

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”**

---

FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI



*Laurea Magistrale in Fisica*

*Tesi sperimentale in Fisica Biomedica*

**Studio degli effetti subletali indotti da  
radiazioni ad alto LET e diverso Z nell'ambito  
del progetto MiMo-BRAGG**

**RELATORE:**

Dott. LORENZO MANTI

**CANDIDATO:**

MAIORINO CARLA

Matr. N94/76

**ANNO ACCADEMICO 2011-2012**



# INDICE

▪	<b>INTRODUZIONE</b>	5
▪	<b>CAPITOLO 1 - RADIAZIONE IONIZZANTE: CARATTERISTICHE ED EFFETTI BIOLOGICI</b>	
○	1.1 <i>La radiazione ionizzante</i>	8
○	1.2 <i>Potere frenante e curva di Bragg</i>	11
○	1.3 <i>Deposizione di energia nel mezzo: LET</i>	15
○	1.4 <i>Dose e RBE</i>	18
○	1.5 <i>Curve dose risposta; effetti di traccia</i>	22
▪	<b>CAPITOLO 2: ATTIVITA' SPERIMENTALE NELL'AMBITO DEL PROGETTO MIMO-BRAGG</b>	
○	2.1 <i>Introduzione</i>	26
○	2.2 <i>MiMo-Bragg: obiettivi sperimentali</i>	30
●	2.2.1 <i>Attività sperimentale a Napoli e Catania</i>	30
	<i>Senescenza cellulare prematura</i>	31
	<i>Aberrazioni cromosomiche</i>	33
○	2.3 <i>Apparato sperimentale: acceleratori</i>	36
●	2.3.1 <i>Generalità sugli acceleratori</i>	36
●	2.3.2 <i>Acceleratore TANDEM (Napoli)</i>	37
●	2.3.3 <i>Ciclotrone superconduttore (Catania)</i>	44
▪	<b>CAPITOLO 3: PROCEDURE SPERIMENTALI</b>	
○	3.1 <i>Introduzione</i>	47
○	3.2 <i>Calibrazione dei rivelatori</i>	48

○	3.3	<i>Caratterizzazione fasci</i>	51
•	3.3.1	Simulazione della diffusione del fascio	51
•	3.3.2	Rivelatori di tracce nucleari a stato solido, calcolo della fluenza e verifica dell'uniformità	55
•	3.3.3	Calcolo del LET	57
•	3.3.4	Misura del fattore di taratura	57
▪	<b>CAPITOLO 4: ANALISI DEI DATI SPERIMENTALI: SENECENZA E ABERRAZIONI CROMOSOMICHE</b>		
○	4.1	<i>Preparazione dei campioni e trattamento post-irraggiamento</i>	59
○	4.2	<i>Caratterizzazione degli effetti subletali</i>	63
•	4.2.1	Senescenza cellulare prematura	63
•	4.2.2	Aberrazioni cromosomiche con tecnica FISH	69
▪	<b>CONCLUSIONI</b>		77
▪	<b>APPENDICE A: IL CICLO CELLULARE</b>		80
▪	<b>APPENDICE B: ABERRAZIONI CROMOSOMICHE</b>		83
▪	<b>APPENDICE C: MATERIALI UTILIZZATI</b>		89
▪	<b>APPENDICE D: PROTOCOLLI</b>		91
▪	<b>BIBLIOGRAFIA</b>		95

*I fashion my future on films in space*

*Silence tells me secretly  
everything, everything....*

# ***INTRODUZIONE***

L'impiego in radioterapia di fasci di ioni di Z intermedio (*adroterapia*), essenzialmente carbonio, si sta affermando rapidamente, come testimoniato dalla recente apertura del CNAO (Centro Nazionale di Adroterapia Oncologica) a Pavia [1], che ha appena concluso la validazione radiobiologica di questi fasci, già peraltro ampiamente sfruttati in Giappone [2] e Germania [3]. A questo si deve aggiungere l'attività che da anni i Laboratori Nazionali del Sud dell'Istituto Nazionale di Fisica Nucleare (LNS-INFN) di Catania svolgono con fasci di protoni per il trattamento di tumori oculari superficiali [4].

Le applicazioni mediche di fasci di particelle cariche sono il frutto di decenni di ricerche in radiobiologia. Ciononostante, le conseguenze a lungo termine dell'esposizione a particelle cariche per la salute umana restano tuttora poco conosciute, principalmente a causa della scarsità di dati sperimentali e alle lacune nei modelli radiobiofisici esistenti, specialmente per quanto attiene agli effetti tardivi sub-letali, di interesse per il tessuto sano.

Il **LET** (**L**inear **E**nergy **T**ransfer) è stato per decenni il parametro di riferimento per l'interpretazione degli effetti radiobiologici, nel tentativo di spiegare in termini di deposizione locale di energia le differenze di efficacia radiobiologica fra diverse qualità di radiazione, cioè fotoni e particelle cariche. E' però crescente la consapevolezza che tale parametro non sia adeguato a predire con accuratezza l'efficacia di ioni di diverso Z, in quanto non tiene conto della struttura di traccia dello ione [5]. E' infatti noto che, per sua natura, la distribuzione degli eventi di ionizzazione ed eccitazione degli atomi e delle molecole del mezzo biologico sia discontinua, per cui molte delle conseguenze osservabili a livello molecolare e cellulare sono solo parzialmente descrivibili da parametri macroscopici e stocastici quali la dose ed, appunto, il LET.

La perdita di energia in funzione della profondità nel materiale attraversato da radiazione ad alto LET (ioni) è descritta dalla ben nota curva di Bragg. D'altra parte,

gli effetti a livello cellulare e molecolare di questa radiazione, a parità di LET ma per vari Z, sarebbero meglio descritti da un'equivalente curva di Bragg "biologica", in cui, cioè, fossero noti gli effetti radiobiologici lungo il profilo fisico di deposizione energetica dello ione alle varie profondità. In particolare, per le particelle cariche l'energia depositata per unità di percorso è differente a seconda della massa e dell'energia dello ione, quindi a parità di energia assorbita l'*Efficacia Radiobiologica Relativa* (**Relative Biological Effectiveness** o **RBE**) non è costante lungo la traccia dello ione. Ciò comporta che particelle con uguale LET abbiano diversa RBE [6].

L'obiettivo principale di questo lavoro di tesi, svolto nell'ambito del progetto MIMO-BRAGG, finanziato dall'INFN, è lo studio di alcuni effetti radiobiologici su cellule normali in seguito ad esposizione a ioni di vario Z, di particolare rilevanza per la valutazione del danno collaterale ai tessuti sani. Tali effetti sono la senescenza cellulare prematura e l'induzione di aberrazioni cromosomiche.

Gli esperimenti qui descritti sono stati svolti utilizzando linee cellulari umane normali e fasci di carbonio e ossigeno accelerati sia presso i LNS-INFN di Catania che presso l'acceleratore Tandem TTT-3 del Dipartimento di Fisica dell'UDS "Federico II" di Napoli. I campioni biologici sono stati esposti in diverse posizioni della curva di Bragg (inizio del plateau e picco pristino a Catania, picco pristino a Napoli). I dati ottenuti serviranno a studiare gli effetti biologici sub-letali di ioni di vario tipo ed energia su cellule normali e quindi potrebbero risultare di interesse per la comprensione dei possibili effetti indesiderati della radioterapia con ioni pesanti.

La tesi si articola in 4 capitoli ed è strutturata come segue:

- ✓ nel primo capitolo verrà introdotta la problematica in esame, tramite la descrizione delle caratteristiche e degli effetti in ambito biologico delle radiazioni ionizzanti;
- ✓ nel secondo capitolo si procederà all'esposizione del rationale del progetto MIMO-BRAGG e sarà dato spazio ai principi di funzionamento degli acceleratori usati nell'esperimento;

- ✓ Il terzo capitolo sarà incentrato sulla caratterizzazione dei fasci di particelle utilizzati per l'irraggiamento dei campioni e sulle operazioni svolte prima, durante e dopo i turni di misura effettuati;
- ✓ Nel quarto capitolo saranno illustrate le procedure di trattamento dei campioni irraggiati e i risultati ottenuti dall'analisi dei diversi effetti tardivi osservati (senescenza cellulare e aberrazioni cromosomiche).
- ✓ Infine, nelle Conclusioni saranno discusse le principali implicazioni dei risultati sperimentali e i possibili sviluppi futuri di questa linea di ricerca.



# CAPITOLO 1

## *RADIAZIONI IONIZZANTI: CARATTERISTICHE ED EFFETTI BIOLOGICI*

---

### 1.1 LA RADIAZIONE IONIZZANTE

La radiazione interagisce con la materia trasferendo ad essa energia per mezzo di fenomeni di *ionizzazione* ed *eccitazione* degli atomi e delle molecole del mezzo attraversato, potenzialmente modificandone la struttura; in particolare, se tale mezzo è rappresentato da materiale biologico, gli eventi di cessione energetica possono creare al suo interno un danno, rompendo legami molecolari ed alterando quindi le proprietà biochimiche del mezzo. In realtà, il danno biologicamente osservabile è il risultato di un processo a catena di cui lo stadio fisico di interazione radiazione-materia rappresenta il primo passo.

Per semplicità di esposizione, le radiazioni ionizzanti possono essere classificate come:

- **DENSAMENTE IONIZZANTI:** particelle cariche e neutroni, lungo la cui traccia gli eventi di deposizione energetica sono estremamente ravvicinati;
- **SPARSAMENTE IONIZZANTI:** fotoni (raggi x e  $\gamma$ ), la cui distribuzione degli eventi di cessione energetica nel mezzo è sporadica e casuale. Quando assorbiti nel mezzo, cedono la propria energia producendo particelle secondarie cariche veloci, che possono provocare ionizzazione diretta.

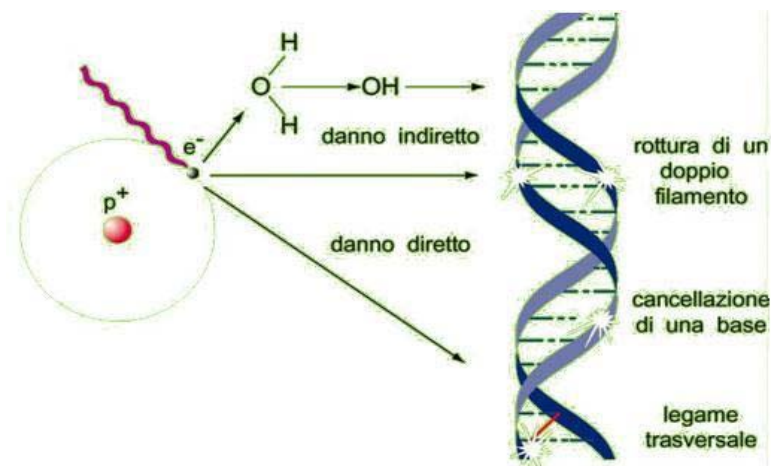
Dal punto di vista del meccanismo con cui le radiazioni ionizzanti possono interagire con le biomolecole, causando quindi effetti biologicamente significativi, si possono distinguere due modalità di azione [1]:

- **Azione diretta**

Trasferimento di energia a una biomolecola (ad es. DNA) attraverso ionizzazioni primarie e/o secondarie che avvengono direttamente sugli atomi della biomolecola, dando inizio a una catena di eventi fisico-chimici culminanti in un effetto biologico osservabile.

- **Azione indiretta**

Trasferimento di energia a una biomolecola attraverso reazioni con altri atomi o molecole (principalmente acqua) della cellula. Questo effetto dipende fortemente dalla presenza di acqua e, più in generale, dalla composizione del mezzo.



**Fig.1.** Azione della radiazione ionizzante sul DNA

Le lesioni primarie (*Fig.1*) sono indotte dalla radiazione negli atomi presenti nel mezzo assorbente in modo casuale, quindi non ci sono molecole all'interno di una cellula più o meno radiosensibili. La molecola di DNA, in quanto presente in una sola copia e portatrice dell'informazione genetica, è il bersaglio per eccellenza della radiazione. Le lesioni radioindotte sul DNA possono alterarne la struttura primaria (sequenza delle basi sull'elica) e secondaria (doppia elica) e le funzioni biologiche (replicazione, trascrizione, espressione, ...). Quelle maggiormente osservate sono:

- Rottura dei legami (idrogeno e p) tra basi
- Danneggiamento di una base azotata
- Danneggiamento di uno zucchero
- Rottura di un filamento singolo (SSB)
- Rottura di entrambi i filamenti (DSB)
- Siti con danni multipli (cluster)
- Intercalazione (introduzione di un frammento tra i due filamenti)
- Legame crociato lungo il filamento (intra-strand cross link)
- Legame specifico lungo un filamento
- Legame crociato tra filamenti (inter-strand cross link)
- Legame crociato tra DNA e proteina

In seguito alla rottura dei legami chimici il danno biologico può condurre la cellula verso due destini, in tempi e modalità diversi:

- *morte cellulare*, che può sopraggiungere entro ore o giorni e induce:
  - effetti precoci;
  - effetti tardivi;
  - conseguenze sullo sviluppo (a livello fetale)
- *mutazioni del DNA*, che possono favorire la carcinogenesi, o a mutazioni genetiche ereditarie dopo generazioni (*aberrazioni cromosomiche*).

Ovviamente, data la natura sparsamente ionizzante dei fotoni, è molto più probabile che il danno radiobiologico da essi provocato sia mediato da ionizzazioni del mezzo in cui le macromolecole di interesse biologico si trovano immerse, ossia

l'acqua, la cui radiolisi provoca la formazione di specie chimiche altamente reattive che diffondono e interagiscono con tali macromolecole.

Viceversa, a causa della elevata densità di ionizzazione che caratterizza le particelle cariche, siano esse elettroni veloci secondari o ioni che interagiscono in maniera coulombiana con il materiale biologico, l'azione diretta è nel loro caso il meccanismo prevalente. Di conseguenza, le interazioni che possono avere ripercussioni sull'integrità delle macromolecole biologiche sono sempre riconducibili a particelle cariche.

## 1.2 POTERE FRENANTE E CURVA DI BRAGG

In generale, due aspetti principali caratterizzano il passaggio di particelle cariche attraverso la materia: la perdita di energia da parte della particella e la deviazione dalla sua direzione iniziale. Questi effetti sono il risultato di vari processi, principalmente di:

- collisioni anelastiche con gli elettroni atomici del mezzo;
- scattering elastico da parte dei nuclei
- reazioni nucleari

Queste ultime si verificano solo ad energie molto elevate e la loro casistica non viene coinvolta praticamente in questo lavoro di tesi, per cui esse non saranno qui trattate.

Le reazioni di scattering elastico dovute all'interazione coulombiana della particella carica con il nucleo hanno minore rilevanza dal punto di vista radiobiologico, in quanto portano principalmente alla deflessione della particella incidente.

Le collisioni anelastiche con gli elettroni atomici possono essere considerate come le principali responsabili della perdita di energia delle particelle cariche nella materia. In queste collisioni (caratterizzate da sezioni d'urto  $\sigma \approx 10^{-17} \div 10^{-16} \text{ cm}^2$ ) viene trasferita energia dalla particella all'atomo, causando ionizzazione o

eccitazione di quest'ultimo. L'energia spesa mediamente da una particella ionizzante per creare una coppia ione-elettrone (cioè un evento di ionizzazione) è definita con **W** e dipende dalla massa e dalla velocità della particella stessa [2].

Va sottolineato come ogni singola collisione sia un processo statistico. Poiché il numero di collisioni particella-elettroni per unità di lunghezza (macroscopica) è molto grande, le fluttuazioni nella perdita di energia totale sono molto piccole: è dunque possibile valutare la perdita media di energia della particella incidente per unità di percorso nella materia, detta **potere frenante** del mezzo attraversato ("stopping power") e indicata con  $\frac{dE^1}{dx}$ . Per energie della particella incidente elevate rispetto alle energie di ionizzazione richieste, il potere frenante è dato dalla formula di Bethe-Bloch, piuttosto complicata; volendo evidenziare semplicemente la dipendenza di questo fattore da alcune quantità, tale formula si può approssimare come [3]

$$-\frac{dE}{dx} \approx \rho \frac{Z Z^2}{A \beta^2} f(\beta)$$

in cui:

- dx: spessore di materiale attraversato, espresso in g/cm<sup>2</sup>;
- ρ: densità del mezzo;
- β= v/c, con v velocità della particella, c velocità della luce;
- Z: numero atomico del mezzo;
- A: numero di massa del mezzo
- f(β): funzione lentamente variabile di β.

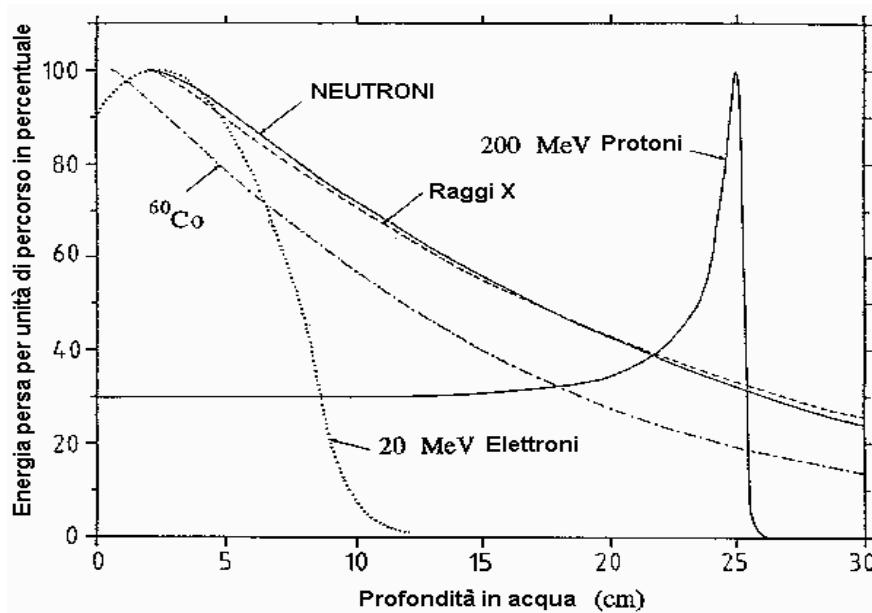
---

<sup>1</sup> E' proprio il carattere intrinsecamente statistico della deposizione di energia che rende la descrizione che segue concettualmente corretta per volumi macroscopici ma inadeguata dal punto di vista micro dosimetrico. Risulta chiaro che, dipendendo gli effetti biologici dagli eventi di ionizzazione su scale dei μm o addirittura dei nm (ordine di grandezza della distanza di separazione delle due eliche del DNA), le fluttuazioni di cui sopra diventano non trascurabili. Questo rappresenta il razionale per il superamento di tali grandezze e giustifica la necessità di tener conto anche della struttura di traccia degli ioni di cui si voglia studiare l'efficacia radiobiologica.

La dipendenza dal mezzo diffondente sta principalmente nel rapporto  $Z/A$ , che a sua volta varia assai lentamente da un isotopo all'altro: se ne deduce che il potere frenante è una caratteristica più della particella che del mezzo, perché dipende fortemente dall'energia cinetica della particella.

Alle basse energie, quando la velocità della particella incidente diventa paragonabile alla velocità degli elettroni atomici intorno al nucleo, l'assunzione che l'elettrone sia fermo rispetto alla particella incidente non è più valida e la formula di Bethe-Bloch necessita di una correzione: a tali energie, infatti, la particella cattura elettroni e il potere frenante decade rapidamente. Quindi, man mano che una particella, nell'attraversare un mezzo, perde energia, il potere frenante aumenta, la particella rallenta sempre più rapidamente e deposita una quantità di energia per unità di percorso che cresce con continuità fino al punto in cui il potere frenante raggiunge il massimo, per poi azzerarsi, ossia nel punto in cui la particella ha ceduto tutta la sua energia fermandosi nel mezzo. Per elettroni e positroni, invece, il rilascio di energia in funzione dello spessore attraversato è differente a causa di ulteriori meccanismi che intervengono nella loro interazione con la materia; in particolare, per gli elettroni il picco non si osserva a causa dei molteplici e casuali cambiamenti di traiettoria a causa dei quali esso rallenta, per cui non si verifica un incremento di energia a fine percorso [3].

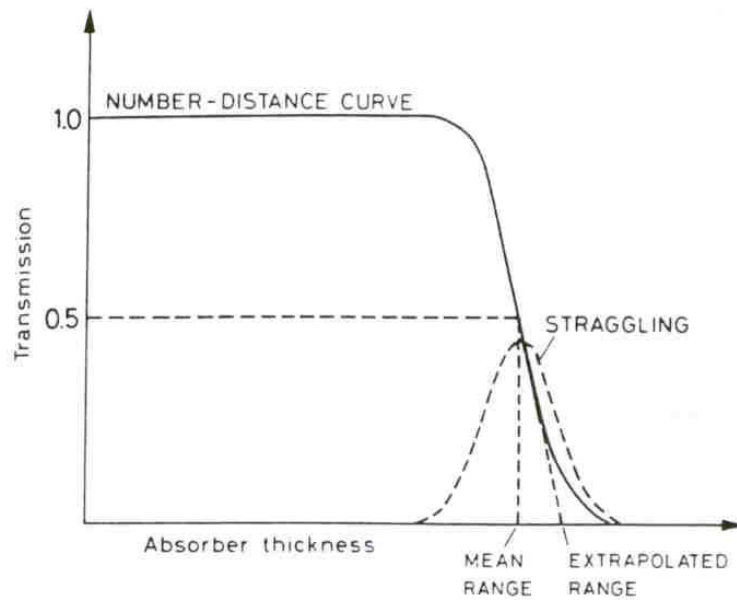
L'andamento della perdita di energia in funzione della profondità del mezzo, noto come **curva di Bragg**, è rappresentato in *Fig.2*; è riportato, per confronto, il comportamento di neutroni, fotoni ed elettroni energetici.



**Fig.2.** Energia persa per unità di percorso per vari tipi di radiazione ionizzante in funzione della profondità raggiunta nel mezzo.

Assumendo che la perdita di energia nel mezzo sia continua, la distanza massima di penetrazione è un numero ben definito per tutte le particelle identiche con stessa energia iniziale che attraversano lo stesso materiale. Questa quantità è chiamata **range** della particella. Considerando un fascio di particelle con identico  $Z$ , si osserva in realtà che il range delle singole particelle varia a seconda della velocità, ossia dell'energia cinetica, delle stesse. Una misura su un numero grande di particelle fornisce dunque una distribuzione statistica di singoli "range" centrata intorno ad un valor medio, detto *range medio*, con una certa deviazione standard. Questo fenomeno è detto *range straggling* (Fig.3). Il range medio è definito come la distanza a cui la metà esatta delle particelle è stata intercettata. Da un punto di vista teorico, possiamo calcolare il range medio di una particella di una data energia iniziale  $E_0$  mediante il seguente integrale [4]:

$$R(E_0) = \int_0^{E_0} -\left(\frac{dE}{dx}\right)^{-1} dE$$



**Fig.3.** Range medio e range estrapolato di una particella

### 1.3 DEPOSIZIONE DI ENERGIA NEL MEZZO: LET

Per quanto detto finora, l'interazione con la materia di radiazioni direttamente ionizzanti può essere caratterizzata dal **potere frenante lineare  $S$**

$$S = \left(\frac{dE}{dx}\right)_{coll} + \left(\frac{dE}{dx}\right)_{irr} = S_{coll} + S_{irr}$$

dove  $dE$  è l'energia perduta dalla particella carica lungo il cammino  $dx$ .

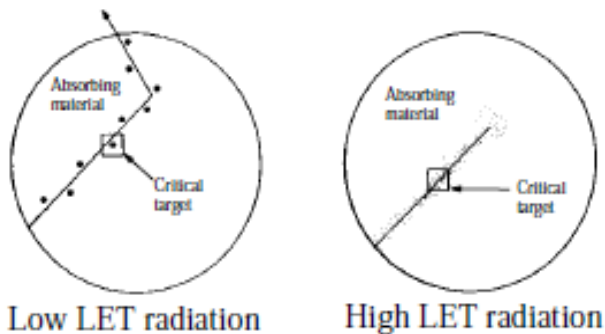
Si hanno due componenti principali:

- perdite dovute a collisione  $S_{coll}$  (*potere frenante lineare da collisione*);
- perdite per irraggiamento  $S_{irr}$  (*potere frenante lineare per irraggiamento*), rilevante solo per elettroni di alta energia.

Si definisce inoltre **potere frenante lineare di massa** il rapporto  $\frac{S}{\rho}$ , dove  $\rho$  è la densità del materiale attraversato [5].



Per l'interpretazione degli effetti delle radiazioni ionizzanti sulla materia vivente è di fondamentale importanza la distribuzione spaziale dell'energia trasferita lungo le tracce dalle particelle cariche. Piuttosto che al potere frenante si preferisce far riferimento a una quantità, il **LET (Linear Energy Transfer, trasferimento lineare d'energia)**, detto anche *potere frenante lineare da collisione*, che tiene conto solamente delle perdite di energia per unità di percorso per collisione, poiché le perdite per irraggiamento avvengono con emissione di radiazione elettromagnetica



**Fig.4.** Deposizione di energia lungo la traccia di particelle a basso ed alto LET

che si suppone trasferisca energia lontano dalle tracce, quindi lontano dal sito di interazione con la molecola biologica di interesse.

Il LET si esprime solitamente in  $\text{keV}\cdot\mu\text{m}^{-1}$ ; dipende da velocità e carica della particella (cresce al crescere di Z e al decrescere di v) e al crescere della profondità di penetrazione sale

rapidamente fino ad un massimo, coincidente con il picco di Bragg della particella. Si usa quindi distinguere le radiazioni ionizzanti in (Fig.4):

- particelle a basso LET: particelle sparsamente ionizzanti, come elettroni e fotoni di ogni energia.
- particelle ad alto LET: particelle densamente ionizzanti, come protoni,  $\alpha$ , ioni pesanti, neutroni.

Come accennato nella nota 1 di pag.12, è essenziale conoscere il LET *puntualmente* lungo la traccia di una particella per predire esaurientemente la risposta radiobiologica. Difatti, nel processo di perdita di energia per ionizzazione le particelle cariche primarie cedono energia ad elettroni della materia, i quali talvolta acquisiscono energia cinetica sufficiente per dare luogo a elettroni secondari (*raggi  $\delta$* ), che si comportano a loro volta come le particelle primarie, trasportando lungo la propria traccia l'energia ricevuta e trasferendola al mezzo in punti anche distanti dal sito ove è avvenuta la collisione. I raggi  $\delta$  di bassa energia sono molto più probabili di quelli di alta energia: di conseguenza, poiché il diametro della traccia non è

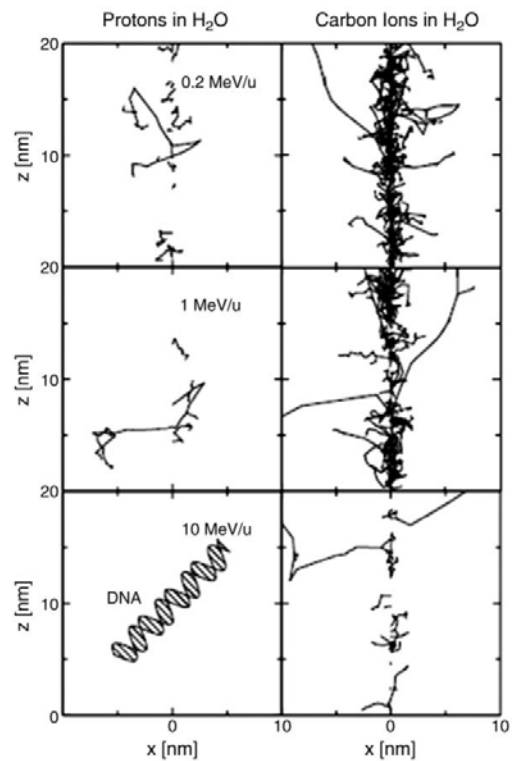
proporzionale al LET, ma dipende dall'energia della particella e, a parità di energia, dal suo Z, la densità di ionizzazione sarà diversa per diversi ioni di pari LET. In generale, gli effetti di particelle di ugual LET ma Z diversi possono differire (Fig.5).

