Università degli Studi di Napoli "Federico II"

Scuola Politecnica e delle Scienze di Base Area Didattica di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali

Dipartimento di Fisica "Ettore Pancini"



Laurea triennale in Fisica

La tecnica mFISH come strumento di indagine per la validazione preclinica della Proton-Boron Fusion Therapy (PBFT)

Relatori: Prof. Lorenzo Manti Dott. Chiara Feoli **Candidato:** Lorenzo Brighel N85000913

La tecnica mFISH come strumento di indagine per la validazione preclinica della Proton-Boron Fusion Therapy (PBFT)

Introduzione1
1. Il razionale fisico e radiobiologico della protonterapia
1.1. I principali parametri biofisici nel contesto adroterapico4
1.2. Vantaggi e limitazioni della protonterapia10
2. La Proton-Boron Fusion Therapy (PBFT)
2.1. Stato dell'arte e recenti sviluppi sperimentali14
2.2. Le aberrazioni cromosomiche e la tecnica mFISH come tool per
investigare il danno complesso al DNA nella PBFT19
2.3. Razionale dell'esperimento23
3. Metodologia, Analisi Dati e Risultati
3.1. Ibridazione dei vetrini
3.2. Acquisizione delle piastre PCC ed elaborazione delle immagini
cromosomiche
3.3. Analisi dati e discussione
Conclusioni
Bibliografia

Introduzione

I progressi scientifici e tecnologici sviluppati nell'ultimo secolo, oltre alle crescenti conoscenze in materia di fisica nucleare e particellare, hanno portato ad un progressivo perfezionamento delle tecniche radioterapiche impiegate nella cura dei tumori. Alle terapie tradizionali a base di fotoni ed elettroni si è affiancato un sempre più massiccio utilizzo dell'adroterapia, in cui fasci accelerati di protoni e ioni carbonio sono utilizzati per inattivare le cellule tumorali. A differenza dei raggi x, sia protoni che ioni carbonio sono infatti caratterizzati da un profilo dose profondità che presenta un picco alla fine del range (curva di Bragg), consentendo una migliore localizzazione del danno indotto. Il notevole vantaggio balistico associato all'utilizzo delle particelle rende l'adroterapia estremamente indicata nel trattamento di tumori profondi localizzati, con la possibilità di preservare il tessuto sano e/o eventuali organi a rischio dal deposito di dose più di quanto ottenibile con la radioterapia convenzionale. Nel caso dei protoni però, il vantaggio rispetto alle terapie tradizionali è limitato ad aspetti prettamente fisici: non ci sono infatti differenze sostanziali tra l'efficienza radiobiologica della protonterapia e quella dei fotoni. Inoltre, nel contesto clinico, i protoni danno luogo a fenomeni di scattering che coinvolgono le particelle più leggere e possono causare un accumulo di ionizzazioni al di fuori del target neoplastico. Per ovviare al problema dell'efficienza radiobiologica e ridurre gli effetti di broadening del fascio particellare è stato implementato l'utilizzo degli ioni carbonio: l'alta densità di eventi ionizzanti che caratterizza questa radiazione permette di indurre una maggiore quantità di danni complessi aumentando di conseguenza l'efficacia della terapia. Aspetto negativo nell'impiego degli ioni carbonio alle energie tipiche del loro utilizzo clinico (a partire dai 200 MeV/amu) è il problema legato alla loro frammentazione, con la generazione di ioni più leggeri ad energie sufficienti a oltrepassare la regione distale del picco di Bragg allargato (Spread-Out Bragg Peak) realizzato per conformare il massimo deposito di dose al tumore, risultando così in un deposito indesiderato di dose nei tessuti sani. Recentemente è stata proposta una strategia che prevede l'utilizzo di una reazione nucleare che potenzialmente aumenterebbe l'efficienza biologica della protonterapia, la cosiddetta Proton-Boron Fusion Therapy. In questo approccio si sfrutta la reazione di cattura di protoni a

bassa energia da parte dell'isotopo 11 del boro e la conseguente produzione di 3 particelle a. Caratteristica di questi prodotti di reazione è il breve range (poche decine di micron in tessuto, quindi nell'ordine di un paio di diametri cellulari) unito ad un'elevata densità di ionizzazione (oltre 100 keV/µm in media rispetto ai 5-6 $keV/\mu m$ raggiunti nella regione centrale del SOBP del fascio primario di protoni): la maggiore densità di ionizzazione delle particelle α causerebbe danni citogenetici di natura ben più complessa di quelli generati dai soli protoni; inoltre, il limitato range di tali particelle, unito al fatto che la reazione si innescherebbe a fine percorso dei protoni in quanto la sezione d'urto è massima per una loro energia di circa 700 keV, confinerebbe il potenziamento dell'efficacia dei protoni unicamente al sistema neoplastico. Sperimentalmente sono già stati osservati dal Laboratorio di Biofisica delle Radiazioni del Dipartimento di Fisica "E. Pancini" dell'Università Federico II di Napoli dei risultati che sembrerebbero confermare questa ipotesi: dall'utilizzo di saggi in cui viene misurata l'induzione di morte riproduttiva (test clonogenico) su cellule irradiate in presenza di atomi di ¹¹B con fasci di protoni clinici presso i Laboratori Nazionali del Sud (LNS)-INFN di Catania e il Centro Nazionale di Adroterapia Oncologica (CNAO) di Pavia, l'analisi della sopravvivenza cellulare ha evidenziato un tasso di letalità significativamente più elevato rispetto alla semplice protonterapia.

L'obiettivo di questa tesi è verificare l'incremento dell'efficienza radiobiologica della Proton-Boron Fusion Therapy (PBFT) rispetto alla semplice protonterapia attraverso l'utilizzo delle aberrazioni cromosomiche come biomarcatore assoluto del danno indotto da radiazione ionizzante. Si effettuerà in vitro un'analisi dei cariotipi sulla linea cellulare non tumorale dell'epitelio mammario MCF10, confrontando i risultati ottenuti sui campioni irradiati unicamente con fasci di protoni con quelli da campioni pretrattati con un *carrier* di ¹¹B. La scelta di una linea cellulare non tumorale è giustificata dal fatto che le cellule tumorali sono genomicamente instabili e presentano quindi di per sé un'elevata frequenza di alterazioni cromosomiche. Lo studio del danno indotto da radiazione sulla linea cellulare è reso possibile dalla tecnica di ibridazione e colorazione dei cromosomi mFISH che, come sarà approfondito nel lavoro di tesi, permette la visualizzazione e l'analisi delle aberrazioni sull'intero cariotipo. Rispetto alla tecnica FISH standard limitata alla colorazione di solo alcune coppie di cromosomi omologhi, la mFISH

permette una misura più accurata degli scambi di tipo complesso, che cioè coinvolgono simultaneamente più cromosomi e sono considerati un indicatore dell'esposizione a radiazione ad alto LET, quali le particelle α che dovrebbero essere prodotte dalla reazione p-¹¹B.

Il lavoro di tesi sarà strutturato in tre capitoli: nel primo si esploreranno i principali parametri biofisici legati al contesto adroterapico, oltre ad analizzare vantaggi e limitazioni della protonterapia e dell'utilizzo degli ioni carbonio rispetto alle terapie tradizionali. Il secondo capitolo sarà invece incentrato sullo stato dell'arte della PBFT e sull'esposizione del razionale dell'esperimento, con un approfondimento sull'importanza delle aberrazioni cromosomiche in quanto biomarcatori del danno complesso indotto da radiazione ionizzante. Nell'ultimo capitolo sarà infine approfondita la tecnica mFISH ed in generale la metodologia sperimentale, cui seguirà la discussione dei risultati ottenuti in fase di analisi.

1. Il razionale fisico e radiobiologico della protonterapia

1.1. I principali parametri biofisici nel contesto adroterapico

La ricerca di nuove tecniche radioterapiche che permettano di ottenere vantaggi nella cura dei tumori, sia in termini di efficacia radiobiologica che di riduzione del rischio di danneggiamento dei tessuti sani, ha portato negli ultimi decenni, accanto al progressivo perfezionamento delle terapie con fotoni ed elettroni, allo sviluppo dell'adroterapia, ovvero trattamenti radioterapici a base di fasci accelerati di particelle cariche. Come noto dalla fisica particellare, una radiazione corpuscolare che interagisce con la materia rilascia energia secondo la formula di Bethe-Bloch attraverso processi dipendenti sia dalla particella incidente che dal mezzo attraversato. Se si immagina "semplicisticamente" il tumore come un insieme di cellule che hanno perso la capacità di morire, l'obiettivo dell'adroterapia è sfruttare gli effetti delle ionizzazioni in modo da sviluppare una serie di danni mirati al DNA del sistema neoplastico e che, se mal riparati o non riparati affatto, possono indurre la morte cellulare.

