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 Magistrale in Fisica

Effetto combinato dell’esposizione a radiazione ionizzante e al particolato atmosferico

(Combined effect of exposure to ionizing radiation and particulate matter)

Relatori:
Prof. Lorenzo Manti
Dott.ssa Emilia Formicola

Candidato:
Luigi Sorrentino
Matricola N94000574

A.A. 2022/2023

Ai miei genitori.

Sommario

Introduzione ..... - 4 -

Capitolo 1: Radioterapia e Particolato atmosferico ..... - 6 -

1.1 Esposizione umana ad agenti cito- e genotossici ..... - 6 -

1.1.1 La radiazione ionizzante (RI): principali effetti biologici ..... - 7 -

1.1.2 Il saggio del micronucleo per la quantificazione di danno al DNA ..... - 12 -

1.2 Uso terapeutico della RI ..... - 14 -

1.2.1 Effetti indesiderati ..... - 16 -

1.3 Effetti del particolato atmosferico ($PM_{2.5}$) ..... - 18 -

1.4 Esposizione combinata a radiazione ionizzante e PM2.5 ..... - 23 -

Capitolo 2: Materiali e metodi ..... - 25 -

2.1 Piano sperimentale ..... - 25 -

2.1.1 Sistema cellulare ..... - 26 -

2.1.2 Caratteristiche del $PM_{2.5}$ ..... - 26 -

2.2 Osservazioni ed esperimenti preliminari ..... - 26 -

2.2.1 Test di contaminazione ..... - 26 -

2.2.2 Scelta della concentrazione del $PM_{2.5}$ ..... - 27 -

2.2.3 Ottimizzazione della resa di binucleazione per il saggio dei micronuclei (CBMN) ..... - 27 -

2.3 Protocollo di coesposizione a RI e al $PM_{2.5}$ e preparazione dei vetrini per il saggio CBMN ..... - 27 -

2.3.1 Dettagli esperimento 1 ..... - 28 -

2.3.2 Dettagli esperimento 2 ..... - 28 -

Capitolo 3: Risultati ..... - 30 -

3.1 Risultati esperimenti preliminari ..... - 30 -

3.2 Risultati esperimento 1 ..... - 30 -

3.3 Risultati esperimento con campioni non irraggiati ..... - 32 -

3.4 Risultati esperimento 2 ..... - 33 -

Capitolo 4: Discussione ..... - 35 -

Conclusioni ..... - 37 -

Bibliografia: ..... - 38 -

Ringraziamenti ..... - 39 -

Introduzione

La radiazione ionizzante (RI) è parte ineludibile della nostra vita. Essa ha accompagnato le specie viventi nella loro evoluzione essendo il fondo naturale ambientale di RI presente ubiquitariamente. Una peculiarità della RI è la sua dualità, in quanto essa può essere impiegata utilmente nella radioterapia e nell'*imaging* diagnostico, ma, allo stesso tempo, l'esposizione alla RI comporta importanti effetti biologici sulle cellule, e quindi sugli organismi. Tali effetti si possono manifestare con una tempistica molto ampia, che spazia da effetti precoci come la morte cellulare riproduttiva (definita come l'incapacità della cellula danneggiata di dividersi alla prima mitosi post-irraggiamento), ad effetti tardivi, il più studiato e conosciuto dei quali è la carcinogenesi radio-indotta. Inoltre, la vasta pletora di danni al DNA che la radiazione induce apre un ventaglio di possibili effetti a livello cellulare che in ultima analisi determinano uno dei tanti fati a cui la cellula può andare incontro.

In termini della modalità di azione sui sistemi biologici, la RI rappresenta l'agente fisico cito- e genotossico più indagato e meglio caratterizzato ma, in realtà, ne esistono molti altri (sebbene la modalità di azione di questi sia stata meno studiata e compresa), che agiscono in concomitanza sia temporale che spaziale alla RI. Tra questi di sicuro rientrano le polveri sottili (o particolato atmosferico, PM), componenti dell'inquinamento atmosferico presenti in quantità importanti (e talvolta oltre i livelli di riferimento stabiliti dalla legislazione vigente per la qualità dell'aria) soprattutto nei grandi agglomerati urbani: gli abitanti di tali siti sono dunque esposti cronicamente al PM nell'arco della loro vita

È lecito supporre, dunque, che esistano condizioni ambientali in cui l'essere umano risulterà esposto in modo combinato alla RI e al PM. Mentre esiste una vasta letteratura scientifica sugli effetti deleteri dell'esposizione umana al PM, l'azione combinata di RI e PM non sembra essere stata studiata a livello cellulare: lo scopo di questo lavoro di tesi è appunto di investigare l'effetto di un'esposizione simultanea di cellule dell'epidermide coltivate in vitro a questi due agenti. In particolare, il sistema pelle è stato simulato mediante l'utilizzo di una linea cellulare di cheratinociti denominata HaCaT, come surrogato del PM è stato utilizzato il prodotto commerciale *Fine Dust*, che è un particolato fine ($PM_{2.5}$, di dimensioni inferiori a 2,5 μm di diametro): rispetto al particolato grosso (PM_{10}) esso è considerato molto più pericoloso per la salute. Le cellule sono state esposte prima al $PM_{2.5}$ per 24 ore e successivamente a RI, a dosi equiparabili a quelle erogate in una seduta di radioterapia frazionata. Questo modello e modalità di esposizione andranno a simulare in una versione più realistica l'esposizione della cute nel contesto clinico della radioterapia.

In effetti, il $PM_{2.5}$ è già stato studiato ampiamente per i suoi effetti nocivi a livello dell'apparato cardio-vascolare e respiratorio nonché per l'induzione di tumori al polmone, e da studi in vitro sembra evidente, in generale, che a livello cellulare

l’esposizione al solo particolato causi una modifica dei livelli di specie reattive dell’ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) intracellulari da cui consegue stress ossidativo. Negli ultimi anni invece nuovi studi si stanno concentrando sull’interazione tra $PM_{2.5}$ e le cellule della cute che sembrano evidenziare un’alterazione della funzionalità di tale tessuto.

D’altro canto, durante i protocolli radioterapici è proprio il danno alla cute uno dei fattori che limita la dose erogabile al tumore per via degli effetti indesiderati al tessuto sano. Il riscontro di un effetto sinergico dell’esposizione combinata tra $PM_{2.5}$ e RI potrebbe dunque richiedere l’attuazione di ulteriori misure di radioprotezione.

Per definire la concentrazione di $PM_{2.5}$ da utilizzare, sono stati effettuati test preliminari di citotossicità per quantificare quella causata dai suoi solventi. Tre soluzioni solvente sono state utilizzate una basata sul dimetilsolfossido (DMSO) e due basate su di una soluzione di *polyethylene glycol (PEG)*. Il saggio radiobiologico utilizzato per lo studio degli effetti combinati con la RI è stato quello del micronucleo, che permette di quantificare il danno indotto a livello del DNA.

Capitolo 1: Radioterapia e Particolato atmosferico

1.1 Esposizione umana ad agenti cito- e genotossici

Dalla seconda metà del XX secolo, con l'avvento della seconda rivoluzione industriale e il susseguirsi delle scoperte scientifiche, si è assistito allo sviluppo di diversi settori industriali, come quello energetico, logistico, agricolo, alimentare e farmaceutico: ciò ha portato alla sintetizzazione e di conseguenza all'introduzione nell'ambiente, di nuovi agenti chimici e fisici, molti dei quali contaminano l'aria, il suolo, l'acqua ed il cibo, agendo da elementi inquinanti. Inoltre, molti di essi sono bioaccumulabili, con elevate proprietà cancerogene, mutageniche e/o reprotossiche [3].

Tra i noti agenti chimici genotossici è possibile annoverare i seguenti: il benzo[a]pirene e il benzo[a]antracene, che sono degli idrocarburi aromatici policiclici (IPA) presenti in tutti i fumi di combustione dei composti organici (tabacco); le aflotossine, che possono contaminare il grano; il cloruro di vinile, usato per la produzione del polivinilcloruro (PVC); il benzene, presente nei fumi industriali; l'arsenico; l'asbesto. Tra gli agenti fisici, invece, vi è la radiazione ionizzante (RI). Suddetti agenti causano lesioni al DNA che possono comportare mutazioni e aberrazioni cromosomiche (AC) [1]. Il DNA (acido desossiribonucleico) custodisce tutte le informazioni necessarie alla vita di una cellula e costituisce pertanto il bersaglio d'elezione di tali agenti chimico-fisici.

Un agente genotossico è tale se causa lesioni al DNA della cellula esposta, che possono interessare la struttura dei cromosomi o la sequenza di nucleotidi, le quali risulteranno modificate rispetto a quelle originarie [2]. Queste lesioni, se non riconosciute e correttamente processate da particolari enzimi addetti al riparo, vengono ereditate dalla progenie della cellula e danno luogo ad AC o a mutazioni: se sono compatibili con la sopravvivenza, esse diventano parte integrante del genoma. In questo senso, la lesione non sarà citotossica ma porterà ad una cellula mutata, la cui informazione genetica è alterata. Queste alterazioni possono comportare lo sviluppo di tumori [1].

Infatti, secondo la teoria della tumorigenesi, il processo che porta al tumore conclamato a partire da una singola cellula è un processo multistep, le cui prime due fasi sono dette fase di iniziazione tumorale e fase di promozione tumorale. Una cellula è predisposta al tumore quando reca in sé una mutazione ereditabile causata da un agente mutageno, detto iniziatore tumorale che, da solo, è però insufficiente a causare un cancro conclamato, in quanto è necessaria una fase di promozione tumorale: questa avviene per effetto di promotori, cioè sostanze o condizioni di per sé non mutageni, ma che favoriscono lo sviluppo del cancro. In genere, l'effetto

immediato di un promotore tumorale è l'induzione di una risposta infiammatoria, che causa la secrezione di fattori di crescita, agendo sia direttamente che indirettamente sulle cellule e stimolandone la proliferazione. [1].

Un altro fattore chiave per la tumorigenesi è l'instabilità genomica, cioè un aumento della frequenza con cui la cellula accumula mutazioni e AC rispetto a quanto faccia normalmente. L'instabilità genomica è innescata da alterazioni in geni che codificano per le proteine destinate al mantenimento dell'integrità del genoma e al controllo della proliferazione cellulare (come i *cell-cycle checkpoints*) [2]. Come si vedrà nelle prossime pagine, il particolato atmosferico (PM) è un potenziale cancerogeno che agirebbe in entrambe le fasi della progressione tumorale.

Non si deve pensare però che per avere mutazioni al DNA sia necessario essere esposti specificamente all'uno o l'altro agente: infatti, benché il DNA sia una molecola stabile, esso è suscettibile anche in condizioni normali ad alterazioni spontanee dovute a danni ossidativi, attacchi idrolitici e metilazioni incontrollate; inoltre, si è esposti ineludibilmente al fondo naturale di RI nonché ai raggi ultravioletti (UV) solari, che contribuiscono a queste lesioni potenzialmente mutagene. Sebbene esistano meccanismi di riparo che proteggono quanto possibile il genoma, questi non sempre sono esenti da errori, ed esiste quindi una frequenza base di mutazioni dovuta al solo fatto di vivere sulla Terra [1]. Quindi, le mutazioni si accumulano nel genoma man mano che si invecchia, e sono queste il motivo per il quale qualsiasi individuo esposto o meno ad agenti mutageni specifici ha una probabilità non nulla di ammalarsi di tumore nell'arco della propria vita [1].

Anche quando si ottiene la prova, epidemiologica o di laboratorio, che una sostanza può essere nociva per la salute, può essere arduo decidere quale livello di esposizione sia accettabile per l'uomo. Infatti, la tossicità di gran parte dei contaminati ambientali è nota alle alte dosi ma, in realtà, al di là di casi molto particolari, generalmente lo scenario di esposizione è quello di basse dosi cronicamente somministrate. Quindi, allo scopo di giungere a conclusioni realistiche sui rischi per la salute, è necessario tener conto del fatto che esiste una compartecipazione di più agenti, in particolare, correlati alla RI; è dunque importante progettare esperimenti che prevedano condizioni di co-esposizione [3].

1.1.1 La radiazione ionizzante (RI): principali effetti biologici

La RI agisce a livello cellulare depositando energia tramite eccitazioni e ionizzazioni. L'energia depositata per unità di massa è descritta dalla dose (D) misurata in gray (Gy). Questa energia può essere assorbita in modi diversi a seconda della tipologia di radiazione (fotoni, particelle cariche o neutroni): per quantificare la qualità della radiazione è utilizzato il parametro "*Linear Energy Transfer*" (LET). I fotoni sono classificati come radiazione sparsamente ionizzante (basso LET)

perché nell'interazione con la materia biologica producono elettroni "veloci" che ionizzano le molecole in maniera casuale nello spazio; invece, le particelle cariche sono densamente ionizzanti (alto LET) perché hanno una struttura di traccia spazialmente definita [2].

