

Full paper	Bollettino Accademia Gioenia Sci. Nat.	Vol. 41	N.° 369	pp. 91-101	Catania 2008	ISSN 0393 - 7143
------------	--	---------	---------	------------	--------------	------------------

**Effetti delle radiazioni ionizzanti su cellule staminali mesenchimali del midollo osseo di ratto: indagini su sopravvivenza, clonogenicità ed espressione di fattori di crescita.**

GIORGIO BELLIA<sup>1</sup>, DANIELA BRONZI<sup>2</sup>, DANIELE TIBULLO<sup>3</sup>, CLAUDIA GRASSO<sup>2</sup>, MASSIMO BARRESI<sup>2</sup>, MICHELA DI MAURO<sup>2</sup>, GIUSEPPE PALUMBO<sup>3</sup>, MARCELLO BELLIA<sup>4</sup>, FLORA LICATA<sup>2</sup>, FRANCESCA SANTANGELO<sup>2</sup>, GUIDO LI VOLSI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Fisica e Astronomia - <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Fisiologiche - <sup>3</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche - <sup>4</sup>Dipartimento di Medicina e Patologie Sistemiche – Sez. di Med. Del lavoro  
Università di Catania, Italy

RIASSUNTO

Le cellule staminali mesenchimali (MSCs) sono cellule multipotenti presenti nella linea stromale del midollo osseo. Lo scopo di questa indagine è stato di verificare se l'irraggiamento con protoni a basse dosi (0,1 Gy e 1 Gy) possa modificare alcune caratteristiche funzionali delle MSCs e, in particolare, la vitalità e la differenziazione verso particolari fenotipi cellulari. Lo studio, effettuato su cellule di ratto, ha dimostrato che le MSCs, anche se irraggiate alla dose più elevata (1 Gy), rimangono perfettamente vitali in quanto non viene attivata la caspasi-3, enzima proteolitico che, tagliando le proteine strategiche nella cellula, induce apoptosi. L'analisi dell'espressione di alcune proteine funzionali, indicative di specifiche tipologie di differenziazione, ha messo in evidenza come compaia, nelle MSCs irraggiate alle dosi più basse (0,1 Gy), un marcato aumento dell'espressione di sinapsina I e di sinaptofisina, abbinato ad un decremento del fattore di crescita neurale (BDNF) e senza significative variazioni del recettore trkB (*tyrosine kinase receptor B*), un recettore ad alta affinità per le neurotrofine. Inoltre, sia l'efficienza clonogenica che la capacità proliferativa delle MSCs subiscono un elevato incremento in seguito ad irraggiamento. Questo dato suggerisce l'esigenza di ulteriori controlli volti a verificare che l'incremento della capacità proliferativa sia da considerare una risposta fisiologica all'irraggiamento a basse dosi e ad escludere l'eventuale predisposizione verso una linea tumorale. Nel complesso, l'analisi dei dati ottenuti dimostra che le MSCs irraggiate fino a dosi di 1.0 Gy mantengono inalterata la loro vitalità. Inoltre basse dosi di radiazioni (0,1 Gy) tendono ad avviare la differenziazione delle cellule verso un fenotipo specifico, con molta probabilità non neurale, ma di tipo secretorio. La definizione di parametri di irraggiamento che indirizzino queste cellule verso una definita espressione fisiologica potrebbe avere promettenti sviluppi sia nella ricerca di base che applicata.

*Parole chiave:* radiazioni ionizzanti, cellule staminali, sopravvivenza clonogenicità, fattori di crescita

## SUMMARY

### **Effects of ionizing radiations on bone marrow mesenchymal stem cells: investigations on survival, clonogenicity and expression of growth factors.**

