

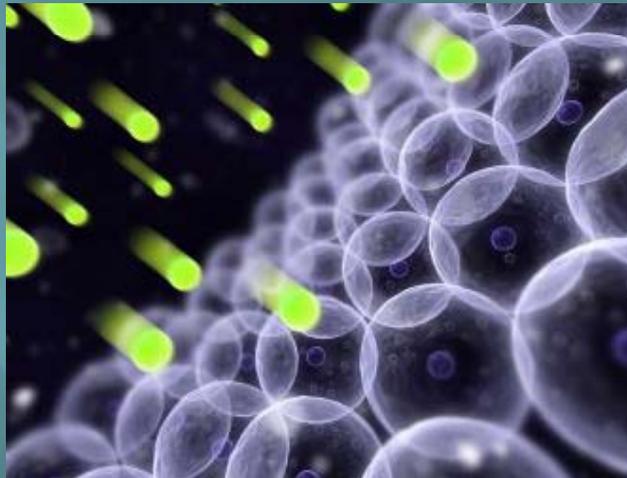
# TEMA H: CELLULE E RADIAZIONI

TUTOR:

ROBERTO CHERUBINI  
VIVIANA DE NADAL

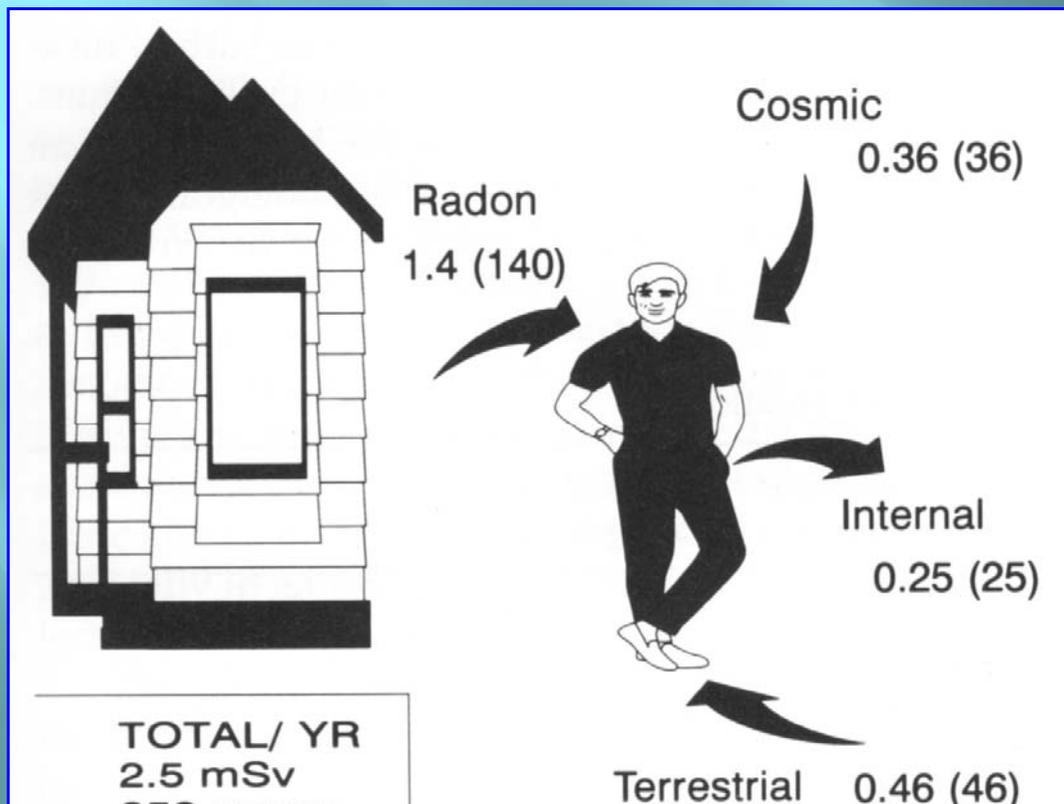
STAGISTI:

PAOLO LUPPI  
GIOVANNI OTTONELLI  
BEATRICE SCAPOLO  
ANDREA RUBIN



1,18  $\mu\text{Sv}$

## FONDO NATURALE DI RADIAZIONI



0,1  $\mu\text{Sv}$ : Mangiare una banana, ricca di potassio



# INTRODUZIONE

Lo scopo dei nostri esperimenti è studiare gli effetti delle radiazioni sulle cellule di mammifero in termini di sopravvivenza e di danno sulle molecole di DNA.