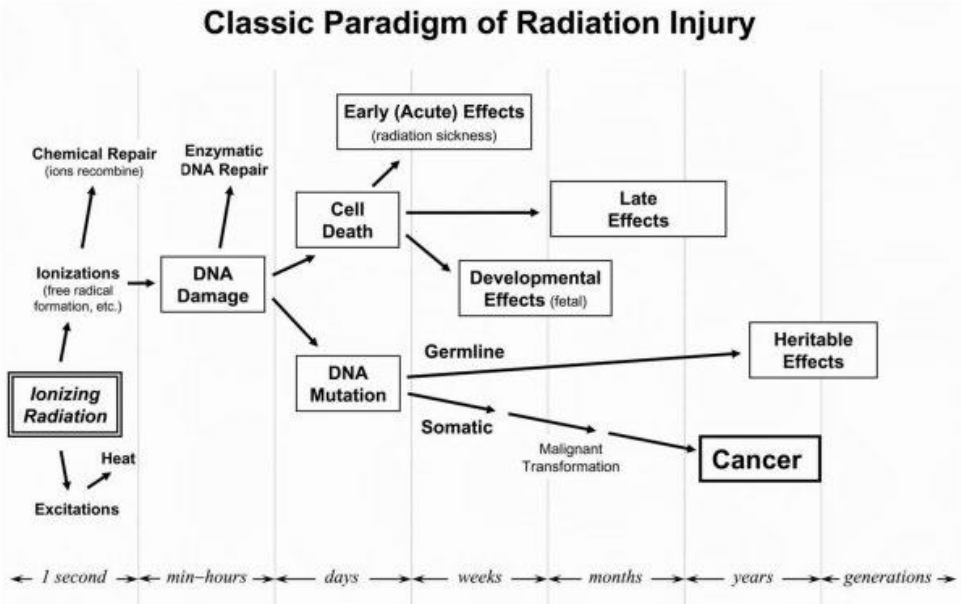

Figura 1: Paradigma classico degli effetti biologici della radiazione ionizzante e loro scala temporale.

A seguito dell'esposizione alla RI, la cellula subisce danni alla membrana fosfolipidica, proteine, enzimi, organelli e DNA. I danni al DNA sono quelli di maggiore importanza rispetto a quelli alle altre biomolecole in quanto esso è presente in unica copia. Infatti, secondo il paradigma classico (fig. 1) ci deve essere un'alterazione della doppia elica di DNA nelle cellule esposte alla RI affinché essa possa produrre un effetto biologico [2, 4]. A differenza di altri agenti fisico-chimici, la RI deposita energia in modo da causare una vasta tipologia di danni a livello del DNA tra cui: alterazione dei legami idrogeno, dimeri di pirimidina, perdita/danno ossidativo alle basi, scambio di basi, legami ectopici intra- ed inter-filamento, legami ectopici con proteine, rotture del singolo filamento (*Single-Strand Break*, SSB), rotture del doppio filamento (*Double-Strand Break*, DSB) [2, 4]. La cellula fa fronte a tali danni attivando un insieme di risposte, intese come pathway biomolecolari e/o risposte enzimatiche, denominate *DNA Damage Response* (DDR). In sintesi, la DDR è un insieme di processi che prevedono l'identificazione e la riparazione del danno laddove possibile. Essa comporta l'innesco di pathway biomolecolari quali: ritardo del ciclo cellulare, espressione di particolari geni codificanti proteine deputate al riparo, e, nel caso di danni non riparabili, morte cellulare (ad esempio morte programmata per apoptosi) [5]. Tutti questi processi contengono *sub-pathway*, non mutuamente esclusivi, e dipendono dal contesto

sociale della cellula: questo comporta l'impossibilità di predire quale sarà il fato della singola cellula a seguito dell'irraggiamento.

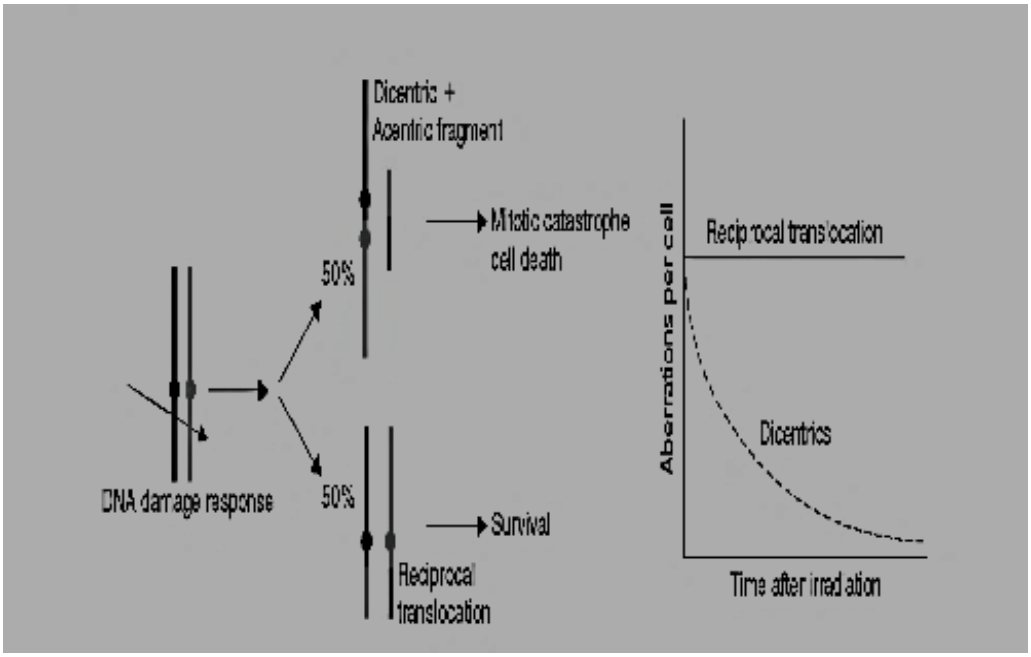

Figura 2: Meccanismi di formazione del cromosoma dicentrico e della traslocazione reciproca e loro distinzione in aberrazione instabile e stabile rispettivamente.

I meccanismi di riparo enzimatico delle alterazioni alla doppia elica che caratterizzano la DDR sono di diverso tipo: essi agiscono, infatti, sia a livello di basi, come il *base excision repair* (BER), che sui danni strutturali, tra cui la rottura del singolo (*single-strand break repair SSBR)* e del doppio filamento: quest'ultimo, in particolare, può essere riparato attraverso i meccanismi di *homologous recombination* (HR) e *non-homologous end joining* (NHEJ). Questi meccanismi, presi singolarmente, sono molto efficaci e specifici, ma, come si è detto, la radiazione induce una vasta tipologia di danni (al variare della dose e del tipo di radiazione) simultanei e spazialmente vicini: essi rappresentano una vera e propria sfida per la cellula e richiedono un alto grado di coordinazione da parte della DDR [2, 5]. In ultima analisi, rispetto ai danni radioindotti al DNA si presenta il seguente scenario: possono essere correttamente riparati con ripristino della configurazione originale (*repair*); non riparati affatto (*unrepaired, unrejoined*); o riparati in modo non corretto, cioè senza ripristinare la configurazione originaria (*misrepair, misrejoining*). In seguito al DDR, dunque, possono verificarsi tre scenari: il *repair* comporta sopravvivenza cellulare, l'*unrepair* comporta morte cellulare in tempi brevi, il *misrepair* porta alla formazione di AC che si dividono in stabili, cioè ereditabili dalla progenie per lunghi periodi di tempo, e instabili, ossia che portano alla morte in tempi relativamente brevi, al massimo alla prima mitosi post-irraggiamento (ad esempio i dicentrici). La mutazione è quindi ereditata quando

essa è compatibile con la sopravvivenza cellulare. Escludendo cause di morte cellulare non dovute a genotossicità, si ha citossocità nel caso di *unrepair* e *misrepair* con presenza di AC instabili, ed invece alterazione dell'informazione genetica nel caso di sole AC stabili e mutazioni quando quest'ultime sono compatibili con la sopravvivenza cellulare (fig. 2) [2, 4, 5].

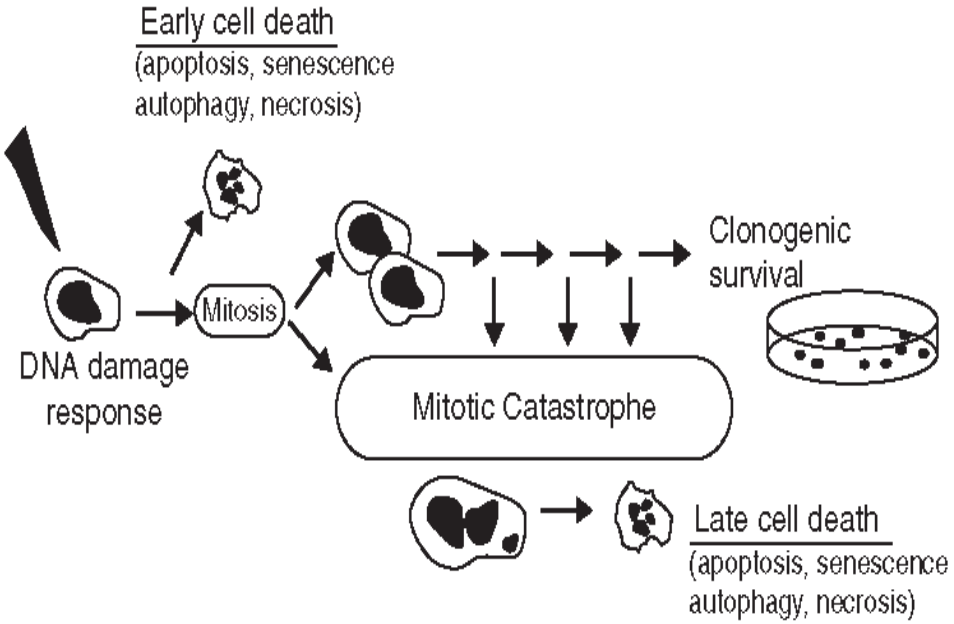

Figura 3: Tempistica di manifestazione delle varie modalità di morte cellulare a seguito dell'esposizione alla radiazione ionizzante.

Entro poche ore dall'esposizione alla RI, si manifestano lo stadio fisico-chimico e quello biologico dell'azione della radiazione. A valle di questi due stadi c'è un ampio intervallo temporale, che può variare dalle frazioni di giorni fino ad intere generazioni, in cui gli effetti della radiazione possono essere espressi. Le cellule che subiscono un danno letale in genere andranno incontro alla morte che può essere interfasica oppure mitotica. La morte interfasica subentra prima che la cellula tenti di dividersi per la prima volta post-irraggiamento e può avvenire per uno dei seguenti fenomeni: morte cellulare programmata (apoptosi), necrosi, autofagia. Per morte mitotica si intende invece la morte che subentra quando la cellula tenta di dividersi: tra i processi che rientrano in questo *pathway* rientrano le mitosi aberranti e la formazione di cellule giganti. In realtà, il danno letale può esprimersi con uno dei fenomeni menzionati anche nel pedigree di una cellula irraggiata che è riuscita a dividersi varie volte (fig. 3). Questo è il motivo per il quale per morte cellullare, specialmente in radioterapia, si intende la perdita del potenziale proliferativo, ovvero l'incapacità da parte della cellula irraggiata di generare una colonia di almeno 50 cellule dopo che sia intercorso il tempo necessario per 5-6 divisioni

cellulari. La morte così definita è detta morte clonogenica ed è misurata con il saggio clonogenico. Questo è il saggio più utilizzato in radiobiologia e consente di ottenere in vitro curve dose-risposta che bene descrivono la radiosensibilità cellulare in vivo.

Come anticipato, non è detto che l'agente esterno induca un effetto radiobiologico che comporti morte cellulare: quando ciò non avviene, si parla di danni subletale: essi possono comportare l'iniziazione alla trasformazione neoplastica, perché (per definizione di tale danno) la cellula potrebbe ereditare un genoma alterato continuando a sopravvivere [5].

Un altro effetto importante che può essere indotto a livello cellulare dalla RI, ma anche da altri agenti e condizioni di stress, quali l'esposizione a radiazione ultravioletta (UV), alterazione dei livelli di ROS intracellulari ed altri segnali esogeni dipendenti dal contesto sociale, è la *stress-induced premature senescence* (SIPS). La SIPS dal punto di vista morfologico e biochimico è indistinguibile dalla senescenza replicativa (SR) che è uno stato irreversibile in cui una cellula normale (cioè non trasformata, non neoplastica) e non differenziata, pur non essendo capace di proliferare, resta metabolicamente attiva. In effetti, la SR è il destino a cui la maggior parte delle cellule normali va incontro, in quanto è come se avessero un predeterminato numero di duplicazioni cellulari consentite nell'arco della loro vita. È stato poi compreso che c'è un meccanismo intracellulare riconducibile al fatto che ad un certo punto della vita di una cellula la produzione dell'enzima telomerasi viene interrotta, con il conseguente accorciamento dei telomeri ad ogni divisione cellulare. Quando i telomeri raggiungono una lunghezza limite si attivano pathway molecolari, in cui gioca un ruolo anche la DDR, che inducono la cellula ad andare in senescenza. Una cellula tumorale riesce a mantenere l'attività telomerasica eludendo in questo modo la senescenza [6].

