



**CENTRO
FERMI**
Museo Storico della Fisica e
Centro Studi e Ricerche Enrico Fermi



II PROGETTO SILENZIO COSMICO: STUDIO DELL'INFLUENZA DELLA RADIAZIONE AMBIENTALE, SUL METABOLISMO E SULLA RISPOSTA AD AGENTI GENOTOSSICI DI SISTEMI BIOLOGICI DI DIVERSA COMPLESSITA'

***F. Fischietti^{1,2}, A. Tessitore^{2,3}, P. Sykes⁴, M. Chiti⁵, A. Esposito⁵, M. Balata⁶, G. Cenci⁷, G. Esposito^{8,9}, M.A. Tabocchini^{1,8,9}, L. Satta¹
a nome della collaborazione "Silenzio Cosmico"***

¹Museo Storico della Fisica e Centro Studi e Ricerche Enrico Fermi, Roma, Italy;

²Università de L'Aquila; ³INFN-LNGS, Gr.coll.UNIAQ;

⁴Flinders University, Adelaide, Australia; ⁵INFN-LNF,

⁶INFN-LNGS, ⁷Università di Roma "La Sapienza";

⁸Istituto Superiore di Sanità, Roma,

⁹INFN Roma1-Gr.coll.Sanità, Roma

Il progetto “Silenzio Cosmico”

La radiazione ambientale rappresenta uno stimolo continuo che ha influenzato la biologia degli organismi viventi durante l'evoluzione, con lo sviluppo di meccanismi di difesa ben conservati durante la filogenesi

Obiettivi

- ➔ Trarre vantaggio dell'opportunità offerta dai Laboratori sotterranei del Gran Sasso-INFN per studiare il ruolo della radiazione ambientale sul metabolismo e sulla risposta ad agenti genotossici di sistemi cellulari e di organismi posti su differenti livelli della scala evolutiva**
- ➔ Effettuare una caratterizzazione puntuale della radiazione ambientale nelle diverse condizioni analizzate per comprendere la relazione tra lo spettro di radiazione e la risposta biologica osservata**

Approccio sperimentale

Condurre con diversi modelli biologici esperimenti in parallelo sia presso laboratori esterni di riferimento che presso il laboratorio allestito in galleria ai LNGS-INFN e analizzare differenze a livello metabolico e di risposta a stress

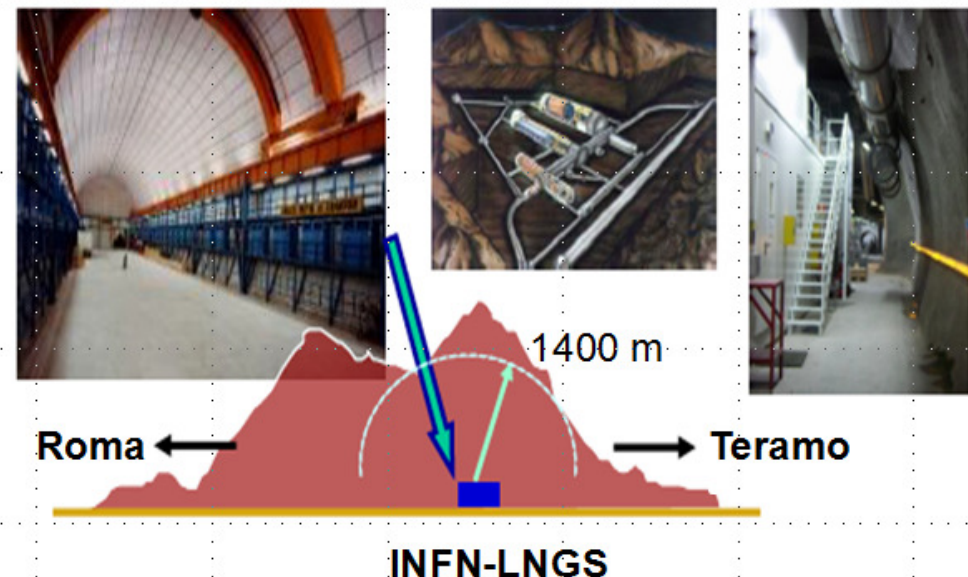
Permanenza in diverse condizioni di radiazione ambientale:

- *per esperimenti lungo termine: 1 settimana per i lieviti, diversi mesi per cellule di mammifero (in entrambi i casi più di 100 generazioni)*
- *Per gli esperimenti a breve termine: fino ad 1 mese*

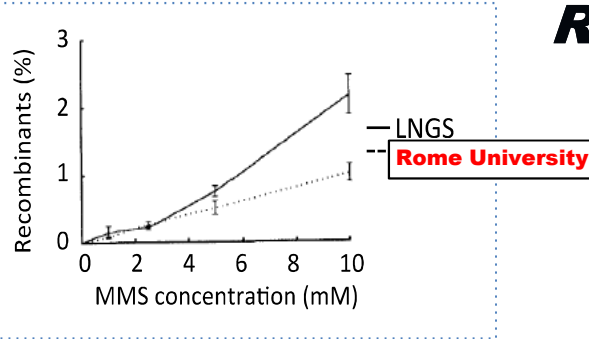
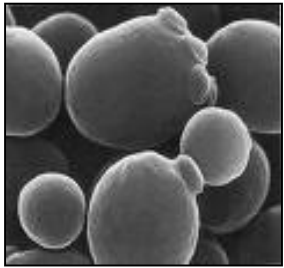
Reference Radiation Environment
(**RRE**)



Low Radiation Environment
(**LRE**)



Satta et al., 1995



S. Cerevisiae 120 generations – 1 week

Risultati di esperimenti a lungo termine su sistemi in vitro

Cellule coltivate per diversi mesi in condizioni di radiazione ambientale fortemente ridotta:

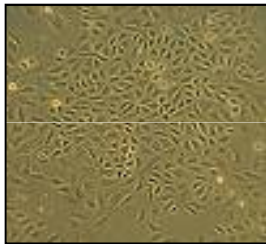


- sono più suscettibili al danno da esposizioni acute ad agenti genotossici
- Sono meno capaci di rispondere allo stress ossidativo

Satta et al., 2002

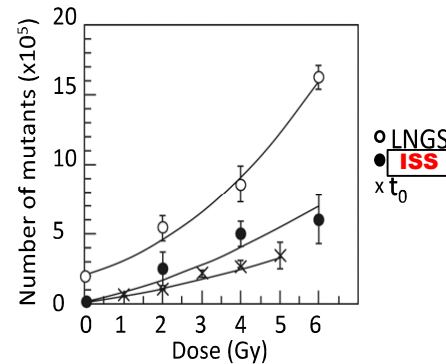
Antonelli et al., 2008

Fratini et al., 2015



Cellule di hamster cinese V79

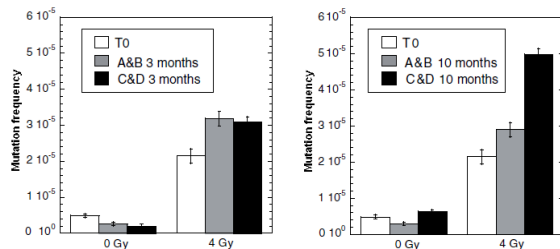
Pulex



9 months of culture

Pulex-2

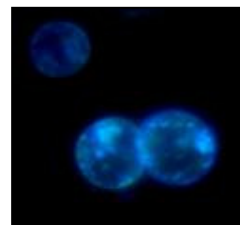
Similar results at LNGS external as reference lab



A&B: external cultures
C&D: underground cultures

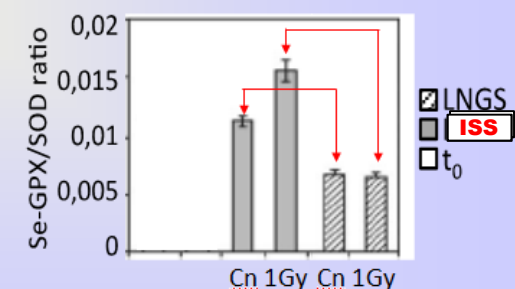
Carbone et al., 2009

Carbone & Pinto et al., 2010



Cellule umane (TK6)

