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

IL SAGGIO DEI MICRONUCLEI PER INVESTIGARE I MECCANISMI ALLA BASE DELLA PROTON-BORON CAPTURE THERAPY (PBCT) IN CELLULE UMANE ESPOSTE AL FASCIO TERAPEUTICO DEL CNAO

Relatore: Prof. Lorenzo Manti

Jours Wanti

Candidato: Daniele Manzi Matricola: N85001211

A.A. 2020/2021

Indice

1 La Proton-Boron Capture Therapy (PBCT)	4
1.1 Principali danni radioindotti al DNA	4
1.1.1 Qualità della radiazione e DNA damage clustering	7
1.1.2 Il cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay	8
1.2 Gli effetti extra bersaglio: il radiation-induced bystander effect	9
1.3 Radioterapia e adroterapia	11
1.4 Protonterapia	15
1.5 La reazione fra protoni e boro per aumentare l'efficacia della protonterapia	16
1.5.1 Questioni aperte	19
2 Metodologia	20
2.1 Il saggio del micronuclei	20
2.2 Procedura sperimentale	22
3 Risultati	25
3.1 Irraggiamento diretto	25
3.2 Effetto bystander	31
3.3 Conclusioni	35
Bibliografia	37

Introduzione

Lo scopo principale della radioterapia (RT) è curare i tumori utilizzando la radiazione ionizzante (RI), cercando al tempo stesso di ridurre al minimo i danni collaterali ai tessuti sani o organi a rischio che risultano inevitabilmente esposti.

Circa il 50% di tutti i pazienti oncologici sono sottoposti a ad una qualche forma di RT. La RT convenzionale impiega fotoni ed elettroni, resta il principale trattamento usato e, grazie al progresso tecnologico, ha raggiunto notevoli livelli di precisione ed affidabilità nei cosiddetti treatment plans, in cui appunto il profilo di dose viene calcolato accuratamente in modo da delimitare con precisione il volume tumorale.

Tuttavia, negli anni sono stati sviluppati anche altre modalità di trattamenti radioterapici, tra cui l'adroterapia. Essa consente in linea di principio di ridurre la dose ai tessuti sani e in molti casi si è dimostrata più efficace nel trattamento di tumori spesso inoperabili o resistenti ai tradizionali trattamenti radioterapici, tanto che, dal 2017, è entrata a far parte dei Livelli Essenziali di Assistenza del Sistema Sanitario Nazionale. A differenza della radioterapia tradizionale, l'adroterapia impiega. al momento, fasci accelerati di protoni e ioni carbonio (12C), anche se altre particelle sono oggetto di considerazione, quali ioni litio o ossigeno. Questa tecnica si sta diffondendo grazie ai vantaggi dovuti alle caratteristiche dell'interazione fisica fra tali particelle cariche e la materia. Infatti, il principale vantaggio dell'adroterapia risiede nel profilo invertito di profondità-dose descritto dalla curva di Bragg, il quale garantisce che la maggior parte della dose venga depositata verso la fine del range dello ione, risultando così in un minor deposito di dose assoluta al tessuto sano. In ambito clinico, modulando le energie di più fasci monocromatici, il cosiddetto picco di Bragg, poi, può essere allargato per conformare la regione di massimo deposito energetico al volume tumorale (Spread-Out Bragg Peak, o SOBP). Quindi, uno dei vantaggi principali dei protoni e degli ioni carbonio è la maggiore precisione balistica rispetto ai fotoni. Il razionale dell'uso di fasci di ioni carbonio rispetto ai protoni, poi, è dettato squisitamente da considerazioni radiobiologiche. Nel caso dei protoni, alle energie necessarie in adroterapia (fino a 230 MeV), la loro efficacia nel causare danni letali alle cellule neoplastiche è di poco superiore a quella esibita dai fotoni e dagli elettroni e ciò li rende poco efficaci nella lotta ai tumori solidi radioresistenti. Infatti, ad essi si associa un RBE (Relative Biological Effectiveness), pari a 1,1: l'RBE è il rapporto tra la dose di un tipo di radiazione ionizzante con quelle di una radiazione di riferimento, tipicamente i fotoni, per indurre un certo livello di uno specifico effetto.

Gli ioni carbonio, invece, presentano in ambito clinico un RBE fino a circa 3. Ne segue che gli ioni carbonio sono considerati più efficaci nel caso di tumori radioresistenti. Essi tuttavia presentano sia complicazioni radiobiologiche che economiche: quelle radiobiologiche sono dovute fenomeni di frammentazione nucleare, i quali causano un rilascio di energia anche nelle regioni sane successive al tumore. Quelle economiche sono legate invece, al fatto che i costi di costruzione e mantenimento delle strutture adatte all'adroterapia con ioni carbonio, sono circa il doppio di quelli dei centri di protonterapia. Perciò la ricerca si è concentrata enormemente sullo sviluppo di modi per aumentare l'efficacia radioterapica dei protoni. È nato così il progetto della Proton-Boron Capture Therapy (PBCT), in cui si propone di utilizzare la reazione di fusione nucleare tra protoni e ¹¹B per generare particelle α che danneggiano gravemente il DNA. Sull'argomento sono stati eseguiti alcuni studi, con l'obiettivo di verificare l'efficacia della PBCT. I primi risultati sono stati positivi, poiché hanno dimostrato una diminuzione del tasso di sopravvivenza cellulare, ma hanno anche fatto nascere dubbi ed interrogativi. Si è notato ad esempio, una discrepanza tra il numero di particelle α previste e quello ricavato dall'aumento dell'RBE. Un altro dubbio è legato ai danni subiti dalle cellule non colpite, poiché, nonostante la reazione non avvenga a causa di un'energia dei protoni non adatta, non sono note le conseguenze sull'effetto bystander, a causa del quale anche cellule non irraggiate, ma a contatto con quelle bersagliate, subiscono danni al DNA per cui si è ipotizzato che queste conseguenze siano collegate alla problematica precedente. Nell'ambito di questo progetto, questo lavoro di tesi si concentra sulla verifica dell'efficacia radiobiologica della PBCT ed ai possibili meccanismi in gioco, ossia il succitato bystander effect, grazie all'analisi dei micronuclei, i piccoli nuclei che si formano ogni volta che un cromosoma non è incorporato in uno dei nuclei figli durante la divisione cellulare, in due linee cellulari irraggiate presso il CNAO (Centro Nazionale di Adroterapia Oncologica), in presenza di portatori di ¹¹B, attraverso il saggio dei micronuclei un test che tramite sonde e microscopi a fluorescenza permettere di osservare i micronuclei. Da quanto presentato, dunque si evince che la tesi sull' argomento scelto, si divide in tre capitoli. Nel primo si illustra, seppure brevemente, il tema della PBCT, l'effetto bystander e i primi risultati sperimentali ottenuti sull'incremento dell'efficacia radiobiologica dei protoni terapeutici. Nel secondo sono esposte nello specifico le metodologie adottate e i risultati ottenuti: in particolare, si descrive il saggio dei micronuclei adottato per la rilevazione dei danni al DNA e la metodica riferita all'irraggiamento diretto e a quella utilizzata per studiare il ruolo del bystander effect (medium-transfer experiment). Infine, nel terzo capitolo, sono illustrati e discussi i risultai dell'analisi dei dati sperimentali. Seguono le Conclusioni.

Capitolo 1

1 Proton-Boron Capture Therapy (PBCT)

1.1 Principali danni radioindotti al DNA.

Non è possibile argomentare sui principali danni radioindotti al DNA se prima, seppure brevemente, non si fornisce una panoramica su cosa sia il DNA e sulla sua importanza biologica.

In tutti gli esseri viventi è presente il DNA (o acido desossiribonucleico); nelle cellule eucariote, esso si trova nel nucleo della cellula ed è composto da 3•10⁹ unità di base, dette nucleotidi (Fig.1). In esso ci sono le informazioni che si trasmettono da una generazione all'altra. Il DNA, quindi, è non solo l'impronta genetica che identifica ogni individuo ma contiene anche le istruzioni necessarie per la sintesi dell'RNA e quindi delle proteine, che sono fondamentali per la vita della cellula.

La molecola di DNA è costituita da due filamenti di acido nucleico tenuti insieme dalle basi azotate. I monomeri che formano i filamenti sono chiamati nucleotidi; ogni nucleotide è costituito da un gruppo fosfato, uno zucchero pentoso (il desossiribosio) e una base azotata che si lega al desossiribosio con un legame N-glicosidico.

Le basi azotate sono 4: Timina, Guanina, Adenina e Citosina.



Figura 1: struttura del DNA e delle basi azotate

Acido Desossiribonucleico

Esse si legano tra di loro seguendo la regola di complementarietà formando legami a idrogeno tra le basi Guanina-Citosina (G-C) e Adenina-Timina (A-T). Da quanto detto sopra, si comprende come il mantenimento dell'integrità del DNA sia fondamentale affinché il patrimonio genetico sia trasmesso fedelmente alle cellule figlie.

