

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 ruolo della senescenza radioindotta in radioterapia

Relatori:
Prof. Lorenzo Manti

Candidato:
Chiara Imperato
Matricola N85001166

A.A. 2020 /2021

Indice

Introduzione	3
Capitolo 1: La radiazione in ambito terapeutico.....	5
1.1 Neoplasie	5
1.1.1 La carcinogenesi come processo multi-step	5
1.1.2 Il microambiente tumorale.....	6
1.2 Radioterapia e adroterapia.....	7
1.2.1 La finestra terapeutica	8
1.2.2 Radioresistenza tumorale	9
1.2.3 Il razionale radiobiofisico per l'adroterapia	11
1.2.3.1 Adroterapia con fasci di ioni ^{12}C	12
Capitolo 2: Il ruolo della senescenza in radioterapia	14
2.1 Il concetto di senescenza	16
2.2 Stress-Induced Premature Senescence (SIPS).....	18
2.2.1 Senescenza indotta da raggi X e ioni ^{12}C	21
Capitolo 3: Senescence-Associated Secretory Phenotype.....	24
3.1 Il fenotipo SASP.....	24
3.2 Implicazioni cliniche del SASP	25
3.2.1 Azione pro-tumorigenica del SASP	25
3.2.2 Azione anti-tumorigenica del SASP	26
Conclusioni	29
Bibliografia	31

Introduzione

Nel 2020, nel mondo, in uno degli anni più bui per l'uomo dalla seconda guerra mondiale, sono morte a causa della pandemia COVID-19 3,3 milioni di persone; sono 9,8 milioni, invece, quelle morte di cancro. Stando ai dati dell'Organizzazione Mondiale per la Sanità, per un totale di 183 stati, prima della pandemia, il cancro si è assestato al primo o al secondo posto come causa di morte prematura in 112 paesi e tra il terzo e il quarto in altri 23.

Sebbene questi dati risultino allarmanti, essi vanno confrontati con i tassi di guarigione, fondamentali per comprendere l'andamento di una malattia. In Italia, nel 2020, secondo quanto riportato dal report "I numeri del cancro in Italia 2020" dell'AIOM (Associazione Italiana Oncologia Medica) la percentuale di guariti è del 39% per individui di sesso maschile e del 52% per individui di sesso femminile. In generale, poi, si sta assistendo, per varie neoplasie, anche ad un significativo miglioramento del tasso di remissione e/o sopravvivenza a breve e medio termine.

Queste percentuali ottimistiche, per una malattia della quale, fino al secolo scorso, addirittura si aveva paura di pronunciare il nome, sono da inserire in un contesto di miglioramento dello stile di vita ma, soprattutto, di continua ricerca in campo biomedico. Ciò si è tradotto in una capacità di diagnosi sempre più precoce e, nel campo specifico del trattamento, in approcci terapeutici sempre più efficaci. Uno di questi è senz'altro rappresentato dalla radioterapia (RT), cui ormai oltre il 50% dei pazienti diagnosticati con cancro è sottoposto, da sola o in combinazione con la chirurgia e/o la chemioterapia. Il razionale alla base della RT bene esemplifica la duplice natura della radiazione ionizzante, ossia la sua capacità di inibire la proliferazione delle cellule tumorali causando danni citogenetici letali e, al contempo, la sua nota azione carcinogenica, proprio a causa di danni subletali potenzialmente trasmissibili alla progenie di cellule esposte. Il rischio di tumori secondari radioindotti costituisce una delle principali fonti di preoccupazione per gli effetti sui tessuti sani che sono inevitabilmente esposti durante la maggior parte dei trattamenti radioterapici.

Proprio nell'ambito della ricerca in RT, mirata ad una maggiore comprensione delle conseguenze complessive in termini sia di guarigione ma anche di riduzione dei rischi per il paziente, si inserisce il seguente lavoro di tesi, incentrato su uno dei principali effetti biologici legati all'interazione della materia cellulare con la radiazione ionizzante: la senescenza prematura radioindotta (*Stress Induced Premature Senescence* o SIPS).

La senescenza, di per sé, rappresenta il fato naturale cui in principio vanno incontro le cellule normali (non differenziate), che dopo un certo numero di cicli di duplicazione, perdono la capacità di proliferare pur rimanendo metabolicamente attive. Questo fenomeno, sin dalla sua scoperta, aprì nuovi orizzonti per la comprensione di alcuni dei meccanismi che favoriscono la progressione tumorale dal momento che le cellule tumorali riescono ad eludere tale senescenza replicativa, acquisendo un fenotipo che consente loro di duplicarsi in maniera indefinita.

Affianco a tale senescenza replicativa fisiologica, divenne poi evidente la capacità di vari agenti cito- e genotossici di indurla, fenomeno appunto denominato SIPS. In particolare, si è visto che la radiazione ionizzante è molto efficace, in determinate circostanze, ad indurre la SIPS,

particolarmente a dosi basse, nell'ordine di quelle impiegate nelle frazioni in cui si articola il trattamento radioterapico. Pertanto, ciò ha suscitato interesse a comprendere quali conseguenze potrebbe avere il presentarsi della SIPS in ambito clinico: in primo luogo, se molte delle cellule di un tessuto sano circostante il tumore andassero in senescenza prematuramente, ciò porterebbe ad un invecchiamento precoce di quel tessuto, che perderebbe o vedrebbe modificate le proprie funzioni fisiologiche. In secondo luogo, associato alla SIPS, è emerso negli ultimi anni il concetto di *Senescence-Associated Secretory Phenotype* (SASP), un fenotipo esibito dalle cellule andate prematuramente in senescenza. Esso consiste nella secrezione di vari fattori molecolari da parte di queste cellule soggette a SIPS, che sembrano avere effetti contrastanti (ed ancora poco definiti) su eventuali cellule tumorali adiacenti.

Infatti, se da un lato le cellule che mostrano il fenotipo SASP secernono vari fattori di crescita che sembrano incrementare la capacità di proliferazione delle cellule tumorali, e quindi potenzialmente minano l'efficacia del trattamento, dall'altro esistono evidenze secondo cui tali fattori potrebbero contrastare la migrazione delle cellule tumorali dal sito primario (metastasi), inibire la proliferazione delle cellule tumorali e richiamare cellule immunitarie sul sito del tumore. Tutti questi effetti sono ovviamente positivi dal punto di vista terapeutico.

In generale dunque, si comprende come una conoscenza approfondita del ruolo del fenotipo SASP sia fondamentale. Questo lavoro di tesi si propone dunque di fare il punto sullo stato dell'arte relativo al ruolo della SIPS e del conseguente fenotipo SASP, concentrandosi in particolar modo sulle implicazioni nell'ambito della radioterapia convenzionale (con fotoni/elettroni) e della radioterapia con fasci di particelle cariche pesanti, ossia l'adroterapia con ioni ^{12}C .

Un primo capitolo servirà da introduzione a diversi concetti di radiobiologia, partendo con una panoramica sulla biologia tumorale, nella quale verrà trattata la carcinogenesi e verrà posta l'attenzione sulla complessità biologica celata dietro la parola "tumore". La seconda parte del capitolo si soffermerà dunque sul presentare il razionale della radioterapia e di una delle sue più recenti e avanzate declinazioni, l'adroterapia, e sull'effettiva risposta di un tumore al trattamento con radiazioni: verranno analizzati i concetti di finestra terapeutica, punto di partenza per un qualsiasi trial clinico, e radioresistenza tumorale.

Il secondo capitolo sarà incentrato, più in dettaglio, sul concetto di senescenza, a partire da un'introduzione alla senescenza replicativa e alle sue conseguenze. È nel secondo capitolo che verrà trattato il concetto di SIPS, concentrandosi in modo particolare su come essa emerga in seguito ad esposizione a raggi X e ioni ^{12}C .

Il terzo capitolo, infine, sarà interamente dedicato al fenotipo SASP, facendo succintamente il punto sui sopracitati duplici effetti che questo comporta in ambito clinico.

Capitolo 1

La radiazione in ambito terapeutico

1.1 Neoplasie

In un individuo adulto la divisione cellulare avviene come risposta a fattori di crescita o ormoni, in equilibrio con la morte cellulare. Può tuttavia verificarsi che le cellule non rispondano a questo tipo di controlli e si dividano in maniera incontrollata, dando luogo, nei tessuti nei quali si trovano, alla formazione di *iperplasie*, masse cellulari anomale [1]. Tali masse cellulari possono talvolta andare incontro ad ulteriori modificazioni e perdere le proprie funzioni originarie; è in questi casi che si parla di *neoplasia*, o tumore.

In base al diverso modo in cui si sviluppano, le neoplasie sono distinte tra:

- Neoplasie benigne: non sono morfologicamente diverse da quelle del tessuto da cui si sono originate, hanno una crescita lenta e circoscritta alla zona di formazione.
- Neoplasie maligne: sono morfologicamente e funzionalmente diverse dalle cellule del tessuto originario e presentano strutture irregolari; tipico delle neoplasie maligne è il fenomeno della “invasività”, per il quale le cellule neoplastiche si infiltrano nei tessuti circostanti.

1.1.1 La carcinogenesi come processo multi-step

La carcinogenesi dipende, come si è detto, da un'errata risposta di una cellula ai vari fattori di controllo della divisione cellulare. Dal punto di vista genetico, errori di questo tipo sono generalmente riconducibili ad un'alterazione in almeno uno dei tre dei gruppi di geni noti per essere coinvolti nella genesi tumorale: oncogeni, oncosoppressori, geni di riparo [2].

Gli oncogeni sono adibiti alla sintesi di fattori di crescita per stimolare la divisione cellulare e, se danneggiati, portano alla divisione incontrollata. Al contrario, i geni oncosoppressori producono sostanze inibitorie della divisione cellulare e, di conseguenza, una loro inattivazione impedisce di bloccare cellule in cui si verificano alterazioni nella proliferazione. Alla classe dei geni di riparo appartengono geni con diverse funzioni, con lo scopo comune di mantenere l'integrità del DNA.

Le mutazioni genetiche possono avvenire in maniera del tutto spontanea a causa di errori nei processi cellulari o come conseguenza di agenti esterni, tra i quali, di maggior interesse fisico, la radiazione ionizzante. In ogni caso, una singola mutazione non è sufficiente a portare alla formazione di un tumore e ne occorrono diverse, anche distanziate temporalmente, affinché si verifichi la carcinogenesi - una attuale stima prevede che siano necessarie tra le 6 e le 12 mutazioni [2].

Un modello generale della carcinogenesi prevede una trattazione del fenomeno come processo multi-step [3], il primo dei quali, *l'iniziazione*, è rappresentato proprio dall'interazione con gli

agenti esterni e conseguente mutazione genetica; all'iniziazione segue la fase di *promozione* del tumore. In questa fase le cellule "iniziate", mediate da sostanze dette *promotori*, vanno incontro ad una proliferazione alterata. I promotori agiscono sulla cellula in vario modo, ad esempio, inibendo la trascrizione di geni di riparo o attivando enzimi catalizzatori di segnali di proliferazione [2]. Le sostanze che possono fare da promotori durante la carcinogenesi sono principalmente sostanze chimiche assorbite dall'ambiente esterno, ma anche farmaci o ormoni che vengono normalmente prescritti in ambito medico e che non risultano dannosi a meno che non interagiscano con le mutazioni dovute alla fase di iniziazione. In genere i promotori sono specifici per un determinato tipo di tessuto e interagiscono con le cellule in maniera indiretta, mediati da recettori.