In considerazione degli effetti della RI a livello cellulare si è visto che il danno radioindotto può essere letale per la cellula o essere compatibile con la sua sopravvivenza alterandone quindi l'informazione genetica. Questa diramazione porta a definire a livello di tessuti e organi una prima classificazione degli effetti in deterministici e stocastici. Quelli deterministici sono riconducibili prevalentemente alla morte cellulare, sono caratterizzati da una dose soglia oltre la quale essi si verificano e la loro severità aumenta con la dose. Invece, quelli stocastici sono dovuti a cellule che sono in qualche modo mutate: per essi non c'è dose soglia e non si parla di severità ma bensì di rischio, inteso come un'elevazione della probabilità di incidenza di questi effetti rispetto all'incidenza spontanea, fisiologica, che si avrebbe in assenza di esposizione alla radiazione [2].

L'effetto stocastico per eccellenza è la carcinogenesi radioindotta. Essa riguarda le cellule somatiche del corpo. Il decorso storico, tragicamente, ha voluto che lo studio epidemiologico più importante per la stima dei rischi da RI consistesse nella coorte di individui sopravvissuti alle bombe atomiche sganciate sulle città giapponesi di Hiroshima e Nagasaki durate il secondo conflitto mondiale. Tale

coorte, oggetto del cosiddetto *Life Span Study (LSS)*, è costituita da circa 120000 persone. Nel LSS si arrivò alla conclusione che, dei 22000 tumori osservati, 1000 fossero attribuibili all'esposizione alla RI. I risultati del *LSS* sono abbastanza accurati per dosi dagli 0,5 Sv ai 2 Sv somministrate ad alti ratei. In questo range di dose i dati di rischio sono ben fittati da una retta (fig. 4). Invece, alle basse dosi i dati sono affetti da incertezze troppo grandi ed una stima di rischio risulta meno affidabile [2].

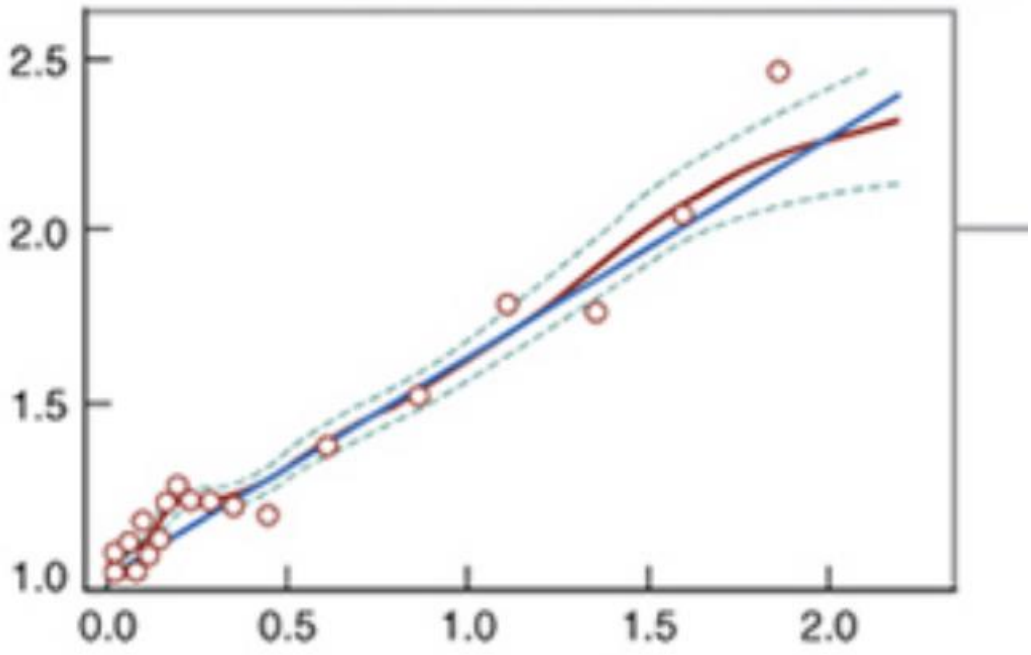

Figura 4: Rischio relativo per l'induzione di cancro tra i sopravvissuti alle bombe atomiche nel periodo di follow-up 1958-1994 rispetto alla popolazione non esposta in funzione della dose espressa in Sievert

1.1.2 Il saggio del micronucleo per la quantificazione di danno al DNA

Dando per assodato che gli effetti biologici della radiazione siano causati da danni al DNA nelle cellule direttamente irraggiate, è di fondamentale importanza in radiobiologia quantificarli in funzione della dose. Le manifestazioni del danno radio-indotto sono dette *end points* e sono espressione del danno residuo, cioè quel danno che permane dopo che la DDR è intervenuta con i suoi meccanismi di riparo; gli *end points* sono a ritroso attribuibili a quella parte di dose fisica che è stata biologicamente efficace. I saggi caratteristici che misurano il danno radio-indotto sono quello delle AC e quello dell'istone γ-H2AX, i quali forniscono un'analisi dettagliata del danno ma sono laboriosi.

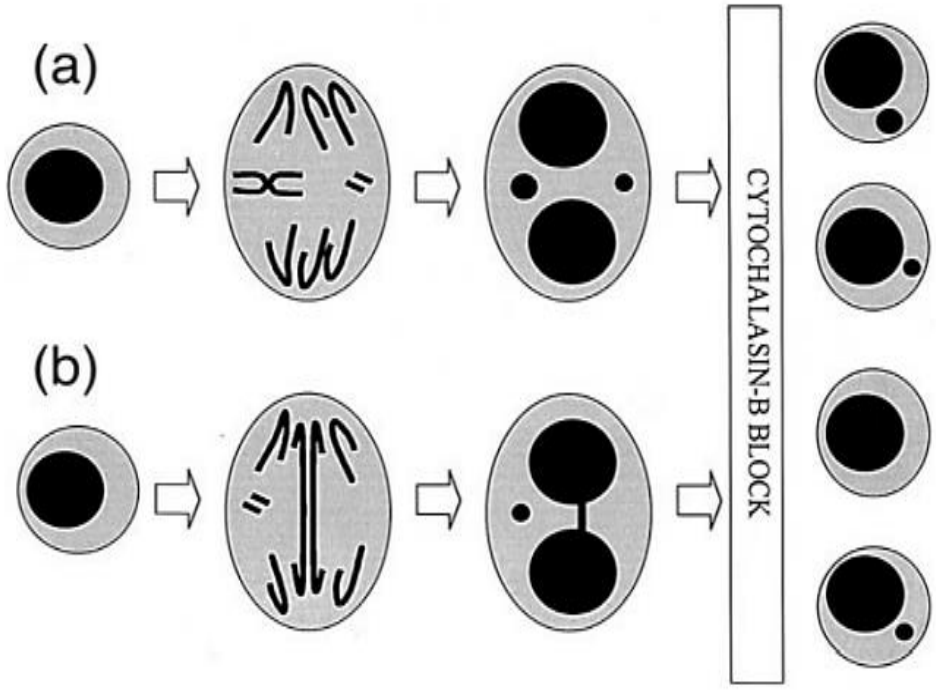

Figura 5: Schematizzazione del principio alla base del cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay.

Di natura più semplice e con un ampio range di applicazioni è invece il saggio dei micronuclei (MN-assay). Questo saggio è sensibile sia ai danni indotti dalla RI sia a quelli dovuti all'esposizione ad agenti chimici genotossici. Il MN-assay consente la misura delle rotture cromosomiche da cui derivano frammenti privi di centromero (frammenti acentrici) nonché la misura di interi cromosomi che sarebbero persi durante la mitosi perché incapaci di legarsi al fuso mitotico. Durante la telofase, una delle sottofasi della mitosi, avviene la ricostituzione della membrana nucleare intorno al DNA replicato: anche questi frammenti acentrici e/o cromosomi vengono racchiusi da membrana, formando dei nuclei più piccoli rispetto ai due destinati alle cellule figlie. Questi piccoli nuclei vengono detti micronuclei (MNi) e sono espressione del danno. Dunque, affinché i MNi vengano espressi, le cellule devono proliferare in tempi compresi tra l'istante in cui sono esposte alla prima telofase post-irraggiamento, e non oltre. Questa condizione viene raggiunta mediante la tecnica detta *cytokinesis-block micronucleus (CBMN).* Nel saggio CBMN le cellule sono esposte ad una sostanza, detta citocalasina B (CB), che le blocca in telofase. Il risultato dell'azione della CB è l'accumulo di virtualmente tutte le cellule che stavano proliferando in uno stato binucleato: in queste condizioni, è possibile visualizzare, se presenti, i MNi. La frequenza di MNi è in genere espressa come numero di MNi in almeno 1000 cellule binucleate (fig. 5) [7].

1.2 Uso terapeutico della RI

A tutt'oggi, la radioterapia (RT) è uno dei trattamenti più efficaci per la cura del tumore: circa la metà di tutti i pazienti oncologici riceve RT. La radiobiologia, con le sue idee e concetti, contribuisce costantemente al miglioramento della RT: a livello di idee, la radiobiologia si è mostrata infatti molto fruttuosa, identificando fenomeni quali ipossia[1] e riossigenazione, ripopolamento cellulare, ridistribuzione cellulare nelle fasi del ciclo cellulare e riparo del danno subletale (che permettono di spiegare perché nella RT moderna si adotta un regime frazionato di esposizione), nonché, con il concetto di radiosensibilità intrinseca, l'esigenza di raggiungere l'adozione di protocolli individualizzati per ogni singolo paziente [2, 5].

Lo scopo della RT è il cosiddetto controllo locale del tumore (*Local Tumour Control*, LTC) che consiste nella sua regressione totale. Ad un dato livello di LTC corrisponde una *tumour control probability*, (TCP). L'irraggiamento del tumore non può avvenire senza quello del tessuto sano limitrofo che, a causa di tale esposizione, risente di effetti indesiderati che possono essere blandi e privi di conseguenze ma anche potenzialmente deleteri. Il primo scienziato a presentare un'analisi della relazione dose-risposta sia per il tumore che per il tessuto sano fu Hermann Holthusen, il quale pose le prime basi per l'ottimizzazione della RT. Egli dimostrò, già nel 1936, analizzando dati clinici, che le curve dose-risposta sia per il TCP che per la probabilità di complicazioni al tessuto sano (*normal-tissue complication probability*, NTCP) esibiscono un andamento a sigmoide, e ne diede un'interpretazione in termini probabilistici (fig. 6) [2, 5].

1 Una condizione di ipossia si ha quando l'afflusso di sangue in un tessuto è insufficiente a garantire la giusta tensione di ossigeno necessaria a soddisfare le richieste metaboliche delle cellule che lo compongono, in generale le cellule ipossiche sono più radioresistenti rispetto a quando sono ben ossigenate. Molti tumori sono caratterizzati da un'elevata frazione di cellule ipossiche.

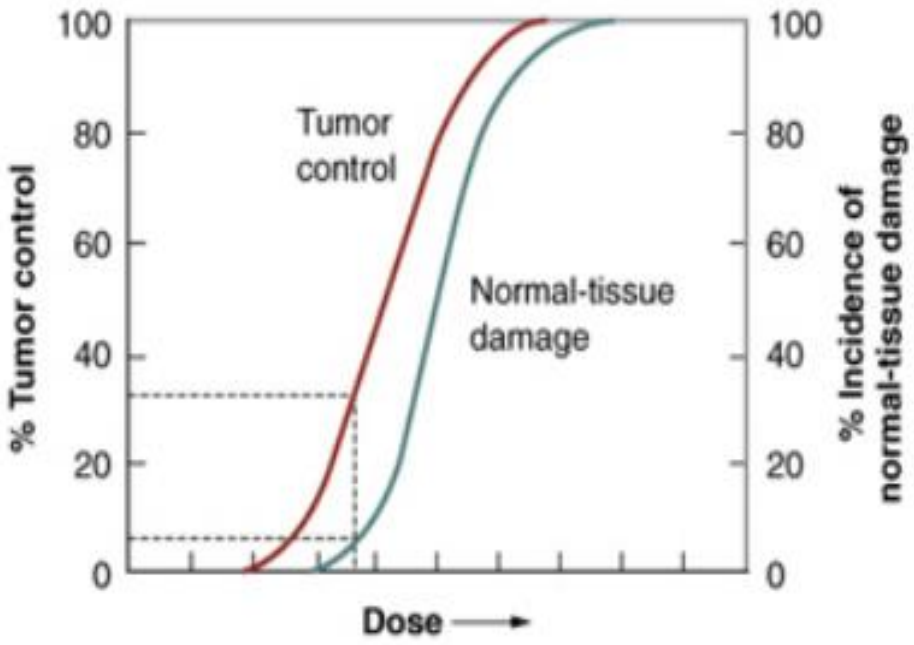

Figura 6: Curve a sigmoide della TCP ed NTCP.

