



Trieste 7 febbraio 2008
INFN Sezione di Trieste
c/o il Dipartimento di Fisica

La radiobiologia
dell'INFN
workshop

CRIORAD

(CRyo-preserved cells and IOnizing RAdiation Damage)

**Collaborazione:
Cagliari, LNF, LNGS, LNL e Pisa**

Studio di Fattibilità

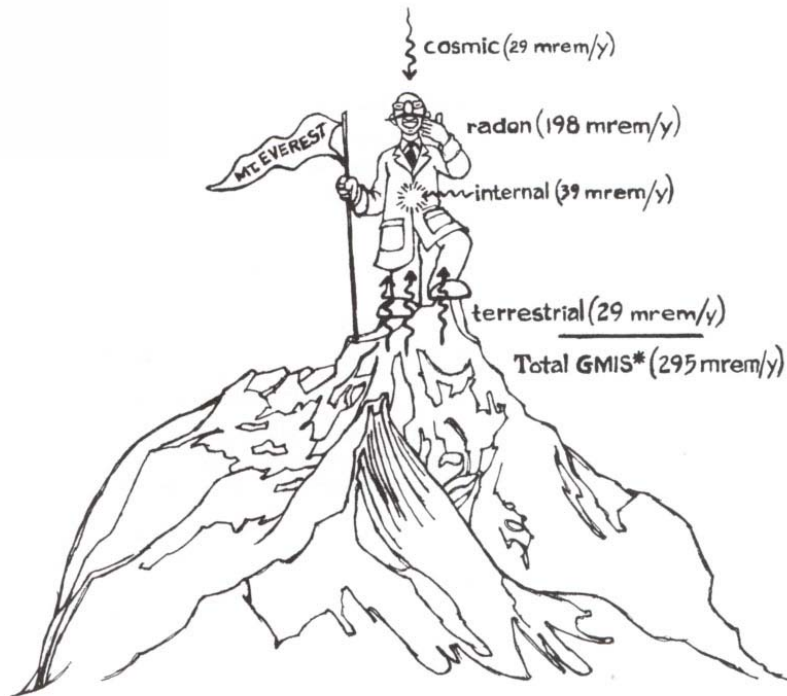
Trieste, 7 Febbraio 2008

Sezioni INFN Partecipanti

CRIORAD

Cagliari:	Brunetti M. Carpinelli P.L. Fiori G.L.C. Masala G.F. Meleddu P. Randaccio P. Oliva N. Diaz	Resp. Locale
LNF:	R. Bedogni A. Esposito	
LNGS:	L. Zamai W. Cesarini F. Grianti M. Balata S. Nisi F. Centis	Resp. Locale
LNL:	R. Cherubini V. De Nadal S. Gerardi D. Zafiropoulos	Resp. locale; rappr. nazionale
Pisa:	U. Bottigli	<i>(partecipazione individuale)</i>

Scopo dell'esperimento



* God Made It So

S. C. Bushong

•La valutazione dell'eventuale contributo dell' **accumulo di dose del fondo naturale (gamma)** in cellule crio-conservate nella incidenza di morte cellulare o induzioni di mutazioni al momento dello scongelamento delle stesse cellule per il loro utilizzo di laboratorio o in "clinica" (es., cellule staminali, germinali, etc).

•L'investigazione della valutazione di danno cellulare e molecolare in **cellule di mammifero in condizioni di "crio-conservazione"** (cioè, in condizioni di quiescenza, tenute a temperatura di -196°C), in confronto a **cellule in condizioni ambientali normali**, a seguito di esposizione a raggi gamma in funzione della dose e del rateo di dose, in regime di dosi acute, protratte o frazionate "mimando" l'esposizione al **fondo naturale (gamma/X)** per un certo intervallo temporale (anni o decine di anni).



Contenitori raffreddati con azoto liquido per la conservazione delle cellule

Ipotesi di lavoro:

**L' esposizione prolungata alla radiazione di fondo
può essere responsabile di aumento di danno in cellule
crio-conservate**

Attività della Sezione INFN di Cagliari

L'attività della Sezione di Cagliari riguarda:

- le procedure di congelamento e scongelamento di popolazioni di batteri normali e modificati. Tali popolazioni verranno irraggiate con una sorgente gamma (di ^{137}Cs) alle dosi di 0.1-0.6 kGy.
- I batteri irraggiati e quelli della popolazione di controllo verranno coltivati e analizzati in termini di morte e mutazioni indotte.
- Si occupa inoltre della realizzazione di un software per il “*conteggio automatico delle colonie cellulari*” nelle apposite piastre utilizzate per il mantenimento delle colture.

Attività dei Laboratori Nazionali del Gran Sasso

L'attività dei LNGS riguarda:

➤ La valutazione dopo scongelamento le differenze di vitalità (% di cellule vive) in cellule criopreservate (linfociti isolati da sangue periferico umano) in presenza di radiazioni gamma.

Per la valutazione della vitalità ed integrità delle cellule criopreservate verranno esaminati subito dopo scongelamento o dopo 12-18 ore di incubazione a 37 °C, 5% CO₂, alcuni parametri cellulari come:

- 1) la mortalità cellulare;
- 2) l'apoptosi;
- 3) l'espressione di antigeni di superficie per distinguere i diversi subset linfocitari (NK, CD16+; linfociti T, CD3+; linfociti B, CD19+), i monociti (CD14+) ed i progenitori emopoietici (CD34+) in modo da valutarne indipendentemente la sensibilità alle radiazioni.

➤ Ottimizzazione delle tecniche di congelamento e recupero dei linfociti e delle colture cellulari in genere.

