

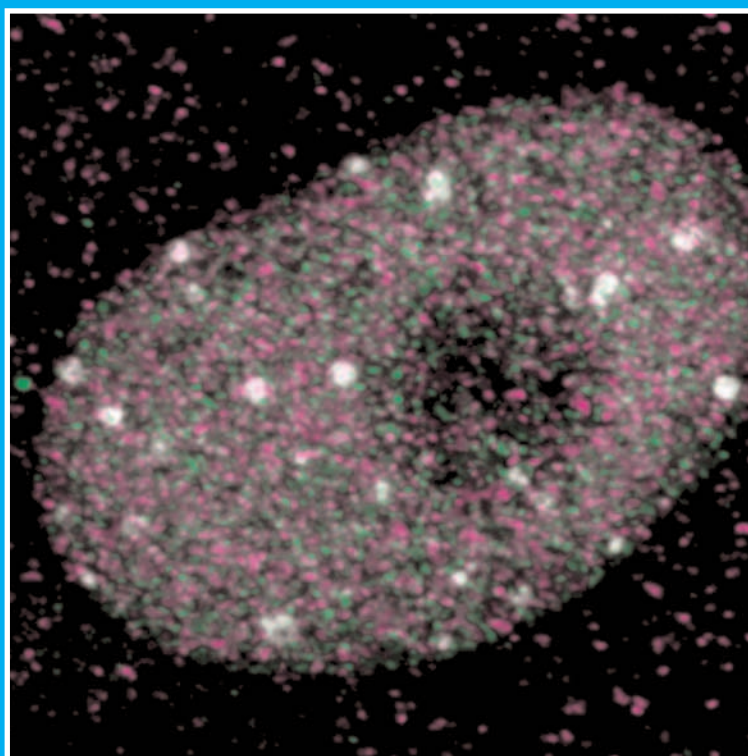
Radiazioni

Ricerca e Applicazioni

**INTRODUZIONE ALLA LUMINESCENZA
DISPUTE SCIENTIFICHE E CRONACHE
POPOLARI LEGATE AL FOSFORO DI
BOLOGNA**

**RECENTI APPLICAZIONI DELLA
LUMINESCENZA IN CAMPO BIOMEDICO,
AMBIENTALE E TOSSICOLOGICO**

*Il Riunione Nazionale della
Societa' Italiana per le Ricerche sulle Radiazioni
I Convegno Nazionale della
Federazione Italiana per le Ricerche sulle Radiazioni
Radiazioni in Medicina e Biologia:
stato delle ricerche ed applicazioni cliniche
Legnaro-Padova, 20-22 novembre 2003*



SOMMARIO

BOLLETTINO SIRR
Società Italiana per le Ricerche
sulle Radiazioni

Publicazione Periodica Quadrime-
strale
Aprile 2003 - Vol. V1 n. 1

Direttore Responsabile
Gianfranco Grossi
grossi@na.infn.it

Responsabile Editoriale
Raffaele De Vita
devita@casaccia.enea.it

Capo Redattore
Francesca Ballarini
francesca.ballarini@mi.infn.it

Comitato di Redazione
Mauro Bonardi
mauro.bonardi@mi.infn.it
Renzo Corvò
corvo@istige.it
Martino Grandolfo
martino@iss.it
Lorenzo Manti
lorenzo.manti@na.infn.it
Matteo Merzagora
merzagora@libero.it

Per Informazioni e Corrispondenza
Francesca Ballarini
Tel. 02 50317399
Tel. 0382 507906
Fax 02 50317630
e-mail: francesca.ballarini@mi.infn.it

Registrazione del Tribunale di Roma
n. 406 del 6 Agosto 1998

Grafica: Renato Cafieri

Stampa: Tipolitografia SEA srl
Zona Ind. Settevene Nepi (VT)
Tel. 0761527323

Pubblicità: Tipolitografia SEA

INTRODUZIONE ALLA LUMINESCENZA

Margherita Venturi

pag. **3**

DISPUTE SCIENTIFICHE E CRONACHE POPOLARI LEGATE AL FOSFORO DI BOLOGNA

Marco Taddia

4

RECENTI APPLICAZIONI DELLA LUMINESCENZA IN CAMPO BIOMEDICO, AMBIENTALE E TOSSICOLOGICO

Aldo Roda

6

FOCUS ON MICROSCOPY 13-16 APRILE 2003 - GENOVA, PALAZZO DUCALE

Mario Faretta

10

EDITORIALE

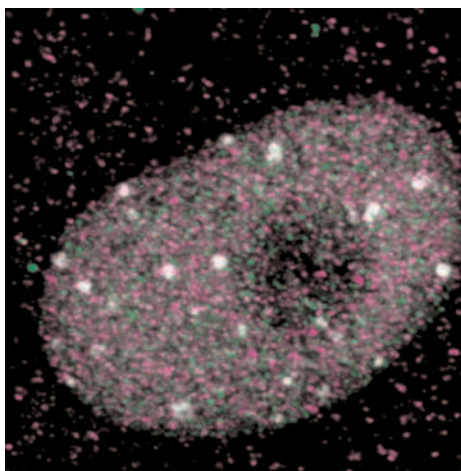
Gianfranco Grossi

12

12TH L.H. GRAY WORKSHOP 6TH INTERNATIONAL WORKSHOP Microbeam Probes of Cellular Radiation Response, Oxford, March 29-31, 2003

Dieter Frankenberg

13



In copertina:
Nucleo di fibroblasto umano
marcato con anticorpi specifici
per PML (anticorpo monoclonale
pgm3; fluorocromo cy5, bianco),
p53 (anticorpo policlonale fl393;
fluorocromo alexa 488, verde) e
sirt1 (anticorpo policlonale non
commerciale; fluorocromo alexa
568, violetto).
L'immagine, acquisita da un
microscopio confocale, è stata
fornita dal Dr. M. Faretta (Istituto
Europeo di Oncologia, Diparti-
mento di Oncologia Sperimentale,
Flow Cytometry and Imaging
Core)

INTRODUZIONE ALLA LUMINESCENZA

Margherita Venturi

Dipartimento di Chimica "G. Ciamician"
Università di Bologna
mventuri@ciamserv.ciam.unibo.it

Nel 1603 Vincenzo Casciarolo, di professione calzolaio ed alchimista dilettante, scopriva nei dintorni di Bologna la "pietra bolognese". Questa pietra divenne il primo oggetto di studio sul fenomeno della luminescenza aprendo una delle pagine più interessanti della storia della Chimica.

Nonostante siano trascorsi quattro secoli da allora, l'entusiasmo e la curiosità sorti intorno alle "misteriose" proprietà di una pietra in grado di imprigionare e liberare la luce del sole non sono mai tramontati. I fenomeni legati all'assorbimento e all'emissione di luce sono ormai patrimonio della conoscenza scientifica, ma non hanno perso il fascino che fin dal principio li ha accompagnati.

La luminescenza trova oggi vasto impiego nei più avanzati settori della ricerca scientifica e nello sviluppo di nuovi materiali ad altissimo contenuto tecnologico. L'accoppiamento di componenti ottici ed elettronici miniaturizzati ha portato alla produzione di microchip in grado di integrare un gran numero di funzioni e di display attivi con proprietà uniche. La luce è inoltre il segnale più efficace per comunicare con le singole molecole; permette, infatti, di interrogarle e di modificarle fino a farle operare come veri e propri dispositivi di dimensioni nanometriche ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$).

Sull'argomento presso il Dipartimento di Chimica "G. Ciamician" dell'Università di Bologna si è svolto il 25 marzo 2003 il Convegno "Luminescenza: dalla scoperta della pietra di Bologna alle più recenti applicazioni". In questo numero del Bollettino viene riportato un breve riassunto delle relazioni che Marco Taddia e Aldo Roda hanno tenuto nell'ambito del suddetto Convegno; spero che molti di voi siano incuriositi e stimolati a leggere di più su questa branca della Chimica che promette molto per il futuro, non solo dal punto di vista della ricerca di base, ma anche e soprattutto per le sue applicazioni nei più svariati

campi, incluso quello della biologia e della medicina.

