

Scuola di Scienze

Corso di Laurea Magistrale in Fisica

**LA RISPOSTA CELLULARE AI DIVERSI
TIPI DI RADIAZIONE TRAMITE
ESPRESSIONE GENICA E
RADIOBIOLOGIA SISTEMICA**

Relatore:

Prof. Gastone Castellani

Presentata da:

Samanta Larocca

Correlatore:

Dott.ssa Isabella Zironi

Dott.ssa Angela Virelli

Sessione II

Anno Accademico 2013/2014

SOMMARIO

ABSTRACT.....	3
INTRODUZIONE.....	4
CAPITOLO 1.....	7
LE SORGENTI DI RADIAZIONI IONIZZANTI.....	7
1.1 PROGETTO EXCALIBUR.....	7
1.1.1 SORGENTE di RADIAZIONE GAMMA.....	7
1.1.2 SORGENTI di PARTICELLE CARICHE (PROTONI).....	9
1.2 PROGETTO PLASMA FOCUS.....	12
1.2.2. SORGENTE DI RADIAZIONE X CONVENZIONALE.....	17
CAPITOLO 2.....	23
INTERAZIONE RADIAZIONE-MATERIA E LORO EFFETTI BIOLOGICI.....	23
2.1 INTERAZIONE RADIAZIONE-MATERIA.....	23
2.1.1 EFFETTO FOTOELETTRICO.....	24
2.1.2 EFFETTO COMPTON E RAYLEIGH.....	24
2.1.3 PRODUZIONE DI COPPIE.....	25
2.2 EFFETTI BIOLOGICI DELLE RADIAZIONI.....	26
2.2.1 DANNO CHIMICO.....	27
2.2.2 DANNO BIOMOLECOLARE.....	28
2.2.3 EFFETTI BIOLOGICI PRECOCI E TARDIVI.....	35
2.2.4 RIPARAZIONE DEL DANNO DA RADIAZIONI.....	37
2.3 FATTORI CHE INFLUENZANO L'EFFETTO BIOLOGICO DELLE RADIAZIONI.....	38
2.3.1 EFFETTO OSSIGENO.....	38
2.4 GLI EFFETTI DELLE RADIAZIONI DULL'UOMO.....	40
2.4.1 EFFETTI SOMATICI.....	40
2.4.2 EFFETTI TERATOGENI.....	41
2.4.3 EFFETTI STOCASTICI.....	42
2.4.4 EFFETTI GENETICI.....	42
2.5 TECNICHE DI MISURA DI ESPRESSIONE GENICA.....	43
2.5.1 TECNOLOGIA DEI MICROARRAY.....	43
2.5.2 SOFTWARE STATISTICI PER L'ANALISI DEI MICROARRAY.....	44

CAPITOLO 3	48
PROGETTO EXCALIBUR.....	48
3.1 IL PROGETTO	48
3.2 PROTOCOLLI SPERIMENTALI	49
3.2.1 COLTURA CELLULARE E PREPARAZIONE DEI CAMIPIONI	49
3.3 IRRAGGIAMENTO DELLE CELLULE	50
3.4 MICROARRAY	51
3.5 ANALISI DATI	51
3.5.1 I DATI.....	51
3.5.2 ANALISI STATISTICHE CON R	52
3.5.3 ANALISI STATITISTICHE CON VIACOMPLEX	59
3.6 RISULTATI	60
3.6.1 RISULTATI OTTENUTI TRAMITE R.....	60
3.6.2 RISULTATI OTTENUTI TRAMITE VIACOMPLEX.....	74
CAPITOLO 4	79
PROGETTO PLASMA FOCUS	79
4.1 IL PROGETTO	79
4.2 PROTOCOLLI SPERIMENTALI	79
4.2.1 COLTURA CELLULARE	79
4.2.2 PREPARAZIONE DEI PORTACAMPIONI	80
4.2.3 PREPARAZIONE DEL CAMPIONE.....	82
4.3 IRRAGGIAMENTO DELLE CELLULE	84
4.4 CITOCHIMICA E CITOMETRIA A FLUSSO	85
4.5 RISULTATI	86
4.5.1 CELLULE IRRAGGIATE CON TUBO RADIOGENO.....	87
4.5.2 CELLULE IRRAGGAITE CON IL PLASMA FOCUS	87
CONCLUSIONI.....	88
APPENDICE A.....	90
APPENDICE B.....	101
APPENDICE C.....	110

ABSTRACT

Questo progetto ha confrontato gli effetti indotti da diversi tipi di radiazioni, diversa intensità delle dosi, diverso rateo di dose su sistemi cellulari differenti. In particolare sono stati seguiti due studi differenti, finalizzati all'indagine degli effetti e dei meccanismi indotti da trattamenti radioterapici su cellule in coltura.

Nel primo studio -EXCALIBUR- sono stati investigati i meccanismi di induzione e trasmissione del danno a basse dosi di radiazioni, in funzione della qualità della radiazione (*raggi γ e protoni*) e della dose.

Cellule di glioblastoma umano (T98G) sono state irraggiate con raggi γ e protoni a due diverse dosi (0,25 Gy e 2 Gy); in questo studio è stata valutata e analizzata la variazione di espressione genica rilevata utilizzando la tecnologia dei microarray.

Per mezzo dell'analisi statistica, con due software diversi, si è osservato come nelle cellule irraggiate si attivino i geni legati alla senescenza cellulare; questo risultato è significativo, visto che potrebbe rappresentare una prospettiva terapeutica interessante per molte neoplasie.

Il secondo studio -Plasma Focus- ha lo scopo di ampliare le applicazioni nel settore medico di una sorgente radiante che produce raggi X ad altissimo rateo di dose (plasma focus). In questo studio, l'attenzione è stata posta sulla preparazione dei campioni biologici per l'irraggiamento. Cellule di adenocarcinoma mammario (MCF7) sono state coltivate in laboratorio e posizionate all'interno di appositi portacampioni pronte per essere irraggiate con raggi X ad alto e a basso rateo di dose.

Per mezzo della microscopia ottica e della citometria a flusso in fluorescenza, si è osservato come un rateo di dose elevato provochi danni cellulari superiori. L'analisi quantitativa ha mostrato che, nelle cellule trattate con il plasma focus, il 18% risulti danneggiato rispetto al 7% delle cellule di controllo; con i raggi X convenzionali risulta danneggiato l'8% di cellule, rispetto al 3% delle cellule di controllo.

INTRODUZIONE

La ricerca per la cura dei tumori è, senza dubbio, un campo di studio in costante e continua evoluzione, è, infatti, il risultato di numerosi studi che di volta in volta arricchiscono di spunti gli sforzi sin qui operati da scienza e medicina. Tuttavia, nonostante l'impegno profuso in questo senso, innumerevoli sono le difficoltà cui sono costretti a confrontarsi gli studiosi del settore.

A fronte di molti tipi di trattamenti radioterapici a disposizione si rivela sempre più necessaria una valutazione degli effetti causati a livello cellulare dell'intervento effettuato. In particolare, la ricerca di base si può rivelare di aiuto fondamentale nel confronto degli effetti indotti da tipi di radiazioni diverse, intensità delle dosi, rateo di dose in tessuti o sistemi cellulari differenti. I risultati ottenuti da questo tipo di indagine comparativa possono essere utilizzati per selezionare il tipo di intervento terapeutico più idoneo in funzione delle condizioni cliniche.

Il laboratorio di biofisica della sezione di fisica applicata del Dipartimento di Fisica e Astronomia è coinvolto da diversi anni in alcuni progetti finalizzati all'indagine degli effetti e dei meccanismi indotti da trattamenti radioterapici su cellule in coltura.

Nell'ambito del mio progetto di tesi sono stata coinvolta nei seguenti due:

1. il progetto EXCALIBUR (**EX**posure **effeC**ts **At Low**-doses of **Ionizing**-radiation in **B**iological **cultUR**es), affidato e condotto da diversi poli di ricerca tra cui quello della sezione INFN di Bologna ha come scopo lo studio degli effetti biologici indotti in sistemi "*in-vitro*" e "*in-vivo*" a seguito a esposizione a radiazioni ionizzanti, in funzione della qualità della radiazione, della dose e del microambiente, con particolare riguardo agli effetti "non-lineari" a basse dosi (*ipersensibilità, radioresistenza indotta, risposta adattativa, effetti di bystander*). In particolare questo progetto si propone di studiare l'azione delle

radiazioni ionizzanti in termini di diversi end-points biologici, e dei meccanismi di induzione e trasmissione del danno a basse dosi di radiazioni, in colture cellulari di mammifero, in funzione della qualità della radiazione (*raggi γ /X; protoni, particelle alfa/ioni elio-4 e ioni pesanti di varie energie*) e della dose.

Cellule di linea tumorali sono state irraggiate con raggi γ , protoni e particelle alpha a due diverse dosi (0,25 Gy e 2 Gy). Gli end-points considerati sono flussi di correnti ioniche misurati tramite la tecnica del patch clamp, lo stato redox valutato con tecniche di fluorescenza dinamica, le capacità proliferative della popolazione con acquisizione di immagini in microscopia ottica e la variazione di espressione genica rilevata utilizzando la tecnologia dei microarray. Solo i risultati di quest'ultima saranno descritti nella mia tesi.

2. Il progetto PLASMA FOCUS, finanziato dall'AIRC e condotto dal dipartimento di Ingegneria Industriale in collaborazione con la sezione di Fisica Applicata del dipartimento di Fisica e Astronomia dell'Università di Bologna e con il Dipartimento Biologia e Biotecnologie L. Spallanzani dell'Università degli Studi di Pavia ha lo scopo di ampliare le applicazioni nel settore medicale di una sorgente radiante che produce raggi X ad altissimo rateo di dose (plasma focus – PF). Le proprietà dei raggi X emessi dal PF differiscono significativamente da quelle dei raggi X emessi dagli acceleratori medicali comunemente diffusi per durata dell'impulso, frequenza di emissione della dose e spettro di energia. Oltre alla caratterizzazione dosimetrica dei raggi X emessi dal PF, risulta dunque necessario, prima di intraprendere qualsiasi applicazione, determinarne l'efficacia biologica valutandola rispetto all'efficacia biologica di raggi X prodotti da fonti convenzionali.

Cellule di linea tumorali sono state irraggiate con raggi X ad alto rateo di dose (prodotti dal PF) e da raggi X ad un rateo di dose minore (prodotti con un tubo a raggi X) alla dose di 2 Gy. Gli end-points considerati sono la vitalità e la capacità di adesione cellulare valutate qualitativamente con tecniche di citochimica in fluorescenza

(colorazione di May Grunwald-Giemsa e colorazione Annexin V - Propidium Iodide). Nella mia tesi sarà descritta la procedura necessaria alla preparazione dei campioni biologici per l'irraggiamento.

L'esito di questi studi potrà dare informazioni rilevanti nella comprensione dei processi di sviluppo dei tumori e nella loro terapia, nell'analisi delle complicanze dovute alla radioterapia, e nello studio sul rischio di tumori secondari in radioterapia.

Nel capitolo 1 verranno descritte le sorgenti di radiazioni ionizzanti usate nei due progetti. Verrà, quindi, posta l'attenzione sulle sorgenti di radiazioni gamma con particolare riferimento al GammaCell; sulle sorgenti di particelle cariche e in particolare sull'acceleratore Van de Graff e infine sul plasma focus e su una sorgente di raggi X convenzionale.

Nel capitolo 2 saranno illustrate le varie tipologie di interazione radiazione-materia, gli effetti che le radiazioni ionizzanti possono avere sull'uomo, e le tecniche di valutazione dell'espressione genica.

Il capitolo 3 conterrà una descrizione del progetto Excalibur, dei protocolli sperimentali seguiti, della raccolta dati, dell'analisi dati effettuata e dei relativi risultati ottenuti.

Il capitolo 4, invece si occuperà del progetto Plasma Focus, con particolare attenzione sulle procedure sperimentali per la coltura cellulare e per l'irraggiamento.

CAPITOLO 1

LE SORGENTI DI RADIAZIONI IONIZZANTI

In questo capitolo verranno descritte nel dettaglio le sorgenti di radiazioni ionizzanti utilizzate nei due progetti introdotti nella parte introduttiva

1.1 PROGETTO EXCALIBUR

1.1.1 SORGENTE di RADIAZIONE GAMMA

Tra i dispositivi in grado di produrre radiazione gamma, sono diffusi gli irradiator utilizzati per la sterilizzazione di sacche di sangue e piastrine impiegate per fini terapeutici nei pazienti trapiantati.

Ci sono fondamentalmente due tipologie di dispositivi di questo tipo (dispositivi contenenti isotopi e dispositivi contenenti un tubo a raggi X). Entrambe le tipologie sono in grado di erogare 2500 cGy di radiazioni ionizzanti ai contenitori pieni di sangue o emoderivati (1).

I dispositivi contenenti isotopi, in generale, sono costituiti da una o più sorgenti radioattive incapsulate (cobalto-60 (^{60}Co), o Cesio-137 (^{137}Cs)) chiuse in un contenitore cavo schermato. Fa parte del dispositivo anche un sistema elevatore che permette di spostare la sorgente radioattiva in modo tale che sia in grado di irradiare il campione. Alcuni dispositivi contenenti isotopi sono dotati, inoltre, di un piatto girevole per posizionare il campione di fronte alla sorgente. Per questi strumenti il rateo di dose a 30 cm da qualsiasi superficie non deve superare i 2 milliroentgen per ora (2).

La seconda tipologia utilizza un convenzionale tubo a raggi X racchiuso in un contenitore cavo schermato. In alcuni casi il tubo a raggi X è in grado di emettere raggi X a 360° intorno al suo piano cilindrico. Alcuni strumenti utilizzano dei caroselli per esporre in modo uniforme il campione. Questa tipologia di dispositivi non può superare un'esposizione di 0,5 milliroentgen in un'ora in qualsiasi punto distante 5 cm dalla superficie esterna.

La sorgente utilizzata per irraggiare i campioni cellulari con raggi gamma è l'irradiatore GammaCell situato presso il policlinico "S. Orsola - Malpighi" di Bologna. Questo strumento è caratterizzato da una sorgente di Cesio-137 con una energia di 662 keV. Nella seguente figura è riportato uno schema di una GammaCell.

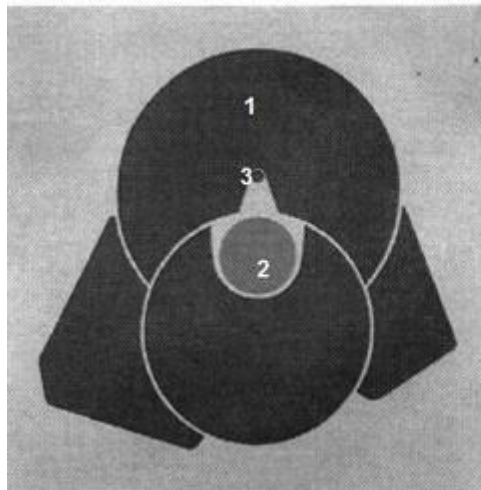


Figura 1: Sezione trasversale della camera di ionizzazione: 1-schermatura di piombo; 2-piatto; 3-sorgente.

L'irradiatore è costituito da una sorgente di Cesio, collocata entro una schermatura fissa in piombo. L'irraggiamento avviene ponendo i campioni su di un piatto rotante, all'interno della camera di irradiazione, a sua volta dotata di una schermatura mobile posta di fronte alla sorgente (3).

1.1.2 SORGENTI di PARTICELLE CARICHE (PROTONI)

Un acceleratore di particelle è una macchina il cui scopo è quello di produrre fasci di ioni o particelle subatomiche (elettroni, positroni, protoni, antiprotoni etc.) con "elevata" energia cinetica. Tali macchine vengono usate principalmente per: scopi industriali (60%) (impiantazione di ioni, sterilizzazione), medici (35%) (produzione di isotopi radioattivi, terapia adronica, etc.), studio della struttura dei materiali (ad esempio sfruttando la radiazione di sincrotrone) o per scopi di ricerca in fisica delle particelle (5%) (un fascio di particelle di elevata energia permette di sondare oggetti di dimensioni molto piccole).

I metodi per accelerare particelle sono basati sull'uso di campi elettrici e magnetici, di cui i primi forniscono energia alle particelle accelerandole e i secondi servono a curvarne la traiettoria sfruttando la forza di Lorentz (ad esempio negli acceleratori circolari: ciclotrone e sincrotrone) o a correggere dispersioni spaziali e di impulso dei fasci accelerati.

I diversi tipi di acceleratori di particelle possono essere classificati in base all'energia (bassa energia: 10-100 MeV; media energia: 100-1000 MeV; alta energia: > 1 GeV), in base all'intensità dei fasci emessi, in base al tipo di particelle accelerate (elettroni, protoni, ioni pesanti) ma, fondamentalmente si dividono in due categorie principali:

- Acceleratori a bersaglio fisso
- Acceleratori a collisione (colliders) (4)

Tra gli acceleratori a bersaglio fisso troviamo gli acceleratori elettrostatici di Van De Graaff che accelerano le particelle sfruttando una differenza di potenziale generata grazie all'accumulo di cariche attraverso un sistema meccanico costituito da un nastro ed alcuni pettini atti a depositare le cariche sul nastro e poi estrarle per accumularle nel punto di accumulo (Fig. 2).

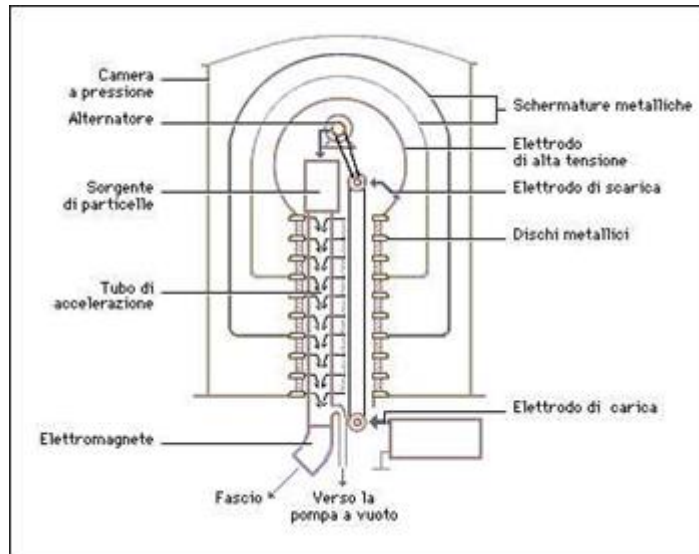


Figura 2: Acceleratore di Van de Graaff (5).

In questo tipo di generatori si raggiungono tensioni che sono proporzionali al raggio dell'elettrodo ad alta tensione. Una macchina con elettrodo di un metro di raggio, può raggiungere una tensione massima di 10^6 V. Per raggiungere tale tensione occorre però che l'elettrodo sia distante da ogni altro oggetto e che l'aria sia quasi priva di umidità. Per ottenere tale caratteristica, dopo il 1935, tutti i generatori sono stati realizzati racchiusi in un recipiente cilindrico di acciaio contenente un gas (aria deumidificata oppure elio), ad una pressione di 10-20 atm. Con la pressione infatti aumenta la capacità del gas di sopportare campi elettrici elevati senza dar luogo a scintille. Dopo il 1940 sono stati usati gas diversi dall'aria (ossido di carbonio, freon, azoto), e realizzati generatori con tensioni da 1 MV fino a 7 MV.

La sorgente utilizzata per irraggiare i campioni cellulari con protoni è l'acceleratore di particelle "Van De Graaff CN" da 7 MeV situato presso i Laboratori Nazionali di Legnaro.

L'acceleratore elettrostatico del tipo "Van de Graaff" CN è stato il primo ad essere installato ai LNL nel 1961. Si tratta di un acceleratore verticale alto circa 7 m, alla sua sommità è posto il terminale ad alta tensione (fino a circa 7 milioni di Volt, da cui anche il nome di "CN-7 MV" dato all'apparato), sostenuto da una colonna e, al suo interno, attraversato dal tubo

accelerante, lungo il quale si distribuisce uniformemente la tensione elettrostatica, tra i 7 MV della testa fino al potenziale di terra (0 V) a livello del suolo (Fig. 3). Il tutto è contenuto in un grande recipiente metallico (la “tank”), riempito di gas ad alta pressione dalle proprietà isolanti. All’interno della testa dell’acceleratore (detta “terminale” di alta tensione) trova spazio la sorgente di particelle (ioni positivi di materiali quali H ed He) e gli apparati che la alimentano (generatori di tensione, alimentatori, apparati per mantenere il canale del fascio in vuoto). Le particelle, finché stanno all’interno del terminale, sono protette dalla sua gabbia di Faraday e non risentono della tensione di quest’ultimo. Non appena però sono condotte verso il basso da sistemi di deflessione e focalizzazione elettrostatica ed escono dalla zona del terminale, sentono il campo elettrico distribuito lungo il tubo e vengono accelerate fino ad una energia finale (all’uscita del tubo) pari a $E = q V$, laddove q è lo stato di carica dello ione (ovvero è un numero che rappresenta di quante cariche elettroniche lo ione è lontano dalla neutralità) e V è la tensione tra il terminale e massa.



Figura 3: La fotografia rappresenta la colonna accelerante dell’acceleratore CN, al cui vertice si trova il terminale a 7 MV.

A questo punto non resta che condurre le particelle accelerate verso il bersaglio e il punto misura tramite deflettori e lenti magnetostatiche. Con il CN si accelerano fasci di protoni, deuterio ed elio (a carica singola o doppia) che sono utilizzati per studi di fisica fondamentale ed applicata. I principali campi applicativi sono: la scienza dei materiali, la radiobiologia, l'interazione radiazione-materia, il danneggiamento da radiazioni, la dosimetria (6).

1.2 PROGETTO PLASMA FOCUS

1.2.1 SORGENTE DI RADIAZIONE X AD ALTO RATEO DI DOSE

Il Plasma Focus (PF), o Dense Plasma Focus (DPF), è un dispositivo in grado di generare, accelerare, comprimere e confinare il plasma. Il plasma è il quarto stato della materia, differente dallo stato solido, liquido e gas.

I dispositivi PF sono in grado di produrre scariche elettriche pulsate nei gas, nei quali micro instabilità e turbolenze portano alla produzione di potenti fasci di elettroni e ioni e all'emissione di una grande quantità di raggi X, e quando il gas di riempimento è il deuterio, anche alla produzione di neutroni e protoni di fusione.

Esistono due diverse configurazioni di base di tale dispositivo, proposte e realizzate indipendentemente da J. W. Mather negli Stati Uniti nel 1964 e da N. V. Filippov nell'URSS nel 1960. Nella configurazione di Mather l'asse di simmetria del sistema coincide con l'asse del moto macroscopico del plasma, mentre in quella di Filippov l'asse di simmetria è perpendicolare all'asse del moto macroscopico (7).

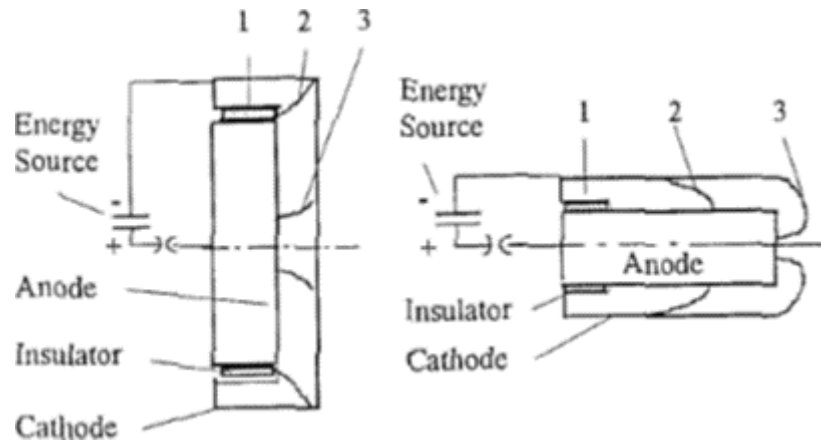


Figura 4: A sinistra lo schema di un PF di tipo Filippov; a destra di tipo Mather.

Il funzionamento del plasma focus può essere suddiviso idealmente in quattro fasi:

- Fase 1: Breakdown ($\sim 0,3 \mu\text{s}$);
- Fase 2: Accelerazione ($\sim 2 \div 3 \mu\text{s}$)
- Fase 3: Compressione ($\sim 2 \div 3 \text{ ns}$);
- Fase 4: Espansione.

Quando l'interruttore, detto *Rail gap*, viene chiuso, avviene un trasferimento di energia dal condensatore agli elettrodi del plasma focus. Gli elettroni presenti tra gli elettrodi nella camera a vuoto vengono accelerati dal campo elettrico e si forma la guaina di plasma.

Una volta che è stata raggiunta l'energia di ionizzazione del gas, valanghe di ionizzazioni multiple fanno sì che la carica libera cresca esponenzialmente producendo il collasso del gas (fase di breakdown); in un arco di tempo molto breve (dell'ordine di grandezze di μs), l'energia immagazzinata dal banco di condensatori viene scaricata sugli elettrodi. Il gas che riempie il gap tra gli elettrodi interni ed esterni si ionizza e forma un plasma. La presenza della guaina isolante provoca una distorsione del campo elettrico tra i due elettrodi e l'effetto netto è una corrente di ioni che si muove verso l'estremità aperta degli elettrodi e una corrente di elettroni veloci che si muove nella direzione opposta verso le estremità chiuse degli elettrodi.

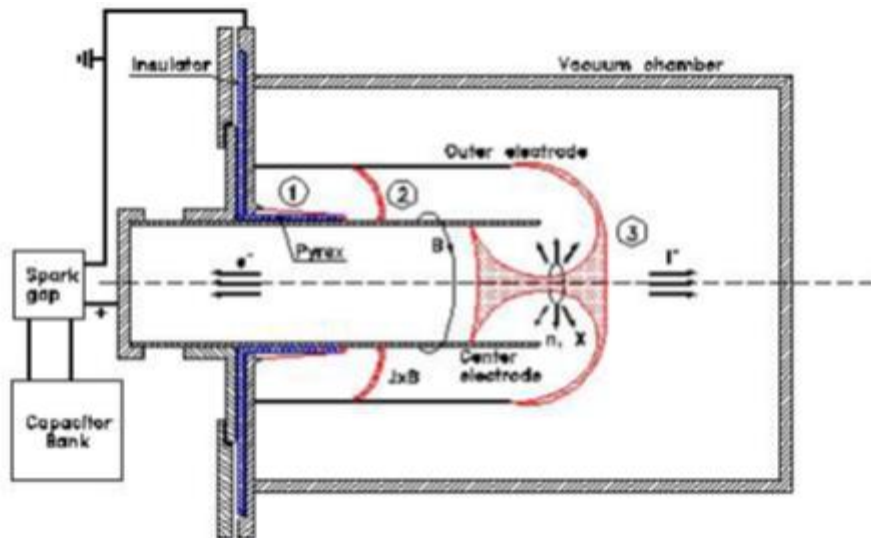


Figura 5: Principio di funzionamento del Plasma Focus. La scarica genera una guaina di plasma sull'isolante (1) che viene accelerata (2) e compressa una volta raggiunta l'estremità dell'elettrodo (3) con conseguente emissione di raggi X, neutroni e formazione di fasci opposti di ioni positivi ed elettroni.