Attività dei Laboratori Nazionali di Legnaro

L'attività dei LNL riguarda:

- Messa a punto dei protocolli di irraggiamento e processamento di colture cellulari congelate e proliferanti
- Analisi in termini di sopravvivenza in colture cellulari di mammifero dell'effetto di irraggiamento in condizioni di congelamento e proliferazione attiva
- Analisi in termini di induzione di mutazioni (al locus HPRT) in colture cellulari di mammifero a seguito di irraggiamento gamma, in condizioni di congelamento e proliferazione attiva

**DETERMINAZIONE DEL MIGLIORE SISTEMA PER
IDENTIFICARE I MUTANTI PER SELEZIONE POSITIVA:
RESISTENZA ALLA CICLOSERINA**

**LA SENSIBILITA' ALLA CICLOSERINA E' DETERMINATA
DALL'ESPRESSIONE DI UN GRUPPO DI GENI CHE MEDIANO LA
PENETRAZIONE DELL'ANTIBIOTICO NEL CITOPLASMA**

**I BATTERI DIVENGONO RESISTENTI SE UNO DEI GENI SI INATTIVA: I
MUTANTI SONO SELEZIONATI IN TERRENI IN PRESENZA DI CICLOSERINA**

**DETERMINAZIONE DELLA M.I.C. (Minima Concentrazione Inibente) PER
LA CICLOSERINA (*DIVERSA DA QUELLA RIPORTATA IN LETTERATURA!*)**

→ *Batteri utilizzati: Escherichia coli*

DETERMINAZIONE DELLA DOSE DA UTILIZZARE:

- 1. indurre mutazioni**
- 2. non determinare mortalità**

BATTERI CONGELATI E NON CONGELATI SONO SOPPOSTI A DOSI CRESCENTI DI IRRAGGIAMENTO (FINO A 4 ORE)

RISULTATO: SIA CELLULE CONGELATE CHE NON CONGELATE COMINCIANO A MORIRE DOPO 30 MINUTI DI IRRAGGIAMENTO (a un rateo di dose pari a 2.225Gy/min)

DETERMINAZIONE DEL NUMERO DI MUTANTI NATURALI

**SEMINA DI BATTERI CONGELATI E NON CONGELATI IN TERRENI
CONTENENTI CICLOSERINA**

**RISULTATO: IL NUMERO DI MUTANTI NATURALI SIA DI BATTERI
CONGELATI CHE NON CONGELATI E' SOVRAPPONIBILE (25 MUTANTI
PER MILIONE)**

SISTEMA PER LA CONTA DEI BATTERI (SIA MUTANTI CHE NON MUTANTI)

C.F.U. (UNITA' FORMANTI COLONIA) IN DIVERSE PIASTRE (DA 10 A 40, IN DIVERSI ESPERIMENTI)

LA C.F.U. SONO CALCOLATE DOPO OPPORTUNE DILUIZIONI, AL FINE DI OTTENERE UN RISULTATO LEGGIBILE

IL SISTEMA DELLE C.F.U. HA PROBLEMI INTRINSECI DI RIPETITIVITA', MA E' L'UNICO POSSIBILE

SISTEMA SPERIMENTALE

CRIORAD

- **PREPARAZIONE DI LOTTI IDENTICI DI CELLULE CONGELATE (CONCENTRAZIONE NOTA: $160 \times 10^5/\text{ML}$)**
- **PREPARAZIONI DI CAMPIONI DI COLTURE BATTERICHE, LA CUI CRESCITA ERA VALUTATA SPETTROFOTOMETRICAMENTE IL GIORNO DELL'ESPERIMENTO (AMPIO MARGINE DI ERRORE)**
- **SEMINA PER CONTA DEI BATTERI NON CONGELATI PRIMA DELL'IRRAGGIAMENTO**
- **IRRAGGIAMENTO PER 30 MINUTI: CONTINUATI PER I CONGELATI ED INTEROTTI (2 MINUTI DI IRRAGGIAMENTO E 1 DI RIPOSO) ; RATEO DI DOSE: 2.225 Gy/min**
- **CONTA DEI BATTERI VITALI (DOPO DILUIZIONI OPPORTUNE) IN TERRENO SENZA ANTIBIOTICO**
- **CONTA DEI MUTANTI (DOPO DILUIZIONI OPPORTUNE) IN TERRENO CON CICLOSERINA**

**NUMERO DI MUTANTI (PER 10⁵ cellule)
Tabella finale di 4 esperimenti**

	Non Congelati	Congelati
Esp.1	43 +/- 12	15 +/- 7
Esp.2	70 +/- 26	36 +/- 7
Esp. 3	48 +/- 25	24 +/- 13
Esp. 4	83 +/- 31	24 +/- 10

Studio degli effetti delle radiazioni ionizzanti su linfociti crio-conservati

E' stato valutato la mortalità (% di cellule morte) da radiazioni gamma su linfociti isolati da sangue periferico umano sia congelati che freschi.

I linfociti sono stati irradiati a dosi relativamente basse 0.3 e 0.9 Gy e relativamente alte 3.0, 6.0, 18.0 e 40 Gy di raggi-gamma (^{137}Cs), sia in dose unica (acuta) che frazionata (divisa in 3 dosi intervallate da 3 ore), "mimando" l'esposizione al fondo naturale (gamma) per un certo intervallo temporale.