La conoscenza della distribuzione di queste particelle lungo una traccia (*struttura di traccia dello ione*) è di primaria importanza nell'interpretazione degli effetti indotti dalle radiazioni nei materiali biologici, in quanto fornisce informazioni dirette sul trasporto di energia a distanza.

Per conoscere la deposizione d'energia in una ben precisa regione intorno alla traccia delle particelle incidenti si fa ricorso ad un'ulteriore quantità, detta *potere frenante per collisione lineare ristretto*  $L_{\Delta}$ , che tiene conto solo dell'energia ceduta localmente nel mezzo, cioè in prossimità della traccia primaria, poiché in esso si considerano esclusivamente le collisioni che comportano cessioni di energia inferiori ad un opportuno valore.  $L_{\Delta}$  è definito come:

$$L_{\Delta} = \left(\frac{dE}{dl}\right)_{\Delta}$$

dove  $dE$  rappresenta l'energia ceduta localmente per collisione da una particella carica lungo un segmento di traccia  $dl$ , avendo considerato nel computo di  $dE$  solo le collisioni che comportano un trasferimento di energia minore di  $\Delta$  (di solito in eV) per singola collisione. Come energia di cut-off di solito in radiobiologia si considera  $\Delta=100$  eV, energia media cui corrisponde un range dei raggi  $\delta$  entro le distanze tipiche dei bersagli biologici (ad esempio, la doppia elica del DNA).



**Fig.5.** Struttura di traccia di protoni e carbonio in  $H_2O$ . A parità di energia, si ottengono diverse strutture di traccia. In basso a sx è raffigurata schematicamente la doppia elica del DNA per avere un raffronto dimensionale.

Se si prendono in considerazione tutte le perdite d'energia senza imporre alcun limite, si ottiene per il LET, che in questi casi si suole indicare con il simbolo  $L_\infty$ , lo stesso valore numerico del potere frenante per collisione. In genere il  $L_{100}$  vale circa il 60% del  $L_\infty$ , quindi i raggi  $\delta$  più energetici (quelli "indipendenti" dalla traccia madre) sono responsabili del trasporto di circa il 40% dell'energia totale persa dalla particella lungo la traccia.

Poiché gli elettroni  $\delta$  hanno un largo spettro di energia, il LET generalmente non assume un valore ben definito, ma segue una distribuzione. Se  $f(L)$  è la probabilità di trovare un valore del LET nell'intervallo  $[L, L+dL]$ , si definisce **track average LET** la quantità

$$\overline{L_T} = \int L \cdot f(L) dL$$

mentre si definisce il **dose average LET** come

$$\overline{L_D} = \frac{[\int L^2 \cdot f(L) dL]}{L_T}$$

## 1.4 DOSE E RBE

L'effetto biologico di una radiazione è tradizionalmente correlato all'ammontare di energia trasferita al volume irraggiato e quindi è stato studiato in funzione del LET. Ovviamente, il LET definisce solo il rateo lineare di trasferimento di energia ma non la quantità effettivamente assorbita dal mezzo. Si può quindi pensare di valutare l'energia media assorbita per mezzo della **dose**, definita come l'energia effettivamente depositata all'interno di un volume unitario  $dV$ : [6]

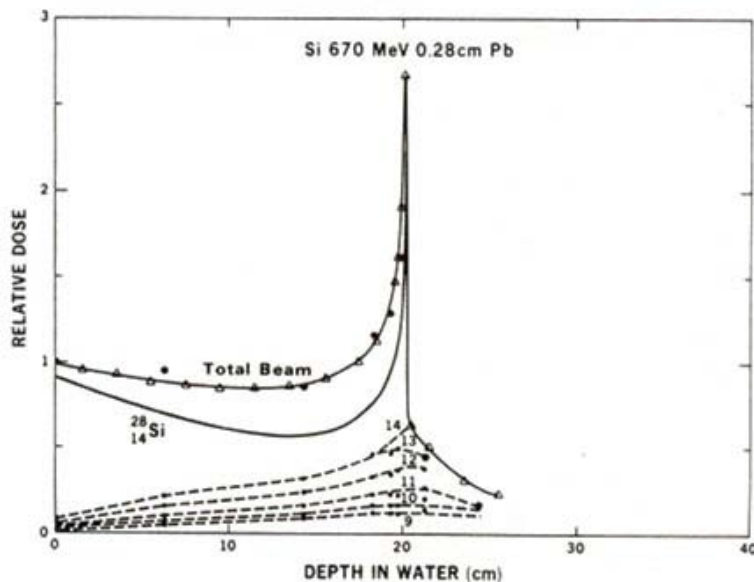
$$D = \frac{dE}{\rho dV} = \frac{dE}{dm}$$

con  $dm$  elemento unitario della massa del campione.  $dE$  è l'energia media rilasciata in un volume  $dV$  di un mezzo di densità  $\rho$  ed è data dalla differenza della somma delle energie che entrano in  $dV$  ( $\Sigma E_{in}$ ) e la somma di quelle che escono ( $\Sigma E_{out}$ ), più la somma algebrica delle energie liberate (positive) ed assorbite (negative) nelle reazioni che avvengono in  $dV$  ( $\Sigma Q$ ):

$$dE = \Sigma E_{in} - \Sigma E_{out} + \Sigma Q$$

L'unità di misura per la dose è il Gray (Gy), dove  $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$ .

La dose assorbita da un fascio di particelle cariche è dovuta alla somma delle varie dosi associate alle ionizzazioni prodotte dal fascio primario e dagli ioni secondari eventualmente prodotti dalla frammentazione del fascio (per energie di questo elevate e bersagli con alto Z). Nel caso di fasci di particelle cariche che attraversano bersagli biologici (numero atomico piccolo-medio) si può avere anche la frammentazione del bersaglio in ioni di minore numero atomico che vengono accelerati (*Fig.6*).



**Fig.6.** Ioni di Si da 670 MeV si frammentano nell'attraversare un bersaglio di piombo. Le curve con indice da 9 a 13 rappresentano le distribuzioni cumulative di dose per i frammenti di Si con numero atomico da 1 a quello indicato.

Per tenere conto del fatto che dosi uguali impartite da tipi differenti di radiazioni producono danni biologici differenti, si introduce il concetto di **dose equivalente**, definita come la dose media assorbita in un organo o tessuto pesata in funzione del tipo e dell'energia della radiazione con i fattori  $W_R$ :

$$H_t = \sum_R W_R \cdot D_{T,R}$$

dove  $D_{T,R}$  è la dose assorbita mediata sul tessuto T. L'unità di misura è il Sievert (Sv).

E' stato stimato che l'assorbimento di 1 Gy da parte di un nucleo cellulare comporta circa 2000 ionizzazioni sul DNA. Le ionizzazioni provocate per azione diretta da radiazioni ad alto LET sono solitamente resistenti alla riparazione del danno sul DNA e sono le principali responsabili della formazione di clusters e DSB (rottura del doppio filamento), che la maggior parte dei dati sperimentali disponibili identifica come la lesione più radiobiologicamente significativa per molteplici endpoint (morte cellulare, carcinogenesi, mutazioni).

La dose assorbita è una quantità *macroscopica* correlata alla energia media assorbita, per esempio, da un campione di cellule, mentre ai fini del danno biologico sarebbe auspicabile conoscere la distribuzione *microscopica* dell'energia, la posizione della traccia e la densità di coppie di ioni create. In biologia delle radiazioni si ha a che fare con diverse tipologie di radiazione e diventa difficile paragonare i risultati degli esperimenti basandosi solo sui valori del LET, essendo questo un parametro statistico che non tiene conto della natura discontinua delle deposizioni energetiche.

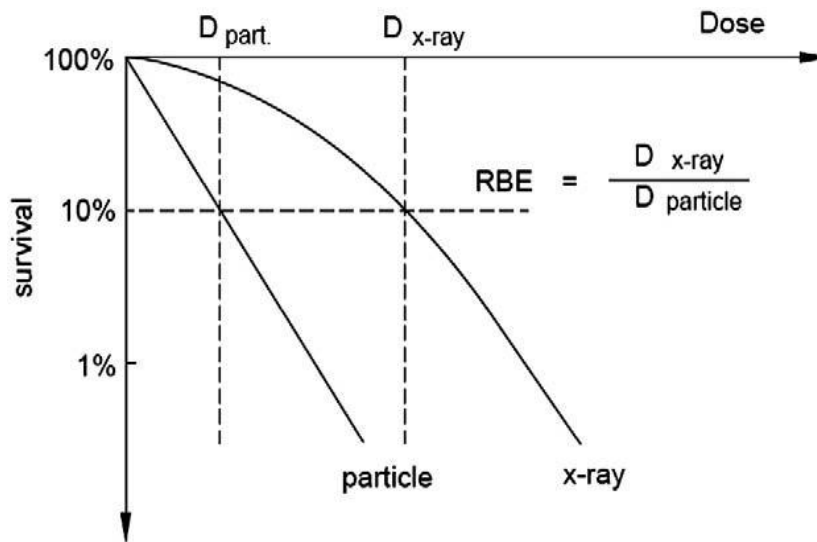
Per paragonare tra loro qualità diverse di radiazioni ionizzanti nella loro efficacia di induzione di un determinato effetto, si definisce l'**RBE** (acronimo dell'inglese **Relative Biologic Effectiveness**), la cui definizione formale è data da [7]

$$RBE = \frac{\text{efficacia biologica della radiazione in esame}}{\text{efficacia biologica di raggi X con } V = 250 \text{ kV}}$$

Considerando la dose della radiazione in esame,  $D_r$ , e quella della radiazione di riferimento,  $D_{rif}$ , che producono lo stesso livello dell'effetto preso in esame:

$$RBE = \frac{\text{Dose (in Gy o rad) efficace di raggi X con } V = 250kV}{\text{Dose (in Gy o rad) efficace della radiazione in esame}}$$

in cui la radiazione X è presa convenzionalmente come radiazione di riferimento (Fig.7).



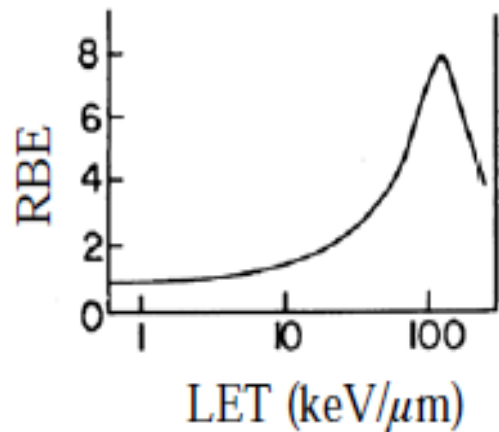
**Fig.7.** Rappresentazione grafica dell'RBE. Considerate le curve di sopravvivenza per una data popolazione cellulare (percentuale di cellule sopravvissute in funzione della dose), per la radiazione di riferimento e per la radiazione in esame, si valuta il valore di dose corrispondente ad una fissata percentuale di sopravvivenza. Il rapporto tra il valore di dose della radiazione di riferimento (x-rays) e quello della radiazione in esame fornisce l'RBE.

Al di là delle radiazioni in esame e di riferimento, l'RBE dipende da un certo numero di altri fattori:

- effetto biologico considerato;
- frazionamento della dose, che tende a “spalmare” il calcolo dell'RBE sulle curve di sopravvivenza delle diverse frazioni di radiazione (importante da considerare in radioterapia);

- variazioni nel *rateo di dose* (dose/tempo, misurato in Gy/min);
- qualità della radiazione (LET)

L'RBE è inizialmente proporzionale al LET e cresce al crescere del LET della radiazione ionizzante (Fig.8). Questo incremento è fondamentalmente il risultato di una maggiore densità di ionizzazione e quindi della formazione di danni fortemente localizzati e di crescente severità, ovvero di minore riparabilità da parte dei meccanismi intracellulari di riparo del danno citogenetico.



**Fig.8.** Andamento dell'RBE in funzione del LET

## 1.5 CURVE DOSE-RISPOSTA; EFFETTI DI TRACCIA

La relazione funzionale tra la dose di radiazione assorbita e l'effetto biologico osservato è rappresentata tramite le *curve dose-risposta*, i cui parametri (larghezza della spalla, pendenza del tratto esponenziale) possono variare in base a:

- tipo di popolazione cellulare
- qualità della radiazione
- effetto considerato
- condizioni ambientali durante (ossigeno, temperatura) e dopo l'esposizione
- aggiunta di farmaci

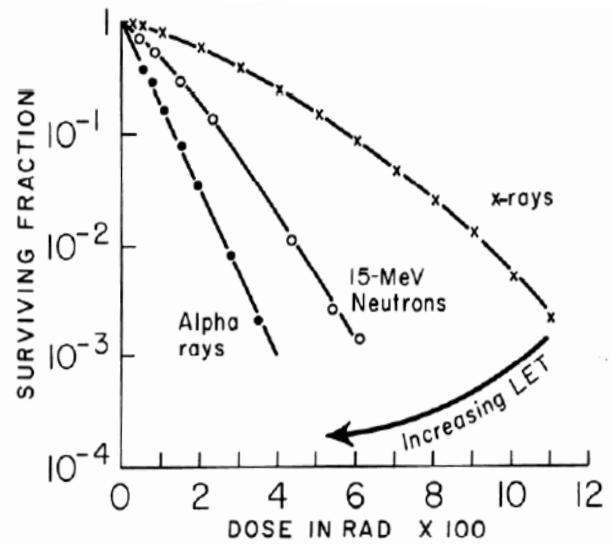
Una delle curve dose-risposta più utilizzate ai fini della comprensione degli effetti letali delle radiazioni è la *curva di sopravvivenza cellulare* (Fig.9), che mette in relazione la dose di radiazioni fornita ad un campione cellulare con la frazione della popolazione cellulare irradiata che sopravvive, misurata in base alla sua capacità clonogenica (capacità di formare colonie). Una curva di sopravvivenza può avere 4 andamenti caratteristici: lineare, esponenziale, sigmoidale, misto, ognuno dei quali indica la radiosensibilità della popolazione cellulare in esame.

Le curve dose-risposta sono state analizzate per elaborare modelli matematici con i quali interpretare il meccanismo di azione delle radiazioni. Tali modelli matematici si basano su una serie di postulati:

- gli eventi discreti di deposizione di energia nella materia, denominati "hit", hanno una natura stocastica nel tempo e nello spazio;
- la morte cellulare è connessa al verificarsi di un'interazione a livello di sedi particolarmente critiche delle cellule ai fini della sua possibilità di divisione;
- esistono nella molecola del DNA alcune sedi la cui integrità è indispensabile per consentire la divisione cellulare;
- l'evenienza di una doppia rottura in una o più di tali sedi è la causa della morte cellulare
- tali sedi sono da considerare i bersagli o "target" biologici di identificabile volume fisico e la risposta in esame si verifica se target specifici vengono inattivati da un definito numero di hit.

I due modelli cui si fa riferimento nello studio dell'interazione radiazione-materia sono:

- ✓ modello "**single target, single hit**", secondo il quale in ogni cellula esiste un solo bersaglio sensibile la cui inattivazione produce la morte della cellula e l'inattivazione della capacità riproduttiva richiede un unico evento in questo bersaglio in ogni cellula;



**Fig.9.** Curve di sopravvivenza a confronto: radiazione di riferimento (x-rays) e radiazioni ad alto LET



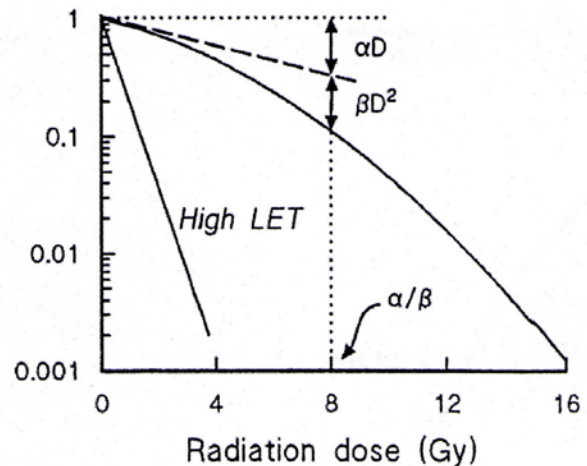
- ✓ modello “**multi target, single hit**”, secondo cui in ogni cellula esistono N bersagli sensibili, in ognuno dei quali deve verificarsi almeno un evento per avere la perdita della capacità riproduttiva.

Un caratteristico andamento della curva dose-risposta relativa a radiazioni ionizzanti (Fig.10) è

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

dove:

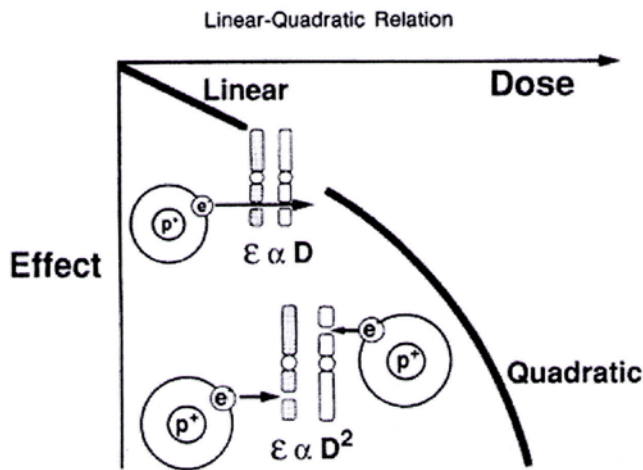
- FS = fattore di sopravvivenza
- D = dose (Gy)
- $\alpha$  = fattore di curvatura lineare
- $\beta$  = fattore di curvatura quadratico



**Fig.10.** Curva di sopravvivenza per radiazioni ionizzanti con andamento lineare-quadratico

Nel modello di curva lineare-quadratico, l’inattivazione della capacità riproduttiva può avvenire sia per un singolo evento in un singolo target che per più eventi nello stesso target. La prevalenza di una delle due modalità di inattivazione determina la forma della curva.

La componente  $\alpha$  (Fig.11) rappresenta la componente lineare del danno direttamente letale (i.e. non riparabile). Può essere identificata con gli eventi di DSB ed è prevalente con radiazioni ad alto LET e a basso dose rate. La componente  $\beta$  rappresenta la componente quadratica della curva e corrisponde al danno riparabile. Può essere identificata con gli eventi di SSB ed è quindi prevalente con radiazioni a basso LET. Il rapporto  $\alpha/\beta$  rappresenta la dose per cui componente lineare e quadratica sono uguali e può descrivere la morfologia della curva. [8]

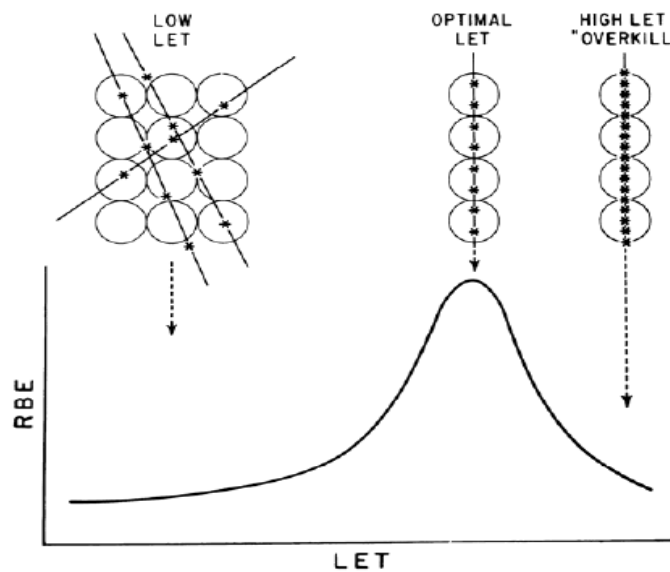


**Fig.11.** Relazione tra hit e target nelle due zone, lineare e quadratica, della curva di sopravvivenza. Il target considerato è rappresentato da una coppia di cromosomi.

A basse dosi, dunque, considerando radiazione a basso LET, la forma della curva di sopravvivenza indica che sono necessari eventi multipli per provocare la morte cellulare: la radiazione a basso LET produce una traccia "sparsamente ionizzante", ed è raro che due tracce depositino energia nella stessa cellula.

Per radiazione ad alto LET, la densità di ionizzazione è tale che in una cellula ci siano con certezza almeno due eventi, abbastanza per provocare

l'inattivazione cellulare. Oltre i 100 keV/μm l'RBE decresce all'aumentare del LET: questo fenomeno è stato definito **effetto overkill** (Fig.12), poiché la densità di ionizzazione in una singola cellula è maggiore di quella necessaria a generare i due eventi sufficienti a provocare l'inattivazione della cellula stessa. Tale dose risulta dunque dissipata all'interno di una singola cellula e non contribuisce all'inattivazione cellulare, quindi a parità di particelle l'RBE decresce.



**Fig.12.** Rappresentazione dell'effetto overkill

## **CAPITOLO 2**

### ***ATTIVITA' SPERIMENTALE NELL'AMBITO DEL PROGETTO MIMO-BRAGG***

---

#### **2.1 INTRODUZIONE**

Nel Capitolo 1 è stata fornita una descrizione teorica delle radiazioni ionizzanti e dei loro effetti sul materiale biologico, in particolare sul DNA, portatore dell'informazione genetica. La grande attenzione rivolta alle conseguenze dell'esposizione umana a questo tipo di radiazioni ha origine dalla presenza costante delle stesse in molti contesti. In particolare, la radiazione ad alto LET è nota per la maggiore efficacia nell'induzione di una serie di effetti biologici rispetto ai fotoni.

La radiazione ad alto LET può provenire da:

- *fonti naturali*
  - radiazione alfa emessa dal decadimento del radon e dai suoi discendenti nel caso della radioattività ambientale;
  - radiazione cosmica HZE (High Energy and Z) nel caso di missioni spaziali;
- *applicazioni mediche*
  - terapie antitumorali che coinvolgono fasci di protoni e ioni carbonio;
  - radioimmunoterapia con radionuclidi
  - diagnostica con radionuclidi.

I meccanismi alla base degli effetti radiobiologici di tali esposizioni e delle conseguenze, in particolare a lungo termine, sulla salute umana, non risultano ancora oggi completamente chiari [1-6], principalmente a causa della complessa natura della risposta dei sistemi biologici agli stress citogenetici.

E' importante ricordare che la severità del danno al materiale biologico investito da radiazione ionizzante ad alto LET cambia con la profondità raggiunta dalle particelle stesse; difatti, il valore della RBE è influenzato da un certo numero di fattori, non per ultimo la variazione del pattern di ionizzazioni lungo la traccia dello ione che penetra nel mezzo. Dal punto di vista radiobiologico, gli effetti dell'esposizione alla radiazione ionizzante sono determinati dal livello di danno inflitto (principalmente a carico del DNA), che a sua volta rispecchia le modalità di deposizione energetica, descritte dalla curva di Bragg. Al crescere del LET della radiazione il danno predominante assume la forma di cluster di lesioni (rottture della doppia, basi danneggiate del DNA) [7], in quanto aumenta la densità di ionizzazione lungo la traiettoria della radiazione.

Tuttavia, la determinazione degli effetti dell'esposizione a ioni accelerati non è un fenomeno di così facile rappresentazione. RBE e LET sono parametri inadeguati a descrivere compiutamente i risultati sperimentali e a predire realisticamente l'efficacia dei vari ioni accelerati: per una corretta interpretazione sia sperimentale che modellistica degli effetti biologici si deve tener conto, infatti, della diversa

struttura di traccia dello ione. Difatti, il LET rappresenta un buon indicatore del tasso di deposizione energetica, ma non è capace di predire gli effetti biologici attraverso una semplice relazione [8]. In particolare, l'energia di radiazione ad alto LET è depositata in maniera quantitativamente differente secondo massa ed energia iniziale dello ione. Ne consegue che l'RBE osservata possa differire, a parità di energia assorbita, ossia di dose [9], e che quindi non si mantenga costante lungo la traccia dello ione [10]. Poiché il diametro della traccia non è proporzionale al LET, ma dipende dall'energia della particella e, a parità di energia, dal suo Z, la densità di ionizzazione sarà diversa per diversi ioni di pari LET.

Per quasi tutti i tipi di ioni e per i principali obiettivi radiobiologici di interesse in radioprotezione e in radioterapia, l'RBE di particelle cariche non varia linearmente con il LET ed è  $\geq 1$ . Mentre il *danno letale* è legato agli effetti acuti e previene la trasformazione neoplastica della cellula, a dosi più basse può intervenire in diverse forme un *danno subletale*, che non causa la morte cellulare, ma accumulandosi in cellule proliferanti può comportare instabilità genetica, trasformazione, mutazione e carcinogenesi. All'aumentare della dose, gli effetti letali aumentano, mentre quelli subletali esibiscono un massimo man mano che all'aumentare del danno il ciclo cellulare<sup>2</sup> rallenta fino ad arrestare la sua progressione. Ne discende che gli effetti non letali sono più probabili nella regione di plateau della curva di Bragg, in cui la letalità cellulare è bassa ma dove le cellule normali ricevono ad ogni modo dosi non trascurabili.

La maggior parte degli studi radiobiologici sugli ioni ha finora puntato maggiormente sugli effetti letali a carico delle cellule tumorali, esaminando principalmente la sopravvivenza clonogenica solo sul picco della curva di Bragg. Ciò è stato dettato dalla necessità di utilizzare la radiazione ad alto LET per la terapia oncologica su tumori radiosensibili. Invece, il danno cellulare subletale nella regione di plateau, oltre il picco e nelle immediate vicinanze della traiettoria dello ione, d'interesse per eventuali effetti ~~targeted~~ [ 11], non è stato ancora

---

<sup>2</sup> Il ciclo cellulare, o ciclo di divisione cellulare, è la serie di eventi che coinvolgono una cellula eucariota tra una divisione cellulare e quella successiva. La sua durata varia a seconda della specie cui la cellula appartiene, del tipo di cellula e delle condizioni di crescita (vedere Appendice A).

adeguatamente misurato e modellizzato. Tale danno a lungo termine può compromettere la stabilità genomica delle cellule normali interessate e l'integrità funzionale dei tessuti sani, e per questi motivi è fondamentale determinare l'efficacia dell'origine di tali effetti per diversi scenari di esposizione.

In generale, è possibile che gli ioni accelerati posseggano un RBE maggiore rispetto alla radiazione a basso LET per effetti non letali tardivi, che occorrendo lungo la regione di plateau della curva di Bragg interessano maggiormente i tessuti sani. Inoltre, è noto sia da studi in vitro che su animali che gli ioni pesanti sono molto più efficienti della radiazione a basso LET anche nell'induzione di cancro, seppure a dosi relativamente basse. Ancora, è stato dimostrato che anche dosi molto basse di radiazione ad alto LET (esposizione subletali) essi sono capaci di indurre senescenza cellulare prematura, che a sua volta può condurre a complicazioni del tessuto sano, compromissione di organi ed altri effetti non tumorigenici.

Al momento esistono solo poche misure di danno subletale lungo la traiettoria di ioni [12-18], che sono limitate a poche posizioni (tipicamente, centro del plateau e del picco allargato) rendendo difficile la stima dell'RBE e delle sue variazioni lungo il cammino della particella. Tali risultati hanno però evidenziato come la curva di Bragg biologica possa variare quantitativamente e qualitativamente per ognuno degli obiettivi esaminati lungo la traiettoria dello ione (curva di Bragg fisica) e come differisca da questa ultima per ciascuno ione e per ciascuna dose. E' fondamentale quindi approfondire lo studio delle proprietà radiobiologiche di ioni di vario Z tramite precise misure del danno citogenetico lungo la loro traccia, che possano così portare alla costruzione di più accurati modelli biofisici degli effetti della radiazione ad alto LET, al fine di elaborare piani di rischio più affidabili in radioprotezione e migliori piani di trattamento e radioterapia [19-21].