Gli Atti del Convegno verranno pubblicati sulla rivista La Chimica e Industria, con molta probabilità nel numero di settembre; tale rivista è consultabile on-line alla seguente pagina web:

http://www.ilb2b.it/chim_indus/home.asp?session=0&ricerca=8, da cui è possibile scaricare gratuitamente gli articoli di interesse.



DISPUTE SCIENTIFICHE E CRONACHE POPOLARI LEGATE AL FOSFORO DI BOLOGNA

Marco Taddia

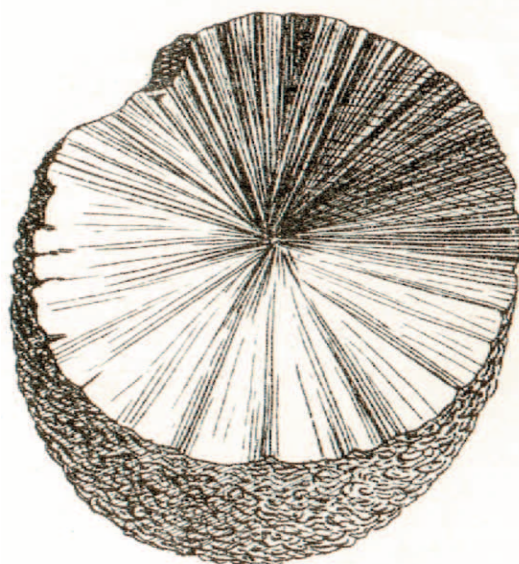
Dipartimento di Chimica "G. Ciamician"
Università di Bologna

Per circa tre secoli, dai primi del '600 all'inizio del '900, la città di Bologna deve il suo posto nella storia della chimica soprattutto ad una pietra, che da essa prese il nome, utilizzata per ricavarne fosfori, ossia materiali capaci di dare fosforescenza. Eppure, specialmente dal 12 dicembre 1711, quando fu fondato l'Istituto delle Scienze ad opera di Luigi Ferdinando Marsigli, al tempo del governo napoleonico che lo soppresse, non mancano motivi d'interesse verso la chimica bolognese. Basti ricordare, ad esempio, l'allestimento di una "camera" della chimica nell'Istituto suddetto, i contributi di Laurenti, Menghini, Valsalva, Vandelli e, soprattutto, quello di Jacopo Bartolomeo Beccari (1682-1766) medico, anatomico e chimico. Beccari, professore di fisica dal 4 dicembre 1711, passò alla cattedra di chimica, istituita per la facoltà medica con decreto del 16 novembre 1737, dando avvio, primo in Italia, all'insegnamento universitario della chimica, corredato di parte sperimentale. Evidentemente, il pur celebre contributo di Beccari alla scoperta del glutine e altri suoi studi in vari campi, incluso quello dei fosfori, con l'ausilio di dispositivi sperimentali originali, non ebbero risonanza europea pari a quella della Pietra di Bologna. La Pietra colpì innanzitutto la curiosità e l'immaginario popolare, attirò verso la città l'interesse dei viaggiatori, ispirò testi letterari, suggerì teorie più o meno fantasiose e alimentò numerose dispute scientifiche.

La data della scoperta delle singolari proprietà della Pietra di Bologna non è nota con esattezza. Tuttavia, secondo gli storici, si colloca fra il 1602 e il 1604. Essa viene generalmente attribuita a Vincenzo Casciarolo (o Casciorolo), un calzolaio bolognese che, secondo Camillo Galvani (1780), "si diletta di travagliare nelle cose chimiche" e, passeggiando presso Paderno "per divertirsi da qualche sua naturale malinconia", vide scintillare una pietra, la raccolse, la portò a casa, la fece cuo-

cere e scoprì, forse casualmente, che mettendola al buio dopo averla esposta al sole, riluceva. La pietra, cui furono attribuiti vari nomi (pietra fosforica bolognese, pietra di Bologna, pietra luciferina, pietra di luna, spongia lucis, lapis illuminabilis, lapis lucifer, phosphorus ecc..) è una varietà di baritina (solfato di bario anidro), raggiata e nodulare, che una volta macinata, impastata con bianco d'uovo o altri leganti e calcinata su carbone, si trasforma in solfuro di bario. La sottostante figura, riprodotta da un testo di Luigi Bombicci (*Corso di Mineralogia*, G. Monti, Bologna, 1862), un autore che amava disegnare dal vero, ne fornisce un esempio che trova riscontro nei pregevoli esemplari conservati presso il museo a lui intitolato.

La prima citazione delle proprietà della pietra di Bologna è dovuta a Giulio Cesare La Galla (1612), mentre la prima descrizione dettagliata della preparazione di materiale fosforescente a partire da essa è di Pietro Poterio (*Pharmacopea Spagyryca*, Iacobi Montis, Bologna, 1622).



Secondo Poterio, colui che per primo rese luminosa la pietra nell'intento di ricavarne oro, fu un noto alchimista di Bologna, Scipio Bagatello. Il nome di Casciarolo non compare nel lavoro di Poterio. L'attribuzione della scoperta al "chimico" Casciarolo è di Majolino Bisaccione (1582-1663) e Ovidio Montalbani (1602-1671), in due lettere pubblicate nel 1634. Quest'ultimo, addirittura, propose di chiamare la pietra "lapis casciarolanus". Il riconoscimento pieno a Casciarolo venne da Fortunio Liceti (o Licetus) (1577-1657), nell'opera *Litheosforus sive de Lapide Bononiensis*, pubblicata a Udine nel 1640. Secondo Liceti, fu appunto Casciarolo, uomo di umili condizioni, che trovò la pietra, ne scoprì le proprietà e la mostrò a Bagatelli. Questi ne parlò a Magini, professore di matematica a Bologna, il quale ne mandò campioni a vari scienziati, tra cui Galileo Galilei, e ad alcuni sovrani europei. Tutto ciò rese rapidamente famosa la pietra, indusse a riprodurre il procedimento di preparazione dei fosfori ed ad interpretarne il comportamento. Nacquero le ipotesi più disparate. Per un certo periodo, da parte di alcuni (Niccolò Cabeo, Athanasius Kircher), si pensò che la pietra si comportasse con la luce così come un magnete si comporta con il ferro. Anche Galileo intervenne nella disputa, seppure di sfuggita, con una lettera a Leopoldo di Toscana, scritta per confutare alcune osservazioni di Liceti sulle opinioni dello stesso Galileo in merito al "candor lunare". La scoperta di un residuo luminoso nella distillazione delle urine calcinate su carbone (il fosforo elementare), avvenuta ad opera di Brand nel 1669, ravvivò ulteriormente la discussione sulle proprietà dei fosfori naturali ed artificiali e vi partecipò anche Robert Boyle. Nel '700, il sistema newtoniano influenzò anche le teorie sulla pietra. I bolognesi contribuirono alla discussione ed un gruppo di membri dell'Accademia (Beccari, Galeazzi e Laurenti) fece numerosi esperimenti in proposito. I Commentari, una sorta di diario scientifico del segretario Francesco Maria Zanotti (*De Bononiensis scientiarum et Artium Instituto atque Accademiae. Commentarii*), registrarono i risultati, compresi quelli dello stesso Zanotti, riportando altresì anche due studi di Beccari sui fosfori, di carattere più generale. Marsigli dedicò all'argomento un'apposita dissertazione e l'Accademia delle Scienze di Parigi non fu da meno, come risulta dai *Mémoires* di Homberg e Du Fay. Fra i trattati di chimica, il celebre *Cours de Chymie* di N. Lémery (1645-1715) è

