

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI FISICA E
ASTRONOMIA
GALILEO GALILEI



CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN FISICA

**Effetti biologici delle radiazioni
ionizzanti:
effetti non-targeted e loro implicazioni
per la radioprotezione e la clinica**

RELATORE: **Giovanna Montagnoli**

LAUREANDO: **Enrico Ridente**

CO-RELATORE: **Roberto Cherubini**

ANNO ACCADEMICO 2014/2015

Introduzione

Storicamente la radiobiologia muove i primi passi nel 1895, subito dopo la scoperta dei raggi X da parte di W.C. Röntgen. Da quell'anno in poi lo studio degli effetti delle radiazioni ionizzanti sui sistemi biologici è stato sempre in continua crescita ed evoluzione.

Una relazione fondamentale da studiare e che è oggetto di ricerche è quella del rischio di cancro in funzione della dose, la cosiddetta curva di rischio. Di quest'ultima se ne conosce molto bene l'andamento per dosi comprese tra i $0,5Gy$ e i $2,5Gy$ derivante dai dati ottenuti dallo studio dei sopravvissuti alle bombe atomiche di Hiroshima e Nagasaki del 1945, invece per ciò che riguarda le basse dosi ($< 0,5Gy$) e le alte dosi ($> 2,5Gy$) si conosce ancora poco. Una conoscenza degli effetti alle basse dosi risulterebbe fondamentale ai fini della radioprotezione e della prevenzione in luoghi come ospedali e, in generale, luoghi in cui si è continuamente esposti a radiazioni ionizzanti.

A tal fine sono stati proposti vari andamenti per spiegare il comportamento dei sistemi biologici esposti a radiazioni ionizzanti (RI). Uno dei più utilizzati ed accettati è l'andamento *lineare senza soglia* (*Linear No-Threshold cancer risk model*, LNT), che si basa sull'assunzione che le cellule reagiscano allo stesso modo sia ad una bassa che ad un'alta dose, ossia il rischio per unità di dose è costante. Tale andamento implica un aumento del rischio in maniera direttamente proporzionale all'aumento della dose assorbita.

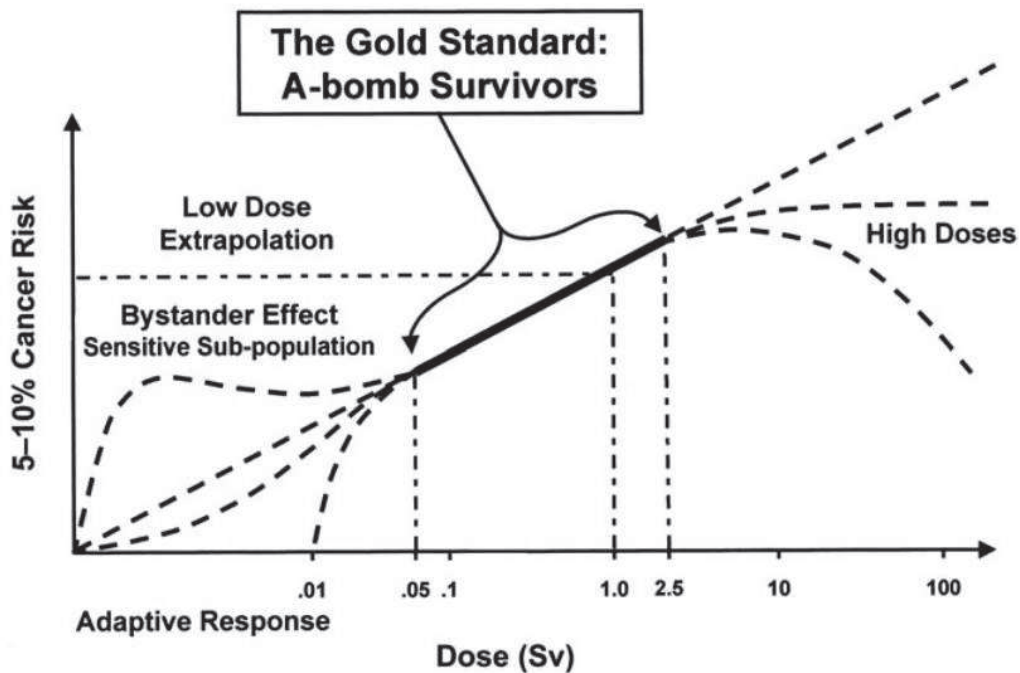


Figura 1: Curve di rischio che presentano i possibili andamenti del rischio di cancro in funzione della dose.

Un ruolo fondamentale per la spiegazione di tale andamento lo ha il DNA, che svolge una funzione centrale nella duplicazione cellulare e per la vita stessa di una cellula.

Alle basse dosi, molti esperimenti presentano effetti che potrebbero portare ad una deviazione dall'andamento lineare senza soglia. Tali effetti sono:

- *Ipersensibilità* (HRS)
- *Radio-Resistenza Indotta* (IRR)
- *Effetti Non-Targeted* (NTE)
- *Risposta Adattativa* (RA)

Per quanto riguarda gli effetti non-*targeted* possiamo parlare di effetto *bystander*, che si verifica quando una cellula non irraggiata subisce un danno dovuto ad una cellula irraggiata, e di instabilità genomica, che si presenta come aberrazioni cromosomiche sulle cellule figlie.

I fattori che causano tali effetti restano ancora non noti.

Questi effetti se presenti fanno sì che, per dosi minori di $0,5Gy$, la curva di rischio devii dall'andamento lineare senza soglia descritto precedentemente.

In questo lavoro di tesi si intende analizzare la risposta adattativa. Essa consiste nell'aumento della radio-resistenza e di adattamento di un sistema biologico ad una dose (*challenging dose*), se pre-trattato qualche ora prima con una più bassa dose (*priming dose*).

Nel nostro caso l'irraggiamento per la *challenging dose* è stato effettuato con particelle α , mentre per la *priming dose* con raggi γ . Una maggiore conoscenza della risposta adattativa e delle sue implicazioni sarebbe di fondamentale importanza anche nel piano di trattamento dei tumori e per la radio-protezione.

Per investigare la risposta adattativa, è stata studiata la curva dose-risposta di cellule AG01522 (fibroblasti umani primari normali) *in vitro*, in termini di sopravvivenza cellulare e in funzione della qualità della radiazione (energia, LET e tipo). Le misurazioni e gli esperimenti di irraggiamento con particelle α (ioni 4He) e raggi γ sono stati effettuati presso il Laboratorio di Radiobiologia e, rispettivamente, presso la *facility* di irraggiamento dell'acceleratore Van de Graaff CN da 7,0 MV del gruppo di radiobiologia e la *facility* di ${}^{60}Co$ dell'INFN-LNL.

Capitolo 1

Effetti biologici delle radiazioni ionizzanti

Danni al DNA

La cellula è l'unità fondamentale degli organismi viventi, essa è in grado di vivere in maniera autonoma e di riprodursi. Nel suo interno si trovano organelli, come i mitocondri o i centrioli, immersi in una sostanza gelatinosa, il citosol, e il nucleo. Quest'ultimo contiene l'acido desossiribonucleico, unità vitale della cellula, meglio noto come DNA.

Quando una radiazione ionizzante (RI) colpisce una cellula, la RI può agire sul DNA in maniera diretta o indiretta. Si parla di azione diretta quando la radiazione ionizza direttamente gli atomi costituenti la macromolecola del DNA, essa è presente soprattutto quando si lavora con radiazioni densamente ionizzanti. Si dice invece azione indiretta quando il DNA viene danneggiato dai radicali liberi, specie altamente reattive, generati dalla ionizzazione di molecole presenti all'interno della cellula. L'azione indiretta coinvolge principalmente molecole d'acqua. Esse costituiscono l'80% delle molecole presenti all'interno della cellula. Sia il danno indiretto che quello diretto portano allo stesso risultato, ossia danneggiano o alterano la struttura del DNA. Una volta individuato il danno, la cellula attiva meccanismi di riparazione che tentano di ripristinare l'integrità del DNA.

Il danno può coinvolgere i singoli nucleotidi costituenti il DNA, sia a livello delle basi azotate che del pentosio e gruppo fosfato che li compongono. Inoltre, essendo formato da una doppia elica, il DNA può andare incontro o a danni da singola rottura (SSB), che coinvolgono una singola catena, o a danni da doppia rottura (DSB), che invece coinvolgono entrambe le catene. I primi sono più semplici da riparare, in quanto il DNA usa la parte di elica intatta per ricopiare le basi danneggiate. I secondi, coinvolgendo l'alterazione di basi del DNA opposte, sono spesso letali e portano la cellula a mutamenti irrimediabili. Può anche accadere però che due SSBs avvenendo a poche basi di distanza possano creare un danno equivalente o quasi a quello di una DSB. In generale, il danno è riparabile abbastanza facilmente dalla cellula quando, su due catene opposte, due siti di danno sono distanti tra loro almeno 6-12 basi azotate.

Se il processo di riparazione non va a buon fine la cellula va incontro a vari destini, tra cui la morte cellulare. Esistono vari tipi di morte cellulare, quella per apoptosi, per necrosi e la morte clonogenica. Ad esempio, la morte clonogenica rappresenta l'incapacità della cellula di completare il ciclo cellulare e dunque di dar vita a cellule figlie.

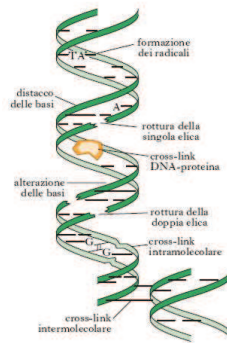


Figura 1.1: Possibili danni delle RI sul DNA

Linear energy transfer (LET)

Per descrivere l'azione delle radiazioni ionizzanti sulle cellule è di fondamentale importanza caratterizzare gli eventi di deposizione d'energia dato che da questi dipende il danno al sistema biologico. La deposizione di energia gioca un ruolo fondamentale per la natura del danno cellulare, per questo motivo in dosimetria si parla spesso di LET ossia di *linear energy transfer*. Esso viene definito come l'energia media depositata localmente nel mezzo dE_L da una particella carica di data energia, lungo un tratto dx .