Questa corrente ionica genera un campo magnetico che interagisce con il campo elettrico producendo una forza $\vec{F} = \vec{j} \otimes \vec{B}$ (Legge Faraday-Neumann-Lenz-Henry) la cui componente longitudinale spinge il plasma fino all'estremità dell'anodo e la componente radiale comprime la guaina sull'anodo. Non appena lo strato di corrente si è formato e trasmette la corrente del circuito, il plasma si allontana dall'isolante e aumenta in altezza; il suo profilo si sviluppa in una forma parabolica a causa della dipendenza della pressione magnetica dalla posizione radiale. La guaina viene quindi spinta verso l'estremità aperta degli elettrodi (fase di accelerazione). Mentre l'estremità aperta degli elettrodi viene raggiunta, i campi magnetici prodotti dalle correnti stringono ed avvitano il plasma in una piccola e densa sfera (Pinch o Focus) confinandolo istantaneamente in una regione di volume piccolissima (fase di compressione). Nella fase di Pinch, la temperatura e la pressione del plasma risultano elevatissime e si generano instabilità che portano alla produzione di un fascio di ioni nella direzione dell'estremità aperta degli elettrodi e di un fascio di elettroni, "retro emesso", nella direzione opposta.

Il Pinch è infine distrutto da ulteriori instabilità che provocano un'espansione della colonna di plasma con conseguente dispersione del plasma stesso e interruzione del passaggio di corrente. Questa è la quarta ed ultima fase detta di espansione. La durata dell'intero fenomeno è dell'ordine di pochi microsecondi (8).

Il plasma focus è in grado di produrre diverse tipologie di radiazioni a seconda del gas di lavoro che viene utilizzato. Proprio per questo motivo i campi in cui viene utilizzato sono numerosi: educazione, ricerca, applicazioni industriali e mediche. In ambiente biomedico diversi studi stanno cercando di capire se è possibile l'utilizzo di questa macchina per produrre radioisotopi per l'esame PET (Tomografia a Emissione di Positroni), tecnica di diagnostica medica per la produzione di immagini del corpo in grado di rilevare dati fisiologici e mappe dei processi funzionali dell'organismo, inoltre, potrebbe essere anche impiegato per tecniche IORT (Intra Operative Radio Therapy); il plasma focus, infatti, consente di ottenere un irraggiamento di fasci di elettroni e raggi X a bassa energia ed altissimo rateo di dose in grado di bonificare il tessuto circostante un tumore, in fase di intervento chirurgico. Consentirebbe un elevato numero di trattamenti al giorno e un buon rapporto tra la qualità della radiazione, il successo della terapia e il costo sanitario.

La sorgente utilizzata per irraggiare i campioni a raggi X ad alto rateo di dose è il Plasma Focus situato nei Laboratori di Ricerca del dipartimento di Ingegneria Industriale, "Laboratorio di Montecuccolino", chiamato Plasma Focus for Medical Applications number 3 (PFMA-3), di tipo "Mather". I due elettrodi sono collegati dalla parte chiusa tramite un interruttore ad alta velocità per le alte correnti, ad un banco di condensatori dove viene immagazzinata l'energia. Gli elettrodi sono contenuti in una camera a vuoto riempita con pochi Torr di un gas, scelto in base allo scopo per cui viene utilizzato il PF. Il gas di riempimento utilizzato nei laboratori di Montecuccolino è azoto in quanto si sfrutta solo il fascio di elettroni prodotti dallo strumento.



Figura 6: Plasma focus del laboratorio di Montecuccolino: un PF di tipo Mather è costituito da due elettrodi cilindrici chiusi ad un'estremità e aperti all'altra; una guaina isolante è posta lungo la parte iniziale dell'elettrodo interno.

Per produrre i raggi X, con i quali sono stati effettuati gli irraggiamenti sulle cellule, si sfrutta il fascio di elettroni retro-emesso che, dopo aver attraversato il tubo di estrazione, viene fatto collidere su un bersaglio di ottone. I fotoni così generati prima di giungere sul campione attraversano tre film GaF cromici che simulano lo spessore della pelle.

Le caratteristiche principali del plasma focus sono riportate nella seguente tabella:

Capacità totale	22 μ F
Voltaggio operativo	18 kV
Energia armature	3.6 kJ
Induttanza totale	150 nH
Lunghezza elettrodi	11.6 cm
Diametro elettrodo interno	2.4 cm

Diametro elettrodo esterno	4.8 cm
Pseudoperiodo dei segnali elettrici	8 μ s
Volume camera a vuoto	8 dm ³

Tabella 1: Caratteristiche del Plasma Focus

1.2.2. SORGENTE DI RADIAZIONE X CONVENZIONALE

Per produrre i raggi X si utilizza un tubo, all'interno del quale è stato fatto il vuoto, contenente due elettrodi: un anodo e un catodo.

Un filamento posto al suo interno viene riscaldato dal passaggio di una corrente elettrica producendo così un sottile fascio di elettroni. Gli elettroni così ottenuti vengono accelerati da una differenza di potenziale compresa tra 10 e 150 kV e colpiscono l'anodo perdendo la loro energia per interazione con la materia costituente quest'ultimo. Solo una piccola parte di questa energia compare sotto forma di raggi X, la restante viene dissipata sotto forma di calore.

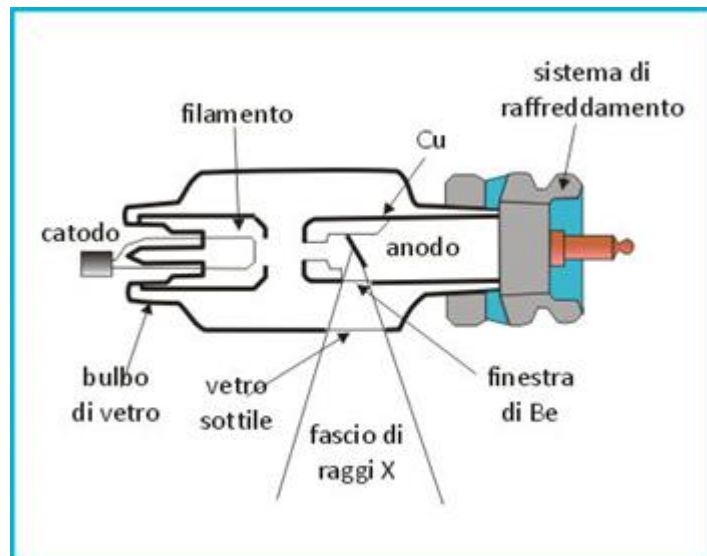


Figura 7: Schema di un tubo a raggi X.

I raggi X sono emessi in tutte le direzioni, e l'anodo, per far in modo che la produzione di fotoni in direzione ortogonale alla finestra sia massima, presenta una superficie inclinata rispetto alla direzione degli elettroni.

Il fascio radiogeno emesso dal tubo è costituito da un insieme di raggi X di differente energia. L'energia media dei raggi X del fascio dipende dall'energia degli elettroni provenienti dal catodo, dal tipo di metallo dell'anodo e dalla presenza o meno di eventuali filtri. Più veloci sono gli elettroni maggiore sarà l'energia dei raggi X; la velocità degli elettroni aumenta o diminuisce aumentando o diminuendo la differenza di potenziale tra anodo e catodo.

I meccanismi di produzione di raggi X sono due:

- Radiazione di frenamento (Bremsstrahlung), circa l'80 %;
- Transizioni atomiche (radiazione caratteristica), circa il 20 %.

1.2.2.1 BREMSSTRAHLUNG

Gli elettroni ad alta velocità presenti nel tubo vengono bruscamente decelerati quando passano vicino agli atomi del materiale che costituisce l'anodo, di solito il tungsteno. Gli elettroni, avendo carica negativa, sono attratti dai nuclei e vengono quindi deviati con conseguente perdita di energia. La perdita di energia si concretizza nell'emissione di radiazione elettromagnetica secondo la relazione $E = h\nu$, con E l'energia, h la costante di Planck e ν la frequenza dell'onda elettromagnetica.

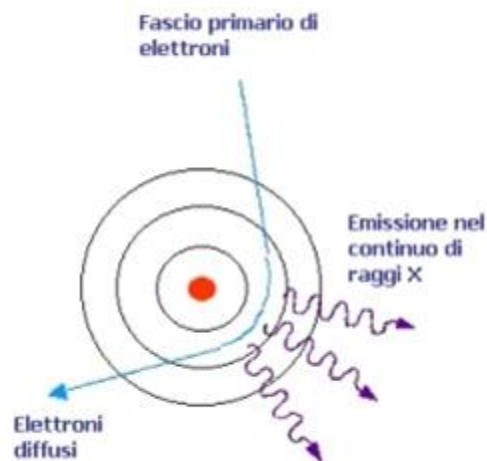


Figura 8: Processo di produzione dei raggi X per Bremsstrahlung.

L'energia di una radiazione X emessa per Bremsstrahlung dipende dall'energia iniziale dell'elettrone e dalla distanza tra l'elettrone e i nuclei di tungsteno.

1.2.2.2 RADIAZIONE CARATTERISTICA

Questo tipo di radiazione è prodotta nel momento in cui un elettrone accelerato urta un elettrone degli orbitali più interni di un atomo che viene rimosso. Quest'ultimo a sua volta verrà sostituito con maggiore probabilità da un elettrone dell'orbitale immediatamente successivo. L'energia persa dall'elettrone che precipita viene emessa sotto forma di radiazione caratteristica. La radiazione X emessa corrisponde alla differenza di energia tra i due livelli, che risulta essere "caratteristica" dell'atomo e dei livelli stessi.



Figura 9: Processo di produzione di raggi X per emissione di radiazione caratteristica.

Quando un elettrone compie un salto quantico esso può realizzarsi tra livelli energetici contigui o non immediatamente successivi: nel primo caso si definisce il picco associato come K_{α} , nel caso in cui il salto sia tra l'orbitale $N+2$ e quello N il picco si denota come K_{β} .

Di seguito è riportato il tipico spettro di emissione di un tubo radiogeno in cui si vedono chiaramente i due meccanismi di produzione: una parte continua dovuta al Bremsstrahlung e i picchi dovuti all'emissione caratteristica.

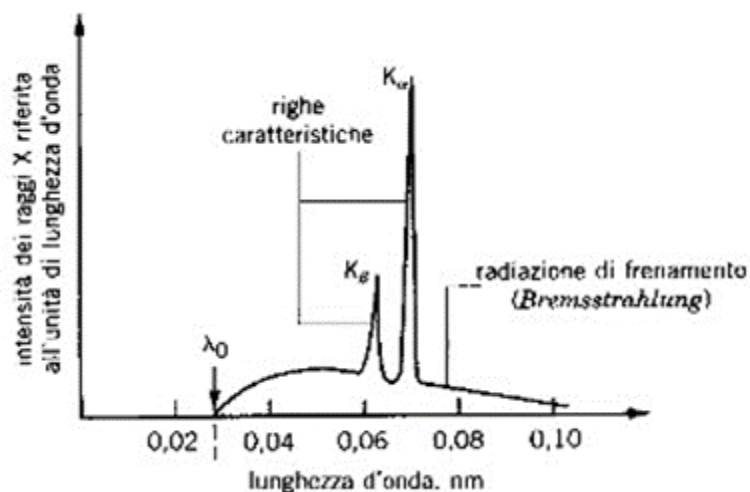


Figura 10: Spettro di emissione dei raggi X.

λ_0 indica la soglia del potenziale di eccitazione al di sotto della quale non si verifica l'emissione caratteristica.

La sorgente utilizzata per irraggiare i campioni cellulari con raggi X a basso rateo di dose è il tubo BALTEAU CSC320/70 situato presso il centro di calibrazione COMECER (SIT n.065/r) di Castel Bolognese. Le condizioni ideali per rendere l'energia media dello spettro di emissione del dispositivo il più vicino possibile all'energia media dello spettro di emissione simulato per il plasma focus sono state identificate nel fascio A4 (ISO-4037-1 1998 - Tab. 3). Per assicurare l'omogeneità del fascio, i campioni cellulari sono stati irraggiati ad una distanza di 50 cm dalla sorgente. I parametri utilizzati durante l'irraggiamento sono riportati in tabella 2. Per raggiungere la dose di 2 Gy sono stati necessari 4 impulsi della durata di 300 sec con qualche minuto di attesa tra un impulso ed il successivo.

La potenza di lavoro utilizzata è:

$$P = I \cdot V = 11 \text{ mA} \cdot 60 \text{ kV} = 660 \text{ W}$$

Potenziale	60 kV
Corrente	11mA
Durata dell'impulso	300 sec
Distanza dalla sorgente	50 cm

Tabella 2: Tabella riassuntiva dei parametri utilizzati per irraggiare i campioni cellulari con il dispositivo Balteau CSC320/70.

Fascio		Vtaggio		Filtraggio (mm)	Primo HVL (mm)			Secondo HVL (mm)		Kerma rate (mGy/h)	
Comecer	ISO 4073	kV	kev	Al	Al	Cu	Al	Cu	Min	Max	
A4	H-60	60	37,3	3,2	2,42	0,079	3,25	0,11	2,2	6500	

Tabella 3: Caratteristiche del fascio Comecer A4.

1.2.2.3 CENNI SUI RAGGI X

È nota come raggi X quella porzione dello spettro elettromagnetico con una lunghezza d'onda compresa approssimativamente tra 10 nanometri (nm) e 1/1000 di nanometro (1 picometro).

I raggi X con una lunghezza d'onda superiore a 0,1 nm sono chiamati *raggi X molli*, quelli con lunghezze minori, sono chiamati *raggi X duri*. I raggi X duri si affiancano ai raggi gamma, più energetici, ma vengono distinti da essi a seconda della loro origine: i fotoni X sono prodotti da variazioni della cinetica degli elettroni, mentre quelli gamma da transizioni e decadimenti all'interno di un nucleo atomico (origine nucleare), o dall'annichilazione di un positrone e di un elettrone.

I raggi X hanno un potere di penetrazione molto elevato: solo spessori dell'ordine dei centimetri di piombo o delle decine di centimetri di calcestruzzo possono fermarli.

CAPITOLO 2

INTERAZIONE RADIAZIONE-MATERIA E LORO EFFETTI BIOLOGICI

In questo capitolo verranno illustrati i diversi meccanismi di interazione della radiazione elettromagnetica con la materia, gli effetti biologici che le radiazioni ionizzanti possono avere sul DNA, sulla membrana e sul citoplasma e le tecniche di valutazione dell'espressione genica.

2.1 INTERAZIONE RADIAZIONE-MATERIA

Le radiazioni possono essere classificate in due grandi categorie, *ionizzanti* e *non ionizzanti* in base alla loro capacità di produrre o meno la ionizzazione del mezzo attraversato.

Le radiazioni non ionizzanti non possono ionizzare la materia in quanto la loro energia è minore del potenziale di ionizzazione degli atomi o delle molecole dell'assorbitore.

Le radiazioni ionizzanti a loro volta possono essere divise in:

- *Direttamente ionizzanti*: comprendono particelle cariche che depositano l'energia nell'assorbitore attraverso un processo diretto che coinvolge l'interazione coulombiana tra le particelle cariche direttamente ionizzanti e gli elettroni orbitali degli atomi dell'assorbitore;
- *Indirettamente ionizzanti*: comprendono particelle neutre che depositano energia sull'assorbitore attraverso un processo a due steps, nel primo c'è il rilascio di una particella carica nell'assorbitore, nel secondo questa particella deposita energia sull'assorbitore

attraverso l'interazione coulombiana con gli elettroni orbitali degli atomi nell'assorbitore (9).

In questo lavoro ci occuperemo principalmente delle radiazioni non direttamente ionizzanti. Le modalità di interazione delle particelle neutre con la materia sono fortemente dipendenti dall'energia delle radiazioni. Per energie comprese tra pochi keV a poche decine di MeV le modalità di interazione sono essenzialmente l'effetto fotoelettrico, la diffusione Compton e Rayleigh e la produzione di coppie.

2.1.1 EFFETTO FOTOELETTRICO

Questo tipo di interazione coinvolge tutto l'atomo: in esso un fotone interagisce con uno degli elettroni orbitali di un atomo del mezzo assorbente, cedendogli tutta la sua energia. A seguito dell'interazione il fotone scompare, l'atomo risulta ionizzato e si ha l'espulsione di un elettrone con energia pari a:

$$E_e = h\nu - E_b$$

con E_e , $h\nu$, E_b rispettivamente l'energia dell'elettrone, del fotone e l'energia di legame.

Se l'elettrone rimosso appartiene ad uno degli orbitali interni il suo posto verrà preso da un elettrone più esterno, con conseguente emissione dell'energia corrispondente alla differenza di energia dei due elettroni sotto forma di un fotone X di fluorescenza.

L'effetto fotoelettrico diventa trascurabile per fotoni di energia superiore a poche centinaia di keV, mentre risulta l'effetto di interazione predominante al di sotto dei 100-150 keV (10).

2.1.2 EFFETTO COMPTON E RAYLEIGH

Nell'effetto Compton il fotone incidente di energia iniziale $h\nu$ non scompare dopo l'interazione, ma oltre all'elettrone estratto dall'atomo si ottiene un

fotone diffuso di energia $h\nu'$ inferiore a quella iniziale con una direzione diversa.

L'angolo di deflessione risulta legato all'energia ceduta nell'interazione, la relazione che lega l'energia del fotone diffuso E_s , l'energia del fotone incidente iniziale E_i , e l'angolo di deflessione θ è la seguente:

$$E = \frac{E_i}{[1 + (E_i/m_e c^2)(1 - \cos \theta)]}$$

Dove $m_e c^2$ è l'energia corrispondente alla massa di riposo dell'elettrone (511keV). La deflessione, quindi, è tanto maggiore quanto maggiore è l'energia ceduta nell'interazione.

L'interazione per effetto Compton risulta la più probabile nell'intervallo di energie dei fotoni fra le poche centinaia di keV e i pochi MeV.

Lo scattering coerente o di Rayleigh avviene tra un fotone ed un atomo del mezzo assorbitore nel suo insieme. In tale processo il fotone è deflesso senza una perdita sostanziale di energia in quanto la massa dell'atomo è relativamente grande.

Lo scattering Rayleigh ha probabilità non trascurabili solo per energie iniziale dei fotoni basse, inferiori a circa 50 keV.

2.1.3 PRODUZIONE DI COPPIE

Questo fenomeno ha luogo quando il fotone passa nelle vicinanze del nucleo e, per interazione con il forte campo elettromagnetico del nucleo stesso, scompare dando luogo ad una coppia di elettroni, uno positivo, l'altro negativo.

L'energia di soglia del fenomeno è di 1,022 MeV, poiché questo è il valore di energia corrispondente alla somma della massa a riposo dell'elettrone e del positrone. Quanto più è grande l'energia tanto maggiore è la probabilità dell'effetto di produzione di coppie.

2.2 EFFETTI BIOLOGICI DELLE RADIAZIONI

Quando le radiazioni ionizzanti arrivano su di un organismo vivente cedono totalmente o in parte la loro energia alle cellule che lo compongono, provocando la ionizzazione di atomi o molecole.

Il danno biologico, provocato dalla radiazione, deriva dalla ionizzazione degli atomi che compongono le strutture molecolari alla base delle cellule negli organismi viventi. Un atomo ionizzato tenderà a produrre nuovi legami chimici all'interno della molecola alla quale appartiene e come conseguenza si può provocare una compromissione delle funzioni vitali della cellula.

La catena degli eventi che porta al danno biologico da radiazioni è la seguente:

Evento	Limiti di tempo
Interazione iniziale	$10^{-24} - 10^{-14} s$
Stadio fisico chimico (Deposito di energia tramite ionizzazione)	$10^{-12} - 10^{-8} s$
Danno chimico (Radicali liberi, molecole eccitate e reazioni intermolecolari)	$10^{-7} s - ore$
Danno biomolecolare (Proteine, acidi nucleici, etc)	$ms - ore$
Effetti biologici precoci (Morte cellulare)	$ore - settimane$
Effetti biologici tardivi (Induzione di neoplasie, effetti genetici)	$mesi - anni$

Tabella 4: Catena di eventi che porta alla lesione da radiazioni (11).

Non è possibile descrivere la sequenza di eventi che collegano l'assorbimento fisico dell'energia con gli effetti biologici conseguenti.

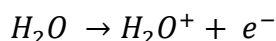
2.2.1 DANNO CHIMICO

I radicali liberi sono atomi o molecole elettricamente neutri, aventi un elettrone spaiato nell'orbita esterna.

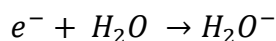
Lo stato quantico dell'elettrone è determinato da un certo numero di parametri, uno dei quali è lo *spin*, che può avere solo due valori. Nell'atomo e nelle molecole stabili, gli elettroni orbitali si trovano a coppie, con opposti valori di spin. Per effetto della radiazione si forma un radicale libero quando un atomo rimane con uno dei suoi elettroni orbitali esterni spaiato rispetto allo spin. I radicali liberi sono molto reattivi, in quanto hanno una grande tendenza ad accoppiare l'elettrone con uno simile presente in un altro radicale, oppure ad eliminare l'elettrone spaiato attraverso una reazione di trasferimento di elettroni. Perciò i radicali liberi possono essere sia accettori di elettroni sia donatori di elettroni.

Quando viene irradiato del materiale vivente, che è costituito per il 70 - 90% da acqua, la maggior parte dell'energia assorbita sarà catturata dalle molecole di acqua.

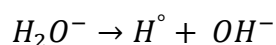
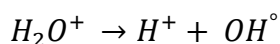
Quando si irradia acqua, questa viene ionizzata con produzione di un elettrone libero e di una molecola d'acqua con carica positiva.



L'elettrone (e^-) liberato interagirà nuovamente con una molecola d'acqua trasformandola in una molecola a carica negativa.



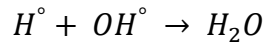
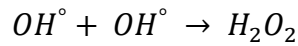
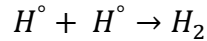
Né l' H_2O^- , né l' H_2O^+ sono stabili e ciascuno si dissocia dando origine a uno ione e a un radicale libero:



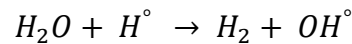
Dove il punto ($^\circ$) indica l'elettrone spaiato del radicale libero.

A questo punto i radicali possono:

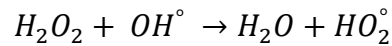
- combinarsi fra loro:



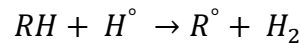
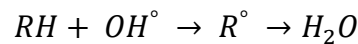
- interagire con molecole d'acqua:



- interagire con i loro stessi prodotti:



Le specie radicaliche possono anche estrarre idrogeno da molecole organiche, RH:



Queste reazioni forniscono nuovi tipi di radicali che possono reagire con molecole biologicamente importanti e provocare danni radiobiologici.

Reazioni di grande interesse radiobiologico sono quelle che avvengono quando i radicali reagiscono con le molecole di ossigeno, in quanto possono condurre alla produzione di radicali perossidi che si sono rivelati biologicamente dannosi. Il potenziamento dell'efficacia delle radiazioni in presenza di ossigeno è noto come *effetto ossigeno*.

2.2.2 DANNO BIOMOLECOLARE

I primi biochimici che si occuparono delle radiazioni concentrarono la loro attenzione sugli effetti delle suddette sulle proteine e su particolari enzimi; negli anni '60 e '70 crescente attenzione è stata rivolta agli acidi nucleici, ed

in modo particolare all'acido desossiribonucleico (DNA). Il DNA è una doppia elica le cui catene sono composte da fosfati alternati con gruppi pentosi a ciascuno dei quali è associata una base azotata; le due catene sono unite insieme da ponti di idrogeno. Le basi azotate sono quattro, due puriniche (Adenina e Guanina), due pirimidiniche (Citosina e Guanina). Adenina e Timina si legano mediante un doppio legame idrogeno mentre Citosina e Guanina si legano mediante un triplo legame idrogeno. Queste basi azotate, raggruppate in gruppi di tre (triplette), sono organizzate in una catena di nucleotidi che formano i vari geni, localizzati sui cromosomi.

Ciascun gene provvede alla codifica di una particolare proteina. Ogni tripletta determina l'inserimento nella proteina in formazione di un ben definito amminoacido.

Gli eventuali errori che si possono creare nella codificazione genetica in seguito alle radiazioni, possono dare origine a molecole di DNA che hanno subito dei cambiamenti di posizione delle triplette con conseguenze sulla proteina costruita. Tali cambiamenti possono portare a malattie di origine genetica.

L'alterazione strutturale radio indotta degli acidi nucleici comporta un effetto letale a carico della cellula quando determina la perdita della sua capacità di dividersi. Ciò si verifica per una compromissione irreparabile dell'informazione ereditaria codificata nella sequenza dei nucleotidi del DNA. Essa può verificarsi mediante tre meccanismi principali: rottura di singola/doppia catena, modificazione strutturale delle basi e creazione di ponti intramolecolari.

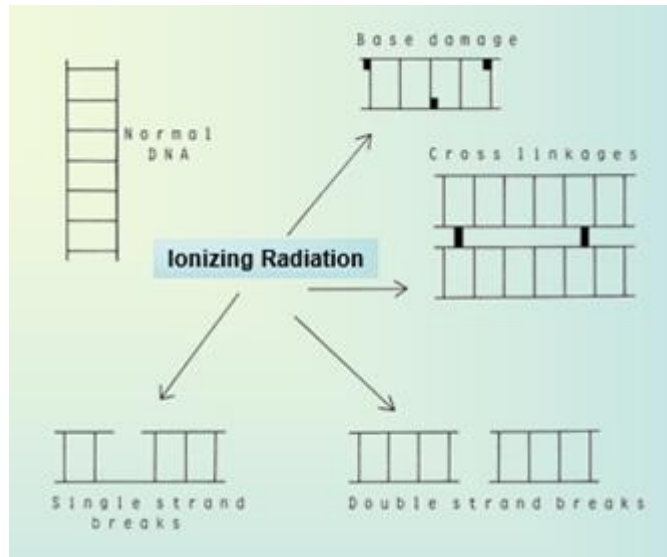


Figura 11: Tre dei tipi principali di danno da radiazioni del DNA.

Si ha la rottura di una singola catena (single strand breaks) quando ad un danno in una delle due catene corrisponde la catena complementare intatta nella parte opposta. È stato dimostrato che il numero di single strand breaks è legato linearmente alla dose di radiazione per un range molto ampio (da 0.2 Gy a 60000 Gy). L'energia media necessaria per produrre una SSB è compresa tra 10 e 20 eV nel caso di radiazioni a basso L.E.T. (trasferimento lineare di energia). Il meccanismo di riparazione di questo tipo di danno è abbastanza semplice e avviene mediante asportazione: nella prima fase del processo si ha il riconoscimento della rottura da parte della endonucleasi, in seguito si ha l'asportazione della lesione e la lacuna così creata viene colmata con nuove basi dalla DNA polimerasi che ricostruisce la catena danneggiata usando come guida la catena complementare sana. Il tratto di DNA ricostruito sarà infine legato alla catena grazie alla DNA ligasi.