Il DNA però può essere danneggiato da varie fonti, ed in particolare è il bersaglio per eccellenza delle radiazioni ionizzanti (RI). Ciò perché, essendo come macromolecola presente in unica copia, ogni alterazione può avere gravi conseguenze per la vita della cellula. Il danno al DNA può essere diviso in due categorie: esogeno (quando il danno è causato appunto da fattori esterni, quali le RI); endogeno (quando il danno è causato da radicali liberi o da problemi di replicazione del DNA).

Le RI possono avere origine naturale oppure essere prodotte artificialmente. Alla prima categoria appartengono ad esempio i raggi cosmici [1] o le particelle alfa prodotte dal decadimento del gas radon[2]. Queste contribuiscono al fondo di esposizione naturale. Alla seconda categoria appartengono invece le radiazioni prodotte da tubi radiogeni o acceleratori di particelle. Queste sono usate ampiamente in diagnostica o terapia.

Le RI interagiscono con il DNA con modalità diverse che si possono raggruppare in due macro-categorie: le azioni dirette e quelle indirette. Le prime consistono nella deposizione di energia direttamente sulla molecola di DNA. Questo è il processo predominante nel caso di particelle cariche, il cui contributo aumenta con lo Z della particella.

Le azioni indirette, tipiche dei fotoni usati nella radioterapia convenzionale, incidono invece sul DNA grazie ai radicali liberi, quali ad esempio le specie reattive dell'ossigeno, che danneggiano a loro volta il DNA (Fig.2).



Figura 2: L'azione delle radiazioni ionizzanti

Le RI possono avere dunque diversi effetti negativi sia a livello cellulare che di organismo, tra cui i più importanti, e meglio studiati, sono: la morte cellulare e la carcinogenesi, entrambi causati da differenti tipi di danni al DNA. I danni possono variare sia per complessità e gravità, ma anche per quantità, in funzione del tipo di radiazione e della dose assorbita. Tra i danni radioindotti più comuni figurano: il danno alle basi; il danno agli zuccheri; la singola rottura della doppia elica (SSB o *Single-Strand Break*). Possono insorgere anche doppie rotture dell'elica di DNA (DSB o *Double-Strand Break*) [3] (Fig.3).

Il danno radioindotto alle basi azotate del DNA deriva dalla rottura dei legami a idrogeno tra basi complementari, e provoca alterazioni nella struttura chimica del DNA. I SSB sono facilmente riparati dalla cellula mediante diversi meccanismi, come detto in seguito. Ben più gravi e complessi invece sono i DBS. Esse variano per complessità e dimensioni essendo legate sia alla distanza tra le rotture e sia alle basi colpite.

La cellula fortunatamente possiede due principali meccanismi per riparare i DSB: l'*Homologous Recombination Repair* (HRR), che richiede un filamento di DNA non danneggiato avente sequenza nucleotidica identica a quella del filamento danneggiato, che viene usato come stampo nel processo, e il processo noto come *Non-Homologous End-Joining* (NHEJ).

Questi due processi non sono ugualmente efficaci; infatti se la HRR viene effettuata correttamente è un procedimento libero da errori perché si tratta della copia dell'informazione da un filamento con sequenza nucleotidica omologa.

La NHEJ, invece, è un metodo propenso alle creazioni di errori in quanto la cellula riunisce le due estremità della rottura in assenza di una sequenza che possa fungere da stampo. Infatti, può esserci una perdita di sequenza durante questo processo ed è alla base di molte lesioni pre-mutagene [4]. Se ben riparate, si ha la formazione di due coppie di filamenti integri; in ogni altro caso, invece, le doppie rotture del filamento, se non riparate, portano quasi sicuramente alla morte cellulare.



Figura 3: Diagrammi di rotture del DNA a singolo e doppio filamento causate da radiazioni.
A: Rappresentazione bidimensionale dell'elica del DNA.
B: Una rottura in un filamento è di scarso significato perché viene riparata facilmente usando il filamento opposto come modello.
C: Le rotture in entrambi i fili, se ben separate, vengono riparate come rotture indipendenti.

D: Se si verificano rotture in entrambi i filamenti e sono direttamente opposte o separate solo da poche coppie di basi, ciò può portare a una rottura del doppio filamento in cui la cromatina si spezza in due pezzi.

Come detto in precedenza, le RI possono danneggiare il DNA tramite azioni dirette e azioni indirette. Queste sono mediate dai radicali che interagiscono e danneggiano il DNA. Tra i radicali, i più importanti sono il radicale ossidrilico •OH e il radicale •H, che si generano quando le RI danno vita alla radiolisi dell'acqua intracellulare.

1.1.1 Qualità della radiazione e damage clustering

Le RI attaccano in modo diverso il DNA. Le RI come particelle α e ioni carbonio generano *cluster* di danni. Questa tipologia di danno è costituita da lesioni multiple spazio-temporalmente correlate: SSB, DSB, lesione di una base localizzate su entrambi i filamenti del DNA, entro due o tre giri della molecola [5]. Tali *clustered lesions* rallentano o bloccano i meccanismi di riparo.

I fotoni generano invece rotture isolate della doppia elica che vengono riparate dalla cellula con maggiore facilità.

1.1.2 Double Strand-Breaks e cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay.

La complessità delle rotture della doppia elica varia a seconda del danno ricevuto. Si possono avere rotture "semplici" o danni complessi.

Più è elevato dunque è il grado di complessità e il numero delle rotture, e maggiore sarà il tempo necessario per riparare tali lesioni e di conseguenza aumenta anche la probabilità di errori che risulterebbero fatali per la cellula perché ne impedirebbero una corretta divisione cellulare andando incontro ad un processo chiamato apoptosi.

La quantificazione dei DSB è fondamentale quindi per la comprensione di base della risposta cellulare alle RI. Per la loro rilevazione esistono diversi metodi, tra cui due dei principali sono: il saggio dei foci e il saggio dei micronuclei.

A questo proposito è utile ricordare cosa è un micronucleo.

Esso è un piccolo nucleo che si forma ogni volta che un cromosoma o un frammento di esso non è incorporato in uno dei nuclei figli durante la divisione cellulare (mitosi), quando cioè i cromosomi sono spazialmente distinti, piuttosto che durante il resto del ciclo cellulare (interfase)(Fig.4).

Occasionalmente, i singoli cromosomi non riescono ad attaccarsi correttamente al fuso mitotico, una struttura che si forma durante la divisione cellulare per separare i cromosomi. I cromosomi attaccati in modo improprio sono in ritardo quando gli altri cromosomi sono tirati verso poli opposti dal fuso mitotico, e quelli in ritardo o si separano dalla cellula figlia appropriata o finiscono nella cellula figlia errata.

In entrambi i casi, la loro ritardata segregazione significa che spesso non riescono a incorporarsi nel nucleo principale delle cellule figlie, ma invece formano un nucleo satellite più piccolo detto micronucleo.



Figura 4: Immagine di una cellula con micronucleo

La formazione di micronuclei di solito serve come indice degli effetti genotossici e dell'instabilità cromosomica (sia ereditaria che indotta).

Dato che i micronuclei sono presenti solo nelle cellule che hanno completato la divisione cellulare, si è sviluppato un metodo particolare che le blocca prima che avvenga la citocinesi. Per ottenere ciò, si trattano le cellule con la *Cytochalasin-B* (CB), in modo da bloccarne la citocinesi, facendo accumulare cellule binucleate non ancora divise. [6]

Il saggio dei micronuclei viene ampiamente preferito nello studio del danno provocato dalle radiazioni in quanto più veloce e meno costoso da realizzare.

Un ulteriore metodo impiegato per la misura dei danni al DNA, è l'ibridazione fluorescente multicolore in sito (FISH o *Fluorescence In Situ Hybridization*) in cui si utilizzano sonde a fluorescenza che si legano in modo selettivo ad alcune specifiche regioni del cromosoma.

In questo modo è possibile misurare il numero di aberrazioni cromosomiche presenti, che sono alterazioni della struttura o del numero dei cromosomi. Esse sono conseguenza di un errore durante la divisione cellulare, più facilmente durante il crossing over, e consistono nella perdita, acquisizione o riarrangiamento di una o più parti di uno o più cromosomi.

1.2 Gli effetti extra bersaglio: il radiation-induced bystander effect

Per molti anni uno degli assiomi fondanti della radiobiologia è stato la convinzione che i danni al DNA provocati dalle RI fossero causati solo da interazioni dirette tra le particelle o loro prodotti secondari, come i radicali, con il DNA.

Nel novembre del 1992 però tale convinzione fu messa fortemente in crisi dagli scienziati Hatsumi Nagasawa e John B. Little che per primi osservarono che cellule non colpite direttamente dalla radiazione, sviluppavano danni analoghi a quelle investite dal fascio di particelle, un fenomeno che prende il nome di effetto *bystander* [7].

