

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**



**FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI**

**CORSO DI LAUREA IN BIOLOGIA**

**Tesi sperimentale  
in  
Biofisica delle Radiazioni**

**Effetti letali, subletali e "non-targeted"  
dell'esposizione *in vitro* di cellule umane normali a  
fasci di particelle cariche accelerate**

**RELATORE:**

**Dott. Lorenzo Manti**

**CANDIDATA:**

**Irene Magro  
Matr. N92/530**

**ANNO ACCADEMICO 2011/2012**

*Ai miei genitori*

# Effetti letali, subletali e "non-targeted" dell'esposizione *in vitro* di cellule umane normali a fasci di particelle cariche accelerate

## Indice

<b>Introduzione</b> .....	7
<b>Capitolo 1: Interazione delle radiazioni ionizzanti con la materia biologica</b> .....	9
1. 1 Le radiazioni ionizzanti .....	10
1.1.1 Meccanismi di interazione dei fotoni con la materia biologica .....	11
1.1.2 Meccanismi di interazione delle particelle cariche con la materia biologica .....	13
1.2 Quantificare la deposizione di energia .....	16
1.2.1 Il trasferimento lineare di energia (LET) .....	17
1.2.2 RBE e dose equivalente .....	20
1.3 Effetti biologici della radiazione ionizzante .....	24
1.3.1 Le mutazioni radioindotte .....	28
1.3.2 Effetto bystander .....	30

<b>Capitolo 2: Aberrazioni cromosomiche radioindotte</b> .....	34
2.1 Meccanismi di riparo e induzione delle aberrazioni cromosomiche .....	35
2.2 Metodiche di studio delle aberrazioni cromosomiche .....	36
2.3 Classi di aberrazioni cromosomiche .....	41
2.3.1 Le delezioni .....	43
2.3.2 Scambi semplici .....	43
2.3.3 Scambi complessi .....	46
2.4 Relazione tra la qualità delle radiazioni ionizzanti ed aberrazioni cromosomiche .....	47
 <b>Capitolo 3: La senescenza</b> .....	 50
3.1 Senescenza replicativa e telomeri .....	52
3.2 Stress-Induced Premature Senescence (SIPS) .....	54
3.2.1 La senescenza cellulare come risposta allo stress .....	55
3.3 Il fenotipo secretorio delle cellule senescenti.....	56
3.4 Effetti del SASP ed effetto bystander .....	59
3.4.1 Effetti sulla proliferazione cellulare .....	60
3.4.2 Effetti sulla migrazione e invasione cellulare .....	61
3.4.3 Effetti sulla differenziazione cellulare .....	62
3.5 Pathway molecolari della senescenza .....	62
3.6 Riconoscere le cellule senescenti .....	64
3.6.1 Senescence-associated $\beta$ -galattosidasi .....	66
3.7 SIPS e radioterapia .....	67

<b>Capitolo 4: Materiali e metodi</b> .....	69
4.1 Progetto d'esperienza .....	69
4.2 Sistemi biologici .....	69
4.2.1 HUVEC .....	70
4.2.2 MCF10A ed MCF7 .....	71
4.3 Apparatì strumentali e modalità per l'irraggiamento .....	73
4.4 La sopravvivenza cellulare .....	77
4.5 Ibridazione fluorescente in situ multicolore (mFISH) .....	79
4.5.1 Microscopio a fluorescenza e acquisizione immagini .....	81
4.6 La senescenza prematura: test della $\beta$ -galattosidasi .....	84
4.7 Esperimento transfer medium: effetto bystander .....	85
<b>Capitolo 5: Analisi e discussione dei risultati sperimentali</b> .....	89
5.1 Curve di crescita .....	89
5.2 Caratterizzazione della radiosensibilità di cellule endoteliali in prossimità del picco di Bragg .....	93
5.2.1 Sopravvivenza cellulare alla radiazione di alto e basso LET .....	93
5.3 Caratterizzazione della risposta subletale di cellule endoteliali alla radiazione ionizzante: la senescenza prematura .....	100
5.4 Valutazione degli effetti bystander di cellule endoteliali irraggiate su cellule epiteliali non irraggiate .....	109
5.4.1 Effetto bystander acuto sulla linea cellulare MCF10A .....	110
5.4.2 Effetto bystander acuto sulla linea cellulare MCF7 .....	112

5.4.3 Effetto bystander e senescenza: risposta tardiva sulla linea cellulare MCF10A .....	114
5.4.4 Effetto bystander e senescenza: risposta tardiva sulla linea cellulare MCF7 .....	117
5.5 Analisi qualitativa dello spettro di aberrazioni cromosomiche indotte da particelle cariche in cellule epiteliali normali .....	120
<b>Conclusioni</b> .....	<b>130</b>
<b>Appendice A</b> .....	<b>135</b>
<b>Appendice B</b> .....	<b>137</b>
<b>Appendice C</b> .....	<b>140</b>
<b>Appendice D</b> .....	<b>143</b>
<b>Bibliografia</b> .....	<b>145</b>
<b>Ringraziamenti</b> .....	<b>150</b>

# INTRODUZIONE

Alla fine del secolo XIX avvennero alcune fra le più importanti scoperte che rivoluzionarono la scienza moderna. Una di queste fu la scoperta dei raggi X che da subito vennero applicati in diversi campi, tra cui quello medico.

Nel corso del tempo, a partire dalla metà del '900, l'interesse nell'applicazione di elettroni accelerati si è sviluppato ad oggi nell'impiego di particelle cariche accelerate nell'approccio terapeutico dei tumori e nello sviluppo di modelli radiobiologici atti ad ottimizzare il loro trattamento.

Il trattamento sia convenzionale (fotoni ed elettroni) che con particelle cariche accelerate di tumori profondi, per quanto esso sia studiato in modo che la radiazione rilasci energia localmente a livello del tumore, comporta inevitabilmente un assorbimento di dose da parte dei tessuti sani penetrati dalla radiazione e circostanti al tumore. Finora, la maggior parte degli studi radiobiologici sugli ioni si è soffermata quasi esclusivamente sugli effetti letali a carico delle cellule tumorali, ma la dose distribuita ai tessuti sani non è trascurabile e costituisce un fattore limitante della radioterapia, considerando che molti degli effetti a lungo termine, derivanti da tale interazione, non sono ancora ben caratterizzati.

Il presente studio vuole porre l'attenzione sugli effetti letali, subletali e non targeted, che radiazioni ionizzanti di alto e basso LET (raggi X, protoni, ioni carbonio e ossigeno) possono avere su cellule sane.

Il *danno letale*, legato agli effetti acuti, è stato valutato mediante la costruzione di curve di sopravvivenza clonogenica su cellule endoteliali ombelicali umane (HUVEC). Il *danno subletale*, la cui accumulazione in cellule sane può comportare a lungo termine instabilità genetica, trasformazione neoplastica, oltre che

degenerazione tissutale e/o perdita di funzione, è stato studiato analizzando l'insorgenza di senescenza prematura radioindotta in cellule della linea HUVEC; inoltre sono state analizzate le aberrazioni cromosomiche, noto indicatore di rischio carcinogenico, in cellule epiteliali di mammella normali (MCF10A). E' stato poi preso in esame il cosiddetto effetto bystander, che rientra nell'alveo dei fenomeni extra-bersaglio (*Non-Targeted Effects* o NTE) secondo i quali cellule non direttamente esposte alla radiazione possono comunque risentirne gli effetti. Tali NTE sono stati studiati per verificare se cellule endoteliali (HUVEC) irraggiate possono esercitare un'azione su cellule epiteliali di mammella normali (MCF10A) e tumorali (MCF7) non irraggiate. Ciò riveste particolare importanza in vivo, in quanto è noto che cellule che entrano in senescenza prematura, per effetto dei vari stressori, tra cui appunto la radiazione ionizzante, possono secernere fattori che coadiuverebbero la proliferazione delle cellule adiacenti. Lo scopo di tali valutazioni è, in prospettiva, contribuire alla comprensione degli effetti radiobiologici delle particelle cariche e quindi all'ottenimento di stime di rischio più affidabili in radioprotezione e migliori piani di trattamento in radioterapia.

In particolare, questa tesi si è sviluppata nell'ambito del progetto di ricerca MIMO-BRAGG, finanziato dall'Istituto Nazionale di Fisica Nucleare (INFN) e condotto presso il gruppo di Biofisica delle Radiazioni del Dipartimento di Scienze Fisiche di Napoli in collaborazione con i Laboratori Nazionali del Sud (LNS)-INFN di Catania, il Dipartimento di Fisica Nucleare e Teorica dell'Università di Pavia e il Centre for Cancer Research and Cell Biology della Queen's University di Belfast, Regno Unito. Tale studio è incentrato sulla misura e la modellizzazione del danno citogenetico indotto da ioni accelerati lungo la curva di Bragg.



# Capitolo 1

## Interazione delle radiazioni ionizzanti con la materia biologica

Con il termine radiazione si suole generalmente indicare un insieme di fenomeni caratterizzati dal trasporto di energia. Il principale effetto dell'interazione delle radiazioni con la materia è la cessione di parte o di tutta l'energia agli atomi e/o alle molecole che la compongono. L'assorbimento delle radiazioni nella materia è un processo complesso, i cui parametri principali sono costituiti dal tipo di radiazione incidente, dalla quantità di energia da essa trasportata e dalla natura del materiale attraversato. In relazione a quanto detto, a livello atomico e molecolare, le conseguenze principali dell'assorbimento di energia da parte della materia sono l'eccitazione e la ionizzazione.

Si parla di *eccitazione* quando l'energia ceduta è tale da portare un elettrone di un atomo o di una molecola ad un livello energetico superiore, facendo passare il sistema da uno stato fondamentale ad uno stato eccitato. L'elettrone eccitato ritorna poi allo stato energetico iniziale diseccitandosi mediante l'emissione di un fotone di energia pari alla differenza dei due livelli energetici. Si verifica un evento di *ionizzazione* quando una radiazione rilascia nel mezzo un'energia superiore all'energia minima di legame dell'elettrone, all'atomo o alla molecola interessata. In questo caso, l'energia assorbita è in grado di espellere l'elettrone, che viene rilasciato nel mezzo con una velocità pari alla differenza tra l'energia assorbita e la sua energia di legame. Dal punto di vista degli effetti biologici, sono principalmente le ionizzazioni gli eventi che hanno maggiori conseguenze, potendo innescare una rapida catena di reazioni a livello chimico (formazione di radicali liberi), a seguito delle quali possono essere indotte e fissate una serie di lesioni biomolecolari. In misura minore, comunque, anche le cessioni di energia che portano all'eccitazione di biomolecole possono avere

conseguenze rilevanti radiobiologicamente se legami chimici importanti vengono alterati o distrutti (Hall, 2006) .

Le *radiazioni ionizzanti* sono onde elettromagnetiche ad alta frequenza o particelle cariche, la cui energia è tale da ionizzare la materia; tutte le radiazioni che non possiedono una quantità di energia sufficiente per produrre un evento di ionizzazione sono invece dette *radiazioni non ionizzanti*. Per sua natura, l'interazione della radiazione ionizzante con la materia avviene in maniera stocastica e discontinua, rilasciando localmente cospicue quantità di energia, in grado eventualmente di indurre la rottura dei legami covalenti delle molecole; la soglia energetica che caratterizza una radiazione ionizzante è  $E > 10 \text{ eV}$ , che corrisponde grosso modo alla quantità di energia necessaria a ionizzare un atomo di idrogeno o una molecola d'acqua (Tubiana et al., 1990).

## **1. 1 Le radiazioni ionizzanti**

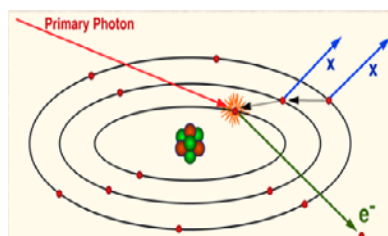
La radiazione può ionizzare il “bersaglio” direttamente o indirettamente. Inoltre, a seconda della densità di eventi di ionizzazione lungo la loro traccia, si possono distinguere in densamente o sparsamente ionizzanti. Le radiazioni si dicono *direttamente ionizzanti* se la cessione di energia avviene direttamente sulla macromolecola, ad esempio il DNA; viceversa, quando la radiazione interagisce con l'ambiente cellulare si parla di radiazioni *indirettamente ionizzanti*. Esse possono dar luogo a fenomeni radiolitici importanti: data la grossa componente acquosa della materia biologica, tali interazioni avvengono principalmente con l'acqua, inducendo la produzione di radicali liberi, che migrando possono a loro volta interagire con le molecole di interesse biologico. Le particelle elettricamente cariche, come ioni pesanti, elettroni e protoni sono poi dette *densamente ionizzanti* in quanto nell'attraversamento del materiale biologico esposto, danno luogo ad una densa colonna di interazioni rallentando lungo la loro traiettoria. Questo tipo di radiazioni sono quindi in grado di formare veri e propri “cluster” di ionizzazioni ed eccitazioni delle molecole del mezzo. Le

*radiazioni sparsamente ionizzanti* sono invece costituite da fotoni, ossia i raggi X e  $\gamma$  (la differenza risiede nel fatto che i primi sono prodotti da fenomeni atomici mentre gli altri derivano da reazioni nucleari): per queste radiazioni la cessione energetica è caratterizzata da eventi sporadici. Quello che si osserva è che le radiazioni sparsamente ionizzanti interagiscono prevalentemente per effetto indiretto, mentre per le particelle cariche (ma anche per i neutroni) prevale l'effetto diretto (Tubiana et al., 1990, Hall, 2006).

### 1.1.1 Meccanismi di interazione dei fotoni con la materia biologica

I principali meccanismi di interazione della radiazione sparsamente ionizzante (raggi X e  $\gamma$ ) che portano a conseguenze rilevanti in ambito biologico sono l'effetto fotoelettrico, l'effetto Compton e la produzione di coppie (Kiefer, 1990). I tre processi possono coesistere, con probabilità differenti, ma l'intervallo di energia della radiazione incidente determina quale dei tre è l'effetto predominante.

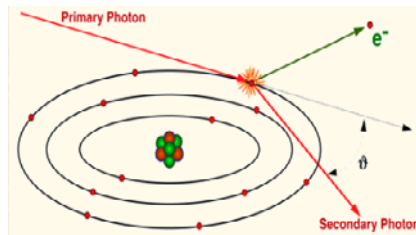
Per energie fotoniche minori di 100 keV, l'effetto predominante è l'*effetto fotoelettrico*, in cui il fotone incidente interagisce con un elettrone degli orbitali più interni della biomolecola, cedendogli tutta la sua energia. In seguito a ciò, l'elettrone viene espulso con un'energia cinetica pari alla differenza tra l'energia iniziale del fotone e l'energia di legame dell'elettrone (fig. 1.1).



**Fig. 1.1** Assorbimento dell'energia tramite effetto fotoelettrico.

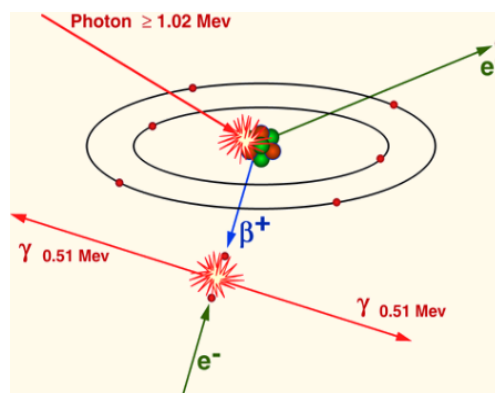
L'*effetto Compton* si verifica prevalentemente quando l'energia media dei fotoni è compresa tra 100 keV e 10 MeV. In questo processo il fotone incidente

interagisce con un elettrone libero o degli orbitali più esterni (debolmente legato al nucleo). Parte dell'energia del fotone è trasferita all'elettrone sotto forma di energia cinetica generando un elettrone veloce che lascia il sistema originario, mentre la traiettoria del fotone incidente viene deviata rispetto a quella iniziale (fig. 1.2).



**Fig. 1. 2** Assorbimento dell'energia attraverso effetto Compton.

La produzione di coppie si verifica per fotoni di energia superiore a 1,022 MeV. Il fotone, interagendo col campo di forza del nucleo, scompare e si assiste alla contemporanea creazione di 2 particelle: un elettrone e un positrone; tutta l'energia oltre la soglia di 1.022 MeV è distribuita in ugual misura tra le due particelle sotto forma di energia cinetica. L'elettrone così prodotto può provocare ulteriori ionizzazioni, mentre il positrone va incontro ad annichilazione, con la conseguente produzione di 2 raggi  $\gamma$  da 0,511 MeV diretti in direzioni diametralmente opposte (fig. 1.3).



**Fig. 1. 3** Assorbimento dei fotoni mediante produzione di coppia.

### 1.1.2 Meccanismi di interazione delle particelle cariche con la materia biologica

Le particelle cariche a medio/alte energie (ioni, particelle  $\alpha$  ed elettroni), attraversando un materiale, possono perdere energia mediante due processi:

- *collisioni anelastiche con gli elettroni atomici del materiale*, che, essendo di natura Coulombiana, danno come risultato la ionizzazione o l'eccitazione degli atomi del materiale;
- *scattering elastico con i nuclei*, che non produce essenzialmente alcun trasferimento di energia dalla particella agli atomi del materiale (data la maggior massa del nucleo rispetto alla particella incidente, la sua traiettoria è deflessa e parte del suo momento è trasferito al nucleo bersaglio).

Le interazioni importanti ai fini del trasferimento di energia dalle particelle alla materia sono di gran lunga le collisioni anelastiche: in tali interazioni l'energia viene trasferita agli elettroni dell'atomo causandone l'eccitazione e/o la ionizzazione.

Le interazioni di scattering sono in realtà il risultato cumulativo di moltissimi microeventi con una loro distribuzione statistica: l'interazione non avviene ad opera di una singola particella bensì con numerose particelle. Anche se ogni particella perderà energia in modo diverso dalle altre, possiamo parlare di una perdita media per unità di percorso che possiamo indicare come *stopping power*,  $\frac{dE}{dx}$ . Tale perdita di energia per unità di distanza percorsa nel mezzo è rappresentata dalla *formula di Bethe-Bloch*:

$$-\frac{dE}{dx} = \frac{4\pi e^2 Z_{eff}^2 N_A \rho Z_b}{m_e v^2 A} \ln \left( \frac{2m_e v^2}{I(1-\beta^2)} - 2\beta^2 - \delta - U \right) \quad (1.1)$$

in cui:

$N_A$ : numero di Avogadro;

$m_e$  ed  $e$ : massa a riposo e la carica dell'elettrone;

$Z_{eff}$  e  $v$ : carica efficace e la velocità della particella incidente;

$\beta$ :  $v/c$ ;

$Z_b$  e  $A$ : numero atomico e peso atomico del target;

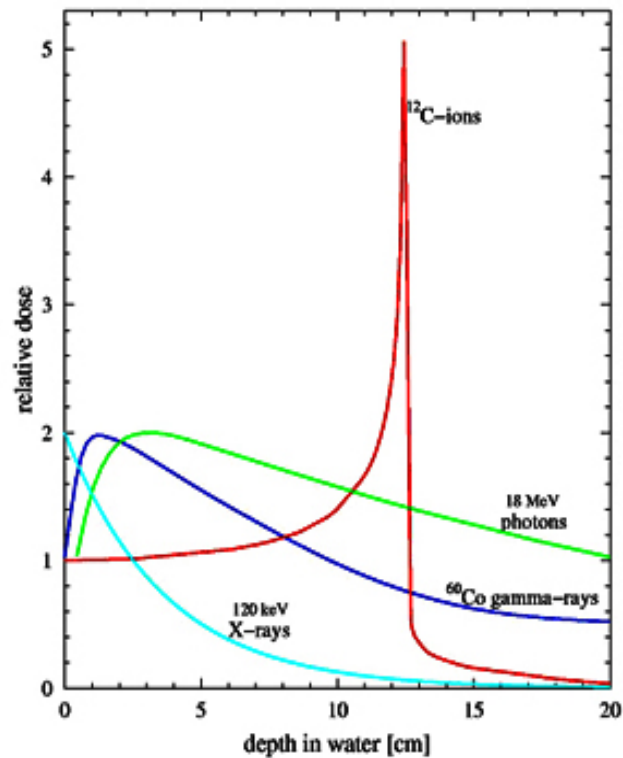
$\rho$  e  $I$ : densità e il potenziale di ionizzazione del materiale attraversato;

$\delta$  ed  $U$ : correzioni relativistiche.

La carica efficace  $Z_{eff}$  generalmente non è uguale al numero atomico dello ione in quanto dipende dalla sua energia e dal mezzo d'interazione. Infatti, la carica dello ione incidente, se è carico positivamente, diminuisce a bassa energia a causa della cattura di elettroni dagli atomi del mezzo, mentre se lo ione incidente è inizialmente carico negativamente, può subire stripping di alcuni dei suoi elettroni, il che risulta di nuovo in una diminuzione della sua carica, appunto effettiva,  $Z$ . Inoltre, indipendentemente dall'energia iniziale dello ione incidente, la diminuzione della sua carica per cattura elettronica si verifica nella regione del picco, ossia quando la sua velocità è molto bassa: è questa inevitabile diminuzione della carica dello ione incidente che determina anche il rapido declino del  $\frac{dE}{dx}$  a fine range, come vedremo poco più avanti. Non esiste una formula teorica universalmente accettata per descrivere la variazione della carica efficace in tutti i mezzi, per cui si utilizzano delle formule semi-empiriche di cui la più utilizzata è la *formula di Barkas*, che descrive il comportamento di  $Z_{eff}$  in acqua:

$$Z_{eff} = Z_p \left( 1 - e^{-125\beta Z_p^{-\frac{2}{3}}} \right) \quad (1.2)$$

Dalla formula di Bethe-Bloch si evince che la perdita media di energia per unità di percorso non dipende dalla massa dello ione ma solo dalla sua carica e dalla sua velocità. Dato che la perdita di energia è inversamente proporzionale al quadrato della velocità, quanto più lo ione è veloce, minore è la probabilità di interagire con gli atomi del mezzo. Pertanto la perdita di energia aumenta con il diminuire della velocità dello ione e, poiché a basse energie  $Z_{\text{eff}}$  diminuisce rapidamente, la perdita di energia raggiunge un massimo in prossimità del punto di arresto dello ione. La curva che descrive questo andamento è la *curva di Bragg*; la massima deposizione di energia dello ione corrisponde al cosiddetto *picco di Bragg* (fig. 1.4).



**Fig. 1.4** Perdita di energia in funzione della profondità per vari tipi di radiazione in acqua.

Questa curva è utile per capire perché vengano usati ioni pesanti per la cura di tumori profondi, ossia difficilmente accessibili chirurgicamente: man mano che una particella, nell'attraversare un mezzo, perde energia, lo stopping power

aumenta, la particella rallenta sempre più rapidamente e deposita una quantità d'energia che cresce per unità di percorso, fino a fermarsi. In definitiva, la maggior parte dell'energia viene depositata ad una certa distanza dal punto di ingresso della particella. Pertanto, in linea di principio, si può calcolare l'energia cui un fascio di particelle cariche deve essere accelerato in modo che la sua profondità massima di penetrazione, ossia il punto in cui si debba depositare l'energia massima, coincida con la posizione del tumore. Inoltre, è evidente come questo meccanismo di cessione molto localizzata dell'energia in funzione della profondità percorsa, differisca da quello impiegato dai fotoni, in cui il massimo di cessione energetica avviene molto superficialmente. Quindi, l'impiego delle particelle cariche in radioterapia (adroterapia) permette una riduzione dell'esposizione alla radiazione dei tessuti sani, e quindi del danno che essi possono subire, rispetto alla quantità di energia rilasciata sul tumore.

## 1.2 Quantificare la deposizione di energia

Una delle grandezze fondamentali utilizzate in radiobiologia è la dose assorbita. Questa è definita come la quantità di energia depositata per unità di massa del materiale irraggiato ed è rappresentata matematicamente dall'equazione 1.3:

$$D = \frac{\overline{dE_{ass}}}{dm} \quad (1.3)$$

dove  $\overline{dE_{ass}}$  è il valore medio dell'energia assorbita dall'elemento di volume irraggiato e  $dm$  è la massa del volume stesso. L'unità di misura della dose assorbita nel SI è il Gray (Gy), pari a 1 Joule/kg.

La somministrazione nel tempo di una determinata quantità di energia si esprime mediante il "dose-rate" o intensità di dose assorbita ( $dD/dt$ ), che



rappresenta la dose assorbita per unità di tempo; essa viene misurata in Gy/sec o, più frequentemente, in Gy/min.

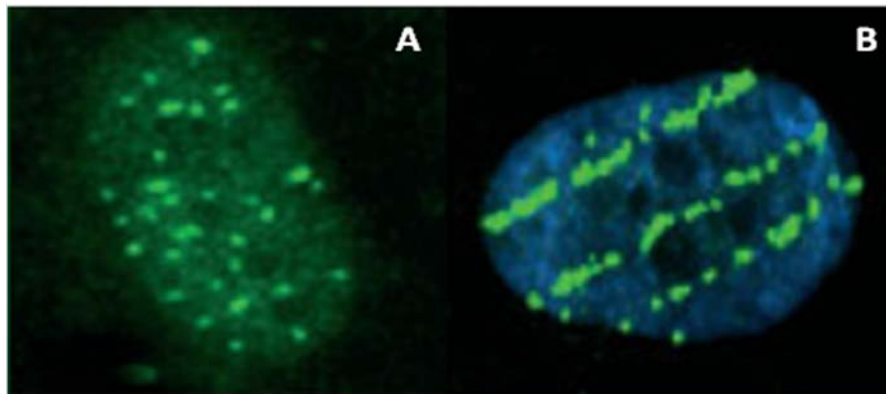
### 1.2.1 Il trasferimento lineare di energia (LET)

La dose è una grandezza essenziale per quantificare gli effetti biologici macroscopici delle radiazioni ionizzanti, ma essa è pur sempre una grandezza macroscopica, che non tiene conto del meccanismo intrinsecamente discontinuo con cui la radiazione deposita la sua energia nel mezzo biologico: ciò comporta che possano esistere notevoli fluttuazioni per i volumi delle dimensioni dei "bersagli" radiosensibili quali il DNA, fluttuazioni che per definizione vengono invece mediate su volumi molto grandi. Inoltre, bisogna considerare che uguali dosi di differenti "qualità" di radiazioni, ad esempio raggi X rispetto a particelle cariche accelerate, tipicamente non producono la stessa magnitudine di un determinato effetto biologico. È stato infatti osservato che i danni prodotti nella materia vivente, a parità di dose assorbita, sono fortemente influenzati dal tipo di radiazione e dalla sua energia: questi parametri incidono sulla diversa distribuzione degli eventi di ionizzazione all'interno del mezzo interessato e l'insieme delle regioni interessate da tali eventi è detto traccia.

La struttura della traccia dipende dalla composizione del materiale biologico attraversato dalla radiazione, ma, soprattutto, dalla sua energia: radiazioni prodotte da fenomeni di diseccitazione nucleare o atomica o dall'interazione coulombiana di particelle cariche con nuclei atomici (raggi X e  $\gamma$ ) determinano eventi di ionizzazione ben separati e distribuiti uniformemente nello spazio, e vengono definite sparsamente ionizzanti, come accennato nel paragrafo 1.1; particelle cariche e neutroni, invece, danno luogo a siti di interazioni molto vicini tra loro e vengono definite radiazioni densamente ionizzanti.

Quanto detto è facilmente visualizzabile facendo uso di una tecnica di immunofluorescenza in un sistema biologico. La figura 1.5 mostra nuclei di fibroblasti umani esposti a radiazioni sparsamente e densamente ionizzanti:

tramite saggio immuno-chimico dei foci  $\gamma$ -H2AX, in cui è rivelata la fosforilazione dell'istone  $\gamma$ -H2AX adiacenti siti di rottura della doppia elica del DNA, il danno citogenetico causato dalle radiazioni sparsamente ionizzanti appare sotto forma di foci uniformemente e causalmente distribuiti nel nucleo, mentre i foci indotti da un'eguale dose di radiazioni densamente ionizzanti mostrano una distribuzione ordinata lungo il percorso della particella (Cucinotta & Durante, 2006).



**Fig. 1.5 (A)** Nuclei di fibroblasti umani esposti a raggi  $\gamma$  (radiazioni sparsamente ionizzanti) e **(B)** a ioni  $^{12}\text{C}$  (radiazioni densamente ionizzanti).

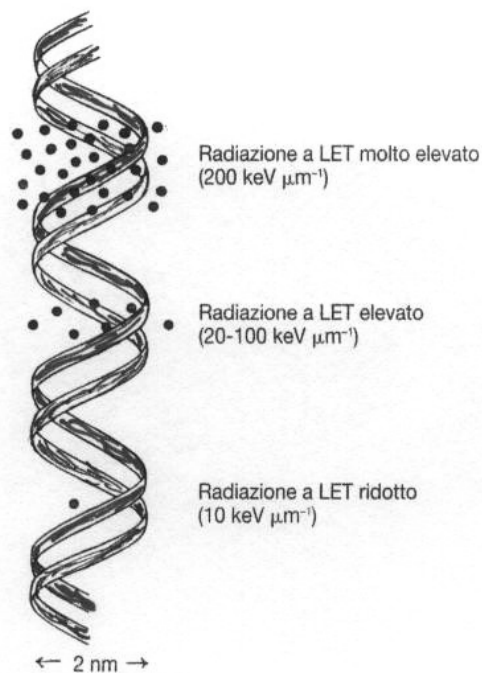
Nel tentativo di correlare al meglio la deposizione energetica a livello microdosimetrico sotto forma di densità di eventi di ionizzazione ed eccitazione con gli effetti biologici potenzialmente osservabili della radiazione ionizzante, è stata introdotta una grandezza che esprimesse la deposizione locale di energia: il trasferimento lineare di energia. Il LET (Linear Energy Transfer) è appunto definito come l'energia ceduta localmente nel materiale attraversato per unità di percorso ed è definito dal rapporto:

$$LET = \frac{dE}{dl} \quad (1.4)$$

dove  $dE$  rappresenta l'energia media localmente depositata nella materia e  $dl$  indica la distanza attraversata dalla particella nel mezzo. Il LET di un determinato ione viene in genere riferito all'acqua, e viene espresso in keV per  $\mu\text{m}$  di acqua attraversata ( $\text{keV}/\mu\text{m}$ ).

Nella valutazione del LET bisogna tener conto che durante un processo di ionizzazione non tutta l'energia depositata dalla radiazione incidente è assorbita localmente dal campione: in parte, essa viene trasportata lontano dal sito di interazione primaria mediante elettroni secondari che, liberati in seguito al primo evento di ionizzazione, interagiscono con gli atomi del target (i cosiddetti raggi  $\delta$ ). Si evince, dunque, che per stimare il LET di una radiazione bisogna considerare sia gli eventi di deposizione di energia dovuti alla particella primaria che quelli dovuti ad eventuali particelle secondarie.

La struttura di traccia di una radiazione è direttamente correlata con il LET: al crescere del LET gli eventi di deposizione d'energia lungo il percorso saranno più numerosi e ravvicinati. Le radiazioni densamente ionizzanti presentano valori di energia trasferita superiori a  $50\text{-}100 \text{ keV}/\mu\text{m}$ , mentre radiazioni sparsamente ionizzanti mostrano valori di LET compresi tra  $0.3$  e  $2.5 \text{ keV}/\mu\text{m}$ . È intuitivo rendersi conto di come, al crescere del LET di una radiazione incidente, aumenti la probabilità che uno o più eventi di ionizzazione avvengano a ridosso sulla doppia elica del DNA, e quindi cresca "l'efficacia" con cui possano essere causati danni a tale molecola (fig. 1.6). Ciò è confermato "macroscopicamente" dalla maggiore efficacia con cui questo tipo di radiazione induce vari effetti citogenetici, quali maggiore morte cellulare o danno cromosomico, a parità di dose di radiazioni a LET minore, come illustrato di seguito.



**Fig. 1.6** Eventi di ionizzazioni per radiazioni di diverso LET. Il motivo per cui radiazioni ad alto LET producono maggiori danni è che una maggior densità di ionizzazione può provocare più rotture contemporanee sulla molecola del DNA.

### 1.2.2 RBE e dose equivalente

Gli effetti biologici riscontrati dopo l'esposizione a parità di dose con radiazioni di differente qualità sono diversi sia da un punto di vista quantitativo che, talvolta, qualitativo.

Quando si vuole esprimere la capacità di radiazioni di diverso LET nell'indurre un danno biologico equivalente, viene introdotta un'altra grandezza: la dose equivalente (H). Essa è definita mediante un fattore di qualità Q che dipende dal LET della radiazione in esame. H si misura in sievert (Sv) ed è legata dalla relazione:

$$H = D \cdot Q \quad (1.5)$$

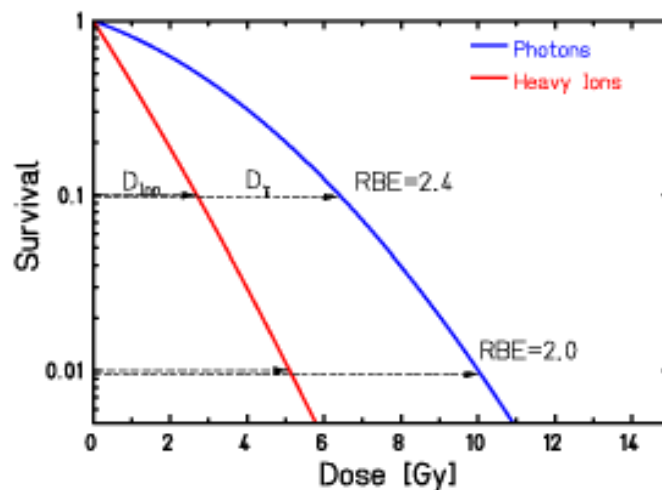
dove  $D$  è la dose assorbita e  $Q$  può essere sostituito, nella pratica radioprotezionistica, da un fattore di peso  $w_r$  caratteristico della radiazione usata.

Per stabilire il rischio biologico associato all'esposizione di una certa radiazione, bisogna conoscere l'efficacia biologica relativa (RBE). L'RBE tiene conto del fatto che dosi identiche di radiazioni con LET diversi producono effetti biologici diversi; essa viene definita con la seguente relazione:

$$RBE = \frac{DoseX}{DoseT} \quad (1.6)$$

dove  $DoseX$  è la dose assorbita di una radiazione di riferimento (convenzionalmente raggi X da 250 kV/picco) necessaria a produrre un certo effetto biologico in un dato tessuto, mentre  $DoseT$  è la dose assorbita della radiazione che si sta testando, necessaria a produrre lo stesso effetto biologico nello stesso sistema.

Per la comprensione del concetto dell'RBE risulta utile lo sviluppo di curve dose-risposta per un effetto molto ben studiato, cioè l'induzione di morte clonogenica: tali curve di sopravvivenza mettono in relazione la risposta biologica delle cellule (sotto forma di frazione di sopravvissuti) con la dose ricevuta dalla popolazione cellulare esposta. La figura 1.7 mostra l'andamento di curve dose-risposta ottenute per radiazioni sparsamente e densamente ionizzanti, dove la frazione di sopravvissuti è riportata sulle ordinate in scala logaritmica rispetto alla dose. Si noti come l'RBE dipenda dal livello dell'effetto che si sceglie di considerare, ossia, nel caso della figura, come differisca a seconda che si scelga di considerare l'iso-effetto come il 10% o l'1% della sopravvivenza misurata.



$$RBE = \frac{D_{\gamma}}{D_{Ion}} \Big|_{Isoeffect}$$

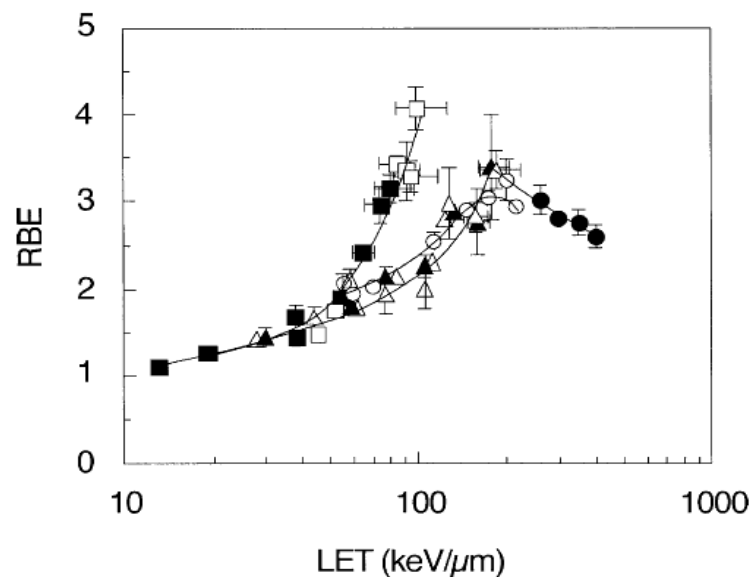
**Fig. 1.7** Tipiche curve di sopravvivenza di cellule di mammifero esposte a raggi-x (radiazioni di riferimento) e particelle cariche (radiazione test), con relativo calcolo dell'RBE.

Pur tenendo ben presente che le curve variano molto a seconda del tipo cellulare utilizzato e della loro radiosensibilità intrinseca, è possibile generalizzare che in tessuti irraggiati con radiazioni sparsamente ionizzanti, l'andamento della curva presenta una "spalla" nella zona corrispondente alle dosi più basse: secondo il modello radiobiofisico più comunemente accettato (modello lineare-quadratico) essa indica una minore efficienza di effetti letali a basse dosi e rappresenta l'accumulo del danno subletale riparabile in funzione della dose somministrata e del tipo di tessuto. Infatti, in tessuti interessati da radiazioni a basso LET, data la consistente distanza spazio-temporale che intercorre tra due eventi di ionizzazione a "basse" dosi (< 2 Gy), i sistemi di riparo cellulari possono riparare il danno radioindotto in maniera efficiente, con conseguente incremento della sopravvivenza cellulare.