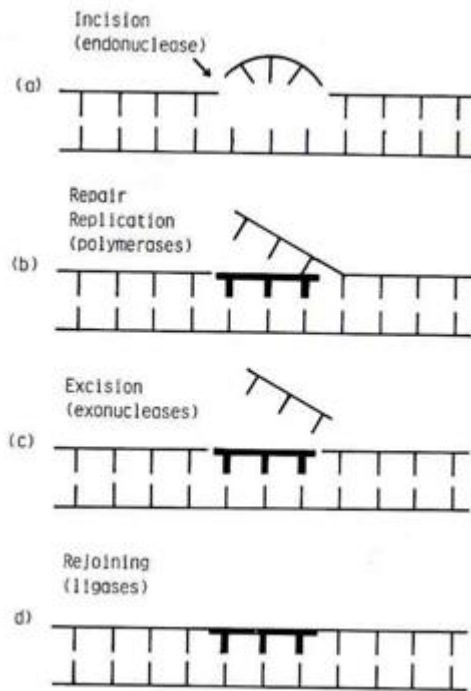


Figura 12: Schema del meccanismo di riparazione mediante asportazione di lesioni radio indotte.

Si ha rottura di doppia catena (dual strand breaks) quando due rotture su singole catene adiacenti provocano il distacco di una parte del DNA. Una doppia rottura si può avere per eventi ionizzanti dovuti alla stessa radiazione, che interessano due catene contemporaneamente o per la concomitanza di due eventi dovuti a radiazioni diverse che, casualmente, interessano due punti prossimi di due catene della stessa macromolecola. Il primo caso si ha soprattutto per radiazioni ad alto L.E.T.; l'elevata densità di rilascio della dose, infatti, rende abbastanza probabile un evento a doppia rottura. Il secondo caso si ha quando una radiazione produce la seconda rottura quando la prima non è ancora stata riparata.

Il rapporto tra la dose e il numero di DBSs indotte rimane in dubbio, almeno nella cellula di mammifero. Alcuni ricercatori hanno osservato una semplice dipendenza lineare, altri invece hanno dimostrato che soltanto la parte iniziale della curva alle dosi più ridotte è lineare, e che a dosi più elevate il numero di DBSs aumenta con la potenza della dose, cioè la curva dose-effetto è lineare quadratica. Sembra che una rottura di doppia catena non

possa essere riparata o che eventualmente possa avvenire una riparazione scorretta o tendente all'errore.

La creazione di ponti intramolecolari consiste nella formazione di legami covalenti che bloccano il processo di duplicazione, impedendo la separazione delle due catene dell'acido nucleico per la duplicazione.

I danni da radiazione a carico della basi puriniche e pirimidiniche riguardano soprattutto danni a carico della timina. Essi presentano una correlazione lineare con la dose e si ritiene che insorgano attraverso l'interazione con radicali liberi acquosi come $^{\bullet}OH$. In questo caso se il danno non venisse riparato si andrebbe incontro ad una modificazione genetica.

Nel caso in cui gli errori causati dalla radiazione siano stati elevati si può verificare la morte programmata della cellula per apoptosi oppure alterazioni di tipo mutagenico od oncologico.

Le mutazioni che si possono verificare sono di due tipi:

- Geniche o puntiformi;
- Cromosomiche.

Le mutazioni geniche sono abbastanza comuni e consistono in cambiamenti della sequenza nucleotidica del DNA che determinano la sostituzione di un amminoacido in una catena proteica. La proteina risultante da questo cambiamento è, generalmente, difettosa. Si possono verificare per: sostituzione di base; inserzione/duplicazione/delezione (frameshift).

Le sostituzioni di base si suddividono in:

- **Transizioni:** sostituzione di una purina (A, G) con un'altra purina o di una pirimidina (T, C) con un'altra pirimidina;
- **Transversioni:** sostituzione di una purina con una pirimidina o viceversa; l'orientamento delle purine e pirimidine nelle due eliche è invertito.

La mutazione frameshift è dovuta a inserzione o delezione di una o poche coppie di basi (mai nel numero di tre o multipli di tre) in regioni codificanti o non. Ne deriva uno scorrimento del frame di lettura dal sito mutato in poi.

Se la base o sequenza inserita è identica a quella precedente si parla di duplicazione.

Le inserzioni, le duplicazioni o le delezioni portano quasi sempre ad un fenotipo mutante completo perché sono responsabili della sintesi di proteine gravemente alterate. Invece una delezione o addizione di tre coppie di nucleotidi porta alla perdita o acquisto di un aminoacido (o più) nella sequenza proteica senza che nel complesso questa sia seriamente modificata.

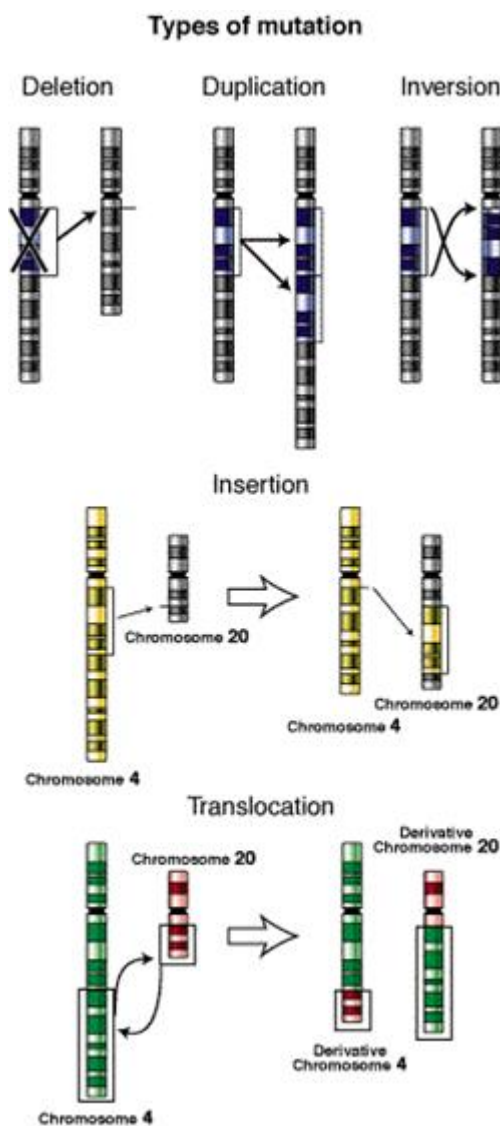


Figura 13: Tipi di mutazione genica.

Le mutazioni cromosomiche possono essere classificate in due gruppi principali: *numeriche* (poliploidia e aneuploidia): cambiamenti nel numero di interi assetti cromosomici oppure modificazioni nel numero di singoli cromosomi; *strutturali* (aberrazioni cromosomiche): modificazioni nella sequenza del DNA lungo l'asse del cromosoma in seguito ad eventi di rottura del cromosoma stesso.

Per quanto riguarda le mutazioni cromosomiche che implicano cambiamenti nella struttura del cromosoma ne esistono di quattro tipi principali:

- Delezioni e duplicazioni: comportano un cambiamento nella quantità di DNA;
- Inversioni: comportano un cambiamento nell'orientamento di un tratto cromosomico;
- Traslocazioni: implicano un cambiamento nella localizzazione di un segmento cromosomico.

Tutte queste mutazioni hanno origine da una o più rotture nel cromosoma.

Se una rottura si verifica all'interno del gene, la sua funzione può andare perduta, pertanto i danni saranno strettamente correlati all'informazione genetica che viene persa.

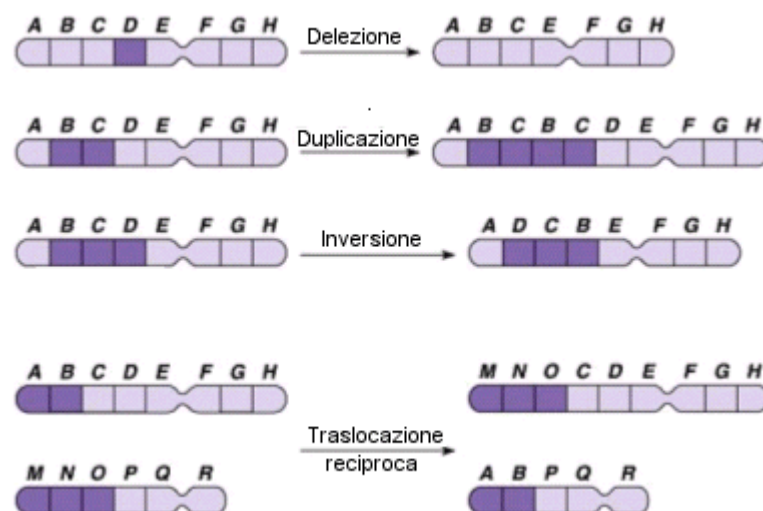


Figura 14: Principali tipologie di mutazioni cromosomiche.

2.2.3 EFFETTI BIOLOGICI PRECOCI E TARDIVI

La capacità riproduttiva delle cellule sia *in vivo* sia *in vitro* costituisce un buon parametro per misurare l'effetto delle radiazioni sul materiale vivente. Si possono distinguere due fenomeni: la morte cellulare e quella riproduttiva. Si parla di morte cellulare quando cellule non proliferanti, quali nervi e muscoli, perdono la loro funzione biologica; si parla invece di morte riproduttiva quando cellule attivamente proliferanti, quali cellule staminali, ematopoietiche o cellule coltivate *in vitro*, perdono la capacità di riprodursi. La capacità di una singola cellula di riprodursi e formare una colonia è una prova della sua integrità. La perdita di tale funzione in relazione alla dose di radiazioni è quantitativamente descritta dalle cosiddette curve di sopravvivenza delle popolazioni irraggiate, che esprimono la percentuale di cellule sopravvivenute in funzione della dose somministrata. Un esempio schematico per irradiazione acuta con raggi X o γ è dato nella curva a della figura sottostante:

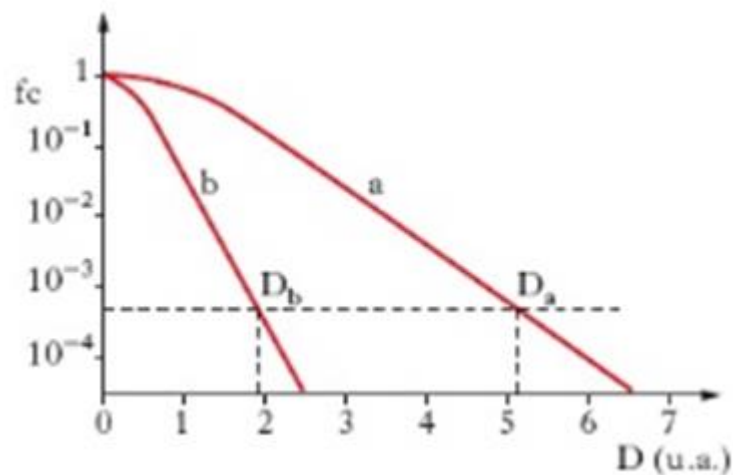


Figura 15: Curve di sopravvivenza di popolazioni cellulari di Mammiferi irradiate con dose unica acuta di raggi X o gamma (a) o di neutroni veloci (b); D , dose assorbita (in unità arbitrarie); f_c , frazione di cellule sopravvivenute.

La curva presenta, alle basse dosi, una “spalla” iniziale seguita, per dosi progressivamente crescenti, da un tratto finale con andamento approssimativamente esponenziale.

La dose necessaria per ridurre del 37% le cellule sopravvivenenti nel tratto esponenziale della curva è denominata D_{α} e caratterizza, per convenzione, la radiosensibilità intrinseca della popolazione cellulare. Poiché cellule in fasi diverse del ciclo di divisione hanno sensibilità diversa, la curva di sopravvivenza di una popolazione in accrescimento esponenziale è la media risultante dalla risposta delle varie sottopopolazioni.

Lo studio degli effetti delle radiazioni in cellule di mammifero coltivate in vitro ha permesso di conoscere la relazione fra radiazioni, ciclo cellulare e riparazione. Le varie fasi del ciclo cellulare sono strettamente condizionate dal completamento della fase precedente. La successione delle varie fasi del ciclo è regolata da specifici punti di controllo (*checkpoints*).

Dopo l'esposizione a radiazioni le cellule sono in grado di rallentare drasticamente la loro progressione, accumulandosi in punti di controllo tra la fase G_1 e S e la fase G_2 e M del ciclo cellulare. Si determina in tal modo rispettivamente un blocco in G_1 e/o in G_2 . Questi rallentamenti transitori concedono un tempo maggiore alle attività riparative, limitando il rischio di avere, nella fase di sintesi del DNA (fase S) e quindi nelle generazioni successive, cellule fortemente danneggiate. Le fasi M e G_2 sono le più sensibili, mentre più radioresistenti sono le cellule in fase S . Secondo alcuni autori queste variazioni possono essere messe in relazione con la conformazione e la compattezza del DNA nelle diverse fasi (12).

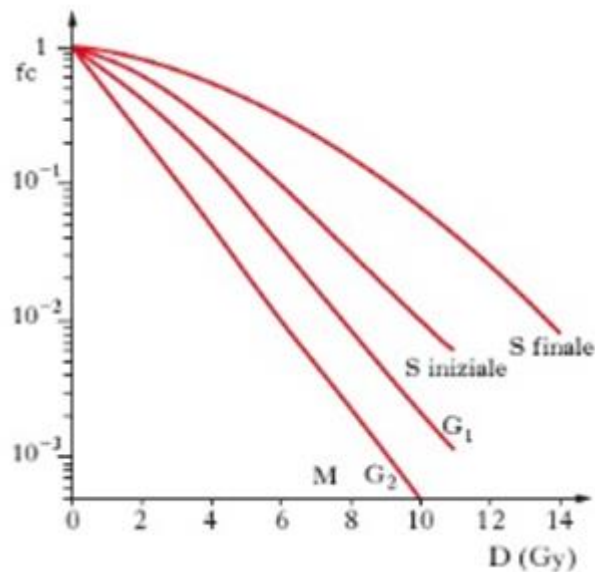


Figura 16: Curve di sopravvivenza di cellule irradiate in fasi differenti del ciclo cellulare: G1-S-G2, interfase; M, mitosi.

2.2.4 RIPARAZIONE DEL DANNO DA RADIAZIONI

Ogni effetto radiobiologico può essere considerato come la risultante di due forze che operano in senso opposto: da una parte, il danno indotto dalla radiazione sulle strutture sensibili della cellula; dall'altra, i meccanismi che ogni sistema biologico può spontaneamente mettere in atto per riparare tale danno. Gli effetti della riparazione del danno vengono studiati sia a livello molecolare sia a livello cellulare. Diversi tipi di riparazione sono stati descritti in cellule di mammifero in coltura e verificati poi in modelli sperimentali *in vivo*. In assenza di divisione cellulare e in condizioni sperimentali adatte, si verifica una riparazione del cosiddetto danno subletale. In questo caso le cellule, durante l'intervallo tra le due dosi somministrate nell'arco di alcune ore, riparano il danno inflitto dalla prima. Il danno, dopo due dosi intervallate, risulterà quindi inferiore a quello atteso dopo la somministrazione di una singola irradiazione di intensità uguale alla somma delle due. Un altro tipo di riparazione riguarda il danno potenzialmente letale: quando si ritarda sperimentalmente l'inizio della divisione cellulare successiva

all'irradiazione, il risultato è che il numero di cellule inattivate risulta inferiore a quello che ci si sarebbe atteso se le cellule fossero state libere di dividersi normalmente.

La riparazione del danno subletale e di quello potenzialmente letale sono particolarmente evidenti dopo irradiazione X o γ . Esiste infine un tipo diverso di riparazione, che riguarda l'intero tessuto: si realizza quando la frazione di cellule che sopravvive a una certa dose ripopola il tessuto irradiato e ne ricostituisce così l'integrità.

I fenomeni di riparazione descritti spiegano un'osservazione del tutto generale, cioè che riducendo l'intensità della dose si ottiene di solito una riduzione dell'effetto.

2.3 FATTORI CHE INFLUENZANO L'EFFETTO BIOLOGICO DELLE RADIAZIONI

Dato uno stesso tipo di radiazione, non è indifferente, dal punto di vista biologico, la possibilità che in tempi diversi si possano verificare effetti differenti.

Fattori fisici, chimici e biologici possono modificare l'entità del danno radiobiologico.

2.3.1 EFFETTO OSSIGENO

In presenza di ossigeno molecolare tutti i sistemi biologici sono molto più sensibili ai raggi X e γ di quanto non avvenga quando sono irradiati a livelli di ossigeno molto bassi (ipossia) o in assenza di ossigeno (anossia). Questa proprietà dell'ossigeno di aumentare l'efficacia di una dose è nota come *effetto ossigeno*, e costituisce uno dei fenomeni più importanti della radiobiologia.

Si ritiene che la sensibilizzazione da ossigeno avvenga attraverso un processo di fissazione, il quale comporta la combinazione dell'ossigeno con i radicali liberi formati nella molecola bersaglio in modo da generare radicali perossidi. Un'ipotesi alternativa propone che le proprietà radiosensibilizzanti dell'ossigeno siano correlate alla sua proprietà di affinità per gli elettroni. Le radiazioni, infatti, possono ionizzare direttamente le molecole bersaglio, e gli elettroni liberi così prodotti possono ricombinarsi nella sede iniziale della loro produzione o spostarsi lungo la molecola ad una sede di intrappolamento degli elettroni.

Quanto più a lungo gli elettroni rimangono liberi prima della ricombinazione, tanto maggiore è il danno che possono provocare. Gli agenti con affinità per gli elettroni, come l'ossigeno, possono reagire con questi elettroni liberi e impedire in questo modo la ricombinazione, favorendo, così, lo stabilirsi di un danno maggiore.

È importante notare che le modificazioni di radiosensibilità sono provocate dalla concentrazione di ossigeno all'interno delle cellule e dei tessuti al momento dell'irradiazione e non già dalla pressione parziale di ossigeno attorno a loro. Ovviamente di norma è presente un equilibrio tra la concentrazione di ossigeno intracellulare ed extracellulare.

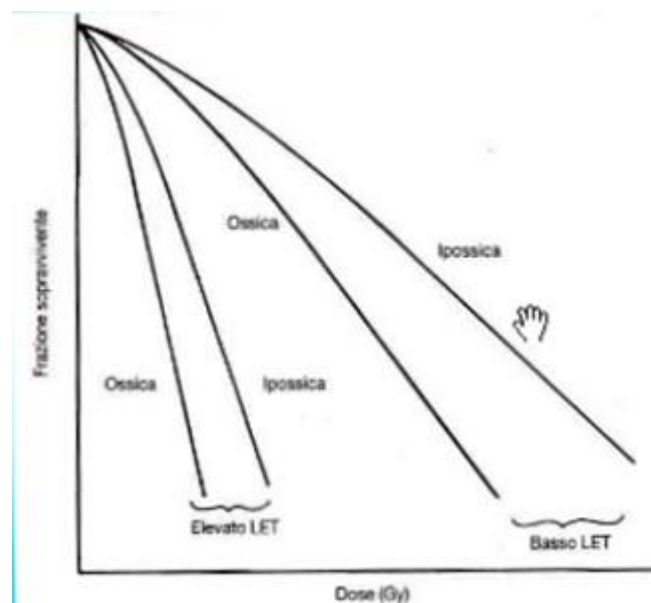


Figura 17: Efficacia dell'ossigeno come agente modificante per le radiazioni ad alto e basso LET.

2.4 GLI EFFETTI DELLE RADIAZIONI DULL'UOMO

Gli effetti delle radiazioni nei tessuti e nell'organismo umano possono essere la conseguenza o della morte di un gran numero di cellule nel tessuto (effetto somatico) o di danni nell'embrione (effetto teratogeno). Manifestazioni del danno in una singola cellula possono essere la causa del cancro (effetti stocastici) o avere conseguenze nelle generazioni successive (effetti genetici).

2.4.1 EFFETTI SOMATICI

La sensibilità di un tessuto dipende dal grado di differenziazione e dalla capacità proliferativa delle cellule che lo costituiscono. La dose di radiazione necessaria per distruggere una funzione cellulare in cellule differenziate è molto più alta di quella necessaria per bloccare l'attiva divisione cellulare. I danni si riscontrano a livello del midollo osseo (leucopenia, linfopenia, piastrinopenia, anemia aplastica), dell'intestino tenue (perdita dell'epitelio, ulcerazione, alterazione dell'equilibrio idrico-salino), della cute e dei suoi annessi (eritema, desquamazione secca e umida, ulcerazione, necrosi, depilazione), degli organi maschili della riproduzione (sterilità transitoria o permanente).

I tessuti a rinnovamento più lento, quali il fegato, il polmone, il rene, che hanno una struttura funzionale flessibile, hanno anche risposte più ritardate e sono in genere sensibili soltanto a dosi relativamente elevate.

L'intervallo di tempo fra l'irradiazione e l'espressione del danno nel tessuto irradiato dipende dall'intervallo di tempo necessario perché una cellula da una fase indifferenziata (cellula staminale) si differenzi, acquistando tutte le funzioni fisiologiche tipiche del tessuto.

In un organismo esposto a radiazioni, inoltre, è necessario distinguere se l'esposizione è stata limitata soltanto a una parte del corpo o è stata totale:

nel primo caso le conseguenze riguardano principalmente il tessuto o l'organo irradiato; nel secondo caso si parlerà di "panirradiazione". Individui esposti a irradiazione mostrano:

- Una sindrome neurologica, caratterizzata da gravi lesioni a carico del sistema nervoso centrale, che si osserva entro poche ore o pochissimi giorni da un trattamento acuto su tutto il corpo con raggi X o γ (dosi dell'ordine di alcune decine di Gy);
- Una sindrome intestinale, che si manifesta entro alcuni giorni o un paio di settimane con vomito, diarrea, emorragie, febbre (10 Gy o più);
- Una sindrome ematologica, che può comparire, dopo l'irradiazione, in un periodo che va da pochi giorni fino a due mesi, con infezioni, febbre, emorragie, perdita di peli e capelli (2-10 Gy).

Si ritiene che la dose letale per il 50 % degli individui irradiati, nel giro di circa due mesi e in assenza di qualsiasi terapia, sia tra 3 e 6 Gy.

2.4.2 EFFETTI TERATOGENI

Gli effetti teratogeni delle radiazioni nei vari stadi embrionali e fetali dello sviluppo sono stati osservati in animali da laboratorio, ma le conclusioni raggiunte sono applicabili anche all'uomo. La fase che precede l'impianto dell'ovulo fecondato è quella più sensibile; in questa fase, infatti, le radiazioni causano la morte prenatale dell'embrione; nella fase successiva all'impianto dell'embrione nell'utero e nella organogenesi le conseguenze delle radiazioni sono ritardo nella crescita e malformazioni dell'embrione. È stato valutato che una dose di 0,05 Gy di radiazione induce una letalità prenatale compresa fra 0 e 1 ogni 1000 nati. (12)

2.4.3 EFFETTI STOCASTICI

Questo tipo di danno si manifesta anche a distanza di anni in relazione alla dose assorbita dall'individuo e non presenta valori di soglia di dose, dal momento che anche il danno di una sola cellula può determinare gravi conseguenze nell'individuo; alla base di questa considerazione vi è l'origine clonale del cancro.

L'intervallo fra l'irradiazione e la comparsa di cellule tumorali può durare anni e decenni. La cancerogenesi è un processo complesso a più stadi: una fase di inizio in cui la cellula viene danneggiata, una fase di promozione quando la cellula inizierà a dividersi, e una fase di progressione legata alla capacità delle cellule stesse di crescere in maniera incontrollata.

Il periodo che intercorre fra la radiazione e lo sviluppo del cancro viene definito "tempo di latenza" e può variare in funzione dell'età dell'individuo irradiato e del tipo di cellule coinvolte, ma non in funzione della dose. Dati ottenuti effettuando degli studi sugli abitanti di Hiroshima e Nagasaki, sottoposti alle radiazioni della bomba atomica nel 1945, hanno messo in evidenza che la leucemia è il tipo di tumore con minore periodo di latenza, si manifesta, infatti, già dopo 7-12 anni dall'esposizione e la sua frequenza decresce fino a raggiungere i valori normali caratteristici della popolazione dopo 20 anni; al contrario, i tumori solidi si manifestano dopo 10-20 anni dall'irradiazione dell'individuo. Il tempo di latenza varia a seconda dei tipi di tessuto considerati, quali tiroide, seno, polmone, stomaco ecc.

2.4.4 EFFETTI GENETICI

Si definiscono effetti genetici i cambiamenti indotti dalle radiazioni nel materiale ereditario dei gameti di un individuo e che possono venire trasmessi alle generazioni successive. Le mutazioni possono essere dominanti se compaiono già nella prima generazione dopo l'irradiazione, recessive se si manifestano solo quando due alleli portatori della stessa

mutazione, provenienti dai due genitori, si trovano ambedue presenti nel genotipo dello zigote. Le mutazioni possono interessare sia caratteristiche morfologiche sia processi essenziali alla vita, il cui cambiamento determina la morte dell'individuo (mutazioni letali).

Un aumento della frequenza di mutazioni causato da radiazioni fu dimostrato per la prima volta nel 1927 da H.J. Miller in cellule germinali di *Drosophila melanogaster*. I risultati del suo studio evidenziarono che la frequenza di mutazione aumentava linearmente con la dose della radiazione. In tutte le specie studiate è stato sempre osservato, dopo l'irradiazione, un aumento delle mutazioni. Questo si riscontrò anche nel topo, il primo mammifero studiato, le cui cellule germinali possiedono una radiosensibilità otto volte superiore a quella di *Drosophila*.

Oltre alle mutazioni geniche le radiazioni possono indurre nei gameti alterazioni strutturali dei cromosomi; in tal caso l'individuo portatore di traslocazione sarà sterile o semi sterile oppure potrà dare origine a individui malformati.

2.5 *TECNICHE DI MISURA DI ESPRESSIONE GENICA*

2.5.1 *TECNOLOGIA DEI MICROARRAY*

Sebbene tutte le cellule del corpo umano contengano materiale genetico identico, in ogni cellula non sono attivi gli stessi geni. Studiare quali geni sono attivi e quali sono inattivi nelle diverse cellule può aiutare gli scienziati a capire il coinvolgimento dei geni stessi sia nei processi fisiologici che in quelli patologici o semplicemente alterati. Con lo sviluppo della tecnologia dei microarray di DNA, è possibile esaminare quali e quanti geni siano attivi in un dato momento.

I microarray di DNA sono creati da macchine robotiche che organizzano minuscole quantità di centinaia o migliaia di sequenze di geni su un singolo

vetrino da microscopio. I ricercatori hanno a disposizione un database di oltre 40.000 sequenze di geni che possono usare per questo scopo. Quando un gene è attivato, la cellula comincia a copiare alcuni segmenti di questo gene. Il prodotto risultante è noto come RNA messaggero (mRNA), che media il trasferimento dell'informazione dai geni (DNA) ai ribosomi dove avviene la sintesi delle proteine. L'mRNA prodotto dalla cellula è complementare, e quindi si legherà alla porzione iniziale del filamento di DNA da cui è stato copiato. Per determinare quali geni sono attivi (accesi) e quali non attivi (spenti) in una determinata cellula, si deve prima raccogliere l'RNA messaggero presente. In seguito si deve etichettare ogni molecola di mRNA utilizzando un enzima di trascrittasi inversa (RT) che genera un cDNA complementare all'mRNA. Durante questo processo dei nucleotidi fluorescenti sono attaccati al cDNA. Successivamente, i cDNA marcati vengono posti su un vetrino di microarray di DNA e quelli che rappresentano l'mRNA della cellula saranno poi ibridati con i loro DNA complementari sintetici attaccati sul vetrino di microarray, lasciando le loro etichette fluorescenti. Attraverso uno specifico scanner si misura l'intensità fluorescente per ciascuna area sul vetrino di microarray.