## 2.2 MIMO-BRAGG: OBIETTIVI SPERIMENTALI

Il progetto *MiMo-BRAGG* (**M**isura e **M**odellizzazione di danno citogenetico lungo la curva di **BRAGG** di ioni accelerati) si propone di studiare e quantificare il danno citogenetico rilevante per l'insorgenza di effetti tardivi lungo la traiettoria di ioni accelerati e la loro modellizzazione rispetto alle caratteristiche fisiche di tali particelle, tenendo in considerazione le variazioni del danno al DNA e della risposta cellulare lungo il percorso dello ione e i vari fattori (fisici e biologici) che li determinano.

Gli obiettivi finali sono:

- la realizzazione di curve di Bragg "biologiche" per effetti correlati con il rischio di tumori e di degenerazione tissutale;
- la modellizzazione, mediante metodi Monte Carlo, degli effetti della struttura di traccia.

Alla realizzazione del progetto afferiscono principalmente il Dipartimento di Scienze Fisiche dell'UDS "Federico II" di Napoli e il Dipartimento di Fisica Nucleare e Teorica dell'UDS di Pavia, insieme alle sezioni INFN dei rispettivi capoluoghi. Tali enti si avvalgono inoltre della collaborazione italiana con i Laboratori Nazionali del Sud, siti in Catania, e della collaborazione estera con il Centre for Cancer Research and Cell Biology, sito presso la Queen's University di Belfast (UK).

### 2.2.1 ATTIVITA' SPERIMENTALE A NAPOLI E CATANIA

Il presente lavoro di tesi illustra in particolare le attività svolte presso il Dipartimento di Napoli e i LNS di Catania, dove l'attività sperimentale è stata rivolta al primo dei due obiettivi del progetto.

In entrambe le strutture, campioni cellulari normali opportunamente trattati sono stati sottoposti ad irraggiamento con fasci di carbonio e ossigeno. In particolare, presso il DSF di Napoli gli irraggiamenti sono stati effettuati con

radiazioni di energia pari a quella raggiunta sul picco della relativa curva di Bragg, mentre presso i LNS, ove il range di energia offerto dall'acceleratore era più ampio, i campioni sono stati irraggiati in diversi punti lungo la curva di Bragg.

I campioni cellulari utilizzati per gli irraggiamenti appartengono a due linee cellulari umane normali (cellule epiteliali della mammella MCF0 e cellule endoteliali della vena ombelicale HUVEC), scelte per le particolari caratteristiche che predispongono allo studio di due effetti subletali della radiazione, la **senescenza cellulare prematura** e le **aberrazioni cromosomiche**. Questi fenomeni sono particolarmente utili per evidenziare differenze tra la dose fisica depositata nel campione e la sua risposta biologica, e sono riconosciuti come importanti indicatori degli effetti a lungo termine della radiazione ionizzante.

I risultati di tali misure saranno in futuro correlati ai parametri fisici della radiazione usata (struttura di traccia, eventi di deposizione energetica, etc.) attraverso opportuni modelli teorici.

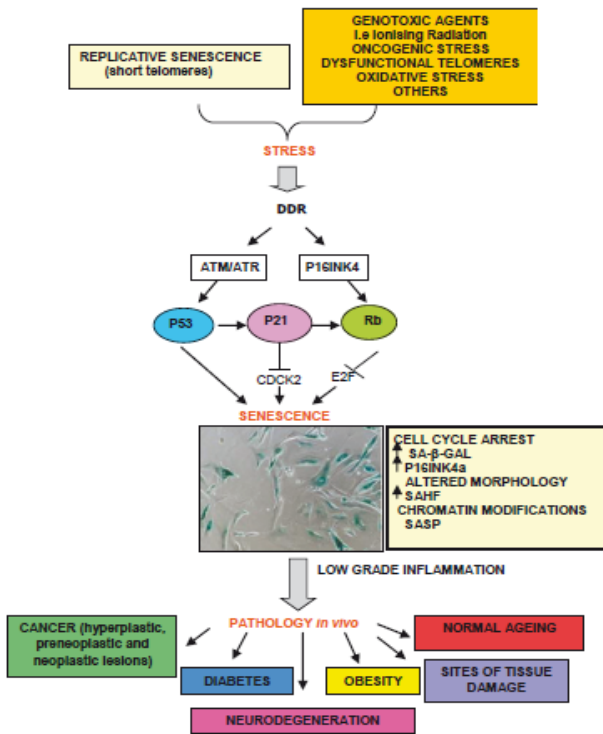
### Senescenza cellulare prematura

Il fenomeno della senescenza nelle cellule somatiche, che consiste nell'esaurimento del potenziale proliferativo di una cellula, è noto da tempo ed è stato osservato per la prima volta in colture di cellule umane normali [22].

A differenza delle cellule tumorali, le cellule normali umane in vitro non proliferano indefinitamente ma entrano in uno stato metabolicamente attivo di arresto irreversibile della crescita, definito *senescenza replicativa*, tipicamente dopo 60-80 cicli di duplicazione. Questo fenomeno venne osservato da Hayflick e Moorhead [23] su fibroblasti fetali, e li condusse a postulare che le cellule, anche in ottimali condizioni di crescita, non fossero in grado di dividersi all'infinito ma subissero un processo di invecchiamento cellulare, che traeva origine da meccanismi intracellulari e fosse dunque espressione di una finita e predeterminata longevità. Inoltre, queste osservazioni identificarono la senescenza come il fato cui ogni cellula (non tumorale) fisiologicamente va incontro. Studi successivi hanno poi fatto luce sulle cause scatenanti la senescenza cellulare e su come questa rappresenti un meccanismo naturale di soppressione tumorigenica, rimuovendo da una coltura di



cellule proliferanti quelle danneggiate da fattori esterni e contenenti mutazioni endogene.



**Fig.1.** Schema dei fattori di espressione e dei mediatori molecolari che intervengono nella senescenza cellulare.

Il fenotipo senescente include l'espressione della Sa-β-galattosidasi e un'espressione maggiore del p16INK4a, che porta ad un arresto del ciclo cellulare e ad un aumento della secrezione dei fattori pro-infiammazione e termina con un SASP. Cellule senescenti sono state osservate tra cellule normali di anziani e in cellule e tessuti di soggetti con varie patologie legate all'età. [32]

Una cellula può diventare senescente in risposta a vari fattori; i cambiamenti che intervengono comportano un fenotipo caratteristico, i cui tratti salienti sono l'arresto permanente della proliferazione, un'espressione genica alterata e una possibile resistenza all'apoptosi (Fig.1). Altri tratti distintivi possono essere alterazioni morfologiche della cellula (appiattimento, aumento del volume cellulare), senescence-associated DNA e heterochromatin foci e la presenza specifica dell'enzima idrolitico-β galattosidasi, sfruttato come efficiente marker di riconoscimento di cellule senescenti in vitro [24].

A seconda dei fattori cui la cellula è sottoposta, la senescenza può essere:

- **replicativa**, correlata a disfunzionalità e riduzione dei telomeri [25-26];
- **prematura**, indotta da stress subletali (**S**tress-**I**nduced **P**remature **S**enescence o **SIPS**) e descritta per la prima volta da Serrano et al. [27] quando dimostrarono l'arresto permanente nella fase cellulare G1 di cellule primarie

umane e di roditore in seguito all'espressione dell'oncogene ras. Da quel momento, è stato mostrato che stress cito- e genotossici di varia natura (danno al DNA, radiazione ionizzante e non, stress ossidativo, attivazione oncogenica etc.) e di entità subletale possono provocare l'insorgenza della senescenza prematura, il cui fenotipo è simile a quello della senescenza replicativa, ma i cui "attivatori" molecolari non sono ancora stati determinati.

La senescenza cellulare prematura radioindotta è un effetto subletale dell'esposizione alla radiazione ionizzante, associato ad un incremento di rischio degenerativo cardiovascolare e neurologico e particolarmente studiato per la sua insorgenza in un ampio range di dosi, anche molto basse, di radiazione di varia qualità [28]. Il suo studio è pertanto di notevole interesse per i possibili effetti degenerativi a lungo termine nei tessuti normali in seguito a radioterapia [29,30], soprattutto alla luce dell'esistenza di un fenotipo associato alla senescenza prematura, caratterizzato dalla secrezione di fattori inibenti o promuoventi la progressione tumorale, denominato *Senescence-Associated Secretory Phenotype (SAPS)*, che può portare alla stimolazione di cellule pre-neoplastiche [31].

Lo studio della senescenza cellulare radioindotta si basa sul saggio dell'espressione della  $\beta$ -galattosidasi. Questo esame, nel contesto di questa attività sperimentale, è stato effettuato sulle cellule endoteliali HUVEC, in quanto esse presentano un pattern di espressione della senescenza fisiologica altamente riproducibile, rendendole il sistema in vitro più comunemente usato per lo studio di questo tipo di effetto.

### Aberrazioni cromosomiche

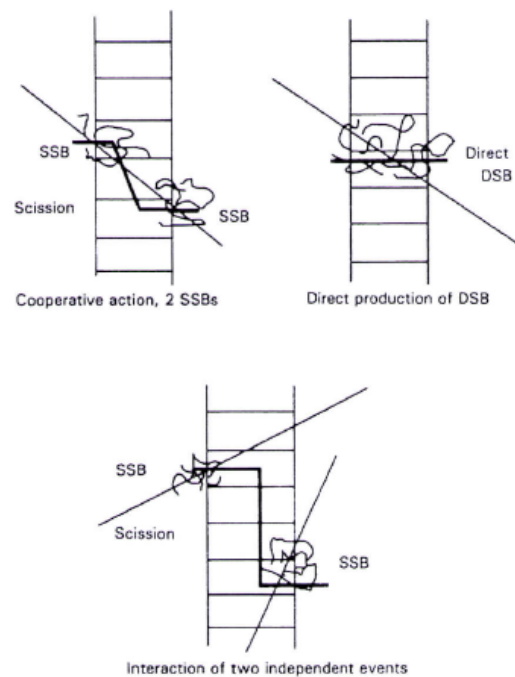
Le aberrazioni cromosomiche (AC) sono il risultato dell'azione diretta sul DNA da parte di agenti di stress, in questo contesto la radiazione ionizzante. Il loro studio è molto utile per la determinazione del potenziale subletale dell'esposizione, in quanto la formazione delle aberrazioni cromosomiche riflette il danno non o mal riparato. La loro persistenza nella progenie delle cellule esposte aumenta il rischio di

trasformazione neoplastica, mentre esse stesse sono universalmente riconosciute come biomarcatori del rischio di cancro in soggetti sani [33].

Il processo di formazione delle AC inizia con le ionizzazioni provocate nel nucleo cellulare dalla radiazione ionizzante, cui seguono rotture del filamento singole (SSB) o doppie (DSB) (Fig.2). Le estremità libere della catena del DNA possono essere ricongiunte correttamente per effetto dei meccanismi intracellulari di riparo ma, se erroneamente legati ad altri siti del DNA, possono produrre:

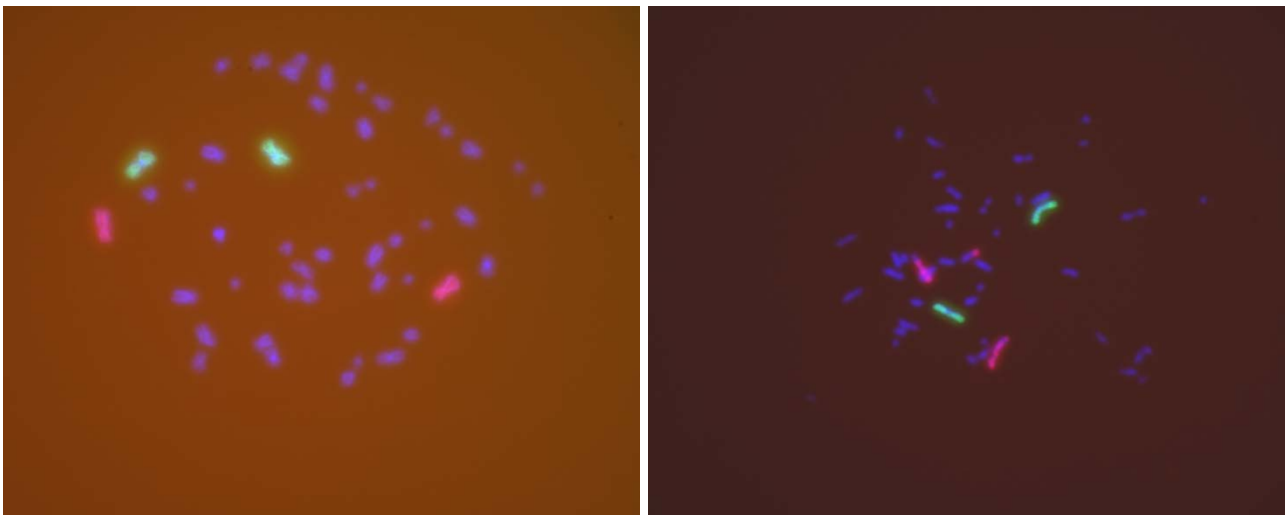
- *frammenti* cromosomici, ovvero materiale che non è ricongiunto al cromosoma originario;
- *riarrangiamenti* o *scambi* di materiale cromosomico, che consistono in una riunione alterata dei cromatidi, causata dalla differente velocità nelle reazioni di ricongiungimento [34].

**Fig.2.** Rotture del filamento di DNA in seguito ad interazione con radiazione ionizzante. Possono essere prodotte due SSB per azione cooperativa di una singola particella che scinde separatamente i due filamenti, una DSB per interazione diretta di una particella con il doppio filamento, due SSB per interazione indipendente di due particelle distinte con i due filamenti singoli.



L'induzione di aberrazioni cromosomiche e il tipo di anomalia dipendono da vari fattori, tra cui i più importanti risultano essere la qualità della radiazione e la dose assorbita. Difatti, per radiazione a basso LET la maggior parte delle lesioni prodotte viene riparata entro poche ore dall'esposizione e rivelata sottoforma di interscambi semplici (vedere *Appendice B*); al crescere della densità di ionizzazione, e quindi del LET, il numero di interscambi complessi cresce notevolmente.

Lo studio dell'induzione di aberrazioni cromosomiche è stato svolto presso il Laboratorio di Biofisica delle Radiazioni del Dipartimento di Fisica di Napoli mediante la tecnica **FISH** (**F**luorescence **I**n **S**itu **H**ybridization) a cromosoma intero applicata ai cromosomi 1 e 2 (*Fig.3-4*). L'ibridazione per l'osservazione di aberrazioni cromosomiche è stata effettuata su cellule epiteliali del tessuto mammellare MCF10-A, in quanto esse presentano un cariotipo relativamente stabile e ben definito, che permette di rivelare chiaramente eventuali modifiche intercorse sui cromosomi dovute al danno da radiazione.



**Fig.3-4.** Esempio di metafasi analizzate per la rivelazione di aberrazioni cromosomiche mediante la tecnica FISH qui utilizzata. L'immagine a sinistra rappresenta una cellula normale, in cui le due coppie di cromosomi ibridizzate si presentano prive di anomalie; l'immagine a destra invece mostra un'aberrazione, consistente in uno scambio che coinvolge uno dei due cromosomi 2 (ibridati con una sonda che emette nella frequenza del rosso quando illuminata dalla luce UV del microscopio a fluorescenza)

## 2.3 APPARATO SPERIMENTALE: ACCELERATORI

Gli irraggiamenti sui campioni cellulari sono stati effettuati presso il Dipartimento di Scienze Fisiche dell'UDS "Federico II" di Napoli e presso i LNS (Laboratori Nazionali del Sud) dell'INFN di Catania. Di seguito viene fornita una breve descrizione degli apparati utilizzati per le misure sperimentali, ponendo l'attenzione sulla loro applicazione nel contesto di questo lavoro di tesi.

### 2.3.1 GENERALITA' SUGLI ACCELERATORI

Un acceleratore di particelle è una macchina in grado di trasferire energia a particelle cariche per mezzo di campi elettromagnetici, in modo che la loro energia passi da un valore iniziale  $T_i$  ad un valore finale  $T_f$ , con la condizione che  $T_f > T_i$  affinché le particelle risultino accelerate. Esistono diversi tipi di acceleratori, classificati in base a specifiche caratteristiche:

- tipo di particelle prodotte;
- energia massima raggiungibile;
- forma e struttura;
- campi utilizzati per l'accelerazione.

Lo schema di funzionamento di base è analogo per tutti i tipi di macchine acceleratrici. Le particelle cariche (ioni) vengono prodotte da una sorgente, per essere poi inviate verso un pre-iniettore e un iniettore, i quali provvedono ad aumentarne l'energia iniettandole nel tubo acceleratore, dove esse vengono accelerate con l'azione di campi elettrici continui o pulsati. Il fascio ottenuto viene poi indirizzato lungo una traiettoria stabilita dalla forma della macchina, grazie all'azione di tensioni, magneti ed eventuali altri elementi accessori che servono a stabilizzare il fascio stesso e mantenerlo al valore di energia utile per lo scopo prefissato.

### 2.3.2 ACCELERATORE TANDEM (NAPOLI)

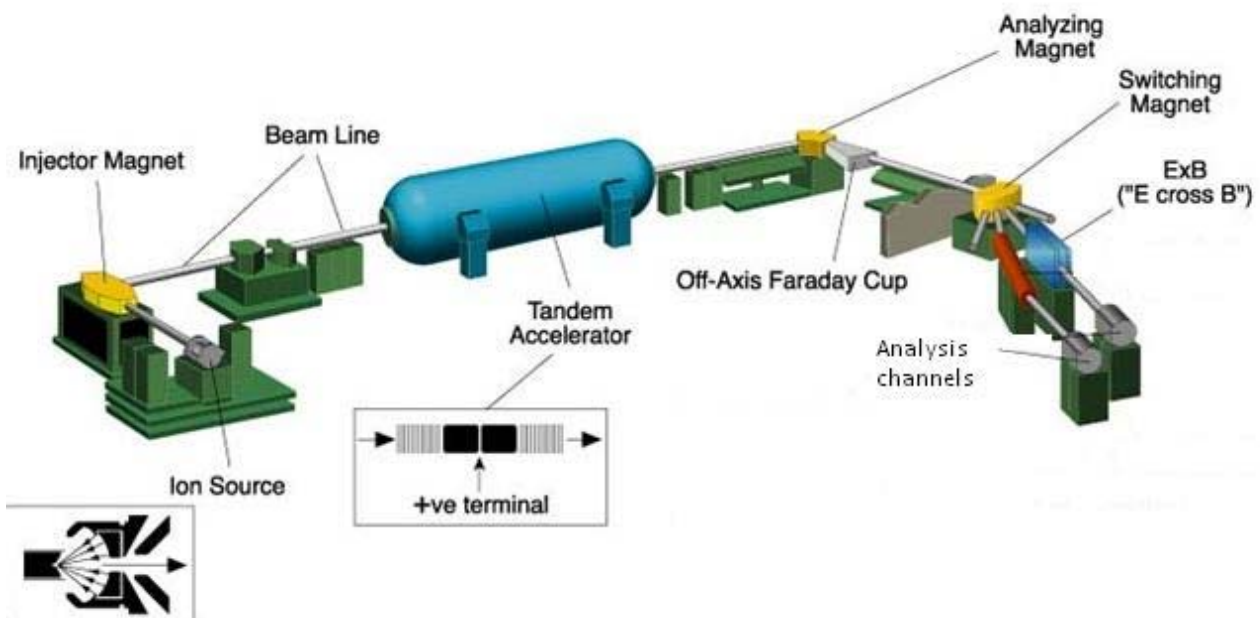
L'acceleratore presente nei laboratori del Dipartimento di Scienze Fisiche dell'UDS "Federico II" di Napoli è un TANDEM TTT-3 Van der Graaf. E' un valido esempio di acceleratore elettrostatico, ossia che sfrutta campi elettrici statici (conservativi) per i quali vale la legge di Maxwell

$$\text{rot}\vec{E} = 0$$

mentre la variazione di energia cinetica  $\Delta T$  delle particelle che vengono accelerate è proporzionale alla variazione di potenziale  $\Delta V$ :  $\Delta T = q\Delta V$ .

Macchine di questo tipo presentano delle limitazioni, prima fra tutte la tensione raggiungibile, limitata dalla rigidità dielettrica; nel caso dell'acceleratore in questione, la massima tensione raggiungibile è di 3 MV.

L'acceleratore TANDEM è schematizzato in Fig.5.

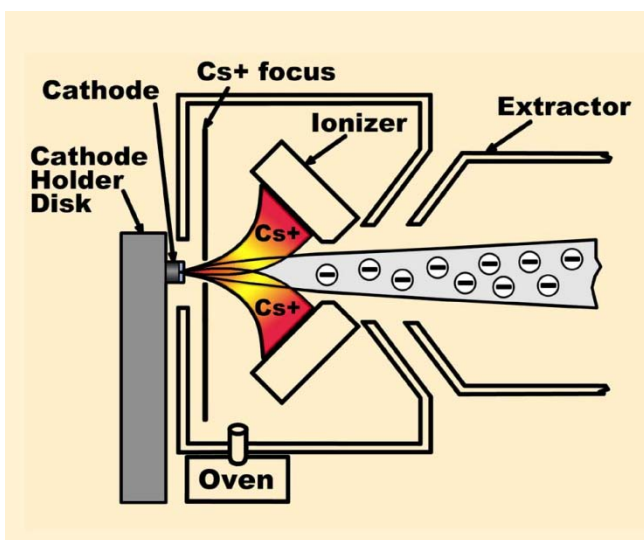


**Fig.5.** Schema dell'acceleratore TANDEM

Di seguito sono descritte le componenti principali della macchina [35].

### Sorgenti ioniche

La produzione degli ioni del fascio avviene in 3 **sorgenti** poste all'esterno della zona di accelerazione, due di ioni negativi (ANIS e KINGSTON) e una di ioni positivi a partire da una matrice gassosa, e convertibili in ioni negativi tramite il canale di scambio Radio Frequency Source (RFS). Nell'attività sperimentale in questione, è stata utilizzata la sorgente KINGSTON per l'estrazione di ioni negativi di C e O, schematizzata in Fig.6.



**Fig.6.** Schematizzazione della produzione di ioni nella sorgente KINGSTON.

Il materiale contenente gli atomi da accelerare subisce un pretrattamento e viene successivamente allocato nella sorgente in un "cilindretto" di Cu (che rappresenta il catodo) e l'estrazione del fascio di ioni avviene grazie al processo di *sputtering*<sup>3</sup>. Una frazione di atomi di Cs diffusi nel dispositivo raggiunge una superficie ionizzante conica, costituita da materiali con alto potenziale di estrazione (Ta, Mo o W) e riscaldata ad alta temperatura. L'interazione tra gli atomi di Cs e la superficie del materiale produce una ionizzazione superficiale diretta, che produce ioni  $Cs^+$ ; tali particelle, grazie alla differenza di potenziale, vengono accelerate verso il catodo di Cu ove è presente il materiale da cui estrarre il fascio. Il materiale solido del catodo viene corrosato dall'impatto con gli ioni  $Cs^+$  e si genera una cascata di collisioni interna in tutte le direzioni ("sputter"); l'interazione degli atomi emessi con i  $Cs^+$  in circolo porta ad una cattura elettronica da parte degli atomi stessi, che diventano ioni negativi ( $C^-$ ,  $O^-$ ). Questi ultimi vengono accelerati dalla differenza di potenziale tra catodo e superficie di ionizzazione verso

<sup>3</sup> Fenomeno che avviene in presenza di elementi altamente elettropositivi e con basso potenziale di ionizzazione, come nel caso del Cs.

un'apertura presente al centro di questa, che rappresenta l'uscita dalla sorgente e conduce al sistema di iniezione.

### Sistema di iniezione

Il fascio di ioni negativi fuoriesce dalle sorgenti con un'elevata apertura angolare, a causa dei valori non trascurabili delle componenti del momento lineare. Al fine di ridurre quest'apertura angolare, è opportuno accelerare le particelle nella direzione di propagazione del fascio; quest'operazione viene realizzata grazie ad un elettrodo di estrazione positivo posto a potenziale +25 kV.

Le particelle vengono in seguito sottoposte ad una prima selezione in massa ad opera del **magnete di iniezione**, che consiste in un dipolo magnetico "single focusing", con una coppia di fenditure (*slits*) poste nel punto di focalizzazione del fascio, il cui scopo è definire la direzione trasversale dello stesso. In *Tab.1* sono riportate alcune caratteristiche del magnete di iniezione.

<i>Angolo di deflessione</i>	$\pm 35^\circ$
$B_{max}$	3000 G (0,3 T)
$I_{max}$	20 A
$R$	50 cm
<i>Risoluzione in massa <math>m/\Delta m</math></i>	30

**Tab.1.** Specifiche del magnete di iniezione

### Dispositivo di accelerazione elettrostatico a due stadi

L'acceleratore TANDEM si basa su un **generatore elettrostatico** di tipo Van der Graaf<sup>4</sup>, racchiuso in un contenitore a tenuta stagna posto a massa (*tank*); l'attività del generatore è sostenuta dalla *colonna acceleratrice*, che costituisce la parte meccanica per il trasporto delle particelle e rappresenta il corpo della macchina effettivamente coinvolto nell'accelerazione delle particelle cariche. La

---

<sup>4</sup> Macchina elettrostatica capace di generare una differenza di potenziale tra due conduttori o un conduttore e la terra. Il principio fisico alla base del suo funzionamento è l'"effetto punta".



colonna consta di una serie di anelli metallici intervallati da un mezzo isolante, solitamente porcellana, e collegati l'un l'altro per mezzo di un resistore; tra un anello e il successivo si crea un gradiente di potenziale che concorre all'accelerazione. Una tensione  $+V_t$  di accelerazione è distribuita lungo le due colonne che costituiscono i due stadi (da qui il nome *Tandem*) tramite due serie di partitori di tensione. Il terminale a tensione  $+V_t$  è situato al centro del complesso, a sua volta racchiuso dal tank, riempito di esafluoruro di zolfo a pressione di 5bar.

Nel primo tratto del dispositivo, gli ioni negativi che partono da un potenziale  $-V$  sono attratti dal potenziale  $+V_t$  al centro e accelerati verso una sottile lamina di carbonio (*stripper*), con spessore variabile da 5 a 20  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , il cui compito è di rimuovere alcuni elettroni dagli ioni negativi per riconvertirli in ioni positivi e di frammentare eventuali molecole isobare presenti nel fascio come impurità. Dopo lo stripper, gli ioni ora positivi vengono attratti verso il fondo della tank dal potenziale negativo al bordo e subiscono un secondo stadio di accelerazione. La presenza dello stripper durante la fase di accelerazione comporta però una degradazione dell'emittanza<sup>5</sup>, in quanto esso rappresenta una sorta di target sul quale gli ioni impattano, con conseguenti diffusioni multiple e perdita di collimazione del fascio.

Le energie raggiunte dagli ioni per le diverse specie atomiche sono date da ( $V_{pr}$  = tensione di preaccelerazione)

$$E = eV(q + 1) + eV_{pr}$$

Nonostante vari accorgimenti applicati per ottenere un fascio di fissata energia E con opportuna focalizzazione, all'interno della macchina si generano dei fenomeni non controllabili che contribuiscono a destabilizzare le normali condizioni di esercizio; i più evidenti sono

- processi di interazione tra il fascio e le molecole d'aria presenti all'interno della macchina a causa della pressione residua;

---

<sup>5</sup> Quantità che misura il grado di collimazione del fascio, nello studio della dinamica del fascio trasverso. Facendo una trattazione statistica del problema, nello spazio delle fasi di Boltzmann è data da

$$\varepsilon = (\sigma_x^2 \sigma_y^2 - \sigma_{xy}^2)^2$$

dove le  $\sigma$  rappresentano gli scarti quadratici medi delle posizioni delle particelle del fascio dagli assi.

- produzione di radiazione, soprattutto da parte degli elettroni che emettono raggi UV e X per bremsstrahlung.

Questi effetti concorrono all'inquinamento del fascio e conducono ad una graduale diminuzione della tensione di terminale; per tali ragioni, prima di ogni utilizzo sperimentale della macchina essa subisce un processo di condizionamento.