Quando le linee cellulari *in vitro* sono irraggiate con radiazioni densamente ionizzanti, la risultante curva di sopravvivenza si mostra come una linea retta,

che indica una progressiva riduzione della capacità riparativa cellulare (e quindi un aumento della severità dell'effetto biologico) all'aumentare delle dose. Tale difficoltà della cellula nell'affrontare i processi di riparazione dipende dal fatto che la distanza dei multi-eventi creati dalle radiazioni ad alto LET è confrontabile con il diametro della doppia elica di DNA (1,8 nm): ciò si traduce in una maggiore probabilità che si verifichino rotture della doppia elica di DNA, danno letale non semplice da riparare correttamente. L'RBE quindi è legato al LET di una radiazione: maggiore è il LET, maggiore è il valore dell'RBE (Barendsen et al., 1960).

L'esame delle curve relative alla dipendenza LET/ RBE per vari end point biologici (morte cellulare, induzione di mutazioni, trasformazione, formazione di tumori in vivo, induzione di aberrazioni cromosomiche) (fig. 1.8), mostra un chiaro picco nell'intervallo LET 100-200 keV /  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 1.8** RBE calcolato per dosi risultanti nel 10% di sopravvivenza in funzione di radiazioni di diverso LET: (■) carbonio, 290 MeV/nucleone; (□) carbonio, 135 MeV/nucleone; (▲) neon, 230 MeV/nucleone; (△) neon, 400 MeV/nucleone; (●) silicio, 490 MeV/nucleone; (○) ferro, 500 MeV/nucleone.

La figura 1.8 mostra curve LET-RBE per diversi fasci di ioni relative alla morte cellulare: l'RBE per ioni carbonio cresce quando il LET aumenta nell'intervallo 13 keV/ $\mu\text{m}$  a 98 keV/ $\mu\text{m}$ ; per ioni neon, l'RBE aumenta per valori LET compresi tra 30 keV/ $\mu\text{m}$  e 184 keV/ $\mu\text{m}$ ; per ioni silicio l'RBE aumenta fino a LET di 145 keV/ $\mu\text{m}$  per poi raggiungere un plateau tra 145 keV/ $\mu\text{m}$  e 214 keV/ $\mu\text{m}$ ; infine, per ioni ferro l'RBE diminuisce all'aumentare del LET a partire da 200 keV/ $\mu\text{m}$ . Questi risultati suggeriscono che gli effetti biologici dipendono sia dalla specie ionica in esame che dall'energia della radiazione (Tsuruoka et al., 2005).

### **1.3 Effetti biologici della radiazione ionizzante**

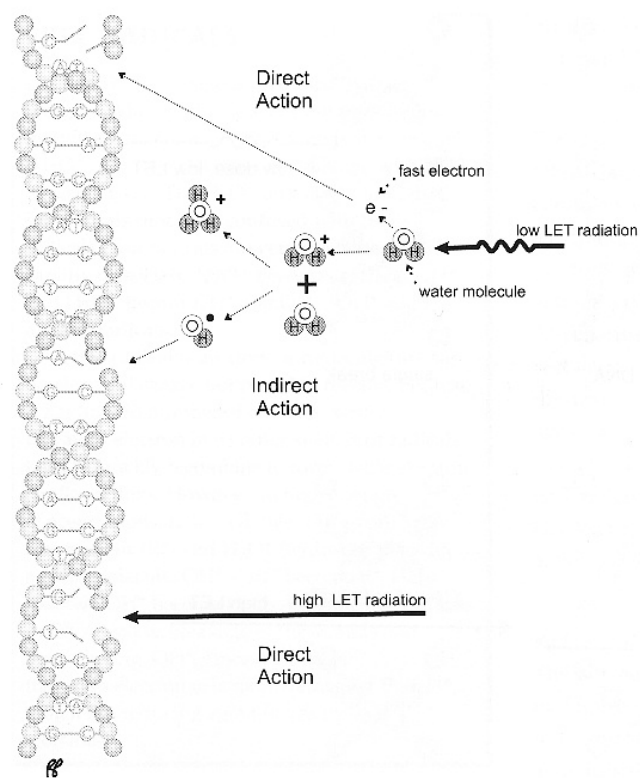
Come accennato nel paragrafo 1.1, la radiazione assorbita dal materiale biologico può dar luogo a due diverse modalità di interazione: azione diretta e azione indiretta.

Nel caso dell'interazione diretta, osservabile principalmente per radiazioni ad alto LET, l'assorbimento di energia avviene direttamente negli atomi della biomolecola di interesse, ad esempio il DNA. L'interazione della molecola di DNA con la radiazione induce un riarrangiamento elettronico tale da portare alla rottura di legami covalenti come quelli coinvolti nello scheletro zucchero-fosfato del DNA.

Quando ci troviamo innanzi ad un'azione indiretta (generalmente in caso di radiazione a basso LET), la particella interagisce con atomi o molecole diverse dal DNA, che vanno incontro a reazioni a catena che hanno come prodotto finale molecole altamente reattive come i radicali liberi. Poiché l'interazione tra la radiazione ionizzante e una molecola è un evento stocastico, la probabilità che ciò coinvolga una determinata molecola è proporzionale alla presenza di questa molecola nel tessuto irradiato. Dato che nei tessuti biologici l'acqua è la molecola più abbondante, essa è la molecola le cui reazioni radioindotte (radiolisi) pesano maggiormente nella produzione di molteplici specie di radicali liberi.



I radicali liberi sono molecole contenenti un elettrone spaiato (spin uncoupling) nell'orbitale più esterno e sono altamente reattivi: pur avendo vita molto breve (un idrossile  $\text{OH}^\cdot$  ha vita media di  $\sim 10^{-9}$  s), essi sono in grado di raggiungere il nucleo ed indurre la rottura dei legami covalenti del DNA interagendo con una base azotata o con uno zucchero. Inoltre, quando due radicali primari reagiscono tra loro producono specie estremamente reattive, come il perossido di idrogeno,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , che è altamente tossico per la cellula. Il danno biologico legato all'attività dei radicali liberi aumenta in presenza di ossigeno. La capacità dell'ossigeno di potenziare la risposta della radiazione è chiamato effetto ossigeno.



**Fig. 1.9** Nell'azione indiretta i prodotti di radiolisi dell'acqua mediano il danno al DNA. Nell'azione diretta, la radiazione danneggia la doppia elica senza la partecipazione di molecole intermedie.

A livello cellulare o di organismo, gli effetti delle radiazioni ionizzanti possono essere di tipo stocastico oppure deterministico. Si dicono *stocastici* se sono caratterizzati da una probabilità di accadimento in funzione della dose ricevuta e dall'assenza di qualsiasi valore soglia per la loro manifestazione; per essi non è possibile stabilire a livello individuale un nesso di causalità tra effetto osservato e dose ricevuta. La caratteristica peculiare di questo tipo di effetti è che essi sono effetti tardivi a carico di cellule che sopravvivono alla radiazione ma che "conservano" una memoria del danno ricevuto. A seconda della natura della cellula che ha subito il danno, la mutazione avrà conseguenze differenti. L'effetto stocastico per eccellenza è l'induzione di cancro.

Gli *effetti deterministici* si verificano, invece, soltanto quando la dose eccede determinati valori e la loro gravità dipende dalla dose ricevuta. Nei pazienti sottoposti a radioterapia, sono tipicamente fenomeni acuti gli eritemi radioindotti, che rappresentano la più comune reazione del tessuto sano.

Fin qui si è sottolineato come il bersaglio radiosensibile sia costituito dal DNA cellulare. In effetti, le radiazioni possono interagire con diverse parti della cellula, causando danni più o meno gravi alle strutture che la compongono. Un esempio è il danno causato dall'attività dei radicali liberi prodotti dalle radiazioni sulle membrane plasmatiche. Attraverso processi di perossidazione dei lipidi e di ossidazione dei gruppi sulfidrilici delle proteine, le radiazioni inducono una diminuzione della fluidità a carico delle membrane cellulari e possibile lacerazione di queste ultime.

Il danno più grave per la cellula, sia che si parli di effetti diretti che indiretti, è comunque a carico del DNA in quanto esso, fra le biomacromolecole, è presente in un'unica copia e contiene l'informazione genetica dell'individuo. La radiazione comporta l'alterazione della struttura primaria e secondaria del DNA con conseguente squilibrio delle funzioni biologiche ad esso legate (replicazione, trascrizione e quindi espressione genica). Le principali alterazioni del DNA sono:

- formazione di radicali dovuta allo spaiamento di un elettrone su di una base;
- distacco di una base;
- rottura del legame fosfodiesterico covalente dello scheletro zuccherofosfato, con formazione di un rotture a singola o a doppia elica (Single Strand Break, SSB.; Double Strand Break, DSB);
- formazione di legami covalenti tra DNA e proteine;
- cross-link tra eliche appartenenti alla stessa molecola o a molecole differenti.

In particolare, le rotture a singolo filamento, SSB, avvengono in seguito all'idrolisi del legame fosfodiesterico e all'eliminazione di un gruppo fosfato attraverso un meccanismo che coinvolge i radicali liberi. L'energia della radiazione che, a basso LET, provoca le rotture SSB è mediamente di 10-20 eV. Le rotture DSB consistono nell'interruzione dei due filamenti complementari di DNA a causa della cessione dell'energia da parte della radiazione. Esse possono essere localizzate nello stesso sito oppure possono essere distanti poche paia di basi o, ancora, possono essere lesioni complesse localizzate con perdita di informazioni geniche. Quando due o più lesioni si formano entro pochi giri dell'elica di DNA si parla di siti con danni multipli o *cluster*, dovuti ad elevate concentrazioni locali di energia, che si verificano principalmente con radiazioni densamente ionizzanti (alto LET). Si parla di *cluster semplici* quando essi sono formati da due sole lesioni e di *cluster complessi* quando sono formati da più di due lesioni.

Se si verifica una lesione del DNA, la cellula reagisce attivando diversi meccanismi di riparazione che tuttavia sono per loro natura soggetti ad errori: già in condizioni normali la replicazione del DNA introduce spontaneamente le rotture che a volte sono riparate erroneamente, con sostituzioni di basi diverse rispetto alle originali. Quando i danni da affrontare diventano maggiori rispetto a tale frequenza spontanea (*baseline mutations*), il complesso insieme di reazioni enzimatiche che sta alla base del sistema riparativo intracellulare può incontrare

difficoltà crescenti a gestire il danno, la cui severità e frequenza influiranno sulla capacità di riparazione. Ad esempio, quando il danno si presenta in cluster il tempo di riparazione del DNA aumenta fino a quattro volte. Se il danno al DNA è su uno solo dei filamenti, il danno è per lo più facilmente e correttamente riparato (*restitution*); se il danno al DNA è su entrambi i filamenti e/o sotto forma di cluster, allora si possono verificare essenzialmente due situazioni:

- la cellula muore subito (morte interfase) o quando tenta di riprodursi (morte mitotica o riproduttiva);
- a cellula non muore ma subisce una perdita di informazioni che può portare a diverse conseguenze (mutazioni, trasformazione, instabilità genomica, etc.).

Gi effetti legati al danno al DNA sono mutazioni, amplificazione genica, formazione di aberrazioni cromosomiche, carcinogenesi, morte cellulare (apoptosi, necrosi, morte clonogenica), formazione di micronuclei, variazione dei pathway espressivi della cellula e senescenza. Questi eventi possono riflettersi in un danno all'organo a cui la cellula appartiene, determinando difficoltà per l'intero organismo. Inoltre, le cellule direttamente irraggiate possono influenzare lo sviluppo di cellule normali in un processo denominato effetto bystander.

Di seguito verranno brevemente analizzati i significati delle mutazioni radioindotte e dell'effetto bystander, mentre per l'approfondimento delle aberrazioni cromosomiche e della senescenza si riporta rispettivamente ai capitoli 2 e 3.

### 1.3.1 Le mutazioni radioindotte

Una mutazione è un cambiamento stabile ed ereditabile del materiale genetico (DNA o RNA) causato non da ricombinazione genetica ma dovuto ad agenti esterni, al caso o ad errori a carico dei sistemi replicativi e di riparazione.

Le mutazioni possono interessare sia cellule somatiche che germinali, e sono ereditate dalle cellule discendenti. Mentre le mutazioni di cellule somatiche interessano il singolo organismo, le mutazioni germinali colpiscono le cellule dalle quali originano le cellule uovo o gli spermatozoi e possono quindi essere trasmesse alla progenie dell'individuo.

Le mutazioni possono essere puntiformi, ossia interessare una singola base nucleotidica, o possono interessare tratti più o meno cospicui di materiale genetico. In un caso o nell'altro, l'allele interessato dalla mutazione viene definito con il termine mutante per distinguerlo dall'allele più diffuso, che viene indicato come *wild type* o tipo selvatico. Gli alleli, mutanti o *wild type*, si distribuiscono all'interno di una popolazione con una certa frequenza che ne indica la diffusione nella popolazione. Inoltre, si parla di frequenza di mutazione quando si vuole indicare quanto frequentemente un allele si trasforma in un altro, in un determinato intervallo di tempo.

Quando si parla di mutazioni radioindotte, le mutazioni generalmente sono sempre o quasi sempre estese in lunghezza, a seconda che esse vengano causate da radiazioni ad alto o basso LET. In particolare, le mutazioni causate da radiazioni a basso LET possono essere sia delezioni intrageniche o multigeniche, duplicazioni e traslocazioni (che assumono il carattere di mutazioni con perdita di funzioni), sia mutazioni puntiformi, che si presentano però come una minoranza dei casi osservati. Le mutazioni dovute a radiazioni ad alto LET sono invece generalmente delle delezioni.

Dato il carattere casuale dell'interazione radiazione materia, le mutazioni da radiazioni possono comparire in tutti i geni che provvedono al controllo della proliferazione cellulare, dell'apoptosi e della riparazione del DNA. La ricerca sperimentale mostra che, in generale, i geni di ampie dimensioni con numerosi siti mutazionali appaiono più radiosensibili di quelli con limitato numero di siti, principalmente per la comparsa di delezioni. Quando una mutazione interessa un proto-oncogene, ossia un gene normale che può diventare oncogenico (ad esempio p53, ret, ras o myc), la cellula può andare incontro ad una

trasformazione neoplastica, che può evolvere nel tempo nella formazione di un tumore. Tuttavia, la frequenza delle mutazioni radioindotte è così bassa che è necessario prendere in considerazione il ruolo di altri fattori capaci di contribuire alle mutazioni di altri geni in grado di sostenere la progressione del tumore, soprattutto considerando che la tumorigenesi è un processo cumulativo.

### 1.3.2 Effetto bystander

Uno degli ambiti di ricerca che si è andato consolidando nell'ultimo ventennio è quello che punta a comprendere se cellule non direttamente irraggiate possano in qualche modo essere influenzate dall'attività di adiacenti cellule irraggiate. Tale fenomeno viene definito *effetto bystander* e le cellule sul quale esso si verifica vengono dette *cellule bystander*.

L'effetto bystander è caratterizzato da un ampio spettro di risposte, sia benigne che dannose, che possono essere tipo specifico delle cellule. Esso si attua o tramite fattori solubili trasmissibili o tramite comunicazione diretta cellula-cellula attraverso giunzioni gap. La prevalenza dell'una o dell'altra modalità sembra dipendere principalmente dalla densità cellulare: quando è abbastanza elevata, permette lo stabilirsi di stretti contatti tra le cellule, quando è più bassa, il segnale viene verosimilmente diffuso data l'impossibilità di contatti diretti e il segnale può diffondere solo attraverso il mezzo (Liu 2006).

Si ritiene che i fattori implicati nell'effetto bystander siano di basso peso molecolare, date le dimensioni del canale formato dalle giunzioni gap. Tra i mediatori più probabili sono stati indicati i radicali liberi e, più in generale, specie molecolari reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS), in sintonia con l'abolizione dell'effetto a seguito del pretrattamento con agenti bloccanti di radicali liberi (scavenger) quali il DMSO (dimetilsolfossido) o lindano (inibitore delle giunzioni gap) (Grandi & Moccaldi, 2005).

Gli approcci sperimentali che hanno permesso di comprendere questo effetto sono stati diversi:

- *metodo del medium transfer* - Il terreno proveniente da cellule irradiate viene trasferito su cellule non irradiate;
- *metodo delle coculture* - due colture, di cui una irraggiata, vengono coltivate nello stesso ambiente ma separate da una membrana permeabile che permette il passaggio dei fattori eventualmente prodotti dalle cellule irraggiate;
- *metodo microbeam* – viene utilizzato un microfascio di radiazioni ( $\mu\text{m}$ ) associato ad un software che consente di irraggiare in posizioni ben definite.

Ciò che soprattutto colpisce è la messa in evidenza dell'effetto bystander per esiti di tipo citogenetico, di mutagenesi e relativi alla trasformazione cellulare. Nel complesso, gli effetti indotti da radiazioni riscontrati in cellule bystander sono (Grandi & Moccaldi, 2005):

- riduzione della sopravvivenza/efficienza clonale;
- aumento della trasformazione cellulare;
- induzione dell'apoptosi;
- aumento della produzione intracellulare di ROS;
- aumento dello scambio di cromatidi fratelli (SCE);
- aumento della frequenza di micronuclei;
- aumento dell'instabilità genomica;
- aumento della frequenza di mutazioni a livello genico;
- alterata espressione genica.

Tra le numerose evidenze dell'importanza dell'effetto bystander, un esempio è lo studio di Mothersill e Seymour: i loro risultati mostrano un significativo decremento dell'efficienza di clonazione di linee cellulari normali e maligne riceventi terreno proveniente da cellule epiteliali irraggiate (Mothersill & Seymour, 1997).

Un altro aspetto che sta emergendo negli ultimi anni è legato ad alcune osservazioni in vivo, che sembrano dimostrare come l'effetto bystander sia coinvolto nella carcinogenesi e come le cellule bystander possano contribuire alle incertezze nella valutazione dei rischi di tumore associati all'esposizione a radiazioni ionizzanti (Goldberg & Lehnert, 2002).

Dati i potenziali effetti dell'effetto bystander, esso potrebbe rappresentare un problema con impatto notevole sulla valutazione del rischio radiazioni e lo sviluppo di terapie a base di radiazioni (Mancuso et al, 2012).

Nonostante i progressi fatti nella conoscenza di questo processo, molte caratteristiche fenomenologiche di base restano da indagare (Blyth & Sykes, 2011). Queste includono:

- la dimostrazione definitiva della presenza e della rilevanza dell'effetto bystander in vivo;
- lo spettro totale degli effetti bystander relativi all'esposizione delle cellule a radiazioni ionizzanti;
- le relazioni tra la qualità e quantità di radiazioni e gli effetti bystander indotti;
- come l'espressione degli effetti bystander è legata a tipi cellulari diversi e/o a stadi di differenziazione cellulare;
- la persistenza della risposte;
- come e se gli effetti bystander possano essere agonistici o sinergici sul bersaglio;
- una più puntuale ed articolata definizione della relazione dose-risposta.

Le radiazioni ionizzanti rappresentano di fatto finora l'unico fattore di rischio cancerogeno per il quale sia stata esplicitamente evidenziata l'induzione di effetti genotossici a livello di popolazioni cellulari non direttamente colpite.

Infine si può affermare che le attuali conoscenze relative all'effetto bystander ci suggeriscono che in termini di effetto biologico primario e di potenziali esiti secondari (induzione neoplastica) è urgente la prospettiva di considerare non



solo la cellula quale unità bersaglio quanto piuttosto l'insieme del microambiente tissutale e dell'organo.

## Capitolo 2

### Aberrazioni cromosomiche radioindotte

Le aberrazioni cromosomiche sono variazioni rispetto alla situazione normale selvatica della struttura o del numero dei cromosomi e possono verificarsi spontaneamente o essere indotte da agenti mutageni, sia di natura chimica che di natura fisica. In particolare, le aberrazioni cromosomiche strutturali sono un'importante conseguenza delle radiazioni ionizzanti nelle cellule eucariotiche e si presentano come la parte microscopicamente visibile dell'ampio spettro dei danni apportati alla cellula da questo tipo di radiazioni. Esse possono causare una serie di effetti biologici che includono morte cellulare, mutazioni e trasformazione neoplastica.

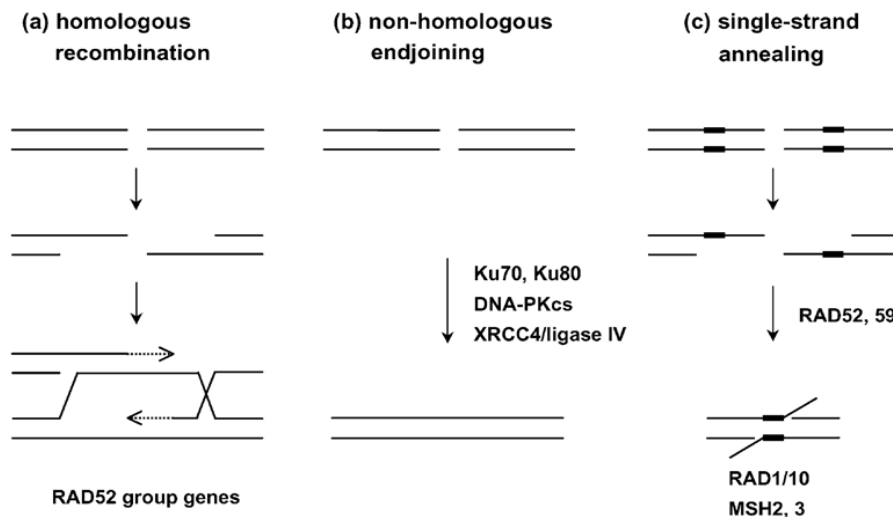
Già dai primi studi effettuati nel tentativo di comprendere la natura delle aberrazioni cromosomiche, apparve chiara la necessità di avere una rottura del materiale genetico che risultasse nella formazione di due estremità libere reattive (Lea, 1946). Le analisi sperimentali hanno mostrato che le rotture della doppia elica (Double-Strand Break o DSB) sono il principale tipo di lesione che dà il via al processo di formazione delle aberrazioni cromosomiche (Obe et al., 1992). Tali lesioni vanno incontro a 3 possibili fati:

- *possono essere riparate correttamente* - in questo caso si ha un ripristino completo dell'integrità cromosomica senza conseguenze sull'attività cellulare (*restitution*);
- *possono rimanere non riparate (unrepaired)* - quando questo accade, si può riscontrare letalità cellulare sia durante l'interfase che durante la mitosi;
- *possono essere riparate non correttamente (misrepaired)* - l'errata riparazione dei DSB, pur rimanendo un meccanismo molecolare ancora

non completamente compreso, si presenta proprio come il meccanismo comunemente accettato per la genesi delle aberrazioni cromosomiche.

## 2.1 Meccanismi di riparo e induzione delle aberrazioni cromosomiche

Nelle cellule eucariotiche, i DSB vengono riparati mediante tre meccanismi fondamentali: il riparo per ricombinazione omologa (*homologous recombination repair*, HRR), la ricombinazione illegittima (*non homologous end joining*, NHEJ) e l'accoppiamento del singolo filamento (*single-strand annealing*, SSA) che si occupa dei DSB non riparati dagli altri due sistemi (Pfeiffer et al., 2000).



**Fig. 2.1** Meccanismi di riparo dei DSB.

I meccanismi HRR intervengono generalmente durante la fase S del ciclo cellulare e a condizione che l'elica complementare all'elica sulla quale è presente il danno, sia integra. Questa, infatti, viene utilizzata come stampo per ripristinare la sequenza originaria. Contrariamente al lievito, dove in presenza di DSB il meccanismo predominante è l'HRR (Friedl et al.,1998), nei mammiferi il meccanismo principale è il NHEJ.

L'NHEJ è il meccanismo predominante delle fasi  $G_0$  e  $G_1$ . E' un sistema aspecifico, quindi non è in grado di rilevare se le estremità che ricongiunge appartengano o meno allo stesso cromosoma. Se sono contemporaneamente presenti più cromosomi danneggiati, il sistema NHEJ può ricongiungere erroneamente estremità appartenenti a differenti cromosomi o a differenti regioni dello stesso cromosoma, generando aberrazioni. Il sistema opera mediante tre subsistemi che cooperano tra di loro: il fattore Ku, un eterodimero costituito dalle proteine Ku70 e Ku80 si lega alle estremità libere del DSB, proteggendole dalla degradazione e preparandole per il successivo allineamento. Ku è la componente d'attacco al DNA della proteina chinasi DNA dipendente (DNA-PK), ed una volta posizionata, recluta la componente catalitica. Infine il complesso XRCC4/DNA ligasi IV aderisce alle estremità e ne media il ricongiungimento (Haber, 2000).

## **2.2 Metodiche di studio delle aberrazioni cromosomiche**

L'analisi del cariotipo permette di evidenziare eventuali anomalie cromosomiche, sia numeriche che strutturali. Durante l'accrescimento cellulare il DNA si presenta come un ammasso disorganizzato non analizzabile: solo al momento della divisione, esso si condensa in strutture ordinate ed analizzabili, appunto i cromosomi. In particolare la metafase rappresenta il momento di maggior definizione delle strutture cromosomiche che appaiono facilmente visualizzabili al microscopio. Per tale ragione la metafase è la fase migliore del ciclo cellulare per la valutazione delle aberrazioni cromosomiche strutturali.

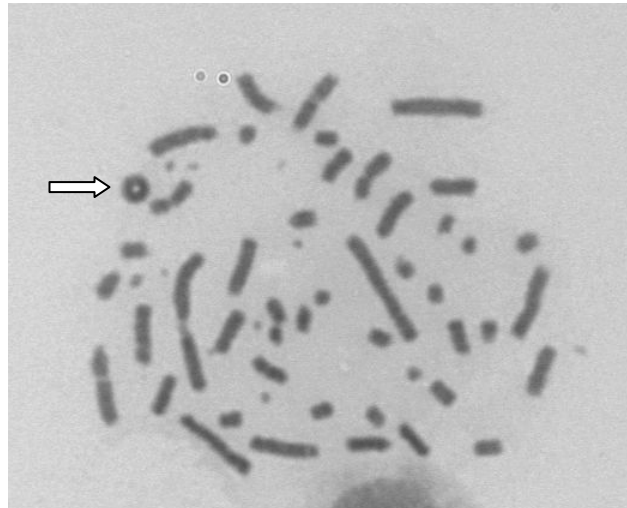
Per ottenere un'analisi statisticamente robusta della frequenza di aberrazioni cromosomiche in una popolazione cellulare che sia stata irraggiata, è indispensabile ottenere il massimo numero di cellule metafasiche possibile. Uno dei composti più usati per bloccare parte della popolazione cellulare che asincronamente si trova nelle varie fasi del ciclo, è il colcemide, anche conosciuto come democolcine. Il colcemide è un associato della colchicina, che agisce nella

depolimerizzazione dei microtubuli limitandone l'assemblaggio. In sostanza, aggiunto nel terreno di coltura, ad opportune concentrazioni e tempi, il colcemide impedisce alle cellule che già si trovano, o che stanno entrando nel tempo in cui agisce, in metafase di proseguire il ciclo cellulare.

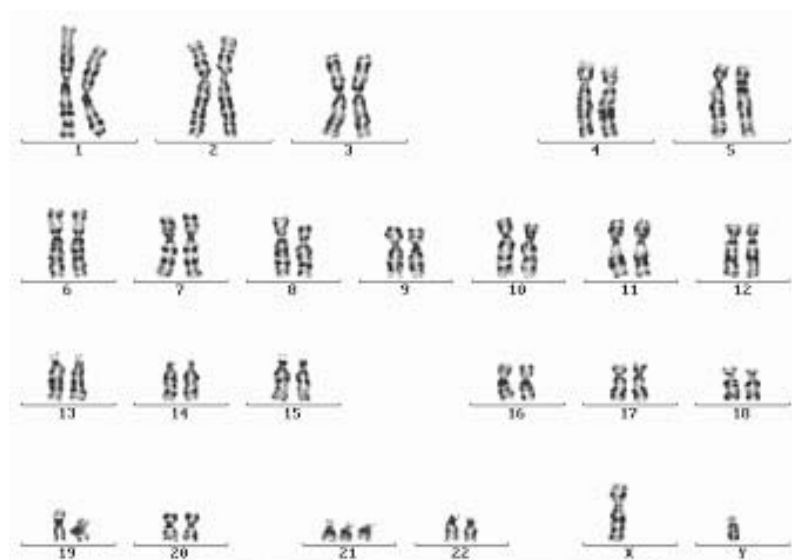
La limitazione del colcemide è che, dato che di fatto limita la crescita mitotica, solo le cellule che già sono in metafase, nel momento dell'aggiunta del composto, vengono bloccate in quella fase di interesse. Di solito infatti, ad ogni dato istante, solo una limitata frazione di cellule si trova in mitosi: per esempio, nei linfociti del sangue periferico stimolati *in vitro* e molto spesso usati in biosimetria, l'indice mitotico di rado supera il 5-10 %. Ciò comporta la necessità di lavorare con grandi numeri di cellule e di realizzare molti preparati citogenetici, il che è dispendioso in termini di tempo e costi (reagenti, sonde per ibridazione, etc). Un'altra limitazione insita nel metodo della raccolta di cromosomi metafasici (*metaphase harvest*) è che l'esposizione alla radiazione ionizzante induce un ritardo nel ciclo cellulare, che è dose e LET dipendente. L'analisi di un campione in queste condizioni si traduce verosimilmente in una sottostima del danno cromosomico effettivo in quanto durante il tempo d'azione del colcemide (tipicamente 2-4 h, a seconda dei protocolli sperimentali più diffusi) le cellule danneggiate dalla radiazione sono bloccate nei vari checkpoint del ciclo e quindi non raggiungono la mitosi. A tale scopo risulta molto utile l'impiego della calyculin A, un inibitore delle serine/treonine fosfatasi di tipo 1 e tipo 2, capace di indurre la defosforilazione dell'MPF (Mitosis Promoting Factor) convertendolo nella sua forma attiva. Tutto ciò promuove una condensazione prematura dei cromosomi (*premature chromosome condensation, PCC*) in qualsiasi fase del ciclo del ciclo cellulare (quando solitamente i livelli di MPF attivo sono molto bassi), ovviando al problema legato alla sottostima del danno.

Nel corso del tempo diverse sono state le metodiche sviluppate nell'analisi cariotipica. Una delle prime colorazioni impiegate fu la colorazione Giemsa, una miscela di blu di metilene ed eosina, specifico per i gruppi fosfato del DNA. La limitazione di questa tecnica è legata al ristretto numero di aberrazioni

visualizzabili, ossia quelli che presentano un'organizzazione strutturale sensibilmente alterata (dicentrici e ring) (fig. 2.2).



**Fig. 2.2** Cariotipo umano visualizzato mediante colorazione in Giemsa in cui è possibile individuare un'aberrazione cromosomica di tipo ring.



**Fig. 2.3** Cariotipo umano visualizzato mediante bandeggio G.

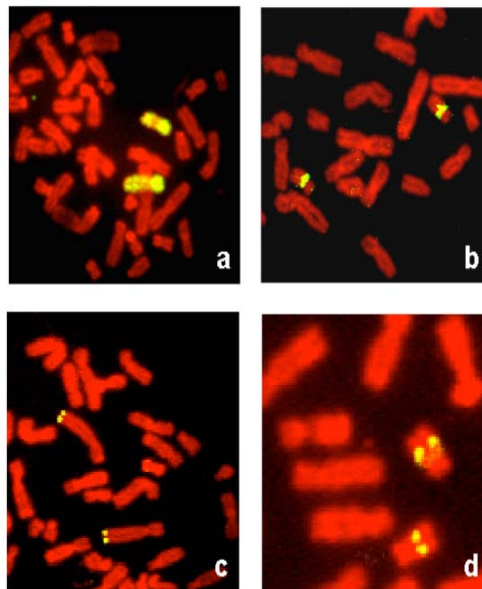
La colorazione Giemsa viene utilizzata anche per il Giemsa banding, comunemente chiamata bandeggio-G (fig. 2.3). Questa è una delle tecniche di bandeggio più usate, che evidenzia bande costanti colorate più o meno

intensamente lungo il cromosoma, e che lo contraddistinguono univocamente dagli altri cromosomi. Con la tecnica del bandeggio è possibile l'analisi di molti tipi diversi di aberrazioni, quali inversioni, traslocazioni, delezioni e duplicazioni, ma l'analisi delle bande è laboriosa e facilmente si incorre in errori.

In alcuni casi, le tecniche di citogenetica tradizionale, pur utilissime per individuare un gran numero di anomalie numeriche e strutturali dei cromosomi, non sono sufficienti e non consentono di rivelare alcune alterazioni perché non permettono di discriminare tra diversi cromosomi. La metodica maggiormente affermata nell'analisi delle aberrazioni cromosomiche in tempi recenti è stata l'ibridazione in situ con sonde di DNA marcate con coloranti fluorescenti (Fluorescent In Situ Hybridization, FISH). La possibilità di usare un vasto repertorio di sonde, permette di identificare traslocazioni, inversioni, delezioni o duplicazioni. Tale metodica ha incrementato enormemente il livello di risoluzione della citogenetica convenzionale: mentre le tecniche classiche si limitano all'identificazione di anomalie cromosomiche superiori a 4 Mb, la FISH invece consente di visualizzare anche anomalie che coinvolgono poche migliaia di paia di basi (riarrangiamenti submicroscopici o microdelezioni parziali). La FISH si basa sulla proprietà del DNA di denaturarsi in modo reversibile e di legarsi ad un frammento di DNA (sonda), marcato con composti fluorescenti, specifico per la regione di interesse. Le sonde possono essere di diversi tipi (fig. 2.4):

- *sonde cromosoma-specifiche* - sono sonde con omologia per un intero cromosoma. L'ibridazione con una sonda cromosoma-specifica permetterà di visualizzare segnali fluorescenti su una determinata coppia di cromosomi omologhi lungo tutto il cromosoma;
- *sonde centromero-specifiche* - sono sonde costituite da sequenze ripetute, dette alfoidi, presenti nei centromeri. Sono state isolate sequenze alfoidi specifiche per il centromero di ogni cromosoma. L'ibridazione con una sonda centromero-specifica permetterà di visualizzare segnali fluorescenti a livello dei centromeri di una coppia di cromosomi omologhi;

- *sonde telomero-specifiche* – sono sonde composte da sequenze classicamente localizzate nella parte terminale dei cromosomi, quindi specifiche per i telomeri di ogni cromosoma;
- *sonde locus-specifiche* – sono sonde indirizzate ad una regione delimitata lungo uno specifico cromosoma. L'ibridazione con una sonda locus-specifica permetterà di visualizzare segnali fluorescenti a livello di una regione sul braccio corto o sul braccio lungo di una coppia di cromosomi omologhi.



**Fig. 2.4.** Ibridazione in situ con diverse tipologie di sonde. **a)** Ibridazione in situ con una sonda specifica per il cromosoma 8: i segnali fluorescenti sono presenti lungo tutta l'estensione dei due cromosomi omologhi. **b)** Ibridazione in situ con una sonda specifica per le sequenze centromeriche del cromosoma X: i segnali fluorescenti identificano due cromosomi X. **c)** Ibridazione in situ con una sonda specifica per i telomeri del braccio lungo (q arm) del cromosoma 4: i segnali fluorescenti sono presenti sui telomeri del braccio lungo dei due cromosomi 4 omologhi. **d)** Ibridazione in situ con una sonda

L'intero cariotipo umano può essere visualizzato con la tecnica mFISH (multicolor FISH). Una combinazione di 5 fluorofori permette di dare un pattern caratteristico di ibridazione a ciascuna coppia di omologhi e ai cromosomi



sessuali. È una tecnica utile e il confronto con i risultati ottenuti con Giemsa o con WCP ha mostrato come è possibile sottostimare la frequenza di alcuni tipi di aberrazioni (scambi complessi) quando non si visualizza l'intero cariotipo (Durante *et al.*, 2002). Una variante dell'mFISH è la arm specific mFISH dove non solo l'intero cariotipo è ibridizzato ma sono contraddistinte anche le braccia cromosomiche.

Nella mBAND si utilizza come per l'mFISH una miscela di fluorofori differenti. In questo caso le sonde sono complementari ad un singolo cromosoma, che risulta suddiviso in regioni di fluorescenza. Un apposito programma elabora l'intensità dei diversi segnali luminosi e fornisce un cromosoma distinto in numerose bande.

L' mFISH è uno dei grandi successi della citogenetica molecolare degli ultimi dieci anni. L'innovazione dell'm-FISH è legata al fatto che essa permette la visualizzazione di tutti i cromosomi, ciascuno colorato con un colore diverso (analisi a 24 colori). Tutto ciò è possibile grazie ad un sistema di etichettatura combinatoriale basato sull'utilizzo di cinque fluorocromi spettralmente separabili. Ogni cromosoma è etichettato con un'unica combinazione di fluorocromi: cinque cromosomi sono etichettati con un singolo fluorocromo, dieci cromosomi con due fluorocromi e nove cromosomi con tre fluorocromi. L'alta efficienza dei moderni microscopi ad epifluorescenza, combinata a software in grado di calcolare gli algoritmi combinatori di etichettatura, permette la separazione e l'identificazione di tutti i cromosomi e rende l'm-FISH il *tool* perfetto per l'analisi di scambi cromosomici complessi (Macville *et al.*, 1997; Kearney, 2006).

### **2.3 Classi di aberrazioni cromosomiche**

Come inizialmente accennato, le aberrazioni cromosomiche radioindotte sono alterazioni della struttura dei cromosomi che interessano uno o più geni e che si producono per lo più come conseguenza di rotture ed errate ricomposizioni dei

cromosomi. Si possono così generare perdite di materiale genetico, duplicazioni, inversioni o trasferimenti di pezzi più o meno estesi di cromosoma. Conseguentemente, i geni possono venirsi a trovare in una posizione diversa da quella originale. Dato che la regolazione dell'attività di un gene dipende, in parte, anche dalla sua localizzazione nel genoma (effetto di posizione), le mutazioni cromosomiche hanno, generalmente, effetti estremamente drammatici.