La definizione di LET può essere espressa nella seguente maniera:

$$LET = \frac{dE_L}{dx}$$

L'unità di misura adottata per il LET è il $\frac{keV}{\mu m}$.

È necessario distinguere ai fini biologici il LET con la definizione di solito usata per la perdita d'energia ossia lo *stopping power*. Quest'ultimo, a differenza del LET, non fa riferimento alla "localizzazione" del deposito di energia.

Definire il LET come una quantità locale è di fondamentale importanza in quanto limita l'azione della deposizione d'energia e dunque del danno ad un raggio ristretto rispetto alla traccia della particella incidente. Anche se il LET è definito solo per particelle cariche, possiamo comunque associare a neutroni e raggi γ un proprio LET. In realtà nel primo caso esso viene associato alle particelle cariche che vengono messe in moto dall'interazione del neutrone. Nel caso delle radiazioni γ il LET è quello associato agli elettroni che vengono emessi dagli atomi a seguito dell'interazione di tale radiazione.

Si parla in genere di radiazioni a basso LET per valori attorno ai $0,2 - 0,5 \frac{keV}{\mu m}$, che corrispondono, ad esempio, a quelle dei raggi γ emessi ad esempio dal ^{60}Co . Gli eventi principali di ionizzazione sono abbastanza separati tra loro, per questo motivo i raggi γ e X vengono detti "sparsamente ionizzanti".

Una particella α emessa da ^{222}Rn ha un LET di circa $100 \frac{keV}{\mu m}$ e tali radiazioni vengono dette "densamente ionizzanti".

In dosimetria vengono usati due tipi di LET, il LET mediato sulla traccia della particella e quello mediato sull'energia. Il primo si ottiene facendo una media del LET per segmenti della traccia di una stessa lunghezza, mentre il secondo si ottiene dividendo il percorso in tratti in cui la radiazione ha perso la stessa quantità di energia e facendone infine la media dei valori ottenuti.

La definizione di LET si basa sull'approssimazione detta di "rallentamento continuo" e può essere descritta dalla formulazione di Bethe-Bloch per l'attraversamento di un materiale da parte di una particella carica.

Essa viene riassunta nella formula (Curtis 1974):

$$-\frac{dE}{dx} = \frac{0.307Z^{*2}Z}{A\beta^2} \left[\frac{\ln 2m_e c^2 \beta^2}{(1-\beta^2)I} - \beta^2 - \frac{C}{Z} - \frac{\delta}{2} \right]$$

dove Z^* è la carica efficace della particella incidente. Infatti, quando la velocità della particella è confrontabile con quella degli e^- del materiale, avviene che quest'ultimi schermano la carica della particella incidente. β rappresenta la velocità della particella normalizzata rispetto alla velocità della luce nel vuoto, c . m_e è la massa a riposo dell'elettrone. Z è il numero atomico del materiale attraversato dalla radiazione ed A il suo numero di massa. C la somma delle correzioni delle *shell* elettroniche e $\frac{\delta}{2}$ un fattore correttivo. I rappresenta il potenziale di ionizzazione del mezzo.

Se esprimiamo il LET in funzione dell'energia residua della particella incidente otteniamo la cosiddetta curva di Bragg, il cui studio è fondamentale per i piani di trattamento dei tumori.

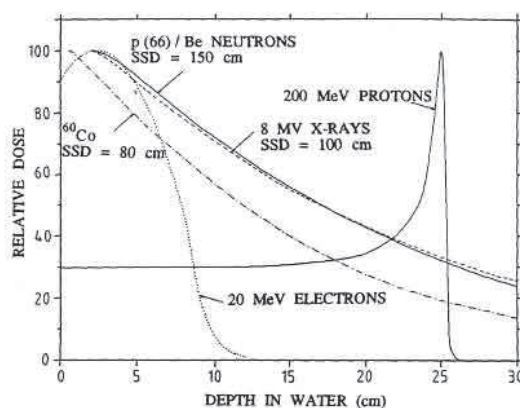


Figura 1.2: Distribuzione di dose in funzione della profondità per vari tipi di radiazione.

Lo studio del LET ha un'importanza notevole nella comprensione del danno biologico.

Il danno da radiazione ionizzante è, infatti, strettamente correlato alla distribuzione spaziale delle ionizzazioni ed eccitazioni che avvengono al passaggio di una RI. [1]

Sapendo che il passo dell'elica del DNA è lungo circa $3,4nm$, che lo spessore della doppia elica è di $2,2nm$ e che radiazioni a basso LET presentano una distanza media tra 2 eventi di ionizzazione dell'ordine delle centinaia di nm mentre quelle ad alto LET dell'ordine dei nm , ci si rende subito conto che le radiazioni ad alto LET, essendo densamente ionizzanti, hanno una probabilità di produrre danni da doppia rottura al DNA molto più alta rispetto a quelle a basso LET, che sono invece sparsamente ionizzanti.

Per avere un'effettiva misura del danno che una radiazione con un determinato LET produce abbiamo bisogno di confrontare il danno indotto da tale radiazione rispetto ad una che prendiamo come riferimento. Per tale motivo introduciamo il concetto di *relative biological effectiveness* (RBE). Una volta fissato l'effetto biologico (*end point* biologico) e il suo livello d'espressione che vogliamo ottenere, si ha:

$$RBE = \frac{\text{dose della radiazione di riferimento per indurre un certo livello di danno}}{\text{dose della radiazione in studio per ottenere lo stesso livello di danno}}$$

La radiazione presa come riferimento solitamente è quella di raggi X con un'energia di 250keV o anche raggi γ . La RBE non rappresenta altro che il rapporto tra la dose della radiazione di riferimento e la dose della radiazione di test in studio per avere lo stesso livello di effetto biologico con entrambe le radiazioni.

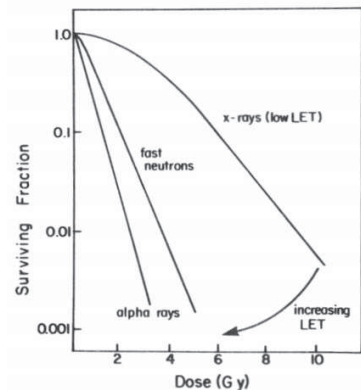


Figura 1.3: Confronto tra curve di sopravvivenza in funzione del LET delle radiazioni considerate. Le curve di sopravvivenza mostrano come cambia la frazione (in scala logaritmica) di cellule sopravvissute (SF) in funzione del LET.

L'efficacia biologica relativa (RBE) dipende da vari fattori:

- Tipo di radiazione e suo LET
- Dosaggio
- Numero di frazionamenti di dose
- Rateo di dose
- Sistema biologico
- *end point* biologico

Studiando l'efficacia delle RI in funzione del LET si nota che le due quantità sono strettamente correlate. La loro relazione dipende dalla densità di ionizzazione della RI incidente.

Dai dati sperimentali *in vitro* si osserva che la curva RBE-LET per vari ioni presenta un massimo corrispondente al valore di LET di $100 - 200 \frac{keV}{\mu m}$.

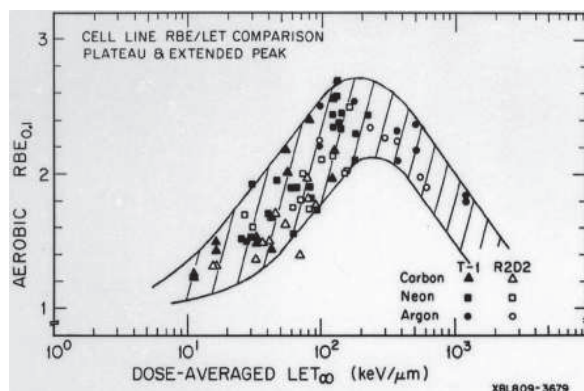


Figura 1.4: Il grafico rappresenta l'RBE per cellule R2D2 e T-1 in funzione del LET misurato per ioni carbonio, neon e argon. Le cellule vengono irradiate in condizioni aerobiche, il livello di sopravvivenza viene considerato al 10%. [2]

Quando si studiano i danni al DNA o in genere a sistemi biologici bisogna prestare particolare attenzione anche all'ambiente in cui essi si trovano. Uno dei fattori chiave, che influenza il danno biologico è la presenza di ossigeno molecolare.

Per poterne capire l'importanza è necessario confrontare ambienti ricchi di ossigeno con altri invece poveri di quest'ultimo e ricchi, invece, di azoto molecolare (N_2).

La presenza di ossigeno modifica la curva di sopravvivenza aumentando l'efficacia di una radiazione ionizzante.

L'ossigeno, infatti, presentando un'affinità elettronica molto alta, è in grado di combinarsi facilmente con i radicali liberi producendo radicali perossidati che reagendo con il DNA ne intaccano le basi azotate.

Inoltre, l'ossigeno riesce a rallentare la ricombinazione degli e^- liberati durante il passaggio di una radiazione ionizzante, prolungando così il danno prodotto dagli e^- prima che questi ricombinino.

Tale capacità dell'ossigeno di modificare la sopravvivenza cellulare è nota come "effetto ossigeno".