Il terzo step della carcinogenesi è rappresentato dalla *trasformazione maligna*, ovvero dall'esibizione da parte della cellula pre-neoplastica del fenotipo tumorale. La trasformazione è diretta conseguenza della promozione e dipende dalla quantità di promotori presenti e dalla loro continuità nel tempo: se la presenza dei promotori nell'ambiente tissutale dovesse essere interrotta – ad esempio potrebbe essere terminato il periodo di assunzione di un farmaco- le cellule pre-neoplastiche resterebbero benigne [3]. In presenza della giusta dose di promotori, la proliferazione di cellule mutate è tale da aumentare il rischio di ulteriori modificazioni dovute ad errori a livello della sintesi, trascrizione e traduzione del DNA [2].

L'ultimo step della carcinogenesi è la *diffusione*: durante questa fase le cellule che mostrano il fenotipo maligno tumorale acquisiscono la capacità metastatica, diffondendosi al di fuori del tessuto di origine tramite vasi sanguigni o linfatici e dando vita a tumori secondari in zone diverse dell'organismo. Non sempre i tumori metastatici mantengono inalterato il fenotipo originario e proprio durante la diffusione si instaura l'eterogeneità cellulare tipica dei tumori maligni più aggressivi [3].

1.1.2 Il microambiente tumorale

Si è parlato di come alcuni tumori, talvolta, diffondendosi tramite vasi sanguigni siano in grado di sviluppare metastasi; i vasi sanguigni sono in realtà da considerarsi parte integrante del tumore stesso, che crea un proprio apparato vascolare a partire da quello del tessuto in cui si origina, tramite un meccanismo definito angiogenesi [4].

Sarebbe riduttivo quindi prendere in esame un tumore limitandosi a considerarne le sole cellule neoplastiche poiché queste sono strettamente correlate al cosiddetto microambiente tumorale, del quale fanno parte, oltre ai suddetti vasi sanguigni, anche leucociti, fibroblasti, e molecole extracellulari addette al *signaling*¹; tramite l'insieme di tutte queste componenti il tumore è in grado di modificare e regolare le funzioni del tessuto in cui si trova in modo da favorire la propria crescita e diffusione.

¹ Meccanismo tramite il quale la cellula trasmette e converte segnali per regolare il proprio comportamento e quello delle cellule circostanti. Generalmente il *signaling* è mediato da molecole extracellulari che si legano a delle specifiche proteine, i recettori, che si trovano sulla membrana cellulare. È il legame che fa sì che venga trasmesso il segnale alle proteine di signaling interne che a loro volta lo trasmettono alle zone della cellula cui esso riguarda [5].

Il sistema circolatorio del tumore, al crescere della massa, non è in realtà in grado di apportare il giusto contenuto di nutrienti e ciò che ne consegue è lo sviluppo di aree carenti di ossigeno, o ipossiche. L'ipossia, come verrà esplicitato nel seguito, è strettamente collegata ad una maggiore radioresistenza ed aggressività del tumore.

Si comprende, dunque, come un ruolo chiave nello studio dei meccanismi legati alla genesi e ai conseguenti, necessari, controllo ed eradicazione di un tumore sia svolto dal microambiente tumorale e dai fattori che ne influenzano lo sviluppo.

1.2 Radioterapia e adroterapia

La radioterapia è una delle principali tecniche antitumorali, insieme alla chemioterapia, e consiste nell'utilizzo delle radiazioni ionizzanti allo scopo di causare la morte riproduttiva delle cellule tumorali.

L'utilizzo della radiazione in ambito medico è quasi contemporaneo alla sua scoperta, avvenuta nel 1895 ad opera di William Röntgen: prima ancora di averne del tutto compreso i meccanismi fisici e biologici, nel 1896 il medico statunitense Emil Grubbe cominciò a sottoporre una sua paziente affetta da cancro al seno a trattamenti terapeutici con raggi X [6].

Seguirono, negli stessi anni, le scoperte di H.Becquerel e dei coniugi Curie sulla radioattività e nei primi anni del '900 furono pubblicati diversi studi a sostegno dell'utilizzo di raggi X per curare il tumore della pelle – a questo stadio, tuttavia, i benefici tratti dalle terapie erano esigui se confrontati con gli effetti collaterali che queste causavano [7].

Fu solo agli inizi degli anni '20 che si cominciò ad avere una conoscenza più approfondita delle diverse tipologie di radiazione e degli effetti biologici derivanti dall'interazione con la materia cellulare di ciascuna di esse.

Ad oggi, le radiazioni ionizzanti (RI) possono essere classificate in due categorie in base alla loro *qualità*, ovvero in base alla densità di ionizzazione della loro traccia. Distinguiamo quindi tra:

- Radiazioni sparsamente ionizzanti, caratterizzate da pochi fenomeni di ionizzazione distanziati spazio-temporalmente tra loro.
- Radiazioni densamente ionizzanti, tipicamente particelle cariche (ad eccezione degli elettroni e dei protoni ad alta energia), per le quali è possibile identificare una struttura di traccia caratterizzata da un elevato numero di fenomeni di ionizzazione per unità di percorso della particella stessa.

Nell'ambito della radioterapia tradizionale vengono utilizzate primariamente radiazioni sparsamente ionizzanti quali raggi X e γ , prodotti, rispettivamente, dall'accelerazione di elettroni (ad energie tra 200 keV e 25 MeV [2]) e dal decadimento di isotopi radioattivi, in particolar modo ^{60}Co .

Accanto a queste tecniche, negli ultimi decenni si è sviluppata una terapia che prevede l'utilizzo di fasci accelerati di adroni - particelle cariche pesanti, come protoni e neutroni- e ioni leggeri, come ad esempio ioni ^{12}C , che prende il nome di adroterapia.

L'idea di utilizzare fasci di particelle cariche per curare il cancro si deve al fisico americano Robert Wilson che, nel 1946, pubblicò un articolo dal titolo "Radiobiological use of fast protons" [8], nel quale illustrò le proprietà fisiche dei fasci di protoni e propose il loro utilizzo in ambito medico. Wilson intuì che i protoni ad alta energia prodotti dagli acceleratori, che proprio in quegli anni erano stati portati ad energie di 150 MeV (in particolare, Wilson lavorò al ciclotrone del Lawrence Berkeley Laboratory) [9], potessero essere utilizzati per trattare tumori solidi profondi grazie al loro profilo *dose-profondità*: la dose rilasciata al tessuto è inversamente proporzionale all'energia cinetica e, pertanto, il massimo della dose si ha immediatamente prima dell'arresto [2, 9]. Fu lo stesso Wilson ad indicare come altre particelle utilizzabili in radioterapia anche ioni He e ^{12}C [9].

In Italia, il primo centro per l'adroterapia è operativo a Pavia dal 2014, presso il Centro Nazionale di Adroterapia Oncologica (CNAO), in grado di trattare tumori solidi profondi sia con protoni che con ioni carbonio. Al CNAO i protoni sono accelerati fino a 230 MeV mentre gli ioni carbonio arrivano anche a 400 MeV/u.

L'adroterapia con soli protoni (detta anche protonterapia) è eseguita anche in altri due centri: il Centro di Protonterapia dell'Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari (APSS) di Trento e il Centro di AdroTerapia ed Applicazioni Nucleari Avanzate (CATANA) dell'INFN per i soli tumori oculari [10].

1.2.1 La finestra terapeutica

Come per ogni terapia in campo medico, nel trattare un paziente con la radioterapia è necessario effettuare un'accurata stima del bilanciamento tra i benefici ed i rischi che questa potrebbe apportare. Il metodo più utilizzato per interpretare gli effetti della radiazione a livello biologico è lo studio delle cosiddette curve dose-risposta. Tali curve mostrano l'andamento in funzione della dose di effetti quali la sopravvivenza cellulare. Questo è di particolare utilità in ambito clinico dal momento che lo scopo della radioterapia è azzerare la sopravvivenza delle cellule tumorali.

Diretta conseguenza delle curve di dose-risposta sono quelle che si riferiscono ai cosiddetti *tumour local control* e *normal tissue complication*. L'andamento di una curva che riporti l'effetto della radiazione su un determinato tessuto è di tipo sigmoideo (a "S"), con l'incidenza che tende a zero a bassissime dosi e che raggiunge rapidamente il 100% al crescere della dose (figura 1).

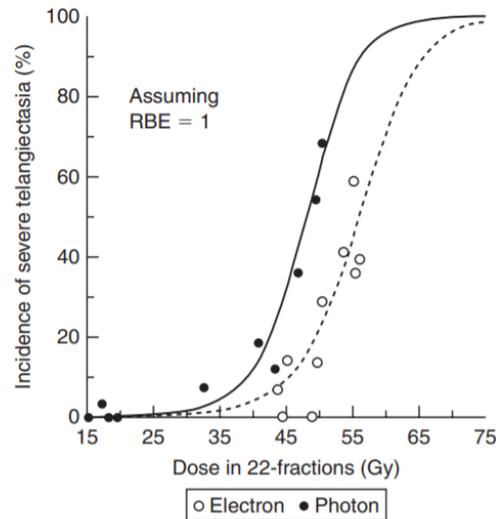


Figura 1 : Due curve dose-risposta che mostrano gli effetti della radiazione sul tessuto sano, dal tipico andamento ad "S", per fotoni ed elettroni [4]

Come detto, in radioterapia, per definire l'intervallo ottimale di dose che comporta le migliori probabilità di cura e le minori probabilità di effetti avversi al tessuto sano, si parla, più nello specifico, di *Tumor Control (TCP)*, vale a dire della perdita della *capacità clonogenica*² da parte delle cellule tumorali e della *Normal Tissue Complication Probability (NTCP)*, ovvero la probabilità che una specifica dose di radiazioni provochi danni al tessuto sano irraggiato [2, 4]. Fu dimostrato dal radiologo tedesco H. Holthusen che anche la curva dose-incidenza per un tessuto tumorale ha lo stesso andamento sigmoideo presente nei tessuti normali [4].

Definendo l'*indice o rapporto terapeutico (IT)* come il rapporto tra TCP e NTCP, si ottiene un valore per il beneficio atteso da un trattamento che preveda la somministrazione di una precisa dose di radiazione [4]: un IT superiore all'unità è il valore auspicabile di un buon trattamento terapeutico.

La TCP può essere studiata, su un gran numero di pazienti, in termini di una distribuzione Poissoniana del numero di cellule tumorali clonogeniche sopravvissute – la distribuzione di cellule morte dopo l'irraggiamento è, in effetti, una distribuzione casuale. Indicato con λ il numero medio di cellule sopravvissute, si ha allora $TCP = e^{-\lambda}$.

Un modello più recente, e più utilizzato, è il modello lineare-quadratico in base al quale si ottiene

$$TCP = e^{-N_0 e^{-\alpha D - \beta d D}}$$

dove N_0 indica il numero di cellule clonogeniche prima dell'irraggiamento e il secondo termine esponenziale rappresenta la sopravvivenza post-irraggiamento con una dose D somministrata in un certo numero di frazioni, ciascuna con dose "d".

² Sono dette clonogeniche le cellule in grado di proliferare indefinitamente per produrre una colonia. Per studiare la sopravvivenza clonogenica si fa riferimento alle curve dose-risposta derivanti dal cosiddetto *saggio clonogenico*, un test che mira a valutare la sopravvivenza cellulare basandosi sul conteggio delle colonie formate dalle cellule post-irraggiamento. [2]

Ponendo le curve dose-risposta sia per il tumore che per il tessuto sano sullo stesso grafico si ottiene la cosiddetta “*finestra terapeutica*”, corrispondente all’area tra le curve (figura 2). Più è larga la finestra, più è sicuro il trattamento ipotizzato.