Le complicazioni vengono, in genere, valutate in termini di cambiamento nell'efficienza funzionale di uno specifico tessuto o organo. L'esito favorevole di un piano di trattamento deve tenere conto delle TCP e NTCP: quanto più distanti tra di loro saranno le due sigmoidi, più il protocollo radioterapico avrà una probabilità di LTC significativamente alta con un livello accettabile di complicazioni. Per questo motivo, è importante la ricerca di strategie atte ad aumentare la distanza tra le due sigmoidi, ossia di allargare quella che si definisce "finestra terapeutica" [4, 5].

I quattro concetti, che sono poi dei pilastri, su cui si basa la RT così come la conosciamo oggi sono indicati come le 4-R della radiobiologia clinica: "Riparo del danno subletale", "Riossigenazione del tumore", "Ridistribuzione delle cellule nelle fasi del ciclo cellulare", "Ripopolamento". Essi furono introdotti da Withers nel 1975, e rappresentano dei fenomeni osservati e studiati radiobiologicamente e che hanno delle ripercussioni sul frazionamento in RT. In questo contesto, per "Riparo del danno subletale" si intende il recupero della capacità clonogenica delle cellule, quando, post esposizione, esse vengano lasciate proliferare. Per "Riossigenazione" si intende il fenomeno secondo cui, di solito, un tumore che ha raggiunto una dimensione significativamente grande esercita una pressione sulle cellule più interne, causando il collassamento dei capillari e delle vene sotto il peso della massa tumorale stessa. Ciò comporta che la parte centrale del tumore sia ipossica e, in quanto tale, più radioresistente. Una frazione di dose, uccidendo le cellule tumorali (*cell killing*) più esterne, permette di diminuire la pressione,

favorendo il fenomeno della neo-vascolarizzazione, la quale riossigena le cellule tumorali più esterne rendendole meno radioresistenti.

Le cellule di un tessuto sono generalmente distribuite uniformemente nelle diverse fasi del ciclo cellulare; le fasi G2 e M sono le più radiosensibili, seguite dalla G1 e dalla fase S, che è la più radioresistente. Ad ogni frazione moriranno quindi prevalentemente le cellule nella fase più radiosensibile: ciò è alla base della "Ridistribuzione". Il "Ripopolamento" avviene tra una frazione e l'altra durante la radioterapia e comporta il rischio che le cellule tumorali sopravvissute ad una certa frazione ripopolino il tumore se la distanza temporale fra una frazione e la successiva è troppo ampia, da cui seguirebbe la necessità di incrementare la dose totale cumulativa finale [2, 4, 5].

Riassumendo, non tutte le 4-R sono favorevoli dal punto di vista del *cell killing,* quindi del controllo locale del tumore; tuttavia, il "Riparo" è necessario per il risparmio del tessuto sano. Inoltre, frazionare la dose aumenta il danno al tumore per effetto della "Riossigenazione" e della "Ridistribuzione" delle cellule nel ciclo cellulare. Trovare il giusto bilanciamento tra i fenomeni delle 4-R è fondamentale nell'ottimizzazione dei protocolli clinici. In genere, si parla di *dose optimum* per indicare la dose che massimizza TCP, e minimizza il più possibile NTCP: al fine di bilanciare l'efficacia del trattamento del tumore preservando il tessuto sano. Come anticipato, nella maggior parte dei casi, le due sigmoidi risultano essere troppo poco distanti l'una dall'altra per definire un *dose optimum*: di fondamentale importanza è, quindi, allargare la finestra terapeutica

1.2.1 Effetti indesiderati

Ottenere curve dose-effetto per gli effetti deterministi ai tessuti sani non è semplice, poiché le cellule dei tessuti normali non sono indipendenti le une dalle altre, ma integrate in una architettura complessa. Ciò comporta un bilancio tra cellule che proliferano, che differenziano e che muoiono, il che assicura un'omeostasi tissutale. Inoltre, ogni tessuto ha una cinetica di rigenerazione che differisce da quella degli altri tessuti [2].

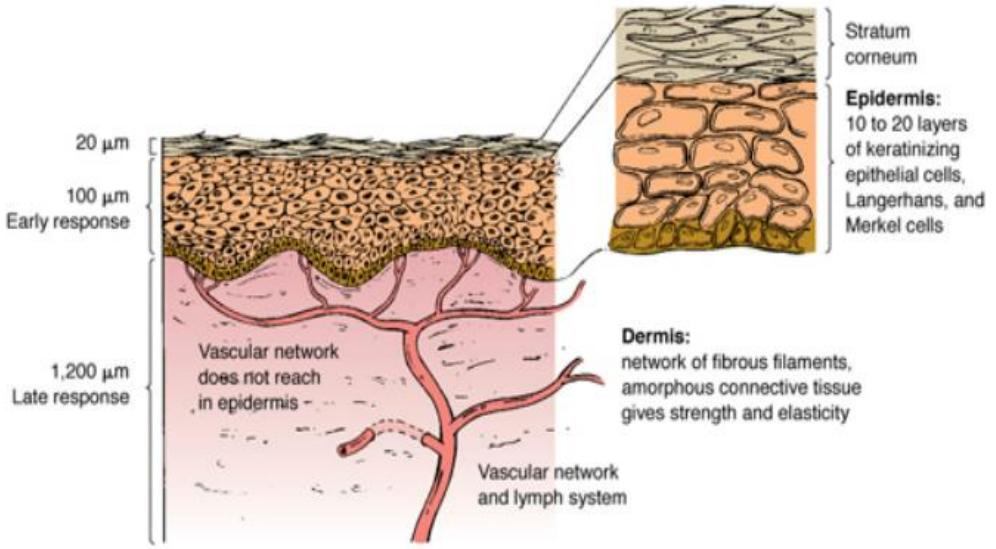

Figura 7: Rappresentazione dell'epidermide e del derma.

In riferimento alla pelle (fig. 7), essa si compone di due tessuti: l'epidermide, che è composta per la maggior parte da cheratinociti, e il derma, un denso tessuto connettivo ricco di collagene ed elastina (prodotti dai fibroblasti) che conferisce resistenza agli sforzi ed elasticità. Nel derma c'è inoltre una fitta rete di vasi sanguigni. Il tessuto dell'epidermide è classificato secondo un modello gerarchico ed è capace di rigenerarsi. Nello strato basale (che si trova più in profondità) c'è un compartimento di cheratinociti staminali indifferenziati, che hanno un'illimitata capacità proliferativa. I cheratinociti prodotti nello strato basale subiscono una citomorfosi cornea, che li porta a modificarsi nel transito dallo strato più interno verso quello più esterno: infatti, essi diventano cheratinociti maturi differenziati e, infine, raggiungono lo strato corneo, in cui perdono i loro nuclei ed organelli diventando dei corneociti, e vengono poi persi per desquamazione. In genere, l'epidermide è il sito delle reazioni acute alla radiazione, mentre il derma di quelle tardive. Entro poche ore dall'esposizione ad una dose singola superiore ai 5 Gy si verificano eritemi simili a scottature solari che sono dovute a vasodilatazione, edema, e perdita dei costituenti plasmatici dai capillari. Per dosi superiori ai 10 Gy, a livello dell'epidermide e dopo 10 giorni dall'irraggiamento (latenza che non dipende dalla dose), compaiono desquamazioni secche, mentre per dosi superiori 15 Gy, desquamazione umida. La severità di questi due effetti dipende dalla dose.

Questi effetti non sono dovuti alla morte di tutte le cellule che compongono l'epidermide, ma a quella delle cellule staminali basali, capaci di rigenerare il tessuto. Infatti, in tal caso le cellule che hanno intrapreso la via della differenziazione non verranno sostituite e a distanza di giorni si avrà un depauperamento dell'epidermide. Gli effetti acuti, cioè precoci, sono in genere reversibili, in quanto le lesioni possono essere rimarginate dalla proliferazione delle cellule staminali circostanti, ma il tempo di recupero dipende dalla dose; essi,

inoltre, sono tipicamente a soglia perché, al di sotto di una certa dose, le cellule staminali che muoiono vengono sostituite facilmente.

Gli effetti tardivi sono più gravi di quelli precoci, in quanto irreversibili: la pelle diventa sottile e fragile e si verifica teleangectasia nei capillari: questi effetti sono dovuti a danni vascolari e alla morte cellulare: la morte dei fibroblasti, per esempio, compromette la struttura del derma, che perde resistenza ed elasticità. Inoltre, se il rilascio di dose avviene maggiormente in profondità (come nel caso di raggi x o γ di alta energia), c'è il rischio di effetti al tessuto sottocutaneo, quali fibrosi e atrofia.

Nel contesto radioterapico, quando venivano utilizzate macchine ad ortovoltaggio (e dunque si irraggiava con fotoni di bassa energia), la distribuzione di dose seguiva un andamento decrescente con la profondità di penetrazione; dunque, non si aveva un risparmio dei tessuti superficiali, come l'epidermide; quindi, il piano di trattamento era limitato dagli effetti acuti. Ad oggi, con l'avvento delle macchine a megavoltaggio è possibile irraggiare con fotoni ad energie più elevate, caratterizzati dal fenomeno del *build up*[2], che preserva il tessuto in superfice. Inoltre, il regime frazionato adottato nei moderni piani terapeutici consente il recupero, tra una frazione e l'altra, dalle reazioni acute che si verificano nell'epidermide.

Per questi motivi, ad oggi, la scelta del *dose optimum* in un piano di trattamento è limitata dai possibili effetti tardivi, più che da quelli acuti. [2].

1.3 Effetti del particolato atmosferico ($PM_{2.5}$)

Gli inquinanti atmosferici sono nocivi per la salute. Molte delle malattie dovute a tali inquinanti sono associate all'esposizione ad un loro componente costitutivo, il particolato atmosferico (PM).

In questa disanima, ci si soffermerà sulla definizione, pericolosità ed effetti cellulari del PM, con un focus particolare sull'azione che esso ha sulle cellule della pelle.

Il PM non è definibile come singolo inquinante, bensì è una miscela di molte specie chimiche (composta di particelle di liquido, frammenti solidi e nuclei solidi idratati) dispersa nell'aria, nota come aerosol atmosferico. Le particelle che compongono il PM variano in dimensione, forma e composizione chimica e possono contenere ioni inorganici, metalli, carbonio elementare, composti del carbonio organico [8].

La composizione chimica, le dimensioni, le proprietà biologiche e fisiche del particolato variano con la regione geografica, in quanto varia il tipo di sorgente

[2] Il fenomeno del Build Up è quello per il quale il profilo Dose-Profondità di penetrazione presenta una fase crescente, il raggiungimento di un massimo, e una fase decrescente tipica, del processo di attenuazione dei fotoni. Tale fenomeno è caratteristico dei fotoni altamente energetici (dai MeV in su) ed è dovuto all'accumulo di elettroni secondari (che sono i mediatori della dose), messi in moto dai fotoni. Il massimo di dose si ha alle profondità tipiche del range degli elettroni secondari (circa qualche millimetro).

inquinante, nonché con la stagione, in quanto variano le condizioni ambientali [8]; quindi, il particolato ha una natura mutevole in continua evoluzione, perché esso subisce nell'atmosfera continue trasformazioni chimiche e fisiche che ne rendono difficile una definizione sistematica [8]. Per questi motivi, il PM è classificato in base alle proprietà aerodinamiche che queste ne determinano la capacità di trasportarsi nell'aria da un luogo ad un altro nonché la capacità di accumularsi nelle vie respiratorie [9].

Il PM è classificato secondo la Direttiva 2008/50/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 21 maggio 2008 in "PM_{10}" e "$PM_{2.5}$". In tale classificazione, il $PM_{2.5}$ è il materiale particolato che penetra attraverso un ingresso dimensionale selettivo, conforme al metodo di riferimento, per il campionamento e misurazione del $PM_{2.5}$, norma EN 14907, con un'efficienza di penetrazione del 50% per materiale particolato di diametro aerodinamico di 2.5 µm [5]. Spesso, però, per semplificare, ci si riferisce al $PM_{2.5}$ come la frazione di particelle con diametro uguale o inferiore a 2.5 µm. Definizioni simili si hanno per il PM_{10} [3]. In definitiva, il PM si compone di PM_{10} (anche detto particolato grossolano), $PM_{2.5}$ (particolato fine) e negli studi più recenti è stato necessario definire anche il $PM_{0.1}$ (particolato ultrafine, di diametro uguale o inferiore a 100 nm) (fig. 8) [9].

Figura 8: Confronto tra le dimensioni di un capello, di un granello di sabbia, del particolato grossolano e del particolato fine.