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent cells in the bone marrow stromal line. The aim of this study was to verify whether low dose proton radiation (0,1 Gy or 1 Gy) can modify some functional characteristics of MSCs like vitality and differentiation into specific cellular phenotypes. This study, performed on rat cells, demonstrates that MSCs, irradiated up to 1.0 Gy, exhibit the same vitality of controls and does not activate caspase-3, proteolytic enzyme which, cleaving strategic cellular proteins, is the effector of apoptosis. The comparison of expression of some functional proteins, markers of specific differentiation patterns, in cells irradiated at the low doses (0,1 Gy) and in controls, gave of a marked increase in synapsin I and synaptophysin, a decrease in brain-derived neural factor (BDNF) and no significant variation of tyrosine kinase receptor B (trkB), a receptor binding neurotrophines. Furthermore, a dramatic enhancement of both clonogenic efficiency and proliferative capability of MSCs appeared following proton irradiation at both doses applied. This last result suggests that further experiments are needed to verify that: i) the increase in proliferation following the exposure to low dose proton irradiation is a physiological response; ii) the exclusion of a possible development into a tumor line . On the whole, the analysis of these data demonstrates that MSCs, exposed to proton irradiation at doses up to 1.0 Gy, exhibit a great vitality. Furthermore, irradiation at low doses (0.1 Gy) induce a cellular differentiation into a specific phenotype, that is secretory, but has a low probability to be neural. The identification of parameters of irradiations able to start a well defined physiological differentiation of MSCs could have promising developments both in the basic as well as in the applied research.

*Key Words:* protons, mesenchymal stem cells, survival, clonogenicity, growth factors

## **Introduzione**

Il termine cellule staminali fa riferimento a cellule che possono differenziarsi in diverse linee sotto la spinta di segnali biochimici appropriati. Nel midollo osseo adulto di diverse specie animali (topo, ratto, uomo) è ormai nota la presenza di cellule immature, denominate cellule staminali mesenchimali (MSCs), in grado di generare molteplici linee cellulari (Caplan et al., 2001).

Studi condotti in vitro hanno dimostrato che le MSCs sono capaci di evolvere in altri tipi di tessuti o cellule, quali epatociti, cardiomiociti e cellule nervose (Caplan et al., 2001; Jiang

et al., 2002; Reyes et al., 2002). I dati sperimentali suggeriscono, altresì, che *in vitro* le MSCs possano differenziarsi sia in neuroni che in cellule gliali (Wislet-Gendebien et al., 2005). Per contro, non attualmente noto come la differenziazione di tali cellule proceda *in vivo*. Nel complesso, le MSCs possiedono un elevato potenziale di espansione, buona stabilità genetica, compatibilità con l'ingegneria tissutale, nonché elevata capacità riparativa di organi e tessuti vitali (Gronthos et al., 2003; Jones et al., 2002; Lodie et al., 2002; Muraglia et al., 2000; Pittenger et al., 2004).

Modalità e tempi della differenziazione sono anche strettamente legati allo sviluppo delle caratteristiche bioelettriche di membrana di questo tipo di cellule. I dati attualmente disponibili, ricavati da MSCs umane (Heubach et al., 2003; Li et al., 2005), descrivono la presenza di varie tipologie di canali per il  $K^+$  (a dinamica lenta, a dinamica rapida,  $Ca^{2+}$ -dipendenti) e di un minor numero di canali per il  $Ca^{2+}$  (tipo L) e per il  $Na^+$  (V-dipendente, bloccato dalla tetrodotossina).

Fino ad ora è stato poco esplorato l'eventuale ruolo delle radiazioni ionizzanti nello sviluppo di queste caratteristiche e nei processi di differenziazione di queste cellule.

Infatti, le radiazioni ionizzanti sono in grado di indurre modificazioni transitorie o permanenti delle caratteristiche chimiche e fisiche dei materiali irradiati. In particolare, la ionizzazione provocata dal passaggio delle radiazioni innesca negli organismi una serie di modificazioni che determinano alterazioni della funzionalità cellulare.

Le radiazioni ionizzanti sono da sempre una presenza costante della nostra quotidianità; molti studiosi concordano nel sostenere che l'evoluzione della specie derivi anche dalla variabilità genetica provocata dall'esposizione continua a radiazioni. Le basse dosi, che si riscontrano a livello ambientale, sono insufficienti a provocare effetti immediatamente visibili, anche se teoricamente sufficienti a determinare i cosiddetti effetti stocastici o probabilistici a lungo termine, tra cui sono compresi i tumori radioindotti, le alterazioni cromosomiche e le mutazioni trasmissibili. L'*International commission on Radiological Protection* considera esposizioni a basse dosi quelle inferiori a 100 mGy. (ICRP, 2004).

Poiché i meccanismi di interazione con la materia variano a seconda delle radiazioni interessate e dell'energia che viene trasferita alla struttura irradiata, nella determinazione dell'effetto biologico vanno considerati due concetti legati alla deposizione dell'energia nella materia attraversata: il trasferimento lineare di energia (LET) e l'efficacia biologica relativa (RBE). Il primo si riferisce all'energia trasmessa dalle radiazioni al mezzo attraversato, che è maggiore per le radiazioni direttamente ionizzanti; il secondo esprime il rapporto tra le dosi di radiazioni di diversa energia che producono lo stesso effetto biologico.

