

Università degli studi di Napoli “Federico II”

Scuola Politecnica e delle Scienze di Base

Area Didattica di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali

Dipartimento di Fisica “Ettore Pancini”



Laurea triennale in Fisica

**Validazione di un software per la ricerca automatizzata
di biomarcatori del danno radioindotti**

Relatore:

Prof. Lorenzo Manti

Candidato:

Martina Isernia

Matricola: N85000855

Anno Accademico 2017/2018

Indice

Introduzione	1
1 Biodosimetria e principali saggi	3
1.1 Aberrazioni cromosomiche	4
1.2 Tecniche di analisi delle aberrazioni cromosomiche	7
1.2.1 Ibridizzazione In Situ con Fluorescenza (FISH)	7
1.2.2 Saggio del dicentrico	9
1.3 Curve dose-risposta	10
2 Procedura sperimentale	12
2.1 Descrizione breve e finalità dell'esperimento	12
2.2 Preparazione dei campioni, irraggiamento e trattamento post-irraggiamento	13
2.2.1 La coltura cellulare	13
2.2.2 Irraggiamento	13
2.2.3 Raccolta delle metafasi (<i>harvest</i>)	13
2.2.4 Colorazione	14
2.3 Il software Metafer v. 4	14
2.3.1 Il modulo Msearch	15
2.3.2 Il modulo DCScore	16
3 Risultati	19
3.1 Metafasi analizzate dal modulo DCScore	19
3.1.1 Metafasi accettate	20
3.1.2 Metafasi scartate	21
3.2 Scoring dei cromosomi dicentrici	22
3.2.1 Confronto tra procedura automatica e manuale	22
3.2.2 Sensibilità e potere predittivo del modulo	25
Conclusioni	27
Bibliografia	29

Introduzione

Lo sviluppo tecnologico della nostra società procede di pari passo con una serie di possibili rischi che potrebbero recare danno alla popolazione. Ciò è esemplificato dall'impiego della radiazione ionizzante in svariati campi. La cronaca degli ultimi decenni ha visto verificarsi incidenti presso centrali nucleari a causa dei quali anche individui non professionalmente esposti sono stati interessati da dosi di radiazione non trascurabili. Similmente, la possibilità di attacchi terroristici su larga scala che impieghino ordigni esplosivi convenzionali per disperdere nell'atmosfera materiali radioattivi (*dirty bombs*) è tuttora considerata una minaccia realistica dalle agenzie di sicurezza di molti Paesi. Infine, pazienti di radioterapia potrebbero incorrere in sovraesposizioni per errati piani di trattamento. In tutti questi casi, le persone esposte non avrebbero con sé dosimetri in grado di misurare e registrare la dose realmente assorbita: pertanto, rappresenta un interesse primario riuscire ad analizzare in maniera efficiente e veloce tutti gli individui che ritengono di essere stati esposti, in maniera tale da poterli indirizzare verso le cure mediche adeguate. Una valida alternativa alla mancanza di una dosimetria fisica è rappresentata dalla cosiddetta dosimetria biologica.

È noto che la radiazione ionizzante provoca dei danni al DNA ed il tipo e la distribuzione spaziale delle lesioni riportate dipende dalla qualità ed intensità della radiazione. In particolare, la quantità di danno radioindotto può essere tipicamente espressa come una funzione crescente della dose assorbita. La biodosimetria sfrutta l'esistenza di tali curve dose-effetto permettendo di risalire retrospettivamente alla dose assorbita la cui stima è possibile misurando specifici indicatori di danno.

Tra i danni radioindotti al DNA più comunemente usati in biodosimetria per la relativa facilità di individuazione e per l'estesa caratterizzazione che ne è stata fatta negli anni ci sono le cosiddette aberrazioni cromosomiche ovvero le anomalie in numero e/o struttura dei cromosomi. La radiazione ionizzante infatti è in grado di provocare una o più rotture della doppia elica del DNA (double-strand breaks o DSB), per il cui riparo esistono diversi meccanismi intracellulari. Errori in tali processi risultano in alterazioni nella struttura originaria che possono essere visualizzati quando il DNA si compatta sotto forma di cromosomi durante la fase del ciclo che prelude alla divisione cellulare, ossia la metafase, e che si presentano come riarrangimenti di "pezzi" di

cromosomi.

Di tutte le possibili configurazioni cui le aberrazioni cromosomiche possono dare origine, soffermeremo il nostro interesse sul dicentrico, ovvero un cromosoma dotato di due centromeri. Si è scelto il dicentrico perché storicamente ha rappresentato il primo biomarcatore di utilità in biodosimetria essendo facilmente individuabile al microscopio tramite un'opportuna colorazione in quanto dotato di una struttura caratteristica e richiedendo una metodica relativamente semplice ed economica.

Il saggio del dicentrico (DCA o DiCentric Assay), però, nonostante sia considerato il gold standard in ambito biodosimetrico, presenta delle tempistiche piuttosto lente: per analizzare 50 metafasi manualmente si impiegano mediamente 60 minuti [1]. Per avere una stima che sia statisticamente rilevante è necessario analizzare almeno 500 metafasi [2]. L'esigenza di avere risposte su segmenti ampi di popolazione in tempi rapidi ha spinto lo sviluppo dell'automazione nel campo della biodosimetria, e, più in generale, nei software dedicati al riconoscimento ed alla quantificazione di marcatori di danno radioindotto. Il Laboratorio di Biofisica delle Radiazioni del Dipartimento di Fisica "E. Pancini" dell'Università di Napoli Federico II ha una pregressa esperienza nel campo della ricerca in questo ambito e si è da tempo dotato di una workstation dedicata alla rivelazione e quantificazione di diversi indicatori di danno citogenetico radioindotto. Recentemente, ha infatti acquisito anche uno specifico software dedicato alla rivelazione dei dicentrici. Tali software sono prodotti sulla base di generiche indicazioni desunte dalla letteratura esistente e non possono essere utilizzati tout court per una qualsiasi linea cellulare e/o metodica sperimentale.

Questo lavoro di tesi triennale è stato quindi volto alla verifica dell'accuratezza nella capacità di tale software nel rivelare e conteggiare i dicentrici presenti in cellule irraggiate in vitro con raggi X.

Il software adoperato, Metafer (v. 4, Metasystems, Germania), permette di effettuare una scansione di un vetrino in pochi minuti: le posizioni delle metafasi riconosciute vengono memorizzate e quindi si procede ad una scansione ad alto ingrandimento durante la quale il programma enumera i dicentrici trovati. La bontà del programma dipende dal numero di falsi positivi (dicentrici riconosciuti erroneamente come tali) e falsi negativi (dicentrici non rilevati) registrati.

Nel primo capitolo sono descritte le principali aberrazioni cromosomiche e le tecniche finora sviluppate atte alla loro individuazione. Inoltre, si è discusso dell'andamento delle curve dose-risposta.

Nel secondo capitolo è esposta la procedura sperimentale adoperata, quindi com'è stata preparata la coltura cellulare da irraggiare e lo strumento di cui ci si è avvalsi per analizzarla, il software Metafer v. 4.

Nel terzo capitolo infine sono presentati i risultati forniti dal software confrontandoli con quelli ottenuti da un riesame dei piani metafasici svolto dall'operatore.

Capitolo 1

Biodosimetria e principali saggi

La biodosimetria è una tecnica biofisica che si prefigge di stimare la dose di radiazione assorbita da un individuo valutando specifici effetti biologici radioindotti e sfruttando il fatto che esiste una relazione funzionale tra questi e la dose (curva dose-effetto).

Esiste una differenza tra dose fisicamente assorbita e dose biologicamente rilevante: non tutta l'energia depositata in un volume (ad esempio una cellula) produce un effetto biologicamente significativo in quanto una frazione di tale energia può essere trasportata al di fuori del volume di interesse (ad esempio da elettroni secondari veloci) mentre il danno inizialmente indotto all'interno della parte "sensibile" della cellula può essere rimosso enzimaticamente dai meccanismi di riparo intracellulari. Il danno residuo è quindi una misura della dose biologicamente rilevante.

Secondo il paradigma dell'azione biologica della radiazione ionizzante, il DNA è il bersaglio per eccellenza in quanto unica macromolecola depositaria dell'informazione genetica. Esistono molteplici tipi di danno al DNA radioindotto: alterazioni delle basi, formazione di cross-link, rotture del singolo e del doppio filamento, e diverse tecniche per rivelarli e quantificarli.

