinger M.: Screening for interindividual differences in radiosensitivity by means of the micronucleus assay in human lymphocytes. *Radiat. Environ. Biophys.* 28, 113-120, 1989.

Huber R., Braselmann H., Bauchinger M.: Intra- and inter-individual variation of background and radiation induced micronucleus frequencies in human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 61, 655-661, 1992.

International Commission on Radiological Protection (ICRP): Radiation dose to patients from radiopharmaceuticals. Pergamon Press, Oxford, ICRP Publ. n° 53, 1987.

International Commission on Radiobiological Protection (ICRP) 1990 Recommendations. Pergamon Press, Oxford, ICRP Publ. n° 60, 1991.

International Atomic Energy Agency: Biological Dosimetry: Chromosomal Aberration Analysis for Dose Assessment. Vienna: IAEA; STI/DOC/10/260; 1986.

Jacobson B.S.: Optimum inactivation dose and indices of radiation response based on the linear quadratic survival equation. *Radiat. Environ. Biophys.* 32, 311-317, 1993.

Knudson A. G.: Genetics of human cancer. *Ann. Rev. Genet.* 20, 231-251, 1986.

Kormos C., Koteles G.J.: Micronuclei in X-irradiated human lymphocytes. *Mut. Res.* 199, 31-35, 1988.

Krishnaja A.P., Sharma N.K.: Heterogeneity of chromosome damage in beta-thalassaemia traits. *Int. J. Radiat. Biol.* 66, 29-39, 1994.

Lee T.K., Wiley A.L., Esinhart J.D., Blackburn L.D.: Radiation dose-dependent variation of micronuclei production in cytochalasin B-blocked human lymphocytes. *Terat. Carcin. Mutag.* 14, 1-12, 1994.

Liniecki J., Bajerska A., Karniewicz W.: The influence of blood oxygenation during in vitro irradiation upon the yield of dicentric chromosomal aberrations in lymphocytes. *Bull. Acad. Pol. Sci. Cl.* 21: 69-85, 1973.

Liniecki J., Bajerska A., Wyszynska K., Cisowska B.: Gamma radiation induced chromosomal aberrations in human lymphocytes: dose rate effects in stimulated and non-stimulated cells. *Mut. Res.* 43, 291-304, 1977.

Littlefield L.G., Sayer A.M., Frome E.L.: Comparison of Dose-parameters for Radiation-induced Acentric Fragments and Micronuclei Observed in Cytokinesis-arrested lymphocytes. *Mutagenesis* 4, 265-270, 1989.

Lloyd D.C., Purrott R.J., Dolphin G.W., Bolton D., Edwards A.A.: The relationship between chromosome aberrations and low LET radiation dose to human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 28: 75-90, 1975.

Lloyd D.C., Purrott R.J., Reeder E.J.: The incidence of unstable chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes from unirradiated and occupationally exposed people. *Mut. Res.* 72, 523–532, 1980.

Lloyd D.C., Purrot R.J.: Chromosome aberration analysis in radiological protection dosimetry. *Radiation Protection Dosimetry*, 1: 19-32, 1981.

Lloyd D.C., Edwards A.A. et al.: Frequencies of chromosomal aberrations induced in human lymphocytes by low doses of X rays. *Int. J. Radiat. Biol.* 53, 49-55, 1988.

Lloyd D.C., Edwards A.A., Leonard A. et al.: Chromosomal aberrations in human lymphocytes induced in vitro by very low doses of X-rays. *Int. J. Radiat. Biol.* 61, 335-343, 1992.

Maxon H.R., Englaro E.E., Thomas S.R. et al.: Radioiodine-131 therapy for well-differentiated thyroid cancer - A quantitative radiation dosimetric approach: outcome and validation in 85 patients. *J Nucl Med* 33, 1132-1136, 1992.

Mitchell C.J., Norman A.: The induction of micronuclei in human lymphocytes by low doses of radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 52, 527-535, 1987.

MIRD/dose estimate report no. 5.: Summary of current radiation dose estimates to humans from various radioactive iodine as sodium iodide. *J Nucl Med* 16, 857-860, 1975.

