ISSN 2282-5746

Fisica in Medicina

Periodico trimestrale di formazione, informazione e aggiornamento dell' Associazione Italiana di Fisica Medica

aifm
ASSOCIAZIONE ITALIANA DI FISICA MEDICA

Numero Monografico

Numero 1 - 2016

Fisica in Medicina

Numero 1/2016
Aprile

Periodico Trimestrale di formazione
Informazione e aggirnamento de lla
Associazione Italiana di Fisica Medica

www.aifm.it

Associazione Italiana
di Fisica Medica

Presidente:
Michele Stasi

Membri del Consiglio
Direttivo:
A. del Vecchio
F. Fusi
R. Matheoud
L. Menegotti
N. Romeo
S. Russo
L. Strigari
A. Trianni

Segretario
A. Panese (Sondrio)

Tesoriere
B. Augelli

Sommario:

OXIDATIVE STRESS IN NUCLEAR MEDICINE: SIMILARITIES AND DIFFERENCES WITH RESPECT TO RADIOLOGY 7
MARCO CHIANELLI (AIMN)

MARKERS GENETICI DELLO STRESS OSSIDATIVO PER L'OTTIMIZZAZIONE DI TERAPIE CON RADIAZIONI IONIZZANTI 9
LIDIA STRIGARI (AIFM)

EFFETTI MOLECOLARI E CHIMICO-FISICI DELL'IRRAGGIAMENTO A BASSE DOSI 12
DANIELE DONDI (SIRR)

STRESS OSSIDATIVO E LAVORATORI RADIOESPOSTI: INDICATORI DI DOSE/EFFETTO/SUSCETTIBILITÀ ALLE BASSE DOSI" 16
CARLO GRANDI (AIRM)

EFFETTI NON-TARGETED: COSA CAMBIA IN RADIOPROTEZIONE 20
ANNA GIOVANETTI (AIRP)

Periodico
Fisica in Medicina

Direttore Onorario
P. Tosi

Direttore Responsabile
F. Levrero

Segretario di Redazione
L. Moro

Componenti del Comitato di Redazione

G. Borasi
N. Canevarollo
G. Capelli
N. Caretto
C. De Ambrosi
A. del Vecchio
F. Di Martino
P. Mancosu
C. Peroni
L. Raffaele
M. Reggio
F. Turrini

In copertina: Convegni e Congressi: VI Workshop Interdisciplinare FIRR "Radiazioni e Stress ossidativo" – Roma, 4 dicembre 2015"

Realizzazione digitale e grafica interni.

Trimestrale dell'Associazione Italiana di Fisica Medica, Piazza della Repubblica 32, 20124 Milano – Autorizzazione n. 403 del 20/12/2013 Tribunale di Milano

EXAMi Rad™
TESTER PORTATILE PER DPI RADIOLOGICI

Verifica la protezione e la sicurezza dei DPI anti raggi x

Controllo d'integrità e livello di protezione dei DPI anti RX

Gestione informatizzata dei controlli

iRadProMaP by SAGO MEDICA srl

www.iradpromap.it

Ci contatti per maggiori informazioni

Tel. 051 686 08 11
info@sagomedica.it

www.sagomedica.it

SAGO MEDICA
MEDICAL EQUIPMENT

HEALTH PHYSICS | NUCLEAR MEDICINE | **DIAGNOSTIC RADIOLOGY** | RADIATION THERAPY

Massima precisione al primo colpo.

NOMEX®

Soluzione chiavi in mano per la dosimetria assoluta e il controllo qualità nella radiologia diagnostica

- Due potenti sistemi per uso indipendente o combinato
- RAD/FLU/DENT, DENT-PAN, MAM, CT, CBCT
- Acquisizione di tutti i parametri in un unico passaggio
- Cambio scala automatico per dose, kV e filtrazione totale
- Valutazione della qualità dell'immagine e determinazione CTDI opzionali
- Collegamento esterno di camere di ionizzazione o detettori a semiconduttore PTW tramite dosimetro NOMEX®

Maggiori informazioni su NOMEX®?
Visitate il nostro sito Internet o scrivete all'indirizzo nomex@ptw.de.

PTW
Knowing what responsibility means

WWW.PTWNOMEX.COM USA | LATIN AMERICA | CHINA | ASIA PACIFIC | INDIA | UK | FRANCE | IBERIA | GERMANY

NEW RaySafe X2

RaySafe™
A Fluke Biomedical Company

La linea dei multimetri Unfors/RaySafe evolve dalla piattaforma Xi, tutt'ora elevato standard di mercato per i controlli di qualità in radiodiagnostica, alla nuova X2.

RaySafe Xi

Principali vantaggi del nuovo sistema X2

- Migliore accuratezza e sensibilità
- Estrema semplicità e velocità d'uso, nessun settaggio manuale necessario
- Sensori indipendenti dall'angolo di inclinazione rispetto all'asse del tubo
- Ampio display a colori touch screen con memorizzazione delle misure e delle forme d'onda
- Ampia gamma di calibrazioni per tutti i mammografi presenti sul mercato

Dopo l'acquisizione di RaySafe da parte di Fluke Biomedical, SLT è diventato il **distributore unico** per tutti i prodotti Unfors/RaySafe AB. L'aggiunta dei prodotti Unfors/RaySafe alla linea dei prodotti Fluke Biomedical attraverso SLT permette ai clienti di avere un **unico punto di riferimento per vendita, supporto, gestione degli ordini ed assistenza tecnica**.

SLT

S.L.T. s.r.l. - Via Torino 30, 20063 Cernusco sul Naviglio (MI)
Tel. (+39) 02.48464064 | unfors-raysafe@slt.eu.com | www.slt.eu.com

Servizi Nucleari s.n.c.

Sorgenti alfa, beta e gamma, puntiformi ed estese, soluzioni, gas, prodotti per spettrometria, medicina nucleare, sorgenti per calibrazione PET, sorgenti speciali.

Sorgenti di taratura per la medicina, l'industria, l'ambiente prodotti da CERCA LEA.

Sistemi per irradiazione emoderivati.

Servizi Nucleari s.n.c.
Strada Pranova 6
15030 Conzano (AL)
tel 0142 925630
347 8497358
fax 0142 925933
http://www.servizinucleari.it
e-mail: info@servizinucleari.it

Active Radsys

Soluzioni attive per la radioprotezione e la fisica medica

- Produzione di software per aziende produttrici ed utenti finali
- Progettazione e co-produzione con i partner di soluzioni personalizzate in materia di strumentazione ed oggetti di misura e di controllo
- Sistemi automatici per il controllo e la misura della radioattività negli ambiti medicale, ambientale ed industriale
- Distribuzione in Italia di prodotti e soluzioni di terze parti per: misura e ricerca della radioattività, spettrometria gamma, Alfa e XRF, controlli di qualità in radiologia, radioterapia e medicina nucleare, monitoraggio ambientale, dosimetria del personale, dosimetria del paziente, misura del Radon, ricerca scientifica, sicurezza e protezione del territorio
- Corsi di addestramento ed assistenza personalizzata

Il fantoccio Quart Cbct_ap e il Software Dvt-Tec : l'unico sistema conforme alla norma europea E DIN 6868-161

Greatz NaI 2002: la prima innovativa sonda al NaI concepita per i controlli non distruttivi sui rottami metallici, minerali, rifiuti…etc.

www.activeradsys.it info@activeradsys.it Tel: 0544 408071 Fax: 0544 276014

FEDERAZIONE ITALIANA RICERCHE SULLE RADIAZIONI

VI WORKSHOP INTERDISCIPLINARE FIRR

RADIAZIONI E STRESS OSSIDATIVO

Centro Ricerche Casaccia

Sala Multimediale Area Capanna

Roma 4 dicembre 2015

FEDERAZIONE ITALIANA RICERCHE SULLE RADIAZIONI

VI WORKSHOP INTERDISCIPLINARE FIRR

RADIAZIONI E STRESS OSSIDATIVO

ENEA Centro Ricerche Casaccia
Sala Multimediale Area Capanna

Roma 4 dicembre 2015

Programma

8.30 **Introduzione: Radiazioni e Stress Ossidativo**
Donatella Tirindelli Danesi (FIRR)
Raffaele De Vita (FIRR)

I Sessione
Moderatori: *Carmela Marino (SIRR), Alessio Morganti (AIRB)*

9.00 **Stress ossidativo in medicina nucleare: cosa cambia rispetto alla radiologia**
Marco Chianelli (AIMN)

9.40 **Markers genetici dello stress ossidativo per l'ottimizzazione di terapie con radiazioni ionizzanti**
Lidia Strigari (AIFM)

10.20 discussione

II Sessione
Moderatori: *Luisa Begnozzi (AIFM), Francesco Schillirò (SIRM)*

10.50 **Effetti molecolari e chimico-fisici dell'irraggiamento a basse dosi**
Daniele Dondi (SIRR)

11.30 **Effetti collaterali e target**
Andrea Magistrelli (SIRM), Francesco Schillirò (SIRM)

12.10 discussione

III Sessione
Moderatori: *Marie Claire Cantone (AIRP), Roberto Moccaldi (AIRM)*

12.40 **Stress ossidativo e lavoratori radioesposti: indicatori di dose/effetto/suscettibilità alle basse dosi**
Carlo Grandi (AIRM)

13.20 **Conseguenze in radioprotezione: la LNT è ancora valida per le basse dosi?**
Anna Giovanetti (AIRP)

14.00 discussione e conclusioni

14.30-14.40 Verifica con questionario e compilazione della scheda di valutazione ECM

Con il Patrocinio

Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile

Consiglio Nazionale delle Ricerche

Istituto Nazionale di Fisica Nucleare

Consiglio Direttivo FIRR

D. Tirindelli Danesi (Presidente),R. De Vita (Segretario/Tesoriere)
L. Begnozzi, A. Lazzari (AIFM); O. Geatti, M. Chianelli (AIMN)
R. Corvò, A. Morganti (AIRB); R. Moccaldi, G. De Luca (AIRM)
M.C. Cantone, A. Giovanetti (AIRP); F. Coppolino, F. Schillirò, (SIRM); C. Marino (SIRR)

Comitato Organizzativo FIRR

R. De Vita (FIRR), M. Pacilio (AIFM), M. Chianelli (AIMN), A. Morganti (AIRB), R. Moccaldi (AIRM), A. Giovanetti (AIRP), A. Magistrelli (SIRM), A. Campa (SIRR)

Informazioni generali

Il Workshop, è accreditato dall'**AIFM**
(Provider Nazionale n. 416-144066)

Crediti formativi ECM n° 6
per tutte le Professioni

Segreteria Scientifica e Organizzativa FIRR

Federazione Italiana Ricerche sulle Radiazioni
associazione senza fini di lucro
c/o Divisione Tecnologie e Metodologie per la Salvaguardia della Salute
ENEA - Centro Ricerche Casaccia s.p. 016 - Via Anguillarese 301 - 00123 Roma
Tel.: 06 30484671
radiazionifirr@enea.it - devita@enea.it - - http://firr.casaccia.enea.it

INDICE

OXIDATIVE STRESS IN NUCLEAR MEDICINE: SIMILARITIES AND DIFFERENCES WITH RESPECT TO RADIOLOGY 7
MARCO CHIANELLI (AIMN)

MARKERS GENETICI DELLO STRESS OSSIDATIVO PER L'OTTIMIZZAZIONE DI TERAPIE CON RADIAZIONI IONIZZANTI 9
LIDIA STRIGARI (AIFM)

EFFETTI MOLECOLARI E CHIMICO-FISICI DELL'IRRAGGIAMENTO A BASSE DOSI 12
DANIELE DONDI (SIRR)

STRESS OSSIDATIVO E LAVORATORI RADIOESPOSTI: INDICATORI DI DOSE/EFFETTO/SUSCETTIBILITÀ ALLE BASSE DOSI" 16
CARLO GRANDI (AIRM)

EFFETTI NON-TARGETED: COSA CAMBIA IN RADIOPROTEZIONE 20
ANNA GIOVANETTI (AIRP)

OXIDATIVE STRESS IN NUCLEAR MEDICINE: SIMILARITIES AND DIFFERENCES WITH RESPECT TO RADIOLOGY

Marco Chianelli, MD, PhD
Endocrinology Unit, Regina Apostolorum Hospital, Albano, Rom

email: marcochianelli@libero.it

It is known that when living tissues are exposed to ionizing radiation DNA damage may occur that in turn may develop in clinical pathologies. DNA damage can be repaired and only in particular circumstances develops in clinical damage. Radiation quality and sensitivity are hot topics in radiobiology. The exposure to ionizing radiation may increase the risk of developing cancer but epidemiology says that different risk is associated with the use of different types of radiation. Notably this is well known with respect to the exposure to external beam radiotherapy vs radionuclide radiotherapy. When referring to radiological risk, therefore, it should be clear that is radiation specific because the biological effects originating by different radiation varies. In the brief manuscript I will try to outline briefly the principal reasons.