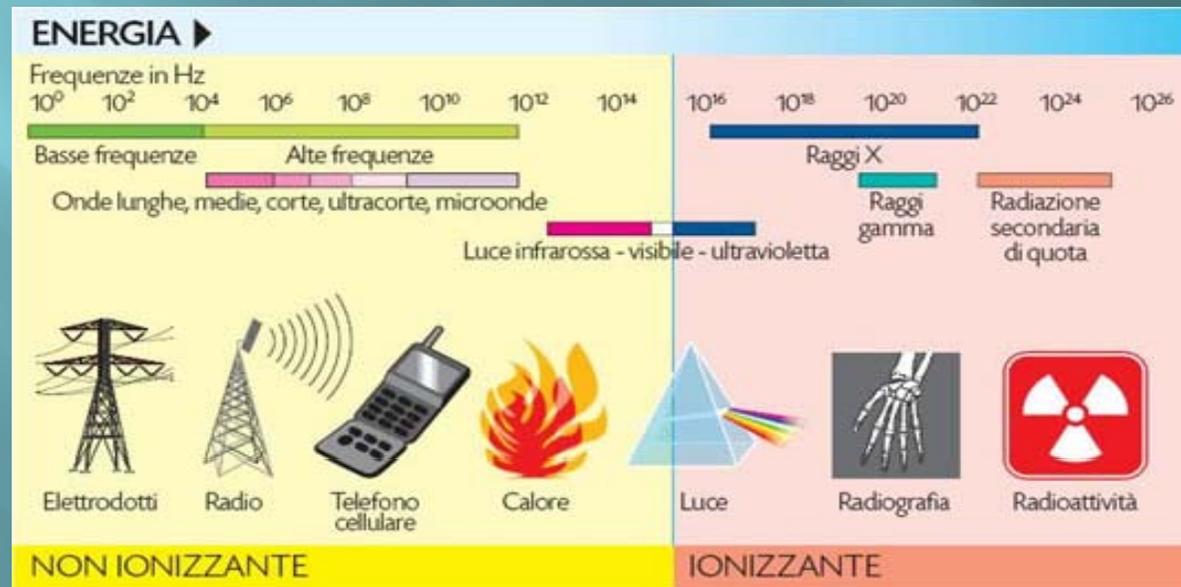
# Radiazioni

Non ionizzanti

Eccitano gli elettroni della materia con cui interagiscono

Ionizzanti

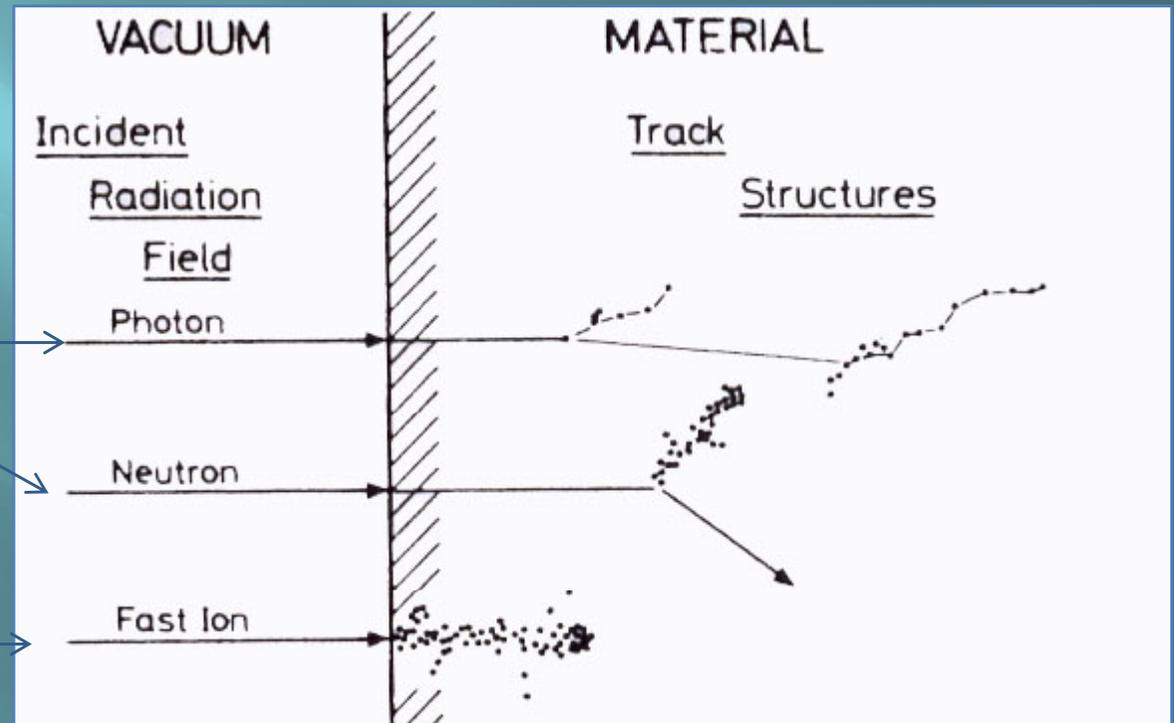
Hanno l'energia sufficiente per strappare gli elettroni dagli orbitali atomici



# Radiazioni ionizzanti

Radiazioni indirettamente ionizzanti

Radiazioni direttamente ionizzanti



Ulteriore classificazione in base al volume di azione delle radiazioni:

- sparsamente ionizzanti;
- densamente ionizzanti;

# Grandezze dosimetriche e radiobiologiche

Dose (ICRU 51):

$$D = \frac{d\bar{\varepsilon}}{dm} \quad \text{J/kg, Gy}$$

Fluenza:

$$\Phi = \frac{dN}{dA} \quad \text{n°particelle/ m}^2$$

Dose rate (ICRU 51):

$$\dot{D} = \frac{dD}{dt} \quad \text{Gy/min}$$

Flusso:

Linear Energy Transfer (Zirckle, 1952)

$$LET = \frac{dE}{dx} \quad \text{keV}/\mu\text{m}$$

$$\varphi = \frac{d\Phi}{dt} = \frac{d^2 N}{dA \bullet dt} \quad \text{m}^{-2} * \text{s}^{-1}$$

# L'energia depositata nella materia: LET

Il LET è regolato dalla formula di Bethe-Bloch (*Bethe 1930, Bloch 1933*):

$$\frac{dE}{dx} = \frac{4\pi e^4 Z_{eff}^2 N}{m_e v^2} \ln \frac{2m v^2}{I(1-\beta^2)} + \text{relativistic}$$

$m_e$  massa dell'elettrone;