Muller W.U., Bauch T., Streffer C., Niedereichholz F. and Bocker W.: Comet assay studies of radiation-induced DNA damage and repair in various tumour cell lines. *Int. J. Radiat. Biol.* 65, 315-319, 1994.

Pantelias G.E. and Maillie H.D.: The use of peripheral blood mononuclear cell prematurely condensed chromosomes for biological dosimetry. *Radiat. Res.* 99, 140-150, 1984.

Pincu M., Callisen H., Norman A.: DNA Content of micronuclei in Human Lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 47, 4, 423-432, 1985.

Prosser J.S., Moquet J.E., Lloyd D.C., Edwards A.A.: Radiation induction of micronuclei in human lymphocytes. *Mut. Res.* 199, 37-45, 1988.

Raaphorst G.P.: Prediction of radiotherapy response using SF2: is it methodology or mythology? *Radiotherapy and Oncology* 28:187-188, 1993.

- Ramalho A., Sunjevaric I., Natarajan A.T.: Use of the frequencies of micronuclei as quantitative indicators of X-rays induced chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes: comparison of two methods. *Mut. Res.* 207, 141-146, 1988.
- Ramsay J., Ward R. and Bleehen N. M.: Radiosensitivity testing of human malignant gliomas. *Int. J. Radiat. Oncol.* 24: 675-680, 1992.
- Reik W. and Surani M. A.: Genomic imprinting embryonal tumours. *Nature* 338, 112-113, 1989.
- Righi E.: Caratteristiche metodologiche ed attuali possibilità di impiego della dosimetria citogenetica. *Riv. Medicina del Lavoro ed Igiene Industriale*, anno XI, 171-211, 1987.
- Rummelein B., Drieschner O., Ehlert U. Weichenthal M., Breitbart E.W., Rudiger H.W.: Increased mutagen sensitivity in human cultured fibroblast with constitutively high micronucleus levels. *Cancer Genet. Cytogenet.* 58, 186-190, 1992.
- Sanford K.K., Parshad R., Gantt R., Tarone R.E., Jones G.M. and Price F.M.: Factors affecting and significance of G2 chromatin radiosensitivity in predisposition to cancer. *Int. J. Radiat. Biol.* 55, 963-981, 1989.
- Sasaki M.S.: Radiation-induced chromosome aberrations in lymphocytes: possible biological dosimeter in man. In Sugahara T., Hug O. (eds.): *Biological Aspects of Radiation Protection*. Berlin Springer, pp. 81-95, 1971.
- Schmidt E., Bauchinger M., Mergenthaler W.: Analysis of the time relationship for the interaction of X-ray-induced primary breaks in the formation of dicentric chromosomes. *Int. J. Radiat. Biol.* 30, 339-346, 1976.
- Schmid W.: The micronucleus test: an in vivo bone marrow method. Cytogenetic assay of environmental mutagens. In: HSU T.C. (ed.). *Cytogenetic Assays of Enviromental Mutagens 1982*, ed. Allanheid, Osmun (Totowa, N.J.) 221-229, 1982.
- Shantz S.P., Hsu T.C., Ainslie N., Moser R.P.: Fragilità cromosomica e neoplasie maligne del primo tratto respiratorio e digestivo tra giovani adulti. *JAMA ed. it.*, 2, 548-552, 1990.



Shibamoto, Y., Streffer, C., Fuhrmann, C., Budach, V.: Tumor radiosensitivity prediction by the cytokinesis-block micronucleus assay. *Rad. Res.* 128: 293-300, 1991.

Sims J.L., Sikorski G.W., Catino D.M., Berger S.J., and Berger N.A.: Poly(adenosinediphosphoribose) Polymerase Inhibitors Stimulate Unscheduled Deoxyribonucleic Acid Synthesis in Normal Human Lymphocytes. *Biochemistry* 21, 1813-1821, 1982.

Stabin M.G., Watson E.E., Marcus C.S., Salk R.D.: Radiation dosimetry for the adult female and fetus from iodine-131 administration in hyperthyroidism. *J Nucl Med* 32, 808-813, 1991.

Streffer C., Van Beuningen D., Gross E., Schabronath J., Eigler F.W. and Rebmann A.: Predictive assays for the therapy of rectum carcinoma. *Radioth. and Oncol.* 5: 303-310, 1986.