Introduction: exposure to ionizing radiation

Exposure to ionizing radiation produces oxygen-derived free radicals in the tissue environment such as hydroxyl radicals (the most damaging), superoxide anion radicals and hydrogen peroxide. Radiation reduces tissue antioxidants and depletes cellular alphatocopherol; whole-body exposure to X-ray decreases tissue concentrations of vitamins C and E on top of the reduction of glutathione; radiation therapy for breast cancer is associated with a decline in tissue vitamin E and Se.

Does increased oxidative stress necessarily turns into clinical consequences?

It is known that physical effects such as Compton and ionisation may induce biological effects such as DNA damage. But, does a biological effect turns necessarily into a clinical effect such as the induction of cancer or deterministic effects?

What are the variables influncing the outcome?

There factors influencing radiation-induced tissue damage: repair capacity, dose, dose rate, tissue sensitivity and affected organs, endogenous antioxidant defenses, modulating intracellular factors, oxygen concentration, levels of thiols and other antioxidants.

Defence mechanisms

A complex protective system against endogenous and exogenous oxidative stress exists: enzymes, such as superoxide dismutase, catalase, and glutathion peroxidase; radical scavengers: intracellular components glutathion, vitamin C and E.

Repair

Low doses of x- or γ-rays induce the synthesis of repair systems (with a delay of up to a few hours) that provide improved protection against renewed and other nonradiation sources of damage for hours to weeks after a single irradiation. This system is maximally expressed after <0.1-<0.5 Gy and fail to appear with higher doses and higher dose rates.

A dose and a dose-rate effectiveness factor is needed to convert risk estimates to the low dose and low dose rates encountered in medical practice; animal studies suggested a factor between 2 and 10, the ICRP assumes a value of 2.

Nuclear medicine is different

Diagnostic nuclear medicine is characterised by low dose, low dose rate, indirectly ionising radiation; at low doses the net result of irradiation depends on a complex interaction between the radiation and the host where the type of radiation, defense mechanism, repair, non target effect, adaptive response all affect the final effect.

X rays may be twice as potent as gamma rays for malignant transformation at low doses.

A recent study investigated the malignant transformation in mammalian cells exposed in vitro to low and high doses of 60Co gamma rays or X rays (0.03-1.5 Gy). Transformation incidence at high doses was similar for X and gamma rays. At low doses, 0.03 Gy, however, transformation induced by X rays was about twice that of gamma rays (Borek)

The dose response and repair kinetics of γ–H2AX foci (a marker of DNA double strand breaks) in vitro, after irradiation of T-lymphocytes with X- and γ-radiation is quite different; (Beels)

repair kinetics (5 and 200 mGy)

after X-ray delayed repair is observed: 40% persisting after 24 h (5 mGy), 10% persisting after 24 h (200 mGy); when cells are exposed to gamma rays (^{60}Co) DNA damage is at background levels after 24 h.

dose response (0–500 mGy dose range)
after X-irradiation: biphasic behavior, low-dose hypersensitivity after γ-radiation: linear dose response.

Experimental limits: open questions in ionising radiations

Which patients is more at risk of developing side effects? individual radiosensitivity which radiation causes the greatest damage? radiation quality what is the effect of radioprotector treatments?
Physical dosimetry cannot provide an answer

Experimental models
the majority of experimental results are from animal model treated with external beam irradiation incidence of secondarycancer from nuclear medicine so little that it would need a very high number of animals

From dosimetry to radiobiology

dosimetry is not always predictive of biological damage and or the clinical effect renal toxicity in patients treated we Y90-dota-TOC correlates with biological effective dose and not with absorbed dose (Barone).

Possible role of biological dosimetry
Clinical effects come at later time points, develop only in a percentage of patients and are difficult to predict. Biologic dosimetry is a marker of individual exposure and allows the direct measurament of genetic damage; can be used as surrogate marker of tissue oxidative damage; it can be used to assess individual radiosensitivity, to verify the effects of protective treatments, to verify the biological effects of different types of radiation

Techniques in biological dosimetry
Micronuclei are small acentric chromosome fragments induced by various clastogenic agents; not specific for radiation, they have, however, good reliability and reproducibility. They disappear from circulation with a clearance rate of 60% / year and show poor sensitivity: 0,2 Gy. They are one of the standard cytogenetic assay for genetic toxicology

Comparison with radiology: therapeutic applications
It is known that in external radiotherapy increased incidence of late-onset solid tumours and of leukaemia; on the other hand, treatment of hyperthyroidism and of differentiated thyroid tumours is rarely associated with the development of secondary tumours

Experimental findings
In an experimental study, the increase in number of micronuclei was studied in two group of patients:
Group A) patients affected by thyroid carcinoma or hyperthyroidism, treated with 131I
Group B) patients with carcinoma of the cervix or Hodgkin's disease treated with external beam radiotherapy. The average increase of micronuclei was, in group A: 32, in group B was 298 or 640 in patients with cervix carcinoma or Hodgkin's disease respectively (Monsieurs).

Nuclear medicine vs radiology: differences in dose rate
Radionuclide therapy is characterised by a continuing and declining exposure at a dose rate of 2–8 Gy/day. On the other hand, EBR therapy has a constant high dose rate, typically around 1-5 Gy/min.
It is possible to speculate, on the basis of the experimental evidence, that the genetic alterations induced by EBR exceed the repair capacity of the cells and greater DNA damage is induced, as detected by micronuclei assay, with a greater risk of malignancy.

Proposed roles for biological dosimetry
Biological dosimetry does not estimate the absorbed dose but directly measures the biological effects on peripheral blood cells and, for its unique characteristics, can be proposed for the evaluation of individual sensitivity, radiation quality, efficacy of radioprotectors, possible surrogate marker of individual risk at low and high doses of radiations and optimisation of treatment.

Conclusion

Low levels of ionising radiations induce biological effects that can be readily and fully repaired in the vast majority of cases; when the dose and the dose rate increase repair mechanisms become insufficient and a clinical consequence may develop. The lower dose rate of nuclear radiations may explain the lower risk profile compared to radiology.

Suggested reading

1) Barone R, *J Nucl Med 2005 46:99S-106S.*
2) Beels L et al, sept 2010 doi: 10.3109/09553002.2010.484479
3) Borek et al Nature 1983 Jan 13;301(5896):156-8
4) Monsieurs MA, *Nucl Med Commun 1999, 20:911-917*

MARKER GENETICI DELLO STRESS OSSIDATIVO PER L'OTTIMIZZAZIONE DI TERAPIE CON RADIAZIONI IONIZZANTI

Lidia Strigari (AIFM)
UOSD Laboratorio di Fisica Medica e Sistemi Esperti, Istituto Nazionale Tumori Regina Elena (IRE-IFO)

e-mail: lidiastrigari2@gmail.com

Gli avanzamenti tecnologici consentono di utilizzare tecniche sempre più sofisticate per effettuare un trattamento conformazionale ed accurato nel campo della radioterapia a fasci esterni. La diffusione e lo sviluppo della terapia con radionuclidi hanno aumentato l'interesse per lo studio degli effetti radiobiologici, rispetto l'efficacia terapeutica e la tossicità degli organi a rischio (OARs). In questi trattamenti, la variabilità della risposta può condizionare la massima dose di radiazione somministrabile. Molti sforzi sono stati compiuti nel tentativo di delineare le relazioni dose risposta (QUANTEC, etc.) nel caso di gruppi di pazienti sottoposti alla stessa terapia, ma questi modelli nel caso del singolo paziente non riescono ad essere parimenti predittivi, essendo la risposta del paziente di tipo binomiale (ovvero effetto o meno) dipendente da molteplici fattori (clinici, genetici, dosimetrici, ecc.). Inoltre, nonostante il rispetto dei limiti di dose del piano di trattamento, la risposta di alcuni pazienti si diversifica per livelli di tossicità (Saftwat et al., 2002). In altri termini l'esposizione a radiazioni ionizzanti puo`quindi determinare in un sottogruppo di pazienti risposte acute o tardive anche particolarmente gravi, a parità di trattamento. La scarsa prevedibilità della risposta dei tessuti sani rappresenta al momento la maggiore limitazione delle terapie, che grazie agli avanzamenti tecnologici potrebbero consentire trattamenti radicali più aggressivi.

Diversi studi generalmente condotti su pazienti sottoposti a radioterapia a fasci esterni dimostrano l'influenza del profilo genetico sul rischio di tossicità. La ricerca è attualmente rivolta all'individuazione di marker genetici e all'identificazione dei processi che determinano la radiosensibilità individuale al trattamento al fine di identificare i pazienti con bassa moderata o alta radiosensibilità prima di effettuare il trattamento radioterapico.

Ovviamente la dose di radiazione è il miglior predittore di risposta. Il DNA è il principale bersaglio responsabile della morte cellulare per alterazioni indotte dalle radiazioni ionizzanti rappresentate da single strand breaks (SSBs), double strand breaks (DSBs) e base damage. Tra queste, una DSBs rappresenta la più grave forma di danno (Wyman& Kanaar, 2006). Le DSBs sono causate da ionizzazione diretta dello scheletro del DNA e/o dall'interazione indiretta per mezzo della ionizzazione di molecole prossime al DNA che può generare specie altamente reattive.

Ovviamente vista la complessità del fenomeno non è sufficiente correlare il danno iniziale indotto al DNA con la tossicità radioindotta (Henriquez-Hernandez et al., 2012).

Il ruolo dello stress ossidativo nella terapia

Alcune strategie terapeutiche come la radioterapia e la terapia fotodinamica sono disegnate appositamente per aumentare il livello di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nelle cellule tumorali. I ROS sono molecole, continuamente generate nelle cellule sia da fattori endogeni (prodotti del normale metabolismo cellulare) che esogeni. Le lesioni al DNA indotte endogenamente (10000 lesioni/cell/day) sono molto più numerose di quelle generate da fattori ambientali (i.e. basse dosi di IR < 0.3 Gy) contribuendo all'accumulo di mutazioni in cellule e tessuti. In seguito all'esposizione a IR vengono ulteriormente generati: radicale idrossilico (*OH), radicale superossido (O_2•–) e ossigeno singoletto ($^1O_2$). I ROS interagendo con le specie biologiche danneggiano il DNA, sregolano la normale sintesi proteica ed i processi di riparo del DNA. Infatti aumentando i livelli di ROS nella nicchia tumorale è possibile contrastare la crescita metabolica dei ROS nelle cellule tumorali.