Allo stato attuale, si è visto che l'effetto *bystander* racchiude al suo interno tre effetti diversi con caratteristiche e proprietà differenti [8]:

- Bystander Effects after Cytoplasmic Irradiation,

- Bystander Effects after Irradiation with a Charged Particle Microbeam,
- Bystander Effects after Transfer of Medium from Irradiated Cells.

Il *Bystander Effects after Cytoplasmic Irradiation*, si verifica quando un fascio di particelle attraversando il citoplasma provoca ugualmente danni al DNA nonostante esso non sia stato colpito direttamente.

Diversi esperimenti sono stati condotti per studiare questo fenomeno, tra i quali si può citare lo studio effettuato da Wu e colleghi al *Radiological Research Accelerator Facility* dell'Università di Colombia [9]; essi impiegarono un fascio di particelle α per colpire il citoplasma delle cellule e osservarono un aumento significativo delle mutazioni genetiche e un aumento minimo della citotossicità.

Alla fine questi giunsero a due importanti conclusioni:

- il bersaglio degli effetti della RI deve essere più grande del DNA

-l'attraversamento da parte delle particelle α del citoplasma può essere più pericoloso dell'attraversamento del nucleo, perché anche se il DNA risulta danneggiato, il danno non è sufficientemente grave da portare alla morte cellulare e ciò quindi causa un aumento del rischio di insorgenza di mutazioni genetiche nelle generazioni future.

Il *Bystander Effects after Irradiation with a Charged Particle Microbeam*, sì ha invece quando un fascio di particelle di vario genere, colpisce delle cellule le quali rilasciano delle sostanze che attraverso le giunzioni gap della membrana, giungono nelle cellule vicine causando danni genomici in cellule non direttamente irradiate[10].

L'ultimo effetto, cioè il *Bystander Effects after Transfer of Medium from Irradiated Cells*, si verifica nel momento in cui le cellule colpite direttamente dalla radiazione, rilasciano sostanze citotossiche nell'ambiente cellulare che se usato per la cultura di altre cellule, provoca in queste ultime, un considerevole aumento di aberrazioni cromosomiche rispetto al numero atteso normalmente [11].

Volendo comprendere dunque i meccanismi impegnati nella risposta radioindotta dall'effetto *bystand*er, il primo passaggio sarà quello di riconoscere quali molecole generate dalle cellule colpite, possono indurre reazioni nelle cellule adiacenti. In tal senso si è mosso uno studio effettuato da Azzam et al [12] che ha indagato sul ruolo del metabolismo ossidativo nella regolazione e attivazione dei meccanismi che portano alla formazione dei micronuclei.

I risultati ottenuti hanno dimostrato l'ipotesi che l' O_2 e l' H₂O₂ prodotti dagli enzimi contenenti la flavina nelle cellule irraggiate dalle particelle α fanno da mediatori per la risposta radioindotta nelle cellule adiacenti a quelle colpite.

Continuando gli studi in questa direzione, altri scienziati hanno ipotizzato che anche l'NO (monossido di azoto) può giocare un ruolo importante nelle risposte indotte dall'effetto *bystander* [13].

Alla luce di tutti questi risultati, non si può più mettere in dubbio che nella valutazione del rischio radiobiologico e dell'efficacia della radiazione, bisogna considerare oltre al danno causato dall'interazione diretta della radiazione con il DNA, anche quello indiretto sulle cellule non colpite. Ancora oggi sono in corso numerosi esperimenti in tal senso. Il cammino non è semplice, perché la comparazione dei dati sperimentali, fondamentale nel metodo scientifico, spesso risulta complessa, poiché le risposte *bystander* delle cellule cambiano in base al tipo di cellula esposta, al tipo di radiazione, al diverso livello energetico della radiazione e in base anche alla distanza delle cellule dalla radiazione, come mostrato da alcuni studi [14]in tal senso.

1.3 Radioterapia e Adroterapia

Nella cura dei tumori sono stati fatti importanti passi in avanti ottenuti con molteplici terapie. Quella più conosciuta ed impiegata è la radioterapia che fa uso di fotoni ed elettroni ad alta energia. La radioterapia fa uso quindi di RI che danneggiano il DNA. I danni effettuati dalle RI sono legati alla quantità di energia che la radiazione cede ed è assorbita dalla materia vivente, cioè la dose, la cui unità di misura nel Sistema Internazionale è il Gray, o Gy, (J/kg).

Un'altra unità di misura tipicamente usata in radioprotezione è il Sievert (Sv) che rappresenta la dose pesata per la diversa qualità della radiazione e la diversa radiorisposta dei vari organi/tessuti. Ha la stessa unità di misura del Gy.

La dose assorbita da sola, però, non basta per descrivere gli effetti delle radiazioni sul materiale biologico poiché a parità di dose, radiazioni differenti inducono danni differenti come è evidente nelle particelle cariche pesanti che, a parità di dose assorbita, possiedono una maggiore efficacia dei fotoni. Per indicare tale efficacia ci si rifà al concetto di *Relative Biological Effectiveness* (RBE) o "Efficienza Biologica Relativa "che è il rapporto tra la dose di una radiazione di riferimento e la dose della radiazione di riferimento.

Per indicare la radiazione di riferimento si usano i raggi X da 250 kV o uno dei due raggi γ emessi dal ⁶⁰Co (1.17/1.33 MeV) [15] e per convenzione si pone l'RBE dei fotoni e degli elettroni uguale a 1.

Quando la radiazione attraversa la materia biologica essa dà vita lungo la sua traccia ad eventi di ionizzazione, e la densità di questi eventi, cioè la quantità di ioni che si generano in un certo volume, dipende dal tipo di radiazione: se è sparsamente ionizzante (la densità sarà bassa) o densamente ionizzante (la densità sarà alta).

La grandezza fisica usata per descrivere questo fenomeno è il LET (*Linear Energy Transfer*) definito come: $\text{LET}_{\Delta} = \frac{d E_{\Delta}}{dx}$, dove dx è un elemento infinitesimale della traiettoria, mentre E_{Δ} è l'energia persa localmente dalla particella in un tratto dx. In questo caso il termine "localmente", si riferisce al fatto che il LET_{Δ} tiene conto solo dell'energia persa dalla radiazione intorno alla traccia. [15]

L'unità di misura del LET è il keV/ μ m.

In radiobiologia è molto comune l'utilizzo del LET_{100} , il quale tiene conto dell'energia persa dalle particelle secondarie (raggi δ , cioè elettroni secondari emessi a causa della ionizzazione degli atomi in un mezzo attraversato da particelle cariche) aventi un'energia iniziale minore di 100eV. Più in generale però ci si riferisce ad una soglia energetica Δ e si indica LET_{Δ}.

Quando si considera un limite così elevato da poter considerare locali tutte le perdite di energia, si parla di LET_{∞} . Dunque il LET_{Δ} rappresenta l'energia ceduta dalla particella primaria ed assorbita dal mezzo all'interno di un volume limitato che circonda la traccia, mentre al contrario il LET_{∞} fa riferimento alle perdite di energia indipendentemente da dove queste vengono assorbite.

Gli studi e le ricerche effettuate fin ora hanno dimostrato che le radiazioni con un alto valore di LET danneggiano con maggiore frequenza e più gravemente il DNA avendo un RBE maggiore rispetto alle radiazioni a basso LET e che la differenza di LET che c'è tra i fotoni e i ioni C è dovuta alle caratteristiche delle interazioni delle particelle con la materia.

Come si evince dalla figura sotto, i fotoni depositano la maggior parte della loro energia nella parte iniziale del loro percorso nella materia, secondo un processo di attenuazione, descritto dalla legge: $I=I_0e^{-\mu x}$, dove I_0 è l'intensità iniziale del fascio di fotoni e μ è il coefficiente di attenuazione.

L'interazione delle particelle cariche con la materia è descritta dalla formula di Bethe-

Bloch:
$$-\frac{dE}{dx} = 2\pi N_{\rm a} r_{\rm e}^2 m_{\rm e} c^2 \rho \left[\frac{Z}{A} \frac{z^2}{\beta^2} \ln \left(\frac{2m_{\rm e} \gamma^2 v^2 W_{\rm max}}{I^2} \right) - \beta^2 - \delta - 2\frac{c}{Z} \right].$$

Dalla formula si evince che i protoni e gli ioni carboni depositano poca energia nella fase iniziale del proprio percorso, aumentandone la quantità fino a rilasciarne la quasi totalità in una regione di spazio molto piccola, detta per l'appunto "picco di Bragg"(Fig.5).