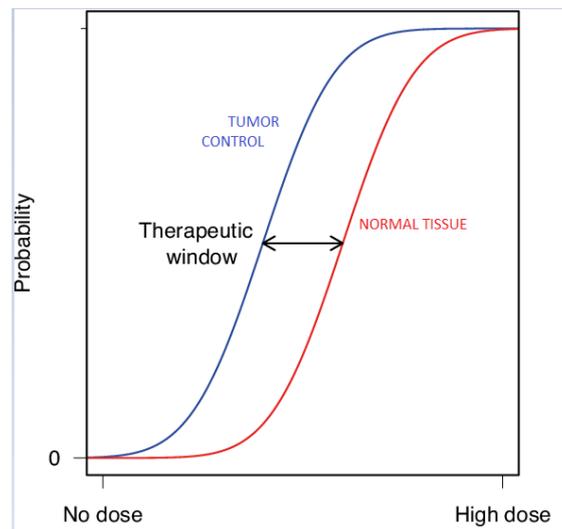


Figura 2: Rappresentazione del concetto di finestra terapeutica in radioterapia [11]

1.2.2 Radioresistenza tumorale

Uno dei principali problemi legati al trattamento del tumore tramite radioterapia è la radioresistenza che questo presenta. Si è accennato in precedenza al ruolo chiave delle cellule tumorali ipossiche proprio in questo contesto e una prima evidenza la si può ottenere già a partire dal confronto di curve di sopravvivenza cellulare estrapolate in contesti aerobi e ipossici (figura 3).

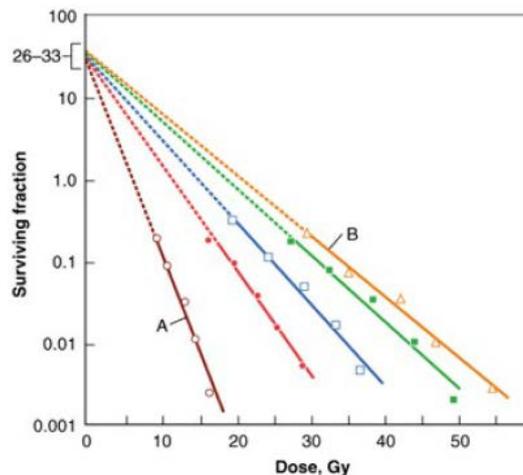


Figura 3 : Curve di sopravvivenza per cellule di criceto cinese in contesti aerobi (A) o ipossici a concentrazioni di ossigeno decrescenti fino alla curva B ($pO_2 = 0.0075$ mmHg) [2]

Il motivo principale della maggior radioresistenza delle cellule ipossiche sta nella cosiddetta “*Oxygen Fixation Hypothesis*”. Tale ipotesi prevede che in presenza di ossigeno molecolare, i danni

causati dalla radiazione vengano resi permanenti, ossia “fissati”: l’assorbimento della radiazione ionizzante, in particolare fotoni, e quindi radiazione sparsamente ionizzante, causa la produzione di elettroni; questi, a loro volta, portano alla creazione di coppie di ioni a causa della radiolisi dell’acqua, l’elemento maggiormente presente a livello cellulare. Gli ioni prodotti hanno vita breve (circa 10^{-10} s) e producono radicali liberi, molecole fortemente reattive in quanto presentano un elettrone di valenza.

A questo punto, in presenza di ossigeno, i radicali liberi ($R\cdot$) creati dalla radiazione potrebbero interagire con il DNA per formare il radicale $RO_2\cdot$, un perossido organico che comporta cambiamenti chimici alla molecola di DNA che non sarebbe più riducibile nella sua forma pura [2]. In assenza di ossigeno, quindi, molti dei danni indotti da radiazione non vengono generati, e quindi fissati.

Per quantificare la maggior radioresistenza esibita dalle cellule in condizioni di ipossia avviene tramite l’*Oxygen Enhancement Ratio* (OER), definito come il rapporto tra le dosi da somministrare in contesti ipossici e aerobi per ottenere lo stesso effetto biologico.

Una peculiarità dell’OER è che esso varia a seconda della fase del ciclo cellulare in cui le cellule si trovano al momento dell’irraggiamento – si parla, infatti, di radioresistenza intrinseca.

Per cellule ad alto tasso proliferativo *in vitro* si ha una radioresistenza maggiore nella fase S, cui è associato un OER di 2,8 mentre nelle fasi G2 e G1, più radiosensibili, l’OER scende a 2,3-2,5 [2].

Un ulteriore fattore che influenza l’OER è il *Linear Energy Transfer* (LET), misurato in keV/ μ m e definito come “la quantità di energia trasferita dalla radiazione lungo la traccia per unità di lunghezza” – in formula: $LET = \frac{dE}{dl}$

All’aumentare del LET, l’OER decresce drasticamente, fino a diventare unitario per radiazioni con un LET > 100 keV/ μ m [2].

Radiazioni con LET di questo tipo sono quelle tipicamente usate in adroterapia (ioni carbonio), da cui si evince il crescente interesse per questo tipo di approccio alla cura di un tumore.

1.2.3 Il razionale radiobiofisico per l’adroterapia

Dal punto di vista fisico, il vantaggio dell’adroterapia rispetto alla normale terapia con i fotoni deriva dalla diversa interazione delle particelle cariche con il tessuto biologico: mentre i fotoni rilasciano il massimo della dose in prossimità della superficie di ingresso, l’energia rilasciata da una particella carica segue la legge di Bethe Bloch³ [4], dalla quale discende che il rilascio di energia è inversamente proporzionale alla velocità della particella. Quindi, esso è minimo in ingresso dove la velocità è massima, dopodiché, al diminuire della velocità a causa delle interazioni coulombiane

³ $\frac{dE}{\rho dx} = \frac{4\pi N_A r^2 m c^2 Z z^2}{\beta^2 A} \cdot [\ln \left(\frac{2m c^2 \beta^2}{I(1-\beta^2)} \right) - \beta^2]$

con gli elettroni orbitali, aumenta con la profondità fino a raggiungere un picco, denominato picco di Bragg, a fine range (figura 4).

Questo si traduce in un profilo inverso dose-profondità delineato dalla curva di Bragg. L'adroterapia, pertanto, sfrutta questa fondamentale differenza rispetto all'interazione dei fotoni con la materia in modo da far coincidere il Picco con il tessuto tumorale, così da minimizzare il rilascio di energia nei tessuti sani circostanti. Inoltre, nessun rilascio di dose avviene oltre il picco di Bragg, risparmiando eventuali organi a rischio. Strettamente in ambito terapeutico, inoltre, si parla di Spread Out Bragg Peak (SOBP): il picco di Bragg viene ripetuto modulando il fascio di particelle in profondità ed energia, tramite un filtro rotante con settori di vario spessore [2]; le curve così ottenute sono sommate tra loro ottenendo il "plateau" che è in grado di ricoprire l'intera zona di interesse, assicurando la somministrazione di un'uguale dose a tutto il volume del tumore (figura 4).

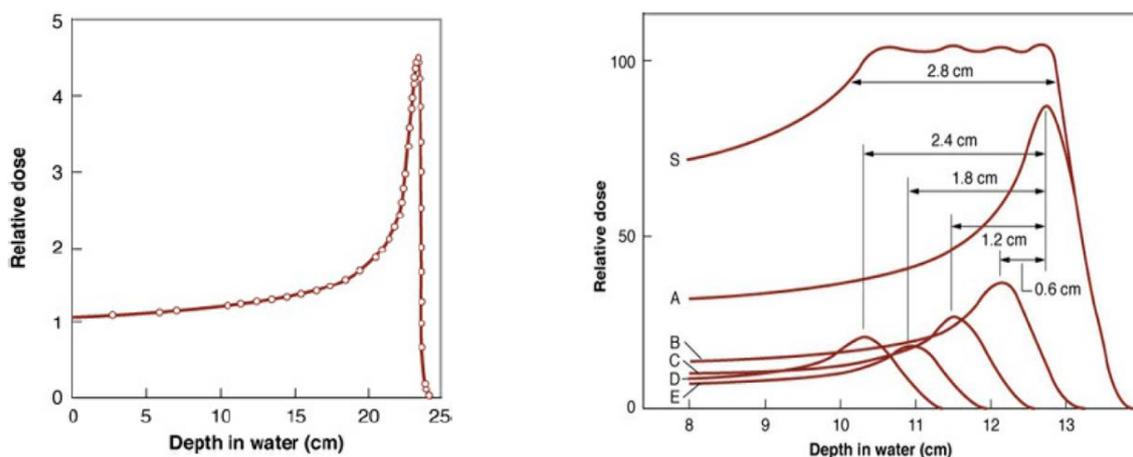


Figura 4 : Picco di Bragg per un fascio di protoni di 187 MeV (sinistra) e SOBP (curva S) per un fascio di protoni: la curva A è il fascio primario a 160 MeV, le curve B-E sono ottenute modulando profondità ed energia (destra). [4]

Il razionale radiobiologico è invece legato al concetto di *Relative Biological Effectiveness* (RBE), definito dal National Bureau of Standards degli USA come “il rapporto tra una dose campione necessaria a causare un determinato tipo di danno, e la dose necessaria della radiazione in esame per causare lo stesso tipo di danno”.

Generalmente la dose presa come riferimento è quella di un fascio di raggi X a 250 kV e pertanto si ottiene per la RBE di una radiazione “r” la seguente formula: $RBE = \frac{D_{250}}{D_r}$.

L'RBE delle particelle usate in radioterapia ha valori che vanno tra 1 e 3 [12]. I protoni usati in radioterapia hanno un RBE pari a 1.1 e non rappresentano quindi un notevole miglioramento rispetto alla radioterapia tradizionale. Diversamente, il valore 2.5 viene raggiunto dai fasci di ioni Carbonio, dei quali si discuterà in dettaglio nel prossimo paragrafo.

1.2.3.1 Adroterapia con fasci di ioni ^{12}C

L'interesse per gli ioni carbonio in radioterapia nacque verso la metà degli anni '70 quando, al Lawrence Berkeley Laboratory cominciarono ad essere trattati i primi casi di tumore sfruttando le

proprietà degli ioni pesanti. Gli ioni carbonio sono radiazioni ad alto LET e il loro RBE è massimo nella zona del picco di Bragg. Come mostra la figura 5, la sopravvivenza cellulare in cellule di criceto cinese irradiate con ioni carbonio a 11 MeV/n (corrispondenti al picco di Bragg) è notevolmente inferiore rispetto a quella per le stesse cellule irradiate con ioni carbonio a 266 MeV/n (zona del plateau iniziale) o con raggi X.

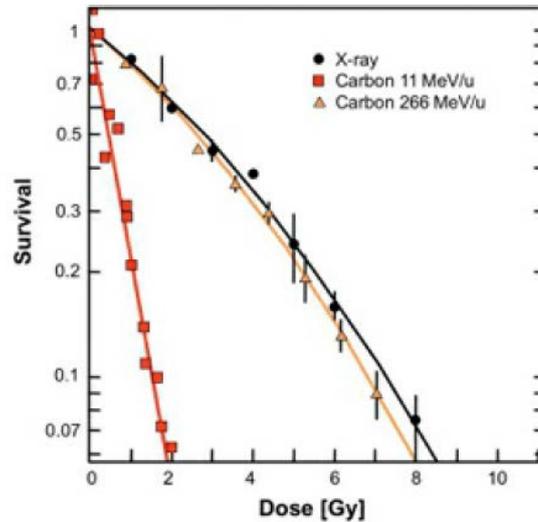


Figura 5: Sopravvivenza cellulare in cellule di criceto cinese irradiate con ioni carbonio a 11 MeV/n e 266 MeV/n e con Raggi X [2]

Oltre il picco di Bragg, se confrontati con i protoni, gli ioni carbonio hanno una minore penombra laterale, definita come la regione ai bordi del fascio di particelle lungo la quale il rateo di dose cambia rapidamente, in funzione della distanza dall'asse centrale del fascio. La penombra è un parametro importante da considerare nel limitare l'effetto della radiazione sui tessuti sani ed è preferibile che essa sia la più piccola possibile.