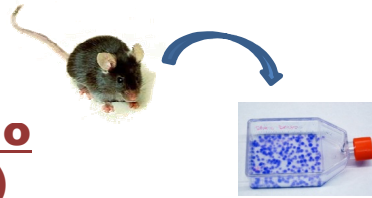
Silenzio Cosmico



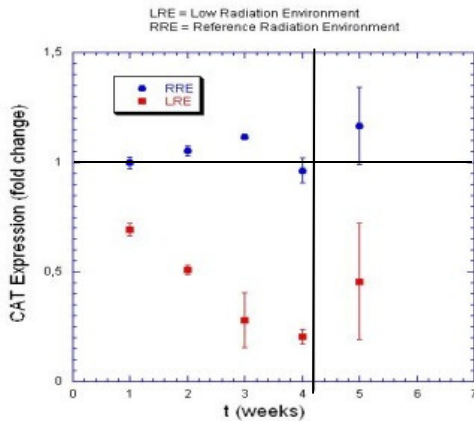
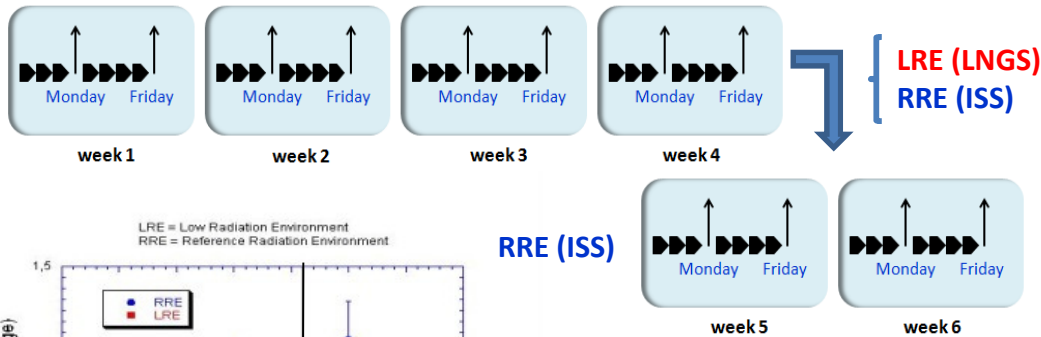
6 months of continuous culture

Cosmic Silence

Cellule A11 derivanti dal topo pKZ1 (modello murino radiosensibile)

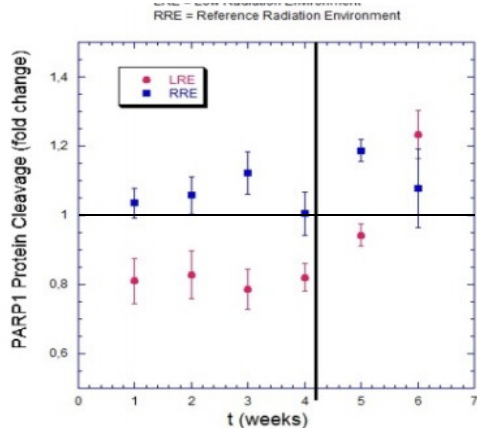


Risultati di esperimenti a breve termine su sistemi in vitro

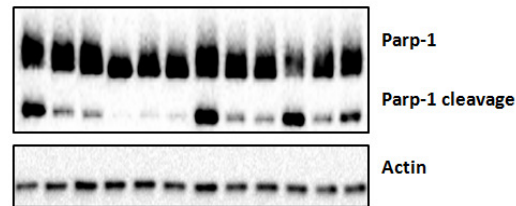


RRE (ISS)

Enzimi antiossidanti (e.g., catalasi)



PARP-1



weeks 1w 1w 1w 2w 2w 2w 3w 3w 3w 4w 4w 4w
 out in-s in out in-s in out in-s in out in-s in

OUT = ISS **IN-S = LNGS with Fe shield**
IN = LNGS without Fe shield

Dopo 4 settimane di coltura in diverse condizioni di radiazione ambientale :

- **si osservano divergenze nell'espressione genica di enzimi con attività antiossidante,**
- **l'attivazione di PARP-1, proteina chiave nella riparazione del danno al DNA, apoptosi, proliferazione, ..., appare ridotta in condizioni di LRE, indipendentemente dalla presenza di schermatura in grado di ridurre il fondo gamma di un fattore 10**
- **Le divergenze si riducono fortemente riportando le colture in RRE**

Aspetto cruciale

Quali sono le componenti dello spettro di radiazione ambientale maggiormente responsabili degli effetti osservati ?

