

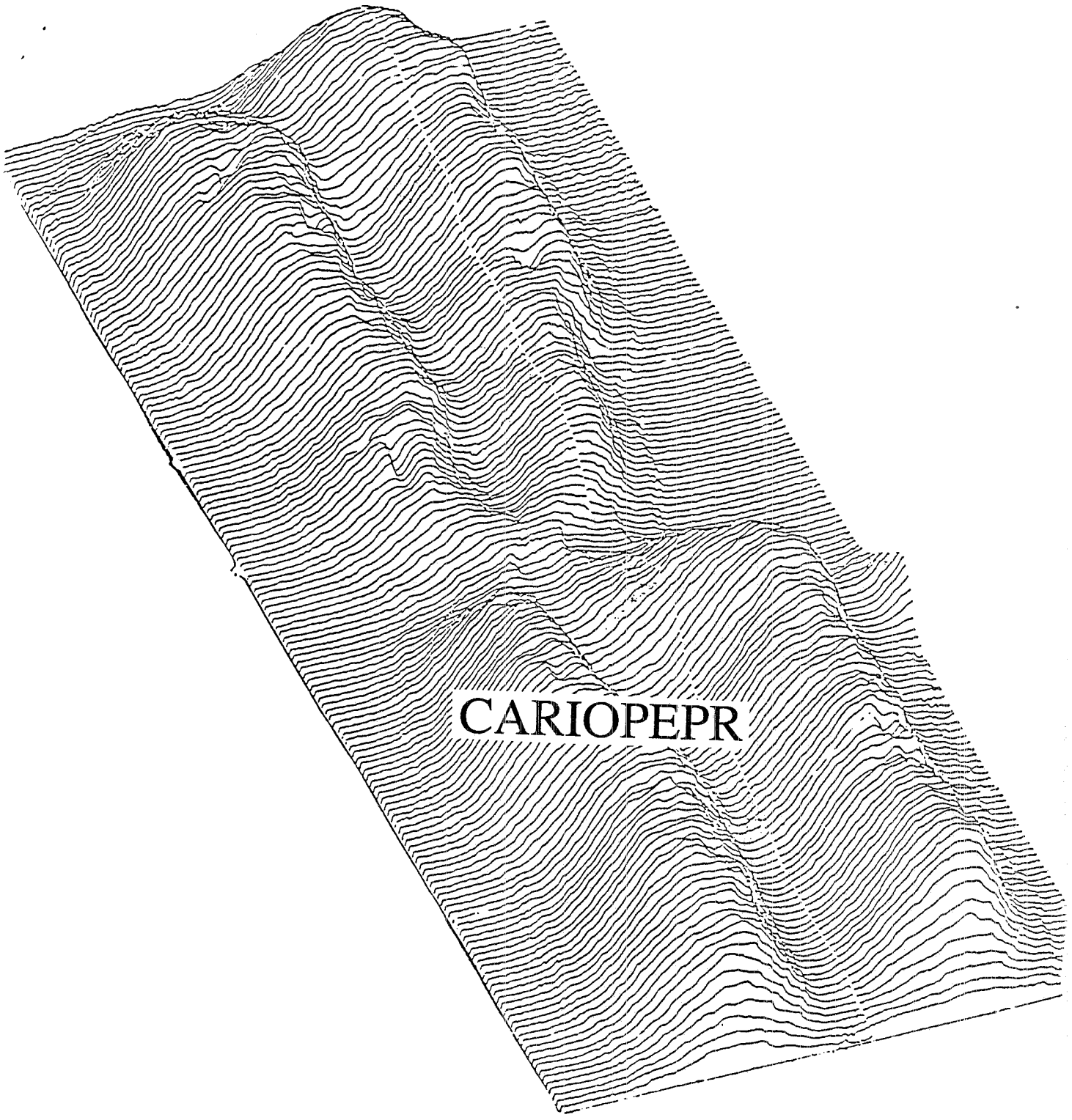
Laboratori Nazionali di Frascati

LNF-87/100(R)

20 Novembre 1987

Gruppo di ricerca CARIOPEPR
(Medicina del Lavoro e Gruppo PEPR LNF, INFN - USL Roma 29 - Gruppo ENEA):

**STUDIO DI UN SISTEMA AUTOMATIZZATO PER LA DOSIMETRIA
CITOGENETICA**



CARIOPEPR

LNF-87/100(R)
20 Novembre 1987

**STUDIO DI UN SISTEMA AUTOMATIZZATO
PER LA DOSIMETRIA CITOGENETICA**

**Gruppo di ricerca CARIOPEPR
(Medicina del Lavoro e Gruppo PEPR LNF, INFN
USL Roma 29 - Gruppo ENEA):**

INDICE

- Introduzione pag. 2

- Dosimetria citogenetica in
Radioprotezione medica pag. 8

- Studio per l'automazione in
dosimetria citogenetica pag. 69

- Appendice tecnica: Allestimento
delle piastre metafasiche (materiale
e metodi) pag.130

- Considerazioni conclusive pag. 135

Introduzione

La nostra ricerca ha come riferimento fondamentale la dosimetria citogenetica, metodologia questa che consente di stimare la dose assorbita attraverso l'osservazione e il conteggio delle aberrazioni cromosomiche radioindotte, ottenute da colture linfocitarie.

L'indicazione principale di questo tipo di diagnostica è rappresentata dall'irradiazione accidentale acuta al corpo intero o a gran parte di esso.

Tuttavia, opportune integrazioni di ordine matematico e statistico permettono di estendere efficacemente questa metodica ad altre condizioni di esposizione, quali l'irradiazione parziale o disomogenea, l'irradiazione subacuta, l'irradiazione protratta e cronica nella duplice modalità di esposizione frazionata e di esposizione continua, nonchè allo studio delle popolazioni o dei gruppi a rischio.

Il limite da valicare, soprattutto per quanto riguarda queste ultime condizioni di esposizione è il cospicuo numero di cellule (piastre metafasiche) da osservare attraverso la microscopia ottica.

L'impegno richiesto è in questo caso lungo, monotono, stancante e nel contempo anancastico. Tale condizione è limitativa delle possibili indicazioni della metodica e in talune circostanze è

responsabile di una quota di errore attribuibile al fattore umano.

Comunque, la lettura di un numero elevato di metafasi (e dei relativi cromosomi normali o aberrati) è condizione necessaria per abbassare la soglia della stima dosimetrica, per ridurre utilmente l'intervallo fiduciale e di conseguenza l'incertezza della misura, ed infine per consentire una corretta interpretazione della distribuzione statistica di Poisson ai fini della stima della distribuzione spaziale della dose assorbita.

E' evidente quindi la motivazione che ci ha indotto alcuni anni fa ad avviare una ricerca che avesse lo scopo di studiare un possibile sistema automatizzato per la lettura dei cromosomi e delle loro aberrazioni ai fini dosimetrici.

Agli inizi degli anni '80 eravamo venuti a conoscenza del sistema BIOPEPR realizzato presso l'Università di Nijmegen in Olanda per lo screening oncocitologico del cancro del collo dell'utero mediante sistemi automatizzati.

In quella circostanza intravedemmo la possibilità alternativa di utilizzare il PEPR (Precision Encoding and Pattern Recognition) dei L.N.F. dell'INFN per scopi di dosimetria citogenetica.

Ciò soprattutto considerando la possibilità di avvalersi, trasferendole in questo campo di ricerca, di tecniche e competenze estremamente sofisticate, normalmente impiegate soltanto nella ricerca di Fisica particellare.

Scopo della ricerca era pertanto quello di mettere a punto un sistema automatico di riconoscimento e conteggio delle aberrazioni cromosomiche indotte dalle radiazioni ionizzanti, sviluppando le opportune modifiche all'hardware e al software di questo sistema, appunto il PEPR, costruito e già utilizzato presso i Laboratori Nazionali di Frascati dell'INFN per la misura automatica di immagini di eventi di alta energia.

Per queste caratteristiche il programma è stato denominato "CARIOPEPR".

Il relativo Gruppo di ricerca, composto da esperti di ematologia e di radioprotezione medica (Medicina del Lavoro INFN, USL Roma 29, gruppo ENEA) e da esperti di riconoscimento di immagini e di utilizzo del PEPR (gruppo INFN), veniva formalizzato in data 14.7.1982 a seguito dell'approvazione del progetto della USL RM 29 inserito nel programma "Ricerca finalizzata sulla nocività da radiazioni ionizzanti in ambienti di lavoro" (Legge regionale n. 62 del 16.6.1980) e all'assegnazione del contributo regionale.

Hanno partecipato all'attività del Gruppo i
seguenti esperti:

Cognome e nome	Laurea/ diploma	Qualifica	Ente di appartenen za
GATTA Luigi	MEDICINA	PRIMARIO	USL RM29
QUERCIA Piero	BIOLOGIA	OPERATORE	USL RM29
DEL NERO Angelo	BIOLOGIA	INCARICO PROFESSIONALE A TEMPO	
LAAKSO Ilkka	FISICA	RICERCATORE	INFN
RIGHI Enzo	MEDICINA	DIRIG. MEDICO	INFN
RINDI Alessandro	FISICA	RICERCATORE	INFN
FIGLIOZZI Leda	FISICA	INCARICO PROFESSIONALE A TEMPO	
MARTINI Agnese	FISICA	INCARICO PROFESSIONALE A TEMPO	
OCONE Rita	FISICA	INCARICO PROFESSIONALE A TEMPO	
VOTANO Lucia	FISICA	RICERCATORE	INFN
BENVENUTO Pierluigi	DIPLOMA	TECNICO RICERCA	INFN
FABBRI Domenico	DIPLOMA	TECNICO RICERCA	INFN
GATTA Mario	MATURITA'	TECNICO RICERCA	INFN
MASI Fabrizio	DIPLOMA	TECNICO RICERCA	INFN
VENTURA Maurizio	PERITO...	TECNICO RICERCA	INFN
DI POFI Mario	MEDICINA	DIRIG. MEDICO	ENEA
VULPIS Nicoletta	MEDICINA	RICERCATORE	ENEA
GRADL Edmondo	DIPLOMA	TECNICO RICERCA	INFN

I componenti del Gruppo, con eccezione degli incaricati a tempo, hanno partecipato ai lavori a tempo parziale, compatibilmente con le loro attività principali svolte presso gli Enti di appartenenza, e senza alcun carico retributivo.

I capitoli che seguono hanno lo scopo di rappresentare, in via conclusiva, lo "stato dell'arte" della linea di ricerca CARIOPEPR, richiamando, quali postulati di partenza della ricerca stessa, gli aspetti essenziali della dosimetria citogenetica, e i vantaggi che possono motivare lo studio e la messa a punto di sistemi automatizzati di riconoscimento e conteggio delle aberrazioni cromosomiche a significatività dosimetrica.

LA DOSIMETRIA CITOGENETICA IN RADIOPROTEZIONE MEDICA: CRITERI METODOLOGICI E SIGNIFICATO CLINICO-DIAGNOSTICO

INTRODUZIONE

La Dosimetria rappresenta un riferimento fondamentale in Radiopatologia e in Radioprotezione.

La stima della dose assorbita per irradiazione esterna viene effettuata comunemente, sia in condizioni ordinarie che in caso di sovraesposizione certa o sospetta, sulla base delle indicazioni fornite da dispositivi sensibili agli effetti fisici delle radiazioni ionizzanti (film-badges, dosimetri a termoluminescenza, ecc.).

Inoltre, è possibile diagnosticare ai fini dosimetrici la contaminazione radioattiva esterna da radionuclidi α -, β - e γ - emettitori mediante appositi rivelatori, come pure la contaminazione radioattiva interna attraverso l'utilizzazione di apparati per la misura diretta (WBC: Whole Body Counter; misure distrettuali su tiroide, polmoni, ecc.) o l'impiego di metodiche indirette. Queste ultime metodiche consistono nella ricerca del radionuclide contaminante su campioni biologici e nella stima dosimetrica dell'irradiazione interna sulla base di modelli dosimetrici costruiti essenzialmente sulle caratteristiche metaboliche e sulle proprietà fisico-chimiche del radionuclide incorporato.

In particolari condizioni, sostanzialmente di tipo accidentale, alla

dosimetria fisica e alla radiotossicologia viene ad aggiungersi la dosimetria biologica, che si realizza attraverso lo studio di indicatori (di natura clinica, cellulare e subcellulare) della fenomenologia biologica radioindotta, quando questa venga ad esprimersi secondo andamenti dose-dipendenti opportunamente correlati.

In tale contesto merita ricordare l'irradiazione esterna localizzata acuta che si manifesta a livello cutaneo con segni e sintomi (epilazione, eritema, edema, flittena, necrosi) la cui soglia di apparizione corrisponde, con buona approssimazione, ad una determinata dose o ad un range ben definito.

Particolarmente interessante è la flittena, lesione caratteristica del danno allo strato basale della pelle, la cui comparsa al 21° giorno dall'irradiazione sta a indicare un livello di dose compreso tra 12 e 20 Gy (la stessa dose è espressa dal margine periferico della flittena stessa in presenza di un gradiente di dose e indipendentemente dall'epoca di comparsa) (19).

Parametri significativa, sul piano esemplificativo, è la forma ematologica della sindrome acuta da irradiazione caratterizzata da andamenti graduati, di cui si vuole sottolineare, per la fase precoce, la progressiva ripidità della caduta linfocitaria e gli incrementi del picco ipergranulocitario e, per la fase conclamata, l'ingravescente riduzione in rapporto all'entità della dose delle piastrine e dei leucociti, che è alla base delle emorragie e delle infezioni caratteristiche di questa sindrome radioindotta (35).

Il conteggio delle aberrazioni cromosomiche indotte dalle radiazioni ionizzanti, opportunamente effettuato, costituisce il fondamento della dosimetria citogenetica, cioè del più sensibile metodo biologico di misura dell'esposizione alle radiazioni ionizzanti (nei casi di irradiazione al corpo intero o a larga parte di esso).

Osservazioni di radiobiologia sperimentale e studi su pazienti sottoposti a radioterapia hanno consentito di stabilire che il numero delle aberrazioni cromosomiche indotte nei linfociti di un soggetto irradiato al corpo intero in maniera uniforme coincide con quello osservabile in un campione di sangue sottoposto ad una irradiazione "in vitro" di pari dose (30).

Su tale presupposto è possibile costruire "in vitro" curve di calibrazione correlando la dose di radiazioni al numero delle aberrazioni cromosomiche osservate.

Pertanto, la dosimetria citogenetica consiste nel conteggio delle aberrazioni cromosomiche indotte dalle radiazioni ionizzanti nell'individuo esposto e nella correlazione del dato così ottenuto con le curve di calibrazione dose-effetto.

Queste curve, ricavate esponendo campioni di sangue "in vitro" a dosi crescenti di radiazioni (di diversa natura e qualità), permettono di calcolare l'equivalente di dose al corpo intero, cioè quella dose uniforme a tutto il corpo, capace di produrre lo stesso numero di aberrazioni cromosomiche osservate "in vitro" (Fig. 1) (16, 28,30).

L'equivalente di dose al corpo intero cui si fa riferimento in dosimetria citogenetica esprime pertanto una dose uniforme al corpo intero quale risulterebbe dal numero delle aberrazioni cromosomiche osservate (dose integrata), tenuto conto del fatto che, in caso di sovraesposizione accidentale, non sempre è avvenuta una distribuzione globale e omogenea dell'irradiazione esterna.

Le condizioni ottimali per la valutazione interpretativa della dosimetria citogenetica sono:

- irradiazione di tipo acuto (non superiore a qualche ora);
- dose superiore a 0.10 - 0.20 Gy;
- distribuzione spaziale di tipo globale e tendenzialmente omogeneo dell'irradiazione (13, 25).

Ogni scostamento da queste condizioni richiede, laddove è possibile, appropriati aggiustamenti interpretativi.

L'indicazione prevalente della dosimetria citogenetica è rappresentata, al momento attuale, dalla sovraesposizione accidentale certa o sospetta, generalmente limitata all'ambito lavorativo.

Tale metodica di dosimetria biologica può risultare particolarmente utile nei seguenti casi:

- a) incertezza della relazione tra dosimetria fisica e dose assorbita;
- b) mancato uso del dosimetro personale;
- c) sovraesposizione "spuria" del dosimetro;
- d) false indicazioni dosimetriche dovute a fattori chimici o a fattori fisici diversi dalle radiazioni ionizzanti.

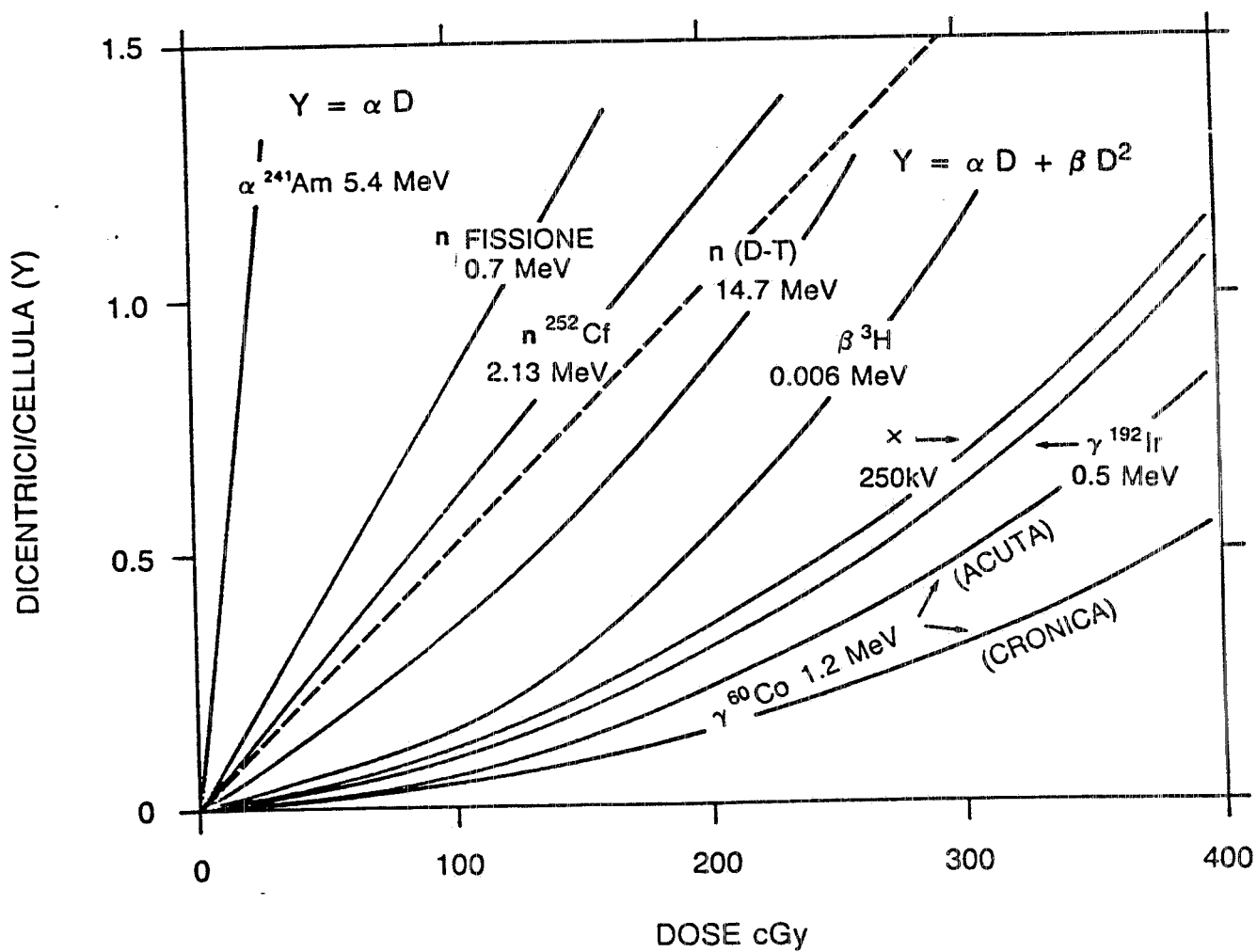


Fig.1 - Curve di calibrazione dose-effetto costruite mediante irradiazione "in vitro" di linfociti umani e relative funzioni matematiche.

(da Du Frain et al. (16), modificata)

Non é inoltre trascurabile la funzione rassicurante esercitata sul piano psicologico da questa indagine diagnostica (30).

LINFOCITI E ABERRAZIONI CROMOSOMICHE

Il linfocita mostra numerose proprietà biologiche che lo rendono efficacemente utilizzabile come "dosimetro circolante" (40, 41).

Tali proprietà biologiche possono essere così riassunte:

- a) In primo luogo é possibile un facile accesso diagnostico in quanto é sufficiente, per la metodica di dosimetria citogenetica, un comune prelievo del sangue venoso, che rende disponibile per la coltura cellulare un numero elevato di linfociti in poco volume.
- b) Nel sangue circolante circa il 70% della quota linfocitaria é costituita da linfociti T che hanno la caratteristica, a differenza dei linfociti B, di essere fitoresponsivi, cioé di rispondere allo stimolo mitogeno della fitoemoagglutinina, producendo un congruo numero di mitosi indispensabile per una buona analisi delle aberrazioni cromosomiche eventualmente presenti.
- c) I linfociti fanno parte di un sistema dinamico a distribuzione ubiquitaria, tale da determinare, in seguito a fenomeni di rimescolamento e di riequilibrio cinetico degli elementi circolanti, una ripartizione integrale media delle aberrazioni radioindotte, paragonabile alla "dose integrale media" della dosimetria fisica (25). I linfociti del sangue periferico non sono che una piccola parte della massa totale dei linfociti del corpo (circa 3g su 1000g totali) e vanno incontro a continua ricircolazione attraverso i tessuti linfatici con tempo medio di permanenza in circolo di circa 30 minuti e con sosta nei linfonodi e nella milza di qualche ora o di qualche giorno (25).

Gli organi linfatici, in assenza di una stimolazione antigenica, presentano

una linfopoiesi molto ridotta, talché la maggior parte dei linfociti (oltre il 95 %) che lascia queste strutture non stimolate deriva dal sangue e non è formata in situ (3).

In ogni modo, nel sangue periferico, oltre ad essere presenti linfociti con aberrazioni cromosomiche primariamente indotte in questa sede, possono essere eventualmente presenti anche linfociti con aberrazioni prodotte nella fase di transito (o di permanenza) di queste cellule in altre sedi corporee (pool extra-vascolare).

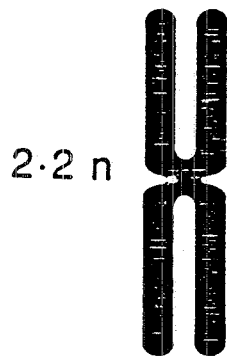
- d) I linfociti circolanti si trovano abitualmente nello stadio G_0 dell'interfase e costituiscono quindi una popolazione cellulare sincrona, capace cioè di fornire una risposta radiobiologica "allineata" e omogenea (le cellule midollari e le cellule epidermiche rappresentano popolazioni asincrone, poco adatte per gli scopi della dosimetria citogenetica).
- e) I linfociti T hanno una lunga durata di vita, valutata come emivita da Dolphin intorno a 3 anni (15), e da Buckton intorno a 1600 giorni (7) (la durata di vita dei linfociti B varia da 1 a 10 giorni).

Le aberrazioni cromosomiche linfocitarie (dicentrici) rimangono costanti per le prime 5 settimane dopo la sovraesposizione, per andare incontro successivamente a graduale riduzione (26, 30)

In linea generale, le radiazioni ionizzanti possono indurre sui cromosomi rotture di tipo cromosomico che si verificano quando la cellula è irradiata nella fase G_0 (o G_1), cioè prima della sintesi del DNA e della duplicazione in cromatidi, o rotture di tipo cromatidico che avvengono per irradiazione durante le fasi S e G_2 . A queste potrà seguire il ricongiungimento delle terminazioni spezzate secondo le varie modalità di ricombinazione.

Poiché i linfociti del sangue periferico, come già detto, si trovano nello stadio G_0 , potranno essere indotte, in seguito a irradiazione, soltanto aberrazioni cromosomiche (Fig.2) (28).

Nello stadio G_0 il cromosoma è composto da un singolo filamento di



- G₁ - Nucleo con DNA diploide (2n)
- S - Periodo di sintesi del DNA e duplicazione cromatidica
- G₂ - Nucleo con DNA tetraploide (2·2n)
- M - Periodo di mitosi
- G₀ - Fase di quiescenza (resting state) potenziale per la divisione cellulare (p.es. linfocita nel sangue periferico)

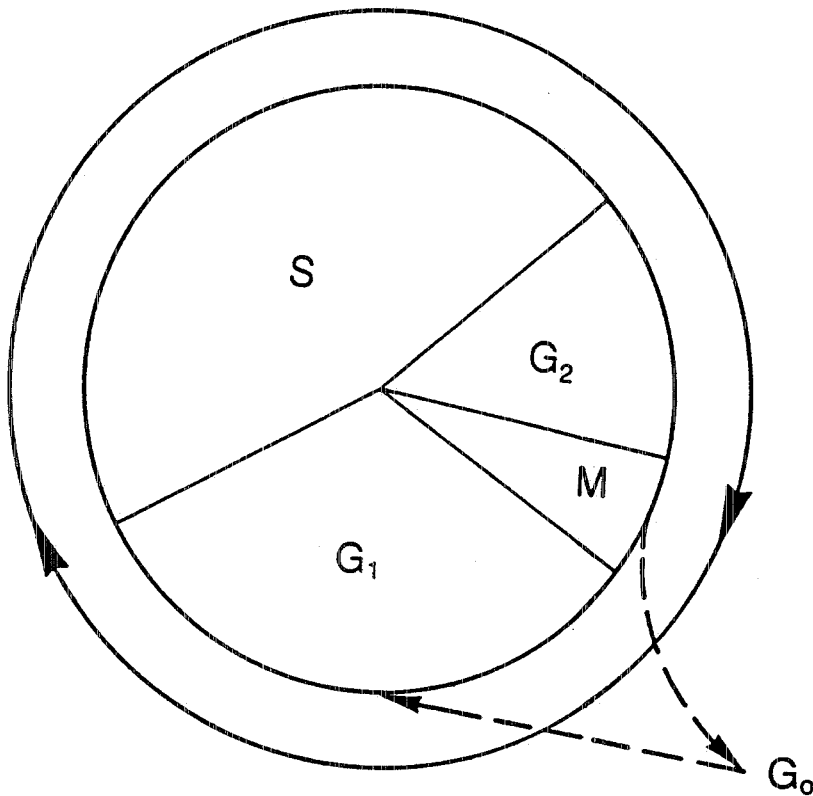


Fig.2 - Schema del ciclo cellulare.

DNA (struttura mononemica) che può subire una o più rotture per ionizzazione prodotta dal passaggio di una particella carica (traccia ionizzante) attraverso il cromosoma stesso o nelle sue immediate vicinanze.

Particelle cariche come gli elettroni prodotti dall'assorbimento di radiazioni x e γ , sono caratterizzate da bassa densità di ionizzazione (basso LET), mentre particelle cariche più pesanti, come le α e i protoni associate all'assorbimento neutronico, presentano invece un alto LET.

Una singola traccia, se ad alta densità di ionizzazione (alto LET), può determinare rotture in due o più cromosomi o in più punti dello stesso cromosoma.

Alle rotture cromosomiche possono seguire:

- a) la riparazione con il ripristino della configurazione originale;
- b) la produzione di aberrazioni da scambio dopo almeno due rotture, con scambio tra due differenti cromosomi (interscambio) o tra i due segmenti di uno stesso cromosoma (intrascambio);
- c) l'assenza di riparazione, come nel caso della delezione terminale, che è l'unica aberrazione cromosomica caratterizzata da una sola rottura (11).

Le aberrazioni cromosomiche vengono distinte in stabili e instabili in funzione della loro capacità di trasferirsi nelle successive generazioni cellulari (Fig. 3) (28,37).

Le aberrazioni stabili, che comprendono la traslocazione e l'inversione pericentrica, comportano generalmente la conservazione del materiale cromosomico e sono caratterizzate dall'assenza del frammento acentrico.

Per la loro capacità di passare nei cicli cellulari successivi sono potenzialmente più gravi delle aberrazioni instabili.

La loro identificazione comporta un notevole impegno in quanto richiede l'osservazione di numerose metafasi attraverso il "montaggio" del kariogramma e l'impiego di tecniche di bandeggio (preferibilmente di tipo R), ma possono risultare comunque utili per definire il momento dell'irradiazione, quando questa non sia recente.

Le aberrazioni instabili sono caratterizzate dalla presenza di un frammento acentrico il cui mancato "aggancio" al fuso mitotico per l'assenza del centromero, impedisce la suddivisione in parti uguali del materiale

Fig.3 - Aberrazioni cromosomiche linfocitarie indotte dalle radiazioni ionizzanti. Con (S) e con (I) sono indicate rispettivamente le aberrazioni stabili e quelle instabili. In "anafase" e in "telofase" compaiono i meccanismi di formazione dei ponti in anafase e dei micronuclei. L'aggiunta di citocalasina B alla coltura linfocitaria in assenza di colchicina, determina in telofase il blocco della citocinesi (o citodieresi), alterando la funzione dei microfilamenti actino-miosinosimili costituenti l'anello equatoriale contrattile. Questa proprietà della citocalasina B può essere utilizzata nella standardizzazione del conteggio dei micronuclei in cellule binucleate per blocco della citocinesi (CB method)(18).