Nell'ambito delle radiazioni ionizzanti gli studi circa gli effetti biologici sono diversi, ma frammentari. In particolare, le informazioni riguardanti gli effetti dei protoni sono carenti e si riferiscono principalmente ad aberrazioni cromosomiche e mutazioni genetiche (Chang et al., 2005).

### **Scopo della Ricerca**

Questa ricerca è stata condotta al duplice scopo di verificare se l'irraggiamento possa esercitare un effetto depressivo sulla vitalità delle MSCs innescando processi di apoptosi o se viceversa possa indurre una differenziazione delle cellule e specificamente modificazioni plastiche di proteine funzionali. Si è voluto in particolare saggiare se l'esposizione a radiazioni ionizzanti possa determinare una modificazione del fenotipo verso modelli di tipo ghiandolare o neurale.

Mediante tecniche immunocitochimiche si è proceduto ad evidenziare alcuni fattori che le cellule possono esprimere in fase di differenziazione. Le analisi effettuate hanno riguardato la

caspasi-3, molecola in grado di guidare i processi di apoptosi per il tramite dell'attivazione di una serie di reazioni a catena, che determinano il cleavage di proteine implicate nell'apoptosi; la sinapsina 1 e la sinaptofisina, glicoproteine presenti nelle terminazioni presinaptiche, ma identificate anche in tessuti non neurali; il fattore di crescita neurale BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) ed il trkB (*tyrosine kinase receptor B*), recettore ad alta affinità per le neurotrofine.

### **Materiali e Metodi**

Il protocollo sperimentale, è stato eseguito secondo le direttive della Commissione Europea (86/609/EEC) e della normativa italiana vigente in materia di sperimentazione animale.

#### *Allestimento delle colture*

Gli esperimenti sono stati eseguiti sia su MSCs isolate da midollo osseo di femori e tibie di ratti Wistar di 8-10 settimane, utilizzando il protocollo di Prockop. Immediatamente dopo il sacrificio, effettuato iniettando Uretano (2g/Kg) per via intraperitoneale e farmaco eutanasi (TANAX), l'aspirato midollare, proveniente da un singolo animale, veniva piastrato in fiasca da 25 cm<sup>2</sup> (T25) con D-MEM (Dulbecco-Modified Eagle's Medium) a basso contenuto di glucosio e con L-glutamina, addizionato del 20% di FBS (Fetal Bovine Serum) e 1% di antibiotico (100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin). La coltura cellulare eterogenea veniva incubata ad una temperatura di 37°C in un'atmosfera umidificata contenente il 5% di CO<sub>2</sub>. Dopo 24 ore veniva effettuata una separazione su piastra che ci permetteva di mantenere esclusivamente le cellule aderenti e di eliminare quelle non aderenti. Tale operazione consisteva nell'eliminazione del surnatante e nell'aggiunta di nuovo terreno di coltura. Ogni 3-4 giorni si effettuavano cambi parziali del terreno fino al raggiungimento della sub-confluenza ovvero fino a quando le cellule occupavano circa 80% della superficie a disposizione. Le cellule venivano staccate mediante il processo di tripsinizzazione e ripiastrate; per purificare la coltura ed espandere le cellule, questo processo veniva effettuato più volte.

L'analisi citofluorimetrica per markers di superficie, condotta su un campione, indicava che le cellule erano negative per il CD34 e il CD45, mentre erano positive per il CD90.