Rispetto ai tessuti normali per portare una cellula tumorale alla morte cellulare sono richiesti meno ROS, in quanto le cellule sane hanno uno stato ossidativo più basso e sono dotate di meccanismi di riparo più efficienti. In aggiunta, la possibilità di rilasciare la dose in modo altamente conformazionale permette di proteggete ulteriormente i tessuti sani dai danni radioindotti, riducendo il numero di ROS.

Un inconveniente delle terapie basate sullo stress ossidativo è legato alla resistenza delle cellule staminali tumorali (CSC). Queste cellule hanno la capacità di auto-rinnovarsi, di differenziarsi in molteplici linee e di

dare vita ai tumori, e quindi sono responsabili della crescita incontrollata dei tumori stessi, legata alla malattia microscopica residua ed alle recidive tumorali (R. Stoyanova et al. 2012). La resistenza delle CSC si basa su meccanismi di riparazione avanzate, up-regolazione del ciclo cellulare, sovra-espressione di enzimi antiossidanti e dei radicali liberi (S.H. Sahlberg et al. 2014). Diverse pathway molecolari regolano CSC e le loro risposte adattative all'ipossia e allo stress ossidativo nella nicchia tumorale. Infine, l'eterogeneità tumorale deriva anche dalla distribuzione spaziale non uniforme delle sollecitazioni micro-ambientali, come l'ipossia, l'acidosi, lo stress ossidativo e la privazione di nutrienti (Mitsuishi Y. et al. 2012).

Poiché le terapie basate sullo stress ossidativo dipendono fortemente dalla disponibilità locale dell'ossigeno molecolare, le cellule tumorali poste in regioni ipossiche potrebbero non rispondere alle suddette terapie. In tale ottica, l'imaging in vivo della mappa ipossica potrebbe guidare la strategia terapeutica per eradicare queste cellule. La radioterapia è una terapia che si basa sullo stress ossidativo. Le radiazioni ionizzanti, elettromagnetiche o particelle, possono distruggere la struttura atomica delle cellule attraverso una serie di cambiamenti chimici. A dosi biologiche terapeuticamente rilevanti, l'interazione diretta delle radiazioni ionizzanti sui nuclei prevale sull'azione indiretta basata sulla radiolisi dell'acqua. Come descritto da Azzam et al. (2012), le radiazioni ionizzanti depositano energia attraverso la generazione di elettroni secondari e producono specie instabili, che danno origine ad ulteriori radicali e prodotti molecolari della radiolisi, distribuiti in una struttura traccia altamente eterogenea (10^{-12} s). Chimicamente le specie reattive diffondono e reagiscono tra di loro e con le strutture biologiche (10^{-6} s). In condizione anaerobica, la radiolisi dell'acqua genera l'anione superossido, il radicale idrossile, il perossido di idrogeno, a seconda del valore del trasferimento lineare di energia (LET) delle particelle messe in moto. Ad esempio, il perossido di idrogeno prevale sul radicale idrossilico all'aumentare LET, mentre le particelle alto LET producono principalmente anione superossido. Sebbene questo spettro di ROS è simile a quello prodotto da processi metabolici, si possono notare differenze biologicamente rilevanti, soprattutto perché le radiazioni ionizzanti generano quasi istantaneamente alte concentrazioni di ROS localizzate che portano ad ampie lesioni cluster, ovvero lesioni ossidative irreparabili.

Come sistema di difesa individuale le cellule producono delle molecole antiossidanti (scavenger dei radicali liberi i.e. SOD, CAT). Gli antiossidanti endogeni sono rappresentati dall'enzima superossido dismutasi (SOD), che può eliminare il radicale superossido ($O^{2\bullet-}$), e da catalasi (CAT) e glutatione (GSH) che decompongono il perossido di idrogeno H_2O_2. Gli antiossidanti esogeni, sostanze presenti negli alimenti ed in integratori alimentari, sono in grado di attivare sistemi di riparo (i.e. vitamine A, C, E, il selenio, etc.). Gli effetti dei radicali liberi sono sotto il controllo dell'equilibrio tra il loro rateo di produzione e di eliminazione per effetto del sistema di difesa. Quando sorgenti esogene producono un eccesso di radicali liberi il sistema di difesa risulta sbilanciato generando un danno ossidativo al tessuto.

I meccanismi che possono sollecitare la difesa cellulare contro le specie reattive dell'ossigeno (ROS) non sono specifiche dell'agente che induce lo stress ossidativo.

Condizioni di stress ossidativo possono verificarsi sia per la diminuzione dei livelli di antiossidanti (per es. a seguito di mutazioni che incidono sull'attività di enzimi come SOD, GSH o tossine che danneggiano il sistema di difesa degli antiossidanti) che per l'aumento della produzione dei ROS (dovuto sia all'effetto dell'esposizione delle cellule o dell'organismo a livelli elevati di O_2 che ad agenti fisici e chimici che generano i ROS).

Livelli più elevati di stress ossidativo (8-oxo-dG in DNA di linfociti) sono osservati in pazienti affetti da rare sindromi genetiche che manifestano radiosensibilità quali ataxia telangiectasia AT (Reichenbach J, 2002), anemia di Fanconi AF (Pagano G, 2004), sindrome di Bloom (Nicotera TM 1989) e sindrome di Cockaine (Tuo J, 2003). Per ciò che concerne gli studi clinici è stata osservata una correlazione tra polimorfismi di geni (GSTA1, CAT, eNOS), lo stress ossidativo e lo sviluppo di teleangectasia post-radioterapia su 390 donne affette da cancro al seno (Kuptsova et al., 2008). È stata inoltre trovata una correlazione tra SNPs in SOD e sanguinamento del retto di grado >2 in 135 pazienti affetti da carcinoma prostatico trattati con brachiterapia o trattamento combinato di radioterapia a fasci esterni e brachiterapia (Matthewet al., 2010).

Un'associazione tra obesità e desquamazione della pelle è stata osservata in pazienti con SNPs di MPO (rischio 4 volte maggiore che in pazienti di peso normale) ed eNOS (6 volte maggiore) (Ahn et al.,2006). Inoltre, SNPs di SOD2 sono stati associati significativamente al rischio di fibrosi sottocutanea in 41 pazienti, estendendo ulteriormente l'analisi a 120 pazienti i risultati non sono stati replicati (Andreassen et al., 2006).

La produzione di ROS aumenta con l'età e può essere responsabile della riduzione dell'attività dell'istone sirtuin 1 (SIRT1), che induce un fenotipo di senescenza in HUVEC e determina un incremento della acetilazione di p53 con un conseguente arresto delle cellule endoteliali.

La senescenza delle cellule endoteliali è associata con una disfunzione endoteliale e con la vulnerabilità delle lesioni aterosclerotiche. Inoltre Ota et al. (2007) hanno dimostrato che il trattamento con cilostazolo induce la produzione di ossido nitrico (NO), che è fondamentale

per la funzione endoteliale, e grazie a un maggiore livello di adenosina monofosfato ciclico (cAMP) induce una conseguente fosforilazione di eNOS. L'aumento dei livelli di NO può, a sua volta, migliorare l'attività di SIRT1, che, ancora una volta, può ritardare la senescenza endoteliale (Ota, H et al 2007). Riassumendo, durante l'invecchiamento, lo stress ossidativo si accumula, in parallelo si osserva una diminuzione della produzione di NO, che potrebbe essere responsabile dell'inattivazione SIRT1 stesso (Manda G. et al. 2015). Infine l'aumento di espressione e/o dell'attività di SIRT1 ha un effetto positivo nel diabete di tipo 2, nel cancro, nelle malattie cardiovascolari, nella BPCO e nella malattia di Alzheimer (Satoh, A et al. 2011).

Nella pratica clinica non ci sono al momento modelli in grado di predire la radiosensibilità di un individuo. Infatti sono attualmente disponibili modelli specifici per predire la probabilità che in un gruppo di pazienti si possano manifestare tossicità, che tengono conto del tipo di cancro e di end-point clinici (diabete, età, fumo, terapie ormonali) e della dosimetria (dosi medie/massime agli organi a rischio) (West and Barnett 2011). In futuro tali modelli potranno essere estesi includendo dati correlati al genotipo.
Relativamente al controllo di malattia ed alla sopravvivenza c'è un aumentato interesse per l'effetto abscopale che sembra sia correlato con l'alta dose per frazione che può essere erogata con le moderne terapie.

Fattori confondenti in EBRT sono determinati da: dose e il tipo di radiazione; dimensione del target; tempo complessivo di trattamento; frazionamento; chemioterapie associate; comorbidità associate.
Finora è stata adottata l'ipotesi di equivalenza biologica per le dosi somministrate con RNT o EBRT, ma è necessario specificare che EBRT impiega la radiazione X e la dose al target è somministrata ad alto dose rate (HDR) 1-5Gy/min in frazioni di 2 Gy (60-70 Gy). RNT, invece, impiega emettitori beta o alfa, l'attività iniettata che risiede nella lesione è piccola (0.1%-10%), l'emivita dei radiofarmaci è molto variabile ma la vita media effettiva è tipicamente 24-72 h e la dose viene rilasciata con un basso dose rate (LDR) che diminuisce in modo continuo 2- 8Gy/day, quindi la massima dose assorbita in genere non supera i 50 Gy (es. si osserva una risposta clinica anche per dosi inferiori a 3 Gy per i linfomi e di ~ 7 Gy per i tumori solidi). Sebbene i principi generali della radiobiologia siano gli stessi in RNT e in EBRT, i meccanismi di risposta ad esposizioni a basse dosi sono fondamentalmente diversi da quelli ottenuti ad HDR (Kassis et al., 2005), in quanto possono intervenire vari processi biologici nel corso dell'irradiazione stessa che modificano la risposta al trattamento.

Tra i fattori che influenzano la risposta vanno annoverati: la tolleranza individuale, influenzata dal patrimonio genetico, età, altre terapie (Meredith et al., 2008); il rapporto dose volume che influenza in maniera diretta la severità della tossicità; l'eterogeneità nella distribuzione (disomogeneità nella espressione/distribuzione di recettori/antigeni o ad una disuniformità nella vascolarizzazione del tessuto tumorale) che influenza la tolleranza dell'intero organo (es. esposizioni di porzioni di organi come reni e sistema nervoso centrale presentano diversi livelli di tolleranza). Tali fattori possono mascherare la correlazione dose assorbita-risposta. Una minore accuratezza nella quantizzazione della dose rispetto alla radioterapia EBRT contribuisce inoltre alle incertezze nei modelli predittivi. A tal fine è importante garantire che le tecniche dosimetriche siano accurate e standardizzate. D'altro canto, l'associazione tra il genotipo ed il fenotipo è generalmente complessa e sono rari i casi in cui è sufficiente la mutazione di un singolo gene perché la radiosensibilità (AT, FA) si manifesti in modo evidente. Generalmente la radiosensibilità dipende dall'effetto combinato di alterazioni di diversi geni e processi. I meccanismi associati allo stress ossidativo sono ancora in fase di studio e una serie di interrogativi riguardanti il loro impatto in terapia con radionuclidi restano irrisolti. Inoltre l'applicazione di metodi di screening di tipo genetico (DNA arrays o analisi dei SNPs) è poco diffusa in particolare per la RNT. In tale contesto, la differenza tra le alterazioni risultanti da emissioni a basso LET rispetto alla radiazione alfa rappresenta un'area di ricerca di grande interesse.

Una comprensione maggiore dei principi radiobiologici e dei meccanismi che vengono attivati dalla terapia con radionuclidi può fornire basi più solide per l'ideazione e lo sviluppo di trattamenti personalizzati. Ciò consentirà di identificare potenziali varianti genetiche, che influenzino la predisposizione alla terapia con radionuclidi, associate agli effetti collaterali che potrebbero rappresentare una base per una maggior comprensione degli esiti clinici e per ottimizzare la terapia.
Ulteriori ricerche sono indispensabili per chiarire i meccanismi di interazione delle radiazioni ionizzanti con le cellule, con l'opportunità di diffondere ulteriormente l'impiego e di ampliare il ruolo della terapia con radionuclidi e con fasci esterni.

