



**EFFETTI INDOTTI DALL'ACQUA PESANTE (COME TALE E IN ASSOCIAZIONE
A RAGGI X) SU CELLULE TUMORALI UMANE COLTIVATE "IN VITRO"**

Catena C[°], Pomponi D.^{°°}, Pane S.[°], Trenta G.^{°°}, Righi E.^{°°},
Celani F.^{°°°}, Marini P.^{°°°}, Nakamura M.^{°°°}

[°] *BIOTEC, CR Casaccia, ENEA*

^{°°} *Gruppo INTRABIO, LNF - INFN*

^{°°°} *Gruppo FREEDOM, LNF - INFN*

Riassunto

Questo studio esamina l'effetto citotossico dell'acqua pesante (D₂O), sterilizzata con raggi γ da ⁶⁰Co, presente nella coltura "in vitro" di una linea di cellule tumorali umane (U937). Viene inoltre esaminata l'azione citotossica dei raggi X singolarmente o combinati con la D₂O.

Sono stati indagati: la sopravvivenza cellulare (MTT test), la genotossicità (test dei micronuclei), la morte cellulare programmata (apoptosi).

I dati sperimentali, da considerarsi preliminari, confermano la trasferibilità delle metodologie da noi impiegate nella dosimetria biologica alla misura degli effetti biologici della D₂O. Concentrazioni della D₂O fino al 5% sono da considerarsi compatibili con la funzionalità cellulare. Una concentrazione di oltre il 20% di D₂O produce, in questa linea cellulare, una marcata letalità (sopravvivenza <10%). L'effetto combinato (D₂O + raggi X) pone in evidenza un probabile effetto radioprotettivo sulla sopravvivenza cellulare da parte della D₂O, almeno in corrispondenza della dose di 2Gy. Il solo trattamento con la D₂O non modifica la frequenza dei micronuclei e l'apoptosi. Trattamenti combinati con raggi X (2Gy) sembrano confermare il probabile effetto radioprotettivo della D₂O al 4% e al 10%.

L'effetto citotossico della D₂O appare dunque promettente per possibili applicazioni in oncologia in funzione della sua azione di blocco del ciclo replicativo e per la letalità cellulare. E' in corso un più ampio studio di approfondimento su linee cellulari normali e su alcune linee cellulari tumorali di diverso isotipo.

Abstract

This study examines the cytotoxic effect of combined treatment of heavy water (D₂O), sterilized by γ rays from ⁶⁰Co source, and X rays on human lymphoma cell line (U937) cultivated "in vitro". The end-points are cellular survival (MTT test), micronucleus induction (CB technique) and apoptosis. The preliminary data confirm the feasibility of the tests for the measure of the radiobiological effects. D₂O concentrations up to 5% are totally compatible with the development of cellular culture (duplication kinetic). A concentration beyond 20% produces, in this line, a strong letality (survival <10%). After 2Gy of treatment the addition of 4% or 10% of D₂O induces a possible radioprotective effect.

The cytotoxic effect of the D₂O, for its blocking action on the cell cycle, seems to be promising for applications in oncology. A study on healthy and on neoplastic primary cellular lines is now carried out by our research group.

Key words: Acqua pesante, D₂O, letalità cellulare, oncologia

Introduzione

L'acqua "pesante" (D_2O) può sostituire, solo in parte, la più abbondante acqua "leggera" (H_2O) come fattore nutrizionale in organismi biologici inferiori e superiori senza modificarne la sopravvivenza. Al di sopra di una determinata concentrazione, ampiamente variabile tra le diverse componenti biologiche (virus, batteri, eucarioti, tessuti, organi e organismi), si può osservare una interferenza con la normale fisiologia fino ad arrivare ad un effetto letale.

In letteratura sono riportate molteplici proprietà biologiche presentate dalla D_2O con l'indicazione di interessanti possibilità di impiego in campo biomedico. Nello studio degli effetti di D_2O sui microrganismi, sulle cellule e sugli animali vanno considerati sia i "solvent isotope effects", dovuti alle particolari proprietà della D_2O come solvente; sia i "deuterium isotope effects", dovuti alla sostituzione di H con D nelle molecole biologiche (Kushner et al., 1999). Alcuni studi "in vitro" (Lamprecht et al., 1990; Somlyai et al., 1993) ed "in vivo" (Altermatt et al., 1988; 1990; Gaeng et al., 1995) hanno dimostrato la capacità della D_2O di interferire con la fisiologia delle cellule sia come agente citotossico, sia come componente delle proteine deuterate.

La D_2O aumenta la stabilità delle molecole organiche, delle macromolecole, dei virus e dei vaccini (capacità biostabilizzante) (Chakrabarti et al., 1999). Livelli non tossici di D_2O riducono in animali di laboratorio l'ipertensione indotta dal NaCl e da etanolo ed i danni associati (Vasdev et al., 1993).

E' stata osservata:

- a) inibizione della sintesi del DNA dose-dipendente (in particolare ad alte concentrazioni di D_2O : > 50%) in cellule tumorali coltivate "in vitro" (Bogdahn et al., 1989; Coligan et al., 1992);
- b) letalità cellulare (misurata con colorante vitale trypan bleu) dose-dipendente e tempo-dipendente della coltura cellulare, osservata nelle stesse cellule e sempre per elevate concentrazioni di D_2O (Smith et al., 1992);
- c) cellule irradiate e immesse immediatamente dopo in terreno contenente 90% di D_2O presentano un potenziamento dell'effetto letale e una incapacità di riparare il danno sub-letale (Ben-Hur et al., 1980).