Esistono due grandi categorie di riarrangiamenti strutturali: le *aberrazioni di tipo cromosomico* e quelle di *tipo cromatidico*. Le prime mostrano il medesimo danno in entrambi i cromatidi fratelli, nelle seconde soltanto uno dei cromatidi ha subito la rottura. Il verificarsi di un tipo anziché un altro dipende dalla fase del ciclo cellulare: in fase  $G_0$  o  $G_1$  il cromosoma è a singolo cromatidio, cosicché qualsiasi riarrangiamento avvenga in questo stadio viene duplicato durante la fase di sintesi del DNA dando luogo alle aberrazioni cromosomiche; se le rotture avvengono durante o dopo la fase di replicazione del DNA si osservano aberrazioni cromatidiche. Se il danno al DNA è avvenuto in una popolazione cellulare asincrona possono essere visualizzate entrambe le categorie.

E' inoltre importante sottolineare che le aberrazioni cromosomiche possono essere letali:

- *le aberrazioni possono condurre alla morte mitotica la cellula che le ospita durante la prima mitosi post-irraggiamento* - ciò può dipendere dal fatto che "meccanicamente" l'aberrazione strutturale è tale da impedire la corretta separazione della cellula in due nuclei, in tal caso la cellula muore durante il tentativo di dividersi alla prima mitosi post-irraggiamento;
- *le aberrazioni possono indurre morte cellulare durante divisioni cellulari che avvengono a distanza dall'irraggiamento* – questo può avvenire se le aberrazioni sono state trasmesse ad una o entrambe le cellule figlie. Tuttavia, se l'aberrazione strutturalmente non compromette la corretta divisione cellulare, potrebbe interessare geni che sono essenziali per la successiva proliferazione, e quindi potrebbero essere tardivamente letali.

- le aberrazioni possono condurre alla trasformazione oncogenica - questo è il caso più preoccupante per la salute umana e si verifica se ad essere interessati sono geni specifici per la regolazione della proliferazione.

Di seguito è stata stilata una descrizione di alcuni dei tipi più comuni di aberrazioni, classificate in base alla loro struttura e origine.

### 2.3.1 Le delezioni

Le delezioni sono perdite di segmenti cromosomici. Esse possono essere classificate in terminali e interstiziali.

Le *delezioni terminali* consistono nella perdita del segmento distale (acentrico) a un punto di rottura e può riguardare sia il braccio corto (p arm) che quello lungo (q arm).

Le *delezioni interstiziali* consistono nella perdita del segmento interposto tra due punti di rottura. Il segmento interno del o dei bracci cromosomici interessati viene perso, mentre il resto del cromosoma ristabilisce la sua continuità. In queste anomalie si ha la conservazione dei due telomeri e del centromero, per cui il cromosoma mutato può segregare ed essere trasmesso.

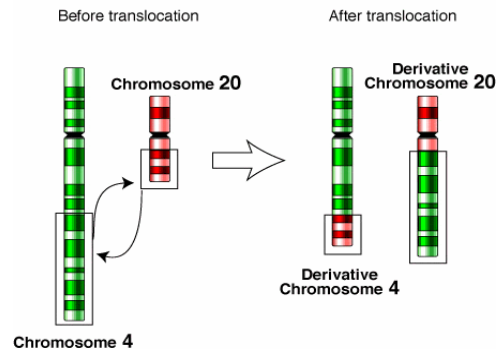
Le delezioni possono essere eventi letali o tumorigenici, in funzione dell'importanza e del ruolo delle regioni geniche presenti nel frammento perso.

### 2.3.2 Scambi semplici

Sono definiti *scambi semplici* le anomalie originate dall'interazione tra due rotture a doppio filamento del DNA. Negli scambi il processo può essere completo o incompleto a seconda che tutte le estremità libere vengano ricongiunte. In questa categoria rientrano gli intrascambi e gli interscambi.

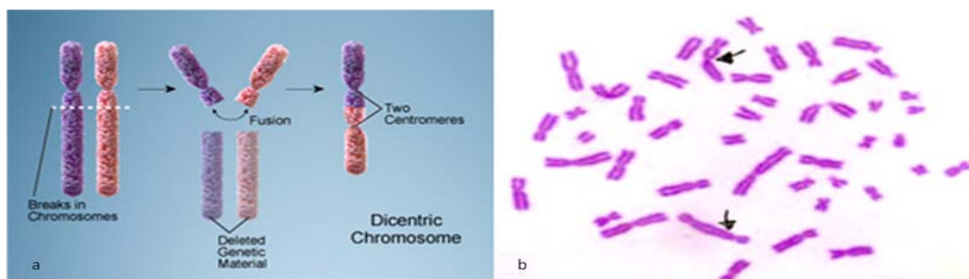
Gli *interscambi* si verificano quando le due rotture avvengono su due cromosomi diversi, omologhi o non, e possono essere simmetrici (traslocazioni) o asimmetrici (dicentrici).

Le *traslocazioni* sono aberrazioni simmetriche in cui i frammenti acentrici originati dalle due rotture sono trasferiti reciprocamente.



**Fig. 2.5** Meccanismo di induzione di una traslocazione reciproca completa tra cromosomi non omologhi.

La traslocazione reciproca (fig. 2.5) è un'aberrazione trasmissibile alla progenie cellulare dato che ciascun cromosoma conserva un centromero, indispensabile per la corretta separazione in anafase. La trasmissibilità di una aberrazione alla progenie è un fattore importante per determinare la carcinogenicità di un'anomalia cromosomica, infatti quando l'aberrazione ha una struttura tale da indurre blocco mitotico o morte cellulare, non rappresenta un rischio di induzione di danni tardivi come il cancro.










**Fig. 2.6 a)** meccanismo di formazione di un cromosoma dicentrico; **b)** cromosomi dicentrici (freccie) visualizzati con colorazione Giemsa.

Quando l'interscambio è asimmetrico, dà origine ad un cromosoma con due centromeri (cromosoma *dicentrico*) (fig. 2.6), e un frammento acentrico originato dai due frammenti acentrici generati dalle lesioni. Come per le delezioni terminali, anche in questo caso il frammento acentrico può essere perduto alla fine della mitosi. Le conseguenze legate alla presenza di un cromosoma dicentrico sono generalmente letali: la presenza di due centromeri all'interno di uno stesso cromosoma, crea conseguenze meccaniche letali durante la divisione cellulare tali da impedire la divisione cellulare (così come accennato sopra).












Le due rotture possono avvenire anche sullo stesso cromosoma, generando strutture diverse da quelle originarie: in questo caso si parla di *intrascambi*. Le due rotture possono avvenire sullo stesso braccio cromosomico (*intrascambi intra-braccia*) o sulle braccia opposte (*intrascambi inter-braccia*); inoltre, come per gli interscambi, anche per questa classe si individua la tipologia simmetrica (*inversioni peri- e paracentriche*) e quella asimmetrica (*ring* e *delezioni interstiziali*). Tale distinzione ha una sua rilevanza anche a livello della trasmissibilità della mutazione cromosomica: infatti, mentre gli intrascambi simmetrici creano modifiche strutturali che non influenzano in modo significativo la corretta segregazione cromatidica (per cui sono trasmissibili alle generazioni successive), gli intrascambi asimmetrici possono portare a struttura fortemente alterate (*ring*) che riducono la probabilità che la cellula porti a compimento la mitosi (per cui non sono generalmente trasmissibili).

Le categorie basilari appena discusse, sono di seguito brevemente rappresentate, sulla base della classificazione fatta da Savage (Savage 1999).

**Examples of 2-lesion *Chromosome-type* aberrations**

	<b>INTERCHANGE</b>	<b>INTER-ARM INTRACHANGE</b>	<b>INTRA-ARM INTRACHANGE</b>	<b>"BREAK" DISCONTINUITY</b>
<b>A</b>	 dicentric	 centric-ring	 interstitial deletion	
<b>S</b>	 reciprocal translocation	 pericentric inversion	 paracentric inversion	
<b>a</b>				

**Examples of 2-lesion *Chromatid-type* aberrations**

	<b>INTERCHANGE</b>	<b>INTER-ARM INTRACHANGE</b>		<b>INTRA-ARM INTRACHANGE</b>		<b>"BREAK" DISCONTINUITY</b>
<b>A</b>	 dicentric	 intra-chromatid (*centric ring)	 inter-chromatid (*dicentric)	 intra-chromatid interstitial deletion	 inter-chromatid isochromatid deletion	 some are incomplete intra-arm intrachanges
<b>S</b>	 reciprocal translocation	 pericentric inversion	 duplication/ deletion	 paracentric inversion	 (*duplication/ deletion)	
<b>b</b>						

**Fig. 2.7 a)** tipi di aberrazioni cromosomiche; **b)** tipi di aberrazioni cromatidiche.

2.3.4 Scambi complessi

Quando la radiazione coinvolge almeno due cromosomi e comporta almeno tre rotture, si parla di scambi complessi (Savage & Simpson, 1994), con un pattern di aberrazioni molto ampio e diversificato.

Un esempio di aberrazione appartenente a questa classe è la formazione di un cromosoma tricentrico, che si origina in relazione al coinvolgimento di tre cromosomi, di cui uno ha subito almeno due lesioni: questo genera un

frammento contenente il centromero, a livello delle lesioni (rotture) si legheranno i due frammenti provenienti dagli altri cromosomi.

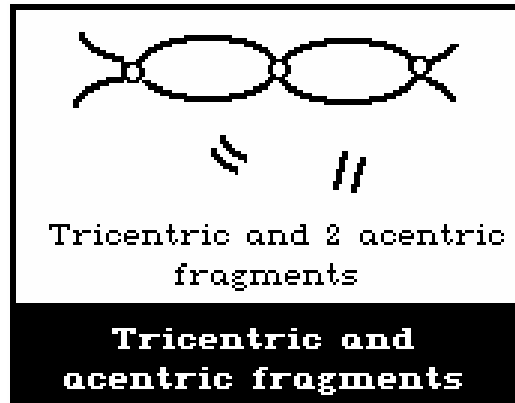


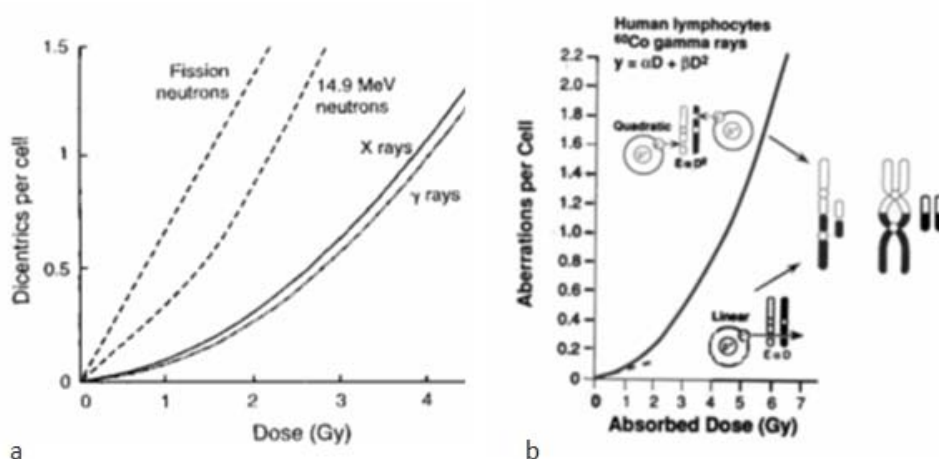
Fig. 2.8 Rappresentazione schematica di un cromosoma tricentrico.

## 2.4 Relazione tra la qualità delle radiazioni ionizzanti ed aberrazioni cromosomiche

Sperimentalmente, si osserva che la frequenza delle aberrazioni cromosomiche presenta un andamento lineare quadratico in funzione della dose di radiazioni a basso LET, secondo la relazione:

$$Y = Y_0 + \alpha D + \beta D^2 \quad (2.1)$$

dove  $Y$  è il numero medio di scambi per cellula,  $Y_0$  rappresenta un eventuale livello pre-esistente di aberrazioni cromosomiche,  $D$  è la dose e  $\alpha$  e  $\beta$  sono parametri noti legati alla qualità della radiazione e al rateo di dose.

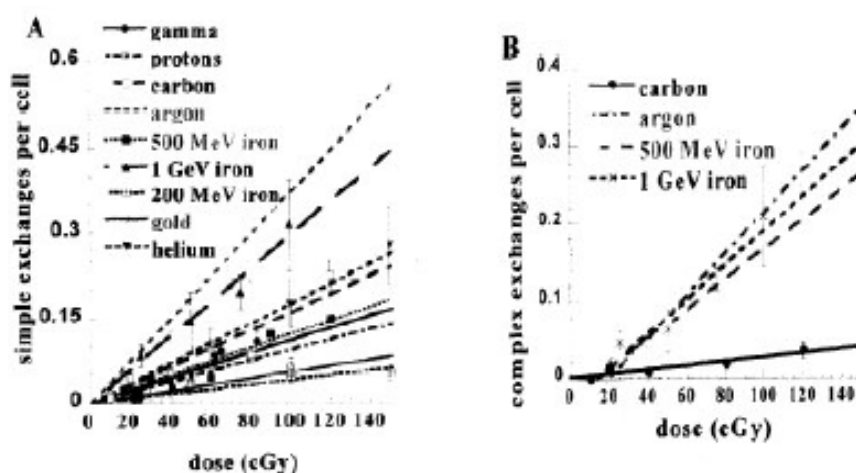


**Fig. 2.9** Rappresentazione grafica dell'andamento quadratico lineare di aberrazioni cromosomiche in relazione alla dose. **a)** curve dose-risposta per cromosomi dicentrici/cellula, ottenuto in linfociti irraggiati con radiazioni sparsamente (raggi X e  $\gamma$ ) e densamente ionizzanti (neutroni); **b)** il meccanismo di formazione delle aberrazioni da scambio prevede l'effetto intra-traccia a basse dosi ed inter-traccia ad alte dosi.

Tra le aberrazioni cromosomiche, quelle più rappresentative sono i dicentrici, in quanto hanno una scarsa incidenza spontanea e le sostanze in grado di provarli non sono numerose. Possiamo definire il dicentrico come l'aberrazione cromosomica elettiva per la dosimetria citogenetica delle radiazioni ionizzanti. In figura 2.9 sono rappresentate le curve dose-effetto per l'incidenza di dicentrici in relazione al tipo e alla dose della radiazione: la pendenza della curva è ripida per le radiazioni ad alto LET e più inclinata per quelle a basso LET. Ciò significa che le prime hanno una maggiore probabilità di provocare almeno due rotture nello stesso cromosoma e nello stesso tempo mediante un'unica traccia radiante (effetto intra-traccia), mentre con le seconde sono richieste due o più tracce radianti per ottenere lo stesso effetto (effetto inter-traccia). Generalmente, l'andamento quadratico lineare per radiazioni di basso LET (fig. 2.9 b) è dato dalla somma di questi due effetti: quando il danno è arrecato da una singola particella, la formazione di scambi è correlata linearmente alla dose, nel caso siano due tracce ad interagire, la correlazione è quadratica.



Quando si parla di radiazioni ad alto LET, lo scenario cambia e le curve dose-risposta assumono un andamento lineare. I risultati sperimentali concordano con queste considerazioni per tutti i tipi di aberrazioni: all'aumentare del LET della radiazione si ha un aumento di scambi semplici e complessi (George et al., 2003). In particolare, la proporzione di scambi complessi aumenta significativamente, riflettendo la maggiore densità di ionizzazioni lungo la traccia delle particelle.



**Fig. 2.10** Curve dose/risposta per scambi semplici (A) e scambi complessi (B) indotti in linfociti da vari tipi di ioni. **A)** gli ioni argon sono i più efficaci nell'indurre scambi semplici, seguiti dagli ioni ferro da 1 GeV/n, mentre i protoni, gli ioni oro e gli ioni ferro da 200 MeV/n sono meno efficaci dei raggi  $\gamma$ ; **B)** solo ioni argon e ioni ferro da 1 GeV/n e da 500 MeV/n inducono un livello significativo di scambi complessi.

## Capitolo 3

### La senescenza

I tipi cellulari di un organismo multicellulare possono essere divisi in due principali categorie: le cellule postmitotiche, che non possono dividersi, e le cellule mitotiche, che hanno invece capacità proliferativa. In animali complessi come i mammiferi, molti tessuti somatici contengono cellule mitotiche. Questo conferisce a tali tessuti caratteristiche importanti quali rinnovo, riparo e, talvolta, rigenerazione delle cellule che li compongono, ma comporta anche una maggiore suscettibilità a malattie iperproliferative come il cancro. Per far fronte a tale pericolo, le cellule hanno sviluppato diversi meccanismi di soppressione tumorale in grado di regolare la crescita incontrollata e la trasformazione maligna delle cellule. Alcuni di questi programmi di soppressione si basano sulla prevenzione dell'accumulo del danno al DNA o sull'ottimizzazione del riparo, altri invece si basano sul monitoraggio di cellule già mutanti o danneggiate che possono trasformarsi in tumorali. Uno di questi meccanismi è la senescenza, che si presenta come un processo cellulare in grado di indurre l'arresto della proliferazione in risposta a diversi stimoli quali accorciamento progressivo dei telomeri, danno al DNA, stimoli oncogenici, stress ossidativi, esposizione a radiazioni ionizzanti ecc., mantenendo al contempo la cellula metabolicamente attiva. Tale arresto irreversibile della crescita ha lo scopo di prevenire la trasmissione del danno alle cellule figlie.

Nonostante il ruolo della senescenza cellulare come meccanismo di soppressione tumorale sia stato riconosciuto solo recentemente (Campisi, 2001), la prima definizione arriva nei primi anni sessanta del '900, ad opera di Leonard Hayflick e colleghi, i quali dimostrarono che fibroblasti umani primari in coltura possono andare incontro solo ad un numero limitato di divisioni (circa 55) prima dell'arresto irreversibile della crescita cellulare. Tale limite replicativo fu poi

denominato “Limite di Hayflick” ed è stata la prima dimostrazione che le cellule vanno incontro a quella che viene definita “senescenza replicativa” (Hayflick & Moorhead, 1961), che oggi sappiamo essere direttamente collegata all'accorciamento telomerico (Serrano & Blasco, 2001; Gewirtz et al., 2008).

L'individuazione dei pathway di regolazione della senescenza cellulare rappresenta tuttora uno dei punti cruciali dello studio di questo meccanismo cellulare. Ad oggi, i più conosciuti sono quelli regolati da p53 e pRB, geni soppressori tumorali upregolati nelle cellule senescenti, che sembrano essere dei veri e propri controllori del traffico delle vie che regolano il ciclo cellulare. Oltre a p53 e pRB, molti sono i geni che subiscono un'alterazione della loro espressione e molteplici sono i cambiamenti funzionali e morfologici adottati dalle cellule senescenti, come si discuterà più nel dettaglio in seguito. Tra le funzioni emergenti di queste cellule, al fianco del ruolo positivo della senescenza cellulare come soppressore tumorale, recenti studi stanno sollevando l'attenzione, verso diversi aspetti negativi. Numerose evidenze, infatti, hanno mostrato che le cellule senescenti presentano un pattern secretorio potenzialmente deleterio sul microambiente della matrice extracellulare di diversi tessuti. L'acquisizione di quello che viene definito come Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP), come si descriverà più avanti, conferisce caratteristiche proinfiammatorie alle cellule senescenti che hanno potenzialmente la capacità di promuovere la crescita tumorale. Questo aspetto non è trascurabile in tessuti che presentano un'alta densità di cellule senescenti, il cui accumulo è direttamente legato all'invecchiamento cellulare e all'esposizione a diversi stimoli, incluso le radiazioni ionizzanti utilizzate in radioterapia (Coppè et al., 2010). Quest'ultima tipologia di senescenza viene generalmente indicata come Stress-Induced Premature Senescence (SIPS).

La SIPS sarà di particolare interesse per questa trattazione: infatti, la senescenza prematura potrebbe rappresentare un importante e, finora sottovalutato, effetto secondario dell'esposizione alla radiazione ionizzante. Questa caratteristica riguarda particolarmente le cellule tumorali sottoposte a

irraggiamento, che vanno incontro o a morte cellulare e apoptosi, o a senescenza; in entrambi i casi il tumore viene indotto ad un temporaneo o definitivo blocco della sua progressione. In tal caso, l'induzione della senescenza avrebbe delle ricadute positive e rappresenterebbe per le cellule un pathway di risposta alternativo alla morte riproduttiva a dosi letali. Recentemente, però, la senescenza indotta da radiazione suscita interesse anche per quanto concerne le cellule normali, soprattutto perché appare inducibile anche da dosi molto basse di radiazione, tipiche cioè di quelle radiazioni a cui viene esposto il tessuto sano in radioterapia. Infatti, durante il trattamento radioterapico, le cellule del tessuto sano, per quanto la radiazione sia localmente indirizzata sul tumore, ricevono comunque una piccolissima parte di dose della radiazione, che potrebbe risultare nell'ingresso e accumulo delle cellule in senescenza. Anche se gli studi sulla SIPS sono sostanzialmente studi *in vitro*, in prospettiva essi aprono questioni interessanti in vivo: con la scoperta che la senescenza può avere risvolti negativi sui tessuti circostanti, limitare o prevenire le condizioni che portino all'accumulo di queste cellule in vivo potrebbe divenire una questione di particolare interesse in radiobiologia.

### **3.1 Senescenza replicativa e telomeri**

Come sopra accennato, le cellule somatiche possiedono una capacità proliferativa limitata *in vitro*, con un limite superiore definito come Hayflick Limit: la durata di tale capacità riproduttiva appare regolato da una sorta di orologio interno della cellula in cui un ruolo fondamentale appare rivestito dai telomeri.

I telomeri sono complessi dinamici costituiti da DNA e proteine posti all'estremità dei cromosomi ed hanno lo scopo di proteggere le parti terminali del DNA conferendo stabilità cromosomica. Il DNA che compone i telomeri è costituito dalla ripetizione (circa 1000-2000 unità ripetitive) di una breve sequenza non codificante che nell'uomo è 5'-TTAGGG-3'. Il core proteico è

invece formato da una serie di proteine specificamente associate alle sequenze ripetute; tra queste TRF1, che regola la lunghezza del telomero, TRF2, che invece stabilizza le estremità cromosomiche impedendo un'eventuale fusione tra cromosomi, e molte altre proteine come TIN2, RAP1, TPP1, e POT-1, alcune delle quali con funzioni di riparo.

I telomeri si sono sviluppati come risposta ad un "malfunzionamento" della DNA polimerasi- $\alpha$  che agisce durante la replicazione. Infatti, la DNA polimerasi richiede un innesco per l'inizio della replicazione, rappresentato da un RNA primer costituito da 4-6 bp di RNA. Dopo che il DNA viene replicato, il primer viene degradato, ma la polimerasi non è in grado di riempire il gap, lasciando un tratto mancante all'estremità 5', con conseguente perdita di materiale genetico. Ne va da sé che, con l'avanzare della proliferazione cellulare, il numero di repliche effettuate aumenta di pari passo con la perdita di tratti di DNA, portando alla possibile morte della cellula. I telomeri impediscono che questa "erosione" arrivi al DNA.

Successivamente, il logoramento dei telomeri fu fermamente associato all'innesco della senescenza replicativa. Questa conclusione fu ricavata da studi effettuati su cellule che esprimevano ectopicamente la telomerasi, una trascrittasi inversa costituita da una subunità ad RNA nota come hTR (human telomerase transferase) e una subunità proteica catalitica hTERT (human telomerase reverse transcriptase), in grado di catalizzare la sintesi di filamenti singoli di unità ripetitive all'estremità del cromosoma utilizzando come stampo hTR. La trasfezione di hTERT consente a molte cellule di bypassare la barriera della senescenza, conferendo un potenziale proliferativo illimitato alle cellule. È stata così formulata l'ipotesi secondo cui le cellule somatiche, a differenza delle cellule germinali, mantengono la telomerasi inattiva e vanno incontro ad accorciamento dei telomeri, con conseguente cessazione della replicazione, seguita o da morte cellulare o da ingresso in senescenza (Gewirtz et al., 2008).

Differentemente dalla senescenza replicativa, dove la lunghezza dei telomeri è critica per l'induzione della senescenza, il ruolo dei telomeri nella SIPS sembra

essere meno importante: Michishita e Suzuki hanno infatti dimostrato, in tempi e con mezzi diversi, che la SIPS è indotta anche quando i telomeri non raggiungono la lunghezza critica necessaria (Michishita et al., 1998; Suzuki et al., 2001). È stato quindi ipotizzato che l'accorciamento dei telomeri più che causa della SIPS, potesse esserne una conseguenza e che il ruolo della telomerasi sia in realtà sovrastimato (Doumont et al., 2001).

### **3.2 Stress-Induced Premature Senescence (SIPS)**

La quantità di radiazione o dose utilizzata in un piano di trattamento radioterapico varia a seconda del tipo e dello stadio del tumore trattato. Per i casi curativi, la dose tipica per un tumore epiteliale solido varia da 60 a 80 Gy, mentre i tumori di linfoma sono trattati con 20-40 Gy; le dosi sono tipicamente amministrate in frazioni di circa 1,8-2 Gy a distanza di 24 h.

Le cellule tumorali sono circondate da cellule sane, le quali, durante l'irraggiamento del tumore, ricevono inevitabilmente una certa dose. La conseguenza all'esposizione a radiazioni ionizzanti può essere la senescenza prematura indotta da stress (SIPS), che si presenta come la risposta più comune di alcuni tipi di cellule quali i fibroblasti, comuni del tessuto connettivo, a dispetto dell'apoptosi (Lopez M, 2010). La SIPS, oltre a comparire nelle cellule normali, si presenta anche in cellule cancerose ed è, in generale, un meccanismo dose dipendente in cui, cioè, più è alta la dose, maggiori sono gli effetti indotti.

La SIPS è definibile come un Senescence-Like Growth Arrest (SLGA), consistente essenzialmente in un blocco della proliferazione avente le caratteristiche tipiche delle cellule in senescenza replicativa. L'unica differenza da quest'ultima sono i tempi in cui la SIPS compare: la senescenza replicativa è un processo regolato da un orologio fisiologico (i telomeri), mentre la SIPS non è un fenomeno programmato, ma indotto al momento della comparsa di un fattore di stress intrinseco o estrinseco (danno al DNA dovuto a radiazioni

ionizzanti o agenti citotossici e stress ossidativo generato da un'attivazione oncogenica) (Suzuki & Boothman, 2008).

La SIPS appare indotta dagli stessi pathway molecolari che inducono la senescenza regolativa. L'irraggiamento delle cellule normali, come già detto, può risolversi nella SIPS, ma anche nel recupero delle strutture funzionali che mantengono le cellule normali. In queste cellule, la risposta di p53 svanisce circa 6 ore dopo l'esposizione a radiazioni ionizzanti; nelle cellule che invece vanno incontro a SIPS, questa risposta viene osservata in modo continuato per almeno 10 giorni mentre p16 è indotto solo dopo cinque giorni post-irraggiamento (Suzuki et al., 2001). Ciò fa capire che, di fatto, il danno indotto dalle radiazioni ionizzanti persiste nelle cellule che vanno incontro a SIPS. Associata a tali danni è la formazione di foci (Ionizing Radiation-Induced Foci o IRIF) entro 30 minuti dall'irraggiamento. Una parte di questi foci scompare dopo un giorno, altri permangono costantemente, mentre altri scompaiono dopo circa cinque giorni post-irraggiamento. Tramite studi di immunorilevazione, la forma fosforilata di p53 a livello della ser15 è stata trovata associata agli IRIF, suggerendo che p53 è direttamente attivata dai danni indotti da radiazioni ionizzanti durante la SIPS (Suzuki et al., 2006). Ciò che inoltre appare molto rilevante per le possibili conseguenze in vivo è che anche dosi molto basse di radiazione (sub-lethal doses) sono capaci di innescare la risposta mediata da SIPS.

### 3.2.1 La senescenza cellulare come risposta allo stress

I segnali di attivazione della senescenza possono essere di varia natura e talvolta cumulativi: infatti, livelli combinati di stress intra o extracellulari possono determinare quanto velocemente le cellule vanno incontro a senescenza.

Il danno diretto del DNA può verificarsi in seguito ad esposizione a radiazioni ionizzanti o a trattamenti con agenti clastogeni e/o mutageni. In relazione al tipo di agente utilizzato, all'intensità di dosaggio e al tipo cellulare utilizzato, la

risposta cellulare a tali trattamenti può essere la morte cellulare, uno stato reversibile di arresto cellulare o la senescenza,.

Le radiazioni ionizzanti sono conosciute per l'induzione della SIPS, sia in cellule normali che cancerose, dopo esposizione sia ad alte che a basse dosi (Ben-Porath & Weinberg, 2005). Se è vero che l'induzione della senescenza in cellule tumorali rappresenterebbe un effetto positivo nell'ambito del trattamento anti-tumorale, un'importante implicazione è capire quale contributo gioca la senescenza come possibile mediatore della ricorrenza tumorale in seguito a radioterapia; inoltre, l'accumulo di cellule senescenti come risultato dell'induzione di SIPS in cellule del tessuto sano potrebbe rappresentare un ulteriore effetto deleterio, precorrendo fenomeni quali degenerazione tissutale e/o malfunzionamento di organi.

Le radiazioni ionizzanti inducono un danno anche in cellule che non sono direttamente irradiate. Questo fenomeno, che rimane controverso, è conosciuto come non-targeted bystander effect (NTE) e sembrerebbe essere dominante a basse dosi di radiazioni. L'NTE può gestire una serie di effetti quali danno al DNA, morte cellulare e proliferazione cellulare associata a trasformazione maligna. Così, sembra ragionevole chiedersi se sia possibile una correlazione tra SIPS, secretoma delle cellule senescenti e i mediatori candidati per l'effetto NTE (Sabin & Anderson, 2011).

### **3.3 Il fenotipo secretorio delle cellule senescenti**

Dato che la cellula senescente resta metabolicamente attiva e nel contempo cambia le sue esigenze fisiologiche, è logico pensare che il pattern proteico e secretorio cambi insieme a tali esigenze, secondo un andamento specifico per ciascun tipo cellulare. Le evidenze che le cellule senescenti possono avere degli effetti deleteri sull'ambiente tissutale hanno portato ad approfondire lo studio del fenotipo secretorio di queste cellule, che già nell'introduzione di questo capitolo è stato denominato come Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP).



Il SASP include una serie di famiglie di fattori solubili ed insolubili che possono avere vari effetti sulle cellule circostanti. Recenti studi effettuati da Coppé e colleghi hanno portato ad una caratterizzazione su larga scala della composizione del SASP (tabella 3.1) (Coppé et al., 2008). Da un primo screening dei componenti, i fattori del SASP possono essere suddivisi in: fattori solubili di segnalazione (interleuchine, chemochine, fattori di crescita), proteasi e componenti insolubili della matrice extracellulare (ECM) come la fibronectina.

Tra i fattori solubili, una delle citochine maggiormente rappresentate è l'interleuchina IL-6. IL-6 è una citochina pro-infiammatoria, di cui è possibile riscontrare un marcato incremento in seguito a stress oncogenico o a danno del DNA. Non a caso, infatti, la sua secrezione appare essere direttamente controllata da una DNA Damage Response (DDR) persistente (ATM e Chk2), indipendentemente dal pathway di p53. IL-6 interagisce con le cellule circostanti che esprimono il recettore IL-6R (gp80), il quale si può ritrovare sulla superficie di cellule epiteliali ed endoteliali.

Al fianco della secrezione di fattori solubili quali citochine e fattori di crescita, le cellule senescenti secernono numerose metalloproteasi, serin proteasi e regolatori dell'attivazione del plasminogeno. Le proteasi del SASP possono avere tre effetti principali: taglio delle proteine associate alla membrana con conseguente rilascio nell'ambiente extracellulare delle versioni solubili dei recettori presenti sulla membrana; clivaggio e degradazione di molecole segnale; degradazione o processamento dei componenti della matrice extracellulare. Tutto ciò può provocare l'inibizione di fattori di crescita autologhi, inducendo rallentamenti o blocchi dei processi riparativi dei tessuti.

SASP factors <sup>a</sup>	Secretory profile of senescent cells <sup>b</sup>	Changes in the SASP due to the loss of p53 and/or gain of oncogenic RAS
<b>Soluble factors</b>		
<b>Interleukins (IL)</b>		
IL-6	↑	↑
IL-7	↑	↑
IL-1a, -1b	↑	↑
IL-13	↑	↑
IL-15	↑	↑
<b>Chemokines (CXCL, CCL)</b>		
IL-8	↑	↑
GRO-a,-b,-g <sup>c</sup>	↑	↑
MCP-2	↑	↑
MCP-4	↑	×
MIP-1a	↑	↑
MIP-3a	↑	×
HCC-4	↑	×
Eotaxin	×	↑
Eotaxin-3	↑	↑
TECK	×	↑
ENA-78	×	↑
I-309	×	↑
I-TAC	×	↓
<b>Other inflammatory factors</b>		
GM-CSF	↑	↑
G-CSF	×	↑
IFN- $\gamma$	×	↑
BLC	×	↑
MIF	↑	↓
<b>Growth factors and regulators</b>		
Amphiregulin	↑	×
Epiregulin	↑	×
Heregulin	↑	×
EGF	↑ or ×	↑
bFGF	↑	↑
HGF	↑	×
KGF (FGF7)	↑	↑
VEGF	↑	×
Angiogenin	↑	×
SCF	↑	×
SDF-1	↑ or ×	↑
PlGF	↑	×
NGF	×	↓

(Continued)

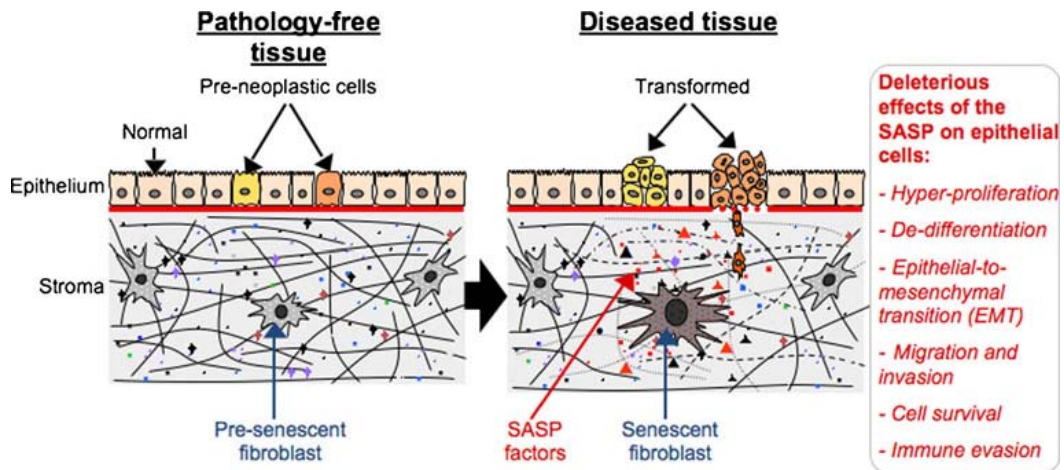
SASP factors <sup>a</sup>	Secretory profile of senescent cells <sup>b</sup>	Changes in the SASP due to the loss of p53 and/or gain of oncogenic RAS
IGFBP-2, -3, -4, -6, -7	↑	↑ or ×
<b>Proteases and regulators</b>		
MMP-1, -3, -10, -12, -13, -14	↑	↑ or ×
TIMP-1	↓ or ×	×
TIMP-2	↑	×
PAI-1, -2; tPA; uPA	↑	×
Cathepsin B	↑	×
<b>Soluble or shed receptors or ligands</b>		
ICAM-1, -3	↑	×
OPG	↑	↑
sTNFR1	↑	×
TRAIL-R3, Fas, sTNFR2	↑	×
Fas	↑	×
uPAR	↑	↑
SGP130	↑	↑
EGF-R	↑	×
<b>Nonprotein soluble factors</b>		
PGE2	↑	–
Nitric oxide	↑	–
Reactive oxygen species	Altered	–
<b>Insoluble factors (ECM)</b>		
Fibronectin	↑	–
Collagens	Altered	–
Laminin	Altered	–

**Tabella 3.1** Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP). Fattori significativamente alterati tra stadio presenescente e senescente.

### 3.4 Effetti del SASP ed effetto bystander

Gli effetti del SASP possono essere differenti (fig. 3.1 ) e sono naturalmente legati al contesto tissutale in cui si presenta la senescenza.

Nel capitolo 1 si è parlato dell'effetto bystander e delle possibili implicazioni sulle cellule circostanti (cellule bystander). Alla luce della caratterizzazione del SASP, l'effetto bystander acquisisce un significato che va oltre l'effetto a breve termine (immediatamente post-radiazione), prolungandosi ai tempi di raggiungimento della senescenza.



**Fig. 3.1.** Fibroblasti senescenti possono produrre diversi effetti sulle cellule epiteliali.

### 3.4.1 Effetti sulla proliferazione cellulare

Uno degli effetti della SASP è quello pro-tumorale. I fattori secreti dalle cellule senescenti sono in grado di promuovere lo sviluppo di tumore in vivo e di fenotipi maligni, quali proliferazione e invasività in modelli di coltura cellulare. Questi effetti sono stati osservati con un certo numero di tipi cellulari, comprese le cellule derivate da seno, pelle, prostata, pancreas e mucosa orofaringea.

I fibroblasti sono tra le cellule più abbondanti del tessuto connettivo che avvolge gli organi, quindi non stupisce che essi vengano spesso scelti come modello per la sperimentazione degli effetti che eserciterebbero sulle cellule vicine qualora venissero irraggiati (ossia in vivo). Proprio su fibroblasti, in particolare WI-38, Krtolica e colleghi hanno dimostrato che la senescenza di questi ultimi può indurre proliferazione di cellule epiteliali neoplastiche e preneoplastiche. Questo gruppo ha messo in evidenza che circa il 10% della stimolazione proliferativa causata da fibroblasti senescenti è dovuta a fattori secreti solubili, mentre circa il 40% è attribuibile a componenti della matrice extracellulare secreti da queste cellule. Così, almeno il 50% della stimolazione risulta essere a carico del fenotipo senescente dei fibroblasti. In più, i fibroblasti senescenti hanno un impatto sulla crescita di cellule epiteliali normali (anche se

molto basso) e soprattutto sulla distruzione dell'architettura e la funzione dei tessuti circostanti. Tutto ciò contribuisce alla formazione di un microambiente favorevole per lo sviluppo delle cellule tumorali (Krtolica et al., 2001).