EFFETTI MOLECOLARI E CHIMICO-FISICI DELL'IRRAGGIAMENTO A BASSE DOSI

Daniele Dondi
Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Pavia
INFN, sezione di Pavia

e-mail: daniele.dondi@unipv.it

Introduzione

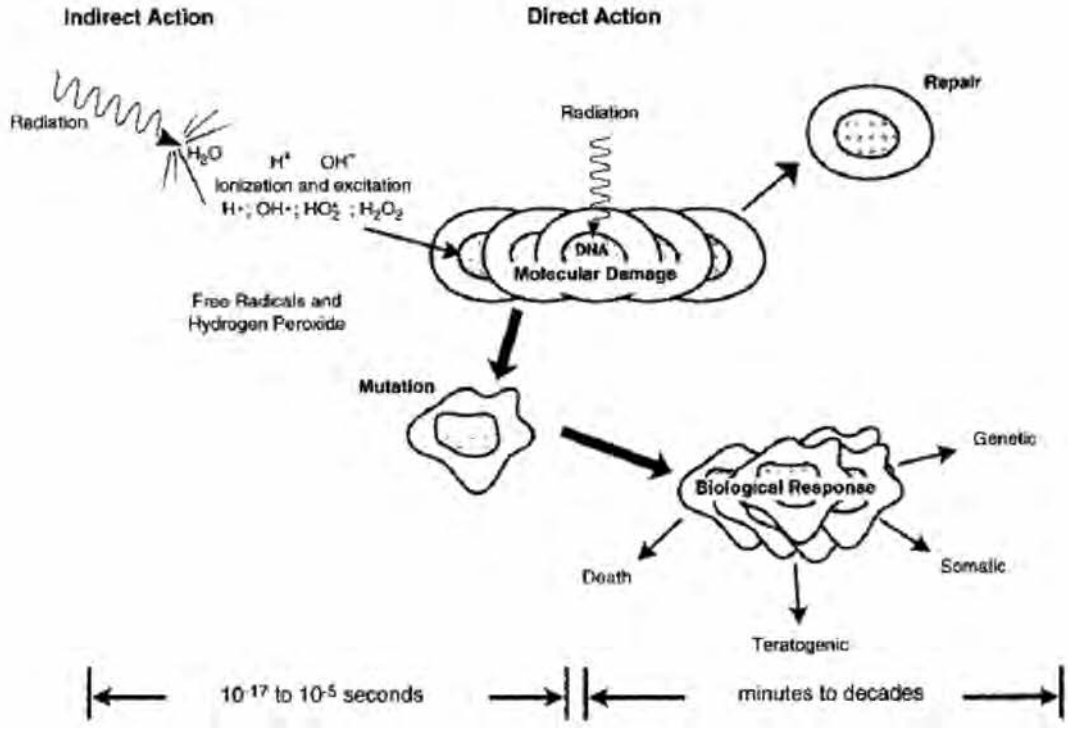
Gli effetti biologici a lungo termine di basse dosi di radiazioni sono poco conosciuti e il rischio è spesso stimato assumendo che l'effetto rimanga lineare. Negli ultimi anni questa ipotesi si è dimostrata in contrasto con molte evidenze sperimentali che hanno rivelato un gran numero di effetti che deviano da questa legge (ipersensibilità, radioresistenza indotta, risposta adattiva, bystander effect e instabilità genomica). Queste osservazioni suggeriscono un andamento non lineare nella regione a basse dosi. Inoltre poche informazioni sono disponibili sugli effetti indotti su sistemi crioconservati, ad esempio banche genomiche per le quali l'esposizione per anni alla radiazione di fondo, in assenza di meccanismi di riparazione, potrebbe portare a danni da accumulo. In questo quadro, nell'ambito del progetto EXCALIBUR (studio degli effetti dell'esposizione a basse dosi di radiazioni ionizzanti in colture biologiche crioconservate) si è intrapreso uno studio multidisciplinare, con particolare enfasi sulla regione a basso dosaggio e fenomeni non lineari.

Effetti non lineari alle basse dosi

A seguito di irraggiamento con radiazioni ionizzanti si possono generare danni diretti al DNA o indiretti ad altre componenti. I danni ad altre componenti, nel caso specifico acqua, che è presente in quantità maggiore, danno origine a radicali e ad altre specie molto reattive aventi breve tempo di vita. Il danno alle macromolecole può quindi avvenire sia per azione diretta delle radiazioni, sia per azione indiretta delle specie generate dall'acqua. (Figura 1)

Il modello della "target theory" sostiene che i target sensibili della cellula debbano essere colpiti direttamente dalla radiazione o indirettamente attraverso l'azione delle specie reattive generate. Questa teoria è efficace soprattutto nella regione ad alte dosi o dove, per ragioni legate al tipo di irraggiamento, si vengono a formare rotture doppie a carico del DNA. Inoltre il danno cellulare è influenzato da molti fattori, tra i quali il rateo di dose, il tipo di cellula, la fase del ciclo cellulare e la concentrazione di ossigeno, solo per citarne alcuni.

Fig. 1



In particolare è piuttosto intuitivo l'effetto del rateo di dose se si correla il tempo necessario per dare una dose totale significativa al tempo necessario per svolgere i vari meccanismi cellulari. Per bassi ratei di dose, quindi, le cellule hanno modo di operare con i meccanismi di riparazione e la probabilità di rotture doppie del DNA diminuisce.
I non-targeted effects sono invece legati indirettamente all'esposizione delle radiazioni e possono portare ad una considerevole non linearità nella zona a basse dosi. Questi effetti non sono dovuti esclusivamente alla risposta della singola cellula ma all'integrazione di risposte cellulari, tissutali e dell'organismo intero.
In realtà in radioprotezione, in via cautelativa, per esposizioni alle basse dosi di radiazioni ionizzanti (<0.5 Gy) la valutazione di rischio è effettuata estrapolando i dati delle alte dosi, mediante una relazione "lineare senza soglia" (LNT, Linear No-Threshold cancer risk model).
A seguito di evidenze sperimentali riscontrate negli ultimi 15 anni sono stati evidenziati molti effetti "non-lineari" specifici delle basse dosi. Tra questi possiamo citare:

- l'ipersensibilità e la radioresistenza indotta (HRS/IRR)
- l'effetto bystander (BE);
- l'instabilità genomica.

Fenomeni di ipersensibilità e radioresistenza indotta sono stati riscontrati in più di 40 linee cellulari in vitro (umane, normali e tumorali, e di roditore), a seguito di irraggiamenti con basse dosi di radiazioni di raggi X/γ. Tali effetti si traducono in una deviazione per dosi < 1 Gy dal convenzionale andamento lineare o lineare-quadratico delle curve dose-risposta, con una mortalità maggiore (HRS) alle dosi più basse e radioresistenza (IRR) successiva al crescere delle dosi.

Effetto bystander

In esperimenti in vitro è stato osservato che il danno da radiazione è espresso anche in cellule non direttamente interessate dal deposito energetico, ma vicine (a contatto o non) a cellule irradiate.
Tale effetto è stato riscontrato con diversi approcci sperimentali (irraggiamenti con "micro fasci" di RX o ioni; irraggiamenti con fasci "larghi" di ioni o con sorgenti con mascheramento di parte della popolazione cellulare esposta; esperimenti di trasferimento del terreno di coltura da una popolazione irraggiata ad una non irraggiata; esperimenti di co-cultura tra popolazione irraggiata e non). (Figura 2)

Per poter spiegare il fenomeno, appare evidente che debbano sussistere dei meccanismi di segnalazione intracellulare. A distanza di molti anni dalla prima osservazione del fenomeno, a tutt'oggi questi meccanismi non sono stati compresi del tutto a livello molecolare, anche se sono stati individuati molti fattori attivi, ovvero molecole che possono diffondersi nel mezzo di coltura o attraverso una comunicazione diretta tra cellule. Alcune di queste molecole sono di difficile rivelazione anche a causa della loro stessa natura, ad esempio instabilità e/o alta reattività, come nel caso di specie radicaliche (ROS e RNS, ovvero, rispettivamente, specie radicaliche all'ossigeno e all'azoto).

A questo proposito diverse molecole sono state evidenziate come vettori di questa segnalazione intracellulare come, ad esempio, anioni superossido e acido ipocloroso. (Figura 3)

Effetti della radiazione di fondo su Sistemi Crioconservati

Il metodo di conservazione per lunghi periodi di tempo di sistemi bio-

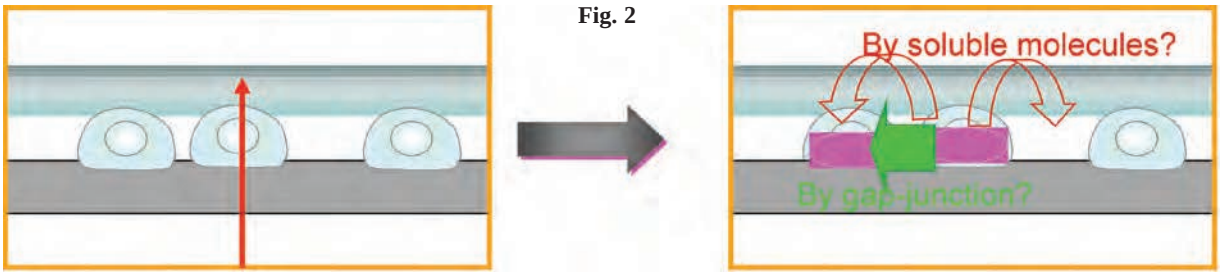


Fig. 2

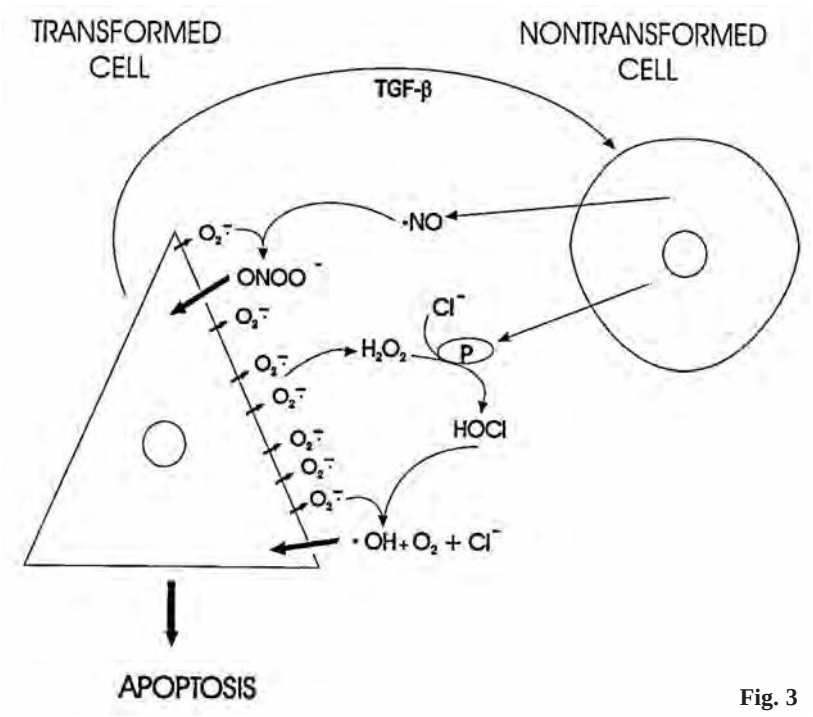


Fig. 3

logici è la cosiddetta “crioconservazione”, che permette il loro mantenimento attraverso opportuni trattamenti preparatori che evitano la formazione di cristalli di ghiaccio che andrebbero a distruggere le strutture cellulari. Solitamente questo si realizza con l'aggiunta al mezzo di coltura di opportuni composti, quali ad esempio dimetilsolfossido (DMSO), che portano alla formazione di un ghiaccio disordinato (vetroso). Il congelamento avviene quindi in condizioni controllate fino ad arrivare alla conservazione finale alla temperatura dell'azoto liquido, -196°C (77 K).