In esperienze effettuate "in vivo", su topi, è stato dimostrato che la presenza della concentrazione "naturale" della D_2O nell'acqua "leggera" (circa 150 ppm) è condizione favorente la crescita tumorale, mentre in condizioni alimentari con acqua privata della componente di D_2O si osserva una inibizione dello stesso fenomeno (Somlyai et al., 1993). Paradossalmente si osserva che:

- a) un pretrattamento alimentare con D_2O nei topi provoca un effetto radioprotettivo (minor effetto letale) dopo esposizione a raggi X;
- b) cellule coltivate "in vitro" e irradiate divengono più radiosensibili in presenza di D_2O nel terreno di coltura (Laeng et al., 1991).

All'incremento di concentrazione della D_2O in acqua "leggera" corrisponde un rallentamento della crescita di cellule tumorali trapiantate "in vivo" in topi, ma solo per concentrazioni molto elevate (D_2O >50%). In tali casi e per dosi crescenti si osservano anche complicanze di natura tossica che possono confondere l'apprezzamento dell'effetto antineoplastico (Barbour and Allen, 1938).

Inoltre, appaiono interessanti gli effetti combinati con irraggiamento X e D_2O (BenHur et al., 1980; Laeng et al., 1991). Studi biologici in tale ambito, oltre ad avere una valenza nello

studio dei composti organici deuterati cellulari (proteine, nucleoproteine, enzimi, membrane, ecc.), potrebbero risultare utili anche per gli aspetti applicativi della D₂O in clinica.

Le nostre metodologie sperimentali, sviluppate per lo studio degli effetti biologici delle radiazioni ionizzanti (Catena et al., 1992; 1995; 1996; 1997; Righi et al., 1998), risultano applicabili anche allo studio della citotossicità indotta dalla D₂O come tale o combinata con i raggi X.

In questo rapporto vengono presentati i risultati preliminari ottenuti utilizzando le citate metodiche d'indagine per una prima valutazione sperimentale del danno indotto da D₂O e dai raggi X separatamente o in combinazione tra loro. Le misure di sopravvivenza cellulare con sale tiazolico (MTT test) e le misure di induzione di micronuclei e apoptosi sono state effettuate sulla linea cellulare stabilizzata U937, derivata da un linfoma con caratteristiche istiocitiche (Sundström and Nilsson, 1976).

Materiali e metodi

La linea cellulare U937 è derivata da cellule neoplastiche estratte dall'essudato pleurico di un paziente, di 37 anni, affetto da linfoma istiocitico. Morfologicamente queste cellule presentano una forma tondeggianti con piccole sporgenze citoplasmatiche. Il diametro medio è di 12,5µm (range 8,1-16,9). Fissate e colorate, le cellule mostrano una moderata quantità di citoplasma (similitudine con i linfociti prima della blastizzazione) contenente piccoli granuli eosinofili e alcuni vacuoli. Il nucleo ha forma variabile e occasionalmente è possibile osservare uno o due grandi nucleoli. La cromatina è spesso grossolanamente granulare (Sundström and Nilsson, 1976).

L'origine istocitaria della linea cellulare è confermata dalla capacità delle cellule U937 di produrre lisozimi, di svolgere attività esterasica e anche dalla mancata produzione di immunoglobuline. Le cellule U937 esibiscono recettori superficiali che consentono di confermare la loro origine istocitaria. Questo quadro è indicativo di una tipologia cellulare più vicina ai monociti-macrofagi che a quella dei linfociti. La linea cellulare U937 è risultata negativa al test per il virus di Epstein-Barr (EBV) (Sundström and Nilsson, 1976).

La linea cellulare U937 si duplica "in vitro" mantenendo una distribuzione a singola cellula, anche se nelle colture esiste una tendenza a formare piccoli aggregati cellulari che però si risolvono facilmente per semplice agitazione. La cinetica di crescita (come raddoppiamento cellulare) è funzione della concentrazione del siero fetale di vitello (comunemente usato nelle colture cellulari) che mostra un valore ottimale intorno al 10%.

La linea cellulare U937 viene mantenuta in crescita esponenziale attraverso due passaggi cellulari alla settimana in fiasche per coltura cellulare (Cell-Cult 31060) alla temperatura di 37°C e in una atmosfera arricchita al 5% di CO₂. Il mezzo di coltura impiegato è costituito da RPMI 1640 (Sigma) addizionato con 75UI/75µg per ml di penicillina/streptomina (Sigma) e con il 10% di siero fetale bovino (Sigma).

I conteggi cellulari effettuati con un contacellule mod. ZF (Coulter Counter, USA) sono espressi in cellule per ml di terreno di coltura. Nelle nostre condizioni sperimentali la coltura si mantiene in crescita esponenziale con inoculi iniziali di circa 30.000 cellule/ml, fino a raggiungere una concentrazione di circa 700.000 cellule/ml dopo 4 giorni. Il tempo di duplicazione è quindi di circa 18 ore.

Acqua pesante, irraggiamento X

La D₂O, fornita dal Gruppo FREEDOM dell'INFN, è stata irradiata con 17 kGy (sorgente di ⁶⁰Co) e stoccata con la sigla γ 99-27.