Figura 5: esempio di energia assorbita dato dalla formula di Bethe-Bloch per radiazioni diverse

Alla luce di quanto esposto fin ora si capisce perché nella cura dei tumori si prediliga l'uso della radioterapia, che provoca la necrosi delle cellule tumorali tramite l'uso delle RI, in genere i raggi X, che sono prodotti utilizzando acceleratori lineari chiamati linac. La radioterapia è usata con obiettivi e tecniche diverse, a secondo delle patologie tumorali da trattare come:

- la radioterapia curativa o radicale che ha lo scopo di eliminare completamente il tumore;

- la radioterapia intraoperatoria, detta anche IORT (*Intra-Operative Radio Therapy*) consistente nella somministrazione di una dose di radiazioni nel corso dell'intervento chirurgico di asportazione del tumore;

- la radioterapia palliativa il cui obiettivo è arrestare la crescita del tumore e alleviarne
i sintomi compreso il dolore nelle forme avanzate e metastatiche, migliorando di conseguenza la qualità di vita dei pazienti;

- la radioterapia *total body*, con la quale viene irradiato tutto l'organismo del paziente in modo da distruggere le cellule malate in alcuni particolari tumori che colpiscono le cellule del sangue e del sistema linfatico.

La radioterapia si differenzia in due modalità: radioterapia esterna e interna. La differenza sta nel luogo in cui la fonte della radiazione si trova, e cioè se è all'esterno o all'interno del corpo del paziente da trattare.

La radioterapia soprattutto quella tradizionale presenta però anche diversi effetti collaterali e controindicazioni legate principalmente al danno esercitato dalle radiazioni ai tessuti sani che incontrano lungo il loro percorso a causa delle caratteristiche fisiche delle interazioni con la materia esposte in precedenza.

Un altro tipo particolare di radioterapia è l'adroterapia.

L'idea di curare tumori usando particelle cariche si affaccia per la prima volta nel 1946 grazie a Robert Wilson con la pubblicazione del suo famosissimo articolo *Radiological Use of Fast Protons* [16].

L'adroterapia per la sua maggiore efficacia si è diffusa molto nell'ultimo quindicinale, come si vede dalle statistiche del PTCOG (*Particle Therapy Co-Operative Group*), un'importante fondazione no-profit fondata nel 1985 da scienziati e professionisti interessati alla ricerca radioterapica. Tali statistiche evidenziano un incremento dei pazienti sottoposti all'adroterapia con buoni risultati soprattutto per quanto riguarda l'uso dei protoni (Fig.6)

L'adroterapia è usata per la cura di alcuni tipi di tumori come ad esempio: tumori pediatrici; tumori alla base del cranio; carcinoma epatocellulare; tumore alla testa e al collo; tumori del sistema centrale nervoso; tumori del seno; tumore al polmone; tumore della prostata; tumore ai testicoli e tumore oculare [17].



Figura 6: grafico tratto dal sito del PTCOG

I vantaggi che hanno permesso a questa particolare branca della terapia tumorale di diffondersi sono principalmente due e cioè la maggiore precisione e la maggiore efficacia nel trattamento di alcuni tumori. L'uso di particelle cariche quali protoni e di ioni carbonio fornisce una maggiore precisione nel rilascio della dose.

In ambito clinico per adattare al meglio il trattamento alle varie situazioni di profondità, locazione e dimensioni del tumore, si varia la profondità a cui si presenta il picco di Bragg, creando così il Spread-Out Bragg Peak (SOBP).

Esso si realizza tramite una sovrapposizione di fasci con intensità e range differenti in modo da far ricadere tutto il tumore nella regione di Bragg. Gli ioni ¹²C differiscono dai protoni per un valore di RBE più elevato di quello dei protoni che vale 1,1, simile a quello degli elettroni e dei fotoni usati che è 1.

Un' altra differenza significativa tra protoni e ioni è che l'azione dei protoni sul DNA è prevalentemente indiretta, cioè il fascio di particelle interagendo soprattutto con gli atomi di ossigeno e le molecole di acqua della cellula, genera radicali liberi in particolar modo le *Reactive Oxygen Species* (ROS), che sono i responsabili dei danni al DNA, mentre gli ioni pesanti quali i ¹²C, danneggiano direttamente il DNA senza bisogno di un intermediario, per cui gli ioni carbonio sono più efficaci dei protoni nel trattamento dei tumori radioresistenti.

1.4 Protonterapia

La protonterapia (terapia con protoni) è una forma di radioterapia usata per trattare il cancro, che è in grado di colpire solo il tumore preservando i tessuti sani e permette di somministrare dosi più intense di radiazioni aumentando le possibilità di successo del

trattamento. Questi vantaggi sono dovuti alle caratteristiche dell'interazione tra i protoni e la materia, descritte nei paragrafi precedenti.

Nella protonterapia i danni ai tessuti sani sono limitati e ciò ne favorisce anche l'uso nei tumori pediatrici poiché c'è una riduzione dei danni a lungo termine con la probabilità che si formino tumori secondari radioindotti.

Come ogni radioterapia, anche la protonterapia, deve fare i conti con gli effetti collaterali, tra cui: diarrea, mal di testa e perdita di appetito.

La maggior parte dei pazienti comunque è in grado di continuare le normali attività durante il trattamento, incluso il lavoro, l'esercizio fisico e la socializzazione.

Ad oggi nel mondo sono sorti molti centri oncologici che fanno ricorso alla protonterapia e più di 80 di essi sono concentrati soprattutto negli USA, in Cina, Giappone, in Europa.

In Italia si trovano:

- Centro di Protonterapia di Trento
- Centro di adroterapia oculare di Catania
- CNAO di Pavia.

Nello specifico il CNAO di Pavia ha stretto recentemente un accordo con la giapponese Hitachi per un nuovo acceleratore per la protonterapia e una sala per il trattamento con una testata rotante (gantry) per colpire il tumore da molteplici direzioni. Sono previsti anche spazi per l'accoglienza e la preparazione delle terapie dei pazienti.

Il CNAO dunque è l'unico centro italiano e uno dei 6 al mondo in grado di erogare l'adroterapia con protoni e ioni carbonio. Con questa espansione il CNAO diventa l'unico centro di adroterapia al mondo a disporre sia di un sincrotrone per ioni multipli (protoni e ioni carbonio) che di un sincrotrone con gantry dedicato ai protoni.

1.5 La reazione fra protoni e boro per aumentare l'efficacia della protonterapia

Gli ioni carbonio risultano essere più efficaci nel trattamento dei tumori radioresistenti ovvero tipi di tumori che, sebbene subiscano un danno da radiazioni, sono capaci di auto-ripararsi dopo un periodo di tempo variabile, dando luogo a una ripresa di malattia, la cosiddetta "recidiva".

Dato che il loro uso risulta più costoso rispetto a quello dei protoni, si è cercato di trovare metodi migliori per aumentare l'efficacia radiobiologica dei protoni. L'obiettivo della PBCT (*Proton-Boron Capture Therapy*) infatti è proprio quello di aumentare l'efficacia dei fasci di protoni grazie al trattamento delle cellule con una soluzione contenente ¹¹B con cui i protoni interagiscono, dando vita ad una reazione nucleare che porta alla creazione di particelle α .

Questa reazione è stata studiata a partire degli anni 30 del Novecento, perché permette di produrre un gran numero di particelle α in una reazione isoterma. Si tratta di una reazione con un Q-valore (la differenza tra l'energia a riposo iniziale e quella finale) di 8,7 MeV e con sezione d'urto massima di 1,2 barn, che può essere schematizzata in questo modo p+¹¹B \rightarrow 3 α [18]. La reazione in realtà avviene in più step, portando alle creazioni di ibridi di risonanza, ottenendo così una reazione del tipo: p+¹¹B \rightarrow ¹²C \rightarrow ⁸Be + $\alpha \rightarrow$ 3 α .

L'interazione del protone con il Boro dà vita al Carbonio, che poi decade in Berillio che interagendo con una particella α , genera tre particelle α . In questo modo, grazie all'alto numero di particelle α generate, che hanno energia massima di 4 MeV e un range nel tessuto di circa 30 µm, si ha una densità di ionizzazione simile a quello degli ioni ¹²C.

Così facendo si ha la precisione balistica dei protoni con la densità di ionizzazione di una radiazione a LET più elevato.

Un trattamento simile alla PBCT è la BNCT (*Boron-Neutron Capture Therapy*) che utilizza i neutroni per dare vita ad una reazione differente che però ha lo svantaggio di generare meno particelle α . Affinché ci sia questo tipo di reazione però, bisogna trattare preventivamente le cellule con un portatore del ¹¹B o ¹⁰B a seconda di quale trattamento viene effettuato. In questo modo le cellule ricevono danni sia per l'interazione dei protoni con il DNA, sia per l'interazione delle particelle α che hanno un LET molto alto.

L' efficacia del metodo dipende fortemente dall'energia dei protoni incidenti, poiché essa influenza la sezione d'urto della reazione.

Nello studio effettuato da Cirrone et al, dunque ci si è concentrati sul trattamento delle cellule tumorali DU145[18], cellule del cancro alla prostata.

L'esperimento è stato realizzato trattando le cellule in vitro con diverse quantità di uno specifico carrier di boro detto BSH (*sodium borocaptate*), in concentrazioni di 40ppm

e 80ppm (parte per milione) ed è stata utilizzata una linea cellulare non trattata come campione di prova.