$v$  velocità del proiettile,

$N$  densità degli elettroni nel target,

$e$  la carica elementare

$\beta$  Il rapporto tra la velocità della particella e la velocità della luce ( $v/c$ )

$I$  il potenziale di ionizzazione

$Z_{eff}$  numero atomico (*empirically approximated by Barkas, 1963* )

# Grandezze della radioprotezione

Radiazioni di diverso tipo a parità di dose hanno effetti biologici diversi

Dose equivalente:

$$H = WR \cdot D \quad \text{Sv}$$

Tipo di radiazione	WR
FOTONI	1
e- , MUONI	1
PROTONI,PIONI	2
ALFA,IONI PESANTI	20
NEUTRONI	2 a 20

A parità di radiazione cambia effetto in base a tessuto irraggiato

DOSE EFFETTIVA:

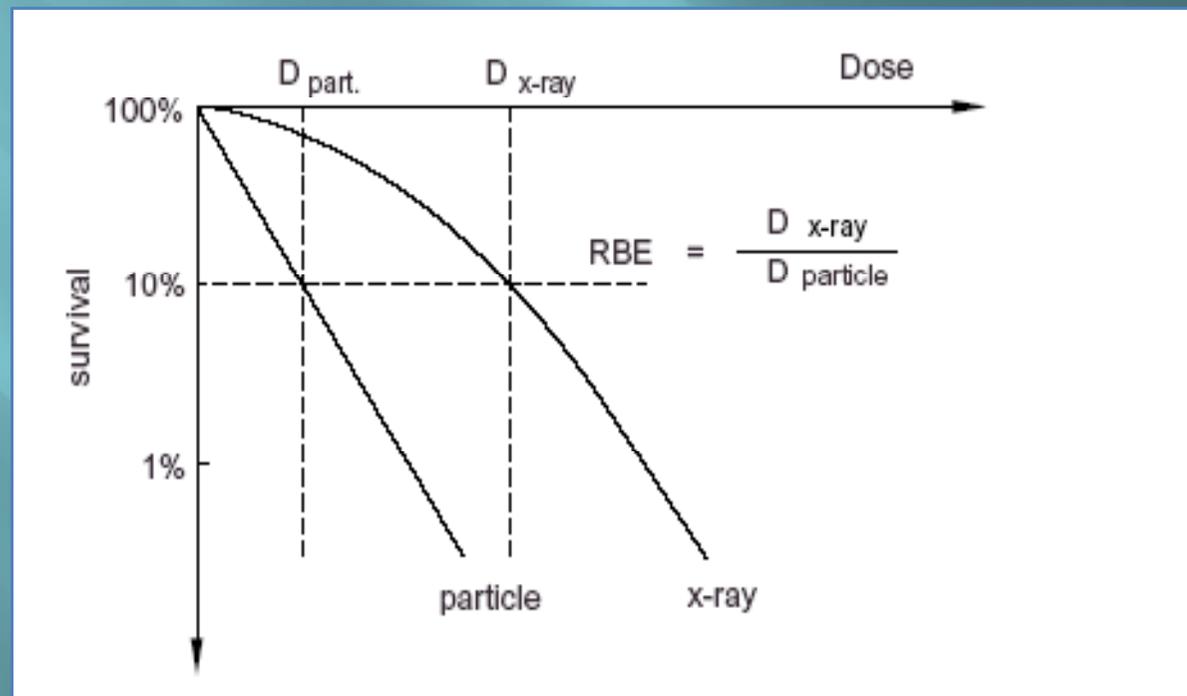
$$E = \sum_T W_T \cdot H_T \quad \text{Sv}$$

TESSUTO	$W_T$
MIDOLLO SPINALE	0,12
RENI	0,08
FEGATO	0,04
CERVELLO,PELLE	0,01

# Efficacia biologica relativa: RBE

RBE: è il rapporto tra la dose della radiazione di raggi X/gamma ( $D_{\gamma}$ ) e la dose di radiazione in esame ( $D_r$ ) a parità di livello di effetto biologico

$$R.B.E = \frac{D_{\gamma}}{D_r}$$



# Introduzione di Biologia

L'unità biologica fondamentale è la CELLULA

Essa è circondata dalla membrana plasmatica e al suo interno possiamo vedere vari organuli (citoscheletro, apparato di Golgi, lisosomi, mitocondri, **nucleo**, etc...) immersi in un "liquido" chiamato citosol

Durante la sua vita la cellula attraversa varie fasi le quali, tutte assieme, compongono il cosiddetto ciclo cellulare

# Ciclo cellulare

Il ciclo cellulare si divide in due fondamentali momenti:

- L' **Interfase** (periodo in cui la cellula si prepara alla riproduzione cellulare). Questo momento è diviso in altre fasi: fase **G1**, fase **S** (durante la quale avviene la duplicazione del DNA) e fase **G2**
- La **Mitosi** (periodo in cui la cellula si riproduce). A sua volta la mitosi è composta da cinque fasi: profase, prometafase, metafase, anafase, telofase.



Il passaggio da una fase del ciclo cellulare a quella successiva è sotto il controllo di specifici **checkpoint** che assicurano che tutti gli eventi di una fase si verifichino prima che inizi la successiva.