L'irraggiamento si è reso necessario in quanto nella D₂O sono state individuate due nuove specie batteriche denominate rispettivamente *Ralstonia* e *Stenotrophomonas detuscolanense* (G. D'Agostaro, F. Celani et al., 2000) nell'ambito dell'esperimento FREEDOM (F. Celani, A. Spallone et al., 2000) che utilizza la D₂O in grandi quantità per esperimenti elettrolitici non convenzionali. Nell'ipotesi che la scarsa riproducibilità dei risultati riportati in letteratura negli esperimenti di impiego di D₂O come agente antitumorale fossero in parte dovuti alla presenza di questi batteri (per alcuni loro aspetti metabolici riconducibili al tipo "estremofilo"; F. Celani, A. Spallone et al., 2001) a scopo cautelativo si è deciso di effettuare un irraggiamento della D₂O con dosi di 17 kGy.

Dal campione così ottenuto si sono preparate delle aliquote che sono state conservate a 4°C. Ciò ha permesso di utilizzare una singola aliquota di D₂O per ogni singolo esperimento. Per raggiungere le concentrazioni sperimentali, la D₂O è stata aggiunta direttamente alla sospensione cellulare all'inizio della coltura.

L'irraggiamento della coltura è stato eseguito utilizzando un impianto radiogeno mod. Trimegagil (Gilardoni, Italia) settato a 250 KV, 15 mA e con filtro di Cu e Al. Il campione, posizionato alla distanza di 70 cm dal fuoco, è sottoposto ad una intensità di dose di 0,86 Gy/min. La dosimetria fisica è stata eseguita ogni volta congiuntamente all'irraggiamento dei campioni per mezzo di un misuratore di dose mod. IQ4 (PTW, USA) opportunamente calibrato.

Test di sopravvivenza cellulare (MTT test)

Lo studio dell'effetto letale a livello cellulare è una delle indagini fondamentali per valutare l'azione di agenti citotossici. Il test di sopravvivenza impiegato utilizza il composto organico tiazolico (sale giallo solubile), dal nome chimico *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide* (MTT). Tale composto, attraverso le deidrogenasi cellulari (enzimi mitocondriali presenti solamente nelle cellule metabolicamente attive), viene trasformato in un precipitato cristallino purpureo (insolubile in acqua) denominato formazan (rosso-purpureo) (Catena et al., 2000). Per le cellule U937 è stato attuato un inoculo iniziale di circa 10.000 cellule per pozzetto di una multi-well composta da 24 pozzetti. Dopo circa 5 cicli di riproduzione (circa 96 ore) dall'inizio della coltura è stato valutato, tramite una conteggio cellulare, il numero di cellule ottenute. E' possibile effettuare il test MTT nel caso in cui la coltura abbia sviluppato circa 5 cicli. Ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 200 µl di una soluzione di MTT (4mg/ml) per le successive 3 ore di incubazione. Terminato il processo di formazione del formazan, la sospensione cellulare presente nel pozzetto viene trasferita in provetta, centrifugata a circa 650 g per 10 min. ed il pellet viene solubilizzato in dimetilsolfossido (DMSO). Successivamente la soluzione viene titolata in spettrometria ottica alla lunghezza d'onda di 560 nm (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech).

Test dei micronuclei

Il micronucleo è costituito da materiale cromatinico che, dopo mitosi cellulare, non si integra nei nuclei delle cellule figlie ed è chiaramente osservabile nel citoplasma incluso in una membrana propria.

Nel nostro contesto sperimentale, la misura dell'effetto genotossico dei raggi X e della D₂O si basa appunto sull'induzione di micronuclei in cellule di mammifero "in vitro", alle quali

è stata bloccata la citochinesi. La citochinesi è il meccanismo che permette alla cellula, dopo aver duplicato il proprio nucleo, di dividersi in due cellule figlie. Le cellule in attiva proliferazione sono trattate con citocalasina B, un metabolita del fungo *Helminthosporium*, capace di inibire la citochinesi, ma non la divisione nucleare. Queste cellule con due nuclei ben separati (cellule binucleate) sono facilmente riconoscibili mediante la microscopia ottica (Fenech e Morley 1985). La citocalasina B è disciolta in DMSO e stoccata in aliquote da 200 µl a -20° C. Al momento dell'uso essa viene diluita in acqua distillata sterile ed aggiunta alle campionature ad una concentrazione di 3 µg/ml.

Le cellule U937, coltivate “in vitro” in crescita esponenziale, sono trattate con la citocalasina B all'inizio del trattamento rispettivamente con: raggi X, D₂O, entrambi. Dopo 24 ore dall'aggiunta della citocalasina B, vengono allestiti i preparati citologici su vetrino per l'osservazione al microscopio ottico. Per una migliore distribuzione delle cellule sul vetrino si ricorre all'utilizzo di una citocentrifuga (Cytospin 3, Shandon, UK). Dopo centrifugazione a circa 100 g per 2 min i vetrini sono posti ad asciugare all'aria. La colorazione si effettua, dopo aver fissato il preparato in alcool metilico assoluto per 10 minuti, mediante un trattamento con una soluzione di Giemsa al 5% per 15 min. I vetrini sono infine montati con il coprioggetto per la conservazione e per la lettura che viene eseguita a 1000x prendendo nota, separatamente, dei micronuclei presenti (1,2,3 o più) esclusivamente nelle singole cellule binucleate. La lettura prevede l'osservazione di almeno 1000 cellule binucleate per punto sperimentale