Le fonti da cui si origina il particolato $PM_{2.5}$ sono in genere antropiche, e spesso riguardano i processi di combustione (tra cui quelli che avvengono nei motori a scoppio, negli impianti di riscaldamento, in molte attività industriali, negli inceneritori e nelle centrali termoelettriche). Invece, la componente PM_{10} consiste

principalmente in materiale della crosta terrestre, sale marino, una componente biologica (batteri), e frammenti di polline: essa è generata da processi meccanici [10].

In un campione di PM, il contributo di massa maggiore è dato dal $PM_{2.5,}$ mentre il più alto numero di particelle è di $PM_{0.1}$ [10].

In base a quanto detto in precedenza, una microparticella di $PM_{2.5}$ può essere vista come un nucleo di carbonio ricoperto di idrocarburi, ioni metallici ed in seconda battuta nitrati e solfati, sulla cui superficie vengono adsorbiti composti tossici come gli idrocarburi aromatici policiclici (IPA), composti organici volatili e metalli di transizione [8].

In genere, la pericolosità aumenta al diminuire delle dimensioni del particolato, perché aumenta la capacità dello stesso di penetrare e depositarsi lungo le vie respiratorie, sempre più in profondità: ad esempio, il $PM_{2.5}$ è in grado di infiltrarsi a livello dei bronchioli e degli alveoli polmonari e da lì immettersi nella circolazione sanguigna, per poi raggiungere altri organi. Inoltre, si ritiene che il $PM_{2.5}$ possa penetrare gli strati interni della pelle attraverso i follicoli piliferi (fig. 9). Quindi, secondo questa visione, il $PM_{2.5}$ sarebbe in grado, superando le barriere dei corneociti o attraverso il flusso sanguigno, di raggiungere le cellule dell'epidermide e del derma ed indurre in esse effetti biologici [10].

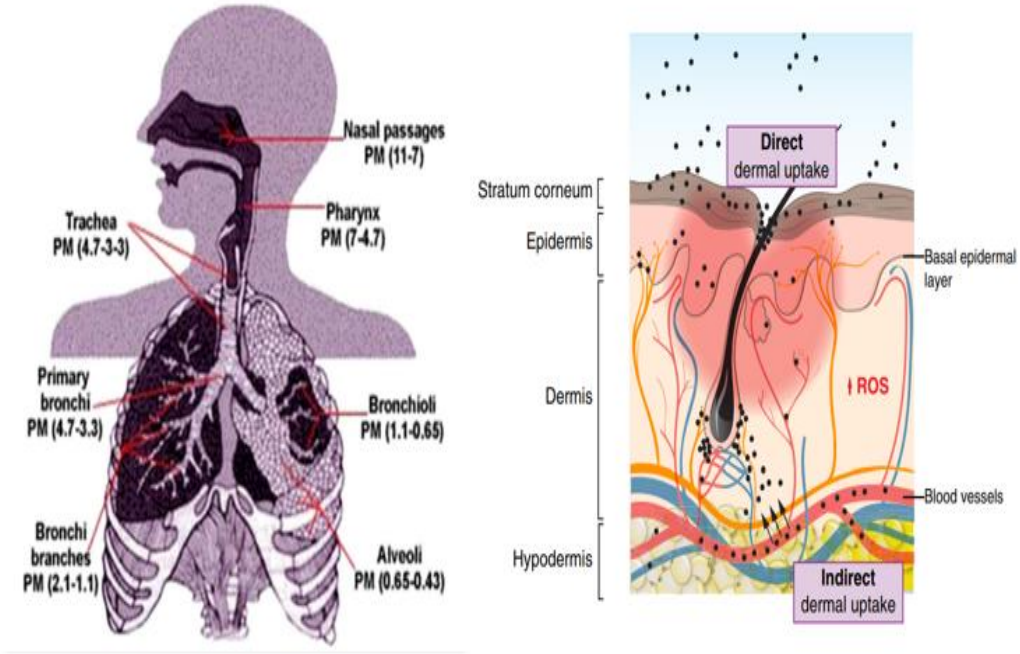

Figura 9: A sinistra: Incorporazione differenziale del PM nelle vie respiratorie al variare delle dimensioni del particolato. A destra: incorporazione del PM a livello della cute sia per infiltrazione lungo i follicoli piliferi sia attraverso i vasi sanguigni.

Mentre i dati che mostrano una correlazione tra malattie cardiovascolari e respiratorie con l'esposizione al $PM_{2.5}$ sono statisticamente robusti, non c'è ancora sufficiente evidenza epidemiologica e clinica di una correlazione tra incidenza di malattie della pelle ed esposizione al $PM_{2.5}$, eccetto per le dermatiti atopiche (AD) [10].

Gli studi epidemiologici sull'esposizione della pelle al $PM_{2.5}$ sono ancora esigui; tuttavia, in letteratura sono presenti molti studi sul modello cutaneo, effettuati in vitro (2D e 3D), ex vivo, nonché in vivo: essi mostrano potenziali effetti avversi a livello cutaneo in seguito all'esposizione al PM. Gli studi in vitro 2D hanno riguardato sia le cellule dell'epidermide, come le *human adult low calcium high temperature (HaCaT)* e le *normal human epidermal keratinocytes (NHEK)* che sono cellule del derma, come le *normal human dermal fibroblasts (NHDF)*. In questi studi le cellule venivano fatte crescere aggiungendo direttamente il $PM_{2.5}$ al mezzo di coltura: tale modalità di esposizione è nota come *Systemic Treatment.* I modelli 3D sono più complessi, però meglio riproducono le caratteristiche della pelle. I modelli 2D e 3D in genere sono preferiti ai modelli in vivo perché hanno costi inferiori, sono più comodi e pratici e non vanno incontro a problemi etici.

In suddetti studi, in particolare, sono stati esaminati dei biomarcatori per la compromissione della funzionalità della pelle come barriera fisica sia dalla prospettiva *outside-in* (dall'esterno verso l'interno) che *inside-out* (dall'interno verno l'esterno). In questi studi si è osservato che i livelli di proteine essenziali per la maturazione e differenziazione dell'epidermide quali filaggrina, involucrina e cheratina vengono alterati. Inoltre, si è visto che le giunzioni occludenti, cioè quelle che chiudono gli interstizi tra le cellule negli epiteli trasformando lo strato di cellule in una barriera impermeabile, vengono degradate [10].

Un altro effetto riscontrato, forse quello più importante, è l'aumento dei livelli di specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) intracellulari. I ROS sono dei radicali liberi, ovvero specie chimiche altamente reattive derivanti dal metabolismo dell'ossigeno e caratterizzate dalla presenza di un elettrone spaiato. Tre sono le vie suggerite che portano alla formazione di ROS [10]:

1. Sulla superficie delle microparticelle, per via della loro elevata reattività superficiale (che è correlata alle dimensioni e alle specie chimiche adsorbite sulla loro superficie), si formano i radicali liberi quali il superossido $O_2^{\cdot-}$, l'ossidrile $^{\cdot}OH$ e il perossido di idrogeno H_2O_2 (anch'esso coinvolto in molte reazioni chimiche con i radicali liberi). Questa è una sorgente esogena di ROS;
2. I metalli di transizione solubili adsorbiti dal particolato sono in grado, quando incorporati nella cellula, di catalizzare la formazione di ROS tramite una reazione di Fenton;
3. Il particolato induce danno mitocondriale compromettendone la funzionalità con rilascio di superossido $O_2^{\cdot-}$: il mitocondrio, infatti, è considerato la principale sorgente endogena di ROS.

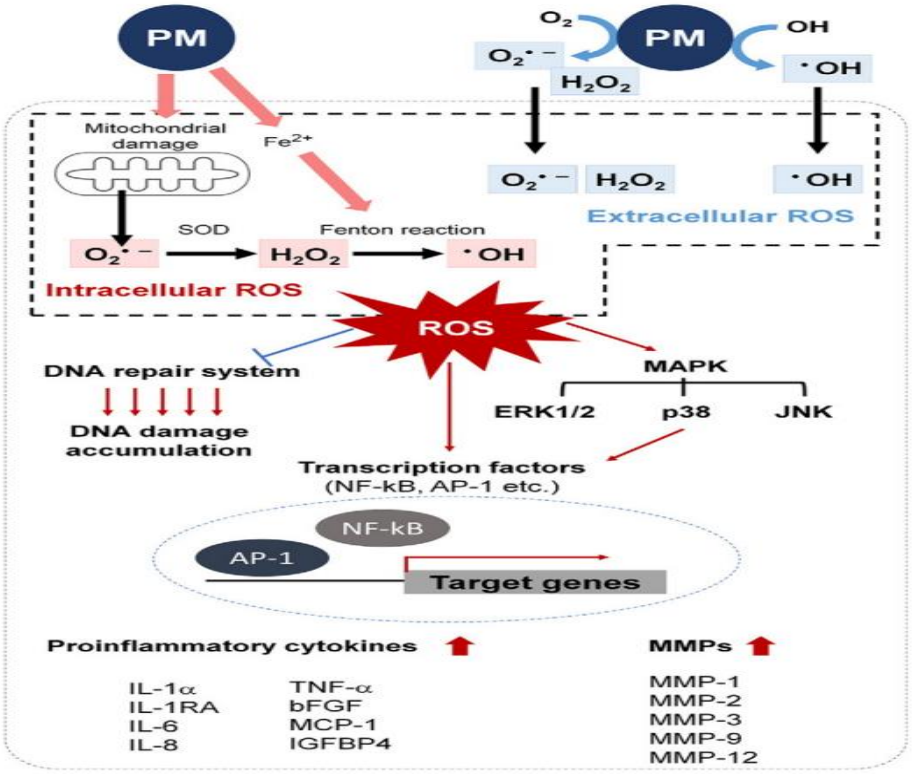

Figura 10: Effetti a livello cellulare del PM2.5

Il $PM_{2.5}$ è in grado di attivare gli enzimi *Nicodinamide adenin e dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase* (NOX) che generano alti livelli di ROS.

Oltre all'aumento del livello di ROS, si ha una stimolazione dei meccanismi cellulari antiossidanti, in particolare varia l'attività del fattore di trascrizione *erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) e cambiano i livelli enzimatici del Superossi-Dismutasi (SOD), del *Glutathione S-transferase* (GST), del *Glutathione peroxidase* (GSH-Px) e della Catalasi (CAT) [8, 10].

La condizione sopra descritta, in cui i livelli di ROS superano le difese antiossidanti della cellula, è definita stress ossidativo. Tipicamente, lo stress ossidativo causa la perossidazione di lipidi, danni a proteine e al DNA, danni ai mitocondri e stress al reticolo endoplasmatico e ad altri organelli ed è inoltre coinvolto nell'induzione di apoptosi e senescenza, inficiando l'omeostasi tissutale e causando un invecchiamento precoce della pelle [10]. In particolare, è stato osservato che i livelli di ROS intracellulare mostrano un aumento sostanziale dopo 30 minuti da un trattamento con il $PM_{2.5}$ alla concentrazione di 50 µg/ml per la durata di 24 ore.

Infine, le cellule della pelle, tra cui cheratinociti e fibroblasti, hanno dei recettori sensibili alle sostanze chimiche esogene che sono importanti nello stimolare la risposta immunitaria. Uno di essi è *aryl hydrocarbon receptor (AhR)*, un fattore di trascrizione che gioca un ruolo anche nel mantenimento dell'integrità della barriera cutanea. Il $PM_{2.5}$ quindi causerebbe la sua attivazione a seguito della quale vengono

espressi enzimi appartenenti alla famiglia *Cytochromes P450* (CYP) che metabolizzano gli Idrocarburi Aromatici Policiclici (IPA). Tali metaboliti danneggiano il DNA e sono di fatto gli artefici del potenziale cancerogeno degli IPA. Un'altra famiglia di recettori che riconoscono gli agenti patogeni sono quelli della famiglia *Toll-like receptor (TLR)*. Il $PM_{2.5}$ legandosi ad alcuni degli TLRs attivano il fattore di trascrizione *nuclear factor kappa B (NF-kB)* e membri della famiglia *mitogen-activated protein kinase (MAPK).* Il NF-kB regola l'espressione di geni coinvolti in vari processi della risposta infiammatoria e l'espressione di citochine pro-infiammatorie quali le interleuchine IL-1α, IL-1β, IL6 e IL8, le molecole di adesione intercellulare ICAM1, il fattore di necrosi tumorale TNF-α ed enzimi quali il *cyclooxygenase* (COX2). L'attivazione di MAPK porta alla fosforilazione di ERK, JNK e p38 ed induce il fattore di trascrizione AP-1 a traslocare nel nucleo. Ciò causa la trascrizione delle *matrix metalloproteinases (MMPs).* Le MMPs sono adibite al rimodellamento della matrice extracellulare (ECM) ed una loro sovra espressione ne altererebbe la struttura (fig. 10) [10].