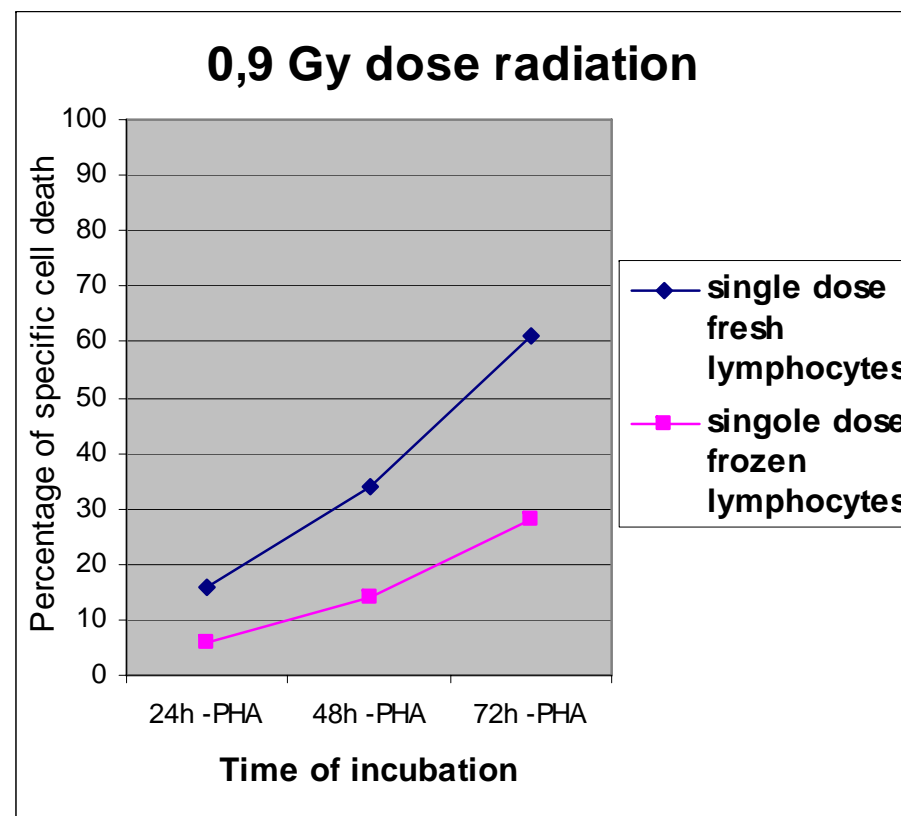
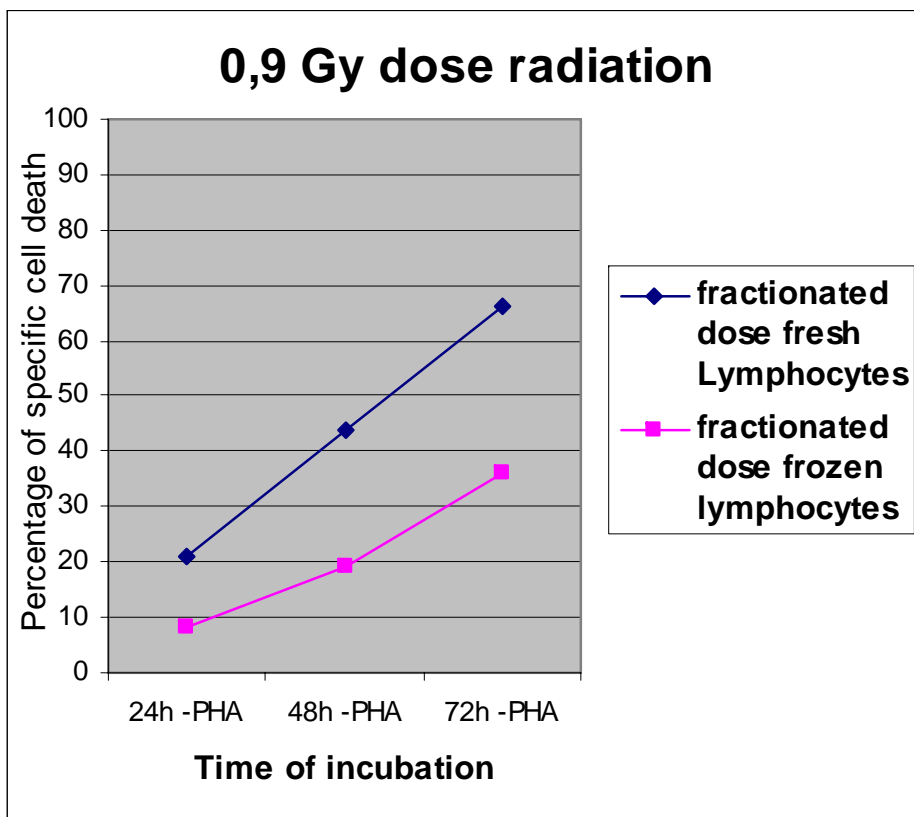
→ *Ricordiamo che un anno di radiazione di fondo corrisponde ad una dose media di circa 2 mGy e quindi una dose di 0.1 Gy corrisponde a circa 50 anni di esposizione al fondo naturale.*