Una volta definito il tipo di radiazione, il suo LET e il livello di SF che vogliamo considerare (solitamente 0,1), si definisce come *oxygen enhancement ratio* (OER) il seguente rapporto:

$$(OER)_{0,1} = \frac{\text{dose in ambiente ricco di } N_2 \text{ per ottenere una SF di } 0,1}{\text{dose in ambiente ricco di } O_2 \text{ per ottenere una SF di } 0,1}$$

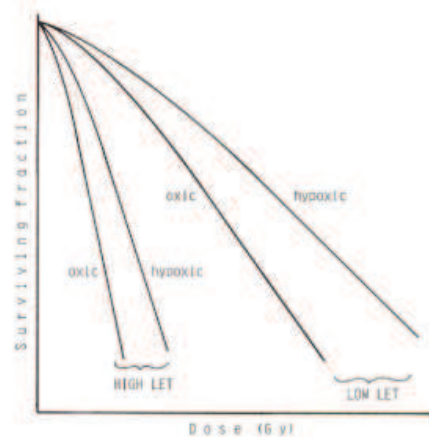
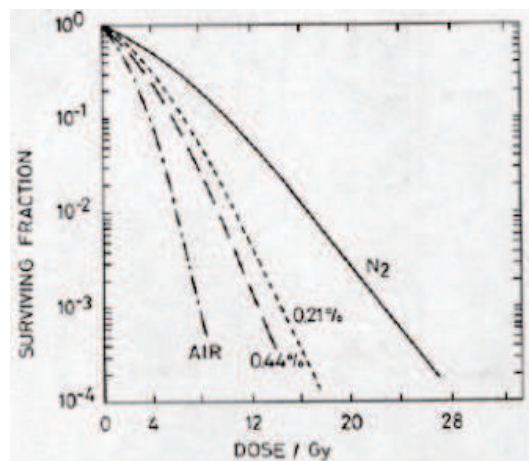


Figura 1.5: Curve di sopravvivenza al variare della presenza di ossigeno e azoto molecolare nell'ambiente. L'immagine a sinistra rappresenta la curva di sopravvivenza di una linea cellulare (cellule umane) irraggiata con raggi X da 250keV. L'immagine a destra rappresenta come l'effetto ossigeno modifichi la SF al variare del tipo di radiazione e LET.

Studiando l'andamento dell'OER in funzione del LET possiamo comprendere come questo influenzi la sopravvivenza e in che modo.

Nel caso del secondo grafico riportato in figura 1.7, notiamo che fino a circa $10 \frac{keV}{\mu m}$ il valore di OER rimane costante per poi diminuire lentamente. Tale diminuzione corrisponde alla scomparsa della spalla nella curva di sopravvivenza, a dimostrazione del fatto che l'OER sia strettamente connesso alla produzione di radicali liberi e dunque a danni di tipo indiretto.

Studiandone l'andamento, risulta che l'effetto ossigeno è decisamente più rilevante per radiazioni a basso LET piuttosto che per quelle ad alto LET. Ciò è spiegabile considerando che radiazioni a basso LET, a differenza di quelle ad alto LET, producono gran parte del danno al DNA per via indiretta.

Infine, se consideriamo l'andamento sia dell'OER che della RBE in funzione del LET per una stessa radiazione (considerando la SF al valore di 0,1) notiamo che gli andamenti sembrano speculari, evidenziando come nel momento in cui la RBE assume il valore massimo, l'OER raggiunge il minimo. Tutto ciò avviene per un valore del LET che si attesta attorno ai $100 \frac{keV}{\mu m}$. Ciò è un'ulteriore conferma di come la RBE dipenda dal danno diretto invece l'OER da quello indiretto.

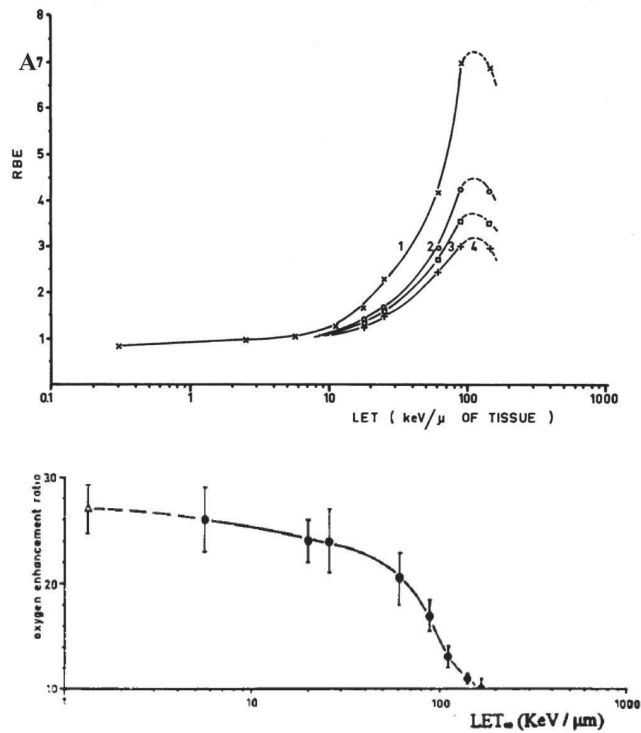


Figura 1.6: I due grafici rappresentano, rispettivamente, la RBE e l'OER in funzione del LET per cellule umane irraggiate con particelle cariche monoenergetiche.

Capitolo 2

Fenomenologia

Effetti non-*targeted* (NTE)

Si definiscono effetti non-*targeted* tutti quegli effetti che coinvolgono cellule non esposte direttamente alla radiazione incidente.

Affinchè tali fenomeni siano presenti le cellule irraggiate e non-irraggiate devono stare a stretto contatto o condividere lo stesso terreno di coltura, in maniera tale da poter attivare i meccanismi legati alle *gap-junctions*, che mettono in comunicazione cellule tra loro vicine attraverso delle proteine di membrana specifiche.

Fanno parte degli effetti non-*targeted* l'*instabilità genomica* (IG) e l'*effetto bystander* (BE).

Gli NTE sono principalmente evidenti alle basse dosi e generalmente presentano una relazione non lineare tra la dose fornita e la risposta cellulare. Essi danno vita ad un concetto di "*target*" più ampio. Ad esempio, l'effetto *bystander* aumenta spazialmente le dimensioni del *target* ad un gruppo di cellule o ad un tessuto, oppure ad un intero organismo. Invece, l'instabilità genomica prolunga l'effetto delle RI nel tempo coinvolgendo molte generazioni cellulari. [3]

Instabilità genomica (IG) ed Effetto *Bystander* (BE)

L'instabilità genomica è un effetto tardivo che si manifesta attraverso l'alterazione del genoma della progenie di cellule sopravvissute al passaggio di una radiazione ionizzante. Esso si può presentare, per esempio, in forma di aberrazioni cromosomiche che sono la conseguenza di una ricombinazione fallita. Tali aberrazioni avvengono quando la cellula subisce il danno durante la prima fase del ciclo cellulare. L'instabilità genomica è stata osservata per vari tipi di radiazioni, di LET e di linee cellulari.

Ci sono innumerevoli prove che dimostrano che le radiazioni ionizzanti hanno effetti anche su cellule non irraggiate posizionate vicino (nello stesso terreno di coltura) a quelle irraggiate. Le cellule reagiscono sia individualmente che collettivamente come se fossero parte di una rete interconnessa.

In generale, possiamo dire che l'effetto *bystander* è per molti aspetti simile agli effetti diretti delle radiazioni, includendo una frequenza maggiore di apoptosi, mutazioni, singola e doppia rottura del DNA e alterando l'attività di proteine regolatrici e degli enzimi.

I risultati riportati in [4], infatti, suggeriscono che il danno genetico in cellule esposte a radiazione diffusa sia causato da fattori rilasciati da cellule irradiate nel mezzo piuttosto che da danni indotti direttamente al DNA dai raggi X.

I ROS (*reactive oxygen species*) vengono spesso indicati come possibili mediatori del BE.

Nel caso di cellule tumorali, una molecola che contribuisce all'effetto *bystander*, è l'ossido di azoto (NO).

Quest'ultimo ha una vita media maggiore rispetto a quella dei ROS, di preciso qualche secondo, mentre quella dei ROS si aggira attorno ai *ns- μ s*. [5]

Altri mediatori del BE potrebbero essere fattori di crescita e ormoni ma anche citochine. [6]

L'effetto *bystander* ha, inoltre, anche importanti implicazioni nella clinica. Ad esempio, in terapie contro i tumori bisogna assicurarsi che a causa del BE non vengano danneggiati anche i tessuti sani circostanti.

Ad ogni modo, il BE può essere anche fonte di effetti positivi come una maggiore radio-resistenza indotta e favorire l'apoptosi di cellule tumorali.