Se un particolare gene è molto attivo, produce molte molecole di RNA messaggero, quindi, cDNA più marcati, che ibridano il DNA sul vetrino di microarray e generano una zona fluorescente molto luminosa. Geni che sono un po' meno attivi producono meno mRNA, quindi, cDNA meno marcati, questo si traduce in macchie fluorescenti più tenui. Se non vi è alcuna fluorescenza, nessuna delle molecole di RNA messaggero hanno ibridato il DNA, indicando che il gene è inattivo.

Questa tecnica viene usata frequentemente per esaminare l'attività di migliaia di geni in tempi e trattamenti diversi.

2.5.2 SOFTWARE STATISTICI PER L'ANALISI DEI MICROARRAY

La statistica, nell'analisi dei dati ricavati dagli esperimenti di microarray, è uno strumento indispensabile, non solo per l'identificazione dei geni

differenzialmente espressi, ma anche per l'individuazione di geni co-regolatori. Nel DNA sono infatti presenti geni, detti regolatori, che portano alla formazione di proteine che hanno il ruolo di interruttori per l'attività di un gene. I software statistici a disposizione per l'analisi dei dati sono diversi. In particolare R e viaComplex sono due linguaggi di programmazione ad alto livello che hanno funzioni tali da essere considerati due validi strumenti per la bioinformatica.

R è un ambiente di sviluppo specifico per l'analisi statistica dei dati, scritto inizialmente da Robert Gentleman e Ross Ihaka; offre una grande varietà di tecniche statistiche (modelli lineari e non lineari, test statistici classici, classificazione, clustering, etc.) e grafiche. R include:

- una facility per il trattamento e la memorizzazione dei dati;
- una suite di operatori per lavorare con gli array, ed in particolare con matrici;
- una grande raccolta di strumenti per l'analisi dei dati;
- facilities grafiche per l'analisi dei dati e la loro visualizzazione;
- un linguaggio di programmazione ben sviluppato, semplice ed efficace, che include istruzioni condizionali, loop, funzioni ricorsive definite dall'utente e possibilità di ingresso ed uscita dalle stesse (13).

R è disponibile come software libero e si compila e si esegue su una vasta gamma di piattaforme UNIX, Windows e MacOS. Tra i vari pacchetti disponibili per R, quello che fornisce maggiori strumenti per l'analisi e la comprensione dei dati genomici è Bioconductor.

ViaComplex permette di analizzare dataset di espressione genica nel contesto di networks di geni. La principale caratteristica del software è che può distribuire una data quantità (dati qualitativi o quantitativi) su un modello di networks di geni per la riparazione del genoma. Per fare questo, ViaComplex sovrappone due tipologie di informazioni: informazioni funzionali e informazioni di interazione. Il risultato è un paesaggio funzionale in cui l'input è proiettato sul grafo del network.

In questo software ogni set di geni descrive un gruppo di geni funzionalmente collegati. ViaComplex considera due grandezze per stimare le alterazioni nell'espressione genica: l'intensità e la distribuzione del segnale nel pathway. Per ottenere un parametro quantitativo che caratterizzi lo stato funzionale di ogni gruppo di geni funzionalmente associati (GFAG) in un campione, ViaComplex misura le informazioni contenute misurando l'entropia di Shannon definita nel seguente modo.

Sia M il numero di geni nel GFAG α , ($\alpha = 1, \dots, n$). Per un dato GFAG, è possibile definire $s(i, \alpha)$, come il segnale di un dato gene i , ($i=1, \dots, M_\alpha$), la cui somma per un dato α porta a N_α .

Il contributo $p(i, \alpha)$ del segnale del gene i al segnale totale del α -GFAG è:

$$p(i, \alpha) = \frac{s(i, \alpha)}{N_\alpha}$$

Tale che $\sum_i p(i, \alpha) = 1$. L'entropia normalizzata, chiamata anche diversità, è definita come:

$$H_\alpha = \frac{1}{\ln(M_\alpha)} \sum_i^{M_\alpha} p(i, \alpha) \ln(p(i, \alpha))$$

Dove tutti i termini sono stati divisi per il fattore di normalizzazione $\ln(M_\alpha)$ per garantire che $0 \leq H_\alpha \leq 1$. In questo modo è possibile confrontare diverse GFAG che possono avere diverso numero di geni. Per normalizzare la quantità di gruppi di geni, prendendo come riferimento la diversità del segnale di controllo, è possibile definire la diversità relativa h_α per ogni dato GFAG come:

$$h_\alpha = \frac{H_\alpha^c}{H_\alpha^c + H_\alpha^r}$$

dove H_α^c, H_α^r sono, rispettivamente, le diversità dell'esperimento e del controllo.

Allo stesso modo l'attività di espressione relativa n_α dell' α -GFAG è:

$$n_\alpha = \frac{N_\alpha^c}{N_\alpha^c + N_\alpha^r}$$

Dove $N_{\alpha}^c, N_{\alpha}^r$ sono rispettivamente l'attività di espressione del gene dell'esperimento e del controllo (14).

Anch'esso è rilasciato con una licenza open source ed è completamente gratuito.

CAPITOLO 3

PROGETTO EXCALIBUR

In questo capitolo verrà presentato il progetto EXCALIBUR; ponendo l'attenzione sullo scopo di questo esperimento, sui metodi sperimentali e sull'attività svolta.

3.1 IL PROGETTO

Come è già stato detto precedentemente molti tipi di radiazioni ad alta energia, permettono di trattare una vasta gamma di tumori, ma il rischio di danneggiare le cellule sane circostanti l'area trattata è molto alto. Il suddetto rischio segue una legge lineare secondo la quale aumenta al crescere della dose depositata.

Diversi studi, però, hanno mostrato la non validità di questa legge per basse dosi. È stato visto, infatti, che basse dosi provocano effetti inaspettati sulle cellule come ipersensibilità, radioresistenza indotta, effetto bystander ed effetti ritardati delle radiazioni in termini di vari end-points biologici contraddicendo il modello lineare senza soglia che vede il DNA come il principale target delle radiazioni.

In questo esperimento vengono valutati gli effetti di due tipi di radiazioni ionizzanti: raggi gamma e protoni, a diverse dosi (0,25 Gy e 2 Gy) registrati su una linea cellulare di glioblastoma umano (T98G).

3.2 *PROTOCOLLI SPERIMENTALI*

3.2.1 *COLTURA CELLULARE E PREPARAZIONE DEI CAMIPIONI*

Le colture cellulari sono sistemi semplificati che consentono il mantenimento di cellule in vitro. La relativa economicità, la facile standardizzazione e riproducibilità sperimentale rendono la metodica vantaggiosa, ciononostante, nella valutazione dei risultati, va considerata la notevole semplificazione del sistema sperimentale in vitro rispetto a quello in vivo.

Le cellule che sono mantenute in coltura possono derivare direttamente dalla dissociazione di un tessuto (colture cellulari primarie) o possono derivare da colture precedenti (ad esempio colture secondarie o terziarie). Nella maggior parte dei casi, tuttavia, le cellule derivate dalla dissociazione di tessuti hanno una limitata capacità replicativa e tendono a diventare "senescenti". Vi sono, però, "linee cellulari" che sono in grado di replicarsi indefinitamente in coltura e che vengono spesso usate come modelli sperimentali. Le cellule di tali linee sono derivate da colture primarie di tumori o da manipolazioni genetiche di colture primarie non tumorali. Tali manipolazioni, collettivamente chiamate "immortalizzazione", prevedono l'inserimento di specifici geni virali o anche la sola propagazione per molti passaggi di una coltura primaria.

Le cellule in coltura possono crescere sia in sospensione sia aderenti a una superficie (*coltura cellulare monostrato*), in un mezzo o terreno di crescita liquido.

I terreni di coltura utilizzati per le cellule animali, contengono sali inorganici ricchi di cationi e anioni come Na^+ ; K^+ ; Mg^{++} ; Ca^{++} ; Cl^- , indispensabili per le funzioni cellulari, il glucosio indispensabile per le funzioni metaboliche, gli amminoacidi essenziali per la sintesi proteica, il siero fonte di proteine e fattori di crescita indispensabili per la proliferazione. Il terreno di coltura fresco è caratterizzato da un colore rosso-violaceo tipico del rosso fenolo,

un indicatore del pH, e via via che le cellule lo consumano vira verso un colore giallastro.

Le fiasche o piastre da coltura contenenti le cellule sono mantenute in incubatori a temperatura costante e in ambiente gassoso e per evitare contaminazioni da microrganismi, tutte le manipolazioni delle colture cellulari vengono effettuate in condizioni di sterilità; ai terreni di coltura, inoltre, vengono spesso aggiunti antibiotici.

Le cellule di glioblastoma (T98G), derivanti da un tumore umano, sono state mantenute nel Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) integrato con 10 % di siero fetale bovino, 1% di L-glutamina e antibiotici (penicillina e streptomina) e 10% di piruvato di sodio.

Quarantotto ore prima dell'irraggiamento le cellule sono state seminate su fogli di mylar posizionati all'interno di porta-campioni specifici.

Sia le cellule irraggiate che quelle non irraggiate, utilizzate come controllo, sono state staccate due ore dopo il trasferimento dalla sorgente con la tripsina (0,02% in acido etilendiamminotetraacetico [EDTA]) e risospese in terreno di coltura (RPMI completo) a temperatura ambiente.

3.3 IRRAGGIAMENTO DELLE CELLULE

L'irraggiamento con raggi gamma è stato eseguito tramite l'irradiatore GammaCell 2000 (sorgente Cs-137: energia 662 keV) del Policlinico "S. Orsola - Malpighi".

Questo tipo di irradiatore permette un irraggiamento uniforme dei campioni con un tasso di dose di 3,0 cGy/s, misurata con una camera di ionizzazione.

L'irraggiamento con protoni è stato eseguito presso i Laboratori Nazionali di Legnaro con l'acceleratore di particelle Van de Graaff CN da 7 MeV e sono stati utilizzati protoni di 3.0 MeV.

3.4 MICROARRAY

In seguito all'irraggiamento con raggi gamma e protoni le cellule T98G sono state congelate a -80°C. A questo punto si è potuti passare all'estrazione dell'RNA con il miRNeasy Mini Kit, seguendo le linee guida del produttore (Quiagen). L'estrazione dell'mRNA è stata effettuata presso i laboratori del Dipartimento di Medicina Specialistica Diagnostica e Sperimentale dell'Università di Bologna dal gruppo di ricerca del Prof. Claudio Franceschi, formato dalla dott.ssa Catia Lanzarini e dalla dott.ssa Miriam Capri.

I campioni sono stati profilati utilizzando l'Array GeneChip Human Exon 1.0 ST. Per il protocollo di etichettatura sono stati utilizzati 100 ng di RNA. L'array Gene Human Exon 1.0 ST utilizza 5362207 probes, raggruppate in 1,4 milioni di probeset (ogni gene è identificato da un set di sonde e non da una soltanto). Le sequenze di input sono divise in regioni di selezione delle probe (PSR), sequenze di target contigue che non si sovrappongono con il genoma (15) e ciascuna regione contiene in genere da 11÷21 probes (o sonde) ciascuno lungo 25 basi nucleotidiche.

Le sonde sono progettate in modo tale da fornire una rappresentazione più accurata possibile dell'attività totale di trascrizione per il locus genico.

3.5 ANALISI DATI

3.5.1 I DATI

La linea cellulare T98G, come detto precedentemente, è stata irraggiata con protoni e raggi gamma a 0,25 Gy e a 2 Gy. Per ogni irraggiamento, un campione di cellule è stato preparato nello stesso modo dei campioni irraggiati e utilizzato come controllo. Al fine di individuare la risposta della cellula nel tempo, l'mRNA da ibridizzare sull'array è stato estratto a due

tempi diversi dopo l'irraggiamento (6 h e 24 h) sia dai campioni cellulari utilizzati come controllo che dai campioni cellulari sottoposti alla radiazione. Inoltre, ogni irraggiamento è stato condotto in triplicato.

I dati sperimentali sono stati ottenuti dalla lettura di un array per ciascuna condizione sperimentale individuata dal tipo di radiazione (protoni o gamma), dalla dose (0 Gy, 0,25 Gy e 2 Gy) e dal tempo al quale è stato estratti i dati con la tecnica dei microarray (6 e 24 h).

Il dataset ottenuto si presenta come una matrice di p righe (numero di geni) per $3 \cdot n_i$ colonne (n_i condizioni sperimentali), dove con n_i si intende il singolo array estratto ad una data ora e sottoposto all'irraggiamento di una data dose. Il dataset è caratterizzato da un numero elevato di geni (33297), ed un numero molto più basso di esperimenti (36).

Il numero esiguo di esperimenti, di gran lunga minore rispetto al numero di geni da analizzare, fa sì che anche un piccolo errore sistematico possa provocare distorsioni significative: per evitare questo rischio i dati sono stati normalizzati, prima di procedere con qualsiasi tipo di analisi.

La normalizzazione dei dati può essere effettuata sia a livello di probe che a livello di gene's signal (espressione) ed è stata eseguita mediante l'algoritmo "Robust Multialignment Algorithm" (RMA). Lo scopo di questo algoritmo è di rendere uguali le distribuzioni empiriche di intensità di tutti gli array; per fare ciò assegna a tutti gli array la stessa distribuzione sostituendo i valori del dataset originale con il quantile medio.

3.5.2 ANALISI STATISTICHE CON R

Uno dei risultati più importanti che si possono ottenere da un esperimento di microarray è l'identificazione dei geni detti "differenzialmente espressi" nei vari gruppi di campioni biologici presi in considerazione nello studio. I geni differenzialmente espressi sono quei geni che mostrano una differenza

significativa di espressione in un gruppo rispetto ad un altro, nel nostro caso, ad esempio, nell'irraggiato rispetto al controllo.

Come ipotesi nulla viene utilizzata quella che non ci sia nessun cambiamento nei livelli di mRNA tra le condizioni prese in considerazione.

Esistono in letteratura diversi test che possono essere usati per l'individuazione dei geni con un diverso livello di espressione. Per le analisi effettuate con il software R si è deciso di usare i metodi lineari: t-test e ANOVA.

Prima di procedere con qualsiasi analisi statistica, si è valutato lo stato di background dei dati. Il metodo più immediato per questo tipo di osservazione è lo scatterplot: date le coppie di dati $(x_1, y_1), \dots, (x_n, y_n)$ ottenute dalla rilevazione delle variabili numeriche X, Y il diagramma di dispersione o scatterplot è un grafico cartesiano formato dai punti $P_1 = (x_1, y_1), \dots, P_n = (x_n, y_n)$.

Un grafico di dispersione è molto utile quando si vuole vedere quanto due set di dati comparabili siano correlati tra loro; in questo caso, viene disegnata come riferimento una linea retta $x=y$ definita come linea d'identità (identity line, linea rossa in Fig. 18). Più i due data set sono correlati più i punti tenderanno a concentrarsi esattamente sulla linea d'identità.

Di seguito è riportato uno degli scatterplot ottenuti.

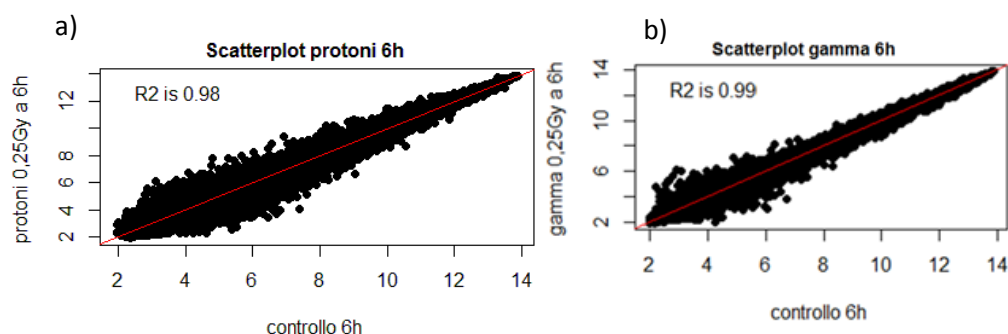


Figura 18: a) Scatterplot dei controlli e degli irraggiati con i protoni a 0,25Gy dopo 6 h. b) Scatterplot dei controlli e degli irraggiati con raggi γ a 0,25Gy dopo 6 h.

Dopo questa analisi preliminare, si è passati all'analisi statistica mediante il test t di Student. Il test viene effettuato gene per gene sull'intera matrice di dati (per ciascuna riga della matrice) ottenendo per ciascun gene e per ciascun confronto un livello di significatività.

La statistica t di Student è calcolata come:

$$t = \frac{\bar{x}^t - \bar{x}^c}{s_p^2}$$

Dove \bar{x}^t , \bar{x}^c sono rispettivamente i valori medi dei controlli e degli esperimenti e s_p^2 indica la varianza combinata tra quella dei controlli e del test, quest'ultimo valore deriva da:

$$s_p^2 = \frac{(m_1 - 1)s_1^2 + (m_2 - 1)s_2^2}{m_1 + m_2 - 2}$$

dove m_1 ed m_2 sono rispettivamente il campione preso dai controlli e dagli irraggiati ed s_1^2 ed s_2^2 le varianze di x^t ed x^c (16).

Il t-test è stato effettuato tra i dati ottenuti dai campioni usati come controllo per i protoni e quelli usati come controllo per i raggi gamma a tempi diversi, tra i dati ottenuti dai campioni usati come controllo per i protoni e quelli usati come controllo per i raggi gamma allo stesso tempo e tra i dati ottenuti dai campioni usati come controllo e quelli ottenuti dai campioni irraggiati allo stesso tempo con dosi diverse. In Appendice A si può vedere lo script creato per il calcolo del t-test e l'estrazione del relativo p-value.

Per identificare i geni significativi è necessario definire una soglia al di sotto della quale si scarta l'ipotesi nulla. In questo lavoro come soglia è stato scelto un p-value minore o uguale a 0,05. Una volta calcolati i p-value è stato disegnato un istogramma solo con quelli significativi per ogni confronto per avere una visione immediata del numero di geni significativi per ciascuna condizioni. Un esempio di istogramma è riportato in figura 19.

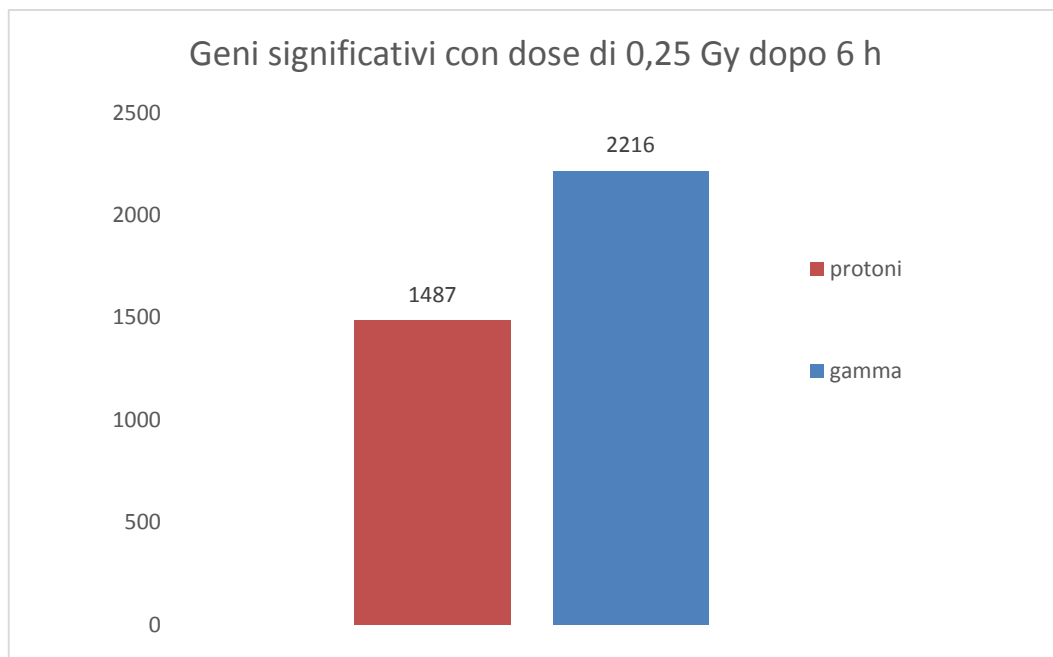


Figura 19: Confronto tra il numero di osservazioni delle probes significative (p -value < 0,05) tra la dose di 0,25 Gy e il controllo a 6 h per protoni e per gamma.

Oltre al t-test è stato anche calcolato il fold change. Il fold change è una misura che descrive quanto una data quantità aumenta o diminuisce passando da uno stato iniziale a uno stato finale, nel nostro caso dal controllo all'irraggiato. Questo valore è calcolato come il rapporto tra il valore medio della quantità finale e il valore medio della quantità iniziale, nel caso in cui i valori siano in forma logaritmica è semplicemente la differenza delle medie tra gli irraggiati e i controlli. Tipicamente una differenza viene considerata significativa se è almeno pari a due o tre volte.

Anche in questo caso, quindi, viene scelto un livello di soglia in modo tale da poter considerare solo i geni che differiscono di più di un livello di cut-off arbitrario. A livello biologico un aumento significativo del livello di espressione di un gene (fold change positivo) ne evidenzia l'attivazione mentre una diminuzione significativa (fold change negativo) ne evidenzia l'inibizione in una data condizione sperimentale piuttosto che in un'altra. Tipicamente in esperimenti su molti geni, la maggior parte non cambia, quindi tracciando un istogramma il numero maggiore dei valori sarà

raggruppato intorno allo 0 (17). Di seguito è riportato un esempio di istogramma dei fold change.

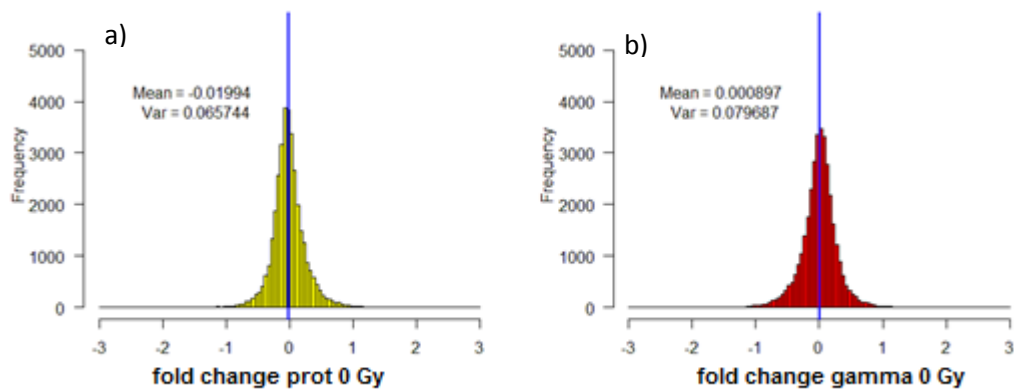


Figura 20: a) Istogramma del fold change dei dati estratti dalle cellule di controllo dei protoni. b) Istogramma del fold change dei dati estratti dalle cellule di controllo dei raggi gamma.

Il fold change è uno dei metodi più semplici e intuitivi per capire se ci sono geni differenzialmente espressi e permette anche di osservare in quale direzione si manifesta la diversa espressione dei geni (fold change positivo: gene up-regolato – fold change negativo: gene down regolato) anche se ovviamente ha sia lo svantaggio della scelta arbitraria della soglia che potrebbe essere inappropriata sia quello che la tecnologia dei microarray tende ad avere un cattivo rapporto segnale-rumore per geni con basso livello di espressione (17). In Appendice B si può vedere lo script per il calcolo del fold change.

Un altro approccio particolarmente interessante sia per l'analisi dei dati dei microarray sia per la selezione dei geni differenzialmente espressi è il metodo chiamato analisi della varianza (ANOVA). L'idea alla base dell'ANOVA è quella di costruire un modello sulle sorgenti di variabilità che influenzano le misure, e quindi usare i dati per stimare la varianza per ogni variabile del modello (17). Il test ANOVA presuppone che i gruppi di dati

provengano da una popolazione normale in ipotesi di omoschedasticità (ossia, la varianza dei gruppi è la stessa di quella della popolazione).

L'ipotesi alla base dell'analisi della varianza è che dati G gruppi, sia possibile scomporre la varianza in due componenti: *Varianza interna ai gruppi* (anche detta *Varianza Within*) e *Varianza tra i gruppi* (*Varianza Between*). Il confronto si basa sull'idea che se la variabilità interna ai gruppi è relativamente elevata rispetto alla variabilità tra i gruppi, allora probabilmente la differenza tra questi gruppi è soltanto il risultato della variabilità interna (18).

La relazione tra la varianza totale σ^2 riferita alle n unità e varianze calcolate sui singoli gruppi σ_g^2 (con $g=1, \dots, G$) risulta essere:

$$\sigma^2 = \sum_{g=1}^G \sigma_g^2 \frac{n_g - 1}{n - 1} + \sum_{g=1}^G (m_g - m)^2 \frac{n_g}{n - 1}$$

la prima sommatoria è la varianza Within mentre la seconda è la varianza Between, m è la media totale delle n unità, uguali alle medie parziali di ciascun gruppo m_g con pesi uguali alle rispettive frequenze relative del gruppo n_g/n .

La media parziale m_g dei valori x_{gj} del g -esimo gruppo è data da:

$$m_g = \sum_{j=1}^{n_g} \frac{x_{gj}}{n_g},$$

mentre la varianza parziale è data da:

$$\sigma_g^2 = \frac{\sum_{j=1}^{n_g} [x_{gj} - m_g]^2}{n_g}$$

La varianza within è uguale alla media ponderata delle varianze parziali, calcolate in ogni gruppo; i pesi sono uguali alle loro frequenze relative.

La varianza between è uguale alla varianza ponderata delle medie parziali; i pesi sono uguali alle frequenze relative di gruppo.

Nel nostro caso è stata effettuata una ANOVA a due vie dove i due fattori sono la dose (0,25 Gy e 2 Gy) e il tipo di radiazione (protoni e raggi gamma). In questo modo è possibile confrontare l'effetto dei due tipi di radiazione per ogni sonda di ciascun array. Anche in questo caso è stata scelta una soglia per il p-value pari a 0,05. Quindi tutti le probes con un p-value maggiore di questa soglia non sono state prese in considerazione per la comprensione dei risultati. Come è stato detto precedentemente, nell'ANOVA si considerano le medie di una variabile; se il p-value è minore della soglia viene rigettata l'ipotesi nulla secondo la quale tutte le medie sono uguali. Ciò non significa che le medie sono tutte significativamente diverse l'una dall'altra, ma piuttosto, che c'è almeno una coppia di medie la cui differenza è statisticamente significativa. È necessario, quindi, trovare un modo che permetta di individuare quali sono le medie diverse tra loro, verificando l'uguaglianza tra tutte le possibili coppie di medie.