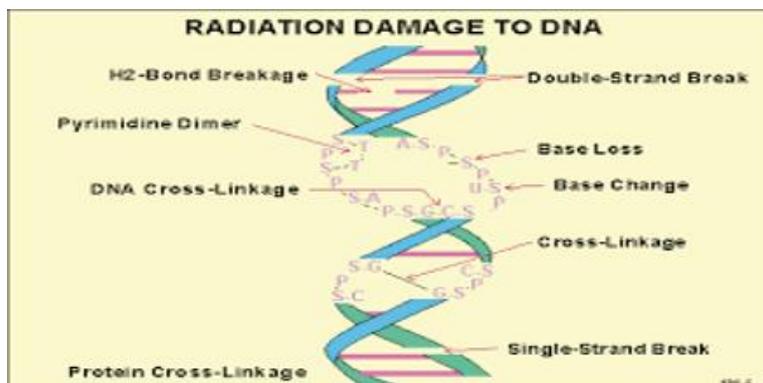


Figura 1.1: Possibili effetti della radiazione sul DNA.

Poiché è possibile determinare curve dose-effetto per la maggior parte di tali lesioni, una strategia conveniente per stimare la dose biologicamente efficace, essa stessa legata alla dose fisica assorbita, consiste nel misurare la frequenza di opportuni biomarcatori al variare della dose. La curva dose-effetto così costruita rappresenta una sorta di curva di calibrazione, rispetto alla quale la frequenza misurata di danno da campioni esposti ad una dose incognita fornisce quindi una stima della dose che lo ha causato. È questo, in estrema sintesi, il rationale che sottende la tecnica radiobiofisica della biodosimetria.

In biodosimetria esistono numerose tecniche, ognuna delle quali si basa sullo studio di uno specifico biomarcatore. Nell'ambito della nostra trattazione ci occuperemo di analizzare le aberrazioni cromosomiche come biomarcatori di interesse, con focus su un tipo specifico di aberrazione, il dicentrico.

1.1 Aberrazioni cromosomiche

Una radiazione ionizzante è in grado di provocare due o più rotture del doppio filamento. I meccanismi di riparo intervengono per ripristinare l'integrità del DNA. Tuttavia, errori nei processi di legame delle porzioni "rotte" possono verificarsi e diventano visualizzabili quando la cellula si trova in metafase ossia quando il DNA si compatta e suddivide in cromosomi: si definiscono quindi aberrazioni cromosomiche strutturali le alterazioni nella struttura dei singoli cromosomi. Queste possono a loro volta provocare la perdita o alterazione di parte dell'informazione genetica contenuta nella sequenza modificata che possono essere trasmesse alla progenie della cellula che le contiene e poi manifestarsi a tempi successivi all'irraggiamento (effetti tardivi), oppure le aberrazioni cromosomiche possono impedire la divisione cellulare causando la morte della cellula che le contiene (effetti acuti). È chiaro come le aberrazioni trasmissibili siano anche "stabili" ossia durature nel tempo, al contrario di quelle che provocando la morte della cellula alla prima divisione post-irraggiamento vengono eliminate dalla popolazione cellulare esposta e sono pertanto classificate come "instabili". Come è facile intuire, se la ricostruzione retrospettiva della dose tramite biodosimetria si riferisce a presunte esposizioni lontane nel tempo, le aberrazioni utili saranno quelle stabili, mentre le aberrazioni instabili possono essere usate per esposizioni recenti [3].

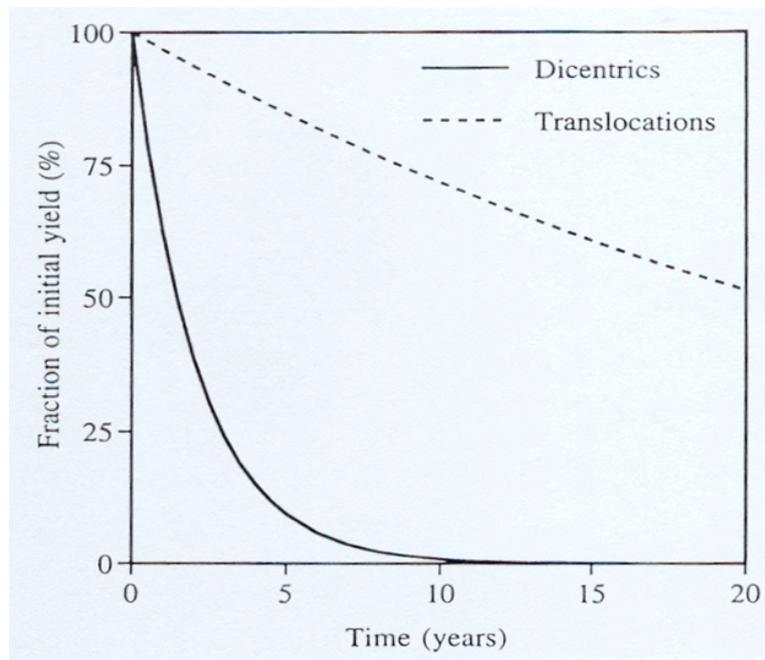


Figura 1.2: Percentuale di dicentrici e traslocazioni in funzione del tempo.

In base al numero di rotture distinguiamo due principali tipi di scambi: semplici e complessi. Uno scambio semplice coinvolge al più due cromosomi e si origina da due rotture, si parla invece di scambio complesso quando il numero di rotture è pari o superiore a tre.

Gli scambi semplici sono a loro volta distinti in due categorie: interscambi quando lo scambio avviene tra due cromosomi distinti, intrascambi quando lo scambio avviene tra cromatidi di uno stesso cromosoma.

I fondamentali scambi semplici sono:

- Le traslocazioni, ovvero quando un frammento acentrico (cioè privo di centromero) di un cromosoma si ricombina con un frammento centrico di un altro cromosoma;
- I dicentrici se la ricombinazione avviene tra due frammenti centrici ed i rispettivi frammenti acentrici come visibile in Fig. 1.3 (a);
- Gli anelli che invece sono delle particolari aberrazioni cromosomiche causate da una rottura su entrambi i bracci di uno stesso cromosoma ed il conseguente ricongiungimento delle estremità. Oltre all'anello si originerà anche un frammento acentrico formatosi per ricombinazione dei due frammenti acentrici come si può osservare in Fig. 1.3 (b).

Le traslocazioni sono un classico esempio di aberrazioni stabili poiché la struttura dei cromosomi anche se invertita è integra e pertanto la cellula madre non riscontrerà problemi nel corso della divisione cellulare.

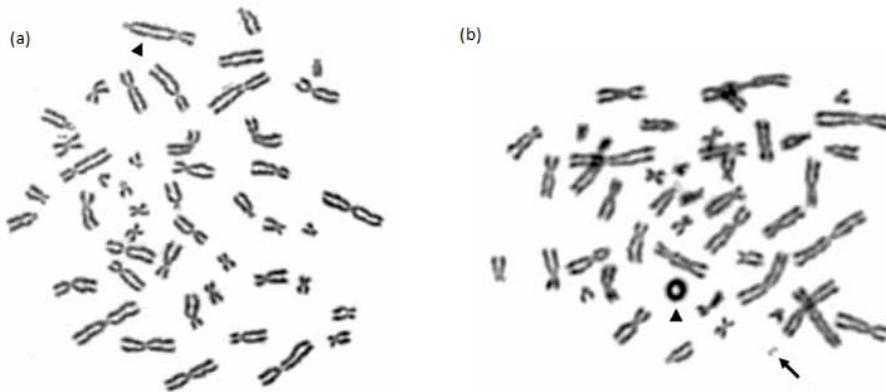


Figura 1.3: In (a) è indicato un dicentrico, facilmente individuabile al microscopio ottico poiché dotato di una caratteristica forma "a caramella". In (b) si può invece osservare un cromosoma ad anello ed il frammento acentrico che si origina insieme ad esso. [2]

Questo significa che anche numerosi anni dopo essere stati esposti ad una radiazione ionizzante si potrebbe ancora osservare la presenza di una traslocazione nel cariotipo.