forse quello che si occupa più diffusamente della Pietra di Bologna, anche dal punto di vista sperimentale e con il supporto di una bella tavola esplicativa. Quest'opera ebbe numerose riedizioni e traduzioni. L'ultima edizione, pubblicata in italiano nel 1719 da Gabriele Hertz, racconta la storia della Pietra, spiega come trovarla, ne cita le proprietà depilatorie, descrive minuziosamente il procedimento per farne fosforo e propone una teoria per spiegarne la luminosità. Certo, Lémery non è indulgente con i predecessori; egli afferma che "*Poterius, Montalbanus, Maginus, Licetus, Menzelus*, ed alcuni altri hanno scritto di questa pietra, ed hanno date le maniere di calcinarla; Ma le loro descrizioni non servono a nulla, perché, seguitandole, non s'ottiene alcun fine". Il secondo tomo del *Dictionnaire de Chimie* di Macquer, pubblicato a Parigi da Lacombe nel 1769, dedica alcune pagine a quello che è ritenuto il fosforo pietroso più celebre, la *Pierre de Boulogne* interpretandone il comportamento con il ricorso al flogisto. Ciò rifletteva lo sforzo del chimico tedesco S. Maargraf, convinto sostenitore della teoria di Stahl. Superata questa teoria, la *Pierre de Boulogne*, continuò a trovar posto anche nei testi didattici francesi. Un esempio è il *Cours de physique expérimentale et de chimie; a l'usage des Ecoles centrales, spécialement de l'Ecole centrale de la Côte d'Or*, pubblicato a Digione e a Parigi all'inizio del 1801, che riporta il procedimento per ottenere i piccoli gateaux fosforescenti.

Gli studi sulla Pietra di Bologna, come documentato dalla letteratura chimica, si protrassero fino al 1940 circa, ma il procedimento e le condizioni che assicurano la piena riuscita della preparazione presentano tuttora qualche incognita. D'altronde, meraviglia e mistero accompagnano da sempre la strana luce della pietra. Anche Goethe ne rimase influenzato e, quando passò da Bologna, se ne procurò alcuni esemplari, citando poi la Pietra anche nel *Werther*. Nel clima di curiosità e di diletto che a livello popolare incoraggiava il lavoro degli studiosi sui "mirabilia minerali e naturali", ben si comprendono le burle che la pietra ispirava e i piccoli commerci di questa autentica rarità.

Si può allora concludere che passeggiando sui calanchi di Paderno per scacciare la "naturale malinconia", il calzolaio Vincenzo Casciarolo raggiunse l'intento anche a vantaggio di molti altri tra i quali, forse, potremmo includere anche noi.

RECENTI APPLICAZIONI DELLA LUMINESCENZA IN CAMPO BIOMEDICO, AMBIENTALE E TOSSICOLOGICO

Aldo Roda

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche
Università di Bologna

e-mail: roda@alma.unibo.it ; web: www.unibo.it/anchem

Introduzione

Luminescenza è il termine generico che definisce l'emissione di luce da parte di molecole senza specificare la causa che la ha originata; la forma più nota di luminescenza è quella conseguente all'assorbimento di luce (fotoluminescenza), della quale la fluorescenza è l'esempio più comune.

Meno conosciuta è la "chemiluminescenza" che rappresenta la luminescenza derivante da un processo chimico esoergonico che porta ad un prodotto in uno stato elettronicamente eccitato, il quale decade allo stato fondamentale emettendo fotoni. All'interno della chemiluminescenza, la "bioluminescenza" è sempre causata da un processo chimico ma avviene in organismi viventi ed è catalizzata da enzimi.

Dal punto di vista chimico-analitico la luminescenza rappresenta uno strumento fondamentale e molto versatile per lo sviluppo di metodologie analitiche sensibili e specifiche, con ampie applicazioni in biomedicina, biotecnologia, biologia molecolare, farmacologia e in chimica ambientale e agroalimentare. I radioisotopi, quali ^3H e ^{125}I , largamente utilizzati per oltre 30 anni in chimica clinica per la marcatura e preparazione di traccianti, sono stati ormai quasi completamente rimpiazzati da sistemi basati su principi di luminescenza.

Fotoluminescenza

Storicamente la fotoluminescenza, ed in particolare la fluorescenza, ha rappresentato il primo esempio di metodologia analitica con elevata rivelabilità. Molti fluorofori sono stati sviluppati ed applicati; basta ricordare il vasto utilizzo della fluorescina e di suoi analoghi in campo immuno-

stochimico e come tracciante ed il suo ruolo trainante per la ricerca di traccianti sempre più efficienti e selettivi.

Sono ormai disponibili nella routine bioanalitica sistemi su chip microarray per analisi di screening ad elevata produttività analitica in biologia molecolare e genetica. L'accoppiamento della specificità della reazione di ibridazione degli acidi nucleici con l'uso di "probe" fluorescenti con emissione a diverse λ , e quindi con diversi colori, ha permesso di sviluppare microarray di piccole dimensioni basati su una serie di sonde geniche immobilizzate e su imaging del segnale fluorescente mediante CCD.

Un altro, e forse più importante, avanzamento tecnologico della fluorescenza è stata la scoperta e la definizione del meccanismo della fluorescenza di proteine, ed in particolare della "green fluorescent protein" (GFP) estratta dalla medusa *Aequorea victoria*. Oggi si conosce tutto sulla GFP, dalla sua struttura al sito attivo, e questa proteina è stata clonata ed utilizzata in moltissimi settori della biochimica. E' ad esempio possibile, mediante ingegneria genetica, accoppiare il gene della GFP ad altri geni che codificano la produzione di proteine organo - o organello - specifiche: in parole semplici è possibile rendere fluorescenti specifici elementi sub-cellulari permettendo lo sviluppo di affascinanti tecniche istochimiche fluorescenti per lo studio dell'architettura cellulare.

Sono state inoltre ottenute forme mutanti della GFP che emettono luce ad altre lunghezze d'onda (nel verde, giallo, rosso) permettendo lo sviluppo di metodi per lo studio di più funzioni o analiti simultaneamente.

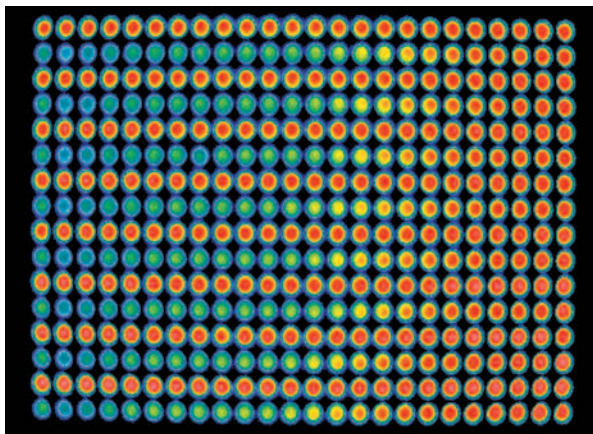
La principale limitazione per lo sviluppo di

metodi fotoluminescenti ultrasensibili è legata al fatto che la fotoeccitazione non è selettiva: molte altre molecole presenti nel campione o matrice biologica vengono anch'esse eccitate, dando luogo a processi di autofluorescenza con conseguente drastica riduzione del segnale analitico "pulito". Sono stati effettuati numerosi tentativi per aumentare la selettività del segnale fluorescente, sviluppando per esempio traccianti con un elevato assorbimento molare, caratterizzati da un elevato spostamento di Stokes e con emissione nel rosso, zona spettrale dove poche molecole organiche naturali emettono. Tra queste, le più studiate sono le porfirine e le ficobiliproteine: per esempio la ficoeritrina presenta un ϵ molare di $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Tuttavia, la sovrapposizione delle bande degli spettri di eccitazione ed emissione non permette di ottenere la selettività necessaria per abbassare i limiti di rivelazione a valori di 10^{-15} - 10^{-18} moli, idonei per la determinazione di molecole di interesse diagnostico o presenti in tracce, quali inquinanti ambientali, farmaci, ecc.