Per tutti i motivi sopracitati, quindi, gli ioni carbonio sono visti come gli ioni "ottimali" da utilizzare per i tumori radioresistenti.

Capitolo 2

Il ruolo della senescenza in radioterapia

2.1 Il concetto di senescenza

Il termine *senescenza* venne impiegato per la prima volta da Hayflick e Moorhead nel 1961 per riportare la loro osservazione in uno studio su cellule diploidi umane *in vitro*, secondo il quale queste avevano mostrato una capacità replicativa finita [13]. Prima di allora, si era convinti che, una coltura cellulare, a patto che fossero fornite condizioni ottimali di crescita in vitro, si potesse mantenere indefinitamente. Questa scoperta ebbe implicazioni importanti anche per la comprensione delle caratteristiche di proliferazione delle cellule tumorali, oltre che per gettare le basi per la definizione del concetto di senescenza.

Ad oggi, l'arresto da parte di una cellula della capacità di proliferare indefinitamente è detto *senescenza replicativa*, derivato dal grande progresso nella comprensione dei meccanismi che ne sono alla base. Se si prendono come esempio i fibroblasti umani usati da Hayflick e Moorhead, cellule del tessuto connettivo addette alla secrezione di fattori di crescita per lo sviluppo della matrice cellulare, essi sono in grado di duplicarsi fino a 50 volte [14] prima di entrare in senescenza, un valore noto, appunto, come *limite di Hayflick*.

Si ritiene che fisiologicamente la senescenza nei fibroblasti sia associata al continuo accorciamento dei telomeri, ripetizioni in tandem di una sequenza di nucleotidi TTAGGG, costituenti la parte finale dei cromosomi. I telomeri non vengono duplicati con il resto del filamento di DNA ma la loro duplicazione avviene ad opera di uno specifico enzima, la telomerasi. La maggior parte delle cellule somatiche umane presenta in realtà assenza o deficienza di telomerasi [5]; ciò comporta che i telomeri si accorcino sempre più ad ogni duplicazione, fenomeno noto come *end replication problem*, fino al raggiungimento di una lunghezza critica di circa 5kb (kilobase) [14]: al di sopra della lunghezza critica, la parte finale dei telomeri si ripiega su sé stessa a formare il cosiddetto "t-loop", una sorta di cappuccio protettivo per le estremità del cromosoma (figura 6) che altrimenti, in quanto non appaiate, sarebbero riconosciute come danni al DNA, cosa che avviene dunque al raggiungimento della lunghezza minima [5]. Questo funge da "trigger" per segnalare alla cellula che non dovrà più dividersi.

Le cellule senescenti sono caratterizzate da una specifica morfologia consistente in un generale appiattimento e allargamento del citoplasma, e acquisiscono tre caratteristiche fondamentali [14], la prima delle quali è l'arresto permanente della crescita: esse sono ferme nella fase "gap" G1 del ciclo cellulare senza possibilità di passare alla fase S, la fase effettiva in cui avviene la duplicazione del DNA.

Una seconda caratteristica è che, sebbene ferme dal punto di vista della proliferazione, le cellule in senescenza mantengono attivo il loro metabolismo, continuando a produrre fattori di crescita. Non è raro, tuttavia, il caso in cui i fattori di crescita prodotti dalle cellule senescenti siano differenziati da

quelli che le stesse cellule produrrebbero se fossero ancora normali cellule esprimenti capacità proliferativa. Riprendendo l'esempio dei fibroblasti umani, i fattori di crescita che questi producono una volta entrati in senescenza sono enzimi che degradano la matrice cellulare, con un ruolo opposto, dunque, rispetto a quelli secreti normalmente [14].

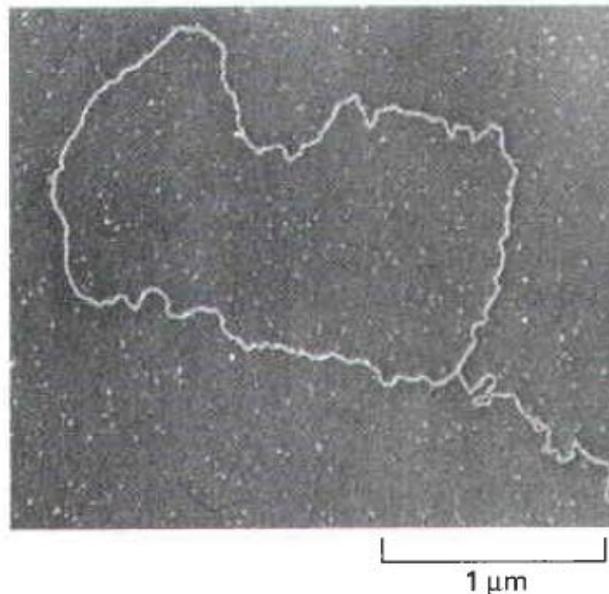


Figura 6: Il t-loop di un cromosoma [5]

Infine, una volta raggiunto lo stato di senescenza, seppur in modo controintuitivo, le cellule acquisiscono una maggior resistenza alla morte programmata, meglio nota come apoptosi [15]; i meccanismi che si celano dietro questo fenomeno non sono ancora del tutto chiari.

Primariamente, la senescenza è supposta essere un vero e proprio “meccanismo di difesa contro il tumore” [16], una sorta di barriera attivata dall’organismo che, nell’interrompere la proliferazione di una cellula, evita così di trasmettere il danno da questa accumulato a livello del DNA alle successive generazioni – si è già fatto accenno alla peculiarità delle cellule tumorali di proliferare indefinitamente, il che sembra essere in accordo con questa visione della senescenza. Ancora a supporto di questa ipotesi è la crescente evidenza sperimentale che le cellule siano mantenute nel loro stato senescente da specifiche proteine con funzione di difesa [17, 18]: i telomeri privi di t-loop, infatti, vengono considerati dei danni al DNA, i cosiddetti *Double Strand Breaks (DSB)*, rotture della doppia elica categorizzate il più delle volte come letali.

Quando il danno è tale da non poter essere riparato, mediante il *DNA Damage Response (DDR)*, l’insieme di specifici meccanismi di riparo messi in atto dalla cellula qualora si trovi in presenza di danni al DNA, vengono attivati i geni responsabili dei diversi *pathways*⁴ da far intraprendere alla

⁴ Principalmente quelli legati all’apoptosi o alla senescenza

cellula: tra questi ci sono i geni p16, pRB e p21 (oncosoppressori che regolano i checkpoint di passaggio tra la fase G1 e la fase S) [17], che si trovano mutati nella maggior parte dei tumori e, soprattutto, p53, noto come “guardiano del genoma” per via del suo ruolo fondamentale nell’attivazione e controllo dei meccanismi di riparo del DNA, oltre che nell’induzione del meccanismo dell’apoptosi.

Altre importanti proteine prodotte tipicamente dalle cellule senescenti sono l’enzima (SA)- β -galattosidasi e l’istone γ -H2AX, richiamato sui cosiddetti *DSB-foci*, i siti del danno alla doppia elica [17]. Tali proteine sono in genere utilizzate come biomarcatori per la senescenza: (SA)- β -galattosidasi è un enzima esclusivo delle cellule senescenti mentre γ -H2AX è la forma fosforilata dell’istone H2AX, formata ogni qual volta sia presente un DSB, ed è normalmente utilizzato proprio come biomarcatore di questo tipo di danno. La particolarità delle cellule senescenti sorge proprio nel momento in cui, studiando la presenza di foci di DSB tramite specifici anticorpi per γ -H2AX, questi appaiono “permanenti”: nonostante essi siano normalmente transienti, diminuendo in numero man mano che il danno viene riparato, sono presenti anche per mesi quando una cellula si trova in uno stato di senescenza [17].

La senescenza è dunque la naturale risposta delle cellule a fattori intrinseci alla cellula stessa, il più importante dei quali sembra essere, quindi, l’accorciamento progressivo della lunghezza telomerica. Le cellule tumorali non giungono mai alla senescenza replicativa poiché presentano una permanente espressione dell’enzima telomerasi, con conseguente mantenimento di una lunghezza telomerica mediamente costante, che quindi contribuisce a segnalare alla cellula di continuare la duplicazione; esistono, tuttavia, numerosi fattori estrinseci in grado di portare le cellule allo stato di senescenza, secondo meccanismi ancora non ben definiti e con conseguenze non sempre immediatamente chiare nel contesto degli effetti sul tessuto/organo in cui tale senescenza “imprevista”, o prematura, si verifica, come discusso nel corso del prossimo paragrafo.

2.2 Stress-Induced Premature Senescence (SIPS)

Vari fattori esterni possono far sì che la cellula entri in senescenza; poiché questo tipo di senescenza viene indotto quando la cellula è andata incontro ad un numero di duplicazioni inferiore rispetto a quello dettato dall’accorciamento dei telomeri, essa viene definita “prematura” mentre tutte le cause scatenanti vengono inglobate nel termine “stress”, che va a riferirsi, appunto, all’induzione di alterazioni della normale fisiologia cellulare; si parla dunque, propriamente, di *Stress-Induced Premature Senescence* (SIPS). Per distinguere questo tipo di danno da quelli che pure si traducono nella perdita da parte della cellula della sua capacità di proliferare, la cosiddetta morte riproduttiva o clonogenica, spesso questa tipologia di danno è detta subletale, anche se di fatto, la cellula entrata prematuramente in senescenza è a tutti gli effetti “morta” dal punto di vista riproduttivo. Nel seguito, la trattazione sarà focalizzata sulla senescenza indotta dalle radiazioni ionizzanti e, più in dettaglio, dalle radiazioni ionizzanti di uso in ambito terapeutico, ma è necessario sottolineare che sono anche altre le possibili cause della senescenza prematuramente indotta, tra le quali lo stress

ossidativo, gli agenti chemioterapeutici, raggi UV e l'esposizione a contaminanti chimici, primariamente rame [18] ed altri metalli pesanti (figura 7).

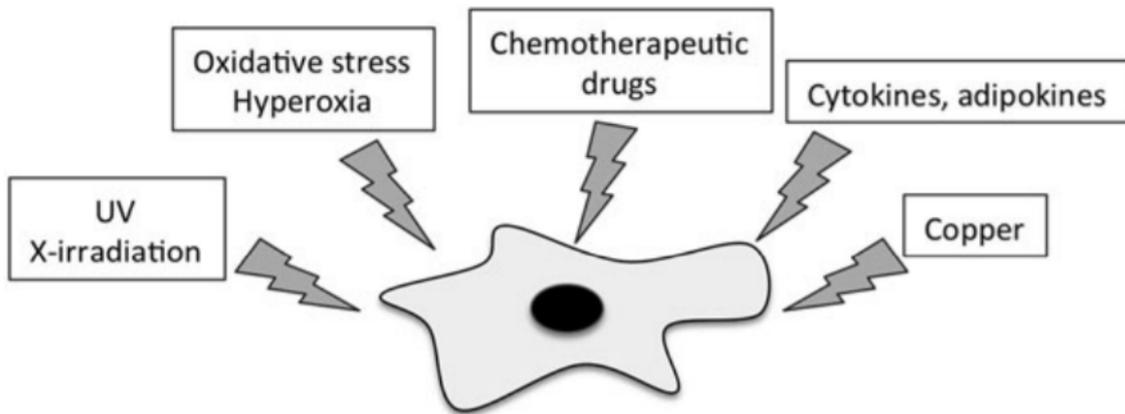


Figura 7: Varie cause della SIPS. Tra esse sono evidenziate l'irraggiamento con raggi X o UV, lo stress ossidativo, l'esposizione ad agenti contaminanti chimici [18]

Il modo in cui le radiazioni ionizzanti inducono la senescenza nelle cellule non coinvolge, almeno secondo la maggior parte degli studi in letteratura, la telomerasi e non sembra comportare un accorciamento "accelerato" o prematuro dei telomeri (figura 8) [19]; tuttavia, le proteine p16, p21 e p53 sono ugualmente implicate nella SIPS quanto nella normale senescenza replicativa.