Nel caso di cellule epiteliali mammarie, fibroblasti umani senescenti possono stimolare la crescita di cellule epiteliali pre-maligne e maligne. Tsai e colleghi hanno dimostrato che l'accumulo di fibroblasti senescenti, derivanti dal trattamento con radiazioni ionizzanti, può perturbare il microambiente del tessuto circostante. Durante lo sviluppo della ghiandola mammaria, i fibroblasti del tessuto connettivo che circondano le ghiandole, partecipano attivamente a tale processo. Il modello di co-coltura tridimensionale, su cui questo gruppo ha lavorato, rifletteva l'architettura del tessuto mammario, permettendo di seguire passo dopo passo il processo di morfogenesi mammaria *in vitro*. In condizioni normali i fibroblasti formavano reti di pseudopodi con l'evidente scopo di formare una piattaforma guida alle cellule epiteliali mammarie, nella ramificazione dei componenti duttali della ghiandola mammaria. Quando tali fibroblasti venivano disturbati da radiazioni ionizzanti, venivano indotti a senescenza. Tale fenotipo era seguito da modifiche sostanziali del citoscheletro e perdita del profilo guida inizialmente assunto da queste cellule. La conseguenza era un'inappropriata crescita della ghiandola mammaria. Inoltre, le MMPs secrete dai fibroblasti senescenti dimostravano di essere responsabili dell'elevata tumorigenicità delle cellule epiteliali della mammella (Tsai et al., 2005).

#### 3.4.2 Effetti sulla migrazione e invasione cellulare

Le cellule senescenti over-secernono una serie di chemochine che possono creare un gradiente in grado di promuovere la migrazione e l'invasione cellulare.

Nel cancro al seno, alti livelli di IL-6 e -8, secrete dai fibroblasti senescenti, sono responsabili dell'aumento di invasività di cellule cancerose provenienti da colture cellulari. Inoltre, la secrezione di MMP-2 e 3 da cellule senescenti può anche promuovere l'invasione di molteplici tipi di cellule epiteliali. Così le cellule

senescenti, tramite SASP, possono indurre l'invasione di una serie di tipi cellulari che sono comuni durante l'acquisizione di un fenotipo aggressivo nei tumori (Coppé et al., 2008).

### 3.4.3 Effetti sulla differenziazione cellulare

I fibroblasti senescenti umani e murini sono in grado di interrompere la differenziazione di cellule epiteliali mammarie e inibire la espressione di marcatori di differenziazione, compromettendo le funzioni mammarie. Quando fibroblasti senescenti vengono co-iniettati con cellule precancerose SCP2 in topo, a livello di cellule epiteliali mammarie, si assiste ad una perdita di differenziazione epiteliale, seguita da acquisizione di invasività e piena trasformazione maligna. Questi effetti non sono dovuti all'elevata espressione di MMP-2 o MMP-3, poiché inibitori di MMP non impediscono l'inibizione della morfogenesi alveolare o lattogenesi, ma sembrano dovuti ad un complesso di interazioni stromale-epiteliali, che coinvolgono sia fattori solubili che insolubili (Parrinello et al., 2005).

## 3.5 Pathway molecolari della senescenza

Anche se diversi stimoli possono indurre la senescenza, essi appaiono convergere su uno o entrambi i pathway che instaurano e mantengono attivo l'arresto della crescita cellulare. Questi pathway sono governati da due soppressori tumorali, p53 e pRB. Entrambe le proteine sono dei regolatori trascrizionali che hanno il compito di gestire una pletora di effettori, a monte e a valle, dei rispettivi pathway di attivazione della senescenza.

p53 è una proteina soppressore tumorale fondamentale nella regolazione del ciclo cellulare ed ha un ruolo cruciale nella mediazione della risposta al danno al DNA (DNA damage response: DDR), a stress ossidativo, a stress oncogenico (iperattivazione di RAS) e a disfunzioni telomeriche. La senescenza replicativa

risultante dall'erosione telomerica è infatti associata strettamente con la fosforilazione di p53. Questi siti di fosforilazione si presentano anche nella risposta al danno indotto da radiazioni ionizzanti ma, a differenza del caso appena descritto, essi non sono determinanti per l'avvio della DDR.

L'attivazione di p53, nel contesto della senescenza, sembra essere controllata da due grandi arterie regolative: una è il pathway DDR mediato da ATM/ATR, l'altra si basa sull'attività delle proteine Chk1/Chk2 (regolate dall'attività ATM/ATR) che invece agiscono sulla stabilizzazione post-traduzionale di p53.

Una volta attiva, p53 guida l'upregolazione della proteina p21 una proteina in grado di inibire una serie di chinasi ciclina dipendenti tra cui CDK2, inducendo l'arresto del ciclo cellulare nella fase G<sub>1</sub>; in più p21 è in grado di attivare pRb tramite l'inibizione della ciclina E/CDK2 interferendo con l'attivazione dei geni necessari alla transizione G<sub>1</sub>→S (Bartek et al., 2001). Questa evidenza suggerisce che i pathway di p53 e pRB sono dipendenti tra loro e non completamente separabili l'uno dall'altro.

Oltre al blocco dei geni responsabili della progressione del ciclo cellulare, pRb potrebbe essere implicato nell'attivazione dei geni necessari per il sostenimento della senescenza. E' interessante inoltre che tali geni, upregolati nelle cellule senescenti, si trovino fisicamente in cluster, suggerendo che la loro upregolazione sia facilmente inducibile tramite riorganizzazioni cromatiniche atte a stabilire una struttura eucromatinica in quelle zone.

Ciò in cui la SIPS differisce dalla senescenza replicativa è la dipendenza dalla famiglia di soppressori tumorali P16INK4. In particolare, p16<sup>INK4a</sup>, trascritto alternativo del locus INK4a, è implicato nell'attivazione di pRb; esso si presenta come un inibitore della ciclina D/Cdk4,6 ed è presente in tutti i tessuti normali. Tuttavia, esso è altamente espresso nelle cellule senescenti in relazione a situazioni di stress.

Recenti studi hanno messo in evidenza la possibilità che anche i miRNAs siano in grado di orchestrare il programma della senescenza. E' stato infatti dimostrato che membri della famiglia miR-34, in particolare mir-34a-c, sono direttamente

attivati da p53. Una volta trascritti, questi miR-34 sono in grado di silenziare i geni implicati nella proliferazione cellulare, guidando così l'ingresso in senescenza (He et al., 2007).

Molto interessante è il ruolo emergente che i miRNAs stanno assumendo nel campo della senescenza prematura indotta da radiazioni ionizzanti. Wang e colleghi hanno infatti identificato in fibroblasti normali umani otto SA-miRNAs (Senescence Associated miRNA), quattro dei quali up-regolati (miR-152, -410, -431 e -439) e quattro down-regolati (miR-155, -20a, -25 e -15a). Tali SA-miRNAs sono espressi sia in cellule in senescenza prematura (indotta da radiazioni ionizzanti) che in cellule in senescenza replicativa. Studi effettuati sulle modalità espressive dei SA-miRNAs down-regolati hanno indicato che miR-155, -20a, -25, and -15a sono specificamente associati al fenotipo senescente. (Wang et al., 2011).

### **3.6 Riconoscere le cellule senescenti**

I marker di senescenza cellulare sono stati identificati nel tempo grazie ad una serie di esperimenti effettuati *in vitro*, utilizzando cellule provenienti da tessuti di mammifero. Quando le cellule raggiungono il loro limite proliferativo, esse assumono una serie di caratteristiche senescenza-associate che talvolta si presentano specifiche per ciascun tipo cellulare.

Il fenotipo prominente che accumuna tutte le cellule senescenti e che le distingue dalle cellule quiescenti o da quelle differenziate, è l'arresto permanente e irreversibile della crescita cellulare, associato a resistenza ad apoptosi e ad un incremento della sensibilità nei confronti di lesioni cellulari.

I fattori di stress inducono la cellula a riconoscere un danno persistente al DNA che risulta nel richiamo di segnali di DDR, i quali vengono emanati da foci nucleari stabili e citologicamente rilevabili indicati anche come DNA-SCARs (DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence) o SDFs (senescence-associated DNA damage foci) (Campisi 2011). I danni generati sul



DNA possono presentarsi sia come un double-strand break (DSB), sia come single-strand break (SSB). Il caso dei DSB risulta particolarmente interessante. Il danno al DNA può essere riconosciuto in un punto qualsiasi del DNA o a livello delle estremità telomeriche, il cui accorciamento critico viene riconosciuto come DSB. Una delle conseguenze del riconoscimento di DSB è la fosforilazione, ad opera della proteina ATM, a livello della Ser-139, dell'istone H2AX, che viene indicato come  $\gamma$ -H2AX. Il significato di questa fosforilazione sembra essere correlato al richiamo e all'assemblaggio dei foci, il cui ruolo è quello di gestire il riparo del DSB (Gewirtz et al., 2008), sia a livello telomerico che non telomerico (Zglinicki et al., 2005). Dato che nelle cellule senescenti il DDR è stabile e persistente, e dato che i foci ne sono una diretta conseguenza, si può assumere che il rilevamento di  $\gamma$ -H2AX sia un buon marker di riconoscimento della senescenza cellulare.

La variazione delle funzioni metaboliche di una cellula è in qualche modo legata anche ad una riorganizzazione delle strutture cellulari e, conseguentemente, della morfologia della cellula che assume generalmente una forma allargata ed appiattita, con l'incremento di un citoplasma ricco di granuli e vacuoli.

Il cambiamento espressivo dei pattern genetici rappresenta un'altra importante caratteristica delle cellule senescenti, che tendono generalmente ad un'iperpressione di proteine come p53, p16, p19 e p21, che non a caso sono i protagonisti principali dei pathway attivi durante la senescenza; ragion per cui i livelli di espressione di queste proteine risultano essere indicativi dello stato di senescenza cellulare. Inoltre, diversi fattori, proteici e non, vengono prodotti e secreti dalla cellula formando un "secretoma" nuovo e specifico per ciascun tipo cellulare che entra in senescenza. Questo fenotipo secretorio contiene una serie di fattori che, presi collettivamente, si presentano come nuovi marker di identificazione delle cellule senescenti.

Oltre ad essere correlato con le nuove esigenze metaboliche della cellula senescente, il cambiamento del profilo di espressione genico è in relazione anche

ad una riorganizzazione cromatinica. Tali riarrangiamenti vengono definiti con il termine Senescence-Associated Heterochromatic Foci (SAHFs), e sono responsabili dell'eterocromatizzazione di zone geniche (molto spesso implicate nella progressione del ciclo cellulare), che vanno inevitabilmente incontro a silenziamento. Data l'intricata rete di vie interessate nella senescenza cellulare, ancora poco si sa sugli effettori implicati sulla riorganizzazione cromatinica, anche se recentemente è stato identificato il soppressore tumorale p16<sup>INK4a</sup> come possibile organizzatore per la formazione dei SAHFs (Narita 2007).

Il più frequente e semplice marker per il riconoscimento delle cellule senescenti rimane comunque il rilevamento della  $\beta$ -galattosidasi.

### 3.6.1 Senescence-associated $\beta$ -galattosidasi

La  $\beta$ -galattosidasi, anche indicata come beta-gal o  $\beta$ -gal, è un enzima idrolasi che catalizza l'idrolisi del  $\beta$ -galattosio. Le cellule senescenti hanno la capacità di esprimere una  $\beta$ -galattosidasi facilmente rilevabile a pH 6.0 e definita come SA- $\beta$ gal (senescence-associated  $\beta$ -galattosidasi). L'attività di questo enzima è diversa dall'attività della  $\beta$ -galattosidasi acida che è rilevabile solo a pH 4.0. La particolarità della SA- $\beta$ gal è che essa è associata alle cellule senescenti e non è possibile trovarne traccia in cellule quiescenti o in stato terminale di differenziamento. Di contro, essa sembra non essere espressa in tutte le specie di mammifero: infatti, mentre è ben espressa nell'uomo e nel ratto, sembra non esserlo in almeno due specie di topo. Inoltre la SA- $\beta$ gal è particolarmente rilevabile in alcuni tipi cellulari ma non in altri, per i quali è necessario l'utilizzo di altri marker di riconoscimento. In questo quadro, quindi, la SA- $\beta$ gal non si presenta come marker universale per il rilevamento della senescenza (Dimri et al., 1995). Tuttavia, il tipo cellulare studiato in questo lavoro di tesi, ossia cellule endoteliali ombelicali embrionali umane (HUVEC), si è dimostrato un ottimo modello per la rilevazione dell'espressione  $\beta$ -galattosidasica.

Una questione cruciale da risolvere nel tempo è stata quella di capire l'origine e/o la funzione della SA- $\beta$ gal. Nel 1995 Dimri e colleghi avevano proposto che l'espressione specifica della  $\beta$ -gal a pH diversi fosse dovuta alla sintesi di due isoforme di  $\beta$ -gal, una delle quali era la SA- $\beta$ gal. Successivamente fu dimostrato che la SA- $\beta$ gal è il risultato di un'overespressione ed accumulo della  $\beta$ -gal lisosomale endogena ad opera del gene GLB1 (Kurz et al., 2000; Lee et al., 2006).

Il rilevamento della SA- $\beta$ gal è molto semplice e si basa sull'utilizzo del substrato cromogenico 5-bromo-4-cloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galactopiranoside anche detto X-gal. L'X-gal viene scisso dalla  $\beta$ -galattosidasi producendo galattosio e 5-bromo-4-cloro-3-idrossindolo. Quest'ultimo è quindi ossidato in 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indaco, un composto blu insolubile facilmente osservabile al microscopio ottico (fig.5.12).

### **3.7 SIPS e radioterapia**

Da quanto detto finora, si può dedurre che la SIPS può avere un impatto clinico (positivo o negativo) sugli effetti indotti dalla radioterapia.

Il beneficio della radioterapia è la possibilità di trattare il tumore in modo non invasivo e di limitare l'utilizzo di trattamenti chemioterapici. Per fare il miglior uso di questi benefici, sarà necessario in futuro cercare di marginare il più possibile gli effetti secondari associati. In questa prospettiva, bisogna comunque ricordare che la SIPS presenta le due facce di una stessa medaglia: da un lato può creare gli effetti negativi già citati, ma dall'altro ha un ruolo importante anche nell'indurre il blocco proliferativo delle cellule tumorali irraggiate (fig. 3.2).

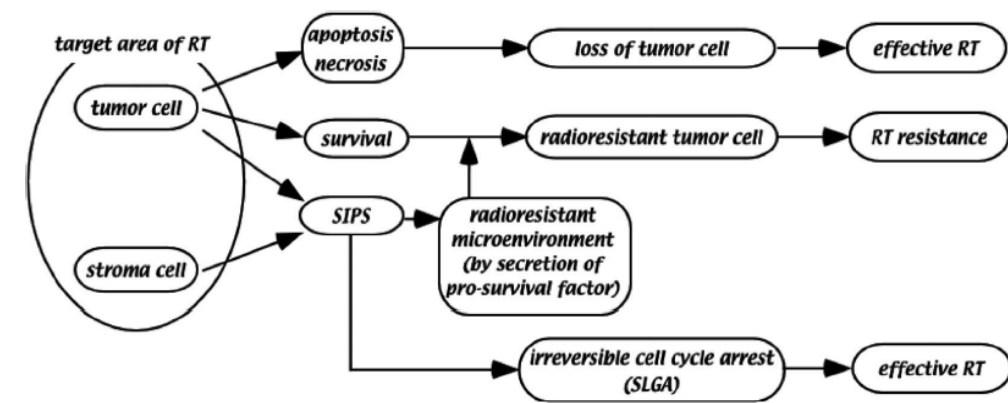


Fig. 3.2. I possibili ruoli della SIPS in radioterapia.

# Capitolo 4

## Materiali e metodi

### 4.1 Progetto d'esperimento

Questo lavoro di tesi si pone l'obiettivo di investigare gli effetti biologici acuti e tardivi delle radiazioni ionizzanti ad alto e basso LET su cellule normali. A questo scopo, il percorso sperimentale seguito è stato articolato al fine di valutare:

- sopravvivenza cellulare
- aberrazioni cromosomiche
- senescenza prematura
- effetto bystander

Ogni effetto è stato studiato su linee cellulari specifiche, illustrate di seguito e scelte in base a caratteristiche da esse possedute rispetto all'effetto radiobiologico in questione che esse possono avere.

### 4.2 Sistemi biologici

Nell'introduzione è stato detto che questa tesi si è sviluppata nell'ambito del progetto di ricerca, finanziato dall'Istituto Nazionale di Fisica Nucleare (INFN), MIMO-BRAGG in cui sono state scelte tre linee cellulari umane normali: le AG1522 (fibroblasti), le HUVEC (cellule endoteliali) e le epiteliali di mammella MCF10A. In particolare i sistemi biologici qui impiegati sono stati il sistema HUVEC e il sistema MCF10A, affiancati dalla linea cellulare tumorale MCF7.

Tutte le colture sono state mantenute in condizioni standard a 37°C con concentrazione di CO<sub>2</sub> al 5%. La crescita di ciascuna linea cellulare è stata caratterizzata mediante curve di crescita mostrate nel capitolo 5.

#### 4.2.1 HUVEC

Le HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) sono cellule diploidi derivate dall'endotelio delle vene del cordone ombelicale. Esse costituiscono un sistema molto utilizzato *in vitro*, in quanto rappresentano un ottimo modello per lo studio della funzione e delle patologie associate al tessuto endoteliale. Inoltre, esse mostrano un pattern altamente riproducibile, in condizioni standard di crescita e mantenimento, per lo studio della senescenza cellulare.

Le cellule endoteliali compongono l'endotelio, la sottile lamina cellulare che riveste la superficie interna dei vasi sanguigni e linfatici. Sono cellule estremamente appiattite che appaiono, però, più spesse nella parte centrale dove risiede il nucleo. Gli aspetti peculiari della loro morfologia riguardano le interdigitazioni con cui si uniscono alle cellule adiacenti.

Oltre al preponderante ruolo di rivestimento vasale, le cellule endoteliali svolgono un gran numero di funzioni che si spingono fino al diretto controllo di fenomeni importanti quali l'aggregazione piastrinica (produzione del fattore di *von Willebrand*), la diapedesi leucocitaria, l'adesione specifica di particolari popolazioni di elementi figurati del sangue alle pareti basali, la sintesi di alcune macromolecole proprie della matrice connettivale e, non ultimo, il controllo selettivo del passaggio delle molecole e delle cellule del sangue ai circostanti parenchimi (Angelini et al., 2007).

Le HUVEC vengono crioconservate alla fine della coltura primaria e possono essere coltivate e propagate almeno per 16 population doublings (per la ricetta del terreno di crescita si rimanda all'appendice A). Inoltre, come accennato, questa linea cellulare presenta un insorgenza di senescenza fisiologica altamente

riproducibile *in vitro*, il che fa sì che essa si presti molto bene allo studio e dell'induzione della senescenza prematura radioindotta.

Da quanto detto si capisce che lo studio degli effetti delle radiazioni su tale sistema biologico è di grande interesse in radiobiologia ed, in particolare, per questa trattazione: le radiazioni usate in radioterapia, pur essendo amministrate in modo da creare in minor danno possibile al tessuto sano, vanno comunque a rilasciare una parte della loro energia sul tessuto sano circostante il tumore, in cui, nella maggior parte delle volte, sono presenti vasi sanguigni (e quindi l'endotelio). Il danno diretto e a lungo termine (senescenza) così creato, altera la struttura e la funzione della microvascolatura inducendo disfunzioni caratterizzate da uno stato infiammatorio permanente: questo sembra il fattore chiave che contribuisce alla comparsa di atrofia parenchimale, fibrosi e necrosi nei tessuti normali in seguito a radioterapia (Quarmby et al., 1999; Prabhakarpandian et al., 2001).

In questo lavoro di tesi le HUVEC irraggiate sono state utilizzate per la costruzione di curve di sopravvivenza clonogenica, saggio di senescenza ed effetto bystander.

#### 4.2.2 MCF10A ed MCF7

I sistemi MCF10A ed MCF7 sono linee cellulari epiteliali di mammella.

La mammella è la struttura che contiene la ghiandola mammaria, deputata alla produzione del latte. Da un punto di vista anatomico, la mammella è costituita da 15-18 lobi, ognuno dei quali contiene più lobuli e un dotto galattoforo principale, che si apre nel capezzolo e permette il passaggio del latte dai lobuli al capezzolo. I lobuli sono circondati da tessuto adiposo, che conferisce alla mammella la sua consistenza. Ogni dotto principale si suddivide in dotti di calibro progressivamente inferiore; tutte queste strutture sono rivestite, al loro interno, da un sottile strato di cellule epiteliali. Le cellule epiteliali, il tessuto

connettivo e quello adiposo agiscono in stretto sinergismo tra loro e sono sottoposti agli stessi stimoli ormonali.

Il tumore mammario si presenta come uno dei tumori in maggiore diffusione degli ultimi anni, ragion per cui risulta utile comprendere quali possano essere gli effetti della radioterapia sulle cellule epiteliali sane circostanti al tumore.

Le cellule MCF10A sono una linea cellulare epiteliale mammaria immortalizzata ma non cancerosa, che non mostra segni di differenziamento terminale o senescenza. Esse sono cellule diploidi, presentano le caratteristiche tipiche delle cellule duttali luminali ed esprimono gli antigeni specifici del seno (Soule & McGrath, 1991). La linea è sensibile all'insulina, glucocorticoidi, enterotossina colera e al fattore di crescita epidermico EGF, e necessita di due tipologie di terreno per il suo mantenimento, ossia il *growth medium* e il *resuspension medium* (la ricetta per entrambi i terreni di coltura è disponibile in appendice A).

Le MCF-7 sono, invece, una linea tumorale epiteliale, largamente usata per studi radiobiologici *in vitro*, derivata da adenocarcinoma mammario. Queste cellule mantengono caratteristiche tipiche dell'epitelio mammario differenziato, quali la capacità di elaborare estradiolo con recettori per gli estrogeni citoplasmatici; inoltre anche se facili da propagare, le cellule sono in genere a crescita lenta. Geneticamente, la linea ha subito delle modifiche del numero di cromosomi nel corso del tempo presentando ad oggi un cariotipo contenente 69 cromosomi.

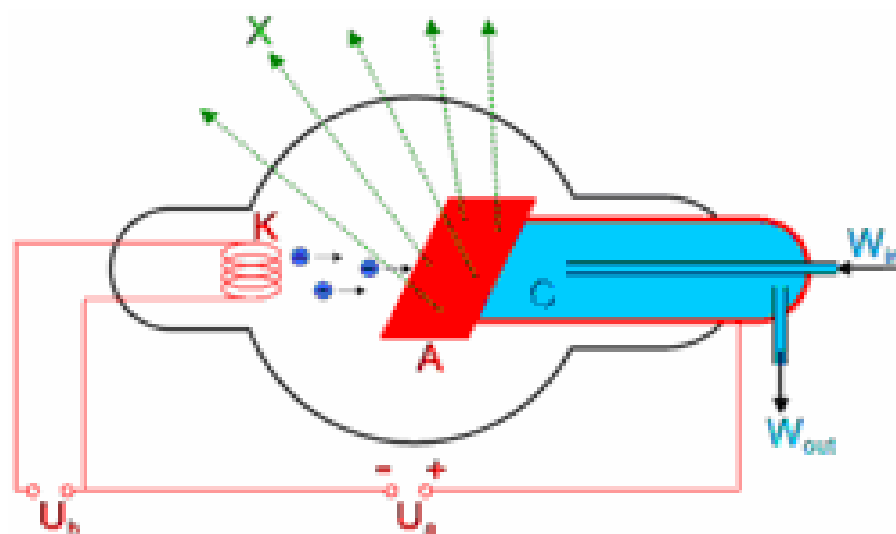
In questo lavoro sperimentale, le MCF10A irraggiate sono state utilizzate per l'analisi del cariotipo mediante mFISH, mentre MCF7 ed MCF10A non irraggiate sono state usate per l'analisi dell'effetto bystander mediante l'approccio del cosiddetto medium-transfer.



### **4.3 Apparatì strumentali e modalità per l'irraggiamento**

Per investigare gli effetti biologici causati da radiazioni di diverso LET sono stati utilizzati diversi sistemi di esposizione: per i fotoni un tubo a raggi X da 250 kV; per protoni, ioni carbonio e ossigeno, un acceleratore di particelle Tandem TTT3 da 3 MV (entrambi situati presso il Dipartimento di Scienze Fisiche di Napoli); alcuni risultati sono stati ottenuti usando un altro acceleratore, il ciclotrone dei Laboratori Nazionali del Sud (LNS) dell'INFN di Catania.

Una macchina a raggi X è caratterizzata da una sorgente di elettroni, da un percorso a vuoto dove accelerare le particelle cariche negativamente e da una tensione necessaria a supportare l'accelerazione creata da due elementi metallici in tungsteno, situati agli estremi opposti e che costituiscono il catodo e l'anodo (Fig.4.1). Mediante un generatore applicato al catodo, viene prodotta una corrente ad alto voltaggio, che determina la fuoriuscita di elettroni per effetto termoionico. Una differenza di potenziale variabile, al massimo di 300 kV, è applicata tra i due elettrodi per accelerare gli elettroni verso l'anodo, generando una corrente all'interno del tubo. Il voltaggio applicato per gli esperimenti descritti in questo lavoro di tesi è stato di 250 kV e la corrente misurata nel tubo di 15 mA. I raggi X da 250 kV sono spesso utilizzati come radiazione di riferimento per gli studi sulla efficacia biologica di radiazioni di diversa qualità (paragrafo 1.2.2).



**Fig. 4.1** Produzione di raggi X all'interno di un tubo radiogeno. In blu è rappresentato il sistema di raffreddamento della sorgente.

Un acceleratore di particelle è una macchina in grado di estrarre particelle cariche da una sorgente ed accelerarle trasferendo loro energia. I metodi per accelerare e trasportare le particelle dalla sorgente di produzione al bersaglio da irraggiare sono basati sull'uso di campi elettrici e magnetici, i primi forniscono energia alle particelle accelerandole mentre secondi servono a curvarne la traiettoria, sfruttando la forza di Lorentz (ad esempio negli acceleratori circolari: ciclotrone e sincrotrone), o a correggere dispersioni spaziali e di impulso dei fasci accelerati.

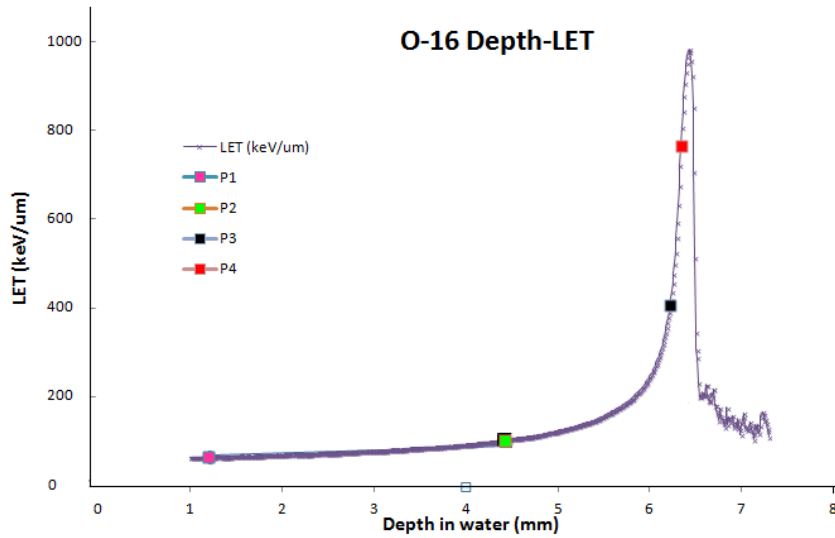
Tutte le macchine acceleratrici, nelle più svariate concezioni, presentano uno schema di funzionamento analogo: una sorgente fornisce le particelle cariche, un pre-iniettore ed un iniettore provvedono ad aumentarne l'energia iniettandole nell'acceleratore, dove queste vengono opportunamente accelerate con l'azione di campi elettrici continui o pulsanti. Il fascio così ottenuto viene forzato a seguire una traiettoria stabilita, con l'azione di dispositivi accessori che incontra lungo il suo percorso.

Per quanto riguarda i fasci di particelle ai quali le cellule sono state esposte, sono stati impiegati protoni, ioni carbonio e ioni ossigeno, le cui caratteristiche fisiche sono mostrate in tabella 4.1.

Tipo di fascio	Energia nominale (MeV)	Energia incidente (MeV)	LET calcolato (Kev/im)
Protoni	1	0,8	27
Protoni	0,8	0,6	34
Carbonio	15	13	726
Carbonio	8,4	6	934
Ossigeno	15	11,4	1300
Ossigeno (LNS)	62	60	80 (posizione 1)
			100 (posizione 2)
			800 (posizione 3)
			1100 (posizione 4)

**Tabella 4.1.** Fasci di particelle impiegati nei turni di esposizione. Per energia nominale si intende quella cui le particelle sono accelerate all'uscita dalla sorgente, mentre per incidente si intende l'energia che esse possiedono dopo aver attraversato spessori di alcuni materiali lungo il loro percorso.

Nei turni di irraggiamento con protoni e ioni carbonio effettuati presso il canale di Biofisica del Tandem TTT3 del Dipartimento di Scienze Fisiche di Napoli, sono stati utilizzati due valori di energia per studiare possibili differenze nella risposta radiobiologica nell'intorno del picco di Bragg, mentre per gli irraggiamenti effettuati con il ciclotrone presso il dipartimento LNS di Catania, che possiede un'energia molto maggiore rispetto al Tandem, è stato possibile studiare l'effetto su diversi punti della curva di Bragg; nell'ambito di quest'ultimo irraggiamento, per questo lavoro di tesi, sono state analizzate le aberrazioni cromosomiche della linea MCF10A in posizione 1 della curva (fig 4.2). Questa posizione è stata scelta perché corrisponde ad un LET sufficientemente elevato per produrre effetti radiobiologici significativamente differenti da quelli dovuti all'esposizione a fotoni.



**Fig. 4.2** Curva di Bragg per ioni ossigeno: perdita di energia (in acqua) in funzione della profondità per il fascio di ioni ossigeno utilizzato per l'irraggiamento presso LNS. I punti P1, P2, P3 e P4 rappresentano la simulazione delle profondità di irraggiamento.

Per l'irraggiamento delle cellule sono stati utilizzati appositi supporti sterili in plexiglass di forma cilindrica (fig. 4.3) la cui base è incollata ad una membrana di mylar (dello spessore di 1,5  $\mu\text{m}$ ), sulla quale sono state seminate le cellule in modo tale che nel giorno dell'esperimento formassero un monostrato. Ciò è essenziale per l'affidabilità dei dati radiobiologici ottenuti, in quanto è necessario che non ci siano disomogeneità nella dose assorbita dovuto ad un eventuale impilamento delle cellule.



**Fig. 4.3** Supporto utilizzato per l'irraggiamento delle cellule.

Ad eccezione dell'analisi delle aberrazioni cromosomiche, tutti gli esperimenti hanno previsto irraggiamento con fasci di particelle cariche e irraggiamento con raggi X come controllo sperimentale.

#### **4.4 La sopravvivenza cellulare**

Le colture cellulari permettono, seppure *in vitro*, di osservare diversi aspetti della vita delle cellule e l'effetto che le radiazioni possono avere su di esse. In particolare, il bilancio tra sopravvivenza e morte cellulare è di estrema importanza nel determinare il risultato dell'irraggiamento.

In questo contesto risulta molto utile la valutazione del potenziale clonogenico della coltura irraggiata, ossia l'abilità di una singola cellula di generare un clone di suoi discendenti in seguito al trattamento citotossico. Il potenziale clonogenico varia non solo in relazione alla qualità della radiazione, ma dipende anche dalla linea cellulare utilizzata (che avrà una sua radiosensibilità intrinseca) e dallo stadio del ciclo cellulare in cui avviene l'irraggiamento.

La prima definizione operativa di sopravvivenza cellulare (indicata con l'acronimo di SF: Surviving Fraction), fu data da Puck e Marcus nel 1956 (Marcus et al., 1956; Puck & Marcus, 1956): una cellula irraggiata sopravvive se origina una colonia contenente almeno 50 cellule, il che equivale a circa 5-6 cicli di divisione cellulare successive all'insulto.

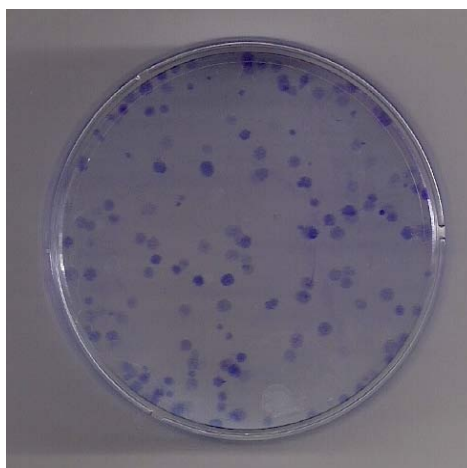
La procedura sperimentale per la realizzazione di una curva di sopravvivenza clonogenica è la seguente:

1. coltura
2. irraggiamento
3. semina in piastre petri
4. fissaggio e colorazione delle piastre petri
5. conteggio dei cloni
6. determinazione della frazione di cellule sopravvissute

## 7. costruzione della curva di sopravvivenza clonogenica

Subito dopo essere state irraggiate le cellule vengono tripsinizzate, contate con camera burker e seminate ad un numero noto di cellule, crescente per dosi di radiazione crescente. Tale modalità di semina è necessaria dato che all'aumentare della dose fornita alle cellule diminuisce il numero di cellule che sopravvivono all'insulto.

Dopo un periodo di tempo che può variare da 7 a 15 giorni, a seconda della linea cellulare, i cloni sono stati fissati e colorati con crystal violet (fig. 4.4), e infine contati secondo il modello di Puck e Marcus. Il risultato del conteggio dei cloni fornisce una misura della frazione delle cellule sopravvissute.



**Fig. 4.4** Cloni fissati e colorati con crystal violet su piastra petri.

Il numero di colonie contate nelle piastre dove sono state seminate le cellule irraggiate non basta, però, a definire la SF. Infatti, bisogna tener presente che anche cellule non danneggiate dalla radiazione possono non formare colonie. Questo fattore viene valutato tramite l'efficienza di piastramento (PE, Plating Efficiency) e viene ricavato dal conteggio dei cloni formati dalle cellule nelle piastre di controllo:

$$PE = \frac{\text{colonie contate}}{\text{colonie inoculate}} \quad (4.1)$$

A partire dalla PE si valuta la SF normalizzata:

$$SF = \frac{\textit{colonie contate}}{\textit{colonie inoculate} \cdot \left(\frac{PE}{100}\right)} \quad (4.2)$$

L'andamento della frazione di cellule sopravvissute (SF), in funzione della dose di radiazione (D) ceduta alle cellule, rappresenta una curva di sopravvivenza clonogenica (Fig. 1.7).

Nel capitolo 5 sono riportate le curve di sopravvivenza ottenute dagli esperimenti effettuati per questo lavoro di tesi, irraggiando la linea cellulare HUVEC con fasci di protoni, ioni carbonio (a due diverse energie) e con raggi X. Inoltre, il saggio clonogenico è stato utilizzato anche nell'esperimento bystander sulle linee MCF10A ed MCF7 non irraggiate.

#### **4.5 Ibridazione fluorescente in situ multicolore (mFISH)**

Nel capitolo 3 si è parlato delle tecniche di visualizzazione delle aberrazioni cromosomiche e, tra queste, è stata citata l'ibridazione in situ fluorescente (FISH), ed in particolare si è parlato dell'mFISH, ossia l'ibridazione fluorescente in situ multicolore.

A differenza della FISH "tradizionale", in cui due o tre coppie di cromosomi analoghi sono marcati l'mFISH fa uso di un mix di cinque sonde che, elaborati e processati da un apposito software, permette di rilevare simultaneamente tutti i 24 diversi cromosomi umani con una sola ibridazione.

Esistono due metodologie per la marcatura delle sonde con fluorescenti, il metodo diretto e il metodo indiretto. Nel metodo diretto, il fluorocromo è associato direttamente al DNA mediante l'utilizzo di nucleotidi coniugati a fluorocromi; la marcatura indiretta utilizza invece una molecola reporter che viene accoppiata ad un fluorocromo mediante il riconoscimento con un

anticorpo specifico. Il vantaggio dell'etichettatura diretta è che l'ibridazione non richiede più passaggi per il rilevamento delle sonde.

Le sonde 24Xyte utilizzate per questa tesi sono fornite dalla ditta MetaSystems (Germania) e sono sonde create con metodo diretto. 24Xyte è un mix che utilizza cinque diversi fluorocromi, ossia Cy5, Deac (Diethylamino-cumarina), FITC, Spectrum Orange TM e Texas Red. L'uso di queste sonde durante l'ibridazione promette una marcatura specifica assicurata da una combinazione unica di etichettatura così come mostrato in figura 4.5.

#	DEAC	FITC	Spectrum OrangeTM	Texas Red®	CyTM5
1					Yellow
2	Blue				
3				Pink	
4		Green			
5			Red		
6		Green			Yellow
7	Blue				Yellow
8				Pink	Yellow
9			Red		Yellow
10	Blue	Green			
11		Green		Pink	
12		Green	Red		
13	Blue			Pink	
14	Blue		Red		
15			Red	Pink	
16	Blue	Green			Yellow
17		Green		Pink	Yellow
18		Green	Red		Yellow
19	Blue			Pink	Yellow
20	Blue		Red		Yellow
21			Red	Pink	Yellow
22	Blue	Green		Pink	
X	Blue	Green	Red		
Y	Blue		Red	Pink	

Fig. 4.5 24Xyte labelling scheme.