Un altro fattore che sembrerebbe condizionare la presenza o meno di BE è la fase del ciclo cellulare in cui si trovano le cellule al momento dell'irraggiamento. [7]

Ancora molte domande su questo fenomeno restano senza una risposta, tra cui le seguenti:

la trasmissione del segnale da cellule irradiate a cellule soggette a BE; il rapporto tra l'effetto *bystander* e altri effetti non-*targeted*; il significato biologico dell'effetto *bystander*; gli effetti benefici associati con la risposta *bystander*; la significatività dell'effetto *bystander* per la radioprotezione. [8] [9] [10]

La morte delle cellule viene di solito attribuita alla deposizione di energia sul DNA. Tuttavia questo modello DNA-centrico è oggetto di discussione. Infatti, gli effetti non-*targeted* includerebbero, oltre al DNA cellulare, altri siti sensibili extra-cellulari ed extra-nucleari. [11] [12]

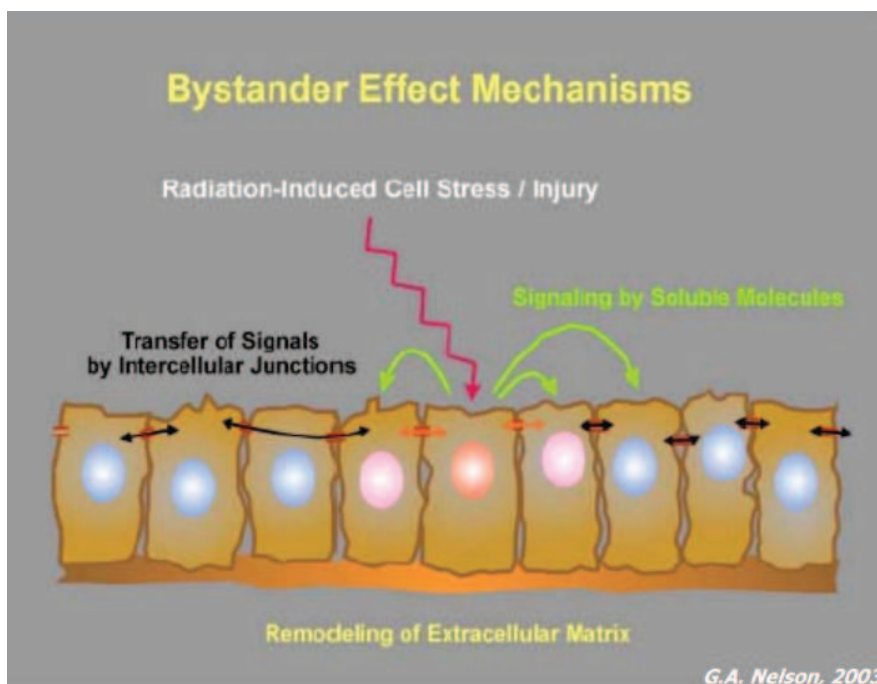


Figura 2.1: Schematizzazione del *bystander effect*

Risposta Adattativa (RA), Ipersensibilità (HRS) e Radio-Resistenza Indotta (IRR)

In esperimenti di sopravvivenza cellulare (*in vitro*), si è osservato che per basse dosi di RI, dell'ordine dei 100mGy , si ha una diminuzione della SF chiamata *ipersensibilità* (HRS), seguita per dosi intorno ai $300 - 400\text{mGy}$, da un aumento della sopravvivenza chiamato *radio-resistenza indotta* (IRR). [13]

Per entrambi i fenomeni, è stato osservato il coinvolgimento di uno dei *checkpoint* che controlla il corretto avanzamento della cellula nelle varie fasi del ciclo cellulare. Per dosi più basse, non attivandosi tale *checkpoint*, si ha una sensibilità maggiore alle RI. Un'altra possibile spiegazione potrebbe risiedere nell'aumento del tasso di morte cellulare per apoptosi indotta dalle RI a bassissime dosi (100mGy) seguito da una sua diminuzione per dosi più alte. [14]

La *risposta adattativa* (RA) è un fenomeno *non-targeted* che è stato osservato in esperimenti sia *in vivo* che *in vitro*. Essa consiste in un aumento della radio-resistenza di un sistema biologico ad una dose, detta *challenging dose*, se qualche ora prima esposto ad una dose più bassa, detta *priming dose* (di solito raggi X/ γ).

I fattori fondamentali che sembrano influenzare il manifestarsi della RA sono 3: *priming dose*, *challenging dose* e tempo intercorso tra i due irraggiamenti. In generale, la *priming dose* non deve superare i 500mGy , infatti la RA è già raramente presente per dosi superiori a 200mGy . [14]

Inoltre, è stato osservato che per molte linee cellulari, il tempo che deve passare tra le due dosi (*priming* e *challenging*) per permettere alle cellule di aumentare la propria radio-resistenza a seguito della *priming* è di circa 5-6 ore. [14]

La risposta adattativa è stata studiata soprattutto nelle cellule di mammifero. [15]

Mentre l'ipersensibilità e la radio-resistenza sono fenomeni associati all'irraggiamento da singola dose, per avere risposta adattativa bisogna invece irraggiare, in due momenti diversi, con due dosi differenti.

Il meccanismo che spiega la risposta adattativa è ancora poco chiaro.

La RA potrebbe avere implicazioni anche nelle applicazioni cliniche. Ad esempio, per ciò che riguarda le terapie contro i tumori, se nelle condizioni d'irraggiamento è presente RA, una bassa dose potrebbe rendere radio-resistenti ad un'alta dose le cellule tumorali.

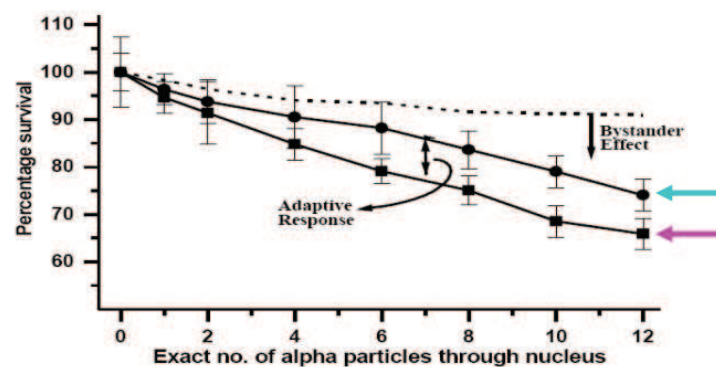


Figura 2.2: Curve di sopravvivenza che mostrano come l'effetto *bystander* e la risposta adattativa cambino la frazione di cellule sopravvissute.

Capitolo 3

Modelli per l'azione biologica

Per studiare quali effetti si manifestano in un esperimento di sopravvivenza cellulare *in vitro* abbiamo bisogno di modelli adatti che descrivano l'andamento della frazione di cellule sopravvissute in funzione della dose D fornita al sistema biologico che vogliamo analizzare.

Diremo che una cellula è sopravvissuta all'esposizione ad una radiazione ionizzante se è stata in grado di dar vita ad una colonia di almeno 50 cellule figlie.

Il modo e il percorso attraverso il quale le cellule vanno incontro a morte cellulare è diverso per ogni linea cellulare. Alcune di queste possono mostrare una dominanza di morte durante la fase mitotica, altre durante l'interfase, mentre altre ancora possono portare alla formazione di cellule giganti. Ad ogni modo, si è osservato che per tutti i tipi di cellule di mammifero *in vitro* le curve di sopravvivenza sono molto simili tra loro.

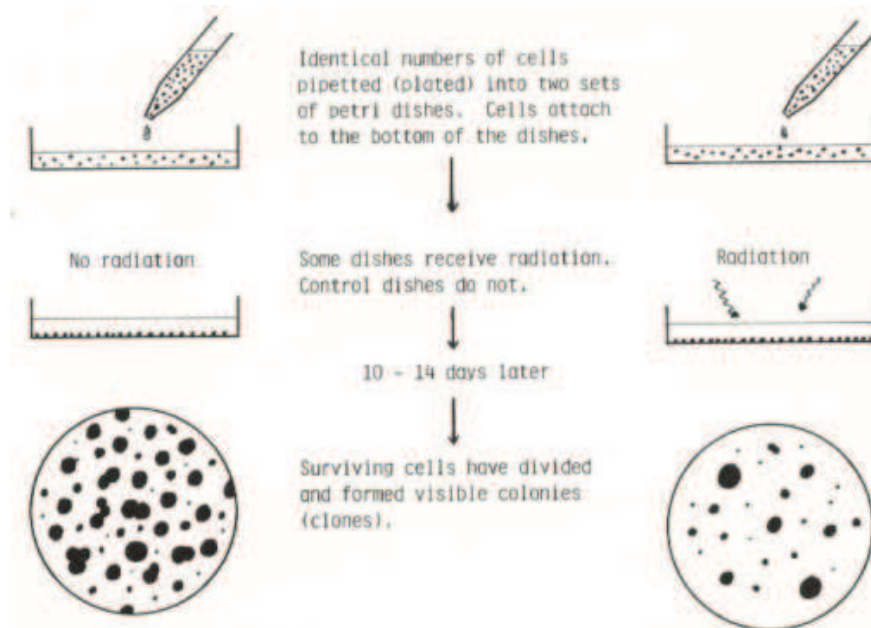


Figura 3.1: Schematizzazione della procedura di semina e valutazione delle cellule sopravvissute per il controllo (sinistra) e per le cellule irraggiate (destra)

La teoria *target* è fondamentale per la comprensione del concetto di danno e sopravvivenza in radiobiologia. Anche se sono stati sviluppati vari modelli per la teoria *target*, essa si basa principalmente sull'inattivazione dei *targets* vitali e la conseguente morte del sistema biologico irraggiato.

Il numero di *targets* e l'energia necessaria per disattivarli non sono sempre facili da individuare.

Lea et al. ([16] [17] [18]) riportando i risultati dei loro studi sull'efficacia di una radiazione su batteri e su virus, hanno riscontrato la diminuzione esponenziale della probabilità di sopravvivenza con l'aumento della dose.

I modelli che storicamente sono stati sviluppati e che vengono discussi di seguito sono 3.

- *simple multitarget model*

$$S(D) = 1 - (1 - e^{-\frac{D}{D_0}})^N$$

Le curve di sopravvivenza possono essere descritte, per dosi in cui l'andamento è lineare, da due parametri: N e D_0 . Il primo viene chiamato valore di estrapolazione, mentre D_0 rappresenta il valore di dose per il quale la SF diminuisce al 37%. Un altro parametro utile è il D_q che invece tiene conto della larghezza della spalla. Esso rappresenta la dose nel punto in cui la parte esponenziale della curva interseca il valore 1 della SF.

Il modello a *multitarget* si fonda sull'assunzione che per ottenere morte cellulare bisogna colpire N bersagli, con un solo colpo (*hit*). Il *simple multitarget model* si basa sull'ipotesi che la pendenza della curva di sopravvivenza alla dose $0Gy$ sia nulla.