Questa lista di effetti osservati a livello sperimentale sulle cellule cutanee induce ad ipotizzare che il $PM_{2.5}$ possa essere un possibile candidato come iniziatore nonché promotore tumorale. Comunque, è da dire che gran parte di questi studi hanno riguardato modelli 2D e 3D, ma questa è una condizione di esposizione che non si verifica nella realtà. Infatti, già in modelli 3-D che si avvicinano di più all'architettura tissutale della pelle la gravità di questi effetti è inferiore.

1.4 Esposizione combinata a radiazione ionizzante e PM2.5

Lo studio dell'esposizione combinata a radiazione ionizzante e $PM_{2.5}$ è del tutto inedito. L'esigenza di approfondirlo nasce dall'interesse di valutare i rischi per chi vive nei grandi agglomerati urbani, ed è di conseguenza esposto fin dalla nascita in modo cronico allo smog. Evidenze di laboratorio evidenziano che il $PM_{2.5}$ ha importanti effetti a livello cellulare. Suddetti studi, però, erano indirizzati principalmente ad evidenziare gli effetti del PM in maniera generica: nello specifico, non sono state costruite curve dose-risposta per l'azione del $PM_{2.5}$, e, tantomeno, in riferimento al *Systematic Treatment*, è stata definita una dose espressa in μg/ml che fosse di isoeffetto rispetto all'esposizione tra PM e pelle così come avviene nel mondo reale.

Altra problematica riguarda la tempistica di esposizione: bisogna, cioè, stabilire per quanto tempo fare agire il PM e stabilire dopo quanto tempo dalla fine del trattamento con il PM somministrare la dose di radiazione al fine di massimizzare un eventuale effetto. Inoltre, pur avendo una curva dose-risposta resta il problema di come interpretarla in quanto non si hanno ancora conoscenze certe sulla modalità

di interazione. L'unico punto fermo è che si conosce il modo di ottenere curve dose-risposta per la RI (es. saggio clonogenico) e come interpretarle.

In questo lavoro di tesi sono stati valutati gli effetti dose-risposta della co-esposizione a RI e PM mediante il saggio dei MN in cellule HaCaT.

Capitolo 2: Materiali e metodi

2.1 Piano sperimentale

Questo lavoro di tesi si è concentrato sulla genotossicità indotta in cellule HaCaT in seguito all'esposizione combinata al particolato fine e alla radiazione ionizzante mediante il saggio *Cytokinesis-block micronucleus assay* (CBMN). La modalità di esposizione al $PM_{2.5}$ scelta è denominata *Systemic Treatment* e consiste nel disciogliere il $PM_{2.5}$ in una soluzione solvente e aggiungere questa direttamente al mezzo di coltura, nelle *flask* in cui le cellule crescono. Questa modalità è stata scelta in quanto il $PM_{2.5}$ si è mostrato insolubile e, disciolto nel solo mezzo di coltura, tende a formare precipitati ed aggregati.
Sono stati provati vari solventi (vettori), tutti noti in letteratura per la loro proprietà di minimizzare aggregati. In particolare, sono state costituite tre soluzioni solvente nel modo descritto in tabella:

VETTORE	$PM_{2.5}$ (mg)	DMSO (ml)	PEG Solution (ml)	Concentrazione STOCK (mg/ml)
A	13	8		1,6
B	6		3	2
C	5	0,5	2	2

Tabella 1: Costituzione delle tre soluzioni solvente (vettori) utilizzati in questo lavoro di tesi.

Il dimetilsolfossido puro, o DMSO, è stato scelto come vettore portante per la costituzione del vettore A. Il vettore B è stato costituito con la sola soluzione in polietilenglicol (PEG) mentre il vettore C con la soluzione PEG e con il DMSO in rapporto 4:1. La soluzione PEG utilizzata per i vettori B e C è disponibile commercialmente e contiene il 50% (w/v) di *polyethylene glycol* (Av. Mol. Wt. 1450) e il 10% di DMSO (v/v) in DPBS senza calcio. Al fine di minimizzare la formazione di aggregati all'interno delle soluzioni è stato deciso, inoltre, di sottoporre a sonicazione per almeno 20 minuti le soluzioni vettore-$PM_{2.5}$ prima di ogni esposizione.

Lo studio si compone di una parte preliminare, che consiste in:

- un test di contaminazione;
- osservazioni del comportamento delle cellule esposte al solo vettore A;
- l'ottimizzazione delle condizioni sperimentali per il CBMN;
- l'analisi di un campione cellulare non esposto a radiazione ma pretrattato con il $PM_{2.5}$ dissolto nei vettori B e C.

Successivamente, sono stati effettuati due esperimenti di co-esposizione: nel primo, le cellule sono state trattate con il vettore A (DMSO) ed irraggiate con il tubo ad ortovoltaggio sito presso il Laboratorio di Biofisica delle Radiazioni del Dipartimento di Fisica E. Pancini, presso il quale sono state anche effettuate tutte le preparazioni del campione cellulare; per il secondo, invece, sono stati utilizzati i vettori B e C e l'irraggiamento è avvenuto presso l'Istituto Nazionale Tumori, "Fondazione Pascale", con fotoni clinici da 6 MV.

2.1.1 Sistema cellulare

La linea cellulare umana HaCaT deriva dall'epitelio (cheratinociti), conserva piene capacità di differenziazione ed ha un fenotipo trasformato, che la rende immortalizzata senza però manifestare proprietà tumorigeniche. Il mezzo di coltura delle HaCaT è il DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) con 10% di *horse serum*, 1 % P/S (Penicillin-Streptomycin), 1% L-Glutamine. Le cellule sono state mantenute in condizioni fisiologiche a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO_2.

2.1.2 Caratteristiche del $PM_{2.5}$

Il $PM_{2.5}$ utilizzato è un prodotto commercialmente noto come *Fine Dust* (*$PM_{2.5}$-Like*), acquistato dalla Merck, ed è un surrogato del particolato fine atmosferico, inquinante presente nell'aria dei grandi agglomerati urbani.

2.2 Osservazioni ed esperimenti preliminari

Gli studi preliminari hanno verificato l'assenza di eventuale contaminazione batterica dovuta all'esposizione al *Fine Dust*. Successivamente, è stato osservato il comportamento delle cellule HaCaT esposte al solo vettore A in presenza e in assenza di *Fine Dust*. Infine, è stata ottimizzata l'efficienza di binucleazione indotta dalla Citocalasina B, l'agente usato nel saggio CBMN.

2.2.1 Test di contaminazione

In una *flask* T25 con cellule adese sono stati aggiunti 123,1 µl di soluzione A così da ottenere una concentrazione finale di 50 µg/ml in un volume di 4 ml di mezzo di coltura. Le cellule sono state monitorate al microscopio ottico per alcuni giorni (il numero di cellule iniziale era basso così da non raggiungere la confluenza entro la fine delle osservazioni), al fine di osservare eventuali contaminazioni, a causa della non sterilità del prodotto *Fine Dust*.

2.2.2 Scelta della concentrazione del $PM_{2.5}$

Sono state effettuate osservazioni qualitative di cellule esposte al *Fine Dust* dissolto nel vettore A, al fine di valutarne la cito-tossicità nonché qualsiasi altro effetto attribuibile al solo DMSO, rispetto ad un controllo di cellule non esposte. Le HaCaT sono state seminate in flask T25 (250000 cellule/*flask*), in un volume di mezzo di coltura di 4 ml. A partire dai campioni così costituiti, in 5 *flask* sono stati aggiunti (sostituendoli a pari quantità di mezzo di coltura) volumi di soluzione A necessari per ottenere una concentrazione finale di PM pari a 10, 25, 50, 75, 100 µg/ml nel mezzo di coltura; gli stessi volumi di solo vettore A, sono stati sostituiti al mezzo in altre 5 *flask*; infine, una *flask* è stata utilizzata come controllo non trattato. Le cellule sono state osservate con il microscopio ottico dopo 24 ore dall'inizio dell'esposizione e trattate con il *Trypan blue*, una sostanza che penetra nelle cellule la cui membrana è stata irreversibilmente danneggiata, ossia cellule morte.

2.2.3 Ottimizzazione della resa di binucleazione per il saggio dei micronuclei (CBMN)

Al fine di ottimizzare la resa di binucleazione delle cellule HaCaT in risposta alla CB sono state investigate due concentrazioni di CB: 1,5 µg/ml e 3 µg/ml. Ciascuna concentrazione è stata fatta agire sia per 24 che per 48 ore, per un totale di 4 campioni. Sono state seminate circa 15000 cellule in 4 *slide flask*. In particolare, da una stock alla concentrazione di 5 mg/ml di CB sono stati prelevati 0,9 µl e 1,8 µl (corrispondenti a 1,5 µg/ml e 3 µg/ml), da aggiungere al mezzo di coltura nelle *slide flask*, per un volume finale di 3 ml. Trascorso il tempo di esposizione, le cellule sono stati fissate con Carnoy (una soluzione 4:1 di metanolo e acido acetico), preraffreddato a –20 °C per 30 minuti. Il trattamento è stato effettuato sciacquando con PBS le slide flask, ed aggiungendo il Carnoy facendolo agire per 20 minuti a -20 °C. Le *slide flask* sono state poi fatte asciugare a temperatura ambiente per 24 h, prima di essere sottoposte al colorante DAPI. L'analisi è stata condotta mediante un microscopio a fluorescenza Axioplan 2 Imaging della Zeiss utilizzando un obiettivo 40X.

In base ai risultati (vedi cap.3) è stato deciso di utilizzare in tutti gli esperimenti 1,5 µg/ml.

2.3 Protocollo di coesposizione a RI e al $PM_{2.5}$ e preparazione dei vetrini per il saggio CBMN

I due esperimenti di co-esposizione a RI e *Fine Dust* sono stati effettuati in periodi diversi: il primo ha previsto un irraggiamento con il tubo ad ortovoltaggio in

dotazione al Laboratorio di Biofisica, Dipartimento di Fisica "E. Pancini", Università di Napoli Federico II.; il secondo irraggiamento è avvenuto con fotoni clinici presso la Fondazione Pascale. Il protocollo, identico per i due irraggiamenti, è il seguente:

Giorno 1: le HaCaT sono state inoculate in slide flasks (20000 cellule/*slide flask*); dopo alcune ore, una volta adese, le cellule sono state esposte al *Fine Dust* per 24 h. Ogni soluzione è stata sottoposta a sonicazione per almeno 20 minuti prima del suo utilizzo.

Giorno 2: le *slide flask* sono state esposte alle dosi di 0, 0.5, 2, 4 Gy. Subito dopo, alle cellule è stata somministrata la CB alla concentrazione determinata dalle prove sopra descritte (1,5 µg/ml).

Giorno 3: sono stati fissati i vetrini con Carnoy come descritto in precedenza.

Giorno 4: i vetrini sono stati controcolorati con DAPI.

L'analisi dei micronuclei è stata effettuata con il microscopio a fluorescenza sopra menzionato.

2.3.1 Dettagli esperimento 1

Nel primo esperimento per somministrare il PM è stato usato il vettore A: sono state seminate le HaCaT in 12 *slide flask* (20000 cellule/*slide flask*), etichettate secondo la seguente tabella:

Campione	Descrizione	Dose (Gy)
Controllo	Cellule HaCat cresciute solo nel loro medium	**0; 0.5; 2; 4**
DMSO	Cellule HaCat cresciute nel loro medium con aggiunta del vettore A	
DMSO+PM	Cellule HaCat cresciute nel loro medium esposte al Fine Dust dissolto in vettore A	

Tabella 2: Descrizione dei campioni utilizzati nel primo esperimento di co-esposizione.

La concentrazione di *Fine Dust* adoperata è pari a 25 µg/ml, ottenuta aggiungendo un volume equivalente di soluzione A sostituendolo a pari quantità di mezzo di coltura con volume finale in *slide flask* di 3 ml, come sotto schematizzato:

VETTORE A				
Cstock (mg/ml)	Volume finale (ml)	Concentrazione finale (µg/ml)	Volume equivalente (µl)	DMSO %v/v
1,6	3,0	25,0	46,2	1,5

Tabella 3: Schema di esposizione al Fine Dust dissolto nel vettore A; DMSO %v/v è la percentuale in volume finale di DMSO in slide flask.

2.3.2 Dettagli esperimento 2

Per il secondo esperimento, invece, sono stati usati i vettori B e C e seminate le HaCaT in 20 *slide flasks* (20000 cellule/*slide flask*) etichettate come segue:

Campione	Descrizione	Dose (Gy)
Controllo	Cellule HaCat cresciute solo nel loro medium	**0; 0.5; 2; 4**
PEG	Cellule HaCat cresciute nel loro medium con aggiunta del vettore B	
PEG+DMSO	Cellule HaCat cresciute nel loro medium con aggiunta del vettore C	
PEG+PM	Cellule HaCat cresciute nel loro medium esposte al Fine Dust dissolto in vettore B	
PEG+DMSO+PM	Cellule HaCat cresciute nel loro medium esposte al Fine Dust dissolto in vettore C	

Tabella 4: Descrizione dei campioni utilizzati nel secondo esperimento di co-esposizione.