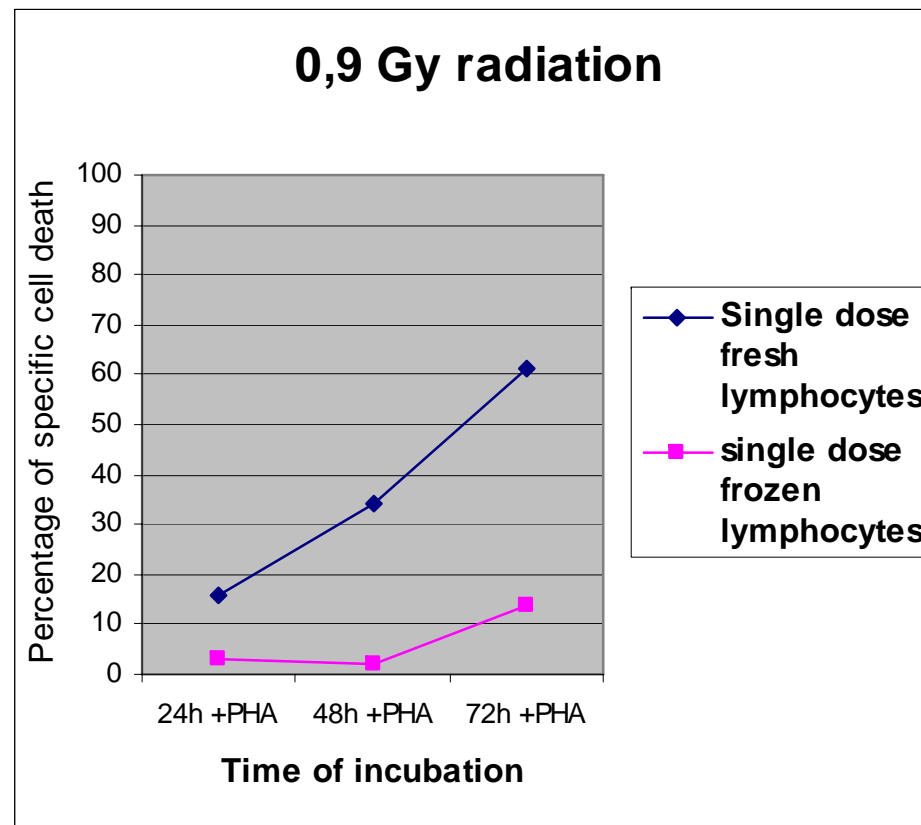
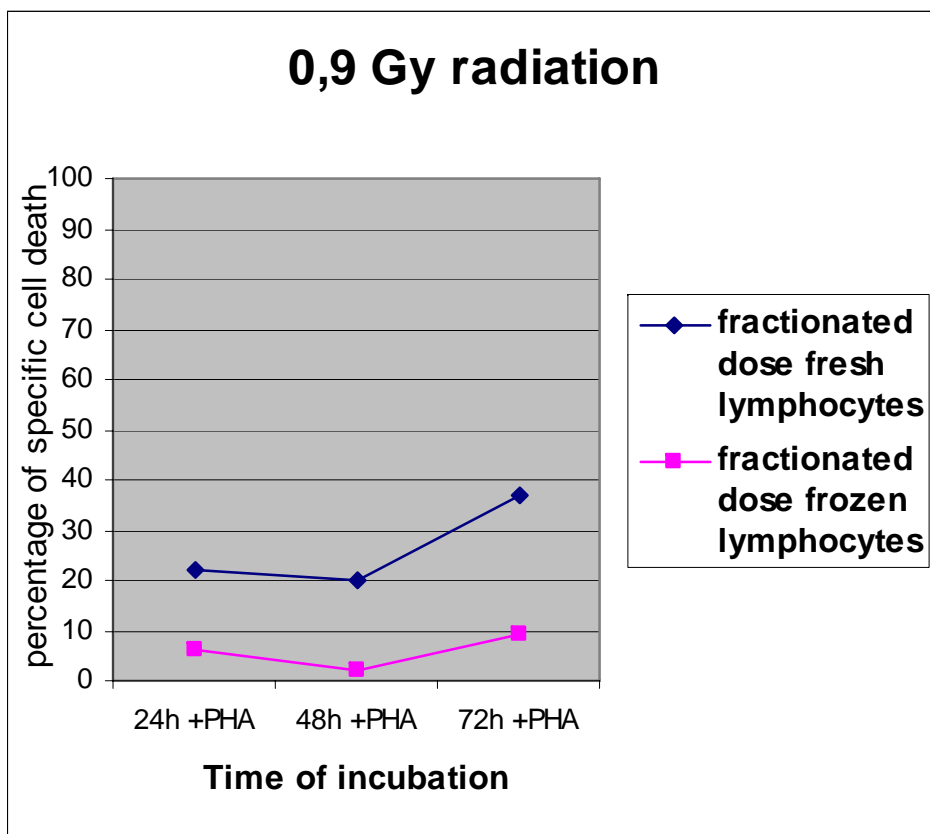
Esempio: le cellule staminali vengono conservate anche per molti anni allo scopo di essere poi riutilizzate nella cura di alcune patologie.

La mortalità cellulare è stata valutata dopo 24, 48 e 72 sia mediante colorazione con 7-amino-actinomicina D (7-AAD) in combinazione con l'antigene di superficie CD45 (rileva una morte di tipo necrotico, necrosi o necrosi secondaria) che mediante colorazione con Ioduro di Propidio dopo fissazione in etanolo (rileva la morte per apoptosi) in citometria a flusso.

In alcuni esperimenti i linfociti, che non sono in attiva proliferazione cellulare (G0), sono stati stimolati con un mitogeno fitoemoagglutinina (PHA) capace di indurre la proliferazione.

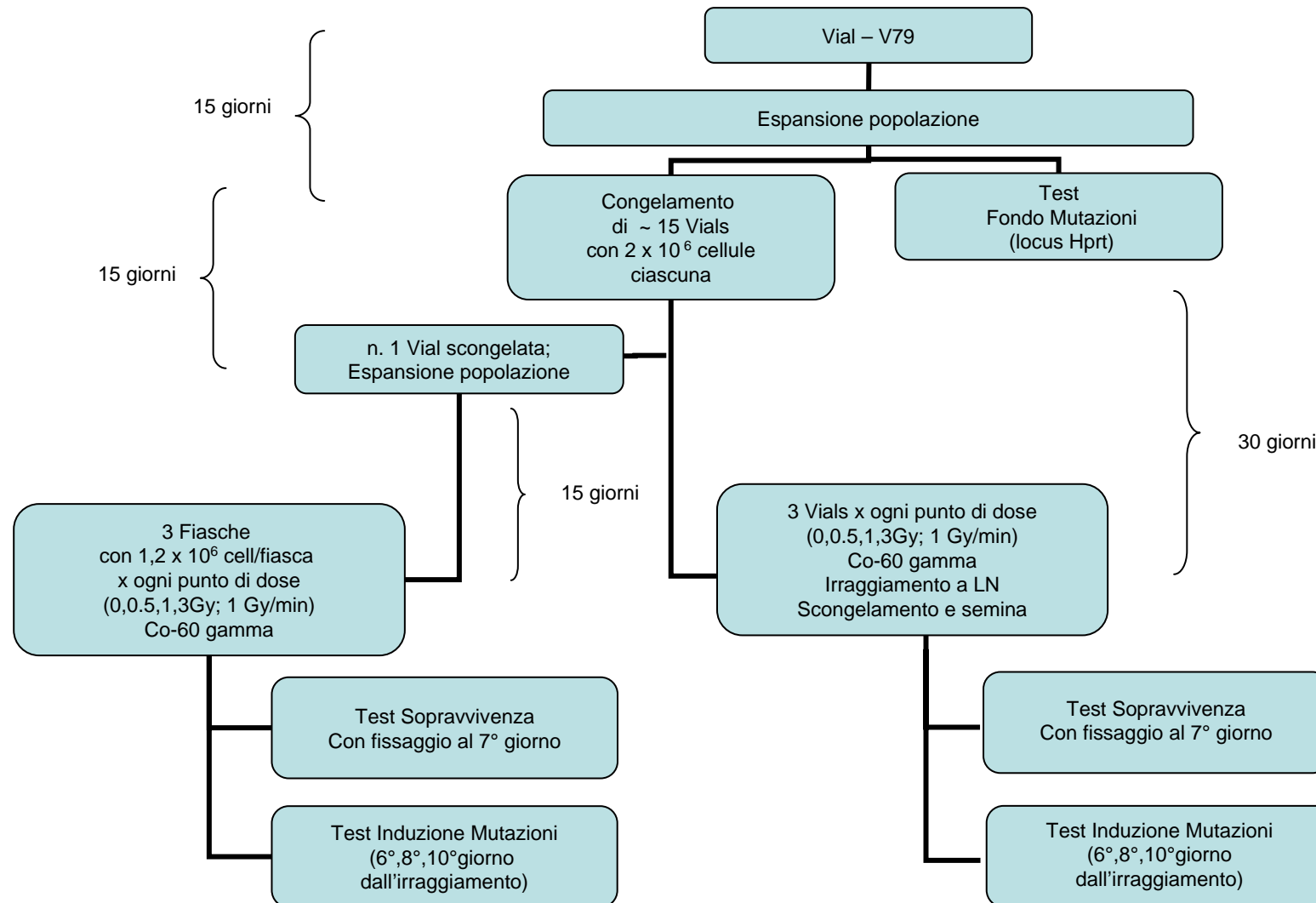
Il congelamento protegge dalla morte in particolare alle dosi basse indipendentemente dal frazionamento della dose e dalla stimolazione mitogenica