#### *Irraggiamento*

L'irraggiamento delle MSCs è stato effettuato, utilizzando il fascio di protoni da 62 MeV generato dal Ciclotrone Superconduttore dei Laboratori Nazionali del Sud (LNS) dell'Istituto Nazionale di Fisica Nucleare, utilizzando la struttura della sala sperimentale CATANA, acronimo per Centro di AdroTerapia e Applicazioni Nucleari Avanzate, costituito per il trattamento dei melanomi oculari (Cirrone et al., 2004). In questa prospettiva, il profilo del fascio che è inviato in questa sala, mediante opportuni diffusori e assorbitori, viene modificato per ottenere un'intensità costante, entro un 3%, su una superficie trasversale di raggio di poco superiore a 2 cm. Prima di raggiungere le cellule, questo fascio di protoni è diaframmato da uno spesso blocco di PVC contenente un foro di 2x2 cm<sup>2</sup>. Le cellule staminali venivano piastrate su fiasche T25 e risultavano confluenti al momento dell'irraggiamento, che era effettuato inserendo tre fiasche per volta in un supporto robotizzato in grado di compiere movimenti 2-D e controllato da remoto. Al momento dell'irraggiamento le fiasche venivano prelevate dall'incubatore e tramite appositi contenitori di polistirolo trasportate, in un tempo non superiore a 5 minuti, nei locali dei Laboratori Nazionali del Sud dove venivano posizionate appena fuori la sala di irraggiamento. Metà dei campioni erano posizionati sul supporto

teleguidato per essere sottoposti a irraggiamento; l'altra metà non irradiata, era utilizzata come controllo. Sono stati effettuati due irraggiamenti a due differenti dosi, 0,1 Gy e 1 Gy, entrambi ad una frequenza di 0,8 Gy/Min. Al termine della seduta, le fiasche venivano riportate nell'incubatore.

#### *Analisi clonogenica e sopravvivenza*

Al fine di valutare la vitalità delle cellule irradiate e di quelle di controllo, dopo l'irraggiamento, si procedeva preliminarmente ad effettuare la conta vitale. Ad una piccola parte del campione veniva aggiunto del trypan blu, una sostanza in grado di colorare esclusivamente le cellule morte; quindi si effettuava la conta di cellule colorate al microscopio. Sulla restante parte del campione veniva effettuata una conta vitale su piastra espressa come numero di unità formanti colonie di fibroblasti (CFU-F).

Dopo aver proceduto al distacco delle cellule mediante tripsinizzazione ed alla successiva risospensione, si effettuava una conta cellulare diretta con camera di Burker, utilizzando un microscopio a contrasto di fase. Un numero noto di cellule (mille) veniva piastrato su capsula di Petri da 35 mm di diametro in D-MEM, addizionato del 20% di FBS ed incubato. Ogni 3-4 giorni si effettuavano cambi parziali del terreno. Dopo 14 giorni le cellule venivano fissate in etanolo, lavate e colorate mediante colorazione di May Grunwald-Giemsa. Si procedeva, quindi, alla conta macroscopica delle colonie e poi alla conta del numero di cellule per CFU-F sia sul campione di controllo che su quello irradiato, mediante l'utilizzo di un microscopio ottico. Il risultato era espresso come efficienza clonogenica (CE), determinato dalla formula  $CE (\%) = (\text{numero di colonie}/\text{numero di cellule piastrate}) \times 100$ .

#### *Immunocitochimica*

Le colture di MSCs erano sottoposte a triplo lavaggio con una soluzione di TRIS 0.1M (Trizma base, SIGMA; Trizma hydrochloride, SIGMA), fissate in paraformaldeide al 4% in PBS (phosphate buffered saline) per 15 min, e poi risciacquate con TRIS.

L'attività perossidasi endogena era inibita mediante incubazione delle colture di MSCs con una soluzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 2% e metanolo al 10% in TRIS per 3 min a temperatura ambiente. Successivamente le cellule venivano sottoposte a tre lavaggi con TRIS.

Al fine di impedire la formazione di legami non specifici degli anticorpi primari, le MSCs erano incubate per 1 ora con una "soluzione di blocco" formata da NHS al 5% (normal horse serum-Santa Cruz) o da NGS al 5% (normal goat serum-Santa Cruz), Triton X-100 al 0.3% (Santa Cruz) in TRIS 0.1M.

Le colture di MSCs erano, quindi, sottoposte ad incubazione "overnight" a 4°C, in varie soluzioni di anticorpi primari policlonali formati da: rabbit anti-BDNF (1:1000, Chemicon); rabbit anti-TrkB (1:2500, Chemicon); rabbit anti-caspase-3 (1:200, Chemicon); rabbit anti-synapsin 1 (1:2000, Chemicon); mouse anti-synaptophysin (1:200, Chemicon), diluiti in una "soluzione di blocco".

Le colture erano lavate in TRIS ed incubate con un appropriato anticorpo secondario (1:200, biotinilated horse anti-IgG, Santa Cruz; 1:200, biotinilated goat anti-IgG, Santa Cruz) per 1 ora a temperatura ambiente.