# DNA

Il DNA (o acido desossiribonucleico) si trova all'interno del nucleo della cellula ed è composto da innumerevoli unità di base dette

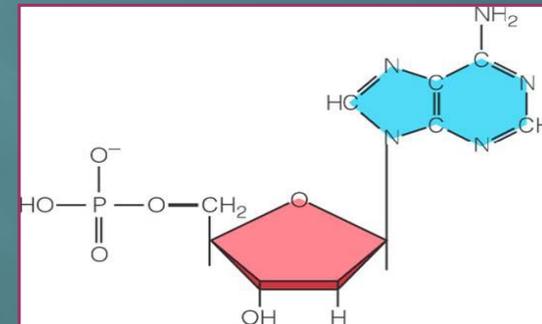
desossiribonucleotidi. (1)

Esso è formato da due catene antiparallele. (2)

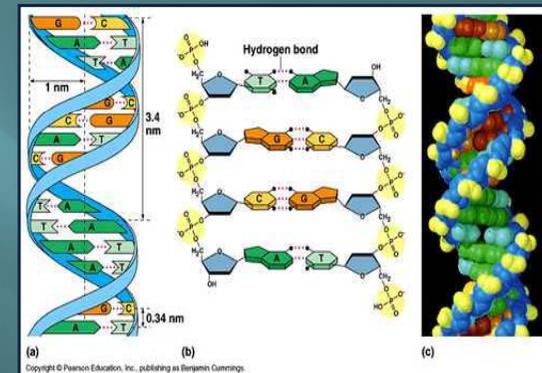
Durante le prime fasi della Mitosi il DNA condensa per facilitare la divisione dei cromatidi durante l'anafase.

Si arriva così ad avere i cromosomi metafasici

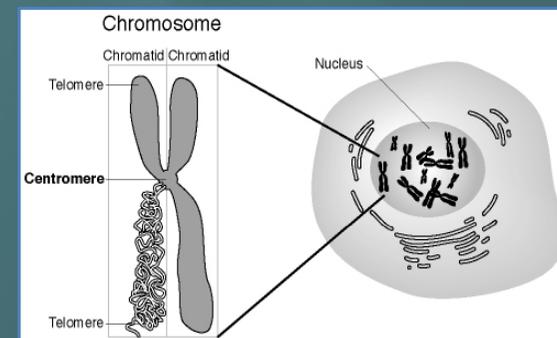
1



2



3



# Danno al DNA

Il DNA è il bersaglio per eccellenza delle radiazioni.

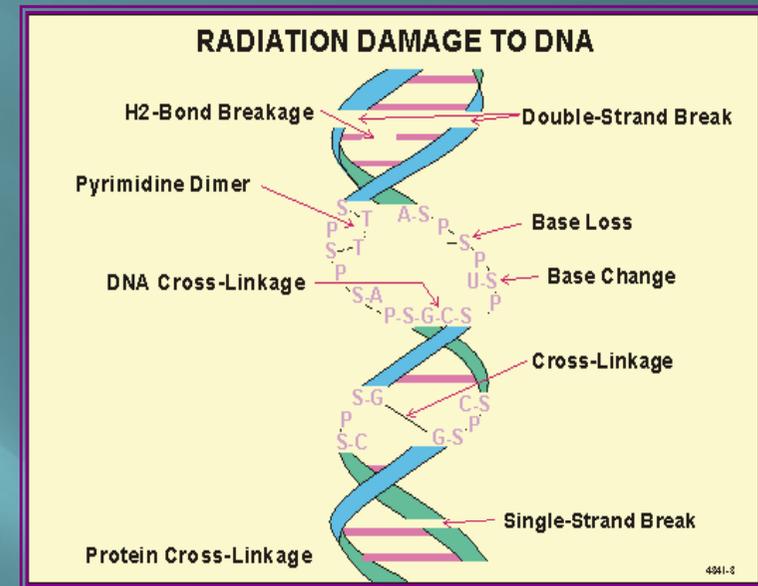
Il danno al DNA può essere inizialmente diviso in due categorie:

- **Esogeno**: quando il danno è causato da fattori esterni (ad esempio radiazioni)
- **Endogeno**: quando il danno è causato da radicali liberi o da problemi di replicazione del DNA

I danni possono riguardare i diversi elementi del DNA; vediamone alcuni...

# Tipi di danno

- **Danno alle basi azotate** : ossidazione, annichilazione, idrolisi delle basi;
- **Cross-link DNA-DNA**: unioni tra diverse basi azotate;
- **Cross-link DNA-proteina**: unione tra DNA e proteine;
- **Rotture ad un singolo filamento della catena**;
- **Rotture a un doppio filamento della catena**.



Quest'ultimo danno è indubbiamente il più grave per la cellula e, quasi sempre, porta alla sua morte. La cellula non è però priva di difese e possiede numerosi metodi di riparazione dei danni subiti.

# Metodi di riparazione

la cellula ha innumerevoli metodi per riparare i danni subiti. Noi ora guarderemo nello specifico le riparazioni a rotture dei filamenti del DNA che sono essenzialmente 3:

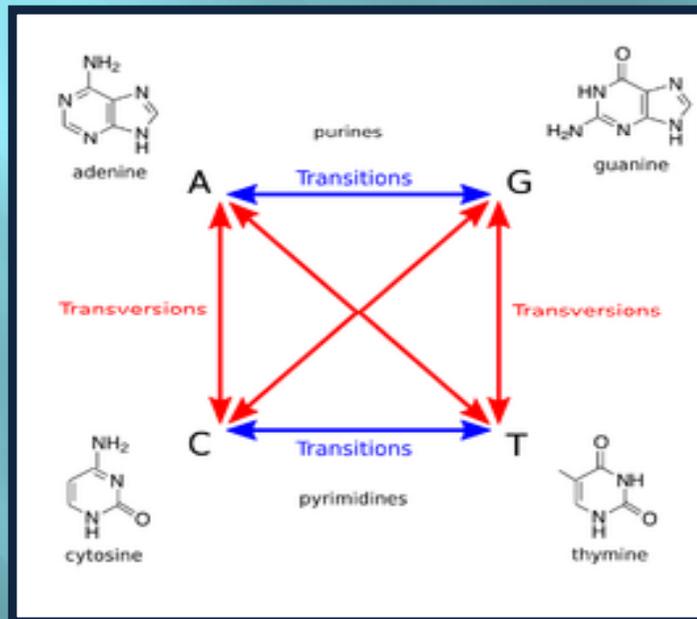
- 1) **HRR**: (Homologous recombination repair): riparazione per ricombinazione omologa. Questo è un metodo error-free
- 2) **NHEJ**: (non homologous end-joining) saldatura di due estremità non contigue
- 3) **SSA**: (single strand annealing) mix tra i primi due metodi

Nel caso in cui i danni non vengano riparati correttamente la cellula corre il rischio di subire delle **mutazioni**

# MUTAZIONI

## GENICHE:

sostituzione di una coppia di basi



## (ABERRAZIONI): CROMOSOMICHE

cambiamento nell'organizzazione di un cromosoma



Queste sono quasi sempre radioindotte e portano nel maggior numero dei casi alla morte della cellula

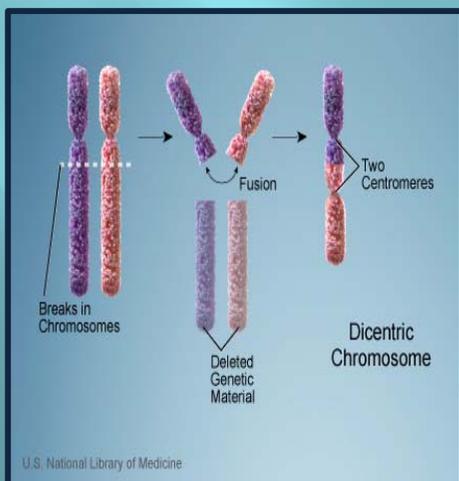
# ABERRAZIONI

## CROMOSOMICHE

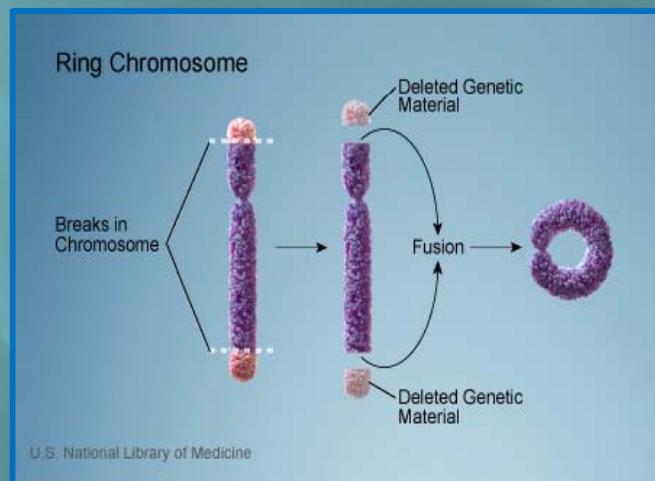
- **Dicentriche (1)**
- **Ad anello (2)**
- **Traslocazione asimmetrica**

## CROMATIDICHE

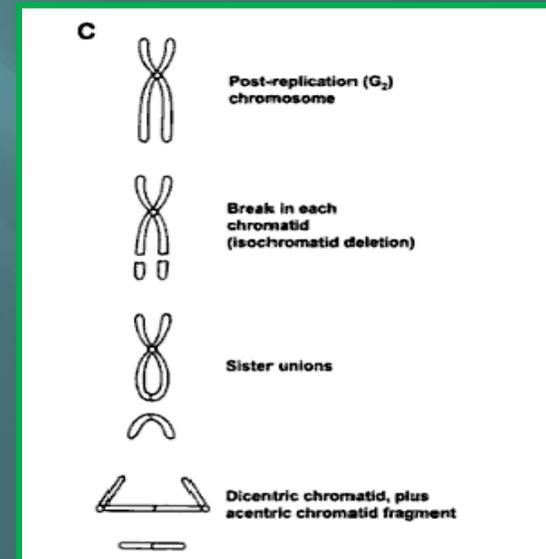
- **Ponti anafasici (3)**
- **Piccole delezioni interstiziali**



1



2



3

# Colture cellulari

cellule isolate dal loro ambiente naturale e mantenute in un sistema definito

COLTURA CELLULARE  
UTILIZZATA

V-79

# Mantenimento di una coltura cellulare

creare «artificialmente» condizioni ambientali prossime a quelle in cui le cellule vivono nel loro tessuto di origine, permettendone la proliferazione

## Parametri chimico-fisici

Temperatura  
 $CO_2$  e  $O_2$   
pH, umidità  
substrato

## Sostanze nutritive

Terreno di coltura contenente  
le macromolecole biologiche  
fondamentali  
Additivi: siero fetale bovino  
→inibitore di tripsina

**MANIPOLAZIONE → STERILITA'**

# ESPERIMENTI EFFETTUATI

## SAGGIO CLONOGENICO

Valutare la  
SOPRAVVIVENZA  
CELLULARE di una  
popolazione

Raggi  
Gamma

Protoni

## SAGGIO DELLA COMETA

Valutare il  
DANNO AL DNA  
delle singole cellule

Raggi  
Gamma

Linea cellulare utilizzata: V-79 (criceto cinese)