Il parametro che definisce l'efficienza di una particolare radiazione è l'RBE (Relative Biological Effectiveness), ovvero l'efficienza con cui un determinato tipo di radiazione in esame induce un livello dato di effetto biologico rispetto ad una radiazione di riferimento. Questa è tipicamente rappresentata da raggi x a 250 kV o raggi γ emessi da ⁶⁰Co. In particolare, l'RBE è definito come il rapporto fra le dosi isoeffetto delle due radiazioni di cui sopra.

$$RBE = \frac{D_{reference}}{D_{test}} | isoeffect$$

Per meglio comprendere la definizione di RBE si può osservare la *Figura 1*, dove sono confrontate le curve di sopravvivenza cellulare per irraggiamenti effettuati con raggi x a 250 kV e con ioni carbonio a energie differenti. L'RBE relativo alla sopravvivenza cellulare residua del 10%, ad esempio, può essere ottenuto dal rapporto tra le dosi di raggi x e di ioni carbonio per cui si ottiene tale effetto.



Figura 1 Curve di sopravvivenza cellulare per irraggiamenti effettuati con raggi x a 250 kV e ioni carbonio a 11.0 e 266.4 MeV/amu.^[5]

La difficoltà principale nella determinazione dell'RBE sta nel fatto che i meccanismi biologici che lo influenzano sono molteplici e non tutti di facile interpretazione; una possibilità è esprimere l'efficacia della radiazione in dipendenza dal LET (Linear Energy Transfer), ovvero la densità di energia depositata lungo la traccia. Come si può dedurre dalla *Figura 1*, ed ancora meglio mostrato in *Figura 2*, si osserva sperimentalmente che a parità di dose l'RBE tende a crescere con il LET della radiazione. Per radiazioni il cui LET raggiunge valori oltre i 200 keV/µm, come gli ioni carbonio mostrati nell'immagine, si assiste però ad un rapido crollo dell'RBE a causa dell'effetto overkill.



Rappresentazione dell'RBE in funzione del LET associato alla radiazione di ioni carbonio. Fonte: Brita Singers Sorensen, Jens Overgaard & Niels Bassler: In vitro RBE-LET dependence for multiple particle types, Acta Oncologica, 50: 757–762 (2011).

Nonostante questa dipendenza dalla densità di eventi di ionizzazione lungo la traccia primaria, non è semplice determinare una relazione quantitativa che permetta di predirne l'RBE. Bisognerà tener conto del fatto che radiazioni differenti, al variare del LET, differiscono negli effetti e nelle tipologie di danno al genoma della cellula bersaglio sia quantitativamente che qualitativamente.^[1] In realtà, il LET è un parametro inadeguato perché non tiene conto della struttura di traccia dello ione; di conseguenza nella determinazione dell'RBE sarebbe opportuno analizzare gli effetti a livello micro e nanometrico della radiazione. I danni al DNA sono poi generati sia dalle ionizzazioni che avvengono direttamente sulla struttura del DNA stesso, sia da quelle che si verificano nell'ambiente intra o extra cellulare; inoltre l'entità del danno dipende fortemente dalla presenza dell'acqua, la cui radiolisi genera radicali liberi. La radiazione sparsamente ionizzante agisce prevalentemente tramite tale azione indiretta, mentre il contributo diretto diventa significativo al crescere del numero atomico della particella.

Le radiazioni ionizzanti, ed in particolare le particelle cariche, possono indurre un vasto range di lesioni alla struttura del DNA: rottura della singola elica (Single Strand Break – ssb), rottura della doppia elica (Double Strand Break – dsb), nonchè diversi tipi di danno alle basi azotate e agli zuccheri pentosi. Tra tutti questi, i dsb risultano essere le lesioni più importanti per gli effetti biologici associati al danno radiativo e sono generalmente dovuti a due ionizzazioni dirette sui due filamenti di DNA ad una distanza ragionevolmente piccola (entro 10-20 coppie di basi) o all'azione combinata di ionizzazioni dirette e di radicali liberi generati dalla ionizzazione stessa.

Una prova dell'importanza di questa tipologia di danno come biomarcatore viene data da uno studio che mette a confronto una serie di particelle di natura diversa^[2] (raggi X, protoni, neutroni e particelle α) coprenti un vasto range di LET fino al valore massimo delle particelle α di 100keV/µm. I dati relativi alla sopravvivenza cellulare dei tessuti irraggiati confermano il fatto che l'efficienza radiobiologica delle particelle ad alto LET è maggiore di quelle a basso LET, con un massimo in corrispondenza delle particelle α per le quali ad una dose di 2 Gy si raggiunge il 10% di sopravvivenza della popolazione cellulare esposta.

Quello che si osserva però nell'analisi dei dsb indotti dalle radiazioni, come mostrato in *Figura 3*, è che non vi è una corrispondenza diretta e univoca tra qualità

della radiazione (come espressa dal LET), numero di rotture della doppia elica e sopravvivenza cellulare.



Figura 3 Curve di sopravvivenza cellulare e numero di DSB indotti per diverse tipologie di radiazioni.^[2]

La differenza netta che si riscontra nelle percentuali di sopravvivenza della popolazione cellulare tra le diverse radiazioni non si rispecchia nel numero di dsb indotti. Il motivo principale per cui nonostante le differenze di LET il numero di dsb generati rimane pressoché costante è che, a parità di dose, si ha un bilanciamento tra il numero di particelle costituenti il fascio (che decresce con il LET) e la densità di ionizzazione. Si osservi quindi che, nonostante l'RBE associato all'induzione di dsb sia praticamente intorno all'unità per tutte le radiazioni, i danni generati da quelle a basso LET sono statisticamente molto meno letali per il sistema cellulare. Una possibile spiegazione viene data dal fatto che radiazioni diverse, al variare del LET, producono tipologie di danno differenti che vengono però rilevate in modo univoco come dsb.

A supporto di questa ipotesi ci sono diversi studi sui meccanismi di riparazione del DNA^[3] che evidenziano come i dsb indotti da radiazioni ad alto LET siano riparati con più difficoltà rispetto a quelli indotti da radiazioni a basso LET, lasciando quindi con maggiore frequenza frammenti e lesioni mal riparate o non riparate affatto (a ulteriore conferma della letalità dei dsb residui e quindi dell'importanza

di questa tipologia di danno come biomarcatore dell'efficacia radiobiologica di una radiazione). Il motivo di tali differenze è da ricercare nella natura della radiazione ad alto LET che comporta una maggiore densità di eventi di ionizzazione e di conseguenza un incremento della probabilità di generazione di danni complessi, cosiddetti "clustered", che richiedono dalle 2 alle 5 ionizzazioni nello spazio di pochi nm e sono estremamente difficili da riparare. Le radiazioni a basso LET, ad esempio i raggi X, generano un danno randomico facilmente riparabile; una radiazione densamente ionizzante produce invece una serie di eventi ravvicinati spazio-temporalmente lungo la propria traccia che portano al danneggiamento della doppia elica del DNA in più punti nello spazio di poche coppie di basi. In definitiva, quindi, sono la complessità del danno e la conseguente letalità cellulare ad aumentare con il LET della radiazione piuttosto che il numero medio di dsb: uno studio sulla simulazione della struttura di traccia di radiazioni ad alto LET^[3] ha dimostrato che oltre il 90% dei dsb causati da questa tipologia di radiazione sono associati ad altre tipologie di danno. Nonostante sia estremamente complesso effettuare una diretta misurazione in vivo di queste lesioni, le analisi effettuate su campioni di DNA isolati in vitro hanno mostrato che i dsb costituiscono solamente il 20% del danno totale causato da una radiazione ad alto LET; la restante parte sono lesioni secondarie che contribuiscono a rendere sempre più marcata la differenza di letalità rispetto al danno recato da radiazioni meno densamente ionizzanti.

I sistemi biologici mammiferi sono in generale caratterizzati da un efficiente sistema di riparazione del DNA, basato sul reclutamento di complessi enzimatici in grado di restituire integra la doppia elica attraverso una serie di processi la cui efficacia e durata differiscono a seconda della severità del danno stesso. Delle migliaia di cambiamenti casuali creati ogni giorno nel DNA di una cellula umana, alcuni dovuti ad errori intrinseci legati al processo di duplicazione, altri causati da variazioni del microambiente cellulare quali temperatura, pH, incidenti metabolici, ed altri dovuti ad agenti esogeni quali radiazioni ed esposizione ad agenti chimici, soltanto pochi si accumulano dando luogo a mutazioni nella sequenza del DNA: meno di un cambiamento accidentale su 1000 dà luogo a una mutazione permanente, il resto viene eliminato dai suddetti meccanismi di riparazione. In questo contesto, i cambiamenti conformazionali alla struttura del DNA causati dai

danni cluster e la conseguente modifica della morfologia dei binding sites hanno come effetto secondario il rallentamento dell'azione delle proteine di riparo.