La reazione anticorpo primario-antigene era resa visibile mediante il metodo ABC (Vector Standard ABC Kit, Vector Labs). La DAB (diaminobenzidina tetrahydrochloride 0,075% -DAB, Sigma) veniva disciolta con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,002% in 0,05M TRIS per 10 min. Al fine di accertare la specificità della reazione antigene-anticorpo, alcune cellule erano trattate come precedentemente descritto ma in assenza di anticorpo primario (controllo negativo).

I campioni di culture cellulari, sottoposti ad immunostochimica, sono stati analizzati ed elaborati per mezzo di Scion Image Beta 4.02 disponibile gratuitamente on line sul sito della Scion Corporation ([www.scioncorp.com](http://www.scioncorp.com)). Si tratta di un software che oltre la visualizzazione fornisce una serie di strumenti utili per l'analisi quantitativa delle immagini. Uno di questi strumenti è rappresentato dalla densitometria ottica (DO). Tale misura può essere effettuata su preparato istologico attraverso microscopia ottica. Il software è in grado di calcolare con esattezza la quantità di luce assorbita per mezzo di un algoritmo basato sulla legge dell'assorbimento di Bouguer-Beer.

## Risultati

### *Sopravvivenza e differenziazione*

La sopravvivenza delle MSCs in seguito ad irraggiamento con protoni alle dosi di 0,1 Gy e di 1 Gy è stata del 100%, cioè pari a quella dei campioni di controllo. Nessuna cellula colorata con trypan blu è stata infatti riscontrata sia nel campione irradiato a 0,1 Gy che in quello esposto a dose più elevata (1 Gy). Inoltre, l'analisi immunocitochimica, effettuata dopo 24 ore dall'irraggiamento per mettere in evidenza eventuali fenomeni di apoptosi, ha rivelato che la caspasi-3 era totalmente assente sia nei campioni di cellule irraggiate (0.1 Gy e 1.0 Gy) che in quelli di controllo.

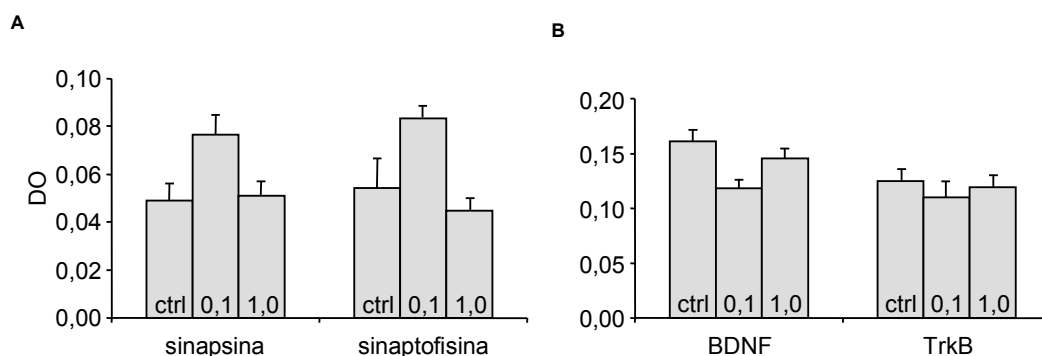
Le analisi immunocitochimiche volte a rivelare l'espressione di sinapsina e sinaptofisina nelle MSCs hanno invece rilevato differenze notevoli tra cellule irradiate e non irradiate.

L'analisi densitometrica ha evidenziato un alto livello di espressione della sinaptofisina nelle MSCs irradiate a 0.1 Gy. Il valore di densità ottica (DO) rilevato in questo campione ( $0.08344 \pm 0.0051$ , SE) è apparso infatti significativamente più elevato ( $p < 0.01$ ) di quello riscontrato nei controlli e nelle cellule irradiate a 1.0 Gy, che non erano significativamente differenti tra loro.

La sinapsina è stata pure espressa in concentrazione elevata ( $DO = 0.07631 \pm 0.0084$ ) nelle cellule appartenenti al campione irradiato a 0.1 Gy. Anche in questo caso il valore di DO è risultato significativamente ( $p < 0.05$ ) più alto di quelli riscontrato sia nei controlli che nelle cellule irradiate alla dose di 1.0 Gy. Le analogie riscontrate riguardo all'espressione di sinapsina e sinaptofisina sono riportate in Fig. 1A.