Se dunque, come appare, è possibile irraggiare le cellule per indurre in esse la SIPS, allora è necessario investigare più nel dettaglio il suo ruolo e le sue conseguenze in ambito clinico per poter ottimizzare i trattamenti.

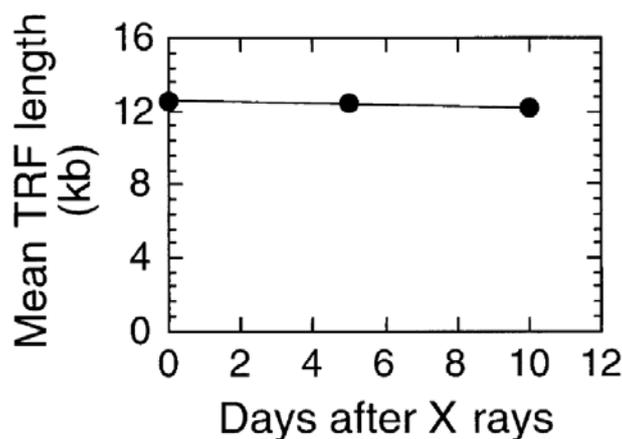


Figura 8: Lunghezza media dei telomeri post irraggiamento con 12 Gy di raggi X. Si nota come la lunghezza non sia significativamente influenzata dall'irraggiamento. [19]

In generale, si nota una prima differenza tra la SIPS indotta da radiazione (talvolta detta IRIS - *Ionizing Radiation-Induced Senescence*) e la senescenza replicativa, per quel che riguarda la fase di arresto: se le cellule in senescenza replicativa si arrestano nella fase G1 del ciclo cellulare (figura 9), il danno al DNA indotto dalle radiazioni fa sì che si arrestino, invece, preferenzialmente nella fase G2 [17]. Il dato sorprendente riguardo le cellule indotte in senescenza arrestate nella fase G2 è che queste presentano diversi fattori molecolari che normalmente vengono prodotti dalla cellula solo nella fase G1 e che sono propri dello stesso fenotipo senescente, quali, ad esempio la Ciclina D1, una proteina che regola il percorso della cellula nella fase G1 fino all'ingresso nella fase S [17].

La fase G2 ha una durata profondamente influenzata dalla risposta al danno radioindotto, con le cellule più radioresistenti che vi permangono più a lungo. L'arresto di una cellula nella fase G2 è strettamente connesso all'azione della p53 che, come sottolineato in precedenza, è scarsamente espressa o mutata nelle cellule tumorali; questa mutazione nel genotipo fa sì che, dopo un breve blocco della fase G2, il DDR non riesca ad avviare i pathways apoptotici e le cellule tumorali, da senescenti, possano così entrare nuovamente nella fase mitotica del ciclo cellulare e ricominciare a duplicarsi [17].

La risposta che diversi studi hanno trovato alla presenza di questo tipo di enzimi regolatori è il cosiddetto *Mitotic Bypass*, un vero e proprio "salto" dalla fase G2 direttamente alla fase G1, senza passare per la fase M di duplicazione [17, 21]. Il bypass della mitosi è mediato da p53 e p21, la cui azione congiunta fa sì che si abbia un'inibizione nell'azione di proteine regolatrici della mitosi [17]. Il bypass della mitosi sarebbe dunque visto come condizione necessaria e sufficiente affinché le cellule entrino in senescenza.

Cellule che sovra-esprimono la p53 sono dunque più suscettibili alla SIPS e risulta necessario indagare sui meccanismi che portano all'espressione o meno di p53 in seguito ad irraggiamento;

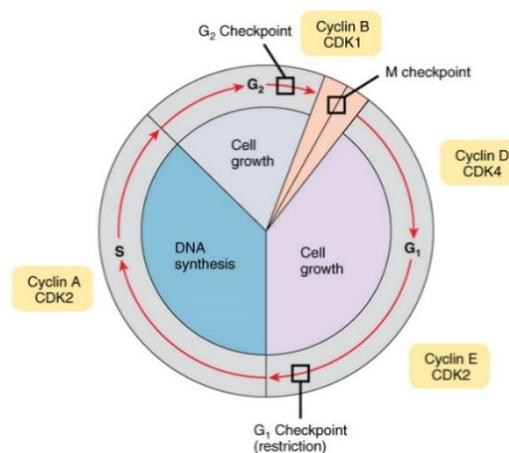


Figura 9: Il ciclo cellulare con evidenziati i relativi checkpoint.

La senescenza replicativa arresta le cellule nella fase G1, quella indotta prematuramente da agenti esogeni nella fase G2. [22]

2.2.1 Senescenza indotta da raggi X e ioni Carbonio

Una delle sfide maggiori per la radioterapia è da sempre la massimizzazione del danno inflitto alle cellule tumorali senza che si abbia anche un aumento di danno collaterale alle cellule normali irraggiate. In altri termini, allargare la finestra terapeutica il più possibile.

Essendo i raggi X e gli ioni Carbonio tra le radiazioni utilizzate, rispettivamente, nella radioterapia e nell'adroterapia, è pertanto, crescente l'interesse riguardo la loro capacità di indurre senescenza sia nelle cellule tumorali che in quelle sane. Soprattutto, evidenze esistono in supporto di un'azione differenziale nell'induzione della SIPS fra queste due radiazioni di differente qualità (LET).

Secondo uno studio in collaborazione tra la University of the Chinese Academy of Sciences di Pechino e l'Institute of Modern Physics di Lanzhou (Cina) [21] tutte le tre diverse linee cellulari esaminate (fibroblasti umani MRC5, melanoma maligno A375 e melanoma uveale 92-1) hanno cominciato a manifestare la presenza del biomarcatore SA- β -Galattosidasi nei giorni successivi all'irraggiamento con 10 Gy di raggi X [21], confermando la comparsa del fenotipo senescente sia nelle cellule sane che in quelle tumorali (figura 10).

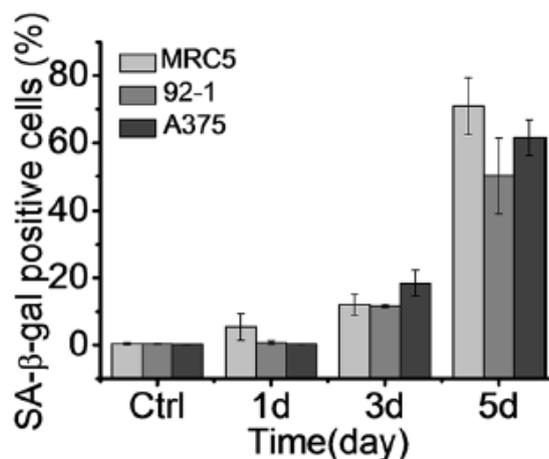


Figura 10: Numero di cellule esprimenti SA- β -Gal in funzione dei giorni trascorsi dall'irraggiamento per tre linee cellulari (fibroblasti umani MRC5, melanoma maligno A375 e melanoma uveale 92-1) studiate nell'ambito dell'esperimento di Zhang et al. [21]

La conferma sperimentale che le cellule tumorali vadano in senescenza prematura ha reso necessari approfondimenti relativi alla dose e alla qualità della radiazione, nonché alle linee cellulari stesse; il razionale radioterapeutico prevede, infatti, irraggiamento con diverse dosi di radiazione in base alla zona nella quale il tumore si manifesta e allo stadio al quale si presenta quando il paziente viene sottoposto al trattamento [2].

Nell'esperimento di Zhang et al. [21] si è proceduto ad irraggiare cellule di melanoma uveale 92-1 con un'uguale dose, pari a 10 Gy, di raggi X e Ioni ^{12}C , confermando che entrambi i tipi di radiazione inducono senescenza, la cui comparsa è evidenziata sempre dalla presenza di SA- β -Galattosidasi (figura 11).

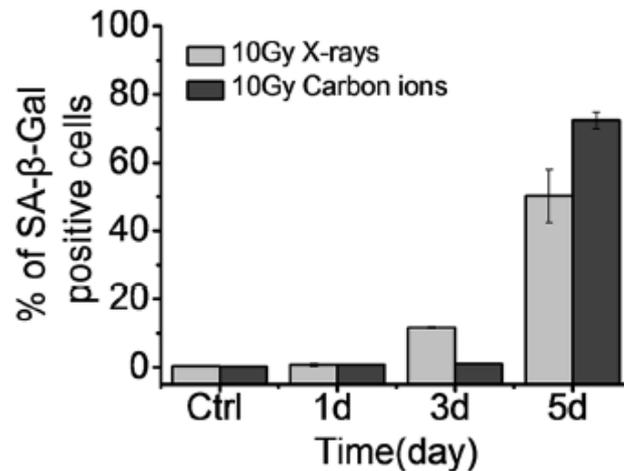


Figura 11: Numero di cellule esprimenti SA-β-Gal in funzione dei giorni trascorsi dall'irraggiamento con 10 Gy di raggi X e Ioni Carbonio nell'esperimento di Zhang et al. [21]

Per quel che riguarda la dipendenza della SIPS dalla dose, in generale, è stato provato sperimentalmente che, sia nelle cellule normali che in quelle tumorali, l'efficacia nell'indurre la SIPS aumenta linearmente con la dose fino a raggiungere un livello di saturazione ad una dose di soglia, diversa in base alla specifica radiazione [19, 21] (figura 12).

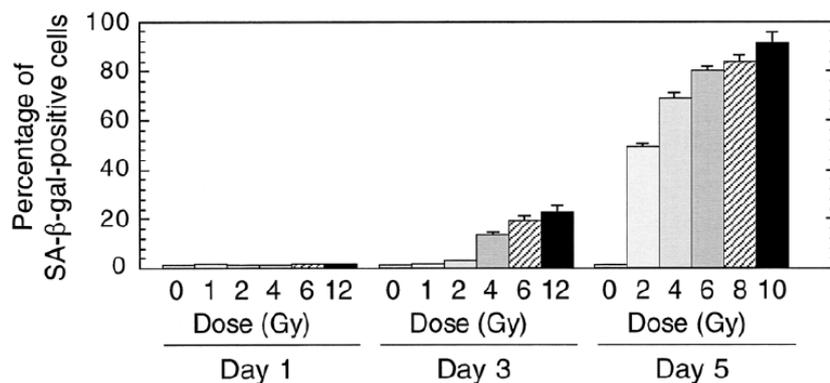


Figura 12: Percentuale di cellule embrionali umane normali esprimenti SA-β-Galattosidasi al variare della dose di raggi X somministrata [19]

La SIPS risulta quindi più efficacemente indotta ad alte dosi, e comunque già a livelli significativi a dosi relativamente basse, come si diceva, ossia confrontabili con quelle del frazionamento in radioterapia. A parità di dose, essa si ritrova maggiormente presente tra le cellule irraggiate con ioni ^{12}C anziché con raggi X, evidenziando oltre che una dipendenza dalla dose anche una dipendenza dal LET (figura 13). Quindi, l'elevato RBE degli ioni, tipicamente osservato nell'induzione della morte cellulare, si ripropone anche per la senescenza, così che la dose oltre la quale la percentuale di cellule senescenti raggiunge il suo massimo sia inferiore per gli ioni ^{12}C rispetto ai raggi X [21]:

il danno procurato da radiazioni ad alto LET, e quindi ad elevata densità di eventi di ionizzazione, è infatti più difficile da riparare, portando alla formazione di DSB che possono creare dei veri e propri *cluster* [2]. L'aumento di danno clusterizzato incrementa la difficoltà per il DDR di riparare la doppia elica e, oltre appunto a causare una maggiore letalità cellulare, può favorire anche la scelta di optare per l'ingresso della cellula danneggiata in senescenza [2, 21].