Si è quindi compreso come l'RBE sia un parametro con una forte dipendenza da una moltitudine di variabili: non solo elementi strettamente collegati alla radiazione, ma anche parametri che descrivono il sistema "bersaglio" (come la radiosensibilità del tessuto irraggiato o eventuali fattori ambientali). In particolare, la radiosensibilità di un determinato tessuto viene parametrizzata attraverso le curve di sopravvivenza cellulare tramite la formula $S = exp(-\alpha D - \beta^2)$,^[4] dove S è la frazione di sopravvivenza, D la dose, mentre α e β sono i parametri che rappresentano rispettivamente la pendenza della curva iniziale e quella ad alte dosi. Proprio per il significato biofisico dei due parametri, il rapporto α/β descrive una misura della capacità di riparo del tessuto. Un valore molto grande di questo rapporto rispecchia una discrepanza elevata tra la pendenza iniziale e quella finale, evidenziando l'elevata radiosensibilità del tessuto. Viceversa, a valori più piccoli si associa una maggiore capacità di riparo delle cellule interessate, per le quali la letalità, e quindi la pendenza della curva di sopravvivenza, aumenta solo a dosi elevate. Infine, da un punto di vista clinico, tenendo conto che la valutazione dell'efficacia radiobiologica risulta fondamentale nella scelta del trattamento più consono da utilizzare in ambito adroterapico, un ulteriore aspetto da tenere in considerazione è la variazione locale dell'RBE sul volume irraggiato, che può essere dovuta sia alla non omogeneità dei tessuti irradiati e quindi alla variazione locale di sensibilità alla radiazione, sia ai fenomeni di scattering e broadening che coinvolgono la traccia particellare modificandone la distribuzione di dose.

1.2. Vantaggi e limitazioni della protonterapia

L'utilizzo dei fasci di fotoni come tecnica radioterapica prevista per la cura dei tumori presenta delle evidenti limitazioni, soprattutto in termini di precisione balistica, se paragonata all'impiego di particelle cariche. Ciò risulta evidente dal confronto tra le curve dose-profilo per radiazioni differenti: come si può osservare in *Figura 4*, i fotoni sono caratterizzati da un profilo di attenuazione dose-profondità continuo; ne consegue una grande difficoltà a localizzare il deposito di energia su di un determinato volume, aumentando quindi la probabilità in ambito clinico di coinvolgere i tessuti circostanti la zona tumorale. Di contro, il profilo dose-profilo di perdita energetica di un fascio di una determinata particella con energia iniziale media fissata ed è da interpretare come una media statistica delle curve delle singole particelle costituenti la radiazione, presenta un picco marcato associato alla possibilità di fornire un alto deposito energetico alla fine del range e di conseguenza localizzare il danno con maggiore precisione^{[4][5]}.



Confronto dei profili dose-profondità di fotoni, protoni e ioni carbonio.^[4]

I fasci di fotoni, inoltre, essendo radiazioni a basso LET, inducono una letalità cellulare molto minore rispetto alle particelle cariche pesanti: proprio per l'assenza di un picco nella curva di Bragg, l'unico modo per aumentare la densità di ionizzazione è aumentare il numero di fotoni, comportando così un sensibile aumento di dose ricevuta anche da tessuti sani ed eventuali organi a rischio. Un profilo più realistico delle curve dose-profondità dal punto di vista clinico è rappresentato dallo Spread Out Bragg Peak (SOBP): nell'irradiare un volume esteso si rende necessario utilizzare fasci accelerati ad energie differenti, in modo che

ognuno di essi raggiunga il "picco" ad una profondità diversa. Nella *Figura 5* si possono osservare i SOBP corrispondenti all'irraggiamento di un tumore localizzato ad una profondità di 15cm ed avente un'estensione di circa 5cm tramite fasci di protoni e di ioni ¹²C, dai cui profili risulta evidente il vantaggio in termini di precisione nell'utilizzo di particelle cariche, per le quali il deposito di dose si concentra nella parte medio-distale del SOBP.



Da un lato la necessità di ottenere un maggior controllo nel danno tumorale, dall'altra la ricerca di soluzioni che comportino una minor distribuzione di dose sul tessuto sano, ha quindi portato negli ultimi decenni ad uno sviluppo sempre più importante dell'adroterapia. Largo utilizzo è stato dato alle terapie a base di fasci accelerati di particelle cariche, in particolare protoni e ioni carbonio. Se da un punto di vista fisico la protonterapia costituisce un notevole miglioramento rispetto ai raggi X, i vantaggi negli aspetti prettamente biologici sono praticamente nulli. Gli studi sulle correlazioni tra RBE e LET per i fasci di protoni^[4] mostrano un aumento significativo dell'efficacia biologica solo negli ultimi micrometri del range, quando la dose tende a diminuire bruscamente dopo il picco del LET. Di conseguenza, per il SOBP viene assegnato un valore di 1.1 all'RBE dei protoni, che hanno quindi un'efficacia radiobiologica superiore del solo 10% rispetto a quella dei fotoni. La scelta della tipologia di particelle da utilizzare nel trattamento adroterapico va comunque valutata a seconda della situazione clinica generale. Considerando il fatto che l'RBE dipende fortemente dalla capacità di riparo del tessuto irraggiato, le valutazioni sulla terapia da seguire non vanno effettuate solamente sulla base della radiosensibilità della zona tumorale, ma tenendo conto anche di quella dei tessuti circostanti.

In ambito pediatrico o nel trattamento di tumori radiosensibili la protonterapia garantisce ottimi risultati uniti alla possibilità di risparmiare una grande quantità di dose al tessuto sano, riducendo notevolmente il rischio di sviluppo di tumori secondari. Un tumore radioresistente necessita invece di una maggiore quantità di eventi di ionizzazione e quindi di una radiazione ad alto LET che garantisca un RBE elevato, rendendo inadeguato l'utilizzo dei fasci di protoni. Una possibile soluzione ai limiti riscontrati nell'impiego della protonterapia nel trattamento di tumori radioresistenti, tale da coniugare la precisione balistica delle particelle ad un RBE maggiore di quello dei protoni, è rappresentata dall'utilizzo di ioni pesanti, in particolar modo ioni ¹²C. Le radiazioni composte da particelle di ioni carbonio sono radiazioni densamente ionizzanti in cui l'RBE aumenta in modo significativo in corrispondenza del picco di Bragg. Si noti inoltre che la curva di Bragg associata ai protoni (Figura 2) presenta una larghezza maggiore ed un picco meno marcato di quella associata agli ioni carbonio. Ciò è dovuto alla dispersione energetica (e quindi di range) risentita maggiormente dai protoni, più leggeri del carbonio, nell'interazione con i tessuti. Un altro importante vantaggio nell'utilizzo degli ioni carbonio rispetto alla protonterapia è legato allo scattering laterale. Lo scattering è un fenomeno i cui effetti interessano principalmente le radiazioni di particelle leggere: a causa del passaggio tra mezzi diversi e dell'interazione con target eterogenei all'interno del corpo umano, la radiazione, nel suo percorso, viene allargata a causa dei molteplici urti elastici con gli elettroni delle particelle incontrate. Il contributo totale di questi urti, pur essendo "piccolo" per la differenza di massa tra protoni ed elettroni, va considerato alla luce della precisione che si richiede nel contesto adroterapico. Gli effetti dello scattering laterale sono proporzionali a $Z_p/(A_p \times V_p)$: la diretta proporzionalità dal numero atomico permette di comprendere come un fascio di protoni subirà un allargamento decisamente superiore rispetto a quello di altre particelle più pesanti. Se paragonato al carbonio, ad esempio, il broadening dei protoni è di circa 3,5 volte superiore rispetto ad un fascio di ioni carbonio con lo stesso range (Un fattore 2 si origina dalla differenza di massa ed un fattore di circa 1,7 dalla minore energia dei protoni per lo stesso range ottenuta tramite le leggi di scala). Un ruolo importante quindi, oltre che la radiazione in sé, lo giocano anche i target con cui il fascio interagisce. In ambito adroterapico l'energia della radiazione entrante viene calcolata tenendo

conto del percorso del raggio centrale, ma poiché il corpo umano è costituito da un sistema non omogeneo di tessuti, lo scattering laterale ha come possibile effetto secondario l'interazione dei raggi più esterni con bersagli di natura diversa da quelli previsti. Tutto ciò comporta una variazione del range di parte del fascio ed un conseguente deposito di energia delocalizzato che rischia di danneggiare i tessuti sani. Per gli ioni carbonio l'effetto è tollerabile in quanto anche nei casi più importanti l'allargamento risulta essere di circa 2mm, mentre per i protoni è un problema di cui tenere conto e che può interferire con la precisione clinica richiesta. Nonostante l'elevata efficienza radiobiologica e la grande precisione balistica, anche l'utilizzo degli ioni carbonio presenta un fondamentale punto a suo sfavore (oltre all'alto costo di produzione legato alla necessità di accelerare particelle pesanti). La frammentazione degli ioni carbonio è infatti un processo secondario che accompagna la perdita energetica e che riguarda in generale le particelle particolarmente energiche^[6]: nell'interazione con la materia vengono generati ioni più leggeri che, avendo la stessa energia della particella madre, avranno un range maggiore e quindi proseguiranno il cammino creando una "dose tail" (osservabile nel caso del carbonio nella Figura 3). Il deposito energetico della dose tail avviene su target differenti da quello del fascio primario, comportando un sensibile aumento del rischio di coinvolgimento dei tessuti sani e quindi di sviluppo di tumori secondari. Poiché l'obiettivo della radioterapia è appunto garantire un'elevata efficacia nella cura tumorale risparmiando il più possibile i tessuti circostanti, il problema della frammentazione degli ioni carbonio è di primaria importanza in ambito clinico. Tema di questa tesi è la cosiddetta Proton-Boron Fusion Therapy, in cui si propone di sfruttare una reazione nucleare che genera particelle α a corto range. L'alto LET di queste particelle determinerebbe così un aumento dell'efficacia radiobiologica della protonterapia, senza presentare i rischi di frammentazione legati all'utilizzo degli ioni carbonio.

