**Budget Integrato Dipartimento 2020**

**Richiesta di un assegno di ricerca**

**TUTOR: Matteo Cerri**

**Effetti radioprotettivi dell’ipotermia nel trattamento della sindrome acuta da radiazione.**

L’esposizione ad alte dosi di radiazioni ionizzanti è uno dei rischi occupazionali a cui è esposto il personale delle centrali nucleari oppure coloro che utilizzano materiale radioattivo, in cui la sindrome acuta da radiazione può causare gravi lesioni, che possono portare al decesso. Al momento, non esiste nessun trattamento efficace per prevenire o diminuire il danno da esposizione accidentale a radiazioni.

Uno studio recentemente pubblicato da Ghosh e colleghi (Ghosh et al., 2017) ha mostrato per la prima volta che l’induzione di uno stato di ipotermia/ibernazione immediatamente successivo alla radiazione fornisce un significativo grado di radioresistenza.

Il torpore è uno stato fisiologico caratterizzato da un’attiva riduzione del tasso metabolico, seguita da una riduzione della temperatura, adottato da alcuni mammiferi e uccelli come strategia di sopravvivenza. È stato più volte dimostrato (Cerri et al. 2016 ), come durante il periodo ipotermico, gli animali ibernanti abbiano un grado di radioresistenza molto superiore a quello osservato in condizioni eutermiche. Ad ora non è conosciuto il substrato fisiologico di tale fenomeno, tuttavia sono state formulate alcune ipotesi: il DNA è in forma più condensata e perciò meno sensibile alle radiazioni; oppure, la minor disponibilità di ossigeno (a causa della riduzione dell’attività cardiorespiratoria) diminuisce la formazione delle specie reattive dell’ossigeno (ROS), che possono causare gravi danni a livello cellulare. Seppur queste ipotesi siano ancora considerate valide, Ghosh e colleghi hanno dimostrato che l’effetto di radioprotezione non è presente solo nell’animale ipotermico, ma anche nell’animale eutermico al momento della radiazione, ma che viene successivamente e in modo tempestivo (fino a 3h) indotto in stato di ipotermia (Ghosh et al., 2017). Anche in questo caso il meccanismo fisiologico non è chiaro, è tuttavia ragionevole ipotizzare che si tratti di un meccanismo di riparazione attiva del danno del DNA. Questi dati, confermati al momento solo nell’ibernante naturale, aprono nuove possibilità sul trattamento dell’esposizione accidentale a radiazioni ionizzanti, oltre a contribuire alla comprensione del meccanismo di radioprotezione nell’ibernazione.

Presso il nostro laboratorio è stato indotto nel ratto, animale non ibernante, uno stato simile al torpore (Cerri et al., 2013), chiamato successivamente torpore sintetico (Cerri, 2017), in cui è stato confermato un significativo aumento di radioresistenza durante il periodo ipotermico (Tinganelli et al., 2019). Questo dato suggerisce che il denominatore comune del fenomeno sia l’ipotermia, e non un meccanismo esclusivo dell’ibernante naturale.

Questo progetto si propone di investigare se anche nel torpore sintetico è possibile ridurre il danno indotto da radiazioni ionizzanti, inducendo l’ipotermia solo successivamente all’irraggiamento, e non durante. Inoltre, si procederà a valutare se l’effetto protettivo possa già essere presente per ipotermie modeste o se sia necessaria un’ipotermia più profonda. Qualora questo dato venisse confermato, l’ipotermia potrebbe rivelarsi un utile strumento per il trattamento acuto ed emergenziale della sindrome acuta da radiazioni in seguito all’esposizione accidentale a grandi dosi di radiazioni ionizzanti.

Verrà utilizzato il protocollo di induzione del torpore sintetico nel ratto, già ampiamente validato nel nostro laboratorio (Cerri et al., 2013) che consiste nel blocco farmacologico della struttura del tronco encefalico Raphe Pallidus, sede di premotoneuroni che controllano gli effettori termogenici, causando la sospensione della risposta termoregolatoria. Al fine di verificare se la radioprotezione sia un effetto passivo causato esclusivamente dall’ipotermia, quest’ultima verrà indotta in un gruppo di animali tramite la somministrazione di un gas anestetico (isoflurano), in cui la riduzione della temperatura è puramente passiva e non regolata centralmente. Inoltre, gli animali verranno studiati a due temperature ambientali diverse, 23°C e 30°C al fine di valutare se anche la profondità dell’ipotermia, oltre alla sua durata, è in grado di modificare l’entità della radioprotezione.

**Procedure sperimentali**

Per tutti gli esperimenti, gli animali verranno sottoposti ad intervento chirurgico in anestesia generale per l’impianto di una microcannula nel Raphe Pallidus ed un sensore di temperatura telemetrico intraperitoneale (Anipill, Bodycap). Dopo una settimana di recupero, gli animali verranno mantenuti in un ambiente ad una temperatura ambientale di 23°C (per ipotermia profonda) o 30°C (per ipotermia moderata), e verranno irraggiati con una dose di 3 Gy di raggi X presso il servizio di radioterapia dell’Ospedale S.Orsola . Al termine dell’irraggiamento, gli animali verranno indotti in uno stato di torpore sintetico mediante ripetute microiniezioni di un agonista GABAA-ergico nel Raphe Pallidus (Gruppi TS), oppure in uno stato ipotermico forzato indotto da anestesia associata a raffreddamento generalizzato (Gruppi IF), o ancora mantenuti in stato di eutermia (gruppi di controllo, C). Dopo 4-6 ore gli animali verranno sacrificati e ne verranno dissezionati gli organi, per la valutazione del danno tissutale e al DNA attraverso tecniche istologiche e molecolari.