I dicentrici e gli anelli sono invece aberrazioni instabili in quanto la morfologia del cromosoma viene compromessa e l'alterazione strutturale subita dal cromosoma comporta numerose problematiche durante la fase di divisione cellulare. È infatti noto che il fuso mitotico al momento della divisione si lega al cinetocoro, che è una struttura proteica associata al centromero. Ne consegue che i frammenti acentrici andranno irrimediabilmente perduti durante questa fase del ciclo cellulare in quanto privi di centromero. Nel caso del dicentrico invece ci sono due centromeri appartenenti ad uno stesso cromosoma e a secondo dell'orientazione che questo assume rispetto al fuso mitotico (perpendicolare o parallela) possono verificarsi fenomeni differenti, ma entrambi implicanti una perdita dell'informazione genetica, ed eventualmente la morte della cellula. Quest'ultima ha maggiori probabilità di verificarsi se il dicentrico si dispone parallelamente al fuso mitotico in quanto impedirà la segregazione dei due cromosomi di cui è composto bloccando meccanicamente la divisione cellulare (catastrofe mitotica).

Le aberrazioni instabili dunque possono essere eliminate già alla prima divisione cellulare, ed in generale sono in grado di trasmettersi per pochi cicli cellulari prima che la cellula che li ha ereditati muoia tentando di dividersi. Da ciò si può concludere che è piuttosto improbabile riscontrare la presenza di un dicentrico a seguito di un'esposizione avvenuta molto indietro nel tempo.

1.2 Tecniche di analisi delle aberrazioni cromosomiche

Come accennato sopra, al fine di individuare correttamente le aberrazioni contenute nel cariotipo è necessario che il DNA si trovi sotto forma di cromosomi, dunque in cellule che si trovino nella fase del ciclo cellulare nota come metafase. Questa rappresenta solo una minima frazione della vita media di una cellula umana (la metafase dura 1-2 h sulle circa 24 h di durata del ciclo cellulare). Per tale motivo si adopera un agente chimico di nome demecolcine (commercializzato come colcemid) il cui scopo è quello di bloccare le cellule che già si trovano in metafase e quelle che vi entrano. In questo modo è possibile aumentare il numero di metafasi e quindi di piastre cromosomiche analizzabili. A secondo della linea cellulare che si utilizza vanno ottimizzati i protocolli per quanto concerne la concentrazione di utilizzo di tale sostanza ed il tempo in cui la si lascia agire.

Solitamente, in biodosimetria si analizzano le aberrazioni cromosomiche radioindotte in linfociti del sangue periferico. Il motivo è duplice: la maggior parte di queste cellule non si riproduce per molti anni nel corso della vita di un individuo, ovvero permangono nella fase del ciclo cellulare detta G_0 . Questo significa che anche se esposte ad una radiazione molto indietro nel tempo il loro DNA conserva “memoria” dell’esposizione in quanto il danno indotto al momento dell’esposizione non è stato espresso e quindi ciò le rende il perfetto candidato per un saggio biodosimetrico. È infatti possibile stimolare le cellule a duplicarsi in vitro grazie ad un agente mitogeno, la fitoemoagglutina, in modo tale da poter osservare le metafasi. Inoltre, essendo i linfociti circolanti in tutto il corpo meglio si prestano alla ricostruzione dosimetrica di eventuali esposizioni a corpo intero o nel caso in cui non si sia certi di quale parte del corpo è stata irraggiata.

1.2.1 Ibridizzazione In Situ con Fluorescenza (FISH)

Le traslocazioni sono aberrazioni stabili e simmetriche. La stabilità, come abbiamo evidenziato in precedenza, permette a queste aberrazioni di trasmettersi, in linea di principio, senza difficoltà dalla cellula madre alle cellule figlie e ciò rappresenta un vantaggio nel caso in cui sia passato molto tempo dall’esposizione alla radiazione. La simmetria invece è uno svantaggio per quanto concerne l’individuazione di tali aberrazioni poiché non avendo subito modificazioni a livello morfologico risulta impossibile determinare la presenza di una traslocazione adoperando una colorazione aspecifica del cariotipo come quella mostrata in Fig. 1.3 e che funziona bene per la rivelazione dei dicentrici.

Per ovviare a tale problema è stata ideata la FISH (Fluorescence in Situ Hybridization), una tecnica che permette di rivelare e localizzare la presenza di specifiche sequenze di DNA nei cromosomi tramite l’utilizzo di opportune

sonde a fluorescenza. Le sonde sono costruite in maniera tale da legarsi per complementarità alle coppie di basi contenute in caratteristiche regioni del DNA.

Al fine di individuare le traslocazioni si adoperano delle sonde specifiche, ovvero dotate di omologia per un intero cromosoma. In questo modo è possibile visualizzare senza ambiguità le coppie di cromosomi omologhi.

Un modo di procedere consiste nell' utilizzare due sonde specifiche per due diverse coppie di cromosomi omologhi, ad esempio per i cromosomi 1 e 2, mentre il resto del cariotipo viene colorato tramite una sonda aspecifica. Così facendo si può determinare se è avvenuta una traslocazione tra le coppie 1 e 2 o tra queste e tutte le altre coppie di cromosomi restanti.

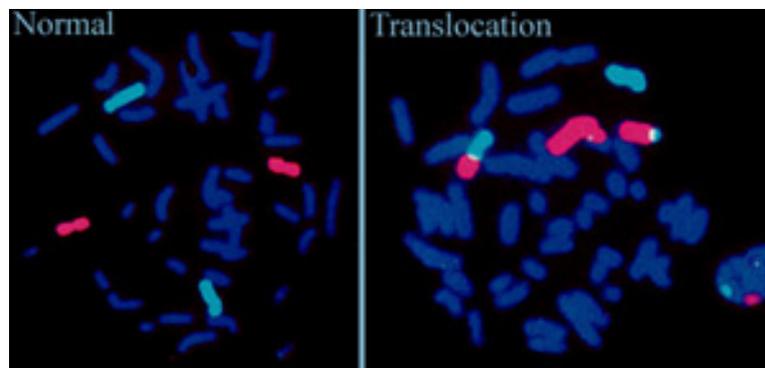


Figura 1.4: Confronto tra un cariotipo normale e di uno dotato di una traslocazione mediante FISH

Attraverso l'utilizzo di sonde fluorescenti si è anche in grado di visualizzare l'intero cariotipo d'interesse, con una tecnica detta mFISH (multicolor FISH). Nonostante si possa associare un singolo fluoroforo soltanto a 5 coppie di cromosomi, è possibile per combinazione di tali fluorofori dare un pattern caratteristico di ibridazione a ciascuna coppia di omologhi. In questo modo possiamo stabilire con accuratezza tra quali coppie di cromosomi è avvenuto uno scambio semplice.

Evidenziando ogni coppia di omologhi possiamo anche determinare in maniera molto accurata gli scambi complessi e determinare tra quali cromosomi avvengono [4].

L'uso limitato di questa tecnica è dovuto al costo piuttosto elevato e alle lunghe tempistiche richieste dalla procedura. È comunque preferibile adoperarla in caso di esposizioni avvenute molto tempo prima dell'analisi.

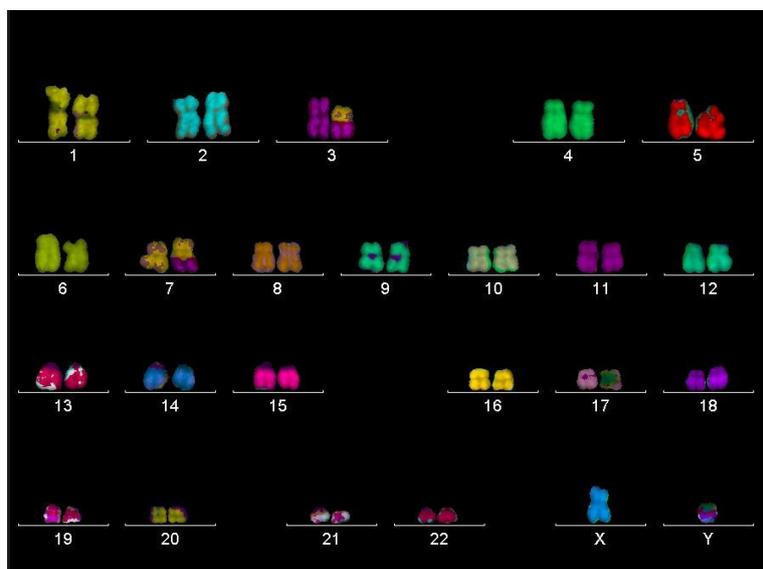


Figura 1.5: Traslocazione avvenuta tra i cromosomi 3 e 7 evidenziata tramite mFISH

1.2.2 Saggio del dicentrico

Il dicentrico è un'aberrazione instabile ed asimmetrica. L'instabilità è dovuta proprio all'asimmetria di tale aberrazione che può provocare problemi alla cellula in fase di duplicazione, pertanto un dicentrico sarà eliminato, se non al primo, dopo pochi cicli cellulari. Si può dunque concludere che un'analisi dei dicentrici è utile se effettuata poco tempo dopo l'esposizione alla radiazione.