→ I risultati sinora ottenuti sembrano indicare che il congelamento salvaguarda le cellule congelate rispetto alle cellule non congelate dai danni provocati dalla radiazione

CRIORAD
u.o.: INFN-LNL
Schema Esperimento

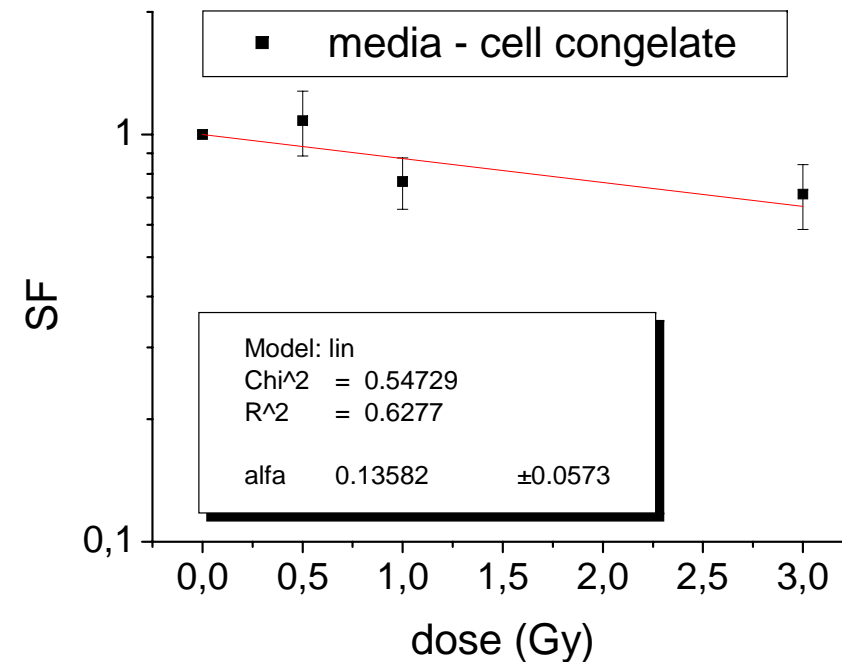
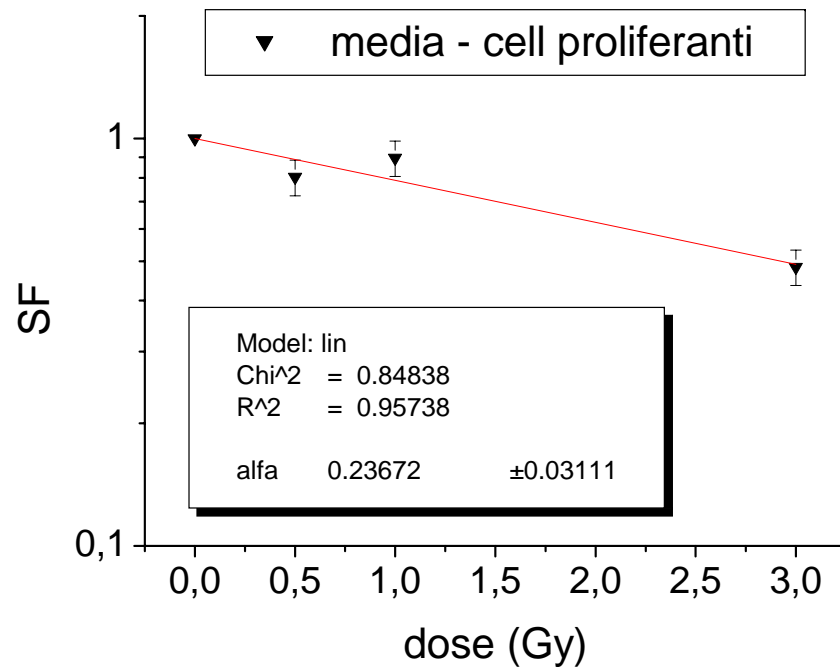