Dopo l'irraggiamento è stata misurata la sopravvivenza clonogenica (Fig.7), cioè la percentuale di cellule geneticamente identiche che restano in vita (in seguito all'esposizione ad un agente chimico o fisico) in una o più colture, in funzione della dose in punti diversi del SOBP e si è osservato che la sopravvivenza clonogenica rimane invariata rispetto al campione di prova all'inizio del SOBP e diminuisce maggiormente all'aumentare della profondità, in accordo con quanto si voleva dimostrare.



Figura 7: sopravvivenza clonogenica lungo il SOBP dei protoni

Dopo è stato analizzato il numero di aberrazioni cromosomiche, strettamente legate alla quantità di danni subiti dal DNA, e anche in questo caso si è osservato un aumento delle aberrazioni nelle cellule trattate con il BSH (Fig.8).

Per tale misurazione sono state impiegate le cellule MCF-10A, cellule epiteliali sane del seno.

Si è deciso in questo senso perchè le cellule tumorali sono caratterizzate da una certa instabilità di base e quindi, non si prestano a una valutazione affidabile del danno al DNA indotto dalle radiazioni. I riarrangiamenti cromosomici indotti dalle radiazioni si sovrapporrebbero quindi a un'elevata frequenza di confusione del danno di base. Sia le aberrazioni cromosomiche che la diminuzione della sopravvivenza clonogenica, sono dovuti quindi principalmente all'interazione di radiazioni ad alto LET con il DNA e quindi ne sono responsabili le particelle α .



Figura 8: curve delle aberrazioni in funzione della dose

1.5.1 Questioni aperte

I dati sperimentali ottenuti hanno dimostrato effettivamente un aumento dei danni subiti dalle cellule precedentemente trattate in modo tale da contenere il boro

Rimangono però alcune problematiche: in primis esiste una discrepanza tra il numero di particelle α prodotte e l'effetto radiobiologico osservato, perché secondo la reazione tra protoni e ¹¹B il numero prodotto è troppo basso per giustificare l'aumento dell' efficacia biologica osservato; un'altra problematica è che non è nota l'azione del bystander effect in questa situazione e cioè in quale misura e in che modo le particelle α incidono sul danno prodotto alle cellule non colpite. [19]

Lo scopo dei vari esperimenti effettuati fin ora, vuole essere quello di trovare una valida risposta alle problematiche sopra evidenziate.

Il dipartimento di Fisica "Ettore Pancini" dell' Università degli studi di Napoli Federico II, ed in particolar modo il laboratorio di Biofisica delle Radiazioni, ha effettuato in tal senso, un esperimento in cui è stato osservato il danno indotto in una linea cellulare da un irraggiamento, con un fascio di protoni terapeutico effettuato presso il Centro Nazionale di Adroterapia Oncologica (CNAO). La stessa è stata trattata con la borofenilalanina (BPA, un altro composto contenente boro) mediante il saggio dei micronuclei. I risultati di tale esperimento sono stati analizzati in questo lavoro di tesi.

Capitolo 2

2 Metodologia

2.1 Il saggio dei micronuclei

Il Laboratorio di Biofisica delle Radiazioni del Dipartimento di Fisica "E.Pancini", ha impiegato il saggio dei micronuclei (MN) per studiare i danni radioindotti al DNA con lo scopo di verificare l'aumento dell'efficacia della protonterapia grazie alla presenza delle particelle α create dalla reazione p+¹¹B, espandendo l'analisi precedentemente compiuta con altre metodiche di analisi citogenetica, quali l'analisi delle aberrazioni cromosomiche con tecniche di ibridizzazione in sito (FISH).

Il saggio dei MN, peraltro, è caratterizzato da una maggiore velocità di realizzazione consentendo comunque una soddisfacente accuratezza dei risultati ottenuti nel caso della quantificazione del danno al DNA cellulare[6].

In particolare, è stato adoperato il CBMN (cytokinesis-block micronucleus) assay in cui si fa uso della Citocalasina-B (CB) per arrestare le cellule in divisione nello stato di binucleazione impedendo la citodieresi. Questo saggio infatti si basa sul concetto che ogni rottura del doppio filamento del DNA o malsegregazione del materiale cromosomico sarà visualizzabile in una cellula binucleata (BN) sotto forma appunto di un micronucleo contenuto nel citoplasma comune che ancora avvolge due nuclei figli (Fig.9).



Figura 9: formazione dei micronuclei e azione della citocalasina B.

Nel corso del tempo sono stati sviluppati diversi criteri da seguire durante il test, sia per l'individuazione delle cellule binucleate, sia per l'individuazione dei micronuclei. Per la scelta delle cellule binucleate i criteri da seguire sono: (1) i due nuclei in una cellula binucleata dovrebbero avere membrane nucleari intatte ed essere situati all'interno del stesso confine citoplasmatico.

(2) i due nuclei devono essere di eguale dimensione e presentare uguale intensità di colorazione.

(3) i due nuclei possono essere collegati da un ponte internucleare che però non deve essere più lungo di 1/4 del diametro nucleare.

(4) i due nuclei possono toccarsi, ma i confini nucleari non devono sovrapporsi.

(5) la membrana nucleare deve essere ben distinguibile dal citoplasma circostante [6].(Fig.10)



Figura 10: (a) cellula binucleata ideale; (b) cellula binucleata con nuclei che si toccano; (c) cellula binucleata con un piccolo ponte plasmatico tra nuclei; (d) cellula binucleata con un relativamente ampio ponte nucleplasmatico.

I criteri per i micronuclei sono:

(1) il diametro dei micronuclei deve essere tra 1/16 e 1/3 del diametro medio del nucleo principale

(2) devono essere facilmente distinguibili dal materiale circostante e dalle particelle.

(3) i micronuclei non devono essere collegati con i nuclei principali.

(4) i micronuclei possono toccare i nuclei ma non sovrapporsi con essi e devono essere

facilmente distinguibili dal nucleo principale.

(5) i micronuclei devono avere la stessa intensità di colore del nucleo principale [6].

(Fig. 11)



Figura 11:(**a**) Cellula con due micronuclei uno con 1/3 e l'altro 1/9 del diametro di uno dei nuclei principali all'interno della cellula. (**b**) Micronuclei che toccano ma non si sovrappongono ai nuclei principali.(**c**) Una cellula binucleata con ponte nucleoplasmatico tra i nuclei principali e due micronuclei.(**d**) Una cellula binucleata con sei micronuclei di varie dimensioni; questo tipo di cellula si vede raramente.

Secondo il protocollo sviluppato è possibile considerare anche il ponte citoplasmatico come indicatore di danno al DNA per cui sono stati sviluppati anche per essi dei criteri per riconoscerli. Non tutti però accettano i ponti come endpoint e infatti nell'analisi condotta dal laboratorio di Biofisica delle Radiazioni non sono stati presi in considerazione.

Le principali cellule su cui viene effettuato sono i linfociti umani e le cellule epiteliali, ma sono stati sviluppati anche metodi per applicarlo ad altri tipi di cellule e questo ha permesso di utilizzare il saggio dei micronuclei non solo per valutare il danno radioindotto, ma anche per altri scopi, come il rilevamento del potenziale mutageno di inquinanti presenti nell'aria, nell'acqua e nel suolo in programmi di monitoraggio ambientale e o anche nello studio di cellule vegetali e animali, compreso quelle umane. [20].

2.2 Procedura sperimentale

Cellule MCF-10A di tessuto epiteliale non tumorale sono state irraggiate con fasci di protoni clinici presso il CNAO di Pavia, in assenza e in presenza di un carrier di ¹¹B, il BPA(borofenilalanina).

Nello specifico si è irraggiato una linea cellulare con protoni a diverse dosi di energia, cioè: 0,5 Mev, 2 Mev e 4 Mev. Successivamente è stato effettuato lo stesso processo su cellule precedentemente trattate con il carrier. Nell'analisi dei risultati effettuata per questo lavoro di tesi sono stati presi in considerazione due irraggiamenti differenti, uno effettuato a luglio 2020 e l'altro ad ottobre 2020, durante i quali i campioni cellulari sono stati esposti in due in posizioni del SOBP differenti. Le misurazioni di luglio riguardano la posizione MID del SOBP, mentre quelle di ottobre sono riferite alla posizione Distal.

Il razionale per l'utilizzo di tali posizioni era verificare una eventuale dipendenza della magnitudine dell'incremento dell'efficacia radiobiologica dei protoni clinici dalla loro energia; in particolare, alla posizione distal ci si aspetta un maggior numero di micronuclei poiché, come già evidenziato in altri studi [18], l'energia media dei protoni è minori rispetto alla posizione MID e quindi più vicina al massimo della sezione d'urto, per la reazione tra protoni e boro.

Lo scopo di questo studio è stato duplice: da un lato corroborare i dati esistenti a sostegno della Proton-Boron Capture Terapy (PBCT) e cioè che le particelle α che si vengono a creare nella reazione danneggiando direttamente il DNA causano dei DBS di maggiore complessità rispetto a quelli causati dai soli protoni alle energie cliniche

(basso LET) a causa del loro maggiore LET, con un conseguente aumento dell'efficacia radiobiologica dei fasci di protoni clinici.