Risultati opposti hanno riguardato l'espressione del BDNF. Infatti, l'analisi densitometrica ha evidenziato nelle MSCs irradiate a 0.1Gy un livello di espressione dell'antigene ( $DO = 0.1184 \pm 0.0072$  ES) significativamente ( $p < 0.05$ ) più ridotto rispetto a quello registrato nelle cellule di controllo e in quelle irradiate a 1.0 Gy, che ancora una volta non differivano significativamente tra loro.

Infine, l'espressione di trkB nei campioni irraggiati è apparsa del tutto comparabile a quella riscontrata nei controlli. I dati relativi a BDNF e trkB sono illustrati in Fig. 1B.



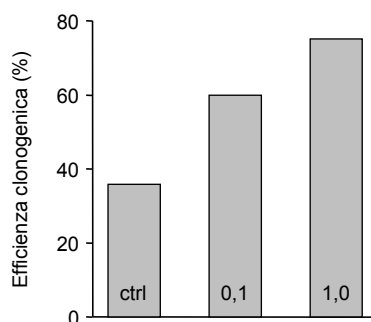
**Fig. 1** – Valori medi di densità ottica indicanti in A l'espressione di sinapsina e sinaptofisina e in B di Brain-derived Neurotrophic factor (BDNF) e Tyrosine kinase receptor B (TrkB). I valori medi dei controlli sono messi a confronto con quelli ottenuti in campioni irraggiati a dosi di 0,1 Gy e 1,0 Gy.

**Fig. 1** - Mean values of optical density showing (A) the expression of synapsin and synaptophysin and (B) Brain-derived Neurotrophic factor (BDNF) and Tyrosine kinase receptor (TrkB). Mean values of controls are compared with those of irradiated cells at doses of 0,1 and 1,0 Gy.

### Clonogenicità

Un dato attentamente valutato è stato quello riguardante la capacità proliferativa delle MSCs dopo irraggiamento con protoni alle due diverse dosi applicate.

L'efficienza clonogenica, che già aumentava nel campione irraggiato a 0,1 Gy, raggiungeva addirittura il 75% nel campione irraggiato a 1 Gy. Tali valori, messi a confronto con i controlli, sono illustrati nella Fig. 2.



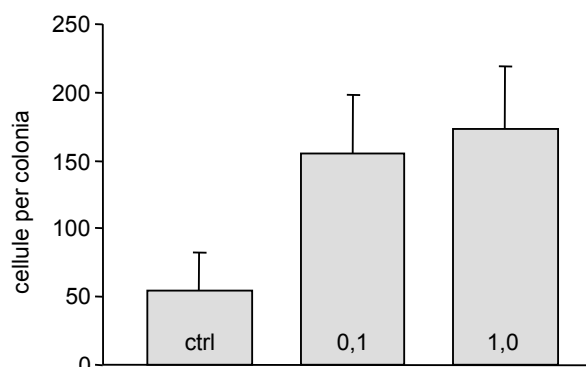
**Fig. 2** - Valori di clonogenicità nel campione di controllo e nelle cellule irraggiate alle dosi di 0,1 Gy e 1,0 Gy.

**Fig. 2** - Values of clonogenicity in the control sample and in irradiated cells at doses of 0,1 and 1,0 Gy.

Gli effetti delle radiazioni sulla capacità proliferativa sono stati ulteriormente valutati effettuando il conteggio del numero di cellule che formano le singole colonie nelle due diverse condizioni di irraggiamento. Le MSCs irradiate a 0,1 e 1 Gy presentavano un numero medio di

cellule per colonia, rispettivamente, pari a  $155 \pm 43$  e a  $173 \pm 46$ , valori non significativamente differenti tra loro, ma nettamente più elevati rispetto a quelli riscontrati nelle MSCs di controllo ( $54 \pm 28$ ).

La Fig. 3 illustra i valori medi delle cellule per colonia nel campione di controllo e nei campioni irraggiati a 0,1 e 1 Gy.



**Fig. 3** – Capacità proliferativa espressa dal numero medio di cellule per colonia nei campioni di controllo ed in quelli irraggiati alle dosi di 0,1 e 1,0 Gy.