(da Coggle (11), Lloyd e Dolphin (28) modificate)

	INTRASCAMBIO						INTERSCAMBIO			
	(S) INVERSIONE PERICENTRICA	(O) FRAMMENTO (DELEZIONE TERMINALE)	(O) MINUTE (DELEZIONE INTERSTIZIALE)	(O) ANELLO CENTRICO E FRAMMENTO	(O) ANELLO ACENTRICO	(O) DICENTRICO E FRAMMENTO	(S) TRASLOCAZIONI			
RIPARAZIONI								STADIO G ₀ DELL'INTERFASE	OSSERVAZIONE	METAFASE
									ANAFASE	

cromosomico tra le due cellule figlie, determinando con frequenza molto elevata effetti letali a livello cellulare. L'abbandono del frammento acentrico nel citoplasma di una delle due cellule figlie porterà alla formazione di un micronucleo (Fig.3) (11, 23).

A tale riguardo merita precisare brevemente che l'utilizzazione dei micronuclei per scopi di dosimetria biologica risulta essere sempre più promettente, soprattutto con il progredire delle tecniche di indagine, che tendono a rendere questa metodologia alternativa adeguatamente accurata e di non difficile esecuzione (particolarmente interessante appare la metodica di "blocco citocinetico" mediante citocalasina B (CB- method) messa a punto recentemente da M. Fenech e A.A. Morley) (18).

Le aberrazioni instabili comprendono:

- a) dicentrici (più raramente tricentrici, quadricentrici, etc.) con frammenti associati;
- b) anelli centrici con frammenti associati;
- c) acentrici suddivisi in frammenti (delezioni terminali), "minutes" (delezioni interstiziali), anelli acentrici (28).

I dicentrici si formano dalla ricongiunzione di due cromosomi che abbiano subito nello stadio G_0 (o G_1) la rottura di uno dei due segmenti che li compongono.

I dicentrici (con i loro frammenti associati) rappresentano circa il 60% di tutte le aberrazioni instabili osservate in seguito a irradiazione acuta, sono facilmente riconoscibili all'osservazione microscopica attraverso i due centromeri, hanno un basso background (circa 1/1000 cellule) (30).

La streptonigrina e la bleomicina risultano essere le uniche sostanze capaci di indurre, oltre alle radiazioni ionizzanti, la formazione di queste aberrazioni (26, 27).

Per tali caratteristiche i dicentrici rappresentano l'aberrazione cromosomica chiave nel campo della dosimetria citogenetica e costituiscono il riferimento principale per la costruzione della curva di calibrazione dose-effetto.

Gli anelli centrici si formano dalla ricongiunzione dei due segmenti di uno stesso cromosoma dopo che questi, nello stadio G_0 (o G_1), hanno subito rispettivamente una rottura e hanno un'incidenza di circa il 5%

rispetto a quella dei dicentrici (30).

I dicentrici e gli anelli centrici subiscono una clearance di circa il 50% per divisione cellulare (11).

Gli acentrici hanno un'incidenza spontanea di circa 1/250 cellule e aumentano per stimoli "non radiologici" (mutageni chimici) (30).

Di particolare interesse é il potenziamento del danno cromosomico indotto nei linfociti umani dalla irradiazione con raggi x in presenza di iodio (12).

In bambini sottoposti ad angiocardigrafia é stato osservato un aumento significativo (di 2-3 volte) delle aberrazioni cromosomiche e dei micronuclei rispetto ai controlli che avevano subito analoga esposizione senza mezzo di contrasto iodato.

Il potenziamento dell'effetto delle radiazioni ionizzanti é sostanzialmente riferibile ad un incremento della dose assorbita, dovuto all'elevata sezione d'urto per effetto fotoelettrico dello iodio per i raggi x, ed é valutato mediante il parametro "dose enhancement factor" (DEF) (12). Questo fenomeno é di entità trascurabile nel caso dell'esposizione a radiazioni γ del Co-60, anche a dosi elevate.

Il potenziamento dell'effetto delle radiazioni ionizzanti in presenza di iodio ha evidenti implicazioni pratiche nella stima della dose al paziente.

Inoltre, il mezzo di contrasto iodato presenta di per sé un effetto clastogenico, dimostrato da un aumento della frequenza degli acentrici con possibile "simulazione" di una dose da radiazioni ionizzanti (il numero degli acentrici prodotto da una concentrazione di 0,1 mol di Angioconray- 80% nel campione di sangue é correlabile ad una dose-equivalente di raggi x di circa 0,5 Gy) (12).

ASPETTI MATEMATICI E STATISTICI

Le curve di calibrazione ottenibili mediante il conteggio delle aberrazioni cromosomiche radioindotte a dosi prefissate possono essere espresse sotto il profilo matematico mediante equazioni idonee a descrivere analiticamente la relazione dose-effetto considerata.

Le curve di calibrazione fanno prevalentemente riferimento ai dicentrici, ma possono essere costruite anche sulla base del conteggio degli anelli centrici, di questi con i dicentrici, dei frammenti.

La formazione dei dicentrici (e degli anelli centrici) richiede, come già detto, due rotture cromosomiche che possono essere prodotte sia da una singola traccia, che da due tracce ionizzanti.

Con radiazioni di alto LET, capaci cioè di determinare una maggiore densità di ionizzazione, aumenta la probabilità che le due rotture siano indotte da una sola traccia ionizzante.

In questo caso la relazione tra numero di aberrazioni cromosomiche e la dose è di tipo lineare ed è adeguatamente descritta dalla funzione matematica

$$Y = \alpha D$$

dove Y è uguale a dicentrici/cellula, α è una costante che esprime la qualità delle radiazioni e quindi la pendenza della retta, D è la dose in Gy (o in rad).

Le aberrazioni correlate alla funzione lineare sono indipendenti dagli effetti dell'intensità di dose.

Come è stato osservato in linfociti umani irradiati "in vitro", seguono la relazione lineare dose-effetto le particelle α dell'Am-241, i neutroni del Cf-252, i neutroni di fissione con energia di 0,7; 0,85 e 0,9 MeV (16, 32) (Fig.1).

Con il decrescere del LET (questo avviene ad esempio nei neutroni con l'aumentare della loro energia) aumenta progressivamente la probabilità che le due rotture determinanti la formazione dei dicentrici (e degli anelli centrici) siano causate da due tracce ionizzanti (la densità di energia depositata è più bassa).

Pertanto, per descrivere adeguatamente la relazione dose-effetto per radiazioni di basso LET è necessario aggiungere un secondo termine di tipo quadratico alla funzione precedente che diviene:

$$Y = \alpha D + \beta D^2$$

dove β è una costante di significato analogo a quello della costante α .

La relazione dose-effetto di tipo lineare quadratico è stata dimostrata su linfociti irradiati "in vitro" con neutroni di energia di 7,6 e 14,7 MeV e

con raggi X e γ (Fig.1) (16, 32).

Merita precisare al riguardo che radiazioni di basso LET rispondono comunque alla relazione lineare $Y = \alpha D$ per dosi fino a 0.5 Gy.

Per ottenere una ragionevole ed adeguata accuratezza statistica, la dosimetria citogenetica richiede necessariamente l'esame di un numero elevato di cellule in metafase, soprattutto se la dose assorbita è bassa.

Il numero delle cellule osservate regola il livello di sensibilità del metodo (cioè la soglia dosimetrica), determina l'ampiezza dell'intervallo fiduciale, influenza il grado di sovrapposizione con la distribuzione statistica di Poisson.

Nelle esposizioni accidentali di "significato medico" è ritenuta abitualmente sufficiente sul piano operativo la lettura di circa 500 cellule in metafase (piastre metafasiche).

In alcune particolari circostanze la lettura viene limitata a 200 e talvolta estesa a 1000 metafasi (30).

Secondo un altro criterio di lettura, l'equivalente di dose al corpo intero è considerato pari a 0 Gy quando non siano stati osservati dicentrici in 300 metafasi (26).

La soglia della dosimetria citogenetica è fissata generalmente intorno a 0.1 Gy per le radiazioni di basso LET (per i neutroni di fissione tale soglia può essere considerata inferiore) (30).

Altri parametri fondamentali da considerare ai fini di questo tipo di dosimetria sono i limiti fiduciali prescelti in genere al 95%, cioè i limiti entro i quali con una probabilità del 95% (19 probabilità su 20) si colloca la stima biologica della dose assorbita (Fig.4) (26). I limiti fiduciali si restringono con l'aumentare del numero N delle cellule osservate con una dipendenza del tipo $1/\sqrt{N}$, migliorando così l'affidabilità della metodica citogenetica (Fig.5) (14).

A titolo esemplificativo si rivela dalla Tab.I che, nelle specifiche condizioni considerate, l'equivalente di dose al corpo intero di 0 Gy ha un limite fiduciale superiore di 0.31 Gy in rapporto alla lettura di 200 cellule e che questo limite si riduce a 0.15 Gy quando le cellule osservate sono 500 (il limite fiduciale inferiore è di 0 Gy in ambedue i casi) (41).

Da questa esemplificazione appare inoltre evidente l'importanza operativa e medico-legale dell'abbassamento del limite fiduciale superiore, quando questo venga a collocarsi, per irradiazione globale-esterna, intorno

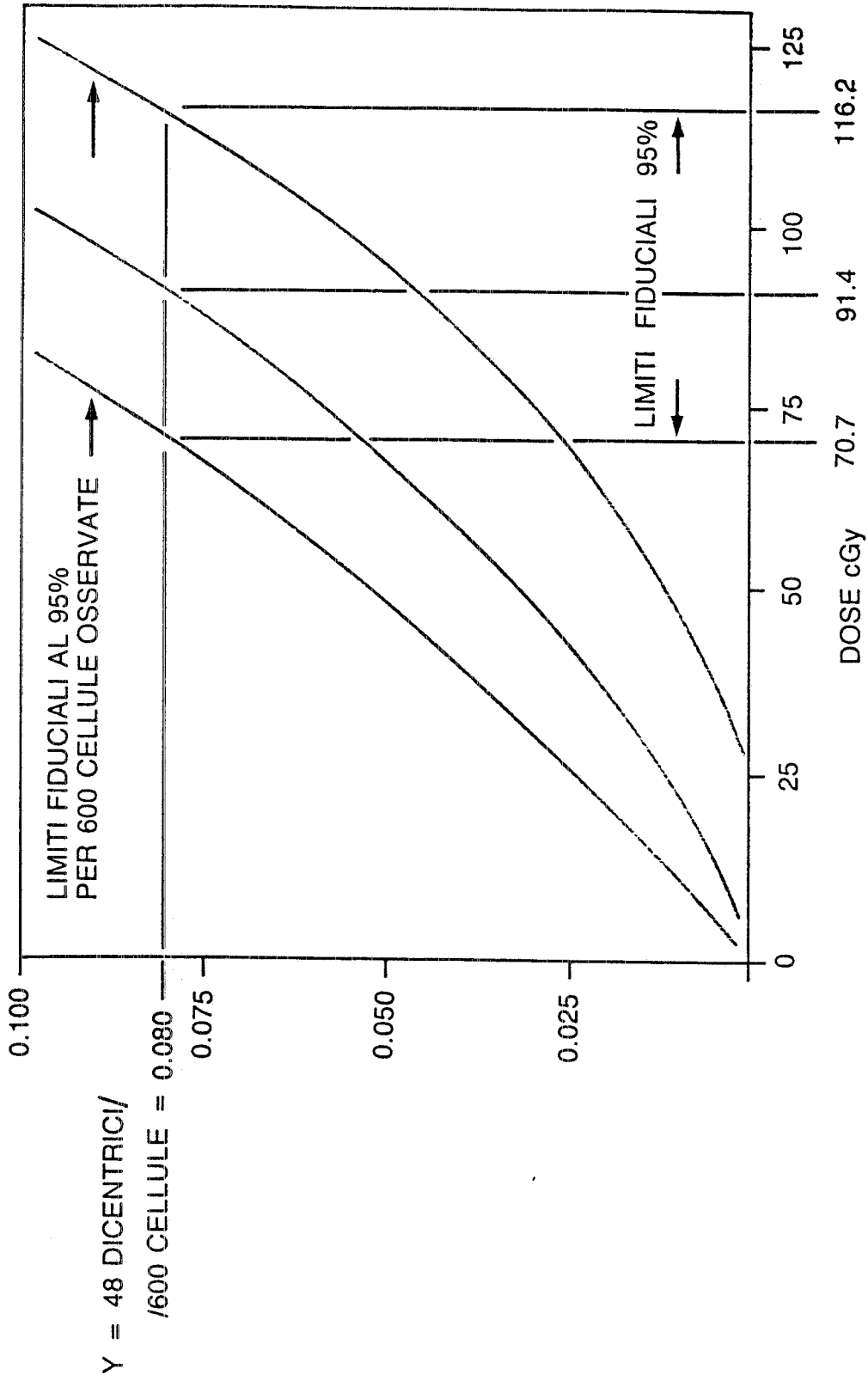


Fig. 4 - Stima dosimetrica (equivalente di dose al corpo intero con valutazione dei limiti fiduciali al 95%) in un caso di esposizione accidentale a radiazioni γ di una sorgente di Ir-192.

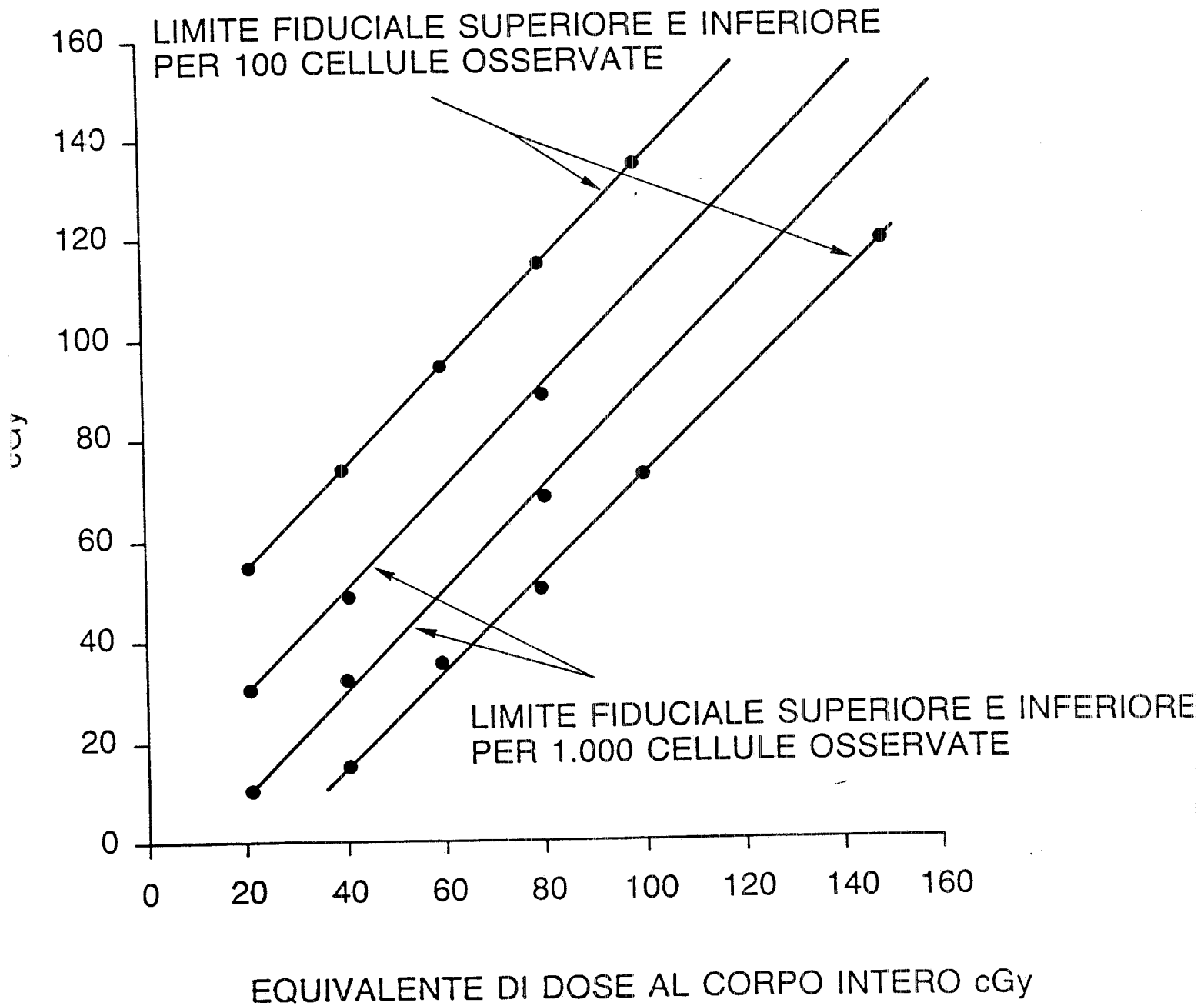


Fig. 5 - Limiti fiduciali al 95% ottenuti esaminando rispettivamente 100 e 1.000 cellule.

(da Dolphin (14))

Tab.I

Equivalente di dose al corpo intero con limiti fiduciali al 95% in rapporto al numero dei dicentrici osservati rispettivamente in 200 e 500 cellule (raggi X da 250 kV, intensità di dose 97 cGy/min)

Limiti fiduciali al 95%

Dicentrici/cellule	Equivalente di dose al corpo intero (cGy)	Limite inferiore (cGy)	Limite superiore (cGy)
0/200	0	0	31
1/200	11	1	42
2/200	20	3	50
3/200	27	7	52
4/200	33	11	63
5/200	39	16	68
0/500	0	0	15
1/500	5	<1	21
2/500	9	<1	26
3/500	11	3	30
4/500	16	5	33
5/500	20	7	37

(da Vulpis (41) modificata)

alla dose di 25 rem (0.25 Sv). Il superamento di questa dose determina, come è noto, la ricorrenza dell'obbligo della sorveglianza medica eccezionale.

Poiché nelle irradiazioni x e γ (basso LET), di più comune osservazione, le aberrazioni cromosomiche vengono prodotte a random come eventi rari a carattere discreto, la probabilità della loro presenza in una popolazione cellulare esposta può essere ben descritta ai fini statistici dalla distribuzione di Poisson, che può essere considerata valida per l'esposizione acuta omogenea al corpo intero e quando sia stato osservato un numero elevato di cellule (16, 30, 32).

La distribuzione di Poisson è interamente definita da un solo parametro, cioè dalla media della distribuzione (in dosimetria citogenetica $Y = \text{dicentrici/cellula}$), ed esprime la probabilità che un certo evento si verifichi n volte (distribuzione dei dicentrici nelle cellule) in una situazione in cui esso si verifica in media Y volte. In questo tipo di distribuzione la varianza è pari alla media, ovvero la deviazione standard è uguale alla radice quadrata della media (nell'esposizione a radiazioni di alto LET, come i neutroni, la distribuzione statistica è caratterizzata da una varianza maggiore della media).

La distribuzione di Poisson, è espressa per la media Y dalla funzione matematica (Fig.6):

$$P_Y(n) = e^{-Y} \frac{Y^n}{n!}$$

dove

$Y =$ dicentrici/cellula (osservati nel campione)

$n =$ 0,1,2,..... dicentrici distribuiti nelle cellule

$e =$ 2,7183 base dei logaritmi neperiani (e^{-Y} può essere calcolato per mezzo di una tavola dei logaritmi)

$n!:$... $0! = 1$... $1! = 1$... $2! = 1 \times 2 = 2$... $3! = 1 \times 2 \times 3 = 6$, ...

La curva poissoniana per piccoli valori di Y ha un andamento

asimmetrico con tendenza a sinistra, mentre tende a sovrapporsi ad una gaussiana al crescere di Y . E' evidente che nella dosimetria citogenetica, in cui comunemente Y è inferiore a 1, la curva poissoniana avrà il primo andamento (Fig.6).

La curva poissoniana nel caso in questione definisce la probabilità con cui nella popolazione (praticamente infinita) dei linfociti del soggetto in esame si trova un numero di dicentrici per cellula pari a n avendone trovati mediamente Y in un campione (per es. di 500 cellule).

Fondamentale per la dosimetria citogenetica è la comparazione della distribuzione della frequenza del numero dei dicentrici per cellula risultante dall'osservazione diretta con la distribuzione della Poisson teorica, calcolata nel caso in esame sulla base della media Y (Tab. II) (16).

La sostanziale coincidenza dei valori teorici della distribuzione con quelli osservati dimostrerà che l'esposizione acuta è di tipo uniforme al corpo intero.

Invece, nella esposizione parziale e nella esposizione non omogenea la distribuzione è "non Poisson" per la sovradisersione della distribuzione dei dicentrici per cellula e/o per la loro distribuzione bimodale (16, 32). La sovradisersione è indicata da valori maggiori di 1 del rapporto varianza/ Y (indice di dispersione) (questo andamento della distribuzione è presente anche nell'esposizione a radiazioni di alto LET).

Molto illustrativo al riguardo è il caso descritto da Jammet et al., relativo all'esposizione accidentale, con esito mortale, avvenuta a Brescia nel 1975 (Fig.7) (22).

La dosimetria citogenetica, sulla base di $Y = 4,77$ dicentrici / cellula, nonché della lettura sulla curva di calibrazione di riferimento per il Co-60, indicava un equivalente di dose al corpo intero di 11,55 Gy.

Tuttavia, la distribuzione della frequenza dei dicentrici osservati non seguiva la tipica distribuzione di Poisson per la presenza di un andamento bimodale, la cui prima componente veniva correlata ad una dose di 8,7 Gy e la seconda ad una dose di oltre 30 Gy.

Venivano inoltre osservate cellule con 13, 14 e 15 dicentrici ciascuna, interpretabili come segni di irradiazione circoscritta, e tutto ciò nel contesto di una sovradisersione della distribuzione.

Il quadro citogenetico indicava pertanto una distribuzione disomogenea dell'irradiazione con una forte concentrazione distrettuale, in

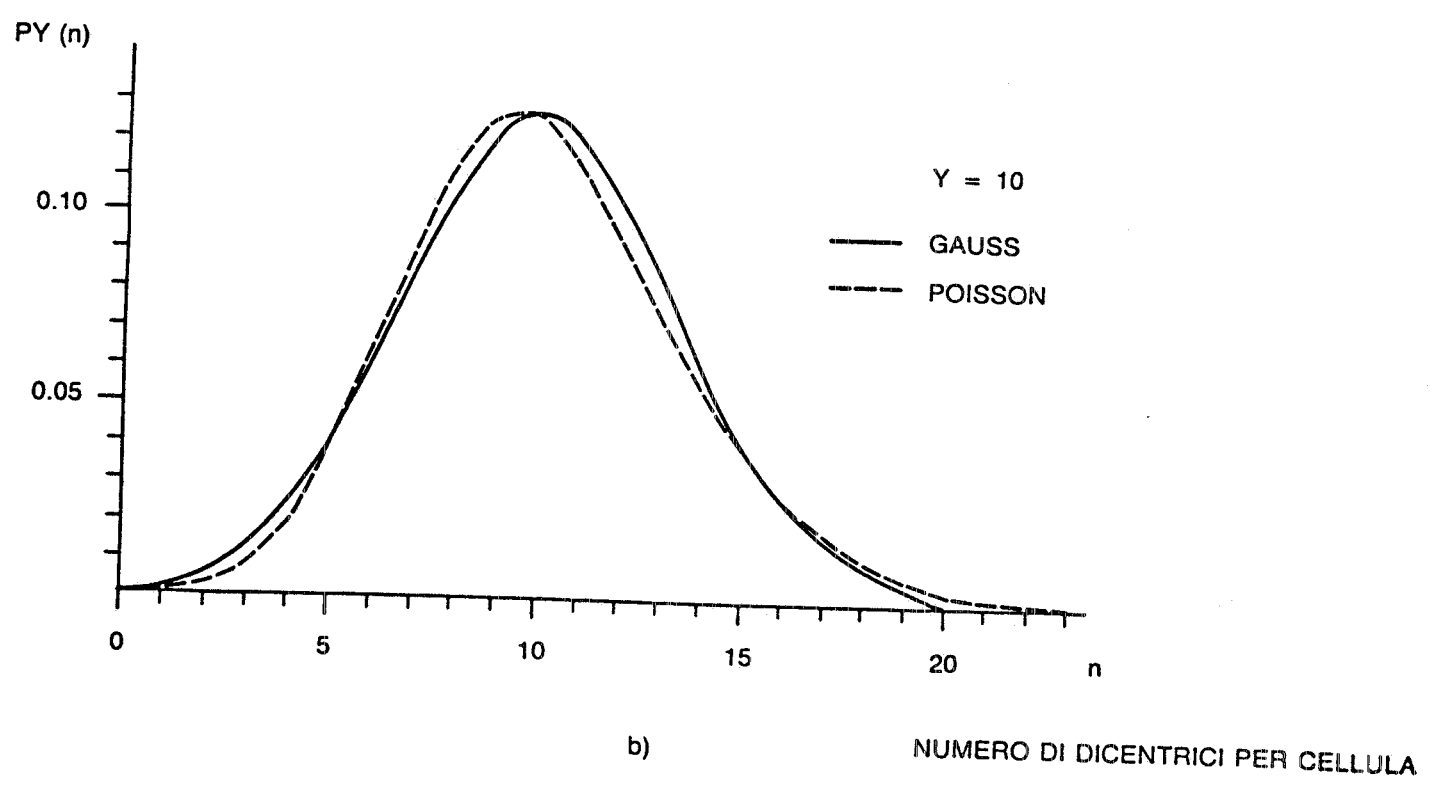
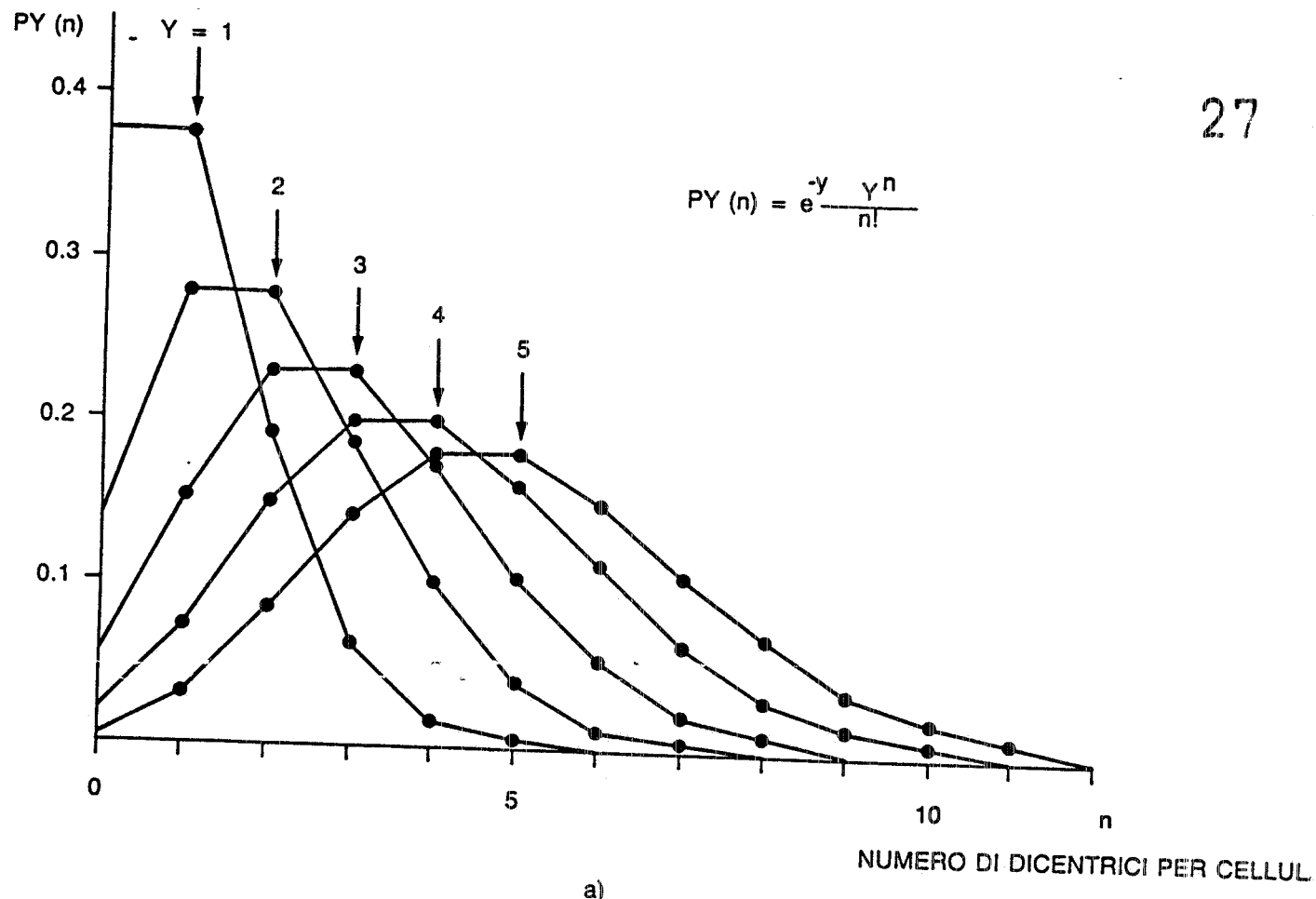


Fig. 6 - a) Distribuzione di Poisson e dosimetria citogenetica
 b) Distribuzione di Gauss e distribuzione di Poisson per $Y = 10$.