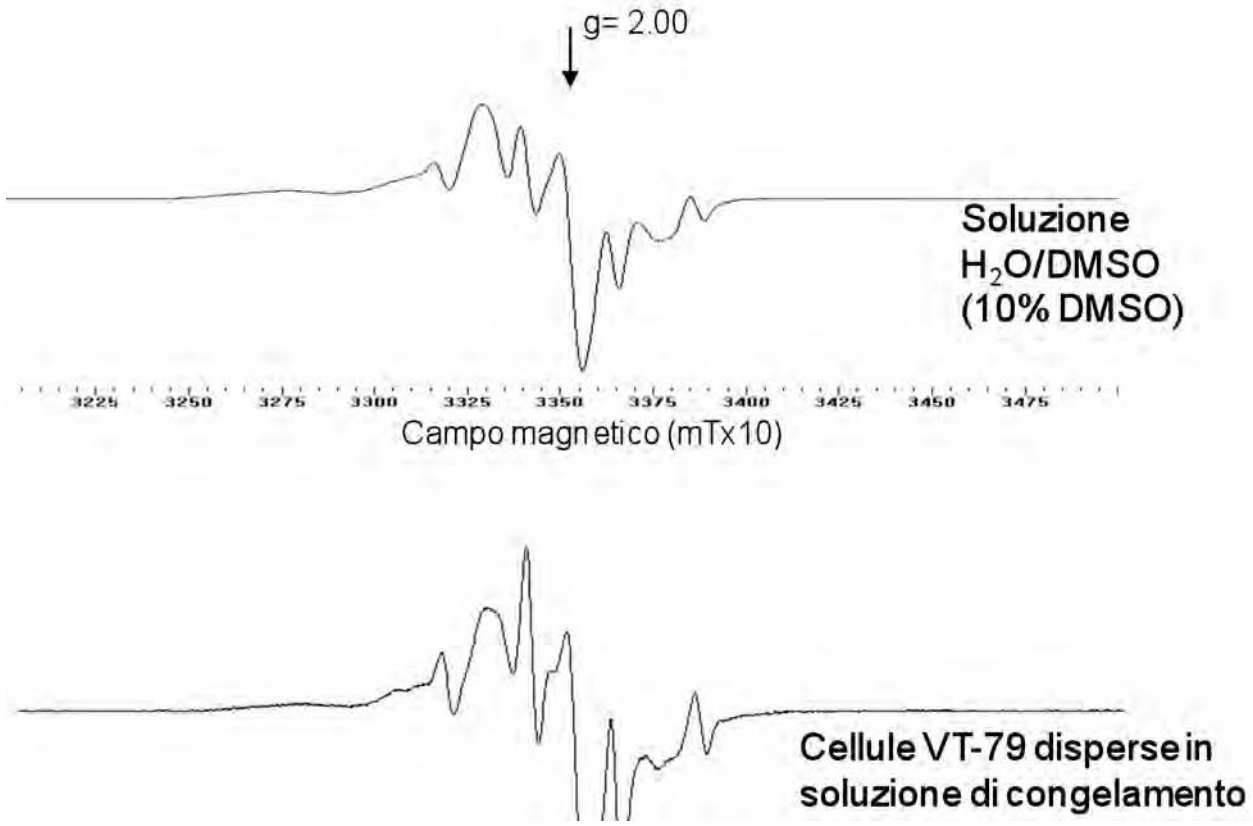
Alle temperature criogeniche i processi biochimici cellulari sono inibiti e quindi si impedisce la senescenza cellulare e la degradazione del materiale biologico. Dipendendo dall’ambiente in cui i sistemi biologici crioconservati vengono custoditi, essi subiranno un irraggiamento protratto per anni, e spesso per decine di anni (come nel caso delle “banche” di colture cellulari o delle “banche” di cellule staminali e/o germinali), a causa del fondo naturale di radiazioni. In linea di principio questo porterebbe ad un accumulo dei danni, riscontrabili solo al momento dello scongelamento e rivitalizzazione delle cellule, poiché si trasformerebbe l’esposizione a “dose protratta” (bassissimo rateo di dose del fondo ambientale) in esposizione a “dose acuta”. In realtà i risultati sperimentali ottenuti confrontando la risposta a raggi-γ di diversi sistemi biologici in condizioni criogeniche e a temperature ambiente, in termini di vari end-point biologici, hanno mostrato un effetto protettivo della crioconservazione. A tale proposito sono stati effettuati esperimenti atti alla misura diretta non distruttiva dei radicali tramite spettroscopia per risonanza paramagnetica elettronica (EPR). Tale tecnica permette di avere sia misure quantitative della concentrazione di radicali che una discriminazione della loro natura, permettendo un'assegnazione alla struttura recante il radicale.

A causa della complessità della matrice del mezzo di coltura, sono stati preparati diversi campioni a complessità crescente, a partire dalla sola acqua:

A1: Acqua deionizzata
A2: Acqua + DMSO (10%)
A3: Terreno di coltura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) completo
A4: Terreno di coltura DMEM completo + DMSO
A5: Terreno di coltura DMEM completo + Fetal Bovine Serum (FBS)
A6: Terreno di coltura completo + FBS + DMSO = terreno di congelamento
A7: Cellule in terreno di coltura completo + FBS (1,5x107 cellule totali)
A8: Cellule in terreno di congelamento(1,5x107 cellule totali)
A9: Acqua + FBS

Le soluzioni sono state quindi congelate ed irraggiate alla temperatura dell'azoto liquido. I campioni sono stati misurati nella cavità EPR alla medesima temperatura. È apparso subito evidente che i campioni contenenti DMSO presentavano una concentrazione di radicali superiore. In particolare gli spettri dei campioni A2, A6 e A7 hanno mostrato andamenti del tutto simili, ad eccezione di una piccola porzione centrale di A6, forse dovuta a specie legate al DNA. (Figura 4)

Fig. 4



Si è quindi proceduto con un riscaldamento controllato (e misura a 77K) per evidenziare il decadimento di specie radicaliche primarie con formazione di specie secondarie. In particolare è stato osservato il decadimento delle specie radicaliche OH e OOH a -130°C mentre i radicali del DMSO decadono entro i -100 °C, portando alla formazione di radicali perossidici che sopravvivono fino a -70°C. Si sottolinea che a -63°C l'eutettico acqua/DMSO 10% presenta il punto di fusione. Nel passaggio da 77K a -70°C sopravvivono circa il 10% dei radicali iniziali. Questo indica una efficiente ricombinazione radicale-radicale rispetto alla formazione di radicali perossidici (ROS). Inoltre, i radicali perossidici non contribuiscono ad aumentare in maniera apprezzabile le specie radicaliche al DNA. Sembrerebbe quindi che il danno radiolitico rimanga dell'ordine di grandezza del danno radiolitico diretto del DNA.

Conclusioni

La presenza di DMSO aumenta la produzione di radicali liberi (metilici). Aumentando la temperatura si generano radicali perossidici con una resa di circa il 10%. Questi radicali producono danno al DNA con resa molto bassa, paragonabile con quella da irraggiamento diretto del DNA.

Il fenomeno descritto riduce drasticamente il danno mediato dalla radiolisi dell'acqua sulle cellule e costituisce una differenza sostanziale rispetto alla radiolisi in fase liquida.

Bibliografia

1) G. Bauer Reactive oxygen and nitrogen species: efficient, selective, and interactive signals during intercellular induction of apoptosis. Anticancer Research, 2000, 20 (6B),4115-4139.
2) D. Dondi, A. Buttafava, A. Zeffiro, R. Cherubini, V. De Nadal, S. Gerardi, A. Faucitano The Origin of the Radiobiological Damage in Cells Stored in Cryostatic Conditions Radiation Physics and Chemistry, 2012, 81 (9) , 1445-1450.
3) H. Wang, K.N. Yu, J. Hou, Q. Liu, W. Han Radiation-induced bystander effect: Early process and rapid assessment Cancer Letters 356, 2015, 137–144.
4) Progetto EXCALIBUR Responsabile nazionale : Roberto Cherubini, INFN-Lab. Naz. Legnaro
Data inizio - data fine : 2009 - 2011.

STRESS OSSIDATIVO E LAVORATORI RADIOESPOSTI: INDICATORI DI DOSE/EFFETTO/SUSCETTIBILITÀ ALLE BASSE DOSI

Carlo Grandi (INAIL/AIRM)
INAIL – Dipartimento di Medicina, Epidemiologia, Igiene del Lavoro ed Ambientale,
Laboratorio Interazioni Sinergiche tra Rischi.

e-mail:ca.grandi@inail.it

Introduzione

Nell'ambito delle finalità della sorveglianza medica dei lavoratori esposti a radiazioni ionizzanti si annoverano la "verifica della compatibilità dello stato di salute del lavoratore con le specifiche condizioni di lavoro", "l'acquisizione di dati di riferimento utili in caso di sovraesposizione accidentale", la "diagnosi precoce di una malattia professionale certa o presunta", la "valutazione dell'efficacia delle misure di controllo del rischio" e la "predisposizione dei supporti utili per le strategie di protezione della salute nei luoghi di lavoro" (linee guida AIRM, 2013). Negli ultimi decenni la prassi radioprotezionistica ha comportato la messa sotto controllo pressoché totale del rischio per effetti deterministici ("reazioni tissutali" secondo la definizione della pubblicazione ICRP 103 del 2007) attraverso l'applicazione dei limiti di esposizione e la forte limitazione del numero e dell'entità delle sovraesposizioni, spostando l'attenzione sui cosiddetti effetti stocastici, in primis le neoplasie, alla prevenzione dei quali è oggi primariamente rivolta anche l'attività di sorveglianza medica dei radioesposti. In tale ottica la disponibilità di indicatori biologici (bioindicatori o biomarker) da affiancare ai tradizionali esami di laboratorio può consentire di adempiere meglio alle finalità della sorveglianza stessa, affinando la dosimetria (come nel caso di alcuni indicatori citogenetici consolidati), permettendo di definire in modo più mirato condizioni di aumentata suscettibilità al rischio o favorendo l'identificazione precoce di effetti che si manifesteranno sul piano clinico. In quest'ultimo caso può essere importante l'individuazione di effetti biologici persistenti, ossia di effetti a livello biologico, non clinico, che insorgono dopo l'irradiazione e permangono per lungo tempo, rilevanti ai fini del successivo sviluppo di malattia (ad esempio di specifici tipi di neoplasie). Una parte importante del meccanismo d'azione delle radiazioni ionizzanti è riconducibile alla sintesi a livello cellulare e tissutale di radicali liberi in genere e di specie reattive dell'ossigeno (ROS) in particolare. La determinazione in opportune matrici biologiche di queste specie chimiche, di loro prodotti di reazione, o di parametri biochimici di risposta (enzimatica e non) a queste specie ossidanti, ossia di marcatori di stress ossidativo e/o di risposta a quest'ultimo, può pertanto costituire una via percorribile nella ricerca di indicatori di dose/effetto/suscettibilità per quanto riguarda le radiazioni ionizzanti, applicabili agli individui radioesposti in genere e ai lavoratori in particolare.