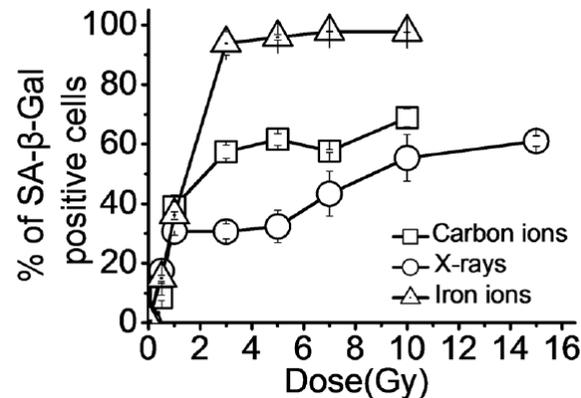


Figura 13: Cellule di melanoma Uveale 92-1 esprimenti SA-β-Galattosidasi in funzione di diverse dosi di raggi X, Ioni Carbonio e Ioni Ferro. La dose di soglia si attesta a 10 Gy per i raggi X e 5 Gy per gli ioni C [21]

In vivo, si è trovato che i pazienti trattati per il cancro alla prostata o al seno mostrano un aumento nell'espressione dei geni p16, p21 e p53 [20], a conferma che la SIPS può essere indotta non solo nelle cellule normali ma anche in quelle tumorali; queste, infatti, nonostante per definizione evitino di intraprendere spontaneamente i pathways senescenti, li mantengono comunque intatti, rendendo possibile una loro attivazione se mediata, ad esempio, dalla radiazione ionizzante [23].

In particolare, la risposta delle cellule tumorali relativamente alla p53, che come visto influenza la permanenza delle cellule nella fase G2 del ciclo cellulare, sembra variare in base al tipo di tumore e alla radiazione utilizzata [17].

Sempre l'esperimento di Zhang et al. [21] ha individuato una correlazione tra la SIPS e l'attivazione persistente del gene p53 nelle cellule di melanoma uveale 92-1, irraggiate con 10 Gy di raggi X e, successivamente, con 0,5 Gy sia di ioni ^{12}C che di raggi X. Nel primo caso, si è notata la presenza di *foci* per le proteine 53BP, attivate dal gene p53 sui siti del danno, fino a 5 giorni post irraggiamento. A basse dosi, invece, si è verificata una diminuzione nel numero di *foci*, conferma che i danni indotti da radiazioni di dosi maggiori sono necessari per l'induzione della SIPS (figura 14).

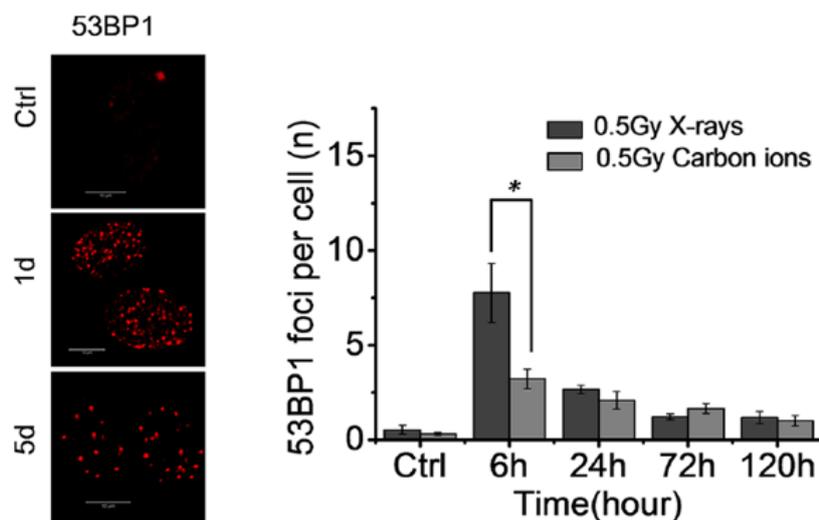


Figura 14: A sinistra, foci persistenti per p53 fino a 5 giorni dopo l'irraggiamento con 10 Gy di raggi X. A destra, la diminuzione nel numero di foci in cellule irraggiate con 0.5 Gy di raggi X e Ioni carbonio [21]

È crescente, inoltre, l'evidenza sperimentale che i trattamenti di radioterapia possano indurre le cellule tumorali ad andare in senescenza, con una dipendenza, così come trovato *in vitro*, sia dal LET che dalla dose: basse dosi (fino a 10 Gy) di radiazione inducono primariamente la senescenza, mentre dosi più alte portano le cellule direttamente alla morte per apoptosi [23]. Laddove, dunque, non si somministrano dosi tali da riuscire ad uccidere le cellule tumorali, end-point prediletto di un qualsiasi trattamento di radioterapia, è comunque possibile indurle in senescenza: un trattamento che preveda una rimozione mirata delle cellule senescenti in combinazione con la radioterapia potrebbe essere un nuovo metodo efficace nell'eradicazione dei tumori⁵ [24].

Diversi studi hanno riportato che *in vivo* la SIPS viene indotta da raggi X e/o ioni Carbonio, oltre che nel melanoma uveale, anche in tumore pancreatico, cancro al seno, carcinoma del colon-retto, tumore alla prostata e glioblastoma [15, 16, 21, 25]. Si comprende, allora, come essa sia una componente inevitabile e fondamentale di cui tener conto nell'approccio terapeutico al trattamento di un tumore, almeno per le sopracitate tipologie.

Tuttavia, se, da un lato, indurre le cellule tumorali ad andare in senescenza porta ad un enorme vantaggio poiché blocca la progressione tumorale, dall'altro, la SIPS nelle cellule normali può indurre malattie cardiovascolari e neurodegenerative che sono di norma presenti maggiormente negli individui anziani [15].

Inoltre, diversi sono gli studi recenti che dimostrano come la SIPS indotta nelle cellule tumorali abbia un carattere transiente. In questo senso, emblematico è l'esperimento di Xu et al. [26] nel quale è stato dimostrato che cellule di NSCLC (*Non-Small Cell Lung Cancer*), irraggiate per

⁵ Diversi studi recenti sono indirizzati alla ricerca di un metodo per l'eliminazione mirata delle cellule senescenti, facilmente riconoscibili per la loro morfologia e i geni che esse esprimono. Due possibili metodi sono stati individuati: utilizzo di specifici anticorpi per fattori molecolari tipici delle cellule senescenti o lo sviluppo di molecole addette ad ucciderle in maniera selettiva [24]

trattamenti di radioterapia con raggi X, riprendono la loro capacità proliferativa entro una settimana dall'irraggiamento. La rilevanza di questi studi è fondamentale, poiché sottolinea come, laddove si volesse sfruttare la SIPS per agire in maniera diretta sull'eliminazione delle cellule tumorali, si dovrebbe tener conto anche della finestra temporale.

Il ruolo cruciale della SIPS viene ancor meglio compreso se si investiga una delle principali conseguenze del fenotipo senescente, un fenomeno meglio noto come SASP (*Senescence-Associated Secretory Phenotype*): le cellule normali che si trovino in vicinanza del tessuto tumorale e in cui sia stata indotta la senescenza prematura, già a basse dosi [27], oltre che fungere da barriera contro il tumore, agiscono come una vera e propria “arma a doppio taglio”, producendo fattori che sembrerebbero alimentare la proliferazione e/o l'aggressione tumorale.

Sul SASP e sul duale ruolo che questo ha in ambito strettamente clinico sarà concentrato il prossimo capitolo.

Capitolo 3

Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP)

3.1 Il fenotipo SASP

Il crescente interesse verso il ruolo della senescenza in radioterapia non si limita alla possibilità di indurre la SIPS nelle cellule tumorali e alla conseguente ricerca di tecniche di rimozione mirata delle cellule senescenti; l'attenzione, negli ultimi anni, si è fortemente rivolta alle cellule normali contigue al, o presenti nel tessuto tumorale, che inevitabilmente vengono irraggiate durante i trattamenti e delle quali è necessario tener conto.

Tali cellule, infatti, entrate in senescenza, mostrano, sia in coltura che *in vivo*, un particolare fenotipo, unico e differenziato per ogni cellula [28, 29], noto come *Senescence-Associated Secretory Phenotype* (SASP). Il SASP consiste di oltre 40 fattori molecolari secreti dalle cellule senescenti, che riescono a modificare il microambiente tumorale attivando i recettori delle cellule vicine [15]; nello specifico, ad esso sembrano essere legati effetti discordanti ed ancora poco definiti per quel che riguarda l'interazione con le vicine cellule tumorali: talvolta, i fattori prodotti inibiscono la proliferazione tumorale, talvolta la stimolano.

Tra i fattori principali del SASP si trovano, infatti, le *interleuchine*, proteine secrete a livello del sistema immunitario per regolare le funzioni di altre cellule dell'organismo, altri fattori molecolari in grado di stimolare il sistema immunitario a mettere in atto *pathways* anti-tumorigenici, ma anche *chemochine* e *metalloproteasi*, proteine coinvolte, rispettivamente, nell'angiogenesi e nella metastatizzazione [15, 28]. (Figura 15)

Il fenomeno, caratterizzato dall'apparente duplice e contrastante azione del fenotipo senescente, unitamente alla maggior presenza di cellule senescenti in un organismo anziano rispetto ad uno giovane, sarebbe spiegato nel contesto della cosiddetta *pleiotropia antagonistica*, una delle più accreditate teorie evuzionistiche, secondo la quale un processo biologico può essere benefico o dannoso a seconda dell'età dell'organismo [30].

Comprendere quali siano gli effetti derivati da questa duplice azione delle cellule normali senescenti (o divenute tali prematuramente per effetto dell'azione di un agente esterno quale la radiazione ionizzante in un contesto clinico) in un tessuto tumorale è dunque essenziale, sia ai fini della prognosi che del successivo piano terapeutico [20].

In aggiunta a ciò, in virtù del continuo aumento dei tassi di guarigione dalle malattie neoplastiche (in Italia, al 2020, pari al 63% per le donne e al 54% per gli uomini [29]), è crescente l'attenzione

anche sugli effetti collaterali che il fenotipo SASP può avere sul lungo termine nei pazienti guariti, ovvero sulle conseguenze che i fattori molecolari coinvolti hanno sull'organismo e che si manifestano solo dopo il termine delle terapie, in particolare causando o accelerando il progredire di malattie cardiovascolari, polmonari e neurodegenerative, nonché, in alcuni casi, la comparsa di tumori secondari [15, 20].

Nel seguito, i due aspetti del SASP saranno trattati separatamente, al fine di chiarire, sulla base delle evidenze presenti attualmente in letteratura, i punti cruciali che, di volta in volta, lo rendono una preziosa risorsa da sfruttare nella ricerca di una cura, o un ulteriore fattore avverso da sopprimere.