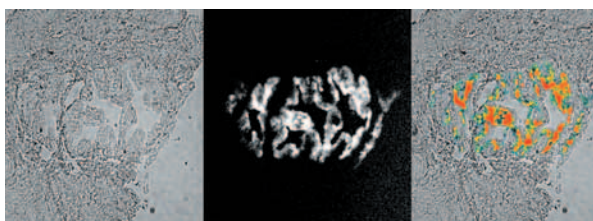
Le migliori prestazioni analitiche in termini di rivelabilità derivano da una originale e interessante proprietà fotofisica di alcuni complessi di metalli di transizione, quali i lantanidi, utilizzati

come traccianti per metodi biospecifici di tipo immunologico o genico. La sorprendente peculiarità di questi chelati è la loro capacità di assorbire flash di luce della durata di $\sim 10^{-6}$ sec e di trasferire l'energia assorbita al metallo, che la riemette in un tempo molto più lungo ($\sim 10^{-6}$ - 10^{-3} sec) rispetto alla fluorescenza delle comuni molecole organiche ($\sim 10^{-9}$ sec). La misura dell'emissione con un ritardo rispetto all'eccitazione permette di rilevare solo la fluorescenza derivante dal tracciante eliminando quella di fondo, con conseguente aumentata selettività rispetto ad una misura in fotoeccitazione costante. Tale tecnica, definita di fluorescenza risolta nel tempo, ha avuto e continua ad avere notevoli applicazioni nell'ambito della bioanalitica ed ha permesso lo sviluppo di metodi immunologici con limiti di rivelazione di 10^{-15} - 10^{-18} moli, superando le prestazioni di radio-traccianti quali ^3H o ^{125}I .

Va ricordata inoltre una interessante applicazione della fluorescenza riguardante lo sviluppo di metodi immunologici basati su misure di fluorescenza polarizzata. È noto che una luce polarizzata eccita solo quelle molecole che hanno i loro oscillatori paralleli al piano della luce eccitatrice. Il grado di polarizzazione della risultante emissione dipende quindi dal tempo di emivita dello stato eccitato (τ) e dal movimento rotatorio della molecola. Una grossa molecola (anticorpo o recettore) ha un tempo di movimento di ~ 10 - 100 ns, mentre una piccola molecola (farmaco) di $\sim 0,1$ - 1 ns. Una piccola molecola marcata con fluorescina non sarà quindi in grado di mantenere polarizzata la luce emessa, mentre se essa è legata ad un anticorpo la sua fluorescenza sarà ancora parzialmente polarizzata; mediante tale principio è stato possibile mettere a punto una serie di metodi omogenei per la determinazione di farmaci, ormoni steroidei e droghe d'abuso. I metodi basati su misure di fluorescenza polarizzata sono tra i più diffusi a livello mondiale nei laboratori di chimica clinica.



Piastra microtiter osservata in chemiluminescenza in falsi colori. (Immagine fornita da Massimo Guardigli).



Localizzazione immunoistochimica dell'antigene specifico PSA in sezioni di prostata, ottenuta con tecniche di fluorescenza risolta nel tempo (TRF). Da sinistra: immagine in luce trasmessa, segnale TRF e loro sovrapposizioni. (Immagine fornita da Massimo Guardigli).

Bio e Chemiluminescenza

Come riportato precedentemente la misura della luce derivante da un processo chimico è potenzialmente di estremo interesse in chimica analitica. In appropriate condizioni sperimentali il segnale analitico, cioè l'emissione di fotoni, è strettamente legato alla concentrazione di analita nel campione, permettendo così lo sviluppo di metodi quantitativi precisi ed ultrasensibili. I

sistemi chemiluminescenti più interessanti sono quelli caratterizzati da una cinetica dell'emissione di tipo "steady-state", cioè con un segnale analitico stabile per alcuni minuti, che semplifica la strumentazione richiesta ed in genere tutte le fasi del processo analitico.

La bio-chemiluminescenza offre potenzialmente la strada più breve per ottenere una migliore rivelabilità rispetto ad altre tecniche fotoluminescenti. Il primo vantaggio riguarda il migliore rapporto segnale/rumore, in quanto l'emissione di fotoni deriva da un processo "buio" e l'unico tipo di rumore è quello strumentale. Al contrario, le tecniche fotoluminescenti presentano fenomeni di emissione aspecifica del campione e problemi strumentali legati a fenomeni di "drift" della sorgente e del rivelatore ed a fenomeni di scattering della luce. Un altro vantaggio della bio-chemiluminescenza è che l'emissione di fotoni deriva da un processo chimico altamente specifico ed è quindi meno influenzata dai costituenti della matrice.

Il processo di emissione bio-chemiluminescente è comunque meno intenso rispetto a quello fotoluminescente che è ovviamente funzione della potenza della sorgente di eccitazione; tuttavia, esso può essere amplificato chimicamente mediante reazioni consecutive e cicliche. Il segnale analitico presenta un ampio ambito di linearità, per almeno 5 decadi di concentrazione, e raggiunge il valore ottimale di steady-state in pochi secondi, rendendo la bio-chemiluminescenza una tecnica ideale per lo sviluppo di metodi rapidi e ultrasensibili.

L'accoppiamento di reazioni enzimatiche (chinasi o idrogenasi) che utilizzano ATP o NAD(P)/NAD(P)H come cofattore con sistemi bioluminescenti, quali la reazione luciferina/ATP/luciferasi o quella della luciferasi batterica NAD(P)-/NAD(P)H-dipendente, ha permesso di sviluppare metodi ultrasensibili per la determinazione di molti substrati, quali alcol, lattosio, acidi biliari, ecc. Anche il sistema chemiluminescente luminolo/H₂O₂/perossidasi è stato accoppiato a molte ossidasi che coinvolgono H₂O₂ quali la glucosio ossidasi, la colesterolo ossidasi o la colina ossidasi, per l'analisi di glucosio, colesterolo e fosfolipidi. Esiste inoltre una vastissima letteratura scientifica sull'accoppiamento di reazioni enzimatiche utilizzando enzimi coimmobilizzati e sistemi a flusso tipo FIA (Flow Injection Analysis) per la determinazione rapida, sensibile ed automatizzata sia di analiti

sia di attività enzimatiche in molti fluidi biologici e in matrici agro-alimentari. L'utilizzo di sistemi enzimatici accoppiati ha inoltre permesso di valutare la localizzazione di analiti ed enzimi in tessuti e cellule in modo estremamente più sensibile rispetto all'utilizzo di cromogeni o substrati fluorescenti.

La più importante applicazione dei metodi chemiluminescenti è lo sviluppo di metodi immunologici che utilizzano traccianti chemiluminescenti per la diretta marcatura di anticorpi o antigeni (analoghi del luminolo o N-sulfonil-acridinio-9-carbossiamidi), oppure traccianti enzimatici (perossidasi, fosfatasi alcalina, β -galattosidasi) e substrati chemiluminescenti. Il vantaggio dei marcatori enzimatici è che permettono l'amplificazione e stabilizzazione del segnale chemiluminescente. Molti dei kit e sistemi automatici di analisi presenti oggi nei laboratori di chimica clinica utilizzano questi sistemi al posto dei radioisotopi.

Mille molecole di fosfatasi alcalina rappresentano il record di rivelabilità dei metodi chemiluminescenti che sono ampiamente utilizzati anche nelle tecniche di ibridazione di acidi nucleici, eventualmente combinati con metodi immunologici. Una sonda DNA, marcata con digossigenina, può essere rivelata dopo sua ibridazione con un anticorpo anti-digossigenina marcato con un enzima ed un substrato chemiluminescente. Il segnale può essere ulteriormente amplificato mediante il sistema biotina-streptavidina, arrivando alla determinazione di pochi femtogrammi di DNA omologo.

I sistemi chemiluminescenti sono stati anche utilizzati per tecniche di immunistochemica (IHC) e di ibridazione in situ (ISH) per la localizzazione di antigeni specifici e acidi nucleici in singole cellule e in tessuti. Tali tecniche, rispetto a quelle che utilizzano la fluorescenza, presentano il vantaggio di fornire informazioni quantitative sulla distribuzione spaziale di patogeni, antigeni, ecc.