L'altro scopo è stato esplorare il possibile ruolo dell'effetto bystander. Ciò perché esiste, come menzionato nel cap.1, una discrepanza fra la resa di particelle α attese dalla reazione e la magnitudine dell'effetto biologico osservato [19].

A tale scopo, il mezzo di coltura delle cellule irraggiate in assenza e in presenza della BPA è stato prelevato, filtrato e trasferito su colture non direttamente irraggiate cellule che sono state incubate per 24h e successivamente trattate con il CBMN assay. Questo procedimento è noto anche come *medium transfer experiment*.

In entrambi i casi, le cellule sono state seminate ed irraggaite in particolari supporti per colture cellulari, chiamate slide flasks (Fig13). Il vantaggio di questo tipo di supporti è che la base su cui crescono le cellule può essere, alla fine delle procedure sperimentali del CBMN assay può essere rimossa e fungere da slide utilizzabile per l'osservazione al microscopio.

Le colture sono state trattate per 4 h con 120 mg/ml di BPA e, subito prima dell'irraggiamento, il terreno di coltura è stato aspirato e sciacquato due volte con una soluzione salina PBS (*Phosphate Buffer Saline*).

Ogni laboratorio mette a punto un protocollo in cui si ottimizzano, sulla base della specifica linea cellulare, i due principali parametri necessari a massimizzare il numero di cellule "utili", appunto le BN: la concentrazione di CB e il tempo di trattamento con la stessa. In questo caso, per la linea cellulare utilizzata, ossia le cellule epiteliali MCF-10A, era stato precedentemente stabilito che la migliore frequenza di binucleazione si ottiene trattando le cellule con 2 mg/ml di CB per 24 h. Pertanto, sia dopo l'esperimento "diretto" che dopo il medium transfer experiment le cellule sono state trattate con tale concentrazione di CB per 24 h.

Dopo tale tempo, si è rimosso il terreno con la CB e le cellule sono state fissate a - 20° C per 20 min con una soluzione Carnoy's (metanolo- acido acetico 4:1) tenuta precedentemente a - 20° C.

In ultimo il fissativo viene rimosso, così pure la parte superiore delle slide flasks e il fondo, che fa da vetrino, lasciato ad asciugare all'aria a temperatura ambiente per almeno 24 h prima della colorazione che viene effettuata con il DAPI, un colorante organico fluorescente che lega fortemente regioni del DNA ricche in sequenze A-T.

L'osservazione dei vetrini e l'analisi della frequenza dei MN sono state effettuata manualmente utilizzando un microscopio a fluorescenza, modello Zeiss Axioplan 2 imaging (Fig.12) utilizzando un obiettivo con ingrandimento 40x. Fra 500 e 1000 cellule BN sono state analizzate per ogni punto sperimentale.

La frequenza dei MN è stata così calcolata:

 $Freq MN = \frac{[MN1 + (MN2 \times 2) + (MN3 \times 3) + (MN4 \times 4) + (MN5 \times 5)]}{(Tot scored)}$

Dove BN è il numero di cellule binucleate senza micronuclei; MN1 è il numero di cellule con 1 micronucleo; MN2 è il numero di cellule con 2 micronuclei; MN3 è il numero di cellule con 3 micronuclei; MN4 è il numero di cellule con 4 micronuclei; MN5 è il numero di cellule con 5 micronuclei. Per il numero totale di cellule binucleate si è utilizzato nelle l'abbreviazione Tot scored.

L'errore è stato calcolato assumendo una statistica di Poisson.



Figura 12: flasks utilizzate per l'esperimento



Figura 13: microscopio Zeiss Axioplan 2

Capitolo 3

3 Risultati

3.1 Irraggiamento diretto.

In questo capitolo si esaminano i dati ottenuti mediante il saggio del micronucleo effettuato sulle cellule esposte al fascio terapeutico del CNAO a luglio 2020 e ottobre 2020.

Per misurare l'eventuale incremento dell'efficacia biologica dei protoni in seguito al trattamento con BPA, e quindi l'effetto della reazione p-B, si è calcolata la frequenza di micronuclei come di seguito descritto:

$$Freq MN = \frac{[MN1 + (MN2 \times 2) + (MN3 \times 3) + (MN4 \times 4) + (MN5 \times 5)]}{(Tot Scored)}$$

Dove MN1 è il numero di cellule con 1 micronucleo; MN2 è il numero di cellule con 2 micronuclei e così via. Per il numero totale di cellule binucleate si è utilizzato nelle

l'abbreviazione Tot scored, mentre BN indica il numero di cellule binucleate senza micronuclei.

Come si può vedere, per dare un peso al diverso numero di micronuclei riscontrabile in ogni cellula, nel calcolare la frequenza si moltiplica il numero di micronuclei per il numero di cellule binucleate in cui si ha quella specifica quantità di micronuclei.

Nella Tabella 1 sono riportati i dati del run di luglio 2020 relativi all'esposizione diretta al fascio di protoni sulla posizione Mid-SOBP del fascio terapeutico del CNAO in assenza del carrier di boro BPA:

							Tot
Dose(Gy)	BN	MN1	MN2	MN3	MN4	MN5	scored
0	1834	71	5	0	0	0	1910
0,5	1254	134	13	2	1	0	1404
2	741	209	39	18	2	1	1010
4	439	323	124	46	21	8	961

Tabella 1: dati relativi a cellule senza BPA con irraggiamento diretto in una posizione Mid-SOBP.

Nella tabella successiva (Tabella 2) sono riportati i valori relativi alle cellule irraggiate nello stesso run, ma precedentemente trattate con il BPA :

							Tot
Dose(Gy)	BN	MN1	MN2	MN3	MN4	MN5	scored
0	1746	69	б	1	0	0	1822
0,5	1238	179	33	13	2	1	1466
2	605	281	77	37	7	6	1013
4	408	359	163	67	22	31	1050

Tabella 2: dati relativi a cellule trattate con BPA ed irraggiamento diretto in una posizione Mid-SOBP.

Confrontando i valori si nota anche che nelle cellule trattate si ha un aumento dei casi di binucleate con più micronuclei, a riprova del fatto che il numero di lesioni gravi e quindi di DBS è aumentato grazie all'interazione tra le particelle α e il DNA delle cellule. Le frequenze di micronuclei per cellula sono mostrate nelle tabelle 3 e 4:

Dose (Gy)	frequenza micronuclei		errore frequenza
0		0,042	0,005
0,5		0,121	0,009

2	0,350	0,015
4	0,867	0,011

 Tabella 3: frequenze dei micronuclei per cellule binucleate senza BPA con irraggiamento diretto in una posizione Mid-SOBP.

		frequenza	
Dose (Gy)		micronuclei	errore frequenza
	0	0,046	0,005
	0,5	0,200	0,010
	2	0,596	0,015
	4	1,075	0,009

 Tabella 4:
 frequenze dei micronuclei per cellule binucleate trattate con BPA ed irraggiamento diretto in una posizione Mid-SOBP.

Come si può vedere, all'aumentare della dose aumenta la frequenza di micronuclei, come atteso. Dall' osservazione dei dati riportati nella tabelle 3 e 4 è possibile notare un aumento dei micronuclei osservati nelle cellule precedentemente trattate, a verifica della tesi iniziale, cioè che le cellule trattate in precedenza con il carrier del boro subiscono danni maggiori una volta esposte al fascio di protoni.



Figura 13: frequenze dei micronuclei per cellule binucleate a varie dosi di radiazione con e senza BPA, nella posizione Mid-SOBP ed irraggiamento diretto.



Figura 14: frequenze dei micronuclei per cellule binucleate con e senza BPA, nella posizione Mid-SOBP ed irraggiamento diretto. La linea blu è usata per le cellule con il BPA e la rossa per quelle senza

Dal grafico (Figura 14) si evince che, nel caso delle cellule trattate con il boro (linea blu), si ha un aumento della frequenza di micronucleazione in funzione della dose, di tipo lineare del tipo y=mD+b, con (m=0,2553 \pm 0,0072)Gy⁻¹e b=(0,065 \pm 0,016), fatta eccezione per il primo punto, la cui frequenza è la stessa delle altre cellule a testimonianza del fatto che il BPA da solo, in assenza di un'esposizione alle radiazioni, non causa un aumento rilevante del numero dei micronuclei.

Per le cellule in assenza di BPA (linea rossa) invece l'andamento è di tipo linearequadratico cioè: $y=AD^2+BD+b$, con A=(0,0256±0,0051) Gy⁻², B=(0,101±0,021) Gy⁻¹ e b=(0,050±0,015).

Ad ottobre, come già detto in precedenza, è stato eseguito un ulteriore esperimento i cui risultati sono riportati di seguito nelle tabelle 5 e 6:

								Tot
	Dose (Gy)	BN	MN1	MN2	MN3	MN4	MN5	scored
	0	1104	59	2	0	0	0	1165
	0,5	1154	160	32	5	2	0	1353
	2	707	237	65	12	4	1	1026
	4	295	370	126	48	16	8	863
_								

Tabella 5: dati relativi a cellule senza BPA ed irraggiamento direttosulla posizione distale del-SOBP.