Per fare questo studio esistono dei test, detti test post-hoc. Il primo test post-hoc fu proposto da Fisher e prende il nome di Least Significant Difference (LSD test). Secondo questo test volendo testare se la media del livello i è uguale alla media del livello j ($\mu_i = \mu_j$) basterebbe costruire l'intervallo di confidenza della differenza delle due medie:

$$\hat{\mu}_i - \hat{\mu}_j = t_{n-1}^{\alpha/2} \hat{\sigma} \sqrt{\frac{1}{J_i} + \frac{1}{J_j}}$$

con J_i e J_j il numero di dati rispettivamente nel gruppo i e j e I è il numero dei livelli) e vedere se il valore 0 cade all'interno di questo intervallo.

Il test di Fisher tiene sotto controllo l'errore di primo tipo (falso positivo) relativo ad ognuno dei singoli confronti. Se si vuole tener conto dell'errore complessivo, cioè l'errore di primo tipo relativo a tutti i confronti considerati si possono applicare procedure più raffinate (19).

Un altro test post-hoc che si può effettuare e che è basato su un altro tipo di considerazione per l'analisi di confronti multipli è il metodo di Tukey: Honest Significant Difference (HSD). Il test di Tukey calcola un nuovo valore

critico per valutare se la differenza tra le medie di due coppie qualsiasi è significativa. Questo valore critico prevede il valore che la differenza tra le medie deve superare per essere significativa. Si calcola, quindi, un valore critico e poi la differenza tra le medie di tutte le possibili coppie. Ogni differenza verrà confrontata con il valore critico di Tukey; se è maggiore di questo valore, la differenza è significativa.

La formula che permette di calcolare il valore critico è la seguente:

$$\overline{d}_T = q_T \sqrt{\frac{MS_{S/A}}{n}}$$

q_T è la studentized range statistic (il rapporto tra la differenza del valore massimo e di quello minimo del campione misurato e la deviazione standard del campione, $MS_{S/A}$ è l'errore quadratico medio ed n è la dimensione del campione per ciascun gruppo (20).

In questo studio per individuare quali livelli di ciascun fattore rendono significativa la differenza tra le medie è stata effettuata una post-hoc comparison con il metodo Tukey HSD. In Appendice C si può vedere lo script creato per il calcolo dell'ANOVA e della post-hoc Tukey comparison.

3.5.3 ANALISI STATISTICHE CON VIACOMPLEX

Il software ViaComplex permette di seguire una nuova strada per l'analisi statistica, quello che fa è mettere a confronto diversi pathway di espressione genica nei controlli e negli irraggiati mediante l'analisi seriale dell'espressione genica (SAGE).

Per stimare la diversità di espressione nei pathway si devono eseguire le seguenti operazioni:

- definire i pathway di espressione genica di interesse;
- individuare i gruppi di geni che meglio rappresentano ciascun pathway;

- individuare le migliori etichette SAGE per questi geni tra tutte le possibili etichette presenti nella libreria;
- organizzare le etichette SAGE in un file separato, uno per ogni pathway;
- verificare l'accordo tra il database originale e i files creati;
- costruire un database:
- stimare il grado di diversità tra i gruppi delle etichette SAGE.

3.6 RISULTATI

3.6.1 RISULTATI OTTENUTI TRAMITE R

3.6.1.1 SCATTERPLOT

Per determinare se l'ipotesi nulla (assenza di dispersione) si può accettare per i dati estratti dalle cellule usate come controllo per l'irraggiamento con i protoni e per quello con i raggi γ a 6 e a 24 h, è stata effettuata l'analisi dello scatterplot di questi dati tramite R.

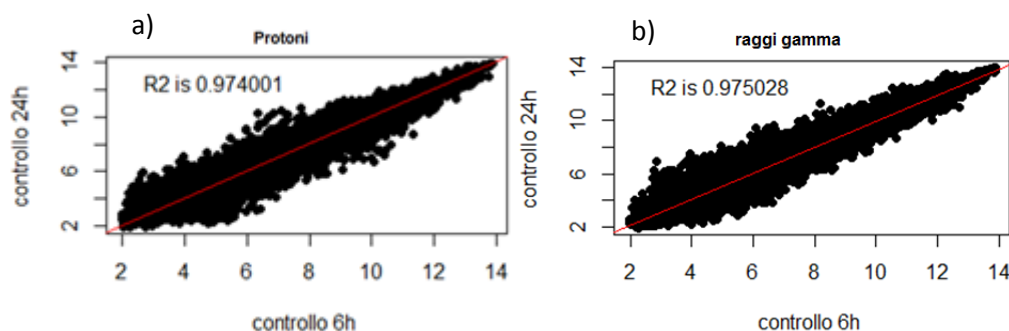


Figura 21: a) Scatterplot dei controlli dopo 6 h e dopo 24 h delle cellule irraggiate con protoni. b) Scatterplot dei controlli dopo 6 h e dopo 24 h delle cellule irraggiate con raggi γ .

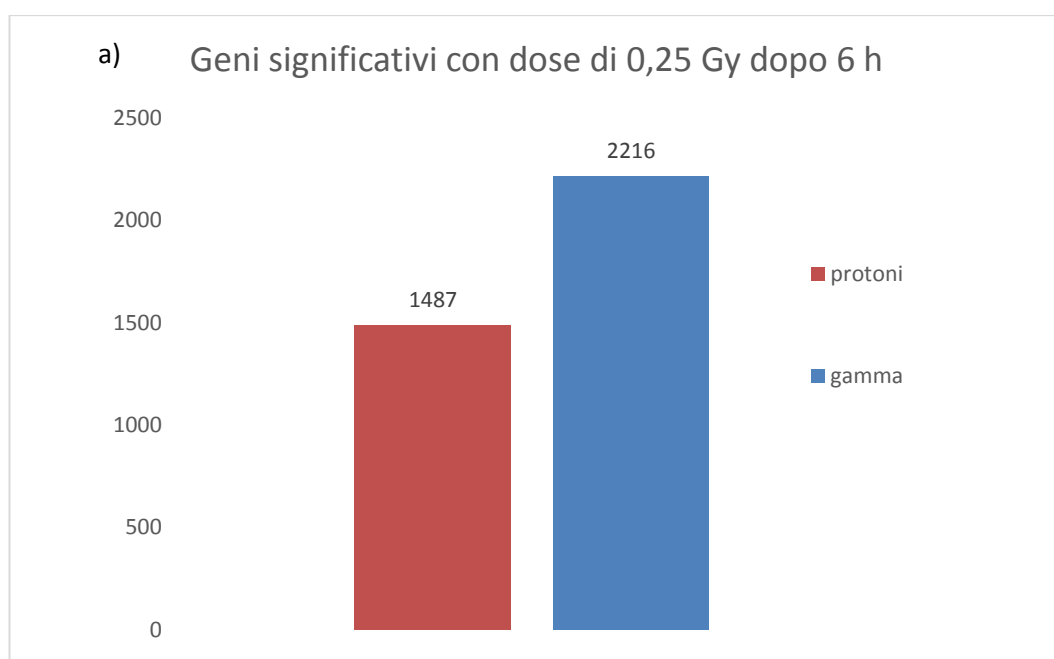
Diversamente da quanto ci saremmo aspettati si è riscontrata una diversità nella distribuzione tra i controlli usati per i protoni e quelli usati per i raggi γ a 6 e a 24 h. Si può notare, infatti, che il grafico ottenuto con i dati estratti a

6 h (sull'asse delle ascisse) e 24 h (sull'asse delle ordinate) dei controlli per le cellule irraggiate con protoni presenti una dispersione leggermente maggiore rispetto ai risultati ottenuti dai controlli delle cellule irraggiate con raggi γ . Questo potrebbe essere dovuto sia ai processi che la cellula subisce nel tempo sia alle condizioni di trattamento alle quali sono sottoposte (es: ore di viaggio, temperatura, variazioni di pH per inefficienza del sistema tampone durante il trasporto presso il sito di irraggiamento).

3.6.1.2 ISTOGRAMMI

Lo studio degli istogrammi che riportano il numero di geni significativi (p-value < 0,05) per ogni confronto ci permette di concludere che l'irraggiamento con raggi γ è più efficace di quello con i protoni in quanto il numero di tali geni è maggiore in ogni grafico.

In figura 22 sono riportati gli istogrammi per i due confronti dopo 6 h, in figura 23 dopo 24 h.



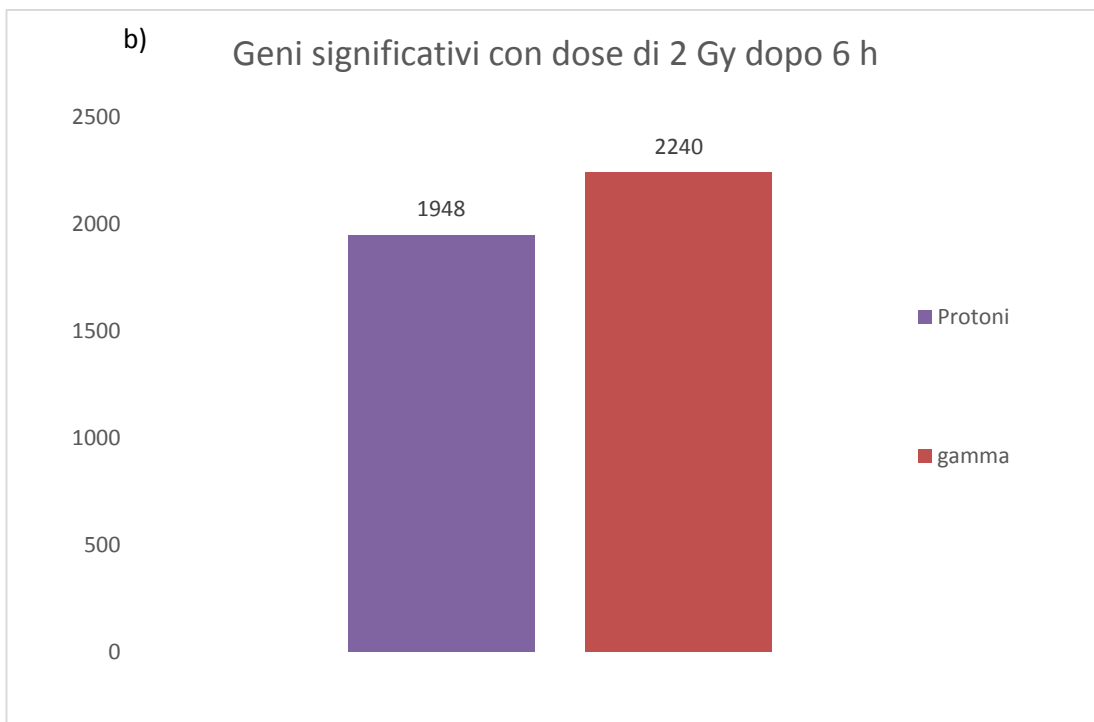
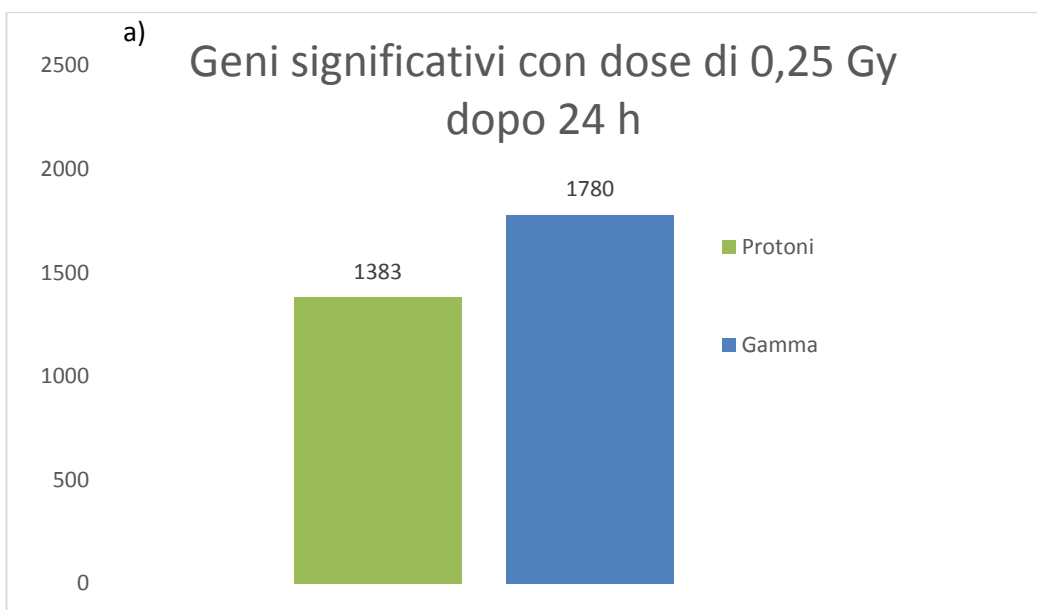


Figura 22: a) Confronto tra il numero di osservazioni delle probes significative tra la dose di 0,25 Gy e il controllo a 6 h per protoni e raggi γ . b) Confronto tra il numero di osservazioni delle probes significative tra la dose di 2 Gy e il controllo a 6 h per protoni e raggi γ .



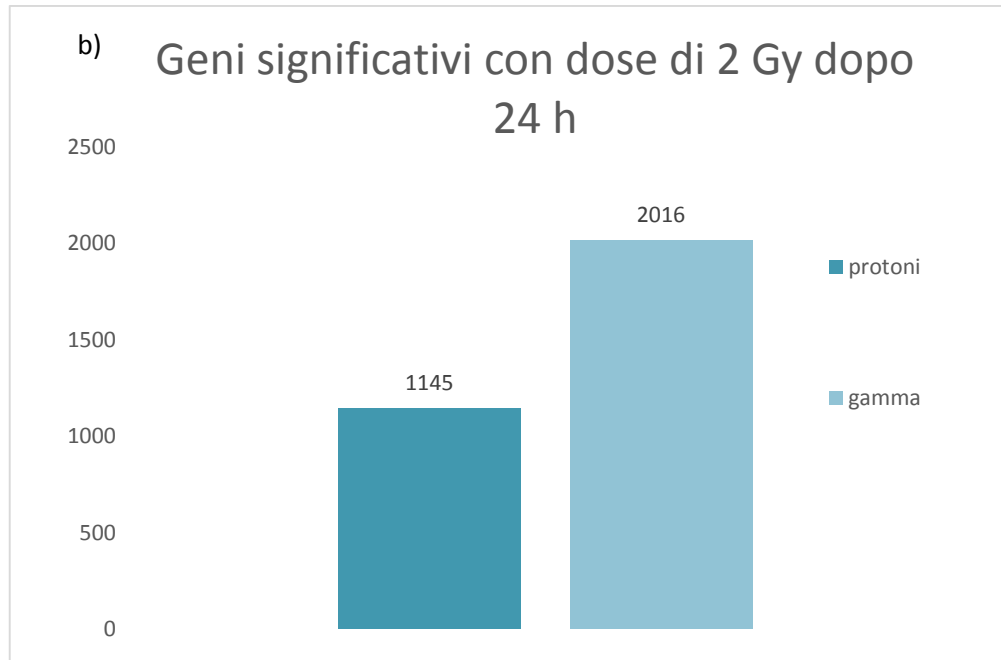


Figura 23: a) Confronto tra il numero di osservazioni delle probes significative tra la dose di 0,25 Gy e il controllo a 24 h per i protoni e raggi γ . b) Confronto tra il numero di osservazioni delle probes significative tra la dose di 2 Gy e il controllo a 24 h per i protoni e raggi γ .

In particolare è possibile vedere che nelle cellule trattate con i raggi γ il numero di geni significativi aumenta con l'aumentare della dose (nelle cellule irraggiate con 2 Gy il numero dei geni significativi è maggiore di quelle irraggiate a 0,25 Gy) e con il passare del tempo (dopo 24 h ci sono più geni significati rispetto alle 6 h).

3.6.1.3 PATHWAY

A partire dai geni significativi trovati con il t-test tramite R, è stato associato ad ogni gene l'annotazione Kegg. La KEGG PATHWAY Database è una delle più importanti banche dati bioinformatiche. Contiene informazioni sui pathway metabolici della cellula, focalizzando l'attenzione anche sulle variazioni delle vie metaboliche tra diversi organismi viventi. L'associazione

dell'annotazione permette di dedurre la funzione svolta dai vari geni e di conseguenza capire se ci siano dei geni di interesse biologico.

Nelle seguenti tabelle sono riportati i geni con la rispettiva funzione e il rispettivo p-value trovati per ogni dose, tempo e tipologia di radiazione.

PROTONI - 0,25 Gy - 6 h

Gene	Funzione	p-value
PSMB6	Ciclo cellulare	0,0029
IKBKB	Apoptosi	0,0038
PSMD8	Ciclo cellulare	0,0057
NFKB2	Apoptosi; coinvolto in fattori di crescita	0,0058
CACNA1G	Coinvolto in motilità cellulare	0,0074
PAK1	Motilità cellulare	0,0088
APC	Apoptosi	0,0097
MCM3	Ciclo cellulare	0,012
CCND1	Ciclo cellulare	0,012
PRKCE	Ruolo essenziale in motilità cellulare e ciclo cellulare	0,013
CDC25B	Ciclo cellulare	0,018
ANAPC5	Ciclo cellulare	0,019
CCND3	Ciclo cellulare	0,023
TAOK2	Senescenza replicativa	0,024
SEC61A2	Secrezione	0,026
TRAF2	Apoptosi	0,027
CDKN2B	Ciclo cellulare	0,028
ANAPC1	Ciclo cellulare	0,028
CDC25C	Ciclo cellulare	0,031
CDH1	Apoptosi	0,035
YWHAB	Ciclo cellulare	0,044

Tabella 5: Geni con p-value significativi coinvolti in processi di interesse biologico nelle cellule irraggiate con i protoni a 0,25 Gy e analizzate a 6 h dall'irraggiamento.

PROTONI - 2 Gy - 6 h

Gene	Funzione	p-value
CEBPB	Senescenza cellulare; SASP	0,0023
UBC	Ciclo cellulare	0,0024
BID	Apoptosi	0,0061
RB1	Ciclo cellulare	0,0061
NFKB2	Apoptosi	0,0064
CDC20	Ciclo cellulare	0,0082
IRAK2	Apoptosi	0,0088
DKK1	Coinvolto nello sviluppo embrionale	0,0095
TERF2	Senescenza cellulare; SASP	0,012
NFKBIA	Senescenza cellulare; SASP	0,014
MAPK10	Senescenza cellulare; SASP	0,015
IRF1	Senescenza cellulare; SASP	0,015
PLK1	Ciclo cellulare	0,014
NFKB1	Senescenza cellulare; SASP	0,017
ANAPC1	Ciclo cellulare	0,019
CDC25A	Ciclo cellulare	0,024
MCM6	Ciclo cellulare	0,030
CDC7	Ciclo cellulare	0,031
CCND3	Ciclo cellulare	0,036
ESPL1	Ciclo cellulare	0,043
CCNA2	Ciclo cellulare	0,048
WEE1	Ciclo cellulare	0,049

Tabella 6: Geni con p-value significativo coinvolti in processi di interesse biologico nelle cellule irraggiate con i protoni a 2 Gy ed analizzate a 6 h dall'irraggiamento.

RAGGI γ - 0,25 Gy - 6 h

Gene	Funzione	p-value
CCNB2	Ciclo cellulare	0,0017
REPIN1	Senescenza cellulare; SASP	0,0028
SHH	Crescita cellulare	0,0038
MIS12	Ciclo cellulare	0,0065
MAP3K1	Apoptosi	0,0068
IL8	Senescenza cellulare; SASP	0,009
MAP3K7	Senescenza cellulare; SASP	0,029
TUBGCP2	Ciclo cellulare	0,043
POLD2	Ciclo cellulare	0,010
BUB1	Ciclo cellulare	0,011
WEE1	Ciclo cellulare	0,013
PTGES2	Senescenza cellulare; SASP	0,014
PSMB8	Ciclo cellulare; apoptosi	0,014
IRF1	Senescenza cellulare; SASP	0,016
PPM1D	Senescenza cellulare; SASP	0,017
DVL1	Senescenza cellulare	0,018
CCNB3	Ciclo cellulare	0,021
CACNA1A	Motilità cellulare	0,023
BID	Apoptosi	0,023
SMC1B	Ciclo cellulare	0,024
CCNA1	Ciclo cellulare	0,028
TP53	Ciclo cellulare; apoptosi	0,028
CSNK1D	Ciclo cellulare	0,030
RNF8	Senescenza replicativa	0,033
TNFRSF1A	Senescenza cellulare; SASP; apoptosi	0,034
ENDO G	Apoptosi	0,034
ANAPC1	Ciclo cellulare	0,034
IRAK4	Apoptosi	0,035

PGF	Crescita cellulare	0,036
CDK4	Ciclo cellulare; senescenza replicativa	0,038
DFFA	Apoptosi	0,039
FGF1	Migrazione cellulare	0,039
ANAPC1	Ciclo cellulare	0,040
MCM3	Ciclo cellulare	0,044
PTGER2	Senescenza cellulare; SASP	0,045
NEDD1	Ciclo cellulare	0,049
NFKB1	Senescenza cellulare SASP; apoptosi	0,049

Tabella 7: Geni con p-value significativo coinvolti in processi di interesse biologico nelle cellule irraggiate con raggi γ a 0,25 Gy e analizzate a 6 h dall'irraggiamento.

RAGGI γ - 2 Gy - 6 h

Gene	Funzione	p-value
CDC20	Ciclo cellulare	0,0017
UBE2D1	Ciclo cellulare	0,0020
MCM3	Ciclo cellulare	0,0061
PTGES2	Senescenza cellulare; SASP	0,0087
PAK2	Apoptosi	0,014
AXIN1	Senescenza cellulare; SASP	0,015
ANAPC1	Ciclo cellulare	0,018
CDK4	Ciclo cellulare; senescenza replicativa	0,019
SKIL	Senescenza cellulare; SASP	0,019
MCM2	Ciclo cellulare	0,020
TNFRSF1A	Apoptosi	0,024
PPP3CB	Apoptosi	0,025
PSMD2	Ciclo cellulare	0,026
ANAPC1	Ciclo cellulare	0,027
BAX	Senescenza cellulare; SASP; apoptosi	0,029
MAD2L2	Ciclo cellulare	0,032
TP53	Ciclo cellulare; apoptosi	0,033
MCM4	Ciclo cellulare	0,034
POLD4	Ciclo cellulare	0,036
FGF1	Migrazione cellulare	0,037
PTGS2	Senescenza cellulare; SASP	0,041
NFKB1	Apoptosi	0,042
IL3	Apoptosi	0,045
ANAPC4	Ciclo cellulare	0,048

Tabella 8: Geni con p-value significativo coinvolti in processi di interesse biologico nelle cellule irraggiate con raggi γ a 2 Gy e analizzate a 6 h dall'irraggiamento.

PROTONI - 0,25 Gy - 24 h

Gene	Funzione	p-value
DDX58	Senescenza cellulare; SASP	0.0003
E2F1	Ciclo cellulare	0,011
FGF1	Migrazione cellulare	0,012
TUBB2C	Ciclo cellulare	0,013
PTTG2	Ciclo cellulare	0,014
FAS	Apoptosi	0,018
BID	Apoptosi	0,021
IKBKG	Apoptosi	0,022
CDC14C	Ciclo cellulare	0,023
MCM4	Ciclo cellulare	0,029
TGFBR1	Senescenza cellulare; SASP	0,032
SKIL	Senescenza cellulare; SASP	0,033
ANAPC4	Ciclo cellulare	0,038
CDK2	Ciclo cellulare	0,038
YWHAG	Ciclo cellulare	0,039
CASP8	Apoptosi	0,043
MCM3	Ciclo cellulare	0,044
TERF2IP	Senescenza cellulare; SASP	0,047

Tabella 9. Geni con p-value significativo coinvolti in processi di interesse biologico nelle cellule irraggiate con protoni a 0,25 Gy e analizzate a 24h dall'irraggiamento.

PROTONI – 2 Gy - 24 h

Gene	Funzione	p-value
UBE2E1	Ciclo cellulare	0,008
WNT2	Senescenza cellulare; SASP	0,013
CCND1	Ciclo cellulare	0,015
BID	Apoptosi	0,029
E2F5	Ciclo cellulare	0,033
FASLG	Apoptosi	0,037
CXCR2	Senescenza cellulare; SASP	0,039
IL1B	Apoptosi	0,042
DFFB	Apoptosi	0,045
WEE1	Ciclo cellulare	0,048

Tabella 10: Geni con p-value significativo coinvolti in processi di interesse biologico nelle cellule irraggiate con i protoni a 2 Gy e analizzate 24h dall'irraggiamento.

RAGGI γ - 0,25 Gy - 24 h

Gene	Funzione	p-value
IFITM1	Crescita cellulare	0,0002
FADD	Apoptosi	0,002
MAPK3	Senescenza cellulare; SASP	0,002
AKT1	Apoptosi	0,005
PRKAR1A	Apoptosi	0,009
SMAD2	Ciclo cellulare	0,010
PPP1CC	Ciclo cellulare	0,023
NOX4	Senescenza cellulare; SASP	0,035
MAP3K1	Apoptosi	0,041
PPP2CB	Ciclo cellulare	0,043
TUBB2C	Ciclo cellulare	0,045
ANAPC5	Ciclo cellulare	0,048
SMAD2	Ciclo cellulare	0,049
MAP2K6	Senescenza cellulare; SASP	0,049

Tabella 11: Geni con p-value significativo coinvolti in processi di interesse biologico nelle cellule irraggiate con raggi γ a 0,25 Gy e analizzate a 24 h dall'irraggiamento.

RAGGI γ - 2 Gy - 24 h

Gene	Funzione	p-value
CDC23	Ciclo cellulare	0,00003
CHUK	Ciclo cellulare	0,002
CCNE1	Ciclo cellulare	0,003
MAP3K1	Apoptosi	0,004
CAPN1	Apoptosi	0,009
HDAC1	Ciclo cellulare	0,011
CASP10	Ciclo cellulare	0,012
PTTG2	Ciclo cellulare	0,014
MDM2	Ciclo cellulare; senescenza replicativa	0,015
MAP2K3	Senescenza replicativa	0,015
PIK3R3	Senescenza replicativa	0,016
RFC5	Ciclo cellulare	0,017
AIFM1	Apoptosi	0,017
PSMD14	Ciclo cellulare, apoptosi	0,020
ANAPC11	Ciclo cellulare	0,022
MAPK3	Senescenza cellulare; SASP	0,023
ANAPC5	Ciclo cellulare	0,024
SKIL	Senescenza cellulare; SASP	0,025
XIAP	Senescenza cellulare; SASP	0,025
FADD	Apoptosi	0,026
IFITM1	Crescita cellulare	0,026
SMAD4	Ciclo cellulare	0,027
CCND2	Ciclo cellulare	0,028
DDIT4	Senescenza cellulare; SASP	0,029
CCNE2	Ciclo cellulare; senescenza replicativa	0,029
PPP1CC	Ciclo cellulare	0,032
TNFRSF1A	Apoptosi	0,032
MCM3	Ciclo cellulare	0,033

TAB1	Senescenza cellulare; SASP	0,038
PSMB2	Ciclo cellulare	0,039
PSMA5	Ciclo cellulare	0,044
MAD2L2	Ciclo cellulare	0,049

Tabella 12: Geni con p-value significativo coinvolti in processi di interesse biologico nelle cellule irraggiate con raggi γ a 2 Gy e analizzate a 24 h dall'irraggiamento.