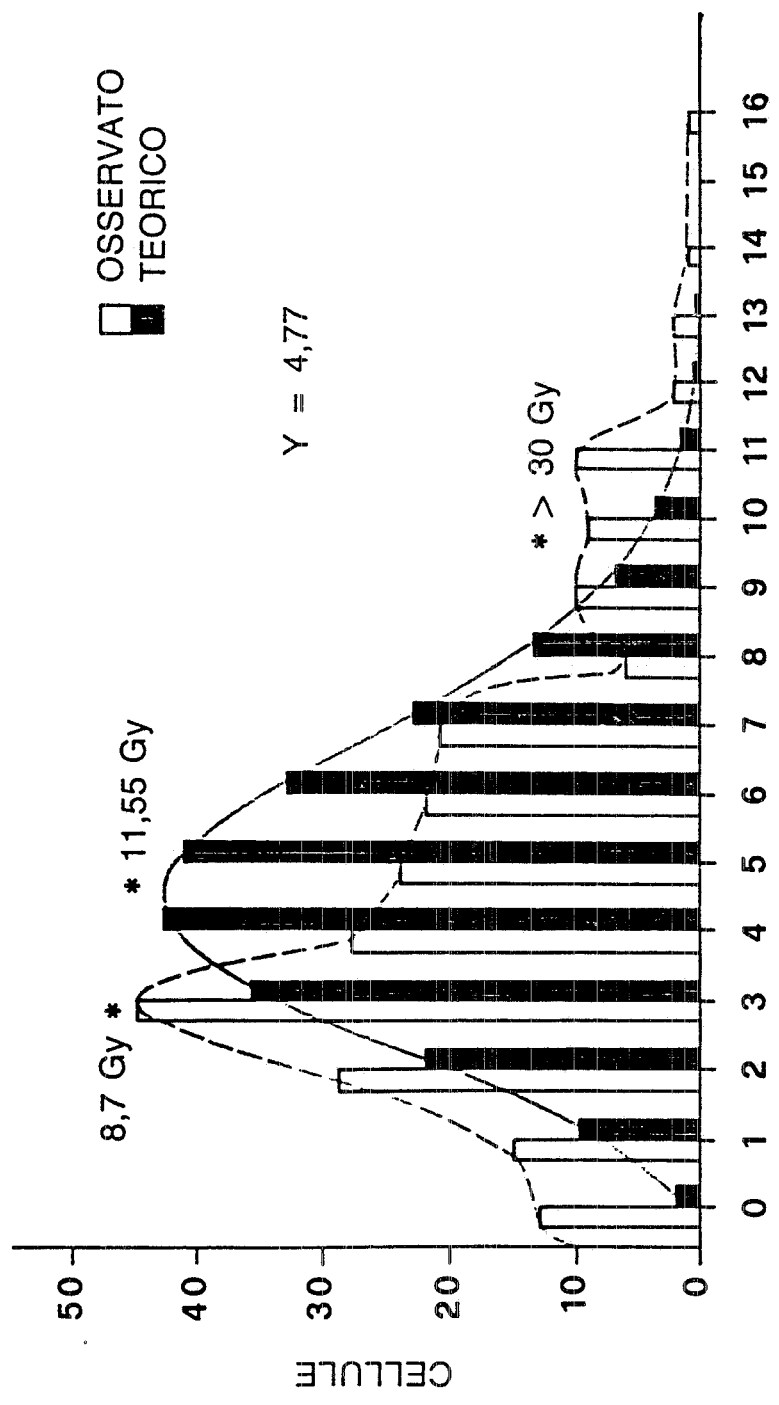
Tab. II

Determinazione di Y(dicentrici/cellula) in funzione di dosi scalari per irradiazione γ "in vitro" da Ir-192 (costruzione curva dose-effetto). Analisi della distribuzione delle frequenze del numero dei dicentrici per cellula (teorica con distribuzione di Poisson e osservata)

Dose (cGy)	Dicentrici	Cellule	Y	Frequenza delle cellule in funzione del numero dei dicentrici						Probabilità ^a	
				0	1	2	3	4	5		
50	7	300	0,023	teorica	293	7	0	0	0	0	>0.90
				osservata	293	7	0	0	0	0	
100	20	200	0,100	teorica	181	18	1	0	0	0	>0.67
				osservata	180	20	0	0	0	0	
200	33	100	0,330	teorica	72	24	4	0	0	0	>0,12
				osservata	74	20	5	1	0	0	
400	218	200	1,090	teorica	67	73	40	15	4	1	>0.89
				osservata	59	80	46	14	1	0	

^a Probabilità calcolata mediante "unit normal deviate values".

(da Du Frain et al.(16))



NUMERO DEI DICENTRICI PER CELLULA

Fig.7 - Distribuzione della frequenza del numero dei dicentrici per cellula nel caso di irradiazione accidentale di Brescia (1975).

(da Jammet et al. (22), modificata)

accordo con la sindrome clinica che denunciava una compromissione neurologica riferibile ad una dose molto elevata in corrispondenza della regione cervicocefalica (encefalopatia microemorragica).

La distribuzione di Poisson é , come già detto, sostanzialmente di tipo asimmetrico e tende ad attenuare questa sua caratteristica in funzione dell'aumento dei valori medi (soltanto per $Y=10$, valore molto improbabile in dosimetria citogenetica, la distribuzione di Poisson é praticamente indistinguibile dalla distribuzione normale) (Fig.6).

Questa proprietà, consistente in una tendenza a sinistra della curva, poiché comporta una asimmetria nei limiti fiduciali superiore e inferiore, consente di assegnare una maggiore attendibilità ai valori di dose più bassi.

ASPETTI METODOLOGICI

La dosimetria citogenetica richiede un comune prelievo di sangue venoso che deve essere effettuato seguendo alcuni semplici accorgimenti.

Le modalità per il prelievo dei campioni di sangue e per il loro invio al Laboratorio specializzato sono le seguenti:

- 1 - Disinfettare accuratamente l'avambraccio con alcool-etero e prelevare sterilmente circa 20 ml di sangue venoso, seguendo la comune tecnica dei prelievi di sangue con siringa di vetro o di plastica sterili.
- 2 - Distribuire il sangue in due provette di plastica eparinizzate sterili da 10 ml (consigliabili le provette Stayne).
- 3 - Tappare le provette ed agitare prontamente, ma delicatamente il contenuto.
- 4 - Apporre sulle provette una etichetta con il nome ed il cognome del soggetto, la data, e l'ora del prelievo.
- 5 - Far pervenire il campione presso il Laboratorio specializzato al più presto possibile, e comunque non oltre 48-72 ore dal prelievo, mantenendo il campione a temperatura ambiente, e comunque non superiore a 20-25 °C e non inferiore a 4° C.

- 6 - Preavvertire il Laboratorio indicando provenienza, numero dei campioni, data e modalità della spedizione.
- 7 - E' essenziale aggiungere alla richiesta il nome, l'indirizzo ed il recapito telefonico del Medico Autorizzato, o comunque della Autorità sanitaria che é intervenuta. Il risultato dell'esame verrà in ogni caso comunicato solamente al medico Autorizzato o a detta Autorità sanitaria.

Queste modalità, desunte dalla documentazione ENEA (già CNEN) (41) fanno parte del "Protocollo di cooperazione tra i Laboratori Nazionali di Frascati dell'INFN e l'Ospedale Civile di Frascati (U.S.L. Roma 29) in caso di sovraesposizione accidentale alle radiazioni ionizzanti" (la disponibilità del Laboratorio di analisi chimico-cliniche dell'Ospedale é garantita 24 ore su 24).

La coltura linfocitaria "in vitro" viene effettuata a 37° C su apposito terreno sintetico addizionato di siero bovino e di fitoemoagglutinina.

Le metafasi vengono bloccate alla 45^a ora mediante aggiunta di colchicina, mentre la fase di incubazione della coltura si conclude alla 48^a ora.

Successivamente si procede alla concentrazione delle cellule mediante centrifugazione, al trattamento con soluzione ipotonica, alla fissazione con miscela di acido acetico e metanolo, alla distribuzione e alla colorazione su vetrini portaoggetto (41).

La scelta del termine di 48 ore per l'incubazione della coltura dipende dal fatto che in questa fase la maggior parte delle cellule é nella prima mitosi e pertanto il numero dei dicentrici eventualmente presenti risulta immutato.

Successivamente, intorno alla 72^a ora, periodo in cui prevalgono le seconde mitosi, il numero dei dicentrici può diminuire a causa della loro caratteristica di aberrazioni cromosomiche instabili (41). In tale caso la dose può risultare sottostimata.

Recentemente alcuni Laboratori di dosimetria citogenetica hanno integrato la metodica della coltura linfocitaria mediante l'aggiunta di 5-bromodesossipurina (BrdU), allo scopo di avere conferma che le cellule in mitosi si trovino nello stadio della prima divisione (16, 32).

La BrdU tende a sostituirsi nello stadio di sintesi alla timidina del

DNA e mostra una minore affinità per il Giemsa (metodo BrdU-Giemsa).

Pertanto, mentre nella prima mitosi i cromatidi restano uniformemente scuri (la "filiera" scura del DNA prevale su quella chiara), alla seconda divisione mitotica la BrdU aggiunta al terreno di coltura permette la colorazione differenziale dei cromatidi fratelli dello stesso cromosoma, realizzando il cosiddetto "effetto Arlecchino" (Harlequin effect) (Fig.8) (34, 38, 42).

E' opportuno che il conteggio delle aberrazioni cromosomiche sia eseguito sullo stesso campione da più persone che abbiano dimostrato una sperimentata concordanza nella lettura.

Viene stimato che circa il 50% del tempo é speso dagli osservatori per la identificazione delle metafasi al microscopio (32). Le metafasi dopo essere state identificate e localizzate a piccolo ingrandimento, vengono osservate nel dettaglio ad ingrandimento maggiore e ad immersione (Fig.9).

Le cellule considerate sono soltanto quelle euploidi (46 cromosomi) e vengono registrati tutti i tipi di aberrazioni cromosomiche, anche se sostanzialmente saranno utilizzati i dicentrici nella stima della dose mediante l'apposita curva di calibrazione dose-effetto. L'identificazione dei frammenti associati ai dicentrici (e agli anelli centrici) consente di disporre di un prezioso "consenso diagnostico" (28).

Per la lettura della dose é importante che il Laboratorio disponga di curve di calibrazione ottenute con le stesse modalità tecniche adottate per l'esame dei campioni.

L'impegno per l'osservazione delle metafasi e per il conteggio delle aberrazioni cromosomiche é stato variamente valutato.

Presso il Laboratorio di citogenetica del National Radiological Protection Board (N.R.P.B.), U.K., si assume un impegno di 2 giorni/uomo per leggere al microscopio 500 cellule (32).

Il suddetto Laboratorio svolge permanentemente dal 1967 un servizio di dosimetria biologica e fino al 1982 erano stati analizzati 611 campioni di sangue (Tab.III e Tab. IV) (31).

Il Radiation Emergency Assistance Center/Training Site (REAC/TS) delle Oak Ridge Associated Universities (ORAU), che svolge un servizio analogo al precedente, indica invece un impegno di 1 giorno/uomo per leggere al microscopio 50 cellule (18.902 metafasi/378 giorni di osservazione al microscopio) (16).

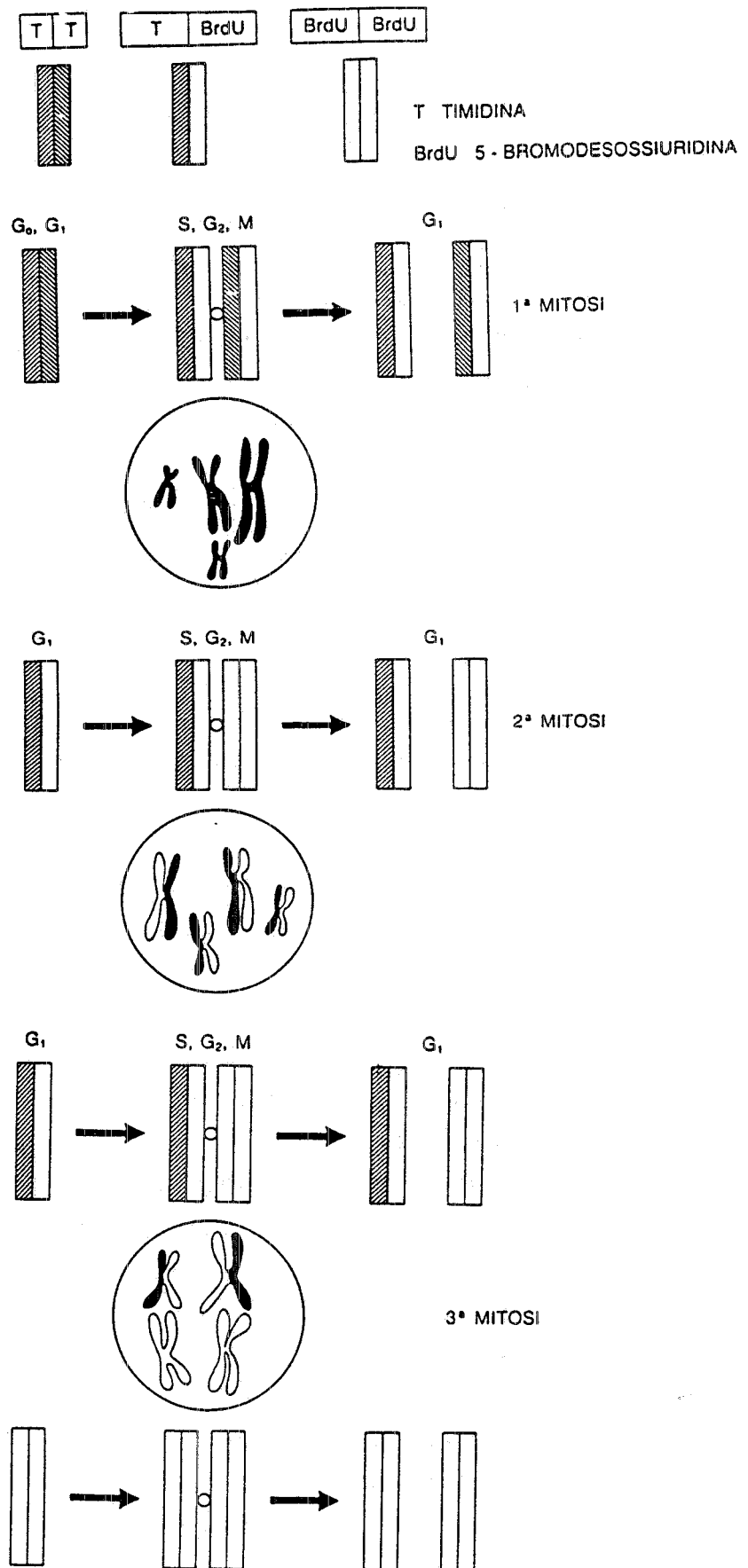
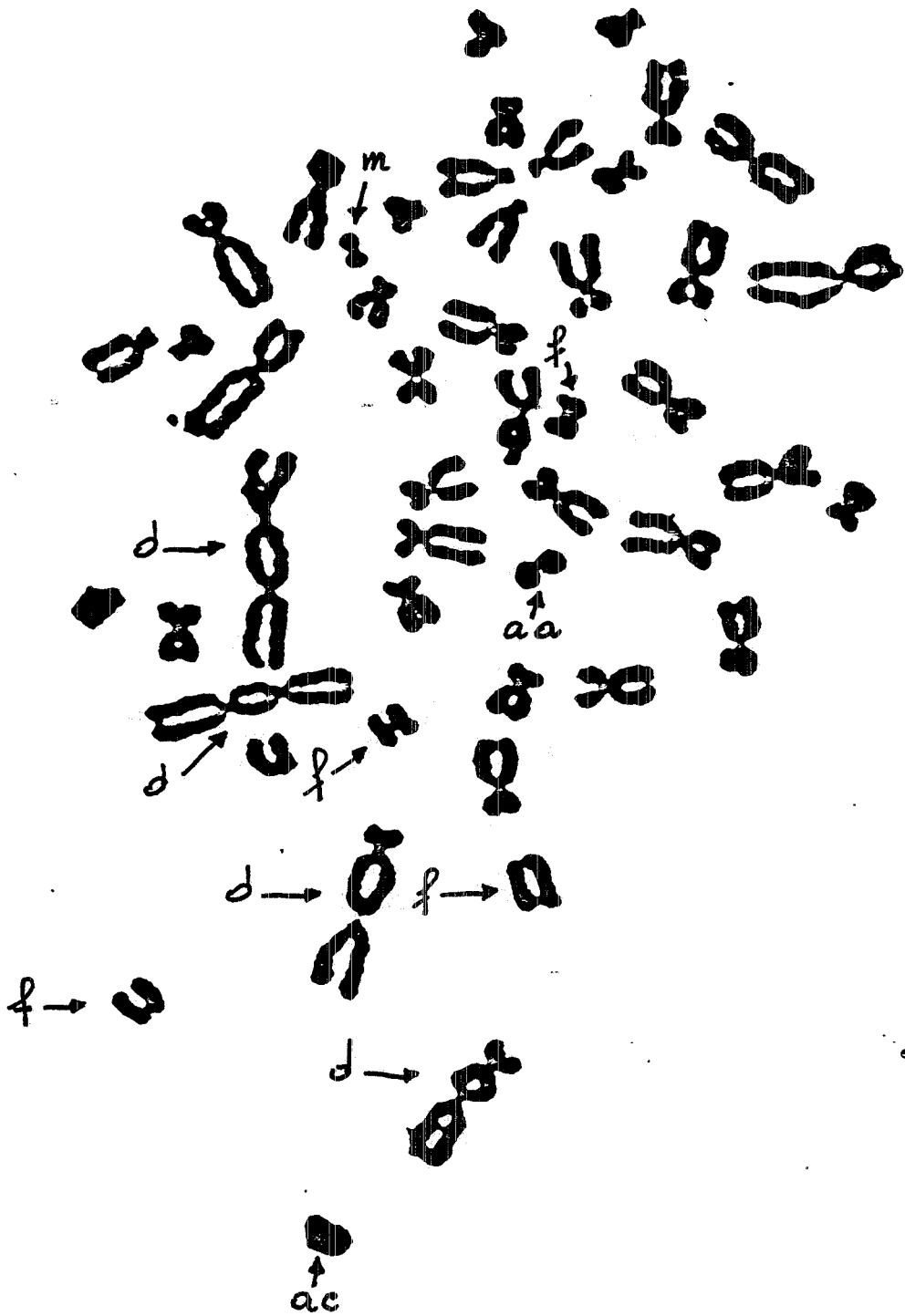


Fig. 8 - Effetto Arlecchino (Harlequin effect). I cromatidi T/BrdU appaiono scuri all'osservazione microscopica in metafase perché la "filiera" del DNA più colorata dal Giemsa per la presenza della Timidina maschera quella più chiara per la presenza del BrdU (metodo BrdU-Giemsa).

Fig. 9 - Piastre metafasiche. In a) e b) dicentrico con frammento associato. In c) presenza di 4 dicentrici (d) con i frammenti associati (f), di un anello centrico (ac), di un anello acentrico (aa) e di un "minute" (m).



a)



c)

Tab.III

Aberrazioni cromosomiche osservate presso il Laboratorio di citogenetica del
National Radiological Protection Board, U.K., nel periodo 1967 - 1982
(611 casi)

Cellule (piastre metafasiche)	Dicentrici	Anelli centrici	Acentrici
266.200 ^a	710 ^b	48 ^c	1.754

^a 436 cellule/persona

^b 2,7 dicentrici/1000 metafasi

^c anelli ~ 7% dei dicentrici

(da Lloyd et al. (31), modificata)

Tab. IV

Distribuzione comparativa delle stime di dose effettuate
mediante dosimetria fisica e dosimetria biologica (NRPB - R 148, 1983)

Tipo di dosimetria	Range di dose (Sv o Gy)					Stima non possibile	Totale casi
	0-0,09	0.1-0,29	0,3-0,99	1-9,99	10 e oltre		
fisica (film badge, TDL)	170	78	89	68	31	175	611
	-----					-----	
	71%					29%	
citogenetica	435	115	10	3	0	48	611
	-----		-----			-----	
	90%		2%			8%	

(da Lloyd et al.(31), modificata)

Merita precisare che il solo studio del kariogramma, di norma effettuato su poche piastre metafasiche, non può avere in alcun caso valore dosimetrico.

Anche le aberrazioni cromatidiche non si prestano per stime dosimetriche, sia per il loro particolare meccanismo di induzione nello stadio S del ciclo cellulare, sia per l'azione di confondimento determinata dalla produzione di tali aberrazioni da parte di infezioni virali e di sostanze chimiche, compresi i farmaci (26).

Inoltre, sono disponibili dati che dimostrano una significativa correlazione positiva delle aberrazioni cromatidiche con l'età (17), nonché osservazioni che evidenziano la possibilità di produzione di tali aberrazioni nel corso della coltura cellulare (8).

I cosiddetti "sister chromatid exchanges" (SCEs) (scambi fra cromatidi fratelli o più semplicemente scambi intercromatidici), visualizzabili mediante la metodica BrdU-Giemsa (Fig.10), possono essere indicatori sensibili della esposizione a molte sostanze chimiche, ma non della esposizione alle radiazioni ionizzanti (20, 27, 38, 43). Un modesto aumento di SCEs è stato osservato in linfociti umani esposti a radiazioni ionizzanti dopo incorporazione di BrdU, di cui è nota l'azione radiosensibilizzante, ma non in linfociti irradiati prima della coltura cellulare (26, 38).

Sono stati esaminati sinora gli aspetti di dosimetria citogenetica riguardanti l'irradiazione acuta omogenea al corpo intero o a grande parte di esso che, pur rappresentando una condizione di esposizione certamente non frequente, costituisce comunque un riferimento ottimale e un approccio indispensabile per lo studio dei fenomeni biologici e dei criteri interpretativi che sono alla base di questa metodologia dosimetrica.

Tuttavia, anche per le altre condizioni di esposizione (irradiazione parziale o disomogenea, irradiazione protratta o cronica, continua o frazionata, ecc.) è possibile disporre di criteri valutativi basati su parametri di tipo biologico (tempo di riparazione delle rotture cromosomiche, durata di vita dei linfociti, decremento delle aberrazioni instabili, ecc.), nonché di criteri correttivi di tipo matematico che possono portare, sia pure in non tutti i casi e non sempre con eguale efficacia, a significative stime della dose (v. Appendice)(*).

Anche questi apporti correttivi e interpretativi devono essere opportunamente registrati nella "risposta" in dosimetria citogenetica.

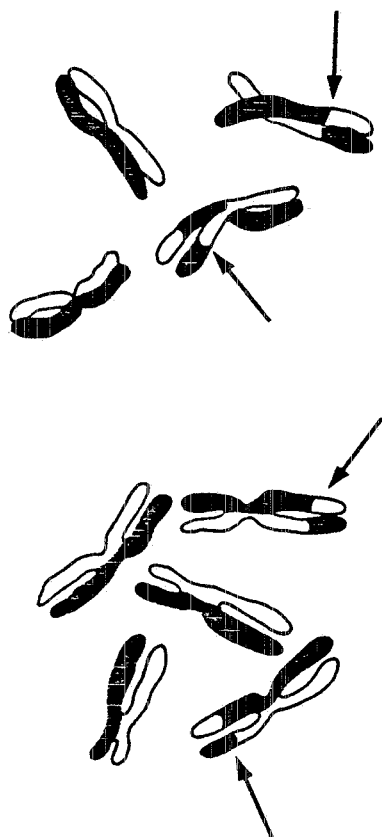


Fig. 10 - "Sister chromatid exchanges" (SCEs): scambi intercromatidici (indicati dalla freccia), visualizzati mediante il metodo BrdU-Giemsa (disegno da microfotografia).

IRRADIAZIONE PARZIALE E IRRADIAZIONE NON UNIFORME

A causa del progressivo rimescolamento dei linfociti irradiati con i linfociti non irradiati, il campione di sangue può non esprimere correttamente il rapporto tra strutture irradiate e quelle non irradiate a causa della diversa cinetica delle due popolazioni linfocitarie (30).

Effetti di distorsione sulla coltura cellulare (diminuzione del numero delle mitosi e sottostima della dose) possono derivare dai seguenti fattori:

- eliminazione di cellule irradiate per morte in interfase (fenomeno dose- dipendente);
- ritardo mitotico dei linfociti irradiati;
- fitoresponsività dei linfociti irradiati ridotta o assente.

(*) In epoca successiva alla stesura della relazione é stato pubblicato dall'IAEA il documento sotto indicato, che si segnala per la sua importanza scientifica e tecnica. I riferimenti bibliografici del documento, di cui sono autori D. Beninson, D.C. Lloyd, A.T. Natarajan, G. Obe, R.J. Preston e M.S. Sasaki, sono i seguenti: IAEA Technical Reports Series N.260, Biological Dosimetry: Chromosomal Aberration Analysis for Dose Assessment, IAEA, Vienna, 1986. Si é ritenuto opportuno integrare la relazione con una appendice dove vengono riportati sinteticamente i parametri essenziali per la stima della dose nelle varie condizioni di esposizione, per la cui elaborazione sono stati utilizzati alcuni dati desunti dalla citata pubblicazione.

Tuttavia, fino a dosi di 0.5 Gy gli effetti di distorsione non incidono in maniera significativa sul numero delle aberrazioni cromosomiche.

La dose alla quale si può risalire mediante il solo \bar{Y} (valore medio dei dicentrici per cellula) é comunque l'equivalente di dose al corpo intero, anche se trattasi di irradiazione parziale (nel qual caso la dose locale é ovviamente diversa da quella stimata a tutto il corpo).

La distribuzione dei dicentrici per cellula é di tipo non-Poisson (sovradispersione, distribuzione bimodale) e consente una stima della disomogeneità dell'irradiazione.

Nella irradiazione parziale é possibile, inoltre, calcolare orientativamente la frazione irradiata del corpo e la sua dose media utilizzando la distribuzione non-Poisson dei dicentrici osservati (Tab.V) (2, 14, 32).

ESPOSIZIONE ACCIDENTALE SUBACUTA PROTRATTA

In una esposizione accidentale, protratta per molti giorni o per alcune settimane consecutive, la dosimetria citogenetica può rilevare una incidenza molto elevata di aberrazioni.

Tuttavia la stima reale dell'entità della dose integrata può risentire dell'influenza di molteplici fattori quali:

- la scomparsa dei linfociti maggiormente danneggiati nel corso del periodo più o meno lungo di irradiazione;
- l'introduzione con le trasfusioni di cellule normali che possono entrare in competizione nelle colture con le cellule del soggetto irradiato

In queste condizioni di esposizione é spesso prevalente l'importanza diagnostica della sindrome ematologica (25).

CONTAMINAZIONE INTERNA

Attualmente non si dispone di dati sufficienti per stimare una dose

Tab. V

Stima percentuale dei linfociti irradiati nell'ipotesi di irradiazione parziale
(soggetto "professionalmente esposto" sottoposto in passato a trattamenti
radioterapici)

Dati	Numero di cellule	Dicentrici per cellula(Y)	Distribuzione dei dicentrici			Indice di dispersione ($\sigma^2/Y \pm E.S.$)	Dose(Gy)	
			0	1	2		γ	raggi X
							Co-60	220 kVp
Osservati	2000	0,035	1934	62	4	1,08 \pm 0,03 ^a	0,6 ^b	0,49 ^b
	603(30%)	0,116	537	62	4	0,99	1,35 ^c	1,09 ^c
O-truncated	Poisson							
	1397(70%)	---	1397	0	0	---	---	---

^a indice di dispersione > 1 indicativo di sovradisersione (irradiazione parziale)

^b equivalente di dose al corpo intero

^c stima di dose nell'ipotesi di irradiazione parziale

(da Bauchinger et al.(2), modificata)

media al corpo intero dovuta a contaminazione interna.

Questo a motivo soprattutto della distribuzione localizzata dei radionuclidi, in particolare degli attinidi .

L'esame citogenetico in casi di contaminazione interna con α -emettitori ha dimostrato che la distribuzione delle aberrazioni nei linfociti non segue la distribuzione di Poisson (notevole sovradisersione) (26).

Una eccezione é rappresentata dalla contaminazione interna accidentale da tritio, in quanto la sua incorporazione é di tipo sostanzialmente ubiquitario. Infatti, in questo caso é stata osservata una notevole coincidenza tra i dati della dosimetria citogenetica e l'equivalente di dose impegnata calcolata dai dati della escrezione urinaria del tritio (30).

IRRADIAZIONE CRONICA

Nel caso di dosi assorbite in modo refratto o cronico, i fenomeni di accumulo delle aberrazioni, nonché i fenomeni di decadimento delle stesse, variamente intersecantesi, rendono estremamente complessa la stima dosimetrica nel singolo soggetto. Le frequenze delle aberrazioni riscontrate al momento dell'esame rappresentano pertanto solo un indice istantaneo di fenomeni biologici precedenti, che dovrà essere oggetto, laddove é possibile, di appropriate correzioni e integrazioni.

Studi dosimetrici comparativi sono stati effettuati per verificare le concrete possibilità di utilizzazione della dosimetria citogenetica a livello individuale nella esposizione professionale al rischio da radiazioni ionizzanti, entro i limiti di dose ammessi.

A tale riguardo é interessante richiamare i parametri adottati da Bauchinger et al. per analisi del tipo considerato (2).