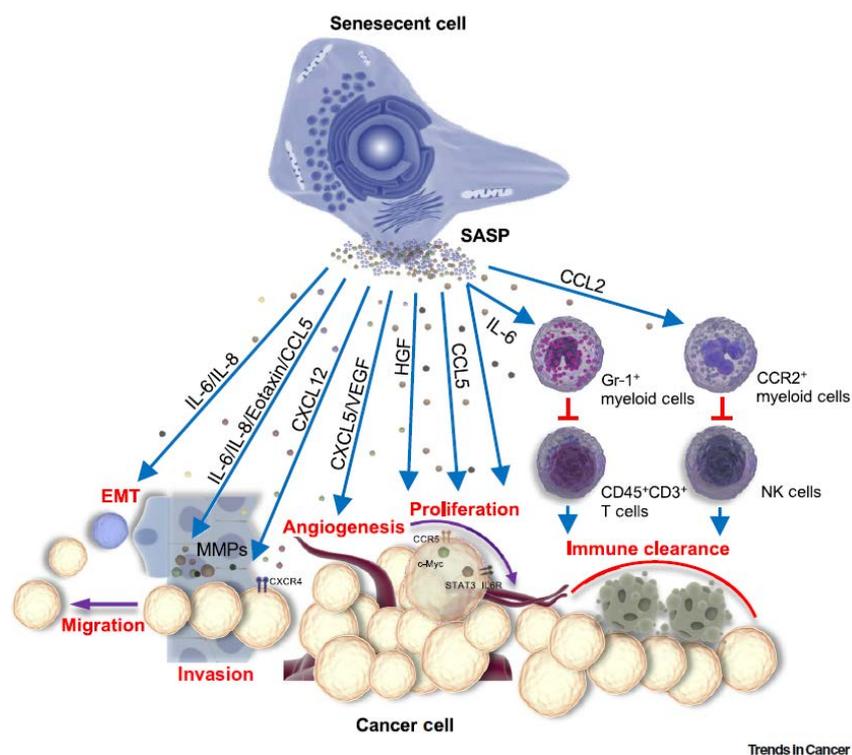


Figura 15: I diversi fattori del SASP e i loro effetti. IL-6, IL-8 sono interleuchine, coinvolte nella metastatizzazione e nella risposta immunitaria; CXCL12, CCL5, CCL2 sono chemochine, promotrici dell'angiogenesi e dell'aumento della capacità proliferativa [15]

3.2 Implicazioni cliniche del SASP

3.2.1 Azione pro-tumorigenica del SASP

Alcuni dei fattori del SASP secreti dalle cellule normali senescenti sono in grado di promuovere la proliferazione delle cellule tumorali e di aumentare l'aggressività di un tumore, favorendone l'invasività e lo sviluppo di metastasi in altri tessuti [15].

Un'importante evidenza dell'azione del SASP in merito all'aumento della proliferazione tumorale si deve all'esperimento di Coppè et al. [31] in merito al fenotipo SASP in fibroblasti normali umani. In tale esperimento si è trovato che, quando posti in co-cultura⁶ con cellule umane di cancro al seno, i fibroblasti senescenti inducevano in esse proprietà metastatiche, prima assenti, aumentandone quindi l'aggressività. Ciò è stato attribuito alla capacità dei fattori SASP di disintegrare la matrice extracellulare, rendendo più facile l'invasione nel tessuto da parte delle cellule tumorali [31].

Esperimenti successivi, tra i quali esemplare è quello di Krtolica et al [32], hanno confermato, impiegando co-culture di cellule epiteliali precancerose e fibroblasti senescenti, l'aumento della capacità proliferativa delle cellule pre-cancerose; nello stesso esperimento si è inoltre mostrato come tale aumento non si verifica, invece, se i fibroblasti senescenti vengono posti in co-cultura con cellule normali. (figura 16)

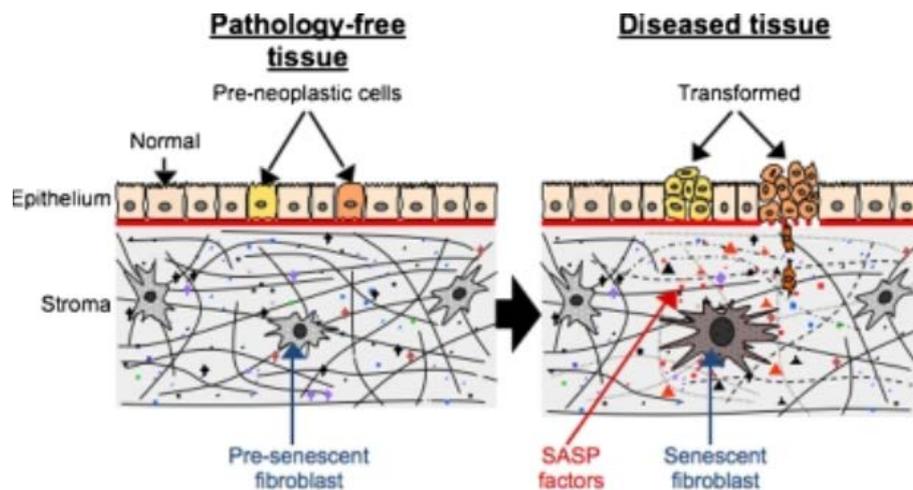


Figura 16: Azione di fibroblasti senescenti sulle cellule precancerose del tessuto epiteliale [33]

Fortemente implicate nel ruolo pro-tumorigenico del fenotipo SASP, sono le interleuchine IL-6 e IL-8, fattori infiammatori presenti nella maggior parte delle cellule irraggiate nelle quali si sviluppi la SIPS [15]; esse richiamano le cellule immunitarie nel tessuto tumorale, sito del danno. A questo punto, tali cellule immunitarie, che di norma eliminano dal tessuto le cellule che presentano oncogeni, creano un ambiente infiammatorio persistente, step essenziale per la tumorigenesi [3, 34].

3.2.2 Azione anti-tumorigenica del SASP

Le interleuchine IL-15, insieme a IL-6 e IL-8, che come detto hanno un ruolo primario nell'azione pro-tumorigenica del SASP, sono anche, tuttavia, delle componenti fondamentali della difesa dell'organismo contro il tumore [15, 34].

⁶ Coltura cellulare nella quale vengono messe in contatto tra loro due o più linee cellulari diverse mediante l'ausilio di opportuni supporti per la crescita cellulare provisti di setti separati da membrane porose in modo da permettere la comunicazione intercellulare fra le colture fisicamente separate.

Esse, infatti, richiamano sul sito del tessuto tumorale le cosiddette cellule *NK* (*Natural Killer*), linfociti in grado di identificare ed uccidere le cellule tumorali in maniera *naturale*, ovvero senza mediazione di altre molecole [34]. (figura 17)

Le chemochine CCL2 e CCR2 sono invece responsabili della risposta immunitaria: i macrofagi da loro richiamati sono infatti in grado di eliminare le cellule senescenti stesse, contribuendo alla barriera antitumorale messa in atto dall'organismo [34].

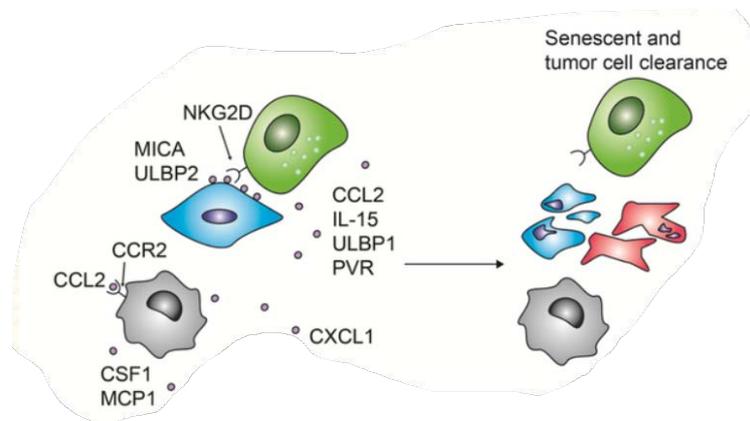


Figura 17: Il ruolo immunitario dei fattori SASP (pallini viola) i quali richiamano le cellule NK (in verde) e le cellule immunitarie (in grigio) portando alla distruzione delle cellule tumorali (in rosso) e di quelle senescenti (in blu). [34]

Altri recenti studi [15, 35] sul ruolo delle cellule senescenti nell'ambito della terapia sono incentrati sull'utilizzo dei cosiddetti *senolitici*, agenti specifici per la rimozione mirata delle sole cellule senescenti. Tale strategia permetterebbe di sfruttare la senescenza nella sua fondamentale funzione immunitaria e, nel contempo, di eliminarne gli effetti pro-tumorigenici, aumentando l'efficacia dei trattamenti. Una prima difficoltà in questo tipo di esperimenti, tuttavia, risiede nella specificità degli agenti senolitici, i quali riconoscono le cellule senescenti in base a delle determinate proteine, la cui assenza in una cellula tumorale, seppur senescente, la renderebbe immune alla loro azione [15]. L'approccio diretto tramite senolitici, inoltre, prevede una differenziazione nel trattamento in base all'età del paziente [15].

È noto che, in genere, i pazienti anziani rispondono meno alle terapie rispetto ai pazienti più giovani [15, 36]. Un individuo anziano, che presenta già cellule andate in senescenza in maniera naturale, accumula ulteriori cellule divenute prematuramente senescenti in risposta alla radioterapia.

La presenza di cellule senescenti, come descritto in precedenza, crea nei tessuti un ambiente particolarmente infiammatorio, associato a malattie altamente degenerative quali il morbo di Alzheimer o l'aterosclerosi [36]. L'ipotesi di un utilizzo di senolitici pre-terapia porterebbe, allora, ad una riduzione preventiva del numero di tali cellule, così da meglio preparare l'organismo a sostenere i trattamenti terapeutici, con una riduzione nei tempi di degenza ospedaliera post-operazione e un abbassamento nei tassi di mortalità in generale [37]. La ricerca per ottimizzare i trattamenti di radioterapia in questa direzione, seppur nel suo stato ancora embrionale, ha portato ai primi risultati *in vitro* su modelli di roditore: in un esperimento di Demaria et al. [38], all'interno di una collaborazione tra il Buck Institute for Research on Aging (California) e l'University Medical

Center di Groningen (Paesi Bassi), si è mostrato come l'utilizzo di senolitici abbia ridotto l'impatto negativo collaterale della radioterapia, riducendo l'affaticamento e migliorando le funzioni cardiache nei soggetti⁷.

In un esperimento di Xu et al. dell'Health Department della University of Connecticut [39] si è invece mostrato come l'induzione della senescenza in soggetti giovani in seguito all'irraggiamento abbia portato, al contrario, ad un peggioramento progressivo nei diversi parametri di controllo (resistenza allo sforzo, velocità di camminata etc.) di individui di roditori nei quali sono state iniettate $1 \cdot 10^6$ cellule senescenti, rispetto ad individui iniettati con altrettante cellule di controllo (figura 18).

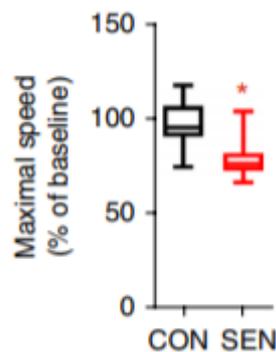


Figura 18: Riduzione nella velocità massima di camminata, rispetto allo standard di riferimento, negli individui iniettati con cellule senescenti rispetto agli individui di controllo nell'esperimento di Xu et al. [39]

Ciò che si evince è che, quindi, in un paziente più giovane che presenta uno standard di riferimento di cellule senescenti più basso rispetto ad un paziente anziano [15], l'utilizzo di senolitici dovrebbe avvenire non in maniera preventiva ma, piuttosto, in una fase successiva alla terapia, per eliminare le cellule entrate in senescenza prematuramente e ridurre l'invecchiamento precoce del tessuto.