# SAGGIO CLONOGENICO

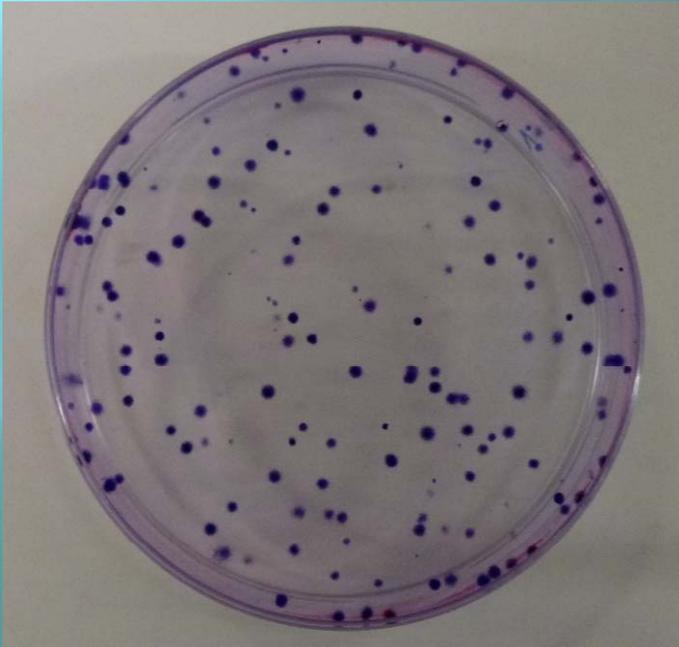
conteggio del numero di cellule che, dopo aver subito una certa dose di radiazione, sono sopravvissute e che sono state quindi capaci di produrre un clone di almeno 50 cellule figlie nel giro di 6 giorni

FISSAGGIO → Violetto di genziana

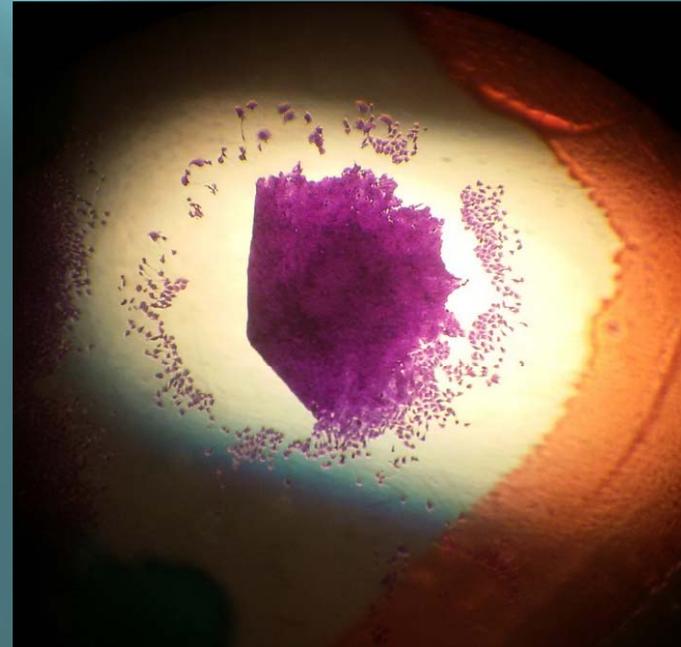


Colture di V-79  
in incubatore

Capsula Petri



Clone



# SOPRAVVIVENZA DELLE CELLULE

- **Scopo:** confrontare la sopravvivenza cellulare di due colture di cellule irraggiate con protoni e raggi gamma.
- **Sopravvivenza cellulare:** rapporto percentuale di cellule capaci di formare un clone dopo l'irraggiamento rispetto alle cellule seminate.
- **RBE (*Efficacia Biologica Relativa*):** rapporto fra le dosi di due differenti radiazioni che producono lo stesso danno.
- **Procedimenti adottati:** irraggiamento con Cobalto-60, irraggiamento con acceleratore Van De Graaff (7MV), saggio clonale, analisi dati ottenuti.

## •Dosi utilizzate

DOSE (Gy)
0
0.5
1
2
3
4

# RAGGI GAMMA

- Utilizzo di una sorgente radiazioni gamma (emissione fotoni) con tali caratteristiche:

*Attività (22.06.2016) : 7 TBq*

*Energie  $\gamma$ : 1.17 MeV e 1.33 MeV*

*$T_{1/2}$  : 5.27 anni*

*Rateo di dose : 1 Gy/min; 19 cm*



- Per ottenere le DOSI abbiamo irraggiato con tempi differenti

$$es : D = 1[Gy] \cdot 30s$$

ottenendo una dose di 0.5 Gy

# Protoni

- Utilizzo acceleratore Van De Graaff (VdG), ponendo le cellule su campioncini di acciaio posti nel portacampione-rotante.
- Non potendo conoscere il numero di particelle nel monitor 3 durante l'irraggiamento delle cellule, abbiamo ricavato dalla formula  $D [Gy] = K \cdot LET [KeV / \mu m] \cdot \Phi [cm^{-2}]$   $K = 1,6 \cdot 10^{-9}$

Dove  $\Phi$  indica la *Fluenza*: numero di protoni per  $cm^2$ , calcolata con un rivelatore posto nel monitor 3 in un irraggiamento precedente a quello delle cellule.