Biosensori cellulari e sistemi foto-bio-chemiluminescenti (sistemi FRET e BRET)

L'uso di geni reporter luminescenti rappresenta uno stimolante ed attuale capitolo della biologia cellulare e delle sue applicazioni analitiche. È stato possibile mediante ingegneria genetica ottenere batteri, lieviti o cellule di mammifero in grado di produrre fotoni in seguito all'interazione con l'analita. Il sistema consiste nell'inserimento

di un gene reporter, che codifica per una proteina luminescente (luciferasi da lucciola luc, batterica lux,...), sotto il controllo di una specifica sequenza, la quale induce l'espressione del gene reporter solo in presenza dell'analita. Questi biosensori sono stati applicati alla determinazione di metalli pesanti (tra i quali Hg, Cd, Cr, Pb) o tossici ambientali (quali modulatori endocrini, idrocarburi aromatici polialogenati, ecc). Oltre alla elevata rivelabilità, questi sistemi presentano il vantaggio di fornire direttamente informazioni sulla biodisponibilità dell'analita, quindi sull'effettiva tossicità del campione.

Sono stati inoltre sviluppati sistemi basati sul trasferimento non radiativo di energia da un donatore fluorescente (FRET, fluorescence resonance energy transfer) o bioluminescente (BRET, bioluminescent resonance energy transfer) ad un accettore. Questi sistemi sono particolarmente adatti per lo studio di interazioni molecolari a corto raggio (10-100 Å), quindi interazioni proteina-proteina, ligando-recettore, o studi di modificazione conformazionale di proteine ed enzimi. Poiché

l'efficienza del trasferimento di energia viene misurata come rapporto tra l'emissione dell'accettore e quella del donatore, questi metodi presentano, rispetto a quelli basati sulla semplice misura dell'intensità di segnali fluorescenti o bioluminescenti, il vantaggio di ridurre la variabilità dovuta a cambiamenti del numero di cellule e dei parametri sperimentali in genere. Inoltre, poiché non necessita di una eccitazione radiativa, la BRET presenta il vantaggio, rispetto alla FRET, di permettere la misura anche in cellule fotosensibili (ad esempio della retina) o che presentano elevata autofluorescenza. La FRET e, più recentemente, la BRET sono state estesamente applicate allo studio di interazioni proteiche, attivazione di recettori, screening di nuovi farmaci e studio dei processi di "signaling" intra- ed intercellulare.

Campbell AK (1988), *Chemiluminescence: Principles and Applications in Biology and Medicine*. VCH, Cambridge.

Garcia-Campana AM, Baeyens WRG (2001) (eds), *Chemiluminescence in analytical chemistry*. Marcel Dekker, New York, NY.

Van Dike K, Van Dike C, Woodfork K (2002) (eds), *Luminescence biotechnology: instruments and applications*. CRC Press, Boca Raton, FL

CONSIGLIO DIRETTIVO SIRR 2003-2004

Presidente

Giustina Simone

Laboratorio di Fisica - Istituto Superiore di Sanità
Viale Regina Elena 299 - 00161 Roma
Tel: +39 06 4990 2719 - Fax: +39 06 4938 7075
e-mail: giustina.simone@iss.it

Segretario - Tesoriere

Raffaele De Vita

Unità di Tossicologia e Scienze Biomediche - ENEA, Casaccia
Via Anguillarese, 301 - 00060 Roma
Tel: +39 06 3048 4671 - Fax: +39-06.30484891
e-mail: devita@casaccia.enea.it

Consiglieri

Armando Buttafava

Dipartimento di Chimica Generale - Università di Pavia
Viale Taramelli 12 - 27100 Pavia
Tel: +39 0382 507353 - Fax: +39 0382 258544
e-mail: armando.buttafava@unipv.it

Roberto Cherubini

Laboratori Nazionali di Legnaro - INFN
Via Romea 4 - 35020 Legnaro
Tel: +39 049 8069393 - Fax: +39 049 641925
e-mail: roberto.cherubini@lnl.infn.it

Renzo Corvò

Unità Operativa Oncologia Radioterapica
Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro
Largo Rossana Benzi 10 - 16132 Genova
Tel: +39 010 5600014 - Fax: +39 010 5600039
e-mail: corvo@istige.it

Laura Guidoni

Laboratorio di Fisica - Istituto Superiore di Sanità
Viale Regina Elena 299 - 00161 Roma
Tel: +39 06 4990 2804 - Fax: +39 06 4938 7075
e-mail: guidoni@iss.it

Andrea Ottolenghi

Dipartimento di Fisica Nucleare e Teorica - Università di Pavia
Via Bassi 6 - 27100 Pavia
Tel: +39 0382 507892 (02 50317655) - Fax: +39 02 50317 630
e-mail: Andrea.Ottolenghi@pv.infn.it

Simona Pazzaglia

Unità di Tossicologia e Scienze Biomediche - ENEA, Casaccia
Via Anguillarese, 301 - 00060 Roma
Tel: +39 06 3048 4998 - Fax: +39-06.30484891
e-mail: pazzaglia@casaccia.enea.it

Paola Scampoli

Dipartimento di Scienze Fisiche - Università di Napoli Federico II
Via Cintia - 80126 Napoli
Tel: +39 081 676353 - Fax: +39 081 676346
e-mail: paola.scampoli@na.infn.it

Presidente Onorario

Marcello Quintiliani
Viale XXI Aprile 21 - 00162 Roma
e-mail: quintiliani@mailcity.com

Consigliere Emerito

Mario Coppola
Via Flaminia, 811 - 00191 Roma
e-mail: coppolamr@tin.it

FOCUS ON MICROSCOPY 13-16 APRILE 2003 - GENOVA, PALAZZO DUCALE

Mario Faretta

Flow Cytometry and Microscopy Core
Dipartimento di Oncologia sperimentale - Istituto Europeo di Oncologia Milano

mfaretta@ieo.it

Dal 13 al 16 aprile si è tenuta a Genova l'annuale edizione del "Focus on Microscopy", organizzata dai Proff. A. Diaspro (Università di Genova), F. Brakenhoff (Università di Amsterdam) e C. Usai (CNR). La conferenza ha coperto aspetti tecnologici di base quali teoria ottica, sviluppo di nuova strumentazione confocale, metodi alternativi alla microscopia confocale per sezionamento ottico e microscopia Raman, unitamente a tematiche legate all'applicazione delle nuove tecnologie a problemi biologici, medici e di scienza dei materiali.

Negli ultimi anni, accanto alle tecniche classiche di microscopia confocale, si è imposta all'attenzione degli utilizzatori la possibilità di eccitare sostanze fluorescenti con la tecnologia multifotone. Il primo riferimento a tale fenomeno risale alla tesi di dottorato del premio Nobel per la fisica Maria Goppert-Mayer, mentre l'applicazione all'osservazione di campioni fluorescenti risale agli anni '90 (Denk et al. 1990). L'elevata trasparenza dei materiali biologici rispetto alla radiazione infrarossa utilizzata nell'eccitazione multifotone fa della microscopia a due fotoni una risorsa di valore inestimabile per lo studio di campioni biologici spessi quali tessuti, embrioni ed organi. S. Fraser (California Institute of Technology) ha esposto il notevole impatto prodotto dalle tecnologie avanzate di imaging nello studio dei meccanismi di sviluppo embrionali. La microscopia a due fotoni può essere usata per seguire la migrazione di specifiche popolazioni cellulari responsabili dello sviluppo del sistema nervoso negli embrioni di pollo. La possibilità di effettuare osservazioni *in vivo* costituisce una svolta rispetto agli studi classici, che richiedevano il sacrificio degli embrioni stessi. La microscopia confocale multifotone rimane però una tecnica superficiale (capacità di penetrazione fino a 500 micron) se paragonata alle dimensioni di organismi complessi

si quali embrioni di mammifero, per cui sono entrate a far parte della ricerca di base tecnologie di immagine non ottiche finora utilizzate in campo diagnostico. Sempre nell'ambito dello sviluppo di organismi viventi, D. Arndt-Jovin (Max Planck Institute, Goettingen) ha presentato l'utilizzo di tecnologie avanzate per lo studio dello sviluppo di embrioni di *Drosophila*. L'espressione di proteine fondamentali nella definizione dell'identità dei diversi segmenti corporei (geni Polycomb), modificate per essere espresse come fusione con Green Fluorescent Protein, permette la loro visualizzazione a livello cellulare *in vivo*, aprendo nuove frontiere nello studio del ruolo giocato da tali proteine nel corso dello sviluppo embrionale.