### Magnete di analisi e magnete di switching

Il **magnete di analisi** provvede alla soppressione delle specie atomiche indesiderate che possono ritrovarsi nel fascio all'uscita dalla tank. E' un magnete con angolo di 90°, che effettua una selezione in massa ed energia delle particelle che lo attraversano. Dato infatti il campo magnetico  $B$  generato, la particella entrante nel magnete verrà accelerata e percorrerà una traiettoria circolare di raggio  $\rho$  al suo interno. Sussiste una relazione tra  $B$ ,  $\rho$ , massa  $M$  ed energia  $E$  della particella

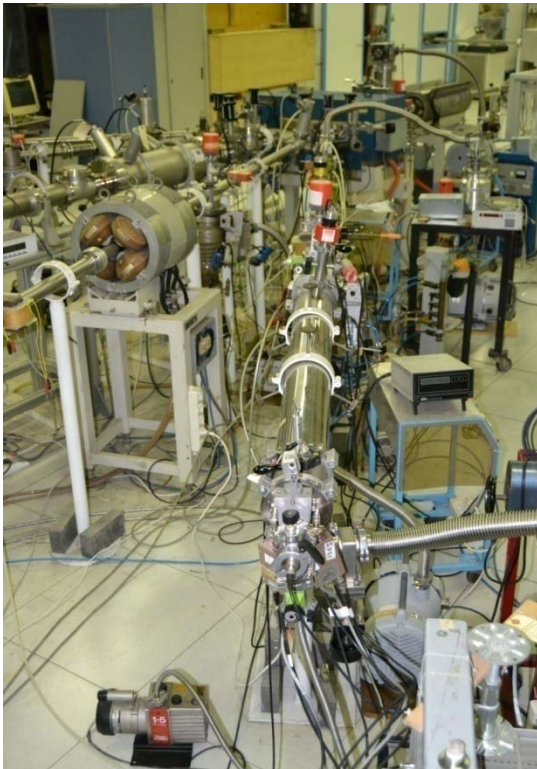
$$B\rho = \frac{Mv}{eq_i} = \sqrt{\frac{2M_i E_i}{e^2 q_i^2}}$$

in cui  $q_i$  è la carica della particella,  $e$  la carica dell'elettrone e  $B\rho$  rappresenta la rigidità magnetica. In base a questa relazione, fissato il valore di  $B\rho$ , dal magnete fuoriescono solo le particelle i cui valori di massa, carica ed energia rispettino l'eguaglianza. Una particolare traiettoria viene selezionata, all'uscita dal magnete, da un sistema di *slitte*, secondo la relazione

$$\frac{ME}{q^2} = cost$$

Il viaggio del fascio di particelle accelerato continua attraverso il canale che collega il magnete di analisi al **magnete di switching**, ultimo componente della struttura acceleratrice, che raccoglie il fascio e lo smista in uno dei vari canali di analisi sperimentale cui è collegato.

## Linee di analisi e canale di radiobiofisica



In uscita dal magnete di switching si trovano tutte le linee di analisi, dedicate alle diverse attività sperimentali svolte o in attivo per mezzo dell'acceleratore TANDEM.

Ad un angolo di 30°, in particolare, è presente il canale di radiobiofisica (*Fig.7*), adoperato per irraggiamenti radiobiologici, come quelli oggetto di questo lavoro di tesi. Le componenti principalmente coinvolte nella regolazione e nella distribuzione del fascio sono la cameretta di scattering e il fondo canale.

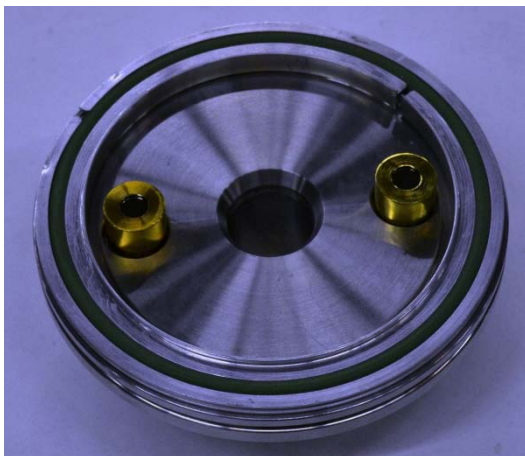
**Fig.7.** Canale di radiobiofisica dell'acceleratore TANDEM

### ✓ **Cameretta di scattering**

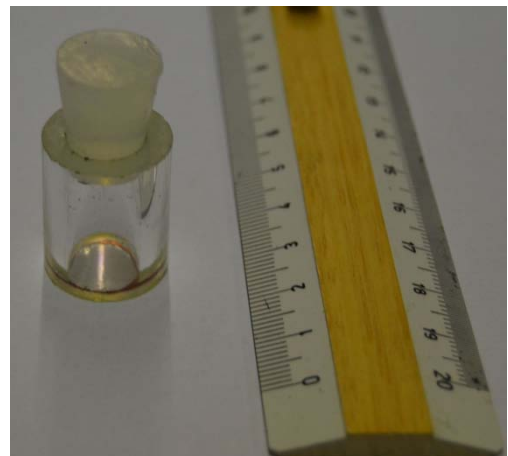
Consiste in una piccola camera metallica posta al centro del canale, dotata di un collimatore di 1mm di diametro seguito da un sottile bersaglio diffusore, costituito di un metallo con alto Z (solitamente oro, ma anche argento o tantalio) e spessore scelto in base all'effetto di diffusione e all'energia delle particelle post-diffusione adeguati agli scopi prefissati. L'azione diffondente del bersaglio, a causa dello scattering multiplo, provoca una distribuzione uniforme del fascio sul fondo canale e, di conseguenza, sul campione biologico da irraggiare. Negli esperimenti condotti per questo lavoro di tesi è stata utilizzata una targhetta di oro da 0,22  $\mu\text{m}$  di spessore.

✓ **Fondo canale**

Il fondo canale di radiobiofisica è costituito da un cilindro metallico aderente al canale e di diametro leggermente maggiore; presenta sulla base opposta al canale un disco metallico, con all'interno tre cavità poste lungo il diametro (Fig.8). Nelle due cavità laterali, simmetriche rispetto al centro del disco, sono inseriti due rivelatori al Si a barriera superficiale, entrambi ad una distanza dal centro del disco di 3,5 cm. Tali rivelatori sono collegati, dall'altra parte del disco, al sistema di monitoraggio; vengono utilizzati come contatori nelle operazioni di dosimetria di fascio e grazie ad essi è possibile monitorare l'uniformità e la geometria del fascio durante ogni irraggiamento.



**Fig.8.** Disco di chiusura del fondo canale di radiobiofisica del TANDEM con inseriti i due rivelatori al Si



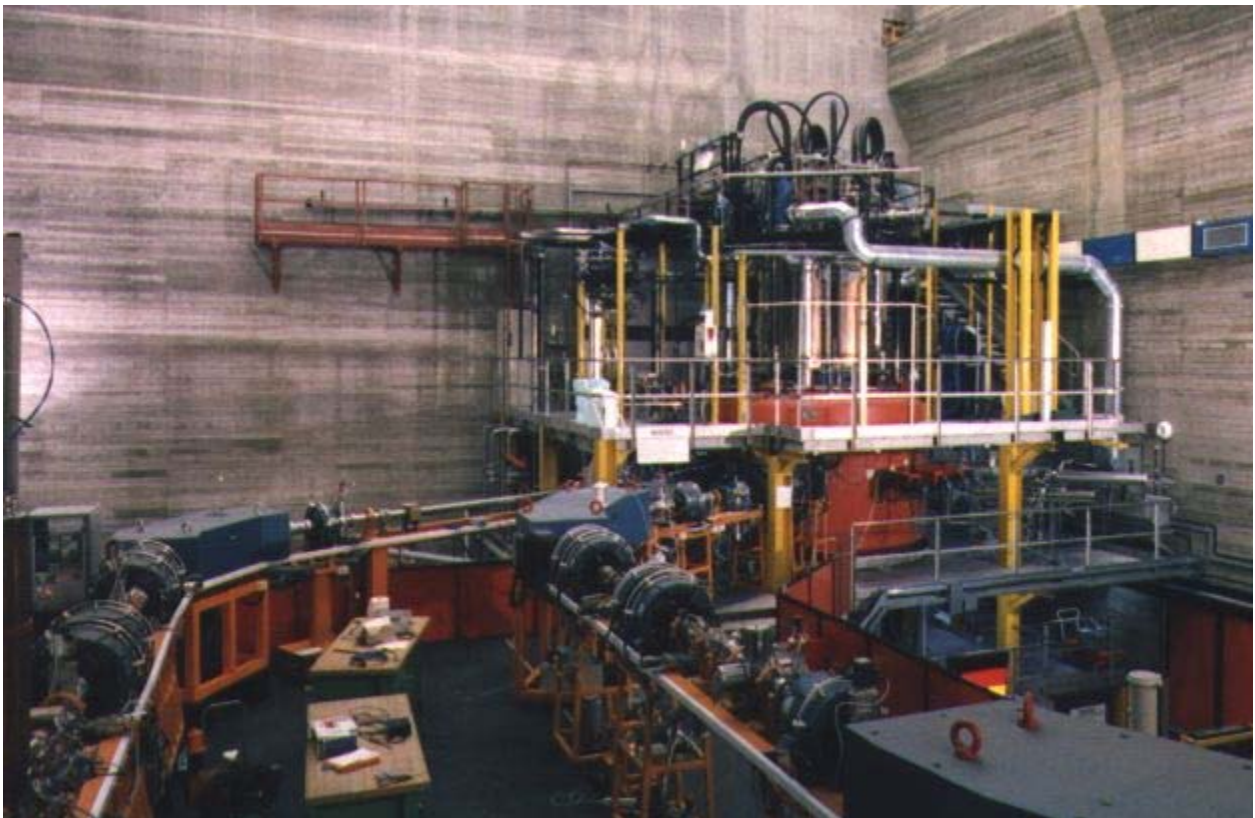
**Fig.9.** Pozzetto porta-campione con riferimento di misura delle dimensioni

Il disco viene fissato al fondo canale meccanicamente e rende quindi possibile la chiusura stagna necessaria alla realizzazione del vuoto. Nella cavità centrale viene inserito un terzo rivelatore al Si per le operazioni di dosimetria, mentre durante le misure viene lì allocato il campione biologico (Fig.9). Quest'ultimo consiste in un cilindretto cavo di plexiglas, le cui dimensioni sono adattate a quelle della cavità del fondo canale; una base è rivestita con uno strato di Mylar di spessore 1,5 $\mu$ m, fissato con colla Araldite, sul quale viene seminato il

campione cellulare da irraggiare, l'altra base è sigillata con un tappo di silicone per preservare la sterilità interna del campione.

### 2.3.3 CICLOTRONE (CATANIA)

Il Ciclotrone Superconduttore (CS) dei LNS (*Fig.10*) è una macchina compatta a tre settori a foccheggiamento forte. Il raggio del polo è di 90cm e il campo magnetico centrale va da 2.2 a 4.8 T, ottenuto per mezzo di bobine al Nb-Ti raffreddate fino alla temperatura di 4.2 K in un bagno di LHe. Il sistema di radiofrequenza ha un range operativo di 15-48 MHz, fornendo agli ioni un'energia tra i 8 e i 100 MeV in modalità armonica  $h=2$ .



**Fig.10.** *Ciclotrone dei Laboratori Nazionali del Sud di Catania*

L'apparato è stato utilizzato per irraggiamenti di campioni cellulari sani delle linee HUVEC e MCF10 con ioni C e O, ad energie poste lungo la curva di Bragg, per valutarne gli effetti sub letali. Per effettuare le misure, i campioni sono stati collocati in fila frontalmente al fascio, a distanze ben definite dai range corrispondenti alle energie di irraggiamento previste.

Di seguito sono descritte brevemente alcune delle componenti fondamentali del ciclotrone.

### Sorgenti ioniche

I fasci di ioni iniettati nel ciclotrone sono prodotti da due sorgenti ECR. La prima, SERSE, è in grado di produrre fasci di ioni con alti stati di carica e intensità molto più alte rispetto alle sorgenti a temperatura ambiente; la seconda, CAESAR, è una sorgente ionica convenzionale, utilizzata per produrre fasci di ioni leggeri con stati di carica medi.

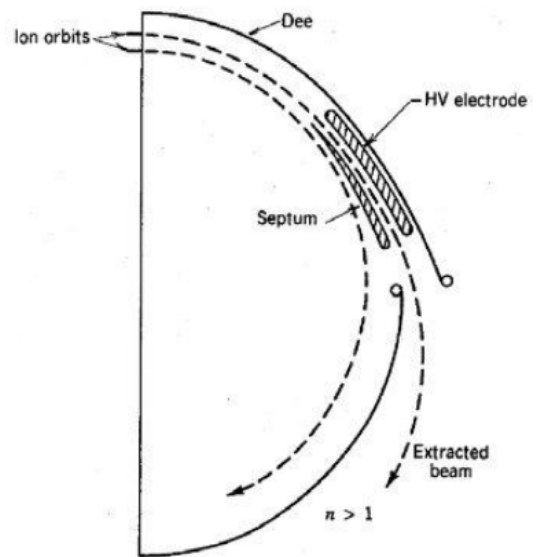
### Sistema di iniezione

Gli elementi principali della linea di iniezione sono 12 solenoidi e 4 quadrupoli. I solenoidi mantengono il fascio ben confinato ma forniscono un focheggiamento debole per minimizzare gli effetti di carica spaziale e la conseguente crescita dell'emittanza. I quattro quadrupoli sono installati tra il magnete di deviazione orizzontale a 40° e quello verticale a 90°. Per mezzo di questi, l'emittanza del fascio può essere ruotata nello spazio delle fasi per favorire l'adattamento con l'accettanza del ciclotrone.

Il buncher assiale consiste in un tubo a drift posto all'interno del ciclotrone a circa 50 cm dal piano mediano. Il buncher assiale è guidato da una singola frequenza nel range di 12-50 MHz ed è progettato per funzionare alla stessa frequenza del ciclotrone.

### Sistema di estrazione

L'estrazione del fascio (*Fig.11*) avviene ad un angolo di  $270^\circ$  e richiede due deflettori elettrostatici, sette canali magnetici e due barre compensatrici. La posizione di tutti questi elementi dipende dal tipo di ioni e dalle loro energie. La diagnostica di fascio lungo il canale di estrazione, dopo i deflettori, viene effettuata da cinque sonde differenziali e due integrali, che controllano la posizione e l'ampiezza radiale; inoltre, un'ulteriore sonda è installata all'ingresso di ogni canale magnetico.



**Fig.11.** Schema dell'estrazione mediante sistemi elettrostatici

## **CAPITOLO 3**

### ***PROCEDURE SPERIMENTALI***

---

#### **3.1 INTRODUZIONE**

Ogni turno di misura svolto a Napoli e Catania è stato caratterizzato da una serie di operazioni generali svolte prima, durante e dopo ogni singolo irraggiamento dei campioni cellulari.

Prima di ogni irraggiamento, è fondamentale accertarsi del corretto set-up della catena elettronica di rivelazione e dei componenti del fondo canale dedicato agli esperimenti di radiobiofisica dell'acceleratore, e assicurarsi che il fascio desiderato sia trasportato, collimato e centrato secondo le esigenze specifiche. E' necessario, inoltre, approntare i campioni cellulari e sottoporli ad un opportuno trattamento in seguito all'irraggiamento. Pertanto, ogni turno di misura sperimentale ha comportato una duplice serie di operazioni, fisiche e biologiche, che hanno richiesto un attento lavoro di preparazione ed ottimizzazione dei protocolli,



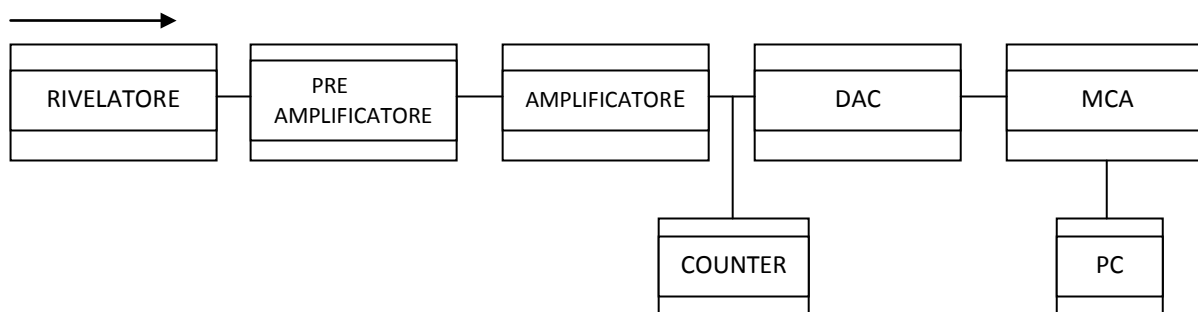
specie per quanto riguarda la messa a punto del fondo canale e le condizioni di crescita dei campioni cellulari.

Sono di seguito riportate le operazioni effettuate ad ogni turno di misura tenutosi presso il Laboratorio TANDEM del Dipartimento di Fisica dell'Università Federico II di Napoli.

### 3.2 CALIBRAZIONE DEI RIVELATORI

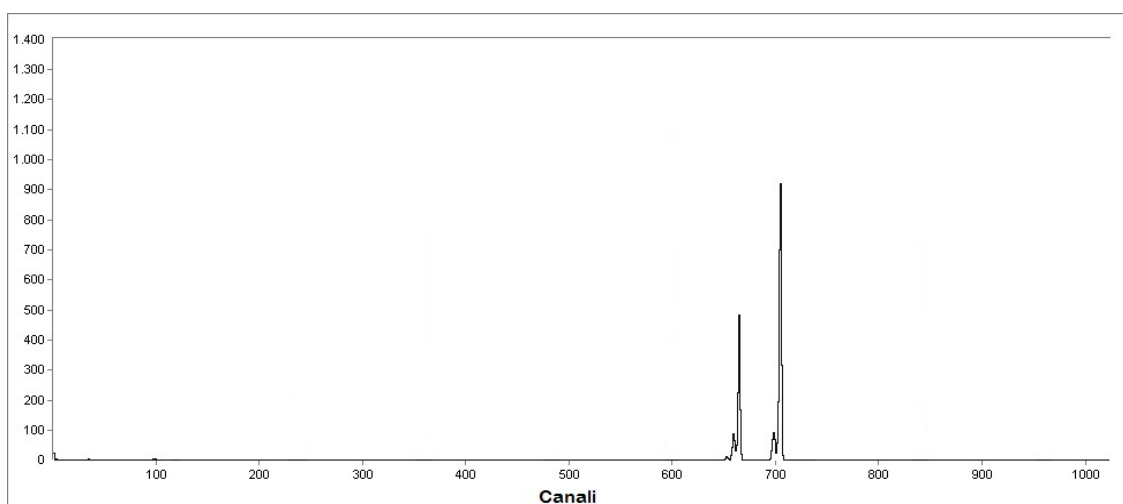
Il fondo canale dedicato agli esperimenti di radiobiofisica, ripristinato circa due anni fa, presenta due rivelatori al Si fissi (destra e sinistra), di area efficace  $0,031\text{cm}^2$ , posti alla distanza di 3,5 cm dal centro del canale, atti a fornire la misura del flusso di particelle (diffuso 1,8 m a monte da una targhetta di Au di spessore di circa  $0,22\ \mu\text{m}$ ) per monitorare il centraggio del fascio sul campione posto al centro del canale durante l'irraggiamento. Un terzo rivelatore viene utilizzato come contatore centrale per valutare la fluenza effettiva delle particelle che arrivano al campione, per poi essere rimosso durante gli irraggiamenti. Quest'ultima operazione è indispensabile alla calibrazione dei rivelatori laterali, in quanto durante l'irraggiamento, quando al posto del rivelatore centrale è collocato il porta campione, dalla misura dei conteggi sui rivelatori laterali è possibile stimare la fluenza effettiva sulle cellule e quindi la dose ad esse erogata. Con rivelatori a stato solido (plastiche CR-39) si effettua poi una verifica a posteriori della accuratezza di tale calibrazione (vedi *Par.3.3*).

Tutti i rivelatori sono stati calibrati in una cameretta con sorgente radioattiva  $\alpha$  a 2 elementi ( $^{241}\text{Am}$  e  $^{244}\text{Cm}$ ) con energie di emissione note (5,486 MeV e 5,805 MeV). L'operazione di calibrazione consiste nel collegare ogni rivelatore, inserito nella camera e investito dalle emissioni della sorgente  $\alpha$ , ad un convertitore multicanale (MCA, Multi Channel Analyzer), che associa ad ogni valore di energia un segnale digitale, riportato poi graficamente su un terminale tramite un software apposito (*Fig.1*).



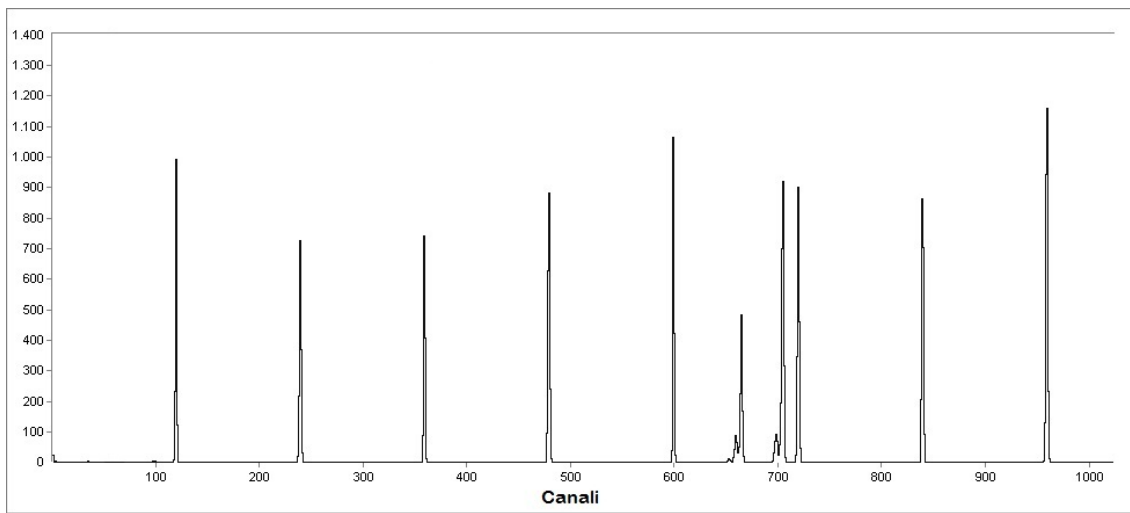
**Fig.1.** Schema della catena elettronica utilizzata per la calibrazione e per i conteggi durante gli irraggiamenti

Il grafico che si ottiene riporta i picchi energetici di emissione della sorgente, corrispondenti ad un certo numero di canale del multicanale (Fig.2). Noti i valori di energia dei picchi della sorgente, si associa ad ognuno di essi il corrispondente numero di canale del MCA e si costruisce la retta di calibrazione canale vs. energia, dalla quale è possibile estrapolare i valori di conversione (coefficiente angolare  $m$  ed intercetta  $n$ ) che permettono di calcolare, in base al canale di un certo picco, il valore di energia corrispondente.



**Fig.2.** Spettro di emissione della sorgente  $\alpha$  ottenuto con uno dei rivelatori laterali a fondo canale

Una più accurata costruzione della retta di calibrazione è stata effettuata con l'ausilio di un impulsatore, un modulo elettronico capace di emettere impulsi di data energia. Nel caso in questione, esso è stato tarato in modo tale da fornire al multicanale impulsi cadenzati di 1 MeV l'uno dall'altro entro un range utile di energie, che venivano visualizzati sullo spettro fornito dal MCA fornendo un ulteriore set di valori grazie ai quali la calibrazione è risultata più efficiente (Fig.3).



**Fig.3.** Spettro di emissione della sorgente  $\alpha$ , in cui sono presenti anche i picchi ottenuti con l'impulsatore

La retta di calibrazione ottenuta per il rivelatore centrale, in particolare, è ha permesso di verificare che l'energia del fascio utilizzato per ogni irraggiamento fosse effettivamente quella desiderata.

### 3.3 CARATTERIZZAZIONE FASCI

La caratterizzazione di un fascio è un'operazione fondamentale da svolgere prima di ogni irraggiamento; le sue fasi fondamentali sono le seguenti:

- simulazione della diffusione del fascio
- utilizzo dei rivelatori plastici per una stima della fluenza
- verifica dell'uniformità della fluenza
- calcolo del LET
- misura del fattore di conversione

#### 3.3.1 Simulazione della diffusione del fascio

Il fascio di ioni viene estratto dal fondo canale in corrispondenza della cavità centrale del disco di metallo che sigilla il canale stesso. Partendo dal magnete di switching, le particelle investono in primo luogo il bersaglio diffusore d'oro posto nella cameretta di scattering, poi, ad una distanza di 1,8 m, la superficie di Mylar che riveste la base del pozzetto portacampione, sulla quale si trova il campione biologico cresciuto e adeso.

Si richiede, quindi, che il fascio abbia un allargamento tale da ricoprire l'intera superficie di esposizione. Per verificare a priori che all'energia in questione lo spessore ed il materiale usati siano adeguati a diffondere il fascio, viene effettuata una simulazione dello *straggling* del fascio con il software SRIM-TRIM, cui viene fornito in input:

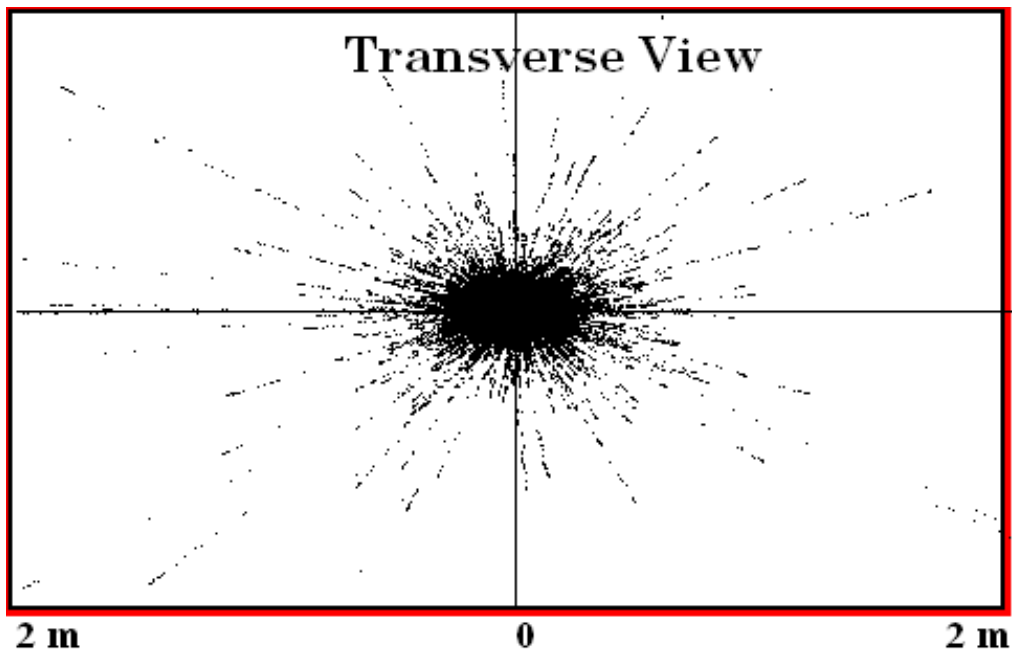
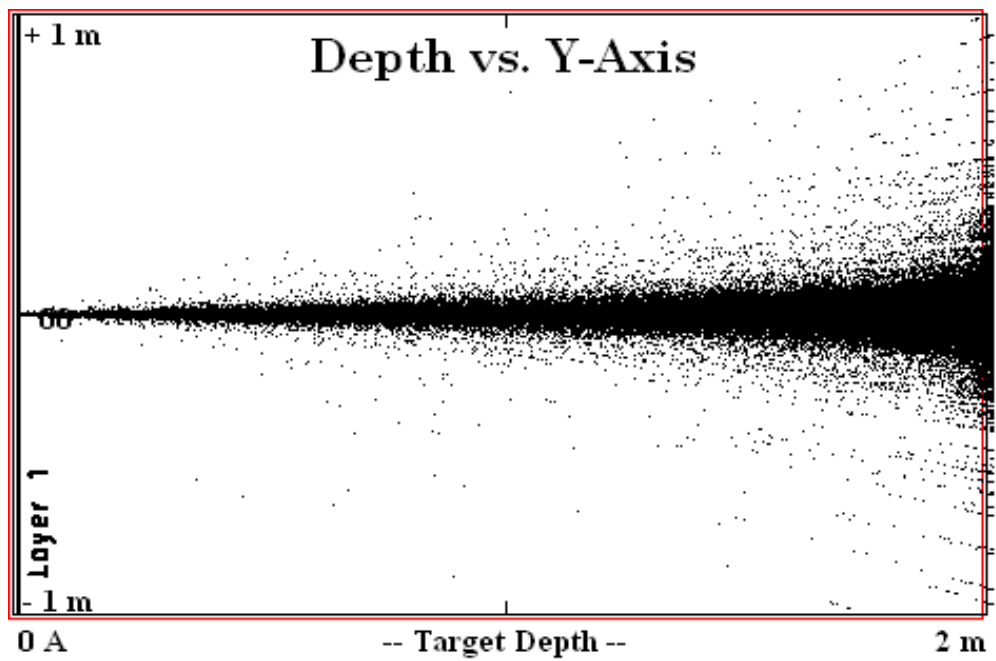
- elemento componente del fascio
- energia iniziale del fascio (prima che il fascio incontri qualsiasi ostacolo) ed eventuale angolo di incidenza (nel nostro caso  $0^\circ$ , perché il fascio è perpendicolare alla superficie da irraggiare)
- elemento/i o sostanza/i che costituiscono lo/gli strato/i assorbitore/i
- unità di misura nella quale rappresentare i dati in uscita
- ulteriori parametri speciali

Per le simulazioni pre-irraggiamento effettuate nel corso di questa attività sperimentale, sono stati considerati fasci di ioni  $^{12}\text{C}$  e  $^{16}\text{O}$ , attraversanti uno spessore di Au di 0,22  $\mu\text{m}$ , 1,8 m di aria e 1,5  $\mu\text{m}$  di Mylar. Ogni simulazione è stata volta a valutare la diffusione del fascio nel tratto di canale tra diffusore e campione e a quantificare il numero di particelle che raggiungono i rivelatori laterali, per il calcolo del rapporto tra fluenza centrale e laterale, necessaria per il monitoraggio del fascio durante l'irraggiamento.