3.6.2 RISULTATI OTTENUTI TRAMITE VIACOMPLEX

Utilizzando il software ViaComplex sono stati ottenuti risultati simili all'analisi precedente infatti, dalle Tabelle riportate in seguito si può notare una variazione specifica dei geni legati alla senescenza cellulare e alla SASP (Senescence Associated Secretory Phenotype) (Tab. 13), all'apoptosi (Tab. 14) e al ciclo cellulare (Tab. 15).

L'analisi viene eseguita prendendo in considerazione due variabili che permettono di vedere se è presente una variazione di espressione genica (*Attività*) e se questa variazione è significativamente diversa (*Diversità*). Le due variabili vengono espresse in tabella con la seguente associazione di colori: rosso = incremento; grigio = variazione non significativa; blu = decremento.

Nella Tabella dei geni associati alla via SASP (13) si può notare una sostanziale variazione dell'espressione genica (Attiv.) in quasi tutti i confronti tra gruppo irraggiato e di controllo. Solo per le cellule irraggiate con i protoni a 0,25 Gy e analizzate dopo 6 h e per quelle irraggiate con i protoni a 2 Gy e analizzate dopo 24 h non si verifica l'attivazione dei geni della pathway SASP (caselle grigie).

In particolare, per quanto riguarda i geni significativamente diversi dal controllo (Attiv.), nelle cellule irraggiate con i raggi γ a 2 Gy e analizzate sia dopo 6 h che 24 h e in quelle irraggiate a 0,25 Gy e analizzate dopo 24 h è presente un aumento dell'espressione genica (caselle rosse) mentre per

quelle irradiate a 0,25 Gy e analizzate dopo 6 h si verifica un decremento dell'espressione in entrambe le variabili (caselle blu).

Per quanto riguarda le cellule irradiate con i protoni, invece, c'è un incremento (caselle rosse) di espressione genica solo negli irraggiamenti a 2 Gy analizzati dopo 6 h e a 0,25 Gy analizzati dopo 24 ore. E' interessante notare che, nel caso dell'irraggiamento a 2 Gy, l'attività dei geni legati alla via SASP risulta modificata solo a 6 h dal trattamento.

Di seguito è possibile vedere un resoconto di quanto ottenuto in relazione alla SASP:

		SASP pathway							
		(Bootstrap 20000 - FDR <= 0.05)				(Bootstrap 20000 - FDR <= 0.05)			
		GAMMA 6h				PROTON 6h			
		2Gray X ctrl		0,25Gray X ctrl		2Gray X ctrl		0,25Gray X ctrl	
		Ativ.	Div.	Ativ.	Div.	Ativ.	Div.	Ativ.	Div.
Genes									
SASP_Subpathway	95.0	0.0183		0.9665	0.9963	0.0001			
RIGI_Subpathway	31.0	0.0103			0.9968	0.0011			
TNF_subpathway	32.0	0.0009			0.9735	0.0001			
TGF_subpathway	37.0	0.0044			0.9819	0.0019			
P53_subpathway	50.0	0.0169			0.9716	0.0026			
		GAMMA 24h				PROTON 24h			
		2Gray X ctrl		0,25Gray X ctrl		2Gray X ctrl		0,25Gray X ctrl	
		Ativ.	Div.	Ativ.	Div.	Ativ.	Div.	Ativ.	Div.
Genes									
SASP_Subpathway	95.0	0.0301	0.0301	0.0043				0.0119	
RIGI_Subpathway	31.0								
TNF_subpathway	32.0	0.0004		0.0013					
TGF_subpathway	37.0		0.0198		0.0191				
P53_subpathway	50.0							0.0295	

Tabella 13: Risultati ottenuti per la via SASP con ViaComplex per ogni confronto.

Caselle rosse: incremento significativo; caselle grigie: variazione non significativa; caselle blu: decremento significativo.

L'analisi dei geni legati alla via dell'apoptosi ha permesso di rilevare una modificazione solo della variabile relativa alla variazione dell'espressione genica (Attiv.), inoltre questa variazione riguarda soltanto alcuni geni. Come si può vedere nella Tabella 14 è presente un incremento dell'espressione genica (caselle rosse) solo nelle cellule irradiate con raggi γ a 0,25 Gy e a 2 Gy analizzate dopo 24 h e in quelle irradiate con i protoni a 2 Gy e

analizzate dopo 6 h e a 0,25 Gy dopo 24 h, mentre nelle cellule irraggiate con raggi γ sia a 2 Gy che a 0,25 Gy analizzate dopo 6 h e in quelle irraggiate con i protoni a 2 Gy e analizzate dopo 24 h si verifica un decremento dell'espressione (caselle blu).

	Genes	APOPTOSIS pathway							
		(Bootstrap 20000 - FDR <= 0.05)				(Bootstrap 20000 - FDR <= 0.05)			
		GAMMA 6h				PROTON 6h			
		2Gray/Ctrl		0,25Gray/Ctrl		2Gray/Ctrl		0,25Gray/Ctrl	
		Attiv.	Div.	Attiv.	Div.	Attiv.	Div.	Attiv.	Div.
apoptosis_hs	83.0					0.0077			
apoptosis_exe_phase	51.0			0.9686					
apoptotic_signaling	12.0								
caspase_cascade	52.0								
death_receptor	13.0					0.0106			
extrinsic_path_apopt	13.0					0.0102			
granzyme_apopt	13.0	0.9757							
induction_apoptosis	20.0			0.9737					
intrinsic_path	29.0								
regulation_apoptosis	60.0								
tnf_receptor	40.0					0.0121			
tnfr1_signaling	13.0								
tnfr2_signaling	10.0					0.0190			
		GAMMA 24h				PROTON 24h			
		2Gray/Ctrl		0,25Gray/Ctrl		2Gray/Ctrl		0,25Gray/Ctrl	
		Attiv.	Div.	Attiv.	Div.	Attiv.	Div.	Attiv.	Div.
apoptosis_hs	83.0	0.0147		0.0185					
apoptosis_exe_phase	51.0			0.0094					
apoptotic_signaling	12.0							0.0383	
caspase_cascade	52.0								
death_receptor	13.0								
extrinsic_path_apopt	13.0								
granzyme_apopt	13.0								
induction_apoptosis	20.0			0.0442					
intrinsic_path	29.0								
regulation_apoptosis	60.0	0.0007		0.0129		0.9979		0.0179	0.0001
tnf_receptor	40.0							0.0413	
tnfr1_signaling	13.0	0.0015		0.0092				0.0499	
tnfr2_signaling	10.0								

Tabella 14: Risultati ottenuti per la via della apoptosi con ViaComplex per ogni confronto.

Caselle rosse: incremento significativo; caselle grigie: variazione non significativa; caselle blu: decremento significativo.

Nel caso della via del ciclo cellulare (Tab. 15) invece si verifica la variazione dell'espressione genica (Attiv.) con una variazione significativamente diversa (Div.). In particolare si verifica un incremento dell'espressione

genica nelle cellule irraggiate con raggi γ a 2 Gy analizzate dopo 6 h e dopo 24 h e a 0,25 Gy e analizzate dopo 24 h (caselle rosse). Per le cellule irraggiate con i protoni c'è un incremento di espressione solo per la dose di 0,25 Gy dopo 24 h e per un solo gene nell'irraggiamento a 2 Gy dopo 6 h. In tutti gli altri confronti non menzionati si verifica un decremento dell'espressione genica (caselle blu).

	Significant increase		CELL CYCLE pathway							
	Non significant		(Bootstrap 20000 - FDR <= 0.05)				(Bootstrap 20000 - FDR <= 0.05)			
	Significant decrease		GAMMA 6h				PROTON 6h			
			2Gray X ctrl		0,25Gray X ctrl		2Gray X ctrl		0,25Gray X ctrl	
	Atw.	Div.	Atw.	Div.	Atw.	Div.	Atw.	Div.	Atw.	Div.
cc_checkpoints					0.9997	0.9985				
cc_mitotic	0.0182	0.0029	10.000	10.000			0.9990		0.9944	0.9980
cc_regulation										
cc_g1s_cp					0.9834					
g1s_dna_damage	0.0402				0.9619	0.9725	0.0394			
g2pathway					0.9798				0.9878	
mitotic_g2-g2m		0.0308			0.9993	0.9948	0.9993		0.9706	0.9852
mitotic_mm_g1		0.0213			10.000	0.9987	0.9931			
mitotic_spindle										
rb_humor_suppressor					0.9518					
regulation_dna_repl					0.9747	0.9740				
regulation_mitotic		0.0352			0.9632	0.9696				0.9803
s_phase	0.0196	0.0464			0.9966	0.9858			0.9683	0.9829
			GAMMA 24h				PROTON 24h			
			2Gray/Ctrl		0,25Gray/Ctrl		2Gray/Ctrl		0,25Gray/Ctrl	
	Atw.	Div.	Atw.	Div.	Atw.	Div.	Atw.	Div.	Atw.	Div.
cc_checkpoints		0.0067					0.9993			0.0485
cc_mitotic		0.0012		0.0158			0.9976	0.9889	0.0001	
cc_regulation										
cc_g1s_cp									0.0352	
g1s_dna_damage	0.0001	0.0318			0.0031		0.9973			
g2pathway	0.0360									
mitotic_g2-g2m	0.0011	0.0434			0.0001					
mitotic_mm_g1		0.0032				0.0261	0.9979		0.0001	0.0325
mitotic_spindle	0.0187									
rb_humor_suppressor										
regulation_dna_repl	0.0001				0.0005		0.9980			0.0308
regulation_mitotic		0.0377			0.0001		0.9973	0.9677	0.0009	
s_phase		0.0097					0.9980			

Tabella 15: Risultati ottenuti per la via del ciclo cellulare con ViaComplex per ogni confronto.

Caselle rosse: incremento significativo; caselle grigie: variazione non significativa; caselle blu: decremento significativo.

Come si nota dalle Tabelle ottenute sia con l'analisi tramite R (Tab 5:12) che con quella tramite ViaComplex (Tab 13:15) le funzioni dei geni che risultano significativamente attivati riguardano l'apoptosi, il ciclo cellulare, la motilità, la migrazione e la crescita cellulare. Inoltre, molti di questi geni sono legati alla senescenza cellulare, intesa come processo naturale per cui le cellule, invecchiando, smettono di dividersi. Questo è un meccanismo che l'evoluzione ha selezionato come arma contro lo sviluppo di tumori, proprio per la sua capacità intrinseca di bloccare la crescita delle cellule. Quando, infatti, viene accidentalmente alterato e conseguentemente iperattivato uno dei quei geni capaci di stimolare la proliferazione cellulare, veri e propri acceleratori della trasformazione maligna, per tutta risposta la cellula mette in atto contromisure anti-proliferative scatenando il programma di senescenza cellulare.

Le cellule senescenti subiscono ampie variazioni dell'espressione genica, con secrezione di citochine proinfiammatorie, chemochine, fattori di crescita e proteasi, costituendo il cosiddetto fenotipo secretorio senescente (SASP dall'inglese Senescence Associated Secretory Phenotype). Questo fenotipo ha molte attività paracrine, che lo identificano non soltanto come un sistema dedicato alla prevenzione dei tumori, ma anche come promotore della riparazione dei tessuti e rigeneratore in seguito a danneggiamento. Danni genomici o epigenomici attivano la risposta al danno del DNA (DDR, dall'inglese DNA Damage Repair), che innesca una serie di meccanismi, compresa l'attivazione di SASP, controllata a feedback negativo, ottenendo infine l'arresto della crescita cellulare (21).

CAPITOLO 4

PROGETTO PLASMA FOCUS

In questo capitolo verrà descritto in breve lo scopo del progetto e verrà posta l'attenzione sui materiali ed i metodi utilizzati nella parte sperimentale.

4.1 IL PROGETTO

Lo scopo di questo progetto è valutare l'effetto biologico del fascio X prodotto dal PF su cellule di carcinoma mammario (MCF7) e confrontarla con l'effetto biologico prodotto da un fascio di raggi X prodotto da una sorgente convenzionale (tubo a raggi X). Per questo motivo, campioni di MCF7 nelle medesime condizioni biologiche sono stati esposti ad entrambe le sorgenti alla dose di 2 Gy per quanto riguarda il PF e di Gy per quanto riguarda il tubo a raggi X

4.2 PROTOCOLLI SPERIMENTALI

4.2.1 COLTURA CELLULARE

Le cellule coltivate in laboratorio per gli esperimenti sono cellule di adenocarcinoma mammario, le MCF-7.

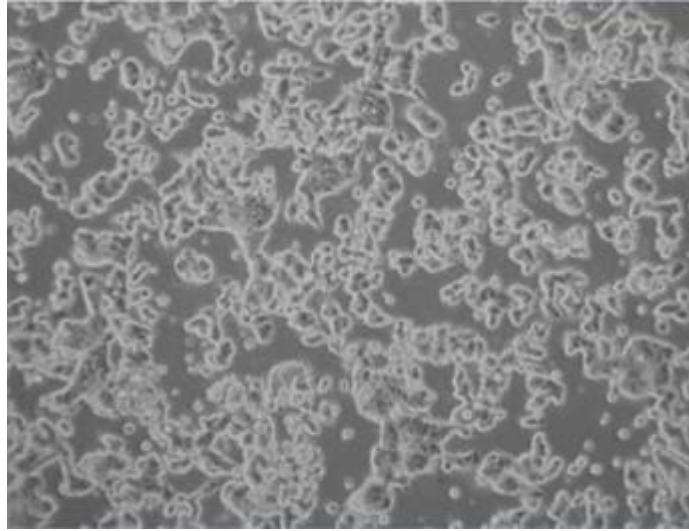


Figura 21: Cellule MCF7 al microscopio ottico in contrasto di fase a 100X di ingrandimento.

Le MCF-7 furono isolate per la prima volta nel 1970 da una donna caucasica di 69 anni. MCF-7 è l'acronimo di Michigan Cancer Foundation-7, in riferimento all'istituto di Detroit dove fu scoperta questa linea cellulare nel 1973 da Herbert Soule e i suoi collaboratori. Prima delle MCF-7 per i ricercatori era impossibile far sopravvivere una linea cellulare mammaria per più di due mesi (22).

4.2.2 PREPARAZIONE DEI PORTACAMPIONI

Prima di seminare le cellule è necessario preparare i porta-campioni all'interno dei quali verrà inserita la soluzione contenente le cellule e in seguito traspostati nei laboratori di Montecuccolino per l'irraggiamento con il Plasma Focus.

I portacampioni utilizzati per gli irraggiamenti sono stati appositamente progettati per poter avere uno supporto altamente trasparente (mylar di spessore 50 μm) alla radiazione sul quale seminare, far aderire e mantenere le cellule all'interno del terreno di coltura durante tutto

l'irraggiamento. I portacampioni sono costituiti da: due ghiera in acciaio, un cilindro in acciaio e due guarnizioni in silicone, gli O-rings.



Figura 22: Componenti del portacampione; da sinistra: cilindro in alluminio, O-rings, dischi di mylar e ghiera.

Prima di poter utilizzare i portacampioni è necessario sterilizzare le varie parti che lo compongono. I dischi di mylar sono stati sciacquati tre volte prima in alcool e poi in Phosphate Buered Saline (PBS) sotto cappa, gli O-ring e le parti in acciaio invece sono state tamponate con etanolo 70% e lasciate asciugare per qualche minuto.

A questo punto il campione può essere assemblato: gli O-rings sono inseriti nelle apposite scanalature poste alle estremità del corpo del portacampione, sopra viene appoggiato il mylar e subito dopo le ghiera sono state leggermente avvitate; il tutto è stato avvolto in carta di alluminio e posto in autoclave. Il ciclo di sterilizzazione in autoclave avviene alla temperatura di 120°C e dura un'ora. Terminata la sterilizzazione, i portacampioni sono stati lasciati raffreddare senza aprire l'autoclave.

L'autoclave assicura l'uccisione dei microrganismi, incluse le endospore, mediante l'utilizzo di calore umido. La sterilizzazione mediante calore prevede un trattamento che provoca la completa distruzione di tutti gli organismi e poiché le endospore sono praticamente ubiquitarie, le

procedure di sterilizzazione vengono opportunamente programmate per la loro eliminazione. Per ottenere questi risultati è necessario raggiungere temperature superiori al punto di ebollizione dell'acqua, e ciò viene ottenuto immettendo vapore saturo sotto pressione nella camera a chiusura ermetica dell'autoclave.

Una volta che i portacampioni si sono raffreddati sono portati, ancora avvolti nell'alluminio, sotto cappa dove vengono aperti per far in modo che la condensa eventualmente formatasi al loro interno si asciughi.



Figura 23: Portacampione assemblato.

Ora i portacampioni sono pronti per la semina delle cellule.

4.2.3 PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Come è stato detto prima le cellule utilizzate sono le MCF-7. Una delle caratteristiche di questo tipo di cellule è quella di crescere in adesione al substrato sul quale vengono seminate senza inibizione da contatto. Le cellule crescono in fiasche polipropileniche contenenti il terreno di coltura descritto di seguito e mantenute in ambiente idoneo (temperatura di 37° C, e concentrazione di CO₂ al 5 %) in incubatore.

Il terreno di coltura di base è l'Eagle's minimal essential medium (EMEM); esso contiene:

- Amminoacidi;
- Sali (cloruro di calcio, cloruro di potassio, solfato di magnesio, cloruro di sodio e fosfato monosodico);
- Glucosio;
- Vitamine (acido folico, nicotinamide, riboflavina, B12).

A questa base al momento dell'uso vengono aggiunti:

- Glutamina (un amminoacido labile);
- Antibiotici;
- Siero (FBS, siero fetale di bovino).

Quando le cellule raggiungono la confluenza (formazione di uno strato monocellulare) sul lato della loro adesione il terreno viene eliminato e le cellule vengono sciacquate due volte con PBS. Per poterle staccare si utilizzano 500 µl di Tripsina diluita in EDTA (0,02%) che degrada le proteine della matrice extracellulare che mantiene le cellule aderenti. Dopo aver lasciato agire per qualche minuto le cellule sono in sospensione e possono essere prelevate aggiungendo 1,5 ml di terreno completo, precedentemente riscaldato a 37° C. Il tutto viene trasferito in un tubo conico sterile con l'aiuto di una pipetta.

Una volta seminate le cellule devono essere posizionate su fogli di mylar nei portacampioni, la quantità di cellule deve essere la stessa per ogni campione, nel nostro caso si voleva che in ogni campione ci fossero 600000 cellule. Per questo motivo le cellule devono essere contate, e lo strumento utilizzato è la camera di burker.

4.3 IRRAGGIAMENTO DELLE CELLULE

Ventiquattro ore dopo la preparazione così come descritta nei paragrafi precedenti, i campioni vengono trasportati ai centri di irraggiamento in contenitori di polistirolo in grado di mantenere la temperatura costante. Due campioni, selezionati in modo casuale, subiscono il protocollo di irraggiamento mentre gli altri due no (controllo).

I campioni prescelti sono stati irraggiati con il Plasma Focus presso il "Laboratorio di Montecuccolino" dell'Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Dipartimento di Ingegneria Industriale

La dose di irraggiamento che si dovrebbe raggiungere è pari a 2 Gy. Tra il campione e il dispositivo vengono inseriti tre film graficomici, un film GAFCRHOMICH VDV2 e due film GRAFCHROMIC EBT3 che simulano lo spessore della pelle umana e che permettono un'analisi della dose emessa: il colore dei film cambia gradazioni di blu a seconda della radiazione ricevuta. L'oscurità del film aumenta all'aumentare della dose assorbita.

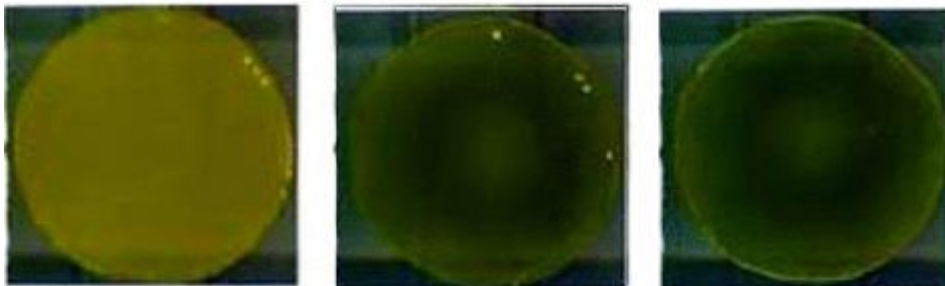


Figura 24: Risposta dei film all'aumentare della dose assorbita.

Le dosi misurate per i due irraggiamenti sui due campioni sono riportati nella seguente tabella:

DATA	CAMPIONE	SCARICHE EFFETTUATE	DOSE (Gy)
03/04/2014	MCF7-P1	15	1,2
03/04/2014	MCF7-P2	10	1,6
16/04/2014	MCF7-P1	8	3,4
16/04/2014	MCF7-P2	15	2,7

Tabella 16: Dose assorbita dai due campioni nei due irraggiamenti.

Tra tutti campioni quello meglio irraggiato risulta essere il secondo della seconda serie.

Subito dopo l'irraggiamento i campioni sono stati portati all'Università di Pavia.

4.4 CITOCHIMICA E CITOMETRIA A FLUSSO

Al fine di valutare gli effetti dell'irraggiamento sulle cellule MCF7 sono stati effettuati i saggi May Grunwald-Giemsa e annessina V - propidio ioduro (Ann / PI) e valutati sia per mezzo della microscopia ottica convenzionale che per mezzo della citometria a flusso in fluorescenza.

Per citochimica in fluorescenza si intende un processo che consente di legare molecole fluorescenti (sonde o marcatori) a substrati cellulari in modo da renderli distinguibili. Ciò può avvenire per legame diretto della molecola fluorescente alla sostanza cellulare o mediante l'uso di anticorpi coniugati, direttamente o indirettamente, con sostanze fluorescenti.

Nella tecnica di colorazione *May Grunwald-Giemsa* il campione viene immerso in una soluzione particolare, che può mettere in evidenza le cellule adese al substrato di Mylar su cui sono state seminate con colori vivaci; le cellule morte, invece, tendono a staccarsi. Inoltre, questa analisi qualitativa permette di mostrare la morfologia e la distribuzione della popolazione di cellule.

L' *Annessina-V* è usata come sonda per rilevare le cellule che esprimono fosfatidilserina sulla superficie cellulare, indice sia di apoptosi che di altre forme di morte cellulare. Questa analisi rivela la quantità di cellule annessina-positive, ossia la quantità di cellule danneggiate che sono morte o che probabilmente moriranno. Osservate al microscopio ottico queste cellule appaiono di colore verde fluorescente su uno sfondo scuro.

Il *Propidio ioduro* è usato come sonda per rilevare le cellule morte. Osservate al microscopio, le cellule legate alla sonda appaiono di colore rosso.

La citometria a flusso è una tecnica di misura di proprietà delle cellule le cui origini sono strettamente connesse con la microscopia ottica. In effetti un citometro a flusso non è altro che un microscopio dotato di un sistema automatico di trasporto delle cellule e di un dispositivo di misura della luce che sostituisce l'occhio dell'osservatore. Questo ultimo aspetto qualifica in modo specifico la caratteristica principale della citometria a flusso, cioè il fatto che si tratti di una tecnica di misura e non di una tecnica di sola osservazione.

Le tecniche di colorazione o, se si preferisce, di reazione con sostanze fluorescenti, rappresentano per la citometria a flusso l'analogo delle tecniche, prevalentemente in assorbimento, caratteristiche della microscopia ottica. Esse garantiscono un'elevata sensibilità di misura, per cui è possibile valutare in maniera quantitativa la presenza di sostanze fino a poche centinaia di molecole per cellula.

4.5 RISULTATI

I risultati della colorazione May Grunwald - Giemsa mostrano che le cellule di controllo hanno un fenotipo cobblestone-like ed una forte adesione cellula-cellula, formano dei domini isolati (cioè si raggruppano in isole di diverse dimensioni) e crescono in monostrato.

4.5.1 CELLULE IRRAGGIATE CON TUBO RADIOGENO

L'analisi quantitativa effettuata mediante citofluorimetria (annessina V – propidio ioduro) mostra che per le cellule esposte alla dose di 2 Gy fornita con il tubo radiogeno la percentuale di danno è molto bassa: circa l'8% delle cellule trattate risulta danneggiata rispetto al 3% delle cellule di controllo. Anche la quantità di cellule morte risulta simile tra i campioni cellulari irraggiati e i campioni cellulari utilizzati come controllo.

La valutazione del surnatante per mezzo della citometria a flusso rivela la presenza di un numero esiguo di frammenti cellulari e detriti rispetto ai relativi campioni di controllo.

4.5.2 CELLULE IRRAGGATE CON IL PLASMA FOCUS

Per le cellule esposte alla dose di 2 Gy fornita con PFMA l'analisi quantitativa effettuata mediante citofluorimetria (annessina V – propidio ioduro) mostra che la percentuale di danno risulta maggiore: circa il 18% delle cellule trattate risulta danneggiata rispetto al 7% delle cellule di controllo.

L'indagine delle cellule adese per mezzo del saggio May Grunwald Giemsa mostra che l'irraggiamento con PFMA-3 ha indotto un maggiore distacco delle cellule dal substrato di mylar sul quale sono state seminate.

La valutazione del surnatante per mezzo della citometria a flusso rivela la presenza di un maggior numero di frammenti cellulari e detriti nei campioni cellulari irraggiati con questa sorgente piuttosto che nei campioni irraggiati con il tubo radiogeno rispetto ai relativi campioni di controllo.

CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi sono stati confrontati gli effetti causati dall'esposizione a tipologie di radiazioni diverse in sistemi cellulari in vitro. La valutazione tramite end-points biologici di interesse specifico nell'ambito della clinica tumorale e del fenomeno della senescenza di effetti indotti da condizioni di trattamento radiogeno diverse permette di selezionare il tipo di intervento terapeutico più idoneo in funzione delle condizioni cliniche.

Nel caso dello progetto EXCALIBUR le cellule di glioblastoma umano (T98G) sono state irraggiate sia con protoni sia con raggi γ a due dosi diverse (0,25 Gy e 2 Gy) e le analisi sono state effettuate a 6 h dopo e 24 h dopo il trattamento.

I risultati ottenuti derivano dall'analisi statistica dei dati di espressione genica ottenuti tramite la tecnologia dei microarray. Questa indagine ha permesso di concludere che nelle cellule irraggiate sia con raggi γ che con protoni si attivano i geni legati alla senescenza cellulare (SASP).

La senescenza cellulare, sia di tipo replicativo che fisiologico, è un "fondamentale programma cellulare", caratterizzato da una alterata espressione di molti geni usualmente attivi nella cellula, che compromette la complessiva funzionalità cellulare. Una cellula senescente induce conseguenze deleterie sulla matrice extracellulare così come su altre cellule fisicamente vicine o fisiologicamente interdipendenti. La senescenza cellulare, e la senescenza replicativa che è una delle sue caratteristiche, derivano, fra l'altro, dall'accorciarsi relativo dei telomeri (strutture specializzate composte da una sequenza ripetuta di DNA e posizionate alla fine di ogni cromosoma).