Affinché avvenga l'ibridazione, le sonde e il DNA, devono essere prima denaturati separatamente a temperature che vanno dai 70°C ai 75°C; successivamente, le sonde e il DNA vengono messe ad ibridare (le sonde devono essere in eccesso rispetto alla concentrazione di DNA: quando si abbassa la temperatura per permettere la rinaturazione, le sonde devono competere efficacemente con i filamenti parentali per le sequenze bersaglio); durante l'ibridazione si verificano interazioni stabili e veloci tra la sonda e il bersaglio, e si possono formare quattro tipi di appaiamento: bersaglio-bersaglio, sonda-sonda, ibridi specifici e ibridi aspecifici. Per assicurare la rimozione di tutte le associazioni che non siano molecole ibride specifiche, si eseguono una serie di lavaggi ad alta stringenza (bassa concentrazione di sali, elevata temperatura, presenza di agenti denaturanti).

Nel complesso, si può affermare che la riuscita dell'mFISH dipende da una serie di fattori, quali la concentrazione di sonda e di bersaglio, la temperatura, il contenuto di sali e il pH delle soluzioni, ma dipende anche dalla qualità dei preparati sui quali si intende fare l'analisi (protocollo per la preparazione dei campioni da analizzare in appendice B): residui consistenti di citoplasma possono infatti creare delle interferenze durante la fase di ibridazione, comportando un segnale generalizzato della sonda. Tutti i vetrini impiegati per l'mFISH sono stati preparati a 24 ore post irraggiamento. In questo lavoro di tesi, è stata affrontata l'ottimizzazione del protocollo dell'mFISH (Anderson, 2010) per la linea cellulare MCF10A; tale protocollo è disponibile in appendice C.

#### 4.5.1 Microscopio a fluorescenza e acquisizione immagini

I campioni che prevedono la visualizzazione di marcatori fluorescenti come i fluorocromi richiedono l'utilizzo di un microscopio a fluorescenza. I fluorocromi sono infatti delle sostanze che, colpite da una certa lunghezza d'onda, in parte la assorbono ed in parte la riemettono con una lunghezza d'onda maggiore che

cadrà nello spettro del visibile, sotto forma di fluorescenza (che sarà visibile finché c'è eccitazione).

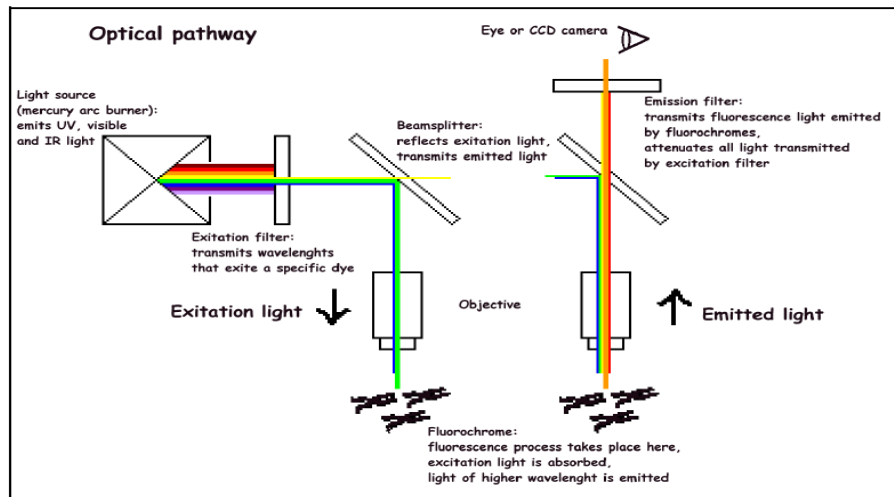
Le sorgenti luminose utilizzate per la microscopia a fluorescenza sono di solito lampade a globo di quarzo contenente vapori di mercurio o alogeni ad alta pressione. Pur avendo massimi nell'UV, queste lampade emettono radiazioni tra UV ed infrarosso. L'appropriata lunghezza d'onda utile per l'eccitazione di un particolare fluorocromo è selezionata mediante filtri di eccitazione.

La luce passa attraverso il filtro di eccitazione, che lascia passare solo la luce monocromatica di interesse, e viene focalizzata attraverso l'obiettivo mediante uno specchio dicroico, che riflette la luce di eccitazione la quale andrà a colpire il campione, lasciando passare invece la luce di fluorescenza emessa dal preparato. Sopra il ripartitore dicroico, la luce di emissione e la residua luce di eccitazione colpiscono il filtro di sbarramento (o di emissione), che permette il passaggio della sola luce di fluorescenza. Quest'ultima, captata dall'oculare, viene convertita nell'immagine da osservare (fig. 4.6).

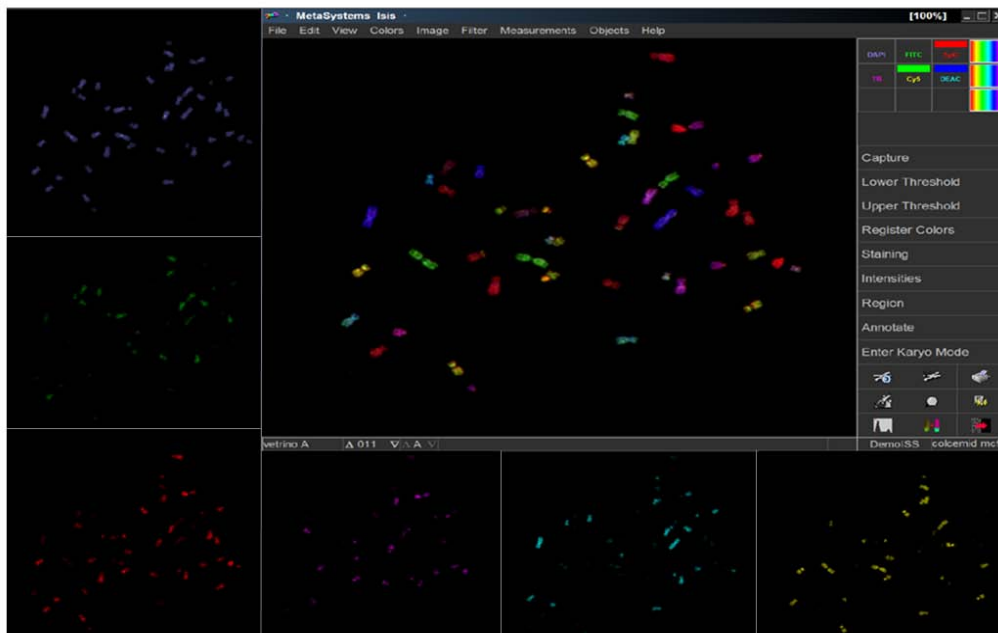
Il microscopio utilizzato per questo progetto di tesi è il modello AxioImager M1 della Zeiss, un microscopio a fluorescenza dotato di sei filtri (DAPI, FITC, Texas Red, Cy5, Spectrum Orange e DEAC), funzionali all'acquisizione di immagini mFISH.

Il software utilizzato per l'acquisizione di immagini e la rielaborazione dei cariotipi, è stato ISIS Fish Imaging System (MetaSystems). Il sistema non è associato a modelli automatici di riconoscimento delle metafasi, quindi per l'acquisizione delle immagini è stata applicata la classica metodologia di ricerca manuale: in un'analisi preliminare del vetrino a basso ingrandimento (obiettivi 10X e 40X), si valutano la definizione dei cromosomi ed eventuali loro sovrapposizioni, nonché l'intensità dei segnali luminosi relativi a ciascun fluorocromo captato dal microscopio, successivamente, si procede all'acquisizione ad alto ingrandimento (obiettivo ad immersione 63X). In ISIS le immagini sono catturate con camera CCD monocromatica.

Durante la fase di acquisizione i sei fluorocromi sono eccitati separatamente, mediante i sei filtri specifici interposti automaticamente e in successione. Al termine dell'acquisizione il sistema combina i sei segnali luminosi captati dalla telecamera associata al microscopio, fornendo un'immagine ottenuta dalla loro sovrapposizione (fig. 4.7).



**Fig. 4.6** Meccanismo generale di funzionamento di un microscopio a fluorescenza.



**Fig. 4.7** Integrazione dei sei segnali fluorescenti, in successione DAPI, FITC, Spectrum Orange, Texas Red, Cy5 e DEAC.

Le metafasi ottenute sono state successivamente rielaborate secondo le seguenti fasi:

- correzione delle intensità dei segnali di emissione registrati dal sistema: il settaggio dei valori di intensità del segnale per ciascun fluorocromo (funzioni "LOWER ed UPPER TRHESHOLD"), permette di escludere eventuali segnali di fondo;
- separazione dei cromosomi: la separazione dei cromosomi è un'operazione necessaria per distinguere ogni entità. La separazione si può fare automaticamente o manualmente;
- creazione del cariotipo: in quest'ambito è possibile utilizzare la funzione FALSE COLORS, che dà la prospettiva dei 24 colori creati dall'interazione delle sonde.

Prima di poter effettuare la classificazione automatizzata dei cariotipi aberrati, è stato necessario eseguire un'operazione di "Training", ossia un'operazione che fornisce al programma i parametri per il riconoscimento della posizione dei singoli cromosomi nel cariotipo, in modo da assicurare la riproducibilità biologica dell'esperimento che si vuole compiere. Questo è stato fatto mediante la costruzione manuale di dieci cariotipi, provenienti da popolazioni cellulari wild-type differenti: essi sono stati utilizzati per fornire un modello statistico della combinazione delle sonde per tutte le 23 coppie di cromosomi omologhi.

I campioni analizzati per la classificazione delle aberrazioni cromosomiche sono stati le MCF10A irraggiate nella posizione P1 della curva di Bragg a dosi 1 e 2,5 Gy.

#### **4.6 La senescenza prematura: test della $\beta$ -galattosidasi**

La  $\beta$ -galattosidasi, anche indicata come beta-gal o  $\beta$ -gal, è un enzima idrolasi che catalizza l'idrolisi del  $\beta$ -galattosio. Le cellule senescenti hanno la capacità di esprimere una  $\beta$ -galattosidasi facilmente rilevabile a pH 6.0 e definita come SA-

$\beta$ gal (senescence-associated  $\beta$ -galattosidasi). Il rilevamento della SA- $\beta$ gal è molto semplice e si basa sull'utilizzo del substrato cromogenico 5-bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galactopiranoside anche detto X-gal. L'X-gal viene scisso dalla  $\beta$ -galattosidasi producendo galattosio e 5-bromo-4-cloro-3-idrossindolo, ossidato successivamente in 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indaco, un composto blu insolubile facilmente osservabile al microscopio ottico (fig. 5.12).

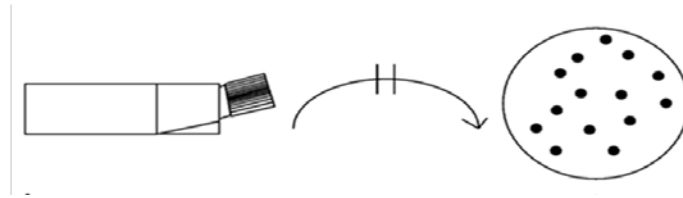
Il test è stato eseguito su colture ad una confluenza di circa l'80%, tripsinizzate e seminate in un numero medio di cellule di 7000/8000 per petri (35 mm di diametro).

La metodica utilizzata per il test della  $\beta$ -galattosidasi (Senescence Cells Histochemical Staining Kit della SIGMA) è disponibile in appendice D ed è stata applicata per seguire l'andamento della senescenza prematura radioindotta della linea cellulare HUVEC, irraggiata con fasci di protoni ( $E_{in}=0,8$  e  $0,6$  MeV), ioni carbonio ( $E_{in}=13$  e  $6$  MeV) ed ossigeno ( $E_{in}=11,4$  MeV), nonché raggi X. In particolare, l'andamento della senescenza per ioni carbonio e protoni è stato seguito per una doppia energia, al fine di evidenziare andamenti eventualmente differenti per i due livelli energetici dovuti a strutture di traccia diverse; in più, le cellule irraggiate con carbonio e protoni all'energia più alta, sono state usate per un confronto con l'andamento della senescenza delle cellule irraggiate con ossigeno. Infine, le cellule irraggiate con carbonio a più bassa energia sono state usate per l'esperimento bystander.

#### **4.7 Esperimento transfer medium: effetto bystander**

Uno dei metodi più semplici ed utilizzati per testare la presenza di un effetto bystander, è il transfer medium. Gli esperimenti di transfer medium si basano letteralmente sul trasferimento, previo filtraggio con filtro da  $0,4 \mu\text{m}$ , del terreno proveniente da una coltura cellulare ad un'altra (Liu et al., 2006) (fig. 4.8). Nel nostro caso l'esperimento si è posto l'obiettivo di indagare gli effetti bystander indotti da cellule HUVEC irraggiate con fasci di ioni carbonio ad energia incidente

di 6 MeV e raggi X, su cellule epiteliali normali e tumorali non irraggiate, rispettivamente MCF10A ed MCF7.



**Fig. 4.8** Schematizzazione di un esperimento di transfer medium.

La scelta di questi modelli cellulari *in vitro* si è basata sull'idea che in un modello *in vivo* i capillari sanguigni attraversano o si ritrovano a contatto con moltissimi tipi di tessuti, tra cui i tessuti epiteliali. Cosa succede ai tessuti epiteliali normali circostanti (nel nostro caso cellule epiteliali di mammella) quando le cellule endoteliali normali dei vasi sanguigni vengono interessate da danni radioindotti dovuti a radioterapia? Esse producono fattori che possono influenzare la sopravvivenza e/o la proliferazione dei tessuti epiteliali? E' possibile, se esiste un effetto, che questi fattori possano agire anche su cellule tumorali? In particolare, il modello riprodotto *in vitro* per questa trattazione, vuole testare non solo gli effetti che le cellule endoteliali irraggiate possono avere su cellule epiteliali di mammella normali, ma anche sulle corrispettive cellule tumorali.

Classicamente, gli studi degli effetti bystander sono legati all'analisi della sopravvivenza di cellule normali in presenza di fattori tossici eventualmente prodotti dalle cellule a tempi brevi dall'irraggiamento. A tale scopo è stato allestito un test di sopravvivenza clonogenica di cellule non irraggiate (cellule accettrici: MCF10A e MCF7), in presenza di terreno proveniente da cellule HUVEC irraggiate (cellule donatrici) prelevato a 4 e 24 ore post-irraggiamento, a dosi di 0,5 e 2 Gy e non irraggiate (0 Gy), che fungono da controllo necessario per il confronto dei reali effetti bystander: nell'arco delle 4 o delle 24 ore, le cellule endoteliali, già in condizioni normali (non irraggiate), potrebbero produrre dei

fattori che influenzano negativamente la crescita cellulare delle cellule epiteliali, è necessario quindi distinguere questi effetti da quelli legati al bystander. Per questo motivo i risultati ottenuti per terreni provenienti da cellule irraggiate a 0,5 e 2 Gy sono stati normalizzati con i valori ottenuti per il terreno proveniente da cellule non irraggiate, sia a 4 che a 24 ore. In più è stato allestito un esperimento di transfer medium utilizzando terreno che non è stato precedentemente in contatto con le cellule (terreno vergine): questo è servito per la valutazione dell'efficienza di piastramento necessaria per normalizzare i dati ottenuti.

Un secondo aspetto che è stato analizzato, a partire dalle stesse cellule irraggiate, è stato il possibile effetto legato all'aumento della percentuale di cellule in senescenza prematura radioindotta sulla sopravvivenza e sulla proliferazione di cellule non irraggiate. L'indagine è stata associata al monitoraggio dell'andamento della senescenza cellulare delle popolazioni cellulari irraggiate e alla comparazione dei livelli di sopravvivenza delle cellule non irraggiate in presenza di terreno proveniente da cellule irraggiate (0,5 Gy e 2 Gy). La sopravvivenza cellulare delle linee epiteliali è stata analizzata quando le colture donatrici hanno raggiunto percentuali significativamente elevate di cellule in senescenza (circa il 25%, il 50% e il 100% delle cellule) e confluenza di circa 50%. Inoltre, si è verificata la necessità di effettuare un test clonogenico anche per cellule riceventi il terreno da cellule non irraggiate (a percentuali di senescenza simili a quelle testate per cellule irraggiate); ciò è servito per capire se l'eventuale effetto bystander legato all'aumento della percentuale di senescenza sia dovuto all'aumento della percentuale di cellule senescenti in generale o all'aumento della percentuale di cellule in senescenza prematura radioindotta.

Prima di poter attuare l'esperimento è stato necessario assicurarsi che le cellule riceventi (MCF10A ed MCF7) fossero in grado di sopravvivere e di crescere con il terreno utilizzato per la coltura delle cellule donatrici (HUVEC). Tale questione risulta ovvia se ci si vuole assicurare che gli eventuali effetti bystander

siano dovuti effettivamente a fattori secreti dalle cellule irraggiate e non alla diversa composizione del terreno: i componenti presenti nel terreno di crescita (appendice A) sono adatti al mantenimento di una linea cellulare specifica, ma potrebbero non essere adatti alla crescita ottimale di un'altra linea cellulare. Mediante curve di crescita-adattamento, è stata quindi effettuata la caratterizzazione della crescita delle linee cellulari MCF10A ed MCF7 in presenza del terreno specifico per le HUVEC; tali curve sono disponibili nel capitolo 5.



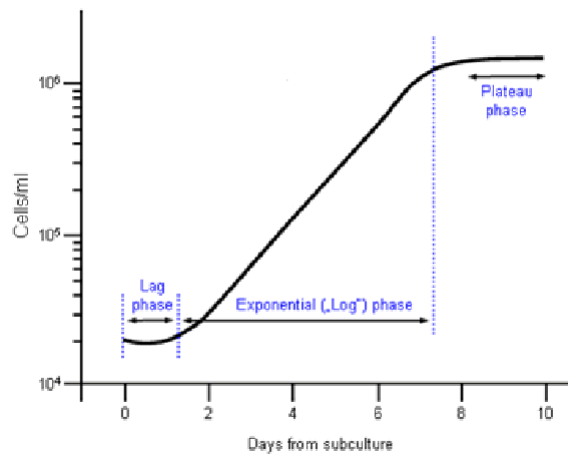
# Capitolo 5

## Analisi e discussione dei risultati sperimentali

### 5.1 Curve di crescita

Prima di raccogliere i dati delle misure degli effetti che si intendono studiare *in vitro* è opportuno caratterizzare le linea o linee cellulari che si intende utilizzare, per esempio determinandone il tempo di duplicazione e le condizioni ottimali di coltura. Le linee utilizzate in questo lavoro sono tutte disponibili commercialmente e/o usate diffusamente, pertanto esistono protocolli dei mezzi di coltura (come descritto in Appendice A) ed altre informazioni, come le densità ottimali di inoculazione o il tempo fra un passaggio e l'altro. E' tuttavia buona norma verificare ed ottimizzare tali protocolli trovando le condizioni che meglio si adattano al proprio laboratorio ed alle proprie tecniche di coltura cellulare. Come parte di tale caratterizzazione sono state costruite delle curve di crescita.

Una curva di crescita si ottiene seminando ad una determinata densità iniziale le cellule in capsule petri o fiasche, in numero adeguato per il campionamento del loro numero nel tempo, ad intervalli più o meno regolari. Una tipica curva di crescita (fig 5.1) consiste in una fase *lag*, una fase *log* e una fase di *plateau*, dove l'ampiezza della fase *lag* corrisponde al tempo di transizione durante il quale le cellule si adattano alle condizioni di coltura, e quindi si può assistere ad un temporaneo declino del loro numero rispetto alla quantità iniziale; la fase successiva, detta *log*, coincide con il tempo durante il quale le cellule sono in fase di crescita esponenziale ed è in questa fase che i dati forniscono una stima del tempo impiegato dalle cellule per duplicarsi, effettuando un fit lineare pesato sui punti sperimentali. Infine, si osserva spesso una fase di *plateau*, in cui la maggior parte delle linee non immortalizzate cessa di crescere per inibizione da contatto.



**Fig. 5.1** Tipica curva di crescita di una coltura cellulare.

Ciascuna curva di crescita dovrebbe essere plottata a partire da cellule in crescita nel proprio terreno di coltura. In questo lavoro di tesi, oltre a determinare le curve di crescita delle linee cellulari MCF10A ed HUVEC utilizzando i loro terreni di crescita, sono state costruite anche le curve di crescita delle linee cellulari MCF10A ed MCF7 coltivate con il terreno utilizzato per le HUVEC (per le motivazioni, si rimanda al paragrafo 4.6).

Le figure 5.2 - 5.6 mostrano le curve di crescita ottenute e i tempi di duplicazione per le linee cellulari sopra citate.

Ciascun punto della curva deriva da una media di tre conteggi, alla quale è stato applicato l'errore standard (equazione 5.1), che definisce una misura della indeterminazione sperimentale, che può dipendere da vari fattori (errori di semina, di conteggio, incertezze nei volumi, etc):

$$SE = \frac{\text{dev. standard}}{\sqrt{n^{\circ} \text{ conteggi}}} \quad (5.1)$$

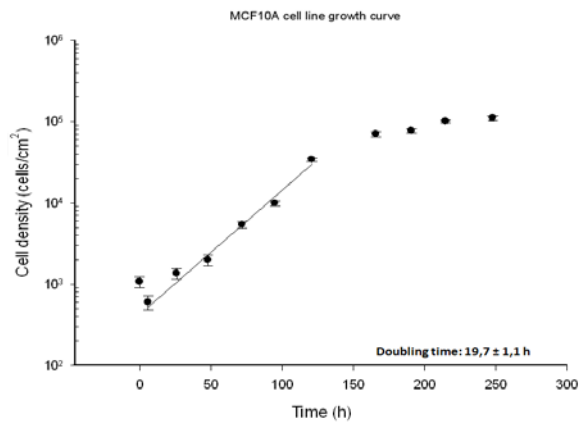


Fig. 5.2 Curva di crescita con tempo di duplicazione della linea cellulare MCF10A.

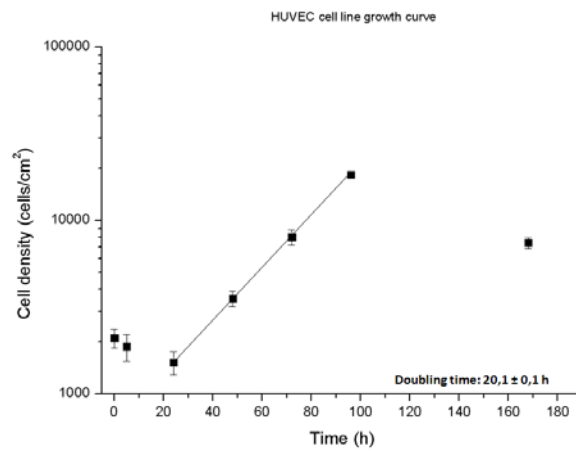


Fig. 5.3 Curva di crescita con tempo di duplicazione della linea cellulare HUVEC.

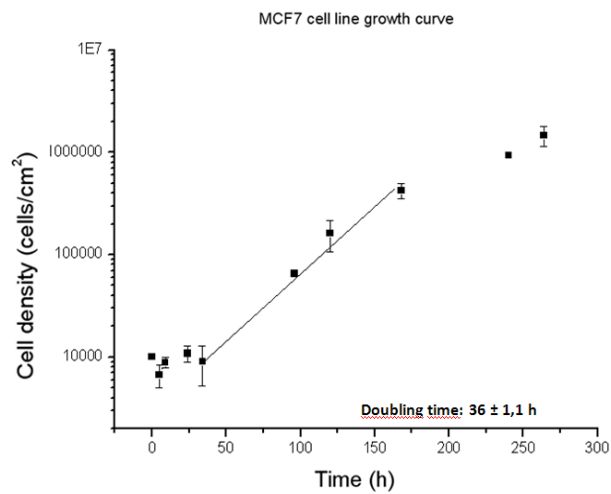
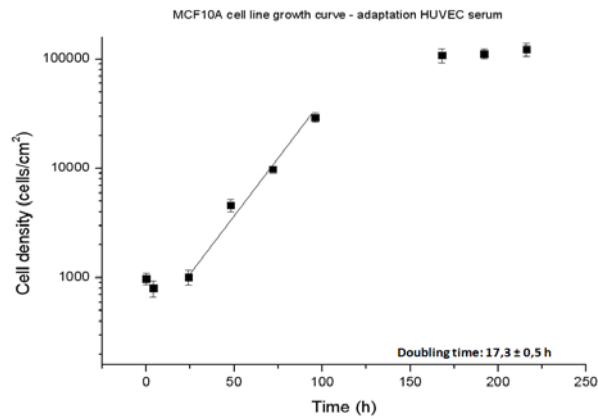
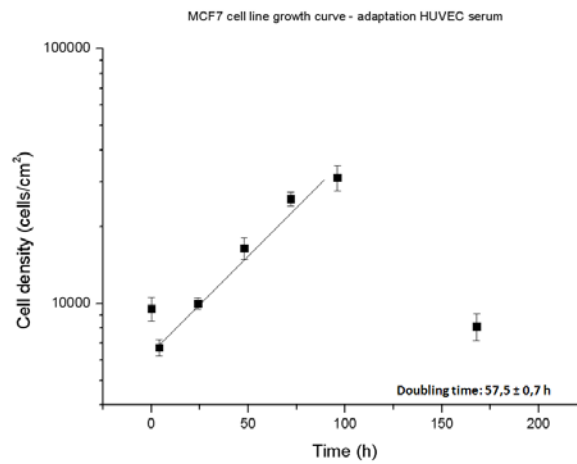


Fig. 5.4 Curva di crescita con tempo di duplicazione della linea cellulare MCF7.



**Fig.5.5** Curva di crescita-adattamento con tempo di duplicazione della linea cellulare MCF10A in terreno HUVEC.



**Fig. 5.6** Curva di crescita-adattamento con tempo di duplicazione della linea cellulare MCF7 in terreno HUVEC.

Come si vede, I tempi di duplicazione delle HUVEC e MCF10A sono molto simili fra loro e pari a circa 20 h. Inoltre, il terreno di crescita delle HUVEC (arricchito di siero) non modifica affatto le condizioni di crescita delle MCF10A mentre il terreno delle HUVEC allunga considerevolmente il tempo di duplicazione delle MCF-7.

## 5.2 Caratterizzazione della radiosensibilità di cellule endoteliali in prossimità del picco di Bragg

Uno degli end-point di questa trattazione è stato quello di determinare gli effetti letali di radiazioni ionizzanti di diversa qualità su cellule endoteliali (HUVEC). Per caratterizzare la radiosensibilità di queste cellule è stata misurata la sopravvivenza cellulare mediante la realizzazione di curve di sopravvivenza clonogenica, così come descritto nel paragrafo 4.4, in risposta a raggi X e a particelle cariche accelerate (protoni e carbonio). Dalle curve è stato possibile valutare l'RBE (efficacia relativa biologica, paragrafo 1.2.2).

### 5.2.1 Sopravvivenza cellulare alla radiazione di alto e basso LET

Lo studio della risposta di una linea cellulare alle radiazioni ionizzanti, in termini di sopravvivenza clonogenica, parte dalla caratterizzazione della risposta ai raggi X: il confronto tra la dose di raggi X, necessaria a produrre un determinato effetto biologico, e la dose di particelle cariche necessaria a produrre lo stesso effetto, fornisce informazioni sull'efficacia del fascio di particelle in questione.

Secondo i modelli di radiobiologia classica, la sopravvivenza cellulare in funzione della dose per radiazioni a basso LET è descritto dal modello lineare quadratico secondo la relazione:

$$SF = e^{(-\alpha D - \beta D^2)} \quad (5.2)$$

dove SF è la frazione di sopravvissuti, D è la dose e  $\alpha$  e  $\beta$  sono parametri ottenibili mediante un fit dei valori sperimentali.

I risultati ottenuti dall'esposizione della linea HUVEC ai raggi X sono in buon accordo con gli andamenti previsti, essi sono riportati, sottoforma di curva dose-risposta che ne deriva, nei grafici nelle figure 5.7 - 5.10.

L'errore applicato ai valori della frazione di cellule sopravvissute è fissato al 10%, in relazione al fatto che l'indeterminazione associata ai conteggi del numero di cellule effettuati con la camera burker e le diluizioni seriali necessarie per l'inoculazione del numero di cellule desiderato per il test clonogenico, fanno sì che l'errore sulla SF, espresso come deviazione standard della media dei conteggi dei cloni, risulta di molto inferiore alla soglia del 10%. Esso non è realistico. Per tale motivo, poiché si è visto che la propagazione degli errori sulla SF restituisce un valore sempre inferiore a tale percentuale, si è considerato l'errore pari al 10%.

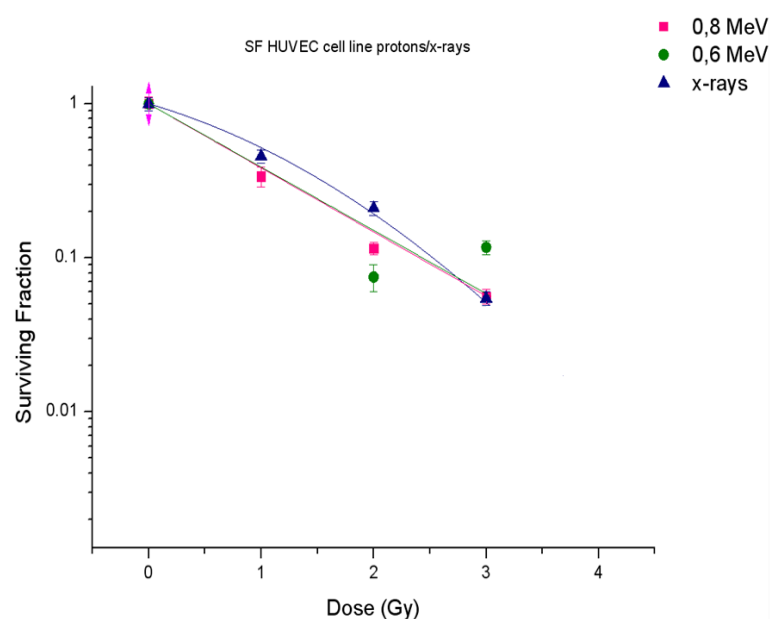
L'andamento della frazione di sopravvissuti in funzione della dose a seguito dell'irraggiamento con fasci di particelle cariche è di norma ben descritto da un modello lineare che, su scala semilogaritmica, utilizza l'equazione 5.3.

$$SF = e^{-\alpha D} \quad (5.3)$$

Negli esperimenti condotti presso il Laboratorio di Biofisica delle Radiazioni, sono state irraggiate cellule con fasci di protoni con energia incidente ( $E_{in}$ ) di 0,8 e 0,6 MeV e fasci di ioni carbonio con  $E_{in}$  di 13 e 6 MeV. Gli irraggiamenti con questi fasci sono stati effettuati presso il Tandem TTT-3 del Dipartimento di Scienze Fisiche. Questo acceleratore permette di ottenere, dai fasci di particelle considerati, un'energia tale da far sì che le cellule siano esposte praticamente sul picco di Bragg (fig. 1.4) e quindi a valori molto elevati di LET.

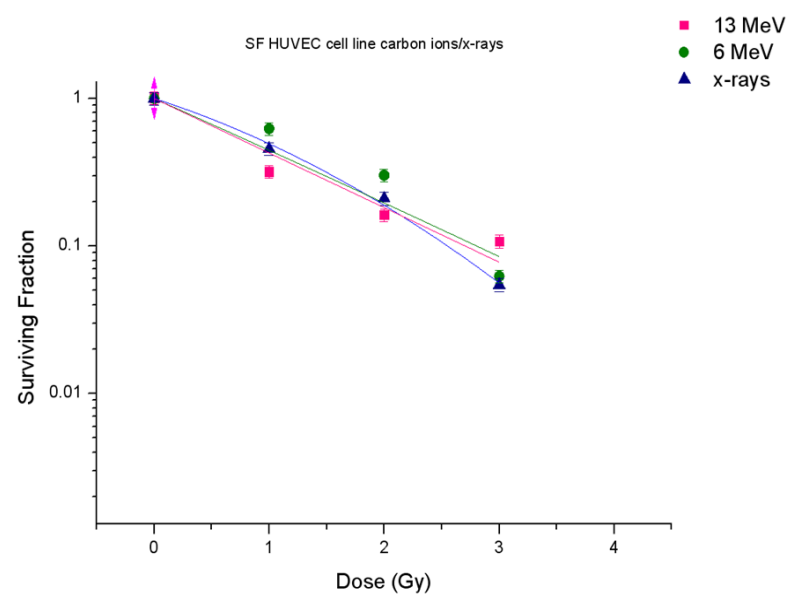
Nelle figure 5.7 – 5.10 sono mostrate le curve dose-risposta ottenute effettuando un fit esponenziale pesati dei risultati sperimentali.

*Confronto tra fasci di protoni a diversa energia e raggi X*



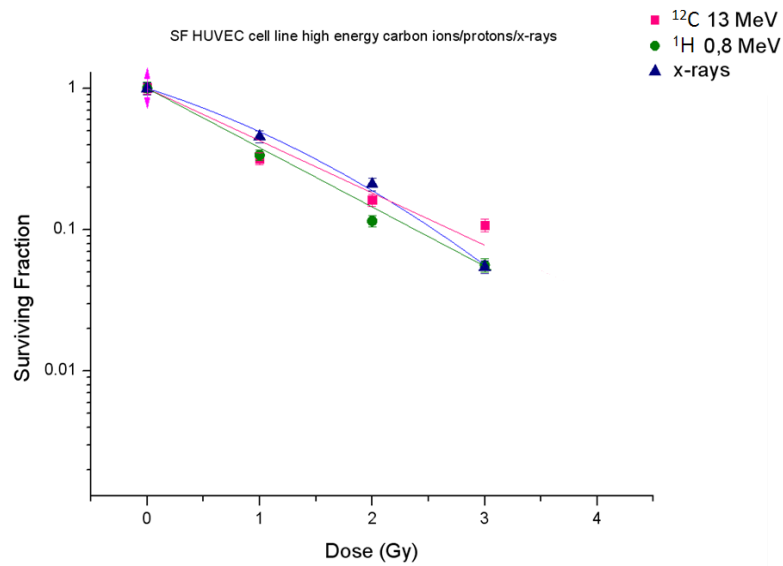
**Fig. 5.7** Sopravvivenza clonogenica a fasci di protoni con  $E_{in}$  di 0,8 MeV (rosa) e 0,6 MeV (verde) e a raggi X (blu).

*Confronto tra fasci di ioni carbonio a diversa energia e raggi X*



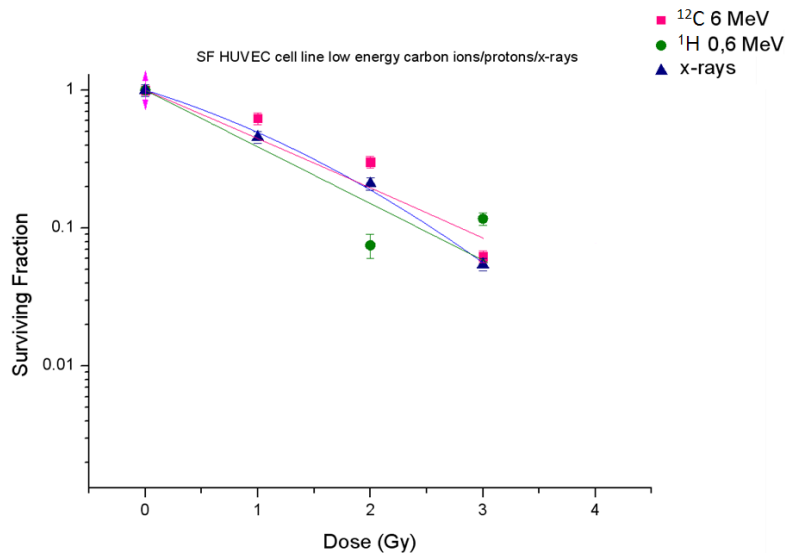
**Fig. 5.8** Sopravvivenza clonogenica a fasci di ioni carbonio  $E_{in}$  di 13 MeV (rosa) e 6 MeV (verde) e a raggi X (blu).

*Confronto tra fasci di ioni carbonio e protoni ad alte energie e raggi X*



**Fig. 5.9** Sopravvivenza clonogenica a fasci di carbonio con  $E_{in}$  di 13 MeV (rosa), fasci di protoni  $E_{in}$  0,8 MeV (verde) e a raggi X (blu).

*Confronto tra fasci di ioni carbonio e protoni a basse energie e raggi X*



**Fig. 5.10** Sopravvivenza clonogenica a fasci di carbonio con  $E_{in}$  di 6 MeV (rosa), fasci di protoni con  $E_{in}$  di 0,6 MeV (verde) e a raggi X (blu).

Dai risultati sperimentali presentati è possibile dedurre alcune osservazioni.



Secondo i modelli radiobiologici classici, ci si attende un differente andamento tra le curve di sopravvivenza a radiazione a basso LET e particelle ad alto LET, da ricercare nel diverso modo in cui si deposita l'energia: i raggi X, producendo eventi di ionizzazione spazialmente separati tra loro, inducono una significativa proporzione di danni potenzialmente riparabili; le particelle cariche, invece, producono eventi di ionizzazione molto ravvicinati tra loro lungo la direzione di penetrazione, generando dei cluster di rottura multipla della doppia elica, danni alle basi e rotture di singola elica. Il tutto si traduce in una minore efficienza dei processi di riparazione nel caso delle cellule colpite da particelle accelerate e, quindi, nella scomparsa della "spalla" caratteristica delle curve dose-risposta a basso LET, dove, a basse dosi, la sopravvivenza aumenta proprio perché maggiore è l'incidenza del danno subletale riparabile. Nel nostro caso, si osserva una minima differenza per quanto riguarda l'induzione di morte cellulare fra particelle cariche e raggi X; questo discende dal fatto che alle energie disponibili all'acceleratore Tandem, il LET degli ioni carbonio è molto elevato (quello dei protoni è comunque un ordine di grandezza inferiore) e quindi i nostri dati bene si adattano con l'andamento "classico" atteso dell'RBE in funzione del LET, come si dirà in dettaglio in seguito.