2. La Proton-Boron Fusion Therapy (PBFT)

2.1. Stato dell'arte e recenti sviluppi sperimentali

La possibilità di sfruttare delle reazioni nucleari come approccio binario per la cura dei tumori ha trovato la sua prima ideazione nel 1936 con la Neutron Capture Therapy (NCT)^[7]. La scoperta del neutrone, avvenuta nel 1932 per opera di James Chadwick, aveva dato il via ad una moltitudine di esperimenti riguardo la fissione nucleare. Il concetto alla base della NCT fu formulato dal fisico americano Gordon Lee Locher anni prima della reale disponibilità di sorgenti accessibili di neutroni termici necessari per la reazione, per cui la sperimentazione partì solo nel 1940, mentre per le prime applicazioni in ambito clinico si sarebbe dovuto aspettare fino al 1951. Nonostante ciò, le conoscenze acquisite riguardo il comportamento dei neutroni nell'interazione con la materia lasciavano ben sperare riguardo le potenzialità di questa nuova tipologia di radiazione corpuscolare. La NCT si fonda sulla possibilità di introdurre sul tessuto neoplastico piccole dosi di particelle altamente reattive con i neutroni in modo da innescare una reazione nucleare tale da generare prodotti densamente ionizzanti. Una possibilità è sfruttare l'utilizzo dell'isotopo del boro ¹⁰B, di per sé innocuo per il corpo umano, che dà luogo all'assorbimento di neutroni termici (E < 0.5 eV). Il nucleo eccitato ¹¹B formatosi nell'interazione decade producendo due ioni di bassa energia e quindi di elevato LET: una particella α ed uno ione ⁷Li³⁺. Il processo appena descritto è alla base della Boron-Neutron Capture Therapy (BNCT), i cui vantaggi derivano dalle caratteristiche dei prodotti di reazione. Essendo sia la particella α che lo ione litio particelle ad alto LET e di bassa energia (circa 1,5 MeV e 150 keV/ μ m per le α e 0,8 MeV e 175 keV/µm per il Li), queste depositano tutta la propria energia lungo una traccia estremamente breve (~4-9 µm), garantendo un'elevatissima densità di eventi ionizzanti nelle immediate vicinanze della loro produzione. Da un punto di vista clinico il problema principale legato alla BNCT risiede nell'elevata radioattività indotta derivante dal bombardamento di neutroni. Questo aspetto, unito all'altissima sezione d'urto del boro per il processo di assorbimento dei neutroni termici (3838 barn), fa sì che sia richiesta un'estrema selettività nel drogaggio dei tessuti, nel senso che è necessario che la reazione avvenga solo nelle cellule tumorali. Negli ultimi anni l'indagine sulle possibilità di un progressivo perfezionamento delle tecniche adroterapiche, in particolare della protonterapia, ha focalizzato l'attenzione sulle grandi potenzialità mediche della Proton-Boron Fusion Reaction. Tale reazione, schematizzata come $p + {}^{11}B \rightarrow 3\alpha$, può essere descritta come un processo a due stadi innescato dall'assorbimento di un protone da parte dell'isotopo ${}^{11}B$ e dalla conseguente formazione di un nucleo ${}^{12}C$ nello stato eccitato; la diseccitazione del carbonio genera una particella α ed uno ione ${}^{8}Be$ che a sua volta decade in altre due particelle α . La reazione, che ha un Q-valore positivo di 8,7MeV ed è quindi un processo esotermico spontaneo, ha una risonanza massima per basse energie del protone: l'apice della sezione d'urto (1,2 barn) si registra infatti in corrispondenza del valore di 675keV dell'energia del centro di massa del sistema^[8] (*Figura* 6).



Andamento sperimentale della sezione d'urto del processo di assorbimento dei protoni nella reazione p-¹¹B, in funzione dell'energia media dei protoni.^[8]

Il potenziale clinico di questa reazione ha quindi portato allo sviluppo della Proton-Boron Fusion Therapy (PBFT). Se paragonata alla BNCT, la PBFT presenta dei notevoli vantaggi sia in termini di energia liberata (3 particelle α invece di 1) che di riduzione del rischio di danneggiamento dei tessuti sani (assenza di radioattività indotta). Analogamente alla BNCT, la PBFT sfrutta la presenza di atomi di boro sull'area del tessuto in cui si vuole innescare la reazione, ma mentre la prima si basa sull'incorporazione del ¹⁰B, nella PBFT vengono impiegati isotopi ¹¹B. Come analizzato nel paragrafo 1.2, la curva dose-profondità dei protoni presenta un picco alla fine del range dove si concentra il massimo deposito di dose: drogando la zona del tessuto neoplastico con un *carrier* di ¹¹B e facendo in modo che questa ricada nel mid-SOBP della radiazione, la reazione che dovrebbe avvenire proprio nella parte medio-distale del SOBP porterebbe alla produzione di particelle a nella regione tumorale. Specificatamente, poiché nella parte mediodistale del SOBP ci sono protoni di bassa energia (essendo alla fine del range), ciò comporterebbe l'automatica selettività della reazione nelle sole cellule tumorali rispetto a quelle normali.^[8] Come già sottolineato, infatti, la sezione d'urto del processo aumenta sensibilmente per basse energie del fascio di protoni, ovvero in corrispondenza del picco di Bragg della curva dose-profondità. Le particelle a prodotte nella reazione presentano un ampio spettro di valori energetici centrato intorno ai 4MeV e con un LET di oltre 140keV/µm, oltre ad avere un range minore di 30µm (in ambiente acquoso) paragonabile con le dimensioni di un paio di nuclei cellulari. Nonostante gran parte di queste particelle vengano prodotte nel citoplasma a causa delle possibili variazioni nell'uptake delle sostanze usate per veicolare gli atomi di ¹¹B, le loro caratteristiche permettono comunque di ottenere un'elevata probabilità di raggiungere il nucleo, determinando così un drastico aumento del numero di danni di tipo clusterizzato indotti sul DNA delle cellule tumorali. Tenendo inoltre conto della precisione balistica ad appannaggio dei protoni, anche in presenza di piccole quantità di boro sul tessuto sano dovute alla non assoluta precisione del drogaggio il rischio di lesioni complesse rimarrebbe comunque minimo in quanto l'energia dei protoni non sarebbe sufficientemente bassa per innescare la reazione. Nonostante i vantaggi di questa tecnica siano stati esplorati e validati negli anni per mezzo di simulazioni Montecarlo^[9], le prime implementazioni in uno scenario preclinico risalgono al 2016 con i primi esperimenti di radiobiologia condotti dal laboratorio di Biofisica delle Radiazioni. Gli studi a riguardo sono stati incentrati sulle reali possibilità della PBFT di costituire un potenziamento dell'efficacia radiobiologica della protonterapia, eliminando allo stesso tempo il rischio di frammentazione associato all'utilizzo di ioni pesanti. In una serie di esperimenti effettuati presso i Laboratori Nazionali del Sud dell'Istituto Nazionale di Fisica Nucleare a Catania, utilizzando la linea di fascio del Centro di AdroTerapia ed Applicazioni Nucleari Avanzate (CATANA), è stato indagato l'ipotizzato aumento di letalità cellulare indotta dall'irraggiamento con un fascio clinico di protoni da 62 MeV in presenza di ¹¹B attraverso un saggio

clonogenico sulla linea cellulare del cancro alla prostata DU145.^[8] Le cellule sono state trattate tramite borocaptato di sodio (BSH), esaminando gli effetti di due concentrazioni di ¹¹B (40 e 80 ppm). Per il saggio clonogenico sono state utilizzate dosi di 0, 0.5, 1, 2, 3 e 4 Gy, mentre le cellule sono state disposte in modo da trovarsi nella posizione di mid-SOBP del fascio di protoni. I risultati sulla sopravvivenza cellulare (*Figura 7*) evidenziano un notevole aumento dell'efficacia radiobiologica nei campioni trattati con BSH, portando ad un Dose Modifying Factor (DMF) di 1.46 tra protonterapia e PBFT per la letalità cellulare. A conferma di questi risultati si possono osservare i parametri che descrivono le curve di sopravvivenza cellulare già trattate nel paragrafo 1.1.