Surrales J., Carbonell E., Marcos R., Degrassi F., Antoccia A. and Tanzarella C.: A collaborative study on the improvement of the micronucleus test in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis* 7, 407-410, 1992.

Swift M., Sholman L., Perry M., Chase C.: Malignant Neoplasm in the Families of Patients with Ataxia-Telangiectasia. *Cancer Research* 36, 209-215, 1976.

Swift M.: Genetics and epidemiology of ataxia-teleangiectasia. In: R.A. Gatti and M. Swift (eds.) *Ataxia teleangiectasia: genetics, neuropathology and immunology of a degenerative disease of childhood.* Kroc Foundation Series vol.19. New York, Alan R. Liss, Inc, 133-146, 1985.

Tepper J.E.: Radiation therapy of colorectal cancer. *Cancer* 51: 2528-2534, 1983.

Thierens, H., Vral, A., and De Ridder, L.: Biological dosimetry using the micronucleus assay for lymphocytes: interindividual differences in dose response. *Health Phys.* 61: 623-630, 1991.

Tubiana M. and Courdi A.: Cell proliferation kinetics in human solid tumours: relation to probability of metastatic dissemination and long term survival. *Radioth. and Oncol.* 15:1,1989.

Tucker S.L.: Is the mean inactivation dose a good measure of cell radiosensitivity? *Radiat. Res.* 105, 18-26, 1986.

Tucker J.D., Ramsey M.J., Lee D.A. and Minkler J.L.: Validation of chromosome painting as a biodosimeter in human peripheral lymphocytes following acute exposure to ionizing radiation *in vitro*. *International Journal of Radiation Biology* 64, 27-37, 1993.

United Nations Scientific Committee on Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR): Genetic and Somatic Effects of Ionizing Radiation. United Nations Publ., New York, 1986.

United Nations Scientific Committee on Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR): Sources, Effects and Risks of Ionizing Radiation. United Nations Publ., New York, 1988.

Van Vliet L.J., Young I.T. and Mayall B.H.: The Athena semi-automated karyotyping system. *Cytometry* 11, 51-58, 1990.

Vral A., Thierens J.H., De Ridder L.: Study of dose-rate and split-dose effects on the *in vitro* micronucleus yield in human lymphocytes exposed to X-rays. *Int. J. Radiat. Biol.* 61, 777-784, 1992.

Vral A., Verhaegen F., Thierens J.H., De Ridder L.: Micronuclei induced by fast neutrons versus 60-Co gamma rays in human peripheral blood lymphocytes. *Int. J. Radit. Biol.* 65, 321-328, 1994.

Weichselbaum R.R., Rotmensch J., Ahmed-Swan S. and Beckett M.A.: Radiobiological characterization of 53 human tumor cell lines. *Int. J. Radiat. Biol.* 56, 553-560, 1989.

West C.M.L., Davidson S.E., Hunter R.D.: Evaluation of surviving fraction at 2 Gy as a potential prognostic factor for the radiotherapy of carcinoma of the cervix. *Int. J. Radiat. Biol.* 56, 761-765, 1989.

Wheldon T.E., O'Donoghue J.A., Hilditch T.E., Barret A.: Strategies for systemic radiotherapy of micrometastases using antibody-targeted <sup>131</sup>I. *Radiotherapy and Oncology* 11, 133-142, 1991.

White D. C.: An Atlas of Radiation Histopathology. USERDA T. I. C., Oak Ridge, Tennessee, 1975.

Workshop Report: Second L.H. Gray Workshop, Hamilton Hall, University of St Andrews, Scotland, 9-12 september 1992. *Int. J. Radiat. Biol.* 61, 293-297, 1992.

Workshop Report: Future directions for predictive assay, 25-27 March 1993, Round Top, Texas. *Int. J. Radiat. Biol.* 64, 335-338, 1993.

Workshop Report: Molecular, cellular, and genetic basis of radiosensitivity at low doses: a case of induced repair? 9-13 May 1993, Whistler, B.C., Canada. *Radiat. Res.* 138, n. 1, (supplement), 1994.

Yamamoto K.I. and Kikuchi Y.: Studies on micronuclei time response and on the effects of multiple treatments of mutagens on induction of micronuclei. *Mut. Res.* 90, 163-173, 1981.