Per quanto riguarda la risposta ai fasci di una stessa particella accelerata ma a diverse energie, quello che si evince dai grafici 5.7 e 5.8 è, in questo caso, una radiosensibilità molto simile per le due energie considerate: fasci di protoni a  $E_{in}$  di 0,8 e 0,6 MeV, presentano essenzialmente lo stesso andamento nella determinazione della sopravvivenza cellulare al crescere della dose, così come accade nei fasci di ioni carbonio a 13 e 6 MeV di  $E_{in}$ .

Se invece si vuole mettere a confronto la risposta radiobiologica a differenti fasci di particelle accelerate, spostiamo l'attenzione sulle figure 5.9 e 5.10. Dai grafici si evince che sia che si parli del confronto delle particelle a più alte dosi (protoni 0,8 MeV e carbonio 13 MeV), sia che si parli delle particelle a più basse dosi (protoni 0,6 MeV e carbonio 6 MeV), i fasci di protoni hanno un potenziale letale leggermente maggiore (non significativo dal punto di vista statistico, in

ogni caso, ma qualitativamente interessante) di quello presentato dai fasci di ioni carbonio. Tutto ciò è riscontrabile anche dal confronto dei valori di RBE esposti in tabella 5.1.

Come abbiamo detto nel capitolo 1, la valutazione dell'RBE ci consente di quantificare l'efficacia biologica di una radiazione ad alto LET rispetto ad una radiazione a basso LET di riferimento. La stima dell'RBE è stata ottenuta per interpolazione grafica derivando le dosi delle radiazioni a confronto (ioni e raggi X) necessarie a generare una frazione di sopravvivenza clonogenica pari al 10%; nella tabella 5.1 sono riportati i valori così determinati dell'RBE.

Ioni	LET (keV/μm)	RBE <sub>10%</sub>
Protoni 0,8 Mev	27	1,04
Protoni 0,6 Mev	34	1,02
Carbonio 13 MeV	726	0,92
Carbonio 6 MeV	934	0,87

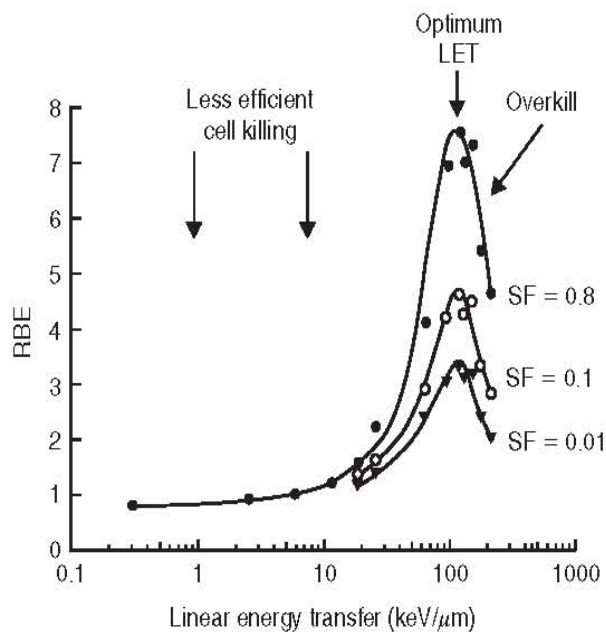
**Tabella 5.1** Valori dell'RBE calcolati per fasci di protoni e ioni carbonio ad una percentuale di sopravvivenza del 10%.

Ciò che si osserva dai valori in tabella è che l'RBE dei protoni oscilla tra 1,02 e 1,04, confermando ciò che si evinceva già da un'analisi preliminare del grafico 5.7, ossia che i fasci di protoni sono solo lievemente più efficaci dei raggi X nell'induzione di danni letali. I valori dell'RBE osservati per i fasci di ioni carbonio, sono addirittura inferiori ad 1, indicando che i raggi X sono più efficaci nell'induzione di effetti letali. Confrontando questi risultati con il grafico 5.8, vediamo che ciò è vero per dosi maggiori di 2 Gy. Come sopra accennato, da un punto di vista classico, sappiamo che al crescere del LET, l'RBE aumenta fino a decrescere rapidamente (fenomeno definito effetto overkill) dopo un picco tipicamente collocato tra 100 e 200 keV/μm (fig 5.11).

Considerando quanto detto per la curva RBE-LET e ricordando che nel caso dei protoni parliamo di radiazioni con LET pari a 27 keV/μm per il fascio ad energia

maggiore e di 34 keV/μm per il fascio ad energia inferiore, possiamo affermare di trovarci in un punto della curva che precede il picco di efficacia relativa biologica e che in questo punto l'efficacia si colloca su valori molto simili a quelli che si avrebbero per i raggi X, ma comunque superiore. Nel caso degli ioni carbonio, ci ritroviamo invece innanzi a LET molto elevati (726 keV/μm per i fasci ad alta energia e 934 keV/μm per i fasci a bassa energia), che superano il picco dell'RBE: ciò fa sì che l'efficacia relativa biologica sia la più bassa prevedibile o, se si vuole, la più vicina ai raggi X.

Tutto ciò quindi bene spiega i risultati ottenuti in merito alla sopravvivenza clonogenica a seguito di esposizione a fasci di protoni, ioni carbonio e raggi X nei nostri esperimenti.



**Fig. 5.11** Classico andamento dell'RBE in funzione del LET.

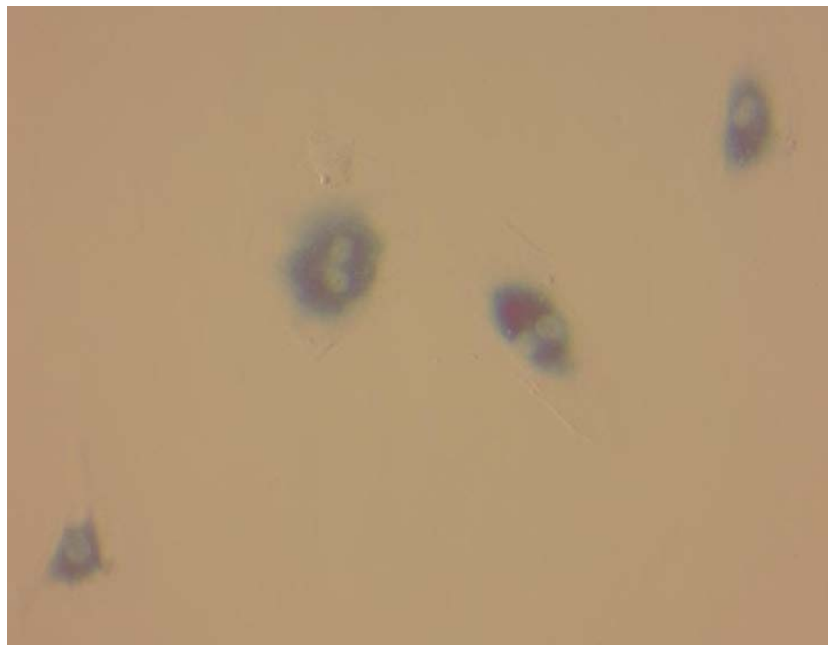
### **5.3 Caratterizzazione della risposta subletale di cellule endoteliali alla radiazione ionizzante: la senescenza prematura**

Lo studio dell'andamento della senescenza prematura radioindotta, ha rappresentato un elemento di grande interesse per lo svolgimento di questa tesi. Mentre, infatti, gli effetti letali delle radiazioni ionizzanti sono ben noti e, come appena visto, anche nel nostro caso, bene riproducono gli andamenti teorici attesi, molto meno nota è la risposta cellulare a stress e danni di tipo subletale, come quelli che, per esempio, possono sperimentare le cellule del tessuto sano in pazienti trattati con adroterapia (radioterapia con protoni e/o ioni carbonio). La comparsa della senescenza prematura radioindotta rappresenta infatti un ottimo indicatore per lo studio degli effetti subletali secondari e a lungo termine in cellule sottoposte ad irraggiamento.

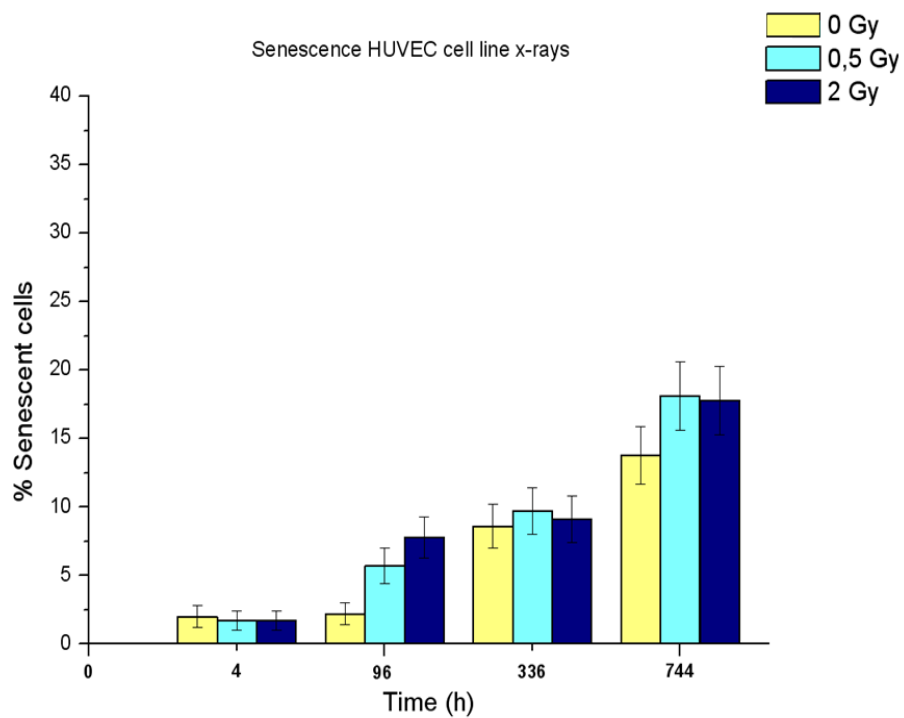
Premesso che i tempi ai quali è stato effettuato il saggio di senescenza è dipeso dallo stato proliferativo della coltura (ricordiamo che il saggio viene condotto quando si verifica una confluenza cellulare di circa l'80%, paragrafo 4.6, ossia prima che le cellule HUVEC vadano incontro ad un arresto proliferativo da inibizione per contatto), è necessario sottolineare anche che, per assicurare una maggiore fedeltà dei risultati biologici, tutti gli esperimenti realizzati per questo studio sono stati condotti ai primi passaggi, ossia quando le cellule HUVEC presentano un tasso di senescenza fisiologica molto basso. E' infatti noto che la fisiologia delle HUVEC cambia in funzione del numero dei passaggi: ad esempio, la lunghezza e l'attività dei telomeri, che varia in base al numero dei cicli replicativi cellulari, portando ad un accorciamento e a una inibizione dell'attività degli stessi, conduce alla senescenza cellulare e alla morte (Hastings et al.,2004).

La valutazione dell'andamento senescente di cellule endoteliali irraggiate è stato testato per raggi X e diversi tipi di particelle accelerate, in particolare protoni ( $E_{in}= 0,8$  e  $0,6$  MeV), ioni carbonio ( $E_{in} = 13$  e  $6$  MeV) e ioni ossigeno ( $E_{in}=11,4$  MeV); a ciascun esperimento è sempre stato associato un controllo non irraggiato per appurare l'effettivo andamento della senescenza prematura

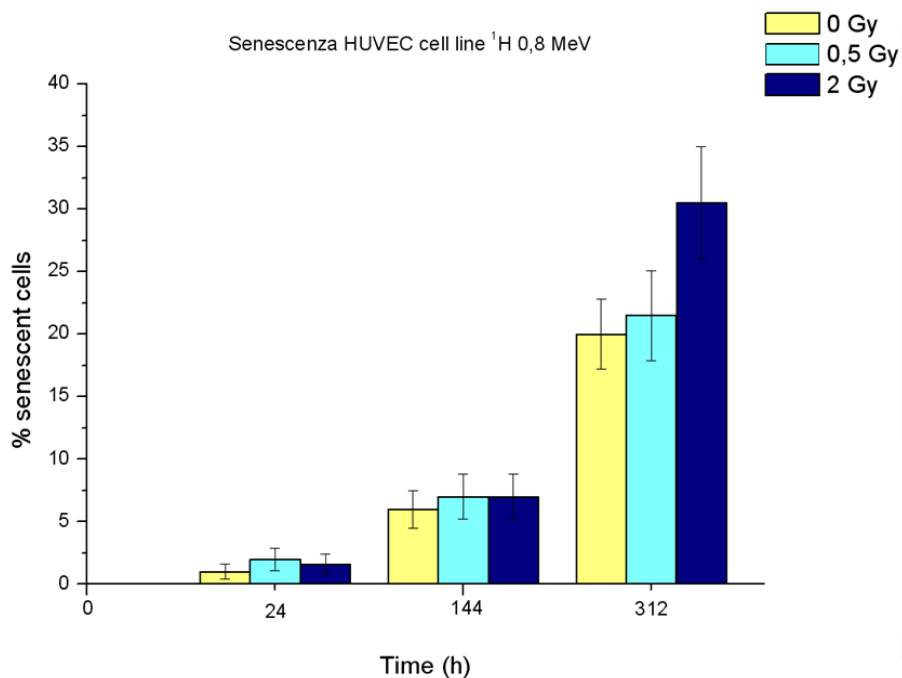
rispetto alla senescenza replicativa ai tempi di saggio. La percentuale di cellule senescenti è stata calcolata su un totale di 300/400 cellule osservate (fig 5.12) ed è stata associata ad un errore espresso come errore standard che segue la legge di propagazione dell'errore (essendo la percentuale legata al rapporto tra le cellule positive al saggio e il totale delle cellule scorate). Le cellule sono state osservate con microscopio in campo chiaro. I risultati ottenuti dallo scoring delle colture irraggiate con i relativi errori sono riportati nelle figure 5.13 e 5.14, che rappresentano rispettivamente i grafici relativi all'andamento della senescenza in seguito ad irraggiamento con raggi X e protoni.



**Fig. 5.12** Cellule senescenti sulle quali è stato effettuato il test della  $\beta$ -galattosidasi.



**Fig. 5.13** Andamento della senescenza in funzione del tempo post-irraggiamento per cellule irraggiate con raggi X a dosi di 0, 0,5 e 2 Gy.



**Fig. 5.14** Andamento della senescenza in funzione del tempo post-irraggiamento per cellule irraggiate con fasci di protoni a  $E_{in}$  0,8 MeV a dosi di 0, 0,5 e 2 Gy.

Un primo approccio nella comprensione della diversa risposta delle cellule a tipi di radiazioni differenti nel tempo, può essere il confronto tra la risposta ai raggi X e ai protoni (0,8 MeV). Dall'analisi preliminare degli istogrammi in figura 5.13 e 5.14, si può apprezzare a colpo d'occhio una risposta alquanto differente tra le cellule irraggiate con raggi X e quelle irraggiate con protoni. Mentre la risposta acuta non risulta in un danno subletale particolarmente apprezzabile per entrambi i tipi di radiazione, nella risposta a breve tempo (riferita al secondo punto temporale di ciascun istogramma) e quella a lungo termine (riferita al terzo punto temporale di ciascun istogramma), presentano una discrepanza.

Nelle cellule irraggiate con raggi X, a 96 ore post-irraggiamento, si assiste ad un incremento notevole delle cellule in senescenza prematura rispetto al controllo non irraggiato, presentando in più una maggiore severità nella percentuale di cellule senescenti provenienti da colture irraggiate a 2 Gy rispetto a quelle irraggiate a 0,5 Gy; a 336 ore lo scenario cambia, presentando un'uniformità della percentuale di cellule senescenti a tutte le dosi e riacquisendo in seguito un incremento della risposta tardiva nei confronti del controllo, anche se con una certa omogeneità tra le percentuali di cellule senescenti provenienti dalle colture irraggiate.

Nelle cellule irraggiate con fasci di protoni (0,8 MeV) non si assiste ad un incremento della senescenza prematura in tempi brevi post-irraggiamento (144 ore), ma ad un'uniformità dell'andamento delle cellule senescenti per tutti i campioni. Durante la risposta tardiva (312 ore) la percentuale di cellule senescenti delle colture irraggiate a 2 Gy aumenta rispetto a quelle irraggiate a 0,5 Gy che rimane invece abbastanza simile al controllo.

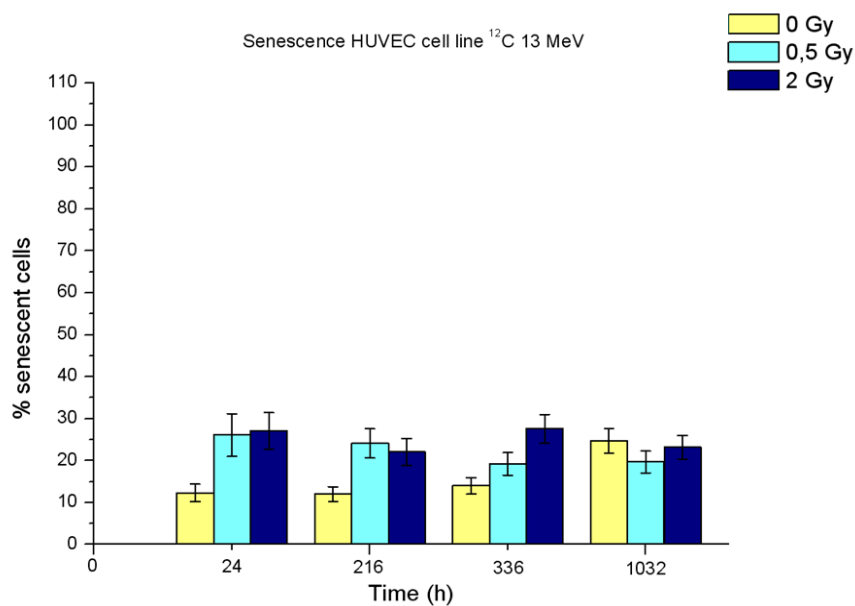
L'andamento della risposta a breve termine proposto dai due istogrammi ci porta a confermare quanto detto per le curve di sopravvivenza per raggi X e protoni. A basse dosi per i protoni abbiamo un effetto letale più severo che per i raggi X dovuto al tamponamento da parte dei sistemi riparativi che agiscono nelle cellule interessate dai raggi X e che permettono alle cellule di sopravvivere.

Il fatto di rimanere vitale, non garantisce però alla cellula di funzionare correttamente, infatti i sistemi riparativi possono riparare erroneamente il DNA inducendo potenzialmente lo stato senescente. Nelle cellule irraggiate con protoni, le cellule maggiormente danneggiate muoiono, lasciando poco spazio a quelle che hanno subito danno riparabile/mal riparato che può condurre le cellule in senescenza prematura. Da ciò si evince quindi che la maggior frazione di sopravvissuti provenienti da colture irraggiate con raggi X va più facilmente in contro a senescenza rispetto a quella proveniente da colture irraggiate con protoni, dove la maggiore severità del danno determina morte cellulare piuttosto che danno mal riparato e senescenza prematura.

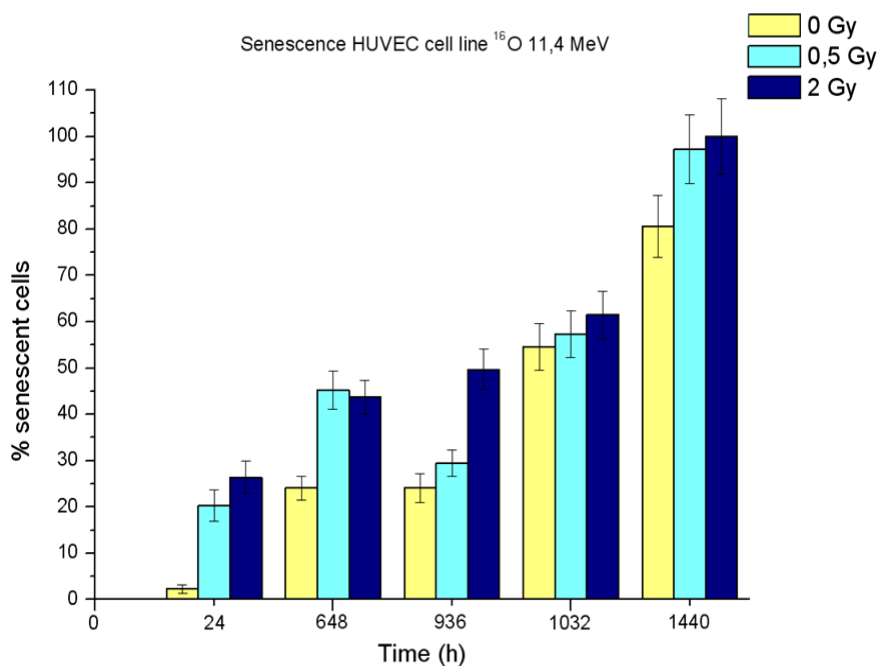
Per quanto riguarda la risposta tardiva invece, le cellule irraggiate con raggi X, dopo una fase di stallo in cui la senescenza prematura sembra non pesare più di quella replicativa sulle popolazioni cellulari, riprendono l'incremento della senescenza prematura radioindotta, a differenza delle cellule irraggiate con protoni (in particolare quelle a 2Gy) che subito dopo la risposta a breve termine, presentano un incremento nella percentuale di cellule in senescenza prematura, mettendo in evidenza una maggiore propensione, da parte di queste cellule, alla risposta tardiva. E' interessante comunque notare come, nella risposta tardiva, la percentuale di cellule senescenti dopo esposizione ai protoni sia significativamente maggiore di quella dopo raggi X.

Una cosa che risulta interessante, è il confronto tra l'andamento della senescenza in popolazioni cellulari interessate dall'interazione con particelle ad altissimo LET, ossia ioni carbonio ( $E_{in} = 13$  MeV e  $LET = 726$  keV/ $\mu$ m) (fig. 5.15) e ioni ossigeno ( $E_{in} = 11,4$  MeV e  $LET = 1300$  keV/ $\mu$ m) (fig. 5.16).





**Fig. 5.15** Andamento della senescenza in funzione del tempo post-irraggiamento per cellule irraggiate con fasci di ioni carbonio a  $E_{in}$  13 MeV a dosi di 0, 0,5 e 2 Gy.



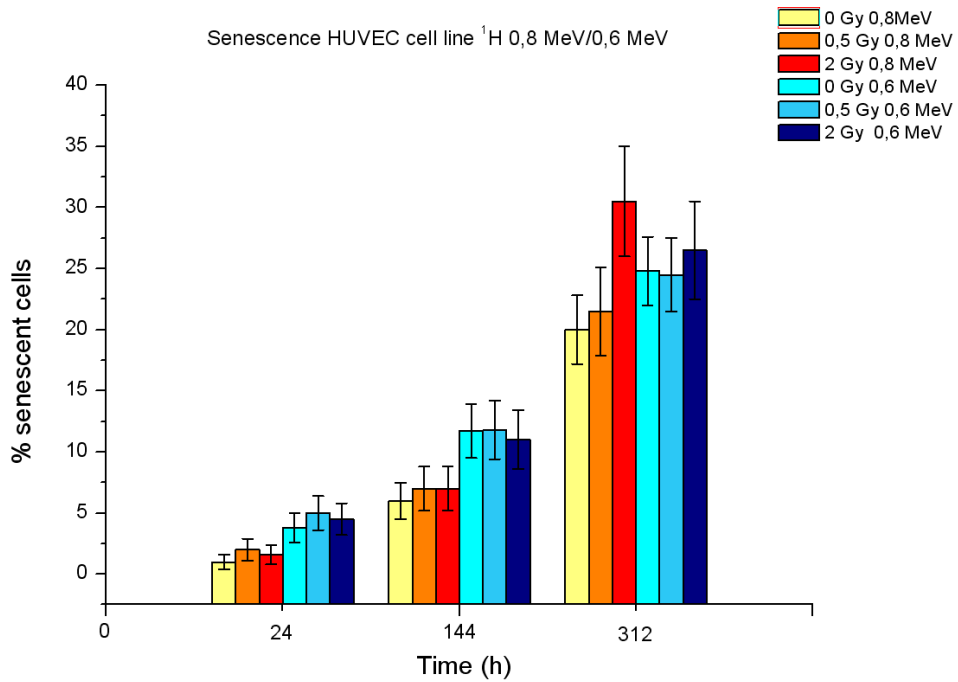
**Fig. 5.16** Andamento della senescenza in funzione del tempo post-irraggiamento per cellule irraggiate con fasci di ioni ossigeno a  $E_{in}$  11,4 MeV a dosi di 0, 0,5 e 2 Gy.

Quando nel paragrafo 5.2.1 si è parlato dell'RBE di particelle ad altissimo LET, si è detto che esse hanno un potenziale simile a quello dei raggi X. Se questo è vero per gli effetti letali però quello che si evince dai grafici ci fa ricredere sull'incidenza degli effetti subletali.

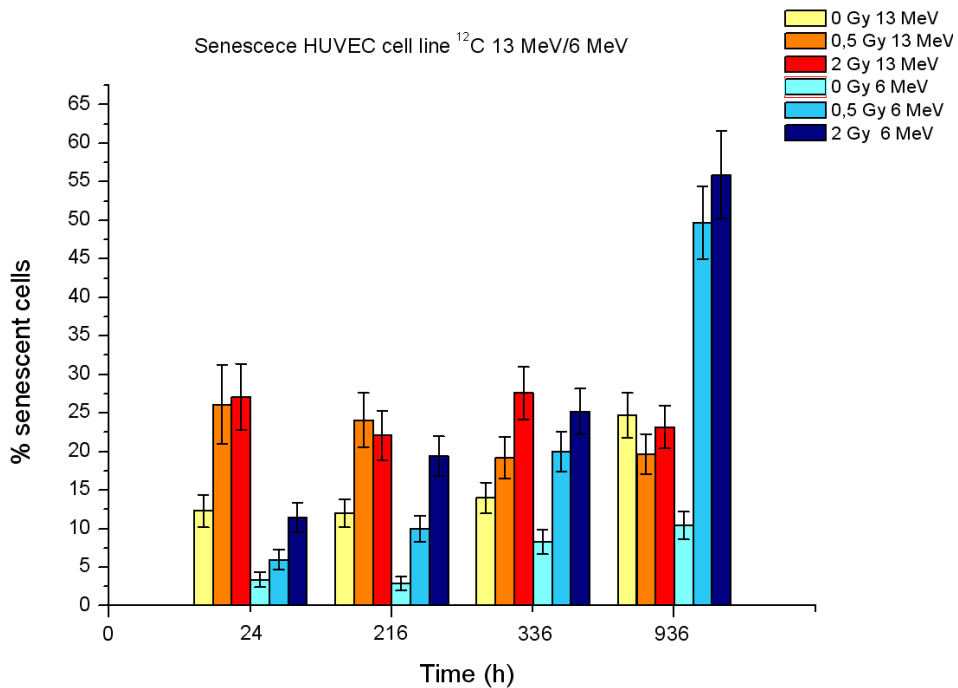
Volendo confrontare i valori della senescenza prematura indotta da ioni carbonio rispetto ai raggi X, notiamo infatti risposta acuta estremamente pronunciata che viene mantenuta anche nella risposta a ioni ossigeno.

Nel confronto tra le risposte a ioni ossigeno e ioni carbonio si può osservare già da subito una differenza nell'andamento: mentre dopo la risposta acuta, negli ioni carbonio la percentuale di cellule in senescenza prematura rimane pressoché costante nel tempo fino ad uniformarsi con la percentuale di cellule in senescenza replicativa, negli ioni ossigeno la risposta è lineare ed aumenta all'aumentare del tempo post-irraggiamento. Questo ci dimostra come ioni diversi anche se entrambi ad altissimo LET e ad energie comparabili, possano però indurre effetti tardivi di diversa severità e soprattutto con andamenti differenti.

Infine risulta utile la comparazione degli effetti tardivi legati all'esposizione di una stessa particella (protoni e carbonio) ma a differenti energie (fig. 5.17 e 5.18).



**Fig. 5.17** Confronto dell'andamento della senescenza in funzione del tempo post-irraggiamento per cellule irraggiate con fasci di protoni a  $E_{in}$  0,8 MeV (serie arancio) e 0,6 MeV (serie blu) a dosi di 0, 0,5 e 2 Gy.



**Fig. 5.18** Confronto dell'andamento della senescenza in funzione del tempo post-irraggiamento per cellule irraggiate con fasci ioni carbonio a  $E_{in}$  13 MeV (serie arancio) e 6 MeV (serie blu) a dosi di 0, 0,5 e 2 Gy.

Quando si è parlato della sopravvivenza cellulare, si è visto che sia per i protoni che per il carbonio, la differenza di energia nell'ambito dello stesso fascio non ha particolare incidenza sugli effetti della risposta letale. Nel caso della senescenza, e quindi di un effetto subletale, quanto detto è valido per i protoni, ma non per gli ioni carbonio.

L'istogramma presentato in fig. 5.17 mette in evidenza il fatto che protoni a diversa energia, non hanno una diversa efficacia nell'induzione della senescenza prematura, e che la progressione della senescenza non solo segue un andamento simile, ma in entrambi i casi i valori della senescenza replicativa del controllo sono uniformi ai valori presentati dalle cellule irraggiate. Per gli ioni carbonio (fig. 5.18) l'induzione della senescenza prematura è diversificata nei fasci di energia diversa. Già in fig. 5.15 si era visto che fascio di ioni carbonio ad  $E_{in}$  di 13 MeV produce un andamento costante della senescenza prematura dopo una severa risposta acuta, ma quello che si evince dalla fig. 5.17 è che ioni carbonio con  $E_{in}$  di 6 MeV hanno un andamento lineare progressivo: dopo una risposta acuta che presenta un maggiore incremento della senescenza per cellule irraggiate a 2 Gy rispetto a quelle irraggiate a 0,5 Gy (che comunque presentano senescenza prematura rispetto al controllo), la percentuale di cellule in senescenza prematura aumenta progressivamente mantenendo tale disparità. L'andamento della senescenza presentato da cellule irraggiate con carbonio a 6 MeV, porta tali popolazioni cellulari ad un raggiungimento rapido di elevate percentuali di cellule senescenti, se confrontato alla percentuali di senescenza raggiunte negli stessi tempi da cellule irraggiate a 13 MeV. L'andamento assunto da queste popolazioni cellulari potrebbe di fatto essere paragonato all'andamento osservato per gli ioni ossigeno (fig. 5.16), facendo ipotizzare che dato che gli ioni carbonio ad  $E_{in}$  pari a 6 MeV hanno un LET più alto ( $934 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ) di quelli ad  $E_{in}$  di 13 MeV ( $726 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ) e che anche gli ioni ossigeno presentano un LET molto elevato ( $1300 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ), il LET della radiazione abbia un forte impatto sull'andamento della senescenza nelle popolazioni irraggiate.

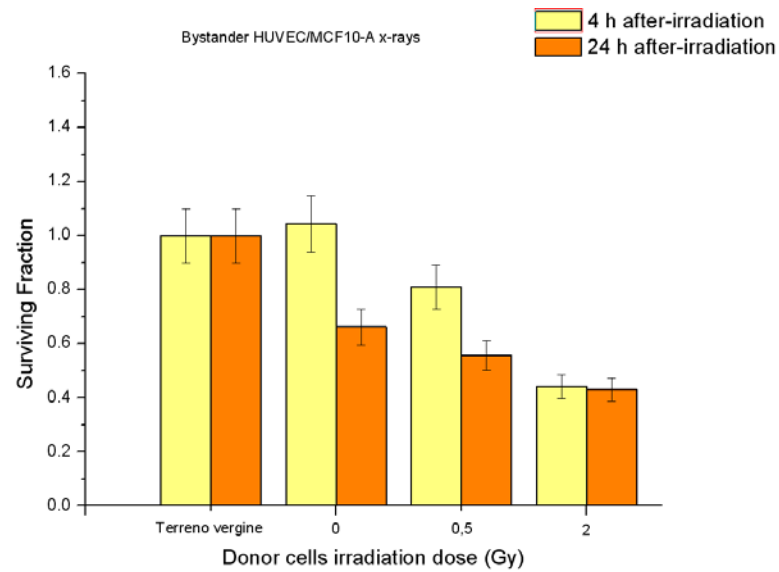
Il fatto che le cellule irraggiate da ioni carbonio ad  $E_{in}$  di 6 MeV presentino un andamento della senescenza prematura relativamente rapido e così accentuato, ha spinto l'interesse alla comprensione degli effetti che queste cellule possono avere nel tempo sui tessuti. Nel prossimo paragrafo quindi verranno affrontati i risultati relativi all'effetto bystander di queste cellule su tessuti epiteliali normali e tumorali.

#### **5.4 Valutazione degli effetti bystander di cellule endoteliali irraggiate su cellule epiteliali non irraggiate**

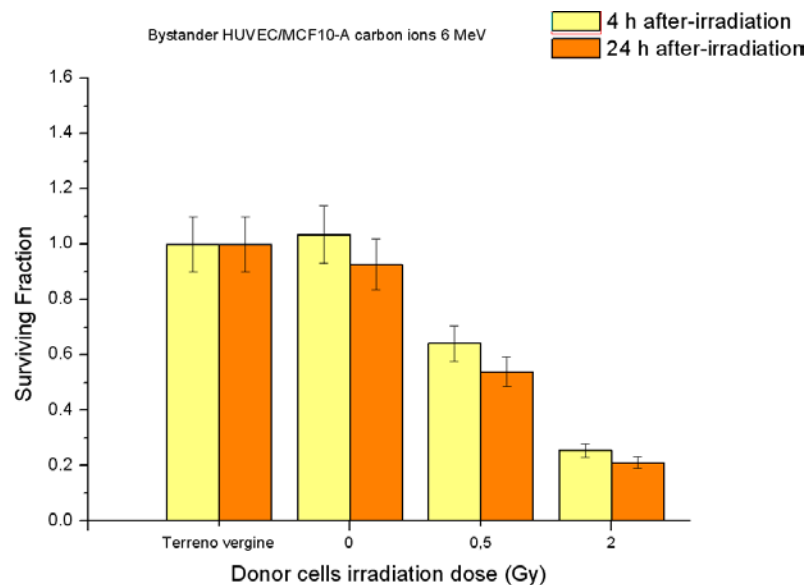
Quello che si è cercato di dimostrare con la progettazione dell' esperimento di transfer medium qui descritto, è la possibilità che, nel tempo, cellule endoteliali irraggiate (HUVEC) e che successivamente entrano in senescenza prematura, possano esercitare per effetto bystander una serie di effetti negativi sui tessuti circostanti (paragrafo 3.4), nel nostro caso simulati per mezzo di colture di cellule epiteliali di mammella normali (MCF10A) e tumorali (MCF7). L'effetto indotto dal terreno proveniente dalle HUVEC irraggiate con ioni carbonio ( $E_{in}$  6 MeV) e raggi X su MCF10A ed MCF7 è stato espresso sotto forma di frazione di sopravvissuti associato ad un errore definito come errore standard (equazione 5.1).

Il primo approccio per comprendere l'andamento degli effetti bystander è stato quello di testare gli effetti acuti post-irraggiamento a 4 e 24 ore dall'irraggiamento. Ciascun esperimento di transfer medium è stato eseguito per terreni provenienti da cellule irraggiate a 0,5 e 2 Gy e da un controllo a 0 Gy, e per un controllo in cui il terreno non proveniva da un precedente contatto con cellule (terreno vergine) (paragrafo 4.7). I risultati sono riportati negli istogrammi nelle figure 5.19 - 5.22.

### 5.4.1 Effetto bystander acuto sulla linea cellulare MCF10A



**Fig. 5.19** Effetto Bystander di cellule HUVEC su cellule MCF10A, in seguito ad irraggiamento con raggi X. Sull'asse y è indicata la SF delle cellule accettrici del terreno (MCF10A) mentre sull'asse x sono indicate le dosi di irraggiamento delle cellule donatrici del terreno (HUVEC).



**Fig. 5.20** Effetto Bystander di cellule HUVEC su cellule MCF10A, in seguito ad irraggiamento con fasci di ioni carbonio  $E_{in}$  6 MeV. Sull'asse y è indicata la SF delle cellule accettrici del terreno (MCF10A) mentre sull'asse x sono indicate le dosi di irraggiamento delle cellule donatrici del terreno (HUVEC).

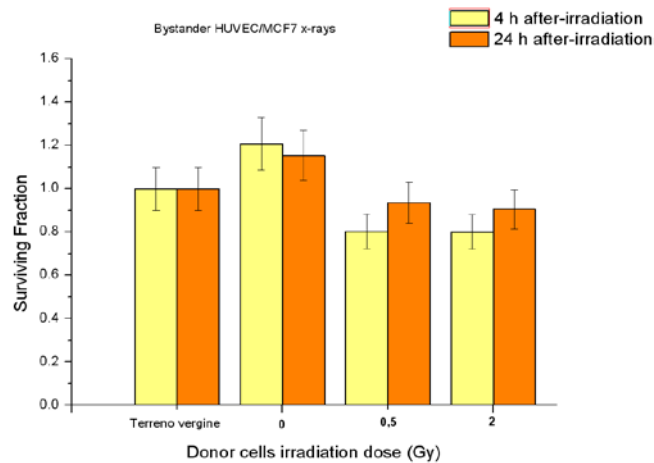
Ciò che si evince dall'analisi degli istogrammi in figura 5.19 e 5.20, è che la linea cellulare MCF10A risente dell'effetto bystander acuto per entrambi i tipi di radiazione.

Cellule HUVEC irradiate con raggi X (fig. 5.19), a 4 ore post-irraggiamento inducono un calo della SF delle MCF10A nell'ordine di circa il 20% per la dose 0,5 Gy e del 50% per la dose 2 Gy. A 24 ore post-irraggiamento l'effetto del terreno HUVEC sulla SF delle MCF10A è meno drastico se confrontato con il controllo a 0 Gy: già con terreno proveniente da cellule non irradiate, si assiste ad un calo della SF di circa il 30%, cosa che farebbe pensare ad un accumulo intrinseco di metaboliti di scarto dannosi nel terreno. Ciò nonostante, il controllo realizzato per il bystander del carbonio, non presenta una tale percentuale nel calo della sopravvivenza, facendo immaginare che nel caso del controllo realizzato per i raggi X, la frazione di sopravvissuti osservata potrebbe semplicemente derivare da condizioni di coltura non ottimali. In ogni caso, normalizzando i valori di sopravvivenza ottenuta per terreni provenienti da cellule irradiate, nel confronto delle SF osservate a 4 ore, si assiste ad un ulteriore calo della frazione di sopravvissuti per la dose a 0,5 Gy, ma non ci sono particolari differenze per la dose a 2 Gy.