Essendo dotati di una forma peculiare, i dicentrici possono essere visualizzati attraverso una semplice colorazione, per esempio quella con Giemsa. Poiché tale tecnica è relativamente economica, richiede un semplice microscopio in campo chiaro ed in generale presenta tempi più brevi di FISH, è stato il saggio che storicamente ha trovato la maggior applicazione in biodosimetria. Inoltre il dicentrico presenta una scarsa incidenza spontanea (circa 0.5-2 per 1000 cellule) ed esistono pochi fattori in grado di provocarne un aumento. Una bassa incidenza spontanea è importante laddove si cerchi di monitorare esposizioni a dosi molto basse. I risultati ottenuti tramite questa tecnica sia in vivo che in vitro presentano una buona corrispondenza [5].

Alcuni studi hanno anche mostrato che tale tecnica fornisce buoni risultati non solo per quanto concerne l'esposizione totale, ma anche per le esposizioni parziali [6].

Nonostante ciò un'analisi di questo tipo presenta delle limitazioni se la dose assorbita è inferiore ai 1 Gy; infatti anche se si tenta di migliorare l'accordo tra le curve di dose-frequenza di dicentrici considerando l'età dei soggetti, non si riesce ugualmente ad ottenere un accordo ottimale [7].

Il saggio del dicentrico è già stato impiegato con successo per monitorare gli individui coinvolti in incidenti su larga scala come quello della centrale nucleare di Fukushima Dai-ichi [8].

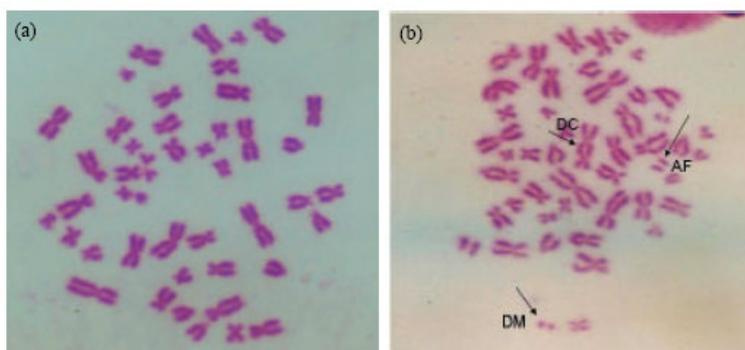


Figura 1.6: In a) si osserva un cariotipo normale mentre in b) un cariotipo che presenta un dicentrico (DC), entrambe le immagini sono state ottenute mediante colorazione Giemsa.

1.3 Curve dose-risposta

L'induzione di danno citogenetico è funzione della dose assorbita. Ciò, come detto, è alla base della biodosimetria. La costruzione di curve dose-risposta in laboratorio è pertanto un passaggio fondamentale. La dipendenza funzionale dell'incidenza di biomarcatori quali i dicentrici è influenzata da diversi fattori fisici, il più importante dei quali è il trasferimento lineare di energia (LET), definito come la quantità di energia trasferita da una radiazione ionizzante ad un materiale per unità di lunghezza lungo la traccia (espresso tipicamente in keV/micron). Esso pertanto caratterizza le particelle cariche e definisce la qualità della radiazione. Si osserva che gli effetti biologici provocati differiscono in base al LET, con la radiazione ad alto LET (dai 20-30 keV/micron in su) mediamente più efficace di quella a basso LET (essenzialmente fotoni) a parità di dose.

Per radiazioni a basso LET si è osservato sperimentalmente che la curva dose-risposta per la frequenza misurata di aberrazioni cromosomiche presenta un andamento lineare-quadratico, del tipo:

$$Y = Y_0 + \alpha D + \beta D^2 \quad (1.1)$$

Dove Y rappresenta la frequenza delle aberrazioni, Y_0 indica un possibile livello di aberrazioni cromosomiche preesistenti (spontanee), D la dose, ed infine i coefficienti α e β sono legati alla qualità della radiazione ed al rate della dose.

Per le radiazioni ad alto LET l'andamento della curva dose-risposta diventa lineare. La pendenza della curva è più ripida per le radiazioni ad alto LET mentre il coefficiente quadratico diminuisce per quelle a basso LET.

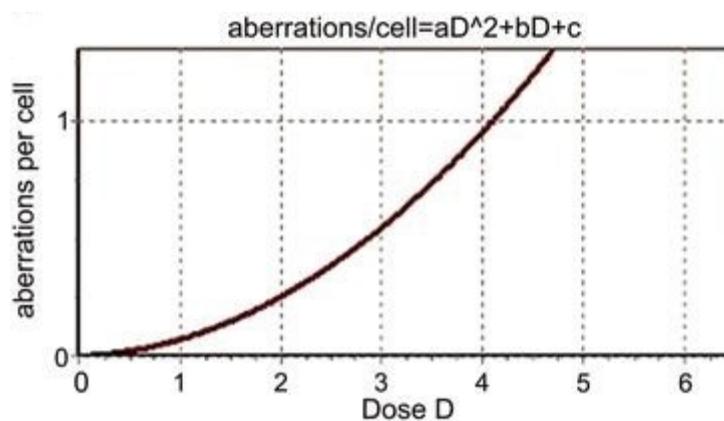


Figura 1.7: Curva dose/risposta per il saggio dei dicentrici ottenuti tramite irraggiamento con raggi X a basso LET[9]

Avere una buona curva di calibrazione sperimentale è indispensabile per riuscire a stimare la dose assorbita da un soggetto. La frequenza di dicentrici per cellula a parità di radiazione è simile per esperimenti effettuati sia in vitro che in vivo, il che rappresenta uno dei motivi fondamentali per cui il saggio dei dicentrici è una delle tecniche ancora più diffusamente adoperate in biodosimetria [5].

Capitolo 2

Procedura sperimentale

2.1 Descrizione breve e finalità dell'esperimento

Lo scopo di questa tesi è validare un modulo del software Metafer 4 (Metasystems, Germania) per la rivelazione ed il conteggio dei dicentrici radioindotti. L'introduzione dell'automazione nella scansione di vetrini per preparati citogenetici è stata favorita dall'esigenza di ricorrere a metodologie più veloci ed efficienti per monitorare la popolazione esposta nel caso in cui si verificasse un incidente su larga scala implicante un rilascio di dose di radiazione ionizzante.

In questi casi, la IAEA (International Atomic Energy Agency) consiglia di effettuare un'analisi manuale di almeno 50 metafasi per evidenziare l'eventuale presenza di dicentrici. Uno studio compiuto su 46 individui coinvolti in un incidente presso Dakar (Senegal) ha però mostrato che se si effettua un confronto dei risultati ottenuti analizzando 50 metafasi rispetto alle 500 necessarie per una statistica più robusta c'è il 50% di errata classificazione della categoria di rischio del soggetto, ovvero per 23 su 46 individui l'analisi di soltanto 50 metafasi ha fornito una sottostima della dose assorbita [10].

Si comprende altresì come non solo le tempistiche ma anche la precisione della stima effettuata sia un prerequisito fondamentale che deve essere verificato nel caso dell'automatizzazione del processo di scoring di un vetrino.

Per poter testare l'affidabilità del software si è dunque proceduto all'irraggiamento con dosi note di un campione cellulare presso il Laboratorio di Biofisica delle radiazioni, che si è negli anni dotato di una workstation atta all'identificazione semi-automatica di vari biomarcatori di danno citogenetico radioindotto, basata appunto sull'impiego della piattaforma Metafer. Nell'ambito di questo lavoro di tesi è stata adoperata la linea cellulare MCF-10 (cellule epiteliali mammarie immortalizzate).