**Esperimento**

Valutare il grado di radioprotezione fornito dall’induzione di uno stato ipotermico (torpore sintetico o ipotermia forzata), successivamente all’esposizione a radiazioni ionizzanti nel ratto.

1. **Gruppo C.23** (n=8) - irraggiamento seguito da eutermia ad una temperatura ambientale (Ta) di 23°C
2. **Gruppo C.30** (n=8) - irraggiamento seguito da eutermia ad una Ta di 30°C
3. **Gruppo TS.23** (n=8) - irraggiamento seguito da torpore sintetico ad una Ta di 23°C
4. **Gruppo TS.30** (n=8) - irraggiamento seguito da torpore sintetico ad una Ta di 30°C
5. **Gruppo IF.23** (n=8) - irraggiamento seguito da ipotermia forzata (ad una Ta di 23°C
6. **Gruppo IF.30** (n=8) - irraggiamento seguito da ipotermia forzata ad una Ta di 30°C

**Bibliografia**

Cerri, M. The Central Control of Energy Expenditure: Exploiting Torpor for Medical Applications. Annu. Rev. Physiol. 2017, 79, 167–186.

Cerri, M.; Mastrotto, M.; Tupone, D.; Martelli, D.; Luppi, M.; Perez, E.; Zamboni, G.; Amici, R. The inhibition of neurons in the central nervous pathways for thermoregulatory cold defense induces a suspended animation state in the rat. J. Neurosci. 2013, 33, 2984–2993.

Cerri, M.; Tinganelli, W.; Negrini, M.; Helm, A.; Scifoni, E.; Tommasino, F.; Sioli, M.; Zoccoli, A.; Durante, M. Hibernation for space travel: Impact on radioprotection. Life Sci. Space Res. (Amst.) 2016, 11, 1–9.

Ghosh, S.; Indracanti, N.; Joshi J.; Ray J.; Indraganti P.K. Pharmacologically induced reversible hypometabolic state mitigates radiation induced lethality in mice. Sci Rep 7: 14900(1):1-14, 2017.

Tinganelli W, Hitrec T, Romani F, Simoniello P, Squarcio F, Stanzani A, Piscitiello E, Marchesano V, Luppi M, Sioli M, Helm A, Compagnone G, Morganti AG, Amici R, Negrini M, Zoccoli A, Durante M, Cerri M. Hibernation and Radioprotection: Gene Expression in the Liver and Testicle of Rats Irradiated under Synthetic Torpor. Int J Mol Sci. 2019, 20(2).

## **PROGRAMMA DI ATTIVITA’ DELL’ASSEGNISTA**

**L’attività dell’assegnista consisterà in:**

1. Microchirurgia nel ratto, in particolare:

* Microchirurgia cranio-encefalica per la somministrazione di sostanze a livello nervoso centrale
* Impianto di sensori telemetrici per la rilevazione della temperatura corporea

1. Estrazione degli organi, utilizzo di tecniche immunoistochimiche e biomolecolari per la valutazione citopatologica dei tessuti e la quantificazione del danno al DNA
2. Acquisizione ed analisi statistica dei dati

Il tutor ha comprovata esperienza nei metodi sovramenzionati (Cerri et al., 2013, Tinganelli et al., 2019). L’assegnista lavorerà interagendo strettamente con il tutor, che istruirà l’assegnista allo svolgimento e analisi di tutti gli esperimenti proposti. L’assegnista inoltre parteciperà a periodiche riunioni in cui verrà invitato a presentare lo stato di progresso della propria attività, al fine di migliorarne le capacità comunicative.

Una singola persona può svolgere 8 esperimenti al mese. Per tutti gli esperimenti, considerato anche un tasso di imprevisti del 10%, sono necessari 53 animali. Per le analisi immunoistochimiche e biomolecolari sono previsti 4 mesi di lavoro, mentre l’analisi dei dati e l’elaborazione statistica prevedono un mese di lavoro. Le attività previste da questo progetto sono eseguibili in 12 mesi lavorativi in totale.

Tabella 1

|  |  |
| --- | --- |
| **Numero animali** | **Stima dei mesi di lavoro** (inclusi imprevisti) |
| 6 gruppi,  8 ratti/gruppo  48 ratti (+10% per imprevisti) | 7 (+4 analisi immunoistochimiche e biomolecolari, +1 elaborazione dati) |

**Bibliografia**

Cerri, M.; Mastrotto, M.; Tupone, D.; Martelli, D.; Luppi, M.; Perez, E.; Zamboni, G.; Amici, R. The inhibition of neurons in the central nervous pathways for thermoregulatory cold defense induces a suspended animation state in the rat. J. Neurosci. 2013, 33, 2984–2993.

Tinganelli W, Hitrec T, Romani F, Simoniello P, Squarcio F, Stanzani A, Piscitiello E, Marchesano V, Luppi M, Sioli M, Helm A, Compagnone G, Morganti AG, Amici R, Negrini M, Zoccoli A, Durante M, Cerri M. Hibernation and Radioprotection: Gene Expression in the Liver and Testicle of Rats Irradiated under Synthetic Torpor. Int J Mol Sci. 2019, 20(2).