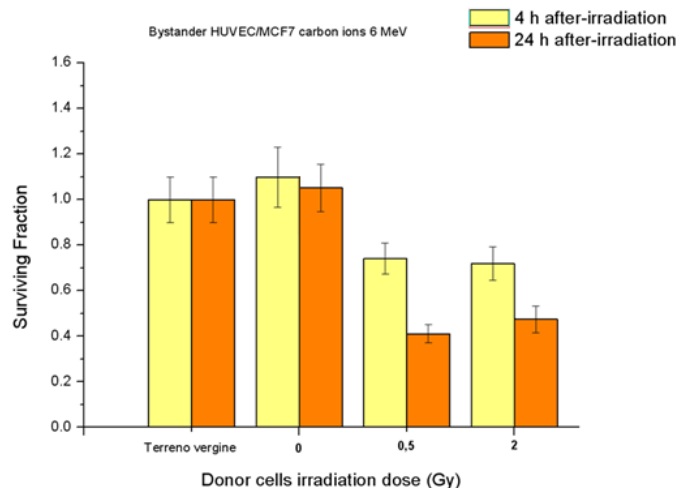
Nel caso di terreno proveniente da cellule HUVEC irradiate con ioni carbonio (fig. 5.20), a 4 ore post-irraggiamento l'andamento degli effetti sulla sopravvivenza delle MCF10A, a 0 e 0,5 Gy è qualitativamente simile a quello osservato in figura 5.19; a 2 Gy si assiste ad una diminuzione della SF che è maggiore di quanto osservato nel caso dei raggi X, scendendo solo al 20% nel caso di terreno proveniente da HUVEC irradiate con 2Gy da ioni carbonio. A 24 ore post-irraggiamento l'effetto del terreno HUVEC sulla SF delle MCF10A mantiene un andamento simile, anche se leggermente più severo, a quello osservato a 4 ore. Nel loro complesso, questi dati suggeriscono una maggiore efficacia degli ioni carbonio nell'induzione di danni *non-targeted* su cellule non direttamente irradiate, sia per raggi X che per ioni carbonio, con un effetto più accentuato nel caso di questi ultimi.

## 5.4.2 Effetto bystander acuto sulla linea cellulare MCF7

Lo scenario dell'effetto bystander cambia enormemente per quanto riguarda le cellule epiteliali tumorali (MCF7).



**Fig. 5.21** Effetto Bystander di cellule HUVEC su cellule MCF7, in seguito ad irraggiamento con raggi X. Sull'asse y è indicata la SF delle cellule accettrici del terreno (MCF7) mentre sull'asse x sono indicate le dosi di irraggiamento delle cellule donatrici del terreno (HUVEC).



**Fig. 5.22** Effetto Bystander di cellule HUVEC su cellule MCF7, in seguito ad irraggiamento con fasci di ioni carbonio  $E_{in} 6$  MeV. Sull'asse y è indicata la SF delle cellule accettrici del terreno (MCF7) mentre sull'asse x sono indicate le dosi di irraggiamento delle cellule donatrici del terreno (HUVEC).



Nel caso di terreno proveniente da cellule HUVEC irraggiate con raggi X (fig. 5.21), sia a 4 che a 24 ore post-irraggiamento, per entrambe le dosi di irraggiamento e per il controllo, la sopravvivenza delle MCF7 non decresce come nel caso di delle cellule normali, ma si nota addirittura un innalzamento della sopravvivenza a 24 ore rispetto a 4 ore.

Nel caso di terreno proveniente da cellule HUVEC irraggiate con ioni carbonio (fig. 5.22), si assiste ad un deciso effetto sulla sopravvivenza clonogenica delle MCF7, sia che il terreno sia trasferito 4 che 24 ore dopo l'irraggiamento in misura maggiore rispetto al caso dell'irraggiamento con X, anche se non si nota differenza fra le dosi (a differenza degli effetti osservati sulle MCF10A in cui la dose influisce sulla severità della diminuzione della SF). Questi dati indicherebbero che l'effetto bystander sulla sopravvivenza di cellule tumorali in seguito a raggi X è decisamente minore rispetto a quello osservato con terreno da cellule endoteliali esposte a gli ioni carbonio: quindi, questi ultimi sembrerebbero in qualche modo maggiormente implicati nella letalità non-targeted su cellule tumorali, anche se con misura e modalità diversa da quelle osservate per gli effetti su cellule epiteliali normali.

La diversità delle risposte acute potrebbe essere sintomo della diversità biologica intrinseca delle cellule epiteliali considerate: le MCF7 sono cellule tumorali che, per definizione, sono maggiormente resistenti all'apoptosi e alla morte cellulare rispetto a cellule normali, quindi probabilmente anche maggiormente resistenti ai fattori letali prodotti da cellule endoteliali irraggiate.

Il fatto che per entrambe le linee cellulari considerate in qualche modo il trattamento delle HUVEC con ioni carbonio abbia fatto riscontrare una maggiore letalità sulle cellule epiteliali rispetto a quando la stessa linea cellulare è stata irraggiata con raggi X, potrebbe essere correlato alla maggiore efficacia delle particelle accelerate nell'induzione di cluster di danno. Tali cluster sono consistenti, difficilmente riparabili rispetto ai danni indotti dalla radiazione a basso LET (raggi X): se e quando riparati, essi potrebbero essere stati mal riparati e potrebbero originare geni mutati dai quali vengono prodotti fattori aberranti e

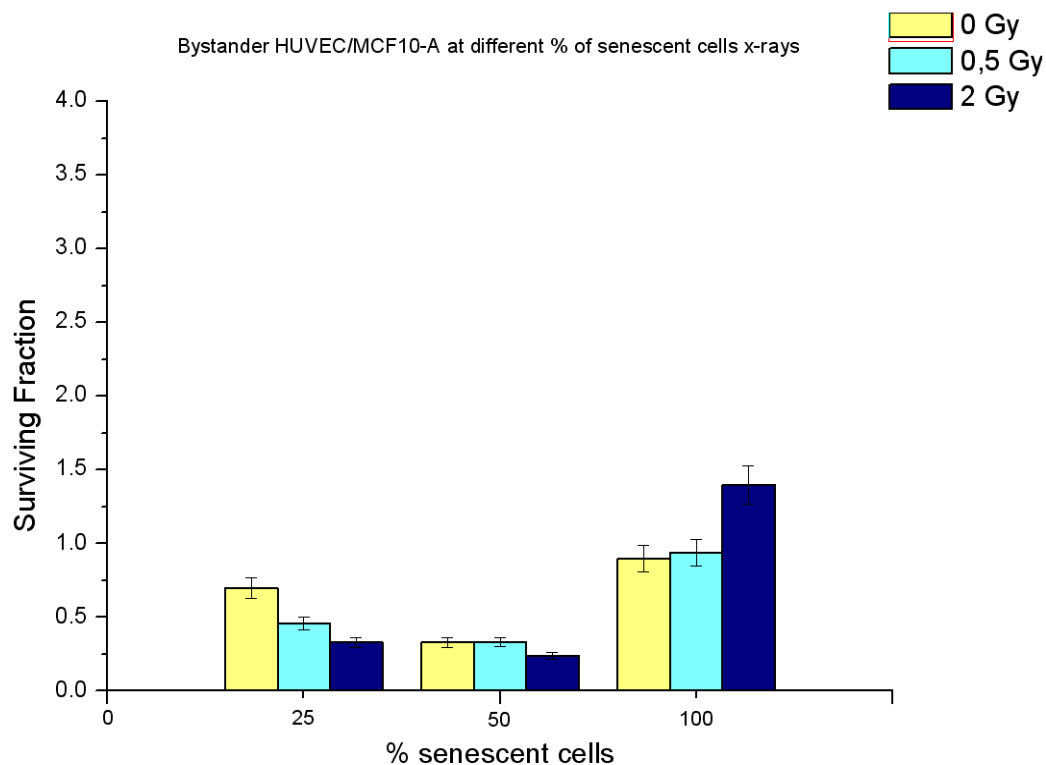
letali; il tutto in maggiore misura e con probabile diversa qualità dei fattori prodotti. E' infatti vero che le cellule esposte al terreno non sono state ovviamente attraversate da queste particelle e quindi interessate da questo tipo di danno, ma è possibile che, in risposta ad un danno tanto più severo rispetto a quello indotto dai raggi X, le cellule direttamente colpite (donatrici del terreno nei nostri esperimenti) subiscano anche una serie di danni indiretti, tipo innalzamento dei livelli di stress ossidativo, magari come conseguenza dell'attivazione dei sistemi di riparazione, che si trasmette nel mezzo di coltura e quindi sulle cellule accettrici. Il fatto che tale stress sia maggiore nel caso di danno di maggiore entità è un'ipotesi che spiegherebbe i nostri risultati.

#### 5.4.3 Effetto bystander e senescenza: risposta tardiva sulla linea cellulare MCF10A

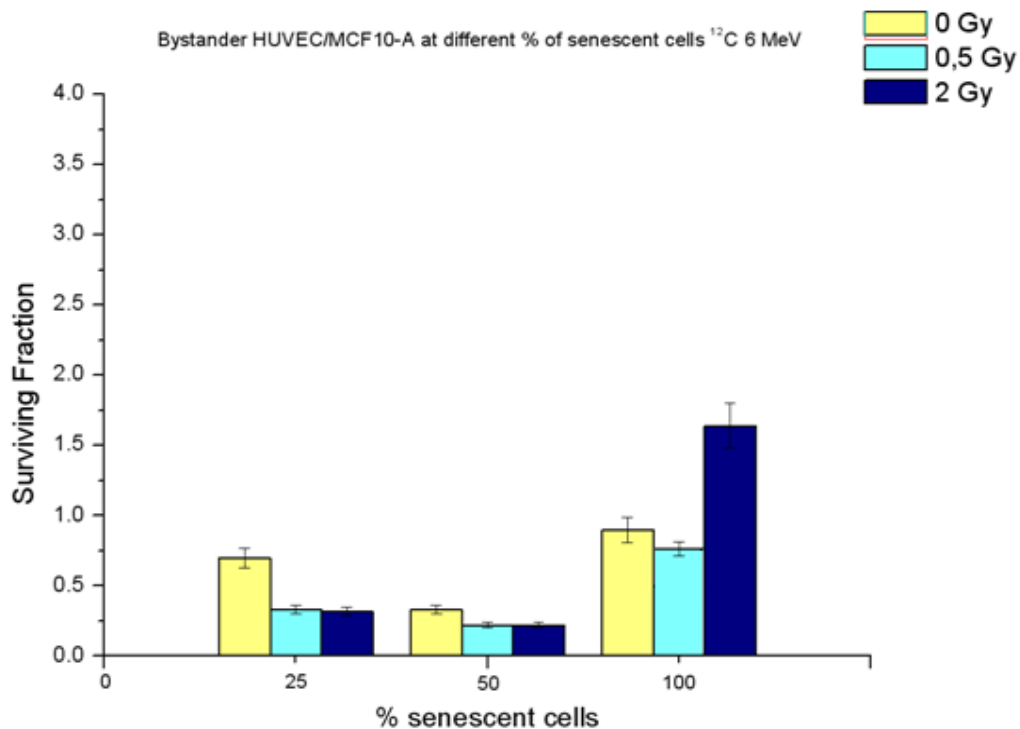
Nel caso della risposta delle cellule HUVEC ai diversi tipi di radiazione ionizzante usati in questo lavoro di tesi, si è notata una spiccata induzione di senescenza cellulare prematura, tipica della SIPS (Stress-induced Premature Senescence), con una chiara dipendenza di questo effetto sia dalla qualità della radiazione che dal tempo (vedi paragrafo 5.3).

Come discusso nel paragrafo 3.3, le cellule che entrano in senescenza, sia fisiologica che indotta da insulti esterni (danni subletali) acquisiscono un pattern secretorio proprio del loro stato, che potenzialmente può esprimersi in una pletera di effetti diversi. Mentre nei paragrafi precedenti abbiamo esaminato l'effetto bystander acutamente indotto dall'irraggiamento di cellule HUVEC sulla sopravvivenza clonogenica di cellule normali o tumorali, qui si è voluto indagare l'effetto che cellule HUVEC, testate a tempi diversi e quindi su colture che esprimevano percentuali crescenti di senescenza, hanno sulla sopravvivenza e sulla proliferazione, e se a parità di percentuali di cellule senescenti donatrici, l'effetto indotto da cellule in senescenza replicativa sia simile a quello indotto da cellule in senescenza prematura radioindotta.

I grafici nelle figure 5.23 - 5.26 mostrano gli effetti bystander esercitati da HUVEC in senescenza (replicativa 0 Gy e prematura 0,5 e 2 Gy) a percentuali di senescenza del 25, 50 e 100%.



**Fig. 5.23** Effetto bystander di cellule HUVEC a percentuali crescenti di cellule in senescenza su cellule MCF10A. Sull'asse y è indicata la SF delle cellule accettrici del terreno (MCF10A) mentre sull'asse x sono indicate le percentuali di senescenza delle cellule donatrici del terreno (HUVEC). Le colonne gialle rappresentano la risposta delle MCF10A a terreno proveniente da popolazioni cellulari HUVEC non irradiate (0 Gy) e quindi in senescenza replicativa; le colonne azzurre e blu rappresentano la risposta delle MCF10A a terreno proveniente da popolazioni cellulari HUVEC irradiate con raggi X rispettivamente a 0,5 e 2 Gy e quindi in senescenza prematura radioindotta.



**Fig. 5.24** Effetto bystander di cellule HUVEC a percentuali crescenti di cellule in senescenza su cellule MCF10A. sull'asse y è indicata la SF delle cellule accettrici del terreno (MCF10A) mentre sull'asse x sono indicate le percentuali di senescenza delle cellule donatrici del terreno (HUVEC). Le colonne gialle rappresentano la risposta delle MCF10A a terreno proveniente da popolazioni cellulari HUVEC non irradiate (0 Gy) e quindi in senescenza replicativa; le colonne azzurre e blu rappresentano la risposta delle MCF10A a terreno proveniente da popolazioni cellulari HUVEC irradiate con fasci di ioni carbonio rispettivamente a 0,5 e 2 Gy e quindi in senescenza prematura radioindotta.

L'analisi dell'effetto bystander di cellule HUVEC, a percentuali differenti di senescenza, su cellule epiteliali normali, mostra risultati interessanti. In primo luogo, analizziamo ciò che accade quando le cellule donatrici del terreno raggiungono percentuali di cellule senescenti pari al 25%.

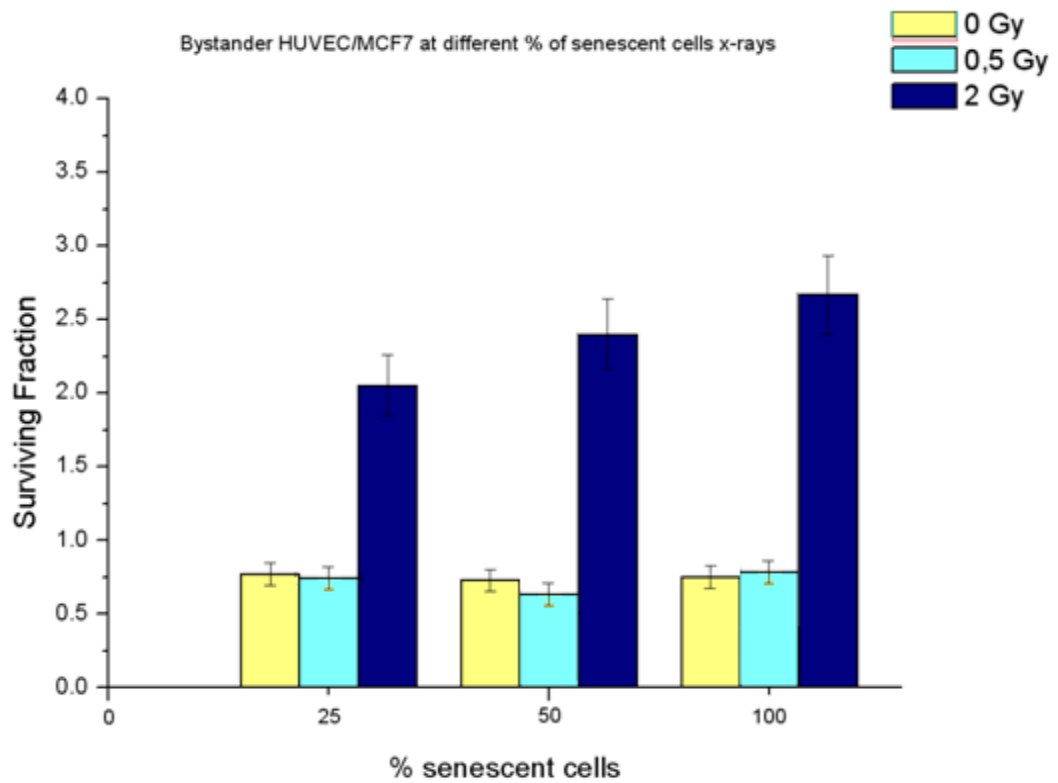
Al 25% di cellule senescenti, sia che il terreno provenga da cellule irradiate con raggi X, sia che provenga da cellule irradiate con ioni carbonio, quello che si osserva è un calo della SF delle MCF10A rispetto all'effetto prodotto dal terreno proveniente da cellule non irradiate. Ciò che caratterizza in questa fase la

differenza di radiazione impiegata è che mentre il terreno proveniente da cellule irraggiate a 2 Gy produce un effetto simile per i due tipi di radiazioni (una sopravvivenza di circa il 30% delle MCF10A), quello proveniente da cellule che hanno ricevuto una dose di 0,5 Gy di raggi X producono un effetto minore e più vicino ai valori di sopravvivenza indotti dallo 0 Gy. Tale andamento si ripropone anche a percentuali di senescenza del 50 e del 100%.

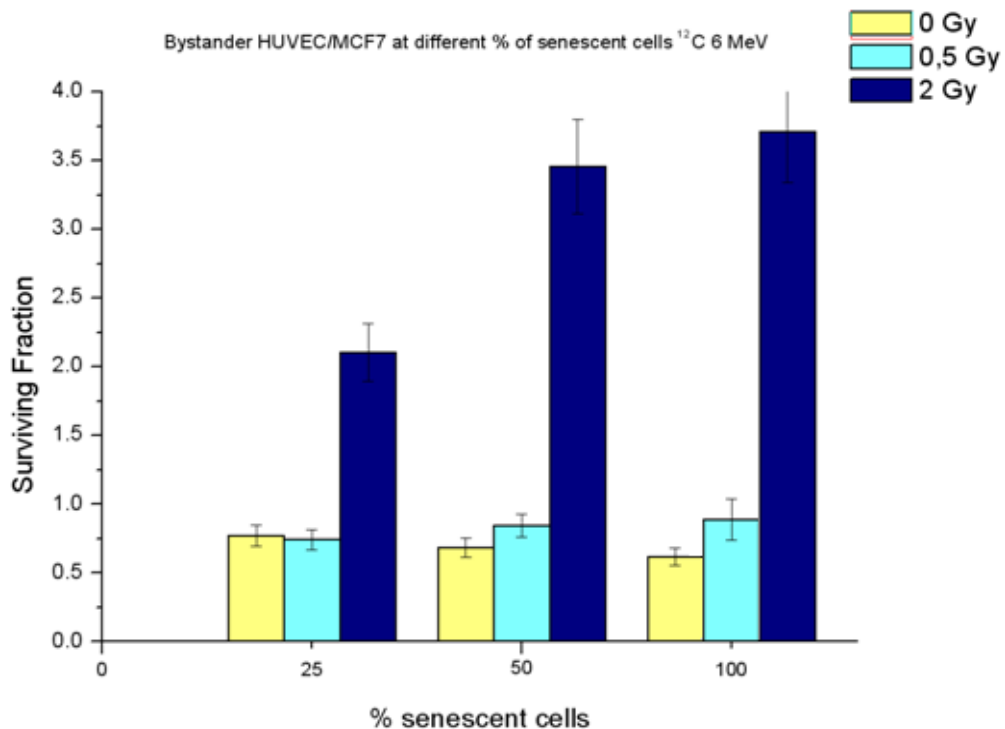
Tuttavia, la sopravvivenza a tutte le dosi e per entrambi i tipi di radiazione, quando esaminata in cellule esposte al terreno proveniente da colture di HUVEC al 100% di senescenza, presenta un generale incremento nella frazione dei sopravvissuti che per i 2 Gy arriva a superare 1 (vale a dire, il valore massimo normalizzato per l'efficienza di piastramento). Tale incremento nella sopravvivenza cellulare induce a pensare che i fattori prodotti da cellule endoteliali in condizioni di senescenza prematura radioindotta al 100%, svolgano un effetto *pro-survival* stimolando la proliferazione di cellule epiteliali normali. Ciò che si deve capire è se tale iperproliferazione sia in qualche modo legata a, o possa risultare a lungo termine in, trasformazione cellulare. Le considerazioni fatte mettono in luce il fatto che la risposta delle cellule epiteliali normali in relazione all'aumento della percentuale di senescenza di cellule endoteliali irraggiate è dipendente dalla dose di irraggiamento, ma sottolinea anche la concreta possibilità che, al di là dei fattori normalmente prodotti dalle cellule in senescenza replicativa, i fattori prodotti da cellule in senescenza prematura abbiano un effetto proprio sulla sopravvivenza e sulla proliferazione di cellule non irraggiate.

#### 5.4.4 Effetto bystander e senescenza: risposta tardiva sulla linea cellulare MCF7

Abbiamo testato il possibile effetto bystander di cellule HUVEC, irraggiate o non e a percentuali differenti di senescenza, su cellule epiteliali tumorali. I risultati sono esposti negli istogrammi in figura 5.25 e 5.26.



**Fig. 5.25** Effetto bystander di cellule HUVEC a percentuali crescenti di cellule in senescenza su cellule MCF7. sull'asse y è indicata la SF delle cellule accettrici del terreno (MCF7) mentre sull'asse x sono indicate le percentuali di senescenza delle cellule donatrici del terreno (HUVEC). Le colonne gialle rappresentano la risposta delle MCF7 a terreno proveniente da popolazioni cellulari HUVEC non irraggiate (0 Gy) e quindi in senescenza replicativa; le colonne azzurre e blu rappresentano la risposta delle MCF7 a terreno proveniente da popolazioni cellulari HUVEC irraggiate con raggi X rispettivamente a 0,5 e 2 Gy e quindi in senescenza prematura radioindotta.



**Fig. 5.26** Effetto bystander di cellule HUVEC a percentuali crescenti di cellule in senescenza su cellule MCF7. sull'asse y è indicata la SF delle cellule accettrici del terreno (MCF7) mentre sull'asse x sono indicate le percentuali di senescenza delle cellule donatrici del terreno (HUVEC). Le colonne gialle rappresentano la risposta delle MCF7 a terreno proveniente da popolazioni cellulari HUVEC non irraggiate (0 Gy) e quindi in senescenza replicativa; le colonne azzurre e blu rappresentano la risposta delle MCF7 a terreno proveniente da popolazioni cellulari HUVEC irraggiate con fasci di ioni carbonio

I risultati ottenuti mettono in evidenza la possibilità che gli effetti riscontrati si traducano in un vantaggio della proliferazione, forse legati all'attività dei fattori che compongono il secretoma delle cellule senescenti, e che tali fattori non solo sono legati alla senescenza prematura radioindotta ma sono anche dose dipendenti.

Confrontando gli istogrammi in figura 5.25 e 5.26, si può notare che la sopravvivenza delle MCF7 trattate con terreni provenienti da HUVEC al 25, 50 e 100% di senescenza, non irraggiate o irraggiate con 0,5 Gy per entrambi i tipi di radiazione, è depressa e rimane costante per le 3 percentuali.

Il risultato interessante, è quello ottenuto dal trattamento delle cellule tumorali con terreni provenienti da HUVEC irraggiate a 2 Gy. Differentemente dalle cellule epiteliali normali, quelle tumorali hanno mostrato un notevole aumento della sopravvivenza (di base molto superiore ad 1), che aumenta al crescere della percentuale di cellule in senescenza prematura donatrici del terreno. Questo accade sia quando le cellule donatrici sono trattate con raggi X sia quando sono trattate con ioni carbonio, con un incremento ancor maggiore della SF nel secondo caso.

Questo fa pensare che le cellule endoteliali in senescenza prematura precedentemente irraggiate a dosi di 2 Gy, ma non quelle irraggiate a 0,5 Gy o quelle a 0 Gy, producano dei fattori in grado di influenzare positivamente la proliferazione di cellule tumorali epiteliali.

Ulteriori analisi quantitative, di tipo biomolecolare e di espressione genica, sono necessarie per investigare l'entità della proliferazione cellulare osservata sia per le MCF10A che per le MCF7.

## **5.5 Analisi qualitativa dello spettro di aberrazioni cromosomiche indotte da particelle cariche in cellule epiteliali normali**

Uno degli effetti subletali maggiormente studiato è l'induzione delle aberrazioni cromosomiche. Lo spettro di aberrazioni cromosomiche che si può riscontrare in seguito ad irraggiamento può essere talvolta complesso, soprattutto in seguito ad irraggiamento con particelle cariche ad alto LET, e richiede un'accurata analisi. L'mFISH è un'applicazione decisamente congeniale a tali tipi di studio perché consente la rivelazione di una molteplicità di scambi complessi, tipici di questo tipo di radiazione, e che sono normalmente sottostimati nell'analisi con FISH a cromosoma intero diretta a due o tre coppie di cromosomi omologhi.

Durante questo lavoro di tesi, l'approccio ad una nuova linea cellulare (MCF10A) nello studio degli effetti di ioni pesanti su cellule umane, ha richiesto



l'ottimizzazione dei protocolli sperimentali dell'mFISH utilizzati in passato per i linfociti, nonché il training del programma ISIS per l'elaborazione dei risultati (paragrafo 4.5.1). I tempi impiegati per tali operazioni si sono rivelati molto lunghi e hanno lasciato poco spazio ad un'analisi quantitativa completa dei campioni irraggiati. I dati di seguito presentati devono essere quindi considerati come preliminari e puramente qualitativi.

L'analisi è stata condotta su campioni di cellule MCF10A irraggiate in posizione P1 della curva di Bragg per l'ossigeno (paragrafo 4.3) per 1 e 2,5 Gy, oltre che sul controllo (0 Gy). Per ogni dose sono state analizzate 40 metafasi. Mentre a 0 Gy, come ci si può aspettare, non sono state riscontrate aberrazioni, l'analisi dei campioni irraggiati ha messo in luce una serie di eventi di ricombinazione alquanto interessanti, soprattutto nei campioni irraggiati a 2,5 Gy. In particolare, per campioni irraggiati a 1 Gy sono state riscontrate 28 metafasi aberranti, laddove per campioni irraggiati a 2,5 Gy sono state individuate ben 35 metafasi aberranti.

I risultati delle analisi dei campioni irraggiati ad 1 Gy sono riportati nella tabella 5.2, mentre i risultati dell'analisi dei campioni a 2,5 Gy, a causa della loro complessità, sono riportati in tre diverse tabelle, 5.3 - 5.5.

M 2 DSB	M 3 DSB	M 4 DSB	M 6 DSB	N° di break / cromosoma	Cromosomi coinvolti	Tipo di aberrazione
18				1	1. 8, 12 2. 9, 22 3. 3, 18 4. 7, 17 5. 16, 22 6. 8, 18 7. 5, 6 8. 5, 10 9. 2, 5 10. 8, 10 11. 4, 19 12. 1, 4 13. 1, 8  14. 1, 4  15. 9, X 16. 6, 10 17. 5, 10 18. 1, 13	1. t(8;12) 2. t(19;22) 3. t(3;18) 4. t(7;17) 5. t(16;22) 6. t(8;18) 7. t(5;6) 8. t(5;10) 9. t(2;5) 10. t(8;10) 11. t(4;19) 12. t(1;4) 13. del 1 + ace1 del 8 + ace8 14. del 1 + ace1 del 4 + ace4 15. t(9;X) 16. t(6;10) 17. t(5;10) 18. t(1;13)
	6			1	19. 6, 17, 18  20. 1, 4, 2  21. 1, 7, 11  22. 3, 10, 21  23. 1, 3, 7  24. 4, 4, 14	19. del 6 + ace6 t(17;18) 20. del 2 + ace2 t(1;4) 21. del 1 + ace1 t(7;11) 22. del 3 t(10;21) 23. del 1 + ace1 t(3;7) 24. del 4 t(4;14)
		3		1	25. 3, 4, 8, 17  26. 2, 2, 11, 15 27. 1, 5, 7, 10	25. t(3;4) t(8;17) 26. del 2 + ace2 del 11 t(2;15) 27. dic(1;5) t(7;10)*
			1	1	28. 2, 3, 3, 11, 13, 15	28. t(2;3) t(3;11) t(13;15)

**Tabella 5.2** Risultati dell'analisi mFISH delle metafasi di cellule irraggiate con ioni ossigeno  $E_{in}$  60 MeV, in posizioni P1 della curva di Bragg, dose 1 Gy. La sigla M n° DSB indica il numero di rotture presentate da ciascuna metafase. t: traslocazione reciproca; t\*: traslocazione non reciproca; del: delezione; ace: frammento acentrico; dic: dicentrico.

M 1 DSB	M 2 DSB	M 3 DSB	M 4 DSB	M 5 DSB	N° di break/ cromosoma	Cromosomi coinvolti	Tipo di aberrazione
3					1	1. 10 2. 2 3. 6	1. del 10 + ace 10 2. del 2 + ace 2 3. del 6 + ace 6
	4				1	4. 7, 15 5. 4, 18 6. 2, 9 7. 1, 8	4. t(7;15)* 5. t(4;18) 6. t(2;9) 7. t(1;8)
		1			1	8. 7, 8, 9	8. del 7 + ace 7 t(8;9)
		2			1 e 2 (scambio complesso)	9. 1, 4 10. 2, 13	9. del 4 <sup>a</sup> + ace 4 <sup>b</sup> t(1;4 <sup>c</sup> ) 10. del 2 <sup>b</sup> (no 2 <sup>a</sup> ) t(2 <sup>c</sup> ;13)
			5		1	11. 1, 7, 14 17 12. 1, 2, 10, 15 13. 3, 6, 9, 11 14. 5, 10, 11, 12	11. t(1;7) dic(14;17) 12. dic(1;10) + ace 1 + ace 10 t(2;15) 13. del 9 del 11 t(3;6)* 14. del 10 + ace 10 del 11 + ace 11 t(5;12)*
				5	1	15. 1, 6, 8, 9, 10 16. 1, 7, 12, 13, 17 17. 1, 2, 9, 14, 15 18. 2, 3, 8, 14, 18 19. 2, 5, 8, 9, X	15. del 1 + ace 1 del 8 + ace 8 del 10 + ace 10 dic(6;9) 16. del 1 + ace 1 t(7;17) t(12;13) 17. del 2 + ace 2 t(1;9) dic(14;15) + ace(14;15) 18. del 2+ ace 2 t(8;18)* dic(3;14) 19. t(2;X)* t(5 <sup>a</sup> ;8)* t(5 <sup>b</sup> ;9)

**Tabella 5.3** Risultati dell'analisi mFISH delle metafasi 1-19 di cellule irraggiate con ioni ossigeno E<sub>in</sub> 60 MeV, in posizioni P1 della curva di Bragg, dose 2,5 Gy. La sigla M n° DSB indica il numero di rotture presentate da ciascuna metafase. Gli apici <sup>a b c</sup> indicano i frammenti creati dalla rottura. t: traslocazione reciproca; t\*: traslocazione non reciproca; del: delezione; ace: frammento acentrico; dic: dicentrico.

M 6 DSB	M 7 DSB	M 8 DSB	N° di break/ cromosoma	Cromosomi coinvolti	Tipo di aberrazione
3			1	20. 1, 8, 8, 12, 15, X  21. 1, 3, 8, 9, 15, 15  22. 2, 2, 7, 5, 9, 11	20. t(1;12) t(8;15)* t(8;X) 21. t(1;15) t(3;15) t(8;9)* 22. del 2 + ace 2 del 5 + ace 5 del 9 + ace 9 del 11 + ace 11 dic(2;7) + ace(2;7)
	1		1	23. 1, 4, 6, 7, 7, 12, 15	23. del 1 + ace 1 t(4;15) dic(6;7) + ace (6;7) dic(7;12)
	1		1 e 2 (scambio complesso)	24. 5, 6, 7, 7, 8, 18, 19	24. del 6 <sup>c</sup> + ace 6 <sup>a</sup> t(5;6 <sup>b</sup> ;19)* t(7;8) t(7;18)
		2	1	25. 1, 1, 4, 7, 10, 11, 13, 14  26. 1, 1, 4, 4, 6, 12, 18, X	25. t(1;13) t(1;10) t(4;14) t(7;11) 26. t(6;X) dic(1;4) dic(1;18) dic(4;12)
		2	1 e 2 (scambio complesso)	27. 1, 2, 7, 9, 16  28. 1, 6, 11, 11, 12, 17	27. del 9 t(1 <sup>a</sup> ;2 <sup>a</sup> ) t(1 <sup>b</sup> ;2 <sup>b</sup> ;16)* t(1 <sup>c</sup> ;7)* t(2 <sup>c</sup> ;6) 28. del 1 <sup>b</sup> + ace 1 <sup>a</sup> t(1 <sup>c</sup> ;17)* dic(6;12) + ace(6;12) dic(11;11)

**Tabella 5.4** Risultati dell'analisi mFISH delle metafasi 20-28 di cellule irraggiate con ioni ossigeno E<sub>in</sub> 60 MeV, in posizioni P1 della curva di Bragg, dose 2,5 Gy. La sigla M n° DSB indica il numero di rotture presentate da ciascuna metafase. Gli apici <sup>a b c</sup> indicano i frammenti creati dalla rottura. t: traslocazione reciproca; t\*: traslocazione non reciproca; del: delezione; ace: frammento acentrico; dic: dicentrico.

M 10 DSB	M 11 DSB	M 12 DSB	N° di break/ cromosoma	Cromosomi coinvolti	Tipo di aberrazione
2			1	<p><b>29.</b> 2, 3, 4, 5, 9, 10, 17, 18, 22</p> <p><b>30.</b> 1, 2, 4, 5, 5, 8, 9, 16, 17, 22</p>	<p><b>29.</b> del 9 + ace 9 del 10 + ace 10 t(4;17<sup>a</sup>)* dic(2;5) dic(3;17) dic(18;22)</p> <p><b>30.</b> del 1 del 4 + ace 4 t(8;22) t(9;17) dic(2;5) dic(5;16)</p>
3			1 e 2 (scambio complesso)	<p><b>31.</b> 1, 1, 5, 8, 9, 9, 12, 15</p> <p><b>32.</b> 1, 2, 2, 4, 5, 9, 12, 14, 17</p> <p><b>33.</b> 2, 6, 6, 9, 9, 12, 12, X</p>	<p><b>31.</b> del 1 + ace 1 del 8 + ace 8 del 9 + ace 9 t(1<sup>a</sup>;5)* t(1<sup>c</sup>;15)* dic(1<sup>b</sup>;12)</p> <p><b>32.</b> del 1<sup>b</sup> + ace 1<sup>a</sup> del 2 t(1<sup>b</sup>;12)* t(1<sup>c</sup>;5<sup>a</sup>)* t(4;17) dic(5<sup>b</sup>;9)</p> <p><b>33.</b> del 2 del 6 + 2ace 6 del X + ace X t(6;12)* t(9;13) dic(9;12)</p>
	1		1 e 2 (scambio complesso)	<b>34.</b> 1, 2, 4, 4, 5, 7, 12	<p><b>34.</b> del 2 + 2ace 2 t(1<sup>a</sup>;4<sup>a</sup>;12) t(1<sup>b</sup>;12) t(4<sup>b</sup>;5<sup>a</sup>) t(5<sup>b</sup>;7) t(4<sup>c</sup>;12)</p>
		1	1	<b>35.</b> 1, 1, 2, 3, 4, 7, 12, 14, 16, 17, 22,	<p><b>35.</b> t(1;4)* t(1;14) t(2;7) t(3;12) t(16;17) t(14;22)</p>

**Tabella 5.5** Risultati dell'analisi mFISH delle metafasi 29-35 di cellule irraggiate con ioni ossigeno E<sub>in</sub> 60 MeV, in posizioni P1 della curva di Bragg, dose 2,5 Gy. La sigla M n° DSB indica il numero di rotture presentate da ciascuna metafase. Gli apici <sup>a b c</sup> indicano i frammenti creati dalla rottura. t: traslocazione reciproca; t<sup>\*</sup>: traslocazione non reciproca; del: delezione; ace: frammento acentrico; dic: dicentrico.