I parametri in questione, scelti di volta in volta, sono i seguenti:

- 1) Conversione della dose indicata dal dosimetro personale (H_p) in dose riferita al corpo intero (H_{wb}), sulla base di modelli standardizzati di esposizione, prescelti in funzione dell'analisi dell'attività lavorativa individuale.
- 2) Stima dosimetrica biologica effettuata ricercando dicentrici, anelli e

acentrici su di un numero elevato di cellule (nella maggior parte dei casi 2000 piastre metafasiche) e facendo riferimento a curve di calibrazione costruite "in vitro" su bassi ratei di dose (per radiazioni x e γ).

- 3) Stima dosimetrica biologica eseguita con metodi alternativi (tra questi il metodo Qdr di Sasaki) (36).
- 4) Correzione della dose media annuale al corpo intero sulla base dell'emivita di 3 anni dei linfociti (dose x 3/anni) o di altri valori di emivita indicati da vari studiosi.
- 5) Correzione della dose media annuale al corpo intero sulla base di un fattore di decremento esponenziale delle aberrazioni instabili verso il livello di background, considerando un'emivita linfocitaria di 3 anni $[(\text{dose/anni}) \times \sum_i \text{esp}(-0.693 \times i/3)]$.
- 6) Calcolo del coefficiente di correlazione per la relazione dose-effetto delle aberrazioni instabili (verifica della relazione lineare).
- 7) Analisi mediante distribuzione di Poisson e stima percentuale dei linfociti irradiati nell'ipotesi di esposizione parziale ("O-truncated Poisson formula") (Tab.V).

Questi studi aprono prospettive certamente interessanti, anche se necessitano di ulteriori approfondimenti e di una maggiore casistica.

SORVEGLIANZA DI POPOLAZIONI O GRUPPI A RISCHIO

La dosimetria citogenetica, per i propri limiti derivanti dalla complessità dei parametri biologici e dagli aspetti di natura statistica, al momento attuale non può essere usata individualmente sul piano operativo per esposizioni a piccole dosi comprese entro o intorno ai limiti ammessi.

Tuttavia, in conseguenza dell'accumulo delle aberrazioni nel tempo, l'analisi cromosomica può avere un certo valore di valutazione globale di gruppi di lavoratori "a rischio" in condizioni omogenee di esposizione alle

radiazioni, quando i risultati dello screening citogenetico siano opportunamente comparati con quelli di un gruppo di controllo.

In alcune indagini epidemiologiche é emerso che l'esposizione regolare alle radiazioni al di sotto del limite di dose di 50 mSv per anno, per un periodo di molti anni, può comportare un incremento di aberrazioni cromosomiche linfocitarie al di sopra del background "naturale o spontaneo" (39).

Evans et al. hanno dimostrato una incidenza significativa di aberrazioni cromosomiche in 197 lavoratori di un arsenale nucleare in U.K., controllati per un periodo di dieci anni (17).

Questi lavoratori, esposti a irradiazione γ e neutronica durante il caricamento di reattori dei sottomarini nucleari, avevano assorbito nella maggioranza dei casi dosi inferiori ai limiti di dose ammessi.

Per i dicentrici, per gli acentrici e per le cellule con aberrazioni instabili era possibile stabilire una relazione lineare tra dose accumulata e frequenza media delle aberrazioni cromosomiche.

Uno studio simile al precedente é stato effettuato in Germania da Bauchinger et al. su 57 lavoratori operanti presso sei impianti nucleari di potenza, che avevano ricevuto, per esposizione a radiazioni γ e a raggi x penetranti, dosi inferiori ai limiti ammessi in periodi di tempo compresi tra un anno e quattordici anni (1).

La frequenza dei dicentrici e degli acentrici era significativamente aumentata rispetto ai controlli, ma non poteva essere stabilita, a differenza di quanto avvenuto nello studio epidemiologico precedente, una correlazione positiva tra il numero delle aberrazioni e la dose totale accumulata.

Anche Lloyd et al., a conclusione di un indagine su lavoratori professionalmente esposti alle radiazioni ionizzanti (radiazioni γ), con dosi comprese nel range di 0.015 - 0.05 Sv per anno, hanno osservato un aumento dell'incidenza dei dicentrici e degli acentrici rispetto ai controlli (29).

In questo caso poteva essere stabilita una relazione dose-effetto di tipo lineare dopo appropriate correzioni effettuate in funzione del turnover dei linfociti.

Pohl - Ruling e Fisher, sulla base di osservazioni eseguite in Austria (Badgastein) in zone con alta radioattività naturale, hanno messo in evidenza un incremento della frequenza media delle aberrazioni (dicentrici, delezioni

interstiziali e frammenti) in rapporto alle dosi (33).

I gruppi esaminati avevano accumulato "blood burdens" da 110 a 340 mR/anno di radiazioni γ e da 1 a 1600 mR/anno di dose α .

Brandom et al. hanno sottoposto ad indagini di dosimetria citogenetica 80 minatori delle miniere di uranio in Colorado esposti al radon e ai suoi figli per dosi di 3000 WLM e oltre (5).

Nei minatori l'incidenza dei dicentrici e degli anelli é risultata maggiore (di 3 volte) rispetto a quella osservata nei controlli.

La frequenza delle inversioni, delle traslocazioni, delle delezioni terminali e interstiziali mostrava un aumento dose-dipendente fino a 3000 WLM.

In un altro studio di Brandom et al., effettuato negli Stati Uniti su lavoratori con contaminazione interna da plutonio nel range di dose media accumulata compreso tra 0.03 e 0.33 Sv, veniva rilevato un aumento significativo della frequenza dei dicentrici, degli anelli, delle inversioni, delle traslocazioni e delle delezioni (6).

La dosimetria citogenetica applicata a questo particolare ambito rappresenta al momento attuale soltanto un campo di ricerca, ma può offrire per il futuro una prospettiva concreta per una valutazione delle dosi alternativa e comunque complementare rispetto alla dosimetria fisica.

SISTEMI DI SCREENING AUTOMATICO PER LA DOSIMETRIA CITOGNETICA

La sensibilità e l'accuratezza statistica della dosimetria citogenetica migliorano progressivamente con l'aumentare del numero delle cellule osservate.

Ciò é particolarmente importante per abbassare il più possibile la soglia della metodica, per ridurre l'incertezza statistica mediante il restringimento dell'intervallo fiduciale, per consentire un uso appropriato e vantaggioso della distribuzione di Poisson, soprattutto quando questo strumento statistico venga impiegato nella stima dosimetrica dell'irradiazione parziale. Parimenti, la lettura di un numero elevato di cellule é

indispensabile, qualora questa metodica sia estesa allo studio delle popolazioni o dei gruppi a rischio.

Attualmente il riconoscimento e il conteggio delle aberrazioni cromosomiche vengono effettuati al microscopio ottico, con modalità che richiedono tempi lunghi e un notevole impegno da parte dell'osservatore.

Non é inoltre trascurabile la componente di monotonia e, al tempo stesso, di anancasmo che inevitabilmente finisce per accompagnare questo tipo di attività.

Pertanto, trovano concreta motivazione i programmi di ricerca dedicati alla messa a punto di sistemi automatizzati di lettura (4, 30, 32).

Un programma di studio per il riconoscimento automatico delle aberrazioni cromosomiche per scopi di dosimetria citogenetica é stato avviato da un gruppo di ricerca composto da esperti di ematologia e di radioprotezione medica (Medicina del Lavoro INFN, USL Roma 29, gruppo ENEA) e da esperti di riconoscimento di immagini e di utilizzo del PEPR (Precision Encoding and Pattern Recognition) (gruppo INFN).

In particolare questo gruppo di ricerca, il cui programma é denominato "CARIOPEPR", si propone di mettere a punto un sistema automatico di riconoscimento e conteggio delle aberrazioni cromosomiche indotte dalle radiazioni ionizzanti, sviluppando le opportune modifiche all'hardware e al software di un sofisticato sistema, il PEPR, costruito e già utilizzato presso i Laboratori Nazionali di Frascati dell'INFN per la misura automatica di immagini di eventi nucleari di alta energia (9, 10).

Il programma di ricerca "CARIOPEPR" si articola in vari punti:

- A) Messa a punto dei preparati biologici secondo una metodologia adatta alla lettura automatizzata; cioè elevata densità di metafasi, procedure di identificazione automatica individuale, macrofotografie ad alta risoluzione.
- B) Potenziamento del sistema interattivo tra PEPR ed operatore mediante lo studio e la realizzazione di un nuovo sistema potenziato di grafica in tempo reale. Tale sistema deve consentire di visualizzare e presentare all'operatore contemporaneamente l'immagine televisiva delle metafasi ed il risultato ottenuto dall'algoritmo di misura automatica.

- C) Studio e messa a punto degli opportuni algoritmi di pattern recognition per un'efficiente rivelazione delle tipologie delle aberrazioni cromosomiche. Ciò dovrà essere raggiunto in fasi successive di sviluppo del software di cui la prima, consistente in un efficiente riconoscimento automatico delle metafasi su vaste aree di campioni, con presentazione all'operatore e archiviazione su computer dei casi dubbi, è già stata messa a punto.
- D) Individuati gli algoritmi adatti al riconoscimento automatico delle aberrazioni si dovranno sostituire alcune fasi del calcolo mediante l'uso di un "array processor" per raggiungere le velocità utili allo scopo della ricerca.
- E) Il passo finale consisterà nella eliminazione della fase intermedia della fotografia delle metafasi sottoponendo direttamente al PEPR i vetrini con i preparati biologici con il vantaggio dell'aumento di risoluzione, eventualmente operando anche nel range di lunghezza d'onda del blu-ultravioletto. Ciò comporterà lo studio e la realizzazione di un nuovo sistema ottico per il PEPR con demagnificazione 1/10.

La disponibilità di sistemi automatizzati di lettura apre indubbiamente prospettive di notevole interesse.

Al riguardo merita citare, oltre alla già richiamata possibilità di aumentare la sensibilità e l'accuratezza statistica della metodica, i seguenti aspetti:

1. rendere più accessibile la dosimetria citogenetica nell'ambito lavorativo per le indicazioni attualmente di maggiore frequenza;
2. ampliare le indicazioni della dosimetria citogenetica nell'ambito lavorativo, comprendendo un esame prima dell'esposizione al rischio ("il bianco") e un esame periodico (biennale o triennale), secondo i criteri di screening dei gruppi a rischio, ed eventualmente, raggiunta la necessaria affidabilità metodologica e per particolari tipi di esposizione, anche a livello del controllo individuale;
3. ampliare la casistica per una migliore correlazione tra dosimetria fisica e dosimetria citogenetica (in base alla casistica del NPRB, UK, relativa

- agli anni 1967-1982, su 611 casi esaminati con dosimetria citogenetica, soltanto in 5 casi era dimostrabile una stretta correlazione con i dati della dosimetria fisica) (51);
4. effettuare studi comparativi e valutare eventuali reciproche integrazioni con la citometria a flusso;
 5. utilizzare il sistema per il conteggio dei micronuclei per scopi di dosimetria biologica (18, 21, 23);
 6. estendere la metodica allo studio delle popolazioni (24)
 - 6.1 per stabilire il "rumore di fondo";
 - 6.2 per un eventuale impiego a vasto raggio in caso di eventi accidentali;
 - 6.3 per lo studio dei residenti intorno agli impianti nucleari;
 - 6.4 per lo studio dei pazienti sottoposti ad accertamenti radiodiagnostici e a trattamenti radioterapici;
 - 6.5 per lo studio delle aberrazioni cromosomiche correlate ad agenti diversi dalle radiazioni ionizzanti.

CONCLUSIONI

La dosimetria citogenetica, capitolo preminente della dosimetria biologica, rappresenta un supporto diagnostico fondamentale nell'ambito della radioprotezione medica.

La conoscenza delle basi biologiche, delle indicazioni, come pure delle limitazioni e delle controindicazioni di questa metodologia, sono indispensabili per una sua corretta e vantaggiosa utilizzazione in medicina preventiva e in campo clinico-radiopatologico.

E' fondamentale che i dati dosimetrici biologici acquisiti siano il più possibile esaurienti e centrati sullo scopo cui sono destinati.

Pertanto, sono da evitare impostazioni non rigorose, impropriamente approssimate e comunque fuorvianti, che non possono non comportare una precaria, spesso impossibile gestione dei dati così ottenuti sul piano sanitario e medico-legale.

Merita infine sottolineare che la dosimetria citogenetica, la cui

estensione applicativa non é ancora esaurita, costituisce un ulteriore apporto scientifico e tecnico alla qualità specialistica che contraddistingue la competenza del Medico Autorizzato per la Radioprotezione.

BIBLIOGRAFIA

- 1 - Bauchinger M., Koln-Gerresheim J. et al., Chromosome analysis of nuclear power plant workers, in *Int.J. Rad. Biol.* 38, 577, 1980.
- 2 - Bauchinger M., Eckerl H., Drexler G., Streng S., Schmid E., Chromosome Dosimetry and Occupational Radiation Exposure, in *Radiation Protection Dosimetry*, 9, 93, 1984.
- 3 - Benacerraf B., Unanue E. R.: *Manuale di Immunologia*, 1981, Piccin Editore, Padova.
- 4 - Bille J., Scharfenberg H., Manner R., Biological dosimetry by chromosome aberration scoring with parallel image processing with the Heidelberg POLYP Polyprocessor system, in *Comput. Biol. Med.*, 13, 49, 1983.
- 5 - Brandom W.F., Saccomanno G., Archer V.E. et al; Chromosome aberrations as a biological dose-response indicator of radiation exposure in uranium miners, in *Rad. Res.*, 76, 159, 1978.
- 6 - Brandom W.F., Archer V.E., Bloom A.D. et al., Chromosome changes in somatic cells of workers with internal depositions of plutonium, in *Biological Implications of Radionuclides released from Nuclear Industries*, IAEA, Vienna, 1979, p.195.
- 7 - Buckton K. E., Smith P.G., Court Brown W. M., The estimation of lymphocyte lifespan from studies on males treated with x-rays for ankylosing spondylitis, in Evans H.T., Court Brown W.M., Mc Lean A.s. eds, *Human Radiation Cytogenetics*, North Holland, Amsterdam, 1967, p.106.
- 8 - Cammarano G., Guercilena S., Forni A., Studi citogenetici in soggetti professionalmente esposti a radiazioni ionizzanti, in *Med. del Lavoro*, 3, 224, 1982.
- 9 - CARIOPEPR (Gruppo), documento programmatico trasmesso al Centro

- Operativo Sorveglianza Medica Emergenza (COSME) dell'ENEA- DISP (1985).
- 10 - CARIOPEPR (Gruppo), Studio per la realizzazione di un sistema di screening automatico per la dosimetria citogenetica, in atti LXXI Cong. Naz. della Società Italiana di Fisica, Trieste 3-8 ottobre 1985, p.182.
 - 11 - Coggle J. E., Effetti biologici delle radiazioni, Edizioni Minerva medica, 1985 .
 - 12 - Coppola M., Vulpis N., Bertoncetto G., Enhancement of chromosomal damage in human lymphocytes irradiated with X-rays in the presence of iodine, in Radiation Protection Dosimetry, 9, 99, 1984.
 - 13 - Doloy M. T., Le Go R., Ducatez G., Lepetit J., Bourguignon M., Utilisation des analyses chromosomiques pour l'estimation d'une dose d'irradiation accidentelle chez l'homme, in atti IRPA IV Congrès International Paris 1977, IRPA 1977, vol.4, N°435, p. 1199.
 - 14 - Dolphin G.W., Biological Dosimetry with Particular Reference to Chromosome Aberration Analysis (a Review of Method) in Proc. Symp. on the Handling of Radiation Accidents, 1969, IAEA, Wien, p.215.
 - 15 - Dolphin G.W., Llyod D.C., Purrott R.J., Chromosome aberration analysis as dosimetric technique in radiological protection, in Hlth. Phys, 25, 7, 1973.
 - 16 - DuFrain R.J., Littlefield L.G., Joiner E.E., Frome E.L., In Vitro Human Cytogenetic Dose-Response Systems, in Hubner K.F., Fry S.A. eds., The Medical Basis for Radiation Accident Preparedness, Elsevier/North-Holland, New York, 1980, p.357.
 - 17 - Evans H.J., Buckton K.E., Hamilton G.E., Carothers A., Radiation-induced chromosome aberrations in nuclear-dockyard workers, in Nature, 277, 531, 1979.

- 18 - Fenech M., Morley A.A., Measurement of micronuclei in lymphocytes, in *Mutation Res.*, 147, 29, 1985.
- 19 - Gongora R., Irradiations externes accidentelles, in *Atti 6° Cong. Naz. AIRM sulle Irradiazioni accidentali e di emergenza*, 1984, ENEA Serie Simposi, p.43.
- 20 - Hansteen I.L., Sce as a Monitor of Industrial and Environmental Toxins, in Sandberg A.A. ed., *Sister Chromatid Exchange*, Alan R. Liss, New York, 1982, p.675.
- 21 - Hogstedt B., Micronuclei in lymphocytes with preserved cytoplasm. A method for assessment of cytogenetic damage in man, in *Mutation Res.*, 130, 63, 1984.
- 22 - Jammet H., Gongora R., Le Go R., Doloy M.T., Clinical and Biological Comparison of two Acute Accidental Irradiations: Mol (1965) and Brescia (1975), in Hubner K.F., Fry S.A. eds., *The Medical Basis for Radiation Accident Preparedness*, Elsevier/North-Holland, New York, 1980, p.91.
- 23 - Jenssen D., The Induction of Micronuclei, in Sandberg A.A. ed., *Sister Chromatid Exchange*, Alan R. Liss, New York, 1982, p.47.
- 24 - Komarov E., Cytogenetic Methods in Diagnosis of Acute Radiation Injuries, in Hubner K.F., Fry S.A. eds., *The Medical Basis for Radiation Accident Preparedness*, Elsevier/North-Holland, New York, 1980 p.341.
- 25 - Lemaire G., Evaluation de la valeur dosimetrique des donnees cytogenetiques, C.I.R., Cours Supérieur de Protection contre les radiations, Sienne 22-26 avril 1985.
- 26 - Littlefield L.G., Joiner E.E., Du Frain R.J., Hubner K.F., Beck W.L., Cytogenetic Dose Estimates from In Vivo Samples from Persons Involved in Real or Suspected Radiation Exposures, in Hubner K.F., Fry S.A. eds., *The Medical Basis for Radiation Accident Preparedness*, Elsevier/North-Holland, New York, 1980, p.375.

- 27 - Littlefield L.G., Effects of DNA- Damaging Agents on SCE, in Sandberg A.A. ed., Sister Chromatid Exchange, Alan R. Liss, New York, 1982, p.355.
- 28 - Lloyd D.C., Dolphin G.W., Radiation-induced chromosome damage in human lymphocytes, in British Journal of Industrial Medicine, 34, 261, 1977.
- 29 - Lloyd D.C., Purrott R.J., Reeder E.J., The incidence of unstable chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes from unirradiated and occupational exposed people, in Mutation Res., 72, 523, 1980.
- 30 - Lloyd D.C., Purrott R.J., Chromosome Aberration Analysis in Radiological Protection Dosimetry, in Radiation Protection Dosimetry, 1, 19, 1981.
- 31 - Lloyd D.C., Prosser J.S., Moquet J.E., Malowany D.J., Doses in Radiation Accidents Investigated by Chromosome Aberration Analysis, XIII, A Review of Cases Investigated: 1982, NRPB-R148, June 1983.
- 32 - Lloyd D.C., An Orverview of Radiation Dosimetry by Conventional Cytogenetic Method, in Eisert W.G., Mendelsohn M.L. eds., Biological Dosimetry - Cytometric Approaches to Mammalian Systems, Springer - Verlag Berlin, Heidelberg, 1984, p.3.
- 33 - Pohl - Ruling J., Fischer P., The dose- effect relationship of chromosome aberrations to alpha and gamma irradiation in a population subjected to an increased burden of natural radioactivity, in Rad. Res., 80, 61, 1979.
- 34 - Purrott R.J., Vulpis N, Lloyd D.C., The use of Harlequin staining to measure delay in the human lymphocyte cell cycle induced by in vitro x-irradiation, in Mutation Res., 69, 275, 1980.
- 35 - Righi E., Di Pofi M., Radioprotezione -Incidenti da radiazioni ionizzanti, in Enciclopedia Medica Italiana, USES Edizioni Scientifiche Firenze, 1985 vol. XII, col. 2493-2512.

- 37 - Savage J.R.K., Chromosomal aberrations at very low radiation dose rates, in *Nature*, 277, 512, 1979.
- 38 - Schwartzman J.B., Tice R.R., 5-Bromodeoxyuridine and Its Role in the Production of Sister Chromatid Exchange, in Sandberg A.A. ed., *Sister Chromatid Exchange*, Alan R.Liss new York, 1982, p.123.
- 39 - United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR), *Ionizing Radiation: Sources and Biological Effects*, 1982 Report, p.454.
- 40 - Vulpis N., Aberrazioni cromosomiche radio-indotte e dosimetria biologica, in *La Ricerca Clin. Lab.*2, 149, 1972.
- 41 - Vulpis N., Analisi delle aberrazioni cromosomiche come tecnica dosimetrica in radioprotezione, in *Notiziario CNEN*, anno 22, 12, 49, 1976.
- 42 - Vulpis N., Purrott R.J., Lloyd D.C., The use of Harlequin staining to assess radiation effects on the in vitro cell cycle kinetics of human lymphocytes, in *Mutation Res.*, 51, 145, 1978.
- 43 - Zakharov A.F., Historical Aspects of Sister Chromatid Exchange, in Sandberg A.A. ed., *Sister Chromatid Exchange*, Alan R. Liss, New York, 1982, p.1.

APPENDICE

CRITERI DI VALUTAZIONE IN DOSIMETRIA CITOGENETICA NELLE
VARIE CONDIZIONI DI ESPOSIZIONERADIAZIONI DI ALTO LET

* 1 traccia → tempo di riparazione delle rotture cromosomiche ininfluente

IRRADIAZIONE ACUTA

IRRADIAZIONE PROTRATTA O CRONICA
(correzioni in funzione della durata dell'esposizione
e della durata di vita dei linfociti)

$\left. \begin{array}{c} \text{CONTINUA} \\ \text{FRAZIONATA} \end{array} \right\} Y = \alpha D$

* distribuzione della frequenza del numero
dei dicentrici per cellula

NON POISSON
(sovradisersione)

RADIAZIONI DI BASSO LET

IRRADIAZIONE ACUTA DOSI > 0.5 Gy
(2 tracce)

$$Y = \alpha D + \beta D^2$$

IRRADIAZIONE ACUTA DOSI < 0.5 Gy
(1 traccia) (Fig.1A)

$$Y = \alpha D$$

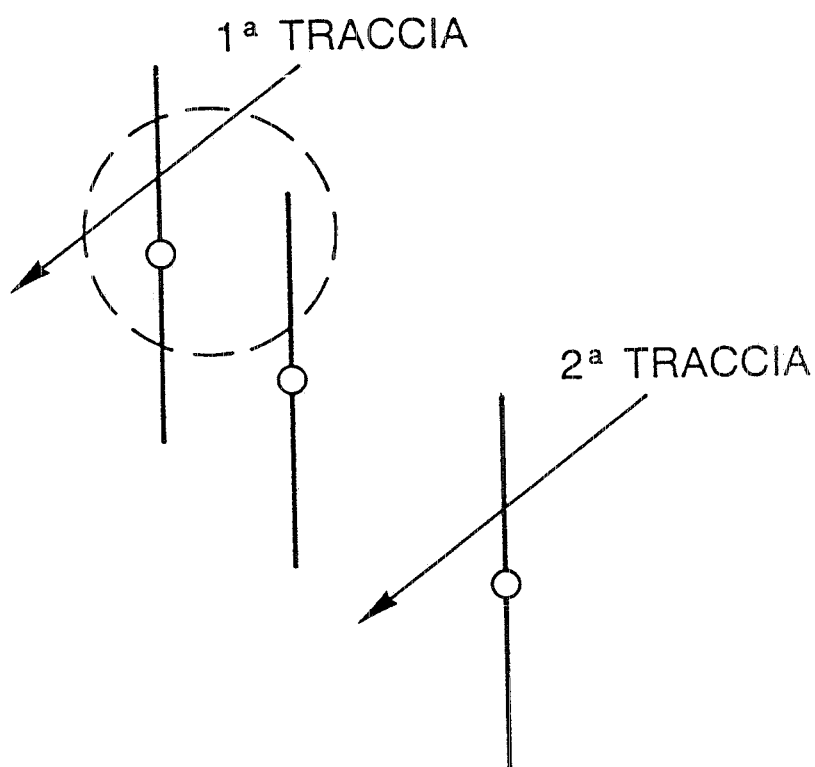


Fig. 1A - Alle basse dosi acute (< 0.5 Gy) è ridotta la probabilità che la 2ª traccia ionizzante attraversi il bersaglio (linea tratteggiata), cioè la zona di interazione o distanza di ricongiunzione, già circonscritta dalla 1ª traccia

IRRADIAZIONE PROTRATTA CONTINUA $Y = \alpha D + \beta G(x)D^2$
 (ore, pochi giorni) DOSI > 0.3 - 0.5
 (2 tracce \rightarrow tempo di riparazione influente) dove
 (Fig. 2A)

(funzione G di Lea)

$$G(x) = \frac{2}{x^2} [x-1+\exp(-x)]$$

$x = t/t_0$ dove
 t = durata dell'irradiazione
 t_0 = durata della vita media
 delle rotture (\sim 2h)

IRRADIAZIONE CRONICA CONTINUA per periodi molto prolungati
 DOSI > 0.3 - 0.5 Gy $G(x) \sim 0$
 (2 tracce \rightarrow tempo di riparazione influente) quindi $Y = \alpha D$

IRRADIAZIONE PROTRATTA O CRONICA
 CONTINUA DOSI < 0.3 - 0.5 Gy (1 traccia) $Y = \alpha D$
 (correzioni in funzione della durata dell'esposizione
 e della durata di vita dei linfociti) (Fig.3A)

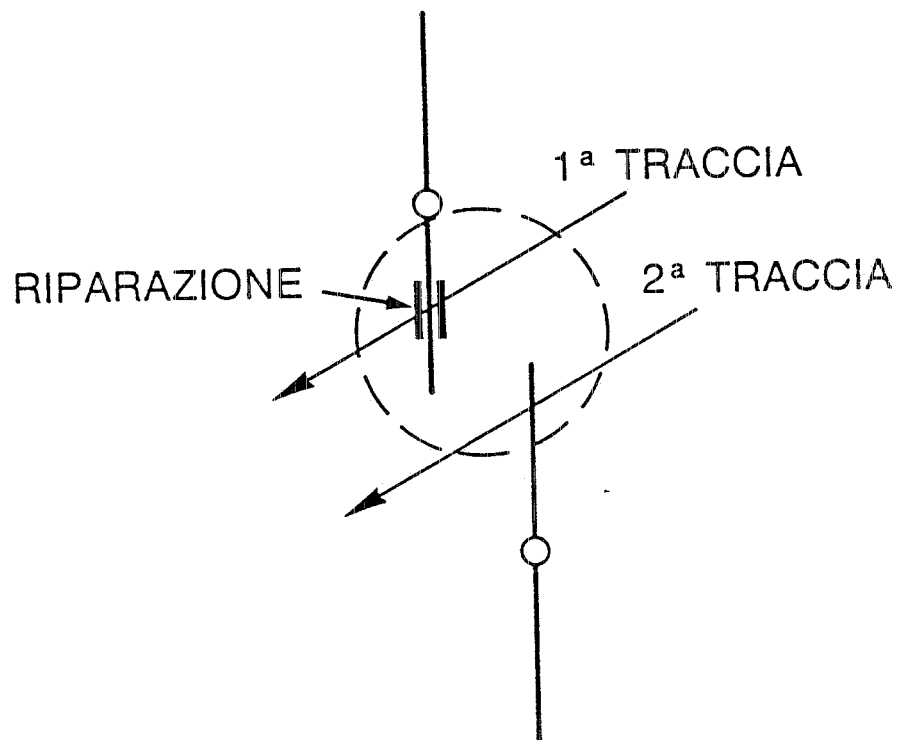


Fig. 2A - Nell'esposizione continua o frazionata con intensità di dose non molto basse è influente il tempo di riparazione, poiché è aumentata la probabilità che la 1ª rottura cromosomica possa essere già riparata quando si rende disponibile per la ricombinazione la 2ª traccia; ciò impedisce la formazione del dicentrico.

La frequenza dei dicentrici prodotti dalla dose totale (da esposizione continua o per somma delle frazioni di dose) sarà pertanto inferiore a quella prodotta dalla stessa dose somministrata acutamente (abbassando l'intensità di dose decresce la frequenza dei dicentrici per unità dose).

La linea tratteggiata indica il bersaglio, cioè la zona di interazione o distanza di ricongiunzione.

IRRADIAZIONE PROTRATTA O CRONICA

FRAZIONATA DOSI > 0.3 - 0.5 Gy

(2 tracce → tempo di riparazione influente)

* Intervallo tra le frazioni di dose > 6h

(Fig. 2A)

DOSE TOTALE = SOMMA DELLE SINGOLE
FRAZIONI DI DOSE
RIFERITE A

$$Y = \alpha D + \beta D^2$$

* Intervallo tra le frazioni di dose < 6 h

$$Y = \alpha D + \beta \exp(-t_1/t_0) D^2$$

dove

t_1 = intervallo di tempo tra le
frazioni di dose

IRRADIAZIONE PROTRATTA O CRONICA

FRAZIONATA DOSI < 0.3 - 0.5 Gy (1 traccia)

(correzioni in funzione della durata dell'esposizione
e della durata di vita dei linfociti)

$$Y = \alpha D$$

RAPPORTO α / β = Dose alla quale il numero delle aberrazioni indotte da una traccia è uguale al numero delle aberrazioni indotte da due tracce. Al di sotto di questa dose la maggior parte delle aberrazioni sarà prodotta da una sola traccia. Pertanto, la relazione dose-effetto sarà lineare e l'influenza dell'intensità di dose trascurabile.