**Fig. 3** – Mean number of cells in each colony in control samples and irradiated ones at doses of 0,1 and 1,0 Gy.

### Discussione

L'analisi dei dati acquisiti in seguito ad irraggiamento delle MSCs dimostra che l'esposizione a radiazioni protoniche è del tutto compatibile con il mantenimento della vitalità di queste cellule e, se effettuata a basse dosi, indirizza le MSCs in modo specifico verso un fenotipo cellulare capace di sintetizzare vescicole e di sviluppare capacità di esocitosi.

Nei campioni irraggiati sia a basse che a medie dosi l'espressione di caspasi-3 è risultata nulla a dimostrazione del fatto che l'esposizione a radiazioni di intensità anche piuttosto sostenuta non avvia processi di apoptosi e non compromette quindi la vitalità di questi ceppi cellulari.

L'analisi immunostochimica eseguita con anticorpi anti-sinapsina e anti-sinaptofisina ha evidenziato un significativo incremento dell'espressione dei due antigeni, che appare selettivo per le cellule irradiate a basse dosi (0,1 Gy). Poiché la sinapsina e la sinaptofisina sono molecole implicate nei processi di esocitosi, si ritiene che esse rappresentino dei markers di funzionalità sinaptica, e quindi potrebbe essere plausibile ipotizzare una differenziazione delle MSCs verso un fenotipo neuronale. In realtà, i risultati ottenuti tendono a invalidare questa ipotesi. Infatti, nei campioni irraggiati sia a bassa che ad alta intensità, l'espressione del recettore per le neurotrofine non risultava significativamente differente da quella riscontrata nei controlli.

Inoltre, l'espressione del BDNF nelle cellule debolmente irradiate era significativamente minore rispetto a quella osservata nel gruppo di controllo. Nella definizione di un eventuale processo di differenziazione e nella valutazione dei fattori espressi in seguito ad irraggiamento occorre tener presente che il BDNF viene espresso sia da cellule differenziate che



non differenziate mentre il *trkB* presenta una espressione ristretta esclusivamente alle cellule che si sono differenziate in neuroni (Yaghoobi et al., 2006). Il complesso dei dati descritti, ci spinge quindi a considerare altamente improbabile che l'irraggiamento induca una differenziazione delle MSCs verso una via neurale.

In risposta all'irraggiamento con protoni a basse dosi le MSCs quindi si differenziano verso un fenotipo cellulare non ancora identificato, ma che è in grado di effettuare esocitosi. La specificità dell'effetto è confermata dal fatto che l'irraggiamento a maggiore intensità non è in grado di indurre l'espressione delle proprietà sopraccitate. Uno sviluppo interessante di questa ricerca consisterebbe nell'identificare la molecola (peptide, ammina, ecc.) che le cellule in corso di differenziazione possono sintetizzare e immagazzinare nelle vescicole neofornate.

Questi risultati devono essere valutati con cautela a causa dell'elevato incremento di capacità proliferativa che le cellule mostrano dopo l'esposizione alle radiazioni. Poiché è noto che radiazioni ionizzanti a dosi medio-basse possono indurre la formazione di cellule tumorali (Ballerini et al., 2002) sarebbe necessario verificare, mediante l'utilizzazione di *markers*, se l'incremento del numero delle colonie e del numero di cellule per colonia sia da considerarsi una risposta fisiologica all'irraggiamento a basse dosi o indichi la predisposizione verso una linea tumorale. In quest'ultimo caso si dovrebbe procedere ad accertare se dosi ancora più basse possano ugualmente avviare nelle MSCs processi di differenziazione verso un fenotipo secernente pur mantenendo la clonogenicità entro ambiti fisiologici.

L'identificazione di precisi parametri di irraggiamento che consentano di indirizzare le MSCs verso una ben definita espressione, oltre a consentire spunti per speculazioni e sviluppi inerenti la ricerca di base, potrebbe trovare interessanti ed ampie applicazioni in campo biologico, farmacologico e clinico.

### **Ringraziamenti**

Si ringraziano i colleghi G. Russo, F. Dirosa e G.A.P. Cirrone per l'assistenza fornita nella preparazione e conduzione del fascio di protoni.

### **Bibliografia essenziale**

Cirrone, G.A.P., Cuttone, G., Lojacono, P.A., Lo Nigro, S., Mongelli, V., Patti, I.V., Privitera, G., Raffaele, L., Rifuggiato, D., Sabini, M.G., Salamone, V., Spatola, C., Valastro, L.M. A 62-MeV proton beam for the treatment of ocular melanoma at Laboratori Nazionali del Sud-INFN., *Nuclear Science, IEEE Transactions on*, Volume 51, Issue 3, Part 3, June 2004: 860 – 865.