Dai dati della *Tabella 1* si evince un aumento del parametro α descrivente la pendenza della curva di sopravvivenza per basse dosi, il cui valore addirittura raddoppia nei campioni trattati con il BSH. Ciò comporta, in linea con le aspettative, una sensibile diminuzione della capacità di riparo dei danni cellulari ed un conseguente aumento di letalità.

	α (Gy ⁻¹)	β (Gy ⁻²)
X ray irradiation	0.222 ± 0.062	0.064 ± 0.014
Proton irradiation in the absence of BSH	0.314 ± 0.022	0.035 ± 0.007
Proton irradiation with 40 ppm ¹¹ B	0.614 ± 0.069	_
Proton irradiation with 80 ppm ¹¹ B	0.705 ± 0.033	—

Tabella 1

Parametri delle curve di sopravvivenza cellulare associate a diverse radiazioni e concentrazioni di ${}^{11}B.{}^{[8]}$

In ambito clinico, l'aumento di RBE determinato dalla PBFT porta come conseguenza la possibilità di ridurre la quantità di dose totale da somministrare al paziente senza inficiare sull'efficacia generale del trattamento.

Per consolidare i risultati ottenuti nel test clonogenico e ad ulteriore prova del ruolo centrale della Proton-Boron Capture Reaction nel boost di efficacia in ambito terapeutico della PBFT, si è proceduto a irraggiare la stessa linea cellulare DU145 in corrispondenza di tre posizioni differenti del SOBP del fascio di protoni. In Figura 8 si possono confrontare i risultati dei test di letalità per l'irraggiamento in corrispondenza di diverse posizioni del SOBP: in entrance la reazione ha una bassa probabilità di avvenimento a causa delle alte energie dei protoni ed il confronto sulla letalità cellulare in questa posizione non restituisce quindi alcun DMF, con due andamenti in funzione della dose praticamente identici. Differenze sostanziali si osservano invece nelle due posizioni mid e distal del SOBP, dove è evidente la maggiore efficacia radiobiologica della radiazione sulle cellule trattate con BSH all'aumentare della profondità e quindi al decrescere dell'energia media dei protoni incidenti. Il risultato è in evidente accordo con l'andamento della sezione d'urto del processo di fusione tra protoni e boro in funzione dell'energia dei protoni, suggerendo che siano le particelle α (generate unicamente nel mid e distal SOBP) ad indurre più danni sul DNA cellulare.



Figura 8 Confronto tra le curve di sopravvivenza della protonterapia in assenza e in presenza di BSH, per diverse posizioni del SOBP.^[8]

2.2. Le aberrazioni cromosomiche e la tecnica mFISH come tool per investigare il danno complesso al DNA nella PBFT

Nel paragrafo 1.1 abbiamo esplorato l'importanza dei Double-Strand Break (dsb) come una delle principali lesioni radioindotte: come misurato dal test clonogenico, la mancata riparazione di tale danno può portare alla morte cellulare replicativa. Un'erronea riparazione dei dsb può, invece, risultare in riarrangiamenti ed alterazioni strutturali del DNA che diventano visibili e misurabili sotto forma di aberrazioni cromosomiche (CA). Queste possono, a loro volta, essere letali per la cellula oppure venire tramandate attraverso la divisione cellulare alle cellule figlie. Negli organismi eucarioti, al fine di semplificare il processo di replicazione, il DNA viene organizzato e compattato in cromosomi grazie all'utilizzo di complessi enzimatici specializzati nel ripiegamento della doppia elica a più livelli di complessità. Il genoma umano in particolare viene compattato in 46 cromosomi: 22 coppie di cromosomi autosomali più i due cromosomi sessuali. I cromosomi esistono in stati diversi durante la vita della cellula; in particolare, nelle fasi del ciclo cellulare in cui la cellula non si sta dividendo questi formano dei lunghi filamenti sottili e aggrovigliati nel nucleo. La duplicazione cellulare si divide in due grandi processi: interfase e metafase. Nella prima vengono duplicati i cromatidi fratelli per la formazione delle coppie di cromosomi omologhi; nella seconda i cromosomi si trovano compattati nella loro struttura caratteristica, disposti lungo l'asse del fuso mitotico e tirati verso le due cellule figlie attraverso delle strutture proteiche localizzate sul centromero. Nella Figura 9 possiamo osservare un'esemplificazione del processo di duplicazione per una cellula con due soli cromosomi.



Figura 9 Schematizzazione della replicazione del materiale genetico nell'interfase e nella metafase del ciclo cellulare.^[10]

La duplicazione cellulare, nonostante i numerosi check-point coinvolti nel controllo dei processi, non è da considerarsi in modo assoluto error-free e può indurre CA che rappresentano il livello di danno "*baseline*" per una determinata linea cellulare *in vitro*. I danni indotti da radiazioni ionizzanti si possono tradurre quindi in CA che aumentano l'instabilità genomica del sistema cellulare e di conseguenza la predisposizione all'insorgenza di tumori, nonché di determinate malattie genetiche^[10]. Storicamente, sono state studiate e classificate diverse configurazioni o tipologie di CA; quelle che saranno trattate nel lavoro di tesi si dividono in due categorie: scambi semplici e scambi complessi. I primi derivano dall'interazione tra due cromosomi recanti ognuno una singola rottura e si dividono in:

• Traslocazioni (*Figura 10a*): in cui un frammento acentrico di un cromosoma si ricombina con il frammento centrico dell'altro.

• Dicentrici (*Figura 10b*): quando si uniscono rispettivamente i frammenti centrici di due cromosomi.



Figura 10a Figura 10b Esempi di traslocazioni (10a) e dicentrici (10b) completi.

Le traslocazioni inoltre si definiscono complete se i frammenti centrici e acentrici dei cromosomi coinvolti nello scambio si ricombinano tra loro (come in *Figura 10a*). La definizione di completezza vale anche per i dicentrici nel caso in cui oltre ai frammenti centrici dei due cromosomi si uniscano anche quelli acentrici (come in *Figura 10b*). In generale negli scambi semplici completi non si ha perdita di materiale genetico, il che permette la conservazione e la trasmissione della mutazione alle cellule figlie aumentandone l'instabilità. Gli scambi complessi richiedono invece l'interazione di tre o più break cromosomici con il possibile coinvolgimento di più cromosomi. Una regola empirica classifica gli scambi cromosomici secondo il cosiddetto CAB (Chromosome, Arm, Break): si definisce complesso uno scambio con un CAB pari ad almeno 2, 2, 3, cioè che sia originato da due cromosomi i cui due bracci abbiano almeno tre rotture.^[11]

Agli scambi complessi è inoltre spesso accompagnata una perdita d'informazione legata al materiale genetico coinvolto nel danno. Esempi di questa tipologia di aberrazioni e dei possibili meccanismi alla base della loro determinazione possono essere osservati nelle *Figure 10c e 10d*.



Nel contesto delle aberrazioni cromosomiche complesse si aggiungono:

• Inserzioni (*Figura 10e*): in cui un frammento di un cromosoma si inserisce in un altro cromosoma.

• Ring (*Figura 10f*): che hanno origine nella rottura di un frammento su ciascun braccio dello stesso cromosoma e dal ricongiungimento delle due estremità.



Alle aberrazioni elencate si associano inoltre delezioni e frammenti (*Figura 10g*). Le prime sono originate dalla perdita di informazione legata ad una porzione del cromosoma, mentre i frammenti possono essere parti centriche o acentriche di cromosomi coinvolti in scambi complessi, oppure esistere in autonomia come porzioni di cromosomi non completamente ricombinati. Si parla inoltre di frammenti terminali qualora la porzione in questione sia all'estremità del cromosoma, interstiziali se invece compresa tra due rotture.



Terminale Interstiziale Figura 10g Esempi di frammenti terminali e interstiziali.

In generale, le CA possono essere utilizzate come biomarcatori dell'esposizione cellulare ad una radiazione ad alto LET. Essendo infatti un prodotto dell'erronea riparazione dei dsb, la loro complessità varia in funzione del LET della radiazione. Ad un aumento della densità di ionizzazione corrisponde un incremento della proporzione di scambi complessi che, nel caso della PBFT, indicherebbe il possibile danneggiamento dovuto all'intervento delle particelle α generate dalla reazione p-¹¹B. Lo studio delle aberrazioni radioindotte è reso possibile dalle tecniche di ibridazione FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) ed una sua variante, detta mFISH (multicolor-FISH). La trattazione verterà in particolar modo su quest'ultima che permette di visualizzare l'intero cariotipo, a differenza della FISH con cui vengono ibridati solamente i cromosomi 1 e 2 (con una conseguente sottostima del danno complesso indotto).