Per l'analisi dei campioni cellulari irraggiati si è adoperato il modulo DCSScore del software Metafer 4 per il conteggio dei dicentrici. Le immagini delle metafasi acquisite dal programma sono poi stati rianalizzati manual-

mente per valutare prima l'efficienza di riconoscimento delle metafasi stesse e poi la presenza di eventuali falsi positivi (FP) o falsi negativi (FN). Le dosi somministrate sono state pari a 2.5 e 5 Gy. Campioni non irraggiati (0 Gy) sono stati usati come controllo.

2.2 Preparazione dei campioni, irraggiamento e trattamento post-irraggiamento

2.2.1 La coltura cellulare

La prima procedura effettuata è stata lo scongelamento della linea cellulare MCF-10, questa infatti era conservata in azoto liquido all'interno di apposite ampolle di plastica. Lo scongelamento deve avvenire in maniera rapida, quindi il contenitore delle cellule viene immerso direttamente in acqua alla temperatura di 37°C. Una volta scongelate, le cellule devono essere centrifugate in modo da rimuovere dal terreno eventuali residui di DMSO (dimetilsolfossido), un agente crioprotettore ma tossico per le cellule se lasciato agire a temperatura ambiente. Le cellule vengono quindi trasferite in appositi supporti per la crescita (tissue culture flasks) mantenute in incubatore alla temperatura di 37°C in un'atmosfera con CO al 5%.

Una volta raggiunto un numero sufficiente per la preparazione dei campioni da essere irraggiati, le cellule sono staccate, contate e diluite trasferendole in altre fiasche preparate ad una densità di 10^5 cellule/fiasca (superficie di crescita pari a 25 cm²) ed irraggiate dopo circa 48 h.

2.2.2 Irraggiamento

Sono state irraggiate 2 fiasche per ciascuna dose utilizzando l'apparecchio radiogeno Stabilipan 2 della Siemens in dotazione ai Laboratori di Biofisica delle Radiazioni, con un rateo di dose di circa 1.3 Gy/min. Le dimensioni delle fiasche consentivano infatti l'irraggiamento simultaneo di due campioni entro un campo in cui la dose è uniforme al 5%.

2.2.3 Raccolta delle metafasi (*harvest*)

I processi di riparazione intracellulare si espletano entro le prime 24 h dall'esposizione. Pertanto, per evidenziare alterazioni radioindotte a livello cromosomico quali i dicentrici, i campioni irraggiati sono stati processati il giorno dopo l'irraggiamento. Poiché il saggio dei dicentrici si basa sull'analisi di queste alterazioni in cellule metafasiche, e dal momento che la metafase è una frazione piuttosto esigua del ciclo cellulare, un problema è rappresentato dall'aver un numero sufficiente di cellule in metafase quando si procede all'estrazione dei cromosomi (raccolta o *harvest*) ed alla preparazione dei vetrini per l'analisi citogenetica. I protocolli classici prevedono l'impiego della

demecolcine (uno dei nomi con cui è commercializzata essendo cui nome Colcemid), una sostanza che impedisce alle cellule che si trovano in metafase di dividersi e che arresta quelle che entrano in questa fase. Da prove preliminari condotte in laboratorio si è visto che per questa linea cellulare la maggiore resa (*yield*) di metafasi si ottiene usando una concentrazione di 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ per 4 h.

Le cellule sono quindi state staccate dal sostrato di crescita e sottoposte alla procedura per l'estrazione cromosomica. Questa prevede il trattamento mediante una soluzione ipotonica di cloruro di potassio che viene lasciata agire per circa 25 min a 37°C. Segue il fissaggio del campione che viene realizzato usando una miscela 3:1 metanolo/ acido acetico glaciale detta Carnoy's per 30 min ponendo le provette contenente i campioni in ghiaccio. A questo punto il preparato è pronto per essere messo su vetrino (squash) adoperando un contagocce. La parte restante del campione è conservato freezer nel caso in cui fosse necessario produrre dei nuovi vetrini.

2.2.4 Colorazione

I vetrini così preparati, lasciati asciugare per almeno 24h, sono sottoposti poi a colorazione mediante un colorante aspecifico detto Giemsa.

La procedura di colorazione prevede l'utilizzo di una coupling jar in cui si sistemano i vetrini cui si aggiunge quindi una quantità di Giemsa in concentrazione 10x tale da ricoprire interamente i vetrini lasciandola agire per 30 min. I vetrini vengono quindi rimossi dalla coupling jar e sciacquati con abbondante acqua distillata. Una volta asciugatisi (circa 24h), i vetrini sono pronti per essere analizzati al microscopio.

2.3 Il software Metafer v. 4

Metafer v. 4 è una piattaforma di scansione che permette numerosissime applicazioni, che vanno dalla microbiologia alle scienze forensi. Oltre alla trasversalità delle sue applicazioni, un punto di forza di tale software risiede nella sua flessibilità; esso infatti è in grado di ottimizzare la procedura di scansione ed acquisizione in base alle tipologie dei campioni da analizzare tramite opportuni classificatori.

Nell'ambito di questo elaborato di tesi ci si è soffermati sulle funzionalità per la diagnostica citogenetica ed in particolare sulle aberrazioni cromosomiche strutturali note come dicentrici.

La piattaforma infatti possiede due moduli ad hoc pensati per questo tipo di saggio: Msearch che permette l'acquisizione delle piastre metafasiche (o piani metafasici) e DCSScore che rianalizza tali metafasi evidenziando l'eventuale presenza di dicentrici.

2.3.1 Il modulo Msearch

Il modulo Msearch fornito dalla Metafer (v. 4) permette di acquisire i piani metafasi lungo tutto il vetrino (o una sua regione a seconda delle esigenze specifiche) tramite una scansione a basso ingrandimento (con un obiettivo 10x).

Prima di cominciare con la scansione vera e propria è necessario impostare:

- il nome con cui si vuole memorizzare il set di scansione;
- il modulo che si vuole adoperare, nel nostro caso Msearch;
- il classificatore d'interesse per il particolare tipo di analisi che si deve andare a svolgere;
- il numero massimo di metafasi da individuare;
- in quale zona del vetrino si vuole far avvenire la scansione.

Effettuate queste operazioni si può quindi procedere con la ricerca delle metafasi. È richiesto che ogni vetrino venga messo a fuoco dall'operatore ed infine la scansione ha inizio.

La scansione mediante il modulo Msearch può essere effettuata sia in luce trasmessa che in fluorescenza. Poiché la colorazione adoperata è quella Giemsa, la scansione è avvenuta in luce trasmessa sfruttando il modulo MsearchTL (transmitted light).

Non esistendo un classificatore di default ottimizzato per la linea cellulare MCF-10, si è resa necessaria, al termine della prima scansione a basso ingrandimento, una cernita manuale sul numero totale di oggetti che il software aveva riconosciuto come metafasi. Ciò è stato realizzato osservando tutti gli oggetti acquisiti in una galleria predisposta dal programma da cui è possibile selezionare gli oggetti scelti marcando le immagini corrispondenti alle migliori metafasi da sottoporre all'analisi successiva, ossia il conteggio delle aberrazioni.

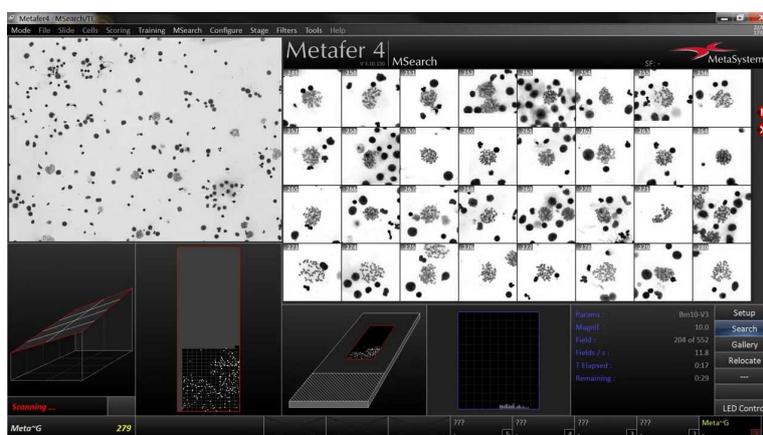


Figura 2.1: La schermata Msearch del software Metafer v. 4

2.3.2 Il modulo DCSScore

Il modulo DCSScore identifica e conta i cromosomi dicentrici automaticamente. Per poterlo adoperare è necessario effettuare una riacquisizione con l'obbiettivo 63x ad immersione in olio.