*In galleria la radiazione ambientale è essenzialmente costituita da **raggi gamma di bassa energia** (fino a 3 MeV), mentre lo spessore e l'origine sedimentaria della roccia rende trascurabile il contributo dei **raggi cosmici** e dei **neutroni** (Rindi et al. 1988)*

I risultati finora ottenuti su modelli *in vitro* suggeriscono che questa componente di basso LET abbia una scarsa influenza sulla risposta biologica

Sono previsti esperimenti ai LNGS in condizioni che prevedono:

- *un **ulteriore aumento della componente gamma** (collaborazione con J.B. Smith, Mexico State University)*
- *l'**irradiazione** dei campioni **con basse fluenze di neutroni** (auspicabilmente disponibili dall'esperimento LUNA)*

E' attualmente in corso una nuova caratterizzazione del campo di radiazione nei diversi siti sperimentali che prevede:

Misure dettagliate della **componente neutronica** con rivelatori BF3 (posizionati in orizzontale e verticale a 150 cm dal suolo, circondati da 1.5 mm of Cd (*Cadmium cut-off=0.5 eV*) o da 12.5 cm di polirtilene)



Spettroscopia **gamma** con HpGe

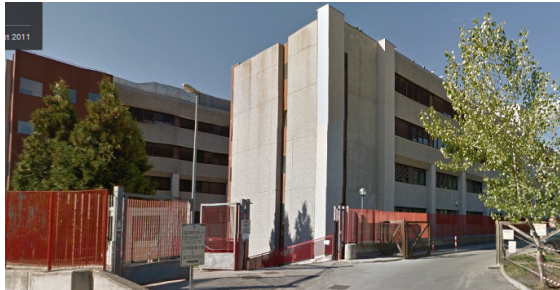
Misure dosimetriche con TLD 700H e con camera a ionizzazione a pressione

Monitoraggio del **Radon** in aria con strumentazione Alfaguard

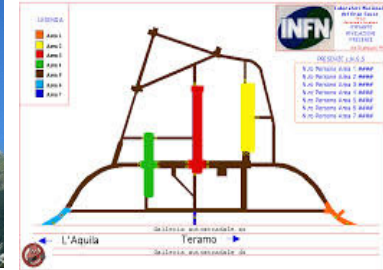
A complemento delle misure sperimentali è prevista una attività modellistica di simulazione con **GEANT4** degli scenari di esposizione ai ISS, LNGS, University of L'Aquila in vista di una valutazione dettagliata della composizione e spettro della radiazione ambientale.

Dai modelli in vitro ai modelli in vivo

Università de L'Aquila/ Università di Roma
(RRE)



INFN-LNGS
(LRE)



***Drosophila
melanogaster***



Topi pKZ1

***Necessità di approvazione della
sperimentazione da parte delle
Autorità competenti (ASL,
Comitato Etico, Ministero della
Salute)***