- *multitarget, single hit model* Il modello viene descritto dalla seguente formulazione:

$$S(D) = e^{-\frac{D}{D_1}} [1 - (1 - e^{-\frac{D}{D_2}})]^N$$

dove D_1 è riferito al danno da singolo evento, mentre D_2 all'insieme di più eventi. A differenza del modello precedente, questo tiene conto di possibile morte cellulare anche a $0Gy$, ossia la pendenza della curva di sopravvivenza in tale valore è diversa da 0. Il *multitarget, single hit model* implica che esistano vari processi che possono portare a morte cellulare. Vengono combinati i principi del *simple multitarget model* con quelli del *single hit*, di solito, quest'ultimo viene attribuito all'azione di una radiazione ad alto LET capace di disattivare tutti i siti vitali.

- *linear-quadratic (LQ) model* L'ultimo modello che esaminiamo viene descritto dalla seguente formulazione:

$$S(D) = e^{-\alpha D - \beta D^2}$$

Nell'equazione il parametro α rappresenta la frequenza di induzione di danni letali da singola traccia, mentre β la frequenza d'induzione di danni sub-letali.

Questo modello si basa sulla teoria che danni da doppia rottura del filamento di DNA cellulare possano causare aberrazioni cromosomiche.

Il modello implica che, nelle curve di sopravvivenza, all'inizio sia presente una pendenza negativa che aumenta sempre di più al crescere della dose. Per le basse dosi, la prima parte della curva è descritta da un danno da singola traccia (domina il parametro α), mentre la parte delle alte dosi è descritta da un danno sub-letale su di uno stesso bersaglio (domina il parametro β). Una curva descritta da un modello con $\beta=0$ indica, infatti, la capacità della radiazione ionizzante di provocare la totalità dei danni letali attraverso un singolo evento di ionizzazione, in questo caso viene supposto che non vi sia nessuna azione dei radicali liberi e che i meccanismi di riparazione siano inefficaci.

I modelli esposti sono stati messi in dubbio da alcuni esperimenti che hanno mostrato che per basse dosi non abbiamo una descrizione corretta dell'andamento della frazione di cellule sopravvissute, soprattutto quando intervengono fenomeni come l'ipersensibilità e la radio-resistenza indotta. [19] [20]

Si è dunque riformulato il *LQ model* supponendo che α vari in funzione della dose. Il modello prende il nome di *modified induced repair model (MIRM)* ed è descritto dalla seguente equazione:

$$S(D) = \exp\left[-\alpha_{res}\left[1 + \left(\frac{\alpha_s}{\alpha_{res}} - 1\right)e^{-\frac{D}{D_c}}\right]D - \beta D^2\right]$$

dove α_s è il valore di α estrapolato alle basse dosi mentre α_{res} alle alte.

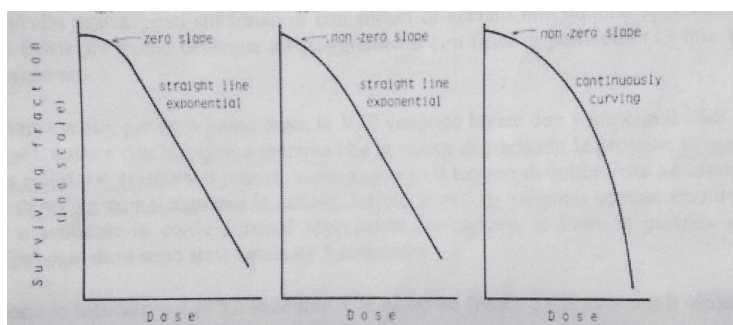


Figura 3.2: Curve di sopravvivenza descritte da tre possibili modelli matematici. [22]

Capitolo 4

Materiali e metodi

Cellule e condizioni di coltura

Le cellule impiegate nell'esperimento descritto in questo lavoro di tesi sono i fibroblasti umani primari normali AG01522.

Le cellule utilizzate per l'esperimento si trovano inizialmente ad una temperatura di -196°C in azoto liquido. Esse vengono congelate attraverso sostanze criogeniche, che andando a sostituire le molecole d'acqua, permettono alle cellule di raggiungere temperature molto basse senza portare a morte cellulare.

In preparazione dell'esperimento le cellule vengono scongelate, nell'arco di qualche minuto, per venire poi trasferite nel terreno di coltura. Le cellule vengono mantenute all'interno di incubatori ad una temperatura di 37°C , con un'atmosfera modificata con il 5% di CO_2 .

Una volta ottenuta una popolazione abbastanza numerosa (alcuni milioni di individui), 48 ore prima dell'irraggiamento le cellule vengono seminate sui fogliolini di mylar all'interno di appositi contenitori in acciaio (detti capsule) che, una volta riempiti con il terreno di coltura, verranno usati sia per l'irraggiamento con le particelle α che per quello con i raggi γ . Per verificare la presenza di risposta adattativa abbiamo irraggiato una popolazione solo con le particelle α e un'altra prima con raggi γ e poi con particelle α . Nel secondo caso è stato scelto un tempo tra le due esposizioni di circa 6 ore. Dopo l'irraggiamento, attraverso un enzima, le cellule vengono staccate dal mylar e portate in sospensione. Una volta diluite, vengono seminate in piastre di Petri ed incubate per 17 giorni. Successivamente, le colonie formati dalle cellule seminate nelle piastre vengono trattate con il violetto di genziana che le fissa e le colora rendendole, così, pronte per il conteggio.

Per ogni valore di dose sono state irraggiate 3 capsule di Petri in acciaio inossidabile le cui cellule, una volta staccate, sono state unite in un'unica sospensione. Da quest'ultima vengono quindi prelevate 5 aliquote contenenti un numero di cellule definito e seminate in altrettante piastre di Petri.

Il numero di cellule seminate su ogni piastra di Petri viene scelto in maniera tale da ottenere un numero di cellule sopravvissute che sia compreso tra 100 e 200.

Per poter confrontare al meglio i campioni irraggiati, tenendo conto anche di altri effetti dovuti all'ambiente esterno, viene analizzato anche un ulteriore campione detto "controllo".

Il "controllo" ha seguito tutto il processamento delle cellule irraggiate, senza però venire irraggiato. Infatti, cambiamenti delle condizioni ambientali o la manipolazione delle capsule di acciaio, potrebbero influenzare la risposta della popolazione cellulare. Per confronto il controllo, dunque, permette di dare una stima del danno dovuto esclusivamente alle radiazioni ionizzanti.

Condizioni di irraggiamento

L'obiettivo di tale lavoro è quello di verificare la presenza o meno di risposta adattativa. A tal fine, si è fornita la *priming dose* attraverso raggi γ di $1,2MeV$ e la *challenging dose* attraverso particelle α di $5,8MeV$. Gli irraggiamenti con i raggi γ sono stati effettuati presso la *facility* ^{60}Co dell'INFN-LNL, mostrata in figura.



Figura 4.1: *Facility* utilizzata per l'irraggiamento con raggi γ . Durante l'irraggiamento il cilindro contenente la sorgente di ^{60}Co viene estratto dal contenitore di piombo che lo circonda.

Qui, grazie ad un supporto appositamente ideato, le capsule di acciaio sono uniformemente irraggiate con una dose di $0,1Gy$. Tali capsule irraggiate con γ vengono poi irraggiate con le particelle α (nuclei di 4He). Gli irraggiamenti con ioni di 4He sono stati effettuati presso la *facility* di irraggiamento per gli studi di radiobiologia dell'acceleratore *Van de Graaff* CN da $7MV$ dei Laboratori Nazionali di Legnaro-INFN. Il fascio, generato dall'acceleratore, ha un diametro di circa $1 - 2mm$ e presenta una distribuzione gaussiana delle particelle al suo interno.

Per le misure di radiobiologia e in particolare per ottenere irraggiamenti alle basse dosi, bisogna allargare il fascio in maniera tale da diminuire il flusso delle particelle e quindi il rateo di dose.

Per tale motivo imponiamo che la sezione circolare del fascio incidente abbia un diametro di $15mm$.

Un parametro fondamentale per la riuscita dell'irraggiamento è lo studio del profilo di fascio. Infatti, quello che noi vogliamo è che l'irraggiamento della capsula di Petri sia il più uniforme possibile, in maniera tale che tutte le cellule adese sul foglio di mylar delle capsule siano esposte alla stessa dose.

L'apparato d'irraggiamento è costituito da due camere di reazione e da un tubo di alluminio (lungo $150cm$, diametro $60mm$). [23]

Lungo la linea di fascio viene mantenuta una pressione di circa $10^{-6} - 10^{-7}mbar$.

In una prima fase il fascio viene studiato attraverso un otturatore al quarzo che inquadrato da una telecamera ne permette un'analisi dell'energia e del corretto centraggio.

Il fascio di ioni generato dall'acceleratore, una volta deviato nella *facility* per gli studi di radiobiologia, incontra un primo collimatore con un foro dal diametro di $1mm$. Quest'ultimo ha lo scopo di creare un fascio ben definito di particelle, con un diametro che è quello del collimatore.

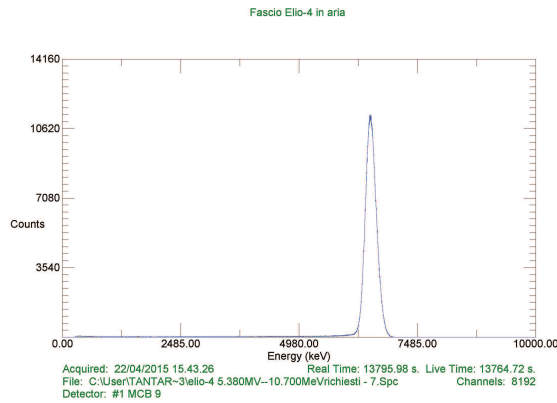


Figura 4.2: Spettro d'energia del fascio di particelle α (in aria) da 6,5MeV. A seguito dell'attraversamento del foglio di mylar alla base della capsula di Petri, l'energia delle particelle α incidenti sulle cellule è di 5,8MeV. Il LET corrispondente a quest'ultimo fascio di particelle α è di $77 \frac{keV}{\mu m}$.