Ponendo  $\Phi_1$  (numero di particelle in aria per particella al monitor 1), abbiamo trovato il numero di particelle ( $f$ ) che dovevamo avere nel monitor 1

$$f = \frac{D}{K \cdot LET \cdot \Phi_1} \quad \text{con } D[Gy] = 0.5, 1, 2, 3, 4$$

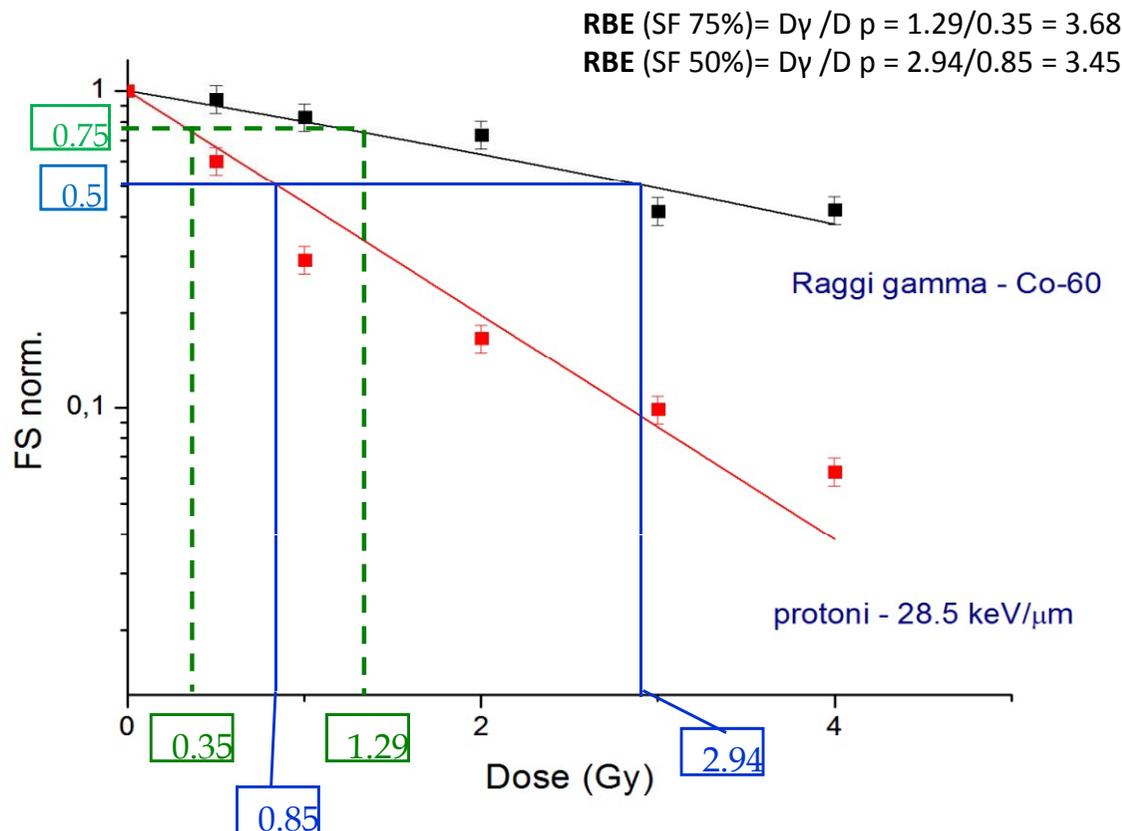
# SAGGIO CLONOGENICO

- *Saggio Clonogenico*: conteggio del numero di cellule che sono state capaci di produrre un clone.
- Abbiamo ottenuto la sopravvivenza cellulare per ogni Dose, dividendo il numero di cloni per il numero di cellule seminate

# ANALISI DATI

Studiando il grafico sottostante, si può notare che i dati ottenuti dai raggi gamma producono una curva lineare quadratica, mentre i dati relativi ai protoni hanno tendenza lineare. Inoltre, una volta calcolato l'RBE (*Efficacia Biologica Relativa*), si osserverà che i protoni provocano un danno maggiore a parità di dose.

I protoni hanno un danno maggiore di circa 3,5 volte dei raggi gamma, a parità di dose. All'aumentare della dose, diminuisce la sopravvivenza cellulare, quindi aumenta la mortalità delle cellule.



$$RBE = \frac{D[Gy]_\gamma}{D[Gy]_{protoni}}$$

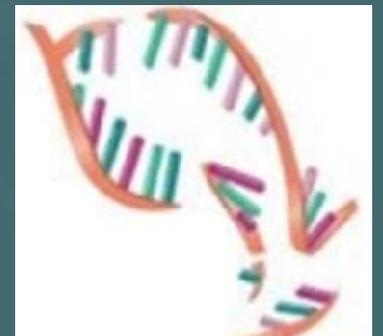
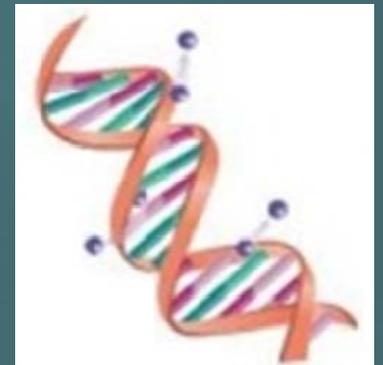
# SAGGIO DELLA COMETA