*DISTRIBUZIONE DELLA FREQUENZA DEL NUMERO DEI DICENTRICI PER CELLULA

IRRADIAZIONE OMOGENEA

AL CORPO INTERO

POISSON

$$\text{teorico } PY(n) = e^{-Y} \frac{Y^n}{n!} \sim \text{osservato}$$

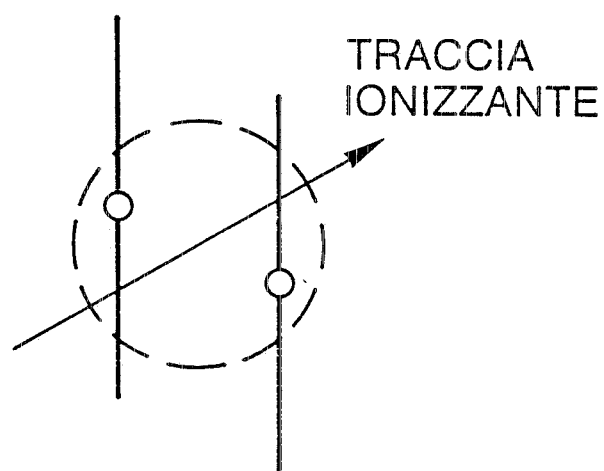


Fig. 3A - Nell'irradiazione acuta alle basse dosi i dicentrici sono prodotti quasi esclusivamente da una traccia ionizzante e presentano una bassa frequenza; lo stesso avviene nell'irradiazione protratta o cronica (continua o frazionata) con intensità di dose molto basse (la probabilità di aberrazioni indotte da due tracce è sostanzialmente nulla). La linea tratteggiata indica il bersaglio, cioè la zona di interazione o distanza di ricongiunzione.

IRRADIAZIONE PARZIALE O
DISOMOGENEA

NON POISSON
(sovradisersione, curva bimodale)

Stima della dose

Metodo di Dolphin (O- truncated Poisson)

$$\frac{Y}{1 - e^{-Y}} = \frac{X}{N - n_0} \quad \text{dove}$$

Y = dicentrici/cellula
X = numero dei dicentrici
osservati
N = numero delle cellule
osservate
n₀ = numero delle cellule senza
dicentrici

$$Yf = \frac{X}{N}$$

dove

f = stima di massima
probabilità della frazione
di cellule irradiate

Metodo Qdr di Sasaki

$$Qdr = \frac{X}{Nu} = \frac{Y_1}{1 - \exp(-Y_1 - Y_2)}$$

dove

X = numero atteso di dicentrici e di anelli nelle cellule danneggiate

Nu = cellule danneggiate

Y₁ = numero dei dicentrici più anelli

Y₂ = numero degli acentrici (in eccesso rispetto ai frammenti acentrici associati ai dicentrici e agli anelli)

IRRADIAZIONE MISTA DA GAMMA E NEUTRONI

Stima della dose

(Criteri ed esempio tratti dalla Pubblicazione IAEA, 1986, citata nella nota a p. 43)

1. Assumendo che tutte le aberrazioni siano indotte da neutroni, leggere la dose sull'apposita curva.
2. Sulla base del rapporto neutroni/ γ (noto dalle misure fisiche) , stimare la dose γ sul totale.
3. Dalla dose γ così stimata ricavare il numero dei dicentrici a questa connesso.
4. Sottraendo al numero totale dei dicentrici il numero dei dicentrici da dose γ , ricavare il numero dei dicentrici attribuibile ai neutroni.
5. Rivalutare la dose da neutroni in base al numero dei dicentrici ottenuto al punto 4.
6. Rivalutare la dose γ in base al rapporto neutroni/ γ di cui al punto 2.
7. Ripetere il procedimento dal punto 2 al punto 6 per ottenere appropriate correzioni mediante metodi iterativi.

* Esempio di irradiazione mista da γ e neutroni per incidente di criticità.

120 dicentrici su 100 cellule osservate

$Y = 1,2$

rapporto neutroni / γ pari a 2:3 nella dose assorbita

curva di calibrazione dose-effetto per neutroni da 0,7 MeV (NRPB,UK).
 curva di calibrazione dose-effetto per radiazioni γ del Co^{60} con intensità di
 dose di 0.5 Gy/min (NRPB, UK).

1. $Y = 1,2$ equivale ad una dose di 144 rad, letta sull'apposita curva dei neutroni.
2. $144 \times 3/2 = 216$ rad da radiazioni γ .
3. Alla dose di 216 rad da radiazioni γ corrisponde sull'apposita curva $Y = 0,266$.
4. $1,2 - 0,266 = 0,934$ che rappresenta la Y da attribuire ai neutroni.
5. $Y = 0,934$ equivale ad una dose di 122,2 rad letta sull'apposita curva dei neutroni.
6. Riprendendo dal punto 2, si ottiene $122,2 \times 3/2 = 183,3$ rad da radiazioni γ .
7. Proseguire con metodo iterativo secondo la sequenza indicata nella tabella:

<u>Punti 1 e 5</u>	<u>Punto 2</u>	<u>Punto 3</u>	<u>Punto 4</u>
Dose da neutroni	Dose γ	Y da radiazioni γ	Y da neutroni
144	216	0,266	0,934
112,2	168,3	0,167	1,032
124	186	0,201	0,999
120	180	0,189	1,011
121,4	182,1	0,194	1,066
121	181,5		

Stima di dose conclusiva:

121 rad da neutroni

182 rad da radiazioni γ

Studio per l'automazione in dosimetria citogenetica

1. Introduzione

Il PEPR (Precision Encoding and Pattern Recognition) è una apparecchiatura costruita, e da molti anni utilizzata, presso i L.N.F. per lo studio automatico delle fotografie di "eventi nucleari" che si sono verificati all'interno delle camere a bolle.

Esso fu progettato circa 15 anni fa per automatizzare il lavoro svolto da operatori che studiavano su un tavolo di scansione le tracce delle traiettorie di particelle nucleari che erano state fotografate nelle camere a bolle.

Il sistema svolge due funzioni separate:

1. la prima funzione (pattern recognition) è quella di localizzare e riconoscere oggetti, fornendo le informazioni relative alle loro posizioni nelle fotografie o films in esame;
2. la seconda funzione (precision encoding) permette, mediante misure di precisione, la classificazione e l'archiviazione degli oggetti trovati.

La possibilità di eseguire tali operazioni è basata sulla capacità del sistema di determinare, istante per istante, il rapporto della luminosità di un pennello di luce prima e dopo che questo abbia attraversato la fotografia da analizzare.

2. Tecniche base del "Image Processing"

2.1. Cenni generali

Viene definita una operazione elementare "scansione" quando nel movimento in linea retta attraverso l'immagine viene effettuato il campionamento della densità ("annerimento") ad intervalli regolari. Il dato corrispondente ad un campionamento (posizione, densità e colore) viene normalmente chiamato "pixel". Nella maggioranza dei casi questo campionamento è ottenuto proiettando l'immagine su un sistema di fotodiodi (CCD), e in tal caso il pixel è definito dall'area di un singolo fotodiodo. Nelle macchine della categoria dei PEPR la scansione corrisponde ad un reale movimento di un puntino luminoso. La trasmissione della luce attraverso l'immagine definiscono il pixel (fig. 1.2). In molti casi si intende come "image processing" il modo di operare dove l'intera immagine è già trasformata in forma di pixels e trasferita in memoria del calcolatore; pertanto una linea di scansione viene rappresentata o "rievocata" dai dati contenuti nelle successive parole di memoria.

In tutti questi casi il processo è di natura sequenziale; e in particolare nel PEPR per il movimento stesso, nei CCD per il modo di lettura dei

fotodiodi, come anche nel caso di un'immagine già depositata in memoria.

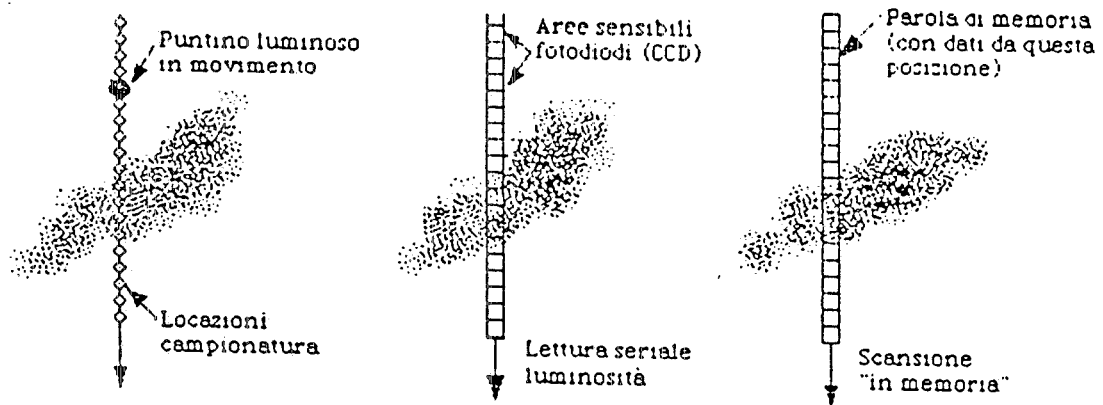


Fig. 1.2 Scansione elementare in tre modi.

Sul flusso di informazione derivato dai successivi pixels viene effettuata l'operazione "rivelazione" dell'oggetto. Normalmente questo consiste nell'identificare il tratto della linea di scansione dove la densità supera un livello soglia prefissato. Nel presente lavoro si usa in molti casi il metodo originale del massimo locale. L'hardware digitale determina in tempo reale il pixel dove si ha il massimo della densità entro la linea della scansione.

Poichè inevitabilmente un processo di rivelazione è di natura sequenziale, la natura sequenziale della scansione non è necessariamente una limitazione sostanziale.

Più linee di scansione formano un "quadrato elementare" dove solitamente si effettua il livello più elementare del processo "riconoscimento di forma", per esempio trovando il baricentro, area e dimensione dei pixels connettenti e con la densità di immagine sopra la soglia, (fig. 2.2.). Bisogna notare che spesso con il termine "image processing" viene inteso un modo di operare dove si applicano i mezzi elettronici allo scopo di evidenziare particolari aspetti nell'immagine, lasciando poi all'osservatore il compito di analisi o "riconoscimento". In genere bisogna valutare caso per caso la produttività tra il "lavoro umano assistito" e il "tutto automatico". L'esperienza acquisita nell'uso di PEPR indica l'utilità di una strategia dove si fa aumentare progressivamente il grado di automatizzazione nel corso del progetto.

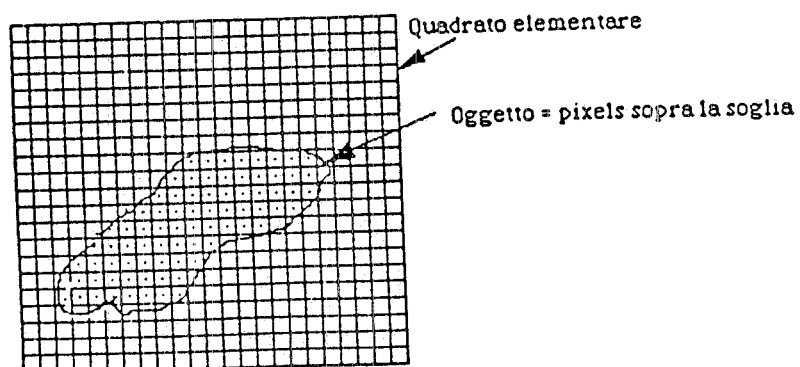


Fig.2.2 Riconoscimento delle forme elementare

Infatti, i principali problemi che si incontrano nei sistemi di alta automazione riguardano la affidabilità del prodotto, e il rapporto costi - velocità di esecuzione. Per ottenere delle velocità ragionevoli nella fase di riconoscimento delle forme, il processo deve svolgersi in qualche forma parallela. Questo è ottenuto normalmente con "supercomputers", per esempio con più microcomputers applicati in parallelo, o "array processors". L'uso di questo tipo di soluzione conduce però a costi di produzione del software particolarmente alti. Parleremo in seguito dei modi con cui questo dilemma è affrontato nei sistemi tipo PEPR.

Spesso si richiede che il processo sia in grado di classificare e mettere in ordine gerarchico gli oggetti trovati, prima di arrivare a prendere delle decisioni individuali. Per questo scopo il processo ha uno stadio iniziale "per imparare". Si può ottenere così un sistema che è capace di adattarsi automaticamente alle condizioni variate. Questa variabilità può verificarsi per esempio nella preparazione del campione biologico, o nel processo fotografico con il quale si produce il materiale sotto esame. Spesso per questo genere di sistema si

usa il termine "intelligenza artificiale". Se la velocità operativa si avvicina al "tempo reale", si parla di sistemi di "visione artificiale".

2.2. Principi del metodo di riconoscimento messa a punto per CARIOPEPR

Il processo PEPR è in grado di effettuare una scansione ripetitiva utilizzando un pixel in forma di linea luminosa. Le dimensioni di questa linea sono poco inferiori al braccio dei cromosomi più piccoli. Tra una scansione e l'altra l'orientazione della linea viene incrementata automaticamente. Contemporaneamente il processore attende la determinazione del massimo segnale (fig. 3.2.). Dal punto di vista del programmatore questa operazione si presenta come una speciale istruzione macchina: "trovare (se esiste) un elemento di immagine di forma lineare". Si impostano alcuni registri del processore PEPR, dando via all'esecuzione. Alla conclusione si verificano le condizioni generali del risultato, se accettabili, si procede al prelievo di questi dagli appositi registri e al loro utilizzo. Si effettua una seconda scansione per trovare il valore della larghezza dell'oggetto appena individuato.

Si possono così riassumere i vantaggi dell'uso di questo algoritmo:

1. si ottiene il processo parallelo e la valutazione gerarchica in modo "gratuito" sia nel tempo di esecuzione che di programmazione.
2. Il risultato sull'altezza del segnale contiene "un'alta percentuale dell'informazione" originariamente presente nel quadrato elementare. Si nota che questo dato da solo individua con molta sicurezza un braccio di cromosoma come tale.
3. Operando principalmente sui massimi di segnale si supera in un modo naturale lo scoglio dell'immagine confusa; infatti ogni immagine di braccio di cromosoma è parzialmente mista con il suo braccio simmetrico (fig. 3.4).

Nella figura 4.2. viene rappresentato un risultato ottenuto con il main program KR3 (vedi cap. 5). A destra si mostra un ingrandimento parziale di una metafase, e a sinistra si grafica il risultato dell'operazione dell'identificazione rappresentando la stessa area dell'immagine. Ogni rettangolo descrive l'oggetto giudicato come braccio mostrandone la posizione, l'orientazione e la larghezza, ottenuti con il task KRG1. Come indicazione del tempo occorrente per l'operazione "identificazione", si può notare che il tempo di scrittura su disco dei dati sopramenzionati (richiesta per poter utilizzare la diagnostica KRG1) è un ordine di grandezza più lungo dell'esecuzione della parte della identificazione.

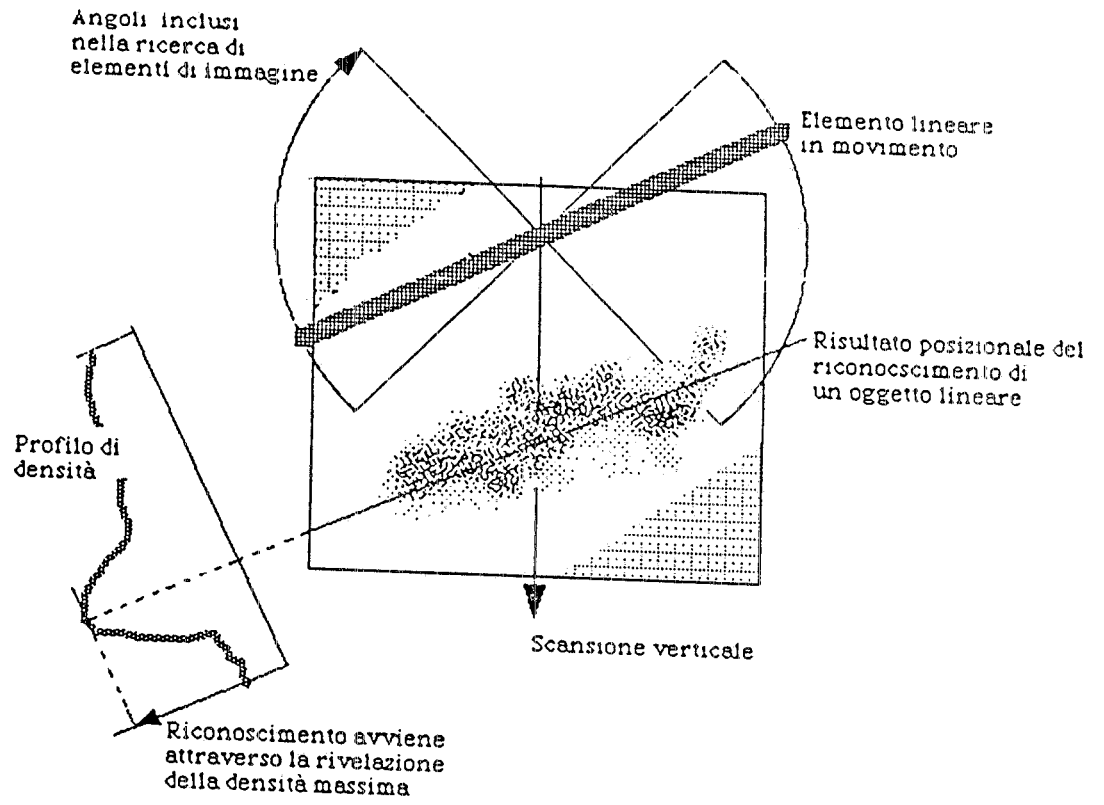


Fig 3.2 Algoritmo hardware per il riconoscimento di strutture lineari



Fig. 4.2 - Riproduzione di una microfotografia di una metafase ed il risultato ottenuto con KR3

3. Hardware del PEPR

3.1. Schema a blocchi

Per quanto riguarda la struttura hardware del PEPR dei LNF possiamo distinguere tre parti, come mostrato schematicamente in fig. 1.3:

1. computer e periferiche
2. CRT e processore PEPR
3. "interactive facilities"

1) Computer e periferiche

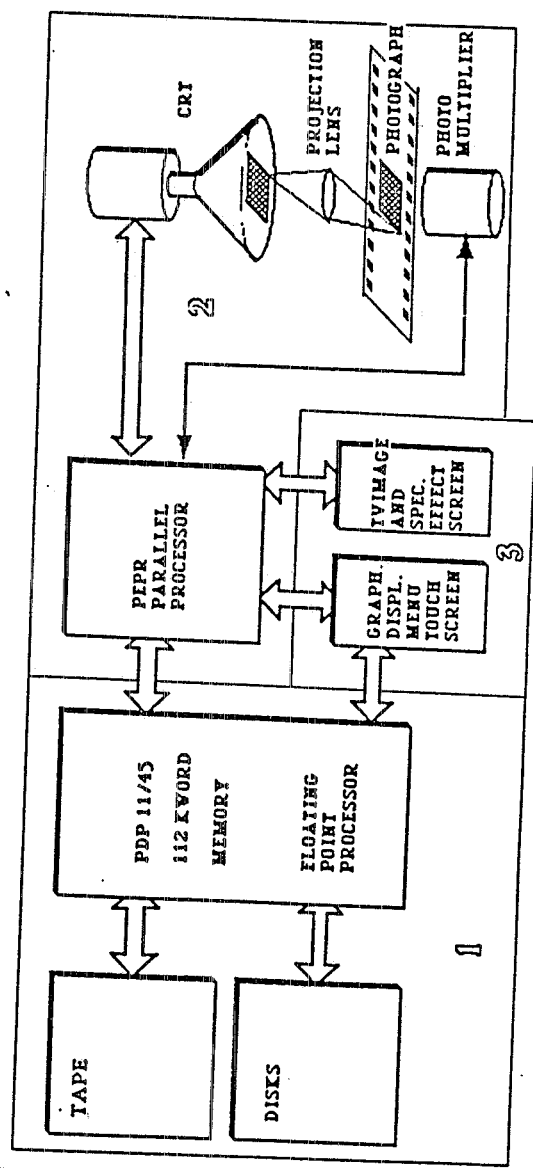
Il calcolatore "dedicato" è un PDP 11/45 con 112 K di memoria che ha il compito di gestire in tempo reale il processo di lavoro.

Forse, più che descrivere in dettaglio la configurazione hardware del computer, che è comunque riportata schematicamente in fig. 2.3, può essere utile ricordare brevemente le funzioni che esso svolge. Queste sono:

1. controllo delle procedure di misura;
2. acquisizione ed elaborazione dei dati.

Il computer è connesso ai 32 registri di 16 bit ciascuno del sistema PEPR. Questi sono direttamente mappati come posti di memoria del PDP, cioè ognuno di essi ha un indirizzo nella "external page" del calcolatore. Ciò vuol dire che il calcolatore può compiere operazioni di lettura e scrittura direttamente su questi

Fig. 1.3 Sistema PEPR del LNF.



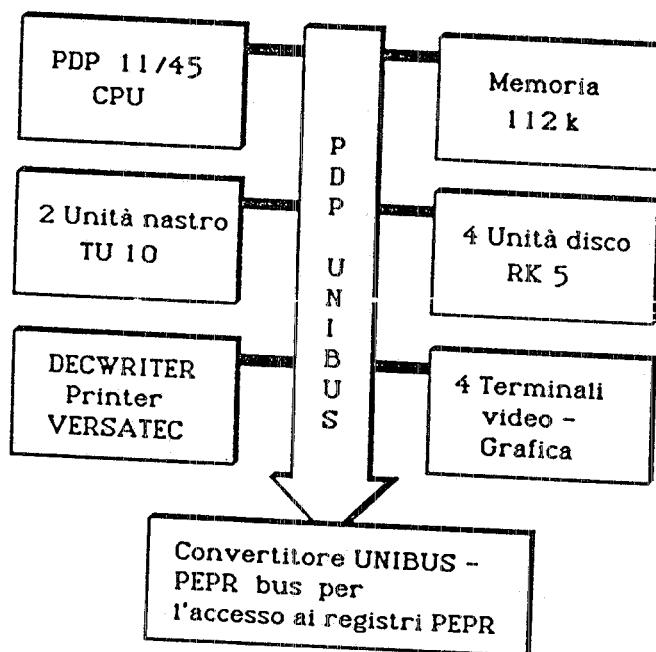


Fig. 2.3 Configurazione del calcolatore

registri come nelle normali locazioni di memoria.

In alcuni di questi vengono memorizzati i risultati delle operazioni di misura, in altri i parametri fissati dall'operatore per definire il tipo di scansione desiderata. Tali registri funzionano quindi da tramite tra il calcolatore e il processore PEPR che controlla l'hardware del sistema.

Mediante il software residente nel PDP è possibile caricare negli opportuni registri PEPR i parametri e i comandi che gestiscono l'hardware e leggere in altri i risultati delle operazioni di scansione eseguite da PEPR, che vengono poi processati nel computer.

2) CRT e processore PEPR

Possiamo considerare la seguente suddivisione in blocchi dell'hardware PEPR:

1. CRT
2. sistema ottico
3. processore digitale PEPR

Il processore digitale è connesso al calcolatore mediante i 32 registri. Possiamo vederlo come un computer a programma fisso in grado di compiere operazioni relativamente semplici in hardware.

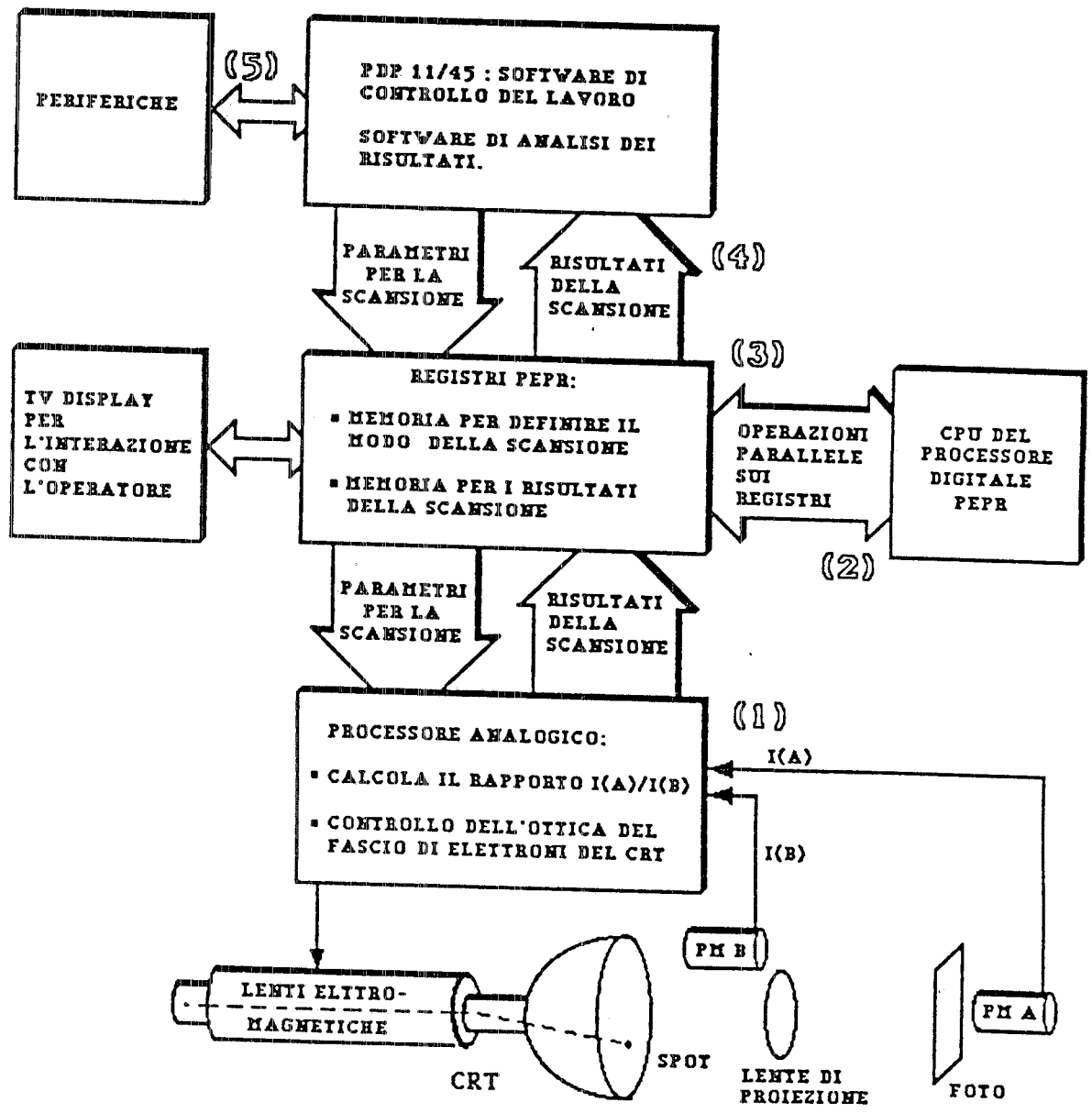
Il CRT è un tubo a raggi catodici di precisione nel quale viene generato, sotto il controllo del processore, un fascetto di elettroni che produce un puntino luminoso del diametro di circa 15 micron sulla superficie del CRT internamente rivestita di fosforo. Tale puntino può anche essere deformato in un elemento di linea di lunghezza variabile consentendo di rivelare direttamente le strutture lineari.

Con un sistema di lenti ottiche la sorgente luminosa (puntino o linea) del CRT viene focalizzata sulla fotografia da analizzare. La luce trasmessa cade su un fotomoltiplicatore (A) posto dopo la fotografia, mentre quella emessa direttamente dal puntino luminoso sulla faccia del CRT è raccolta da un secondo fotomoltiplicatore (B) (fig. 3.3).

Il rapporto tra i segnali $I(A)/I(B)$ è la misura della densità fotografica nel punto campionato dell'immagine.

Quando il punto/linea luminoso, nel suo movimento di scansione, attraversa un oggetto sulla fotografia, questo viene rivelato dal processore digitale PEPR effettuando sul segnale digitale operazioni di soglia o di ricerca di un particolare valore del massimo rilevato.

Fig.3.3 Schema a blocchi del sistema PEPR. I numeri in parentesi indicano schematicamente la sequenza di analisi dei dati



3.2. Interactive facilities

La caratteristica dei PEPR, che li distingue dagli altri sistemi automatici di scansione, è la flessibilità dell'apparato che permette di lavorare, su decisione dell'operatore, sia in modo "manuale" che in modo completamente automatico. Il sistema è fornito di uno schermo televisivo nel quale è possibile osservare la regione del film esaminata da PEPR, regione che può essere definita dall'operatore mediante una "speed ball" della consolle (una manopola collegata ai registri del PEPR).