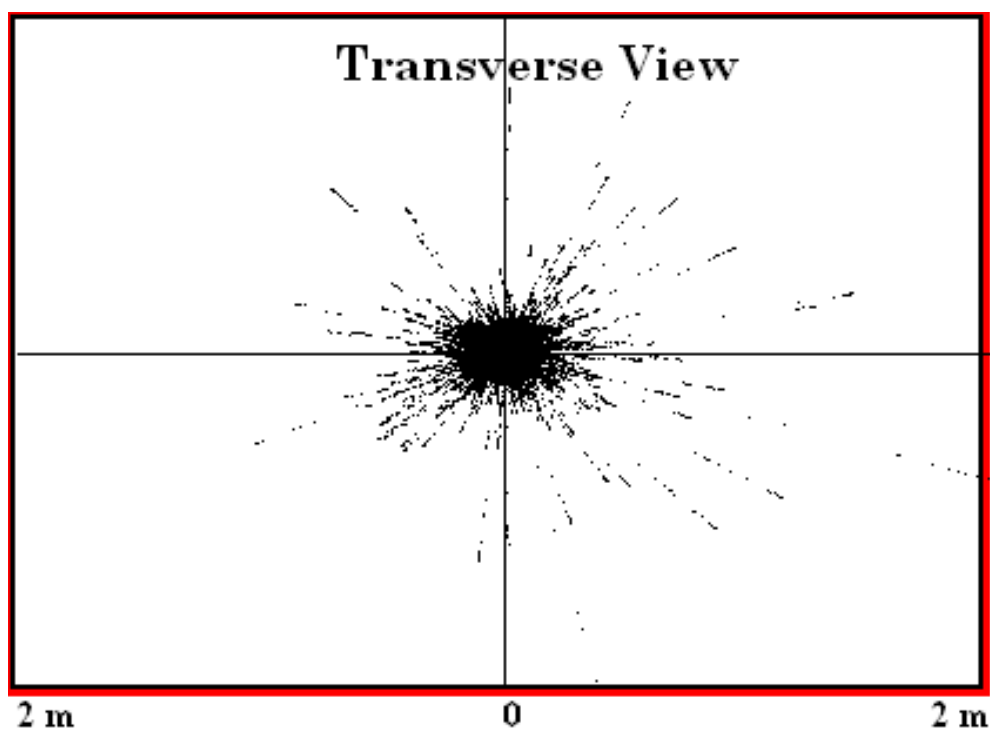
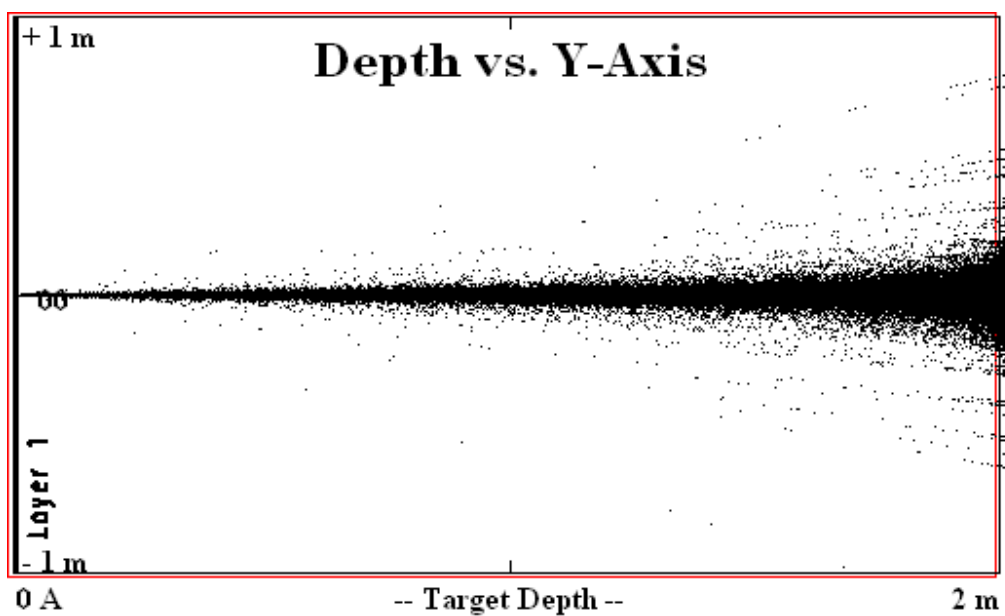
Di seguito sono riportati i grafici risultanti dalla simulazione di due fasci di  $^{12}\text{C}$  ai due valori di energia del picco di Bragg selezionati per gli irraggiamenti presso il laboratorio dell'acceleratore TANDEM del Dipartimento di Fisica di Napoli, 8,4 MeV (Fig.4-5) e 14,4 MeV (Fig.6-7), attraversanti gli spessori riportati in Tab.1.

<b>Materiali attraversati</b>	<b>Spessore</b>
Oro	0,22 $\mu\text{m}$
Aria	1,8 m
Mylar	1,5 $\mu\text{m}$

**Tab.1.** Spessori attraversati dai fasci utilizzati per gli irraggiamenti prima di raggiungere il monostrato cellulare



**Fig.4-5.** Vista x-y e y-z dello stragling del fascio di  $^{12}\text{C}$  simulato, con  $E = 8,4 \text{ MeV}$



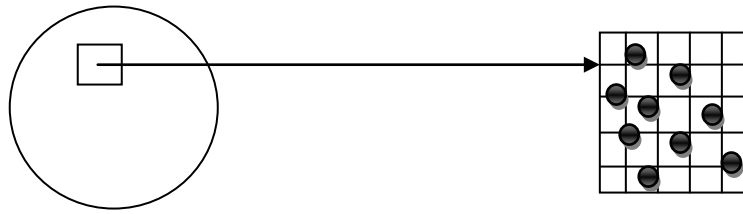
**Fig.6-7.** Vista x-y e y-z dello stragging del fascio di  $^{12}\text{C}$  simulato, con  $E = 14,4 \text{ MeV}$

### 3.3.2 Rivelatori di tracce nucleari a stato solido, calcolo della fluenza e verifica dell'uniformità

Essenziali in ogni irraggiamento sono il raggiungimento di una buona omogeneità nella distribuzione della fluenza, e quindi della dose sulla superficie di crescita cellulare, e della massima stabilità del fascio su un'area ben definita. Per questi motivi, è indispensabile un corretto monitoraggio del fascio tramite il calcolo della fluenza di fascio, effettuata pre e post irraggiamento con rivelatori di tracce nucleari a stato solido (chiamate più comunemente plastiche) CR-39. Tali rivelatori sono costituiti da un dischetto di plastica trasparente ai fotoni e sensibile alle particelle cariche. Quando una particella carica attraversa il rivelatore, produce una regione cilindrica di danno polimerica detta *traccia latente* (in quanto invisibile all'osservazione microscopica subito dopo l'irraggiamento), che si rivela in seguito ad un processo di corrosione chimica o etching mediante una base forte. Le molecole della plastica danneggiate reagiscono con la base e vengono corrose, apparendo al microscopio come macchie sferiche di colore scuro. Il loro diametro dipende da differenti parametri, quali la temperatura, la durata del periodo di etching e il tipo di soluzione basica utilizzata, tutti parametri ottimizzati nel protocollo da noi seguito, ossia 30 min a 80°C con una soluzione di KOH 10N.

Il controllo dell'uniformità del fascio e la valutazione della fluenza si svolgono quindi inserendo una di queste plastiche su un portacampione di plexiglas di struttura simile ai pozzetti utilizzati per gli irraggiamenti, con la differenza che questo cilindretto non è cavo ma presenta una rientranza sul fondo atta ad accogliere il rivelatore. Dopo aver tarato opportunamente il fascio, la plastica viene dunque irraggiata e subisce il processo di etching, in seguito al quale viene analizzata al microscopio tramite un oculare 32x munito di una griglia quadrata di area  $0,001225 \text{ cm}^2$ , utile per definire un campo nella visuale dello strumento. Si compie dunque una serie di conteggi del numero di tracce per campo, con selezione casuale dei campi lungo la superficie del rivelatore (Fig.8).





**Fig.8.** Particolare della superficie di un rivelatore CR-39 visto al microscopio tramite oculare con griglia

Dai conteggi relativi ai diversi campi effettuati su ciascuna plastica, è stato valutato il numero medio di tracce per area di campo, indicate con  $n$ , con relativo errore statistico  $\sigma_n$ . La **fluenza** è stata ricavata secondo la formula

$$\phi = \frac{\text{numero di particelle}}{\text{area}} = \frac{n \cdot A_{CR-39}}{A_{campo}}$$

dove  $A_{CR-39}$  è l'area della plastica esposta al fascio e  $A_{campo}$  l'area del campo. Nota la fluenza, si risale alla **dose** per mezzo della relazione

$$D(Gy) = LET \left[ \frac{kev}{\mu m} \right] \cdot \phi [cm^{-2}] \cdot 1,6 \cdot 10^{-9}$$

Dal confronto fra la dose “teorica” richiesta e quella calcolata in seguito ai conteggi effettuati sulle plastiche, l’errore medio sulla dose risulta inferiore al 10%. Tale risultato rientra nei parametri di accettazione delle misure in radioterapia (ove lo scarto dalla dose è solitamente dell’ordine di qualche unità percentuale), in modo tale da assicurare la validità del metodo di valutazione della dose sopra descritto.

### 3.3.3 Calcolo del LET

Il LET e l'energia degli ioni che investono il monostrato cellulare del campione sono stati valutati con il software SRIM; le energie massime fornite in input sono state alternativamente 14,4 e 8,4 MeV, gli spessori attraversati sono riportati nella *Tab.1*. Anche se lo spessore di aria è stato considerato nel calcolo, la pressione interna del canale ( $10^{-6}$ - $10^{-7}$ atm) è tale da rendere quasi trascurabile il contributo dello scattering degli ioni con le particelle d'aria per il calcolo della perdita di energia del fascio.

Il risultato della simulazione di SRIM consiste in una tabella in cui sono riportate le perdite di energia delle particelle, in relazione all'energia iniziale delle stesse nel range energetico di input, nella serie di materiali attraversati. Sapendo che la perdita di energia è esprimibile come

$$-\frac{dE}{dx} = -\rho \frac{dE}{d\varepsilon}$$

con  $\varepsilon$  spessore massivo, dalle diverse perdite di energia si è risaliti al valore del LET delle particelle incidenti sul target biologico. Inoltre, si è stimato il range residuo delle particelle all'interno del monostrato cellulare, schematizzato come uno strato di H<sub>2</sub>O di spessore 12,5 $\mu$ m.

### 3.3.4 Misura del fattore di taratura

Il calcolo della fluenza effettiva di particelle sul campione biologico viene effettuato a partire da una stima di fluenza "teorica", determinata sulla base di valori predisposti per ottenere una certa dose sulle cellule. Come detto nel paragrafo 3.2, i rivelatori a Si posti a fondo canale permettono di controllare che il fascio sia centrato sul campione durante l'irraggiamento, verificando che entrambi contino lo stesso numero di particelle nell'unità di tempo, permettendo così di risalire all'effettiva fluenza sulla superficie di mylar del pozzetto portacampione. Nella fase di esposizione, tale controllo

non può essere effettuato; per questo motivo, nelle fasi pre e post irraggiamento, in luogo delle plastiche viene inserito un rivelatore, detto centrale, sul quale viene inviato il fascio per un tempo  $t$  definito. Il numero di conteggi rilevati da questo rivelatore e dai laterali (anche uno solo dei due) viene rapportato (conteggi C/conteggi L) in maniera statistica e, considerando l'area dei rivelatori e il valore di fluenza teorico, si calcola il numero di conteggi attesi sui rivelatori durante l'irraggiamento, che permette di valutare la fluenza "reale" che si dovrebbe ottenere dal test con le plastiche. Una volta calcolata la fluenza effettiva di particelle con i rivelatori plastici, è necessario calcolare un **fattore di taratura** che metta in relazione i due valori di fluenza per poter sistemare i parametri del fascio ed ottenere il dose rate corretto per gli irraggiamenti. Tale fattore è calcolato come

$$F_t = \frac{\textit{fluenza effettiva}}{\textit{conteggi attesi sul rivelatore laterale}}$$

## CAPITOLO 4

### *ANALISI DEI DATI SPERIMENTALI: SENESCENZA E ABERRAZIONI CROMOSOMICHE*

#### 4.1 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI E TRATTAMENTO POST-IRRAGGIAMENTO

Le linee cellulari utilizzate per gli irraggiamenti sono quelle previste dal progetto MiMo-Bragg<sup>6</sup>. La procedura di preparazione dei campioni preliminare ad ogni irraggiamento ha annoverato le seguenti operazioni.

✓ ***Scongelamento cellule***

Le cellule sono solitamente conservate in azoto liquido in apposite ampolle di plastica (cryogenic vials). Mentre l'operazione di congelamento è stata

---

<sup>6</sup> Discusso nel Capitolo 2.

effettuata portando gradualmente le cellule alla temperatura di stoccaggio, lo scongelamento è avvenuto in maniera rapida, immergendo il contenitore delle cellule in acqua alla temperatura di 37°C<sup>7</sup>. Una volta scongelate, le cellule sono state centrifugate per rimuovere dal terreno eventuali residui di DMSO, agente crioprotettore, citotossico per cellule a temperatura ambiente.

✓ **Coltura**

Le cellule sono state cresciute all'interno di fiasche per colture cellulari in incubatore a 37° e al 5% di CO<sub>2</sub>. Le cellule sono state poste in crescita almeno due settimane prima di ogni turno di misura, per permettere loro di raggiungere un numero adeguato a potervi effettuare i vari test post-irraggiamento.

✓ **Preparazione pozzetti**

I pozzetti porta campione consistono in cilindretti in plexiglass fatti realizzare su misura, di circa 1,1 cm di diametro per poter essere alloggiati nel fondo canale (ved. Cap.3). Una pellicola di Mylar da 1,5 µm è stata stesa con cura su una superficie piana, tenuta sotto tensione per evitare la formazione di grinze: i cilindretti sono stati adagiati ed incollati al Mylar con Araldite™, curata in forno alla temperatura di 160°C per quattro ore. Tale trattamento rafforza l'azione adesiva e riduce eventuali irregolarità nello strato di Mylar; questo dettaglio è fondamentale, dato che gli irraggiamenti con particelle al Tandem sono stati realizzati con energie tali che lo ione attraversi lo strato cellulare praticamente a fine range. Ne discende che irregolarità anche di pochi micron nella superficie su cui le cellule crescono porterebbero a disomogeneità significative nella dose ricevuta dal monostrato cellulare. Una volta raffreddati, i pozzetti sono stati delicatamente staccati dal foglio di Mylar e poi sterilizzati sotto cappa a flusso laminare con etanolo puro, prima di

---

<sup>7</sup> Le due operazioni vengono svolte secondo queste modalità allo scopo di minimizzare il danno alle strutture proteiche intracellulari

procedere alla semina delle cellule sulla base di Mylar, dovendo le cellule crescere in ambiente asettico.

✓ ***Inoculazione campioni***

Le cellule sono state seminate nei pozzetti a concentrazioni e in tempi precedenti all'irraggiamento tali da garantire la formazione di un monostrato cellulare al momento dell'esposizione al fascio. Tale fattore è importante quanto la regolarità della superficie di crescita (vedi sopra) per assicurare una distribuzione quanto più uniforme possibile della dose.

✓ ***Irraggiamento***

Presso l'acceleratore Tandem, i porta campione sono stati disposti orizzontalmente, ossia con la base di Mylar perpendicolare alla direzione del fascio. Il terreno di crescita è stato rimosso e ogni porta campione è stato temporaneamente sigillato con un tappo sterile di silicone, per garantire l'asepsi durante l'irraggiamento e, al contempo, prevenire eventuali fuoriuscite di liquido. Il set up di irraggiamento<sup>8</sup> prevedeva che la base di Mylar fungesse da barriera per il mantenimento del vuoto nel fondo canale; una sottilissima intelaiatura al tungsteno si trovava a fondo battuta nell'alloggiamento del porta campione per evitare la rottura del Mylar. I pozzetti sono stati irraggiati uno alla volta in sequenza, riportati in laboratorio, nuovamente riempiti con terreno di crescita e mantenuti in ambiente sterile (cappa a flusso laminare) a temperatura ambiente, in attesa del processamento post-irraggiamento. Il rateo di dose è stato 1-2 Gy/min durante tutti gli irraggiamenti, pertanto il tempo in cui i campioni restavano in assenza di terreno è stato breve e tale da non compromettere l'integrità cellulare. I campioni di controllo sono stati trasportati nel Laboratorio Tandem in modo tale da subire un identico trattamento, eccezion fatta ovviamente per l'esposizione al fascio.

---

<sup>8</sup> Descritto nel Cap.2

✓ **Processamento e semina post-irraggiamento**

Dai campioni cellulari irraggiati è stato rimosso il mezzo di coltura, per poi essere sciacquati con soluzione salina tampone<sup>9</sup> allo scopo di rimuovere eventuali residui di terreno; all'interno di ciascun porta campione è stato posto un cilindretto di metallo<sup>10</sup>, di dimensioni tali da aderire perfettamente alle pareti del pozzetto. Tale accorgimento è stato necessario per recuperare esclusivamente le cellule cresciute al centro dello strato ed evitare di raccogliere anche quelle cellule adese ai bordi del fondo e quindi possibilmente schermate alla radiazione dalla presenza di eventuali residui di araldite infiltratisi sotto il pozzetto. Nel cilindretto è stato quindi introdotto 1ml di tripsina<sup>11</sup> per staccare le cellule dalla base di Mylar. E' stato poi aggiunto un egual volume di terreno di coltura, per smorzare l'azione della tripsina una volta staccate le cellule, ed è stato prelevato un campione della sospensione cellulare ottenuta per procedere al conteggio, effettuato con il supporto di una camera Burkner<sup>12</sup>. Per ogni linea cellulare e per ogni dose sono stati approntati diversi campioni.

---

<sup>9</sup> PBS, Phosphate Buffered Saline

<sup>10</sup> Precedentemente sterilizzato in etanolo

<sup>11</sup> Enzima appartenente alla classe delle idrolasi, che ha il compito di rompere i legami intracellulari e staccare le cellule dalla superficie di adesione. Agisce a 37° in tempi variabili (dai 5 ai 10 minuti), a seconda della sua concentrazione e delle caratteristiche della linea cellulare.

<sup>12</sup> Dispositivo di conteggio manuale di cellule al microscopio elettronico. E' costituita da un vetrino rettangolare di dimensioni piane 7,5x3,5 cm<sup>2</sup> e spessore di 4 mm; presenta 2 celle di profondità 0,1 mm e superficie nota, separate da un incavo che permette l'esecuzione di due conteggi sullo stesso strumento. Su di esse è posto un vetrino, assicurato grazie ad apposite alette metalliche. Il sottilissimo spazio che si viene a creare fra le due superfici viene quindi riempito per capillarità con una goccia di sospensione cellulare. Il reticolo della camera Burkner è strutturato in nove quadrati più grandi (*campi*) delimitati da tre righe parallele, con all'interno quadrati e rettangoli delimitati da due righe parallele; grazie a questa struttura è possibile effettuare il conteggio delle cellule presenti nel campione.

## 4.2 CARATTERIZZAZIONE DEGLI EFFETTI SUBLETALI

### 4.2.1 Senescenza cellulare prematura

Il saggio della  $\beta$ -galattosidase ( $\beta$ -gal<sup>13</sup>) è stato effettuato sulle cellule endoteliali HUVEC per misurare l'insorgenza sia acuta che tardiva della senescenza cellulare prematura, uno degli effetti sub letali di interesse per questo lavoro di tesi. Le cellule sono state saggiate subito dopo l'irraggiamento e a tempi successivi: infatti, una parte dei campioni è stata posta in coltura e propagata, fino ad un massimo di circa di due mesi. Ad intervalli regolari, campioni di tali colture sono in seguito stati saggiati per l'espressione della  $\beta$ -gal; in parallelo sono stati trattati i campioni di controllo, ossia cellule HUVEC non irraggiate, rispetto al cui tasso di senescenza spontaneo o fisiologico è stata calcolata l'incidenza di senescenza radioindotta.

L'insorgenza della senescenza è stata analizzata per raggi X e due tipi di particelle accelerate, ioni carbonio e ioni ossigeno; ogni esperimento è stato effettuato con due dosi per ciascuno ione (0,5<sup>14</sup> e 2 Gy), più controllo. La percentuale di cellule senescenti con relativo errore standard è stata calcolata su un totale di circa 500 cellule osservate per punto dose e a ciascuno dei tempi post-irraggiamento. Le osservazioni sono state condotte con microscopio in campo chiaro.

Di seguito sono riportati i grafici dell'andamento della percentuale di cellule senescenti in funzione del tempo, per raggi X (*Fig.1*), ioni C ( $E_{in} = 12$  MeV: *Fig.2*;  $E_{in} = 6$  MeV: *Fig.3*) e ioni O ( $E_{in} = 12$  MeV, *Fig.4*), dove con  $E_{in}$  si intende l'energia incidente sul monostrato.

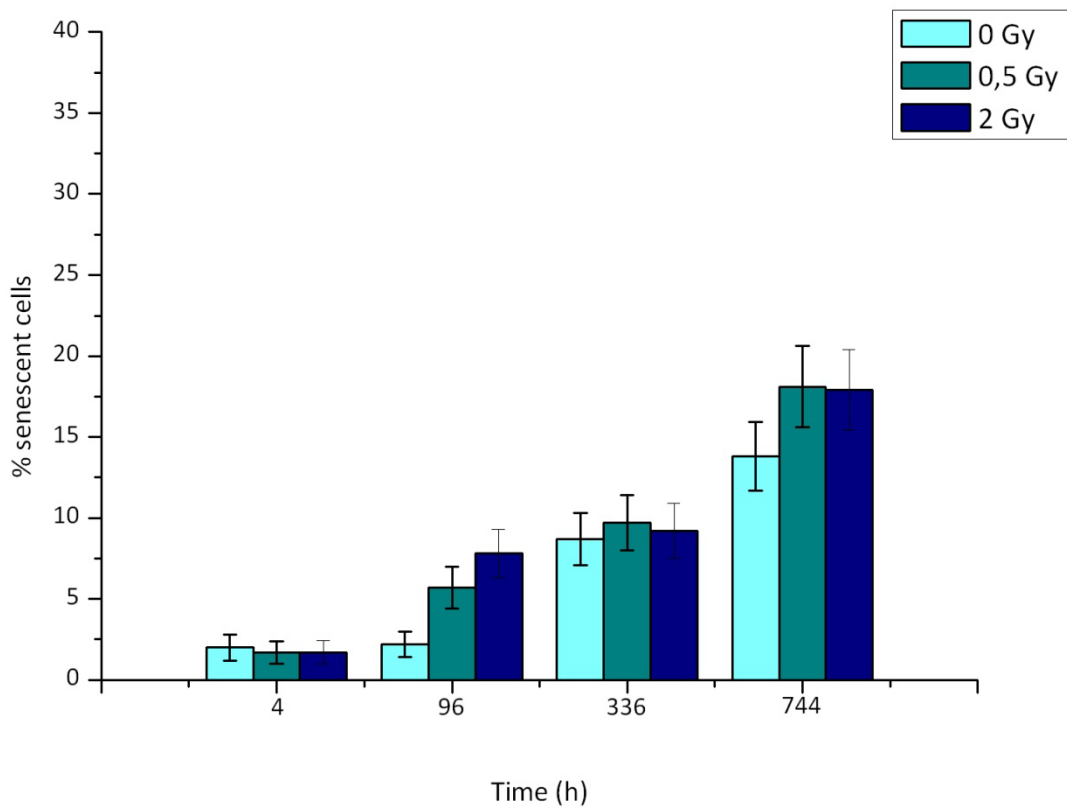
---

<sup>13</sup> Discusso nel Cap.2.