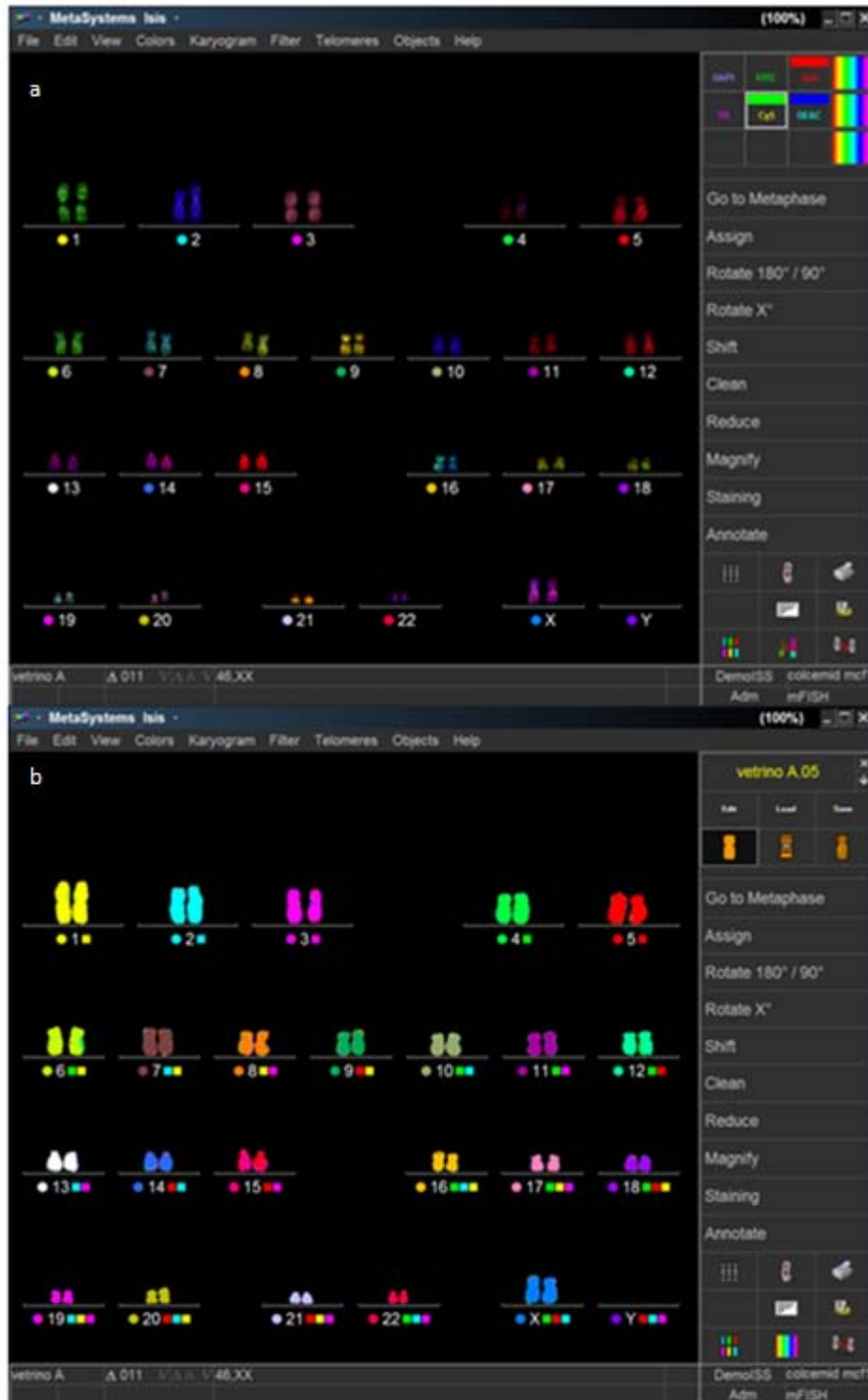
A 1 Gy le metafasi sono state interessate da 2 a 6 rotture cromosomiche. Il pattern di aberrazioni presentati da questi campioni non sono particolarmente articolati (la maggior parte delle aberrazioni consiste in traslocazioni tra due cromosomi) e non si assiste in nessun caso a scambi complessi.

A 2,5 Gy le metafasi vengono interessate da 1 fino a 12 rotture cromosomiche. Il cospicuo numero di rotture cromosomiche osservato è direttamente associato ad un enorme complessità dei pattern di aberrazione che vedono ben 9 scambi complessi su 40 metafasi analizzate. Inoltre, al di là della presenza di scambi complessi in metafasi, anche dove essi non si verificano, si assiste comunque a profili di aberrazioni molto articolati che all'interno di una stessa metafase si esplicano in un elevato numero di traslocazioni, delezioni e formazione di dicentrici.

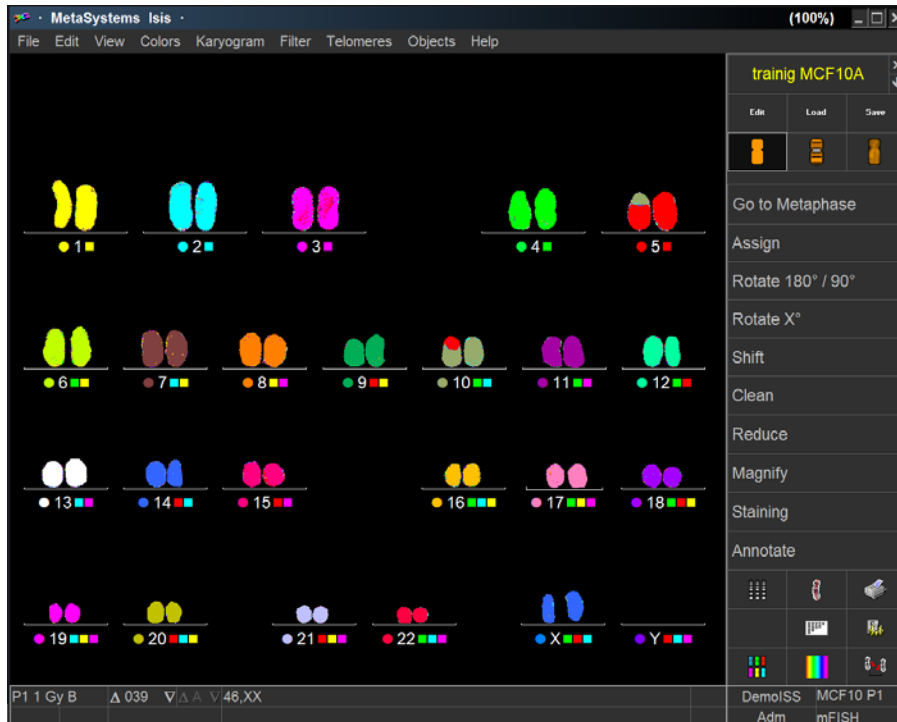
Per meglio illustrare questi risultati, può essere utile riferirsi ad un supporto grafico che rappresenti i cariotipi elaborati tramite ISIS. Le figure 5.27 - 5.29 raffigurano i rispettivamente un cariotipo di controllo e i cariotipo di cellule irraggiate a 1 e a 2,5 Gy.

Nella figura 5.28 si può osservare un classico evento di traslocazione reciproca in cui il cromosoma 5 ricombina con il 10. In figura 5.29 si assiste a diversi eventi di aberrazione: entrambi i cromosomi 2 subiscono una rottura che li porta ad una delezione con conservazione dei frammenti; il cromosoma 5 subisce un break con formazione di due frammenti di cui il frammento acentrico trasloca con il cromosoma 4 (che a sua volta ha subito una rottura con perdita del frammento acentrico) e il frammento centromerico trasloca con il frammento acentrico proveniente dalla rottura di uno dei cromosomi 7. Infine, il cromosoma 12 subisce due break alle estremità con perdita di entrambi i frammenti acentrici: ciò che rimane è un frammento centromerico con estremità reattive di cui una effettua un evento di traslocazione non reciproca con il cromosoma 8 e l'altra trasloca con il cromosoma 12, ottenendo una traslocazione del tipo  $t(8;11;12)$  che si è rivelato essere un dicentrico. Questi ultimi eventi coinvolgono quindi 4

rotture e ben tre cromosomi rendendo di fatto la traslocazione t(8;11;12) un evento di scambio complesso.



**Fig. 5.27** Cariotipo mFISH di cellule MCF10A campione. **a)** visione del cariotipo dopo l'integrazione dei fluorocromi; **b)** visione del cariotipo con falsi colori.



**Fig. 5.28** Cariotipo mFISH di cellule MCF10A irraggiate con ioni ossigeno  $E_{in}$  60 MeV a dose 1 Gy. Si può osservare una traslocazione  $t(5;10)$ .



**Fig. 5.29** Cariotipo mFISH di cellule MCF10A irraggiate con ioni ossigeno  $E_{in}$  60 MeV a dose 2,5 Gy. Si possono osservare 2 del 2 + ace 2;  $t(4;5)^*$ ;  $t(5;7)$ ;  $t(8;11;12) \rightarrow$  dicentrico.



Quanto osservato fino ora è in perfetto accordo con le teorie radiobiologiche classiche secondo cui l'incidenza delle aberrazioni radioindotte, ma soprattutto l'incidenza di scambi complessi, è fortemente legata alla dose e al LET della radiazione tramite un andamento lineare (fig. 2.10): maggiore è il LET e la dose maggiore è la probabilità di provocare almeno due rotture nello stesso cromosoma e, nello stesso tempo, mediante un'unica traccia radiante (George et al., 2003).

## Conclusioni

L'obiettivo di questo lavoro di tesi sperimentale in Biofisica delle Radiazioni consisteva nello studiare gli effetti letali e subletali direttamente indotti in cellule umane normali da radiazioni ionizzanti di varia qualità (fotoni e fasci di particelle cariche), oltre che esaminare i cosiddetti effetti "extra bersaglio" (*non-targeted effects* o NTE). Gli effetti diretti sono stati studiati mediante il saggio della sopravvivenza clonogenica, mentre gli effetti indiretti sono stati valutati mediante l'induzione della senescenza cellulare prematura (*Stress-Induced Premature Senescence* o SIPS) e l'esame qualitativo dello spettro di aberrazioni cromosomiche (AC), attraverso analisi del cariotipo con la tecnica mFISH. I NTE sono stati studiati mediante la realizzazione di un *medium transfer experiment*, in cui il terreno di coltura proveniente da cellule endoteliali irraggiate è stato trasferito su cellule epiteliali di mammella normali o tumorali: su tali cellule è stata studiata la capacità proliferativa mediante saggio clonogenico. Il medium transfer è stato effettuato o subito dopo l'irraggiamento delle cellule "donatrici" (4 e 24 h) o a tempi successivi, quando queste avevano raggiunto tre livelli di senescenza (25, 50 e 100%).

L'esame delle curve di sopravvivenza clonogenica realizzate per la linea cellulare HUVEC (cellule endoteliali ombelicali), ha mostrato un sostanziale accordo con i modelli radiobiologici esistenti secondo cui fasci di particelle accelerate in prossimità del picco di Bragg (alto ed altissimo LET) esibiscono un'efficacia radiobiologica relativa ai raggi X (Relative Biological Effectiveness o RBE) praticamente unitaria (ossia paragonabile all'effetto ottenuto per le radiazioni a basso LET di riferimento) per quanto riguarda l'induzione di morte cellulare clonogenica. In particolare l'analisi delle curve di sopravvivenza clonogenica, ha

messo in evidenza che fasci di protoni accelerati hanno un effetto letale di poco più efficiente di quello mostrato dai raggi X, avendo a fine range un LET di circa 30 keV/ $\mu\text{m}$ , mentre fasci di ioni carbonio inducono un effetto letale di poco inferiore a quello mostrato per i raggi X. In conclusione, possiamo affermare che i protoni sono più efficienti del carbonio e dei raggi X nell'induzione di danni letali. Nella caratterizzazione degli effetti subletali a breve e a lungo termine di cellule endoteliali (HUVEC) a diversi tipi di radiazione ionizzante, l'analisi dei risultati ottenuti ha evidenziato una netta risposta in termini di senescenza prematura, e tale risposta è particolarmente articolata a seconda della radiazione considerata e della sua energia. In sintesi, si osserva un'insorgenza acuta della senescenza prematura radioindotta (pochi giorni dall'irraggiamento) insieme ad una risposta tardiva, ossia che dura settimane. Nel caso dei protoni si osserva un'incidenza tardiva di senescenza cellulare significativamente più alta rispetto ai raggi X. Comparando l'andamento della senescenza in popolazioni cellulari esposte a ioni carbonio ( $E_{in}= 13 \text{ MeV}$ ) ed ossigeno ( $E_{in}= 11,4 \text{ MeV}$ ), ad altissimo LET, si osserva invece una risposta subletale con andamenti differenti a lungo termine: la percentuale di cellule in senescenza prematura rimane pressoché costante nel tempo nel caso degli ioni carbonio, mentre con gli ioni ossigeno la percentuale di cellule che entrano in senescenza prematura aumenta linearmente all'aumentare del tempo post-irraggiamento. Questo dimostra come ioni diversi, anche di LET simile, possano indurre effetti tardivi di diversa severità: questo dimostrerebbe che il LET, comunemente usato in radiobiologia come principale parametro fisico per predire la radiorisposta cellulare, è in parte inadeguato, specie per quanto riguarda gli effetti subletali in cellule umane. Tutto ciò potrebbe avere importanti ripercussioni sia in radioprotezione (ad esempio per l'esposizione alle particelle alfa dall'inalazione del gas radon indoor), sia per quanto riguarda le implicazioni riguardanti le reazioni del tessuto sano di pazienti trattati con adroterapia, trattamento che si sta rapidamente affermando anche in Italia con la recente apertura del CNAO (Centro Nazionale di Adroterapia Oncologica) a Pavia.

La valutazione degli effetti bystander di cellule endoteliali irraggiate con ioni carbonio e raggi X su cellule epiteliali di mammella non irraggiate ha dimostrato effettivamente la capacità del terreno di coltura proveniente dalle cellule direttamente esposte alla radiazione di indurre effetti *non-targeted*. Tali NTE, inoltre, appaiono diversi a seconda che le cellule epiteliali accettrici siano normali (MCF10A) o tumorali (MCF7). Nella risposta acuta a 4 e 24 ore, le HUVEC irraggiate inducono effetti letali sulle MCF10 in maniera dipendente dalla dose e con maggiore severità quando il terreno è trasferito 24 ore post-irraggiamento rispetto a quando ciò avviene 4 ore post-irraggiamento. Inoltre, tali effetti sono indotti con maggiore efficacia dagli ioni carbonio rispetto ai raggi X. Il terreno proveniente da cellule HUVEC irraggiate con raggi X e trasferito 4 o 24 ore post-irraggiamento non incide significativamente sulla sopravvivenza delle MCF7, mentre nel caso di cellule HUVEC irraggiate con ioni carbonio, un effetto è osservabile solo nel caso di terreno trasferito 24 ore post-irraggiamento, senza differenza per le due dosi di irraggiamento. La diversità delle risposte acute potrebbe essere sintomo della diversità biologica intrinseca delle cellule epiteliali considerate: le MCF7 sono cellule tumorali che per definizione sono maggiormente resistenti all'apoptosi e alla morte cellulare rispetto a cellule normali, quindi probabilmente sono anche maggiormente resistenti ai fattori letali prodotti da cellule endoteliali irraggiate.

NTE tardivi sono stati studiati trasferendo terreno da colture di HUVEC inizialmente irraggiate (e non), propagate nel tempo e testate varie percentuali di senescenza (replicativa e prematura). Terreno da colture con il 25% e 50% di senescenza prematura radioindotta e replicativa, sopprimono la sopravvivenza clonogenica delle cellule MCF10A con simile severità di effetti indotti da cellule in senescenza prematura radioindotta sia da ioni carbonio che da raggi X. Al 100% di cellule senescenti agenti, si ha, invece, un aumento della capacità proliferativa delle cellule accettrici in presenza del terreno proveniente da colture donatrici derivanti da cellule esposte a 2 Gy. Tale effetto suggerisce che i fattori secreti da cellule endoteliali in condizioni di senescenza prematura radioindotta al 100%,

svolgano un effetto positivo sulla (iper)proliferazione di cellule epiteliali normali. Questo potenziale iperproliferativo, è apparso ancora più marcato su cellule epiteliali tumorali suggerendo, ancora una volta, il legame della proliferazione cellulare con fattori che compongono il secretoma delle cellule senescenti, dove tali fattori non solo sono legati alla senescenza prematura radioindotta ma sono anche dose dipendenti. Infatti, appare che l'effetto bystander di popolazioni cellulari di HUVEC in senescenza replicativa (0 Gy) e in senescenza prematura indotta da dosi di 0,5 Gy (sia per raggi X che per ioni carbonio), a tutte le percentuali di senescenza, non mettono in evidenza tali effetti iperproliferativi né su cellule MCF10A né su cellule MCF7 (entrambe le linee presentano addirittura un decremento della sopravvivenza cellulare).

L'ultimo aspetto preso in considerazione per la valutazione del danno subletale radioindotto, è stata l'incidenza di aberrazioni cromosomiche su cellule MCF10A irraggiate con ioni ossigeno, sul plateau della curva di Bragg (quello che maggiormente interessa i tessuti sani in adroterapia perché corrisponde all'ingresso del fascio sul corpo umano), a dosi di 1 e 2,5 Gy. Lo studio di questi danni è essenziale per la determinazione del potenziale subletale dell'esposizione. La formazione delle aberrazioni cromosomiche infatti riflette il danno non o mal riparato.

L'analisi qualitativa delle aberrazioni con tecnica mFISH ha messo in evidenza un'elevata incidenza di eventi di traslocazione ad 1 Gy e diversi tipi di aberrazioni anche all'interno della stessa metafase (nonché numerosi eventi di scambi complessi) in campioni irraggiati a 2,5 Gy. Ciò conferma le teorie radiobiologiche classiche secondo cui l'incidenza delle aberrazioni radioindotte è strettamente relazionata alla dose della radiazione e che all'aumentare del LET aumenta la frazione di danno complesso.

In conclusione, questi risultati bene si accordano con le attuali conoscenze radiobiologiche sugli effetti acuti letali delle radiazioni ionizzanti e confermano la capacità delle radiazioni di indurre effetti subletali quali la senescenza cellulare prematura, che potrebbe avere importanti ripercussioni per le conseguenze

tardive del danno nei tessuti sani di pazienti affetti da tumore e trattati con radioterapia; in più mostrano l'esistenza di effetti extra-bersaglio che sembrerebbero favorire, a lungo termine la proliferazione cellulare da parte di fattori secreti da cellule endoteliali in senescenza radioindotta. Questi ultimi dati potrebbero confermare il potenziale deleterio *in vivo* della cosiddetta SAPS (Senescence-Associated Secretory Phenotype) sulle cellule epiteliali di mammella, tumorali e non, prossime all'endotelio.

## Appendice A

### Composizione dei mezzi di coltura cellulare

#### Terreno di crescita e mantenimento delle cellule HUVEC

- EMB-2 (Endothelial Cell Basal Medium-2) 500 ml
- Bullett kit:
  - FBS 10 ml
  - Idrocortisone 0,2 ml
  - hFGF-B 2 ml
  - VEGF 0,5 ml
  - R3-IGF-1 0,5 ml
  - Acido ascorbico 0,5 ml
  - hEGF 0,5 ml
  - GA-1000 0,5 ml
  - Eparina 0,5 ml

#### Terreno di crescita e mantenimento delle cellule MCF10

##### *Resuspension medium*

- DMEM-F12 500 ml
- Horse serum 100 ml
- Penicillina/Streptomicina 5 ml

### *Growth medium*

- DMEMF-12                    500 ml
- Horse serum                25 ml
- EGF                            0,1 ml
- Idrocortisone                0,25 ml
- Tossina del colera            0,05 ml
- Insulina                      0,5 ml
- Penicillina/Streptomicina 5 ml

### Terreno di crescita e mantenimento delle cellule MCF7

- DMEM-F12                    500 ml
- FBS                            25 ml
- Penicillina/Streptomicina 5 ml
- Fungizone                    2,5 ml



## Appendice B

### Preparazione dei vetrini per analisi citogenetica: HARVEST E SQUASH

#### Reagenti per la raccolta cromosomica (harvest) e squash

- Reagenti per indurre condensazione cromosomica: Colcemid (conc. finale 0,02 µg/ml) o Caliculyn A (conc. finale 50 µM)
- Carnoy: Metanolo – Acido acetico 3:1; -20°C
- Acetone; Temperatura Ambiente (TA)
- HCl/EtOH 1:1; TA
- KCl 0,075 M; 37°C
- Tripsina 1X
- ddH<sub>2</sub>O
- ddH<sub>2</sub>O; 37°C

#### ***Step 1: pulitura dei vetrini***

- Porre i vetrini in acetone per 5 min
- Trasferire i vetrini nella soluzione HCl/EtOH per 5 min
- Sciacquare i vetrini con ddH<sub>2</sub>O
- Riscaldare i vetrini in ddH<sub>2</sub>O in una couplin jar a 45°C

## **Step 2: HARVEST**

- Coltivare le cellule in una flasca T25 fino ad una confluenza di circa 80%
- Aggiungere 100 µl di Colcemid in 5 ml di terreno per 4 ore o 2 µl di Caliculyn A in 4 ml di terreno per 30 min
- Recupero del terreno surnatante in un falcon tube
- Lavare con 2 ml di 1XPBS recuperandolo
- Aggiungere 2 ml di tripsina 1X, lasciar agire e aggiungere 2 ml di terreno; recuperare il tutto
- Centrifugare a 1600 rpm per 7 min
- Eliminare il surnatante
- Rompere delicatamente il pellet con 2 ml circa di KCL preriscaldato a 37°C e portare ad un volume finale di 8 ml
- Incubare a 37°C per 25 min
- Aggiungere 2 ml di Carnoy freddo e lasciare i tubi falcon in ghiaccio per 10 min
- Centrifugare a 1600 rpm per 7 min
- Eliminare il surnatante e rompere il pellet con Carnoy. Raggiungere un volume di 10 ml.
- Porre su ghiaccio per 30 min
- Centrifugare a 2000 rpm per 5 min
- Eliminare il surnatante e rompere il pellet con Carnoy. Raggiungere un volume di 5 ml.
- Centrifugare a 2000 rpm per 5 min
- Eliminare il surnatante e rompere il pellet con Carnoy. Raggiungere un volume di 5 ml.
- Centrifugare a 2000 rpm per 5 min
- Eliminare il surnatante

### ***Step 3: SQUASH***

- Risospendere il pellet con il Carnoy. La quantità di Carnoy dipende dalla concentrazione di metafasi/PCC che si desidera ottenere sul vetrino.
- Prelevare con una pipetta pasteur poche gocce di sospensione e lasciarle cadere sui vetrini precedentemente riscaldati (dopo aver scrollato l'acqua in eccesso) posti ad una distanza di 20 cm
- Far asciugare i vetrini
- Far invecchiare i vetrini in una scatola chiusa per un periodo di 2/7 giorni

## Appendice C

### Protocollo mFISH 24 X-Cyte per cellule MCF10A

#### Reagenti richiesti

- 1 N HCl; TA
- 0,07 N NaOH; TA
- 0,1X SSC; pH 7,0 - 7,5; TA
- 0,1X SSC; pH 7,0 - 7,5; 4°C
- 2X SSC; pH 7,0 - 7,5; TA
- 2X SSC; pH 7,0 - 7,5; 4°C
- 1X SSC; pH 7,0 - 7,5; 75°C
- 4XSSCT: 4XSSC/NP40 0,01%; pH 7,0 - 7,5; TA
- 1XPBS; TA
- EtOH 30% - 50% - 70% - 90% - 100%; TA
- Soluzione di post-fissazione: 60 µl di Formaldeide 37%; 2 ml di 1xPBS; 100 µl MgCl<sub>2</sub> (1 N); 4°C
- Pepsina: 1 g + 50ml H<sub>2</sub>O
- MetaSystems 24XCyte probe
- Dapi/antifade 250ng/ml

#### ***Step 1: pretrattamento digestivo delle proteine***

- Preriscaldare in una couplin jar 1 ml di HCl + 99 ml H<sub>2</sub>O
- Aggiungere 500 µl di pepsina agitando bene

- Immergere immediatamente i vetrini ed incubare per 3 min
- Sciacquare i vetrini in 1XPBS per 3 min
- Applicare su ogni vetrino 100 µl di soluzione di post-fissazione e coprire con una cover slip da 24 x 60 mm<sup>2</sup> ed incubare per 10 min a TA
- Sciacquare i vetrini in 1XPBS per 3 min

NB: Lo step 1 viene effettuato solo per preparati con eccessiva presenza di citoplasma, che potrebbe interferire con un'ottimale visualizzazione del preparato al microscopio

### ***Step 2: denaturazione dei cromosomi***

- Incubare i vetrini in una soluzione 2XSSC a 70°C per 30 min
- Lasciar raffreddare i vetrini nella couplin jar fino a 37°C (circa 30 min)
- Trasferire vetrini in una soluzione 0,1XSSC a TA per 1 min
- Denaturare i vetrini in NaOH 0,07 N a TA per 1 min
- Trasferire i vetrini in una soluzione 0,1XSSC a 4°C per 1 min
- Disidratare i vetrini in EtOH 30% - 50% - 70% - 90% - 100% per 1 minuto (ciascuno)
- Lasciar asciugare all'aria

### ***Step 3: denaturazione della sonda ed ibridazione***

- Denaturare la sonda 24XCyte a 75°C per 5 min (5 µl per vetrino)
- Mettere in ghiaccio per 30 sec
- Lasciare a 37°C per 30 min
- Ibridare i vetrini e sigillarli con un sottile strato di rubber cement (5 µl per vetrino, cover slip 24 x 24 mm<sup>2</sup>)
- Incubare in camera umida a 37°C per 48 ore

#### ***Step 4: trattamento post-ibridizzazione***

- Rimuovere delicatamente il copri oggetto dal vetrino
- Incubare i vetrini in una soluzione 1XSSC riscaldata a 75°C per 5 min
- Trasferire i vetrini in 1XPBS per 2 min
- Lasciar asciugare al buio
- Applicare 10 µl di Dapi/antifade per vetrino e applicare una cover slip 24 x24 mm<sup>2</sup>
- Lasciare in frigo al buio per 15 min prima della lettura

## Appendice D

### Saggio della $\beta$ -galattosidase per la rivelazione della senescenza cellulare-Senescence Cells Histochemical Staining Kit / SIGMA ALDRICH™

#### Reagenti richiesti

- 1X Fixation buffer (composizione: 20 % formaldeide, 2% glutaraldeide, 70,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 14,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,37 M NaCl, 26,8 mM KCl)
- Reagente B: 400 mM potassio ferricianide
- Reagente C: 400 mM potassio ferrocianide
- 40 mg/ml X-gal solution: preriscaldata a 37 °C per 1 ora
- 10X Staining solution
- 1X PBS
- dH<sub>2</sub>O

#### **Procedura**

- Aspirare il terreno di crescita dalle piastre seminate (capsule petri da 35 mm)
- Lavare due volte con 1 ml di 1X PBS
- Eliminare il PBS ed aggiungere 1,5 ml di fixation buffer. Incubare per 6-7 minuti
- Durante il tempo di incubazione, preparare la Staining Mixture così come segue (per 6 campioni):

- 1 ml di Staining solution 10X
  - 125  $\mu$ l di Reagente B
  - 125  $\mu$ l di Reagente C
  - 250  $\mu$ l di X-gal
  - 8,5 ml di dH<sub>2</sub>O
- 
- Lavare 3 volte con 1 ml di 1X PBS
  - Eliminare il PBS ed aggiungere 1 ml di Staining Mixture
  - Sigillare le piastre con parafilm™ ed incubare a 37 °C in assenza di CO<sub>2</sub> overnight
  - Osservare le cellule al microscopio a campo chiaro



## Bibliografia

- Anderson A: Multiplex Fluorescence in situ Hybridization (m-FISH). *Protocols ed Applications* 2010, vol.659.
- Angelini F, Botti D, Colombo R, Gornati R, Monaco G, Odierna G, Olmo E, Ottaviani E, Panzica GC, Rosati F, Sottile L, Stingo V, Venturini G: *Biologia dei tessuti* 2007, 118-120.
- Barendsen GW, Walter HMD, Fower JF, Bewley DK: Effects of Different Ionizing Radiations on human cells in tissue culture. *Irradiation techniques and dosimetry. Radiat Res.* 1960, 13:832–840.
- Bartek J, Lukas J: Pathways governing G1/S transition and response to DNA damage. *FEBS Lett* 2001, 490:117-122.
- Ben-Porath I, Weinberg RA: The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 2005, 37(5):961-76.
- Blyth BJ, Sykes PJ: Radiation-induced bystander effects: What are they, and how relevant are they to human radiation exposures? *Radiat Res.* 2011, 176(2):139-57.
- Campisi J: Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol.* 2001, 11:27-31.
- Campisi J: Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective. *Current Opinion in Genetics & Development* 2011, 21:107-112.
- Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J: The Senescence-Associated Secretory Phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2010, 5:99-118.
- Coppé JP, Patil CK.; Rodier F, Yu S, Muñoz DP.; Goldstein J; Nelson PS.; DesprezPY; Campisi J: Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLoS Biol* 2008, 6(12):2853–68.

- Cucinotta FA, Durante M: Cancer risk from exposure to galactic cosmic rays: implications for space exploration by human beings. *Lancet Oncol* 2006, 7: 431–35.
- Dimri GP: A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in ageing skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92: 9363-9367.
- Doumont P, Royer V, Pascal T, Dierick JF, Chainiaux F, Frippiat C, de Magalhães JP, Ealiers F, Remacle J, Toussaint O: Growth kinetics rather than stress accelerate telomere shortening in cultures of human diploid fibroblast in oxidative stress-induced premature senescence. *FEBS Lett.* 2001, 502(3):109-112.
- Durante M, George K, Wu H, Cucinotta FA: Karyotypes of human lymphocytes exposed to high-energy iron ions. *Radiat. Res.* 2002, 158:581-590.
- Friedl AA, Kiechle M, Fellerhoff B, Eckardt-Schupp F: Radiation-induced chromosome aberration in *Saccharomyces cerevisiae*: influence of DNA repair pathways. *Genetics* 1998, 148:975-988.
- George K, Durante M, Wu H, Willingham V, Cucinotta FA: *In vivo* and *in vitro* measurement of complex-type chromosomal exchanges induced by heavy ions. *Advances in Space Research* 2003, 31:1525-1535.
- Gewirtz DA, Holt SE, Elmore LW: Accelerated senescence: An emerging role in tumor cell response to chemotherapy and radiation. *Biochemical Pharmacology* 2008, 76:947-957.
- Goldberg Z, Lehnert BE: Radiation-induced effects in unirradiated cells: A review and implications in cancer. *International Journal of Oncology*, 2002, 21: 337-349.
- Grandi C, Moccaldi R: Effetto *bystander*: rassegna critica e implicazioni per la valutazione del rischio in radioprotezione. *G. Ital. Med. Lav. Erg.* 2005, 27:1, 21-34.
- Haber JE: Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet* 2000, 16 : 259-264.
- Hall E J: *Radiobiology for the radiologists*, Lippincott Williams & Wilkins, New York 2006.

- Hastings R., Qureshi M, Verma R, Lacy PS, Williams B: Telomere attrition and accumulation of senescent cells in cultured human endothelial cells. *Cell Proliferation* 2004, 37(4): 317.
- Hayflick L, Moorhead PS: The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961, 25:585-621.
- He L, He X, Lim LP, De Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, Xue W, Zender L, Magnus J, Ridzon D: A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 2007, 447:1130–1134.
- Joiner M, Van Der Kogel a, Hodder A: *Basic Clinical Radiobiology* London, 2009.
- Kearney L: Multiplex-FISH (M-FISH): technique, developments and applications. *Cytogenetic Genome Res* 2006, 114:189–198.
- Kiefer J: *Biological radiation effects. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg* 1990.
- Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J: Senescent fibroblast promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. *PNAS* 2001, 98:12072-12077.
- Kurz, DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky, JD: Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J. Cell Sci.* 2000, 113 (Pt 20): 3613–3622.
- Lea DE: *Actions of radiation on living cells.* 1st Edn. Cambridge University Press, 1946.
- Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, Kleijer WJ, Di Maio D, Hwang ES: Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* 2006, 5:187–195.
- Liu Z, Mothersill CE, McNeil FE, Lyng FM, Byun SH, Seymour CB, Prestwich WV: A dose threshold for a medium transfer bystander effect for human skin cell line. *Radiation research* 2006, 166:19-23.
- Lopez M: *Apoptosi e senescenza cellulare.* *Oncologia medica pratica* 2010, 3° ed. 7:97-106.
- Macville M, Veldman T, Padilla-Nash H, Wangsa D, O'Brien P, Schröck E, Ried T: Spectral karyotyping, a 24-colour FISH technique for the identification of chromosomal rearrangements. *Histochem Cell Biol* 1997, 108:299–305.

- Mancuso M, Pasquali E, Giardullo P, Leonardi S, Tanori M, Di Majo V, Pazzaglia S, Saran A: The radiation bystander effect and its potential implications for human health. *Curr Mol Med*. 2012, 12(5):613-24.
- Marcus PI, Cieciura SJ, Puck TT: Growth *in vitro* of epithelial cells from normal human tissues. *J Exp Med*. 1956, 104(4):615–628.
- Michishita E, Nakabayashi K, Ogino H, Suzuki T, Fujii M, Ayusawa D: DNA topoisomerase inhibitors induce reversible senescence in normal human fibroblast. *Biochem Biofis Res Commun* 1998, 253(3):667-671.
- Mothersill C, Seymour C: Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells. *International Journal of Radiation Biology* 1997, 71:4, 421-427.
- Narita, M: Cellular senescence and chromatin organization. *British Journal of Cancer*, 2007, 96(5), 686–691.
- Obe G, Johannes C, Schulte-Frohlinde D: DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation. *Mutagenesis* 1992, 7:3-12
- Parrinello S, Coppé JP, Krtolica A, Campisi J: Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J. Cell Sci*. 2005, 118:485–96.
- Pfeiffer P, Goedecke W, Obe G: Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* 2000, 15:289-302
- Prabhakarandian B, Goetz DJ, Swerlick RA, Chen X, Kiani MF: Expression and Functional Significance of Adhesion Molecules on Cultured Endothelial Cells in Response to Ionizing Radiation. *Microcirculation* 2001, 8:355–364.
- Puck TT, Marcus PI: Action of x-rays on mammalian cells. *J Exp Med*. 1956, 1;103(5):653-666.
- Quarmby S, Kumar P, Wang JM, Macro JA, Hutchinson JJ, Hunter RD, Kumar S: Irradiation Induces Upregulation of CD31 in Human Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999, 19:588-597.

- Sabin RJ, Anderson RM: Cellular Senescence - its role in cancer and the response to ionizing radiation. *Genome Integr.* 2011, 2: 7.
- Savage JRK, Simpson P: On the scoring of FISH-"painted" chromosome-type exchange aberrations. *Mutat. Res.* 1994, 307:345-53.
- Savage JRK: An introduction to chromosomal aberrations. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Hematol* 1999, 3(2).
- Serrano M & Blasco MA: Putting the stress on senescence. *Current Opinion in Cell Biology* 2001, 13:748–753.
- Soule H, McGrath CM: Immortal human mammary epithelial cell lines. US Patent 1991 5:026,637.
- Suzuki K, Mori I, Nakayama Y, Miyakoda M, Kodama S, Watanabe M: Radiation induced senescence growth arrest requires TP53 function but not telomere shortening. *Radiat. Res.* 2001, 155:248-253.
- Suzuki M, Boothman DA: Stress-induced Premature Senescence (SIPS) – Influence of SIPS on Radiotherapy-. *J. Radiat. Res* 2008, 49:105-112.
- Suzuki M, Suzuki K, Kodoma S, Watanabe M: Interstitial chromatin alteration causes persistent p53 activation involved in the radiation-induced senescence-like growth arrest. *Biochem. Biophys.* 2006, 340:145-150.
- Tsai KKC, Chung EYY, Little JB: Cellular mechanism for low-Dose ionizing radiation-induced Perturbation of the breast tissue microenvironment. *Cancer Res* 2005, 65:6734-6744.
- Tsuruoka C, Suzuki M, Kanai T, Fujitaka K: LET and Ion Species Dependence for Cell Killing in Normal Human Skin Fibroblasts. *Radiation Research* 2005, 163:494–500.
- Tubiana M, Dutreix J, Wambersie A: Introduction to radiobiology, Taylor and Francis, London 1990
- Wang Y, Scheiber MN, Neumann C, Calin GA, Zhou D: MicroRNA regulation of ionizing radiation-induced premature senescence. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011, 1;81(3):839-48.
- Zglinicki TV, Saretzki G, Ladhoff J, D'Adda di Fagagna F, Jackson SP: Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech Ageing Dev* 2005, 126(1):111-117.

## Ringraziamenti

Questi anni della magistrale non sono stati anni semplici da affrontare. I dubbi e le incertezze sul futuro non hanno reso facile la scelta di un corso di laurea tanto impegnativo eppure paradossalmente tanto sottovalutato. I miei genitori sono stati la mia forza nel momento del dubbio, il faro nella tempesta che ti fa sperare di arrivare a destinazione e che qualcosa prima o poi deve migliorare. Non ci sono parole per descrivere quello che loro hanno fatto e fanno per me: ciò che sono lo devo soprattutto alla loro educazione e alla presenza costante nella quotidianità. Per questo ed altro ancora li ringrazio immensamente.

Ringrazio il mio relatore, il Dott. Lorenzo Manti, per avermi aiutata a sviluppare questa tesi, per avermi permesso di attuare idee “costose” e per avermi dato l’opportunità di capire che la vita scientifica è fatta non solo di successi ma anche di errori e che è necessario prendere consapevolezza di entrambi per diventare dei ricercatori completi.

Ringrazio le mie colleghe di laboratorio, per i loro consigli e per avermi aiutata a superare le crisi di panico ante-tesi. Un grazie speciale va a Francesca, per aver reso meno noiose le lunghe giornate di laboratorio e per avermi trasmesso almeno un po’ della sua esperienza.

Grazie a Cristina, Rita e Valeria, con voi ho cominciato questo percorso e con voi l’ho concluso, insieme alle due “new-entry”, Katia e Viola. In voi ho scoperto donne e AMICHE piene di intelligenza e capacità, in grado di farmi sorridere con una parola detta sottovoce durante i corsi e allo stesso tempo di starmi vicine nei momenti di difficoltà. Inoltre ringrazio il mio amichetto Fabrizio, per le lunghe conversazioni telefoniche (degne di chi non si fa sentire mai) e per aver condiviso con me paure e perplessità di studenti laureandi.

Grazie ad Adelaide, Chiara e Sara. Difficilmente nella vita si possono incontrare amiche da poter considerare come sorelle. Grazie per essermi state vicine sempre, nei momenti belli, ma soprattutto in quelli brutti.

Grazie a Genny, che con amore mi ha sostenuta in questi anni. Scusa per quando ti ho trattato male durante gli esami anche se non era colpa tua: grazie per la pazienza con cui hai sopportato i miei sbalzi d'umore e le mie paranoie ... grazie per essere sempre e costantemente nella mia vita.

E, in ultimo, un grazie a me stessa: in fondo se sono arrivata fino a qui, è anche merito mio!