La microscopia in fluorescenza ha inoltre preso piede nel campo degli studi funzionali di biomolecole attraverso lo sviluppo dei metodi di "Fluorescence Recovery After Photobleaching" (FRAP) e "Fluorescence Correlation Spectroscopy" (FCS). Nel caso della FRAP, che può fornire una valutazione delle capacità diffusive di specifiche macromolecole all'interno di diversi compartimenti cellulari, l'illuminazione ad elevata intensità di una specifica regione cellulare porta all'inattivazione irreversibile (bleaching) dell'emissione di fluorescenza delle molecole irradiate. Tale analisi richiede la creazione di modelli per il fitting dei dati sperimentali e per la predizione di comportamenti complessi dovuti ad esempio alla presenza di sottopopolazioni aventi differenti gradi di mobilità a causa di interazioni molecolari, come presentato da B. Sprague (National Cancer Institute/National Institute of Health, Bethesda) e A. Houtsmuller (Erasmus University Rotterdam). Quest'ultimo ha applicato le metodologie sopra descritte allo studio *in vivo* delle cinetiche di reazione coinvolgenti proteine responsabi-

li dei meccanismi di riparo dei danni al DNA e aventi simultaneamente un ruolo nella trascrizione. Studi di microscopia confocale *in vivo*, unitamente ad analisi con metodi FRAP e successiva modellizzazione, hanno portato ad evidenziare come il fattore di trascrizione e riparo TFIIH, coinvolto sia nella trascrizione dipendente da RNA Polimerasi I e II sia nell'eliminazione dei danni a singola elica indotti da radiazione UV, presenti una diversa mobilità a seconda dell'attività funzionale svolta. La risultante dipendenza tra diffusività e attività funzionale porta le molecole a risiedere per qualche secondo nei siti attivi di trascrizione per poi essere sostanzialmente immobilizzate nei pressi del DNA danneggiato per qualche minuto, indicando una sostanziale diversità nel ruolo giocato dal fattore TFIIH a livello molecolare nei due processi. La FCS permette di estrapolare dalle fluttuazioni temporali dell'intensità di fluorescenza informazioni su una data molecola presente nel cono di illuminazione del fascio laser di un microscopio confocale. Esempi di tali informazioni sono la concentrazione, la capacità diffusiva e, applicando la tecnica a fluorocromi diversi, la possibile interazione fra specie molecolari. Il tempo richiesto per il campionamento è dell'ordine dei millisecondi con un'osservazione generalmente limitata ad un singolo punto. Recenti innovazioni nel settore (E. Gratton, University of Illinois) hanno portato ad estendere i limiti di raccolta del segnale ad aree relativamente ampie, consentendo di stimare in regioni cellulari le frazioni di molecole mobili ed immobili unitamente ai gradienti locali di velocità. Il passo successivo si concretizza nelle tecniche di "Image Correlation Spectroscopy" (P. Wiseman, McGill University, Montreal), utilizzate per estrapolare le proprietà di trasporto e aggregazione in membrane cellulari dallo studio delle correlazioni spaziali e temporali dell'intensità di fluorescenza. Una seconda modalità di indagine nel campo delle interazioni proteiche viene fornita dalla "Fluorescence Resonance Energy Transfer" tra due fluorocromi aventi specifiche proprietà spettrali (A. Periasamy, University of Virginia, Charlottesville). L'emissione di fluorescenza per FRET avviene tramite l'eccitazione di un molecola donatrice che si diseccita trasferendo la propria energia ad un secondo fluoroforo, che a seguito di tale assorbimento viene eccitata per poi emettere fluorescenza. Il verificarsi dell'emissione per FRET indica la prossimità spaziale (tipicamente

inferiore ai 10 nm) e quindi l'interazione fra le due specie molecolari. L'utilizzo di modificazioni puntiformi nella struttura di GFP ha portato allo sviluppo di nuove proteine fluorescenti soddisfacenti i criteri richiesti per l'osservazione dei fenomeni di FRET ("Cyan fluorescent Protein" e "Yellow Fluorescent Protein"). Fondendo tali molecole a macromolecole biologiche di interesse e sfruttando le tecnologie di microscopia confocale a singolo e multi fotone, si è conseguentemente realizzata la possibilità di valutare interazioni molecolari in cellule viventi. Un nuovo metodo di misurazione di tali fenomeni si basa sul "Fluorescence Lifetime Imaging", che prevede la misurazione del tempo di vita medio sfruttando la natura impulsata delle sorgenti di eccitazione multifotone. In presenza di FRET la vita media della molecola donatrice risulta abbreviata; la misura, essendo indipendente dalla concentrazione di fluoroforo, fornisce un metodo di valutazione più robusto rispetto ai rapporti di intensità.

Parallelamente alla disponibilità di una varietà sempre crescente di sostanze fluorescenti, è cresciuta la necessità di strumenti ad elevato potere di risoluzione spettrale per la separazione dei diversi fluorocromi. Le maggiori ditte produttrici del settore microscopia confocale hanno presentato le diverse soluzioni esistenti per soddisfare le crescenti richieste nel campo della microscopia "spettrale". L'utilizzo di modulatori acusto-ottici otticamente attivi in sostituzione dei classici filtri dielettrici, unitamente all'uso di elementi dispersivi, ha trovato impiego nella microscopia confocale ad alta risoluzione spettrale (R. Borlinghaus, Leica Microsystems, Heidelberg). Le stesse capacità di analisi spettrale possono essere ottenute mediante reticoli di diffrazione in grado di proiettare i massimi del primo ordine su un array di fotomoltiplicatori (R. Ankerhold, Carl Zeiss, Jena). La tecnologia a filtri (A. Dixon, Bio-Rad, UK) può acquisire capacità di risoluzione spettrale mediante l'impiego in sequenza di filtri dielettrici a banda passante bassa ed alta, creando una finestra minima di 10 nm estensibile tra i 450 ed i 610 nm.

La sfida classica nella microscopia ottica consiste nel superamento del limite di diffrazione imposto dalla legge di Abbe; gli sviluppi raggiunti in tale settore sono stati presentati da S. Hell (Max Planck Institute, Gottingen). In particolare la "Stimulated Emission Depletion" e la "Ground State Depletion" permettono il superamento di

tale limite mediante processi non lineari. L'utilizzo di intensità e/o lunghezze d'onda di eccitazione che modulano spazialmente la sorgente primaria di eccitazione consentono di portare la risoluzione ottica al di sotto dei 100 nm. L'uso di geometrie particolari come la microscopia 4π in cui si impiegano due obiettivi contemporaneamente, rappresenta un ulteriore strumento per l'incremento della risoluzione spaziale. L'applicabilità a problemi biologici è stata dimostrata dall'osservazione ad alta risoluzione del reticolo mitocondriale di cellule di mammifero (A. Egner, Max Planck Institute, Göttingen). Tecniche di illuminazione strutturata consistenti nella modulazione spaziale dell'intensità di illuminazione in microscopia in campo largo possono essere utilizzate per incrementare il numero di informazioni ad alta risoluzione nell'immagine osservata (M. Gustafsson,

University of California, San Francisco).

Lo sviluppo di nuova strumentazione ottica con sempre maggiori capacità risolutive può aprire nuove strade verso la soluzione di problemi legati alla ricerca biologica di base ed applicata. Le tecnologie ottiche forniscono, rispetto alle tecnologie di microscopia elettronica, l'ineguagliabile proprietà di essere compatibili con l'osservazione di campioni viventi. Risulta tuttavia indispensabile un continuo confronto tra sviluppatori ed utilizzatori, unica carta vincente per il futuro, come testimoniato dalla crescente partecipazione a congressi interdisciplinari di cui il "Focus on Microscopy" ha rappresentato e rappresenterà un eccellente modello.