Test dell'apoptosi

L'apoptosi è un processo di morte cellulare programmata mirato ad eliminare una cellula “trasformata” o “modificata”. Il nostro protocollo sperimentale prevede l'aggiunta di una soluzione colorante fluorescente (Hoeschst 33342, Sigma) alla concentrazione finale 3µM per 30 minuti. Successivamente la sospensione cellulare viene trasferita in un fissativo formato da formalina al 4% in soluzione salina bilanciata. Dopo centrifugazione circa 100 g per 10 min. il pellet viene risospeso in 400 µl dello stesso fissativo e trasferito su un vetrino mediante citocentrifugazione a 100 g per 2 min. La conta differenziale avviene con microscopio a fluorescenza tra cellule con singolo nucleo e cromatina dispersa (cellule integre) e quelle con più nuclei aventi colorazione nucleare omogenea (cellule apoptotiche).

Risultati

La stima dell'effetto letale indotto dalla D₂O presente nel terreno di coltura sulla linea cellulare U937 è mostrata in Figura 1. I dati di 8 esperimenti dimostrano che per basse concentrazioni di D₂O (< 5%) è presente una buona compatibilità con la crescita delle cellule coltivate “in vitro”. All'aumentare di questa concentrazione (>5%) si osserva una progressiva riduzione della sopravvivenza cellulare fino a raggiungere un marcato effetto letale (sopravvivenza inferiore al 10% per concentrazioni della D₂O dell'ordine del 20%).

Analogamente una stima della radiosensibilità cellulare di questa linea è mostrata in Figura 2. In questo caso, 5 esperimenti hanno confermato un andamento della letalità da irradiazione dose-dipendente. Mentre il trattamento singolo della D₂O alla concentrazione del 20% in terreno di coltura induce una sopravvivenza di circa il 10% (effetto letale del 90%), nel caso di una esposizione ai raggi X tale effetto é raggiungibile per dosi intorno ai 5 Gy.

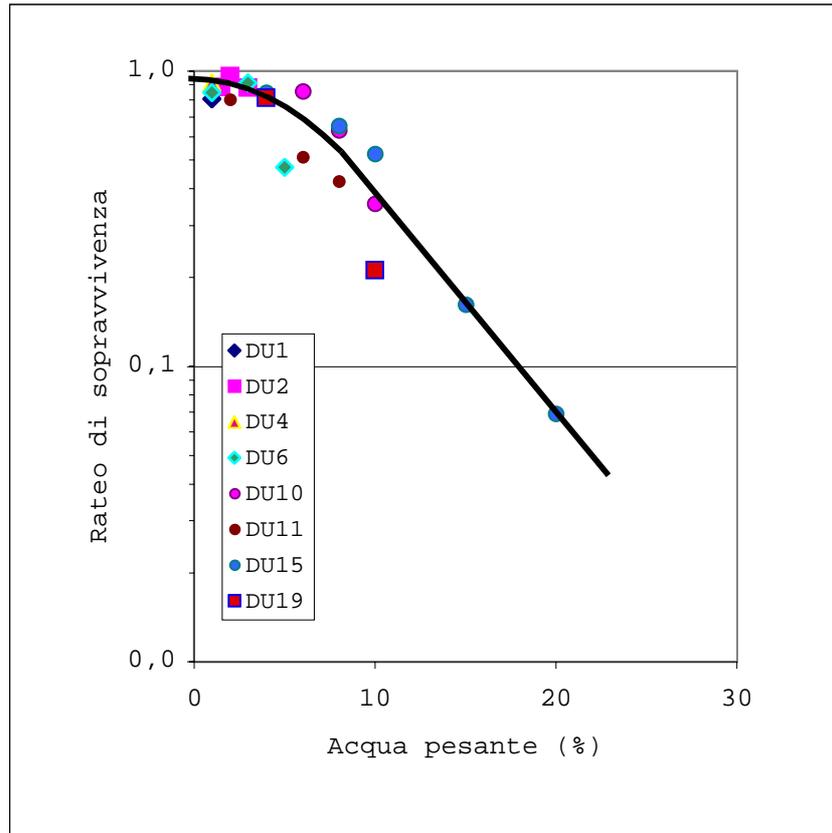


Figura 1 - Letalit  cellulare indotta da acqua pesante.

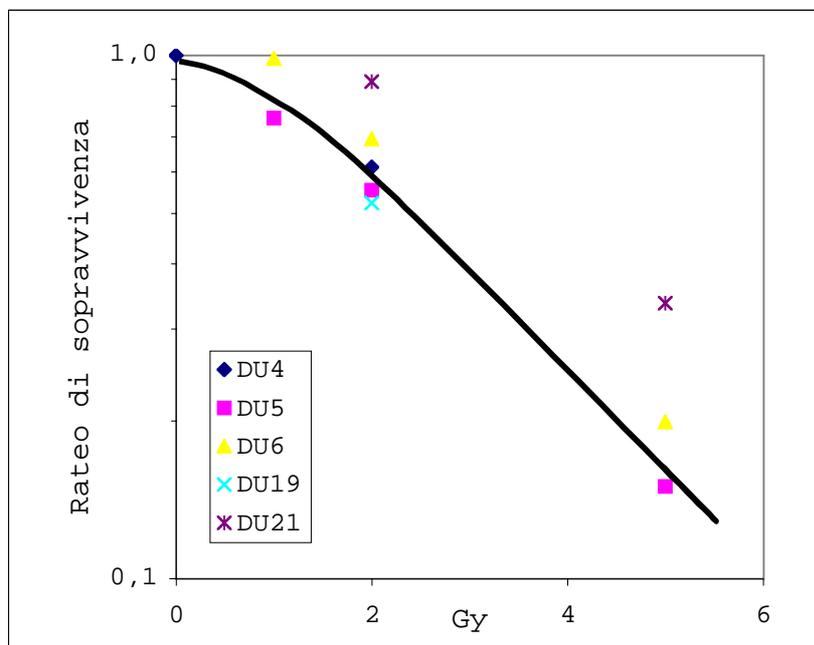


Figura 2 - Letalit  cellulare indotta da raggi X.