Le posizioni delle metafasi sono state registrate dal programma tramite il modulo MsearchTL, quindi sfruttando l'opzione AutoCapt ed impostando come classificatore CaptMetaTL_marked il microscopio va a riposizionarsi sulle metafasi memorizzate di nostro interesse.

Mentre l'intero vetrino è scansionato in pochi minuti, per riacquisire ad alto ingrandimento 1000 metafasi il programma impiega circa 3 ore.

A questo punto è possibile selezionare l'opzione Detect Dicentricis nel menu a tendina della funzione AutoCapt e cliccare sulla voce DCSScore.

Al contrario della riacquisizione in 63x, il DCSScore prevede soltanto pochi minuti per scansionare un migliaio di piani metafasici alla ricerca di cromosomi dicentrici.

Per poter agire in maniera soddisfacente, il DCSScore richiede che i piani metafasici rispettino alcuni canoni. Vengono eliminate automaticamente dal programma tutte le metafasi in cui:

- Il DNA si trova in una forma despiralizzata rispetto ai cromosomi;
- C'è un numero di cromosomi superiore od inferiore rispetto al valore di soglia impostato;
- La risoluzione dell'immagine è troppo scadente;
- Il vetrino presenta un fondo eccessivo;
- I cromosomi sono troppo ravvicinati o raggruppati (cluster).

Una volta che il modulo DCScore ha terminato la sua ricerca, nella Gallery del programma compariranno in verde le metafasi che il modulo è riuscito ad analizzare con successo mentre in grigio quelle che non rientrano nei suoi parametri.

È quindi possibile osservare tutti i piani metafasici ingranditi selezionando l'opzione Relocate.

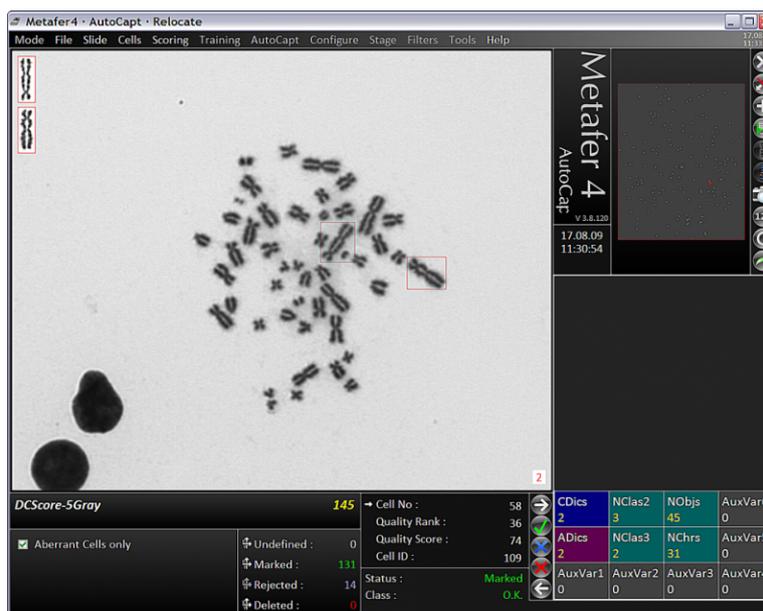


Figura 2.2: Un piano metafasico analizzato mediante il modulo DCScore fornito dal software Metafer v.4

Quando il programma identifica un dicentrico, ne viene mostrato un ingrandimento in alto a sinistra all'interno di un riquadro rosso. Se si vogliono visualizzare soltanto le metafasi in cui il modulo ha individuato dei dicentrici è sufficiente selezionare l'opzione "Aberrant Cells only".

Come si può osservare in Fig 2.2, affianco all'immagine della metafase analizzata è mostrato uno Scoring Sheet dove compare il numero di dicentrici conteggiati automaticamente (ADics) ed è possibile modificare manualmente il numero di dicentrici individuati dall'operatore, cliccando sul riquadro indicato come CDics. Questa funzionalità è pensata appositamente per il modulo DCScore.

Ogni cellula è dotata di 2 "coordinate" che permettono all'operatore di ritrovarle in galleria senza ambiguità: queste sono il Cell no. ed il Cell ID, visualizzabili in basso centralmente in Fig 2.2.

Tutte queste informazioni sono visualizzabili nell' Evaluation Report che può essere esportato come file e/o stampato. La possibilità di avere un resoconto di quante cellule sono state analizzate e di quanti dicentrici sono stati individuati sia dal programma che dall'operatore in corrispondenza di

quale metafase costituisce senza dubbio uno dei maggiori punti di forza della piattaforma ed è fondamentale per poterne valutare il funzionamento in termini di accuratezza e riproducibilità di analisi come discusso nel prossimo capitolo.

Capitolo 3

Risultati

3.1 Metafasi analizzate dal modulo DCSScore

Come si è già accennato nel capitolo 2, il modulo DCSScore necessita che le metafasi in esame rispettino alcuni canoni per poter essere correttamente analizzate.

Una volta acquisiti i vetrini con l'obbiettivo 63x ad immersione in olio ed applicato il modulo DCSScore, questi sono stati i risultati restituiti dal programma per quanto concerne le metafasi per i vetrini irraggiati:

	Metafasi totali	Metafasi accettate	Metafasi scartate
2.5 Gy	884	419	465
5 Gy	571	217	354

Tabella 3.1: I risultati forniti dal modulo DCSScore

In termine di percentuali rispetto alle metafasi totali:

	% Metafasi accettate	%Metafasi scartate
2.5 Gy	47.7	52.3
5 Gy	38.0	62.0

Tabella 3.2: I risultati forniti dal DCSScore in percentuale

Si comprende quindi come il campione da analizzare sia ridotto ad oltre la metà di quello iniziale.

Bisogna dunque stimare se il programma ha correttamente scartato i piani metafisici dove non era possibile effettuare lo scoring di eventuali dicentrici, oppure ha erroneamente eliminato delle metafasi dove si poteva valutare la presenza dei cromosomi dicentrici.

È stata valutata la bontà delle metafasi acquisite soltanto per i vetrini irraggiati in quanto per il controllo (0 Gy) non ci si aspetta di trovare cromo-

somi dicentrici, avendo essi una bassa insorgenza spontanea (0.5-2 per 1000 metafasi). È chiaro quindi che lo scarto di metafasi per i vetrini irraggiati è il dato critico dal momento che è molto maggiore la probabilità che il programma abbia erroneamente non analizzato una metafase in cui era presente un dicentrico.

Sono quindi stati osservati tutti i piani metafasici per i vetrini irraggiati, sia quelli riportati come "marked" sia quelli riportati come "rejected" dal programma.

3.1.1 Metafasi accettate

Inizialmente sono stati stimati gli errori di classificazione per le cellule riportate come "marked" dal software:

	Totale accettate	Accettate dall'operatore	Scartate dall'operatore
2.5 Gy	419	359	60
5 Gy	217	167	50

Tabella 3.3: I risultati per la misclassificazione delle cellule approvate dal programma

Da questa prima analisi manuale si può già evincere che sussistono degli errori da parte del modulo quando seleziona le metafasi atte ad essere sottoposte allo scoring.

Quello che resta da valutare è se il programma sbaglia nella sua classificazione sempre allo stesso modo, ovvero se le stime ottenute per i diversi vetrini sono tra di loro confrontabili.

Assumiamo quindi che i nostri dati seguano la distribuzione poissoniana.

Sia allora:

$$f = \frac{\text{Numero di successi}}{\text{Numero di prove}} = \frac{n}{N} \quad (3.1)$$

La frequenza dei successi, dove con successi si intende il numero di volte in cui l'operatore ha concordato con il programma nell'approvare le metafasi adatte allo scoring.

E sia:

$$\sigma_f = \frac{\sqrt{n}}{N} \quad (3.2)$$

L'errore sulla frequenza.

È quindi possibile effettuare un test per valutare se la discrepanza fra i due valori è statisticamente significativa.