Cellule V79 – proliferanti e congelate

Sopravvivenza cellulare

CRIORAD

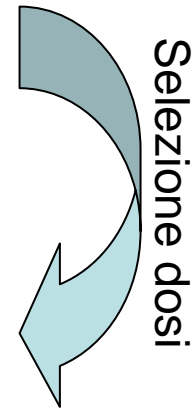
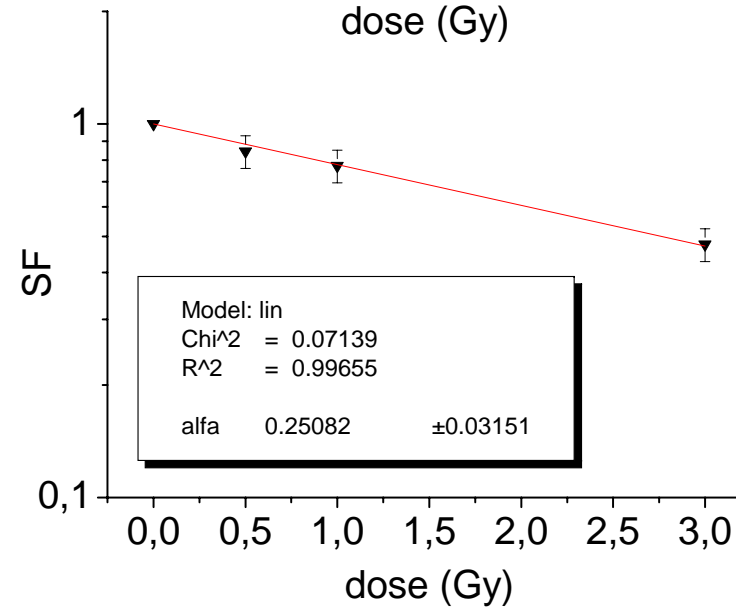
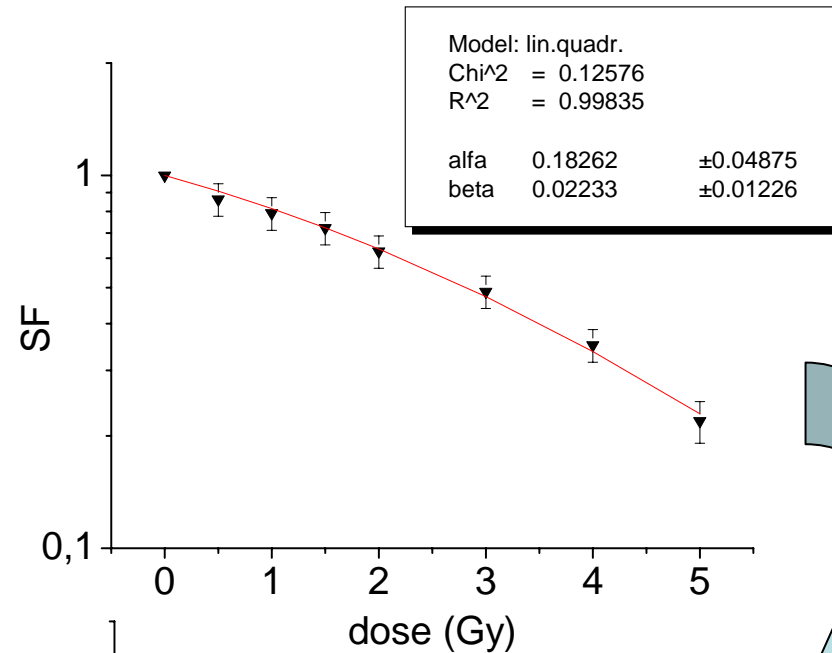
Risultati preliminari



Media 3-4 exp.

Cellule V79 – proliferanti Sopravvivenza cellulare

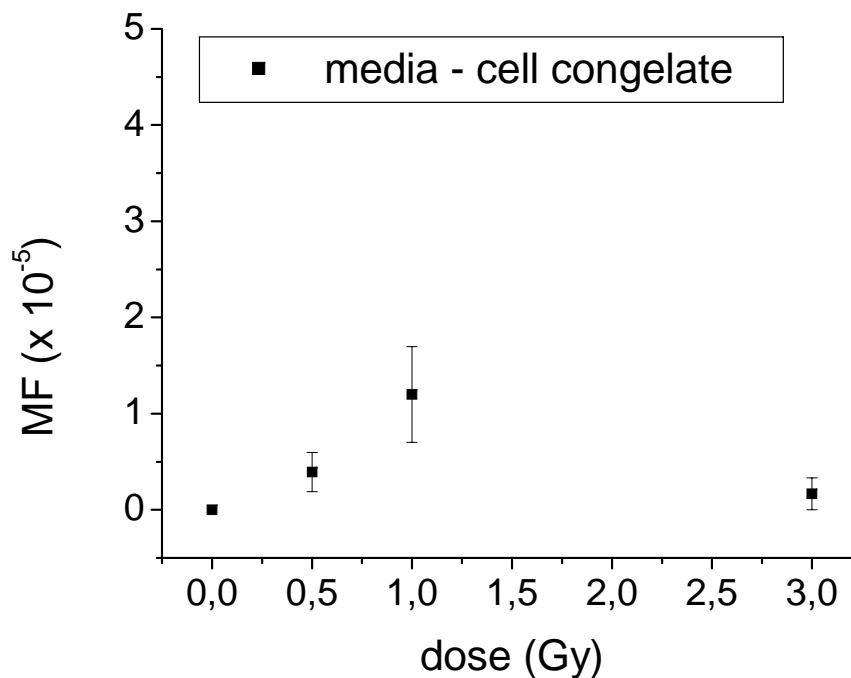
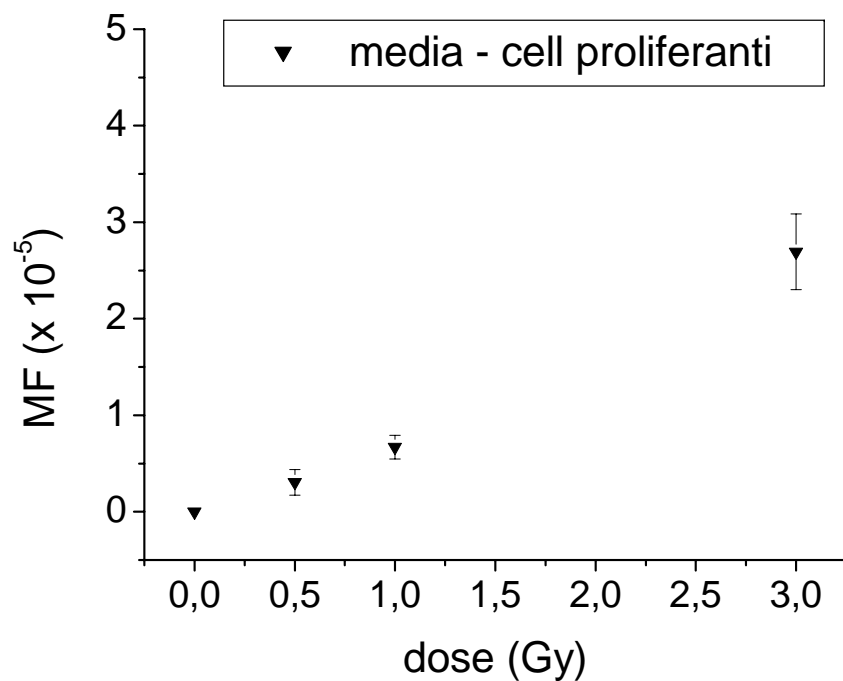
Media 9 exp.