Dose(Gy)	BN	MN1	MN2	MN3	MN4	MN5] S	Fot scored
0	1275	50	5	0		0	0	1330
0,5	1129	190	50	10		5	0	1384

2	622	296	105	43	8	5	1079
4	268	332	173	89	38	21	921

 Tabella 6: dati relativi a cellule trattate con BPA ed irraggiamento direttosulla posizione distale del SOBP.

In questo esperimento, le cellule sono state esposte direttamente ad un fascio di protoni nel punto Distal del SOBP e le frequenze ottenute sono riportate nelle tabelle 7 e 8:

		frequenza		
Dose (Gy)		micronuclei		errore frequenza
	0	(0,054	0,007
	0,5	(0,183	0,011
	2	(0,413	0,015
	4		1,008	0,003

 Tabella 7: frequenze dei micronuclei per cellule binucleate senza BPA con irraggiamento diretto in una posizione distale del SOBP.

Dose (Gy)	f. n	requenza nicronuclei	errore frequenza
	0	0,045	0,006
	0,5	0,246	0,012
	2	0,641	0,015
	4	1,305	0,021

Tabella 8: frequenze dei micronuclei per cellule binucleate trattate con BPA ed irraggiamento diretto in una posizione distale del SOBP.



Figura 15: frequenze dei micronuclei per cellule binucleate a varie dosi di radiazione con e senza BPA, nella posizione distale del SOBP ed irraggiamento diretto.



Figura 16: frequenze dei micronuclei per cellule binucleate con e senza BPA, nella posizione Distal-SOBP ed irraggiamento diretto. La linea blu è usata per le cellule con il BPA e la rossa per quelle senza

Anche in questo caso (fig.16) si ha un andamento lineare per le cellule trattate (linea blu) del tipo y=mD+b con m= $(0,2553\pm0,0072)$ Gy⁻¹ e b= $(0,065\pm0,016)$, mentre per le cellule non trattate (linea rossa) si ha un andamento quadratico y=AD²+BD+b, con A= $(0,0256\pm0,0051)$ Gy⁻², B= $(0,101\pm0,021)$ Gy⁻¹ e b= $(0,0506\pm0,0145)$.

Dall'analisi dei dati si evince chiaramente che le caratteristiche generali del danneggiamento del DNA sono le stesse negli esperimenti eseguiti a luglio e ad ottobre 2020 cioè: si ha un aumento della frequenza di micronucleazione in funzione della dose di tipo lineare per le cellule tratte con il boro; un aumento delle binucleate con più di un micronucleo ed una maggiore frequenza di micronuclei per cellula.

Un'altra considerazione importante che si può evidenziare nel grafico seguente (Fig.17) è che nelle cellule trattate precedentemente con il BPA ed esposte direttamente al fascio di protoni, si registra un danno più elevato alla distanza Distal-SOBP rispetto alla distanza Mid-SOBP, come previsto dalla PBCT. Nella siffatta posizione infatti, la distribuzione d'energia dei protoni incidenti sarà centrata su valori più bassi rispetto alla posizione mid-SOBP, e quindi ci sarà un maggior contributo di protoni con energie prossime a quelle che innescano la reazione p-B.



Figura 17: frequenze dei micronuclei percellule binucleate trattate con il BPA misurate a distanza Mid-SOBP e Distal-SOBP.

3.2 Effetto bystander

I dati ottenuti dall'esperimento di medium transfer mostrano chiaramente che esiste un contributo dell'effetto bystander negli effetti indotti dalla reazione p-B.

Nelle successive tabelle (Tabelle 9-10-11-12) sono riportate sia le misurazioni di ottobre 2020 che di luglio 2020, anche se per quest'ultime manca la misura a 4 Gy per motivi tecnici.

Dose(Gy)	BN	MN1	MN2	MN3	MN4	MN5	Tot scored
	0	1003	38	1	0	0	0	1042
	0,5	713	30	1	0	0	0	744
	2	889	40	1	0	0	0	930
Tabella 9:	dati rela	tivi a cellul	e esposte al	terreno di c	coltura di ce	ellule senza	BPA e irrag	ggiate nella

posizione Mid-SOBP.

Dose(Gy)		BN	MN1	MN2	MN3	MN4	MN5	Tot scored
	0	997	44	2	0	0	0	1043

		0,5	706	148	11	0	0	0	865
		2	666	128	10	0	0	0	804
Т	abella 10: dat	ti relativi	a cellule es	sposte al terr	reno di coltu	ıra di cellule	trattate co	n il BPA e iı	raggiate

nella posizione Mid-SOBP.

Dose							
(Gy)	BN	MN1	MN2	MN3	MN4	MN5	Tot scored
0	1104	59	2	0	0	0	1165
0,5	1343	61	4	2	0	0	1410
2	1156	53	2	0	0	0	1211
4	1253	45	6	0	0	0	1304

 Tabella 11: dati relativi a cellule esposte al terreno di coltura di cellule senza BPA e irraggiate nella posizione distale del SOBP.

					R ART A		
Dose(Gy)	BN	MINI	MINZ	MIN3	MIN4	MN5	Tot scored
0	1275	50	5	0	0	0	1330
0,5	1182	191	26	5	0	0	1404
2	1023	159	22	0	0	0	1204
4	1159	166	19	5	0	0	1349

 Tabella 12: dati relativi a cellule esposte al terreno di coltura di cellule trattate con il BPA e irraggiate nella posizione distale del SOBP.

Dopo aver visionato i dati e aver calcolato le frequenze , si è giunti ai risultati riportati nelle tabelle 13-14-15-16:

	frequenza	
Dose (Gy)	micronuclei	errore frequenza
0	0,038	0,006
0,5	0,043	0,007
2	0,045	0,007

 Tabella 13: frequenze di micronuclei per cellule binucleate relative a cellule esposte al terreno di coltura di cellule senza BPA e irraggiate in una posizione Mid-SOBP.

	frequenza		
Dose (Gy)	micronuclei		errore frequenza
	0	0,046	0,006
0	,5	0,197	0,014
	2	0,184	0,014

 Tabella 14: frequenze di micronuclei per cellule binucleate relative a cellule esposte al terreno di coltura di cellule trattate con il BPA e irraggiate in una posizione Mid-SOBP.

		frequenza		
Dose (Gy)		micronuclei		errore frequenza
	0		0,054	0,007
	0,5		0,053	0,006
	2		0,047	0,006
	4		0,044	0,006

 Tabella 15: frequenze di micronuclei per cellule binucleate relative a cellule esposte al terreno di coltura di cellule senza BPA e irraggiate in una posizione distale del SOBP.

Dose (Gy)		frequenza micronuclei		errore frequenza
	0		0,045	0,006
	0,5		0,184	0,01
	2		0,169	0,011
	4		0,162	0,01

Tabella 16: frequenze di micronuclei per cellule binucleate relative a cellule esposte al terreno di coltura di cellule trattate con il BPA e irraggiate in una posizione distale del SOBP.



Figura 18: frequenze dei micronuclei per cellule binucleate a varie dosi di radiazione con e senza BPA, nella posizione Mid-SOBP per effetto bystander.



Figura 19: frequenze dei micronuclei per cellule binucleate a varie dosi di radiazione con e senza BPA, nella posizione distale del SOBP per effetto bystander.



Figura 20: frequenze dei micronuclei per cellule binucleate con e senza BPA, nella posizione Mid-SOBP per effetto bystander. La linea blu è usata per le cellule con il BPA e la rossa per quelle senza



Figura 21: frequenze dei micronuclei per cellule binucleate con e senza BPA, nella posizione Distal-SOBP per effetto bystander. La linea blu è usata per le cellule con il BPA e la rossa per quelle senza

Quello che si evince da questi grafici dunque è che l'effetto bystander è presente poiché nelle cellule esposte al terreno delle cellule trattate con la BPA, i micronuclei sono in numero maggiore rispetto alle cellule esposte al terreno delle cellule non trattate e che il terreno di coltura della popolazione di controllo non esposta a radiazioni non ha influenzato la frequenza dei micronuclei.

Si nota anche (Fig. 20 e 21) che nelle cellule esposte al terreno di coltura delle cellule colpite dalle radiazioni, si ha un aumento dei micronuclei e che tale aumento non dipende dalla dose della radiazione, infatti nei casi delle radiazioni di 2 e 4 Gy, non si riscontra un aumento, ma bensì una diminuzione della frequenza di micronuclei rispetto al caso della radiazione di 0,5 Gy e ciò implica che viene meno l'andamento lineare della frequenza di micronucleazione in funzione della dose che si aveva nel caso dell'esposizione diretta.