2.3. Razionale dell'esperimento

Nel paragrafo 2.1 si è osservato come la PBFT comporti, in linea di principio, dei notevoli vantaggi in ambito clinico rispetto alla protonterapia convenzionale, risultato evidenziato dalle differenze di sopravvivenza nei test clonogenici effettuati in presenza ed in assenza di BSH. Il lavoro di questa tesi verte sulla ricerca di una conferma dell'effettivo aumento di efficacia radiobiologica associata alla PBFT, attraverso l'analisi delle aberrazioni cromosomiche come biomarcatori del danno indotto da radiazione ionizzante. Esso si inserisce nell'ambito del progetto di ricerca NEPTUNE (Nuclear process-driven Enhancement of Proton Therapy UNravEled), finanziato dall'Istituto Nazionale di Fisica Nucleare (INFN). L'obiettivo dell'esperimento sarà inoltre verificare il ruolo centrale delle particelle α prodotte dalla proton-boron capture reaction che, in quanto radiazioni altamente ionizzanti, dovrebbero indurre prevalentemente danni clusterizzati e quindi una maggiore incidenza di CA di tipo complesso. Per il lavoro sono state utilizzate cellule dell'epitelio mammario della linea non tumorale (spontaneamente immortalizzata) denominata MCF10. L'utilizzo di una linea cellulare non tumorale piuttosto di una neoplastica è legato alla natura propria delle cellule tumorali: poiché tali cellule sono intrinsecamente instabili nel loro genoma, sarebbe molto complicato riuscire a distinguere le aberrazioni proprie (baseline) della cellula neoplastica da quelle indotte dalla radiazione. Gli irraggiamenti dei campioni sono stati effettuati tramite fasci di protoni a 62MeV utilizzati il trattamento di melanomi oculari e generati dal ciclotrone del Centro di AdroTerapia ed Applicazioni Nucleari Avanzate (CATANA) presso l'INFN-LNS a Catania. Questo lavoro di tesi è quindi consistito nell'analisi di campioni irradiati da dosi di 0.5 e 2 Gy nelle posizioni entrance e distal del SOBP. Il carrier impiegato per il deposito cellulare di ¹¹B è il BSH. Il motivo dell'analisi di campioni irraggiati nelle due posizioni di cui sopra risiede nel fatto che in entrance ci si aspetta un'equale induzione di danno da parte dei protoni, senza il contributo delle particelle α dal momento che la reazione p-¹¹B non dovrebbe avvenire, mentre tale contributo ci si aspetta sia massimo nella posizione distale, quindi a fine range.

3. Metodologia, Analisi dati e Risultati

3.1. Ibridazione dei vetrini

Le analisi delle aberrazioni indotte da radiazione sono state effettuate attraverso la tecnica mFISH: la mFISH sfrutta 5 fluorocromi distinti più il DAPI (6-diamidin-2-fenilindolo) utilizzato come contrastante aspecifico per la colorazione dei cromosomi. Le combinazioni dei 5 fluorocromi costituiscono 24 sonde differenti (Whole Chromosome Probes – WCP) utilizzate per marcare le 24 coppie di cromosomi (tenendo conto dei cromosomi sessuali X e Y per i quali avremo due sonde distinte)^[12]. Ogni fluorocromo sfrutta una sequenza nucleotidica complementare ad una porzione di DNA specifica per i cromosomi da marcare; in questo modo, ogni coppia di cromosomi omologhi sarà caratterizzata da una "colorazione. La mFISH è una tecnica particolarmente delicata e laboriosa: tra la preparazione delle linee cellulari, ibridazione, acquisizione ed analisi dei dati possono intercorrere anche diversi giorni.

Le cellule irraggiate a Catania sono state trasportate a Napoli e sottoposte ad un trattamento per indurre la condensazione del DNA sottoforma di cromosomi. In particolare, si è usato il processo chiamato Premature Chromosome Condensation (PCC) che viene effettuato tramite l'utilizzo di una sostanza chiamata calvculinA e che induce la condensazione dei cromosomi anche in cellule che non si trovano in metafase (ossia nelle fasi G1 e G2, mentre non funziona per quelle che si trovano nella fase di sintesi del DNA, o fase S) al fine di aumentare il numero di campioni analizzabili per dose e posizione lungo il SOBP. Infatti, se si utilizzassero solo le cellule propriamente in metafase (fase M) queste costituirebbero un campione piuttosto esiguo (la fase M infatti dura circa 1-2 h su un ciclo di circa 24h). La PCC risulta essere fondamentale anche nel contesto della stima del danno indotto da radiazione ionizzante, in modo particolare nel caso di alte dosi e/o alto LET. Se non venisse effettuata e si procedesse ad esaminare unicamente le cellule metafasiche naturalmente presenti del campione, la cui distribuzione nelle varie fasi del ciclo cellulare è asincrona, si avrebbe una sottostima del danno indotto poichè le cellule più gravemente danneggiate non avrebbero ancora raggiunto la metafase a causa

del rallentamento del ciclo cellulare dovuto agli effetti della radiazione. Una volta terminata l'induzione della condensazione cromosomica, i campioni cellulari vengono sottoposti ad un processo di harvesting che consiste in un trattamento con una soluzione ipotonica (KCl) ad una temperatura di 37°C per circa 20 minuti, seguita da una fase di fissaggio in una soluzione detta Carnoy's (Metanolo:Acido acetico 3:1). Segue quindi la procedura detta squash, in cui gocce della sospensione cellulare vengono depositate su vetrino da microscopia; occorre ora denaturare il DNA delle cellule così ottenute. La denaturazione viene effettuata tramite un bagno termico in una soluzione di una soluzione salina (SSC) a 70°C per 30 minuti; terminata la denaturazione, i vetrini vengono lasciati raffreddare a temperatura ambiente. Circa 5 minuti prima del termine del raffreddamento inizia la denaturazione delle sonde, lasciate a temperatura ambiente per circa 40 minuti e infine centrifugate (11µl per ogni fluorocromo per un coprivetrino di dimensione 24x24 mm): le sonde vengono incubate a 75°C per 5 minuti, poi messe su ghiaccio per pochi secondi prima di passarle al secondo bagno termico a 37°C per 30 minuti. Prima dell'applicazione delle sonde i vetrini vengono sottoposti ad immersione in diverse soluzioni e lasciati asciugare in posizione verticale per circa 20 minuti. Le sonde denaturate vengono quindi depositate sulle slides (10µl per un coprivetrino di dimensione 24x24mm), mentre la conseguente applicazione del coprivetrino serve a favorire la distribuzione dei fluorocromi ed evitarne l'evaporazione, nonché per l'osservazione al microscopio che si effettua utilizzando un obiettivo ad immersione in olio. I campioni vengono quindi incubati per 48 ore in ambiente umido a 37°C. Terminata l'incubazione vengono rimossi i coprivetrini e sciacquati i vetrini in due soluzioni detergenti con concentrazioni differenti di SSC a temperature diverse (la prima 72°C per 2 minuti, poi a temperatura ambiente per 30 secondi). Dopo un rapido passaggio in acqua distillata per evitare formazioni di cristalli, i vetrini vengono lasciati asciugare per circa 30 minuti a temperatura ambiente. L'ultimo passaggio è l'applicazione del DAPI, precedentemente prelevato dal freezer e lasciato a temperatura ambiente per circa 20 minuti. Una volta depositato il DAPI e riapplicati i coprivetrini, le slides vengono lasciate a temperatura ambiente per circa 30 minuti in modo da permettere al DAPI di agire. L'intero processo di ibridazione dei vetrini va effettuato evitando l'esposizione a fonti luminose che potrebbero danneggiare la fluorescenza delle sonde (quenching).

3.2. Acquisizione delle piastre PCC ed elaborazione delle immagini cromosomiche

L'osservazione e l'acquisizione dei vetrini sono state realizzate tramite un microscopio a fluorescenza semiautomatizzato supportato dal programma Metafer (versione 3.12.9), della MetaSystems (Germania). Metafer consente di effettuare diverse tipologie di analisi dati seguendo un protocollo che viene continuamente ottimizzato tramite un processo di "machine learning" per permettere di massimizzare la qualità di resa delle piastre cromosomiche (PCC). Una prima ricerca automatica delle PCC nella regione da scansionare viene effettuata dal modulo utilizzando un obiettivo 10X e selezionando manualmente l'area del vetrino su cui sono state distribuite le cellule. Determinata la regione di analisi e localizzate le PCC inizia la stabilizzazione del piano focale, in modo da velocizzare la successiva fase di cattura delle singole piastre cromosomiche. Il numero ideale di set da analizzare dipende sia dalla dose, e quindi dalla stima del numero minimo di cariotipi statisticamente significativi, che dalla metodologia di analisi. Nel caso della mFISH l'analisi dell'intero cariotipo risulta particolarmente laboriosa, per cui l'ideale sarebbe avere 100-150 PCC ricostruibili per vetrino. Terminata la cattura automatica delle piastre cromosomiche (Figura 11), effettuata sempre con l'obiettivo 10x tramite il modulo "MSearch", si selezionano manualmente quelle ritenute "accettabili" per qualità di resa e numero approssimativo di cromosomi contenuti nell'immagine (idealmente 46).