La concentrazione di *Fine Dust* adoperata è pari a 50 µg/ml, ottenuta nel seguente modo per i vettori B e C rispettivamente (Tabelle 5 e 6):

VETTORE B				
Cstock (mg/ml)	V. finale (ml)	C. finale (µg/ml)	V. eq. di sol. PEG (µl)	DMSO % v/v
2,0	3,0	50,0	75,0	0,25

Tabella 5: Schema di esposizione al Fine Dust dissolto nel vettore B; DMSO %v/v è la percentuale in volume finale di DMSO in slide flask, anche in questo caso diversa da zero (vedi composizione soluzione PEG).

VETTORE C					
Cstock (mg/ml)	V. finale (ml)	C. finale (µg/ml)	V. eq. di sol.PEG (µl)	V. eq. di DMSO (µl)	DMSO % v/v
2,0	3,0	50,0	60,0	15,0	0,70

Tabella 6: Schema di esposizione al Fine Dust dissolto nel vettore C; DMSO %v/v è la percentuale in volume finale di DMSO in slide flask.

Capitolo 3: Risultati

3.1 Risultati esperimenti preliminari

L'esito del test di contaminazione è stato negativo all'osservazione al microscopio ottico; quindi, non è stato necessario adottare procedure per sterilizzare il *Fine Dust*;

Dopo aver esaminato un eventuale effetto biologico (citotossicità) per diverse concentrazioni di *Fine Dust* dissolto nel vettore A, si è deciso di utilizzare la concentrazione di 25 µg/ml nei successivi esperimenti di co-esposizione con la radiazione. Infatti, si è osservato al microscopio ottico che la concentrazione di DMSO è citotossica per le concentrazioni di *Fine Dust* corrispondenti a 50, 75, 100 µg/ml, con un livello di mortalità pressoché totale per i casi 75 e 100 µg/ml e una vitalità parziale a 50 µg/ml; a 25 µg/ml, invece, il livello di vitalità, praticamente confrontabile con quello del campione non trattato, è stato ritenuto accettabile per gli esperimenti con questo vettore.

Infine, i risultati dell'esperimento effettuato al fine di ottimizzare la resa di binucleazione delle cellule HaCaT in risposta alla CB sono stati i seguenti:

CB (µg/ml)	Durata esposizione (h)	Non BN	BN	MN1	MN2	MN3	MN4	MN5	Totale contate	Frequenza MN	Errore Freq. MN	Efficienza BN
3	24	551	422	26	1	0	0	0	1000	0,062	0,011	0,449
1,5	24	495	492	13	0	0	0	0	1000	0,026	0,007	0,505
3	48	483	471	38	5	3	0	0	1000	0,110	0,014	0,517
1,5	48	439	536	24	1	0	0	0	1000	0,046	0,009	0,561

Tabella 7: Esito del conteggio effettuato nell'esperimento per l'ottimizzazione della resa di CB; Non BN= cellule non binucleate; BN= cellule binucleate senza micronuclei; MN1, MN2, MN3, MN4, MN5= cellule binucleate con 1,2,3,4,5 micronuclei rispettivamente;. L'efficienza di binucleazione è stata calcolata come il rapporto fra cellule BN ed il totale delle cellule analizzate, incluse quelle con MN. La frequenza di micronuclei (f) è stata ottenuta con la formula usata nel paragrafo 3.2;

Per scegliere la migliore combinazione di concentrazione di CB e suo tempo d'azione sono stati quindi valutati l'efficienza di binucleazione e la *baseline frequency* di MN (ossia il danno indotto dalla CB). Dai dati riportati in Tabella 7, 1,5 µg/ml di CB fatta agire per 24 ore è stata scelta come combinazione migliore data la relativamente alta efficienza di binucleazione (di fatto inferiore al dato relativo a 48 h), ma risultante nella minore *baseline frequency* in assoluto.

3.2 Risultati esperimento 1

Il danno al DNA, espresso sotto forma di micronuclei (MN), è stato misurato come frequenza di MN (*f*) ovvero come numero medio di micronuclei per cellula.

Essa è stata ottenuta a seguito dell'analisi al microscopio a fluorescenza tramite la seguente formula:

$$f = \frac{MN1+2*MN2+3*MN3+4*MN4+5*MN5}{Totale\ Cellule\ Binucleate}; \quad Errore\ f = \sqrt{\frac{f*(1-f)}{Totale\ Cellule\ Binucleate}};$$

Dove MN1, MN2, MN3, MN4, MN5 rappresentano il numero di cellule binucleate con 1,2,3,4,5 micronuclei rispettivamente. In questo modo viene "pesato" l'ammontare di danno per cellula.

I risultati del primo esperimento sono riassunti nella Tabella sotto e nel Grafico 1

Vettore A, Concentrazione di Fine Dust 25 µg/ml										
DOSE		BM	MN1	MN2	MN3	MN4	MN5	CONTATE	Freq. MN	Err. Freq. MN
0 Gy	Controllo	1177	22	1	0	0	0	1200	0,020	0,004
	DMSO	1159	39	2	0	0	0	1200	0,036	0,005
	DMSO+PM	1144	51	0	1	0	0	1196	0,045	0,006
0,5 Gy	Controllo	700	98	2	0	0	0	800	0,128	0,012
	DMSO	644	56	0	0	0	0	700	0,080	0,010
	DMSO+PM	718	77	5	0	0	0	800	0,109	0,011
2 Gy	Controllo	340	144	14	2	0	0	500	0,356	0,021
	DMSO	379	106	13	2	0	0	500	0,276	0,020
	DMSO+PM	377	99	24	0	0	0	500	0,294	0,020
4 Gy	Controllo	198	203	59	27	8	5	500	0,918	0,012
	DMSO	315	146	26	8	4	1	500	0,486	0,022
	DMSO+PM	333	112	45	7	2	1	500	0,472	0,022

Tabella 8: Dettaglio dell'analisi per il primo esperimento di co-esposizione.

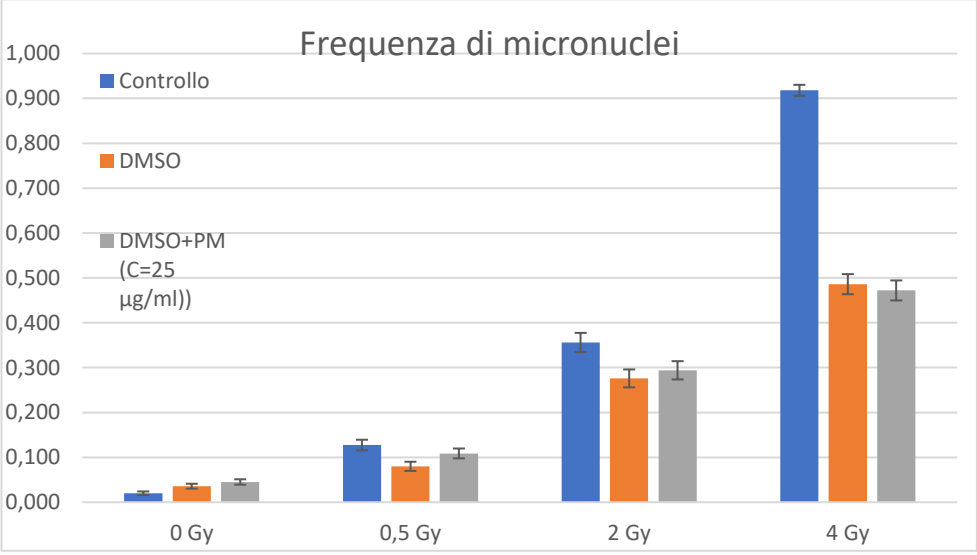

Grafico 1: Rappresentazione grafica dell'analisi riguardante il primo esperimento di co-esposizione.

Da una prima osservazione, risulta molto probabile un effetto radioprotettore del Vettore A (DMSO): per questo motivo, è stato deciso di sostituirlo con il Vettori B, di sola soluzione PEG, e il vettore C, che oltre alla soluzione PEG contiene anche DMSO in rapporto (4:1).

3.3 Risultati esperimento con campioni non irraggiati

Prima di usare i vettori con minore concentrazione di DMSO, è stato necessario valutarne l'eventuale genotossicità in assenza di radiazione. Viene qui pertanto riportato il risultato dell'analisi su campioni non irraggiati, utilizzando i Vettori B e C e una concentrazione di 50 µg/ml di *Fine Dust* (Tabella 9):

		Vettori B e C, Concentrazione 50 µg/ml								
DOSE		BM	MN1	MN2	MN3	MN4	MN5	CONTATE	Freq. MN	Err. Freq. MN
0 Gy	PEG (Vettore B)	950	50	0	0	0	0	1000	0,050	0,007
	PEG+DMSO (Vettore C)	951	46	3	0	0	0	1000	0,052	0,007
	PEG+PM (Vettore B)	891	102	7	0	0	0	1000	0,116	0,010
	PEG+DMSO+PM (Vettore C)	897	101	3	0	0	0	1001	0,107	0,010

Tabella 9: Esito conteggio ed analisi per l'esperimento fatto con i campioni non irraggiati.

I dati di cui sopra possono essere riassunti come segue (Grafico 2):

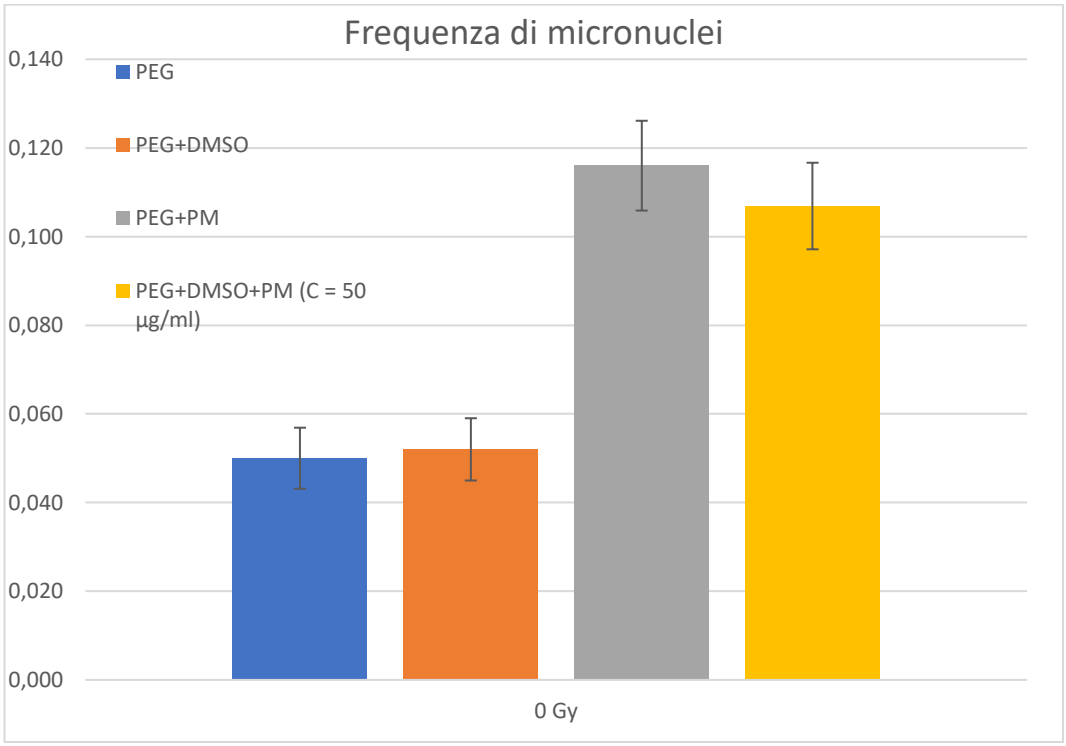

Grafico 2: Rappresentazione grafica dell'analisi riguardante l'esperimento con i campioni non irraggiati.

Si nota che la presenza di PM nei due vettori aumenta la genotossicità rispetto a DMSO e PEG da soli di oltre un fattore 2. Tuttavia, avendo verificato che la presenza del solo DMSO protegge le cellule in presenza di radiazione e PM, si decide di usare comunque questi due vettori per lo studio dell'azione combinata di RI e PM.

3.4 Risultati esperimento 2

Da quanto detto sopra, i vettori B e C basati sul PEG sono stati usati nel secondo esperimento di co-esposizione.