## Raggi Gamma

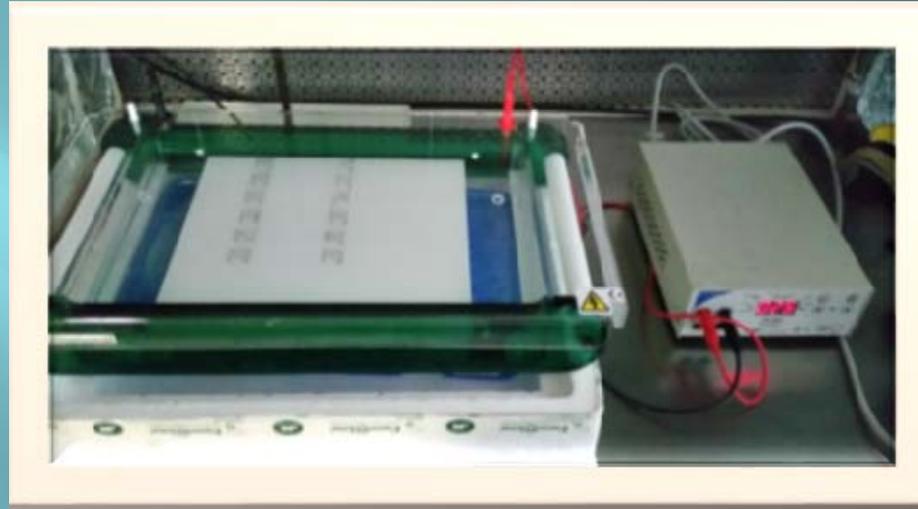
- ▣ **Scopo:** studiare il danno subito dal DNA di una coltura cellulare sottoposta a radiazioni Gamma, attraverso la "*Comet Assay*", in funzione della dose (0, 0.5, 3)
- ▣ **Caratteristiche:** versatile, sensibile, veloce
- ▣ **Materiali e strumenti:** cellule V-79, sorgente di Cobalto-60, cella elettroforetica, microscopio a fluorescenza

# SAGGIO DELLA COMETA: PROTOCOLLO

- Immergere le cellule in gel di agarosio (low-melting) e distribuirne un'aliquota sul vetrino pre-ricoperto di normal-agarose
- Immergere i vetrini in soluzione di lisi per rimuovere la membrana cellulare e tutte le componenti citoplasmatiche
- Rilassare il DNA in soluzione alcalina pH13

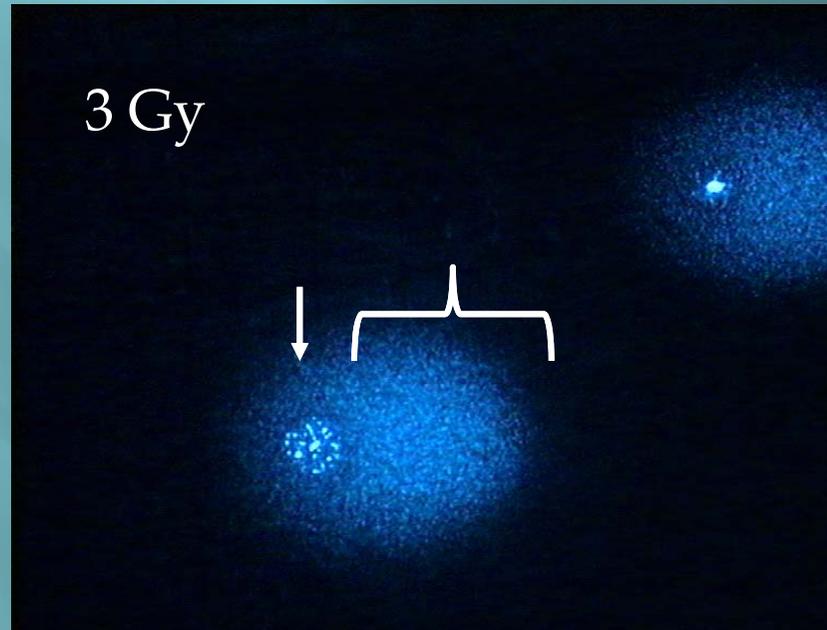
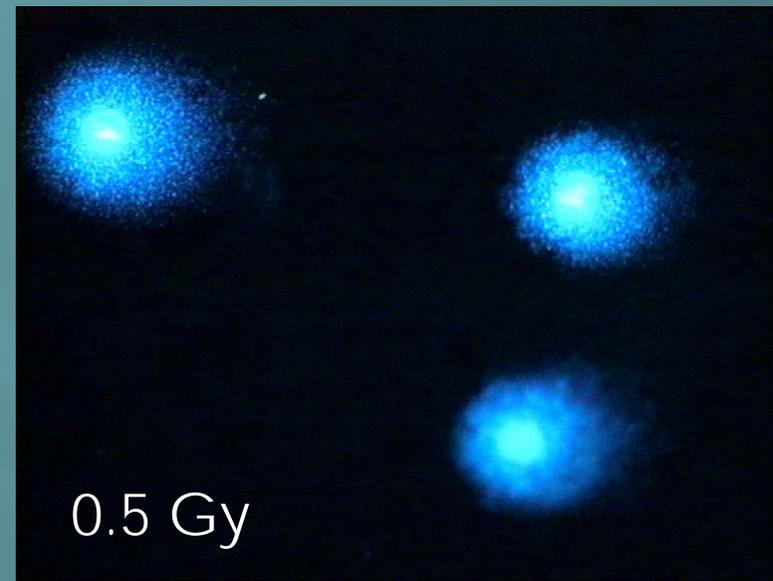


- Sottoporre il DNA ad elettroforesi in buffer a pH13



- Colorare il DNA con un colorante fluorescente (DAPI) per visualizzarlo al microscopio a fluorescenza





## COMETE

la **testa** contiene il DNA intatto, la **coda** contiene i frammenti di DNA danneggiato

Grazie per l'attenzione!