L'effetto della combinazione dei due trattamenti (D_2O e raggi X) rilevato in un singolo esperimento è mostrato nella Figura 3. L'effetto citotossico osservato nei trattamenti combinati almeno per la dose di 2 Gy e per la concentrazione di D_2O del 4%, non riflette la somma degli effetti ottenuti nei trattamenti singoli. La possibilità di un effetto radioprotettivo nella citata condizione verso il danno da radiazioni potrebbe quindi non essere escluso. Si può notare che questo stesso fenomeno non è presente per la dose di 5 Gy.

In termine di frequenza dei micronuclei (indicatori di effetto genotossico) il fenomeno appare invertito (almeno per la concentrazione della D_2O al 4%). Infatti nella Figura 4 risulta un sensibile incremento della frequenza dei micronuclei nel trattamento combinato con il 4% di D_2O rispetto al singolo trattamento con 2Gy. Alla concentrazione del 10% di D_2O la frequenza dei micronuclei indotta dall'irraggiamento appare diminuita. Una possibile interpretazione potrebbe essere la seguente: a quest'ultima concentrazione della D_2O il fenomeno della letalità cellulare potrebbe prevalere sulla capacità di formare i micronuclei, pertanto il dato potrebbe essere interpretato come falso negativo.

Le cellule in apoptosi aumentano con il trascorrere del tempo dall'inizio del trattamento. Pertanto, è opportuno eseguire misure di apoptosi a diversi tempi dall'inizio dell'esperimento con gli agenti indicati. In Figura 5 sono riportati tre diagrammi relativi a tre diversi momenti di analisi: rispettivamente 24h, 48h e 72h dal trattamento con D_2O e raggi X da soli o combinati.

In prima istanza si può affermare che:

- a) il solo trattamento con D_2O alle concentrazioni del 4% e 10% non induce sostanzialmente il fenomeno dell'apoptosi;
- b) il solo trattamento con raggi X induce apoptosi in maniera tempo-dipendente (a conferma della natura dinamica del processo) e dose-dipendente;
- c) nei trattamenti combinati, alle due concentrazioni di D_2O (4% e 10%) e alle due dosi di Rx (2Gy e 5Gy), emergono discordanze nei tre diversi tempi di osservazione.

Per quanto riguarda il precedente punto c) si può osservare che:

- α) alle 24h dall'inizio del trattamento appare un fenomeno di potenziamento dell'effetto apoptotico indotto dai 2Gy in presenza della D_2O al 4%;
- β) nelle stesse condizioni a 5Gy il fenomeno è invertito;
- γ) alle 72h il sistema tende ad equilibrarsi e il fenomeno apoptotico risulta, probabilmente, maggiormente influenzato dall'irraggiamento;
- δ) nello sviluppo dei fenomeni osservati (micronuclei e apoptosi) è da tenere presente la capacità delle radiazioni ionizzanti di inibire la cinetica del ciclo cellulare; pertanto le discrepanze, rilevate nelle prime fasi sperimentali (24h-48h), potrebbero essere il risultato di questo effetto.

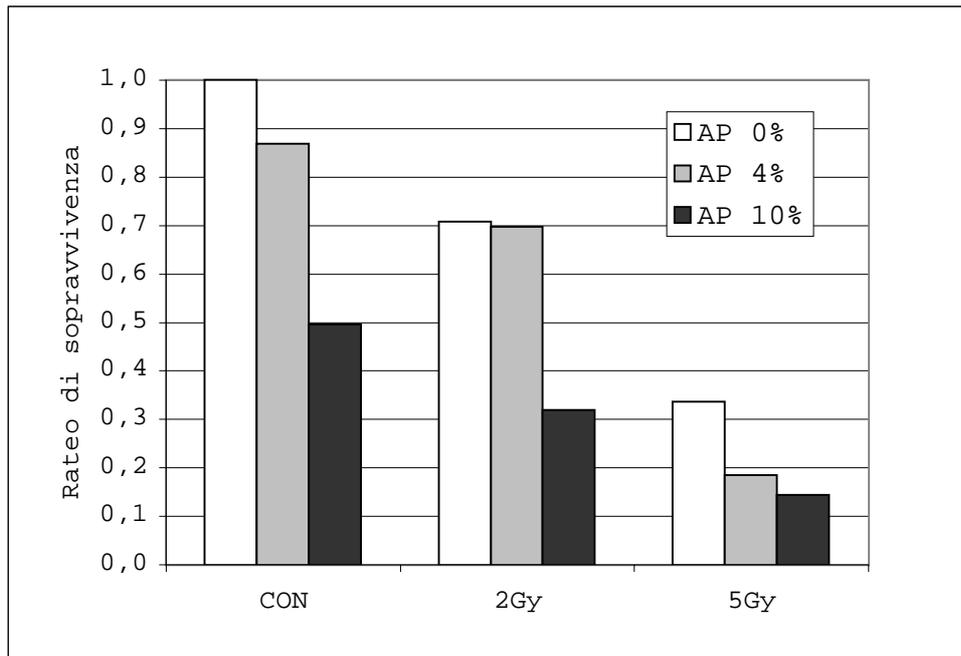


Figura 3 - Effetto combinato, raggi X e acqua pesante, sulla sopravvivenza cellulare.