Al giorno d'oggi i meccanismi di induzione e propagazione della senescenza stanno diventando di grande importanza per molte patologie. Riuscire ad attivare il processo di senescenza nelle cellule malate, infatti, potrebbe permettere la cura di molti, se non quasi tutti, i tumori.

Infine ricordiamo che il fenomeno di effetto “bystander” indotto dalla senescenza, è stato inizialmente ispirato dalle ricerche radiobiologiche e poi è stato realmente osservato per la progressione della senescenza e non solo. Ricerche in corso, stanno evidenziando che molte patologie età-associate (Diabete di tipo II, malattia di Alzheimer etc) condividono sia una base “infiammatoria” che un meccanismo di propagazione del danno analogo a quello descritto dall'effetto bystander.

Nel caso del progetto PLASMA FOCUS le cellule di carcinoma mammario (MCF7) sono state messe in coltura seguendo tutte le procedure sperimentali descritte e irraggiate con PFMA-3 (alto rateo di dose) e con una sorgente convenzionale di raggi X (basso rateo di dose) alla dose di 2 Gy.

Per confrontare gli effetti indotti dai due diversi ratei di dose sono stati utilizzati i dati ottenuti tramite la microscopia ottica convenzionale e la citometria a flusso in fluorescenza. I risultati preliminari indicano che a parità della dose fornita, un rateo di dose estremamente elevato, come quello caratteristico del dispositivo PFMA-3, produce un danno maggiore, a livello cellulare, rispetto ad un rateo di dose moderato, come quello caratteristico del tubo radiogeno.

L'analisi quantitativa infatti ha mostrato che circa il 18% delle cellule trattate con il PFMA-3 risulta danneggiata rispetto al 7% delle cellule di controllo, percentuale molto più alta di quella che si riscontra nelle cellule trattate con una sorgente a raggi X convenzionale. In questo caso circa l'8% delle cellule trattate risulta danneggiata rispetto al 3% delle cellule di controllo.

Il risultato ottenuto fa ben sperare sul futuro utilizzo di questa sorgente di raggi X come strumento per la radioterapia, soprattutto nella cura delle masse tumorali di piccole dimensioni (1-0.1 cm).

APPENDICE A

```
source("http://www.bioconductor.org/biocLite.R")

library( genefilter)

#importo il dataframe

Data<-read.table("C:/Users/Samanta/Desktop/Rtxt/AllData_IR_excalibur_ord.txt",
header=TRUE, sep = "")#, quote = "\"",dec = "," )

rownames(Data) <- Data$Probeld

data<-Data[,-c(1)]

###p-value protoni-gamma 0Gy a 6h ###

p_g0 <- data[, c("X1.CEL", "X2.CEL", "X3.CEL", "X11.CEL", "X14.CEL", "X17.CEL")]

p_g0<-as.matrix(p_g0)

#calcola la statistica

resultp_g0<-data.frame()

for (i in 1:nrow(p_g0)){

  t_testp_g0 <-t.test(p_g0[i,1:3],p_g0[i,4:6],paired=T)

  t_test_p_g0<-t_testp_g0$p.value

  resultp_g0<-rbind(resultp_g0,t_test_p_g0)

}

#nomino le righe e le colonne

row.names(resultp_g0)<-rownames(p_g0)

colnames(resultp_g0)<-"p.value_prot_gamma_0Gy_6h"

#####p-value protoni-gamma 0Gy a 24h#####

P_G0 <- data[, c("X29.CEL", "X30.CEL", "X31.CEL", "X20.CEL", "X23.CEL", "X26.CEL")]

P_G0<-as.matrix(P_G0)

#calcola la statistica

resultP_G0<-data.frame()

for (i in 1:nrow(P_G0)){
```

```

t_testP_G0 <-t.test(P_G0[i,1:3],P_G0[i,4:6],paired=T)
t_test_P_G0<-t_testP_G0$p.value
resultP_G0<-rbind(resultP_G0,t_test_P_G0)
}

#nomino le colonne e creo il data frame di mio interesse
colnames(resultP_G0)<-"p.value_prot_gamma_0Gy_24h"

Pval<- cbind(resultp_g0,resultP_G0)

#importo il file con annotazione

Annotazione<-
read.table("C:/Users/Samanta/Desktop/Rtxt/annot_union_ontoc_t98g.txt",
header=TRUE, sep = "")#, quote = "\"",dec = "," )

Probe<-Data$Probeld
colnames(Probe)<-"Probe"

Pval<-data.frame(Pval, Probe)

Pval<-subset(Pval,select=c(Probe,p.value_prot_gamma_0Gy_6h,
p.value_prot_gamma_0Gy_24h))

#inserisco l'annotazione a tabella con p-value

Pval_annot<-merge(Pval,Annotazione, by="Probe" , all.x=T,incomparables = NULL)

Pval_annot<-Pval_annot[,-c(4)]

Pval_annot<-Pval_annot[c(1,4, 5, 6, 2, 3)]

View(Pval_annot)

h6<-subset(Pval_annot[,c(1:5)],Pval_annot$p.value_prot_gamma_0Gy_6h<= 0.05)
h24<-subset(Pval_annot[,c(1,2,3,4,6)],Pval_annot$p.value_prot_gamma_0Gy_24h<=
0.05)

write.table(h24,"C:/Users/Samanta/Desktop/Rtxt/h24.txt", quote = TRUE, sep="\t" )

#istogramma (soglia 0,05)

hist(Pval_annot$p.value_prot_gamma_0Gy_6h, breaks=20, ylim=c(0,5500),xlab="p-
value protoni_gamma", main="Histogram of P-value, soglia 0.05", las=1, col="yellow")

hist(Pval_annot$p.value_prot_gamma_0Gy_24h,breaks=20,ylim=c(0,5500), xlab="p-
value protoni_gamma", main="Histogram of P-value",las=1, col="red", add=T)

```

```

legend(0.2, 4500 ,inset =.05,lty =1, cex =0.7, c (
"p.value_prot_gamma_0Gy_6h","p.value_prot_gamma_0Gy_24h"), col=c ("yellow",
"red"), bty="o", horiz=FALSE)

text (locator(1), "n=33297 osservazioni")

#####calcolo il t-test tra controllo e irraggiato a 6h e 24h per i protoni e per i gamma
#p-value dei protoni a 6h tra controllo e irraggiati a 0,25Gy

p0_p025<-data[,c("X1.CEL","X2.CEL","X3.CEL","X4.CEL","X5.CEL", "X6.CEL")]
p0_p025<-as.matrix(p0_p025)
#calcola la statistica
resultp0_p025<-data.frame()
for (i in 1:nrow(p0_p025)){
  t_testp0_p025 <-t.test(p0_p025[i,1:3],p0_p025[i,4:6],paired=T)
  t_test_p0_p025<-t_testp0_p025$p.value
  resultp0_p025<-rbind(resultp0_p025,t_test_p0_p025)
}
#nomino le righe e le colonne
row.names(resultp0_p025)<-rownames(p0_p025)
colnames(resultp0_p025)<-"p.value_prot0Gy_prot_025Gy_6h"
#p-value controllo irraggiati 2Gy protoni
p0_p2<-data[,c("X1.CEL","X2.CEL","X3.CEL","X7.CEL","X8.CEL", "X9.CEL")]
p0_p2<-as.matrix(p0_p2)
#calcola la statistica
resultp0_p2<-data.frame()
for (i in 1:nrow(p0_p2)){
  t_testp0_p2 <-t.test(p0_p2[i,1:3],p0_p2[i,4:6],paired=T)
  t_test_p0_p2<-t_testp0_p2$p.value
  resultp0_p2<-rbind(resultp0_p2,t_test_p0_p2)
}
#nomino le righe e le colonne

```

```

colnames(resultp0_p2)<-"p.value_prot0Gy_prot_2Gy_6h"
IRp_val <-cbind(resultp0_p025,resultp0_p2)
#p-value controllo irraggiati 0.25 Gy gamma
g0_g025<-data[, ("X11.CEL","X14.CEL","X17.CEL","X12.CEL","X15.CEL", "X18.CEL")]
g0_g025<-as.matrix(g0_g025)
#calcola la statistica
resultg0_g025<-data.frame()
for (i in 1:nrow(g0_g025)){
  t_testg0_g025 <-t.test(g0_g025[i,1:3],g0_g025[i,4:6],paired=T)
  t_test_g0_g025<-t_testg0_g025$p.value
  resultg0_g025<-rbind(resultg0_g025,t_test_g0_g025)
}
#nomino le righe e le colonne
colnames(resultg0_g025)<-"p.value_gamma0Gy_gamma_025Gy_6h"
IRp_val <-cbind(IRp_val,resultg0_g025)
#p-value controllo irraggiati 2 Gy gamma
g0_g2 <- data[, c("X11.CEL","X14.CEL","X17.CEL","X13.CEL","X16.CEL", "X19.CEL")]
g0_g2<-as.matrix(g0_g2)
#calcola la statistica
resultg0_g2<-data.frame()
for (i in 1:nrow(g0_g2)){
  t_testg0_g2 <-t.test(g0_g2[i,1:3],g0_g2[i,4:6],paired=T)
  t_test_g0_g2<-t_testg0_g2$p.value
  resultg0_g2<-rbind(resultg0_g2,t_test_g0_g2)
}
#nomino le righe e le colonne
colnames(resultg0_g2)<-"p.value_gamma0Gy_gamma_2Gy_6h"
IRp_val <-cbind(IRp_val,resultg0_g2)
#p-value dei protoni a 24h tra controllo e irraggiati a 0,25Gy

```

```

P0_P025<-data[,c("X29.CEL","X30.CEL","X31.CEL","X32.CEL", "X33.CEL", "X34.CEL")]
P0_P025<-as.matrix(P0_P025)
#calcola la statistica
resultP0_P025<-data.frame()
for (i in 1:nrow(P0_P025)){
  t_testP0_P025 <-t.test(P0_P025[i,1:3],P0_P025[i,4:6],paired=T)
  t_test_P0_P025<-t_testP0_P025$p.value
  resultP0_P025<-rbind(resultP0_P025,t_test_P0_P025)
}
#nomino le colonne
colnames(resultP0_P025)<-"p.value_prot0Gy_prot_025Gy_24h"
IRp_val <-cbind(IRp_val,resultP0_P025)
#p-value dei protoni a 24h tra controllo e irraggiati a 2Gy
P0_P2 <- data[, c("X29.CEL","X30.CEL","X31.CEL","X35.CEL","X36.CEL", "X37.CEL")]
P0_P2<-as.matrix(P0_P2)
#calcola la statistica
resultP0_P2<-data.frame()
for (i in 1:nrow(P0_P2)){
  t_testP0_P2 <-t.test(P0_P2[i,1:3],P0_P2[i,4:6],paired=T)
  t_test_P0_P2<-t_testP0_P2$p.value
  resultP0_P2<-rbind(resultP0_P2,t_test_P0_P2)
}
#nomino le colonne
colnames(resultP0_P2)<-"p.value_prot0Gy_prot_2Gy_24h"
IRp_val <-cbind(IRp_val,resultP0_P2)
#p-value gamma tra controllo e irraggiato a 0,25Gy a 24h
G0_G025<-data[,c("X20.CEL","X23.CEL","X26.CEL","X21.CEL", "X24.CEL", "X27.CEL")]
G0_G025<-as.matrix(G0_G025)
#calcola la statistica

```

```

resultG0_G025<-data.frame()
for (i in 1:nrow(G0_G025)){
  t_testG0_G025 <-t.test(G0_G025[i,1:3],G0_G025[i,4:6],paired=T)
  t_test_G0_G025<-t_testG0_G025$p.value
  resultG0_G025<-rbind(resultG0_G025,t_test_G0_G025)
}

#nomino le righe e le colonne
colnames(resultG0_G025)<-"p.value_gamma0Gy_gamma_025Gy_24h"
IRp_val <-cbind(IRp_val,resultG0_G025)

#p-value gamma tra controllo e irraggiato a 2Gy a 24h
G0_G2 <- data[, c("X20.CEL", "X23.CEL", "X26.CEL", "X22.CEL", "X25.CEL", "X28.CEL")]
G0_G2<-as.matrix(G0_G2)

#calcola la statistica
resultG0_G2<-data.frame()
for (i in 1:nrow(G0_G2)){
  t_testG0_G2 <-t.test(G0_G2[i,1:3],G0_G2[i,4:6],paired=T)
  t_test_G0_G2<-t_testG0_G2$p.value
  resultG0_G2<-rbind(resultG0_G2,t_test_G0_G2)
}

#nomino le righe e le colonne
colnames(resultG0_G2)<-"p.value_gamma0Gy_gamma_2Gy_24h"
IRp_val <-cbind(IRp_val,resultG0_G2)
View(IRp_val)

#aggiungo una colonna con le Probe, mi servirà dopo per funzione merge
IRp_val<-data.frame(IRp_val, Probe)

IRp_val<-subset(IRp_val,select=c(Probe,
p.value_prot0Gy_prot_025Gy_6h,p.value_prot0Gy_prot_2Gy_6h,
p.value_gamma0Gy_gamma_025Gy_6h,p.value_gamma0Gy_gamma_2Gy_6h,
p.value_prot0Gy_prot_025Gy_24h,p.value_prot0Gy_prot_2Gy_24h,
p.value_gamma0Gy_gamma_025Gy_24h, p.value_gamma0Gy_gamma_2Gy_24h))
View(IRp_val)

```



```

#inserisco annotazione a tabella con p-value

IRp_val_annot<-merge(IRp_val,Annotazione,by="Probe",all.x=T,incomparables = NULL)

IRp_val_annot<-IRp_val_annot[,-c(10)]

IRp_val_annot<-IRp_val_annot[c(1,10,11, 12, 2, 3, 4,5,6,7,8,9)]

View(IRp_val_annot)

write.table(IRp_val_annot,"C:/Users/Samanta/Desktop/Rtxt/IRp_val_annot.txt", quote =
TRUE, sep="\t" )

####seleziono geni significativi di ogni colonna

p025<-
subset(IRp_val_annot[,c(1:5)],IRp_val_annot$p.value_prot0Gy_prot_025Gy_6h<= 0.05)

g025<-
subset(IRp_val_annot[,c(1:4,7)],IRp_val_annot$p.value_gamma0Gy_gamma_025Gy_6h
<= 0.05)

write.table(p025,"C:/Users/Samanta/Desktop/Rtxt/p025.txt", quote = TRUE, sep="\t" )
write.table(g025,"C:/Users/Samanta/Desktop/Rtxt/g025.txt", quote = TRUE, sep="\t" )

p2<-subset(IRp_val_annot[,c(1:4,6)],IRp_val_annot$p.value_prot0Gy_prot_2Gy_6h<=
0.05)

g2<-
subset(IRp_val_annot[,c(1:4,8)],IRp_val_annot$p.value_gamma0Gy_gamma_2Gy_6h<=
0.05)

write.table(p2,"C:/Users/Samanta/Desktop/Rtxt/p2.txt", quote = TRUE, sep="\t" )
write.table(g2,"C:/Users/Samanta/Desktop/Rtxt/g2.txt", quote = TRUE, sep="\t" )

P025<-
subset(IRp_val_annot[,c(1:4,9)],IRp_val_annot$p.value_prot0Gy_prot_025Gy_24h<=
0.05)

G025<-
subset(IRp_val_annot[,c(1:4,11)],IRp_val_annot$p.value_gamma0Gy_gamma_025Gy_2
4h<= 0.05)

write.table(P025,"C:/Users/Samanta/Desktop/Rtxt/Pr025.txt", quote = TRUE, sep="\t" )
write.table(G025,"C:/Users/Samanta/Desktop/Rtxt/Ga025.txt", quote = TRUE, sep="\t" )

P2<-subset(IRp_val_annot[,c(1:4,10)],IRp_val_annot$p.value_prot0Gy_prot_2Gy_24h<=
0.05)

```

```

G2<-
subset(IRp_val_annot[,c(1:4,12)],IRp_val_annot$p.value_gamma0Gy_gamma_2Gy_24h
<= 0.05)

write.table(P2,"C:/Users/Samanta/Desktop/Rtxt/Pr2.txt", quote = TRUE, sep="\t" )

write.table(G2,"C:/Users/Samanta/Desktop/Rtxt/Ga2.txt", quote = TRUE, sep="\t" )

#####

####ISTOGRAMMI CON SOGLIA 0.05####

#####

par(mfrow=c(1,1))

hist(IRp_val_annot$p.value_prot0Gy_prot_2Gy_6h, breaks=20,
ylim=c(0,2500),xlab="p.value_prot", main="Histogram of P-value, soglia 0.05", las=1,
col="purple")

hist(IRp_val_annot$p.value_prot0Gy_prot_025Gy_6h, breaks=20,
ylim=c(0,2500),xlab="p.value_prot", main="Histogram of P-value, soglia 0.01", las=1,
col="grey", add=T)

legend(0.15,2780,inset=.05,lty=1,cex=0.7,c("p.value_prot0Gy_prot_025Gy_6h",
,"p.value_prot0Gy_prot_2Gy_6h"),col= c("grey","purple"), bty="o", horiz=FALSE)

text(locator(1), "n=33297 osservazioni")

hist(IRp_val_annot$p.value_gamma0Gy_gamma_2Gy_6h, breaks=20,
ylim=c(0,2500),xlab="p.value_gamma", main="Histogram of P-value, soglia 0.05", las=1,
col="pink")

hist(IRp_val_annot$p.value_gamma0Gy_gamma_025Gy_6h, breaks=20,
ylim=c(0,2500),xlab="p.value_gamma", main="Histogram of P-value, soglia 0.05", las=1,
col="orange", add=T)

legend(0.25,2750,inset=.05,lty=1,cex=0.55,c("p.value_gamma0Gy_gamma_025Gy_6h",
p.value_gamma0Gy_gamma_2Gy_6h"), col=c("orange","pink"), bty="o", horiz=FALSE)

text(locator(1), "n=33297 osservazioni")

hist(IRp_val_annot$p.value_prot0Gy_prot_025Gy_24h,breaks=20,
ylim=c(0,2500),xlab="p.value_prot", main="Histogram of P-value, soglia 0.05", las=1,
col="brown")

hist(IRp_val_annot$p.value_prot0Gy_prot_2Gy_24h,breaks=20,ylim= c(0,2500),
xlab="p.value_prot", main="Histogram of P-value, soglia 0.05", las=1, col="red", add=T)

legend(0.3,600,inset=.05,lty=1,cex=0.55,c("p.value_prot0Gy_prot_025Gy_24h","p.value
_prot0Gy_prot_2Gy_24h"), col=c("brown","red"), bty="o", horiz=FALSE)

text(locator(1), "n=33297 osservazioni")

```

```

hist(IRp_val_annot$p.value_gamma0Gy_gamma_2Gy_24h,breaks=20,
ylim=c(0,2500),xlab="p.value_gamma", main="Histogram of P-value, soglia 0.05", las=1,
col="darkorange")

hist(IRp_val_annot$p.value_gamma0Gy_gamma_025Gy_24h, breaks=20,
ylim=c(0,2500),xlab="p.value_gamma", main="Histogram of P-value, soglia 0.05", las=1,
col="darkgreen", add=T)

legend(0.2,700,inset=.05,lty=1,cex=0.6,c("p.value_gamma0Gy_gamma_025Gy_24h","p.
value_gamma0Gy_gamma_2Gy_24h"), col=c("darkgreen","darkorange"), bty="o",
horiz=FALSE)

text(locator(1), "n=33297 osservazioni")

hist(IRp_val_annot$p.value_gamma0Gy_gamma_025Gy_6h, breaks=20,
ylim=c(0,2500),xlab="p.value", main="Histogram of P-value, soglia 0.05", las=1,
col="orange")

hist(IRp_val_annot$p.value_prot0Gy_prot_025Gy_6h,breaks=20,
ylim=c(0,2500),xlab="p.value", main="Histogram of P-value, soglia 0.01", las=1,
col="grey", add=T)

legend(0.25,2750,inset=.05,lty=1,cex=0.55,c("p.value_prot0Gy_prot_025Gy_6h","p.valu
e_gamma0Gy_gamma_025Gy_6h"), col=c("grey","orange"), bty="o", horiz=FALSE)

text(locator(1), "n=33297 osservazioni")

hist(IRp_val_annot$p.value_gamma0Gy_gamma_025Gy_24h, breaks=20,
ylim=c(0,2500),xlab="p.value", main="Histogram of P-value, soglia 0.05", las=1,
col="darkgreen")

hist(IRp_val_annot$p.value_prot0Gy_prot_025Gy_24h,breaks=20,
ylim=c(0,2500),xlab="p.value", main="Histogram of P-value, soglia 0.05", las=1,
col="brown", add=T)

legend(0.2,700,inset=.05,lty=1,cex=0.6,c("p.value_gamma0Gy_gamma_025Gy_24h","p.
value_prot0Gy_prot_025Gy_24h"), col=c("darkgreen","brown"), bty="o", horiz=FALSE)

text(locator(1), "n=33297 osservazioni")

hist(IRp_val_annot$p.value_gamma0Gy_gamma_2Gy_6h,breaks=20,
ylim=c(0,2500),xlab="p.value", main="Histogram of P-value, soglia 0.05", las=1,
col="pink")

hist(IRp_val_annot$p.value_prot0Gy_prot_2Gy_6h,breaks=20,
ylim=c(0,2500),xlab="p.value", main="Histogram of P-value, soglia 0.05", las=1,
col="purple", add=T)

legend(0.2,700,inset=.05,lty=1,cex=0.6,c("p.value_gamma0Gy_gamma_2Gy_6h","p.valu
e_prot0Gy_prot_2Gy_6h"), col=c("pink","purple"), bty="o", horiz=FALSE)

```

```

text(locator(1), "n=33297 osservazioni")

hist(IRp_val_annot$p.value_gamma0Gy_gamma_2Gy_24h, breaks=20,
ylim=c(0,2500),xlab="p.value", main="Histogram of P-value, soglia 0.05", las=1,
col="darkorange")

hist(IRp_val_annot$p.value_prot0Gy_prot_2Gy_24h,breaks=20,
ylim=c(0,2500),xlab="p.value", main="Histogram of P-value, soglia 0.05", las=1, col="red",
add=T)

legend(0.3,600,inset=.05,lty=1,cex=0.55,c("p.value_gamma0Gy_gamma_2Gy_24h","p.v
alue_prot0Gy_prot_2Gy_24h"),col=c("darkorange","red"), bty="o", horiz=FALSE)

text(locator(1), "n=33297 osservazioni")

##CERCO GENI SIGNIFICATIVI, CON SOGLIA 0,05

p_g_0_6<-(Pval_annot$p.value_prot_gamma_0Gy_6h<=0.05)
p_g_0_24<-(Pval_annot$p.value_prot_gamma_0Gy_24h<=0.05)
p_g_0_6_24<-cbind(p_g_0_6, p_g_0_24)
p_g_0_6_24<-as.data.frame(p_g_0_6_24)

A<- vennCounts(p_g_0_6_24)

vennDiagram(A,names=c("protoni-gamma 0Gy 6h", "protoni-gamma 0Gy
24h"),mar=rep(1,4),cex=c(1.5,1.5,1.5),lwd=2, circle.col="gray",counts.col=c("black"),sho
w.include=F,cex.main=(2),col.main="black",cex.lab=(1),fg="red",)

p0_p025_6<-(IRp_val_annot$p.value_prot0Gy_prot_025Gy_6h <=0.05)
p0_p2_6<-(IRp_val_annot$p.value_prot0Gy_prot_2Gy_6h<=0.05)
g0_g025_6<-(IRp_val_annot$p.value_gamma0Gy_gamma_025Gy_6h<=0.05)
g0_g2_6<-(IRp_val_annot$p.value_gamma0Gy_gamma_2Gy_6h<=0.05)
p0_p025_24<-(IRp_val_annot$p.value_prot0Gy_prot_025Gy_24h<=0.05)
p0_p2_24<-(IRp_val_annot$p.value_prot0Gy_prot_2Gy_24h<=0.05)
g0_g025_24<-(IRp_val_annot$p.value_gamma0Gy_gamma_025Gy_24h<=0.05)
g0_g2_24<-(IRp_val_annot$p.value_gamma0Gy_gamma_2Gy_24h<=0.05)

p_g_025_6<-cbind(p0_p025_6, g0_g025_6)

B<- vennCounts(p_g_025_6)

vennDiagram(B,names=c("protoni 0,25Gy 6h", "gamma 0,25Gy
6h"),mar=rep(1,4),cex=c(1.5,1.5,1.5),lwd=2, circle.col="gray",counts.col=c("black"),show.
include=F,cex.main=(2),col.main="black",cex.lab=(1),fg="red",)

```

```

p_g_2_6<-cbind(p0_p2_6, g0_g2_6)
C<- vennCounts(p_g_2_6)
vennDiagram(C,names=c("protoni      2Gy      6h",      "gamma      2Gy
6h"),mar=rep(1,4),cex=c(1.5,1.5,1.5),lwd=2, circle.col="gray",counts.col=c("black"),show.
include=F,cex.main=(2),col.main="black",cex.lab=(1),fg="red",)
p_g_025_24<-cbind(p0_p025_24, g0_g025_24)
D<- vennCounts(p_g_025_24)
vennDiagram(D,names=c("protoni      0,25Gy      24h",      "gamma      0,25Gy
24h"),mar=rep(1,4),cex=c(1.5,1.5,1.5),lwd=2, circle.col="gray",counts.col=c("black"),sho
w.include=F,cex.main=(2),col.main="black",cex.lab=(1),fg="red",)
p_g_2_24<-cbind(p0_p2_24, g0_g2_24)
E<- vennCounts(p_g_2_24)
vennDiagram(E,names=c("protoni      2Gy      24h",      "gamma      2Gy
24h"),mar=rep(1,4),cex=c(1.5,1.5,1.5),lwd=2, circle.col="gray",counts.col=c("black"),sho
w.include=F,cex.main=(2),col.main="black",cex.lab=(1),fg="red",)
sign<- cbind(p_g_0_6, p_g_0_24, p0_p025_6, p0_p2_6, g0_g025_6, g0_g2_6,
p0_p025_24,p0_p2_24, g0_g025_24,g0_g2_24 )
sign_annot<-data.frame(sign, Annotazione)
sign_annot<-sign_annot[,-c(11)]
sign_annot<-sign_annot[c(11,12,13, 14, 1,2, 3, 4,5,6,7,8,9, 10)]