Dopo aver attraversato il collimatore, il fascio entra in una prima camera di reazione, dove dopo aver attraversato un foglio d'oro ($2.2mg/cm^2$), viene rivelato da un rivelatore SSB (*silicon surface barrier detector*) posto ad un angolo di 40° rispetto al foglio d'oro. Tale valore rappresenta un buon compromesso tra la significatività statistica delle particelle incidenti e una bassa frequenza di eventi.

Il fascio continua per una seconda camera di reazione nella quale è presente all'ingresso un collimatore, uguale al primo, al centro un foglio d'oro e un rivelatore SSB posto allo stesso angolo, rispetto al foglio d'oro, del primo rivelatore. Infine, prima di raggiungere l'estremità della linea di fascio, il fascio incontra altri 3 collimatori, con diametro di $15mm$, che hanno lo scopo di rendere disponibili per l'irraggiamento solo la porzione centrale del fascio costituita da particelle con velocità che possono essere considerate parallele alla direzione di linea.

Dopo i collimatori il tubo presenta all'estremità un foglio di mylar alluminato da entrambe le parti, per uno spessore totale di $10\mu m$, usato come finestra per l'estrazione del fascio di particelle in aria.

Estratto in aria, il fascio incide su un terzo SSB utilizzato per la misura dell'energia e dell'intensità del fascio in aria.

Nell'attraversare i 2 fogli d'oro, i 2 fogli di mylar (la finestra di estrazione del fascio e la base delle capsule di Petri) e lo spessore d'aria le particelle α perdono energia.

Dopo aver stabilizzato e analizzato il fascio (in termini di energia e intensità), il terzo SSB viene sostituito da una ruota portacampioni di raggio $12cm$ con 20 postazioni, nelle quali verranno posizionate le capsule di Petri in acciaio contenenti le cellule da irraggiare.

La rotazione di tale ruota è controllata esternamente dalla postazione dell'analisi dati, in maniera tale da poter selezionare e cambiare il campione da analizzare.

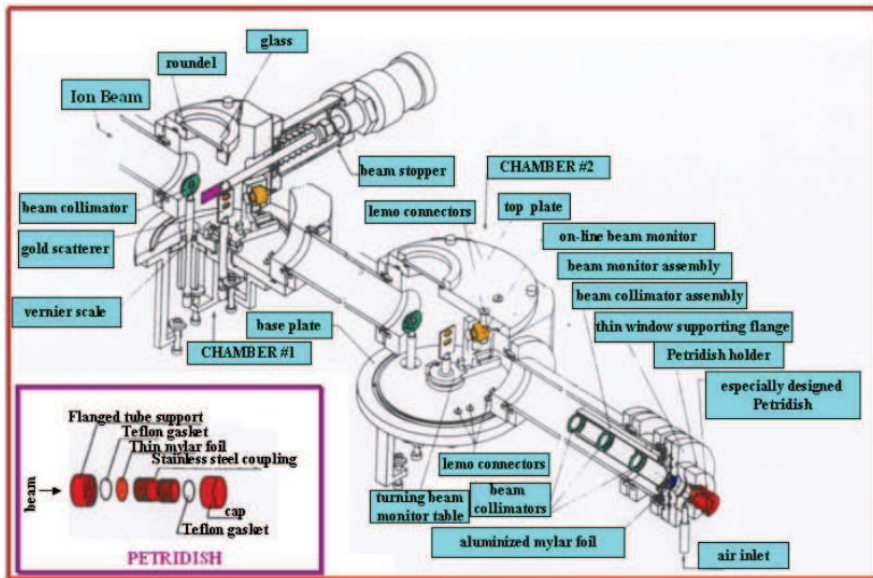


Figura 4.3: Apparato sperimentale utilizzato per gli esperimenti di irraggiamento con le particelle α .

Le capsule di Petri in acciaio appositamente realizzate per gli irraggiamenti sono costruite nel seguente modo:

- un anello d'acciaio inossidabile con un diametro di 2,2cm
- una guarnizione in teflon di diametro 1,3cm
- foglio di mylar di 1,3cm di diametro e $7\mu\text{m}$ di spessore
- un corpo cilindrico da avvitare all'anello di base
- un coperchio con guarnizione in teflon per chiudere il tutto

Contando il numero di particelle sul primo, sul secondo e sul terzo rivelatore in aria, si vede come queste quantità siano correlate tra loro. Ciò permette, una volta sostituito il terzo rivelatore con le capsule di Petri in acciaio, di calcolare il numero di particelle incidenti sulle cellule utilizzando gli altri due rivelatori.

Dato che la dose assorbita dipende da quante particelle vanno ad incidere sulle cellule e non dal tempo di esposizione, è stato deciso di fissare il numero di particelle incidenti sul primo rivelatore.

Una volta raggiunto il numero di particelle da noi prefissato, un otturatore di tantalio, appositamente ideato, intercetta il fascio bloccando le particelle all'ingresso della *facility*. Utilizzando tale metodo, riusciamo ad ottenere una riproducibilità migliore del 1%.

Per quanto riguarda la dose somministrata al campione, essa viene calcolata nella seguente maniera:

$$D[\text{Gy}] = 1.6 * 10^{-9} L[\text{keV}/\mu\text{m}] F[\text{part.} * \text{cm}^{-2}]$$

dove L rappresenta il LET ed F è la fluenza delle particelle incidenti sulle cellule.

Dato che il terzo rivelatore SSB (in aria), nel momento dell'irraggiamento cellulare, viene sostituito dalle capsule di Petri, tale fattore viene calcolato nella seguente maniera:

$$F = \Phi * \Psi$$

dove Φ è un fattore di correlazione tra il primo rivelatore e quello in aria, invece Ψ è il numero di particelle che vengono rivelate nel primo SSB.

Per il nostro esperimento utilizziamo un rateo di dose di $1Gy/min$.

Al fine di studiare il profilo di fascio sono stati utilizzati dei rivelatori GafChromici che, acquistando un colore blu nelle porzioni in cui sono attraversati dalle particelle α , permettono di verificare se l'intera superficie di mylar delle capsule di acciaio, su cui sono adese le cellule da irraggiare, viene irraggiata uniformemente.



Figura 4.4: Foto del GafChromico utilizzato a seguito dell'esposizione ai raggi α . Si noti come la parte centrale, essendo stata irraggiata, presenta un colore più scuro rispetto al bordo, che durante l'irraggiamento, veniva mascherato dall'anello di acciaio inossidabile della base della capsula di Petri che lo conteneva.

Capitolo 5

Risultati e discussione

Le cellule utilizzate per l'irraggiamento sono le AG01522, fibroblasti umani primari normali.

Per ogni valore di dose sono state irraggiate 3 capsule di Petri in acciaio contenenti i fibroblasti in numero opportuno, in maniera tale da avere un campione di cellule significativo da studiare.

Per ogni dose, dopo l'irraggiamento, le cellule sono state seminate in 5 piastre di Petri in numero definito in funzione della dose.

Per calcolare la frazione di cellule sopravvissute (SF) in funzione della dose, utilizziamo la seguente equazione:

$$SF(D) = \frac{\text{numero medio di colonie dopo l'irraggiamento per piastra di Petri}}{\text{numero medio di cellule seminate per piastra di Petri}} * \frac{100}{PE}$$

Dove PE è l'efficacia di piastramento, che viene calcolata nella seguente maniera:

$$PE = \frac{\text{numero medio di colonie derivanti dalle cellule non irraggiate (controllo)}}{\text{numero medio di cellule seminate per piastra di Petri}} * 100$$

A causa dell'incertezza introdotta dalle varie fasi del protocollo sperimentale, viene attribuito un errore sulla frazione di cellule sopravvissute del 10%. Questo viene, in seguito, confrontato con quello ottenuto attraverso la propagazione degli errori, scegliendo tra i 2 quello con il valore più alto.

In questo lavoro di tesi sono stati utilizzati raggi γ per fornire la *priming dose* e particelle α per la *challenging dose*.

Ciò che noi vogliamo verificare è la presenza di risposta adattativa confrontando due popolazioni cellulari, una per esposizioni alle sole particelle α ed un'altra esposta ai raggi γ e dopo circa 6 ore alle particelle α .

Per avere un confronto diretto delle curve di sopravvivenza da paragonare, vengono scelti per entrambe le condizioni d'irraggiamento gli stessi valori di dose *challenging*.

Dal conteggio delle colonie, il numero di cellule sopravvissute in funzione della dose è riportato nelle tabelle 5.1 e 5.2 .

I parametri necessari per studiare l'andamento della frazione di cellule sopravvissute, in funzione della dose, vengono riportati nelle tabelle 5.3 e 5.4 .

Dose (Gy)	1	2	3	4	5
0	118	125	121	130	117
0,5	128	125	127	120	124
1	119	112	114	124	117
1,5	106	103	72	111	79
2	132	133	139	136	129
3	161	163	161	156	150

Tabella 5.1: Conteggio delle colonie provenienti da cellule AG01522 sopravvissute (5 piastre di Petri per dose) a seguito dell'esposizione delle capsule di Petri sia alle radiazioni γ che alle particelle α . I valori della dose rappresentano la dose somministrata alle cellule dalle particelle α , mentre la *priming dose*, somministrata mediante esposizione ai raggi γ , vale $0,1Gy$ per tutte le capsule sottoposte ad irraggiamento combinato (particelle α e raggi γ).