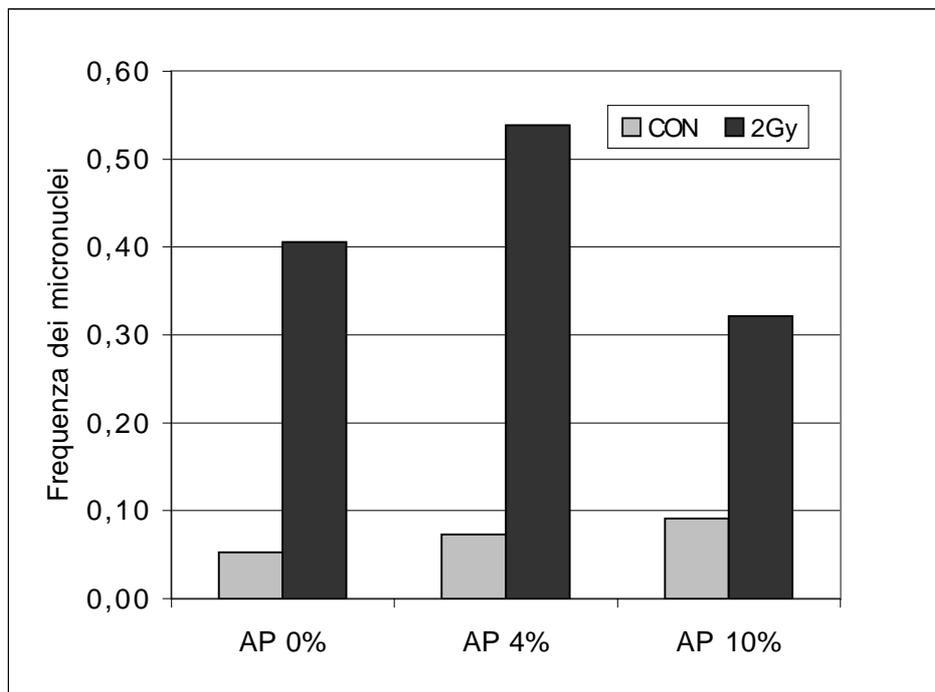


Figura 4 - Frequenza dei micronuclei dopo trattamento combinato con acqua pesante e 2 Gy di raggi X.