<sup>14</sup> A 0,5 Gy la mortalità cellulare clonogenica non supera in media il 30%



### Raggi X - Percentuale di cellule HUVEC senescenti

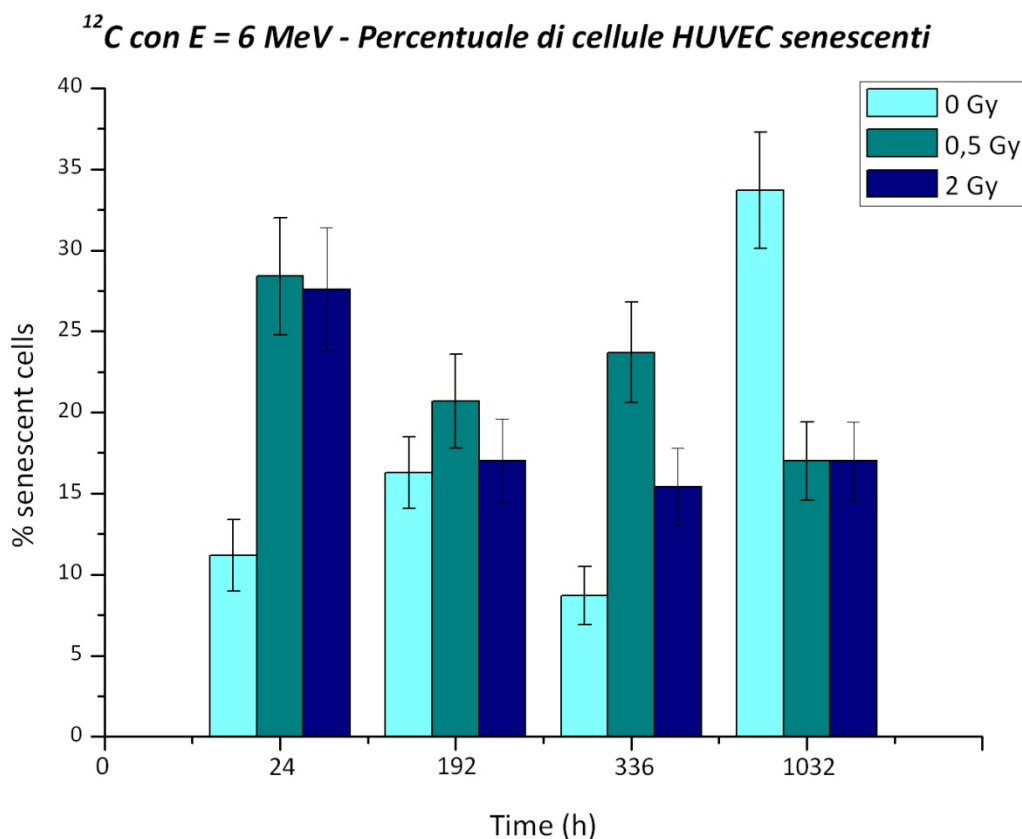


**Fig.1.** Andamento della senescenza di cellule HUVEC in seguito ad irraggiamento con raggi X da 250kVp

Osservando il grafico in Fig.1, si può notare che a tempi immediatamente successivi all'irraggiamento (4 h) non si osserva una risposta significativa in termini di senescenza, la cui incidenza è invece significativamente maggiore tra i campioni irraggiati rispetto al controllo a 96 h dall'irraggiamento. Tale incremento inoltre appare essere dose-dipendente. A 336 h dall'irraggiamento, invece, si osserva una sostanziale uniformità nella frazione di cellule senescenti a tutte e tre le dosi, al contrario di quanto accade nell'ultimo punto utile, a 744 h, quando si assiste ad una seconda "ondata" di senescenza tra i campioni irraggiati che rappresentano un incremento nella senescenza indotta rispetto al controllo. E' dunque possibile concludere da questi dati che esistano due fasi temporali di manifestazione di senescenza radioindotta, una relativamente acuta (4 giorni post-irraggiamento) ed

una tardiva (a circa un mese nella progenie delle cellule sopravvissute all'irraggiamento).

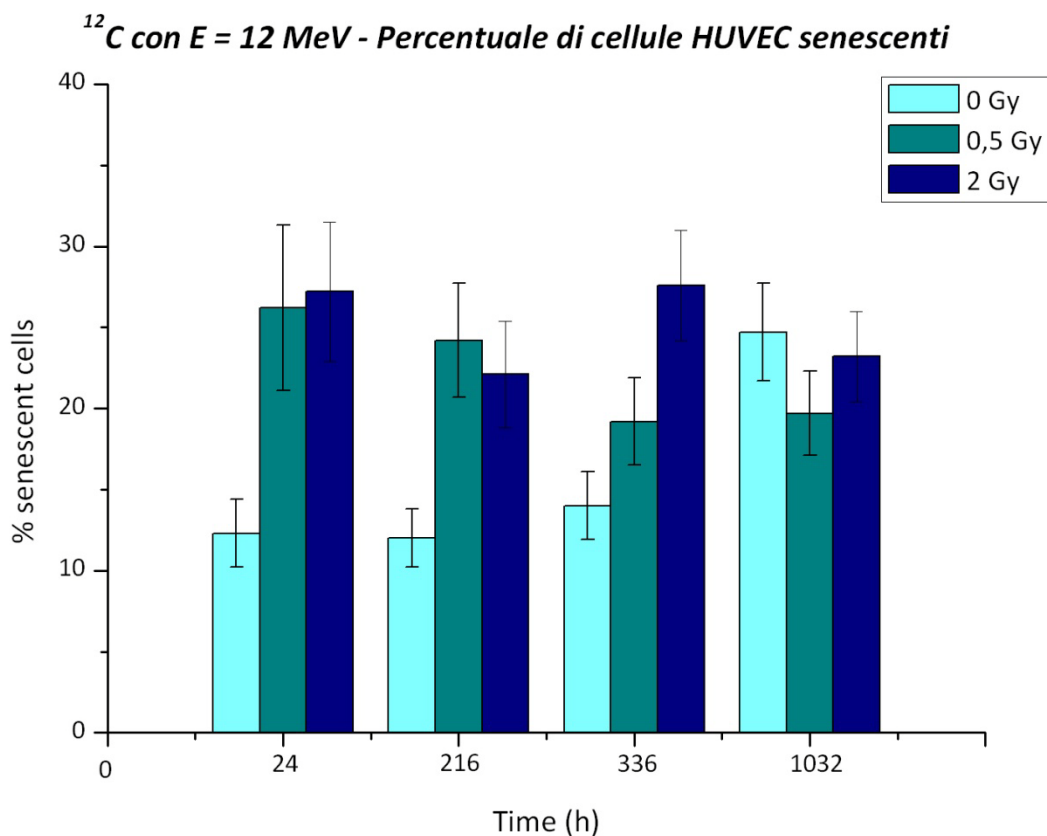
La senescenza radioindotta è stata poi esaminata in popolazioni cellulari irraggiate con particelle ad altissimo LET, ossia ioni carbonio e ioni ossigeno in corrispondenza del picco di Bragg.



**Fig.2.** Andamento della senescenza di cellule HUVEC in seguito ad irraggiamento con ioni carbonio con E = 6 MeV

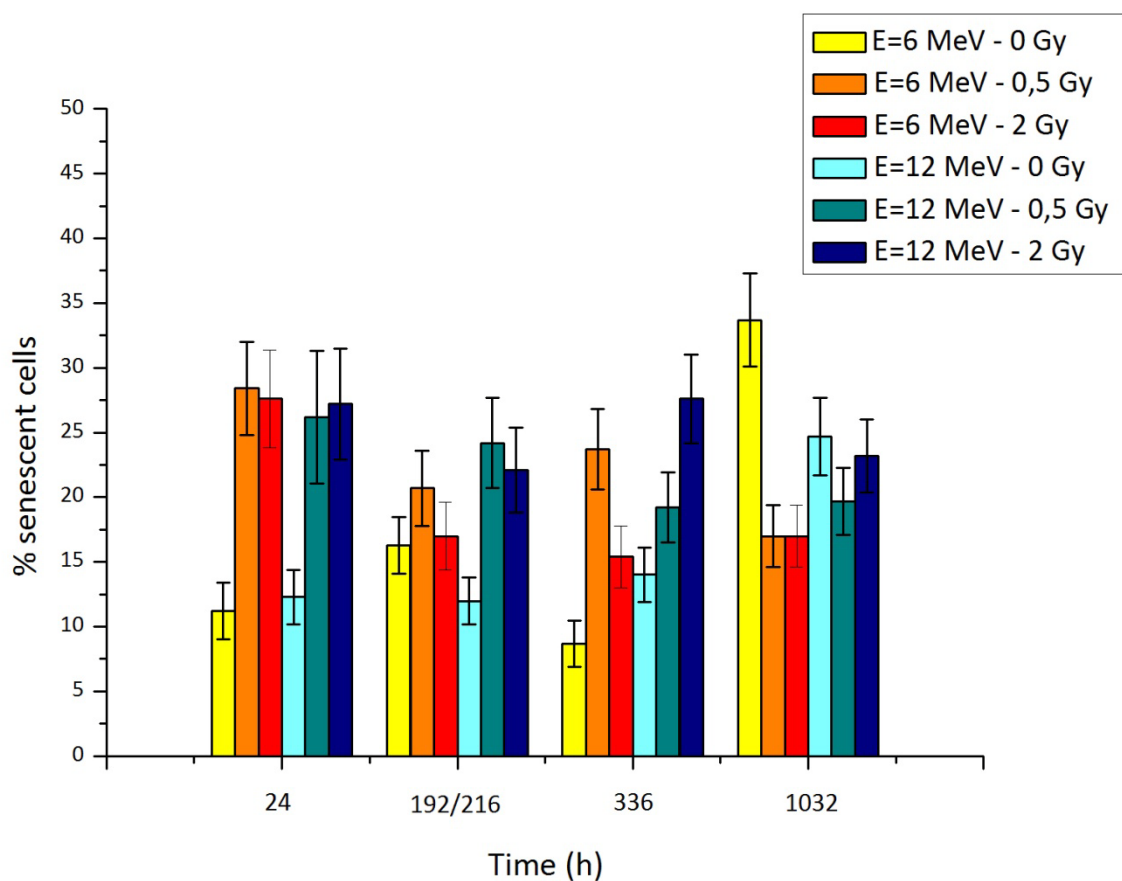
In Fig.2 è mostrato l'andamento della senescenza di cellule HUVEC irraggiate con ioni C ( $E_{in} = 6$  MeV e  $LET = 934$  keV/ $\mu$ m). Rispetto a quanto osservato con i raggi X, a sole 24h dall'irraggiamento è possibile osservare un incremento altamente significativo della percentuale di cellule senescenti nelle cellule esposte rispetto al controllo. Tale risposta si attenua circa una settimana dopo (192 h) per poi

ripresentarsi entro un mese circa dall'irraggiamento, quando la percentuale di cellule in senescenza replicativa supera di circa 20% quelle in senescenza prematura. Inoltre, è importante rilevare che la percentuale di cellule senescenti nella popolazione sottoposta ad una dose di 0,5 Gy risulta sempre maggiore (fino a circa 43 giorni dall'irraggiamento) di quella della popolazione sottoposta a 2Gy, il cui andamento a partire da un giorno dall'irraggiamento tende a decrescere con regolarità. L'ultimo punto (1032 h, ossia circa 40 giorni post-irraggiamento) mostra una elevatissima percentuale di cellule senescenti nella popolazione di controllo, circa 3 volte maggiore di quella osservata fra la progenie delle cellule irraggiate: questo potrebbe indicare l'insorgenza di morte cellulare ritardata fra le cellule sopravvissute inizialmente all'irraggiamento, fenomeno associato con l'instabilità genomica radioindotta.



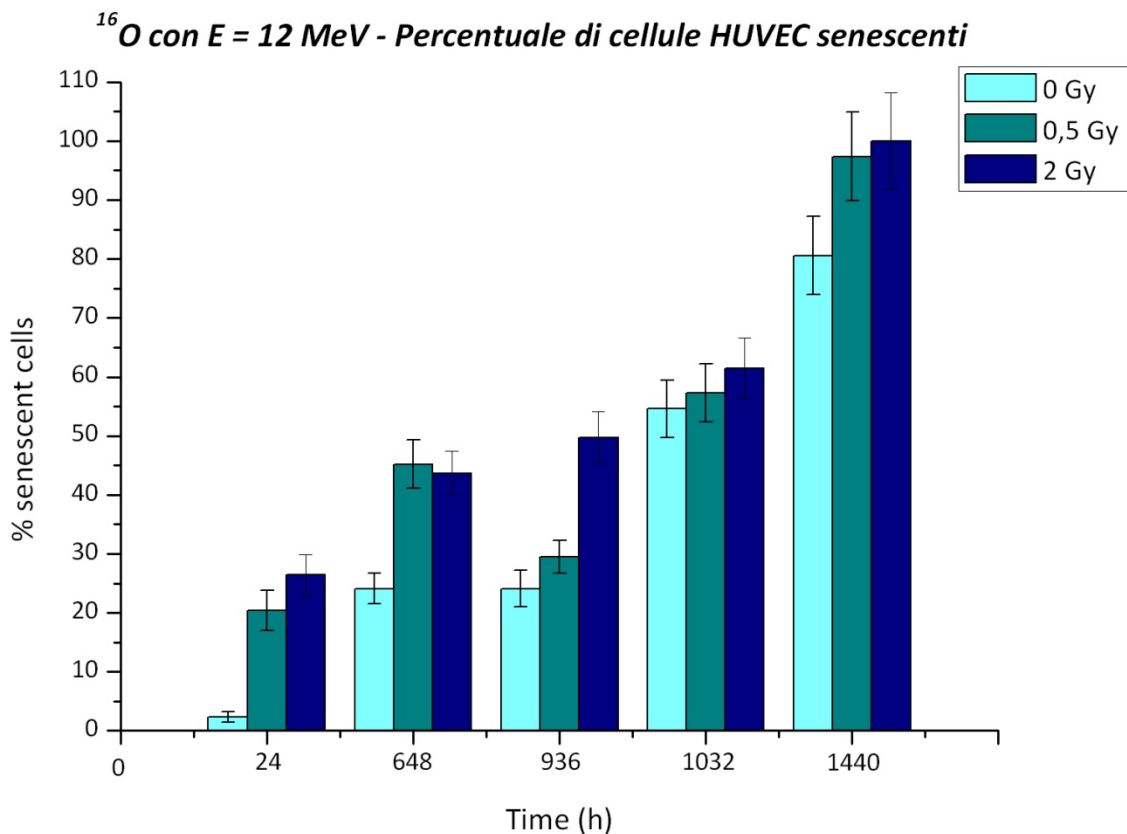
**Fig.3.** Andamento della senescenza di cellule HUVEC in seguito ad irraggiamento con ioni carbonio con E = 12 MeV

In Fig.3 è possibile osservare l'andamento della senescenza di cellule HUVEC irradiate con ioni C ( $E_{in} = 13 \text{ MeV}$  e  $LET=726 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ). Anche in questo caso, è possibile notare che già 24 h dopo l'irraggiamento la percentuale di cellule in senescenza prematura è significativamente maggiore di quella di cellule in senescenza replicativa (controllo non irraggiato). La differenza fra cellule irradiate e controllo tende a ridursi, fino ad annullarsi del tutto a 1032 h (43 giorni post-irraggiamento). Inoltre, a differenza di quanto osservato nel caso dei raggi X, l'incremento della senescenza radioindotta non appare dipendere significativamente dalla dose, eccetto che per il punto a 336 h.



**Fig.4.** Confronto degli andamenti della senescenza di cellule HUVEC in seguito ad irraggiamento con ioni carbonio con  $E = 6 \text{ MeV}$  ed  $E = 12 \text{ MeV}$

E' utile confrontare su un unico grafico gli andamenti della percentuale di cellule senescenti per ioni carbonio a diverse energie del picco di Bragg, 6 e 12 MeV rispettivamente<sup>15</sup> (Fig.4). Per entrambe le energie degli ioni carbonio, la percentuale di cellule senescenti risulta sempre maggiore dei valori misurati nel caso dei raggi X, indicando una maggiore efficacia delle particelle cariche nell'induzione della senescenza cellulare.



**Fig.5.** Andamento della senescenza di cellule HUVEC in seguito ad irraggiamento con ioni ossigeno con E = 12 MeV

In Fig.5 è riportato, invece, l'andamento della senescenza di cellule HUVEC in seguito all'esposizione a ioni ossigeno ( $E_{in} = 15$  MeV e  $LET = 1300$  keV/ $\mu$ m).

<sup>15</sup> I dati contenuti nel grafico corrispondenti ad un tempo di 192/216h sono stati raccolti a due tempi diversi per i campioni irraggiati a 6 MeV (192h) e per quelli irraggiati a 12 MeV (216h).

Confrontando le risposte a ioni ossigeno e ioni carbonio, si può immediatamente osservare una differenza nell'andamento. Nel grafico relativo agli ioni carbonio, come già detto, dopo la risposta acuta la percentuale di cellule in senescenza prematura è maggiore rispetto a quella fisiologica (controllo) e i valori restano all'incirca costanti, per poi diminuire nel punto temporale più distante dall'irraggiamento. Nell'andamento della senescenza indotta da ioni ossigeno, invece, la percentuale di cellule senescenti tra la popolazione irraggiata sembra aumentare linearmente con il tempo post-irraggiamento, con valori percentuali più alti rispetto al carbonio e senza una sensibile dipendenza dalla dose. In questo senso, l'andamento misurato con gli ioni ossigeno appare più simile a quello osservato con i raggi X. Quindi, l'ossigeno appare ancor più efficace del carbonio (oltre che ovviamente dei raggi X) nell'indurre questo tipo di risposta cellulare alla radiazione.

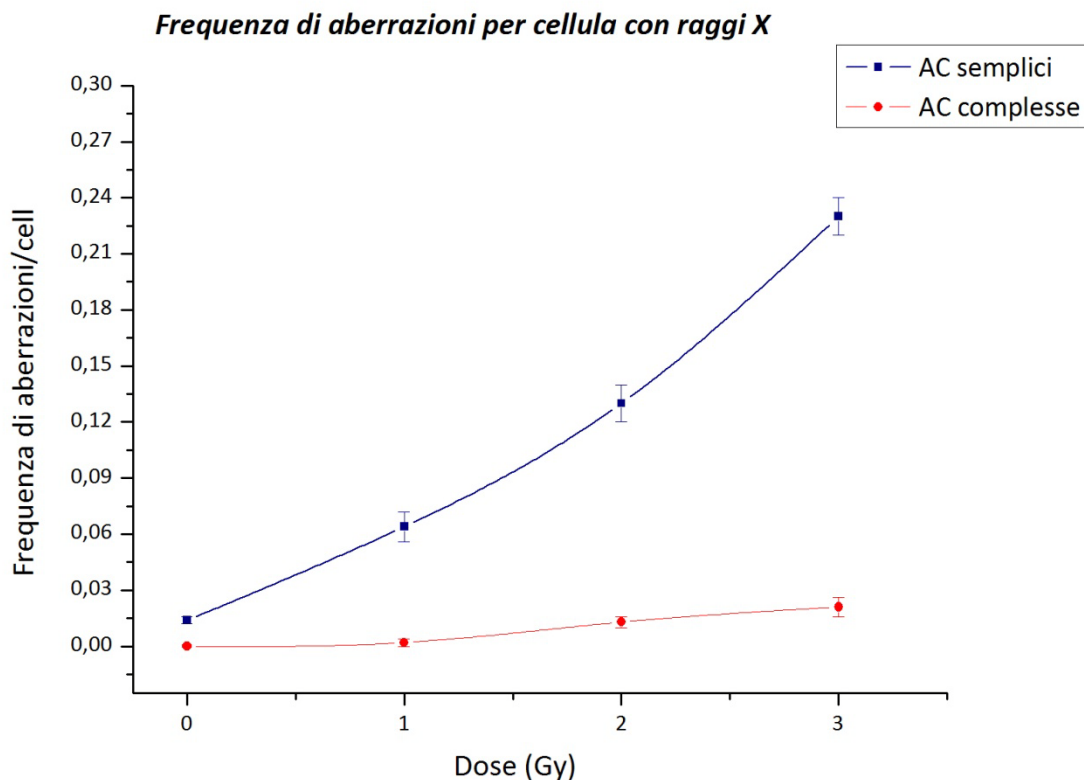
Questa discrepanza negli andamenti relativi alle due tipologie di ioni è una possibile dimostrazione di come ioni di diverso Z, in prossimità del picco di Bragg e quindi a valori elevatissimi di LET, possano indurre effetti tardivi quantitativamente differenti.

#### **4.2.2 Aberrazioni cromosomiche con tecnica FISH**

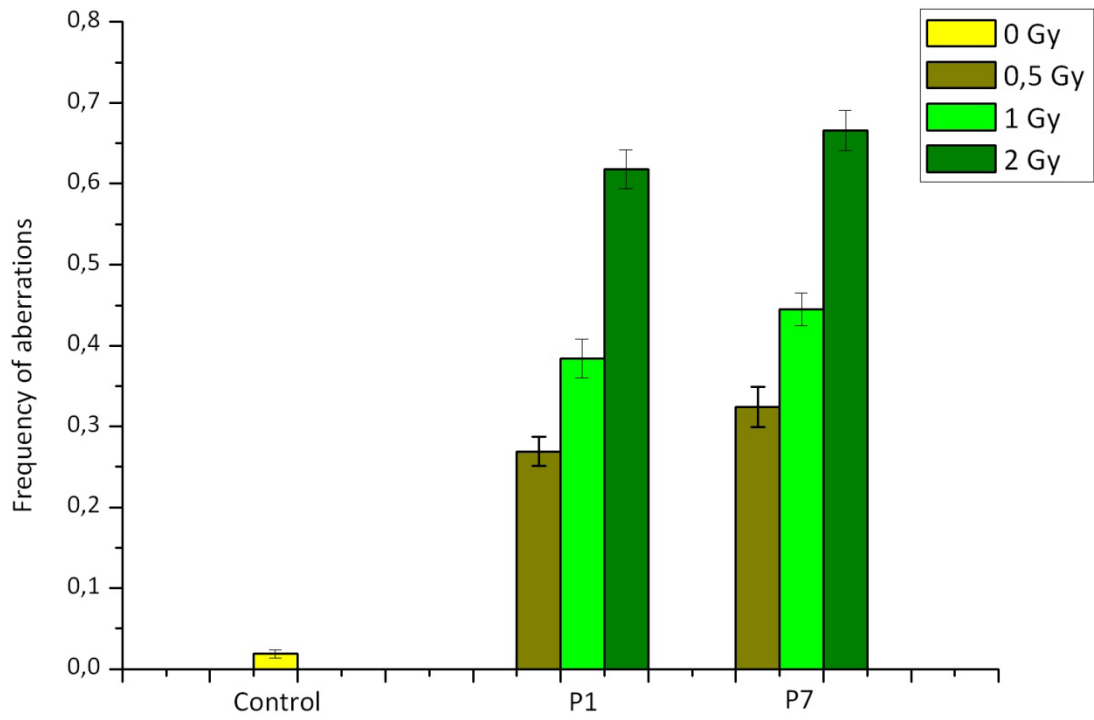
Il secondo effetto subletale analizzato in questo lavoro di tesi è rappresentato dalle aberrazioni cromosomiche, il cui spettro in seguito ad irraggiamento con particelle cariche ad alto LET contiene di solito una preponderanza di scambi di tipo complesso rispetto alla qualità delle aberrazioni che si osservano dopo trattamento con fotoni. Le aberrazioni cromosomiche sono state studiate su campioni della linea cellulare MCF10A (cellule del tessuto della mammella), irraggiate in due posizioni della curva di Bragg con ioni carbonio accelerati ai LNS-INFN di Catania: P1 (inizio del plateau) e P7 (picco pristino) della curva di Bragg con ioni carbonio, a dosi di 0,5, 1 e 2,5 Gy, oltre che sul controllo (0 Gy). Irraggiamenti con raggi X alle stesse dosi sono stati effettuati per un confronto.

L'indagine volta alla ricerca di AC è stata effettuata tramite tecnica FISH (Fluorescence In-Situ Hybridization), attuata sui cromosomi 1 e 2 delle cellule suddette con microscopio a fluorescenza e software METAFER. Per ogni dose sono state analizzate diverse centinaia di metafasi. L'analisi è stata volta alla ricerca di scambi semplici e complessi (vedere *Appendice B*) e alla valutazione della frequenza di aberrazioni cellulari (#aberrazioni/#cellule aberrate).

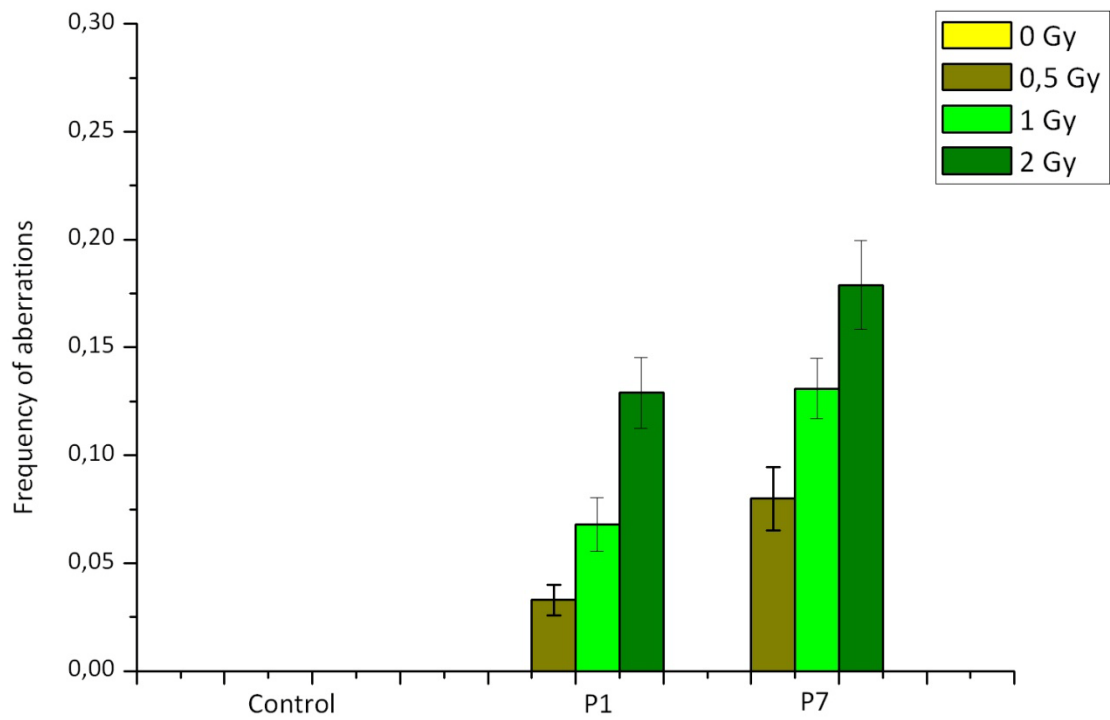
Di seguito sono riportati i grafici relativi ad irraggiamenti effettuati con ioni carbonio a dosi di 0,5, 1 e 2 Gy più controllo, corrispondenti alla frequenza di scambi di tipo semplice e di tipo complesso, con grafici di paragone effettuati dopo irraggiamento con X a dosi di 1, 2 e 3 Gy più controllo. Il confronto tra gli effetti indotti dalle due tipologie di radiazione è stato eseguito tenendo presente che a dosi di 1 Gy di X e di 0,5 Gy di carbonio i dati ottenuti per la sopravvivenza cellulare delle popolazioni coinvolte sono comparabili, come pure accade per dosi superiori (2 Gy e 3 Gy di X forniscono una percentuale di sopravvivenza simile a quella procurata da 1 Gy e 2 Gy di ioni carbonio).