Dose (Gy)	1	2	3	4	5
0	139	143	143	146	145
0,1	117	118	117	119	126
0,5	132	127	130	136	123
1	140	136	138	140	138
1,5	118	112	118	116	122
2	112	116	111	113	109
3	149	140	141	141	145

Tabella 5.2: Conteggio delle colonie provenienti da cellule AG01522 sopravvissute (5 piastre di Petri per dose) a seguito dell'esposizione delle capsule di Petri alle sole particelle α .

Dose (Gy)	Semina	Mean	Std Dev	SE of mean	SF_%	SF_N	Err_Bio	Err_Stat	Err_Tot
0	500	143,2	2,68328	1,2	28,64	1	0,1	0,00838	-
0,5	1500	129,6	4,9295	2,20454	8,64	0,30168	0,0302	0,00513	0,0302
1	3500	138,4	1,67332	0,74833	3,95429	0,13807	0,0138	7,4654E-4	0,0138
1,5	5000	117,2	3,63318	1,62481	2,344	0,08184	0,008184	0,00113	0,008184
2	7500	112,2	2,58844	1,15758	1,496	0,05223	0,005223	5,38912E-4	0,005223
3	10000	143,2	3,76829	1,68523	1,432	0,05	0,005	5,88418E-4	0,005

Tabella 5.3: Parametri calcolati per ottenere la SF e il suo errore per le cellule irraggiate solo con la *challenging dose*.

Dose (Gy)	Semina	Mean	Std Dev	SE of mean	SF_%	SF_N	Err_Bio	Err_Stat	Err_Tot
0	500	122,2	5,35724	2,39583	24,44	1	0,1	0,01961	-
0,5	1500	124,8	3,11448	1,39284	8,32	0,34043	0,034	0,0038	0,0324
1	3500	117,2	4,65833	2,08327	3,34857	0,13701	0,0137	0,00244	0,0137
1,5	5000	94,2	17,48428	7,81921	1,884	0,07709	0,007709	0,0064	0,007709
2	7500	133,8	3,83406	1,71464	1,784	0,073	0,0073	9,3543E-4	0,0073
3	10000	158,2	5,26308	2,35372	1,582	0,06473	0,006473	9,63061E-4	0,006473

Tabella 5.4: Parametri calcolati per ottenere la SF e il suo errore per le cellule irraggiate sia con la *priming dose* che con la *challenging dose*.

Dato che tutti gli irraggiamenti con i raggi γ sono stati effettuati a $0,1Gy$, il fattore di normalizzazione (valore di sopravvivenza derivante dal controllo) che è stato utilizzato per la popolazione esposta sia ai raggi γ che alle particelle α è il valore della SF per le cellule irraggiate alla dose (*priming*) di $0,1Gy$. Interpolando i dati secondo la relazione lineare-quadratica otteniamo quanto segue:

$$SF(D) = e^{-\alpha D - \beta D^2}$$

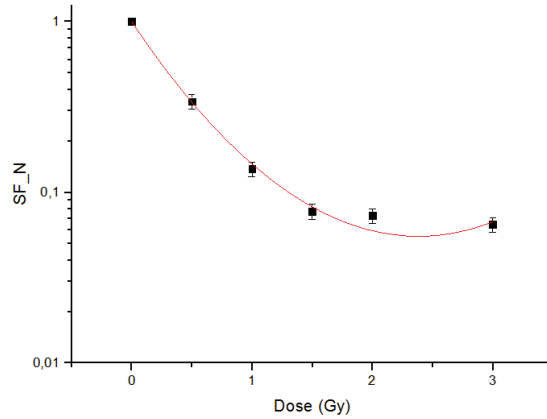


Figura 5.1: Curva di sopravvivenza dopo l'irraggiamento con raggi γ da ^{60}Co e fascio di particelle α di energia 5,8MeV.

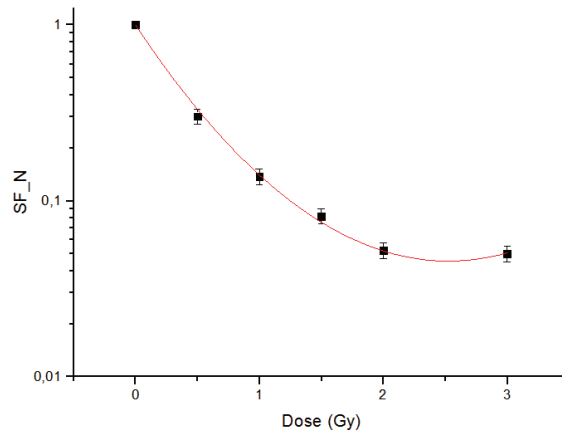


Figura 5.2: Curva di sopravvivenza dopo l'irraggiamento con il fascio di particelle α di energia 5,8MeV.

I parametri α e β che otteniamo per le due curve sono rispettivamente per la popolazione irraggiata con *priming + challenging dose* e per quella irraggiata con la *challenging dose*:

$$\alpha_{p+c} = 2,43025 \pm 0,08948 \text{ Gy}^{-1} \quad \beta_{p+c} = -0,51016 \pm 0,03513 \text{ Gy}^{-2}$$

$$\alpha_c = 2,44933 \pm 0,05513 \text{ Gy}^{-1} \quad \beta_c = -0,48524 \pm 0,02176 \text{ Gy}^{-2}$$

Le due curve presentano un fattore β negativo, con conseguente concavità positiva della curva di sopravvivenza.

I grafici mostrano , per entrambe le curve, una coda per le dosi di 2 e 3 Gy. Tale andamento può essere dovuto o ad un parziale mascheramento delle cellule al momento dell'irraggiamento oppure ad una sub-popolazione più radio-resistente rispetto al resto della stessa popolazione. Per le ragioni appena esposte, maschereremo tali dati quando analizzeremo le nostre curve di sopravvivenza. Interpolando con la relazione lineare si ha:

$$SF(D) = e^{-\alpha D}$$

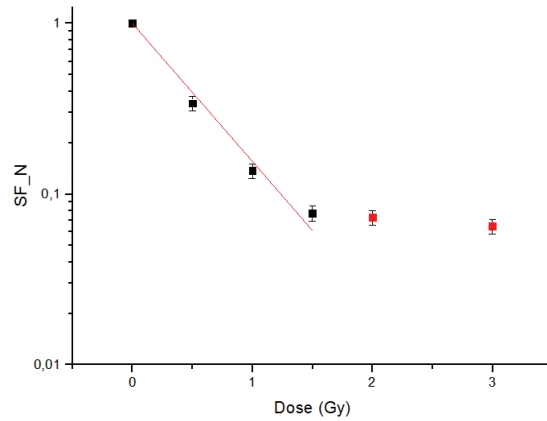


Figura 5.3: Curva di sopravvivenza dopo l'irraggiamento con raggi γ da ^{60}Co e fascio di particelle α di energia 5,8MeV nell'intervallo di dose 0-1,5 Gy.

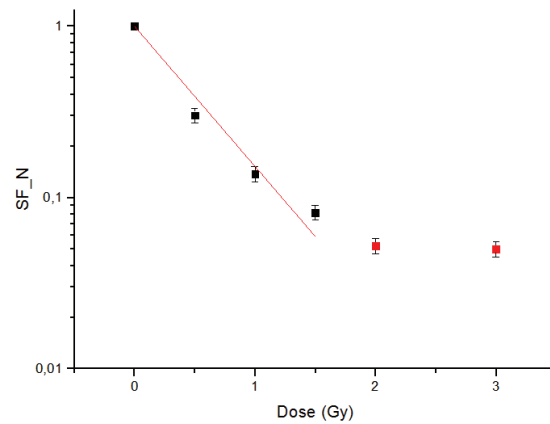


Figura 5.4: Curva di sopravvivenza dopo l'irraggiamento con il fascio di particelle α di energia 5,8MeV a seguito del mascheramento dei dati nell'intervallo di dose 0-1,5 Gy.

Il parametro α che otteniamo per le due curve vale rispettivamente per la popolazione irraggiata con *priming + challenging dose* e per quella irraggiata con la *challenging dose*:

$$\alpha_{p+c} = 1,86166 \pm 0,09709 \text{ Gy}^{-1}$$

$$\alpha_c = 1,88400 \pm 0,14356 \text{ Gy}^{-1}$$

Confrontando tali valori, risulta che essi sono molto simili. Per le cellule analizzate, dunque, non è presente risposta adattativa. In particolare, notiamo che non c'è un effetto di potenziamento del danno dovuto al pre-irraggiamento con i raggi γ .

Conclusioni

In questo lavoro di tesi sono stati analizzati gli effetti non lineari delle radiazioni ionizzanti. In particolare, si è analizzata la risposta adattativa. Una migliore comprensione dei meccanismi molecolari alla base di quest'ultimo effetto può portare ad un miglioramento del trattamento del cancro, la valutazione dei rischi e le strategie di gestione del rischio.

La risposta adattativa è stata osservata in molti organismi differenti: batteri, lieviti, alghe e cellule di mammifero *in vitro*.

Diversi *end point* biologici sono stati utilizzati per verificare la presenza o meno di RA in esperimenti *in vitro*. [24]

Lo studio dei meccanismi di riparazione dei danni al DNA in cellule V79 di criceto cinese, hanno mostrato che la risposta adattativa potrebbe essere il risultato di meccanismi di riparazione del DNA che attivandosi portano a minori danni residui. [25]

La risposta adattativa risulta sia dipendente dal tempo che dalla dose, con un massimo dell'effetto ottenibile qualche ora dopo l'esposizione alla *priming dose*. Ad esempio, tale massimo varia tra le quattro e le sei ore per l'alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Bryant, 1976; Chankova et al., 2005, 2007).