L'autore si scusa con tutti coloro che per ragioni di spazio non hanno potuto essere menzionati.

Editoriale

Carissimi,

ho sempre pensato che il Bollettino, oltre che essere un importante veicolo di diffusione di informazioni fra i soci SIRR, dovesse svolgere principalmente il compito di far conoscere la nostra Associazione, nei suoi diversi aspetti, a quante più persone possibile, dovesse essere uno dei nostri "fiori all'occhiello", il nostro biglietto da visita nello svolgimento di questo compito. Obiettivamente, nei suoi oramai dodici anni di vita, quest'opera di divulgazione non sempre è riuscita, e questo ci ha portato a fare una critica dell'operato che ci auguriamo possa diventare positiva.

A nome della Redazione del Bollettino, totalmente rinnovata nel normale avvicendamento ad esclusione del Direttore Responsabile, vorrei ringraziare la passata Redazione, e in particolare Marco Durante, per il lavoro svolto, e presentare la nuova versione grafica della nostra rivista. Ho volutamente utilizzato il termine "rivista", in quanto i nostri sforzi saranno indirizzati al raggiungimento di questo obiettivo. Infatti da questo numero "Bollettino della Società Italiana per le Ricerche sulle Radiazioni (SIRR)" appare come occhiello. Vi verranno infatti pubblicati anche articoli su argomenti di attualità in campo scientifico, che pur se non strettamente legati alle radiazioni possano essere di stimolo per tutti noi.

Il compito che attende tutta la Redazione è abbastanza arduo, ma io sono molto fiducioso. Tutti hanno accettato l'incarico con entusiasmo e quando si lavora con questo spirito ottenere gli obiettivi prefissati è più facile. Speriamo comunque di interagire fortemente con tutti i soci e gradiremmo molto avere suggerimenti e opinioni.

Auguro a tutti buon lavoro e uno splendido successo.

Gianfranco Grossi

12TH L.H. GRAY WORKSHOP 6TH INTERNATIONAL WORKSHOP

Microbeam Probes of Cellular Radiation Response,
Oxford, March 29-31, 2003

Dieter Frankenberg

University of Goettingen

dfrank@med.uni-goettingen.de

The scientific programme of the workshop can be subdivided into 2 major and 2 minor groups. The contents of the 2 major groups are (1) development and construction of microbeams and (2) bystander effects including their interrelationships to other low dose phenomena. The subjects of the 2 minor groups are (3) reports about first qualitative results of microbeams or X-ray-microprobes which will enter the quantitative phase within the next one or two years and (4) microbeam related radiation physical and microdosimetric considerations.

(1) Worldwide there are strong activities in the development and construction of microbeams, most of which will be based on beam focusing thus avoiding the straggling problems when using collimators.

The existing and future microbeams will cover then an LET-range from about 2 to 10,000 keV/μm. The beam directions are from bottom or are horizontal with their specific problems and solutions. The Gray Cancer Institute has added to their existing C_K and Al_K X-ray probes a Ti_K X-ray probe to extend the LET-range to lower values. A general introduction into X-ray optics documented the difficulties faced with increasing photon energies. Reports on software developments to control charged particle microbeams, and cell imaging techniques available for microbeams complemented this first group of presentations.

(2) In this group of presentations several questions were addressed concerning bystander effects and their interrelationships to LET-dependence, inducible radioresistance, genomic instability, adaptive response or cell density.

Using the conventional track etching method it was shown that the cyclin-dependent kinase inhibitor CDKN1A (p21) was not significantly enhanced in bystander cells after exposure of 1 to 2 %

of all cells to heavy ions with an LET of 4000 keV/μm (zinc ions) or 150 keV/μm (carbon ions) (Taucher-Scholz et al).

Growing cell populations of different origins showing bystander effects after alpha particles exposure did not exhibit any bystander effect after exposure to 50 to 70 keV electrons using a special collimator for irradiation of selected areas. As endpoints were used fluorescence assays for CDKN1A and PCNA. These investigations question the possibility of an endpoint-dependence of observing bystander effects (Braby and Ford).

Nuclear targeting of primary human fibroblasts with counted 10 MeV protons with an LET of 5 keV/μm, the lowest LET ever used in targeting of cell nuclei, yielded cell killing as expected from broad beam exposures. Targeting of only 10 % of all cells did not show any bystander effect although cells were approximately 70 % confluent to form gap junctions, as it was in all experiments performed at the Columbia microbeam using alpha particles. Based on these preliminary results it was hypothesized that an existing bystander effect could be masked by induced radioresistance which is known to be absent after exposure to high LET irradiation (Frankenberg/PTB Braunschweig).

Exposure of fractions (20 % of all cells down to one particle per population) of T-lymphocytes to ³He ions indicated a clear bystander effect for long term chromosomal instability. The induction of the instability phenotype was substantially reduced in bystander cells when antibiotics against TNF-α were introduced into the medium. From these data it was concluded that bystander mechanisms are powerful mediators of the delayed instability phenotype, and that cytokines play a pivotal role (Kadhim et al).

In experiments combining either low dose (0.02 Gy to 0.5 Gy) pre-irradiation using X-rays

or subsequent high dose (3 Gy) X-irradiation with exposure of only 10 % of A_L-cells at high cell density to alpha particles showed interaction between bystander effect and adaptive response. The data indicate that bystander mutagenesis is suppressed by the adaptive response, i.e. by 0.02 to 0.5 Gy pre-irradiation. On the other hand the 90 % bystander A_L-cells after exposure of 10 % of the A_L-cells with a lethal dose exhibited an increased mutation yield when subsequently exposed to 3 Gy of X-rays. The mutant yield was higher than a simple additive effect of bystander mutation and X-irradiation (3 Gy) (Zhou et al.).

Irradiation of sparsely seeded cells with conventional doses after a bystander treatment where only a single cell was targeted yielded significant protection even after X-ray exposures of as low as 20 mGy (Prise et al.).

Cell density is an important parameter for the development of bystander effects. A bystander effect is evident even at low cell density when gap junction communication is not possible as demonstrated in a variety of experiments at the Gray Laboratory microbeam. Bystander effects for cell killing and neoplastic cell transformation of C3H10T1/2-cells were investigated at low and high cell density after exposure of 10 % of all cells to alpha particles. For both endpoints the bystander effect was significantly higher when cell communication was possible (Mitchell et al.).

Using the C_K X-ray microprobe it was demonstrated that irradiation of the cytoplasm of a single cell reduces the clonogenic potential of the whole cell population. This suggests cytoplasm damage being a critical factor in triggering the bystander effect. Micronuclei (MN) induction was found to be dependent of the number of targeted co-cultured cells (one single cell up to 10 % of all co-cultured cells) and independent from the number of ³He-ions delivered to the targeted cells, indicating that radiation itself is just a trigger of the bystander effect.

Incubation of cells in NO-specific scavengers (c-PTIO or aminoguanidine) reduced the bystander MN induction to the background. Incubation of cells in 8% DMSO, known as radical scavenger, did not significantly affect the bystander response in contrast to protecting cells in the case of all samples irradiation (Shao et al.).

Microbeams allow relatively precise measurements of single cell transcriptional state/gene

expression. However, a considerable cell-cell variability was observed implying that monitoring expression of genes at a particular time point cannot be used for prediction of a given phenotype (Geard et al.).

Bystander effects were observed in several novel artificial human skin tissue systems after exposure to alpha particles. A quantitative mechanistic model of bystander effects was extended to include protracted exposure, with inverse dose-rate effects attributed to replenishment of a sub-population of cells being hypersensitive to bystander signals. In this approach bystander effect and inverse dose-rate effect are manifestation of the same basic phenomenon. The analysis concluded that a linear extrapolation of radon miner data to low doses without accounting for dose-rate/bystander effect would result in an underestimation of domestic radon risks by a factor of about 4. Since the BEIR VI report has already applied a phenomenological correction factor of about 4, the current domestic radon risk estimates are unlikely to be underestimated as a result of bystander effect (Belyakov et al.).