Biomarker di stress ossidativo ed esposizione a radiazioni ionizzanti

In generale, i bioindicatori possono essere di esposizione (sono correlati alla "dose" ricevuta da tessuti/organi specifici o dall'intero organismo, fornendone una stima), di effetto (correlazione con l'effetto a livello biologico e/o clinico) e di suscettibilità (correlati a una o più condizioni di aumentato rischio per l'organismo di sviluppare una o più patologie in relazione ad una specifica esposizione). Le principali caratteristiche di un indicatore ideale sono le seguenti:

- elevata sensibilità e specificità;
- linearità di risposta in un intervallo sufficientemente ampio;
- correlazione con l'effetto biologico/clinico di interesse (nel caso degli indicatori di effetto);
- misurabilità mediante saggi/metodiche privi di errori sistematici e con minimo errore casuale di misura;
- accessibilità (non invasività o minima invasività, implicante l'utilizzo di matrici biologiche quasi sempre "surrogate");
- costi contenuti.

Per quanto riguarda i *biomarker* di esposizione, solo per alcuni indicatori di natura citogenetica le conoscenze sono al momento abbastanza consolidate per l'utilizzo anche routinario nell'attività di radioprotezione ad integrazione della dosimetria fisica. Questi stessi indicatori sono anche da considerarsi potenziali *biomarker* di effetti persistenti e di suscettibilità. Molti altri candidati sono stati proposti quali biomarcatori di esposizione, di effetto e di suscettibilità, inclusi alcuni correlati allo stress ossidativo (Pernot et al., 2012). Esistono molte metodiche per valutare direttamente o indirettamente lo stress ossidativo sia *in vitro* sia *in vivo*

(Palmieri e Sblendorio, 2007): alcune permettono di identificare e misurare radicali liberi e ROS in tempo reale nelle cellule e nei tessuti, altre consentono di rilevare in matrici biologiche i prodotti dell'attacco ossidativo alle biomolecole, mentre altre ancora valutano il potenziale antiossidante, sia complessivo sia in termini di antiossidanti specifici (ad esempio glutatione ridotto, enzimi quali SOD, CAT etc.).

Il ridotto numero di studi attinenti la valutazione dello stress ossidativo nei lavoratori radioesposti contrasta sia con le numerose ricerche *in vitro* e *in vivo* aventi per oggetto i meccanismi di danno radiogeno ROS-mediato e la connessa modulazione della risposta antiossidante sia con le moltissime indagini di natura citogenetica condotte su individui radioesposti. I pochi studi effettuati hanno privilegiato l'ambito sanitario (unità di radiologia e di radioterapia) e sono eterogenei per quanto riguarda tipologia e numero di parametri misurati, oltre che in termini di valutazione dei potenziali fattori confondenti. La segnalazione di un aumento degli indicatori di stress ossidativo e/o di aumentata risposta biologica ad una condizione di squilibrio tra specie ossidanti e specie antiossidanti in lavoratori esposti cronicamente a basse dosi e a bassi ratei di dose di radiazioni non è facilmente interpretabile, data la ridotta numerosità dei gruppi studiati e le possibili coesposizioni fonti di stress ossidativo presenti nel contesto lavorativo ed extralavorativo (Grandi, 2015). Ad oggi l'applicazione delle metodiche di valutazione dello stress ossidativo per esposizione a radiazioni ionizzanti, sinteticamente riportate in tabella, raramente esula dall'ambito della ricerca, proprio per l'assenza di un percorso validativo che permetta di disporre di indicatori di esposizione/effetto/suscettibilità affidabili, da utilizzare isolatamente o congiuntamente ad altri indicatori validati. A prescindere dagli aspetti di tipo preanalitico e analitico, un primo ostacolo riguarda l'elevato numero dei potenziali indicatori. La scelta arbitraria di un loro ristretto sottoinsieme non è al momento giustificata dallo stato delle conoscenze. La rilevazione contemporanea di un gran numero di marcatori (approccio *multimarker*) non risolve però il problema, anche se può dare informazioni più complete, dato che in molti casi è difficile avere intervalli di riferimento affidabili o intervalli di riferimento *tout court* e che lo stato redox di una matrice biologica standard non riflette necessariamente lo stato redox di tessuti o organi specifici bersaglio di noxae che hanno un meccanismo d'azione basato sullo stress ossidativo. Un altro problema importante è di natura temporale. La cinetica dei ROS e dell'attivazione delle risposte antiossidanti può essere molto diversa in relazione alla singola specie chimica reattiva. Di conseguenza è cruciale, oltre che la scelta della matrice e degli analiti, il momento del prelievo dei campioni e dell'esecuzione dell'analisi: dopo un certo tempo la perturbazione dello stato redox potrebbe non essere più rilevabile.

Tuttavia, così come ipotizzato in letteratura, un incremento prolungato dello stress ossidativo e/o delle risposte antiossidanti potrebbe aver luogo nel caso di esposizioni croniche a basse dosi e a bassi ratei di dose di radiazioni ionizzanti, oggi proprie soprattutto dell'ambito lavorativo, ma anche per esposizioni acute, ad esempio sovraesposizioni accidentali. Un aumentato livello di stress ossidativo nel tempo potrebbe peraltro essere all'origine di fenomeni quali instabilità genomica ed effetti non al bersaglio (effetto *bystander*), oltre che di possibili risposte adattative. Proprio l'esistenza di effetti non al bersaglio e di risposte adattative, ampiamente descritti negli studi soprattutto *in vitro*, rende sempre più problematico per l'esposizione a basse dosi di radiazioni ionizzanti l'assunto del modello dose-risposta lineare senza soglia (*Linear Non Threshold* o LNT). Quest'ultimo rappresenta ad oggi l'ipotesi alla base della radioprotezione sia per la popolazione generale sia per i lavoratori esposti a radiazioni ionizzanti (ICRP, 2007), che è stata da tempo accettata a livello internazionale (ed è alla base dell'attuale legislazione nazionale e della recependa direttiva 2013/59/EURATOM) per ragioni cautelative ma che non è mai stata dimostrata alle basse dosi e ai bassi ratei di dose. E' infatti da anni in corso un ampio dibattito circa la validità del modello LNT e l'opportunità di integrarlo o meno con considerazioni radiobiologiche legate alla risposta adattativa e agli effetti non al bersaglio, operazione peraltro molto difficile allo stato delle conoscenze, anche perché uno dei vantaggi del modello LNT è la relativa semplicità di applicazione nelle condizioni espositive dei lavoratori e del pubblico. Tale modello continuerà quindi verosimilmente ad essere seguito per molto tempo. Tuttavia, in termini di sviluppo di *biomarker* alle basse dosi e ai bassi ratei di dose la presenza di risposte non lineari potrebbe essere un ulteriore ostacolo alla loro piena validazione per un utilizzo in situazioni operative.

Conclusioni

In definitiva, i principali step da percorrere ai fini dello sviluppo di bioindicatori dedicati sono i seguenti.

- Identificazione del bioindicatore o della combinazione di bioindicatori rilevanti in termini di valutazione della dose, dell'induzione di effetti e della suscettibilità individuale per esisti sanitari a lungo termine per gli esposti a radiazioni ionizzanti a basse dosi e a bassi ratei di dose in modo protratto.
- Valutazione dell'influenza della qualità della radiazione e dei pattern di irradiazione (a corpo intero oppure localizzati), soprattutto in termini di relazione dose-risposta.
- Individuazione dei *pattern* temporali rilevanti in relazione ai livelli e alle modalità di esposizione.
- Validazione analitica (matrici di interesse, tempi e modalità di prelievo, metodiche di analisi, elaborazione dati etc.).

Potenziali bioindicatori riguardanti lo stress ossidativo e la produzione di radicali liberi relativi alle radiazioni ionizzanti.

Biomarker	*Metodiche di rilevamento, matrici biologiche e intervallo temporale fruibile dopo l'esposizione*	*Sensibilità/intervallo di risposta*	*Specificità e fattori di confondimento*
8-ossi-deossiguanosina extracellulare (prodotta dal danno ossidativo alla base guanina, seguita dal clivaggio del nucleoside). *Biomarker* di esposizione e teoricamente di suscettibilità	HPLC con rivelatore elettrochimico. Principali matrici: sangue intero fresco, cellule mononucleate del sangue periferico fresche, siero fresco e congelato, linee cellulari, saliva, urine. 1-2 h post-irradiazione	1 – 100 mGy; saturazione per dosi tra 0,1 e 1 Gy	Assenza di specificità: prodotta anche dalle altre cause di stress ossidativo
Altri sottoprodotti dell'azione dei ROS a livello delle biomolecole. Teoricamente *biomarker* di esposizione, di effetti persistenti e di suscettibilità	Metodiche chimico-analitiche, biochimiche e biologico-molecolari (inclusa la metabolomica). Teoricamente qualunque tessuto o matrice. Tempi utili variabili in funzione dell'indicatore considerato	Variabili in funzione dell'indicatore considerato, della matrice biologica e delle condizioni	Assenza di specificità: prodotti dall'azione di tutte le cause di stress ossidativo. Potenziali confondenti: età, sesso, stati fisiologici e condizioni patologiche. Necessità di approccio *multimarker*
Indicatori di risposta (enzimatici e non enzimatici) allo stress ossidativo radioindotto. Teoricamente *biomarker* di esposizione, di effetti persistenti e di suscettibilità	Metodiche chimico-analitiche, biochimiche e biologico-molecolari (incluse la trascrittomica e la proteomica per enzimi e proteine). Teoricamente qualunque tessuto o matrice. Tempi utili variabili in funzione dell'indicatore considerato	Variabili in funzione dell'indicatore considerato, della matrice biologica e delle condizioni	Assenza di specificità: prodotti dall'azione di tutte le cause di stress ossidativo. Potenziali confondenti: età, sesso, stati fisiologici e condizioni patologiche. Necessità di approccio *multimarker*
Radicali liberi in matrici biologiche "dure" (osso, smalto dentale, unghie). Teoricamente *Biomarker* di esposizione e di effetti persistenti	Risonanza elettronica (paramagnetica) di spin (ESR o EPR). Frammenti ossei, dello smalto dentale e matrice ungueale (per osso e smalto difficoltà di acquisizione del campione). Anche anni o decenni (osso e smalto), fino al rinnovo della matrice ungueale (unghie)	Variabile a seconda di matrice e condizioni. Anche 100 mGy per lo smalto dentale. Intervallo di risposta esteso anche a molti Gy	Buona specificità. Per lo smalto: possibile confondimento legato allo stato della dentatura e all'esposizione a radiazione UV. Per le unghie: possibile confondimento legato allo stato trofico, allo stress meccanico e all'esposizione a radiazione UV

- Valutazione dell'influenza dei fattori di confondimento e delle coesposizioni.
- Identificazione di valori di *cut-off* o di intervalli di riferimento per la popolazione, stratificati in funzione di variabili quali sesso, età, presenza di condizioni patologiche, stili di vita (abitudine al fumo, alcol, esercizio fisico, dieta), polimorfismi metabolici etc.