Cellule V79 – proliferanti e congelate

Induzione di mutazioni

Risultati preliminari



Media 3 exp.



*Sviluppo tecnologico:
sistema esperto “conta colonie”*

SOFTWARE

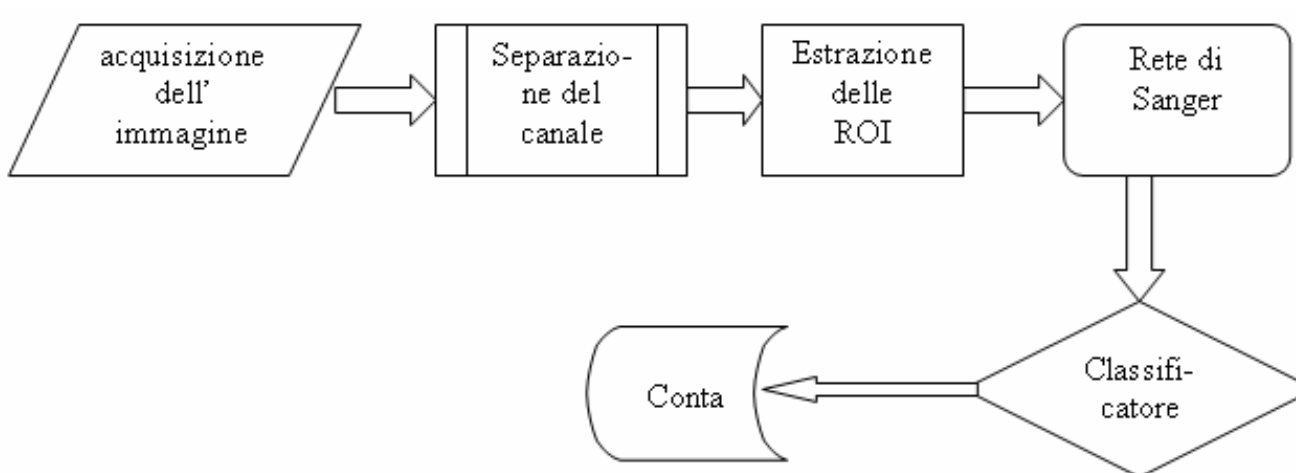


Fig. 1. Struttura a blocchi del procedimento. L'immagine è acquisita dallo scanner, viene separato il canale blue e si estraggono le ROI. I possibili candidati sono analizzati da una rete di Sanger. L'output di Sanger viene passato al classificatore che opera la conta.

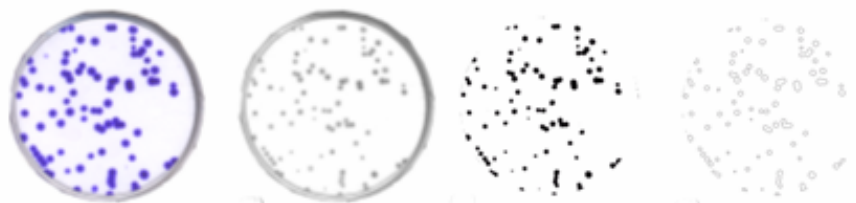
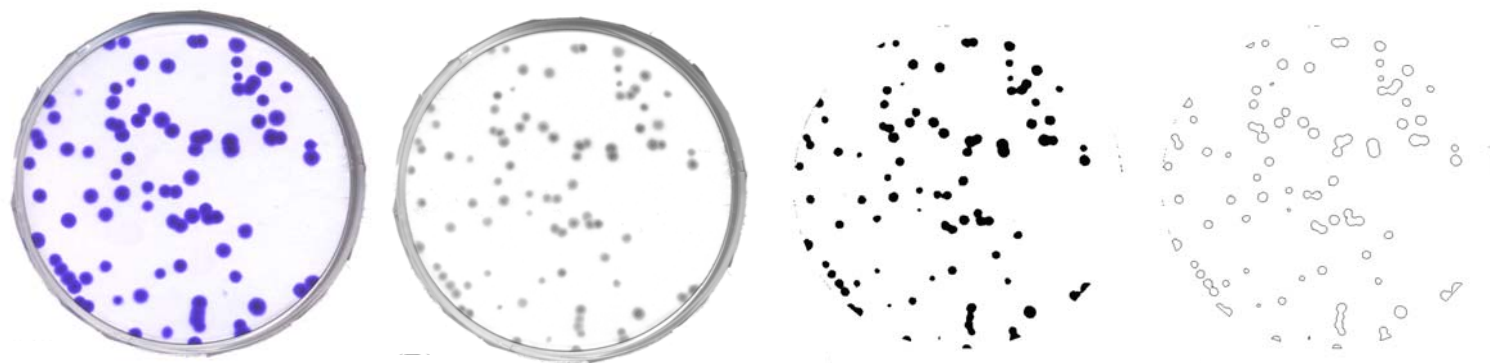