```

APPENDICE B

```
source("http://www.bioconductor.org/biocLite.R")

library( genefilter)

source("http://faculty.ucr.edu/~tgirke/Documents/R_BioCond/My_R_Scripts/overLapper.R")

#importo il dataframe

Data<- read.table("C:/Users/Samanta/Desktop/Rtxt/AllData_IR_excalibur_ord.txt",
header=TRUE, sep = "")#, quote = "\"",dec = "," )

rownames(Data) <- Data$Probeld

data<-Data[,-c(1)]

#####calcolo i fold change#####

prot <- data[, c("X1.CEL","X2.CEL","X3.CEL","X4.CEL","X5.CEL",
"X6.CEL","X7.CEL","X8.CEL", "X9.CEL")]

prot<-as.matrix(prot)

resultcf<-data.frame()

for (i in 1:nrow(data)){

  media1 <-mean(prot[i,1:3])

  media2 <-mean(prot[i,4:6])

  fold_change<-media2-media1

  resultcf<-rbind(resultcf,fold_change)

}

row.names(resultcf)<-rownames(prot)

colnames(resultcf)<-"fold_change_prot_025Gy_6h"

resultcf1<-data.frame()

for (i in 1:nrow(data)){

  media1 <-mean(prot[i,1:3])

  media2 <-mean(prot[i,7:9])

  fold_change1<-media2-media1

  resultcf1<-rbind(resultcf1, fold_change1)
```

```

}

colnames(resultcf1)<- "fold_change_prot_2Gy_6h"

Fold_change<-cbind(resultcf, resultcf1)

gamma<-data[, c("X11.CEL","X14.CEL","X17.CEL","X12.CEL","X15.CEL",
"X18.CEL","X13.CEL","X16.CEL", "X19.CEL")]

gamma<-as.matrix(gamma)

resultcf2<-data.frame()

for (i in 1:nrow(data)){

  media1 <-mean(gamma[i,1:3])

  media2 <-mean(gamma[i,4:6])

  fold_change2<-media2-media1

  resultcf2<-rbind(resultcf2, fold_change2)

}

colnames(resultcf2)<- "fold_change_gamma_025Gy_6h"

Fold_change<-cbind(Fold_change, resultcf2)

resultcf3<-data.frame()

for (i in 1:nrow(data)){

  media1 <-mean(gamma[i,1:3])

  media2 <-mean(gamma[i,7:9])

  fold_change3<-media2-media1

  resultcf3<-rbind(resultcf3, fold_change3)

}

colnames(resultcf3)<- "fold_change_gamma_2Gy_6h"

Fold_change<-cbind(Fold_change, resultcf3)

PROT <- data[, c("X29.CEL","X30.CEL","X31.CEL","X32.CEL","X33.CEL",
"X34.CEL","X35.CEL","X36.CEL", "X37.CEL")]

PROT<-as.matrix(PROT)

resultcf4<-data.frame()

for (i in 1:nrow(data)){

  media1 <-mean(PROT[i,1:3])

```

```

media2 <-mean(PROT[i,4:6])
fold_change4<-media2-media1
resultcf4<-rbind(resultcf4,fold_change4)
}
colnames(resultcf4)<- "fold_change_prot_025Gy_24h"
Fold_change<-cbind(Fold_change, resultcf4)
resultcf5<-data.frame()
for (i in 1:nrow(data)){
  media1 <-mean(PROT[i,1:3])
  media2 <-mean(PROT[i,7:9])
  fold_change5<-media2-media1
  resultcf5<-rbind(resultcf5,fold_change5)
}
colnames(resultcf5)<- "fold_change_prot_2Gy_24h"
Fold_change<-cbind(Fold_change, resultcf5)
GAMMA <- data[, c("X20.CEL","X23.CEL","X26.CEL","X21.CEL","X24.CEL",
"X27.CEL","X22.CEL","X25.CEL", "X28.CEL")]
GAMMA<-as.matrix(GAMMA)
resultcf6<-data.frame()
for (i in 1:nrow(data)){
  media1 <-mean(GAMMA[i,1:3])
  media2 <-mean(GAMMA[i,4:6])
  fold_change6<-media2-media1
  resultcf6<-rbind(resultcf6,fold_change6)
}
colnames(resultcf6)<- "fold_change_gamma_025Gy_24h"
Fold_change<-cbind(Fold_change, resultcf6)
resultcf7<-data.frame()
for (i in 1:nrow(data)){
  media1 <-mean(GAMMA[i,1:3])

```



```

media2 <-mean(GAMMA[i,7:9])
fold_change7<-media2-media1
resultcf7<-rbind(resultcf7,fold_change7)
}
colnames(resultcf7)<- "fold_change_gamma_2Gy_24h"
Fold_change<-cbind(Fold_change, resultcf7)
###CALCOLO IL FOLD CHANGE TRA CONTROLLO E CONTROLLO###
prot0<-data[,c("X1.CEL","X2.CEL","X3.CEL","X29.CEL","X30.CEL","X31.CEL")]
prot0<-as.matrix(prot0)
resultcf8<-data.frame()
for (i in 1:nrow(data)){
media1 <-mean(prot0[i,1:3])
media2 <-mean(prot0[i,4:6])
fold_change8<-media2-media1
resultcf8<-rbind(resultcf8,fold_change8)
}
colnames(resultcf8)<- "fold_change_controllo_prot"
Fold_change<-cbind(Fold_change, resultcf8)
gamma0<-data[,c("X11.CEL","X14.CEL","X17.CEL","X20.CEL","X23.CEL","X26.CEL" )]
gamma0<-as.matrix(gamma0)
resultcf9<-data.frame()
for (i in 1:nrow(data)){
media1 <-mean(gamma0[i,1:3])
media2 <-mean(gamma0[i,4:6])
fold_change9<-media2-media1
resultcf9<-rbind(resultcf9,fold_change9)
}
colnames(resultcf9)<- "fold_change_controllo_gamma"
Fold_change<-cbind(Fold_change, resultcf9)

```

```

View(Fold_change)

####importo il file con l'annotazione completa#####

Annotazione<-
read.table("C:/Users/Samanta/Desktop/Rtxt/annot_union_ontoc_t98g.txt",
header=TRUE, sep = "")#, quote = "\"",dec = "," )

Probe<-Data$ProbedId

names(Probe)<-"Probe"

Fold_change<-data.frame(Fold_change, Probe)

Fold_change<-
subset(Fold_change,select=c(Probe,fold_change_prot_025Gy_6h,fold_change_prot_2Gy_6h,fold_change_gamma_025Gy_6h ,fold_change_gamma_2Gy_6h,
fold_change_prot_025Gy_24h,fold_change_prot_2Gy_24h,fold_change_gamma_025Gy_24h,fold_change_gamma_2Gy_24h, fold_change_controllo_prot,
fold_change_controllo_gamma))

#inserisco l'annotazione al fold change

Fold_change_annot<-merge(Fold_change,Annotazione, by="Probe" ,
all.x=T,incomparables = NULL)

Fold_change_annot<-Fold_change_annot[,-c(12)]

Fold_change_annot<-Fold_change_annot[c(1,12, 13, 14, 2, 3, 6, 7, 4, 5, 8 ,9, 10, 11)]

View(Fold_change_annot)

fold_change<- write.table(Fold_change_annot,
file="C:/Users/Samanta/Desktop/Rtxt/fold_change.txt",sep = "\t", col.names

#####calcolo media e varianza di istogrammi

resultcf<- as.matrix(resultcf)

mean0<-mean(resultcf)

var0<-var(resultcf, na.rm=TRUE)

resultcf1<- as.matrix(resultcf1)

mean1<-mean(resultcf1)

var1<-var(resultcf1, na.rm=TRUE)

resultcf2<- as.matrix(resultcf2)

mean2<-mean(resultcf2)

var2<-var(resultcf2, na.rm=TRUE)

```

```

resultcf3<- as.matrix(resultcf3)
mean3<-mean(resultcf3)
var3<-var(resultcf3, na.rm=TRUE)

resultcf4<- as.matrix(resultcf4)
mean4<-mean(resultcf4)
var4<-var(resultcf4, na.rm=TRUE)
resultcf5<- as.matrix(resultcf5)
mean5<-mean(resultcf5)
var5<-var(resultcf5, na.rm=TRUE)
resultcf6<- as.matrix(resultcf6)
mean6<-mean(fold_change6)
var6<-var(resultcf6, na.rm=TRUE)
resultcf7<- as.matrix(resultcf7)
mean7<-mean(resultcf7)
var7<-var(resultcf7, na.rm=TRUE)
resultcf8<- as.matrix(resultcf8)
mean8<-mean(resultcf8)
var8<-var(resultcf8, na.rm=TRUE)
resultcf9<- as.matrix(resultcf9)
mean9<-mean(resultcf9)
var9<-var(resultcf9, na.rm=TRUE)

####ISTOGRAMMI####

n<-0
for(i in 1:60)
{n[i]= (0.05*i)}
n<-union(0,n)
N<-0
for(i in 1:60)

```

```

{N[i]= (-0.05*i)}

final<-union(N,n)

c<-sort(final)

par(mfrow=c(2,2))

hist(Fold_change_annot$fold_change_prot_025Gy_6h, breaks=c, ylim=c(0,5500),
xlim=c(-3,3),xlab="fold change_prot 0,25Gy_6h", main="Histogram of Fold change",
las=1, col="orange")

abline(v = mean0, col = "blue", lwd = 2)

text(-1.5, 4000, paste("Mean =", round(mean0, 6), "\n Var =", round(var0, 6)))

hist(Fold_change_annot$fold_change_prot_2Gy_6h, breaks=c, ylim=c(0,5500), xlim=c(-
3,3),xlab="fold change_prot 2Gy_6h", main="Histogram of Fold change", las=1,
col="green")#, add=T)

abline(v = mean1, col = "blue", lwd = 2)

text(-1.5, 4000, paste("Mean =", round(mean1, 6), "\n Var =", round(var1, 6)))

#legend("topright",inset=.05,lty=1,c("fold change_prot 0,25Gy_6h","fold change_prot
2Gy_6h"), col=c("green","orange"), bty="o", horiz=FALSE)

#text(locator(1), "n=33297 osservazioni")

hist(Fold_change_annot$fold_change_gamma_025Gy_6h, breaks=c, ylim=c(0,5500),
xlim=c(-3,3),xlab="fold change_gamma 0,25Gy_6h", main="Histogram of Fold change",
las=1, col="yellow")

abline(v = mean2, col = "blue", lwd = 2)

text(-1.5, 4000, paste("Mean =", round(mean2, 6), "\n Var =", round(var2, 6)))

hist(Fold_change_annot$fold_change_gamma_2Gy_6h, breaks=c, ylim=c(0,5500),
xlim=c(-3,3),xlab="fold change_gamma 2Gy_6h", main="Histogram of Fold change",
las=1, col="red")#, add=T)

abline(v = mean3, col = "blue", lwd = 2)

text(-1.5, 4000, paste("Mean =", round(mean3, 6), "\n Var =", round(var3, 6)))

#legend("topright",inset=.05,lty=1,c("fold change_gamma 0,25Gy_6h","fold
change_gamma 2Gy_6h"), col=c("yellow","red"), bty="o", horiz=FALSE)

#text(locator(1), "n=33297 osservazioni")

#length(Fold_change_annot$fold_change_prot_025Gy_24h)

```

```

hist(Fold_change_annot$fold_change_prot_025Gy_24h, breaks=c, ylim=c(0,5500),
xlim=c(-3,3),xlab="fold change_prot 0,25Gy_24h", main="Histogram of Fold change",
las=1, col="orange")

abline(v = mean4, col = "blue", lwd = 2)

text(-1.5, 4000, paste("Mean =", round(mean4, 6), "\n Var =", round(var4, 6)))

hist(Fold_change_annot$fold_change_prot_2Gy_24h, breaks=c, ylim=c(0,5500), xlim=c(-
3,3),xlab="fold change_prot 2Gy_24h", main="Histogram of Fold change", las=1,
col="green")#, add=T)

abline(v = mean5, col = "blue", lwd = 2)

text(-1.5, 4000, paste("Mean =", round(mean5, 6), "\n Var =", round(var5, 6)))

#legend("topright",inset=.05,lty=1,c("fold change_prot 0,25Gy_24h","fold change_prot
2Gy_24h"), col=c("orange","green"), bty="o", horiz=FALSE)

#text(locator(1), "n=33297 osservazioni")

hist(Fold_change_annot$fold_change_gamma_025Gy_24h, breaks=c, ylim=c(0,5500),
xlim=c(-3,3),xlab="fold change_gamma 0,25Gy_24h", main="Histogram of Fold change",
las=1, col="yellow")

abline(v = mean6, col = "blue", lwd = 2)

text(-1.5, 4000, paste("Mean =", round(mean6, 6), "\n Var =", round(var6, 6)))

hist(Fold_change_annot$fold_change_gamma_2Gy_24h, breaks=c, ylim=c(0,5500),
xlim=c(-3,3),xlab="fold change_gamma 2Gy_24h", main="Histogram of Fold change",
las=1, col="red")#, add=T)

abline(v = mean7, col = "blue", lwd = 2)

text(-1.5, 4000, paste("Mean =", round(mean7, 6), "\n Var =", round(var7, 6)))

#legend("topright",inset=.05,lty=1,c("fold change_gamma 0,25Gy_24h","fold
change_gamma 2Gy_24h"), col=c("yellow","red"), bty="o", horiz=FALSE)

#text(locator(1), "n=33297 osservazioni")

par(mfrow=c(1,2))

hist(Fold_change_annot$fold_change_controllo_prot, breaks=c, ylim=c(0,5500), xlim=c(-
3,3),xlab="fold change_controllo_prot", main="Histogram of Fold change", las=1,
col="yellow")

abline(v = mean8, col = "blue", lwd = 2)

text(-1.5, 4000, paste("Mean =", round(mean8, 6), "\n Var =", round(var8, 6)))

```

```
hist(Fold_change_annot$fold_change_controllo_gamma, breaks=c, ylim=c(0,5500),
xlim=c(-3,3),xlab="fold change_controllo_gamma", main="Histogram of Fold change",
las=1, col="red")#, add=T)

abline(v = mean9, col = "blue", lwd = 2)

text(-1.5, 4000, paste("Mean =", round(mean9, 6), "\n Var =", round(var9, 6)))
```

APPENDICE C

```
Carico le librerie necessarie

library(Biobase)

library (annotate)

library(hugene10sttranscriptcluster.db)

# Lettura dati e creazione dell'espression-set che lega la matrice dei valori di espressione
#al design sperimentale

data<-read.table("C:/Users/Samanta/Desktop/Rtxt/AllData_IR_excalibur_ord.txt",
header = TRUE, sep = "")

basedir <- "C:/Users/Samanta/Desktop/FileR/CEL"

tab<- read.delim (file.path (basedir, "T98_SampINFO.csv"),header=T,sep=" ",
check.names = FALSE, as.is=TRUE)

all(rownames(tab)==colnames(data))

data<-as.matrix(data)

z <- ExpressionSet(data, AnnotatedDataFrame(tab))

# Apertura del database di annotazione e creazione del feature-data

annotation(z)<-"hugene10sttranscriptcluster.db"

ID<-featureNames(z)

Symbol <- getSYMBOL(ID,"hugene10sttranscriptcluster.db")

Path<-as.character(lookUp(ID, "hugene10sttranscriptcluster.db", "PATH"))

fData(z) <- data.frame(Symbol=Symbol,Name=Name,Entrez=Entrez,Path=Path)

#BOXPLOT

library(rafalib)

mypar()

boxplot(exprs(z),range=0,las=2, names=z$sample,lab.col=as.fumeric(z$TIME), col =
c("grey","grey","grey", "red","red","red", "green","green","green" ), at
=c(1,2,3,4,5,6,7,8,9, 11,12,13,14,15,16,17,18,19, 21,22,23,24,25,26,27,28,29,
31,32,33,34,35,36,37,38,39),main="T98g Excalibur")

Carico il work-space con i dati costituiti dall' expression-set annotato.

load("C:/User/Samanta/Desktop/FileR/z_ok.RData")
```

```

pData(z)

#Compute Tukey Honest Significant Differences

#Selezione dati:mRNA estratto a 6h

selSamples<-(z$TIME == "6")

seih<-z[,selSamples]

pData(seih)

#Fattorizzazione delle variabili per modello lineare:

  IR = tipo di radiazione

  DOSE = dose

pdat<-pData(seih)

ir<-factor(pdat$IR)

dose<-factor(pdat$DOSE)

#Function che computa la Tukey post hoc comparison per il termine di interazione
#(IR:DOSE) dell'anova a 2 vie ed estrazione della matrice dei p value relativi a tutti i
#confronti possibili.

anovaINT<-function(x,ir,dose) TukeyHSD(aov(lm(x~ir*dose)), "ir:dose")[[1]][,4]

pvalsINT_Y<-apply((data=as.data.frame(exprs(seih))),1,anovaINT,ir=pdat$IR,
dose=pdat$DOSE)

#Selezione dei confronti di interesse sperimentale:

  GAMMA Gy025-Gy0

pvals_025_G<-pvalsINT_Y["Gamma:Gy025-Gamma:Gy0",]

#Ordinamento per p.value crescente

ord<-order(pvals_025_G, decreasing=F)

pvals_025_G.ord<-pvals_025_G[ord]

#Selezione dei primi 50 valori

pvals_025_G.ord<-pvals_025_G.ord[1:50]

#Selezione delle relative probes e dei relativi geni che le identificano

pvals_025_G.ord_exp<-seih[c(names(pvals_025_G.ord)),]

pvalsDOSE_025_G_Y_50<-fData(pvals_025_G.ord_exp)

pvalsDOSE_025_G_Y_50$p<-pvals_025_G.ord

```



```

# PROTONI Gy025-Gy0
pvals_025_P<-pvalsINT_Y["Protoni:Gy025-Protoni:Gy0",]
#Ordinamento per p.value crescente
ord<-order(pvals_025_P, decreasing=F)
pvals_025_P.ord<-pvals_025_P[ord]
#Selezione dei primi 50 valori
pvals_025_P.ord<-pvals_025_P.ord[1:50]
#Selezione dei relativi geni
pvals_025_P.ord_exp<-seih[c(names(pvals_025_P.ord)),]
pvalsDOSE_025_P_Y_50<-fData(pvals_025_P.ord_exp)
pvalsDOSE_025_P_Y_50$p<-pvals_025_P.ord

#GAMMA Gy2-Gy0
pvals_2_G<-pvalsINT_Y["Gamma:Gy2-Gamma:Gy0",]
#Ordinamento per p.value crescente
ord<-order(pvals_2_G, decreasing=F)
pvals_2_G.ord<-pvals_2_G[ord]
#Selezione dei primi 50 valori
pvals_2_G.ord<-pvals_2_G.ord[1:50]
#Selezione dei geni
pvals_2_G.ord_exp<-seih[c(names(pvals_2_G.ord)),]
pvals_2_G_Y_50<-fData(pvals_2_G.ord_exp)
pvals_2_G_Y_50$p<-pvals_2_G.ord

# PROTONI Gy2-Gy0
pvals_2_P<-pvalsINT_Y["Protoni:Gy2-Protoni:Gy0",]
#Ordinamento per p.value crescente
ord<-order(pvals_2_P, decreasing=F)
pvals_2_P.ord<-pvals_2_P[ord]
#Selezione dei primi 50 valori
pvals_2_P.ord<-pvals_2_P.ord[1:50]

```

```

#Selezione dei geni
pvals_2_P.ord_exp<-seih[c(names(pvals_2_P.ord)),]
pvals_2_P_Y_50<-fData(pvals_2_P.ord_exp)
pvals_2_P_Y_50$p<-pvals_2_P.ord

#Creazione della tabella con i risultati
result_tukey_6h<-data.frame()

result_tukey_6h<-cbind( pvalsDOSE_025_G_Y_50, pvals_2_G_Y_50,
pvalsDOSE_025_P_Y_50, pvals_2_P_Y_50)

colnames(result_tukey_6h)<-c("gamma_025_6h", "p","gamma_2_6h",
"p","Protoni_025_6h", "p","protoni_2_6h","p")

#Selezione dati: mRNA estratto a 24h
selSamples<-(z$TIME == "24")
v4h<-z[,selSamples]

#Fattorizzazione delle variabili per il modello lineare:
#IR = tipo di radiazione
#DOSE = dose

pdat<-pData(v4h)
ir<-factor(pdat$IR)
dose<-factor(pdat$DOSE)

#Function che computa la Tukey post hoc comparison per il termine di interazione
(IR:DOSE) dell'anova a 2 vie ed estrazione della matrice dei p value relativi a tutti i
confronti possibili.

anovaINT<-function(x,ir,dose) TukeyHSD(aov(lm(x~ir*dose)),"ir:dose")[[1]][,4]

pvalsINT_Y<-apply((data=as.data.frame(exprs(v4h))),1,anovaINT,ir=pdat$IR,
dose=pdat$DOSE)

#Selezione dei confronti di interesse sperimentale:

# GAMMA Gy025-Gy0
pvals_025_G<-pvalsINT_Y["Gamma:Gy025-Gamma:Gy0",]

#Ordinamento per p.value crescente
ord<-order(pvals_025_G, decreasing=F)
pvals_025_G.ord<-pvals_025_G[ord]

```

```

#Selezione dei primi 50 valori
pvals_025_G.ord<-pvals_025_G.ord[1:50]

#Identificazione dei geni
pvals_025_G.ord_exp<-v4h[c(names(pvals_025_G.ord)),]
pvalsDOSE_025_G_Y_50<-fData(pvals_025_G.ord_exp)
pvalsDOSE_025_G_Y_50$p<-pvals_025_G.ord

# PROTONI Gy025-Gy0
pvals_025_P<-pvalsINT_Y["Protoni:Gy025-Protoni:Gy0",]

#Ordinamento per p.value crescente
ord<-order(pvals_025_P, decreasing=F)
pvals_025_P.ord<-pvals_025_P[ord]

#Selezione dei primi 50 valori
pvals_025_P.ord<-pvals_025_P.ord[1:50]

#Identificazione dei geni
pvals_025_P.ord_exp<-v4h[c(names(pvals_025_P.ord)),]
pvalsDOSE_025_P_Y_50<-fData(pvals_025_P.ord_exp)
pvalsDOSE_025_P_Y_50$p<-pvals_025_P.ord

# GAMMA Gy2-Gy0
pvals_2_G<-pvalsINT_Y["Gamma:Gy2-Gamma:Gy0",]

#Ordinamento per p.value crescente
ord<-order(pvals_2_G, decreasing=F)
pvals_2_G.ord<-pvals_2_G[ord]

#Selezione dei primi 50 valori
pvals_2_G.ord<-pvals_2_G.ord[1:50]

#Identificazione dei geni
pvals_2_G.ord_exp<-v4h[c(names(pvals_2_G.ord)),]
pvals_2_G_Y_50<-fData(pvals_2_G.ord_exp)
pvals_2_G_Y_50$p<-pvals_2_G.ord

# PROTONI Gy2-Gy0

```

```

pvals_2_P<-pvalsINT_Y["Protoni:Gy2-Protoni:Gy0",]
#Ordinamento per p.value crescente
ord<-order(pvals_2_P, decreasing=F)
pvals_2_P.ord<-pvals_2_P[ord]
#Selezione dei primi 50 valori
pvals_2_P.ord<-pvals_2_P.ord[1:50]
#Identificazione dei geni
pvals_2_P.ord_exp<-v4h[c(names(pvals_2_P.ord)),]
pvals_2_P_Y_50<-fData(pvals_2_P.ord_exp)
pvals_2_P_Y_50$p<-pvals_2_P.ord
#Creazione della tabella con i risultati
result_tukey_24h<-data.frame()
result_tukey_24h<-
cbind(pvalsDOSE_025_G_Y_50,pvals_2_G_Y_50,pvalsDOSE_025_P_Y_50,pvals_2_P_Y_5
0)
colnames(result_tukey_24h)<-
c("Probe","gamma_025_24h","p","Probe","gamma_2_24h","p","Probe","Protoni_025_2
4h","p","Probe","protoni_2_24h","p")
#creo una tabella unica per 6h e 24h
result_tukey_tot<-data.frame()
result_tukey_tot<-cbind(result_tukey_6h,result_tukey_24h)
#Salvo la tabella in un file di testo
write.table(result_tukey_tot,file="C:/Users/Samanta/Desktop/Rtxt/anova/result_tukey_
tot.txt")

```

BIBLIOGRAFIA

1. **TY, H. Abe and Norimura, T.** Accurate measurement of doses in the sample chamber of a ¹³⁷Cs gamma-ray irradiation apparatus. *J UOEH*. 1999.
2. **LH, P. Bogner, et al.** Dosimetry of a blood irradiator. *Strahlenther Onkol Journal*. 1998.
3. **J. Chapman, R. D. Finney.** Guidelines on gamma irradiation of blood components for the prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease. *Transfusion Medicine*. 1996.
4. http://www.mi.infn.it/~bracco/pdf-Istituzioni/macchine_acceler.pdf. [Online]
5. http://www.ips.it/scuola/concorso_99/ipercern/acceleratori/vandegraaff.htm. [Online]
6. <http://www.lnl.infn.it/index.php/en/accelerators-3/cn>. [Online]
7. Unibo.it. [Online]
http://montecuccolino.dienca.unibo.it/index.php?option=com_content&view=article&id=30&Itemid=52.
8. **E. Angeli, C. Bonifazzi, a. Da re, M. Marziani, A. Tartari, M. Frignani, S. Mannucci, D. Mostacci, F. Rocchi, Sumini M.** Development of diagnostic tools for plasma focus derived x ray source. *Nukleonika*. 2006, Vol. LI.
9. **Podgorsak, Ervin B.** *Radiation physics for medical physicists*. s.l. : Springer, 2010.
10. **Marengo, Mario.** *La fisica in medicina nucleare*. Bologna : Patron Editore, 2001.
11. **Coggle, J. E.** *Effetti biologici delle radiazioni*. Torino : Edizione Minerva Medica, 1998.
12. Treccani.it. [Online] <http://www.treccani.it/enciclopedia/radiazione/>.
13. <http://www.r-project.org/>. [Online]
14. **M. Castro, J. Rybarczyk, R. de Almeida.** ViaComplex V.1.0: Software for Landscape Analysis of Genome; Reference Manual.
15. http://www.microarrays.ca/services/exon_array_design_technote.pdf. [Online]
16. *Fold change rank ordering statistics: a new method for detecting differentially expressed genes*. Doulaye Dembélé, Philippe Kastner. 2014.
17. **Draghici, Sorin.** Statistical intelligence: effective analysis of high-density microarray data. *Drug Discovery Today*. 2002, Vol. VII.
18. **Zani, S.** *Analisi dei dati statistici, vol. I*. Milano : Giuffrè editore, 1994.
19. **G. Keppel, T.D. Wickens.** *Design and analysis: A researchers handbook (4rd Edition)*. Upper Saddle River : NJ: Pearson. , 2004.

20. A. J. Klockars, G.R. Hancock, M.J. McAweenwy. Power of unweighted and weighted versions of simultaneous and sequential multiple-comparison procedures. *Psychological Bulletin*. 1995, 118.
21. T. Brailsford Robertson, L. A. Ray. Experimental studies on growth: on the growth of animals relatively long. *The Journal of Biological Chemistry*. 1920.
22. *Wikipedia*. [Online] [Cited: 06 2014, 12.] <http://en.wikipedia.org/wiki/MCF-7>.
23. Baumjohann, W. and Treumann, R. A. *Basic space plasma physics*. Londra : Imperial College Press, 1996.
24. A. Dinklage, T. Klinger, G. Marx, L. Schweikhard. *Plasma Physics: Confinement, Transport and Collective effect* . Berlino : Springer, 2005.
25. Wiedemann, H. *Particle accelerator physics*. s.l. : Springer-Verlag, 1993.
26. Wangler, T. P. *RF Linear Accelerator*. New York : John Wiley & sons, 1998.