⁷ Sono disponibili studi sull'uomo, sia *in vivo* che *in vitro*, in riferimento a trattamenti di chemioterapia (Vedi Wyld et al. [37] e Demaria et al. [38])

Conclusioni

La senescenza cellulare è, per definizione, il naturale punto di arrivo della vita delle normali cellule di un organismo che abbiano esaurito il proprio potenziale proliferativo; essa, quindi, funge da barriera antitumorigenica dell'organismo.

Le cellule tumorali, che per definizione mantengono intatta la loro capacità di proliferare in maniera indefinita, aggirano la senescenza e permangono nel ciclo cellulare continuando a dividersi.

Tra i principali metodi utilizzati nella terapia antitumorale vi è la radiazione ionizzante tramite la radioterapia: se la radioterapia con fotoni è infatti ancora la modalità radioterapica più diffusa, il crescente aumento nell'impiego dell'adroterapia, ossia radioterapia con fasci accelerati di particelle cariche, è dovuto alla maggior precisione balistica derivata dalla curva di Bragg; in particolare, l'uso degli ioni carbonio si giustifica alla luce della loro maggior efficacia nell'inattivazione cellulare.

L'impiego della radiazione ionizzante, qualora non porti alla morte riproduttiva della cellula, che resta l'obiettivo primario di un qualsiasi trattamento terapeutico, può talvolta indurre le cellule ad andare in senescenza, fenomeno noto come *Stress-Induced Premature Senescence*, o SIPS.

Obiettivo specifico di questo elaborato di tesi è stato dunque quello di evidenziare le caratteristiche comuni alle cellule che vadano incontro alla SIPS e di presentare un'analisi delle differenze tra la SIPS e la normale senescenza replicativa; utilizzando alcuni tra gli articoli più rilevanti presenti nella letteratura scientifica al riguardo, si è posta l'attenzione su vari aspetti: si è evidenziato come questa non dipenda dalla lunghezza telomerica, a differenza di quanto osservato nel caso della senescenza replicativa, ed è stata dunque condotta una trattazione sul rapporto tra la SIPS e i diversi tipi di radiazione, nello specifico raggi X e ioni ^{12}C .

Tramite il saggio del biomarcatore SA- β -galattosidasi, i diversi esperimenti riportati hanno evidenziato che entrambi i tipi di radiazione sono in grado di indurre la SIPS, in maniera dipendente dalle dosi e dal LET, con le radiazioni a più alto LET (ioni ^{12}C) che, a parità di dosi, risultano maggiormente efficaci.

La SIPS viene indotta sia nelle cellule tumorali che nelle vicine cellule normali. Su queste ultime si è dunque incentrata la parte finale del lavoro, focalizzata primariamente sul particolare fenotipo che esse mostrano, il *Senescence-Associated Secretory Phenotype* (SASP). Tale fenotipo è oggetto delle più recenti ricerche riguardanti la senescenza cellulare radioindotta riportate in letteratura, a causa della duplice e contrastante azione che esso pare presentare.

Il SASP consiste in una molteplicità di fattori molecolari secreti dalle cellule che presentino la SIPS, ed è uno dei più grandi interrogativi attualmente posti dalla radiobiologia clinica. Se, da un lato, la senescenza è un'ottima alleata nella lotta al tumore, interrompendo la proliferazione di cellule danneggiate, precancerose o già nello stato neoplastico, dall'altro, tramite i fattori molecolari

del SASP, la presenza di cellule senescenti nei pressi del tessuto tumorale diventa, talvolta, un ulteriore ostacolo al successo del trattamento.

Sono stati riportati i contrastanti effetti che i principali fattori SASP sembrano avere nel momento in cui si trovano ad interagire con le cellule tumorali e, raccogliendo i dati più recentemente pubblicati in letteratura, si è posta l'attenzione sui loro effetti pro- e anti-tumorigenici. I dati riportati sono, tuttavia, riferiti a poche tipologie di tumore e non è possibile stabilire se tale comportamento delle cellule senescenti sia valido in assoluto, il che costituisce un importante spunto per il progresso della ricerca in quest'ambito. È stato inoltre fatto accenno ad un recente oggetto di studio nel tentativo di implementazione dei trattamenti anti-tumorali, la terapia senolitica, un possibile strumento da combinare ai tradizionali metodi di terapia per diminuire gli effetti collaterali dovuti alle cellule senescenti, eliminandole in maniera mirata dal tessuto.

Nonostante molto resti ancora da chiarire sul fenomeno della SIPS e, ancor più, del relativo fenotipo SASP, è già evidente come sia necessario continuare ad indirizzare l'interesse verso quest'ambito, approfondendo la comparsa e il ruolo dei diversi fattori del SASP relativamente al tipo di tumore e di agente scatenante della senescenza (radiazione ionizzante, agenti chemioterapici etc.), affinché si possa sempre progredire nel trattamento di una patologia che, ancora oggi, resta la più tragicamente diffusa a livello mondiale, con l'obiettivo di privarla, seppur gradualmente, di tale nefasto primato.

BIBLIOGRAFIA

- [1] D. Sadava, H. Craig Heller, G. H. Orians, W. K. Purves, D. M. In: Hillis, \Biologia.BLU - Il corpo umano", Zanichelli; 2019.
- [2] Hall E.J., Giacca A., Radiobiology for the Radiologist, Lippincott Williams & Wilkins editors, 8th edition, 2018.
- [3] Weston A, Harris C.C., Multistage Carcinogenesis. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker; 2003.
- [4] M. Joiner, A. van der Kogel. Basic Clinical Radiobiology (4th ed.), Hodder Arnold editors; 2009.
- [5] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff et al. Molecular Biology of The Cell, 5th edition. Garland Science; 2007.
- [6] Gianfaldoni S., Gianfaldoni R., Wollina U., Lotti J., Tchernev G., Lotti T. An Overview on Radiotherapy: From Its History to Its Current Applications in Dermatology. Open Access Maced J. Med. Sci. 2017. 5(4):521- 525.
- [7] Lederman M. The early history of radiotherapy: 1895–1939. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 1981. 7: 639–648.
- [8] Wilson R. R. Radiological use of fast protons. Radiology. 1946. 47:487–91.
- [9] Endo M., Robert. R. Wilson (1914–2000): the first scientist to propose particle therapy—use of particle beam for cancer treatment. Radiol. Phys. Technol. 2018. 11, 1–6.
- [10] Scienza Per Tutti – INFN. <https://scienzapertutti.infn.it/6-adroterapia-in-italia>. Accessed 16 July 2021.
- [11] Lens, E. Respiratory motion management for radiotherapy of pancreatic cancer patients. PhD thesis. University of Amsterdam. 2017. 1: 9-17.
- [12] International Atomic Energy Agency. Relative Biological Effectiveness in Ion Beam Therapy, Tech. Rep. Series. 2008. No. 461.
- [13] Hayflick L., Moorhead P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp. Cell Res. 1961. 25: 585–621
- [14] Suzuki M., Boothman D.A. Stress-induced premature senescence (SIPS)-influence of SIPS on radiotherapy. J. Radiat. Res. 2008
- [15] Whang B., Kholi J., Demaria M. Senescent Cells in Cancer Therapy: Friends or Foes? Cell, 1996. Vol. 84: 497–500.

- [16] Campisi J. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism, *Trends in Cell Biology*, 2001. Volume 11, Supplement 1: S27-S31.
- [17] Li M., You L., Xue J., Lu Y. Ionizing Radiation-Induced Cellular Senescence in Normal, Non-transformed Cells and the Involved DNA Damage Response: A Mini Review. *Front. Pharmacol.* 2018. 9:522.
- [18] Rattan S.I.S., Hayflick L. *Cellular Ageing and Replicative Senescence*. Springer, Cham; 2016.
- [19] Suzuki K., Ojima M., Kodama S., Watanabe M. Radiation-induced DNA damage and delayed induced genomic instability. *Oncogene*. 2003. 22(45):6988-93
- [20] Shay W.J., Roninson I.B. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene*. 2004. 23: 2919-2933.
- [21] Zhang X., Ye C., Sun F., Wei W., Hu B., Wang J. Both Complexity and Location of DNA Damage Contribute to Cellular Senescence Induced by Ionizing Radiation. *PLoS ONE*. 2016. 11(5): e0155752
- [22] Cell cycle checkpoint. In Wikipedia, The Free Encyclopedia. https://en.wikipedia.org/wiki/Cell_cycle_checkpoint. Accessed July 3, 2021
- [23] Chen Z., Cao K., Xia Y., Li Y., Hou Y., Wang L., Li L., Chang L., Li W. Cellular senescence in ionizing radiation (Review). *Oncol Rep*. 2019. 42(3):883-894.
- [24] Tchkonja T., Zhu Y., van Deursen J., Campisi J., Kirkland J.L. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J Clin Invest*. 2013. 123(3):966-972.
- [25] Huart, C., Chen, J. W., Le Calvé, B., Michiels, C., Wéra, A.C. Could Protons and Carbon Ions Be the Silver Bullets Against Pancreatic Cancer? *Int. J. Mol. Sci.* 2020. 21: 47-67.
- [26] Xu J., Patel N.H., Saleh T., Cudjoe E. K., Alotaibi M., Wu Y., Lima S., Hawkrigde A.M., Gewirtz D.A. Differential Radiation Sensitivity in p53 Wild-Type and p53-Deficient Tumor Cells Associated with Senescence but not Apoptosis or (Nonprotective) Autophagy. *Radiat. Res*. 2018.
- [27] Sabin R.J., Anderson R.M. Cellular Senescence - its role in cancer and the response to ionizing radiation. *Genome Integr*. 2011. 2(1):7.
- [28] Cytokine. In Wikipedia, The Free Encyclopedia. <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Cytokine&oldid=1036159824>, Accessed 29 June, 2021
- [29] Fondazione AIOM, <https://www.fondazioneaiom.it/dove-mi-curo/i-numeri-del-cancro-in-italia-2020/>. Accessed 29 June, 2021.
- [30] Rodier F., Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J. Cell Biol*. 2011. 192(4):547-556.
- [31] Coppé J.P., Patil C.K., Rodier F., Sun Y., Muñoz D.P., Goldstein J., et al. Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLoS Biol*. 2008. 6(12):2853-68.
- [32] Krtolica A., Parrinello S., Lockett S., Desprez P.Y., Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2001. 98(21):12072-7.

- [33] Davalos A.R., Coppe J.P., Campisi J., Desprez P.Y. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2010. 29(2):273-283.
- [34] Lau L., David G. Pro- and anti-tumorigenic functions of the senescence-associated secretory phenotype. *Expert Opin. Ther. Targets.* 2019. 23(12):1041-1051.
- [35] Wang, C., Vegna, S., Jin, H. et al. Inducing and exploiting vulnerabilities for the treatment of liver cancer. *Nature.* 2019. 574, 268–272.
- [36] Wyld, L., Bellantuono, I., Tchkonja, T., Morgan, J., Turner, O., Foss, F., George, J., Danson, S., & Kirkland, J. L. Senescence and Cancer: A Review of Clinical Implications of Senescence and Senotherapies. *Cancers.* 2020. 12(8): 21-34.
- [37] Freund, A., Orjalo, A. V., Desprez, P. Y., & Campisi, J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends in molecular medicine.* 2010. 16(5), 238–246.
- [38] Demaria, M., O'Leary, M. N., Chang, J. et al. Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse. *Cancer discovery.* 2017. 7(2), 165–176.
- [39] Xu, M., Pirtskhalava, T., Farr, J.N. et al. Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. 2018. *Nat. Med.* 24, 1246–1256.