Figura 11 Cattura delle piastre cromosomiche in modalità MSearch utilizzando l'obiettivo 10x.

Passando ad un ingrandimento maggiore mediante un obiettivo 40X ad immersione in olio, in modalità "Autocapture" il microscopio si posiziona sulle singole PCC selezionate e aziona a cascata 6 filtri corrispondenti ai singoli fluorocromi per l'acquisizione delle immagini. È importante che il cambio tra un filtro e il successivo avvenga in modo tale da minimizzare gli spostamenti della lente lungo il piano del vetrino, al fine di ottenere delle immagini quanto più perfettamente sovrapponibili. Le immagini acquisite delle singole fluorescenze vengono rielaborate ed unite virtualmente in modo da produrre un'unica resa "pseudocolorata" dei cromosomi (*Figura 12*).



Figura 12 Rielaborazione virtuale delle immagini corrispondenti ai singoli fluorocromi acquisite a 40x.

La ricostruzione del cariotipo viene effettuata manualmente con l'ausilio di un programma legato a Metafer, detto Isis. Le acquisizioni a disposizione vengono quindi processate attraverso una serie di tool che permettono di migliorare la qualità delle immagini (selezione degli elementi della metafase da analizzare, correzione del background, riduzione del rumore di fondo, sovrapposizione ottimale delle catture dei singoli filtri ecc.). Un grande vantaggio nella ricostruzione del cariotipo tramite Isis, oltre a poter visualizzare e discernere le aberrazioni cromosomiche sulla base delle immagini acquisite per i singoli filtri (quindi tenendo conto di grandezza e forma dei cromosomi), è la possibilità di osservare l'intensità del segnale di ciascun fluorocromo su tutta la lunghezza del cromosoma (*Figura 13*), semplificando così il riconoscimento delle aberrazioni di natura complessa.



Figura 13 Rappresentazione dei segnali delle sonde sul cromosoma 12, marcato dai fluorocromi rosso e verde.

Un importante limite insito della mFISH, essendo una tecnica basata appunto sulla colorazione dei cromosomi, è la difficoltà nel riconoscere le aberrazioni intracromosomiche o gli scambi che avvengono tra cromosomi omologhi.

In *Figura 14* vi è un esempio della ricostruzione di un cariotipo relativo ad un campione cellulare irraggiato in presenza di BSH con una dose di 2 Gy in posizione entrance del SOBP: si osserva sul cromosoma 9 una traslocazione incompleta del cromosoma 12 ed un'aberrazione *baseline* che coinvolge un frammento del cromosoma 15, entrambe visualizzabili dal segnale delle sonde in *Figura 15*.



Figura 14

Ricostruzione del cariotipo tramite il programma Isis: nell'immagine è rappresentato il cariotipo di un campione irraggiato da una dose di 2 Gy sull'entrance del SOBP ed in presenza di BSH.





Visualizzazione delle aberrazioni sul cromosoma 9 attraverso i segnali delle sonde. Nella porzione finale si osserva la traslocazione incompleta del cromosoma 12, mentre i segnali viola e rosso nella parte iniziale del cromosoma 9 sono associati ad un'aberrazione baseline che coinvolge il cromosoma 15 della linea cellulare.

3.3. Analisi dati e discussione

I dati presentati nel lavoro di tesi riguardano l'acquisizione e la ricostruzione dei cariotipi di dieci vetrini che differiscono fra loro per dose ricevuta e posizione del target biologico lungo il SOBP del fascio di protoni, relativi ad un turno di misura effettuato a LNS-INFN. Specificatamente sono stati analizzati campioni esposti in entrance e sulla parte distale del SOBP (distal), irraggiati con dosi pari a 0,5 e 2 Gy. Per ogni combinazione dose-posizione è stato effettuato un confronto tra campioni trattati con BSH prima dell'irraggiamento ed altri sottoposti a semplice protonterapia. Nel corso della trattazione le aberrazioni cromosomiche saranno differenziate in scambi semplici (comprendenti traslocazioni e dicentrici) e scambi complessi (per i quali si è tenuto conto anche dei ring); non saranno invece presi in considerazione frammenti ed eventuali aberrazioni numeriche. Le frequenze rappresentate nei grafici sono state calcolate mediando il numero di aberrazioni N registrate sul numero di cariotipi analizzati K (freq = N/K), mentre gli errori sono stati calcolati come $\sigma_{freg} = \sqrt{N}/K$. Infine, gli errori sugli scambi totali, che comprendono scambi semplici, complessi e ring, sono stati calcolati come la radice della somma in quadratura dei singoli errori.

In prima analisi si è verificato che le concentrazioni di atomi di ¹¹B presenti nei campioni cellulari (il punto di lavoro è di 80 ppm) non determinassero di per sé eventuali danni al genoma. I risultati ottenuti nell'analisi dei due campioni non irraggiati ma utilizzati per il controllo dell'eventuale citotossicità del BSH non hanno evidenziato variazioni nella frequenza di aberrazioni in presenza del *carrier*: oltre alle aberrazioni *baseline* della linea cellulare, sia in presenza che in assenza del BSH è stata infatti rilevata una frequenza media di 0,01 scambi semplici per cariotipo, mentre non risultano affatto aberrazioni complesse in entrambi i campioni.

Una prima analisi dell'induzione di aberrazioni nei campioni irraggiati in presenza o assenza di BSH è mostrata nei due grafici riportati in *Figura 9*, che si riferiscono alle frequenze registrate di scambi semplici (a sinistra) e a quelle di scambi complessi (a destra).



Rappresentazioni delle frequenze di aberrazioni. Nell'immagine a sinistra sono raffigurati gli scambi semplici (traslocazioni e dicentrici), in quella a destra i complessi (ring inclusi).

Per quanto riguarda gli scambi semplici, nei vetrini irradiati alla dose più bassa delle due usate, ovvero 0,5 Gy, non si osservano differenze significative nell'induzione di aberrazioni tra le due posizioni del SOBP; tuttavia, dal confronto tra cellule irraggiate e trattate con BSH e quelle non trattate con BSH si rileva un aumento del danno indotto sul distal nel campione trattato con il carrier di boro, mentre in entrance le frequenze sono uguali entro gli errori sperimentali. Come era lecito attendersi, più marcata è invece la frequenza di scambi misurata, sia in entrance che sul distal, in corrispondenza della dose di 2 Gy. In particolare, dal confronto tra BSH e non BSH sul distal emerge un incremento dell'11% degli scambi semplici in presenza del carrier, mentre in entrance la frequenza di aberrazioni sul campione trattato con BSH è consistente con quella ottenuta in assenza di BSH. Da notare che, indipendentemente dalla presenza del BSH, si assiste ad un aumento degli scambi semplici sul distal, dove rispetto alla posizione di entrance si ha una crescita nella frequenza delle aberrazioni pari al 42% in presenza del BSH e al 32% in assenza di esso. Ciò è in linea con il fatto che il LET della radiazione di protoni nella parte distale può arrivare anche a superare i 10 keV/µm rispetto ai 2-3 che si regsitrano in ingresso.

Di primaria importanza nella validazione della PBFT è invece l'analisi degli scambi complessi poiché una loro eventuale preponderanza nei campioni trattati con il boro supporterebbe l'ipotesi di un aumento dell'efficacia biologica dei protoni a seguito dell'emissione della particelle alfa nella reazione p-¹¹B.

Osservando l'immagine a destra nella *Figura 9*, a 0,5 Gy è da sottolinerare la comparsa sul distal di scambi complessi, assenti invece nella posizione di entrance, con una maggiore induzione in corrispondenza del campione trattato con il BSH (nonstante la differenza non appaia statiticamente rilevante). Ben diversa è invece la situazione osservata a 2 Gy: oltre alla crescita generale della frequenza di danno cromosomico di tipo complesso dovuta all'incremento di dose, si rileva sul distal del campione trattato con il BSH un netto aumento di aberrazioni rispetto alla posizione di entrance. Per quest'ultima posizione, come nel caso degli scambi semplici, la differenza fra il campione trattato con boro e quello non trattato non è significativa.

Come già esposto nei primi due capitoli, i danni di tipo clusterizzato e le aberrazioni complesse che ne derivano sono un chiaro indicatore dell'azione di una radiazione ad alto LET. Per valutare se l'incremento di scambi complessi registrati sia randomico o legato effettivamente all'andamento della sezione d'urto della protonboron fusion reaction e alla conseguente produzione delle particelle α , è utilire esaminare l'andamento della frequenza degli scambi complessi misurati nei campioni nelle due posizioni del SOBP (*Figura 10*), rivolgendo l'attenzione in particolar modo ai risultati ottenuti in funzione della presenza del BSH in corrispondenza dei 2 Gy di dose.