Lo sviluppo degli approcci omici e la costante discesa dei costi per la loro applicazione su larga scala potranno consentire, unitamente all'allestimento di indagini epidemiologiche *ad hoc*, percorsi di validazione per quanto riguarda un approccio *multimarker* esteso ai determinanti dello stress ossidativo. L'eventuale disponibilità di protocolli validati per la rilevazione dello stress ossidativo potrà essere abbinata ad altri tipi di test biologico già consolidati nel campo della radiobiologia, della radiopatologia e della radioprotezione (ad esempio quelli inerenti la dosimetria citogenetica) e costituire quindi, se coadiuvata dalla dosimetria fisica e dalla valutazione rigorosa di coesposizioni lavorative ed extralavorative rilevanti, uno strumento potenziato al servizio della sorveglianza medica dei lavoratori radioesposti per fini dosimetrici, di rilevazione di effetto e di identificazione di condizioni di suscettibilità. Inoltre, tali protocolli faciliterebbero probabilmente una valutazione integrata in termini di dose/effetto/suscettibilità anche per quanto riguarda le coesposizioni a radiazioni ionizzanti ed ad altri cancerogeni con meccanismo ROS-mediato, ad esempio nel caso di coesposizione a radon e a cancerogeni polmonari come IPA, asbesto, silice e arsenico. Infine, l'insieme delle considerazioni svolte contribuisce a sottolineare la necessità di un retroterra culturale solido e l'esigenza di un aggiornamento professionale il più possibile approfondito e multidisciplinare per il medico competente/autorizzato, dato che:

- nella sorveglianza dei radioesposti, e quindi anche nella formulazione del giudizio di idoneità, è fondamentale considerare l'insieme delle esposizioni lavo-

rative a rischio e le loro eventuali interazioni, nonché la modulazione del rischio radiogeno da parte delle esposizioni connesse agli stili di vita,

- l'adempimento degli obblighi di formazione e informazione del lavoratore deve essere sempre più improntato ad un'ottica di promozione della salute.

Riferimenti

1) Associazione Italiana di Radioprotezione medica. Linee guida AIRM: sorveglianza medica dei lavoratori esposti a radiazioni ionizzanti. IPSOA, 2013.
2) Direttiva 2013/59/EURATOM del Consiglio del 5 dicembre 2013. Norme fondamentali di sicurezza relative alla protezione contro i pericoli derivanti dall'esposizione alle radiazioni ionizzanti, abroga le direttive 89/618/Euratom, 90/641/Euratom, 96/29/Euratom, 97/43/Euratom e 2003/122/Euratom. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea L 13/1 del 17 gennaio 2014.
3) Grandi C. Stress ossidativo e lavoratori radioesposti: considerazioni in merito alla messa a punto di bioindicatori di dose/effetto/suscettibilità con particolare riferimento alle basse dosi e ai bassi ratei di dose. Parte prima. Aggiornamenti di radioprotezione 2015 (giugno) n. 46: 13-30.
4) Grandi C. Stress ossidativo e lavoratori radioesposti: considerazioni in merito alla messa a punto di bioindicatori di dose/effetto/suscettibilità con particolare riferimento alle basse dosi e ai bassi ratei di dose. Parte seconda. Aggiornamenti di radioprotezione 2015 (giugno) n. 46: 31-43.
5) International Commission on Radiological Protection. The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 103. Ann. ICRP 37 (2-4), 2007.
6) Pernot E., Hall J., Baatout S., Benotmane M.A., Blanchardon E., Bouffler S., El Saghire H., Gomolka M., Guertler A., Harms-Ringdahl M., Jeggo P., Kreuzer M., Laurier D., Lindholm C., Mkacher R., Quintens R., Rothkamm K., Sabatier L., Tapio S., de Vathaire F., Cardis E. Ionizing radiation biomarkers for potential use in epidemiological studies. Mutat. Res. 2012; 751: 258-286.

EFFETTI NON-TARGETED: COSA CAMBIA IN RADIOPROTEZIONE

Anna Giovanetti
Divisione Tecnologie e Metodologie per la Salvaguardia della Salute
ENEA CR Casaccia, Roma

e-mail: anna.giovanetti@enea.it

Sommario
Da più di venti anni è stato stabilito, nel campo della radiobiologia delle basse dosi, un nuovo paradigma che integra la teoria del "single hit", stabilendo che gli effetti delle radiazioni non sono limitati alle cellule colpite direttamente, ma possono coinvolgere anche cellule in prossimità (effetto bystander) o discendenti (instabilità genomica) da quelle irraggiate. Le basse dosi possono anche proteggere contro esposizioni a dosi più alte (dose adattativa), verosimilmente stimolando gli enzimi di riparo, le difese antiossidanti e il sistema immune. Nonostante l'esistenza degli effetti non targeted (NT) sia adesso generalmente accettata, non c'è accordo sui meccanismi coinvolti e sulle implicazioni nel campo della biologia delle radiazioni e della radioprotezione. Nel campo della radioprotezione il verificarsi di effetti NT ha aperto una discussione sulla validità del modello LNT (Linear No-Threshold) nel range delle basse dosi. Per l'Accademia delle Scienze francese alla luce dell'esistenza della dose adattativa è opportuno introdurre un livello di soglia, mentre altre organizzazioni internazionali come l'ICRP, reputano opportuno mantenere il modello LNT. Il sistema attuale, infatti, ha il vantaggio di essere relativamente semplice, quantitativo e di coprire una vasta gamma di scenari di esposizione e tipi di radiazioni; inoltre si basa su una serie di ipotesi che sono ritenute accettabili ai fini della pianificazione di interventi in campo radioprotezionistico. L'attuale modello però deve essere sempre confrontato con le nuove scoperte in radiobiologia ed epidemiologia. Dal punto di vista sociale, tutti i cambiamenti introdotti devono apportare un vantaggio per la protezione o la semplificazione del sistema.

L'IPOTESI LNT

Fino a 10-20 anni fa gli effetti deleteri delle radiazioni come mutazioni e carcinogenesi, erano attribuiti esclusivamente a un danno diretto sul DNA nucleare, causato dall'assorbimento dell'energia della radiazione. In particolare, secondo la teoria del single hit, una singola interazione è sufficiente per dare origine alla progressione tumorale.

Basandosi sulla teoria del single hit e sui dati epidemiologici raccolti principalmente sulle popolazioni giapponesi sopravvissute alle bombe atomiche, nel 1958 UNSCEAR ha stabilito che la relazione tra la dose assorbita e la probabilità di sviluppare tumori è di tipo lineare senza soglia (LNT) escludendo quindi la possibilità di un'esposizione priva di rischio (Calabrese 2013).

L'ipotesi LNT stabilisce che:

- Qualsiasi quantità di radiazioni può comportare un aumento del rischio di causare cancro ed effetti ereditari;
- Il rischio è direttamente proporzionale alla dose, e senza soglia;
- Le altre variabili non incidono sugli effetti.

L'ipotesi LNT, alla base dei principi e delle pratiche in radioprotezione, non tiene conto delle differenze qualitative tra i tipi di radiazione e del rateo di dose sugli effetti e neanche dei fattori che modificano il rischio come la radio-sensibilità individuale (età, sistema immunitario, gli enzimi di riparazione del DNA ...) e gli effetti sinergici o antagonistici causati dall'esposizione ad altri agenti.

A causa della mancanza di metodi in grado di analizzare danni a livello sub-cellulare e molecolare gli effetti delle basse dosi sono stati desunti per estrapolazione da quelli osservati per le alte dosi. Negli ultimi anni la messa a punto di metodi sperimentali ed epidemiologici più sensibili e specifici ha permesso di distinguere gli effetti indotti specificatamente dalle basse dosi. Per esempio l'applicazione di nuovi metodi statistici sui dati riguardanti la mortalità per tumore sulla popolazione giapponese esposta alla radiazione ha mostrato un danno indotto nel range 0-20 mSv, molto maggiore del previsto e in contrasto con il modello lineare (Dropkin, 2007).

Alle basse e bassissime dosi sono state osservate risposte cellulari differenti da quelle alle dosi più alte. Queste ultime provocano danni al DNA e morte cellulare o impediscono il normale funzionamento, le basse dosi

hanno invece attivano pathways cellulari e la produzione di segnali tissutali che modificano l'effetto delle radiazioni: danno indiretto o non-targeted, non presenti ad alte dosi.

EFFETTI INDIRETTI

Già negli anni '50 era stato osservato che le radiazioni ionizzanti potevano determinare effetti su cellule non direttamente irradiate, il midollo osseo di bambini sottoposti a radiazione a livello della milza come trattamento per la leucemia granulocitica cronica presentava alterazioni riconducibili a radiazioni, in assenza di esposizione diretta, inoltre il plasma prelevato da pazienti sottoposti a radioterapia presentava attività clastogena (effetto abscopale) (Goh and Sumner, 1968).
Le basse dosi sono state dimostrate indurre risposte apparentemente contrastanti dovuti soprattutto alla comunicazione cellulare come l'effetto bystander e la dose adattativa. L'effetto bystander si riferisce alle risposte biologiche osservate in cellule non irraggiate direttamente ma situate vicino a cellule irradiate, nella risposta adattativa una cellula precedentemente esposta ad una bassa dose di radiazione, presenta una radioresistenza maggiore nei confronti di un ulteriore irraggiamento (Mothersill and Seymour, 2006).
Il modello LNT potrebbe dunque essere troppo conservativo nel caso della risposta adattativa o sottostimare il rischio nei casi in cui il numero delle cellule danneggiate è maggiore del numero delle cellule colpite.

Effetto bystander (BE)

Numerosi esperimenti evidenziano che le radiazioni ionizzanti sono in grado di determinare importanti effetti biologici quali la riduzione della sopravvivenza cellulare, alterazioni citogenetiche, mutazioni genetiche, induzione di apoptosi etc., anche su cellule non direttamente irraggiate ma in contatto con le irraggiate (Nagasaka and Little, 1992). Questo fenomeno è detto effetto bystander. Successivamente sono stati realizzati numerosi esperimenti in vitro, per capire i meccanismi biologici alla base di questo fenomeno biologico. Gli esperimenti sono essenzialmente di tre tipi: trattamento di cellule con il terreno di cellule irraggiate, irraggiamento di una parte limitata di cellule con basse dosi di particelle alfa e irraggiamento di una parte limitata di cellule con micro fasci di radiazione (Nagasawa and Little, 1992).
L'insieme dei risultati sperimentali indica che l'effetto bystander è mediato dalla diffusione di molecole rilasciate dalle cellule irraggiate alle cellule non irraggiate, dove si legano a recettori citoplasmatici e/o di membrana. La diffusione di questi fattori avviene attraverso il mezzo di coltura o tramite le gap junctions. La diffusione, dei fattori rilasciati, attraverso il mezzo è stata confermata attraverso esperimenti conil terreno delle cellule irraggiate; invece la comunicazione attraverso le comunicazioni cellulari è supportata dall'inibizione dell'effetto bystander registrata da esperimenti in cui le cellule sono state pretrattate con inibitori delle gap junctions . I meccanismi cellulari alla base del BE non sono ancora del tutto chiariti, tra i mediatori sono state indicate alcune citochine, i radicali liberi dell'ossigeno, ROS, e dell'azoto, RNS (Klammer et al 2015).
L'effetto riscontrato sulle cellule bystander può manifestarsi in diversi modi: riduzione della sopravvivenza/clonogenicità, aumento della trasformazione cellulare, induzione dell'apoptosi, aumento della produzione di ROS e RNS, aumento dello scambio di cromatidi fratelli, aumento della frequenza di micronuclei, aumento dell'instabilità genomica.
Come anche gli altri effetti indiretti, l'effetto bystander non aumenta con il crescere della dose, il suo contributo relativo è quindi maggiore nel range delle basse dosi, ovvero il livello delle esposizioni diagnostiche, occupazionali e ambientali.