Sia:

$$d = |f_1 - f_2| \quad (3.3)$$

$$\sigma_d = \sqrt{\sigma_{f_1}^2 + \sigma_{f_2}^2} \quad (3.4)$$

$$t = \frac{|d|}{\sigma_d} \quad (3.5)$$

con d differenza fra le due frequenze trovate e σ_d l'errore ad essa associato. In conclusione si hanno i seguenti dati:

	f	σ_f
2.5 Gy	0.86	0.05
5 Gy	0.77	0.06

Tabella 3.4: Frequenza dei successi con relativi errori

	d	σ_d	t
2.5 Gy e 5 Gy	0.09	0.08	1.13

Tabella 3.5: Test di discrepanza

Il test di discrepanza in presenza di errori statistici afferma che le discrepanze sono significative se $t > 1.96$; nel nostro caso quindi la discrepanza tra i vetrini non è significativa.

3.1.2 Metafasi scartate

Dopo aver valutato i piani metafasi indicati come "marked" dal modulo, si sono rianalizzati manualmente quelli contrassegnati come "rejected":

	Totale scartate	Accettate dall'operatore	Scartate dall'operatore
2.5 Gy	465	210	255
5 Gy	354	130	224

Tabella 3.6: I risultati per la misclassificazione delle metafasi approvate dal programma

Dall'analisi emerge chiaramente, come riportato in Tabella 3.6, che il modulo DCSScore in questa fase perde una grande quantità di informazione utile scartando metafasi che invece avrebbe dovuto accettare (ossia che sarebbero dovute essere classificate come "marked"). e dunque sarebbe opportuno intervenire sui parametri pre-impostati per ottimizzare questa fase. Si noti come sia comunque minore la frequenza di errori nell'accettare metafasi che devono essere invece scartate (mediante del 20% come visto nel paragrafo precedente) rispetto all'errore commesso nel non accettare metafasi che invece risultano essere analizzabili, errore questo che arriva fino a quasi il 40% nel caso del vetrino con campione irraggiato con 5 Gy. Ciò potrebbe essere cruciale in quanto il numero di metafasi è in questi casi di per sè piuttosto esiguo proprio a causa dei danni provocati dalla radiazione per effetto dei quali molte cellule si arrestano ben prima di giungere in metafase. .

In maniera analoga al caso precedente abbiamo valutato se le frequenze delle metafasi rigettate sono uguali entro l'errore fra i due vetrini: stavolta per successi si intendono quindi i casi in cui l'operatore ed il software concordano nel rigettare una metafase non adatta al processo di scoring.

	f	σ_f
2.5 Gy	0.55	0.03
5 Gy	0.64	0.04

Tabella 3.7: Frequenza dei successi e relativo errore

	d	σ_d	t
2.5 Gy	0.09	0.05	1.80

Tabella 3.8: Test di discrepanza

Si noti che anche in questo caso il valore di t è inferiore a 1.96, si è quindi legittimati a concludere che le variazioni inter-campione sono fluttuazioni casuali.

3.2 Scoring dei cromosomi dicentrici

3.2.1 Confronto tra procedura automatica e manuale

Tramite il modulo DCSScore il programma ha effettuato una valutazione delle metafasi che ha precedentemente accettato per rivelare e contare eventuali cromosomi dicentrici. Tutte le metafasi reputate analizzabili dall'operatore sono state rivalutate manualmente.

Si definiscono quindi:

- Veri positivi (VP) i dicentrici correttamente riconosciuti dal modulo;
- Falsi positivi (FP) i cromosomi erroneamente individuati come dicentrici dal modulo;
- Falsi negativi (FN) i dicentrici che il modulo non ha riconosciuto.

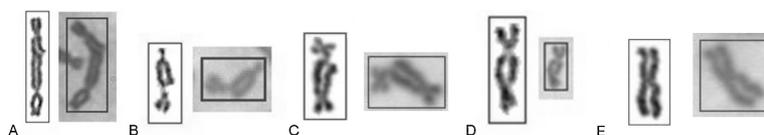


Figura 3.1: Alcuni esempi di falsi positivi: In (A) due cromosomi sovrapposti, in (B) e (C) due cromosomi vicini, in (D) un cromosoma con i bracci dei cromatidi sovrapposti ed in (E) un cromosoma normale, anch'esso a volte erroneamente classificato come dicentrico [11].

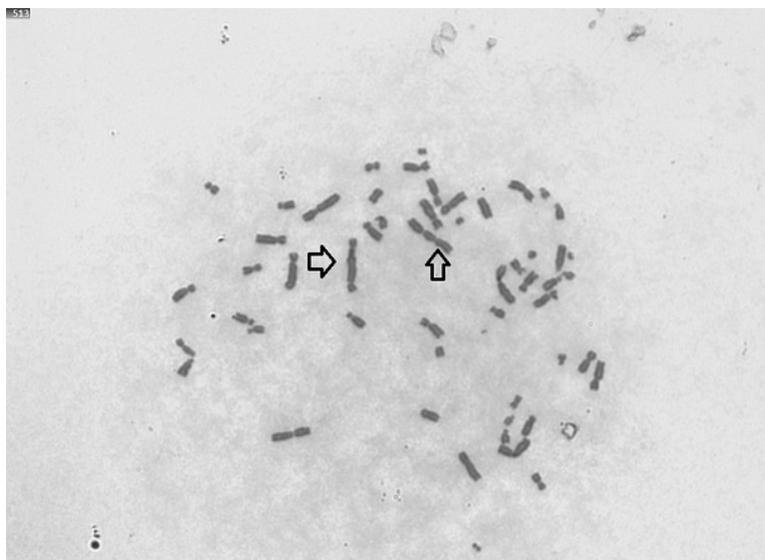


Figura 3.2: Due falsi negativi indicati da una freccia

I risultati ottenuti dal confronto tra procedura automatica e manuale sono i seguenti:

	Totale cellule	AD	MD	VP	FP	FN
2.5 Gy	569	55	42	13	42	29
5 Gy	297	46	53	16	30	27

Tabella 3.9: Risultati del confronto tra scoring manuale ed automatizzato

In Tabella 3.9 sono state inserite anche le metafasi che il programma non ha valutato ma che sono state repute analizzabili dall'operatore. I dicentrici trovati nelle metafasi scartate dal modulo compaiono nei falsi negativi e nel conteggio manuale.

Nella colonna AD (automatic detection) sono riportati i dicentrici individuati dal programma, mentre in MD (manual detection) quelli che ha individuato l'operatore.

Si vuole adesso determinare se il modulo ha funzionato allo stesso modo per i due vetrini, considerando allora le frequenze degli eventi riportati in Tabella 3.9:

	f_{AD}	f_{MD}	f_{VP}	f_{FP}	f_{FN}
2.5 Gy	0.097	0.074	0.023	0.074	0.051
5 Gy	0.155	0.178	0.054	0.101	0.090

Tabella 3.10: Frequenze

	$\sigma_{f_{AD}}$	$\sigma_{f_{MD}}$	$\sigma_{f_{VP}}$	$\sigma_{f_{FP}}$	$\sigma_{f_{FN}}$
2.5 Gy	0.013	0.011	0.006	0.011	0.009
5 Gy	0.023	0.025	0.013	0.018	0.017

Tabella 3.11: Errori sulle frequenze

Dove l'errore sulle frequenze è stato stimato assumendo una distribuzione poissoniana come in 3.2.

Dal test della discrepanza, è emerso che:

	d	σ_d	t
f_{VP}	0.031	0.014	2.21
f_{FP}	0.027	0.021	1.23
f_{FN}	0.041	0.019	2.05

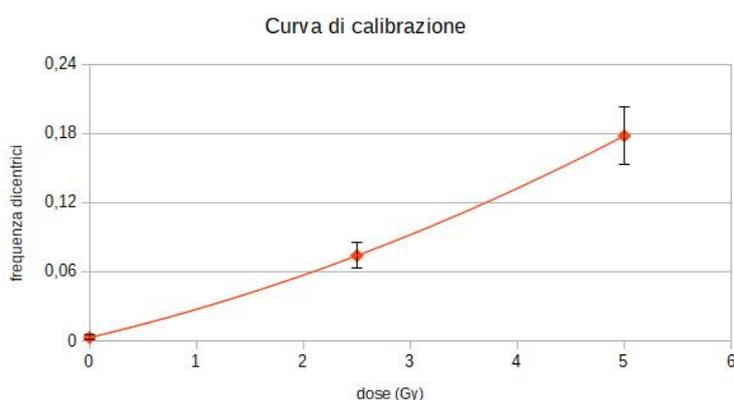
Tabella 3.12: Test di discrepanza

Dalla Tabella 3.12 si osserva che l'unica discrepanza non significativa tra il vetrino a 2.5 Gy e quello a 5 Gy riguarda i falsi positivi. Una possibile spiegazione riguardo la discrepanza significativa per i veri positivi potrebbe essere che il "background" del vetrino a 5 Gy fosse migliore di quello dell'altro, ossia che fosse più pulito e con meno fattori confondenti (aloni del citoplasma residui, polvere, etc) e pertanto il programma sia stato in grado di riconoscere correttamente una percentuale maggiore di dicentrici. Per i falsi negativi si può inoltre supporre che poiché ci si aspetta una percentuale maggiore di cromosomi dicentrici per i 5 Gy su questo vetrino il programma potrebbe averne "saltato" un numero superiore.