In generale, si può affermare che la maggiore radio-resistenza indotta da adattamento alle radiazioni dura solo per un periodo di tempo limitato. [24]

È stato recentemente riportato che in cellule della prostata di topi transgenici è stata osservata RA "inversa", che si ottiene quando l'esposizione all'alta dose precede l'irraggiamento alla bassa dose [26]. La RA inversa induce gli stessi danni sul sistema biologico di quelli osservati quando le cellule vengono prima esposte alla radiazione con la dose più bassa. Questi risultati possono indicare che i meccanismi alla base della RA non possono essere dovuti a meccanismi che preparano la cellula alla *challenging dose* ma alla modulazione della risposta cellulare a seguito di tale esposizione.

Inoltre, alcuni lavori ([24]) hanno riportato che la presenza di fattori di crescita o ormoni nel terreno di coltura potrebbe modulare la risposta dei linfociti (cellule presenti nel sangue) in modo tale che questi esprimano risposta adattativa.

Vari esperimenti hanno mostrato che l'induzione della risposta adattativa anche in sistemi *in vivo*. [27, 28] *In vivo* però, un altro fattore da considerare è la ripopolazione cellulare.

In base agli esperimenti e i modelli sviluppati fino ad oggi possiamo affermare che per la risposta adattativa le condizioni sottostanti hanno un'influenza rilevante per l'eventuale manifestazione del fenomeno:

- *Priming dose* (PD)
- *Challenging dose* (CD)
- Intervallo PD-CD
- Proliferazione delle cellule / regolazione del ciclo cellulare
- *In vitro* / *in vivo*
- Induzione di riparazione del DNA
- Induzione della produzione di proteine
- Tipo di cellula e stadio di sviluppo
- Stimolazione del sistema immunitario
- Predisposizione genetica

In questo lavoro di tesi la risposta adattativa non è stata osservata su cellule *in vitro* AG01522, d'altra parte non è stato osservato neppure un effetto di potenziamento del danno dovuto al pre-irraggiamento con i raggi γ .

Le condizioni d'irraggiamento usate sono: raggi γ da ^{60}Co per la *priming dose* (0,1Gy), particelle α da 5,8MeV per la *challenging dose* e tempo intercorso tra le due esposizioni di 6 ore.

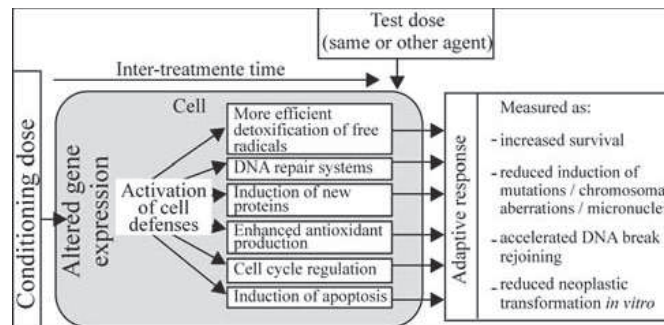


Figura 5.5: Alcuni dei probabili meccanismi connessi alla risposta adattativa. [24]

Bibliografia

- [1] Alpen E. L. **Radiation Biophysics**, Prentice-Hall International.
- [2] Blakely E.A., Ngo F.Q.H., Curtis S.B., Tobias C.A. **Heavy-ion radiobiology: Cellular studies** Adv. Radiat. Biol. 11 195–389 (1984).
- [3] Kadhim M., Salomaa S., Wright E., Hildebrandt G., Belyakov O.V., Prise K. M., Little M.P. **Non-targeted effects of ionising radiation—Implications for low dose risk** (2012).
- [4] Marín A., Martín M., Lin L., Alvarenga F., López M., Fernández L., Büchser D., Cerezo L. **Bystander effects and radiotherapy** (2014).
- [5] Matsumoto H., Tomita M., Otsuka K., HataShita M. **A new paradigm in radioadaptive response developing from microbeam research** (2009).
- [6] Prise K.M., Folkard M., Kuosaitė V., Tartier L., Zyuzikov N., Shao C.H. **What role for DNA damage and repair in the bystander response?** Mutat Res;597:1–4 (2006).
- [7] Krueger S.A., Collis S.J., Joiner M.C., Wilson G.D., Marples B. **Transition in survival from low-dose hyperradiosensitivity to increased radioresistance is independent of activation of ATM Ser1981 activity** Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 69 (2007).
- [8] Mothersill C., Seymour C.B. **Radiation-induced bystander effects and the DNA paradigm: an “out of field” perspective.** Mutat Res;597:5–10 (2006).
- [9] Kaminski J.M., Shinohara E., Summers J.B., Niermann K.J., Morimoto A., Brousal J. **The controversial abscopal effect.** Cancer Treat Rev;31:159–72 (2005).
- [10] Morgan W.F., Sowa M.B. **Non-targeted bystander effects induced by ionizing radiation.** Mutat Res;616:159–64 (2007).
- [11] Gerardi S., Cherubini R., De Nadal V. **Effetti biologici indotti da basse dosi di radiazioni ionizzanti. Studi in vitro e implicazioni per la valutazioni di rischio.** (2011).
- [12] Prise K.M., Schettino G., Folkard M., Held K.D. **New insights on cell death from radiation exposure.** Lancet Oncol 2005;6:520–8 (2005).
- [13] Pinto M. **Radiobiologia delle basse dosi di radiazioni ionizzanti: fenomenologia.**
- [14] Hou J., Wang F., Kong P., Yu P.K.N., Wang H., Han W. **Gene profiling characteristics of radioadaptive response in AG01522 normal human fibroblasts** (2015).

- [15] Yoshida N., Imada H., Kuniguta N., Norimura T. **Low dose radiation-induced adaptive survival response in mouse spleen T-lymphocytes in vivo.** Journal of radiation research, (1993).
- [16] Lea D.E., Haines R.B., Bretscher E. **The bactericidal action of X-rays, neutrons and radioactive radiations.** J Hyg (Lond);41:1–16 (1941).
- [17] Lea D.E. **The inactivation of viruses by radiations.** Br J Radiol.;19:205–12 (1946).
- [18] Lea D.E., Coulson C.A. **The distribution of the numbers of mutants in bacterial populations.** J Genet.;49:264–85 (1949).
- [19] Marples B., Joiner M.C. **The response of chinese hamster V79 cells to low radiation doses: evidence of enhanced sensitivity of the whole cell population** (1993).
- [20] Marples B., Joiner M.C. **Modification of survival by DNA repair modifiers: a probable explanation for the phenomenon of increased radioresistance** (2000).
- [21] Carabe-Fernandez et al. **The incorporation of the concept of minimum RBE into the LQ model and the potential improved radiobiological analysis of high-LET treatments** Int J. Rad Biol. Vol 83 (2007).
- [22] Coogle J.E. **Biological effects of radiation** Taylor & Francis Ltd, London (1983).
- [23] Belli M., Cherubini R., Galeazzi G., Mazzuccato S. et al. **Proton irradiation facility for radiobiological studies at 7MV Van De Graff accelerator** Nuclear instruments and methods in physics research, A256, 576-580 (1987).
- [24] Dimova E.G., Bryant P.E., Chankova S.G. **“Adaptive response” - Some underlying mechanisms and open questions** Genetics and Molecular Biology, 31, 2, 396-408 (2008).
- [25] Ikushima T., Aritomi H., Morisita J. **Radioadaptive response: efficient repair of radiation-induced DNA damage in adapted cells** Mutat Res. 358(2):193-8 Nov. (1996).
- [26] Day T.K., Zeng G., Hookler A.M., Bhat M., Turner D.R., Sykes P.J. **Extremely low doses of X-radiation can induce adaptive responses in mouse prostate** Dose Response. 5(4):315-22. Oct. (2007).
- [27] Choi V.W.Y., Cheng T.K.S.H., Oikawa M., Yu K.N., Iso H. **Adaptive Response in Zebrafish Embryos Induced Using Microbeam Protons as Priming Dose and X-ray Photons as Challenging Dose** J. Radiat. Res., 51, 657–664 (2010).
- [28] Streffer C. **Adaptive Response – A Universal Phenomenon for Radiological Protection?** Institute for Science and Ethic, University of Duisburg-Essen, 45117 Essen, Germany.

Ringraziamenti

Desidero ricordare tutti coloro che mi hanno aiutato nella stesura della tesi con suggerimenti, critiche ed osservazioni: a loro va la mia gratitudine, anche se a me spetta la responsabilità per ogni errore contenuto in questa tesi.

Ringrazio anzitutto la mia relatrice, la Professoressa Giovanna Montagnoli, per avermi indirizzato per il compimento delle mie aspettative di argomento di tesi, introdotto ai Laboratori Nazionali di Legnaro dell'INFN e per avermi aiutato con gentilezza e disponibilità in tutto il periodo di tesi.

Ringrazio inoltre il mio correlatore, il Professor Roberto Cherubini, e la Dottoressa Viviana De Nadal per le loro spiegazioni e insegnamenti: senza il loro aiuto e la loro guida sapiente e paziente questa tesi non esisterebbe.

Inoltre, grazie a loro ho avuto modo di sviluppare e di nutrire interesse verso l'ambito della Fisica Medica, di cui ho deciso di approfondirne lo studio con il mio percorso magistrale.

Un ringraziamento particolare va agli amici e alla mia fidanzata che mi hanno incoraggiato o che hanno speso parte del proprio tempo per aiutarmi nel completamento di questi tre anni di studi universitari.

Sono molto grato ai miei colleghi e amici: Simone Botticelli, Angelo Balestra, Marco Faccioli e Francesco Bussola per essermi stati accanto, accompagnato e condiviso le difficoltà di questo percorso verso la laurea.

E' doveroso da parte mia ringraziare mio padre, mia madre, e i miei fratelli che mi sono sempre stati vicini, sia economicamente che moralmente, tra gli alti e bassi della mia carriera universitaria e in generale della mia vita.

Vorrei infine ringraziare Dio, a cui è dedicato questo lavoro di tesi, per aver creduto in me.