(3) In this subgroup progress reports were presented for the microbeams at the University of Bordeaux (CENBG), at the University of Leipzig (LIPSION microbeam), at the microbeam installed on TIARA, JAERI-Takasaki, and at the 12.5 keV X-ray microprobe beamline at the Advanced Light Source of the LBNL in Berkeley. The Bordeaux group tested successfully targeting accuracy and cell dish conditions. At the LIPSION microbeam were tested the cell dishes consisting of a 35 mm diameter petri dish with a Si₃N₄ window at the centre (2 mm x 2 mm, 200 nm thickness). First exposures of EaHy926-hybrid cells to 2.25 MeV protons were performed to check qualitatively for survival using specific staining for vital and dead cells. The TIARA-group reported as preliminary results slightly limited cell growth of non-hit cells in the dish where one cell was targeted with one ⁴⁰Ar ion (11.5 MeV/u) and of cells after exposure of solely their cytoplasm. At the Berkeley X-ray microprobe 100 μm wide stripes as photon beams and various distances between stripes (100 μm to 900 μm) were applied to investigate cell communication applying immunohistochemical assays such as for induction of CDNK1A and phosphorylation of H2AX and p53-serine15. Preliminary results showed a dose

and cell type dependent expression of p53 serine-15p.

(4) In this subgroup 3 presentations were devoted to simulation of low LET (electrons and soft X-rays) energy depositions important for microbeam exposures. It was pointed out that several parameters such as beam size, window thickness and depth into the sample have a large impact on the amount of energy delivered to particular cells, for example in multicellular targets such as explants or an acinus. This has to be con-

sidered especially for microbeam exposures using heavy ions with their energetic delta rays. Further on, for the comparability of microbeam exposures sufficient physical and biological information have to be provided to allow repeats of specific experiments at another installation. Meaningful intercomparisons between microbeam installations related to different radiation qualities or to targeting different regions in the cell are considered to be very useful to solidify microbeam data.



**Società Italiana per le
Ricerche sulle Radiazioni**



Laboratori Nazionali di Legnaro



**Federazione Italiana per le
Ricerche sulle Radiazioni**

*II Riunione Nazionale della
Società Italiana per le Ricerche sulle Radiazioni
I Convegno Nazionale della
Federazione Italiana per le Ricerche sulle Radiazioni
su:*

**Radiazioni in Medicina e Biologia: stato delle
ricerche ed applicazioni cliniche**

Legnaro-Padova, 20-22 novembre 2003

La Riunione, nella sua seconda edizione, organizzata congiuntamente al I Convegno Nazionale FIRR, vuole essere punto di incontro di studiosi di diverse discipline (fisici, biologi, medici, chimici), appartenenti a Università ed Enti di Ricerca italiani, impegnati sulle problematiche della radiobiologia e sulle applicazioni cliniche delle radiazioni. Si discuterà in particolare lo stato attuale delle ricerche di base e delle tecniche diagnostiche e radioterapiche innovative. L'incontro permetterà il confronto e il migliore coordinamento delle attività delle Società scientifiche interessate e dei programmi di ricerca.

E' previsto l'accreditamento dell'evento nell'ambito del Programma Educazione Continua in Medicina (ECM) per ottenere i crediti formativi.

Argomenti:

- **Meccanismi ed effetti cellulari e molecolari delle radiazioni ionizzanti e non**
- **Target molecolari per diagnosi e terapia**
- **Suscettibilità individuale**
- **Interazioni radiazioni e farmaci**
- **Radioterapia con adroni**
- **Tecniche innovative in radioterapia**
- **Piani di trattamento ed implicazioni radiobiologiche**
- **Imaging funzionale**
- **Dosimetria e sviluppi tecnologici**
- **Radioprotezione**
- **Chimica delle radiazioni**
- **Radiochimica**

Sono previste presentazioni di relazioni su invito, comunicazioni orali e posters.

Segreteria Scientifica:

Raffaele De Vita
Sezione Tossicologia e Scienze
Biomediche
ENEA, Centro Ricerche Casaccia
s.p. 016
Via Anguillarese, 301 - 00060 Roma
Tel.: 06/30484671 - Fax: 06/30484891
e-mail: devita@mail.casaccia.enea.it

Silvia Gerardi
Laboratori Nazionali di Legnaro
Istituto Nazionale di Fisica Nucleare
Viale dell'Università 2 - 35020 Legnaro
(Padova)
Tel.: 049/8068393 Fax. 049/641925
e-mail: silvia.gerardi@lnl.infn.it

Giustina Simone
Dipartimento Tecnologie e Salute
Istituto Superiore di Sanità
Viale Regina Elena 299 - 00161 Roma
Tel: 06/4990 2719 - Fax: 06/4938 7075
e-mail: giustina.simone@iss.it

Guido Sotti
Unita' Operativa Radioterapia
Azienda Ospedaliera di Padova
Via Giustiniani 1 - 35128 Padova
Tel: 049/8212940 - Fax 049/8212958
e-mail: guido.sotti@unipd.it

Segreteria Organizzativa Locale:
Anna D'Este
Laboratori Nazionali di Legnaro
Istituto Nazionale di Fisica Nucleare
Viale dell'Università 2
35020 Legnaro (Padova)
Tel.: 049/8068310 - Fax: 049/8068829
e-mail: anna.deste@lnl.infn.it

Paolo Schiavon
Laboratori Nazionali di Legnaro
Istituto Nazionale di Fisica Nucleare
Viale dell'Università 2
35020 Legnaro (Padova)
tel. 049/8068547 - Fax. 049/641925
e-mail: paolo.schiavon@lnl.infn.it

Presidenza del Convegno:

Roberto Cherubini (INFN-Legnaro, Padova)
Piercarlo Muzzio (Università di Padova)
Donatella Tirindelli Danesi (ENEA, Roma)

Comitato Scientifico:

Emilio Bombardieri (Milano)
Armando Buttafava (Pavia)
Leopoldo Conte (Varese)
Mario Coppola (Roma)
Renzo Corvò (Genova)
Raffaele De Vita (Roma)
Laura Guidoni (Roma)
Roberto Orecchia (Milano)
Andrea Ottolenghi (Pavia)
Simona Pazzaglia (Roma)
Marcello Quintiliani (Roma)
Gian Luca Sannazzari (Torino)
Paola Scampoli (Napoli)
Giustina Simone (Roma)
Giorgio Trenta (Roma)

Tutte le informazioni riguardanti il Convegno, le date di scadenza e le istruzioni per la sottomissione dei contributi scientifici sono riportate nella pagina web della manifestazione:

www.Radiazioni2003.lnl.infn.it
e-mail: Radiazioni2003@lnl.infn.it



Oltre 10 anni di fattiva presenza nella distribuzione di prodotti per la diagnostica di laboratorio hanno consolidato la reputazione e l'affidabilità della **Soc. Valter Occhiena**.

Dalla medicina nucleare alla anatomia patologica, oggi specializzata nel settore degli anticorpi monoclonali per citometria a flusso, la **Valter Occhiena** è sempre stata attenta agli sviluppi delle nuove tecnologie e tesa all'innovazione delle metodologie applicate, fianco a fianco con i ricercatori dei laboratori nazionali, soprattutto quelli di diagnostica delle neoplasie ematologiche e di ricerca applicata all'oncologia umana.

Alle indiscutibili caratteristiche tecniche dei prodotti che propone, la **Valter Occhiena** abbina un servizio tecnico e commerciale ai più alti livelli, elementi fondamentali per una azienda oggi all'avanguardia.

I traguardi raggiunti e la soddisfazione dei risultati acquisiti, permettono oggi alla **Valter Occhiena** di ampliare la già vasta gamma di prodotti offerti in modo tale da soddisfare le crescenti necessità di altri specifici settori garantendo la qualità, l'affidabilità e il servizio di sempre.

VALTER OCCHIENA srl

Via Rosta 7 bis - 10143 Torino (Italy)
Numero Verde 800 26 46 46 - vo@valterocchiena.com