***Frequenza di aberrazioni per cellula con ioni carbonio***



***Frequenza di aberrazioni complesse per cellula con ioni carbonio***



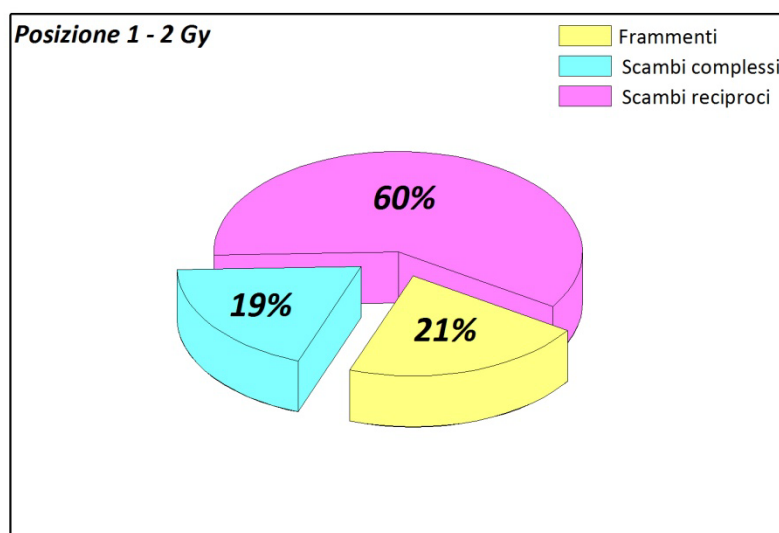
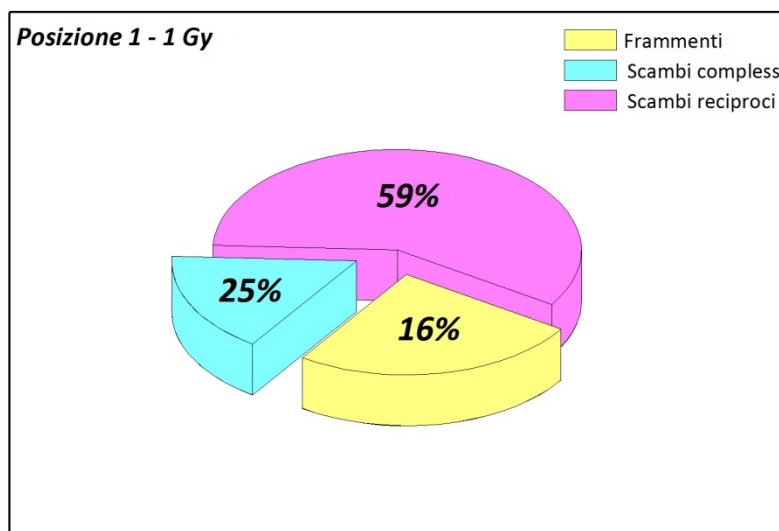
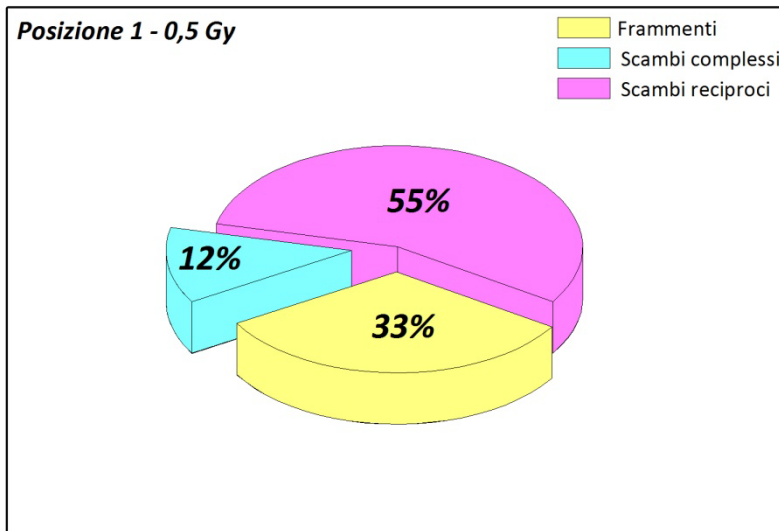


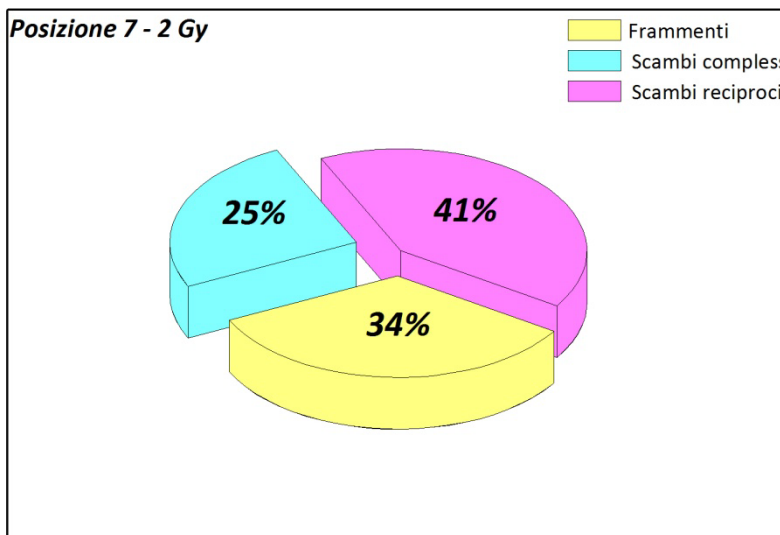
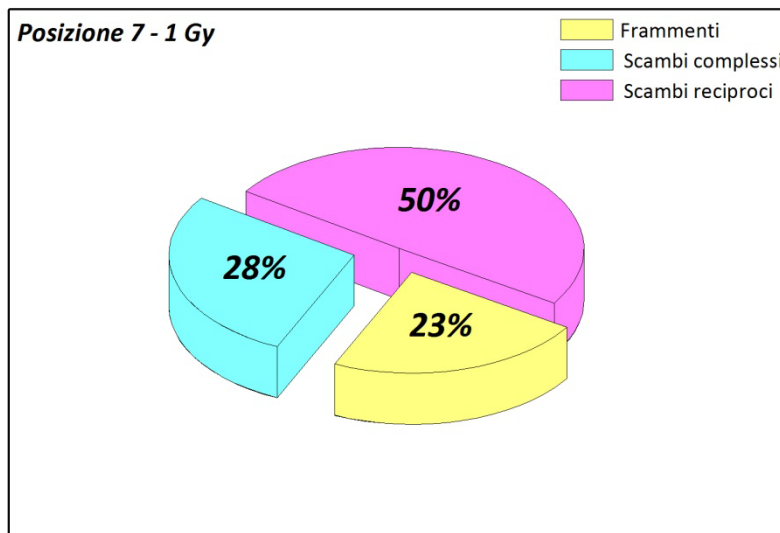
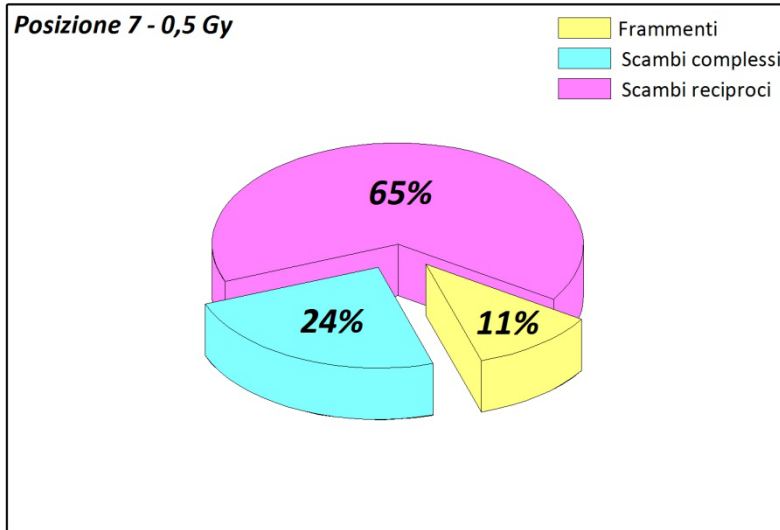
Nel caso dei raggi X, l'induzione di AC cresce pressoché linearmente con la dose. In particolare, la frequenza di scambi complessi risulta praticamente nulla a 1 Gy; anche alla massima dose utilizzata, la maggior parte delle AC consiste in scambi semplici.

Dal confronto tra l'andamento della frequenza di scambi semplici con raggi X e quello relativo al carbonio, è possibile evidenziare un incremento del 80% circa di AC semplici indotte da particelle cariche a tutte e tre le dosi. La situazione invece appare diversa osservando i valori della frequenza di AC complesse generate da X e carbonio; la produzione di tali aberrazioni dovuta all'azione di raggi X risulta quasi nulla a 1 Gy di dose e poco più alta a 2 e 3 Gy, non raggiungendo comunque valori di rilievo. Considerando i risultati ottenuti da irraggiamenti con carbonio, invece, già in P1 a 0,5 Gy l'interazione di tali ioni ha originato una percentuale di AC rimarcabile; a dosi superiori (1 e 2 Gy), la percentuale di AC complesse indotte da carbonio in P1 supera di circa l'80% quella di AC indotte dagli X alle dosi corrispondenti, mentre in P7 la discrepanza raggiunge quasi il 90%. Nel complesso, gli effetti degli ioni carbonio sulla popolazione cellulare risultano decisamente più incisivi rispetto a quelli della radiazione a basso LET considerata, in particolare nella produzione di AC di tipo complesso.

Raffrontando, infine, i grafici della frequenza di AC semplici e complesse indotte da carbonio, il trend di crescita lineare seguito risulta identico per entrambi, ma è possibile osservare un incremento maggiore dei valori per le AC complesse indotte passando dalla P1 alla P7, rispetto a quanto accade nell'andamento di AC semplici, ove la discrepanza nei valori della frequenza calcolati in P1 e in P7 si aggira intorno al 10%.

Sono di seguito riportati in grafici a torta i valori di alcune tipologie di aberrazioni (frammenti, scambi complessi, scambi reciproci) valutati per le due posizioni di irraggiamento alle varie dosi.





Nella posizione 1, ossia all'inizio del plateau della curva di Bragg, per dosi crescenti la percentuale di scambi reciproci non varia significativamente al crescere della dose, mentre aumenta la frequenza di scambi complessi a discapito dei frammenti. In posizione 7 (picco di Bragg), già a 0,5 Gy la frequenza di scambi complessi è maggiore di quella per 0,5 Gy ed 1 Gy in P1; tali scambi non mutano in percentuale sul totale delle aberrazioni analizzate, mentre ciò che cresce al crescere della dose è l'abbondanza relativa di frammenti, cui fa riscontro una progressiva riduzione nell'incidenza di scambi reciproci. Questo fenomeno è compatibile con l'elevato LET delle particelle che inducono rotture multiple nel materiale cromosomico.

# **CONCLUSIONI**

L'attività sperimentale alla base di questo lavoro di tesi è stata volta allo studio degli effetti subletali indotti in due linee cellulari umane (MCF-10 e HUVEC) da radiazioni ionizzanti ad alto LET di vario Z (fasci di ioni carbonio e ossigeno). In particolare, è stata rivolta l'attenzione alla senescenza prematura radioindotta, studiata con il saggio della  $\beta$ -galattosidase, e alle aberrazioni cromosomiche, analizzate sui cromosomi 1 e 2 mediante tecnica FISH. Parte integrante di questo lavoro è stata la messa a punto e calibrazione della strumentazione utilizzata per il monitoraggio dei fasci (in particolare i rivelatori utilizzati a fondo canale e l'apparato elettronico ad essi collegato) ed è stato validato il set-up, recentemente modificato, del fondo canale presso l'acceleratore Tandem del Dipartimento di Fisica dell'Università Federico II di Napoli per la realizzazione di esperimenti di radiobiofisica con fasci di ioni a medio Z in prossimità del picco di Bragg. L'utilità dello studio di questi fasci consiste nella possibilità di investigare possibili effetti di traccia nell'induzione di alcuni endpoint radiobiologici di interesse in radioprotezione e radioterapia per le conseguenze sulle cellule normali umane, che di solito vengono trascurati nei modelli radiobiologici in voga, basati sul LET, e per i quali manca un adeguato corredo di dati sperimentali.

L'analisi dei risultati ottenuti dal saggio della senescenza effettuato sulle cellule endoteliali HUVEC, esposte ai raggi X come controllo e a ioni carbonio ed ossigeno, ha dimostrato l'insorgere del fenomeno della senescenza prematura in modalità e tempistiche differenti a seconda della radiazione considerata (ossia, in base al numero atomico dello ione) e della sua energia (ovvero del suo LET). Nel caso dell'esposizione a raggi X, la risposta si è manifestata piuttosto tardivamente, permanendo però a lungo; nel caso dell'interazione con ioni l'induzione di senescenza si è manifestata dopo pochi giorni dall'irraggiamento, evidenziando una sorta di andamento "ad ondate", con una prima fase acuta seguita da una recrudescenza del fenomeno a tempi successivi. Inoltre, le teorie radiobiologiche

attuali descrivono la dipendenza dalla qualità della radiazione soltanto di alcuni endpoint (ad esempio la morte cellulare e l'induzione di mutazioni ed aberrazioni cromosomiche), ed essenzialmente utilizzando come parametro il LET. Se si osserva il fenomeno qui studiato della senescenza cellulare, su cui esiste una sostanziale assenza di dati sperimentali, dal punto di vista dello Z degli ioni utilizzati e per valori del LET elevatissimi per i quali le teorie radiobiologiche attuali non prevedono differenze sostanziali (overkill effect) è stato possibile osservare che la percentuale di cellule in senescenza prematura rimane pressoché costante nel tempo nel caso degli ioni carbonio, mentre la percentuale di cellule che entrano in senescenza prematura con gli ioni ossigeno aumenta linearmente col tempo. Questa differenza negli andamenti relativi alle due tipologie di ioni indica come ioni di diverso Z, seppur entrambi ad alto LET, possano indurre effetti tardivi di diversa severità, dimostrando dunque l'inadeguatezza del LET come unico parametro fisico per predire la risposta radiobiologica cellulare, in particolar modo per quanto riguarda gli effetti subletali in cellule umane. Tali deduzioni potrebbero influenzare gli studi in radioprotezione (per quanto riguarda, ad esempio, l'esposizione degli astronauti ai raggi cosmici ad alto LET oltre l'atmosfera terrestre, o l'esposizione alle particelle  $\alpha$  emesse da gas radon indoor diffuso), ma soprattutto potrebbero essere alla base dell'analisi degli effetti secondari sul tessuto sano di pazienti sottoposti ad adroterapia.

Il secondo effetto subletale preso in considerazione, fondamentale per la determinazione dell'incidenza di danni non o mal riparati a livello cellulare, è stata l'incidenza di aberrazioni cromosomiche su cellule MCF10A irraggiate con ioni carbonio, in due posizioni della curva di Bragg (inizio del plateau, che interessa le regioni sane del tessuto irraggiato in adroterapia, e picco di Bragg), a differenti dosi. Tale analisi, effettuata sui cromosomi 1 e 2 con tecnica FISH, ha rivelato un'elevata insorgenza di aberrazioni cromosomiche, sia semplici che complesse, in seguito ad irraggiamento con ioni e un andamento della frequenza di aberrazioni che tende ad aumentare con la dose. Inoltre, l'induzione di AC appare altamente significativa già in corrispondenza del plateau e tale effetto differisce solo del 10% circa rispetto a quello ottenuto all'energia del picco di Bragg. Ciò potrebbe portare a conseguenze

sul tessuto sano irraggiato in adroterapia; in particolare, molto alta è la percentuale di scambi complessi che, se trasmessi alla progenie delle cellule danneggiate ma sopravvissute, potrebbero rappresentare un fattore di rischio di trasformazione neoplastica.

Per concludere, i risultati ottenuti indicano la capacità delle particelle cariche di indurre effetti subletali in tessuto sano anche a dosi relativamente basse, confermando la necessità di includere altri parametri fisici quali la struttura di traccia per un'adeguata modellizzazione dei loro effetti a livello cellulare.

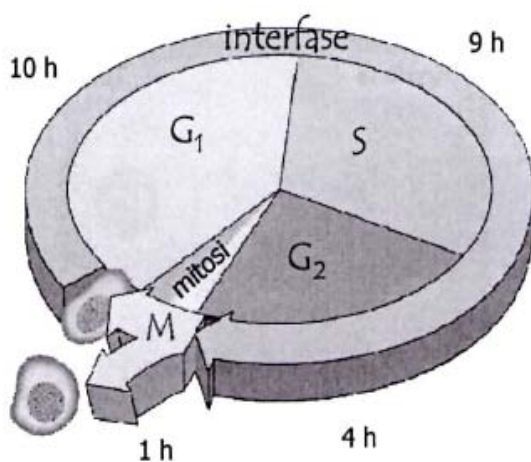
## Appendice A

### IL CICLO CELLULARE

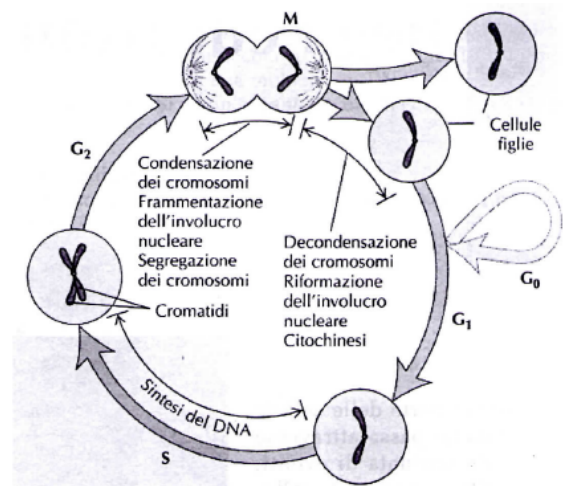
Il ciclo cellulare è una serie di eventi che ha luogo tra una divisione cellulare e quella successiva. Può essere diviso in due fasi principali, *interfase* e *mitosi*, ma più comunemente si fa riferimento a quattro fasi, scandite da particolari meccanismi cellulari (Fig.1):

1. fase **S (sintesi)**, processo di duplicazione del DNA e dei cromosomi che sarà poi equamente suddiviso fra le due cellule figlie nella successiva mitosi;
2. fase **M (mitosi)**, processo di divisione nucleare che porta alla divisione cellulare;
3. fasi **G<sub>1</sub>-G<sub>2</sub>**, fasi di gap che intercorrono rispettivamente tra le fasi M ed S e le fasi S ed M. Nella fase G<sub>1</sub>, la cellula comincia a crescere, intraprende il regolare metabolismo e cominciano a svilupparsi i suoi organelli interni. Nella fase G<sub>2</sub>, si crea il fuso mitotico e i cromosomi iniziano a condensarsi.

Nei vertebrati, può anche accadere che la cellula, durante la fase G<sub>1</sub>, non si moltiplichi ed entri in una fase quiescente **G<sub>0</sub>**, che può durare giorni, mesi o addirittura anni (Fig. 2).



**Fig.1.** Il ciclo cellulare



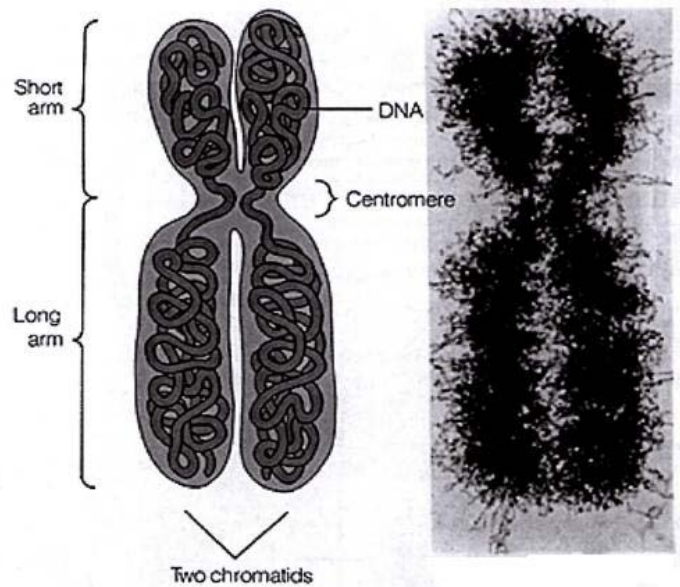
**Fig.2.** Rappresentazione del ciclo cellulare con riferimento ai cromosomi



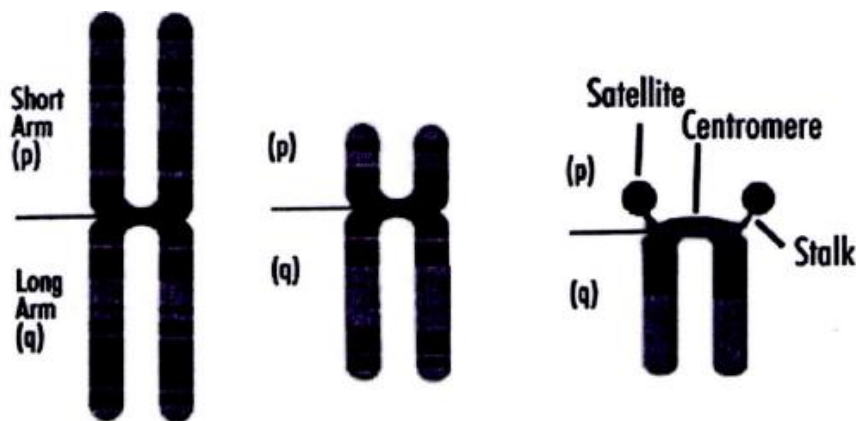
### Fase S

Durante questa fase, il DNA nucleare e quindi i cromosomi vengono duplicati. Le due parti identiche dei cromosomi condensati vengono detti *cromatidi*; essi sono tenuti insieme da una struttura denominata *centromero* e formati ognuno da un braccio corto e un braccio lungo (Fig.3).

Il centromero è una regione specifica del cromosoma eucariotico coinvolta nel processo di segregazione cromosomica, durante il quale ad esso si associa una struttura proteica chiamata cinetocore, che permette la segregazione dei cromatidi fratelli nelle due cellule figlie. In base alla posizione del centromero, i cromosomi possono essere classificati come in Fig.4.



**Fig.3.** A sx: rappresentazione di un cromosoma e delle sue componenti. A dx: cromosoma reale.



Metacentric Submetacentric Acrocentric

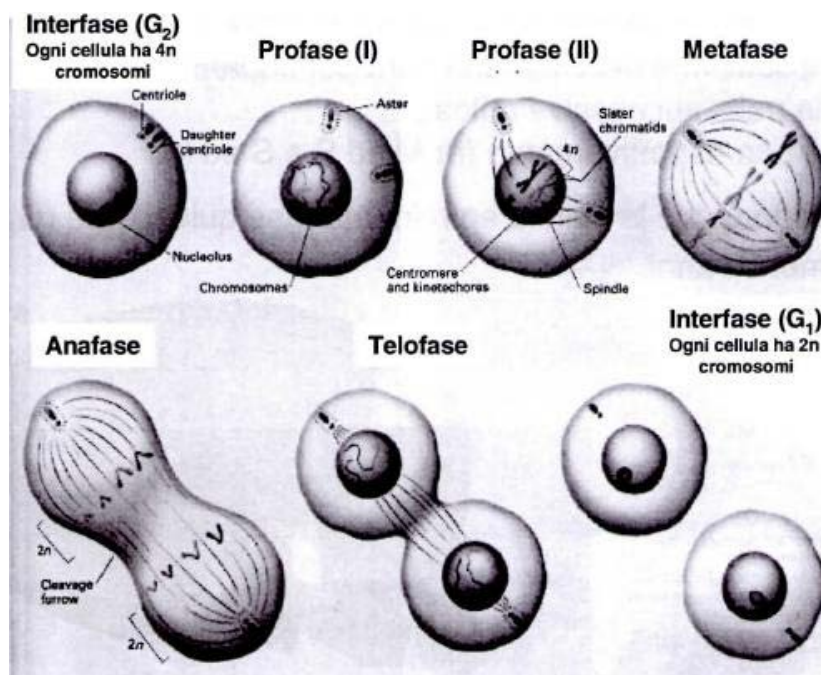
**Fig.4.** Classificazione dei cromosomi in base alla posizione del centromero

## Mitosi

La fase di mitosi cellulare è a sua volta suddivisa in 4 fasi (Fig.5: lezione 8 BDR, diap.4):

- **profase**, durante la quale cominciano a posizionarsi gli estremi (asters) del fuso mitotico (spindle) e la cromatina comincia a condensarsi in cromosomi visibili;
- **metafase**, fase in cui la membrana nucleare si rompe e i cromosomi condensati cominciano a posizionarsi lungo i filamenti del fuso mitotico;
- **anafase**, in cui il fuso comincia ad allungarsi e la membrana cellulare si restringe al centro;
- **telofase**, fase finale della mitosi in cui avviene il distacco delle due cellule figlie e la formazione di due nuovi involucri nucleari, ognuno con il relativo corredo cromosomico.

La metafase risulta essere la fase fondamentale del ciclo: in essa, i cromosomi sono condensati nella caratteristica forma ad X, pronti alla separazione e già duplicati, in quanto ogni cromatide contiene una delle due molecole di DNA generate durante la duplicazione avvenuta in fase S.

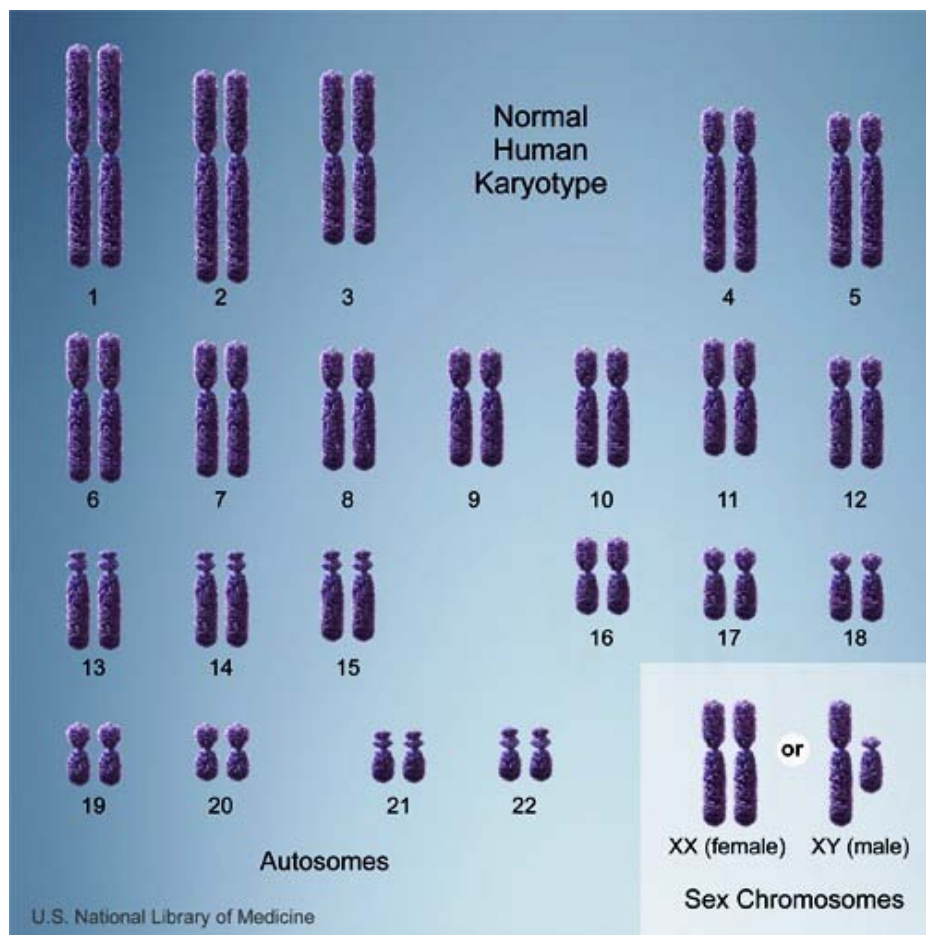


**Fig.5.** Il ciclo cellulare analizzato in tutte le sottofasi della mitosi

## Appendice B

### ABERRAZIONI CROMOSOMICHE

Negli eucarioti, fatta eccezione per le cellule germinali e pochi tipi cellulari altamente specializzati, ogni cellula contiene due copie di ciascun cromosoma, ognuna ereditata da un genitore, che vengono chiamate *cromosomi omologhi*. Il *cariotipo* (l'insieme di coppie di cromosomi caratteristico di ogni specie) di un essere umano è costituito da 23 coppie di cromosomi, 22 coppie di autosomi omologhi e l'ultima, che identifica il genere sessuale, da due eterosomi (XX per le femmine, XY per i maschi) (Fig.6).