In queste condizioni, i risultati dell'analisi sono (Tabella 10):

Vettori B e C, Concentrazione Fine Dust 50 µg/ml										
DOSE		BM	MN1	MN2	MN3	MN4	MN5	CONTATE	Freq. MN	Err. Freq. MN
0 Gy	Controllo	702	98	0	0	0	0	800	0,123	0,012
	PEG (Vettore B)	682	118	0	0	0	0	800	0,148	0,013
	PEG+DMSO (Vettore C)	690	110	0	0	0	0	800	0,138	0,012
	PEG+PM (Vettore B)	628	172	0	0	0	0	800	0,215	0,015
	PEG+DMSO+PM (Vettore C)	617	179	4	0	0	0	800	0,234	0,015
0,5 Gy	Controllo	664	193	2	0	0	0	859	0,229	0,014
	PEG (Vettore B)	652	136	12	0	0	0	800	0,200	0,014
	PEG+DMSO (Vettore C)	640	157	3	0	0	0	800	0,204	0,014
	PEG+PM (Vettore B)	437	163	0	0	0	0	600	0,272	0,018
	PEG+DMSO+PM (Vettore C)	567	220	13	0	0	0	800	0,308	0,016
2 Gy	Controllo	290	165	38	7	0	0	500	0,524	0,022
	PEG (Vettore B)	285	169	28	15	3	0	500	0,564	0,022
	PEG+DMSO (Vettore C)	307	147	37	8	1	0	500	0,498	0,022
	PEG+PM (Vettore B)	279	170	34	14	2	1	500	0,586	0,022
	PEG+DMSO+PM (Vettore C)	311	148	31	7	3	0	500	0,486	0,022
4 Gy	Controllo	255	150	62	26	5	2	500	0,764	0,019
	PEG (Vettore B)	241	142	76	30	9	2	500	0,860	0,016
	PEG+DMSO (Vettore C)	257	169	53	13	7	1	500	0,694	0,021
	PEG+PM (Vettore B)	268	153	47	26	4	2	500	0,702	0,020
	PEG+DMSO+PM (Vettore C)	241	167	53	19	2	4	486	0,737	0,020

Tabella 10: Esito conteggio ed analisi per il secondo esperimento di co-esposizione

A cui corrisponde il seguente grafico (Grafico 3):

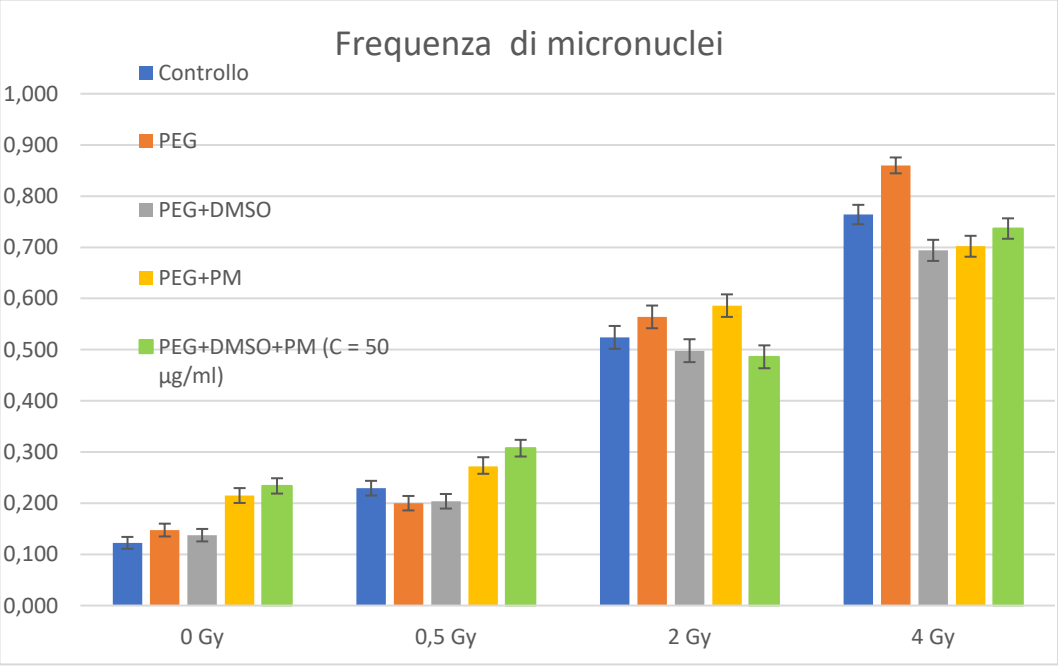

Grafico 3: Rappresentazione grafica dell'analisi riguardante il secondo esperimento di co-esposizione

I risultati confermano un’azione genotossica dei due Vettori in presenza di PM a 0 Gy e non permettono di trarre conclusioni robuste circa un’azione sinergica tra RI e PM.

Capitolo 4: Discussione

Dai risultati dell'esperimento 1, ovvero l'analisi dell'induzione di micronuclei mediante il saggio CBMN in cellule HaCaT co-esposte prima a *Fine Dust* per 24 ore alla concentrazione 25 µg/ml e poi a RI (alle dosi di 0, 0.5, 2, 4 Gy) con il *Fine Dust* veicolato tramite DMSO puro, è possibile fare due osservazioni.

La prima è che, eccetto che per i campioni non irraggiati, il controllo ha una frequenza di micronuclei (*f*) più alta rispetto ai campioni "solo DMSO" e "DMSO+PM", differenza che aumenta all'aumentare della dose. Questo comportamento è alla sua manifestazione più estrema alla condizione di 4 Gy. Da ciò si trae la conclusione che c'è un notevole effetto radioprotettore dovuto al vettore DMSO. Le proprietà radioprotettrici o citotossiche del DMSO riscontrate in questo lavoro di tesi, alle concentrazioni utilizzate nel caso dell'esperimento 1, sono coerenti con risultati di altri studi trovati in letteratura [11,12]. Da questa considerazione è scaturita l'idea di proseguire gli esperimenti con i vettori B e C, basati sul PEG.

La seconda osservazione che può essere fatta è che alla condizione "DMSO+PM" corrisponde una frequenza di micronuclei leggermente più alta rispetto al "solo DMSO", solo a 0,5 Gy, da cui si deduce che l'eventuale effetto del *Fine Dust* (PM) sarebbe espresso maggiormente alle basse dosi piuttosto che a dosi più elevate.

Nell'esperimento 2 il saggio CBMN è stato applicato allo stesso tipo di cellule, ma, rispetto all'esperimento 2, la concentrazione di *Fine Dust* è stata il doppio, ossia 50 µg/ml e le soluzioni veicolanti che hanno sostituito il DMSO sono state due e entrambe basate sul PEG. In assenza di radiazione e alla dose di 0.5 Gy si osserva un leggero aumento della frequenza di MN, (*f*), attribuibile al solo *Fine Dust* in quanto in presenza di RI (0,5Gy) tale frequenza aumenta dello stesso fattore rispetto la campione non irraggiato, escludendo un effetto "radiosensibilizzante" del PM. A 2 Gy e 4 Gy si ritrova un possibile effetto radioprotettore del DMSO presente nel veicolo C rispetto al controllo; tuttavia, a 2 Gy, la tipica dose di una frazione in radioterapia, l'effetto del PM è del tutto trascurabile rispetto ai rispettivi controlli, cioè a parità di Veicolo. Risulta, infatti:

- per PEG+DMSO+PM (vettore C), f=0.486±0.022 rispetto a 0.498±0.022 del PEG+DMSO;
- per PEG+PM (vettore B), f = 0.586±0.022 rispetto a 0.564±0.022 del solo PEG.

Per l'irraggiamento a 4 Gy, sembra manifestarsi un effetto peggiorativo del solo Veicolo B (PEG solo) per il quale il danno è il più alto in assoluto (*f*=0.860), anche rispetto alla condizione in cui il PM è presente in questo veicolo (*f*=0.702).

Infine, lo studio aggiuntivo fatto su campioni non irraggiati e con i vettori basati sul PEG alla concentrazione di *Fine Dust* di 50 µg/ml dimostra che l'azione del solo *Fine Dust* aumenta la frequenza di micronuclei del doppio rispetto ai controlli e che quindi è presente un effetto genotossico misurato come induzione di micronuclei di questo agente sulle cellule HaCaT. La genotossicità del $PM_{2.5}$ su questo sistema cellulare è stata dimostrata anche con altri saggi (eg. Comet Assay) in altri lavori sperimentali noti dalla letteratura [13].

Conclusioni

I risultati di questo studio, incentrato sul saggio dei micronuclei su cellule di cheratinociti HaCaT, sembrano mostrare l'assenza di un effetto sinergico nell'esposizione combinata tra radiazione ionizzante (RI) e un surrogato commercialmente disponibile del particolato atmosferico fine, *Fine Dust* (*$PM_{2.5}$-Like*). L'effetto potrebbe essere di tipo additivo alla dose più bassa impiegata, cioè a 0.5 Gy, in quanto i dati mostrano un incremento della frequenza di micronuclei, che però è aumentata dalle soluzioni vettore impiegate per veicolare il PM anche nei campioni non irraggiati. Tale incremento è debolmente osservabile a 2Gy per il solo vettore basato esclusivamente sul PEG (vettore B), mentre alla dose più alta di 4 Gy, ogni effetto del *Fine Dust* è potenzialmente nascosto da quello della RI e/o dalla genotossicità dei Vettori.

Nonostante i risultati qui presentati siano non conclusivi, questo ha rappresentato un primo studio sulla possibile interazione tra RI e PM sul sistema modello in vitro della pelle. Se è noto dalla letteratura che il PM da solo causa danni biologici, un eventuale effetto sinergico, ossia radiosensibilizzante dalla concomitante presenza del PM, potrebbe rappresentare un fattore con proprietà tali da restringere la finestra terapeutica e quindi essere un ostacolo per la radioterapia (RT), essendo la pelle il primo organo bersaglio per effetti acuti indesiderati della RT.

Va anche sottolineato come in questo studio non si siano approfondite alcune questioni importanti che riguardano la composizione chimica del *Fine Dust* e la sua modalità di azione: infatti, è da capire se viene incorporato, ed in che misura, dalle cellule. Inoltre, studi futuri potrebbero esaminare altri *end point* radiobiologici di interesse clinico, quale la morte cellulare misurata con il saggio clonogenico, oppure la misura dei livelli di stress ossidativo (ROS intracellulari), in quanto i ROS sono una modalità di azione comune sia alla RI che al $PM_{2.5}$.

Infine, l'effetto genotossico manifesto alle basse dosi di RI del *Fine Dust*, potrebbe spianare la strada a studi che riguardano le basse e le bassissime dosi cronicamente somministrate, tipiche di uno scenario di esposizione radioprotezionistico.

Bibliografia:

[1] **B. Alberts, A. Johnson, et al.** "Biologia molecolare della cellula", 5ª edizione, Zanichelli.

[2] **E. J. Hall, A. J. Giaccia.** "Radiobiology for the radiologist", 8th edition, Walters Kluwer.

[3] **L. Manti, A. D'Arco.** "Cooperative biological effect between ionizing radiation and other physical and chemical agents", Elsevier, 2010.

[4] **M. Tubiana, J. Dutreix et al.** "Introduction to Radiobiology", Taylor & Francis.

[5] **M.C. Joiner, A. J Van der Kogel.** "Basic Clinical Radiobiology" 6th Edition, Taylor & Francis.

[6] **M.Suzuki, D.A. Boothman.** "Stress-Induced Premature Senescence (SIPS) -Influence of SIPS on radiotherapy", J. Radiat. Res., 2008

[7] **M. Fenech.** "The in vitro micronucleus technique", Mutation Research, 2000

[8] **Ching-Chang Cho, Wen-Yeh Hsieh, et al.** "In Vitro and In Vivo Experimental Studies of $PM_{2.5}$ on Disease Progression", International Journal of Environmental Research and Public Health, 2018

[9] **Direttiva 2008/50/CE** del Parlamento Europeo e del Consiglio del 21 maggio 2008.

[10] **Irini M. Dijkhoff, Barbara Drasler, et al.** "Impact of airborne particulate matter on skin: a systematic review from epidemiology to in vitro studies", Particle and Fibre Toxicology, 2020.

[11] **María Borja-Martínez, Jesús Lozano-Sánchez, et al.** "Revalorization of Broccoli By-Products for Cosmetic Uses Using Supercritical Fluid Extraction", Antioxidants, 2020.

[12] **Genro Kashino, Kevin M Prise, et al.** "Effective Suppression of Bystander Effects by DMSO Treatment of Irradiated CHO Cells", J. Radiat. Res., 2007.

[13] **Rong Hu, Xiao-Yuan Xie, et al.** "$PM_{2.5}$ Expsure Elicts Oxidative Stress Responses and Mitochondrial Apoptosis Pathway Activation in HaCaT Keratinocytes", Chinese Medical Journal, 2017

Ringraziamenti

Ringrazio,

il Chiarissimo Professore relatore Lorenzo Manti per avermi accolto con amichevole simpatia, per la sua disponibilità in ogni tempo, luogo e mezzi, per i suoi preziosi insegnamenti consentendomi di superare tutte le problematiche dello studio intrapreso;

la gentile dottoressa relatrice Emilia Formicola per i suoi preziosi suggerimenti e disponibilità;

il dottor Valerio Cosimo Elia per il supporto pratico sperimentale;

tutto il gruppo del Laboratorio di Biofisica delle Radiazioni nonché i colleghi per il vicendevole sostegno;

inoltre, la Chiarissima Professoressa Mariagabriella Pugliese per gli utili consigli.