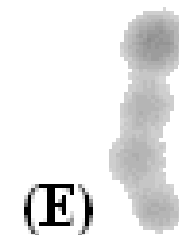
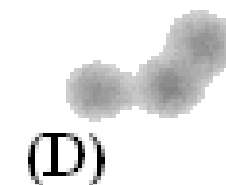
Fig. 2. Particolare dell'immagine delle piastre: L'immagine è acquisita dallo scanner a colori, poi viene separato il canale blue e si estraggono le ROI attraverso l'algorithm di region growing.

SOFTWARE

Il prototipo del sistema di conta automatico, realizzato, è basato principalmente su algoritmi di region-growing per l'estrazione delle regioni d'interesse dell'immagine (ROI), di una rete neurale di Sanger per la caratterizzazione di tali regioni e da un classificatore. La classificazione finale migliore è fornita da una rete neurale feed-forward (FF-NN) con un errore sulla conta del 2% su un campione di 150 piastre Petri.



CRIORAD



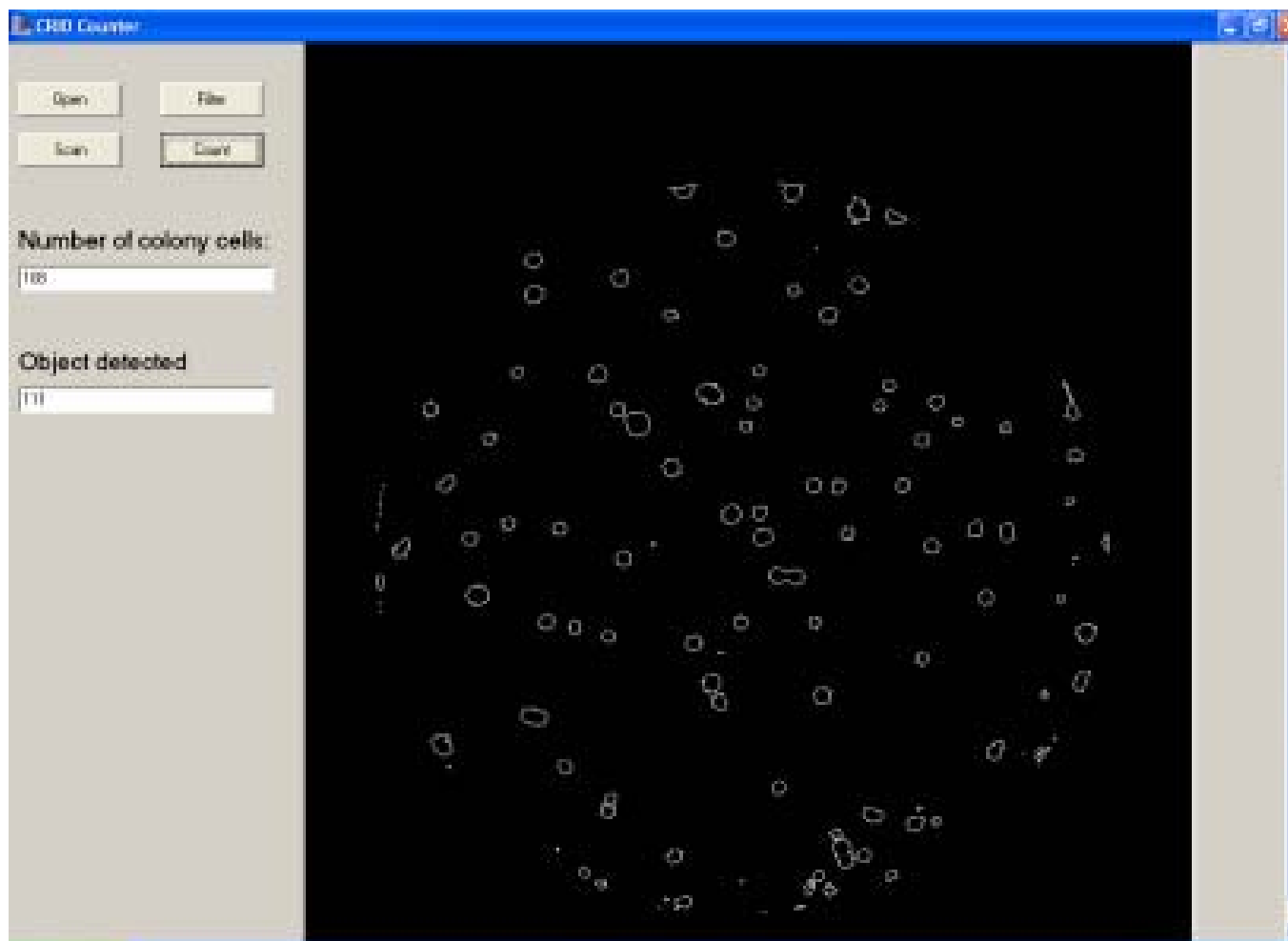
SCANNER

- Lo scanner usato è un comune scanner a 8 bit dove si prendono immagini a colori bitmap RGB a 8
- Un supporto di carta bianca è posto all'interno della piastra e uno fa da contorno (dimensione 7x7 cm² per piastre piccole da 5.2 cm di diametro)



SOFTWARE

CRIORAD



CAGLIARI

L'interfaccia grafica del programma. E' mostrato l'output dell'algoritmo region growing nell'immagine. E' possibile leggere il numero di colonie cellulari trovate nella prima riga o solo gli oggetti trovati senza classificazione nella seconda.

..Grazie dell'attenzione..

..Grazie dell'attenzione..