Infine, assumendo lo scoring manuale come nostro gold standard, è stata costruita una curva di calibrazione dose-risposta per questa esperienza, ottenendo:

	Totale cellule	MD	f_{MD}	$\sigma_{f_{MD}}$
0 Gy	767	2	0.003	0.002
2.5 Gy	569	42	0.074	0.011
5 Gy	297	53	0.178	0.017

Tabella 3.13: Risultati dello scoring manuale



che ha un andamento in accordo con quello lineare-quadratico riportato in letteratura (vedi Fig. 1.7). La linea riportata per la curva di calibrazione non è derivante da un fit, bensì è una semplice guida per l'occhio.

Gli errori sulle frequenze sono stati stimati assumendo una distribuzione poissoniana.

3.2.2 Sensibilità e potere predittivo del modulo

Sulla scorta dei risultati finora mostrati, proviamo a fornire una valutazione complessiva del funzionamento del software per la ricerca ed il conteggio delle aberrazioni. Con il termine sensibilità del modulo definiamo la capacità di identificare correttamente i cromosomi dicentrici. Se il modulo avesse un'ottima sensibilità, allora il rischio di falsi negativi, cioè di dicentrici non individuati, sarebbe basso.

Di contro, con il termine potere predittivo del modulo si indica la probabilità che ciò che è stato riconosciuto dal sistema come dicentrico sia effettivamente un dicentrico.

Si ha allora:

$$S = \frac{VP}{VP + FN} = \frac{VP}{MD} = \frac{f_{VP}}{f_{MD}} \quad (3.6)$$

$$PP = \frac{VP}{VP + FP} = \frac{VP}{AD} = \frac{f_{VP}}{f_{AD}} \quad (3.7)$$

Dove con S si indica la sensibilità del modulo e con PP il valore predittivo positivo.

I risultati ottenuti sono i seguenti:

	S	PP	σ_S	σ_{PP}
2.5 Gy	0.31	0.24	0.13	0.09
5 Gy	0.30	0.35	0.17	0.13

Tabella 3.14: Sensibilità e valore predittivo positivo del modulo

Gli errori sono stati stimati considerando la classica espressione della propagazione degli errori alle derivate parziali:

$$\sigma_{f(x)} = \sum_{j=1}^k \left| \frac{\partial f(x_j)}{\partial x_j} \right| \sigma_{x_j} \quad (3.8)$$

Idealmente, S e PP dovrebbero essere 1, ossia dovrebbero verificarsi zero falsi negativi e zero falsi positivi. Tuttavia, anche considerando gli errori, né la sensibilità né il potere predittivo del modulo superano il 50%. Ne concludiamo che è necessario ottimizzare il modulo DCSScore poiché con le impostazioni di fabbrica il suo operato non è soddisfacente.

Conclusioni

Lo scopo del presente lavoro di tesi era la validazione manuale di un modulo (DCScore) per il riconoscimento ed il conteggio dei cromosomi dicentrici, parte della suite Metafer (Metasystems, Germania) specializzata nell'analisi di danno citogenetico. In particolare, questo modulo è ampiamente usato in applicazioni biosimetriche per la ricostruzione retrospettiva della dose assorbita, per esempio nel caso di individui esposti accidentalmente. Dovendo, in linea di principio, gestire molti campioni e fornire stime robuste statisticamente, l'automazione del processo di analisi di preparati citogenetici rappresenta un passo obbligato che però necessita di una verifica per quanto riguarda l'efficienza e la fedeltà con cui tale riconoscimento avviene.

Dal collaudo manuale effettuato sul modulo DCScore possiamo concludere che il programma necessita di una ottimizzazione generale.

Per quanto concerne l'acquisizione delle metafasi sussiste una notevole perdita di informazione utile in quanto oltre il 50% delle metafasi preliminarmente individuate durante la scansione a basso ingrandimento vengono poi rigettate dal primo dei due step in cui il DCScore analizza i cromosomi metafasici e individua quelli dicentrici. Possiamo supporre che uno dei problemi riscontrati dal software in questa fase riguardi il fondo del vetrino: sia la presenza di pulviscolo sulla superficie del vetrino, sia i tempi e la concentrazione adoperata per la colorazione Giemsa potrebbero aver influito negativamente sulla resa finale dell'acquisizione. Quindi per quanto concerne il nostro operato si potrebbe considerare di migliorare sia la conservazione dei vetrini sia il protocollo della colorazione. Tuttavia, dall'analisi manuale emerge che anche metafasi ben visibili e "di buona qualità" sono inspiegabilmente rigettate.

Riguardo invece la sensibilità del modulo ed il suo potere predittivo i risultati non sono migliori.

Una percentuale significativamente elevata di dicentrici che erano stati individuati dal modulo nelle metafasi ritenute adatte al processo di scoring, è stata valutata in maniera differente dall'operatore (falsi positivi), conferendo al modulo nel suo stato attuale un basso potere predittivo. Numerosi sono stati anche i dicentrici che il programma non ha individuato (falsi negativi), mentre i casi in cui il programma e l'operatore hanno concordato

nella determinazione di un cromosoma dicentrico (veri positivi) sono stati relativamente pochi e ciò si traduce in una bassa sensibilità del programma.

In conclusione, si può dedurre dai risultati ottenuti che anche in questa fase di analisi dei piani metafasici è opportuno effettuare un'ottimizzazione del programma. Questa comporterà una modifica dei parametri mediante i quali il software procede all'identificazione delle metafasi da sottoporre ad analisi (marked) e del riconoscimento dei dicentrici.

Bibliografia

- [1] C. Beinke et al., *Laboratory Intercomparison of the Dicentric Chromosome Analysis Assay* Radiat. Res. 180, 129–137 (2013);
- [2] K.F. Wong et al. *Cytogenetic biodosimetry: what it is and how we do it* Hong Kong Med J Vol 19 No 2, 168-73 (2013);
- [3] A. Fučić et al., *Stable and Unstable Chromosome Aberrations Measured after Occupational Exposure to Ionizing Radiation and Ultrasound* Croat Med J. 48, 371-7 (2007);
- [4] B. D. Loucas et al., *Complex Chromosome Exchanges Induced by Gamma Rays in Human Lymphocytes: An mFISH Study* Radiat. Res. 155, 660-671 (2001);
- [5] A. Léonard et al., *Dose-Effect Relationship for In Vivo and In Vitro Induction of Dicentric Aberrations in Blood Lymphocytes of Children*, Radiat. Res. 141, 95-8 (1995);
- [6] A. Vaurijoux et al., *Detection of Partial-Body Exposure to Ionizing Radiation by the Automatic Detection of Dicentrics* Radiat. Res. 177, 357–364 (2012);
- [7] Y. Abe et al., *Dose–response curves for analyzing of dicentric chromosomes and chromosome translocations following doses of 1000 mGy or less, based on irradiated peripheral blood samples from five healthy individuals* Radiat. Res. 177, 357–364 (2012);
- [8] Y. Suto et al., *Biodosimetry of restoration workers for the Tokyo Electric Power Company (TEPCO) Fukushima Daiichi nuclear power station accident* Health Phys. 105(4), 366-73 (2013);
- [9] M.M.P. Lemos-Pinto et al., *A dose-response curve for biodosimetry from a 6 MV electron linear accelerator* Braz J Med Biol Res vol.48 no.10 Ribeirão Preto (2015);
- [10] A. Vaurijoux et al., *Strategy for Population Triage Based on Dicentric Analysis* Radiat. Res., 171, 541-548 (2009);

- [11] H. Romm et al., *Automatic scoring of dicentric chromosomes as a tool in large scale radiation accidents* Mutation Research 756, 174– 183 (2013).