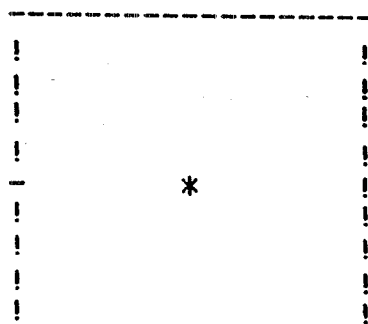
L'immagine elaborata automaticamente compare su uno schermo grafico alfanumerico veloce che funziona anche da tastiera per l'operatore (touch screen di fig. 1.3). Istante per istante compaiono su questo schermo le opzioni valide per l'azione dell'operatore. Egli può selezionarne una toccando sullo schermo la frase relativa all'opzione voluta.

Da un confronto dell'immagine ricostruita sullo schermo alfanumerico e l'immagine originale comparsa sullo schermo televisivo, l'operatore può giudicare la bontà dell'analisi e decidere di procedere in modo automatico o passare ad una analisi manuale.

3.3. Caratteristiche di funzionamento

Come accennato in precedenza, la scansione di una fotografia può essere eseguita sia con lo spot che con la linea. Per poter compiere tale scansione il fascio nel CRT deve essere opportunamente deflesso. La deflessione viene prodotta in due fasi distinte. Mediante una deflessione principale il fascio viene indirizzato in uno dei $2^{16} \times 2^{16}$ punti individuabili sulla superficie del CRT. L'unità di misura di questo spostamento è la main deflection unit (MDU) pari a $2,5 \mu\text{m}$. Attorno al singolo punto così individuato è poi possibile definire una cella di scansione compresa in una distanza dal punto di $\pm 64 \text{ IC}$

+ 64 IC



-64 IC

+ 64 IC

IC (interpolation count) è un'unità di misura che può essere selezionata tra i seguenti valori: $1,5 \mu\text{m}$; $6 \mu\text{m}$; $24 \mu\text{m}$; $96 \mu\text{m}$. In corrispondenza di

tali valori viene definita una modalità di scansione della cella come riportato nella tabella seguente:

Nome della scan-cell	Lunghezza (μm)	Interpolation count (μm)
----------------------	-----------------------------	---------------------------------------

super track	192	1,5
track	770	6,0
find	3.100	24,0
super find	12.300	96,0

Definendo dei gates è poi possibile ridurre ulteriormente i limiti di scansione.

La scansione di una cella, indipendentemente dal valore fissato per IC, richiede sempre 64 μs per essere compiuta essendo limitata a 128 ticks dell'orologio interno al calcolatore ed essendo la frequenza di sampling uguale a 2 MHz.

Una caratteristica di estrema utilità presentata dalla scansione con la linea è costituita dal fatto che è possibile orientare la linea e compiere le corrispondenti scansioni, a diversi angoli, permettendo di individuare facilmente la direzione di una traccia, nel caso di eventi

nucleari, e di un braccio di cromosoma come nel caso che più ci interessa. Anche in questo caso si definisce una tipica unità di misura di incrementi angolari uguale a $180^\circ/255 = 0,7^\circ$.

In conclusione la ricerca degli oggetti in un fotogramma viene dunque eseguita suddividendo la superficie in esame in celle di scansione di dimensioni ben definite limitandosi poi alla scansione di una singola cella alla volta.

Riassumendo, i parametri essenziali del PEPR sono dunque i seguenti:

1. diametro del puntino con il quale si effettua la scansione di circa 15 μ m. Il puntino è deformabile in una lineetta lunga fino a circa 2mm, orientabile a passi di $/255$ radianti;
2. frequenza di campionamento di 2 MHz;
3. precisione di localizzazione del puntino a 2 μ m su un'area utile di $12 \times 7 \text{ cm}^2$.

Rispetto agli analizzatori commerciali di immagini PEPR si differenzia per le seguenti caratteristiche:

1. accesso veloce ai fotogrammi voluti (al massimo 7m/sec. su bobine di pellicole di lunghezza massima 350 m);
2. accesso veloce a qualunque punto del fotogramma (da 10 microsec a 1 microsec);

3. possibilità di rivelare direttamente strutture lineari mediante l'uso della linea;
4. rilevamento nelle forme e loro classificazione mediante i "massimi locali" in aggiunta al più convenzionale funzionamento a "soglia".

4. Programma di lavoro CARIOPEPR

4.1. Introduzione

Nella prima fase dell'esperimento forniamo a PEPR delle fotografie di strisci cromosomici ingranditi circa 20 volte per ottenere una larghezza media dei bracci di cromosoma ($1\mu \times 20$) risolvibile dall'hardware.

Per fare questa foto utilizziamo una lente ad altissima risoluzione ($< 1\mu$) e delle emulsioni fotografiche ad alta risoluzione.

E' in programma di eseguire queste fotografie con luce ultravioletta.

Su una fotografia di $7 \times 12 \text{ cm}^2$ è possibile, in teoria, fotografare un campo di circa $4 \times 4 \text{ mm}^2$ di striscio cromosomico.

E' allo studio un metodo di deposizione dello striscio con elevata densità di metafasi in striscetta di plastica trasparente in modo da automatizzare la fotografia su rulli di pellicola. Questo permette di sfruttare la velocità di PEPR anche nella fase di analisi da fotografia.

Quando gli algoritmi di individuazione dei cromosomi saranno a punto, sarà opportuno evitare il passaggio attraverso la fotografia ed analizzare con PEPR direttamente gli strisci cromosomici. Ciò comporterà lo studio e la realizzazione di un nuovo sistema ottico per PEPR con demagnificazione 1/10.

4.2. Aspetti generali sul software

Come abbiamo visto, alcuni programmi dell'elaboratore PDP 11/45 utilizzati da PEPR sono dedicati al controllo dell'hardware (formazione del puntino o linea luminosa, definizione della scan-cell, ecc.). Si tratta di programmi sia di corredo alla macchina. Con questi algoritmi si esegue una prima cernita degli oggetti dell'immagine fotografata.

I veri e propri programmi di riconoscimento sono strutturati in livelli di crescente precisione:

1. al primo livello il PEPR esegue solo la ricerca di una zona di metafasi e offre un aiuto "secretariale" all'operatore nel lavoro di riconoscimento;
2. il secondo livello potrebbe includere un conteggio dei pezzi separati;
3. il terzo livello includerebbe un tentativo di riconoscimento vero e proprio.

Questo procedimento per step è dettato dall'esperienza nel campo delle alte energie dove l'automazione nell'analisi è meglio riuscita.

Il software relativo al punto 1. è già stato sviluppato ad un livello che possiamo ritenere soddisfacente riuscendo ad individuare in circa 2 secondi le metafasi che si trovano su circa 10 mm^2 di striscio.

4.3. Routine di base per l'automazione in dosimetria citogenetica

a) Subroutine LSP.

E' una subroutine già ben collaudata. Inizializza PEPR per una scansione in verticale con un elemento di linea orizzontale. Successivamente esegue una scansione con un puntino lungo la linea orizzontale dove era stato trovato il massimo nella densità fotografica nella prima scansione. In questo modo la posizione del massimo trovato con la seconda scansione indica l'oggetto preminente nell'area indagata. Tipicamente questa area è un quadrato con lato 700 microns. Ogni scansione richiede circa 100 microsecondi.

Nella fig. 1.4 si mostra il risultato ottenuto con LSP su un'immagine di oggetti aventi dimensioni minime di circa 300 microns.

LSP permette l'individuazione di oggetti parzialmente sovrapposti con un'efficienza di circa 1%.

b) Subroutine LSPE.

E' una routine abbastanza collaudata, per l'individuazione dei transienti di densità nelle immagini (edge detector): PEPR esegue ripetute scansioni con una linea, cambiando soltanto

l'angolazione di quest'ultima di un dato incremento, fino al completamento di un giro (180 gradi). Le operazioni di rilevamento sono eseguite sulla derivata del profilo della densità utilizzando la facility hardware del "dummy sweep". Questo consiste in una doppia scansione: durante la prima il profilo della densità y_i viene acquisito nella memoria interna ad intervalli equidistanti delle coordinate x_i di scansione; durante la seconda, si sottrae dal segnale y_i quello residente in memoria relativo alla posizione x_i+k . Il segnale di differenza è perciò proporzionale alla derivata del segnale originale.

L'output di questa operazione hardware è la massima altezza della derivata del segnale entro l'area indagata, la sua orientazione, larghezza e posizione.

Nella fig. 2.4 si mostra il risultato ottenuto con LSPE su un'immagine di metafasi. La lunghezza della linea utilizzata, 370 microns, è troppo grande rispetto alle dimensioni dei cromosomi più piccoli (ca. 400 microns) per pensare di ottenere risultati soddisfacenti.

L'algoritmo ha trovato sostanzialmente tutti i bordi, se si tiene conto che accetta nella versione attuale solo il bordo preminente

entro ciascun quadratino di ricerca. Per illustrare le condizioni di operazioni si mostra nella fig. 3.4 un tipico profilo di densità attraverso le due braccia del cromosoma.

c) Routine DSL

E' un modo di operare nell'hardware PEPR messo a punto per segnali poco modulati e ravvicinati.

Il principio è illustrato nella fig. 4.4: si effettua la scansione ripetutamente con una soglia automaticamente decrementata alla fine di ogni passo. Si mostra anche l'operazione "isteresi soglia" che avviene ogni qual volta il segnale uguaglia il valore di questa.

Il valore del centro del segnale e la larghezza alla soglia vengono immagazzinati automaticamente in appositi registri, se la larghezza non supera un predeterminato valore. In questo modo, si ha la possibilità di rivelare nei quattro registri due segnali ravvicinati.

Il tempo necessario per questa sequenza hardware è dell'ordine di un millisecondo.

Nella fig. 5.4 si mostrano i risultati di una serie di scansioni DSL lungo due tracce di camera a bolle che si intersecano a piccolo angolo (la scala verticale è compressa di un

fattore 5). Sono indicati le larghezze rms delle tracce.

d) Routine BOX

Si potrebbe prevedere di ottenere un algoritmo che circonscrive un oggetto già trovato con LSP in una scatola. Si otterrebbe così un conteggio e una stima approssimativa degli oggetti in un determinato campo senza entrare nei dettagli del riconoscimento.

e) Routine DEL

Dalla routine LSPE si può pensare di sviluppare una routine che, utilizzando la linea come elemento di scansione, rivela l'orientazione dell'oggetto trovato con LSP.

Il primo stadio di qualunque schema sarà pressochè il programma LSP. Con questa routine, in pochi secondi, si possono individuare le possibili metafasi su circa 10mm^2 dell'area di uno slide, posto che sia stato possibile effettuare la fotografia dello slide con ingrandimento 30X e risoluzione di circa 1,5 microns.



Fig. 1.4 Risultato di un test con il programma LSP
(algoritmo per ritrovamento e classificazione
degli oggetti)

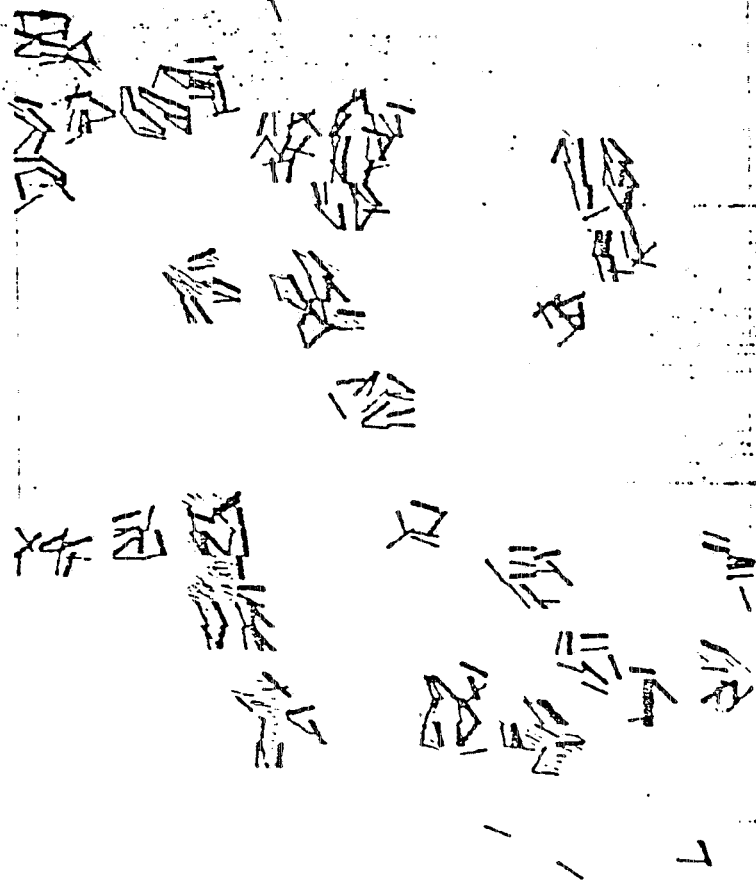


Fig 2.4 Applicazione su cromosomi del LSPE
("trovabordi").

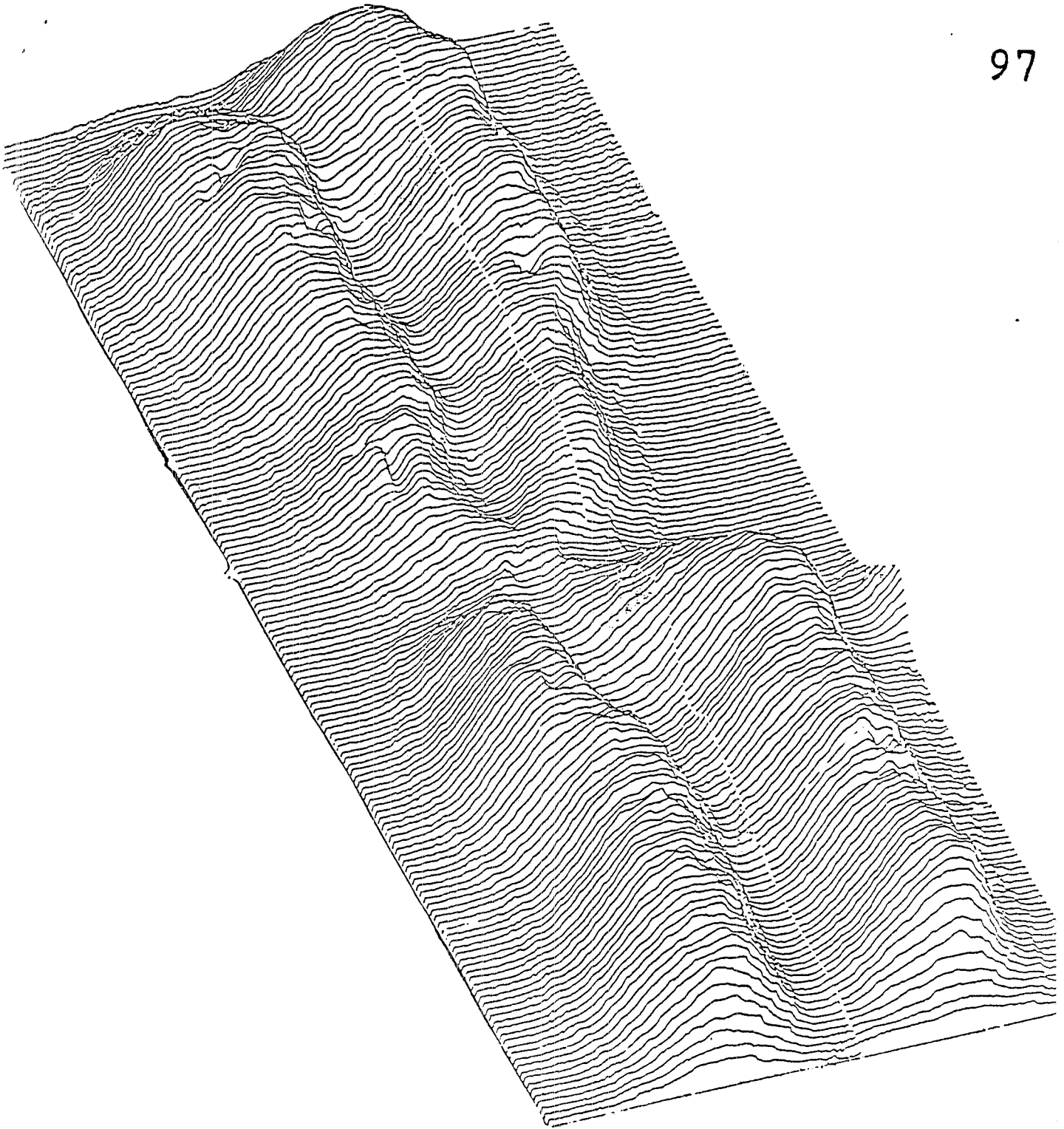


Fig. 3.4 Profilo di densità di un cromosoma in
rappresentazione tridimensionale
(programma di diagnostica SWPL).

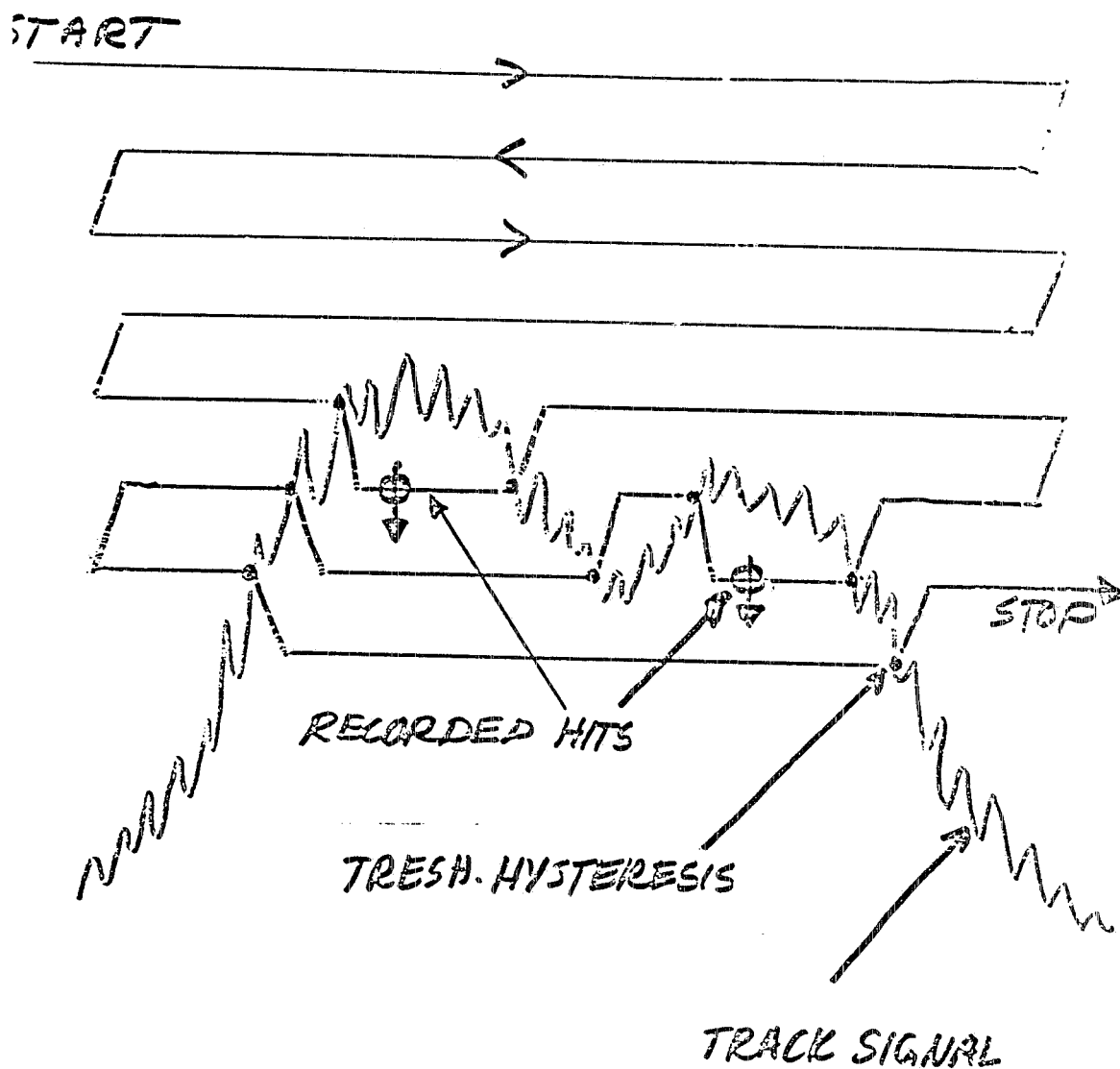


Fig 4.4 Principio della funzione hardware PEPR
 "Soglia variabile passo a passo".

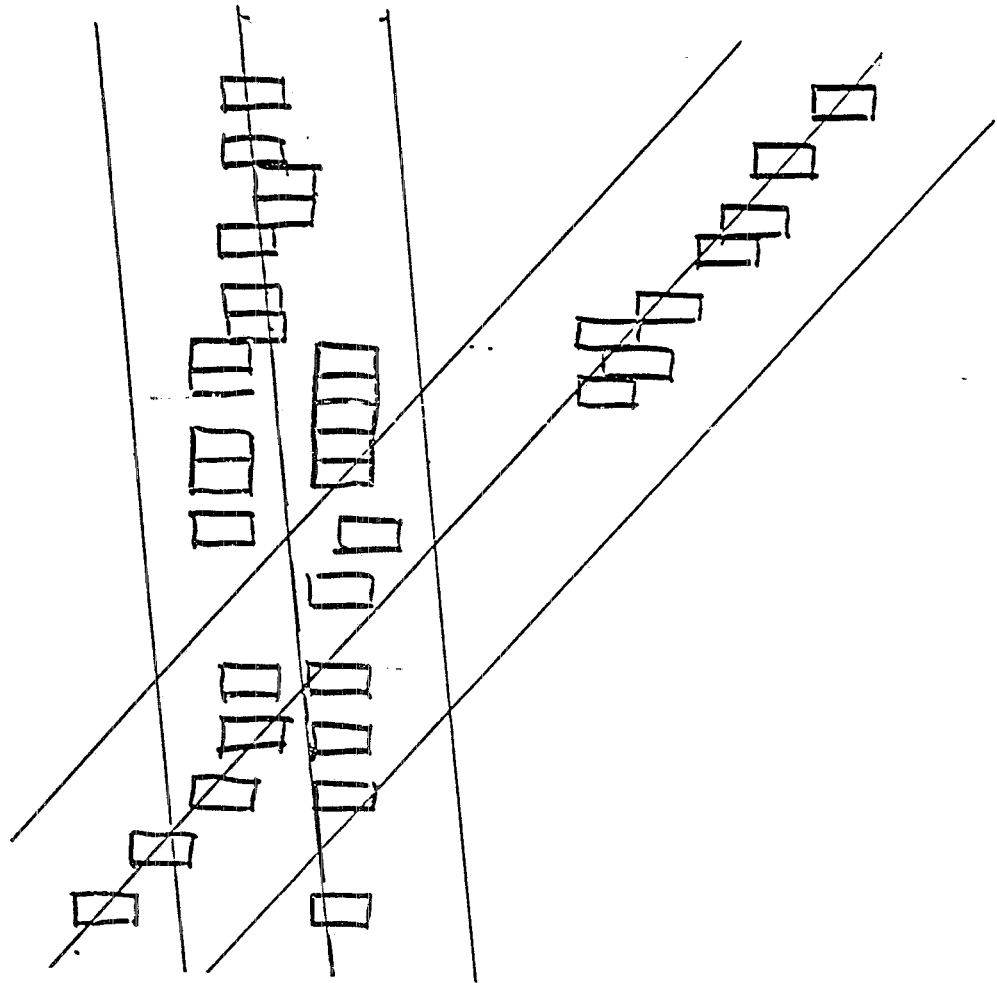


Fig. 5.4 Esempio di identificazione degli oggetti
in una situazione confusa con il metodo
soglia a passo a passo

5. Software per la ricerca automatica delle metafasi

5.1. Routines di base

Il software prodotto si divide in tre categorie:

1. routines operative del PEPR che formano una interfaccia tra il processore del PEPR ed i programmi applicativi dell'"utente". Sono stati originariamente prodotti in precedenti lavori da parte del gruppo PEPR.
2. Software per verificare le diverse strategie. (In parte discusse nel cap. 4).
3. Programma KR3 per la ricerca delle metafasi.

I programmi sono da considerarsi "sperimentali", nel senso che sono nella stesura rimasta dopo un continuo processo di modifica. La "buona regola" della programmazione, cioè la riscrittura definitiva è rimasta incompiuta. Non si è tenuto conto della ottimizzazione della velocità di esecuzione, per esempio utilizzando i tempi di attesa di completamento delle operazioni PEPR per le elaborazioni nel PDP.

E' opportuno a questo punto fare una osservazione generale sul modo di creare software nuovo, tornando al discorso sull'affidabilità dei programmi. Per evitare gli errori macroscopici di programmazione, che in questo tipo di sistemi sono

- 10

difficili da rintracciare, è conveniente adottare uno stile secondo il quale si parte da un sistema di programma operante, introducendo le novità a "piccoli passi", per essere in grado di localizzare un eventuale "errore mortale" introdotto. Più difficile è scoprire gli errori che non si manifestano con risultati palesemente distorti. Per una macchina che macina decine di megabit di informazione al secondo, è praticamente escluso un controllo "manuale" passo per passo. L'unica strada percorribile è quella di sviluppare i mezzi grafici con cui analizzare la distribuzione delle variabili del risultato, sia in tempo reale come diagnostica immediata, sia su una grossa mole di dati a posteriori verificando anche la risposta al variare dei parametri di ingresso. Un secondo passo utile per verificare la correttezza della trascrizione dell'algoritmo in software è di riscrivere tutto con un algoritmo modificato o equivalente. In questo modo si verifica anche l'algoritmo stesso. E' un test di stabilità della soluzione eventualmente ottenuta.

1. KR3: è un task per la ricerca delle metafasi composto dalle seguenti parti: inizializzazione, operazioni per "insegnamento" per verificare le condizioni di lavoro, operazioni automatiche, opzioni di diagnostica.
2. NSCAN: subroutine per effettuare operazioni PEPR (di provenienza storica con il nome MSCAN).

3. RESETT: subroutine di gestione PEPR.
4. CINTT: task di gestione degli interrupts provenienti dal PEPR.
5. KEYCOM: subroutine di gestione del "Touch screen" per effettuare dei comandi manuali.
6. SWPL: task per operare PEPR in un modo del tutto manuale. Principale mezzo di diagnosi del software comando PEPR (di provenienza storica).
7. MODSGA: task per il ripristino e/o modifica dei parametri che servono nelle operazioni PEPR residenti nello SGA (Sharable Global Area).
8. INRITA: subroutine di inizializzazione dei task KRn.
9. FORM: subroutine per il riconoscimento di forma.
10. DELT: subroutine per il riconoscimento di bracci di cromosoma come menzionato nel cap. 2.2 e utilizzato nel KR3.

5.2. Routines di analisi

Questi programmi sono progettati per funzionare all'interno degli algoritmi automatici allo scopo di ottenere una visione d'insieme sul modo di operare di questi. Come anche gli algoritmi, le routines di analisi sono configurate come una serie di subroutines che vengono composte di più tasks che

possono operare indipendentemente e comunicare tra loro mediante il common SCA (Sharable common area) e/o Event flags.

1. REGAPS: task che inizializza gli istogrammi. Viene messa in esecuzione mediante CALL REQUES.
2. HKRMT: output task di istogrammazione veloce su unità grafica Matrox, usando STATN, MTHPL.
3. KRG1: output task per grafica nel sistema Plot - 10, a partire sul file scritto da routines KRn.
4. GRAFI: output task per gli istogrammi nel sistema Plot - 10, usando il routine SIXPAC.
5. RETVER: disegna nel sistema grafica Plot - 10 un rettangolo orientato.
6. FILL: subroutine che viene chiamata per accumulare un istogramma.
7. STATN: subroutine che calcola le statistiche finali su un istogramma.
8. PLOT: subroutine che fare output di un istogramma su un terminale alfanumerico.
9. MTHPL: subroutine per fare output di un istogramma sul display Matrox.
10. SIXPAC: subroutine di grafica degli istogrammi su display Tektronix.

5.3. Routines diagnostica hardware PEPR

E' stato effettuato un riallineamento dell'ottica elettronica del tubo a raggi catodici. Per facilitare questo compito si è prodotto una serie di routines che disegnano opportune figure sulla faccia del CRT. Inoltre sono state prodotte delle routines che permettono di determinare le dimensioni dello spot in funzione delle correnti nelle lenti elettromagnetiche che regolano il fuoco e l'astigmatismo. Da questi dati sono stati determinati poi i polinomi che vengono usati nei programmi. E' stato altresì scritto un programma con il quale si verifica la stabilità del sistema di coordinate della deflessione x-y.

5.4. Autori del software

Le prime versioni dei programmi KRn sono dovuti a Roberta Casaccia (vedere la sua tesi Università di Roma 1985), Ilkka Laakso e Agnese Martini. Il programma KR3 è stato scritto da Ilkka Laakso e Rita Ocone. Le routines di diagnostica sono state scritte da Leda Figliozzi e Ilkka Laakso, insieme con la messa a punto finale del KR3. L'impegno totale di lavoro software può essere stimato ad un anno effettivo, se si esclude il tempo necessario per familiarizzarsi con i sistemi per i nuovi venuti.

5.5. Programmi KRn, INRITA, DELT, FORM

Il programma principale chiama la subroutine INRITA che provvede all'inizializzazione di PEPR. Vengono cioè fissati alcuni parametri fondamentali per lo scanning automatico e viene accesa la TV per l'interazione con l'operatore. In questo modo possono essere acquisiti i comandi anche da tastiera o meglio dal touch screen. In questa fase di interazione con l'operatore vengono acquisiti i punti estremi della zona di fotografia da esaminare, i parametri e i comandi di scrittura per gli istogrammi.