Concludendo si evince che, a differenza dell'esposizione diretta, non è stata registrata una rilevante differenza di danno nelle cellule esposte al terreno di coltura di cellule colpite ad una distanza Mid del SOBP, rispetto a quelle il cui terreno si trovava ad una distanza Distal.

3.3 Conclusioni

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di analizzare i dati ottenuti esponendo campioni di cellule a fasci di protoni clinici presso il CNAO (Centro Nazionale di Adroterapia Oncologica) nell'ambito dell'esperimento NEPTUNE allo scopo di:

- validare la Proton-Boron Capture Therapy (PBCT), il cui scopo è potenziare l'efficacia radiobiologica dei fasci di protoni clinici mediante l'azione delle particelle α rilasciate dalla reazione di fusione nucleare tra i protoni e il ¹¹B, combinando in questo modo la precisione balistica dei fasci di protoni e l'efficacia nel danneggiare gravemente il DNA delle radiazioni ad alto LET.
- verificare ci fosse un contributo dell'effetto bystander, in modo da risolvere almeno parzialmente uno dei problemi della PBCT cioè una discrepanza fra la resa di particelle α attese dalla reazione e la magnitudine dell'effetto biologico osservato.

I dati analizzati sono stati ottenuti mediante il saggio del micronucleo in cui rotture della doppia elica del DNA si manifestano sotto forma di micronuclei in cellule che si stanno dividendo dopo l'irraggiamento ed arrestate nello stato di binucleazione grazie all'aggiunta di una sostanza, la citocalasina B (CB).

L'analisi in particolare è stata effettuata su campioni cellulari irraggiati con tre dosi diverse: 0,5 Gy, 2 Gy e 4 Gy e utilizzando come controllo una popolazione cellulare non esposta a radiazioni. Inoltre lo studio riguarda campioni cellulari irraggiati in due sedute diverse, una effettuata a luglio 2020 ed una realizzata ad ottobre 2020.

Nelle due sessioni i campioni cellulari sono stati posizionati in due punti differenti del SOBP, ossia nel punto a metà del SOBP (Mid SOBP), e nel punto distale del SOBP.

Per studiare l'effetto bystander, il terreno di coltura in cui si trovavano le cellule irraggiate è stato prelevato ed è stato impiegato come fattore di condizionamento per cellule non irraggiate, per un intervallo temporale di 24h, una procedura sperimentale nota come medium-transfer experiment.

Dallo studio e dall'analisi dei dati relativi all'esposizione diretta delle cellule al fascio di protoni trattate con il carrier di boroBPA, si è evidenziato sia un aumento generale del numero dei micronuclei, sia un aumento del numero di binucleate con più di un micronucleo e questi sono dei chiari segnali dell'azione di particelle ad alto LET che nel nostro caso sono le particelle α generate nella reazione di fusione nucleare tra i protoni e il boro a conferma della validità della PBCT.

Una riprova che questo incremento è realmente dovuto alla presenza di particelle α generate dalla specifica reazione p+¹¹B, consiste nel fatto che confrontando la frequenza

di micronuclei calcolata a distanza Mid del SOBP con quella calcolata a distanza Distal, si vede che quest'ultima è più elevata, perché è proprio a questa distanza che l'energia media dei protoni si avvicina al massimo della sezione d'urto della reazione.

Dall'analisi dei dati relativi la medium-transfer experiment, si nota che nelle cellule esposte al terreno di coltura delle cellule trattate con il BPA e poi irraggiate, si ha un aumento dei micronuclei.

Questo risultato può spiegare in parte la discrepanza del numero di particelle α riscontrata negli esperimenti precedenti, poiché una parte del danno cellulare misurato in quegli esperimenti non era dovuto all'interazione diretta delle particelle α con le cellule, ma all'effetto bystander causando così una sottostima dell'effetto dovuto alle particelle α effettivamente generate.

Da quanto scritto fin ora, appare chiaro che la PBCT sembra essere una valida startegia per permettere alla protonterapia di essere usta in linea di principio anche per tumori radioresistenti anche se futuri studi sono necessari per chiarirne pienamente i meccanismi radiobiofisici alla base della PBCT.

Bibliografia

[1] L. C. Simonsen, T. C. Slaba, P. Guida, A.Rusek, *NASA's first ground-based Galactic Cosmic Ray Simulator: Enabling a new era in space radiobiology research.* Plos Biology, 18(5), e3000669 https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000669 (2020).

[2] W. J. Angell, F. Bochicchio, S. Conrath, S. C. Darby, *Who Handbook On Indoor Radon A Public Health Perspective*. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data (2009).

[3] R.X Huang, P.K Zhou, *DNA damage response signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer*. Signal Transduction and Targeted Therapy volume, 5,60, https://doi.org/10.1038/s41392-020-0150-x (2020).

[4] E. J. Hall , A. J.Giaccia , *Radiobiology for the Radiologist* , Lippincott Williams & Wilkins , Philadelphia ,15-23 (2018).

[5] B.Bukowska, B.T. Karwowski, *The Clustered DNA Lesions - Types, Pathways of Repair and Relevance to Human Health.* Current Medicinal Chemistry,25(23),2722-2735 (2018).

[6] M. Fenech, *The in vitro micronucleus technique*. Mutation Research, 455, 81–95 (2000).

[7] H. Nagasawa , J. B. Little, *Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles*. Cancer Research, 52(22), 6394–6396 (1992).

[8] W.F. Morgan, Non-targeted and Delayed Effects of Exposure to Ionizing Radiation: I. Radiation-Induced Genomic Instability and Bystander Effects In Vitro. Radiation Research, 159(5), 567-580 (2003).

[9] L. J. Wu, G. Randers-Pehrson, A. Xu, C. A. Waldren, C. R. Geard,
Z. Yu and T. K. Hei, *Targeted cytoplasmic irradiation with alpha particles induces mutations in mammalian cells*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96(9), 4959–4964 (1999).

[10] H. Zhou, M. Suzuki, G. Randers-Pehrson, D. Vannais, G. Chen, J. E. Trosko, C. A. Waldren and T. K. Hei, *Radiation risk to low fluences of alpha particles may be greater than we thought*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98(25),14410–14415 (2001).

[11] C. Mothersill and C. Seymour, *Medium from irradiated human epithelial cells but not human fifibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells*. International Journal of Radiation Biology, 71(4), 421–427 (1997).

[12] E. I. Azzam, S. M. De Toledo, D. R. Spitz and J. B. Little, *Oxidative metabolism modulates signal transduction and micronucleus formation in bystander cells from alpha-particle-irradiated normal human fifibroblast cultures*. Cancer Research, 62(19),5436–5442 (2002).

[13] H. Matsumoto, M. Tomita, K. Otsuka, M. Hatashita, A New Paradigm in Radioadaptive Response Developing from Microbeam Research. Journal of Radiation Research, 50:Suppl., 67-69 (2009)

[14] C. Lepleux , A. Marie-Brasset , M. Temelie, M. Boulanger, É. Brotin, MB.Goldring , C.Hirtz , G.Varès , T.Nakajima, Y.Saintigny, D.Savu, F.Chevalier, *Bystander effectors of chondrosarcoma cells irradiated at different LET impair*

proliferation of chondrocytes. Journal of Cell Communication and Signaling, 13, 343–356 (2019).

[15] T. Landberg, J. Chavaudra, J. Dobbs, G. Hanks, K.-A. Johansson, T. Möller, J. Purdy, *Prescribing, Recording and Reporting Photon Beam Therapy*. International Commission on Radiation Units and Measurements, Prescribing, Recording and Reporting Photon Beam Therapy, ICRU Report 50, Bethesda, MD (1993).

[16] U.Amaldi, *Particle accelerators: from Big Bang Physics to Hadron Therapy*. Springer, Berlino (2015).

[17]V. Verma, C. Shah, J.C. Rwigema, T. Solberg, X. Zhu, CB Simone II. *Cost-comparativeness of proton versus photon therapy*. Chinese Clinical Oncology, 5(4) (2016).

[18]G. A. P. Cirrone, L. Manti, D. Margarone, G. Petringa, L. Giufrida, A. Minopoli, A. Picciotto, G. Russo, F. Cammarata, P. Pisciotta, F. M. Perozziello,

F. Romano, V. Marchese, G. Milluzzo, V. Scuderi, G. Cuttone & G. Korn, *First* experimental proof of Proton Boron Capture Therapy (PBCT) to enhance protontherapy efectiveness. Scientific Reports, 8(1141) (2018).

[19]G.A.P. Cirrone, G. Petringa, A. Attili, D. Chiappara, L.Manti, V. Bravatà, D. Margarone, M.Mazzocco, G. Cuttone. *Study of the discrepancy between analytical calculations and the observed biological effectiveness in proton boron capture therapy (PBCT)*. Radiation and Applications, 3, 147-151 (2018).

[20] B. Gustavino, S. Caciolli, L. Mancini, *Linea guida del test dei micronuclei in Vicia faba per la valutazione di effetti mutageni in acque dolci e sedimenti*.Rapporti ISTISAN, 13(27) (2013).