Figura 10

Confronto delle frequenze di aberrazioni complesse in presenza ed in assenza di BSH. A sinistra vengono rappresentate le aberrazioni in entrance, nell'immagine a destra quelle sul distal.

In entrance gli scambi complessi nel campione trattato con BSH non differiscono significativamente da quelli misurati nel campione irraggiato senza BSH: questo risultato confermerebbe che la reazione non stia avvenendo e che quindi tali scambi complessi siano prodotti dal solo fascio primario di protoni. Come ci si aspetta dalla sezione d'urto della reazione che è massima per basse energie dei protoni e quindi alla fine del range, è sul distal che la differenza si fa più netta: nel campione trattato con BSH si osserva un aumento significativo di scambi complessi pari al 57% in più rispetto al campione "non BSH", con una frequenza di aberrazioni 2,5 volte superiore alla frequenza ottenuta in entrance in presenza del *carrier*.

Infine, in *Figura 11* sono rappresentate le frequenze delle aberrazioni totali registrate nell'analisi dei campioni irradiati. Focalizzando l'attenzione sui risultati ottenuti in corrispondenza della dose terapeutica di 2 Gy, si osserva sul campione trattato con il BSH un aumento del 17% del danno totale indotto sul distal rispetto alla frequenza ottenuta sul campione senza BSH, mentre in entrance si assiste ad un aumento di circa il 7%. Sebbene l'aumento sul danno totale non sembri così elevato, bisogna ricordare che il principale contributo statistico nel conto aberrazioni totali è dato dagli scambi semplici (dalle 4 alle 6 volte numericamente superiori rispetto ai complessi) la cui frequenza come abbiamo potuto osservare non varia di molto in funzione della presenza del BSH. Questi risultati sembrano quindi confermare che la presenza del boro aumenti la capacità dei protoni di danneggiare il DNA e che tale danno sia arrecato dalle particelle α ad alto LET generate dalla reazione di fusione p-¹¹B.



Figura 11 Confronto delle frequenze di aberrazioni totali (scambi semplici + complessi + ring).

Conclusioni

Lo scopo del presente lavoro di tesi era la validazione della reazione fra protoni e atomi di ¹¹B come strategia per il potenziamento dell'efficacia biologica della protonterapia (Proton-Boron Fusion Therapy, PBFT) attraverso un saggio che permette di quantificare le aberrazioni cromosomiche radiondotte. Queste rappresentano un biomarcatore del danno indotto da radiazione ionizzante particolarmente sensibile alla qualità della radiazione, ossia alla variazione del LET. In particolare è stata impiegata una tecnica, nota come multicolor(m)-FISH, che consente la ricostruzione dei cariotipi delle cellule irraggiate nelle varie configurazioni. L'esperimento i cui dati sono stati analizzati e discussi aveva utilizzato una linea cellulare non tumorale MCF10 ed era stato realizzato presso i LNS-INFN di Catania da parte del Laboratorio di Biofisica delle Radiazioni del Dipartimento di Fisica "E. Pancini" dell'Università Federico II di Napoli. Per dimostrare che la reazione aumenti effettivamente l'efficacia biologica dei protoni sono stati analizzati campioni esposti a due dosi di radiazioni (0,5 e 2 Gy) in due posizioni dello Spread Out Bragg Peak (SOBP) del fascio terapeutico usato, cioè in entrance e sul distal. I risultati sembrano evidenziare il ruolo centrale della protonboron fusion reaction nell'incremento della frequenza di aberrazioni complesse registrata sui campioni pre-trattati con il BSH. In linea con la curva dose-profondità del fascio di protoni e con l'andamento della sezione d'urto della reazione p-¹¹B, che è massima per un'energia dei protoni di circa 700 keV, l'analisi delle aberrazioni ha infatti evidenziato un aumento significativo, unicamente sulla parte distale del SOBP, della frequenza totale di scambi cromosomici sui campioni irraggiati e trattati con BSH rispetto a quelli irraggiati in assenza di boro. Inoltre, se davvero tale incremento di efficacia radiobiologica dei protoni incidenti è dovuto alla reazione p-¹¹B, allora ci si aspetta una preponderanza di scambi di tipo complesso nei campioni trattati con il BSH poiché questi sono strettamente correlati con l'erronea riparazione dei danni clusterizzati al DNA cellulare indotti, a loro volta, prevalentemente da radiazioni densamente ionizzanti. Le particelle alfa emesse dalla reazione p-¹¹B hanno un LET stimato nell'ordine dei 140 keV/µm, rispetto ai 2-3 keV/µm dei protoni in entrance e dei circa 10-15 keV/µm sul distal. Dallo scoring effettuato sui campioni irradiati nella posizione di distal con una dose

di 2 Gy (il tipico valore di dose per frazione in radioterapia) si rileva un importante incremento nella frequenza di aberrazioni complesse in presenza del BSH. Tale incremento, nel contesto della PBFT, è quindi indice dell'azione delle particelle α ad alto LET prodotte dalla reazione di fusione la cui sezione d'urto è massima alla fine del range del fascio di protoni.

In definitiva, i risultati emersi dal lavoro di tesi supportano quindi la PBFT in quanto terapia capace di potenziare l'RBE della protonterapia senza rinunciare all'elevata precisione balistica caratteristica dei fasci di protoni. Tenendo conto che nel contesto protonterapico gli irraggiamenti sono effettuati in modo da far ricadere il target neoplastico nel mid-SOBP della radiazione, dove in presenza degli atomi di ¹¹B si concentra la produzione delle particelle α densamente ionizzanti e a corto range, si riuscirebbe a confinare l'accumulo di danno complesso e il conseguente aumento di efficacia radiobiologica unicamente sul tessuto tumorale.

Esperimenti più recenti stanno implementando l'utilizzo, come *carrier* del ¹¹B, del BPA (Bisfenolo A) che sembra avere un maggior potere penetrativo della membrana cellulare e quindi un miglior uptake rispetto al BSH, con un atteso vantaggio in termini di efficacia radiobiologica. Inoltre, presso il Laboratorio di Biofisica delle Radiazioni si stanno esaminando, in aggiunta alle aberrazioni cromosomiche, anche altri saggi capaci di evidenziare danno al DNA di tipo complesso, tra cui il cosiddetto saggio dell'istone fosforilato γ -H2aX, in cui complessi proteici specifici co-localizzano sui siti delle rotture della doppia elica del DNA e possono essere rivelati mediante microscopia a fluorescenza.

Bibliografia

- 1. Dudley T. Goodhead, *Mechanisms for the Biological Effectiveness of High-LET Radiations*, J. RADIAT. RES., 40: SUPPL., 1–13 (1999).
- 2. K. M. Prise, *Use of radiation quality as a probe for DNA lesion complexity*, INT. J. RADIAT. BIOL., 1994, VOL. 65, NO. 1, 43-48.
- 3. Aroumougame Asaithamby and David J. Chen, *Mechanism of Cluster DNA* Damage Repair in Response to High-Atomic Number and Energy Particles Radiation, Mutat Res. 2011 June 3; 711(1-2): 87–99.
- 4. Uli Weber and Gerhard Kraft, *Comparison of carbon ions versus protons*, in THE CANCER JOURNAL, JANUARY 2009.
- 5. W. K. Weyrather, J. Debus, *Particle Beams for Cancer Therapy*, Clinical Oncology (2003) 15: S23–S28.
- 6. E. Haettner, H. Iwase and D. Schardt, *Experimental fragmentation studies with C12 therapy beams*, Radiation Protection Dosimetry (2006), Vol. 122, No. 1–4, pp. 485–487.
- 7. C. Salt et al, *Boron and gadolinium neutron capture therapy*, Russian Chemical Bulletin, International Edition, Vol. 53, No. 9, pp. 1871—1888, September 2004.
- 8. G. A. P. Cirrone, L. Manti et al, *First experimental proof of Proton Boron Capture Therapy (PBCT) to enhance protontherapy effectiveness*, Scientific Reports, January 2018.
- 9. Do-Kun Yoon, Joo-Young Jung, and Tae Suk Suh, *Application of proton boron fusion reaction to radiation therapy: A MonteCarlo simulation study*, APPLIED PHYSICS LETTERS 105, 223507 (2014).
- **10.** Bruce Alberts et al, *Biologia molecolare della cellula*, Zanichelli Quinta edizione, Cap. 4.
- **11.** Michael N. Cornforth, *Analyzing Radiation-Induced Complex Chromosome Rearrangements by Combinatorial Painting*, Radiation Research 155, 643-659 (2001).
- Rhona Anderson, *Multiplex Fluorescence in situ Hybridization* (MFISH), Fluorence in situ Hybridization (FISH): Protocols and Applications, Methods in Molecular Biology vol. 659, Joanna M. Bridger and Emanuela V. Volpi (eds.).