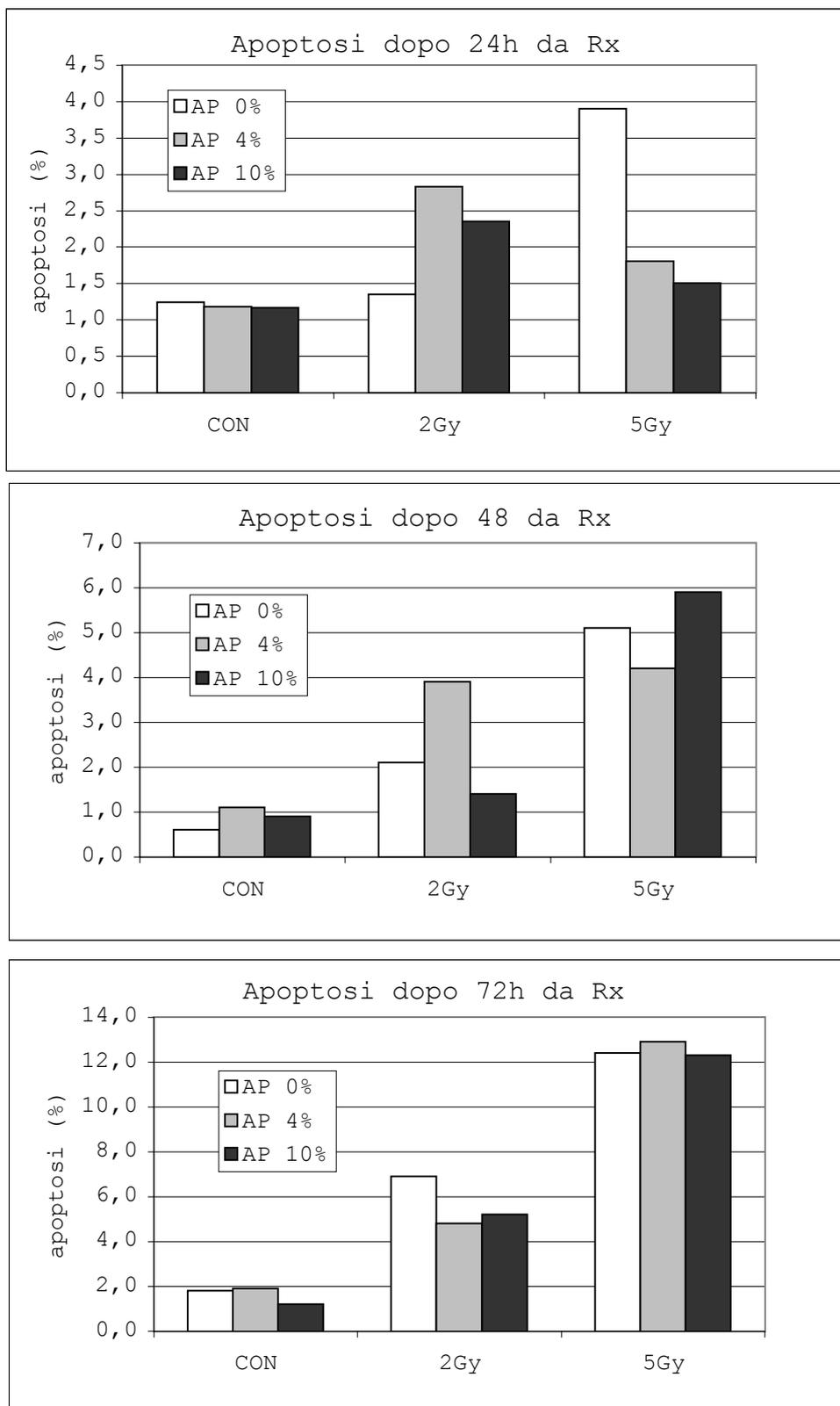


Figura 5 - Apoptosi indotta dopo trattamento combinato con acqua pesante e raggi X misurata a diversi tempi dall'inizio della coltura.

Discussione

Alla luce di informazioni tratte dalla letteratura ci è parso opportuno indagare sugli effetti “in vitro” della D_2O su cellule tumorali umane. La prima indagine, di importanza fondamentale, è la misura della sopravvivenza cellulare. In questo caso è stato misurato l'effetto indotto da concentrazioni crescenti di D_2O nel terreno di coltura. E' stato osservato, nelle nostre condizioni sperimentali, un progressivo aumento della citotossicità per concentrazioni di D_2O superiori al 5%, con marcata letalità (sopravvivenza < 10%) per concentrazioni di D_2O intorno al 20%. Sulla base di curve dose-effetto ottenute dopo trattamento delle cellule con raggi X, è stato possibile dimostrare che una concentrazione di D_2O intorno al 20% produce un effetto letale simile a quello osservato dopo un irraggiamento di oltre 5Gy.

L'effetto combinato con D_2O e raggi X, anche se al momento di non chiara interpretazione, appare interessante dal punto di vista radiobiologico per una probabile azione radioprotettiva della D_2O . E' comunque nostra intenzione approfondire lo studio del fenomeno utilizzando cellule coltivate “in vitro” per molte generazioni (cellule condizionate) in presenza di concentrazioni di D_2O compatibili con la crescita cellulare. I dati sperimentali da noi ottenuti sul probabile effetto radioprotettivo della D_2O nei confronti della letalità cellulare indotta da una dose di 2Gy potrebbero essere connessi alla produzione di proteine deuterate da parte delle cellule. Questa ipotesi, indubbiamente suggestiva, potrebbe risultare realistica in considerazione della maggiore stabilità di questi composti.

L'effetto genotossico (espresso dalla frequenza dei micronuclei) e la morte cellulare programmata (apoptosi) sono fattori che partecipano (e non solo loro) alla letalità cellulare. L'analisi di questi fenomeni, contestualmente misurati con l'effetto letale, ci hanno fornito indicazioni importanti sull'azione della D_2O . Sulla base dei risultati preliminari sopra indicati e delle ipotesi formulate è stata avviata una sperimentazione secondo gli schemi sopra riportati utilizzando substrati biologici più mirati e comprendenti, per un indispensabile confronto, linee cellulari ematiche normali e linee ematiche tumorali (leucemie e linfomi). Lo studio in corso comprenderà anche l'approfondimento dei meccanismi di azione coinvolti in questi fenomeni di indubbio interesse.

Ringraziamenti

Un particolare ringraziamento al Dott. Giacomo D'Agostaro (CR Casaccia, ENEA) per il complesso lavoro svolto nella identificazione dei batteri presenti nella D_2O , per i preziosi suggerimenti e per le critiche costruttive.

Si ringraziano il Dr. Antonio Spallone, il Dr. Piero Quercia, il Dr. Vittorio Di Stefano (Esperimento FREEDOM), il Dr. Roberto Cherubini (LNL, INFN) e l'Ing. Flavio Fontana (Pirelli Labs, Milano) per il loro fondamentale contributo nell'acquisizione e selezione critica della documentazione bibliografica disponibile sull'argomento.

Bibliografia

Altermatt H.J., Gebbers J., Laissue J.A., Heavy water delays growth of human carcinoma in nude mice. *Cancer* 62, 462-466, 1988.

Altermatt H.J., Gebbers J.O., Laissue J.A. Heavy water enhances the antineoplastic effect of 5-fluoro-uracil and bleomycin in nude mice bearing human carcinoma. *International Journal Cancer* 45, 475-480, 1990.

Barbour H. and Allen E. Tumor growth one fifth saturated with deuterium oxide (heavy water). *Am. J. Cancer* 32, 1938.

Ben-Hur E., Utsumi H., Elkind M.M. Potentially lethal and DNA radiation damage: similarities in inhibition of repair by medium containing D₂O and by hypertonic buffer. *Radiation Research* 84, 25-34, 1980.

Bogdahn U., Apfel R., Hahn M., Gorlach M., Bohl C., Hoppe J. and Martin R. Autocrine tumor cell growth inhibiting activities from human malignant melanoma. *Cancer Res.* 49, 5358-5363, 1989.