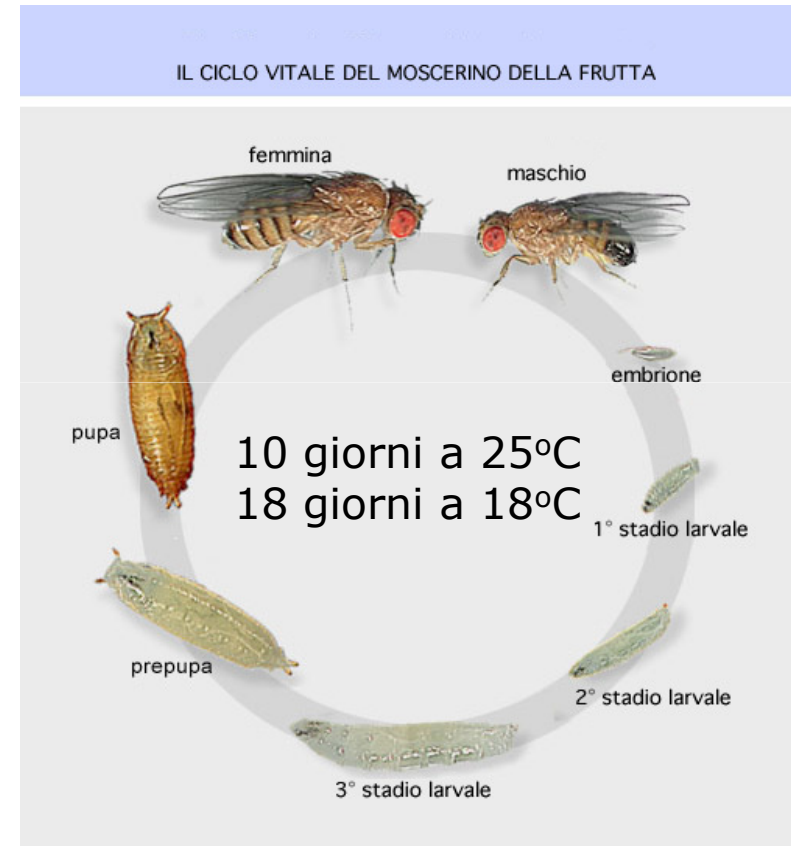




Drosophila come sistema modello

VANTAGGI

- **Ciclo vitale molto breve**
- **Numero elevato di progenie**
- **Adatto ad esperimenti di mutagenesi**
- **Piccole dimensioni e facilmente allevabile in laboratorio**
- **Bassi costi**



Saggi su animali modello

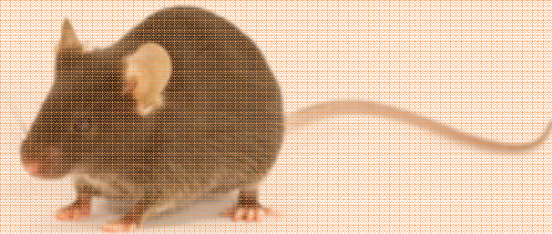
(LRE/RRE)

Drosophila melanogaster



- Frequenza di mutazioni nel locus *LacZ*
- Sopravvivenza, fertilità, attività locomotoria
- Analisi della Divisione Cellulare e Integrità cromosomica
- Analisi dell'espressione di proteine coinvolte in:
 - ✓ Apoptosi
 - ✓ Riparazione del DNA
 - ✓ Eliminazione dei ROS

pKZ1 mouse model



- Saggio “*LacZ* inversion”
- Analisi dell'espressione di proteine coinvolte in:
 - ✓ Apoptosi
 - ✓ Riparazione del DNA
 - ✓ Eliminazione dei ROS

In condizioni basali

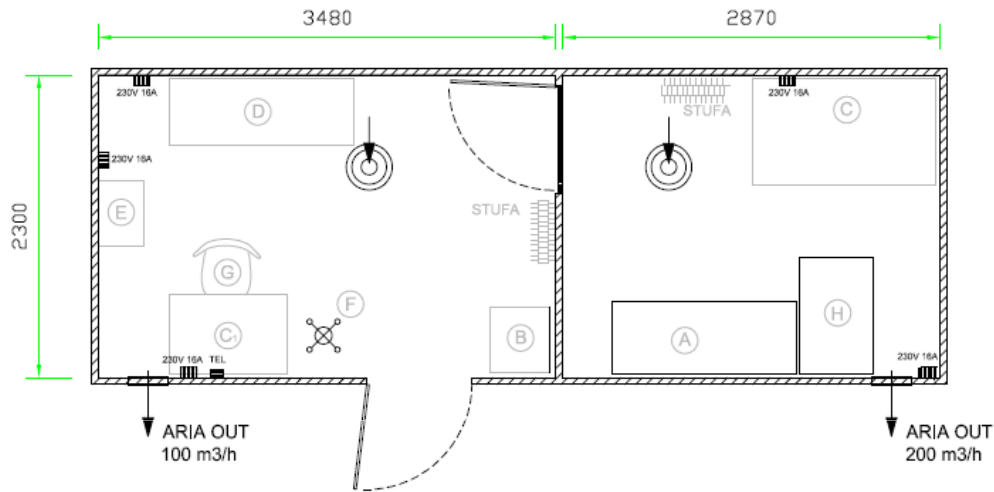
Dopo esposizione a radiazioni ionizzanti (raggi X) presso la Radioterapia dell'Ospedale San Salvatore-Università de L'Aquila