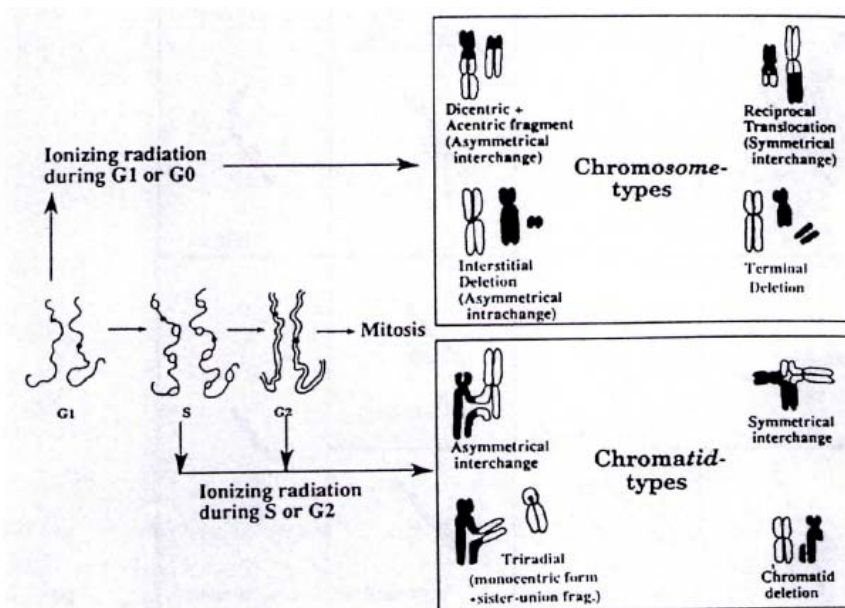


**Fig.6.** Cariotipo umano

Lo studio dell'induzione di aberrazioni cromosomiche è importante per la ricerca dell'associazione di molti tumori e malattie ereditarie alla presenza nel corredo cromosomico di aberrazioni numeriche o strutturali.

Le categorie di aberrazioni cromosomiche note sono:













- **costituzionali**, che affliggono uno dei genitori (e in questo caso l'anomalia è anche omogenea) oppure la cellula fecondata (in questo caso, l'anomalia è a mosaico) e si trasmettono in tutto il ciclo di sviluppo e specializzazione delle cellule figlie.
- **acquisite**, che si manifestano durante la specializzazione cellulare e affliggono una determinata linea cellulare (di un dato tessuto o organo);
- **numeriche**, che influiscono sulla *ploidia* (numero di cromosomi), alterando il set cromosomico con l'aggiunta di uno o più cromosomi a tutte o ad alcune coppie del cariotipo (euploidia, poliploidia, aneuploidia)
- **strutturali**, dette cromosomiche quando modificano la struttura dei cromosomi interi (avvengono durante le fasi G<sub>1</sub> o G<sub>0</sub>), o cromatidiche se hanno ripercussioni sulla struttura dei singoli cromatidi (avvengono durante le fasi S o G<sub>2</sub>) (Fig.7)
- simmetriche/asimmetriche



**Fig.7.** Aberrazioni cromosomiche strutturali, suddivise in cromosomiche e cromatidiche

Le aberrazioni cromosomiche strutturali possono essere classificate in vari modi. Una maniera dettagliata è la classificazione in (Fig.8):

- Interscambi e intrascambi
- Simmetriche e asimmetriche
- Tipo semplice e complesso
- Forma completa o incompleta

	<u>INTERCHANGE</u>	<u>INTER-ARM INTRACHANGE</u>	<u>INTRA-ARM INTRACHANGE</u>	<u>DISCONTINUITY</u>
				
<u>ASYMMETRICAL INTERACTION</u>	 dicentric	 centric-ring	 interstitial deletion	
<u>SYMMETRICAL INTERACTION</u>	 translocation	 pericentric inversion	 paracentric inversion	 terminal deletion

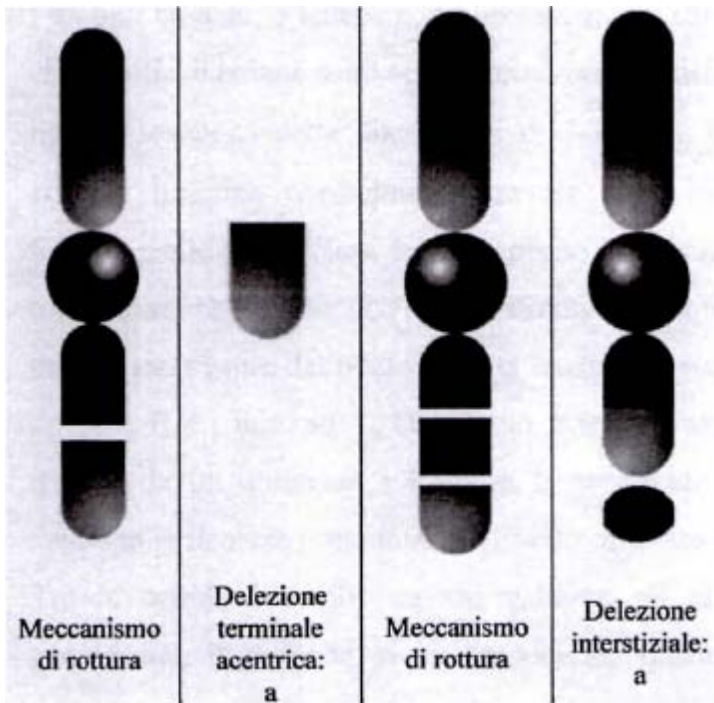
**Fig.8.** Classificazione di aberrazioni cromosomiche simmetriche e asimmetriche

Un modo più schematico, invece, consiste nel classificarle in:

- Frammenti
- Scambi semplici
  - Interscambi
  - Intrascambi
- Scambi complessi

Di seguito, vengono riportate le schematizzazioni delle suddette tipologie di aberrazioni cromosomiche.

### Frammenti



Quando nel braccio di un cromosoma si verificano una o più rotture (*break*), si formano delle aberrazioni denominate frammenti (Fig.9), che possono essere:

- **centrici**, quando contengono il centromero;
- **acentrici**, quando sono privi di centromero.

Un frammento può anche essere originato dalla rottura della parte terminale di un cromosoma; in quel caso, è detto **frammento** (o delezione) **terminale**. Se invece è

*Fig.9. Formazione di frammenti acentrici con due meccanismi di rottura differenti*

generato dalla perdita di una parte di cromosoma compreso tra due rotture su di un braccio del cromosoma, si parla di **frammento** (o delezione) **interstiziale**. In entrambi i casi si osserva un cromosoma più corto ed un frammento acentrico.

### Scambi semplici

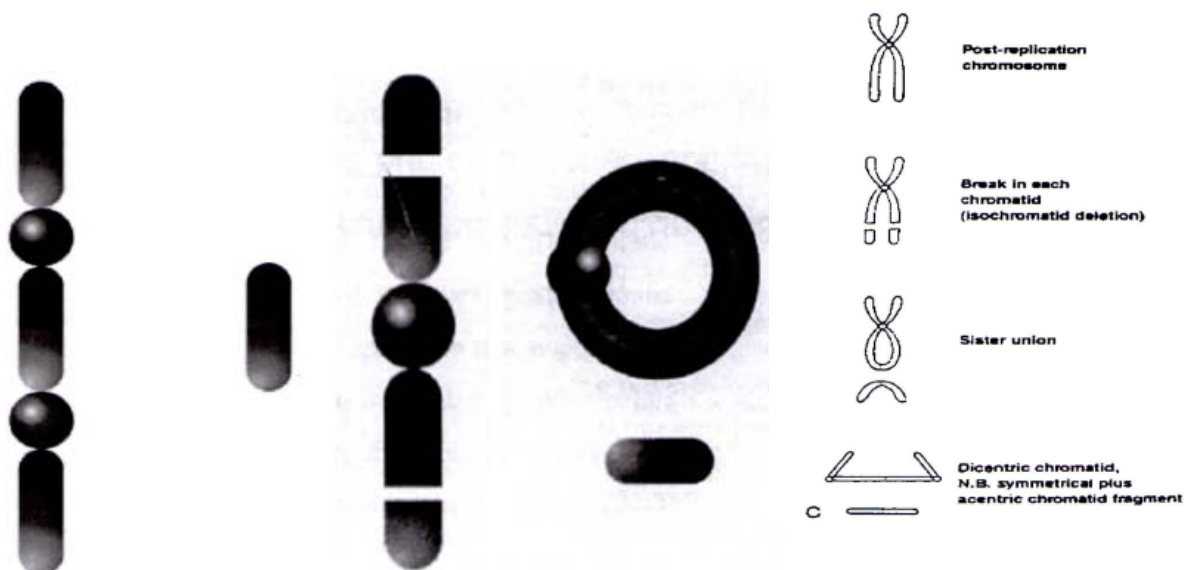
Gli scambi semplici sono aberrazioni cromosomiche che derivano dall'interazione di due cromosomi aventi ciascuno una singola rottura (*interscambi*) e si dividono in:

- **traslocazioni**, quando un frammento acentrico di un cromosoma si ricombina con un frammento centrico di un altro cromosoma;

- **dicentrici**, quando si uniscono da una parte i due frammenti con centromero e dall'altra i restanti frammenti acentrici, che eventualmente possono ricombinarsi.

E' possibile che avvengano anche scambi tra i cromatidi di uno stesso cromosoma: in questo caso si parla di *intrascambi*, che possono consistere in (Fig.10):

- **rings** (anelli) **centrici** (se contengono il centromero) o **acentrici** (se privi di centromero);
- **ponti anafase**, generati dalla rottura di entrambi i cromatidi, con formazione di due frammenti acentrici e di un cromosoma contenente i due bracci "tagliati" uniti fra di loro. Tale struttura, durante l'anafase, si "allunga" lungo il fuso mitotico, impedendo la corretta segregazione del cromosoma coinvolto nell'aberrazione.



**Fig.10.** Frammento dicentrico + frammento acentrico (sx).  
 Ring centrico con frammento (centro).  
 Ponte anafase (dx).

### **Scambi complessi**

Gli scambi complessi si osservano quando in due cromosomi si formano almeno tre rotture. Essi richiedono il ricongiungimento di rotture localizzate in prossimità spaziale e temporale, quindi la densità di ionizzazione e/o la struttura di traccia influenzano fortemente la formazione degli scambi.

Un esempio di scambio complesso è dato dalle inserzioni in cui un frammento di un cromosoma (a prescindere se contenga o meno il centromero) si inserisce in un altro cromosoma.

Data la classificazione delle AC, si parla di **stabilità** di un'aberrazione quando essa non influisce sulla morfologia dei cromosomi e non comporta perdita di materiale genetico.

Gli scambi simmetrici sono definiti aberrazioni stabili perché, non comportando alcuna anomalia morfologica, non generano problemi meccanici alla divisione e, non producendo frammenti, non determinano alcuna perdita di materiale genetico. Per questi motivi, le traslocazioni reciproche possono essere trasmesse alle cellule figlie anche per diversi cicli di divisioni cellulari, diventando quindi potenzialmente più importanti per gli effetti tardivi del danno indotto dalla radiazione.

Delezioni e scambi asimmetrici sono invece definiti aberrazioni instabili perché ostacolano la normale segregazione dei cromosomi nelle cellule figlie e possono essere letali entro pochi cicli cellulari. Se la delezione implica la perdita del centromero, il risultato è un cromosoma acentrico, che generalmente viene perso durante la divisione cellulare. A seconda dell'organismo questa perdita cromosomica può avere conseguenze molto gravi o letali. Per quanto riguarda i dicentrici, in base al loro orientamento rispetto alle fibre del fuso mitotico possono impedire la corretta segregazione o essere ereditati da una cellula figlia. Anche i ring sono aberrazioni instabili, perché vengono persi dopo la prima mitosi non potendo legarsi alle fibre del fuso.



## **Appendice C**

### **MATERIALI UTILIZZATI**

#### *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 2,0 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

## ***Appendice D***

### **PROTOCOLLI**

#### **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 ferrocianide
- Reagente C: 400 mM potassio ferrocianide
- 40 mg/ml X-gal solution
- 10x Staining solution preriscaldata a 37 °C per 1 h
- 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, aggiungere 1,5 ml di Fixation buffer e incubare per 6-7 min
- Preparare la Staining Mixture con i seguenti reagenti nell'ordine (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

## **Test FISH (Fluorescence In-Situ Hybridization) per la rivelazione di aberrazioni cromosomiche sui cromosomi 1 e 2**

### Reagenti richiesti

- Sonda XCP 1 Green (cromosoma 1) e XCP 2 red (cromosoma 2) 50 µl Metasystem
- 0,4 x SSC (pH 7,0-7,5) a 72 °C
- 2 x SSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0) a temperatura ambiente
- DAPI/antifade

### Procedura

#### ***Step 1: Preparazione campioni e ibridazione***

- Porre una goccia di campione cellulare su un vetrino da microscopio pulito.
- Far asciugare all'aria (per un'osservazione posticipata all'ibridazione, conservare i vetrini a -20 °C)
- Applicare 10 µl di soluzione con sonda
- Coprire con un copri vetrino 22x22 mm<sup>2</sup>
- Sigillare con rubber cement
- Denaturare il campione e la sonda simultaneamente, riscaldando il vetrino su una piastra a 75 °C per 2 minuti
- Incubare in camera umidificata a 37 °C overnight.

### **Step 2: Risciacqui post-ibridazione**

- Rimuovere attentamente il copri vetrino e tutte le tracce di colla dal vetrino
- Sciacquare il vetrino in 0,4 x SSC per 2 min
- Rimuovere il vetrino e sciacquarlo in 2 x SSC a temperatura ambiente per 30 s
- Risciacquare brevemente in acqua distillata per evitare formazioni di cristalli e lasciare asciugare all'aria

### **Step 3: Aggiunta liquido di contrasto**

- Applicare 10  $\mu$ l di DAPI/antifade sulla zona del vetrino ~~in posto~~ il campione cellulare e coprire con un copri vetrino 24x32 mm<sup>2</sup>
- Lasciar agire il DAPI per 10 min
- Procedere alla visualizzazione al microscopio
- Conservare i vetrini a -20 °C. Il segnale di ibridazione sar  visibile entro 6 mesi



# BIBLIOGRAFIA

## Introduzione

- [1] Orecchia et al., *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004 Aug; 51(2):81-90. Review
- [2] Minozara et al., *J. Radiat Res*. 2010; 51(4):385-92. Review.
- [3] Durante M, Loeffler J.S., *Nat Rev Clin Oncol*. 2010 Jan; 7(1):37-43. Epub 2009 Dec 1. Review.
- [4] N. Givenchi Et al., *Online beam monitoring in the treatment of ocular pathologies at the INFN Laboratori Nazionali del Sud-Catania*, *Physica Medica* Volume 27, Issue 4, October 2011, Pages 233–240
- [5] Goodhead, D.T., *Int. J. Radiat. Biol.* 65 (1994) 7-17
- [6] Desai N., Davis E., O'Neill P., Durante M., Cucinotta F.A., Wu H., *Radiat. Res.* 164 (2005) 518-522.

## Capitolo 1

- [1] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, *Biologia molecolare della cellula*, 5° ed. Zanichelli (2009)
- [2] W.R. Leo, *Techniques for physics experiments*, Lausanne (1987), 17-63.
- [3] W. E. Burcham et al., *Nuclear and particle physics*, Birmingham (1994), 22-36.

- [4] F. H. Attix, *Introduction to radiological Physics and radiation dosimetry*, USA (1986), 124-155
- [5] ICRU (International Commission on Radiation Units and Measurement), (1998) *Fundamental Quantities and Units for Ionizing Radiation*, ICRU report 60.
- [6] Cember, H., *Introduction to Health Physics*, 2<sup>nd</sup> ed. McGraw-Hill, New York (1992)
- [7] E. J. Hall, A. J. Giaccia, *Radiobiology for the radiologist*, 6<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins (2006)
- [8] M. Tubiana, J. Dutreix, A. Wambersie, *An introduction to Radiobiology*, 2<sup>nd</sup> ed. Taylor & Francis (1990)

## Capitolo 2

- [1] Raju MM. R., Eisen YY., Carpenter K., Jarrett K., Harvey W.F., *Radiat. Res.* 1333 (1993) 2899-296
- [2] Cucinotta F.A., Plante I., Ponomarev A.L., Kim M.H., *Radiat. Prot. Dosimetry* 1143 (2011) 3384-390
- [3] Malouf M., Durante M., Foray N., *J. Radiat. Res.* 52 (2011) 126-146.
- [4] Fokas E., Kraft G., An H., Engenhardt-Cabillic R., *Biochim Biophys Acta* 1796 (2009) 216-229.



- [5] Claesson K., Magnander K., Kahu H., Lindegren S., Hultborn R., Elmroth K., *Int. J. Radiat. Biol.* 87 (2011) 372-384
- [6] Newhauser W. and Durante M., *Nature Rev. Cancer* 11 (2011) 438-448
- [7] Hada M. and Georgakilas A. G., *J. Radiat. Res.* 49 (2008) 203-210
- [8] Cucinotta F.A., Wilson J.W., Shavers M.R., Katz R., *Int. J. Radiat. Biol.* 69 (1996) 593-600
- [9] Desai N., Davis E., O'Neill P., Durante M., Cucinotta F.A., Wu H., *Radiat. Res.* 164 (2005) 518-522
- [10] Nikjoo H., Uehara S., Wilson W.E., Hoshi M., Goodhead D.T., *Int. J. Radiat. Biol.* 73 (1998) 355-364.
- [11] Little M.P., *Mutat. Res.* (687) 2010 17-27.
- [12] Matsubara S., Ohara H., Hiraoka T., Koike S., Ando K., Yamaguchi H., Kuwabara Y., Hoshina M., Suzuki S., *Radiat. Res.* 123 (1990) 182-191
- [13] Heilmann J., Taucher-Scholz G., Haberer T., Scholz M., Kraft G., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 34 (1996) 599-608
- [14] Tsuruoka C., Suzuki M., Fujitaka K., *Biol. Sci. Space* 18 (2004) 188-189.
- [15] Konishi T., Takeyasu A., Yasuda N., Natsume T., Nakajima H., Matsumoto K., Asuka T., Sato Y., Furusawa Y., Hieda K., *J. Radiat. Res.* 46 (2005) 415-424

- [16] Wu H., Hada M., Meador J., Hu X., Rusek A., Cucinotta F.A., *Radiat. Res.* 2006 Oct;166(4):583-9.
- [17] Manti L., Durante M., Grossi G., Pugliese M., Scampoli P., Gialanella G., *Nucl. Instr. Meth B*, 259 (2007) 884-888
- [18] Roig A.I., Hight S.K., Minna J.D., Shay J.W., Rusek A., Story M.D., *Int. J. Radiat. Biol.* 86 (2010) 194-204
- [19] Suzuki M., Tsuruoka C., Uchihori Y., Ebisawa S., Yasuda H., Fujitaka K., *Radiat Res.* (164) 2005 505-508.
- [20] Grossi G., Bettega D., Calzolari P., Durante M., Elsässer T., Gialanella G., Hessel P., Manti L., Pugliese M., Ritter S., Santini M. T., Scampoli P., Weyrather W. K., *Il Nuovo Cimento C* 47 (2008) 39-47
- [21] Suzuki M., Boothman D.A., *J. Radiat. Res.* 49 (2008) 105-112.
- [22] Manti L., *La senescenza cellulare prematura come effetto subletale della radiazione ionizzante*, *Radiat. Ric. E Appl.*, Anno XV n. 1-2 (2012), 18.
- [23] Hayflick L. e Moorhead P.S., *The serial cultivation of human diploid cell strains*, *Exp. Cell. Res.* (1996), 25, 585-621.
- [24] Dimri G.P., *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in ageing skin in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995), 92, 9363-9367.

- [25] Harley C.B., Futcher A.B., Greider C.W., *Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts* (1990), *Nature* 345, 458-460.
- [26] Hastings R., Qureshi M, Verma R., Lacy P.S, Williams B., *Telomere attrition and accumulation of senescent cells in cultured human endothelial cells* (2004), *Cell Prolif.* 37, 317-324.
- [27] Serrano M., Lin A.W., McCurrach M.E., Beach D., Lowe S.W, *Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a* (1997), *Cell* 88, 593-602.
- [28] Tsuruoka C., Suzuki M., Fujitaka K., *Biol. Sci. Space* 18 (2004) 188-189.
- [29] Konishi T., Takeyasu A., Yasuda N., Natsume T., Nakajima H., Matsumoto K., Asuka T., Sato Y., Furusawa Y., Hieda K., *J. Radiat. Res.* 46 (2005) 415-424
- [30] Wu H., Hada M., Meador J., Hu X., Rusek A., Cucinotta F.A., *Radiat. Res.* 2006 Oct;166(4):583-9.
- [31] Davalos A.R., Coppe J.-P., Campisi J., Desprez P.-Y., *Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression* (2010), *Cancer Metastasis Rev.* 29, 273-283.
- [32] Sabin R.J., Anderson R.M., *Cellular senescence-Its role in cancer and the response to ionizing radiations* (2011), *Genome Integrity* 2011, 2-7.

- [33] Bonassi S., Norppa H., Ceppi M., Strömberg U., Vermeulen R., Znaor A., Cebulska-Wasilewska A., Fabianova E., Fucic A., Gundy S., Hansteen I.L., Knudsen L.E., Lazutka J., Rossner P., Sram R.J., Boffetta P., *Carcinogenesis* 29 (2008) 1178-1183.
- [34] Durante M., George K., Wu H., Yang T.C., *Rejoining and misrejoining of radiation-induced chromatin breaks. I. Experiments with human lymphocytes*, *Radiat. Res.* 145 (1996): 274-280.
- [35] Campajola L., *Produzione, accelerazione e trasporto di fasci*, seminario 2009



## **RINGRAZIAMENTI**

Con questo lavoro si conclude finalmente il mio percorso universitario, dopo troppi (o troppo pochi, in realtà?) anni, durante i quali ho vissuto mille esperienze, conosciuto persone di tutti i tipi, trovato e perso e ritrovato l'amore, amato e detestato e amato ancora il mio "lavoro" e le mie scelte. Vorrei ringraziare, ognuno in maniera diversa, tutti coloro che mi hanno fatto crescere e andare avanti, anche solo grazie ad una chiacchierata in treno, o ad un sorriso fugace per strada, o anche dopo avermi rubato il cellulare (e qui chi sa il fatto sghignazzerà interiormente) o avermi rivolto uno sguardo poco amichevole... Purtroppo, gran parte di questi personaggi sono a me sconosciuti, ma per mia fortuna sono ancora tante le persone che mi sono state accanto, da vicino e da lontano, nei momenti bui e in quelli radiosi, e non saranno mai troppe le volte in cui le ringrazierò di questo, in ordine sparso e mai di importanza, perché ognuna di esse mi ha plasmato a suo modo.

Il mio primo pensiero va, com'è ovvio, ai "creatori" della storia della mia vita, i miei genitori, che hanno saputo sorreggermi nei momenti burrascosi e mi hanno lasciata affrontare questo mondo con tutti i dovuti timori, uniti alla consapevolezza che la strada da me scelta mi avrebbe portata lontano. Grazie, mamma e papà, per la dolce fermezza e la ferma dolcezza, per i pranzetti consolatori e gli insegnamenti di vita, per il vostro sostegno e la vostra guida, che spero mi riserverete ancora in tante altre occasioni.

In ordine di apparizione (!) non può che esserci la mia migliore amica, mia sorella Antonella, il cui apparato uditivo ha sviluppato poteri sovranaturali, pari solo a quelli di un supereroe, dopo avermi sopportato ore ed ore al telefono (e i "ringraziati" che seguono la compatiranno) tra consigli, momenti di sfogo e discussioni varie. A parte questo, grazie, Deuty, senza di te la mia vita di certo non sarebbe stata la stessa, e questo periodo appena trascorso non avrebbe avuto lo stesso sapore.

Continuando sulla stregua delle melensaggini (sono partita bene, ma troppo miele non lo reggo dopo un po'), dedico i prossimi ringraziamenti alle mie sorelle mancate, Angela e Federica, destinate, ahiloro, alla stessa sorte della suddetta Antonella, ma entrambe con un savoir-faire diverso, che permette loro di attenuare le mie tendenze carlesche. Grazie, ragazze, per le risate, i pianti, le depressioni e gli "inciuci", per essere cresciute insieme a me e aver coltivato con me speranze e sogni. Vicine o lontane, "un'amicizia lunga una vita".

E tale spero che resti anche il rapporto con due tra gli amici più inaspettati che mi ritrovo, Sara e Federico, perché davvero nella vita non sai mai chi ti capita, e soprattutto DOVE ti capita di conoscere alcune delle persone che non ti molleranno più. Una delle coppie che per me incarna il vero significato dell'amore, e il cui affetto è ricambiato e percepibile anche a chilometri di distanza. Grazie, Sara, per la tua amicizia sincera, romantica e senza limiti, che ha contribuito a farmi superare tanti momenti di difficoltà; grazie, Fede, per il tuo sguardo azzurro e calmo e per la maturità che ti contraddistingue, la quale, nonostante tutto, non impedisce mai alla parte folle di te di guardare alla vita con gioia.

La sto tirando per le lunghe, come mio solito, alla fine forse chi mi starà ancora ad ascoltare sarà solo il mio fratellino acquisito, Massimo, l'unico e solo (bisogna rendergliene atto) che riesce a tenere il bandolo della matassa dei miei discorsi senza distrarsi un secondo. Certo, vorremmo picchiarci per ogni singola opinione divergente ogni volta che ci sentiamo, poi però basta una pizza e un film per farci dimenticare tutto. Grazie, Max, per ricordarmi sempre quant'è bella la fisica e quant'è meraviglioso il mondo intorno a noi, ma soprattutto che ognuno di noi può essere straordinario.

Un grazie particolare va ad un'altra coppia di amici di una vita, Emilio e Cinzia, prima all'uno e poi all'altra per motivi di "apparizione", come dicevo prima. Anche se siamo presi dalla pressante routine quotidiana, riusciamo a goderci ogni momento da trascorrere assieme, e in più di un'occasione si sono rivelati preziosi confidenti e compagni di viaggio. Grazie, ragazzi, per aver condiviso con me sapori e dissapori, interessi comuni e differenti, problemi e spensieratezza.

Ultimi (per ora!) ma in realtà sempre costanti, i miei Vladimir ed Estragon, Fabio e Salvatore, l'artista e lo scrittore, il mio ponte sull'umanesimo e la creatività, il mio vitale contatto con quei momenti di spensieratezza che non torneranno più, ma che loro hanno sempre reso vivi e sempre lo faranno. Grazie, Fabioz e ScritTore, spero di restare sempre la vostra Bloody.

Un grande e affettuoso grazie va ai tanti "colleghi" universitari, che in diverse occasioni si sono dimostrati molto di più: Stefania e Tiziana in primis, "angel & devil" delle mie lunghe giornate universitarie, che soprattutto negli ultimi tempi mi sono state molto accanto, poi il professorone globetrotter Orlando, con i suoi racconti fantastici sull'uomo in ricerca e sulla ricerca dell'uomo, Maria con le sue storie e i mille gossip, Alessandro, Luigi, Antonia, Francesco, Alessia, Ivana, Cristina e tanti altri, grazie di cuore, non vi dimenticherò mai.

Fugaci ma fondamentali ringraziamenti sono dovuti a coloro che hanno plasmato la mia cultura, sin dagli albori del mio cammino didattico, accendendo una fiamma nel cuore per alimentare i miei interessi e una nella ragione per realizzare i miei progetti. In particolare, il mio pensiero va alle mie maestre e ai miei docenti delle medie, tutti bene o male a "pari merito", alle prof.sse Ler e Mainardi, per avermi insegnato che la scuola non serve soltanto a "leggere, scrivere e far di conto", ma soprattutto a relazionarsi e a comprendere il vero potenziale di ogni individuo.

Inoltre, ringrazio gli innumerevoli docenti e ricercatori universitari con cui ho avuto a che fare in tutti questi anni, che mi hanno mostrato tutte le sfumature che può assumere l'animo umano e mi hanno inconsapevolmente aiutato a fare le mie scelte di vita. Grazie per ogni momento, di lavoro, di svago, di studio, ma questo di certo non sarà un addio.

Infine, la persona senza la quale questo traguardo non sarebbe stato raggiunto dalla stessa persona che sono e dalla donna che voglio essere: Francesco, il mio Luce, il mio compagno, amico, fratello, confidente. Non basteranno mai le parole per renderti grazie della tua presenza e del tuo affetto, e spero di poterlo fare ogni giorno della mia vita.

Winter is over, spring is here. Let the sunshine in.