Dose adattativa (AR)

L'AR consiste nell'aumentata resistenza alle radiazioni che cellule pre-irraggiate con basse dosi possono presentare se esposte successivamente a dosi più elevate. Questo fenomeno è stato descritto sia in vitro che in vivo in relazione non solo alla sopravvivenza cellulare ma anche ad esiti quali aberrazioni cromosomiche e mutazioni geniche. Per quanto riguarda le radiazioni ionizzanti, le dosi di pre-esposizione affinchè si abbia una risposta adattativa sono nell'ordine di 50-200 mGy (Feinendegen, 1999). I meccanismi coinvolti nella risposta adattativa non sono stati completamente chiariti, ma si pensa siano legati all'induzione di sistemi enzimatici antiossidanti, attivazione meccanismi di riparo del DNA, attivazione del sistema immune. Gli studi realizzati finora hanno mostrato che i meccanismi cellulari alla base della risposta adattativa sono simili a quelli coinvolti nell'effetto bystander, secondo alcuni autori al di sotto di una soglia, che dipende dal genotipo e dall'ambiente cellulare, le radiazioni stimolano i sistemi di riparo e le difese antiossidanti, al di sopra della soglia la cellula non è in grado di ristabilire l'equilibrio redox e i ROS attaccano le macromolecole biologiche. (Mothersill and Seymour, 2004).

Instabilità genomica (GI)

La GI indotta da radiazioni si manifesta con danno genetico nelle cellule discendenti dalle cellule irraggiate. Esperimenti su colture cellulari hanno evidenziato diverse manifestazioni dell'instabilità genomica, tra cui: aberrazioni cromosomiche, morte cellulare indotta e mutazioni geniche. Per alcuni ricercatori l'instabilità genomica consiste nell'aumento della frequenza delle mutazioni spontanee. Diversi studi hanno evidenziato che il meccanismo dell'instabilità genomica indotta da radiazioni, è probabilmente epigenetico (informazioni che vengono trasmesse alla progenie, ma che non sono direttamente attribuibili alla sequenza del DNA (Aypar

et al 2010). Le basi biologiche della GI radio-indotta non sono state ancora completamente chiarite. Alcuni dati sperimentali suggeriscono il coinvolgimento dello stress ossidativo e di un alterato stato infiammatorio in associazione con l'incremento di apoptosi e necrosi (Lorimore and Wright, 2003). Nella progenie di una singola cellula irraggiata ci si aspetterebbe di trovare le stesse mutazioni genetiche della cellula madre (trasmissione clonale). Nell'instabilità genomica invece è stata dimostrata la presenza di aberrazioni cromosomiche e mutazioni non-clonali nella progenie delle cellule irraggiate che possono presentare anche un tasso maggiore di morte e la perdita del potenziale riproduttivo che persiste a tempo indeterminato in linee cellulari stabilizzate. Questo meccanismo epigenetico può essere indotto dall'aumento intracellulare di ROS (Szumiel et al 2015).

LO STRESS OSSIDATIVO

Nonostante i meccanismi cellulari non siano stati completamente chiariti, lo stress ossidativo è stato dimostrato avere un ruolo chiave sugli effetti diretti e indiretti indotti dalle radiazioni ionizzanti. Lo stress ossidativo è dovuto allo sbilanciamento dell'equilibrio tra pro-ossidanti e antiossidanti, a favore dei pro-ossidanti con il conseguente accumulo di radicali liberi. Questi ultimi sono specie chimiche altamente instabili a causa della presenza nella loro struttura di uno o più elettroni spaiati, e tendono a raggiungere uno stato più stabile accoppiandosi con altre molecole o atomi, "rubando" loro atomi di idrogeno o interagendo con altre specie radicaliche attraverso reazioni di ossido-riduzione. Nel corso di questo tipo di reazione si assiste ad un trasferimento di elettroni tra i composti che partecipano alla reazione, in cui una specie perde elettroni (processo di ossidazione) a vantaggio di un'altra che li acquista (processo di riduzione): la molecola che perde elettroni è l'agente riducente, mentre quella che li guadagna è l'ossidante innescando una reazione a catena, in cui un radicale libero genera un altro radicale libero, fino a quando due radicali si incontrano fermando la cascata di reazioni. Dal punto di vista chimico, i radicali liberi costituiscono un'ampia famiglia di composti che per semplificare possono essere suddivisi in due principali categorie: i ROS (Reactive oxygen Species), che sono specie reattive contenenti ossigeno e i RNS (Reactive Nitrogen Species) che comprendono le specie radicaliche. I ROS e le altre specie radicaliche reattive vengono prodotti dalle cellule stesse durante i normali processi fisiologici, o possono avere origine esogena. All'interno dell'organismo sono normalmente rilasciati come sottoprodotti metabolici della respirazione aerobica, di alcuni processi enzimatici e di reazioni immunitarie, mentre tra i principali fattori esterni che portano alla formazione di radicali liberi ci sono inquinamento atmosferico, radiazioni ionizzanti, agenti chimici e stress. In condizioni fisiologiche i sistemi viventi possiedono sistemi di difesa endogeni che proteggono le biomolecole strutturali e funzionali dall'attacco dei radicali liberi. Tali sistemi di difesa, che possono essere di tipo enzimatico come il glutatione, la superossido dismutasi, e la catalasi e non enzimatico come molecole antiossidanti e vitamine assunte con la dieta, reagiscono con le specie radicaliche prima che queste possano attaccare le strutture biologiche, diminuendo il potenziale dannoso. In assenza di queste barriere antiossidanti, i radicali liberi reagiscono rapidamente con il DNA, o con i lipidi e le proteine, causando danni cellulari di grave entità e perfino la morte delle cellule stesse.

Un concetto importante nella valutazione del rischio indotto dall'esposizione a basse dosi di radiazioni ionizzanti, è legato alle analogie esistenti fra danno al DNA indotto da radiazione, che produce anche radicali liberi, e danno endogeno dovuto alla generazione di ROS durante il normale metabolismo cellulare. Lo stress ossidativo può indurre risposte cellulari molto diverse che vanno dall'incremento della proliferazione all'arresto del ciclo cellulare fino all'induzione dello stimolo apoptotico o della necrosi. La risposta dipende dalla linea cellulare e dalla dose di stress indotto (Martindale e Holbrook, 2002).

COSA CAMBIA NELLA STIMA DEL RISCHIO

La nostra percezione degli effetti delle alle basse dosi di radiazioni ionizzanti è cambiata radicalmente con le scoperte del BE, AR e GI. Tuttavia i meccanismi della risposta cellulare e le interrelazioni tra questi processi hanno bisogno di essere capiti meglio prima che questi siano incorporati nella valutazione del rischio.

Allo stato attuale sono in discussione ipotesi contrapposte sui potenziali rischi delle radiazioni nel range delle basse dosi:

- Non vi è alcuna dose di radiazione che può essere considerata completamente sicura e l'uso di radiazioni deve sempre essere determinato sulla base del rapporto rischi benefici (modello LNT);
- A causa di BE e GI il rischio delle basse dosi è superiore a quello previsto dal modello LNT;
- I rischi per la salute delle dosi inferiori a 0,1 Gy non sono misurabili e possono anche essere inesistenti (esistenza di una soglia);
- Data l''esistenza della AR le basse dosi possono protettive contro l'esposizione a fattori di stress ambientali.

Inoltre l'esistenza di una trasmissione orizzontale (BE e AR) e verticale (GI) del danno ha messo in dubbio la teoria del "single hit" e quindi la predizione del rischio di tumore calcolata contando le rotture cromosomiche, sta emergendo invece l'ipotesi che le basse dosi inducano un cambiamento epigenetico che permette alle cellule instabili di proliferare.

La discussione sugli effetti delle radiazioni nel range

delle basse dosi è molto accesa a causa del loro enorme impatto sulla salute delle generazioni attuali e future e delle loro implicazioni pratiche, soprattutto in ambito occupazionale e medico.

L'Accademia Francese delle Scienze e l'Accademia Nazionale di Medicina, dopo aver analizzati i risultati e la letteratura sull'argomento, concludono che per le basse dosi l'ipotesi LNT non può più essere considerata valida (Tubiana 2005). Infatti nel 1958 i sistemi di difesa antiossidante e di riparo del DNA non erano ancora conosciuti. La proporzionalità tra dose ed effetti cancerogeni è plausibile solo se l'efficacia dei meccanismi di difesa rimane costante indipendentemente dalla dose mentre molti studi hanno dimostrato che a basse dosi le difese funzionano meglio; gli studi epidemiologici non sono stati in grado di rilevare un aumento significativo dell'incidenza di cancro per dosi <100 mSv e quindi l'utilizzazione del modello LNT per dosi <20 mSv non è giustificato.

Anche la commissione Biological Effects of Ionizing Radiation BEIR-VII (2006) ha esaminato la letteratura sui rischi da esposizione a radiazioni sia naturali sia prodotte dall'uomo, a dosi <100 mSv, concludendo che pur essendoci evidenze che alle basse i meccanismi di difesa sono più efficienti non esistono elementi sufficienti per sostituire il modello LNT. L'attuale sistema di radioprotezione ha il vantaggio di essere relativamente semplice, quantitativo e di coprir una vasta gamma di scenari di esposizione e tipi di radiazione. Si basa su una serie di ipotesi e approssimazioni che sono ritenute ancora valide per le applicazioni in radioprotezione.

Queste ipotesi devono essere confrontate con i nuovi dati in radiobiologia ed epidemiologia.

Dal punto di vista sociale ogni cambiamento introdotto deve migliorare la protezione e semplificarne l'applicazione.

Riferimenti

1) Aypar U, Morgan WF, Baulch JE. Radiation-induced genomic instability: are epigenetic mechanisms the missing link? Int J Radiat Biol. 2011 Feb;87(2):179-91. doi: 10.3109/09553002.2010.522686. Epub 2010 Nov 2. Review.

2) BEIR VII Phase 2 Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation: Washington, DC: The National Academies Press, 2006. doi:10.17226/11340.

3) Calabrese EJ. Origin of the linearity no threshold (LNT) dose-response concept. Arch Toxicol. 2013 Jul 26. [Epub ahead of print].

4) Dropkin G Low dose radiation and cancer in A-bomb survivors: latency and non-linear dose-response in the 1950-90 mortality cohort. Environ Health. 2007 Jan 18;6:1.

5) Feinendegen LE. The role of adaptive responses following exposure to ionizing radiation. Hum Exp Toxicol. 1999 Jul;18(7):426-32. Review.

6) Goh K, Sumner H. Breaks in normal human chromosomes: are they induced by a transferable substance in the plasma of persons exposed to total-body irradiation? Radiat Res. 1968 Jul;35(1):171-81.

7) Klammer H, Mladenov E, Li F, Iliakis G. Bystander effects as manifestation of intercellular communication of DNA damage and of the cellular oxidative status. Cancer Lett. 2015 Jan 1;356(1):58-71. doi: 10.1016/j.canlet.-2013.12.017. Epub 2013 Dec 24. Review.

8) Lorimore SA, Wright EG. Radiation-induced genomic instability and bystander effects: related inflammatory-type responses to radiation-induced stress and injury? A review. Int J Radiat Biol. 2003 Jan;79(1):15-25. Review.

9) Mothersill C, Seymour C. Radiation-induced bystander effects: evidence for an adaptive response to low dose exposures? Dose Response. 2006 Aug 25;4(4):283-90.

10) Mothersill C1, Seymour C. Radiation-induced bystander effects and adaptive responses--the Yin and Yang of low dose radiobiology? Mutat Res. 2004 Dec 2;568(1):121-8.

11) Nagasawa H, Little JB. Bystander effect for chromosomal aberrations induced in wild-type and repair deficient CHO cells by low fluences of alpha particles. Mutat Res. 2002 Oct 31;508(1-2):121-9.

12) Szumiel I. Ionizing radiation-induced oxidative stress, epigenetic changes and genomic instability: the pivotal role of mitochondria. Int J Radiat Biol. 2015 Jan;91(1):1-12. doi: 10.3109/09553002.2014.934929. Review.

13) Tubiana M1 Dose-effect relationship and estimation of the carcinogenic effects of low doses of ionizing radiation: the joint report of the Académie des Sciences (Paris) and of the Académie Nationale de Médecine. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2005 Oct 1;63(2):317-9.