Terminata la fase di inizializzazione il main-programm provvede a spengere la TV e a suddividere la superficie in esame in celle di scansione di dimensioni volute. In questo caso particolare la singola cella ha dimensioni tipiche di $700 \times 700 \mu\text{m}^2$.

La ricerca, col puntino o con la linea luminosa, avviene in una cella per volta.

Nella subroutine INRITA, tra i parametri fissati, sono stati anche definiti i "gates" della cella che delimitano la finestra di scansione. Si tratta di ulteriori limiti che possono anche coincidere con i bordi stessi della scan-cell e che possono, in funzione delle circostanze, essere opportunamente variati.

Durante la scansione, PEPP è in grado di memorizzare la posizione e la larghezza dei segnali relativi a quattro massimi individuati nella cella. Va anticipato che la larghezza o l'intensità del segnale danno informazioni sul tipo di oggetto trovato che potrebbe non essere un cromosoma ma una semplice impurità.

La prima scansione nella cella viene eseguita con l'elemento di linea orizzontale.

La barra luminosa scorre lungo la cella, determinando una scansione verticale, muovendosi da un gate della finestra di scansione all'altro. Per ogni posizione della barra avviene il processo di analisi del segnale luminoso come sopra accennato, per ricercare il massimo di densità fotografica.

Se il massimo trovato in questa prima fase si trova su un bordo della cella si presume che il vero punto di massimo sia nella cella attigua; allora si cambia il gate corrispondente in modo tale da escludere tale punto dalla attuale cella di ricerca per andare ad esaminarlo in un secondo momento quando si eseguirà la scansione della cella vicina. Un tipico caso è riportato in fig. 1.5.

Una volta trovato un massimo di densità fotografico nella cella viene memorizzato la sua posizione ICL (fig. 2.5) e si prosegue l'analisi con il puntino luminoso.

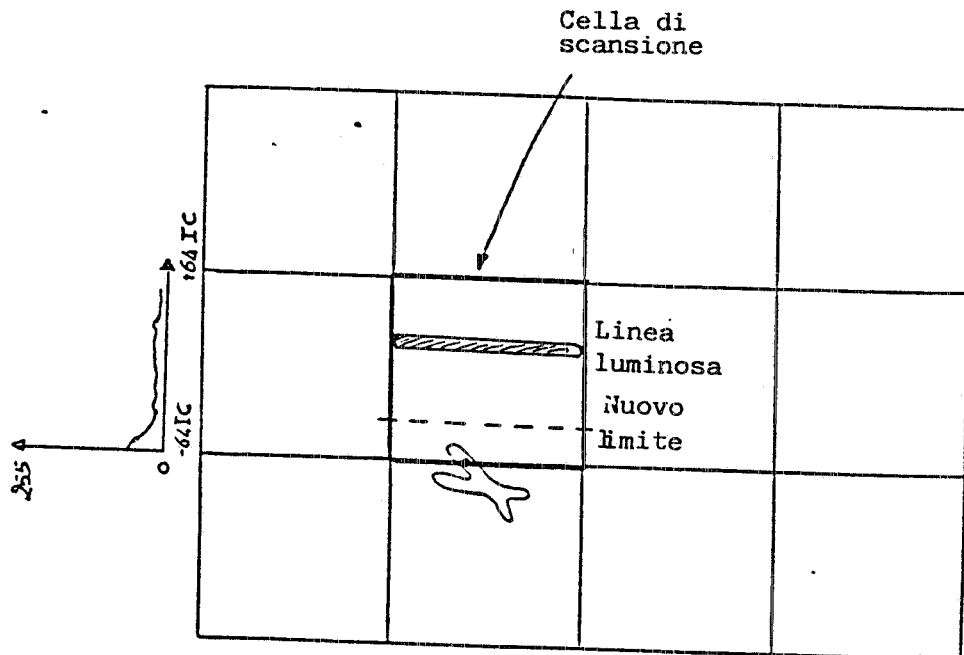


Fig. 1.5. Esempio di scansione verticale con la linea luminosa. Tipico caso in cui il massimo della densità fotografica cade sul bordo della scan-cell. Sulla sinistra della scan-cell è riportato il profilo di densità fotografica in funzione della linea luminosa. I livelli di grigio memorizzabili sono 255.

La scansione con il puntino viene eseguita perpendicolarmente a quella della linea (fig. 3.5), cioè lo spot si muove lungo la linea orizzontale dove era stato trovato il massimo della densità fotografica nella prima scansione. In questo modo viene individuata l'altra coordinata ICP relativa al massimo, permettendo di localizzare l'oggetto preminente nell'area indagata. La fig. 1.4 mostra il risultato che si ottiene su un'immagine di oggetti di dimensione minime di circa 300 \AA m.

Come si vede dai profili di densità riportati nella fig. 3.5 e più in particolare nella fig. 2.6 il massimo della densità fotografica si ottiene in corrispondenza dei bracci dei cromosomi.

Ciò può essere sfruttato per approfondire l'analisi di forma.

A tale scopo sono state sviluppate due subroutine: FORM e DELT.

La subroutine FORM individua i profili di densità al di sotto di una quantità fissa dei massimi trovati e ne calcola quindi le larghezze.

La chiamata a questa subroutine viene fatta sia per i profili verticali che per quelli orizzontali a seconda del valore attribuito ad una certa variabile logica.

La posizione da cui si parte per l'analisi è data dalle coordinate (XM, YM) del massimo locale

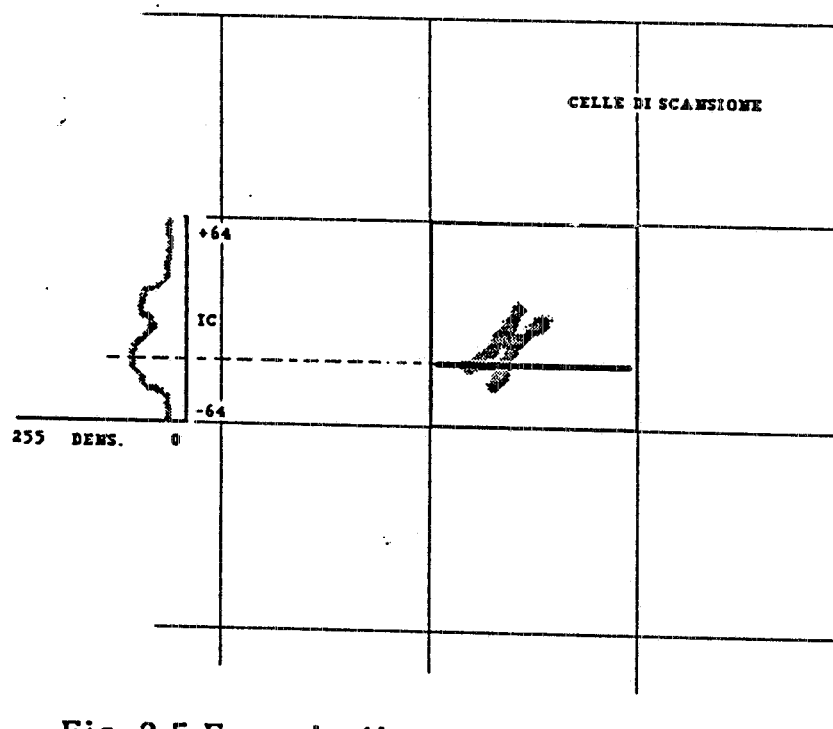


Fig. 2.5 Esempio di scansione verticale con la linea. A sinistra il profilo di densità analizzato.

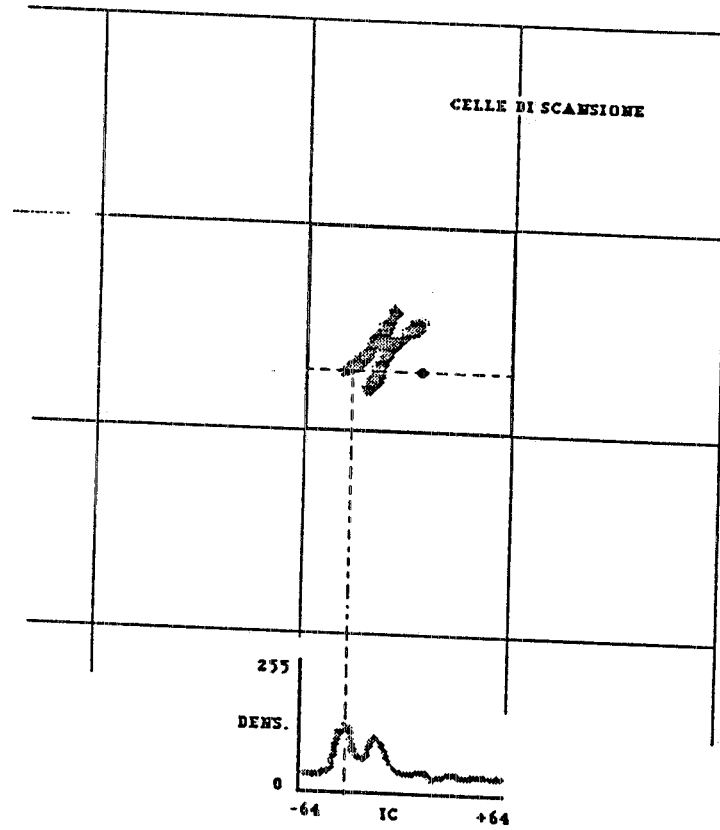


Fig. 3.5 Esempio di scansione orizzontale con il puntino sulla base dei risultati indicati nella fig. 2.3. Il profilo di densità su cui si basa l'analisi è mostrato.

di densità della cella. Le scansioni, verticali ed orizzontali, procedono in modo identico: quindi sarà sufficiente descriverne una, per esempio quella verticale.

A partire da XM si esegue un ciclo di scansioni successive con lo spot, al massimo 8, a passi di 20 MDU secondo se si procede nello stesso verso o in verso opposto rispetto all'asse delle ascisse nel sistema di riferimento main-deflection. Si procede con le scansioni fino ad ottenere due scansioni successive con risultato nullo. Nel corso di tali scansioni si misurano le larghezze dei segnali ad una certa soglia.

Quindi viene calcolata la larghezza media dei segnali sia dei profili in verticale che di quelli in orizzontale.

Successivamente il programma chiamante esegue i seguenti controlli:

1. se è fallito soltanto il test sul numero di profili in verticale viene caricato un istogramma con le larghezze medie dei profili in orizzontale;
2. se è fallito soltanto il test sul numero di profili in orizzontale, viene caricato un istogramma con le larghezze medie dei profili in verticale;

3. se sono falliti entrambi i tests, non si eseguono ovviamente istogrammi;
4. se entrambi i tests hanno dato risultati positivi, nell'istogramma viene caricata la larghezza ottenuta come media della "larghezza media verticale" e della "larghezza media orizzontale" divisa per 2. Questo è ragionevole in quanto se entrambi i tests hanno dato risultati positivi si può ritenere che l'oggetto sia orientato a 45° . In fig. 4.5. riportiamo un esempio di tali istogrammi dove è possibile vedere la larghezza media calcolata.

Tale procedimento permette di valutare la larghezza media delle braccia dei cromosomi, quantità su cui si può basare l'individuazione dei cromosomi e su cui si possono sviluppare successivi test e algoritmi.

La subroutine DELT ricerca invece l'orientamento delle braccia di cromosomi. Questo viene fatto sfruttando la possibilità di orientare la linea di scansione a diversi angoli centrandola sul punto di massima densità fotografica identificato nelle scansioni precedenti.

L'orientazione del braccio risulta definita dalla completa sovrapposizione della barra di luce: infatti in tale posizione il segnale che si ottiene corrisponde al minimo della luce trasmessa.

La routine DELT, opportunamente adattata, consentirà di introdurre dei tests sulla posizione reciproca delle braccia, sui centromeri, ecc.

Tali sviluppi porteranno poi a selezionare i cromosomi aberrati.

Con il sistema grafico veloce MATROX, i risultati appaiono come rappresentati nella fig. 4.5.

In uno schermo contiguo può essere esaminata l'immagine TV dello stesso cromosoma, permettendo una immediata valutazione della operazione automatica.

Spesso risulta necessario evidenziare l'immagine cromosomica con maggiore dettaglio quantitativo sulla esatta distribuzione della densità.

Questo si ottiene con il programma SWPL, come risulta nelle figg. 5.5 e 6.5.

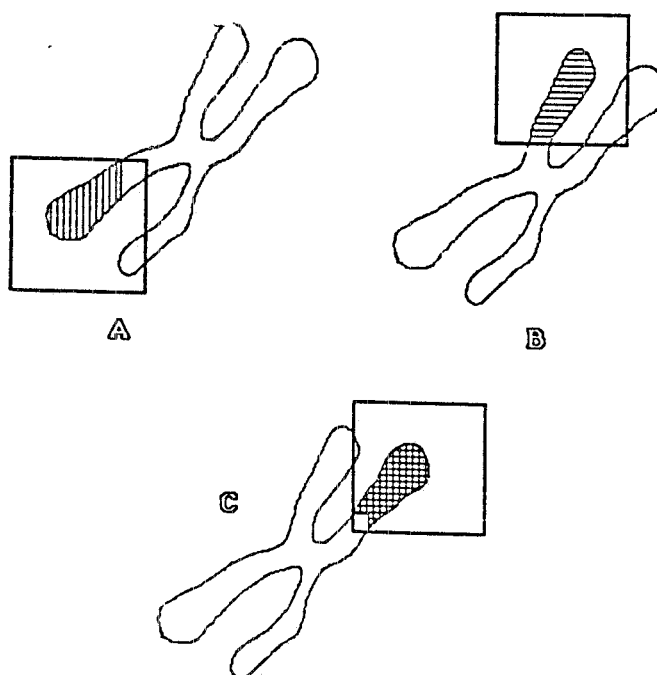
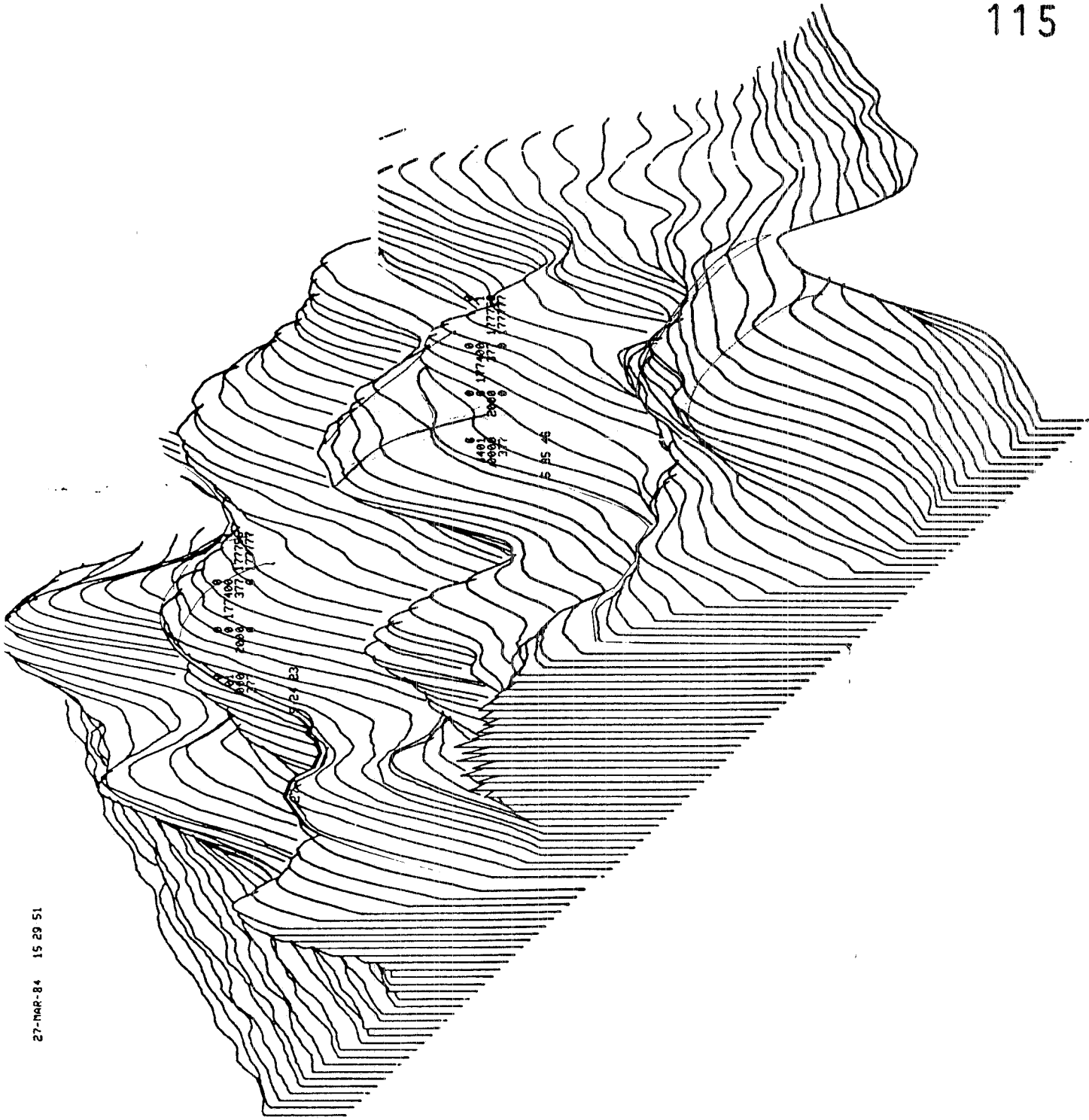


Fig. 4.5 Esempio di scansione con la subroutine FORM .
A) Risultato positivo con la sola scansione verticale .
B) Solo orizzontale C) Risultato positivo per entrambi i modi ,
"caso 45° gradi".



27-MAR-84 15 29 51

Fig. 5.5 Rappresentazione tridimensionale di densità di immagini cromosomiche ottenuta con il programma di diagnostica SWPL.

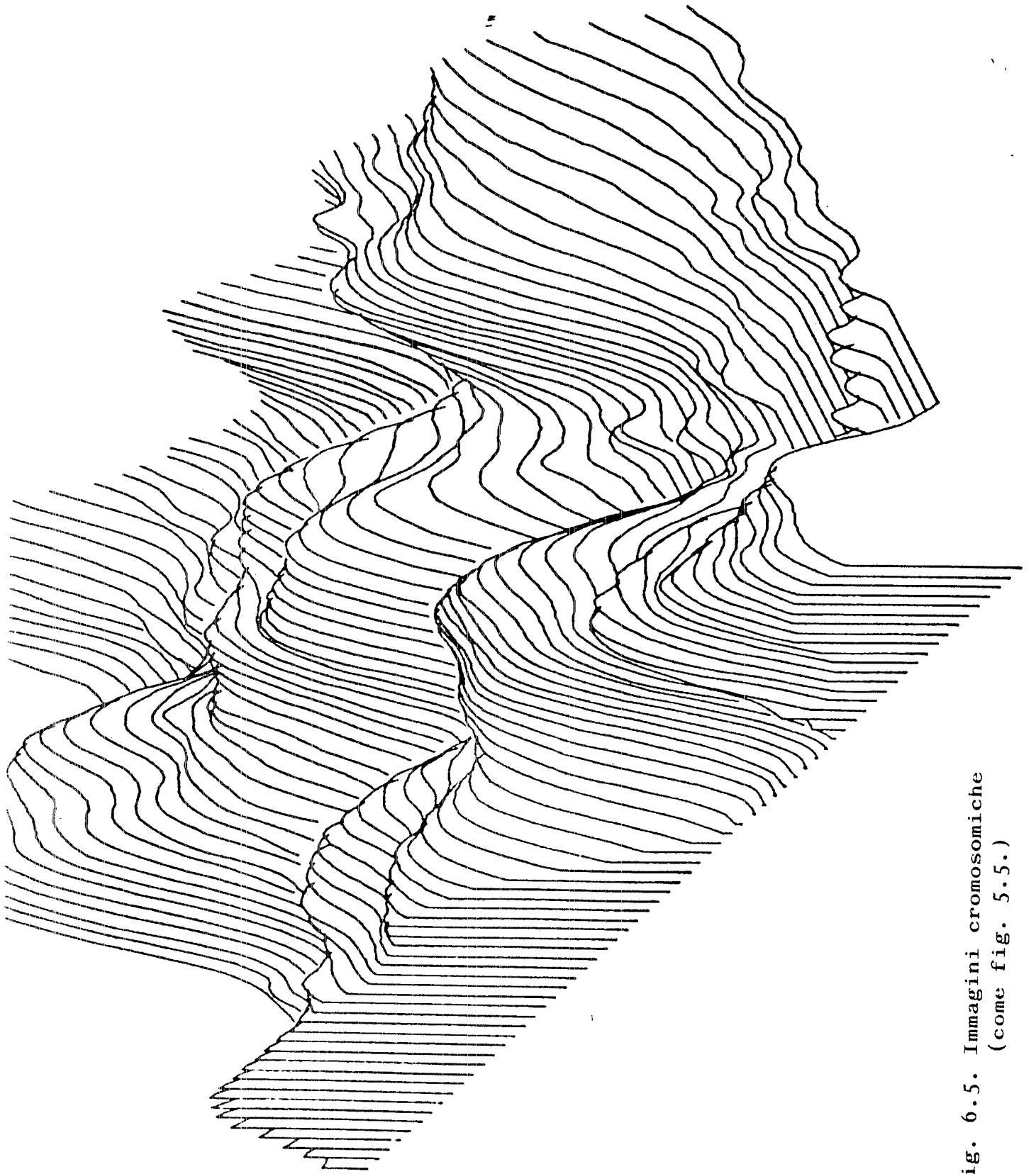


Fig. 6.5. Immagini cromosomiche
(come fig. 5.5.)

6. Studio preliminare per l'identificazione dei cromosomi e dei centromeri

Anche se si è convenuto che il lavoro sulla ulteriore automazione debba essere rimandato dopo il primo passo del riconoscimento delle metafasi, sono state eseguite delle prime prove che formano il software KR4. E' stata studiata la correlazione tra le coppie delle braccia dei cromosomi. Precisamente, se l'identificazione di un braccio è corretta, l'esistenza dell'altro braccio nella posizione prevedibile è rapidamente verificabile. Una volta ottenuta questa conferma, la identificazione del cromosoma sarebbe vicina. Per avere un'idea di come procedere allo sviluppo di un algoritmo per questo scopo, si è effettuato uno studio con il programma SWPL (vedere cap. 5.1). Si effettua una scansione con un elemento di linea nel senso longitudinale del cromosoma, (fig. 1.6) ottenendo un profilo di densità di un cromosoma come mostrato nella fig. 2.6.1. Nelle figure 2.6.2. e 2.6.3. si mostrano i profili delle prime derivate del precedente profilo dalle quali, mediante l'uso dell'algoritmo "ricerca dei massimi locali", si può arrivare alla determinazione della lunghezza del cromosoma e della posizione del centromero.

7. Conclusioni sul lavoro svolto sul software

E' stato messo a punto un sistema che individua rapidamente una metafase su un fotogramma. Gli algoritmi utilizzati nel sistema sono stati accuratamente verificati. Nel corso di queste verifiche, sono state fatte delle comparazioni, con algoritmi "classici". Per la impossibilità di produrre la fotografia di "produzione", è mancata la dimostrazione conclusiva del sistema. Nella versione attuale la velocità di esecuzione è già interessante, ed è suscettibile di ulteriori perfezionamenti.

8. Studio del sistema ottico - fotografico

Nei piani iniziali della collaborazione era previsto l'acquisto nella prima fase di un sistema macrofotografico ad alta risoluzione, con riduzione intorno a 20x. Inaspettamente sono state incontrate notevoli difficoltà, al momento attuale insormontabili, nel reperire il materiale necessario, in particolare le lenti di fabbricazione standard, e in alternativa le lenti da progettare ad hoc. Contemporaneamente è stato possibile avere una indicazione di massima sui costi valutati a 70 M Lt per le prime e a 250 M lt per le seconde.

In attesa che si potesse chiarire questa situazione, si è ottenuto in prestito una lente dall'Università di Nijmegen in Olanda (Nikon Macro Nikkor $f= 28$ mm. 1,7, 10X). Per le prove si è realizzata una opportuna attrezzatura di macrofotografia dotato di sistemi necessari per queste risoluzioni: sistemi per l'isolamento delle vibrazioni, movimenti micrometrici per il posizionamento ed l'allineamento. Il sistema è mostrato schematicamente nella fig. 1.8.

Per determinare la scelta dei filtri da usare insieme con il colorante Giemsa, si è ottenuto il relativo spettro di assorbimento (figg. 2.8, 3.8). Nella fig. 4.8 viene mostrata una macrofotografia di un vetrino contenente piastre metafasiche. La

risoluzione risulta di poco inferiore alle 700 linee/mm. indicate nei cataloghi, ed è insufficiente per risolvere le braccia nei cromosomi.

La possibilità di studiare una ottica con la riduzione di circa 20X comunque esiste, cosicchè si potrebbe pensare alla eliminazione della fotografia intermedia montando l'ottica proiettiva direttamente tra il CRT ed il vetrino biologico. Si otterrebbe un vantaggio importante: potendo usare un sistema di messa a fuoco automatico, facilmente ottenibile con le funzioni già esistenti nel processore, si può rilasciare la condizione della assoluta planarità dei piani di immagine.

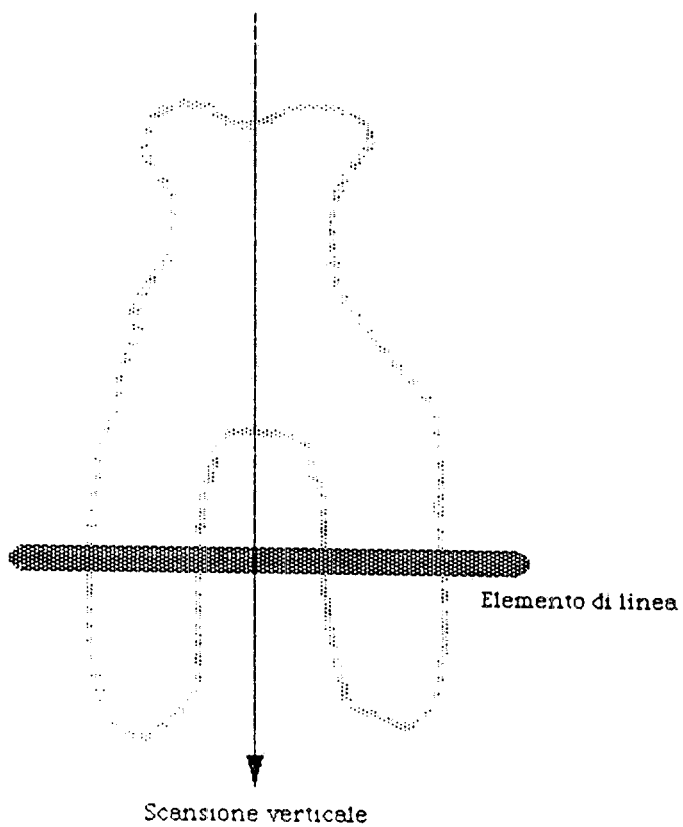


Fig 1.6 Scansione per il profilo longitudinale di un cromosoma

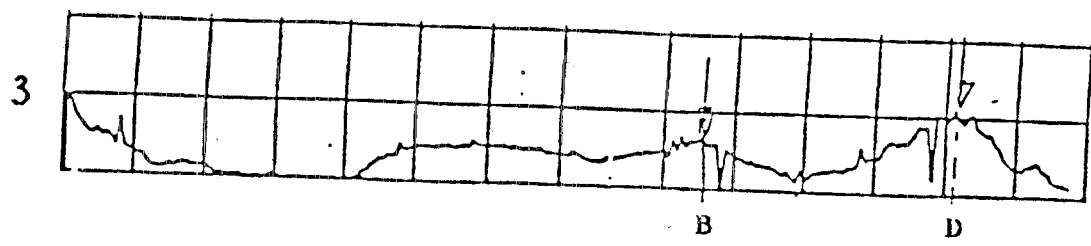
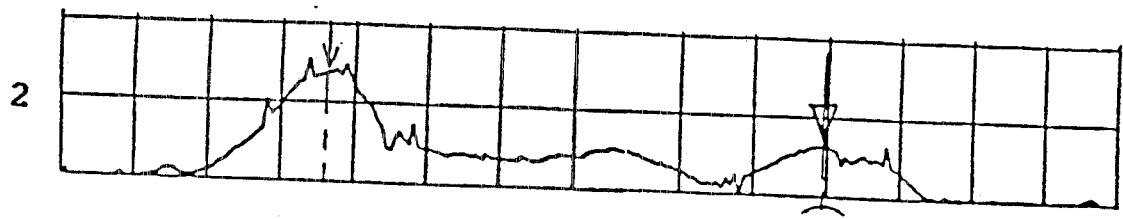
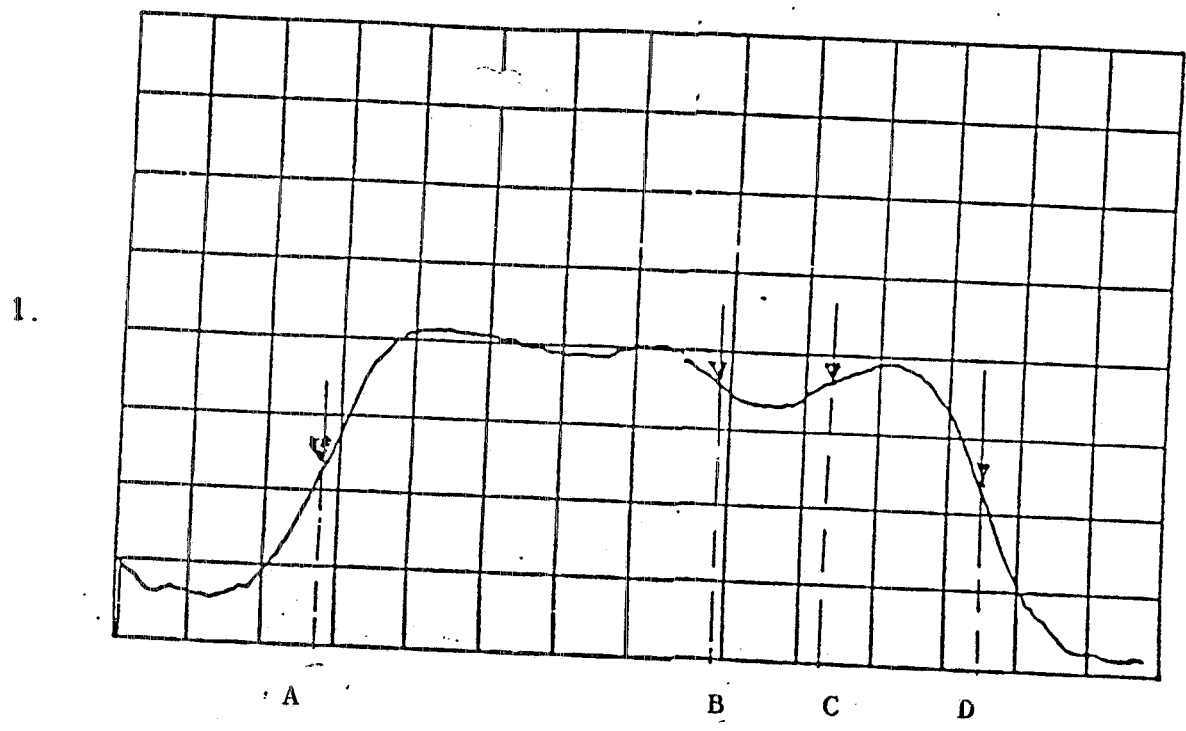


Fig 2.6 Profilo longitudinale e la sua derivata.