Dopo esposizione in situ ad agenti chimici

Nuova stazione sperimentale ai LNGS per studi in vivo

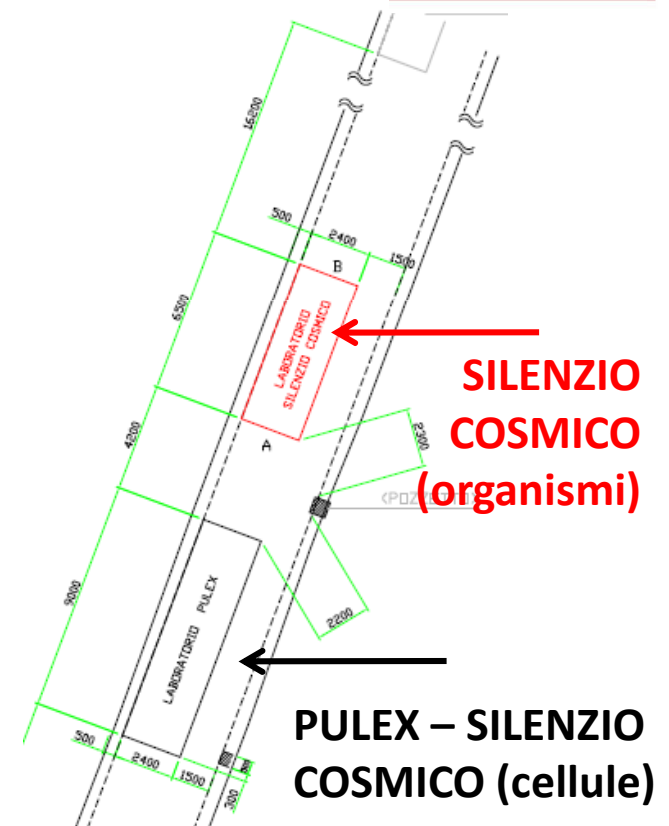
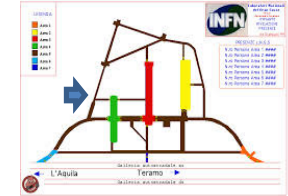


PIANTA:



LxPxH
6500x2300x2500

- Allestimento della nuova stazione sperimentale in posizione contigua a quella per colture cellulari (PULEX)
 - *Sistemi di controllo di temperatura e luce*
 - *Sistema di ventilazione*



La realizzazione sperimentale è attualmente in fase di realizzazione grazie al supporto dei [LNGS](#)

Ospiterà la strumentazione acquisita nell'ambito all'esperimento SILENZIO COSMICO dell'[INFN-CSN5](#)

Fondamentale per questa attività il contributo agli esperimenti PULEX e SILENZIO COSMICO del [Centro Fermi](#), in particolare per il supporto a giovani ricercatori

La collaborazione **SILENZIO COSMICO**



ISS and INFN Roma 1 – Gr.coll. Sanità			LNGS - INFN and INFN Gr.coll. UniAq		
Maria Antonella Tabocchini	B	ISS	Edoardo Alesse	M	UniAQ
Emanuela Bortolin	F	ISS	Alessandra Tessitore	B	UniAQ
Giuseppe Esposito	F	ISS	Francesca Zazzeroni	B	UniAQ
Cinzia De Angelis	F	ISS	Adriano Angelucci	B	UniAQ
Cristina Nuccetelli	F	ISS	Assunta Pompili	B	UniAQ
Mauro Belli	F		Antonella Gasbarri	B	UniAQ
Emiliano Fratini	B	Centro Fermi	Fausta Fischietti	B	Centro Fermi
Maria Balduzzi	B	ENEA	Giovanni Cenci	B	UniRM
			Marco Balata	E	LNGS
Other collaborations			Luca Ioannucci	T	LNGS
Benjamin Blyth	B	Flinders Univ.	Giovanni Luca Gravina		UniAQ
Rebecca Omrsby	B	Flinders Univ.	LNF - INFN		
Pamela Sykes	B	Flinders Univ.	Adolfo Esposito	F	LNF
Francesco Cardellini	F	ENEA	Maurizio Chiti	T	LNF
Roberto Amendola	B	ENEA			
Luca Fruci	V	DVM	Luigi Satta	F	



B=biologo; F=fisico; M=medico; V=veterinario; E=ingegnere; T=tecnologo



Grazie per l'attenzione !