Catena C., Conti D., Del Nero A., Righi E. Inter-individual differences in radiation response shown by in vitro micronucleus assay: effects of 3-aminobenzamide on X-ray treatment. *International Journal Radiation Biology* 62, 687-694, 1992.

Catena C., Parasacchi P., Conti D., Righi E., Galassi B., Scanni A.,: Micronucleus assay (MN-test) in oncology. XIII Riunione Nazionale di Oncologia Sperimentale e Clinica. *Tumori* 81, n.4, 85, 1995 .

Catena C., D. Conti, P. Parasacchi, P. Marengo, B. Bortolato, M. Botturi, M. Leoni, M. Portaluri, P.G. Paleani-Vettori and E. Righi: Micronuclei in cytokinesis-blocked lymphocytes may predict patient response to radiotherapy. *International Journal Radiation Biology* 70, 301-308, 1996.

Catena C., Parasacchi P., Conti D., Sgura A., Trenta G., Righi E., Trinci M.M. and Trinci M. Peripheral blood lymphocytes decrease and micronucleus yields during radiotherapy. *International Journal Radiation Biology* 72, 575-585, 1997.

Catena C., Conti D., Trenta G., Righi E., Breuer F., Ventroni G., Mauro G.A., Melacrinis F.F., Montesano T., Ronga G. Micronucleus yield and MTT-test as indicators of damage in patient's lymphocytes after ¹³¹I therapy. *The Journal of Nuclear Medicine* 41(9), 1522-1524, 2000.

Celani F., Spallone A., Marini P., di Stefano V., Nakamura M., Mancini A., Pace S., Tripodi P., Di Gioacchino D., Catena C., D'Agostaro G. Petraroli R., Quercia P., Righi E. Trenta G.: High Hydrogen loading into thin Palladium wires through precipitate of alkaline-earth carbonate on the surface of cathodes: evidence of new phases in the Pd-H system and unexpected problems due to bacteria contamination in the heavy water.. ICCF8, Conf. Proc. Italian Physical Society, pagg.181-190, Vol. 70 (2000).

F. Celani, A. Spallone, P. Marini, V. di Stefano, M. Nakamura, A. Mancini, G. D'Agostaro, E. Righi, G. Trenta, P. Quercia, C. Catena: *Electrochemical H-D loading of Palladium wires by hydro-alcoholic electrolytes related to the new discovered Ralstonia bacteria into heavy water: The 3rd Meeting of Japan CF-Research Society, Yokoama National University , October 25-26, 2001, -<http://fomcane.nucl.eng.osaka-u.ac.jp/jcf/>*

Chakrabarti G., Kim S., Gupta M.L., Barton J.S., Himes R.H., Stabilization of tubulin by deuterium oxide. *Biochemistry* 1999, 38, 3067-3072.

Coligan J.E., Kruisbeek A.M., Margulies D.H., Shevaqch E.M., Strober W. Current Protocols Immunology. NIH Monography. J. Wiley and Sons, New York, 1992.

D'Agostaro, G.A.F., Celani, F.J.V.A., Grollino, M.G., Catena, C., Petraroli, R., Carrieri, S., Quercia, P., Righi, E., Trenta, G., Spallone, A., Marini, P., di Stefano, V., Mancini, A., Di Gioacchino, D., ; National Centre Biology Information, 26 June 2000.

Fenech M. and Morley A.A. Measurement of Micronuclei in Lymphocytes. Mutation Research 147, 29-36, 1985.

Gaeng D.P., Geiser M., Cruz-Orive L.M., Larsen S.E., Schaffner T., Laissue J.A., Altermatt H.J. Paradoxical effects of bleomycin and heavy water (D₂O) in mice. International Journal Cancer 62, 784-790, 1995.

Kushner D.J., Baker A., Dunstall T.G. Biotechnological potential of heavy water and deuterated compounds. Can J. Physiol Pharmacol 77, 79-88, 1999.

Laeng R.H., Mini R.L., Laissue J.A., Schindler R. Radioprotection of cultured cells by preincubation in medium containing deuterium oxide. International Journal Radiation Biology 59, 165-173, 1991.

Lamprecht J., Schroeter D., Paweletz N. Mitosis arrested by deuterium oxide. Light microscopic, immunofluorescence and ultrastructural characterization. European Journal Cell Biology 51(2), 303-12, 1990.

Righi E, Catena C, Conti D, Trenta G. Biodosimetric diagnostic profile. Rivista del Nuovo Cimento 21, 1-57, 1998.

Smith G.K., Duch D.S., Dev I.K., Kaufman S.H. Metabolic effects and kill of human T-cell leukemia by 5-deazaacyclotetrahydrofolate, a specific inhibitor of glycineamide ribonucleotide transformylase. Cancer Res. 52, 48-95, 1992.

Somlyai G., Jancsó G., Jákli G., Vass K., Barna B., Lakics V., Gaál T. Naturally occurring deuterium is essential for the normal growth rate of cells. Federation of European Biochemical Societies 317, number 1, 2, 1-4, 1993.

Sundström C., Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line. International Journal Cancer 17, 565-577, 1976.

Vasdev S., Gupta I.P., Sampson C.A., Longrich L., Paral S. Deuterium oxide normalized blood pressure and elevated cytosolic calcium in rats with ethanol-induced hypertension. Can. J. Cardiol. 9, 802-808, 1993.