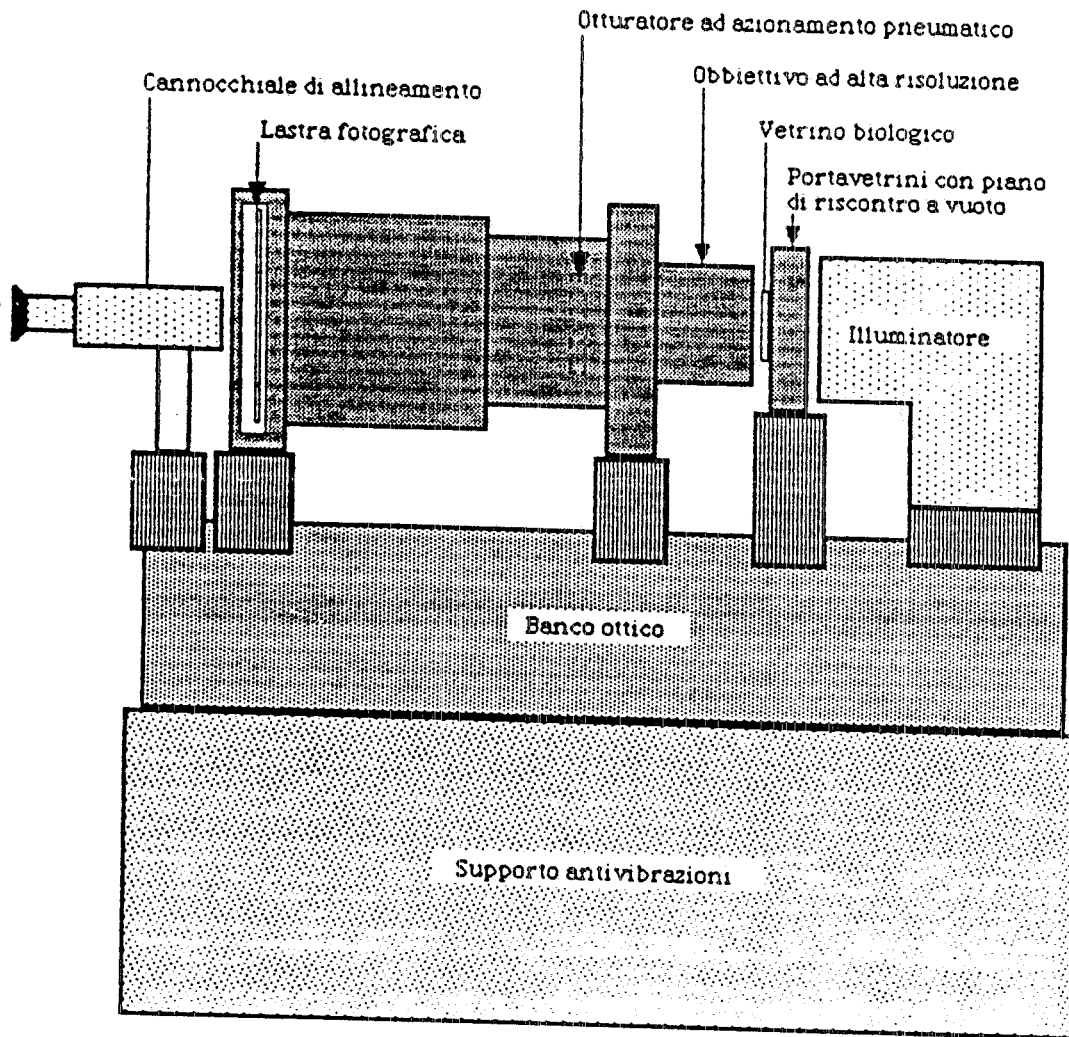


Fig 1.8 Apparato fotografico di alta risoluzione
messa a punto nel Gruppo PEPR.

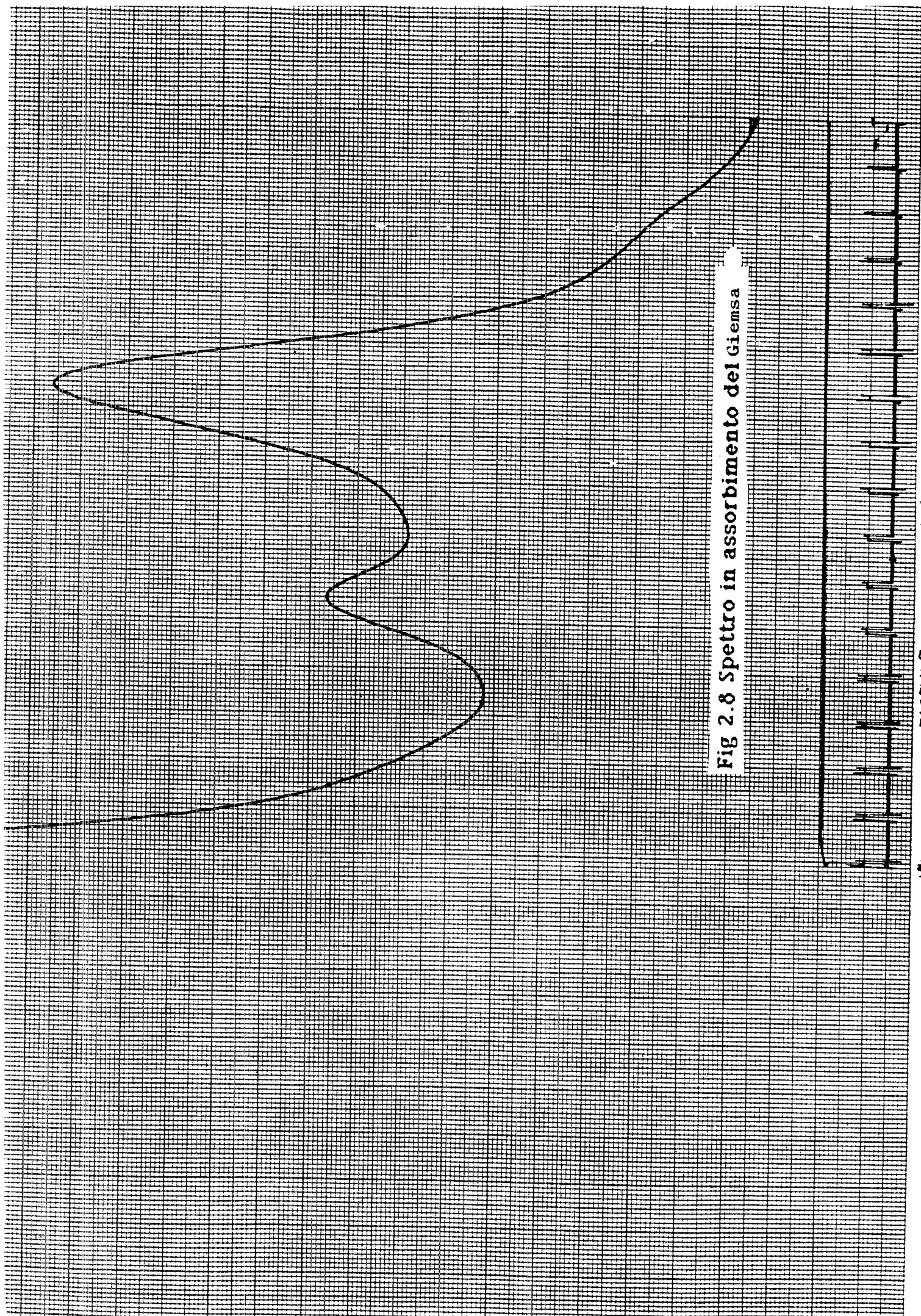


Fig 2.8 Spettro in assorbimento del Giemsa

170 BASELINE
CORRECTED
SLIT 3 mm
SCAN 20.1.11.
RECORDED 10 mm/cm
350 cm

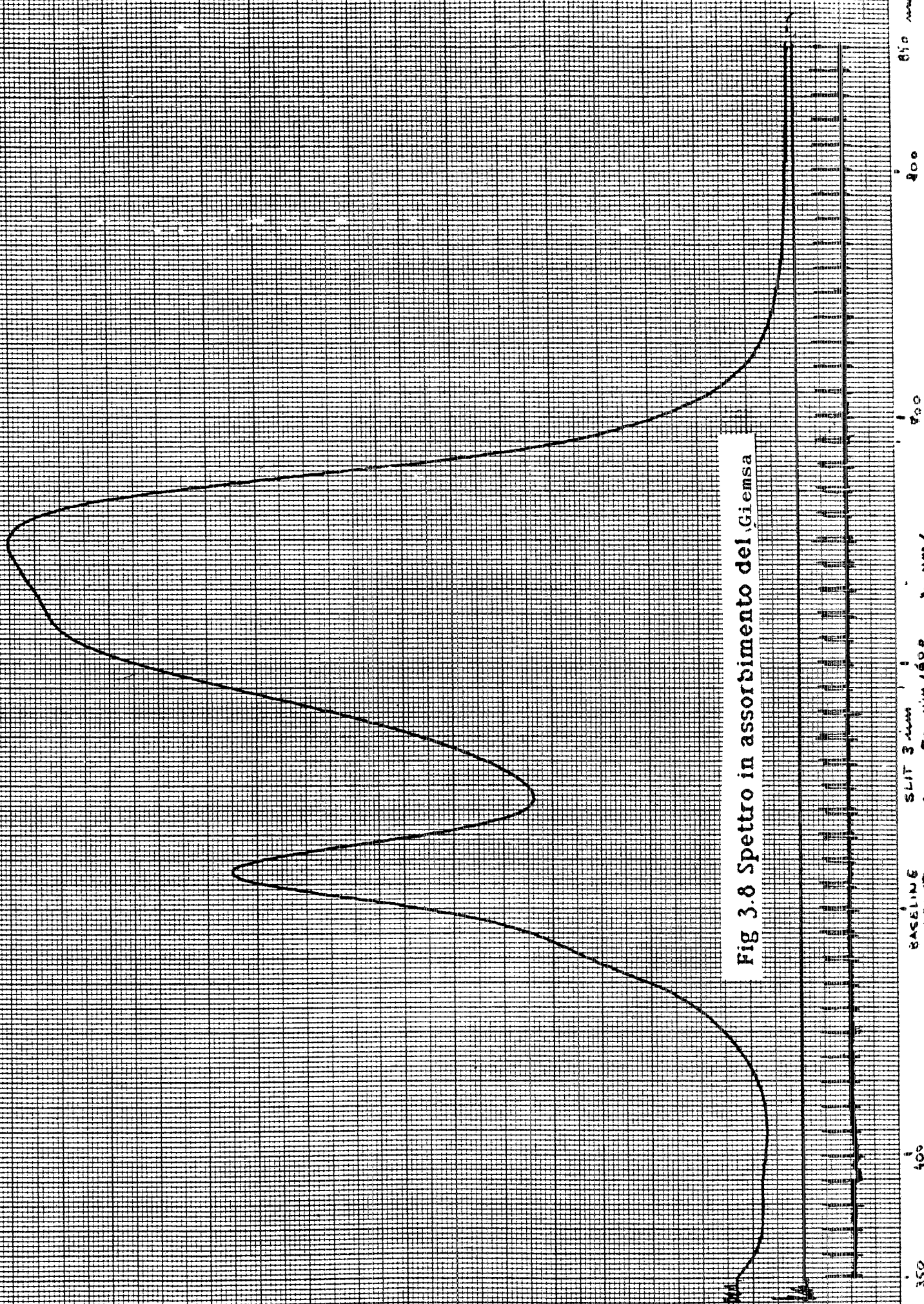


Fig 3.8 Spettro in assorbimento del Giemsa

350 400 450 500 550 600 650
BASELINE SLIT 3 mm
SCANNING SPEED 1600 mm/min

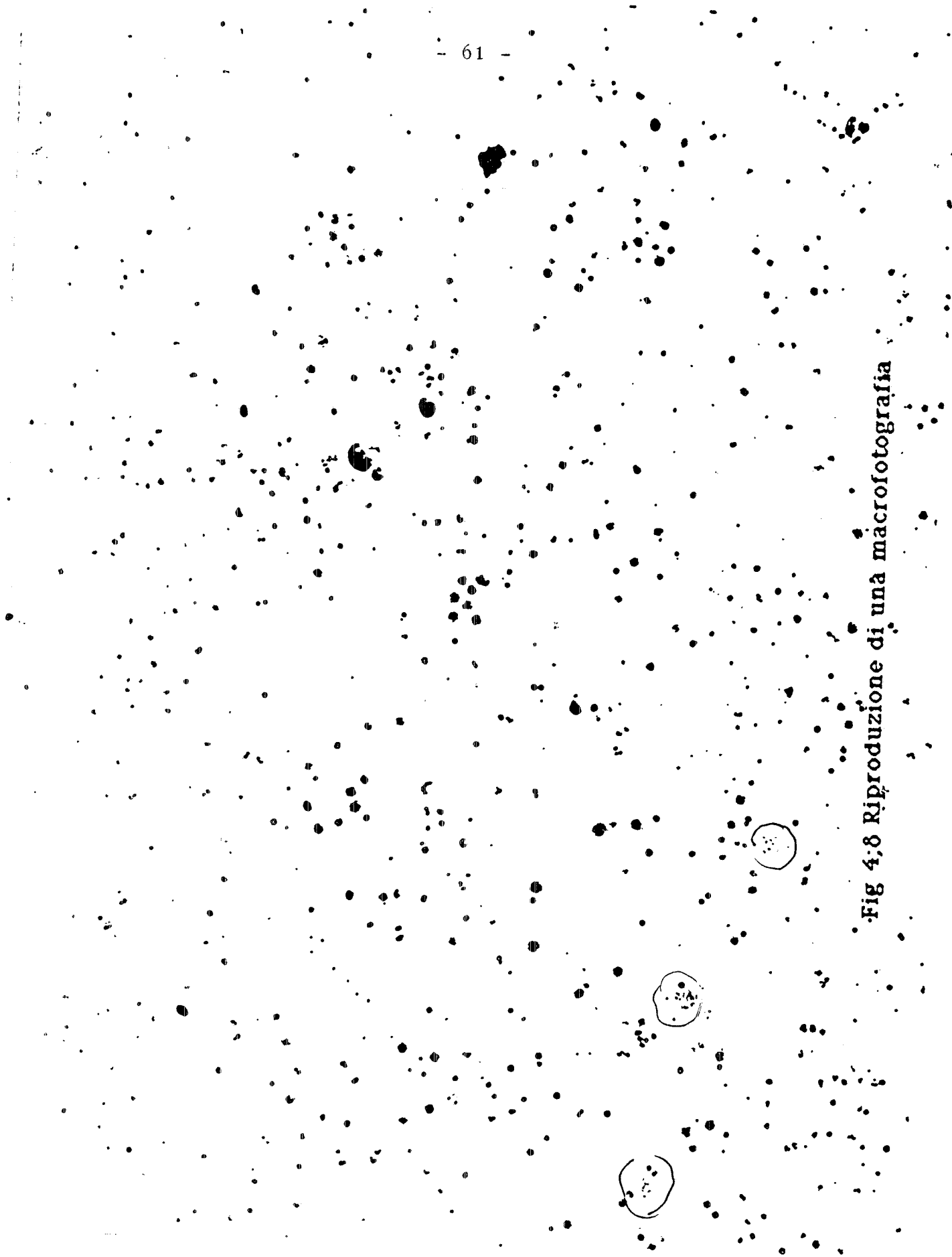


Fig 4,8 Riproduzione di una macrofotografia

Bibliografia

1. P. Allen et al.
A set of on line routines to guide PEPR in
measuring.
Bubble Chamber Film
LNF-79/13, 1979.
2. P. Allen et al.
Basic data acquisitive routines for PEPR.
LNF-79/18, 1979.
3. J. Bille et al.
Biological dosimetry by chromosome aberration
scoring with parallel image processing with the
Heidelberg polyprocessor system.
Comput. Biol. Med., Vol. 13, N. 1 1983.
4. G.L. Carayannopoulos and E.A. Patrick
And algorithm for segmentation of metaphase
spreads.
Pattern Recognition, 8, 151, 1973.
5. Cariopepr Group
A study to approach the automated screening in
the cytogenetic dosimetry,
20th Annual Meeting of European Society for
Radiation Biology, Pisa, September, 15-19, 1986.

6. P. Finnon, D.C. Lloyd, A.A. Edwards
An assessment of the metaphase finding
capability of the Cytoscan 110
Mutation Res. 164, 101, 1986.
7. T. Lörch, J. Bille, M. Friebe, G. Stephan.
An automated biological dosimetry system
Proc. 20th Annual Meeting of the European
Society for Radiation Biology, Pisa, September
15-19, 1986.
8. PEPR Group Frascati-Roma
The projectd Track-find Algorithms for Frascati
PEPR
Proc. Conf. on Computer Assisted Scanning,
Padova 1976.
9. J. Piper et al.
Automation of chromosome analysis.
Signal Processing 2, 203, 1980.
10. D.J. Zahniser, P.S. Ond, M.C.T. Raaijmakers,
G.P. Vooy, R.T. Van de Walle
BIOPEPR: A System for the Automatic Prescreening
of Cervical Smears.
J. Histochem Cytochem, 27, 635, 1979.

Appendice tecnicaAllestimento delle piastre metafasicheMateriali e metodiMATERIALI

1. Vetrini portaoggetti accuratamente sgrassati in soluzione saponosa detergente per almeno 24 ore. I vetrini devono essere successivamente sciacquati molto accuratamente in acqua corrente e lasciati immersi in acqua distillata fino al momento dell'uso.
I vetrini vanno usati ancora bagnati allontanando l'eccesso di acqua.
2. Eparina in soluzione (200 U. I./ml)
3. Terreno di coltura HB 101 Tm oppure HB 103 Tm (*)
Ad ogni 100 ml di terreno di coltura vanno aggiunti:
 - a. 1 ml di Piruvato di Na (soluzione 0,1 M)
 - b. 1 ml di supplemento ricostituito con 10 ml di soluzione fisiologica sterile. Il supplemento ricostituito può essere conservato congelato.
 - c. 1 ml di antibiotico (Penicillina 500.000 U + streptomina 0,5 g)

(*) Prodotto dalla Hana-Media, ditta Recordati

d. 1 ml di L-Glutamina (soluzione 0,2 M)

e. 0,5 ml di fitoemoagglutinina

Il terreno così ricostituito, se conservato a 4°C, può essere utilizzato entro 15 giorni dalla preparazione.

4. Colcemid

a. soluzione concentrata: sciogliere 100 mg in 250 ml di fisiologica

b. soluzione d'uso: 2,5 ml della soluzione concentrata in 250 ml di soluzione fisiologica.

5. KCl soluzione 0,075 M

6. Alcool metilico

7. Acido acetico glaciale

8. Soluzione colorante Giemsa

METODO

1. Prelevare con siringa sterile 5 ml di sangue venoso e dispensare in provetta sterile contenente 1 ml di eparina in soluzione.

2. Dispensare per ogni soggetto in esame 0,25 ml di sangue eparinato in tre contenitori sterili di vetro muniti di tappo a vite contenenti 5 ml di terreno di coltura.

3. Agitare delicatamente i contenitori e porli in bagnomaria a 37°C.

4. Trascorse 45 ore di incubazione, aggiungere sterilmente ad ogni contenitore 0,25 ml della soluzione d'uso di Colcemid.
5. Porre i contenitori in bagnomaria a 37°C per 3 ore.
6. Estrarre i contenitori dal bagnomaria, agitare delicatamente e trasferire il contenuto in provette coniche graduate di vetro da centrifuga. Da questo momento la sterilità non è più necessaria.
7. Centrifugare a 1.200-1.500 gpm per 10 minuti.
8. Aspirare il sopranatante lasciando un fondello di 0,2-0,5 ml.
9. Eseguire il trattamento ipotonico con 4-5 ml di soluzione di KCl 0,075M, preparata di volta in volta e preriscaldata in bagnomaria a 37°C.
10. Porre di nuovo le provette in bagnomaria a 37°C per 10 minuti.
11. Porre le provette in un recipiente contenente ghiaccio tritato per 2-3 minuti.
12. Aggiungere ad ogni provetta 4 ml di una soluzione di alcool metilico-acido acetico 3:1, mantenendo le provette in ghiaccio.
Insufflare aria delicatamente per risospendere uniformemente il sedimento. Attendere 30 minuti.

I campioni possono essere processati immediatamente o conservati in frigorifero a 4°C fino a 24 ore.

13. Centrifugare per 20 minuti a 1.200-1.500 gpm.
14. Aspirare il supernatante. Dispensare 4 ml della soluzione alcool metilico-acido acetico 3:1 e risospendere il sedimento delicatamente.
15. Ripetere per due volte i passaggi di cui ai punti 13 e 14.
16. Risospendere il sedimento in 1 ml di soluzione alcool metilico-acido acetico 3:1 ed agitare delicatamente.
17. Deporre con una pipetta pasteur su più vetrini una goccia della sospensione lasciandola cadere da circa 5-10 cm.
18. Lasciare asciugare i vetrini all'aria per 10 minuti.
19. Fissare in alcool metilico per 30 minuti.
20. Colorare in Giemsa diluito 1/10 per 10 minuti.
21. Asciugare all'aria.

Considerazioni conclusive

Lo studio condotto nell'ambito della linea di ricerca CARIOPEPR ha confermato in primo luogo, sulla base di un'ampia e aggiornata letteratura, la validità e l'importanza della dosimetria citogenetica come metodologia diagnostica fondamentale in radioprotezione, nonché la possibilità di utilizzazione di questa indagine non soltanto nella sua indicazione principale, rappresentata dalla irradiazione acuta accidentale al corpo intero, ma anche nelle altre condizioni di esposizione sia a livello individuale, che a livello di popolazione o di gruppo a rischio.

La messa a punto di metodiche citogenetiche per l'ottenimento di preparati biologici adatti alla lettura automatizzata ha portato a risultati indubbiamente positivi, grazie anche alla preziosa collaborazione ricevuta dall'Istituto di Genetica dell'Università Cattolica di Roma.

L'acquisizione di tali metodiche comporta, tra l'altro, come interessante ricaduta operativa, la possibilità di istituire in tempi brevi in ambito ospedaliero (USL Roma 29), una facility di dosimetria citogenetica (con disponibilità di 24 ore su 24), avente funzioni di supporto specialistico in caso di irradiazioni accidentali, certe o sospette.

L'integrazione organizzativa di una simile competenza in strutture radioprotezionistiche a carattere nazionale, come il Centro Operativo Sorveglianza Medica nell'Emergenza (COSME) dell'ENEA DISP, rappresenterebbe indubbiamente un contributo di notevole rilevanza.

Per quanto riguarda le modifiche all'hardware e al software del PEPR, necessarie per la lettura automatica delle piastre metafasiche e dei cromosomi, i risultati raggiunti possono essere così riassunti:

- E' stato effettuato il riallineamento del sistema ottico-elettronico del PEPR. In questa fase è stata studiata l'eliminazione dell'alone mediante l'appropriato uso del fuoco intermedio del CRT per ottimizzare sia la risoluzione che il rapporto segnale-rumore.
- E' stato ultimato l'algoritmo PEPR per l'individuazione delle metafasi nella nuova condizione di messa a punto del PEPR. Questo risultato già consentirebbe di automatizzare circa il 50% del lavoro di lettura al microscopio ottico.

Inoltre, sono stati effettuati studi sugli algoritmi per il riconoscimento dei cromosomi, basati sul principio innovativo dei "massimi locali".

- In merito alla messa a punto di un sistema macrofotografico ad alta risoluzione finalizzato alla produzione di film per un uso estensivo proprio del PEPR, sono stati realizzati:
 - un banco ottico con isolamento dalle vibrazioni, a comando pneumatico;
 - portavetrini con vuoto e microposizionatore;
 - metodiche di innalzamento di contrasto per il colorante citologico Giemsa.

Purtroppo, i numerosi contatti avuti con l'Industria per reperire l'ottica necessaria per l'esperimento (sistema ottico per la macrofotografia ad alta risoluzione dei preparati biologici) hanno dato inaspettatamente a tutt'oggi esito negativo.

Ne è stato possibile ottenere, malgrado numerose prove e vari accorgimenti, risultati soddisfacenti mediante l'impiego della lente avuta in prestito dall'Università di Nijmegen in Olanda (Nikon Micro Nikkor $f = 28$ mm. 1.7,10 X del Gruppo BIOPEPR), a causa di alcune caratteristiche ottiche non del tutto consone alle esigenze dell'esperimento CARIOPEPR.

Questi motivi contingenti hanno impedito di giungere, in questo ciclo di studio, alla dimostrazione conclusiva dell'efficienza del sistema e alla sua trasposizione applicativa.

Malgrado le difficoltà incontrate, la linea di ricerca CARIOPEPR, merita tuttavia di essere sostenuta e portata avanti per le sue finalità e per l'importanza dei risultati sinora ottenuti, che, ancorchè non definitivi, hanno certamente un valore fondamentale nei confronti dell'attesa utilizzazione nel campo considerato di una macchina già fortemente operativa.

Nello stesso tempo deve essere tenuta presente anche la possibilità di scelte alternative di "image processing" che a parere del Gruppo, non possono però prescindere al momento attuale dall'impiego di sistemi ottici del tipo considerato.

Accanto ai risultati direttamente connessi con lo studio sperimentale, è necessario considerare i risultati positivi provenienti dagli effetti di ricaduta che, nel caso specifico, non sono stati certamente trascurabili.

A tale riguardo merita precisare che il CNR, riconoscendo la validità del programma di ricerca, su proposta del competente Comitato Nazionale per le Scienze Fisiche, ha concesso un contributo finanziario.

Inoltre, in seguito alla corrispondenza intercorsa tra la Presidenza dell'INFN e la Direzione dell'ENEA DISP, è prevedibile uno sviluppo del programma, oltre che nell'ambito della

dosimetria citogenetica, anche nel campo dello studio di parametri di diffusione atmosferica (nubi dense) e della lettura di dosimetri di tracce per la rivelazione del radon e di suoi figli.

Parimenti, sono intercorsi accordi con il Laboratorio di Fisica interdisciplinare dei Laboratori Nazionali di Legnaro dell'INFN per una collaborazione nel campo della dosimetria biologica.

Merita anche aggiungere che recentemente in sede internazionale è stata autorevolmente sottolineata la necessità di poter disporre di sistemi automatizzati in dosimetria citogenetica, esigenza questa peraltro drammaticamente dimostrata dall'incidente di Chernobyl.

Il Gruppo di ricerca CARIOPEPR ha inoltre presentato relazioni al LXXI Congresso nazionale della Società Italiana di Fisica (Trieste, 1985) e al XX Meeting annuale della Società Europea di Radiobiologia (Pisa, 1986).

Infine, deve essere posta in risaltó l'importanza dell'occasione di incontro tra Istituti di ricerca e Strutture sanitarie operative venutasi a determinare attraverso programmi e leggi della Regione, dedicati alla ricerca finalizzata.

E' auspicabile che l'esperienza maturata, peraltro, con modalità e in un ambito che non avevano ancora storia, possa avere ancora prospettive concrete, pur considerando l'opportunità di alcuni apporti migliorativi sul piano organizzativo.