Abouelfetouh A, Kondoh T, Ehara K, Kohmura E. Morphological differentiation of bone marrow stromal cells into neuron-like cells after co-culture with hippocampal slice. *Brain Res.*, 2004, 1029: 114-119.

Ballerini F., Biaggi M., Ottolenghi A., Saporita O. “ Cellular communication and bystander effect: a critical review for modelling low-dose radiation action”. *Mutat. Res.* 501: 1-12, 2002.

Bellia, G., Cosentino L., Finocchiaro P., Loukachine K. Response of hybrid photodiodes with scintillators under realistic conditions. *IEEE Transactions on Nuclear Science*, 1997, 44: 538.

Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine. *Trends Mol. Med.*, 2001, 7: 259-264.

De Haan JB, Cristiano F, Iannello R, Bladier C, Kelner MJ, Kola I: "Elevation in the ratio Cu/Zn-superoxide dismutase to glutathione peroxidase activity induces features of cellular senescence and this effect is mediated by hydrogen peroxide". *Human Molec Gen* 5: 283-292, 1996.

Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, and Rodriguez H: "Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement". *Free Radic Biol Med* 32: 1102-1115, 2002.

Edwards AA. RBE of radiations in space and the implications for space travel. *Phys. Med.*, 2001, 17: 147-152.

Evan GI and Vousden KH: "Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer". *Nature* 411: 342-348, 2001.

Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J. Cell. Sci.*, 2003, 116: 1827-1835.

ICRP: Committee 1 Task Group Report "Low-dose Extrapolation of Radiation-Related Cancer Risk". Draft of December 10, 2004.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002, 418: 41-49.

Jones EA, Kinsey SE. Isolation and characterisation of bone marrow multipotential mesenchymal progenitors cells. *Arthritis Rheum.*, 2002, 46: 3349-3360.

Kharbanda S, Bharti A, Pei D, Wang J, Pandey P, Ren R, Weichselbaum CT, Walsh R, Kufe D: "The stress response to ionizing radiation involves c-Abl-dependent phosphorylation of SHPTP1". *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6898-6901, 1996.

Knoll G.F. – Radiation detection and measurement – J.Wiley & Sons, 2000-2005

Lenaz G: "Role of mitochondria in oxidative stress and ageing". *Biochem Biophys Acta* 1366: 53-67, 1998.

Little J.B., Azzam E., de Toledo S.M., Nagasawa H. "Bystander effect: intercellular transmission of radiation damage signals". *Radiat. Prot. Dosimetry* 99: 159-162, 2002

Lodie TA, Blickarz CE, Devarakonda TJ, He C, Dash AB, Clarke J, Gleneck K, Shihabuddin L, Tubo R. Systematic analysis of reportedly distinct populations of multipotent bone marrow-derived stem cells reveals a lack of distinction. *Tissue Eng.*, 2002, 8: 739-751.

Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci.*, 2000, 113: 1161-6.

Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ. Res.*, 2004, 95 : 9-20.

Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest.*, 2002, 109: 337-346.

Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sandberg PR. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exptl. Neurol.*, *Stem Cells*, 2000, 164: 247-256.

Tian K, McTigue M, and de los Santos C: "Sorting the consequences of ionizing radiation: processing of 8-oxoguanine/abasic site lesions". *DNA Repair* 1: 1039-1049, 2002.

Tureson I, Nyman J, Holmberg E, and Odén A: "Prognostic factors of acute and late skin reactions in radiotherapy patients". *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 36: 1065-1075, 1996.

Ward JF: "DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation and reparability". *Prog Nucleic Acids Res Mol Biol* 35: 95-125, 1988.

Wislet-Gendebien S, Hans G, Leprince P, Rigo JM, Moonen G, Rogister B. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. 2005, 23: 392-402.

Yaghoobi MM, Mowla SJ. Differential gene expression pattern of neurotrophins and

their receptors during neuronal differentiation of rat bone marrow stromal cells. *Neurosci Lett.* 2006 Apr 10-17;397(1-2):149-54.

Zhou H., Randers-Pehrson G., Waldren C.A., Hei T.K. "Radiation-induced bystander effect and adaptive response in mammalian cells". *Advan. Space Res.* 2004; 34: 1368-1372, 2004.